

氏名	なか やま よし あき 中山 喜 明
学位(専攻分野)	博士 (薬学)
学位記番号	薬博第646号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	ゼブラフィッシュ <i>Fgf19</i> の同定と眼形成におけるその役割

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤 信行 教授 中山 和久 教授 竹島 浩

論文内容の要旨

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor, Fgf) は、線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に対し、増殖活性や分化誘導などの多様な生物活性をもつ細胞間シグナル因子である。これまでに Fgf が成体で血管新生、創傷治癒、神経細胞生存維持、胎児期で四肢形成、中胚葉誘導、脳形成に関与していることが明らかにされており、これらの知見が遺伝子治療や再生医療の分野で応用されている。

現在 Fgf ファミリーとしては22種類の Fgf がヒト及びマウスにおいてそれぞれ同定されており、このうち *Fgf10*, *Fgf16* ~23の9種類の Fgf は申請者の所属研究室で単離、同定されている。マウス *Fgf15* は染色体上の近傍の遺伝子配列やそのアミノ酸配列の相同性が高いことから、ヒト FGF19 のマウス相同遺伝子であることが同定されている。これらヒト FGF19 及びマウス *Fgf15* はいずれも胎生期の脳及び眼に発現していることが他のグループにより報告されている。しかし、*Fgf15* ノックアウトマウスが胎生12.5日以降にほとんど死亡するため、胎生期におけるその役割は明らかにされていない。そこで、申請者は母体外で受精し、発生が早いことから発生過程の観察が容易であり、標的遺伝子の機能阻害実験が容易に行えるゼブラフィッシュを実験動物として用い、胎生期における *Fgf19* の機能解析を試みた。

第一章 ゼブラフィッシュ *Fgf19* の同定、胎生期における発現パターン解析及び *Fgf19* の機能解析

ゼブラフィッシュゲノムデータベースに対し、ヒト FGF19 のアミノ酸配列をもとに BLAST 検索を行い、ゼブラフィッシュ *Fgf19* 相同体の候補遺伝子を得た。この遺伝子の翻訳配列はヒト FGF ファミリーのうち、ヒト FGF19 と最も高い相同性を示した。また、ゼブラフィッシュ染色体上におけるこの遺伝子の近傍の遺伝子配列は、ヒト染色体における *FGF19* の近傍の遺伝子配列とよく類似していた。これらのことから、今回得られた新規遺伝子をヒト *FGF19* のゼブラフィッシュ相同体と同定した。

ゼブラフィッシュ *Fgf19* の発生過程における発現パターンを検討したところ、胎生期の脳や眼、耳胞等で発現していた。この発現パターンは、マウスの胎生期における発現パターンと類似していることから、種を超えてその機能が保存されていると考えられる。そこで、モルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた機能阻害実験を行うことにより、*Fgf19* の発生過程での機能を検討した。その結果、*Fgf19* 機能阻害胚では脳や眼の形態に異常がみられた。以上の結果から、*Fgf19* が発生過程において脳や眼の形成に必要であることを明らかにした。

第二章 網膜形成における *Fgf19* の役割の検討

Fgf シグナルは網膜領域において細胞増殖細胞生存維持、神経分化、網膜前後軸決定に関与していることが様々な実験により示唆されているが、その具体的な Fgf リガンドについてはほとんどわかっていなかった。上記の実験により *Fgf19* が胎生期の網膜に発現し、さらに *Fgf19* 機能阻害胚では網膜の形態に異常が認められたことから、*Fgf19* が網膜形成において機能する Fgf リガンドであると考えられた。そこで申請者は *Fgf19* の網膜形成における詳細な機能解析を行った。

Fgf19 機能阻害胚では野生型と比較して網膜が縮小していたことから、*Fgf19* が細胞増殖活性や細胞生存維持活性を有し

ていることが予想された。そこで *Fgf19* 機能阻害胚の網膜領域における細胞増殖と細胞死の検出を行った。その結果、*Fgf19* が発生過程の網膜領域において細胞増殖には関与せず、細胞生存維持に必要であることを明らかにした。これまでに *Fgf* シグナルが網膜神経分化に関与していると報告されている。そこで *Fgf19* 機能阻害胚での網膜神経細胞の分化及び層構造形成について検討を行ったところ、発生過程において *Fgf19* は網膜神経の分化や層構造形成に関与していないことが示された。さらに上記の研究より、*Fgf19* は網膜前方領域に強い発現がみられ、*Fgf19* が網膜の前後軸決定に関与していると期待されることから、*Fgf19* の網膜の前後軸決定に対する影響を検討した。その結果、網膜に発現する *Fgf19* が網膜前方領域の特性決定に必要であることを明らかにした。この網膜の前後軸決定は発生後期の網膜から中脳視蓋への視神経の投射パターンに関与することが明らかにされている。そこで *Fgf19* 機能阻害胚における視神経投射パターンについて検討を行ったところ、視神経の投射パターンに異常が認められた。以上の結果から、*Fgf19* は網膜形成過程において細胞生存維持と網膜の前後軸決定に関与していることを明らかにした。

第三章 網膜形成における *Fgf* 受容体の役割の検討

上記の研究により *Fgf19* が網膜形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。*Fgf* は細胞膜上の 4 種類の *Fgf* 受容体 (*Fgfr1*~*Fgfr4*) に結合してはじめてその作用をおよぼすことができる。そこで申請者は網膜の前後軸決定において機能する *Fgf* 受容体の検討を行った。

4 種類のゼブラフィッシュ *Fgfr* 遺伝子を単離し、網膜形成過程における発現パターンを検討したところ、*Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr4* の発現が検出された。そこでこれら 3 種の *Fgfr* の機能阻害胚を作成し、*Fgfr* の網膜の前後軸決定に対する影響を確認した。*Fgfr1* とその結果、*Fgfr1*, *Fgfr4* が網膜の前後軸決定に必要であることが明らかになった。

以上の通り、申請者は *Fgf19* が網膜形成過程において網膜領域に発現していること、また、網膜の細胞生存維持と前後軸決定に必要であることを明らかにした。本研究は、網膜形成機構の解明およびの網膜神経変性疾患の原因解明に有用な知見を提供するものと期待される。

論文審査の結果の要旨

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor, *Fgf*) は、線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に対し、増殖活性や分化誘導などの多様な生物活性をもつ細胞間シグナル因子である。これまでに *Fgf* が成体で血管新生、創傷治癒、神経細胞生存維持、胎児期で四肢形成、中胚葉誘導、脳形成に関与していることが明らかにされており、これらの知見が遺伝子治療や再生医療の分野で応用されている。

現在 *Fgf* ファミリーとしては 22 種類の *Fgf* がヒト及びマウスにおいてそれぞれ同定されている。*Fgf19* ノックアウトマウスが胎生 12.5 日以降にほとんど死亡するため、胎生期におけるその役割は明らかにされていない。そこで、申請者は母体外で受精し、発生が早いことから発生過程の観察が容易であり、標的遺伝子の機能阻害実験が容易に行えるゼブラフィッシュを実験動物として用い、胎生期における *Fgf19* の機能解析を試みた。

ゼブラフィッシュゲノムデータベースに対し、ヒト *FGF19* のアミノ酸配列をもとに BLAST 検索を行い、ゼブラフィッシュ *Fgf19* 相同体を得た。ゼブラフィッシュ *Fgf19* の発生過程における発現パターンを検討したところ、胎生期の脳や眼、耳胞等で発現していた。そこで、モルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた機能阻害実験を行うことにより、*Fgf19* の発生過程での機能を検討した。その結果、*Fgf19* 機能阻害胚では脳や眼の形態に異常がみられた。

Fgf19 機能阻害胚では野生型と比較して網膜が縮小していたことから、*Fgf19* が細胞増殖活性や細胞生存維持活性を有していることが予想された。そこで *Fgf19* 機能阻害胚の網膜領域における細胞増殖と細胞死の検出を行った。その結果、*Fgf19* が発生過程の網膜領域において細胞増殖には関与せず、細胞生存維持に必要であることを明らかにした。これまでに *Fgf* シグナルが網膜神経分化に関与していると報告されている。そこで *Fgf19* 機能阻害胚での網膜神経細胞の分化及び層構造形成について検討を行ったところ、発生過程において *Fgf19* は網膜神経の分化や層構造形成に関与していないことが示された。さらに上記の研究より、*Fgf19* は網膜前方領域に強い発現がみられ、*Fgf19* が網膜の前後軸決定に関与していると期待されることから、*Fgf19* の網膜の前後軸決定に対する影響を検討した。その結果、網膜に発現する *Fgf19* が網膜前方領域の特性決定に必要であることを明らかにした。さらに、*Fgf19* は網膜形成過程において細胞生存維持と網膜の前後軸決定

に關与していることを明らかにした。

Fgfは細胞膜上の4種類のFgf受容体(Fgfr1~Fgfr4)に結合してはじめてその作用をおよぼすことができる。そこで申請者は網膜の前後軸決定において機能する4種類のゼブラフィッシュ*Fgfr*遺伝子を単離し、網膜形成過程における発現パターンを検討したところ、*Fgfr1*、*Fgfr2*、*Fgfr4*の発現が検出された。そこでこれら3種の*Fgfr*の機能阻害胚を作成し、*Fgfr*の網膜の前後軸決定に対する影響を確認した。その結果、*Fgfr1*、*Fgfr4*が網膜の前後軸決定に必要であることが明らかになった。

以上、申請者は*Fgf19*が網膜形成過程において網膜領域に発現していること、また、網膜の細胞生存維持と前後軸決定に必要であることを明らかにした。本研究は、網膜形成機構の解明およびの網膜神経変性疾患の原因解明に有用な知見を提供するものと期待される。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。