

氏名	おお ばやし のり ひこ 大 林 典 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 503 号
学位授与の日付	平成 14 年 7 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	新規 Fgf, Fgf18 の同定とその骨・軟骨形成における生理的役割に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 伊藤 信行 教授 川 寄 敏 祐 教授 佐藤 公道

### 論 文 内 容 の 要 旨

FGF (fibroblast growth factor) は分泌性シグナル因子の一つであり、発生・発達段階における種々の細胞の増殖・分化をはじめ、成体における創傷治癒・神経保護など、様々な生命現象に関わることが知られている。一方で、創傷治癒、骨折治癒あるいは心疾患治癒等をターゲットとした治療薬としての有用性が検討されている。FGF は当初、10種類が報告されていたが、申請者はさらなる未知 FGF の存在を期待し、新規な FGF を探索することにより生体システムの一端的な解明や創薬科学への貢献につながると考えた。

申請者は FGF の構造の相同性に着目した遺伝子探索法により新規な Fgf, Fgf18 を同定した。そして、その機能を解析するために *Fgf18* 遺伝子欠損マウスを作製した。種々の骨・軟骨疾患が FGF 受容体 (FGFR) の変異により引き起こされることから、骨・軟骨形成における FGF シグナリングの重要性が示唆されてきたが、Fgf18 が FGF としては初めて骨・軟骨形成に関与する FGF であることを見出した。以下二章にわたって、Fgf18 について得られた知見を論述する。

#### 第一章 新規な Fgf, Fgf18 の同定と発現パターン、およびその生物活性

FGF は、構造の相同性から種々のサブファミリーに分類することができる。しかし、FGF8 には相同性の高い FGF が存在せず、FGF8 様の新規な FGF の存在が期待された。そこで、Fgf8 のアミノ酸配列を基に、ラット胎生14日齢 polyA<sup>+</sup> RNA より homology-based RT-PCR を行ったところ、新規なラット *Fgf18* cDNA の部分断片を得、*Fgf18* の全長配列を単離した。またマウス *Fgf18*, ヒト *FGF18* についても単離した。次にマウス胎児期において *in situ* hybridization 法 (ISH) により *Fgf18* mRNA の発現を解析した。*Fgf18* は、胎生 8 日齢より発現が始まり、胎生 12 日齢では未分化骨・軟骨組織をはじめ、肺、下垂体後葉、各種神経節といった広範な発現パターンを示した。また成体組織では、肺に高発現することを Northern blot 法により明らかにした。次に Fgf18 の生物活性について検討するため、昆虫細胞において組換え Fgf18 蛋白を作製した。Fgf18 には典型的シグナル配列が認められ、Fgf18 を発現させると細胞外に分泌されたことから、Fgf18 は分泌性シグナル因子であると考えられた。線維芽細胞 NIH3T3 に対し、Fgf18 は弱い増殖活性しか示さず、典型的な線維芽細胞増殖因子 Fgf2 とは異なっていると考えられた。

#### 第二章 *Fgf18* 遺伝子欠損マウス (*Fgf18*<sup>-/-</sup>) 作製と表現型解析

Fgf18 の *in vivo* における機能を解析するために、ジーンターゲット法により *Fgf18*<sup>-/-</sup> を作成した。*Fgf18*<sup>-/-</sup> は出産直前に死亡した。その表現型について解析したところ、頭蓋骨や長管骨形成不全といった骨・軟骨形成における異常が認められた。

脊椎動物の骨格は、膜性骨化と内軟骨性骨化の 2 種の様式により形成される。頭蓋骨や鎖骨は膜性骨化により、また脊椎骨や種々の長管骨は内軟骨性骨化により形成される。*Fgf18*<sup>-/-</sup> の骨形成における表現型を解析するため、頭蓋骨形成における *Fgf18*, *Fgfr* の発現パターンを ISH により解析した。その結果、*Fgf18* は頭蓋骨形成の初期より、骨前駆体細胞が存在する頭部間充織で発現し、後に成熟骨芽細胞でも発現は維持されていた。同様の時期、*Fgfr2* が、*Fgf18* とともに骨前駆

体細胞において発現していた。*Fgf18*<sup>-/-</sup>では、骨前駆体細胞の細胞増殖性が特異的に低下し、さらに骨芽細胞の分化も遅延していた。次に軟骨形成における*Fgf18*<sup>-/-</sup>の表現型を解析するため、長管骨形成における*Fgf18*, *Fgfr*の発現をISHにより解析した。*Fgf18*は軟骨膜や関節といった軟骨周囲の組織において、一方、*Fgfr3*は軟骨に発現していた。*Fgf18*<sup>-/-</sup>では、軟骨細胞の増殖・分化がともに亢進していた。

ヒト *FGFR2*の構成的活性化により頭蓋骨癒合症などの膜性骨化における骨形成異常が引き起こされ、骨形成におけるFGFシグナリングの重要性が示唆されてきた。しかしながら*Fgfr2*<sup>-/-</sup>が発生初期で死亡してしまうことから、骨形成過程におけるFGFの機能についてはほとんど不明であった。また、軟骨形成において、ヒト *FGFR3*の構成的活性化により種々の軟骨形成不全が引き起こされ、逆に*Fgfr3*<sup>-/-</sup>では軟骨形成が亢進し、長管骨の成長は促される。従って、FGFシグナリングは軟骨形成を負に調節しているものと考えられてきた。しかしながら、内因性のリガンドが不明であった。*Fgf18*は*Fgfr2*, *Fgfr3*と結合することが明らかにされたFgfである。*Fgf18*<sup>-/-</sup>の骨・軟骨形成における解析結果から、骨形成において*Fgf18*シグナリングは*Fgfr2*を介して、骨前駆体細胞の増殖を亢進させ、その後、骨芽細胞の分化を促進させているものと考えられた。一方軟骨形成において、*Fgf18*<sup>-/-</sup>と*Fgfr3*<sup>-/-</sup>は同様の表現型を示し、*Fgf18*は軟骨周囲から軟骨に対し*Fgfr3*を介して、その増殖・分化を負に調節しているものと考えられた。

以上、本研究は、新規Fgf, *Fgf18*を同定し、その骨・軟骨形成過程における役割を明らかにしたもので、骨・軟骨形成過程の解明や、骨・軟骨疾患の成因解明・治療に有用な知見を得たものである。

#### 論文審査の結果の要旨

FGF (fibroblast growth factor) は分泌性シグナル因子の一つであり、発生・発達段階における種々の細胞の増殖・分化をはじめ、成体における創傷治癒・神経保護など、様々な生命現象に関わることが知られている。申請者はFGFの構造の相同性に着目した遺伝子探索法により新規なFgf, *Fgf18*を同定した。そして、その機能を解析するために*Fgf18*遺伝子欠損マウスを作製した。種々の骨・軟骨疾患がFGF受容体 (*FGFR*)の変異により引き起こされることから、骨・軟骨形成におけるFGFシグナリングの重要性が示唆されてきたが、*Fgf18*がFGFとしては初めて骨・軟骨形成に関与するFGFであることを見出した。

*Fgf8*のアミノ酸配列を基に、ラット胎生14日齢 polyA<sup>+</sup>RNAより homology-based RT-PCRを行ったところ、新規なラット *Fgf18*cDNAの部分断片を得、*Fgf18*の全長配列を単離した。またマウス *Fgf18*, ヒト *FGF18*についても単離した。次にマウス胎児期において *in situ* hybridization 法 (ISH) により *Fgf18* mRNA の発現を解析した。*Fgf18*は、胎生8日齢より発現が始まり、胎生12日齢では未分化骨・軟骨組織をはじめ、肺、下垂体後葉、各種神経節といった広範な発現パターンを示した。また成体組織では、肺に高発現することを Northern blot 法により明らかにした。次に *Fgf18*の生物活性について検討するため、昆虫細胞において組換え *Fgf18* 蛋白を作製した。*Fgf18*には典型的シグナル配列が認められ、*Fgf18*を発現させると細胞外に分泌されたことから、*Fgf18*は分泌性シグナル因子であると考えられた。

*Fgf18*の *in vivo*における機能を解析するために、ジーンターゲット法により *Fgf18*<sup>-/-</sup>を作製した。*Fgf18*<sup>-/-</sup>は出産直前に死亡した。その表現型について解析したところ、頭蓋骨や長管骨形成不全といった骨・軟骨形成における異常が認められた。*Fgf18*<sup>-/-</sup>の骨形成における表現型を解析するため、頭蓋骨形成における*Fgf18*, *Fgfr*の発現パターンをISHにより解析した。その結果、*Fgf18*は頭蓋骨形成の初期より、骨前駆体細胞が存在する頭部間充織で発現し、後に成熟骨芽細胞でも発現は維持されていた。同様の時期、*Fgfr2*が、*Fgf18*とともに骨前駆体細胞において発現していた。*Fgf18*<sup>-/-</sup>では、骨前駆体細胞の細胞増殖性が特異的に低下し、さらに骨芽細胞の分化も遅延していた。次に軟骨形成における*Fgf18*<sup>-/-</sup>の表現型を解析するため、長管骨形成における*Fgf18*, *Fgfr*の発現をISHにより解析した。*Fgf18*は軟骨膜や関節といった軟骨周囲の組織において、一方、*Fgfr3*は軟骨に発現していた。*Fgf18*<sup>-/-</sup>では、軟骨細胞の増殖・分化がともに亢進していた。

*Fgf18*は*Fgfr2*, *Fgfr3*と結合することが明らかにされたFgfである。*Fgf18*<sup>-/-</sup>の骨・軟骨形成における解析結果から、骨形成において*Fgf18*シグナリングは*Fgfr2*を介して、骨前駆体細胞の増殖を亢進させ、その後、骨芽細胞の分化を促進させているものと考えられた。一方軟骨形成において、*Fgf18*<sup>-/-</sup>と*Fgfr3*<sup>-/-</sup>は同様の表現型を示し、*Fgf18*は軟骨周囲から

ら軟骨に対し Fgfr3 を介して、その増殖・分化を負に調節していることが明らかになった。

以上、本研究は、新規 Fgf, Fgf18 を同定し、その骨・軟骨形成過程における役割を明らかにしたもので、骨・軟骨形成過程の解明や、骨・軟骨疾患の成因解明・治療に有用な知見を得たものである。

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14年6月20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。