

氏名	ほし かわ まさ みつ 星 川 雅 充
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 492 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	FGF-8 サブファミリーに属する新規 FGF の同定とその神経系における役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤 信行 教授 川崎 敏祐 教授 市川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

FGF (Fibroblast Growth Factor) は発見当初は単なる線維芽細胞の増殖因子として考えられていたが、その後の研究により多様な細胞の増殖/分化に深く関わる生理活性ペプチドであることが明らかになった。FGF の発現は幅広く胎児から成体までにおよび、また個々の FGF が時間的、空間的に異なった独自の発現パターンを持っていることから FGF が様々な組織、臓器の発生、発達、維持、再生に関与していると考えられている。

申請者は FGF が神経系においても発生や維持に深く関わっていることに着目し、神経系に発現する FGF ファミリーに属する未知の因子を同定することで脳における FGF の新しい機能を解明できると考えた。そこで申請者は後述する方法で探索を行った結果、神経系に強い発現が認められる新規 FGF の同定に成功した。以下二章にわたってこの新規 FGF について得られた知見について論述する。

第一章 新規 FGF の同定とその胎児期における発現分布

FGF ファミリーは当時16種類のメンバーから成っていたが、構造上の相同性からサブファミリーに分類できる。しかし、FGF-8 だけは他の FGF との相同性が低くサブファミリーを形成していなかった。この事から FGF-8 と相同性が高くサブファミリーを形成しうる未知の FGF の存在が示唆された。そこで構造上の相同性を利用できる Homology-based PCR 法により新規 FGF の探索を行った。その結果、ラット14日目胎児の cDNA より新規 FGF, FGF-17 を同定した。また同時に FGF-18 も同定された。これら新規 FGF の一次構造には分泌シグナルと予想される配列が存在したため、分泌タンパクであることが考えられた。実際、昆虫細胞にこれらのタンパクを発現させたところ細胞外に分泌され、分泌性のシグナル伝達因子であることが確かめられた。

次に申請者は、FGF-17 および FGF-18 の胎児における発現分布を *in situ hybridization* 法により検討した。その結果、FGF-17 はラット14日目胎児の中脳後脳境界部 (isthmus) および前脳の前端部 (septum) にもみ発現が認められ、10日目および18日目胎児では発現していなかった。一方 FGF-18 はラット14日目胎児脳では中脳後脳境界部および下垂体に発現が認められ、ついで18日目胎児脳では大脳皮質及び海馬に強い発現が認められた。以上の結果より FGF-17 が胎児期の限られた領域に一過性に発現し、そして FGF-18 は14日目と18日目胎児とで異なった領域に発現することが明らかになり、FGF-17, FGF-18 とともに脳の形成に関与している可能性が示唆された。

第二章 ニューロン由来グリア細胞増殖因子としての FGF-18

脳の生後の発達・成熟過程における FGF-17 および FGF-18 の機能を解析するため、まず生後から成体にかけての脳における FGF-17, FGF-18 の発現推移を検討した。その結果、FGF-17 は生後発達の過程では発現は認められなかった。一方 FGF-18 の発現は生後徐々に強まっていき生後10日目あたりでピークとなったが、生後20日目では減弱し、56日目では発現は消失していた。その発現はどの時期においても大脳皮質、海馬に最も強く認められたが、発現のピークであった生後10日目ではその他に視床、線条体等に幅広い発現が認められた。またいずれの領域においても FGF-18 はニューロンに

発現していた。

以上の結果、FGF-18が生後の脳発達過程に強く発現するという他のFGFとは異なる発現パターンを持つことから、FGF-18が神経系の生後発達に独特な役割を担っていると考えられた。そのため申請者はFGF-18の神経系における機能解析を中心に研究を行った。

まず申請者はFGF-18の標的細胞の特定を試みた。脳に発現しているFGF受容体(FGFR)はFGFR1, FGFR2およびFGFR3であるが、さらにその細胞局在も明らかにされており、FGFR1はニューロン、FGFR2は主にオリゴデンドロサイト、FGFR3はアストロサイトおよびミクログリアに局在している。このためFGF-18と各FGFRとの結合特異性を調べることでFGF-18の標的細胞を特定できると考えた。そこでタンパク間の相互作用を検討できるBIAcore systemを用いてFGF-18と各FGFRとの結合実験を行った結果、FGF-18はFGFR3と非常に強く結合することが明らかになった。また、FGFR2とは弱く結合するが、FGFR1とは結合しないことも明らかになった。この結果からFGF-18はニューロンに発現しているがニューロン自身には作用せず、分泌された後アストロサイトやミクログリアに対して作用している事が示唆された。

そこで申請者はFGF-18が実際にアストロサイトやミクログリアに対して活性を持っているかどうかを検討するため大脳皮質初代培養系よりアストロサイトおよびミクログリアを単離し、FGF-18の増殖活性を検討した。BrdU取り込みにより増殖活性を測定したところ、FGF-18はアストロサイトやミクログリアに対し増殖活性を持つ事が明らかになった。またそれはアストロサイトやミクログリアに増殖活性を持つことが既に明らかにされているFGF-2と同程度の強い活性であった。

以上、本研究により申請者はFGF-8サブファミリーに属する新規FGFを同定した。FGF-17およびFGF-18は胎児期脳においては一過性に発現し、脳の形成に関わっている可能性が示された。さらに、FGF-18は生後の脳発達過程においても一過性に発現し、ニューロン由来グリア細胞増殖因子として機能することが明らかにされた。これらの成果は、FGFの脳の形成における役割を明らかにしていく上で重要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) は発見当初は単なる線維芽細胞の増殖因子として考えられていたが、現在では様々な細胞に多様な生理活性を示す多機能性細胞間シグナル伝達因子であることが明らかにされている。

申請者はFGFが神経系においても発生や維持に深く関わっていることに着目し、神経系に発現する未知なFGFを同定することは脳におけるFGFの新しい機能を解明だけでなく、新たな医薬品の開発にもつながるのではないかと考えた。

FGFファミリーは構造上の相同性からいくつかのサブファミリーに分類できるが、FGF-8だけはサブファミリーを形成していなかった。このことから、FGF-8と相同性が高く、サブファミリーを形成しうる未知なFGFの存在が予想された。また、FGF-8は脳の形成に必須な役割を果たしていることが明らかにされていることからFGF-8サブファミリーに属す新規FGFもまた神経系において重要な役割を担っていることが期待された。

そこでHomology-based PCR法によりFGF-8サブファミリーに属す新規FGFの探索を行った。その結果、申請者は新規FGF, FGF-17を単離し、また同時にFGF-18も単離された。そして、これら新規FGFは分泌シグナルを持ち、細胞外に分泌される分泌性のシグナル伝達因子であることが明らかになった。

次に申請者は、FGF-17およびFGF-18の胎児脳における発現分布を検討した結果、FGF-17はラット14日目胎児の中脳後脳境界部(isthmus)および前脳の前端部(septum)にのみ発現が認められ、18日目胎児では発現は認められなかった。一方FGF-18はラット14日目胎児脳では中脳後脳境界部および下垂体に発現が認められ、ついで18日目胎児脳では大脳皮質及び海馬に強い発現が認められた。以上の結果よりFGF-17が胎児期の限られた領域に一過性に発現し、そしてFGF-18はラット14日目と18日目胎児とで異なった領域に発現することが明らかになった。FGF-17やFGF-18が発現している領域には中脳後脳境界部のように脳の形成を誘導するオーガナイザーとして働く領域も含まれていることから、FGF-17やFGF-18が胎児期脳の形成に関与している可能性が示された。

神経系の生後の発達・成熟過程におけるFGF-17およびFGF-18の機能を解析するため、まず生後から成体にかけての

脳における FGF-17、FGF-18 の発現推移を検討した。FGF-17 は生後発達の過程では発現は認められず、その発現は胎児期に限られることが明らかになった。一方 FGF-18 は生後の脳発達過程で一過性に強く発現していた。その発現はどの時期においても大脳皮質、海馬に最も強く認められたが、発現のピークであった生後10日目ではその他に視床、線条体等に幅広い発現が認められた。またいずれの領域においても FGF-18 はニューロンに発現していた。

以上の結果、FGF-18 が生後の脳発達過程に強く発現するという他の FGF とは異なる発現パターンを持つことから、FGF-18 が神経系の生後発達に独特な役割を担っていると考えられた。

そこで、申請者は FGF-18 の標的細胞の特定を試みた。脳に発現している FGF 受容体 (FGFR) は FGFR1、FGFR2 および FGFR3 であるが、さらにその細胞局在も明らかにされており、FGFR1 はニューロン、FGFR2 は主にオリゴデンドロサイト、FGFR3 はアストロサイトおよびミクログリアに局在している。そこでタンパク間の相互作用を検討できる BIA-core system を用いて FGF-18 と各 FGFR との結合実験を行った結果、FGF-18 は FGFR3 と非常に強く結合することが明らかになった。また、FGFR2 とは弱く結合するが、FGFR1 とは結合しないことも明らかになった。この結果から FGF-18 はニューロンに発現しているがニューロン自身には作用せず、分泌された後アストロサイトやミクログリアに対して FGFR3 を介して作用している事が示唆された。

このため次に申請者は大脳皮質初代培養系を用いて FGF-18 のニューロンおよびグリア細胞に対する活性を検討した。ニューロンに対しては生存維持活性を、グリア細胞に対しては増殖活性を調べた。その結果、FGF-18 はニューロンに対する生存維持活性は示さなかったが、FGF-18 はアストロサイトやミクログリアに対しては強い増殖活性を持つ事が明らかになった。

以上の結果から、FGF-18 がニューロンに発現するがニューロンには作用せず、分泌された後アストロサイトやミクログリアに対し FGFR3 を介して作用しその増殖を促進している事が明らかになった。ニューロン-グリア細胞間のシグナル伝達が脳の形成時や病態時に重要な役割を担っていることが明らかにされてきており、グリア細胞とニューロンの相互作用では、グリア細胞が各種サイトカインを分泌し、ニューロンの生存を維持するなどの作用を及ぼしているといったことはよく研究されている。しかし、ニューロンからグリア細胞へのシグナル伝達についてはあまりよくわかっていないことから、今回の結果によりニューロンが FGF-18 を分泌することでグリア細胞の増殖を制御している可能性が示されたことは大変興味深く思われる。

以上、本論文では FGF-8 サブファミリーに属する新規 FGF を同定し、その発現解析および機能解析を行った結果、FGF-17 および FGF-18 は胎児期の脳の形成に関わっており、また FGF-18 はグリア細胞系の生後の発達に関与している事を示した。これらの成果は、神経系における FGF の新たな役割を明らかにし、脳の形成・発達における分子メカニズムを明らかにしていく上でも重要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2月26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。