

氏 名	おお まち しげ き 大 町 成 樹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 515 号
学位授与の日付	平 成 15 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	中脳黒質に特異的に発現する神経栄養因子, FGF-20 の構造と生理的 意義に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

FGF (fibroblast growth factor) は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞の増殖や分化に関与する増殖因子である。FGF は生体内において広範囲に発現しており、単なる細胞増殖因子としての作用だけでなく、例えば、胎児期における中胚葉の誘導、四肢の発達、神経系の形成・分化や、生体での神経細胞の生存維持、血管新生、組織の修復など多様な生命現象に関与する非常に重要な因子であると考えられている。FGF には、現在までにアミノ酸配列の相同性から22種類の FGF が同定されており、ファミリーを形成している。研究当初 FGF ファミリーとして19種類が知られていたが、新規の FGF を同定し、その生理的意義を解明することは、多様な生命現象を理解する上で非常に意義のあることだと考えた。申請者は、新規 FGF (FGF-20) を同定し、その発現部位、生理活性および作用機構を明らかにした。

第一章 新規 FGF (FGF-20) の同定と発現分布

申請者は、既知の FGF のアミノ酸配列の相同性から homology-based PCR 法により新規 FGF 遺伝子を単離し、20番目に同定された FGF であるため FGF-20 と命名した。そして FGF-20 mRNA の発現組織を同定するために、定量的 RT-PCR, in situ hybridizaion を行ったところ、FGF-20mRNA はラット成体において中脳黒質緻密部のドパミン作動性ニューロンにのみ特異的に発現していることを明らかにした。FGF の多くは時間的・空間的に限定された発現分布をみせて、発現部位近傍で局所的に作用すると考えられている。このことから、FGF-20 が成熟した、中脳黒質緻密部のドパミン作動性ニューロンに対して独自の生理活性をもっていることが示唆された。中脳黒質はパーキンソン病においてドハミン作動性ニューロンの選択的変性・脱落の起こる領域として知られている。そのため、FGF-20 とパーキンソン病の関連も示唆された。

第二章 ドパミン作動性ニューロンに特異的な神経栄養因子としての FGF-20

FGF-20 の機能を探るため、バキュロウイルス発現系により FGF-20 組換えタンパクを作成した。また、その精製過程において分泌性のタンパクであることも確認した。まず、ラット E16 の中脳腹側部神経細胞の初代培養系により、FGF-20 のドパミン作動性ニューロンに対する生存維持活性の検討を行った。血清を除去すると、血清入りのコントロールに比べて、ドパミン作動性ニューロンの生存率は約30%に減少したが、そこに最終濃度 100pg/ml の FGF-20 を添加すると生存維持活性は最大となり、生存率は約90%に回復した。またこの活性は他のニューロンに対してはみられなかった。FGF の作用は、膜貫通型レセプターである7種類の FGF レセプターのチロシンキナーゼ活性を介している。中脳黒質緻密部における FGFR の発現分布を in situ hybridization 法により調べたところ、ドパミン作動性ニューロンには FGFR-1c のみが強く発現していることを明らかにした。また、FGF-20 と FGFR-1c との結合実験を、BIAcore system を用いて検討したところ、FGF-20 は FGFR-1c と相互作用しうることを明らかにした。さらに細胞内シグナルに関しても検討し、SU5402 (FGFR-1 inhibitor) と PD98059 (MEK inhibitor) が FGF-20 の神経栄養活性を阻害することを明らかにした。また同じ初代培養系において、FGF-20 により ERK1/2 のリン酸化が増強されたが、SU5402 によりこの作用は阻害された。つまり、FGF-

20は少なくともMAPK系を介して作用していると考えられる。

以上、本研究により申請者は、FGF-20が、既知の神経栄養因子とは異なり、中脳黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンに特異的な神経栄養因子であることを明らかにした。またその作用は、オートクラインあるいはパラクライン的にFGFR-1cに直接作用し、MAPK系を介していることを明らかにした。本研究により、パーキンソン病の原因究明・治療に重要な知見を与えると期待される。

論文審査の結果の要旨

FGF (fibroblast growth factor) は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞の増殖や分化に関与する増殖因子である。FGFは生体内において広範囲に発現しており、単なる細胞増殖因子としての作用だけでなく、例えば、胎児期における中胚葉の誘導、四肢の発達、神経系の形成・分化や、生体での神経細胞の生存維持、血管新生、組織の修復など多様な生命現象に関与する非常に重要な因子であると考えられている。FGFには、現在までにアミノ酸配列の相同性から22種類のFGFが同定されており、ファミリーを形成している。研究当初FGFファミリーとして19種類が知られていたが、新規のFGFを同定し、その生理的意義を解明することは、多様な生命現象を理解する上で非常に意義のあることだと考えた。申請者は、新規FGF (FGF-20) を同定し、その発現部位、生理活性および作用機構を明らかにした。

申請者は、既知のFGFのアミノ酸配列の相同性から homology-based PCR 法により新規FGF遺伝子を単離し、20番目に同定されたFGFであるためFGF-20と命名した。そしてFGF-20 mRNAの発現組織を同定するために、定量的RT-PCR, in situ hybridizationを行ったところ、FGF-20 mRNAはラット成体において中脳黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンにのみ特異的に発現していることを明らかにした。FGFの多くは時間的・空間的に限定された発現分布をみせて、発現部位近傍で局所的に作用すると考えられている。このことから、FGF-20が成熟した、中脳黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンに対して独自の生理活性をもっていることが示唆された。中脳黒質はパーキンソン病においてドーパミン作動性ニューロンの選択的変性・脱落の起こる領域として知られている。そのため、FGF-20とパーキンソン病の関連も示唆された。

FGF-20の機能を探るため、バキュロウイルス発現系によりFGF-20組換えタンパクを作成した。また、その精製過程において分泌性のタンパクであることも確認した。まず、ラットE16の中脳腹側部神経細胞の初代培養系により、FGF-20のドーパミン作動性ニューロンに対する生存維持活性の検討を行った。血清を除去すると、血清入りのコントロールに比べて、ドーパミン作動性ニューロンの生存率は約30%に減少したが、そこに最終濃度100pg/mlのFGF-20を添加すると生存維持活性は最大となり、生存率は約90%に回復した。またこの活性は他のニューロンに対してはみられなかった。FGFの作用は、膜貫通型レセプターである7種類のFGFレセプターのチロシンキナーゼ活性を介している。中脳黒質緻密部におけるFGFRの発現分布をin situ hybridization法により調べたところ、ドーパミン作動性ニューロンにはFGFR-1cのみが強く発現していることを明らかにした。また、FGF-20とFGFR-1cとの結合実験を、BIAcore systemを用いて検討したところ、FGF-20はFGFR-1cと相互作用しうることを明らかにした。さらに細胞内シグナルに関しても検討し、SU5402 (FGFR-1 inhibitor) とPD98059 (MEK inhibitor) がFGF-20の神経栄養活性を阻害することを明らかにした。また同じ初代培養系において、FGF-20によりERK1/2のリン酸化が増強されたが、SU5402によりこの作用は阻害された。つまり、FGF-20は少なくともMAPK系を介して作用していると考えられる。

以上、本研究は、FGF-20が既知の神経栄養因子とは異なり、中脳黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンに特異的な神経栄養因子であることを明らかにした。またその作用は、オートクラインあるいはパラクライン的にFGFR-1cに直接作用し、MAPK系を介していることを明らかにした。

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15年2月25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。