

氏名	宮 頭		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10347 号		
学位授与年月	令和 4 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ <i>Sulf1</i> の成獣マウス脳における発現と高次脳機能における役割		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	松本 正幸
副査	筑波大学教授	博士（医学）	武井 陽介
副査	筑波大学講師	博士（医学）	井出 政行
副査	筑波大学助教	博士（医学）	丹羽 康貴

## 論文の内容の要旨

宮頭氏の博士学位論文は、ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1* の成獣マウス脳における発現と高次脳機能における役割について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1*、*Sulf2* はヘパラン硫酸糖鎖の 6 位の硫酸基を加水分解することによりヘパラン硫酸糖鎖とシグナル分子の相互作用を変化させ、それにより生体シグナルを調節する。マウスの中樞神経では *Sulf1*、*Sulf2* 両遺伝子の欠損により発生期の皮質脊髄路形成に異常が生じること、ショウジョウバエの神経筋接合部では *Sulf1* の発現低下あるいは欠損によりシナプス伝達に変化することなどが報告されているが、*Sulf1*、*Sulf2* の高次脳機能調節における役割は明らかでない。著者は、まず成獣マウス脳における *Sulf1*、*Sulf2* の発現パターンを詳細に調べ、次いで *Sulf1* コンディショナルノックアウトマウスの行動表現型を解析することで、*Sulf1* の高次脳機能における役割を解明することを本研究の目的としている。

著者は、C57BL/6N 遺伝背景の野生型成獣マウス脳における *Sulf1*、*Sulf2* の発現を、in situ ハイブリダイゼーション法により解析している。*Sulf1* とドパミン受容体の共局在を解析するため、*Sulf1* 遺伝子座に *LacZ* 遺伝子が挿入され、かつ *Drd1* ないし *Drd2* プロモーター制御下に黄色蛍光タンパク質遺伝子 (YFP) を発現する *Sulf1*<sup>LacZ/+</sup>;*Drd1*-YFP、*Sulf1*<sup>LacZ/+</sup>;*Drd2*-YFP マウス、Cre リコンビナーゼを発現する *Sulf1*<sup>LacZ/+</sup>;*Drd1*-Cre、*Sulf1*<sup>LacZ/+</sup>;*Drd2*-Cre マウスを使用して実験を行っている。前二者では YFP 発現、後二者では AAV-hSyn-DIO-mCherry 局所注入による Cre 発現細胞特異的な mCherry 発現により *Drd1* ないし *Drd2* 発現細胞を標識し、β-ガラクトシダーゼの免疫染色により *Sulf1* 発現細胞を標識している。*Sulf1* 発現細胞、ドパミン受容体発現細胞を二重標識した脳切片を共焦点顕微鏡により観察し、*Sulf1* とドパミン受容体の細胞レベルでの共局在を解析している。さらに CRISPR-Cas9 システムを用いて C57BL/6N 遺伝背景の *Sulf1* flox マウスを新規に作製し、*Sulf1* コンディショナルノックアウトマウスの行動を解析している。

著者は、成獣マウス脳において、*Sulf1* が側坐核シェル領域、線条体尾部、大脳皮質 6 層、視床室傍

核、嗅結節などに豊富に発現していることを明らかにし、その他、脈絡叢や感覚性脳室周囲器官などにも豊富な発現を確認している。一方で *Sulf1* は脳全体に広く発現しており、大脳皮質などの一部を除き *Sulf1* とは発現細胞が異なること、ニューロン以外にグリア細胞にも発現することを明らかにしている。*Sulf1* の発現がドパミン神経投射部位に一致することから、著者が *Sulf1<sup>LacZ/+</sup>;Drd1-YFP*、*Sulf1<sup>LacZ/+</sup>;Drd2-YFP* マウスを用いて *Sulf1* とドパミン D1・D2 受容体の細胞レベルでの共局在を解析したところ、*Sulf1* 発現細胞のうち D1 受容体を発現するものは側坐核シェル領域で 55.6%、線条体尾部で 59.3%、前頭前皮質で 61.6% であること、D2 受容体を発現するものは側坐核シェル領域で 37.6%、線条体尾部で 31.5% であることを確認している。D1 受容体発現細胞のうち *Sulf1* を発現するものは側坐核シェル領域で 90.7%、線条体尾部で 95.2%、前頭前皮質で 94.8% であり、D2 受容体発現細胞のうち *Sulf1* を発現するものは側坐核シェル領域で 72.0%、線条体尾部で 73.0% であることを確認している。視床室傍核は *Sulf1* の発現が豊富であり、本来 *Drd2* も発現するが、*Drd2-YFP* マウスでは視床室傍核に YFP が発現しないため共局在解析を行うことができなかったため、著者は、*Sulf1<sup>LacZ/+</sup>;Drd1-Cre*、*Sulf1<sup>LacZ/+</sup>;Drd2-Cre* マウスの脳に AAV-hSyn-DIO-mCherry を局所注入することで *Sulf1* 発現細胞とドパミン受容体発現細胞を二重標識し、*Sulf1* とドパミン D1・D2 受容体の共局在を解析している。その結果、*Sulf1* 発現細胞のうち D1 受容体を発現するものは側坐核シェル領域で 62.6%、線条体尾部で 55.3%、前頭前皮質で 78.6% であり、D2 受容体を発現するものは側坐核シェル領域で 38.0%、線条体尾部で 43.6%、視床室傍核で 83.8% であることを確認している。D1 受容体発現細胞のうち *Sulf1* を発現するものは側坐核シェル領域で 90.6%、線条体尾部で 87.3%、前頭前皮質で 96.0% であり、D2 受容体発現細胞のうち *Sulf1* を発現するものは側坐核シェル領域で 78.0%、線条体尾部で 80.8%、視床室傍核で 93.5% であることを確認している。以上のように、著者は、側坐核シェル領域、線条体尾部、前頭前皮質、視床室傍核のドパミン D1・D2 受容体発現細胞は、その大部分が *Sulf1* を発現することを明らかにしている。これらの結果を基に、著者は *Sulf1* がドパミンシグナルに関与する可能性があると考え、*Sulf1* コンディショナルノックアウトマウスの行動解析を行い、一部の試験で野生型マウスと異なる行動が見られることを明らかにしている。

このように、著者は 2 通りの発現細胞同定法を用いた解析から、*Sulf1* は側坐核シェル領域、線条体尾部、前頭前皮質、視床室傍核におけるドパミン D1・D2 受容体発現細胞の大部分に発現することを明らかにしている。さらに *Sulf1* コンディショナルノックアウトマウスが特徴的な行動異常を呈すことを確認し、*Sulf1* がドパミンシグナルを介して高次脳機能に関与することを明らかにしている。著者はこれら一連の研究成果から、*Sulf1* の欠損により高次脳機能異常が生じる理由として、1) *Sulf1* がドパミンシグナルに直接的に関与する、あるいは 2) *Sulf1* がドパミン受容体を発現する細胞の正常機能獲得、維持に関与する可能性を提案している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

*Sulf1* は神経系の発生に重要な役割を果たしていることが知られていた。その *Sulf1* が、発生のメカニズムとは直接関係なく、ドパミン受容体発現神経細胞に特異的に発現することを世界に先駆けて明らかにした本研究の独自性は高く評価できる。ドパミン神経系の異常は様々な精神・神経疾患と関係しており、本研究により明らかとなった *Sulf1* コンディショナルノックアウトマウスの行動異常は、これらの疾患の病態理解につながるものとして大きく期待できる。

令和 4 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。