

新規FGF（FGF-10）の同定と
生理的意義の解明

2000

山 崎 正 博

【目次】

| | |
|---------------------------------|----|
| 序 論 | 1 |
| 略語表 | 3 |
| 第一章 新規FGFの同定と生体内分布 | |
| 序 説 | 4 |
| 第一節 新規FGFの単離 | 7 |
| 第二節 FGF-10蛋白の生物活性 | 11 |
| 第三節 FGF-10遺伝子の発現分布 | 14 |
| 考 察 | 17 |
| 実験方法 | 18 |
| 第二章 脂肪組織特異的因子としてのFGF-10 | |
| 序 説 | 22 |
| 第一節 脂肪組織におけるFGF-10発現の詳細な検討 | 23 |
| 第二節 脂肪細胞におけるFGF-10発現 | 26 |
| 第三節 FGF-10の脂肪細胞への活性の検討 | 30 |
| 第四節 FGF-10の脂肪組織の発達に与える影響の検討 | 33 |
| 第五節 FGF-10knockoutの脂肪組織形成に与える影響 | 35 |
| 考 察 | 38 |
| 実験方法 | 39 |
| 結 語 | 42 |
| 謝 辞 | 43 |
| 発表論文目録 | 44 |
| 引用文献 | 45 |

【序論】

FGF (Fibroblast Growth Factor) は線維芽細胞を初めとし、上皮細胞や血管内皮細胞、グリア細胞など様々な細胞に増殖活性を示すペプチド性増殖因子である。そしてアミノ酸配列の相同性から研究当初は九種類 (1,2,3,4,5,6,7,8,9)、現在19種類のメンバーからなるファミリーを形成することが知られている (10,11,12,13,14,15,16)。また、当研究室では更に二つのFGFが存在することを確認している。その構造はファミリー間で配列の相同性が高く生理活性に関わると考えられているコア領域と、比較的相同性の低いN末端領域とからなる。また、FGF-3を始めとして多くのFGFがN末端にシグナルペプチドを持ち細胞外に分泌されることが知られていることから (3,4,5,6,7,8)、FGFは細胞-細胞間の情報伝達に関わると考えられる。

FGFファミリーのうちaFGF、bFGFは胎児及び成体の広範な臓器に広く分布するのに対し、その他のFGFは胎児期や成体の一部の臓器などで時間的、空間的に限定された発現分布を見せる。これらのFGFは特定の時期に発現部位近傍で局所的に作用する因子と考えられている。

また、その生理作用として各種器官の損傷修復 (17,18,19,20,21)、神経生存維持 (22,23)、皮膚の創傷治癒 (24)、血管新生 (25,26)、胎児期では中胚葉誘導 (25,27,28)、筋発生 (29)、四肢形成 (30,31) など様々な作用を持ち、実際にこれらの生理作用を利用して角膜や皮膚の創傷治癒や各種臓器の再生修復、血管新生作用を利用した心筋梗塞などへの応用が期待されている (32,33)。

私は、このファミリーに属する新規ペプチドを明らかにすることが、新たな生体代謝経路の解明やそれを応用した新規医薬品の開発などにおいて意義深いものになると考え、遺伝子のレベルで探索を行った。今回私は、実際に生体で発現している新規なFGFを探索する目的で実験を行うために、FGFファミリーの持つ構造類似性に着目したHomology-based PCR法を用いた。またそのsourceとしてラット胎児を使用することで実際の生体で高発現している因子を単離することを目指した。

その結果、新規なFGF、FGF-10を単離する事に成功した。また、この新規FGFが成体において白色脂肪組織に特異的に高発現していることも明らかとし、今までに類をみない脂肪組織特異的増殖因子として形成や発達に関わる因子であることを示唆する重要な知見を得た。

以下、これらの知見について二章に分けて論述する。

【略語表】

本文中あるいは図表中で用いた略号は以下の通りである。

aFGF: acidic fibroblast growth factor

bFGF: basic fibroblast growth factor

cDNA: complementary DNA

CTP: cytidine 5'-triphosphate

FGF: fibroblast growth factor

FGFR: fibroblast growth factor receptor

FRSK: fetal rat skin keratinocyte

PCR: polymerase chain reaction

PBS: phosphate-buffered saline

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

tRNA: transfer RNA

UTP: uridine 5'-triphosphate

【第一章：新規FGFの同定と生体内分布】

序説

FGFは、最初牛下垂体より線維芽細胞に対する細胞増殖活性を持つ二種のペプチド（aFGF・bFGF）として単離されてきた（1,2）。その後の研究から、アミノ酸配列の類似した複数のメンバーからなるファミリーを形成していることが明らかとなった。Fig.1-0-1に研究当初発見されていた九種類のFGFの構造を示す。aFGF、bFGF、FGF-9を除くFGFはシグナル配列を持つ分泌蛋白である。シグナル配列を持たないFGFに関しても細胞外に存在することが知られており、細胞障害時に出てくる、または未知の細胞外分泌機構を持つと仮定されている。また、FGFは中央部にコア領域を持っており、その部分でのアミノ酸配列の相同性は30～60%である。特にaFGFで30番目及び101番目に存在するシステインは高度に保存されている。これに対し、N末端側の領域は比較的相同性が低い。

このようにFGFは構造上類似する点があるが、メンバーの多くは最初からFGFとして単離されたわけではなく、培養細胞から増殖活性を持つ因子として単離されたもの（5,8,9）や、oncogeneとしてとられたもの（34）がアミノ酸配列の類似性から後からメンバーに加えられたものである。また、FGFファミリーに属する因子は当初は線維芽細胞増殖活性を持つことが特徴であったが、現在では多彩な細胞に増殖活性を持つ事が知られており、なかにはFGF-7のように線維芽細胞に対しては増殖活性を持たないが上皮細胞に対しては増殖活性を持つ因子も存在することが分かっている。このように、FGFファミリーは単に「線維芽細胞の増殖因子」として括ることはできない多様な因子群である。

実際FGFファミリーは、生体内では細胞増殖のみならず、血管新生因子や発生・分化の調整因子（35）、神経栄養因子（36）としても働くことが知られており、多様な生理作用を担う重要なペプチド群であると考えられる。また、これらの作用が医薬への応用も考えられていることからその点でも興味深い因子であると考えられる。

私はこのファミリーに属する因子を新規に発見することが、新たな生体の機能解明と新たな医薬への応用の双方に有意義であると考え、実際に生体内で発現している新規FGFを選択的に探索するためにHomology-based PCR法と言う方法を用いて実験を行った。

一章では、その探索の方法とその結果見つかった新規FGFの構造と活性、及び生体内分布を報告する。

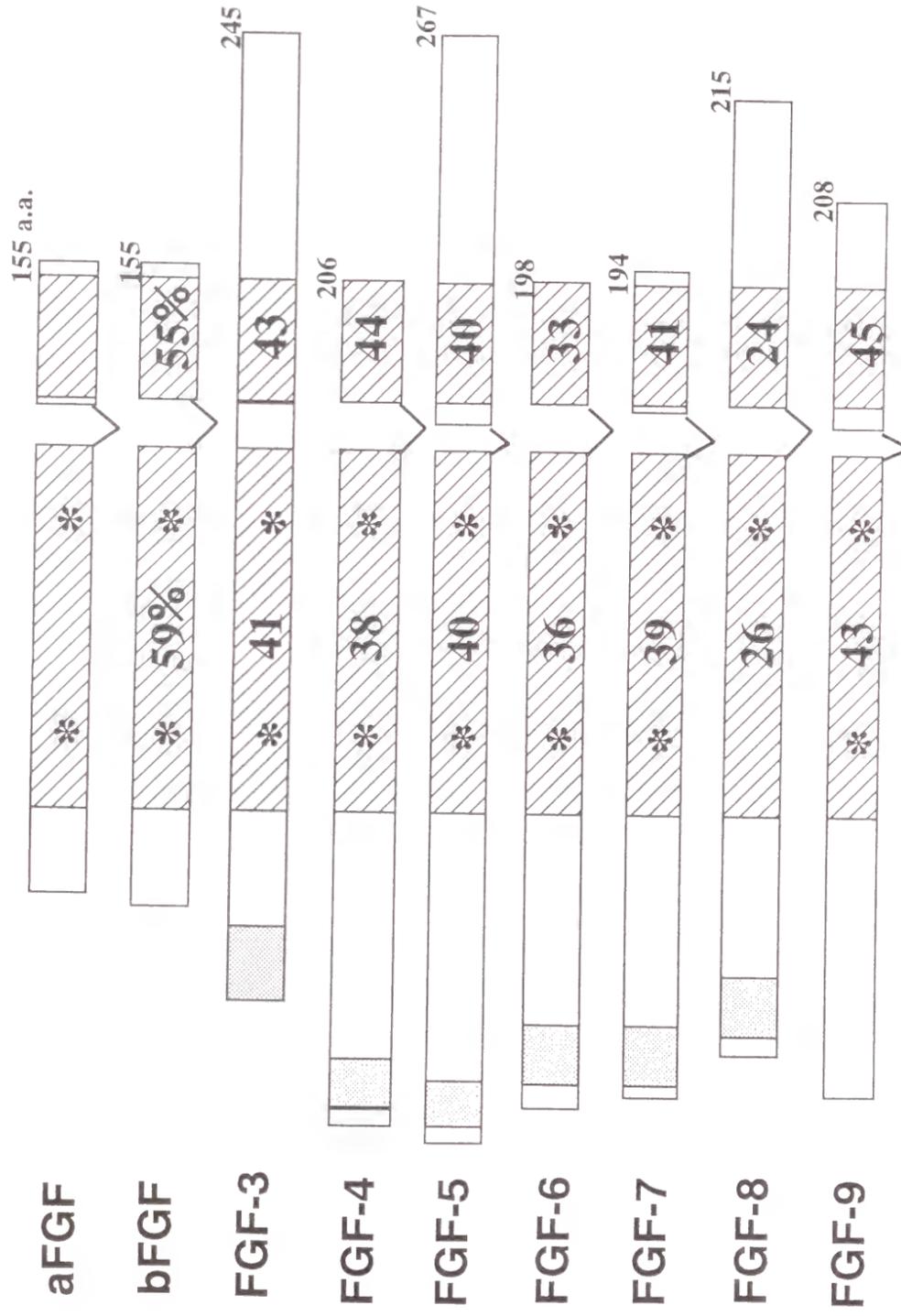


Fig. 1-0-1 The FGF family of growth factors.

The nine members are illustrated as bars.

*; Conserved Cystein. [hatched box]; Signal peptide sequence. [shaded box]; Core region.

The numbers in bars indicate the degree of amino acid identity among members.

Homology-based PCR法によりFGF関連遺伝子を探索した。本方法は、既知の蛋白のアミノ酸配列の相同性を利用して縮重プライマーを作製し、それに類似する物質の遺伝子をPCRにより選択的に増幅する方法である。FGFファミリーはそのアミノ酸配列上で一様に類似しているわけではなく、第一章の序説で述べたようにファミリー間で特に相同性の高いコア配列が中央に存在する。更に各FGFのメンバーで特に相同性の高いもの同士では、部分的にアミノ酸配列が一致する部位が存在する。私はFGF配列のもつこの特性を利用してHomology-based PCRを行った。すなわち、各FGFのコア領域でアミノ酸配列が一致する部位を基に作成した縮重プライマーでRT-PCRを行い、得られた遺伝子断片の中に新規FGFをコードするものがないかをシーケンス解析によって探索するという方法をとった。

また、鋳型としてrat 胎児14.5日目より抽出したtotal RNAより合成したcDNAを使用した。これは、この時期が胎児の発生において各種器官の形成や発達の著しい形態形成期に当たり、それに関わる様々なFGFが高発現していることが知られていることから、未知のFGFの発現が見られる可能性が高い時期であると判断したためである。

【結果】

幾つかの縮重プライマーを試した結果、FGF-3とFGF-7の縮重プライマーを用いて作製したcDNAライブラリーから新規FGFと考えられる遺伝子が単離された。この遺伝子は、コーディング領域が645塩基対からなり、コードする蛋白は215アミノ酸になる (Fig.1-1-1)。

このアミノ酸配列の特徴としては、FGFファミリー間で高度に保存されている2つのシステイン残基のうちN末のものが、FGF-8と同じくセリンに置き換わっていることや、50番目のアミノ酸から13個のセリンが連続するセリンリッチ領域の存在が挙げられる。しかしながら、その意義は不明である。

また、この配列をVon Heijneの計算法 (37) を用いて解析したところ、N末端に36アミノ酸からなるシグナルペプチドと想定される配列が存在したこ

とから、この蛋白は分泌蛋白であると思われた。

```

ATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCCTCAGCCTTTCCCCACCTGCCGGGCTGCTGTTGCTGCTT
M W K W I L T H C A S A F P H L P G C C C C F
CTTGTGCTCTTCTTGGTGTCTCCGTCCTGTACCTGCCAAGCTCTTGGTCAGGACATGGTGTAC
L L L F L V S S V P V T C Q A L G Q D M V S P
CGGAGGCTACCAACTCCTCTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCGTCCTTCTCCTTCTCCTCCTCC
E A T N S S S S S S S S S S S S S S S S F S S P S
AGCGCGGGGAGGCATGTGCGGAGCTACAATCACCTCCAGGGAGATGTCCGCTGGAGAAAGCTGTTCTC
S A G R H V R S Y N H L Q G D V R W R K L F S
CTTCACCAAGTACTTTCTCAAGATTGAAAAGAACGGCAAGGTGAGCGGGACCAAGAAGGAAAAGTGC
F T K Y F L K I E K N G K V S G T K K E N C P
CGTACAGTATCCTAGAGATAACATCAGTGGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAAC
Y S I L E I T S V E I G V V A V K A I N S N
TATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAGAATTAAACAATGACTGTAAACT
Y Y L A M N K K G K L Y G S K E F N N D C K L
GAAAGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAACACCTATGCATCTTTTAACTGGCAGCACAACGGCAGGC
K E R I E E N G Y N T Y A S F N W Q H N G R Q
AAATGTATGTGGCATTGAATGAAAAGGAGCTCCCAGGAGAGGACAAAAACAAGAAGGAAAAACACC
M Y V A L N G K G A P R R G Q K T R R K N T
TCCGCTCACTTCTCCTCCCATGGTGGTCCACTCATAG
S A H F L P M V V H S *

```

Fig.1-1-1 Nucleotide sequence of the coding region of the rat FGF-10 cDNA and the predicted amino acid sequence of the protein.

■ : Serine-rich region ■ : conserved cystein

Underlined amino acids indicate a putative signal peptide sequence.

また、この配列と既知のFGFとの相同性をアミノ酸レベルで見た。Fig.1-1-2には、他のFGFとのコア領域におけるアミノ酸配列の相同性を示す。コア領域はその中央に挿入配列が存在する。表にはその挿入配列の前後各々について個別に相同性を計算した結果を示している。

この結果から、単離された遺伝子のコードする蛋白は他の9つのFGFと30~60%の相同性を示し、特にFGF-7、FGF-3と相同性が高いことがわかった。このことから、私は今回単離された遺伝子のコードする蛋白は確かにFGFファミリーの一員であると考え、十番目に発見されたFGFとしてFGF-10と名付けた。

| | Homology (%) | |
|-----------------|--------------|----|
| FGF-1 (a FGF) | 41 | 32 |
| FGF-2 (b FGF) | 37 | 43 |
| FGF-3 (int-2) | 52 | 66 |
| FGF-4 (hst-1) | 36 | 30 |
| FGF-5 | 49 | 46 |
| FGF-6 (hst-2) | 44 | 41 |
| FGF-7 (KGF) | 55 | 62 |
| FGF-8 (AIGF) | 28 | 41 |
| FGF-9 (GAF) | 42 | 52 |

Fig.1-1-2 Amino acid sequence comparison of rat FGF-10 with other members

次に、平均距離法によりFGFの齧歯類における進化系統樹を作製したところ、FGF-10と進化的に最も近いのはFGF-7であることが分かった (Fig.1-1-3)。

以上の結果から、FGF-10はFGFファミリー内ではFGF-7に最も近い分子であると考えられた。

Method: UPGMA

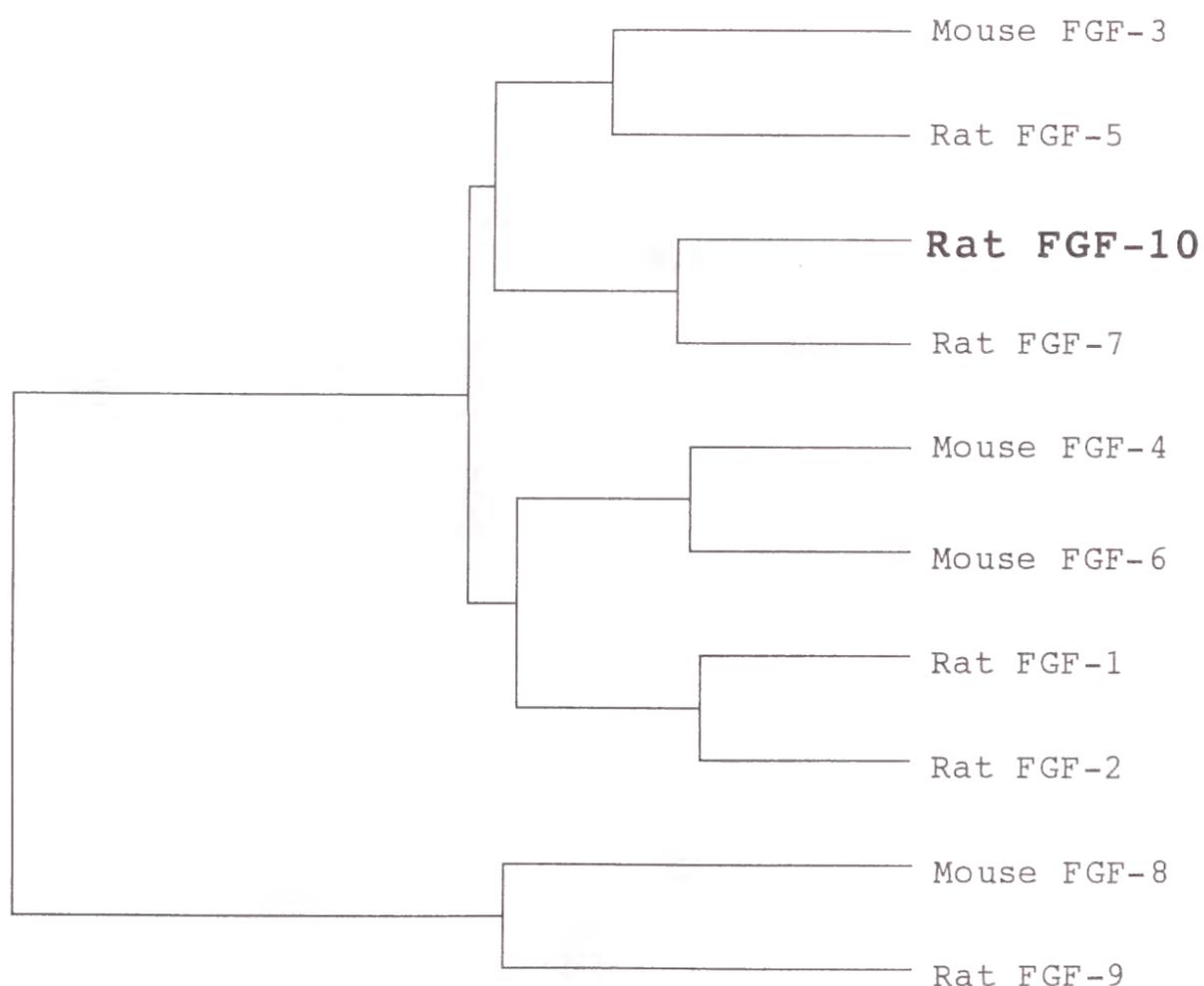


Fig.1-1-3 The apparent evolutionary relationship of members, FGF-1 ~FGF-10 of the human FGF family.

第二節：FGF-10蛋白の生物活性

1) 第一節で述べたように、FGF-10はシグナル配列を持つと思われることから、細胞外に分泌される分泌蛋白であると考えられた。このことから、私はFGF-10蛋白を培養細胞において発現させれば、その培養上清中にFGF-10蛋白が放出され、その培養上清がなんらかの生物活性を持つと考えた。このことを確かめるため、動物細胞であるCOS-1細胞でFGF-10蛋白を発現させ、培養上清の細胞増殖活性を調べた。また、細胞増殖活性は上皮細胞の培養細胞株であるFRSK細胞に対する活性を指標とした。

【結果】

この培養上清は、FRSK細胞に対してコントロールに比べ3倍近いチミジン取り込みを、即ちDNA合成の亢進を引き起こした (Fig.1-2-1)。これはこの培養上清中に含まれるFGF-10蛋白によるものと考えられることから、FGF-10が実際に細胞外に分泌され細胞増殖活性を持つ蛋白であることが明らかとなった。

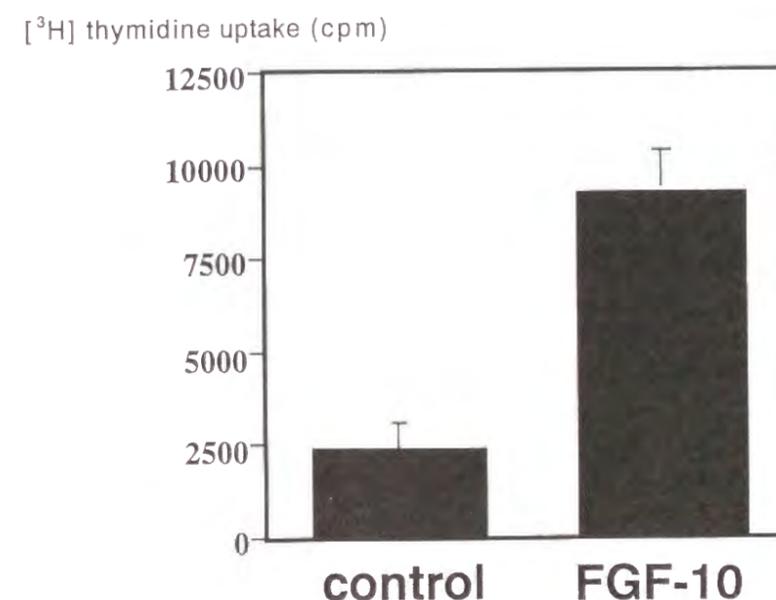


Fig.1-2-1 Mitogenic activity of FGF-10.

Mitogenic activity of recombinant FGF-10 produced in COS-1 cells was examined using FRSK cells.

2) 更に、FGF-10の細胞に対する増殖活性を詳しく検討した。細胞は線維芽細胞としてNIH/3T3細胞を、上皮細胞としてFRSK細胞を使用した。また、線維芽細胞の増殖因子としてFGF-2を、上皮細胞の増殖因子としてFGF-7を用いて、その活性を指標としてFGF-10の細胞増殖活性を検討した。また、本実験では大腸菌で大量発現させたFGF-10蛋白を使用している。

【結果】

線維芽細胞ではbFGFで見られるような増殖活性は見られず、FGF-7同様コントロールとほとんど差が出なかった (Fig.1-2-2, A)。一方、上皮細胞に対しては増殖活性を示し、その活性はFGF-7とほぼ同程度かそれ以上であった (Fig.1-2-2, B)。

この結果から、FGF-10は線維芽細胞には活性がないが上皮細胞には細胞増殖活性があるというユニークな因子であると考えられた。

このような活性特性は他のFGFファミリーではFGF-7で見られるのみであり、第一節で述べたように両者のアミノ酸配列の相同性が高いことや、進化上最も類似していることなどと合わせて考えると、両者はFGFファミリー内で更にサブファミリーと呼べる独自のカテゴリを形成するものと考えられる。

このようにFGF-10とFGF-7の両者が似通っていることから、両者は生体内で相補的役割を示す可能性がある。私はFGF-10の発現している組織を明らかにすることで、FGF-10の生体内機能の解析を目指すと共に、この可能性についても検討した。

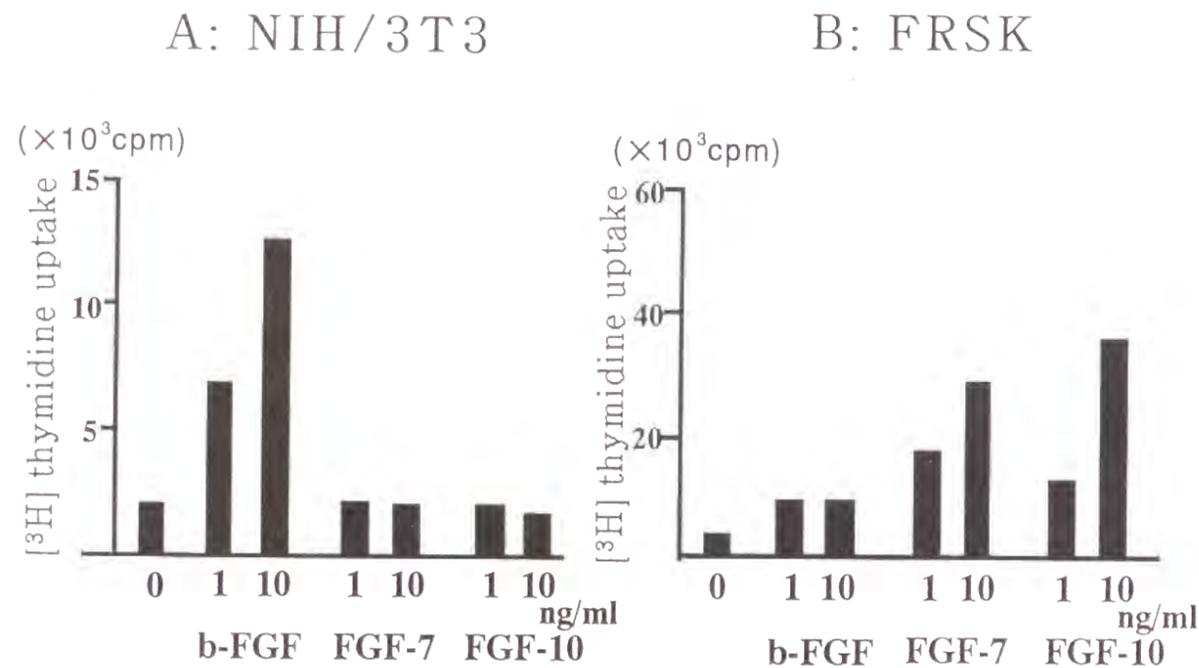


Fig.1-2-2 Determination of mitogenic activity of FGF-10.

Mitogenic activity of recombinant FGF-10 produced in *E. coli* along with bFGF and FGF-7 as controls was examined using NIH/3T3 cells (A) and FRSK cells (B).

第三節：FGF-10遺伝子の発現分布

FGF-10の生理的意義を解明するため、胎児期及び成体におけるFGF-10遺伝子の発現部位の特定を試みた。

【結果】

1) embryo：ラット14日目胎児においてin situ hybridizationを行った結果 (Fig.1-3-1)、下垂体後葉、第一頸椎、肺、十二指腸、脊髄尾端部など限られた組織に強いシグナルが見られた。また、上顎部、下顎部、舌部、脳後方部にも見られた。このことから、FGF-10遺伝子は胎児において様々な組織で特異的に発現していることが分かった。

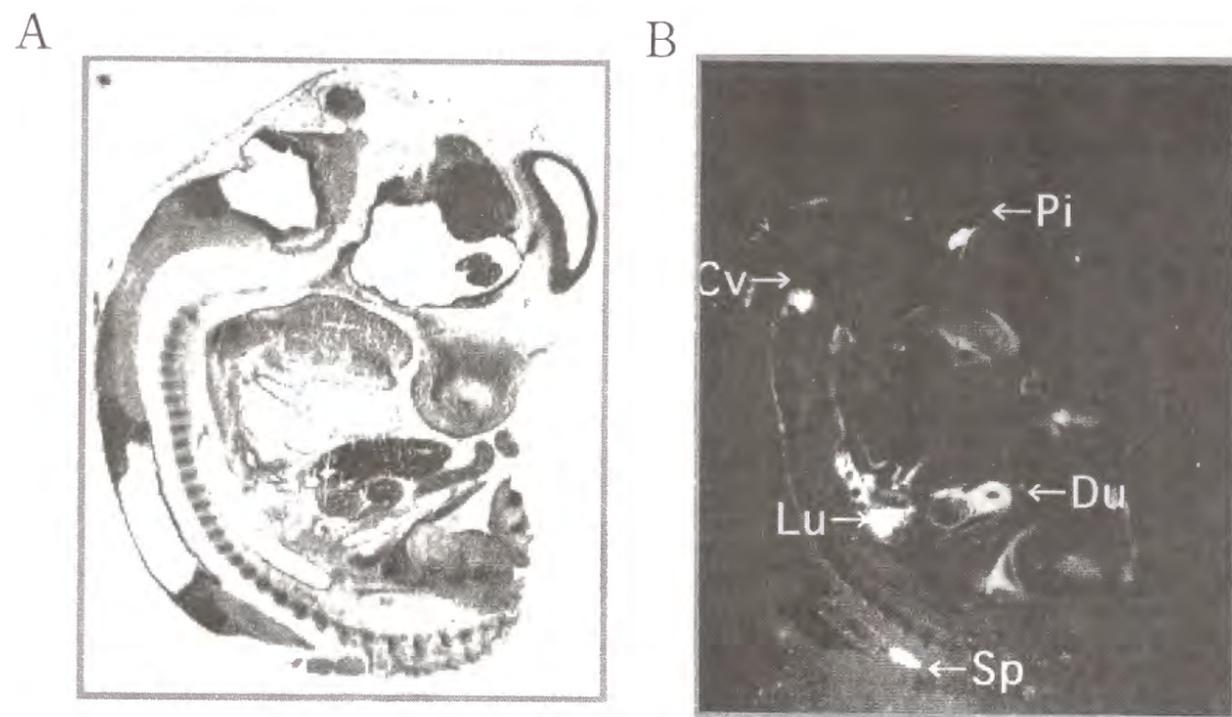


Fig.1-3-1 Localization of FGF-10 mRNA in sagittal section of the rat embryo (E14).

A sagittal section of the embryo was hybridized with a ^{35}S -labeled FGF-10 cRNA probe. The labeled section was counterstained with hematoxylin and eosin. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs are shown.

Pi, the posterior pituitary; Cv, the first cervical vertebra; Du, the duodenum; Lu, the lung; Sp, sacral and coccygeal segments of the spinal cord.

2) adult：成体ラットの主要な臓器（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、脂肪組織）についてNorthern analysisを行った (Fig.1-3-2)。特に強い発現が見られたのは肺と脂肪組織でありその他の臓器ではほとんど発現が見られなかった。また、このほかの臓器として胃、筋肉、胸腺、膵臓、脾臓、精巣などでRT-PCRによって発現を見ているが (data not shown)、FGF-10遺伝子の発現は見られなかった。

このことから、成体においてはFGF-10の主な発現部位は肺と脂肪組織であり、特に脂肪組織に高発現することが明らかとなった。

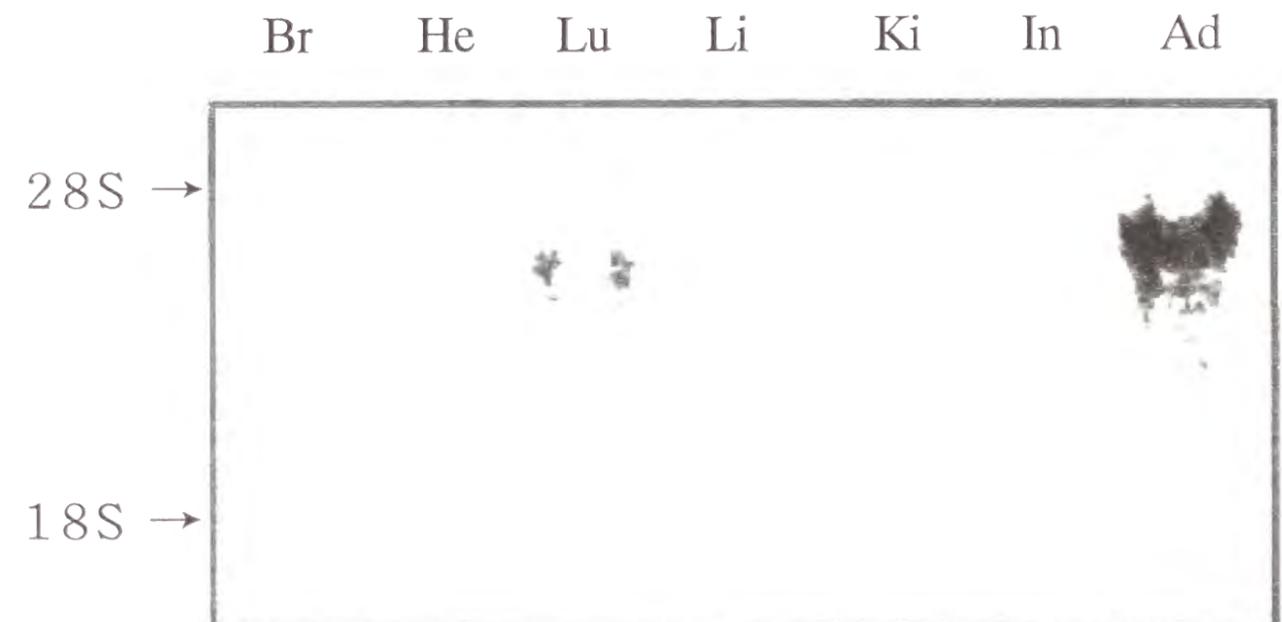


Fig.1-3-2 Expression of FGF-10 mRNA in the rat adult tissues.

Total RNA ($10\ \mu\text{g}$ each) was electrophoresed on a denaturing agarose gel (1%) containing formaldehyde. RNA was transferred onto a nitrocellulose membrane, and hybridization was performed with a ^{32}P -labeled rat FGF-10 cDNA probe. The positions of 28S and 18S RNAs are indicated as 28S and 18S. Lanes Br, He, Lu, Li, Ki, In, Ad indicate total RNA from the adult brain, heart, lung, liver, kidney, intestine, and epididymal adipose tissue, respectively.

FGF-7は胎児期においては筋芽細胞や前脳、脾臓や肺などに見られ (38,39)、成体においては肺や皮膚に発現している (40)。FGF-10の発現はFGF-7と重なる部分もあるが、胎児期の下垂体や脳後方部、成体の脂肪組織におけるFGF-10の高発現はFGF-10にしか見られないものであった。このことから、FGF-10は単なるFGF-7の代替因子ではなく独自の生理作用を持つ因子であると考えられる。

第一章 考察

第一章の実験結果から、FGF-10はアミノ酸配列だけでなく、進化上、また増殖活性の細胞特異性などからも、FGF-7に最も類似したFGFと考えられる。FGF-7は線維芽細胞に活性をもたず、上皮細胞に活性を持つなどファミリー内でも特異なFGFであった。FGF-7とFGF-10は、アミノ酸配列だけでなくその活性も類似していることから、両者は単に配列が似ているだけでなく、FGFファミリー内で他のFGFファミリーから独立したサブファミリーを形成していると考えられる。

また、FGF-10遺伝子は胎児期には第三節の1.に示したように、色々な組織で特異的な発現をしていた。更に形態形成期の胎児の whole-mount in situ hybridizationでFGF-10が肢芽に高発現していること、並びにFGF-10 beadsの埋め込み実験で蛇足の形成が見られることなどが明らかとなった (41)。また、Vanderbilt大学のHoganらはFGF-10が肺の発生時の分岐構造形成において重要な因子であることを報告している (42)。これらのことはFGF-10が胎児期において器官の形態形成に重要な因子であることを示唆している。

一方、アダルトでは脂肪組織や肺に特異的に発現しており、特に脂肪組織でより強く発現していることから、成体での主な発現部位は脂肪組織であることが明らかとなった。

このように脂肪組織に特異的に高発現している細胞増殖因子は現在までに報告されていない。この点からFGF-10の脂肪組織における役割が今まで知られていないユニークなものであることが期待された。また、胎児期においてFGF-10が器官形成に重要な因子であることが示唆されていることから、FGF-10が脂肪組織の形成や発達に関わる因子であることも期待された。

【第一章；方法】

：第一節の実験法：

1) cDNAの合成

各 cDNA は、RNA を 300unit の Moloney murine leukemia virus reversetranscriptase (GIBCO-BRL)、15unit の human placenta RNase inhibitor (Wako)、0.5 μ g random hexadeoxynucleotide primer を含む反応液 (final 20 μ l) 中で 37°C 1時間反応させて合成した。

2) Homology-based-PCR法による新規FGFの単離とその全配列決定

第一節の実験法1の方法により、ラット14日目胎児のpoly-A RNAより逆転写したcDNAを作成した。このcDNAを鋳型として、FGFファミリー特異的な縮重プライマーを用いたPCRによりFGFに類似性のある遺伝子断片 (約110pb) を増幅した。縮重プライマーはFGF-3とFGF-7の共通配列 (FGF-3における96番目~101番目のアミノ酸配列YLAMNKから、126番目~131番目のYNTYAS) の縮重プライマーを使用した。これらの遺伝子断片をpGEM-T Vectorに組み込み大腸菌に導入し、多様な配列をもつcDNAライブラリーを得て、それぞれについて蛍光自動シーケンサーにより配列決定した。得られた配列のうち、新規と思われるものをデータベースに登録されている既知の配列と比較することで、新規の配列であるかどうかを確認した。こうして得られた断片配列を基にし、RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法により、得られた遺伝子断片の上流 (5'側) 並びに下流 (3'側) の配列を決定した。

：第二節の実験法：

1) COS-1細胞を用いたFGF-10蛋白の発現、及び生物活性の測定

ラット FGF-10 遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターである pCDM8 に導入した。これを電気パルス法により COS-1 細胞に導入した。導入後、10% fetal

bovine serum を添加した DMEM 培地で 24 時間培養し、その後無血清培地にて 96 時間培養した。FGF-10 蛋白を含む培養上清を上皮細胞 (FRSK cells) の培地に添加し 18 時間培養後、 $[6\text{-}^3\text{H}]$ thymidine (Amersham) を加えて更に 4 時間培養した。その後培地を除去し、2N NaOH で細胞を破碎、セルハーベスタで回収して細胞内に取り込まれた ^3H -thymidine のカウントを測定した。また、コントロールとしてインサートを組み込んでいない発現ベクターのみのものを導入した COS-1 細胞の上清を使用した。

2) 大腸菌を用いた FGF-10 蛋白の発現、及び生物活性の測定

NIH 3T3 及び FRSK cells は 96 穴プレートに 1×10^3 cells/well になるようにまいたものを使用した。細胞は各々 DMEM 培地 / 10% calf serum (NIH3T3 cells)、Ham's F-12 培地 / 10% fetal bovine serum (FRSK cells) で 80% コンフルエントになるまで培養した。その後、細胞を PBS で二回洗浄後更に二十四時間培養し、human FGF-10、human FGF-7 (Peprotech Inc.)、human b-FGF (R&D Systems) を培地に添加し十七時間培養後、 $[6\text{-}^3\text{H}]$ thymidine を加えて更に四時間培養した。その後培地を除去し、2N NaOH で細胞を破碎、セルハーベスタで回収して細胞内に取り込まれた ^3H -thymidine のカウントを測定した。

大腸菌発現系を用いた human FGF-10 蛋白については、共同研究先である住友製薬から分与していただいたものを使用した。

：第三節の実験法：

1) in situ hybridizationによる FGF-10 遺伝子の発現組織の同定

Wistar 系ラットの 14 日目胎児の sagittal 方向、厚さ 16 μ m の新鮮凍結切片をクリオスタットによって作成した。切片は、ゼラチン/poly lysine コーティングしたスライドガラス上に張り付けた。この切片を前処理として 4% ホルマリン/PBS で 15 分固定後、1 μ g/ml proteinase K 溶液で 10 分処理、0.25% 無水酢酸 / 0.1M トリエタノールアミン / 0.15M NaCl 中で 10 分間アセチル化をほどこした。これをエタノールで脱水、クロロホルムで脱脂した後、乾燥させた。乾燥後、プレハイブリダイゼーションバッファをのせ、55°C で 1 時間インキュベートした。プレハイブリダイゼーションバッファは以下の組成である。

| | |
|-----------|---|
| 50% | Formamide |
| 4× | SSC (1×SSCは150mM NaCl/15mM sodium citrateである) |
| 5× | Denhardt's solution |
| 10mM | EDTA |
| 20mM | DTT |
| 0.25mg/ml | Yeast tRNA |
| 0.50mg/ml | Salmon sperm DNA |

インキュベーション終了後、プレハイブリダイゼーションバッファを除去し、³⁵Sで標識したFGF-10cRNAプローブを含むハイブリダイゼーションバッファに交換し、55℃で18時間ハイブリダイズさせた。プローブはpGEM-T vectorに組みこまれたFGF-10遺伝子を[α -³⁵S] UTP (30TBq/mmol Amersham) 存在下で、T7ないしはSP6 RNA polymeraseを用いてin vitro転写し、その後アルカリ処理により平均鎖長200bpに水解することにより作成した。

ハイブリダイゼーションバッファはプレハイブリダイゼーションバッファに10% dextran sulfateを加えたものを使用した。ハイブリダイゼーション終了後、2×SSCで二回洗浄し、50 μ g/ml RNase溶液で37℃30分RNase処理を行い余剰プローブを分解した。更に、50% formamide/2×SSC中で55℃30分の洗浄を二回行い、アルコールで脱水後乾燥させた。その後、micro-autoradiographyによりcRNAプローブを可視化、ヘマトキシリン-エオジン染色で細胞を可視化し、鏡検によりFGF-10 mRNAの発現領域を見た。

2) Northern analysisによるFGF-10遺伝子の発現組織の同定

Wistar系雄ラット (7~8週齢) から摘出した主要臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、脂肪組織) より、total RNAを抽出した。脂肪組織は副精巣周辺のものを使用した。RNA抽出はQuick Prep total RNA extraction kit (Pharmacia Biotech)を用いて行った。これをformaldehyde変性アガロースゲル (1%) で電気泳動した。分離したRNAの泳動像を20×SSC中overnightでニトロセルロース膜に写し取った。膜は80℃で二時間乾燥させた後、ハイブ

リダイゼーションバッファ中で55℃六時間プレハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションバッファは以下の組成である。

| | |
|----------|----------------------|
| 50% | Formamide |
| 5× | SSC |
| 50mM | Tris-HCl (pH 7.5) |
| 0.1% | sodium pyrophosphate |
| 1.0% | SDS |
| 4× | Denhardt's solution |
| 0.1mg/ml | Salmon sperm DNA |

その後、新たなハイブリダイゼーションバッファに³²PでラベルしたFGF-10cDNAプローブを加え、60℃で18時間ハイブリダイズさせた。プローブはReady to GO DNA labelling beads kit (Pharmacia Biotech)を用い、[α -³²P] CTP (110TBq/mmol, ICN Biochemicals Inc.)で標識することで作成した。ハイブリダイゼーション終了後、膜を2×SSC/0.1% SDSで室温下20分三回洗浄し、続いて0.1×SSC/0.1% SDSで55℃20分二回洗浄した後、乾燥させた。乾燥した膜はイメージングプレートに18時間露光させ、BAS-2000 (Fuji Photo Film Co.) により解析を行った。

【第二章：脂肪組織特異的因子としてのFGF-10】

序説

脂肪組織は今までは単なるエネルギーの貯蔵部位としてしか考えられていなかったが、最近の研究からレプチン（43）やPAI-1（44）のように脂肪組織自身が肥満や成人病に関わる様々な物質を産生/分泌することが明らかとなり、新たな内分泌器官として注目され始めている。

特に最近肥満ラットであるob/ob mouseの解析の過程で発見されたレプチンは、脂肪組織で発現、分泌され、視床下部に存在するob-Rと呼ばれるレプチンレセプターに結合し、摂食を抑制するという今までにない蛋白であった（45,46）。また、レプチンやそのレセプターの異常が実際に肥満やインスリン抵抗性、それに伴う糖尿病、高脂血症などの病態を引き起こすことも明らかになっている。このように脂肪組織において特異的に発現する因子は、今まで発見されていない重要な生体内機能に関わる可能性があり、同時に臨床応用も期待できる極めて興味深い物質であるといえる。

第一章で述べたように、FGF-10はアダルトの脂肪組織で特異的に発現が見られる今までにない増殖因子である。これは上で述べたような理由から非常に興味深い事実であり、FGF-10の機能を解明することは肥満や成人病の研究や医薬への応用も期待できると思われた。よって、私はFGF-10の発現が見られる組織の中でも特に脂肪組織に重点を置いて以降解析を行うこととした。

第二章では、その実験において得られた知見を示す。

脂肪組織はその性質の違いから大きく分けて白色脂肪組織と褐色脂肪組織の二つに分けられる。これらは形態的にも生体内での役割にも大きな違いがある。

白色脂肪組織は組織の大部分が単胞性の脂肪滴を持った脂肪細胞に代ってしめられており、毛細血管や神経はあまり発達していない。白色脂肪組織は皮下、副精巣周辺部などを始めとする身体内の至る所に存在する一般的な組織と言える。白色脂肪組織に存在する脂肪細胞は白色脂肪細胞と呼ばれ、先に述べたように単胞性の脂肪滴が細胞の大部分を占めている直径20 μ m ~ 100 μ mの大きな細胞が主である。細胞の縁には細胞質と核が押し込まれている。白色脂肪細胞ではエネルギーを中性脂肪として保存し、必要に応じて血中に放出する他脂質代謝などを行う。即ち、白色脂肪組織は生体内におけるエネルギー備蓄のための組織である（47,48）。

また、白色脂肪組織は更に刺激に対する反応性の違いから内臓脂肪とその他の部位の脂肪組織とに分けられる。内臓脂肪組織は腸間膜周辺部に存在する脂肪組織で、小腸で吸収された栄養分に即応して脂質の取り込みや放出を行う。このため過食や飢餓など短期間の栄養状態の変化に対する反応性が高い脂肪組織である。その他の部位の白色脂肪組織はもっと長期間の栄養状態の変化で脂質代謝を行うため、短期間の栄養状態の変化には反応性が鈍い（49）。両者は各々の反応性を持って個体がエネルギー危機に陥ったときのために備えている。

一方、褐色脂肪組織は微細な脂肪滴を多数含んだ脂肪細胞からなり、更にその細胞を縫うように血管や神経などが張り巡らされている。褐色脂肪組織は特に齧歯類や冬眠を行う生物で発達しており、ヒトを始めとするその他の生物では新生児に極小さく見られる程度である。存在部位も肩胛骨間に主に存在し、腋下部や腎周辺部に極わずかに存在する以外見られない特殊な組織である。褐色脂肪組織に存在する脂肪細胞は褐色脂肪細胞と呼ばれ、微細な脂肪滴が多数存在する他胞性脂肪滴と、異常に多いミトコンドリアが特徴である。褐色脂肪細胞に存在するミトコンドリアには非共役蛋白

(UCP:uncoupling protein) と呼ばれる特徴的なプロトンポンプが存在する。これは通常の細胞のミトコンドリア内に存在するH-ATPaseと違い、ATP産生無しにミトコンドリア内外のプロトン輸送を行う。その結果、細胞は中性脂肪をATP産生無しに消費させることが可能になる。すなわち、蓄積エネルギーを生体内エネルギーに変換せず、熱エネルギーへと変換する（非震え熱産生）ことになる。従って、褐色脂肪組織は熱産生組織である。

そして、交感神経刺激により細胞内の中性脂肪を使用して非震え熱産生を行うことで寒冷時の体温上昇に役立つが、一方で過食時には余剰エネルギー消費を行う（50）組織となる。即ち、褐色脂肪組織はエネルギー消費を行う組織でもある。

私はこれら様々な脂肪組織におけるFGF-10の発現を、Northern analysisで調べた。

【結果】

Northern analysisによってFGF-10遺伝子の脂肪組織間での発現量の違いをラットにおいて調べた（Fig.2-1-1）。

その結果、白色脂肪組織（副精巣周辺、皮下、腸間膜周辺）ではいずれもFGF-10が高発現していたが、褐色脂肪組織（肩甲骨間）では発現が微弱なであった。

この結果から、FGF-10は白色脂肪組織に特異的に高発現する因子と考えられた。

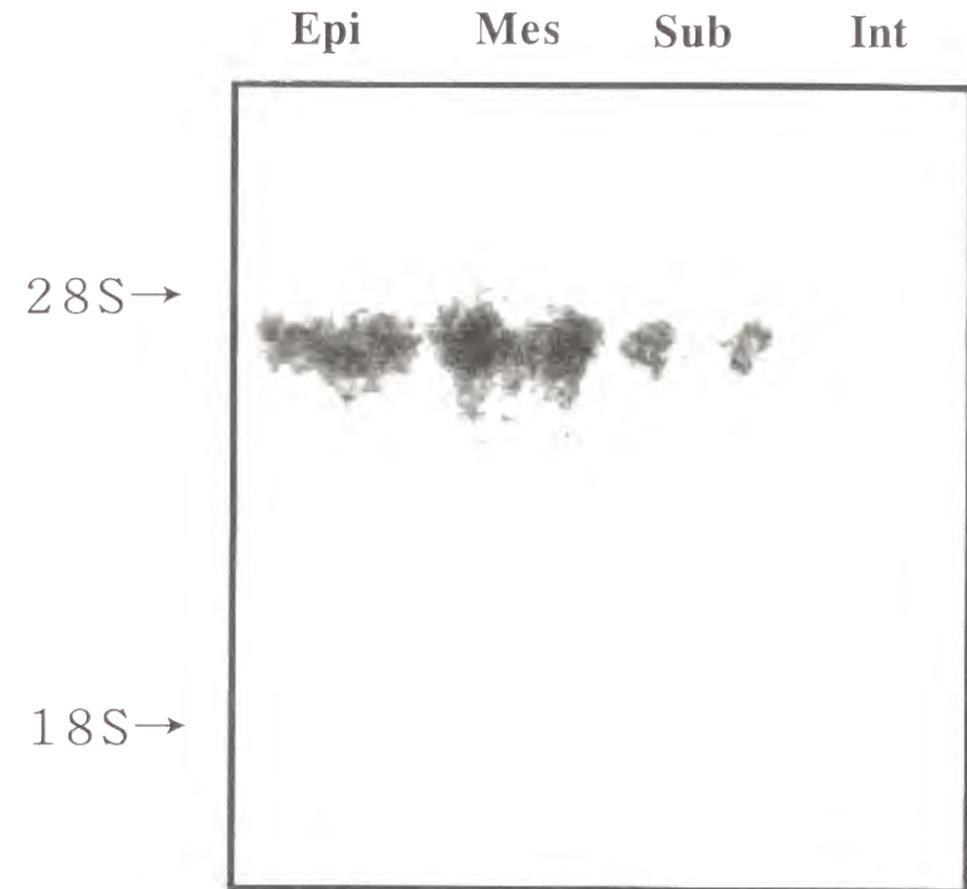


Fig.2-1-1 Expression of FGF-10 mRNA in rat adipose tissues.

Aliquots of RNAs (10 μ g) were electrophoresed on a denaturing agarose gel (1%) containing formaldehyde. RNA was transferred onto a nitrocellulose membrane, and hybridization was performed with a 32 P-labeled rat FGF-10 cDNA probe. The positions of 28S and 18S RNAs are indicated as 28S and 18S. Lanes Epi, Mes, Sub, Int indicate RNA from epididymal, mesenteric, and subcutaneous white adipose tissues, and interscapular brown adipose tissue, respectively.

第二節：脂肪細胞におけるFGF-10発現

1) 脂肪組織は大きく分けると、分化が進み細胞内に脂肪滴を多くため込んだ成熟脂肪細胞と、そこまで分化が進んでおらずほとんど脂肪滴をためていない前駆脂肪細胞とで構成されている(47)。この両者は分化の程度が違うだけでなく、発現している物質や影響を受ける分子に違いが存在する。私は脂肪組織内でFGF-10の発現する細胞に特異性があるかを調べるため、脂肪組織を成熟脂肪細胞画分と前駆脂肪細胞を多く含むstromal-vascular画分に分画し、両者におけるFGF-10の発現量の違いを見た。

【結果】

遠心分画によりラット白色脂肪細胞を成熟脂肪細胞画分と前駆脂肪細胞を多く含むstromal-vascular画分とに分け、Northern analysisでFGF-10発現量を調べた(Fig.2-2-1 B)。また、コントロールとして、成熟脂肪細胞にのみ発現が見られるレプチンを使用した(Fig.2-2-1 A)。

その結果、FGF-10はレプチンとは逆に成熟脂肪細胞画分ではほとんど発現が見られなかったが、前駆脂肪細胞画分には高発現していた。

このことから、FGF-10は白色脂肪組織の細胞でも特に前駆脂肪細胞で特異的に高発現している因子と考えられた。

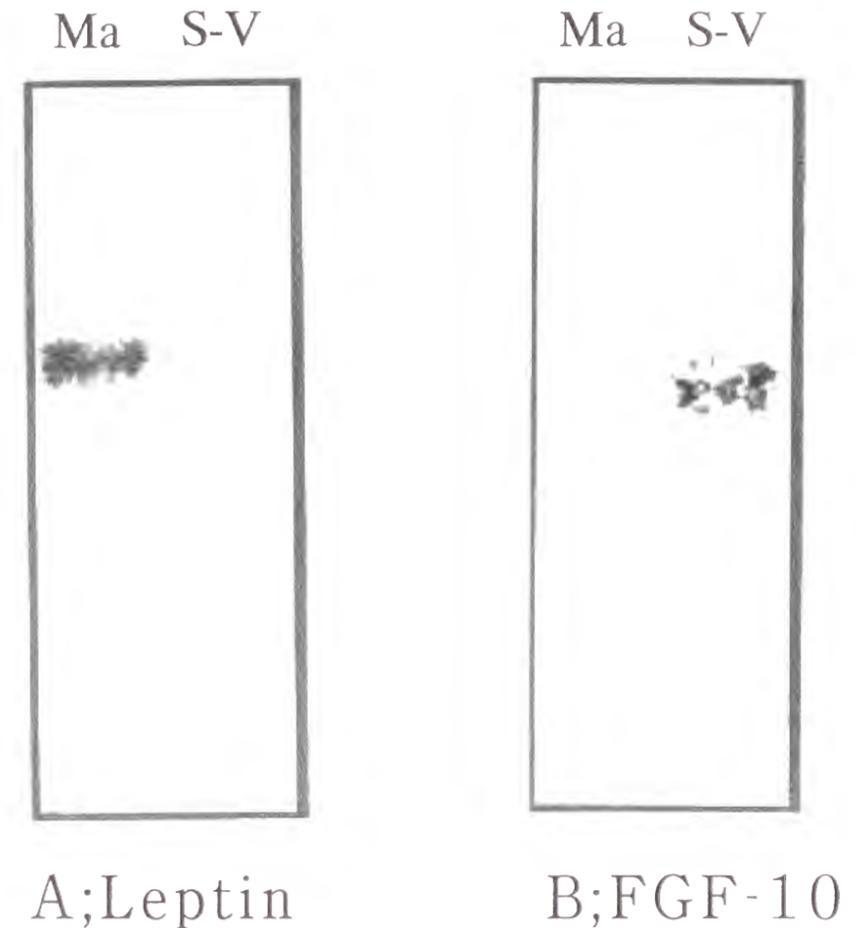


Fig.2-2-1 Expression of FGF-10 mRNA in mature adipocytes and stromal-vascular cells of the subcutaneous white adipose tissue.

Aliquots of RNAs (10 μ g) were electrophoresed on a denaturing agarose gel (1%) containing formaldehyde. RNA was transferred onto a nitrocellulose membrane, and hybridization was performed with a 32 P-labeled rat leptin cDNA probe (A) and a 32 P-labeled rat FGF-10 cDNA probe (B). Lanes Ma and S-V indicate RNA from mature adipocytes and stromal-vascular cells of subcutaneous white adipose tissue, respectively.

2) 第二節 1.の結果はFGF-10が脂肪細胞分化によって発現量の変化する因子である可能性を示している。既に分化によって発現の変化する因子は幾つか知られており、例えば脂肪細胞特異的な転写因子であるC/EBP β は前駆脂肪細胞から分化のある程度進んだ脂肪細胞にかけて発現するが、同じく脂肪細胞特異的な転写因子であるPPAR γ は分化がある程度進んだ前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に発現し(51)、脂肪組織から分泌されるレプチンは更に分化の進んだ成熟脂肪細胞でのみ発現する(52)ことなどが知られている。これらの因子は脂肪細胞の機能や脂肪細胞分化、組織発達に関わることが知られている。特にC/EBP β やPPAR γ は脂肪細胞の分化に極めて重要なキープクターであることが知られている(53)。

FGF-10が分化の進行過程で発現量が変わるかどうかを確かめるために、分化中の脂肪細胞についてFGF-10の発現量を検討した。そしてその方法として、先ほど得た前駆脂肪細胞画分を初代培養し、これに分化誘導をかけたときのFGF-10発現量の変化をRT-PCRを用いて見ることにした。

また、分化の度合いの指標として、分化後期のマーカー遺伝子であるPPAR γ の、成熟脂肪細胞のマーカー遺伝子としてレプチンの発現を各々見た。

【結果】

FGF-10は分化誘導開始二十四時間後(培養開始三日目)で発現のピークを迎え、その後はPPAR γ と対照的に分化が進むに伴い逆に発現が減少した(Fig.2-2-2)。そしてレプチンの発現が見られる培養開始八日目にはほとんど発現が見られなくなった。

これらのことからFGF-10は前駆脂肪細胞の分化の初期に一過性に発現が亢進する因子であることが分かった。

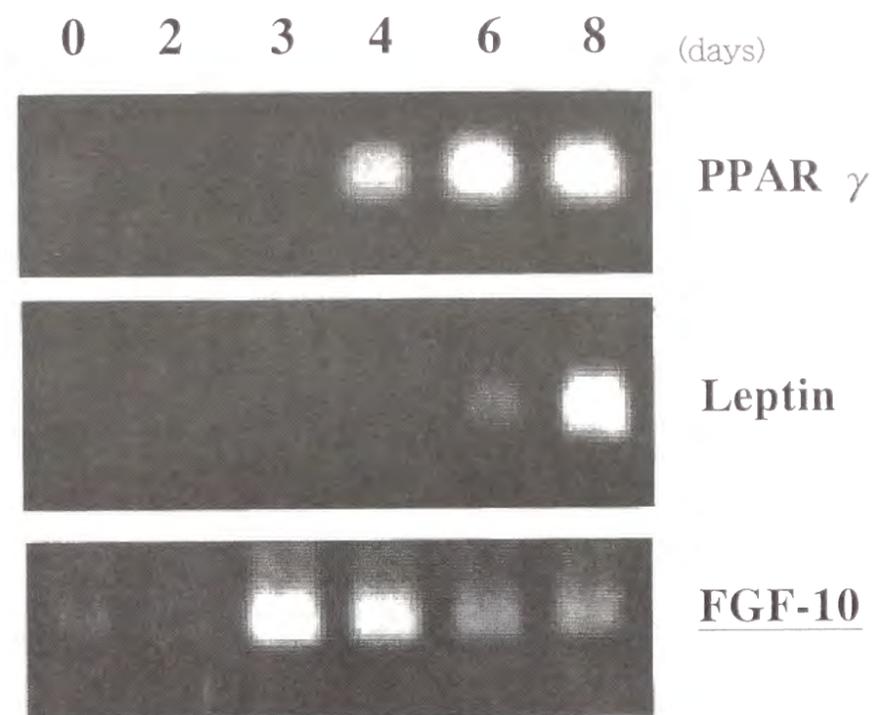


Fig.2-2-2 Temporal patterns of FGF-10 mRNA during preadipocyte differentiation.

Total RNAs were collected at 0, 2, 3, 4, 6, 8 days throughout the preadipocyte differentiation program.

以上のことから、FGF-10は前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化し始める時期に一過性に発現が亢進すると考えられる。FGF-10が脂肪細胞全般に発現しているのではなく、前駆脂肪細胞の、しかも分化過程で一過性に発現が亢進することは、FGF-10のもつ生理作用が時期的、細胞的に特異的なものであることを表している。

このことをふまえ、私は次にFGF-10が実際の脂肪組織において、どの細胞に対して、どのような作用をする因子であるかを同定しようと試みた。

第三節：FGF-10の脂肪細胞への活性の検討

1) FGFは細胞表面上にある特異的な受容体を介して、その生理機能を発現している (2)。現在までにFGFのレセプターは、FGFR-1からFGFR-4の四種類が同定されている (54,55,56,57,58,59,60,61,62)。これらはいずれも細胞外にイムノグロブリン様ドメインを持ち、細胞内にはチロシンキナーゼドメインを持つ構造を示し、互いに50~70%の相同性を持っている。また、FGFR-1~FGFR-3には最も細胞質よりの第三イムノグロブリン様ドメインの選択的スプライシングによりbタイプとcタイプの二つのアイソフォームが存在していることから、リガンド結合特異性の違うレセプターが合計7種類存在する。

さて、FGF-10はFGF-7と同様にFGFレセプターの中でもFGFR-2bに特異的に結合することが報告されている (63)。実際、当研究室においてもFGFレセプターの細胞外領域を用いたリガンド結合実験においてそのことを確認している。私は、FGF-10のレセプターと考えられるFGFR-2bの脂肪組織における成熟脂肪細胞・前駆脂肪細胞の各細胞画分での発現を調べ、FGF-10の作用する細胞の同定を試みた。その手段として、FGFR-2の遺伝子上にFGFR-2bのみに制限酵素Hae IIIの認識部位がある領域が存在することを利用した。その領域のPCR産物をHae IIIで制限酵素消化し電気泳動すると、FGFR-2bが存在している場合は産物が切断されて低分子側に二本のバンドが出てくるが、存在しない場合は一本のみである。このことを利用し、前駆脂肪細胞及び成熟脂肪細胞のFGFR-2b発現を調べた。

【結果】

結果、FGFR-2bは成熟脂肪細胞画分では検出されなかったが、一方前駆脂肪細胞画分では発現していることがわかった (Fig.2-3-1)。よって、FGF-10は成熟脂肪細胞ではなく前駆脂肪細胞に対して作用する因子であると考えられた。

FGF-10が前駆脂肪細胞に高発現していることとFGF-10のレセプターと考えられるFGFR-2bが前駆脂肪細胞でのみ発現していることを併せて考えると、

FGF-10は前駆脂肪細胞にautocrine・paracrine的に働く因子と考えられる。

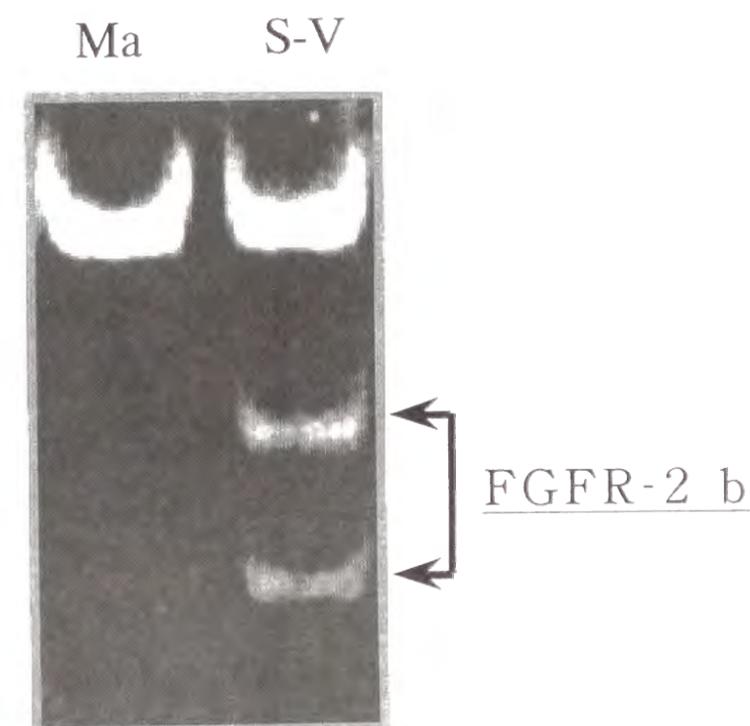


Fig.2-3-1 Expression of isoforms of immunoglobulin-like domain III of FGFR-2 in rat mature adipocytes and stromal-vascular cells.

The DNA fragments of immunoglobulin-like domain III with surrounding regions of FGFR-2 were amplified from the total RNA from mature adipocytes and stromal-vascular cells by polymerase chain reaction using specific primers. The amplified DNA of FGFR-2 were digested with Hae III. The digests were fractionated by electrophoresis on a poly acrylamide gel (8%).

Lanes Ma and S-V indicate RNA from mature adipocytes and stromal-vascular cells of subcutaneous white adipose tissue, respectively.

2) 第三節の1.で述べたように、FGF-10は前駆脂肪細胞に作用する因子と考えられる。そこで、初代培養した前駆脂肪細胞に対してFGF-10が実際に細胞増殖活性を持つかどうかを生細胞数を測定するWST-1アッセイ法を用いて検討した。本実験では第一章で使用した大腸菌発現系から得られたFGF-10蛋白を使用した。

【結果】

FGF-10を加えていない細胞に比べて、FGF-10を加えた細胞では濃度依存的に細胞数の増加が見られた (Fig.2-3-2)。このことからFGF-10は確かに前駆脂肪細胞に対して増殖活性があることが分かった。

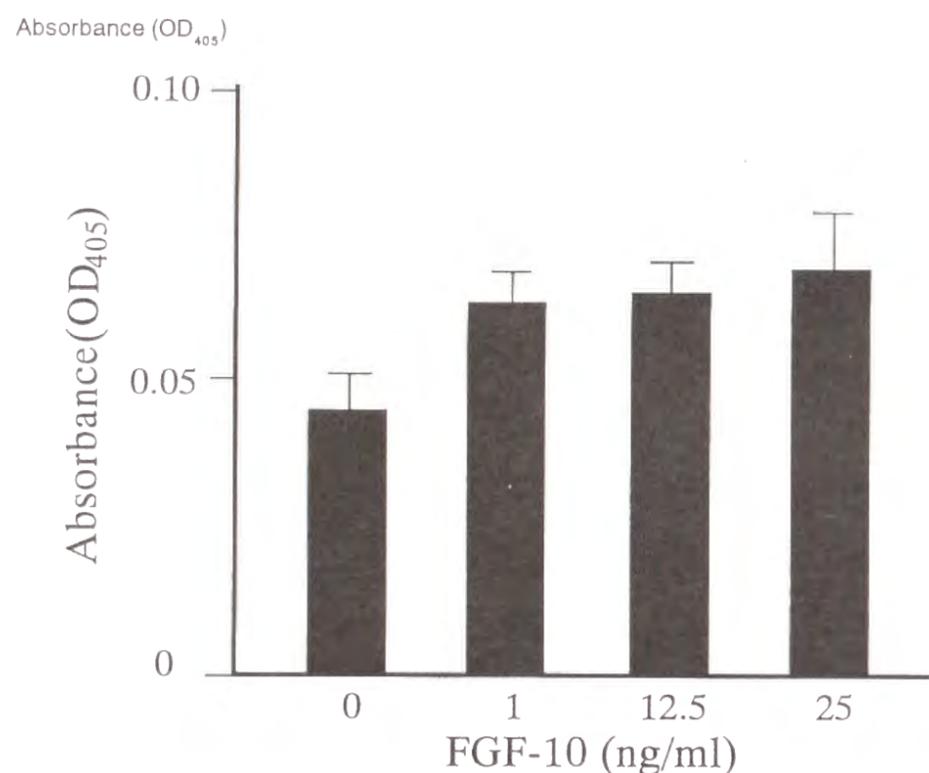


Fig.2-3-2 Mitogenic activity of recombinant FGF-10 for primary rat preadipocytes.

Mitogenic activity of recombinant FGF-10 was determined using primary rat preadipocytes from the epididymal white adipose tissue as described under "Capter 2's methods".

第四節：FGF-10の脂肪組織の発達に与える影響の検討

第三節で述べたように、FGF-10は前駆脂肪細胞の増殖因子と考えられるが、そうすると脂肪組織の発達や形成など未成熟な脂肪細胞の増殖が起こるときにFGF-10が重要な役割を持つ可能性がある。これを確かめるために以下実験を進めた。

脂肪組織は胎児発生後期から形成されていくが、本格的な発達には離乳が起こる生後二十日前後を境に起きる (64)。これは、乳児期の母乳内の糖質に依存したエネルギー代謝経路が離乳に伴い食餌中の脂質を中心とした代謝経路に切り替わる、即ち代謝経路の成熟が起きて始めて脂質蓄積器官である脂肪組織が生体内で大きな意味を持つようになるからである (65)。

もし、脂肪組織発達にFGF-10が関わるならば、離乳前後のこの時期に遺伝子の発現量が大きく変化すると考え、生後の皮下及び腸間膜周辺部の脂肪組織より抽出したRNAによるNorthern analysisを用いてその変化を検討した。

【結果】

皮下、腸間膜周辺部いずれの脂肪組織でもFGF-10は四週齢以降、即ち離乳後に発現量が増大し、その後はほぼ一定に発現していた (Fig.2-4-1)。このことからFGF-10は離乳後の脂肪組織発達に重要な役割を持つ可能性が高いと考えられた。

FGF-10が胎児期における脂肪組織形成に関わる可能性について検討するため、FGF-10 KO mouseの解析を行った。

FGF-10 KO mouseは東大分子生物学研究所との共同研究で作製した。Fig.2-5-1に示すように、FGF-10の欠失は四肢や肺の形成不全を引き起こした。また、その他下垂体、顎下腺など様々な組織の形成不全がみられた。これらの結果は、FGF-10が肢芽形成や肺の分岐構造形成を始めとする胎児期の形態形成に重要な役割を持つことを示唆した以前の報告（41,42）を裏付けるものであった。

Subcutaneous mesenteric

P10 P28 P49 P70 P10 P28 P49 P70

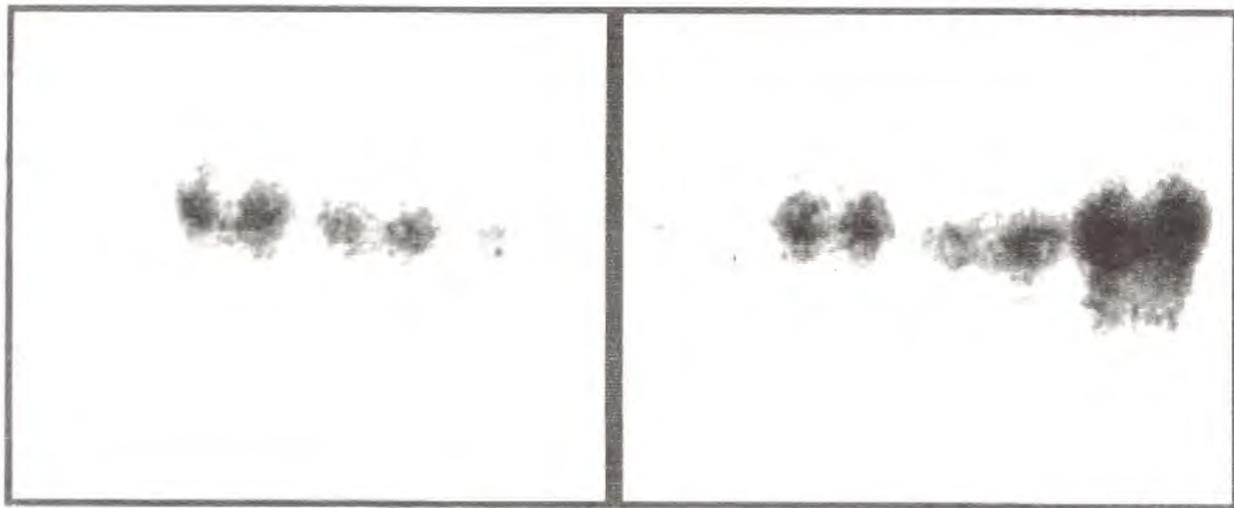


Fig.2-4-1 Expression of FGF-10 mRNA in white adipose tissues during postnatal development.

Aliquots of RNAs (10 μ g) were electrophoresed on a denaturing agarose gel (1%) containing formaldehyde. RNA was transferred onto a nitrocellulose membrane, and hybridization was performed with a 32 P-labeled rat FGF-10 cDNA probe. Lanes P10, P28, P49, and P70 indicate RNA from subcutaneous and mesenteric white adipose tissues at postnatal days 10, 28, 49, and 70, respectively.

A



B



FGF-10^{+/+}



FGF-10^{-/-}

Fig.2-5-1 FGF-10 knockout mouse.

A; Newborn FGF-10^{+/+} (left) and FGF-10^{-/-} (right) pups from side view.
B; Frontal view of thoracic anatomy.

私は、FGF-10が脂肪組織形成に重要な因子であるならば、このKO mouseにおいて脂肪組織に何らかの異常が出ると考え、以下の実験を行った。

1) まず、生後すぐの新生児においてFGF-10 mRNAが脂肪組織にどの程度発現しているのかを調べるために、KO mouseと同系統のC57BL/6系のマウスについてin situ hybridization法でFGF-10 mRNA発現を調べた。

【結果】

FGF-10は、生後すぐのC57BL/6系マウスにおいて、皮膚の直下に存在する白色脂肪組織で発現が見られた (Fig.2-5-2)。その発現は胎児期においてFGF-10が高発現している肺と同程度であり、胎児期においてもFGF-10が脂肪組織に発現していることが分かった。一方、肩胛骨間の褐色脂肪組織では成体と同じくほとんど発現が見られなかった。

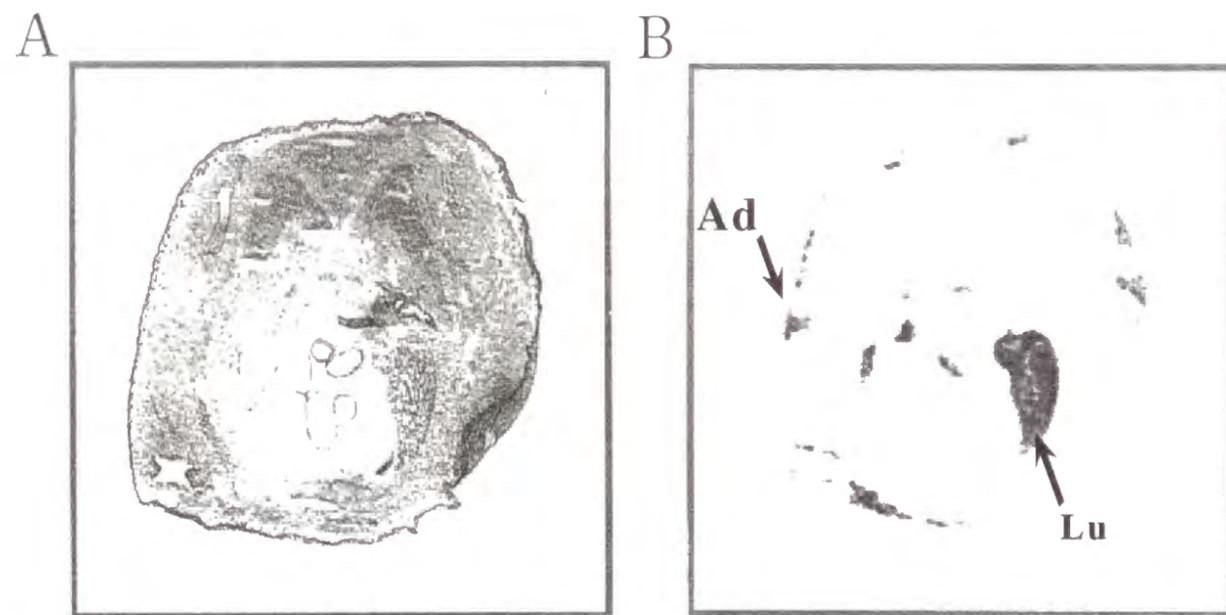


Fig.2-5-2 Expression of FGF-10 mRNA in newborn mouse.

A cross-section of the newborn mouse was hybridized with a ³⁵S-labelled FGF-10 cRNA probe (B). The section was also counterstained with hematoxylin and eosin (A). Ad and Lu indicate the subcutaneous white adipose tissue and lung, respectively.

2) 胎児から新生児にかけての時期の白色脂肪組織においてもFGF-10が発現していることから、FGF-10の欠失は胎児期の脂肪組織に影響を与える可能性が高いと考えられた。このことを確かめるため、FGF-10 KO mouseとwild typeのmouseの皮下脂肪組織の水平方向切片をoil red Oによって脂肪染色し、脂肪組織の大きさや脂肪滴蓄積量に変化があるかどうかを調べた。

【結果】

脂肪組織は大きさ、脂肪滴の蓄積とも、FGF-10 KO mouseでwildに比べて著しく減少しており (Fig.2-5-3)、形成不全を起こしていた。一方、褐色脂肪組織においては白色脂肪組織ほどの形成不全は見られなかった。これは元々褐色脂肪組織にはFGF-10がほとんど発現していないためと考えられる。

以上のことから、FGF-10は白色脂肪組織形成に重要な因子と考えられる。

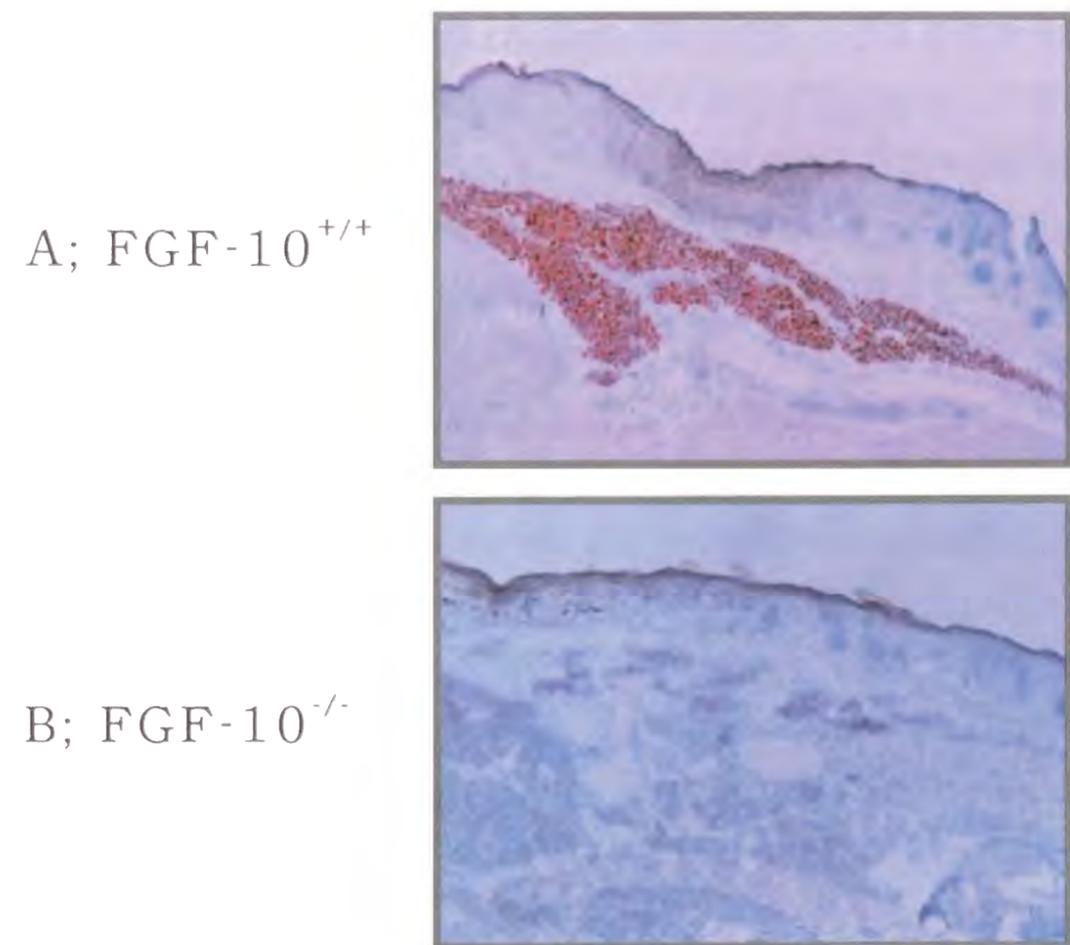


Fig.2-5-3 Oil red O staining of newborn mouse.

A; FGF-10^{+/+}
B; FGF-10^{-/-}

第二章 考察

以上のことから、FGF-10は白色脂肪組織で高発現し、前駆脂肪細胞においてautocrineまたはparacrineに働く前駆脂肪細胞増殖因子と考えられる。

また、FGF-10は脂肪細胞の分化の極初期に前駆脂肪細胞に増殖因子として働く可能性が考えられた。脂肪細胞の分化では、その初期にclonal expansionと呼ばれる一過性に細胞数が増加する時期があることが知られており(49)、前駆脂肪細胞に増殖活性を持つFGF-10が同じく分化初期に一過性に発現亢進することは非常に興味深い現象と考えられる。

そして、離乳後に発現が上昇すること、FGF-10をknockoutすることで脂肪組織の形成不全が起こることから、FGF-10は脂肪組織の形成・発達に関わる因子と考えられた。脂肪組織の過形成は肥満につながり、ひいては高脂血症や糖尿病、動脈硬化など様々な成人病の引き金となる。脂肪組織の形成・発達にFGF-10が関わるならば、これらの疾患の病因の解明や予防・治療に役立つかもしれない。また、最近の研究で高脂血症治療薬として使われているチアゾリジン誘導体がPPAR γ を標的としていることが明らかとなった(66)。この報告から、チアゾリジン誘導体は代謝の活発な若い脂肪細胞数を増やすことで結果的に血中脂質量を低下させるのではないかという仮説が提唱されている。もしこの仮定が真実であれば、前駆脂肪細胞の増殖因子であるFGF-10にも同様の作用があるかもしれない。

このようにFGF-10の脂肪組織における役割は、学術的だけでなく医薬への応用の見地からも非常に興味深いものと期待された。

【第二章：方法】

：第一節の実験法：

1) 脂肪組織におけるNorthern analysis

Wistar系雄ラット(7~8週齢)から摘出した各部脂肪組織(副精巣周辺部、腸間膜周辺部、皮下、肩胛骨間)よりtotal RNAを抽出し、Northern analysisを行った。RNA抽出法並びにNorthern analysisの方法は第一章に記載した方法に準ずる。

：第二節の実験法：

1) 脂肪組織の分画

Rodbellらの方法(67)を基に実験を行った。Wistar系雄ラット(4週齢)から摘出した各脂肪組織(腸間膜周辺部、皮下)を1mg/mlのcollagenase Type I(Worthington biochemical Co.)で消化し、ナイロンメッシュ(Φ 200 μ m)で未消化物を除去した後、300 \times gで2分間遠心し、上部に浮遊している成熟脂肪細胞と下部に沈殿している前駆脂肪細胞画分とに分けた。

2) 分画した細胞のNorthern analysis

第二節の実験法1の方法により得られた細胞から各々total RNAを抽出し、Northern analysisを行った。RNA抽出法並びにNorthern analysisの方法は第一章に記載した方法に準ずる。

3) 脂肪細胞の初代培養

第二節の実験法1の方法により得られた前駆脂肪細胞画分を、M199培地/10% fetal bovine serumを用いて37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下でインキュベートした。24時間後に培地を新しいものに取り替え、プレートに張り付かなかった細胞を除去した。その後、コンフルエントになるまで培養し各実験に使用した。

4) 脂肪細胞の分化誘導とRT-PCRによる遺伝子発現の検討

第二節の実験法1.の方法により得られた前駆脂肪細胞を35mm dishに1600,000cells/dishづつまき、第二節の実験法3.の方法で培養した。二日間培養しコンフルエントに達した時点で、 $0.2 \mu\text{M}$ Insulin / $0.25 \mu\text{M}$ Dexamethasone / 0.5mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)を加えたM199培地/10% fetal bovine serumに取り替え、分化誘導をかけた。48時間後に再びM199培地/10% fetal bovine serumに交換し、以降二日に一度培地を交換した。

この方法に基づき培養と分化誘導を行い、培養開始から0日目・2日目・3日目・4日目・6日目・8日目の各過程において細胞からRNAを抽出した。まず、35mm dishから培地を除去し、PBSで二回洗浄した後にセルスクレイパーを用いて細胞をプレートから剥がし、Quick Prep total RNA extraction kit (Pharmacia Biotech)を用いてtotal RNAを抽出した。

得られたtotal RNA ($1 \mu\text{g}$) から、第一章第一節の実験法1.の方法でcDNAを合成し、PPAR γ (5'-GAGATGGAATTCTGGCCCACCAACTTCGG-3'、及び5'-TATCATAAATAAGCTTCAATCGGATGGTTC-3')、レプチン (5'-TGCTCCAGCAGCTGCAAGGT-3'、及び5'-GAAGAATGTCCTGCAGAGAG-3')、FGF-10 (5'-CTTCCAGTATGTTCTTCTG-3'、及び5'-GGCAAAGAGTCATTGGTTGT-3')の各特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。

：第三節の実験法：

1) FGFR-2の脂肪細胞における発現分布

Miyakeらによる実験法 (68) に基づいて実験を行った。第二節の実験法1.の方法で抽出したtotal RNAを第一節の実験法1.の方法でcDNA合成し、FGFR-2b/FGFR-2c共通プライマー (5'-CAGCCCCACATCCAGTGGAT-3'及び5'-TTGGATCCTCTGGCAACTCG-3')でRT-PCRを行った。増幅したPCR産物は制限酵素Hae IIIで 37°C 18時間消化後、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動による分離を行った。

2) WST-1アッセイを用いたFGF-10の細胞増殖活性の検討

第二節の実験法1.の方法により得られた前駆脂肪細胞を96穴プレートに

3000cells/wellになるようにまき、無血清のM199培地で20時間培養後、0.1% fetal bovine serumを含むM199培地にFGF-10蛋白を0~25ng/ml添加し、 37°C 、5% CO_2 下で三日間培養した。その後、well内の生細胞数をWST-1 cell counting kit (Wako)で測定した。

：第四節の実験法：

1) 生後の脂肪組織のNorthern analysis

生後10日齢、四週齢、七週齢、十週齢のWistar系雄ラットの腸間膜及び皮下の脂肪組織よりtotal RNAを抽出し、Northern analysisを行った。RNA抽出法並びにNorthern analysisの方法は第一章に記載した方法に準ずる。

：第五節の実験法：

1) in situ hybridizationによるFGF-10遺伝子の新生児の発現の検討

FGF-10 KO mouse作成に使用したC57BL/6系マウスの誕生直後の個体を水平方向の新鮮凍結切片とし、in situ hybridization法によりFGF-10 mRNAの発現を調べた。in situ hybridization法は第一章に記載した方法に準ずる。

2) oil red Oによる脂肪染色

FGF-10 KO mouseおよびそのwild typeの誕生直後の個体を水平方向の新鮮凍結切片とした。切片は、ゼラチンコーティングしたスライドグラス上に張り付けた。この切片の内、皮下脂肪組織を含むものを15%ホルマリン/PBSで20分固定後、純水で30秒、60% isopropanolで1分洗浄し、oil red O液 (0.18% oil red O/60% isopropanol) につけ 37°C で10分インキュベートした。その後、60% isopropanolで2分、純水で3分洗浄した後にヘマトキシリンで対比染色を行い、飽和 Li_2CO_3 で色出しした後に封入した。

【結語】

私は、ラットより新規FGFであるFGF-10を単離し、これの生理的意義を解明する研究を通じて以下のような新しい知見を得た。

1. 今回新規に単離されたFGFであるFGF-10は215アミノ酸からなり、N末端側に36アミノ酸からなる分泌蛋白であった。
2. FGF-10は、アミノ酸配列の類似性、増殖活性の細胞特異性などから、FGF-7サブファミリーの一員であると考えられた。
3. FGF-10は、胎児期においては色々な組織に高発現していたが、成体期には肺と脂肪細胞にのみ特異的な発現を示した。なかでも白色脂肪組織で特に高発現しているユニークな因子であった。
4. FGF-10は脂肪組織において、分化初期に一過性に発現し、前駆脂肪細胞でautocrineもしくはparacrineに働き、その増殖を司ると考えられた。また、脂肪細胞のclonal expansionの時期とFGF-10遺伝子発現の亢進する時期が似通っていることから両者に何らかの関係があることが期待された。
5. FGF-10は、離乳後の脂肪組織発達に伴い発現が上昇することやFGF-10の欠失が脂肪組織の形成不全を引き起こすことから、脂肪組織の形成、発達に関与する因子であると考えられた。

FGF-10は、脂肪組織特異的に発現する新たな増殖因子であり、脂肪組織形成/発達に重要な因子でもある。このことから、FGF-10は新たな生体内機能の解明という学術的な意味だけでなく、肥満やそれに伴う成人病の成因の解明やその予防や治療と言った医学的な意味でも、非常に興味深い因子であると考えられた。

【謝辞】

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学薬学部伊藤信行教授に深く感謝いたします。

また、共同研究において多大なご協力を頂きました東京大学分子細胞生物学研究所の加藤茂明教授、並びに住友製薬総合研究所および米国Amgen社の皆様に心から感謝の意を表します。

更に、多くの貴重なご助言を賜りました京都大学医学部の中尾一和教授、神戸大学医学部の小川渉助手に厚くお礼申し上げます。

また、本研究において公私に亘るご協力を頂いた京都大学薬学部の大内淑代助教授、並びに三宅歩博士、江本尚代修士、浅木敏之学士をはじめとする京都大学薬学部遺伝子薬学分野の方々に深く感謝いたします。

【発表論文目録】

本研究の一部は以下の論文に公表した。

"Structure and Expression of the Rat mRNA Encoding a Novel Member of the Fibroblast Growth Factor Family."

Yamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S., and Itoh, N.

The Journal of Biological Chemistry 271, 15918-15921 (1996)

"Structure and Expression of Human Fibroblast Growth Factor-10"

Emoto, H., Tagashira, S., Mattei, MG., Yamasaki, M., Hashimoto, G., Katsumata, T., Negoro, T., Nakatsuka, M., Birnbaum, D., Coulier, F., and Itoh, N.

The Journal of Biological Chemistry 272, 23191-23194 (1997)

"FGF-10 is a growth factor for preadipocytes in white adipose tissue."

Yamasaki, M., Emoto, H., Konishi, M., Mikami, T., Ohuchi, H., Nakao, K., and Itoh, N.

Biochemical and Biophysical Research Communication 258, 109-112 (1999)

"Fgf10 is essential for limb and lung formation."

Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., and Kato, S.

Nature genetics 21, 138-141 (1999)

【引用文献】

1. Baird, A. and Klagsbrun, M. *Cancer Cells* 3, 239-243 (1991)
2. Burgess, W.H. and Maciag, T. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 575-606 (1989)
3. Dickson, C., Fuller-Pace, F., Kiefer, P., Acland, P., MacAllan, D. and Peters, G. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 638, 18-26 (1991)
4. Yoshida, T., Sakamoto, H., Miyagawa, K. and Sugimura, T. & Takeda, M. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 638, 27-37 (1991)
5. Goldfaub, M., Bates, B., Ducker, B., Hardin, J., and Haub, O. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 638, 38-52 (1991)
6. Coulier, F., Ollendorff, V., Marics, I., Rosnet, O., Botoz, M., Plamche, J., Marchetto, S., Pebusque, M-J., deLapeyriere, O., and Birnbaum, D. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 638, 53-61 (1991)
7. Aaronson, S. A., Bottaro, D. P., Miki, T., Ron, D., Finch, P.W., Fleming, T. P., Ahn, J., Taylor, W. G. and Rubi, J. S. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 638, 62-77 (1991)
8. Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, M., Sato, B., Matuo, H. and Matsumoto, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8928-8932 (1992)
9. Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T. and Kurokawa, T. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4251-4259 (1993)
10. Yamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S. and Itoh, N. *J. Biol. Chem.* 271, 15918-15921 (1996)
11. Smallwood, PM., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, JP., Hendry, SH., Gilbert, DJ., Copeland, NG., Jenkins, NA. and Nathans, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9850-9857 (1996)
12. McWhirter, JR., Goulding, M., Weiner, JA., Chun, J. and Murre, C. *Development* 124, 3221-3232 (1997)
13. Miyake, A., Konishi, M, Martin, FH., Hernday, NA., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, T., Arakawa, T. and Itoh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 148-152 (1998)

14. Hoshikawa, M., Ohbayashi, N., Yonamine, A., Konishi, M., Ozaki, K., Fukui, S. and Itoh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 187-191 (1998)
15. Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Kimura, S., Yamasaki, M., Fukui, S. and Itoh N. *J. Biol. Chem.* 273, 18161-18164 (1998)
16. Nishimura, T., Utsunomiya, Y., Hoshikawa, M., Ohuchi, H. and Itoh, N. *Biochim. Biophys. Acta.* 1444, 148-151 (1999)
17. Cuevas, P., Martinez-Coso, V., Fu, X., Orte, L., Reimers, D., Gimenez-Gallego, G., Forssmann, WG. and Saenz, De, Tejada, I. *Eur. J. Med. Res.* 4, 403-410 (1999)
18. Takahama, Y., Ochiya, T., Tanooka, H., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Nakano, H. and Terada, M. *Oncogene* 18, 5943-5947 (1999)
19. Fu, X., Cuevas, P., Gimenez-Gallego, G., Wang, Y. and Sheng, Z. *Chin Med J (Engl)* 111, 398-403 (1998)
20. Funato, N., Moriyama, K., Baba, Y. and Kuroda, T. *J. Dent. Res.* 78, 1511-1517 (1999)
21. Ma, TY., Kikuchi, M., Sarfeh, IJ., Shimada, H., Hoa, NT. and Tarnawski, AS. *J. Lab. Clin. Med.* 134, 363-371 (1999)
22. Jacques, TS., Skepper, JN. and Navaratnam, V. *Neurosci. Lett.* 276, 197-200 (1999)
23. Eclancher, F., Kehrli, P., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. *Brain. Res.* 737, 201-214 (1996)
24. Werner, S., Peters, KG., Longaker, MT., Fuller-Pace, F., Banda, MJ. and Williams, LT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6896-6900 (1992)
25. Benharroch, D. and Birnbaum, D. *Isr. J. Med. Sci.* 26, 212-219 (1990)
26. Bocci, G., Danesi, R., Benelli, U., Innocenti, F., Di, Paolo, A., Fogli, S. and Del, Tacca, M. *Cancer Chemother Pharmacol* 43, 205-212 (1999)
27. Weinstein, DC, Marden, J., Carnevali, F. and Hemmati-Brivanlou, A. *Nature* 394, 904-908 (1998)
28. Cornell, RA., Musci, TJ. and Kimelman, D. *Development* 121, 2429-2437 (1995)

29. Sugi, Y. and Lough, J. *Dev. Biol.* 168, 567-574 (1995)
30. Goldfarb, M. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 311-325 (1996)
31. Martin, GR. *Genes Dev.* 12, 1571-1586 (1998)
32. Ay, H., Ay, I., Koroshetz, WJ. and Finklestein, SP. *Cerebrovasc Dis.* 9, 131-135 (1999)
33. Bauters, C. *Clin. Cardiol.* 20, II-52-57 (1997)
34. Lammie, GA., Fantl, V., Smith, R., Schuuring, E., Brookes, S., Michalides, R., Dickson, C., Arnold, A. and Peters, G. *Oncogene* 6, 439-444 (1991)
35. Benharroch, D. and Birnbaum, D. *Isr. J. Med. Sci.* 26, 212-219 (1990)
36. Walicke, P., Cowan, WM., Ueno, N., Baird, A. and Guillemin, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3012-3016 (1986)
37. von, Heijne, G. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690 (1986)
38. Mason, IJ., Fuller-Pace, F., Smith, R. and Dickson, C. *Mech. Dev.* 45, 15-30 (1994)
39. Krakowski, ML., Kritzik, MR., Jones, EM., Krahl, T., Lee, J., Arnush, M., Gu, D. and Sarvetnick, N. *Am J Pathol* 154, 683-691 (1999)
40. Housley, RM., Morris, CF., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, JE., Aukerman, SL., Devine, PL., Whitehead, RH. and Pierce, GF. *J. Clin. Invest.* 94, 1764-1777 (1994)
41. Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N. and Noji, S. *Development* 124, 2235-2244 (1997)
42. Bellusci, S., Grindley, J., Emoto, H., Itoh, N. and Hogan, BL. *Development* 124, 4867-4878 (1997)
43. Mantzoros, CS. *Ann. Intern. Med.* 130, 671-680 (1999)
44. Shimomura, I., Funahashi, T., Takahashi, M., Maeda, K., Kotani, K., Nakamura, T., Yamashita, S., Miura, M., Fukuda, Y., Takemura, K., Tokunaga, K. and Matsuzawa, Y. *Nat. Med.* 2, 800-803 (1996)
45. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, JM. *Nature* 372, 425-432 (1994)

46. Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, LA., Woolf, EA., Weng, X., Ellis, SJ., Lakey, ND., Culpepper, J., Moore, KJ., Breitbart, RE., Duyk, GM., Tepper, RI. and Morgenstern, JP. *Cell* 84, 491-495 (1996)
47. Ailhaud, G., Grimaldi, P. and Negrel, R. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 207-233 (1992)
48. Gregoire, FM., Smas, CM. and Sul, HS. *Physiol. Rev.* 78, 783-809 (1998)
49. Funahashi, T., Nakamura, T., Shimomura, I., Maeda, K., Kuriyama, H., Takahashi, M., Arita, Y., Kihara, S. and Matsuzawa, Y. *Intern. Med.* 38, 202-206 (1999)
50. Giralt, M., Martin, I., Iglesias, R., Vinas, O., Villarroya, F. and Mampel, T. *Eur. J. Biochem.* 193, 297-302 (1990)
51. Loftus, TM. and Lane, MD. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 603-608 (1997)
52. Ogawa, Y., Masuzaki, H., Isse, N., Okazaki, T., Mori, K., Shigemoto, M., Satoh, N., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T., and Nakao K. *J. Clin. Invest.* 96, 1647-1652 (1995)
53. Cowherd, RM., Lyle, RE. and McGehee, RE, Jr. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10, 3-10 (1999)
54. Ruta, M., Howk, R., Ricca, G., Drohan, W., Zabelshansky, M., Laureys, G., Barton, D. E., Francke, U., Schlessinger, J. and Givol, D. *Oncogene* 3, 9-15 (1988)
55. Isacchi, A., Bergonzoni, L. and Sarmientos, P. *Nucleic. Acids. Res.* 18, 1906 (1990)
56. Itoh, N., Terachi, T., Ohta, M. and Seo, MK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 680-685 (1990)
57. Johnson, DE., Lee, PL., Lu, J. and Williams, LT. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4728-4736 (1990)
58. Dionne, CA., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, JM., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, WH., Jaye, M. and Schlessinger, J. *EMBO. J.* 9, 2685-2692 (1990)
59. Hattori, Y., Odagiri, H., Nakatani, H., Miyagawa, K., Naito, K., Sakamoto, H., Katoh, O., Yoshida, T., Sugimura, T. and Terada, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5983-5987 (1990)

60. Keegan, K., Johnson, DE., Williams, LT. and Hayman, MJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1095-1099 (1991)
61. Wanaka, A., Johnson, EM. Jr and Milbrandt, J. *Neuron.* 5, 267-281 (1988)
62. Partanen, J., Makela, T. P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson, W. L., and Alitalo, K. *EMBO J.* 10, 1347-1354 (1991)
63. Luo, Y., Lu, W., Mohamedali, KA., Jang, JH., Jones, RB., Gabriel, JL., Kan, M. and McKeehan, WL. *Biochemistry.* 37, 16506-16515 (1998)
64. Greenwood, M. R. C. and Hirsch, J. J. *Lipid Res.* 15, 474-483 (1974)
65. Girard, J., Ferre, P., Pegorier, JP. and Duee, PH. *Physiol. Rev.* 72, 507-562 (1992)
66. Lehmann, JM., Moore, LB., Smith-Oliver, TA., Wilkison, WO., Willson, TM. and Kliewer, SA. *J. Biol. Chem.* 270, 12953-12956 (1995)
67. Rodbell, M. *J. Biol. Chem.* 239, 173-181 (1964)
68. Miyake, A., Hattori, Y., Ohta, M. and Itoh, N. *J. Neurosci. Res.* 45, 534-541 (1996)