

氏名	あさきとしゆき 浅木敏之
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第567号
学位授与の日付	平成17年3月23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	脂肪組織形成におけるFgf10の役割の解明

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤信行 教授 川崎敏祐 教授 中山和久

論文内容の要旨

Fgf (Fibroblast growth factor) は、線維芽細胞のみならず様々な細胞の増殖、分化に関与する多機能性細胞間シグナル因子である。アミノ酸配列上での相同性から、現在ほ乳類では22種類のメンバーからなるファミリーを構成している。多くのFgfは、胎児期、成体期において時間的あるいは空間的に限局した発現パターンを示し、特定の時期に特定の場所において、細胞増殖因子としてだけでなく、各種器官の損傷修復、皮膚の創傷治癒、血管新生、胎児期での中胚葉誘導、筋発生、四肢形成など様々な生理活性を発揮することが知られている。その中で、Fgf10は成体ラットでは肺と脂肪組織に高発現していることが示されていた。申請者らは、Fgf10の生理的な機能を探るためFgf10遺伝子欠損マウス(Fgf10 KO)を作成、解析したところ、胎児において脂肪組織の著しい形成不全が生じていた。そこで申請者は、脂肪組織形成過程での細胞増殖、分化におけるFgf10の役割の解明を目的に、本研究を行った。

第一章 脂肪細胞におけるFgf10の発現と生理的役割

Fgf10 KOは四肢および肺の欠損を示し、呼吸不全により出生直後に死亡する。Fgf10 KOの新生児において、脂肪組織を解析した。その結果、脂肪細胞数、脂肪滴の貯留ともに野生型に比べて著しく減少し、脂肪組織の形成不全が認められた。そこで脂肪組織におけるFgf10の発現を詳細に解析したところ、Fgf10は未分化な前駆脂肪細胞に特異的に高発現していた。脂肪細胞分化のモデルとして使用される胚性線維芽細胞(MEF)を用いた検討でも、Fgf10は脂肪分化初期に一過性に高発現し、分化初期に見られる一過性の細胞増殖とも時期的にはほぼ一致した。これらの結果から、Fgf10が生体内で前駆脂肪細胞に高発現し、脂肪細胞の増殖と分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

第二章 脂肪細胞増殖におけるFgf10の役割

申請者は、脂肪細胞増殖にFgf10が重要な役割を果たしていると考え、検討を行った。まず増殖マーカー、PCNAを用いて増殖活性を検討したところ、Fgf10 KOではPCNA陽性細胞の割合が野生型の半分程度に減少していた。さらに胚性線維芽細胞に対し、Fgf10は濃度依存的に細胞増殖を亢進した。Fgfの主要な細胞内シグナリングとしてMAPキナーゼ(MAPK)経路が報告されている。そこで、Fgf10による脂肪細胞増殖でのERKおよびp38MAPKの関与について検討した。Fgf10はERK、p38MAPKのリン酸化を亢進した。またERK、p38MAPK阻害剤により、Fgf10の脂肪細胞増殖活性はどちらもほぼ完全に阻害された。さらに細胞周期に関与する下流因子としてRbタンパクが知られている。そこで、Fgf10がMAPK活性化ののちRbタンパクのリン酸化を介して脂肪細胞増殖を亢進する可能性を考え、検討を行った。Fgf10はRbおよびp130(Rb2)をリン酸化した。またこれらのリン酸化は、ERK、p38MAPK阻害剤のうち、Rbは両者、p130はERK阻害剤によって強力に抑制された。これらの結果から、Fgf10はMAPKリン酸化ののちRbタンパクのリン酸化を介して、脂肪細胞を増殖させることが示唆された。

第三章 脂肪細胞分化におけるFgf10の役割

次に脂肪細胞分化におけるFgf10の役割に関して検討を行った。まず胎児期の脂肪組織形成過程において、Fgf10および

転写因子群の発現を検討したところ、Fgf10とC/EBP α は共に初期段階から発現し、その後脂肪滴の貯留とともにPPAR γ 、C/EBP β の発現が誘導された。この転写因子群の発現様式は従来 *in vitro*での研究から提唱されてきた脂肪分化モデルとは大きく異なっていた。さらにFgf10 KOの脂肪組織において転写因子群の発現を検討した。するとC/EBP β 、PPAR γ の発現が著しく減少していたが、C/EBP α の発現は維持されていた。一方、C/EBP α 遺伝子欠損マウス (C/EBP α KO)でも同様の解析を行った。C/EBP α KOでもC/EBP β 、PPAR γ の発現が著しく減少していたが、Fgf10の発現は維持されていた。これらの結果から、*in vivo*においては従来の *in vitro*モデルと異なり、Fgf10はC/EBP α とともに脂肪細胞分化の初期から独立して発現し、その後両者が協調してC/EBP β 、PPAR γ の発現を誘導することにより脂肪細胞は分化していると考えられる。

以上、本研究より、Fgf10は生体内において前駆脂肪細胞に高発現し、MAPK経路の活性化ののちRbタンパクのリン酸化を介して前駆脂肪細胞の増殖を誘導すること、また転写因子C/EBP α とともに転写因子群の発現を誘導し脂肪細胞分化の進行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、*in vivo*での脂肪細胞分化の分子機構が、従来の *in vitro*モデルとは大きく異なることも明らかとなった。本研究は脂肪組織形成の研究、ひいては肥満症関連の研究・治療に重要な知見を提供すると期待される。

論文審査の結果の要旨

Fgf (Fibroblast growth factor) は、線維芽細胞のみならず様々な細胞の増殖、分化に関与する多機能性細胞間シグナル因子である。アミノ酸配列上での相同性から、現在ほ乳類では22種類のメンバーからなるファミリーを構成している。多くのFgfは、胎児期、成体期において時間的あるいは空間的に限局した発現パターンを示し、特定の時期に特定の場所において、細胞増殖因子としてだけでなく、各種器官の損傷修復、皮膚の創傷治癒、血管新生、胎児期での中胚葉誘導、筋発生、四肢形成など様々な生理活性を発揮することが知られている。その中で、Fgf10は成体ラットでは肺と脂肪組織に高発現していることが示されていた。申請者は、Fgf10の生理的な機能を探るためFgf10 遺伝子欠損マウス (Fgf10 KO) を作成、解析したところ、胎児において脂肪組織の著しい形成不全が生じていた。そこで申請者は、脂肪組織形成過程での細胞増殖、分化におけるFgf10の役割の解明を目的に、本研究を行った。

Fgf10 KOは四肢および肺の欠損を示し、呼吸不全により出生直後に死亡する。Fgf10 KOの新生児において、脂肪組織を解析した。その結果、脂肪細胞数、脂肪滴の貯留ともに野生型に比べて著しく減少し、脂肪組織の形成不全が認められた。そこで脂肪組織におけるFgf10の発現を詳細に解析したところ、Fgf10は未分化な前駆脂肪細胞に特異的に高発現していた。脂肪細胞分化のモデルとして使用される胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた検討でも、Fgf10は脂肪分化初期に一過性に高発現し、分化初期に見られる一過性の細胞増殖とも時期的にはほぼ一致した。これらの結果から、Fgf10が生体内で前駆脂肪細胞に高発現し、脂肪細胞の増殖と分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

申請者は、脂肪細胞増殖にFgf10が重要な役割を果たしていると考え、検討を行った。まず増殖マーカー、PCNAを用いて増殖活性を検討したところ、Fgf10 KOではPCNA陽性細胞の割合が野生型の半分程度に減少していた。さらに胚性線維芽細胞に対し、Fgf10は濃度依存的に細胞増殖を亢進した。Fgfの主要な細胞内シグナリングとしてMAPキナーゼ (MAPK) 経路が報告されている。そこで、Fgf10による脂肪細胞増殖でのERKおよびp38MAPKの関与について検討した。Fgf10はERK、p38MAPKのリン酸化を亢進した。またERK、p38MAPK阻害剤により、Fgf10の脂肪細胞増殖活性はどちらもほぼ完全に阻害された。さらに細胞周期に関与する下流因子としてRbタンパクが知られている。そこで、Fgf10がMAPK活性化ののち、Rbタンパクのリン酸化を介して脂肪細胞増殖を亢進する可能性を考え、検討を行った。Fgf10はRbおよびp130 (Rb2) をリン酸化した。またこれらのリン酸化は、ERK、p38MAPK阻害剤のうち、Rbは両者、p130はERK阻害剤によって強力に抑制された。これらの結果から、Fgf10はMAPKリン酸化ののちRbタンパクのリン酸化を介して、脂肪細胞を増殖させることが示唆された。

次に脂肪細胞分化におけるFgf10の役割に関して検討を行った。まず胎児期の脂肪組織形成過程において、Fgf10および転写因子群の発現を検討したところ、Fgf10とC/EBP α は共に初期段階から発現し、その後脂肪滴の貯留とともにPPAR γ 、C/EBP β の発現が誘導された。この転写因子群の発現様式は従来 *in vitro*での研究から提唱されてきた脂肪分化モデルと

は大きく異なっていた。さらに *Fgf10* KO の脂肪組織において転写因子群の発現を検討した。すると *C/EBPβ*, *PPARγ* の発現が著しく減少していたが、*C/EBPα* の発現は維持されていた。一方、*C/EBPα* 遺伝子欠損マウス (*C/EBPα* KO) でも同様の解析を行った。*C/EBPα* KO でも *C/EBPβ*, *PPARγ* の発現が著しく減少していたが、*Fgf10* の発現は維持されていた。これらの結果から、*in vivo* においては従来の *in vitro* モデルと異なり、*Fgf10* は *C/EBPα* とともに脂肪細胞分化の初期から独立して発現し、その後両者が協調して *C/EBPβ*, *PPARγ* の発現を誘導することにより脂肪細胞は分化していると考えられる。

以上、本研究より、*Fgf10* は生体内において前駆脂肪細胞に高発現し、MAPK 経路の活性化ののち Rb タンパクのリン酸化を介して前駆脂肪細胞の増殖を誘導すること、また転写因子 *C/EBPα* とともに転写因子群の発現を誘導し脂肪細胞分化の進行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、*in vivo* での脂肪細胞分化の分子機構が、従来の *in vitro* モデルとは大きく異なることも明らかとなった。本研究は脂肪組織形成の研究、ひいては肥満症関連の研究・治療に重要な知見を提供すると期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月1日に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。