

新 制
薬
174

FGF受容体の脳内発現に関する研究

1998

三宅 歩

FGF受容体の脳内発現に関する研究

1998

三宅 歩

目次

序論	1
第一章 FGF受容体mRNAの探索と脳内における発現様式.....	8
実験結果	9
第一節 ラットFGF受容体ファミリーの探索	9
第二節 FGF受容体ファミリー mRNAのラット脳内における発現様式	11
第三節 FGF受容体ファミリー mRNAの発現細胞の同定	19
第四節 脳内に発現しているFGF受容体のアイソフォームの同定	24
考察	27
実験方法	30
第二章 生後の発達過程の脳内におけるFGF受容体mRNAの発現	35
実験結果	36
第一節 生後の発達過程の脳内における FGF受容体ファミリーmRNAの発現	36
第二節 小脳における FGFR-4 mRNAの一過性発現	38
考察	40
実験方法	41
総括および結論	42
謝辞	44
発表論文目録	45
引用文献	46

序論

脳の研究は、脳の働き、神経機能を明らかにすることを目指し、大きな進歩を遂げてきている。様々な学問分野から研究がなされており、これらの研究のすべてが神経系の疾患の原因解明になくはない分野で、学問分野として重要視されてきた。長い間にわたって研究が続いてきたことは、脳の働きを解明することがヒトの生命にとって、とても大切であることを物語っている。脳の重要性から考えても、すでに脳の研究は医学生物学の中で飛び抜けて進んできている。しかし、最も高度に発達した臓器として脳の研究がこれほど進んでいるかのように見えても、まだあまりにも知られていない部分が多いのが現状である。

近年、脳神経系には、数知れぬほど多くある神経回路網のそのおのおのに特異的な標的由来因子が存在すると考えられている。線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor, 以下FGFと略す)はこれらの期待される因子の一種であるが、中枢神経系に対する作用以外にも間葉系細胞および外胚葉由来の細胞の増殖、分化因子として創傷治癒のみならず、血管新生や中胚葉の形成など多様な生物活性をもっている。

現在、FGFファミリーのメンバーとしては少なくともFGF-1からFGF-16までの16種類が同定されており(Fig. 1-1)、アミノ酸配列の相同性は30~79%である(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)。プロトタイプであるacidic FGF (FGF-1)とbasic FGF (FGF-2)は胎児及び成体の様々な臓器に存在しているが、FGF-3、FGF-4、FGF-5及びFGF-6は胎児や腫瘍細胞において、FGF-7は腎臓、結腸、回腸など一部の成体組織において主に発現している(11, 12, 13, 14, 15)。また、FGF-8とFGF-9はマウス乳癌細胞とヒトグリオーマ細胞から、FGF-10はラット胎児からそれぞれ単離されている(4, 5, 7)。さらに、FHF-1~FHF-4(FGF-11~FGF-14)はヒト網膜から、FGF-16はラット心臓からそれぞれ単離されている(8, 10)。一方、FGF-15はE2A-Pbx1の下流標的因子として同定されている(9)。これらの中でaFGF、bFGF、FGF-9及びFHF-1~FHF-4の6種が中枢神経系において豊富に存在しており(8, 16, 17)、神経栄養作用及び神経分化作用などを示すことから、上述した様にFGFの脳神経系における作用が注目されている(3, 18, 19)。

FGFは細胞表面上にある特異的な受容体を介して、その生理作用を発現している(2)。1989年、ニワトリのbFGF受容体の遺伝子クローニングが最初に行われたから(20)、次々にヒトのFGF受容体遺伝子ファミリーのクローニングが行われ、

著者らが本研究を始めた時には3種類のFGF受容体遺伝子が同定されていた(FGFR-1, -2, -3) (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)。構造上の特徴は、いずれもチロシンキナーゼを細胞内に持ち、細胞外にイムグロブリン様ドメインを持つことであり、アミノ酸配列の相同性は55~70%である(Fig. 1-2) (28, 29)。

脳内における神経細胞の分化や機能維持に対するFGFの役割を解明するためには、FGFが作用を発現している部位、すなわちFGF受容体の脳内発現分布を検討することが重要であると考えられる。そこで、著者は脳について生理学的、解剖学的知見の豊富なラットを用い、脳内で発現しているFGF受容体を探索するとともに、それらのmRNAの脳内発現分布を詳細に検討した。既知の3種類のFGF受容体、FGFR-1, -2, -3の構造上の類似性を利用したhomology-based polymerase chain reaction(PCR)法によりラット脳cDNAライブラリーを探索したところ、既知の3種類のFGF受容体 mRNA 以外に、新規なFGF受容体としてFGFR-4 mRNAを単離した。さらに、これらのFGF受容体mRNAのラット脳内発現分布をin situハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、FGFR-1, -2, -3 mRNAは脳内で広範囲に発現していたが、その発現パターンはそれぞれ特異的で、FGFR-1 mRNAは神経細胞、FGFR-2, -3 mRNAはグリア細胞に特異的に発現していた。一方、FGFR-4 mRNAは内側手綱核の神経細胞においてのみ特異的に発現していた。

脳においてFGFは、神経細胞に対してと同様にグリア細胞に対しても様々な作用を示すことが報告されている(30, 31)。そこで、グリア細胞には主要なものとしてオリゴデンドロサイトとアストロサイトの2種類があることから、さらに2種類のグリア細胞特異的のマーカを用いて、FGFR-2 及び FGFR-3 mRNAを発現しているグリア細胞を同定した。この同定には、2種類のmRNAの発現を同一切片上で同時に検出できるdouble in situハイブリダイゼーション(DISH)法と、in situハイブリダイゼーション法と免疫組織化学を組み合わせた二重染色法を行い、ミエリンの主要構成タンパク質でオリゴデンドロサイト系グリア細胞に特異的な遺伝子であるミエリンプロテオリピッド(PLP) mRNA あるいはアストロサイト系グリア細胞に特異的なタンパク質であるグリア線維酸性タンパク質(GFAP)との共存について検討した(32)。その結果、FGFR-2 mRNAはオリゴデンドロサイトに、FGFR-3 mRNAはアストロサイトにそれぞれ発現していることが明らかとなった。また、FGFR-1 mRNAは広範囲な神経核の神経細胞に発現していたが、FGFR-4 mRNAは内側手綱核の腹側部においてのみ発現しており、この領域はコリン作動性ニュー

ロンを多く含んでいると報告されている(33, 34)。そこで、FGFR-4 mRNAの発現細胞の同定についてもdouble in situハイブリダイゼーション法を行い、コリン作動性ニューロンに特異的な遺伝子であるアセチルコリン合成酵素(ChAT) mRNAとの共存について検討した(35)。その結果、内側手綱核の腹側部に存在するFGFR-4 mRNA発現細胞はコリン作動性ニューロンであった。

ヒトとマウスのFGFR-1、FGFR-2及びFGFR-3には、イムノグロブリン様ドメインIIIの選択的スプライシングによって生じる2種類のアイソフォーム、IIIb型とIIIc型が存在する(6, 36)。これらのアイソフォームは、それぞれリガンド親和性が異なる(6, 36, 37, 38)。そこで、リガンドと受容体の特異性を検討するために、脳において発現しているFGF受容体のアイソフォームを同定した。FGFR-1は脳ではIIIc型のみが発現していることを以前に明らかにしており、FGFR-4はIIIc型しか存在しないことから、本研究ではFGFR-2, -3に関して検討した。しかし、ラットのFGFR-2とFGFR-3のこれらのアイソフォームはまだ同定されていなかったため、著者は大脳皮質と肺からFGFR-2とFGFR-3のIIIb型とIIIc型のイムノグロブリン様ドメインIII領域の塩基配列を決定し、グリア細胞に発現しているFGFR-2及びFGFR-3のアイソフォームがIIIc型であることを明らかにした。

さらに、著者は本研究において、生後の脳発達過程におけるFGFの生理機能を解明することを目的とし、生後2日、7日、11日、15日、49日のラット脳においてもFGF受容体ファミリーmRNAの発現分布をin situハイブリダイゼーション法を用いて検討した。その結果、生後11日目前後にFGFR-4 mRNAのみが、小脳皮質の外顆粒層の顆粒細胞で一過性に発現していることが明らかとなった。

以下、これらの知見について二章に分けて論述する。

なお本文中あるいは図表中で使用した略号は以下の通りである。

aFGF	acidic fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
CA1, 2, 3	field CA1, CA2 and CA3 of Ammon's horn
Cb	cerebellum
CC	corpus callosum

cDNA	complementary DNA
ChAT	choline acetyltransferase
ChP	choroid plexus
Cx	cerebral cortex
DAB	diaminobenzidine
DG	dentate gyrus
DISH	double in situ hybridization
DTT	dithiothreitol
D3V	dorsal third ventricle
ec	external capsule
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EG	external granule layer
EGd	deep zone of the external granule layer
EGs	superficial zone of the external granule layer
Epi	epithalamus
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Hi	hippocampus
Hyp	hypothalamus
ic	internal capsule
IG	internal granule layer
ISH	in situ hybridization
LHbM	lateral habenular nucleus, lateral
MHb	medial habenular nucleus
Mol	molecular layer
mRNA	messenger RNA
OB	olfactory bulb
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLP	myelin proteolipid protein

Po	pons
PPTg	pedunculopontine tegmental nucleus
PVP	paraventricular thalamus nucleus, post
RNase A	ribonuclease A
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SSC	saline-sodium citrate
Th	thalamus
TK	tyrosine kinase
TM	transmembrane
tRNA	transfer RNA
UTP	uridine-5'-triphosphate

[GENETYX: Evolutionary tree]

Method: UPGMA

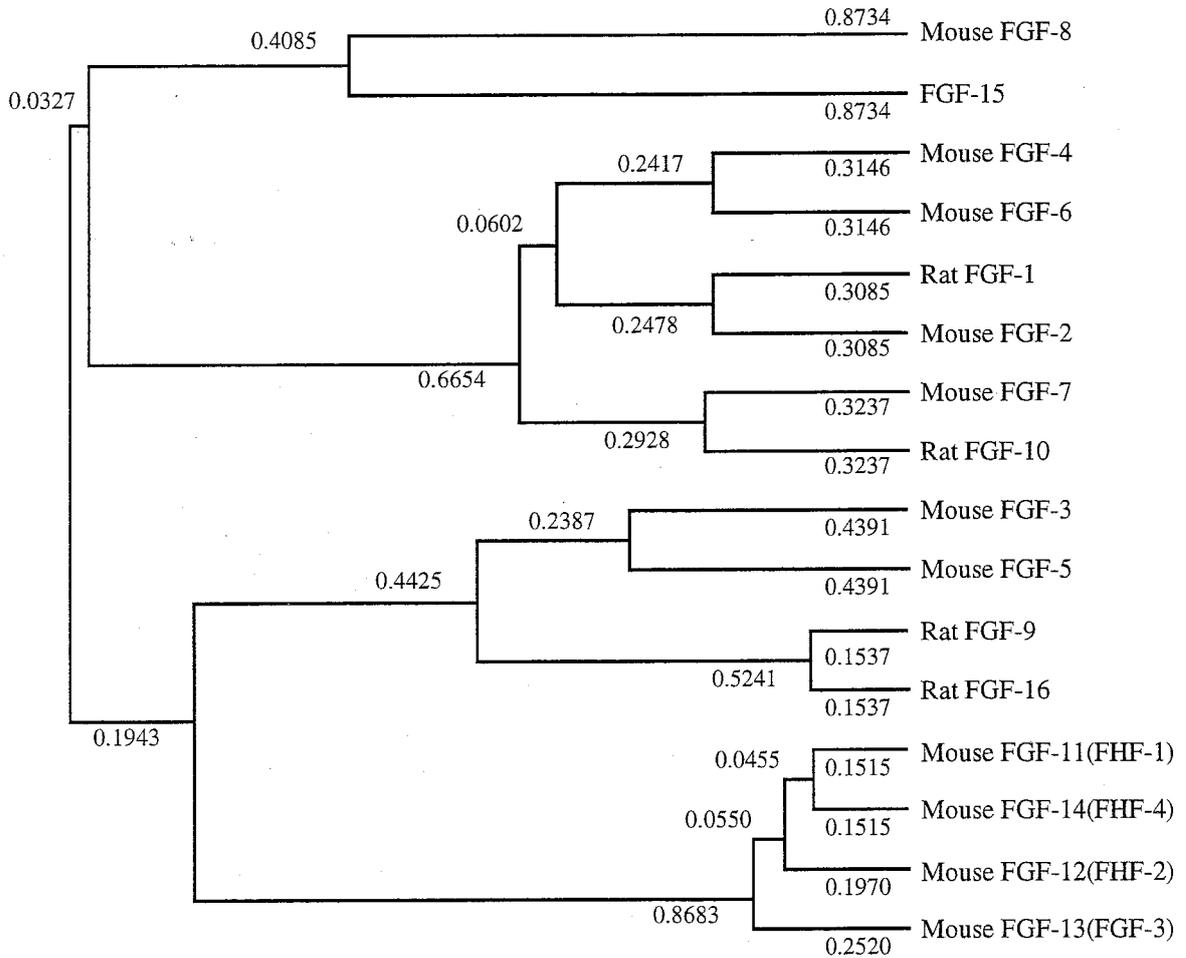


Fig. 1-1 FGF family

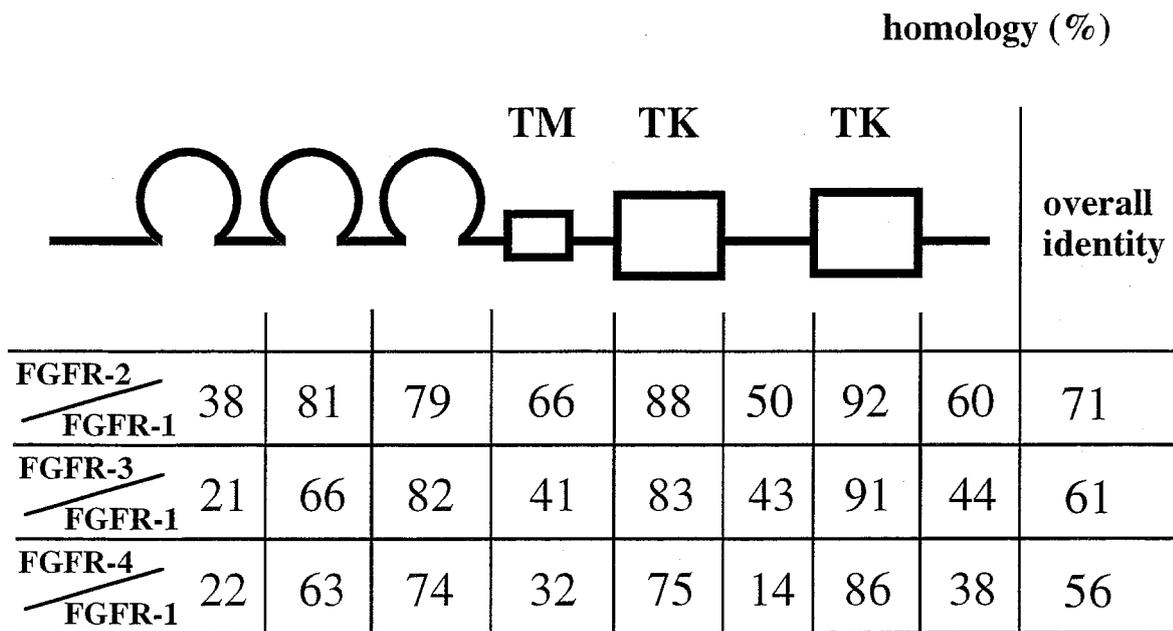


Fig. 1-2 Structures of FGFR-1—FGFR-4

第一章 FGF受容体mRNAの探索と脳内における発現様式

近年、FGFは増殖因子としてのみならず、中枢神経系の分化因子、栄養因子として注目されている。その中でも、特に脳神経系に対する作用の研究が進んでいるのはbFGFで、神経細胞の初代培養系における分化及び生存促進作用、海馬神経細胞のグルタミン酸毒性に対する拮抗作用、軸索切断された前脳基底野コリン作動性ニューロンに対する回復促進作用などを示すことが報告されている(3, 18, 19, 39, 40)。FGFのこれらの生理作用はFGF受容体により媒介されることから、脳内におけるFGFの機能を解明するには、FGF受容体ファミリーmRNAの脳内における生理的意義を検討することが必要である。しかし、FGFを対象にした研究が数多く報告されてきたにもかかわらず、FGF受容体を対象にした研究はほとんどなく、脳内発現分布が明らかになっているのは4種類のFGF受容体のうちFGFR-1のみである(41)。

第一章では、脳内で発現しているすべてのFGF受容体mRNAの脳内発現分布を解明することを目的として、ラット脳からFGF受容体cDNAをクローニングし、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、FGF受容体ファミリーmRNAの脳内発現の領域及び細胞特異性を検討した。さらに、FGFR-2, -3, -4の3種類のFGF受容体に関しては、発現細胞を同定した。また、脳内に発現している各FGF受容体のアイソフォームについても同定した。

実験結果

第一節 ラットFGF受容体ファミリーの探索

ヒトFGFR-1のアミノ酸334番目から339番目まで(EDAGEY)と531番目から536番目まで(EMEMMK)のアミノ酸配列(21, 22, 23, 24)は、ヒトFGFR-2及びFGFR-3の相当する領域のアミノ酸配列と一致する(25, 26, 27)。そこで、この部分はラットFGF受容体のファミリー間でも保存されているアミノ酸配列であると考え、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。このプライマーを用いて、ラット脳poly(A)+RNAからhomology-based PCR法により、FGF受容体ファミリー cDNAのtransmembrane領域及びjuxtamembrane領域(~600bp)を増幅し、M13ベクターに組み込んでクローニングした。

その結果、80個のFGF受容体関連のクローンが得られ、そのうち46個がラットFGFR-1 cDNAであった(ヒトFGFR-1とアミノ酸配列で99%の相同性を示す)(Fig. 2-1)(21, 22, 23, 24)。その他のクローンのうち13個がラットFGFR-2 cDNAで、21個がラットFGFR-3 cDNAであった(それぞれヒトFGFR-2, -3とアミノ酸配列で98%と94%の相同性を示す)(Fig. 2-1)(25, 26, 27)。しかし、この3種類以外のFGF受容体関連のcDNAクローンは、脳からは単離することができなかった。そこで、胎児(embryonic day 19)のpoly(A)+RNAからさらに178個のFGF受容体関連のcDNAクローンを単離した。上記のFGFR-1, -2, -3 cDNAに加えて、46個のラットFGFR-4 cDNAをクローニングすることができた(Fig. 2-1)。これは、ヒトFGFR-4とアミノ酸配列で86%の相同性を示し(42)、最近報告されたラットFGFR-4とは98%の相同性を示した(43)。また、単離したFGFR-1, -3, -4のcDNAサイズは約600bpであったが、FGFR-2 cDNAのみ約400bpであった。これは、FGFR-2 cDNA内にEcoR I 認識配列が存在したためである。

以上、著者はラットの脳と胎児からFGFR-1~FGFR-4のtransmembrane領域及びjuxtamembrane領域をコードするcDNAフラグメントを単離することができたので、次にこれを用いてin situハイブリダイゼーション法を行い、FGF受容体ファミリー mRNAの脳内発現分布を検討した。

```

*****
FGFR-1 (EDAGEY) TCLA GNSIGLSHHS AWLTVLEALE ERPAVMTSPL YLEIIYCTG
FGFR-2 (EDAGEY) TCLA GNSIGISFHS AWLTVLPAPV REKEITASPD YLEIAIYCIG
FGFR-3 (EDAGEY) TCLA GNSIGFSHHS AWLVLPAAE ELMEVDEAGS VYGVLSYGVG
FGFR-4 (EDAGEY) TCLA GNSIGLSYQS AWLTVLPAAE EDLAWTTATS EARYTDIILY

*****
AFLISCMVGS VIIYKMKSGT KKSDFHSQMA VHKLAKSIPL RRQVTVSADS
VFLIACMVVT VIFCRMKTTT KKPDFSSQPA VHKLTKRIPL RRQVTVSAES
FFLFILVVAA VTLCLRSPP KKGLGSPTVH KVSRFPLKAQ VSLESNSSMN
VSGSLALVLL LLLAGVYHRQ AIHGHSRQP VTVQKLSRFP LARQFSLESR

SASMNSGVLL VRPSRLSSSG TPMLAGVSEY ELPEDPRWEL PRDRLVLGKP
SSSMNSNTPL VRITTRLSST ADTPMLAGVS EYELPEDPKW EF
SNTPLVRIAR LSSGEGPVLA NVSELEPAD PKWELSRTRL TLGKPLGGGC
SSGKSSLSLV RGVRLSSSAP PLLTGLVSLD LPLDPLWEFP RDRLVLGKPL

LGEFCFGQVV LAEAIGLDKD KPNRVTKVAV KMLKSDATEK DLSDLIS (EMEMMK)

FGQVVM AEAI GIDKDRTAKP VTVAVKMLKD DATDKDLSDL VS (EMEMMK)
GEGFCFGQVVR AEALGMDSSR PDQTSTVAVK MLKDNASDKD LADLIS (EMEMMK)

```

Fig. 2-1 Amino acid sequences of the transmembrane and juxtamembrane regions of rat FGFR-1—FGFR-4 predicted by their cDNAs. Amino acid sequences in parentheses indicate putative consensus amino acid sequences of the FGF receptor family which correspond to the degenerate oligonucleotide primers. Underlined amino acids indicate the amino acids identical with those of human homologs. Amino acids in the transmembrane regions are marked by asterisks.

第二節 FGF受容体ファミリーmRNAのラット脳内における発現様式

ラット脳のsagittal sections 及び horizontal sectionsを作成し、FGF受容体ファミリー mRNA の発現について in situ ハイブリダイゼーション法により検討したところ、FGFR-1 mRNAの発現は脳内で広範囲に認められた(Fig. 2-2Aと3A)。これに隣接する切片をセンスプローブでハイブリダイゼーションした場合は、シグナルが全く認められなかった(Fig. 2-2Eと3E)。また、FGFR-2及びFGFR-3 mRNAも脳内で広範囲に発現していたが、FGFR-4 mRNAの発現は全く認められなかった (Fig. 2-2B, C, Dと3B, C, D)。

FGFR-1 mRNAは、海馬、脚橋被蓋核、橋核、小脳などの領域で強く発現していた(Fig. 2-2A)。一方、これらの領域でのFGFR-2 及び FGFR-3 mRNAの発現は弱かった。FGFR-2 mRNAは脈絡叢で強く、脳梁、外包、内包、前交連など神経線維に富む領域や嗅球で中程度に発現していた (Fig. 2-2Bと3B)。しかし、これらの領域ではFGFR-1及びFGFR-3 mRNAの発現は弱くなっていた。また、FGFR-1および FGFR-2とは対照的に、FGFR-3 mRNAは脳内で一様に広く発現が認められた (Fig. 2-2Cと3C)。海馬においては、FGFR-1 mRNAがアンモン角領域 (CA1, CA2, CA3) の錐体細胞層と歯状回の顆粒細胞に発現していた (Fig. 2-4A)。CA2, CA3野ではCA1野、歯状回でのシグナルよりも強いシグナルが観察された。しかし、FGFR-2及びFGFR-3 mRNAのCA野における発現は弱く、歯状回では全くシグナルが認められなかった(Fig. 2-4B, C)。さらに、FGFR-1 mRNAは、小脳では顆粒細胞層にシグナルが観察された。FGFR-2 mRNAも小脳において弱く発現していたが、FGFR-1 mRNAとは異なり、小脳の顆粒細胞層よりも白質に発現していた。

次に、FGFR-1～FGFR-3が中程度に発現していた橋でFGF受容体ファミリー mRNAの発現細胞を検討したところFig. 2-5Aに示すとおり、FGFR-1 mRNAはクレシルバイオレットで薄く染まり大きな核を持つ、神経細胞(44)と考えられる細胞で発現していた。一方、FGFR-2 及び FGFR-3 mRNAは、クレシルバイオレットで濃染され比較的小型の核を持つ、グリア細胞と考えられる細胞で発現していた (Fig. 2-5B, C)。また、FGFR-4 mRNAはFig. 2-5Dに示すとおり、橋においては神経細胞及びグリア細胞のどちらにおいてもシグナルが検出できなかった。さらに、脳内の他の領域でも発現細胞を検討したが、大部分の領域において橋での結果と同様の結果を示した。

さらに、coronal sectionについても同様に発現分布を検討したところ、先程の

sagittal 及び horizontal section では脳内のどの領域においても発現が認められなかったFGFR-4 mRNAが、視床上部において発現していた(Fig. 2-6D)。この領域をさらに高倍率で検討したところ、内側手綱核においてのみシグナルが観察された(Fig. 2-7B)。その他の領域においては先程と同様、FGFR-4 mRNAのシグナルは検出されなかった。内側手綱核でFGFR-4 mRNAの発現細胞を検討したところ Fig. 2-8 に示すとおり、クレシルバイオレットで薄く染まり大きな核を持つ、神経細胞と考えられる細胞で発現していた。

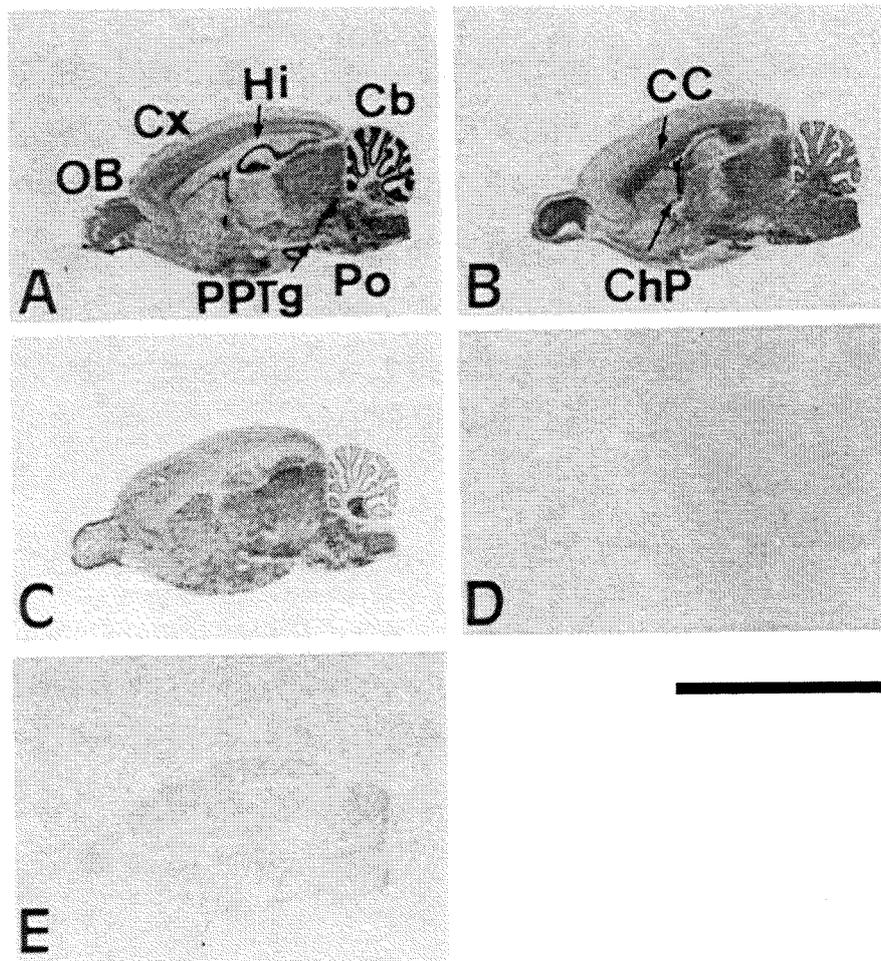


Fig. 2-2 Localization of FGFR-1—FGFR-4 mRNAs in sagittal sections of rat brain (macroautoradiographs). The sagittal sections of rat brain were hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-1 (A), FGFR-2 (B), FGFR-3 (C), and FGFR-4 (D) antisense RNAs and FGFR-1 sense RNA (E) as a control and exposed to X-ray film for 10 days. OB, olfactory bulb; Cb, cerebellum; PPTg, pedunculo-pontine tegmental nucleuse; Po, pons; CC, corpus callosum; ChP, choroid plexus. Scale bar = 1 cm.

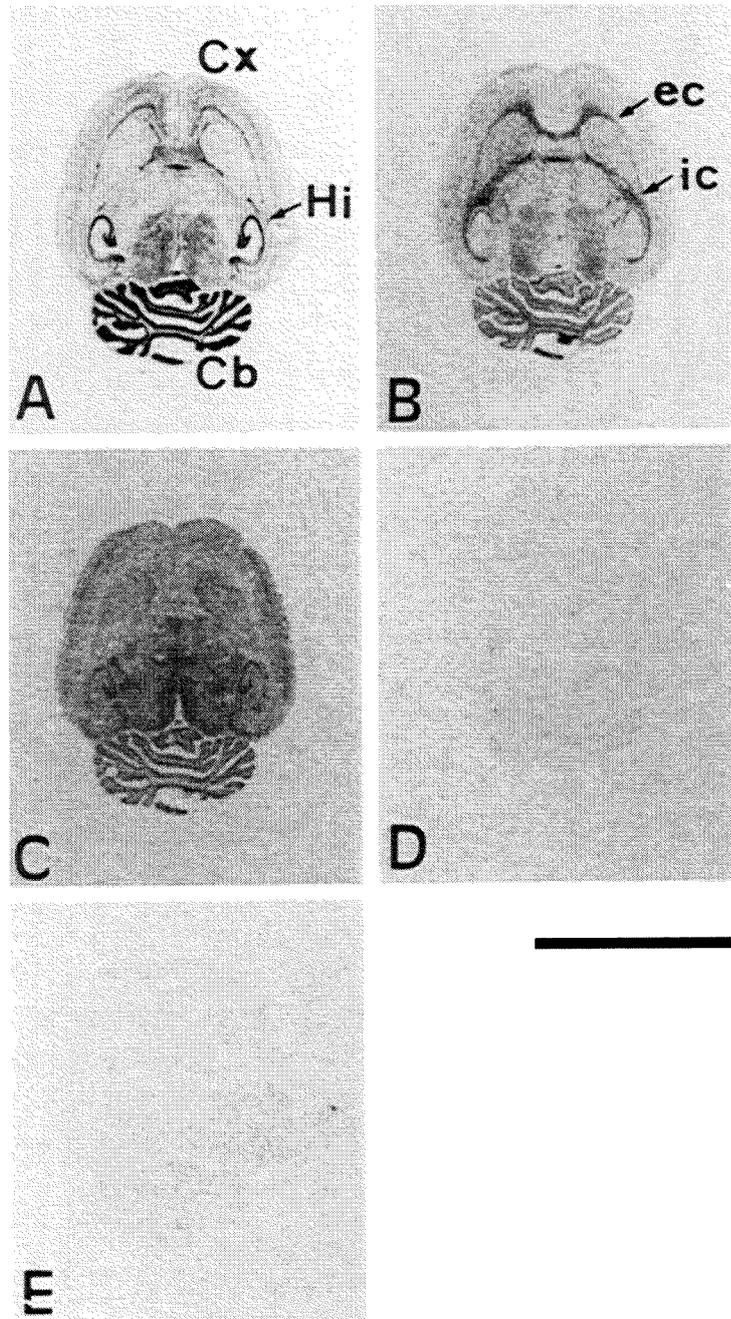


Fig. 2-3 Localization of FGFR-1—FGFR-4 mRNAs in horizontal sections of rat brain (macroautoradiographs). The horizontal sections of rat brain were hybridized with the ^{35}S -labeled FGFR-1 (A), FGFR-2 (B), FGFR-3 (C), and FGFR-4 (D) antisense RNAs and FGFR-1 sense RNA (E) as a control and exposed to X-ray film for 10 days. Cx, cerebral cortex; Hi, hippocampus; Cb, cerebellum; ec, external capsule; ic, internal capsule. Scale bar = 1 cm.

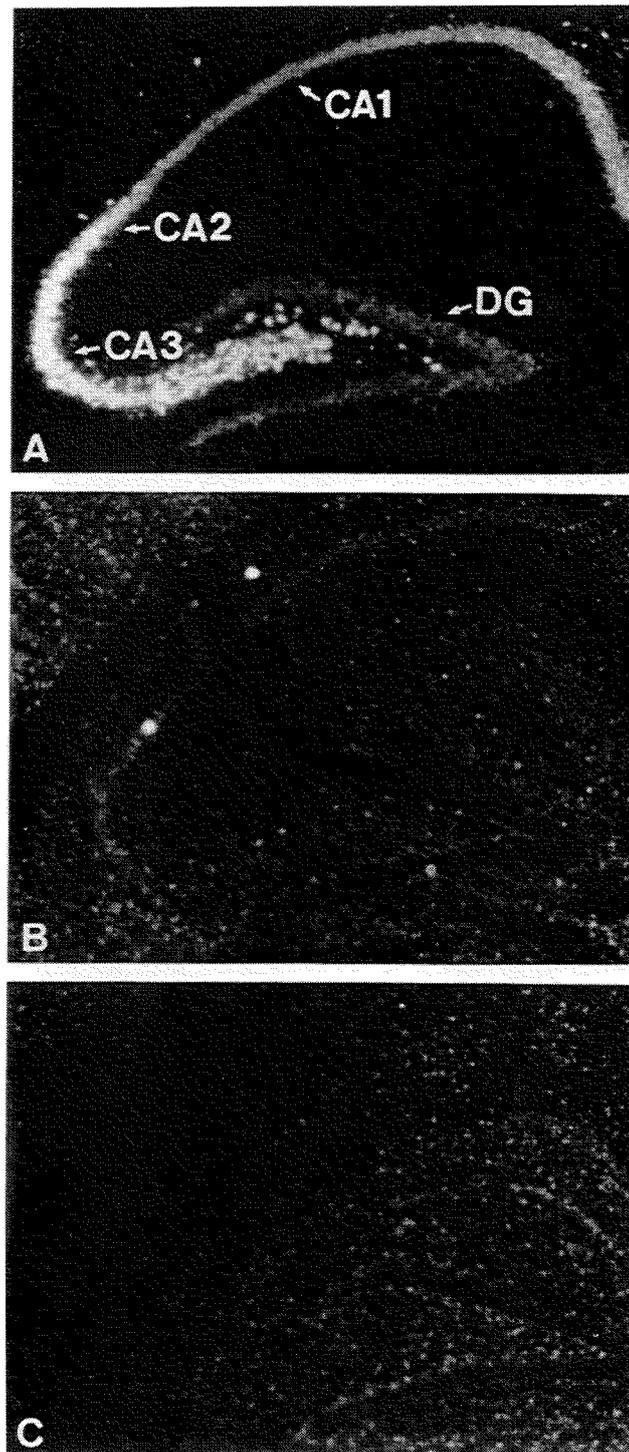


Fig. 2-4 Localization of FGFR-1 (A), FGFR-2 (B), FGFR-3 (C) mRNAs in rat hippocampus (dark-field microautoradiographs). Labeled sections were dipped in liquid emulsion and exposed for 3 weeks. DG, dentate gyrus; CA1—3, CA1—3 regions of the hippocampus. Scale bar = 500 μ m.

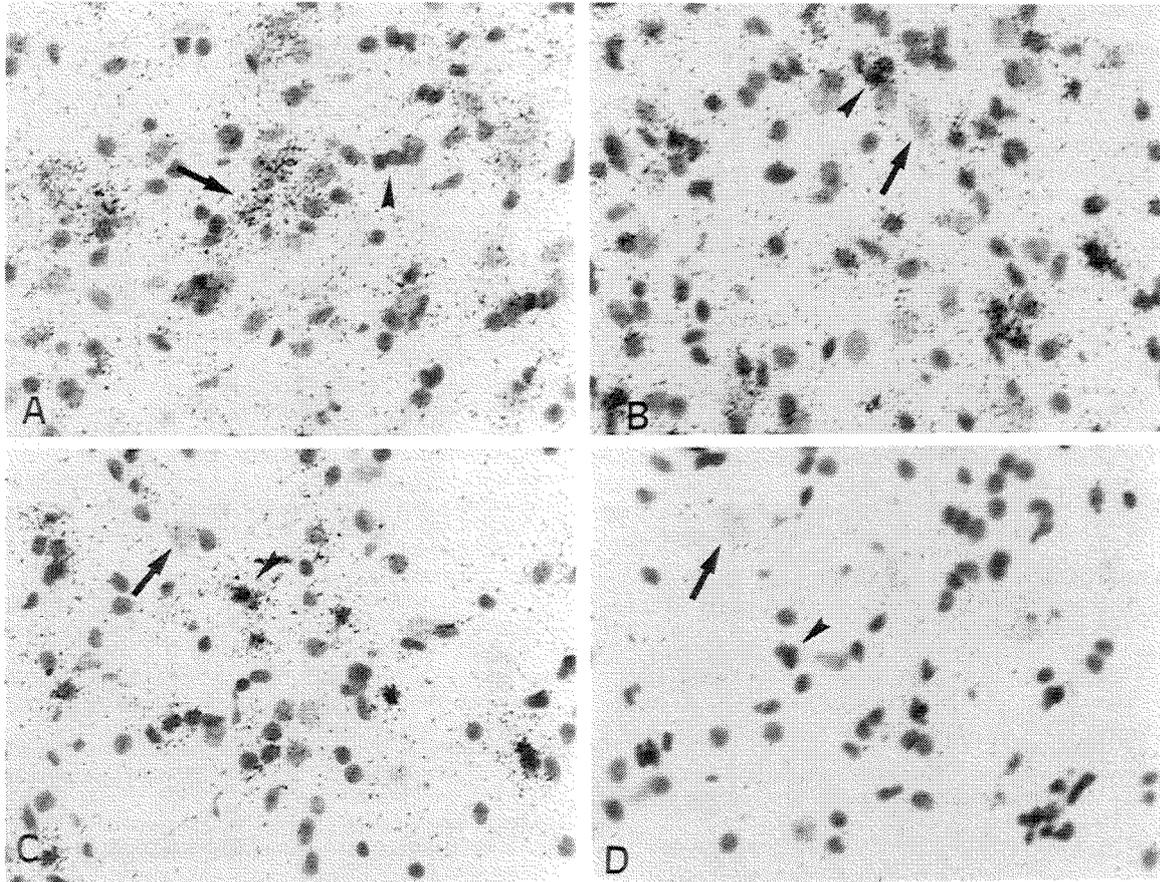


Fig. 2-5 Cellular localization of FGFR-1 (A), FGFR-2 (B), FGFR-3 (C), and FGFR-4 (D) mRNAs in rat pons (bright-field microautoradiographs). Labeled sections were dipped in liquid emulsion and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Arrows and arrowheads indicate neurons and glial cells, respectively. Scale bar = 50 μ m.

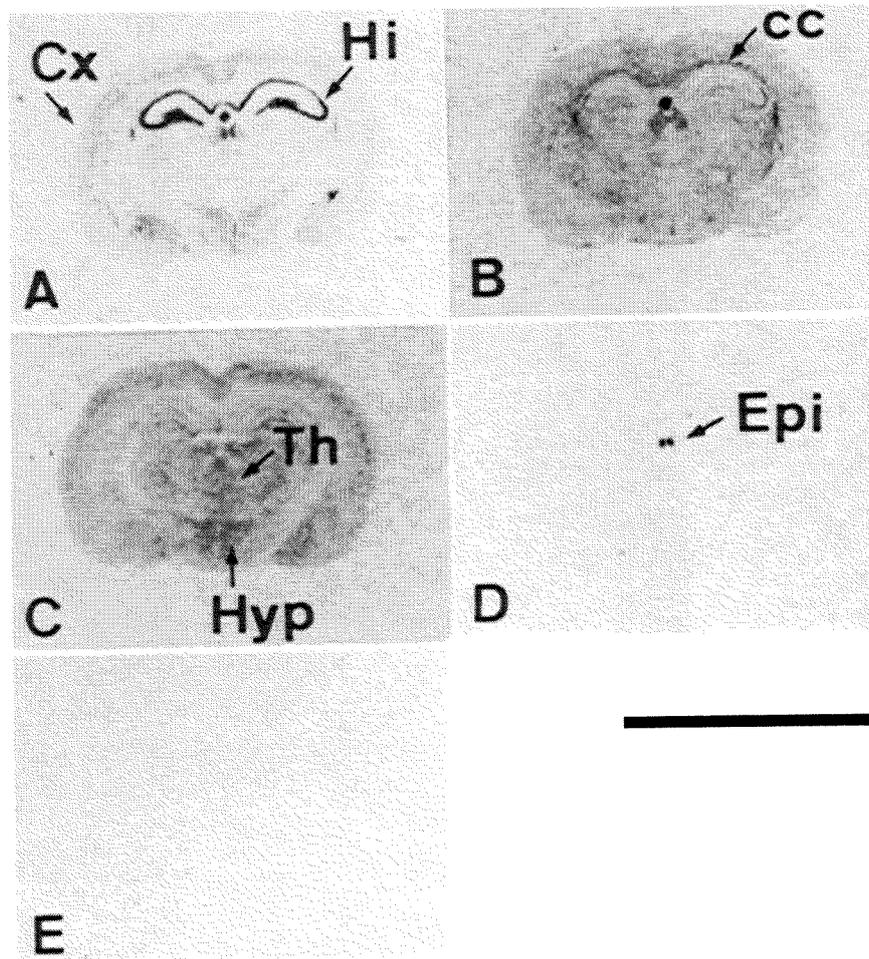


Fig. 2-6 Localization of FGFR-1—FGFR-4 mRNAs in coronal sections of rat brain (macroautoradiographs). The coronal sections of rat brain were hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-1 (A), FGFR-2 (B), FGFR-3 (C), and FGFR-4 (D) antisense RNAs and FGFR-1 sense RNA (E) as a control and exposed to X-ray film for 10 days. Cx, cerebral cortex; Hi, hippocampus; cc, corpus callosum; Th, thalamus; Hyp, hypothalamus; Epi, epithalamus. Scale bar = 1 cm.

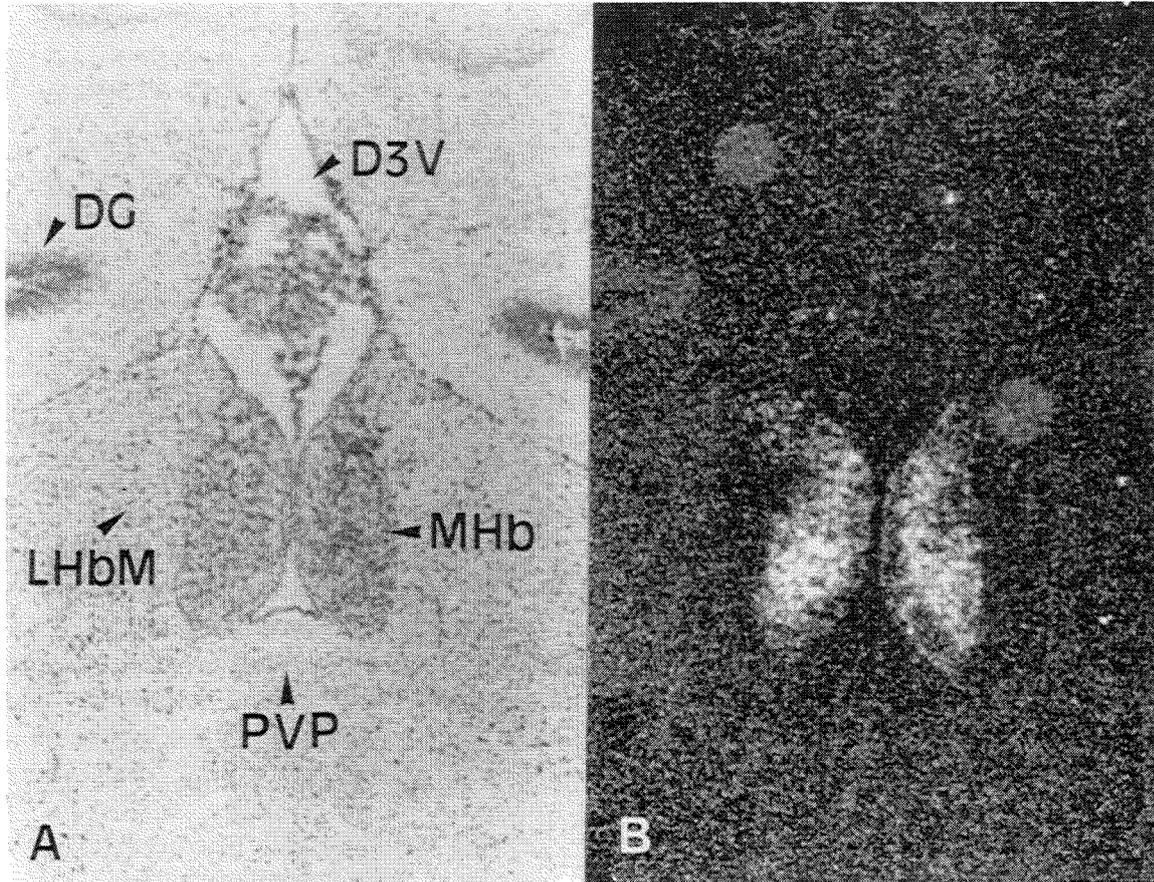


Fig. 2-7 Localization of FGFR-4 mRNA in rat epithalamus.

Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs. The labeled section with the ^{35}S -FGFR-4 antisense RNA was dipped in liquid emulsion and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. DG, dentate gyrus; D3V, dorsal third ventricle; MHb, medial habenular nucleus; LHbM, lateral habenular nucleus, lateral; PVP, paraventricular thalamus nucleus, post. Scale bar = 500 μm .

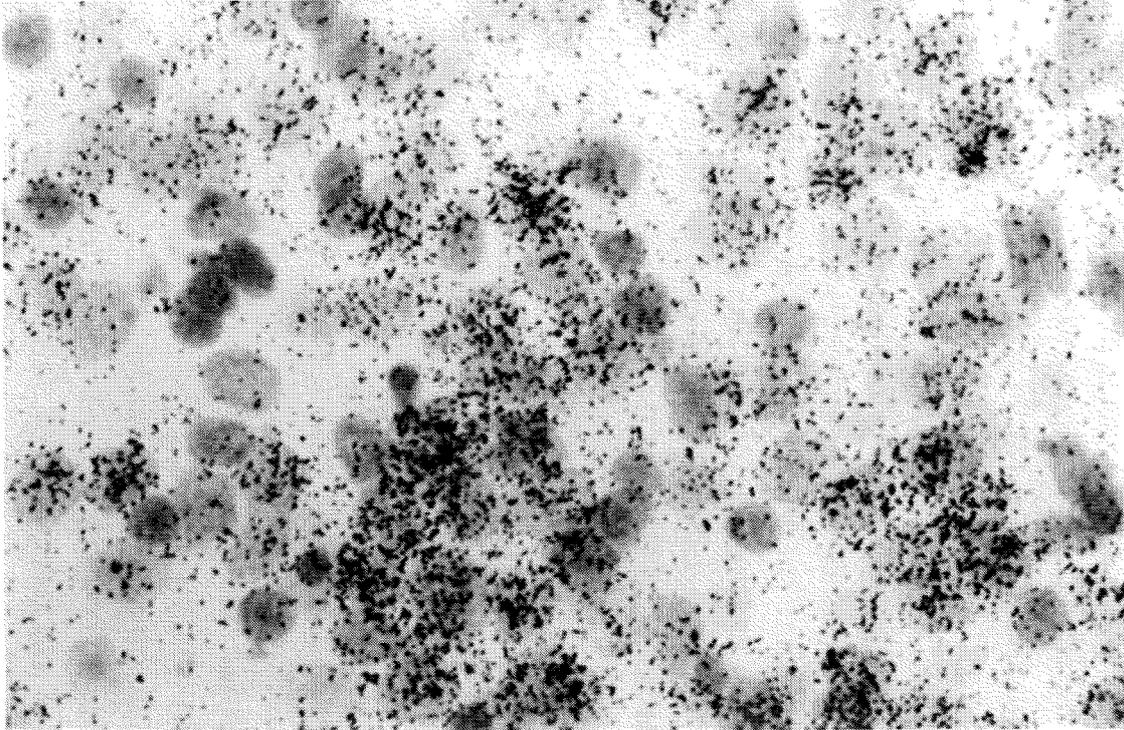


Fig. 2-8 Cellular localization of FGFR-4 mRNA in rat medial habenular nucleus.

Bright-field photomicrograph. The labeled section with the ^{35}S -FGFR-4 antisense RNA was dipped in liquid emulsion and counterstained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Scale bar = 50 μm .

第三節 FGF受容体ファミリーmRNAの発現細胞の同定

(1) FGFR-2及びFGFR-3 mRNAとPLP mRNAとの共存

大脳皮質 (Fig. 2-9A) と脳梁 (Fig. 2-9C) でPLP mRNAとFGFR-2 mRNAとの共存を DISH法により検討したところ、FGFR-2 mRNA は PLP mRNA と共存していた。さらに、FGFR-3 mRNA についても同様に検討したところ、FGFR-3 mRNAは PLP mRNAとは共存していなかった(Fig. 2-9 B, D)。このことは、オリゴデンドロサイトはFGFR-2 mRNAを発現しているが、FGFR-3 mRNAは発現していないことを実証している。

(2) FGFR-2及びFGFR-3 mRNAとGFAPとの共存

大脳皮質 (Fig. 2-10B) と中脳 (Fig. 2-10D) で GFAP と FGFR-3 mRNA との共存を in situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学を組み合わせた二重染色法で検討したところ、FGFR-3 mRNA のシグナルは GFAP 陽性細胞上に観察された。また、FGFR-2 mRNAについても同様に検討したところ、FGFR-2 mRNAのシグナルはGFAP 陽性細胞上には検出されなかった (Fig. 2-10A, C)。このことは、アストロサイトは FGFR-3 mRNAを発現しているが、FGFR-2 mRNAは発現していないことを実証している。

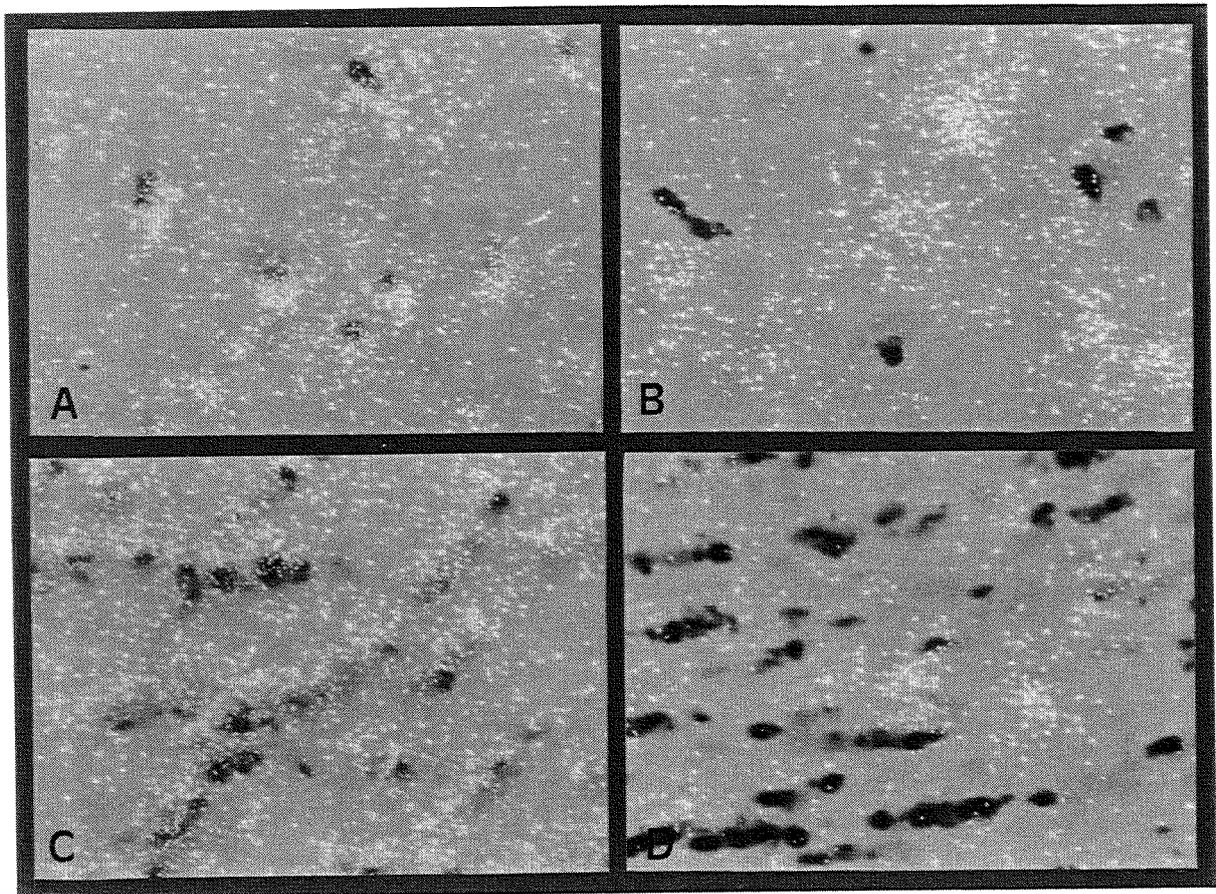


Fig. 2-9 Cellular colocalization of FGFR-2 and FGFR-3 mRNAs with PLP mRNA in the brain. Sections of the cerebral cortex (A and B) and corpus callosum (C and D) were examined by double in situ hybridization with a ^{35}S -labeled FGFR-2 (A and C) or FGFR-3 (B and D) antisense RNA probe and a digoxigenin-labeled PLP antisense RNA probe. Stained cells indicate oligodendrocytes that express PLP mRNA. Grains show the localization of FGFR-2 or FGFR-3 mRNA. Scale bar = 50 μm .

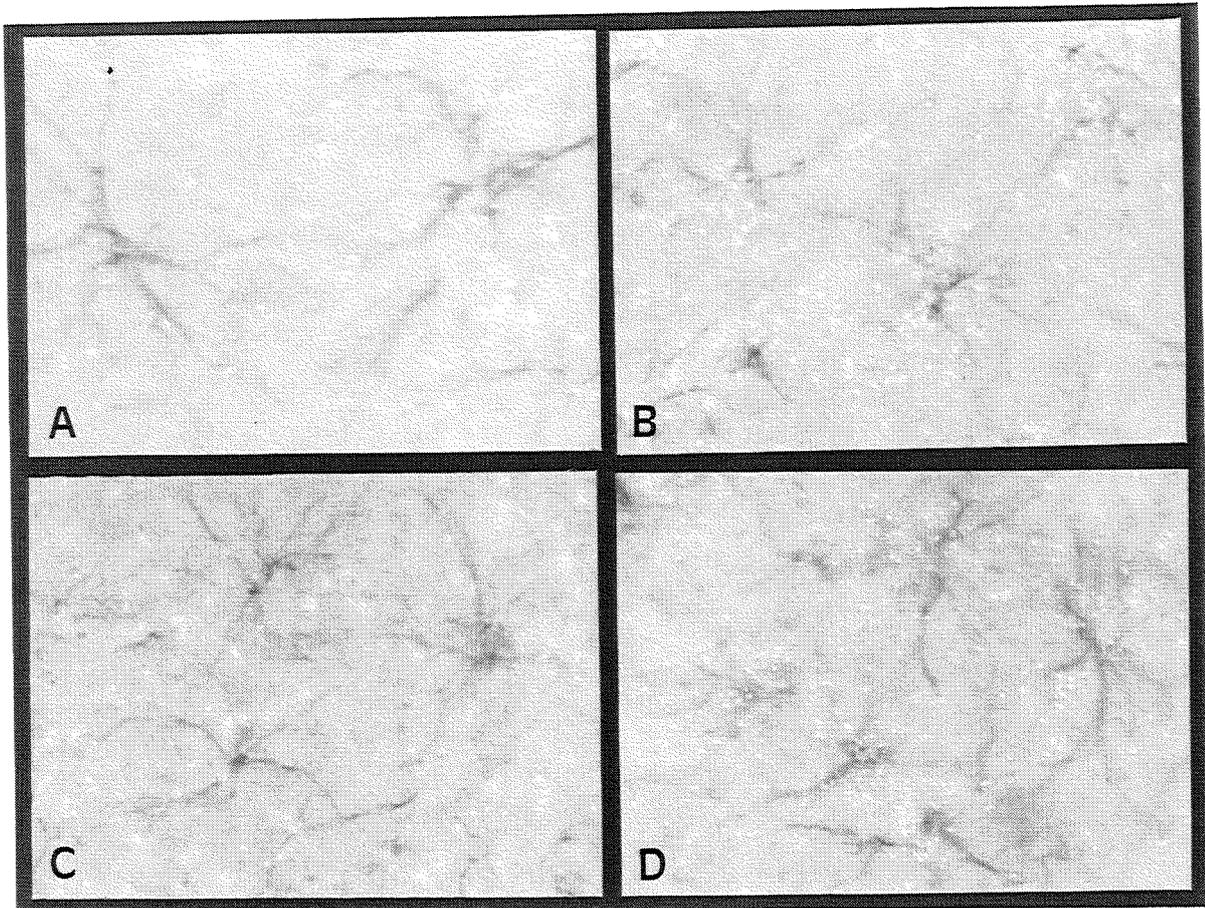


Fig. 2-10 Cellular colocalization of FGFR-2 and FGFR-3 mRNAs with GFAP in the brain. Sections of the cerebral cortex (A and B) and midbrain (C and D) were examined by in situ hybridization in combination with immunohistochemistry with a ³⁵S-labeled FGFR-2 (A and C) or FGFR-3 (B and D) antisense RNA probe and rabbit antiserum to GFAP. Stained cells indicate astrocytes which express GFAP. Grains show the localization of FGFR-2 or FGFR-3 mRNA. Scale bar = 25 μ m.

(3) FGFR-4 mRNAとChAT mRNAとの共存

FGFR-4 mRNA は内側手綱核の腹側部に選択的に発現していることから、この領域においてChAT mRNAとFGFR-4 mRNAとの共存を DISH法で検討したところ、FGFR-4 mRNA は ChAT mRNA と共存していた (Fig. 2-11と12)。このことは、内側手綱核の腹側部に存在するコリン作動性ニューロンのみが FGFR-4 mRNA を発現していることを示している。

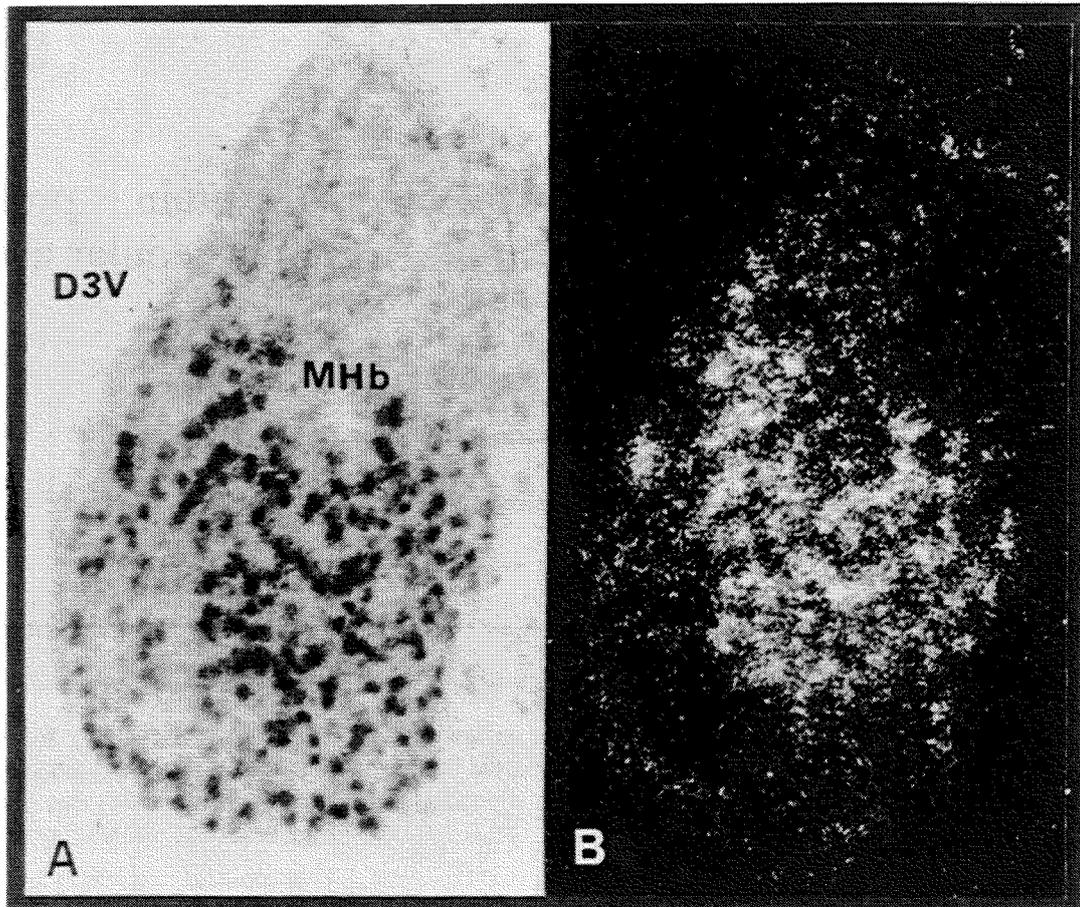


Fig. 2-11 Localization of ChAT mRNA (A) and FGFR-4 mRNA (B) in the medial habenular nucleus of the adult brain. The coronal section of the adult rat brain was hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-4 antisense RNA probe and the digoxigenin-labeled ChAT antisense RNA probe. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs. (A) Dark-stained cells indicate the cells expressing ChAT mRNA. (B) White grains show the localization of FGFR-4 mRNA. MHb, medial habenular nucleus; D3V, dorsal third ventricle. Scale bar = 100 μ m.

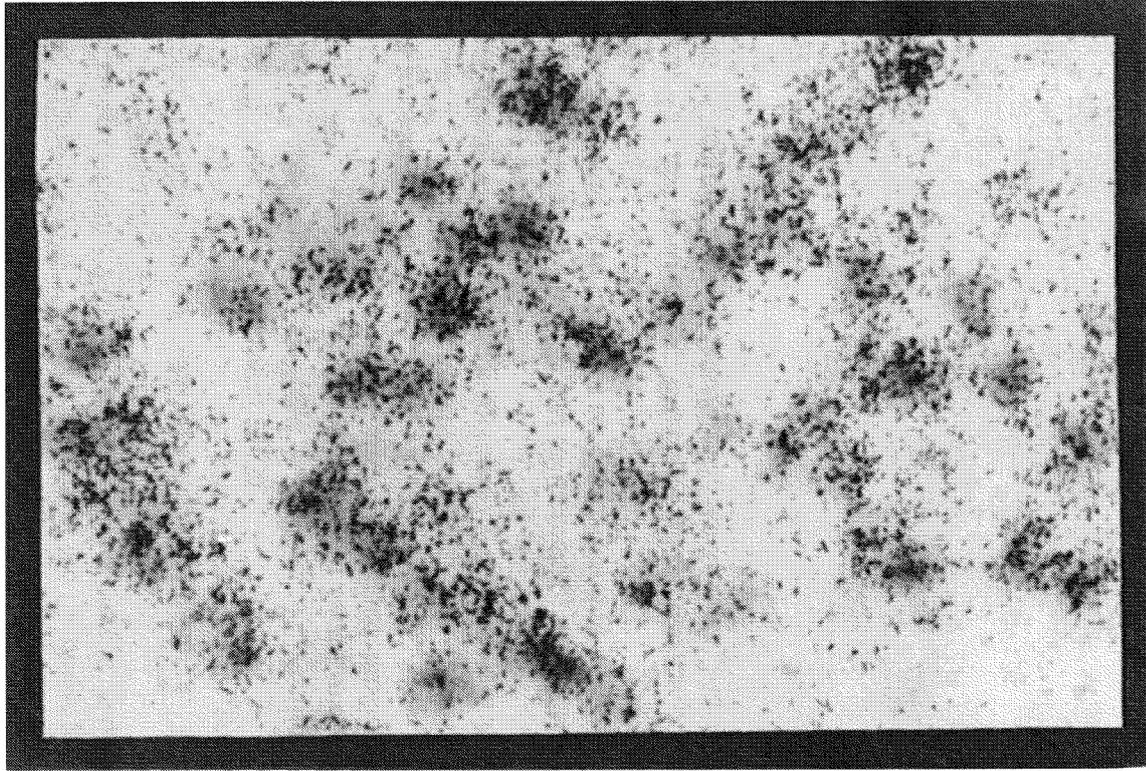


Fig. 2-12 Cellular localization of ChAT mRNA and FGFR-4 mRNA in the ventral part of the medial habenular nucleus of the adult rat brain. The coronal section of the adult rat brain was hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-4 antisense RNA probe and the digoxigenin-labeled ChAT antisense RNA probe. Dark-stained cells indicate the cells expressing ChAT mRNA. Black grains show the localization of FGFR-4 mRNA. Scale bar = 50 μ m.

第四節 脳内に発現しているFGF受容体のアイソフォームの同定

ラット大脳皮質のtotal RNAから、FGFR-2及びFGFR-3のイムノグロブリン様ドメイン III領域の cDNA断片を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法で増幅した。増幅したcDNA断片は pGEM-Tベクターに組み込んでクローニングし、塩基配列を決定した。マウスのホモログとアミノ酸配列を比較した結果、大脳皮質から単離したクローンはすべて IIIc型で、IIIb型の cDNAフラグメントは単離できなかった。そこで、ラットFGFR-2とFGFR-3のIIIb型のcDNAフラグメントは、肺から単離した。ラットFGFR-2とFGFR-3のアイソフォーム IIIb型とIIIc型のアミノ酸配列は、Fig. 2-13 に示している。ラットFGFR-2とFGFR-3のアイソフォーム IIIb型の cDNAフラグメントは、それぞれ Hae IIIと Apa Iで切断される (Fig. 2-14, A-lane bとB-lane b)。しかし、アイソフォーム IIIc型の cDNAフラグメントは、これらの酵素で切断されない (Fig. 2-14, A-lane cとB-lane c)。そこで、オリゴデンドロサイトで発現しているFGFR-2のイムノグロブリン様ドメインIII領域のアイソフォームを検討するために、脳の全域からこのドメインを含むcDNAフラグメントを増幅し、Hae IIIで消化した (Fig. 2-14A)。その結果、脳の全領域において検出されたのは、IIIc型のみであった。FGFR-3についても同様に、脳の全領域からイムノグロブリン様ドメイン III領域を増幅し、Apa Iで消化した結果、IIIc型のみが脳の全領域から検出された (Fig. 2-14B)。

```

|-----Immunoglobulin-like Domain III-----|
|-----Exon III b-----|
HSGINSSNA--EVLALFNVTMDAGEYICKVSNYIGQANQSAWLTVLPKQQ
FGFR-2  GSKYGPDGLPYLKVLK
|-----Exon III c-----|
AAGVNTDKEIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLTVLP---

|-----Exon III b-----|
SWISENVEADAR-LRLANVSERDGGEYLCRATNFIGVAEKAFWLRVHGPQAA
FGFR-3  GSKVGPDGTPYVTVLK
|-----Exon III c-----|
TAGANTTDRELEVLSLHNVTTFEDAGEYTCLAGNSIGFSHSAWLVVLP---

```

Fig. 2-13 Amino acid sequences of immunoglobulin-like domain III of rat FGFR-2 and FGFR-3. Exons IIIb and IIIc indicate amino acid sequences encoded by alternatively spliced exons (exons IIIb and IIIc) of rat FGFR-2 and FGFR-3 genes. Immunoglobulin-like domain III indicates the amino acid sequences of immunoglobulin-like domain III of rat FGFR-2 and FGFR-3.

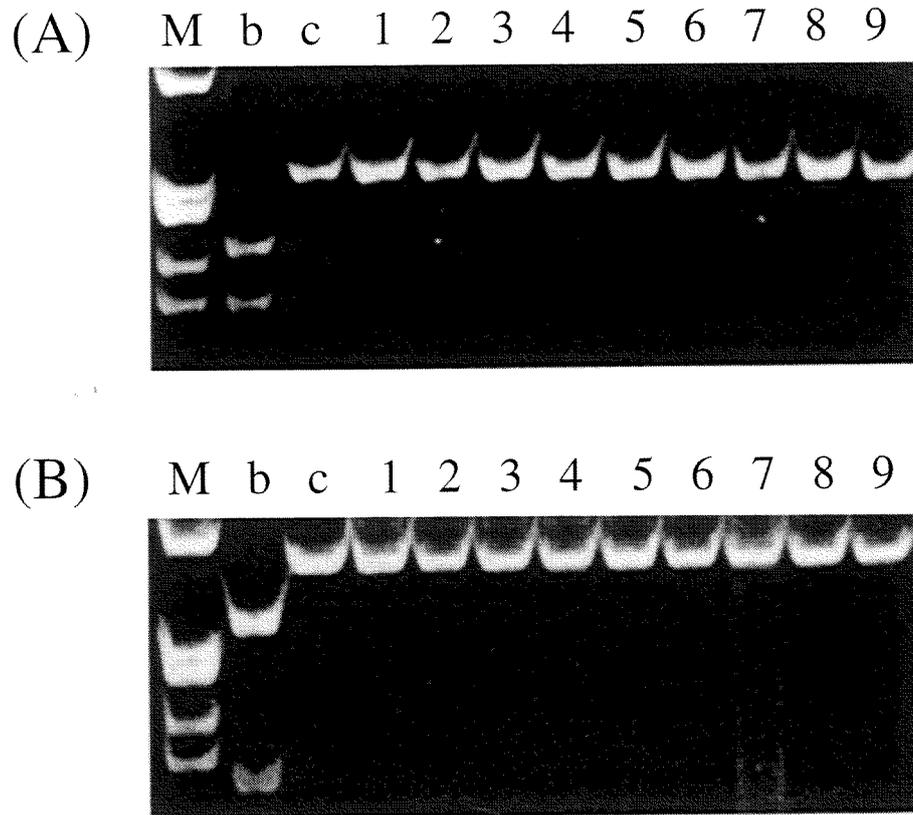


Fig. 2-14 Expression of isoforms of immunoglobulin-like domain III of FGFR-2 and FGFR-3 in rat brain regions. The DNA fragments of immunoglobulin-like domain III with the surrounding regions of FGFR-2 and FGFR-3 were amplified from the total RNA of each brain region by polymerase chain reaction using specific primers. The amplified DNAs of FGFR-2 (A) and FGFR-3 (B) were digested with Hae III and Apa I, respectively. The digests were fractionated by electrophoresis on a polyacrylamide gel (8%). M, ϕ X174 DNA-Hae III digest; b, type IIIb; c, type IIIc; 1, olfactory bulb; 2, cerebral cortex; 3, striatum; 4, hippocampus; 5, thalamus; 6, hypothalamus; 7, midbrain; 8, brainstem; 9, cerebellum.

考察

第一章では、まず、脳内で発現しているFGF受容体を探索することにより、ラットにおいてもFGF受容体が4種類存在することを明らかにした。FGF受容体の脳内発現分布に関しては、WanakaらがラットFGFR-1 mRNAの発現をin situハイブリダイゼーション法で検討し、脳内で広範囲に発現しているが、その発現パターンは領域特異的であることを報告していた。しかし、他の3種類のFGF受容体mRNAの脳内分布は明らかにされていなかった。そこで、さらに著者は、4種類のFGF受容体mRNAのラット脳内発現分布をin situハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、FGFR-1, -2, -3 mRNAが脳内で広範囲に発現していたが、その発現パターンは特異的で、FGFR-1 mRNAは神経細胞、FGFR-2 mRNAはオリゴデンドロサイト、FGFR-3 mRNAはアストロサイトにそれぞれ発現していることを明らかにした。一方、FGFR-4 mRNAは内側手綱核のコリン作動性ニューロンにのみ特異的に発現していた。

さらに、著者らの研究室では現在報告されている16種類のFGFのうち、FGF-1からFGF-10までの10種類のmRNAのラット脳内における発現についても、in situハイブリダイゼーション法により検討している(17, 45)。その結果、10種類の中でaFGF、bFGF、FGF-9 mRNAの3種類が脳内で高発現していた。Acidic FGF mRNAは主に視床、中脳、脳幹などを含む特定の神経核の神経細胞、特に中脳や脳幹の運動ニューロンに強く発現していた(46)。Basic FGF mRNAは海馬の灰白層、CA2野、海馬痕跡の神経細胞に発現が認められた(47, 48, 49)。しかし、aFGF mRNAとは対照的にbFGFは、脳内の広範囲なグリア細胞にも発現が観察された。FGF-9 mRNAは脳内で広範囲に弱い発現が認められるが、海馬、中脳、脳幹、小脳などの神経細胞に強く発現していた(17)。

脳内で高発現している3種類のFGF、aFGF、bFGF、FGF-9 mRNAのすべてが海馬で発現している(17, 46, 47)。しかし、海馬神経細胞で強く発現している受容体はFGFR-1 mRNAのみで、FGFR-2, -3, -4 mRNAは発現していないことから、海馬の神経細胞におけるFGFの作用は主にFGFR-1によって介されると思われる。また、脳内の広範囲な神経細胞に発現しているのもFGFR-1 mRNAのみであることから、FGFの神経細胞全般に対する作用もFGFR-1を介しているものと考えられる。

さらに、FGFはグリア細胞に対しても多様な作用を示すことが報告されてい

る(50)。アストロサイトに対してFGFは、*in vitro*で形態的变化、遺伝子発現の変化、タンパク質分泌の刺激などを促すことが報告されている(30)。オリゴデンドロサイトに対しては、*in vitro*で増殖、発達、遺伝子発現の変化などを促進する(31)。さらに、ラット脳内へのbFGFの投与は、活性型アストロサイトを増加させる。FGFR-2とFGFR-3 mRNAがそれぞれオリゴデンドロサイトとアストロサイトに発現していることから、FGFのこれらのグリア細胞に対する作用は、この両受容体を介していると考えられる。

また、FGF受容体のイムノグロブリン様ドメインIII領域は、リガンド結合の特異性に関与していると考えられている。FGFR-1, -2, -3には、イムノグロブリン様ドメインIII領域のC末端側半分の選択的スプライシングによって生ずる、アイソフォーム(IIIb型とIIIc型)が存在する。これらのアイソフォームは、異なるリガンド親和性を示す(6, 36, 37, 38)。FGFR-2 IIIb型は、aFGF、FGF-7と高親和性で結合するが、bFGFに対する親和性は非常に低い。対照的に、FGFR-2 IIIc型はaFGF、bFGF、FGF-9に対して同等に高親和性で結合する。また、FGFR-3 IIIb型はaFGFのみとしか高親和性で結合しない。一方、FGFR-3 IIIc型はaFGF、bFGF、FGF-4、FGF-9と高親和性で結合する。本研究で、著者は脳におけるFGFR-2とFGFR-3のアイソフォームを同定し、どちらもIIIc型のみが発現していることを明らかにした。aFGFは、特定の神経核の神経細胞に高発現しているが、非神経細胞には発現していない(4, 51)。一方、FGFR-2とFGFR-3 mRNAは脳内で広範囲に発現していることから、aFGFは、これらの受容体のリガンドではないと思われる。対照的にbFGFとFGF-9 mRNAは、脳内で広範囲に発現しており、FGFR-2 IIIc型及びFGFR-3 IIIc型と結合することから、両受容体のリガンドである可能性が示唆された。従って、bFGFはグリア細胞で産生され、FGFR-2とFGFR-3を介してグリア細胞からグリア細胞へ作用しているものと思われる。一方、FGF-9は神経細胞で産生され、FGFR-2とFGFR-3を介して神経細胞からグリア細胞へ作用している可能性が考えられる。以上のことから、FGFの作用メカニズムとしては神経細胞とグリア細胞間の多様な相互作用が考えられる。

また、塩負荷により内側手綱核の神経細胞は著しい核の縮小を引き起こし、副腎は肥大することが報告されている(52)。この内側手綱核のコリン作動性ニューロンにおいてのみ、FGFR-4 mRNAが発現していることから、FGFR-4は内側手綱核の塩・水分バランスをコントロールする神経メカニズムに関与している

可能性が示唆された。しかし、今のところ手綱核とその投射先である脚間核 (53, 54, 55)のどちらにおいても、既知のFGFの発現は報告されておらず、従って、新規なFGFが存在する可能性が考えられる。また、新規なFGFの存在だけでなく、新規なFGF受容体が存在している可能性も同様に排除できない。

実験方法（第一章）

1. 動物

実験には雄性Wistar系ラット(7週齢)を用いた。

2. 脳の取り出しと部位分け

ラットを麻酔下断頭し、脳を取り出した。取り出した脳を氷上にて部位分けし(56)、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、橋・延髄、小脳を取り、液体窒素にて凍結した。In situ ハイブリダイゼーション法による実験に用いる場合は、脳は部位分けせず、水分を良く取り除いた後、粉末ドライアイスで急速に凍結させた。試料はすべて-80℃で保存した。

3. 組織からのpoly (A)+RNA調製

Total RNAは、チオシアン酸グアニジン法 (57) により各組織から抽出した。Poly (A)+RNAは、oligo(dT)cellulose (Collaborative Research Inc. Type 2)により調製した。RNAは、260nmにおける吸光度を測定することにより定量した。

4. ラットFGF受容体ファミリーcDNAのクローニング

ラットFGF受容体ファミリーcDNAは、homology-based PCR法にてクローニングした。ラット脳poly (A)+RNA (5 μ g)は300 unitsのMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO-BRL)、15 unitsのhuman placenta RNase inhibitor (Wako Pure Chemicals, Japan)、0.5 μ gの random hexadeoxynucleotide primerを含む reaction mixture (20 μ l) 中、37℃で60min反応させ、cDNAを合成した。

ヒトFGFR-1のアミノ酸配列、334番目から339番目までの (EDAGEY) と531番目から536番目までの (EMEMMK) (21, 22, 23, 24) は、ヒトFGFR-2とFGFR-3のアミノ酸配列中にも保存されている (25, 26, 27)。従って、上記のアミノ酸配列はラットFGF受容体ファミリーにおいても保存されていると仮定して、この領域の縮重プライマーを作成し、Zymoreacter(ATTO, Tokyo, Japan)でPCRを行った。後の操作でベクターに組み込むため、センスプライマーには Pst Iサイトを、アンチセンスプライマーには Eco RIサイトを付加した。約 600bpの PCR産物を GeneClean-II kit (Bio 101, La Jolla, USA)を用いてゲルから抽出し、Pst Iと Eco RIで酵素消化した後、

M13 DNA vectorに組み込んでクローニングした。得られたクローンの塩基配列は dideoxy法(58)により解析した。

5. 切片作製

粉末ドライアイスで急速に凍結させた全脳を-80℃で少なくとも1日保存後、クリオスタットを用い、15 μ mの厚さの新鮮凍結切片を作製し、1%のゼラチンコートをしたスライドガラスに張り付けた。切片は全脳にわたって作製した。作製した切片は、in situ ハイブリダイゼーションに用いるまで、-80℃で保存した。

6. FGF受容体ファミリーの鋳型DNAの調製とプローブの標識

アンチセンス及びセンスRNAプローブ作成のため、ラットFGFR-1~FGFR-4 cDNAをpBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) に組み替えた。FGFR-1, -3, -4のアンチセンスプローブ合成用の鋳型DNAとしては Bam HIで切断したものを、FGFR-2については Xba Iで切断したものをを用いた。また、FGFR-1のセンスプローブ合成用の鋳型DNAとしてはHind IIIで切断したものをを用いた。

[α ³⁵S] UTP (30 TBq/mmol, Amersham Japan, Tokyo) の存在下 T7 あるいは T3 RNAポリメラーゼを用いてin vitro転写することにより、各々、³⁵S標識アンチセンスあるいはセンスRNAプローブを得た。標識後、アルカリ処理により平均鎖長約250塩基に水解した。

7. In situ ハイブリダイゼーション

4%ホルマリン/PBS中で15分インキュベートし切片を固定した後、1 μ g/ml Proteinase K溶液中で10分、さらに、0.25%無水酢酸/0.1Mトリエタノールアミン/0.15M NaCl 中で10分インキュベートした。エタノール系列に通し脱水した後、クロロホルムによる脱脂を行った。乾燥後、切片の上にプレハイブリダイゼーションバッファーをのせ、55℃で1時間インキュベートした。プレハイブリダイゼーションバッファーの組成を以下に示す。

Formamide	50 %
SSC	4 X
Denhardt's solution	5 X
EDTA	10 mM
DTT	20 mM
Yeast tRNA	0.25 mg/ml
Salmon Sperm DNA	0.5 mg/ml

1 X SSCの組成は150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである。

インキュベート終了後、プレハイブリダイゼーションバッファーを除去し、³⁵Sで標識したアンチセンスあるいはセンスRNAプローブを含むハイブリダイゼーションバッファーに交換し、55°Cで15時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションバッファーはプレハイブリダイゼーションバッファーに10% dextran sulfateを加えたものを用いた。ハイブリダイゼーション終了後、10 mM DTTを含む2 X SSC中、55°Cで4回洗浄した後、50 μg/ml RNase A溶液中、37°Cで30分インキュベートした。さらに、50% formamide / 2 X SSC / 10mM DTT中、55°Cで2回洗浄した。アルコール系列に通して切片を脱水した後、乾燥させ、マイクロオートラジオグラフィに用いた。マイクロオートラジオグラフィは以下の要領で行った。すなわち、切片上に乳剤液 (NTB-3; Kodak, Rochester)を塗布し、暗箱中で3週間露光した。露光後、現像液 (D-19; Kodak, Rochester)中で3分間現像し、水洗の後、定着液 (Fujifix; Fuji, Tokyo)中で5分間定着した。クレシルバイオレットによる対比染色の後、アルコール系列に通して脱水し、封入した。

8. PLPの鋳型DNAの調製とプローブの標識

PLP cDNAはラット脳 poly (A)+RNAから RT - PCR 法にてクローニングした。Zymoreacter(ATTO, Tokyo, Japan)によるPCRは、PLPの特異的プライマーとして TTAGAGTGCTGTGCTAGATと ACCTTCATGATTGCTGCCACTTACを用いて、行った。この結果得られた約780塩基対のPCR産物をpGEM-T (Promega, Madison, USA)ベクターに組み込んだ。形質転換により大腸菌に組み込み、大量培養してプラスミドを得た。PLPの鋳型についてはアンチセンスプローブ合成には Sac I、センスプローブ合成にはSac IIで切断したプラスミドDNAを鋳型DNAとして調製した。

プローブの標識はdigoxigenin-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)存在下で *in vitro* 転写により行った。標識後、アルカリ処理により平均鎖長約250塩基に水解した。

9. ChAT の鋳型DNAの調製とプローブの標識

ChAT cDNAもPLPと同様にラット脳 poly (A) +RNAからRT-PCR法にてクローニングした。Zymoreacter(ATTO, Tokyo, Japan)を用いたPCRでアミノ酸11番目から506番目までの領域(約1500塩基対)を増幅し、pGEM-T ベクター (Promega, Madison, USA) に組み込んで、クローニングした。鋳型DNAにはアンチセンスプローブの合成用に Sac IIで、センスプローブの合成用にSal Iで切断したものをを用いた。

プローブの標識はdigoxigenin-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)存在下で *in vitro* 転写により行った。標識後、アルカリ処理により平均鎖長約250塩基に水解した。

10. Double in situ ハイブリダイゼーション

2種類のmRNAの発現を同一切片上で同時に検出するためDISHを行った。ハイブリダイゼーションの際に、³⁵Sで標識したFGF受容体に対するプローブとジギキゲンで標識したPLPあるいはChATに対するプローブとを混ぜて行った他は、通常通りのISHを行った。洗浄操作終了後、PLPあるいはChATプローブの可視化を行うために以下の操作を行った。まず1.5%の正常ヒツジ血清(DAKO, Carpinteria, USA)でブロッキングを行い、アルカリホスファターゼを結合させたdigoxigenin に対する抗体 (Boehringer Mannheim)で2時間反応させた。4-nitro blue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim)と5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (Boehringer Mannheim) によってPLP あるいはChAT mRNA陽性細胞の可視化を一晩行った。アルコール系列で脱水した後、2.5% コロジオン (Nacalai tesque)で切片表面をコーティングし、NTB-3乳剤を塗布した。4週間の後、現像しグリセロールによる水性封入を行い検鏡した。

11. In situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学による二重染色

4% ホルマリン/ PBS中で15分インキュベートして切片を固定し、非特異的な結合を減少させるために10 mM DTT / 100 U/ml RNase inhibitor (RNasin; Wako Pure Chemicals, Japan)を含む1.5% 正常ヤギ血清溶液中でインキュベートした後、1次抗体と室温で1時間反応させた。1次抗体は抗GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)ポリクローナル抗体 (DACO Japan, Kyoto)を用いた。1次抗体および次に用いる2次抗体溶液には、ヘパリン 5 mg/mlを加えた。1次抗体との反応終了後、Vectastain ABC キット(Vector, Burlingame)を用いて発色させた。すなわち、ビオチン化2次抗体と30分間反応させた後、ABC試薬溶液中で30分インキュベートし、0.25 mg/ml DAB (diaminobenzidine 4HCl) / 0.005% H₂O₂溶液中で発色させた。染色の終了した切片を洗浄後、さらに、上述した方法によりin situ ハイブリダイゼーションによるmRNAの検出を行った。

12. ラットFGFR-2及びFGFR-3のイムノグロブリン様ドメインIII領域のcDNAのクローニング

RT-PCRを行い、ラット大脳皮質と肺の total RNA から FGFR-2 及び FGFR-3 のイムノグロブリン様ドメインIII領域のcDNAフラグメントを増幅した。FGFR-2の特異的プライマーとしては、CAGCCCCACATCCAGTGGATとTTGGATCCTCTGGCAACTCGを、FGFR-3の特異的プライマーとしては、TTCCACTGCAAGGTGTACAGとCCAAGAGGCTTACCGAGTGTを用いた。増幅したcDNAフラグメントはpGEM-T vectorに組み込んでクローニングした。得られたクローンの塩基配列はdideoxy法(58)により解析した。

13. ラット脳に発現しているFGFR-2及びFGFR-3のイムノグロブリン様ドメインIII領域のアイソフォームの同定

脳の9種類の領域（嗅球、大脳皮質、線状体、海馬、視床、視床下部、中脳、脳幹、小脳）のtotal RNAから、FGFR-2及びFGFR-3のイムノグロブリン様ドメインIII領域のcDNAフラグメントをRT-PCRにより増幅した。増幅したcDNAフラグメントは、FGFR-2に関してはHae IIIで、FGFR-3に関してはApa Iでそれぞれ消化した。反応生成物は8%ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、バンドを検出した。

第二章 生後の発達過程の脳内におけるFGF受容体 mRNAの発現

第一章では4種類のFGF受容体mRNAのアダルトラット脳内発現分布を明らかにした(59)。FGFR-1, -2, -3 mRNAは、脳内で広範囲に発現していたが、その発現パターンは特異的で、FGFR-1は神経細胞、FGFR-2はオリゴデンドロサイト、FGFR-3はアストロサイトにそれぞれ発現していることを示した(41, 59, 60, 61, 62)。一方、FGFR-4は内側手綱核のコリン作動性ニューロンにのみ特異的に発現していた(63, 64)。しかし、生後の発達過程におけるFGF受容体ファミリーmRNAの脳内発現分布についても、これまで明らかにされていなかった。現在までの*in vitro*の研究により、FGFが神経細胞の前駆細胞やグリア細胞の増殖、分化に関与していることが報告されている。従って、FGFは脳の形態形成にも関与している可能性が考えられる。

そこで本研究では、さらに、生後の脳発達過程におけるFGFの機能を解明することを目的として、生後2日、7日、11日、15日、49日のラット脳について*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、FGF受容体ファミリーmRNAの脳内発現分布を検討した。

実験結果

第一節 生後の発達過程の脳内におけるFGF受容体ファミリーmRNAの発現

生後2日、7日、11日、15日、49日のラット脳全域にわたって、4種類のFGF受容体ファミリーmRNAの発現について検討したところ、FGFR-1, -2, -3の3種類は、すでに生後2日目からアダルトでの発現分布と同様の分布を示しており、その発現はアダルトまで持続していた。一方、FGFR-4 mRNAは、アダルトで認められた内側手綱核における発現は各過程で持続的に観察されたが、それ以外に小脳において一過性の強い発現が認められた(Fig. 3-1)。

FGFR-4 mRNAは、生後7日目あたりから小脳皮質において発現が認められ、生後11日目において最も強いシグナルが観察された。しかし、生後49日目では小脳皮質におけるFGFR-4 mRNAのシグナルは、検出できなかった。

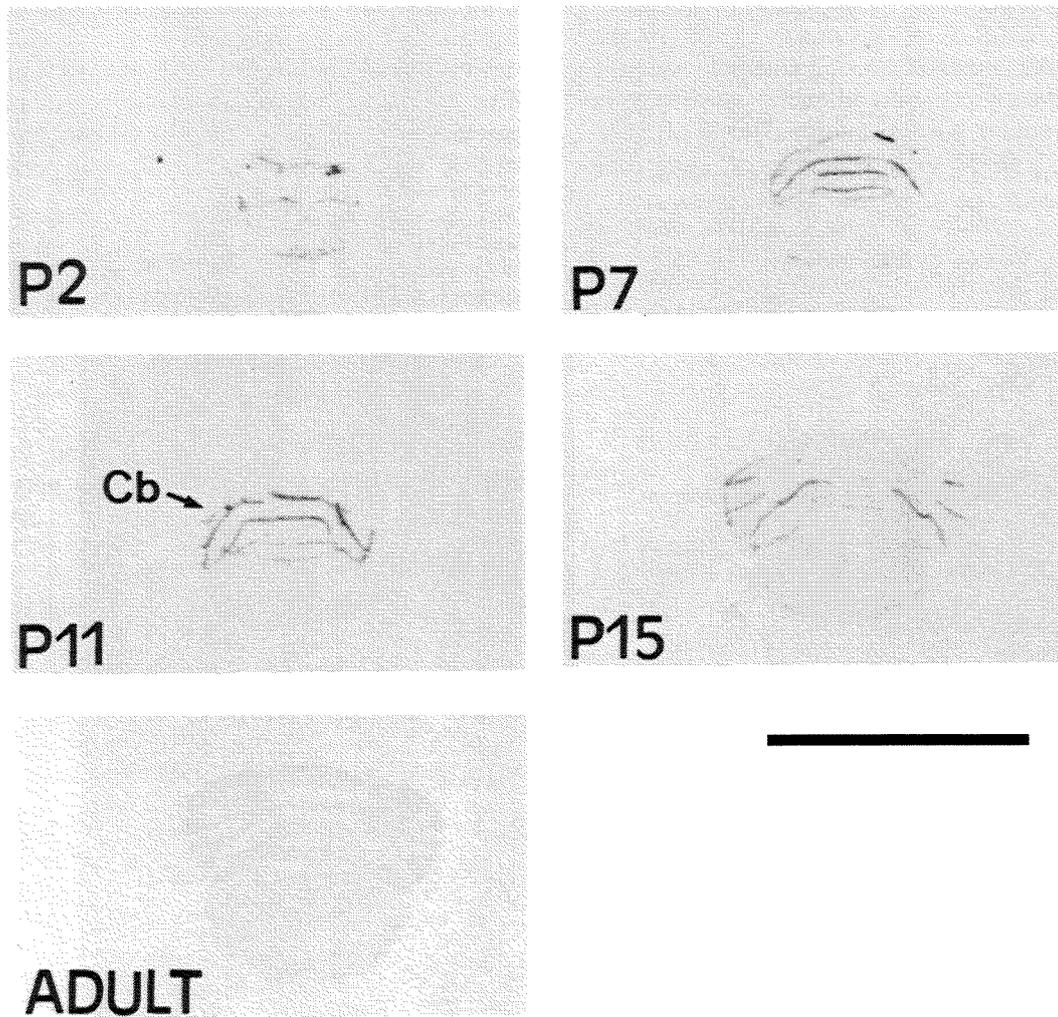


Fig. 3-1 Localization of FGFR-4 mRNA in coronal sections of the rat cerebellums at different postnatal development stages (P2, P7, P11, P15 and ADULT). The coronal sections of the rat cerebellums were hybridized with the ^{35}S -labeled FGFR-4 antisense RNA probe and exposed to X-ray film. Cb, cerebellum. Scale bar = 1 cm.

第二節 小脳におけるFGFR-4 mRNAの一過性発現

第一節でFGFR-4 mRNAの強い発現が認められた生後11日目の小脳皮質を高倍率で検討したところ、強いシグナルは外顆粒層に認められた (Fig. 3-2)。さらに、この領域においてFGFR-4 mRNAの発現細胞を検討したところ、外顆粒層の表層、つまり増殖領域の顆粒細胞に発現していた (Fig. 3-3)。

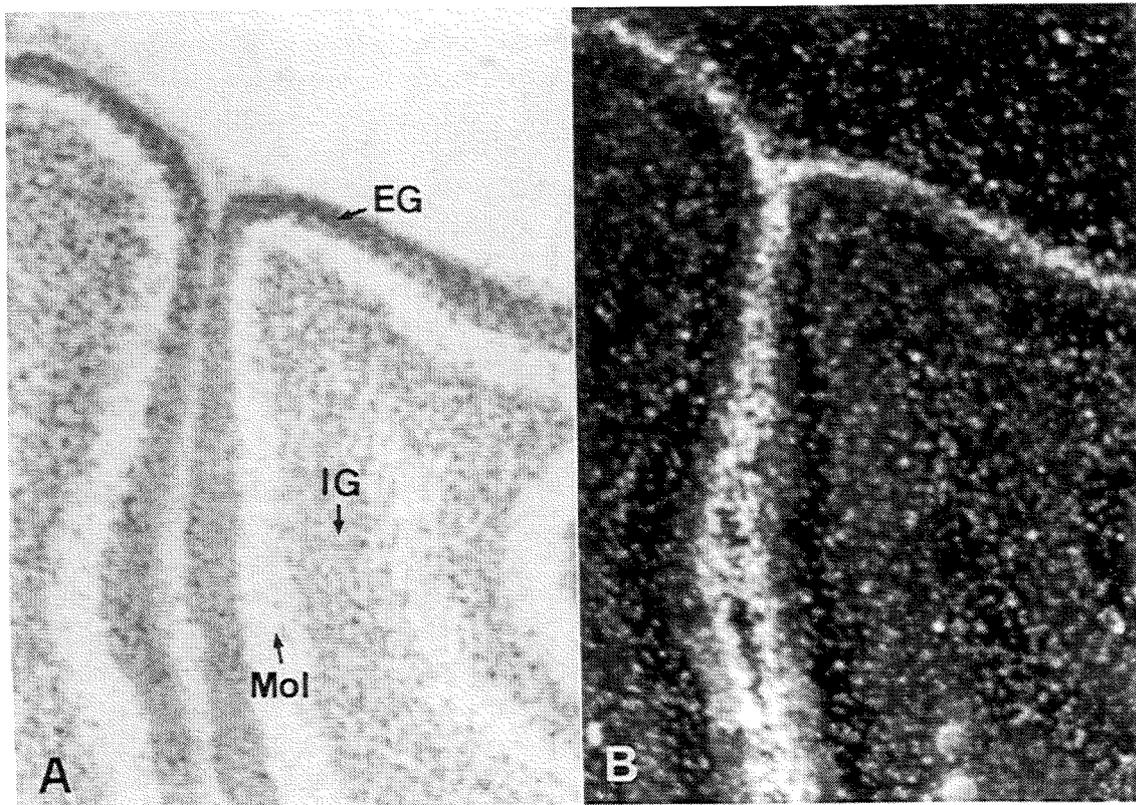


Fig. 3-2 Localization of FGFR-4 mRNA in coronal sections of the rat cerebellum (P11). The coronal section of the rat cerebellum was hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-4 antisense RNA probe. The labeled section was counterstained with cresyl violet. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs. B, white grains show the localization of FGFR-4 mRNA. EG, external granule layer; Mol, molecular layer; IG, internal granule layer. Scale bar = 200 μ m.

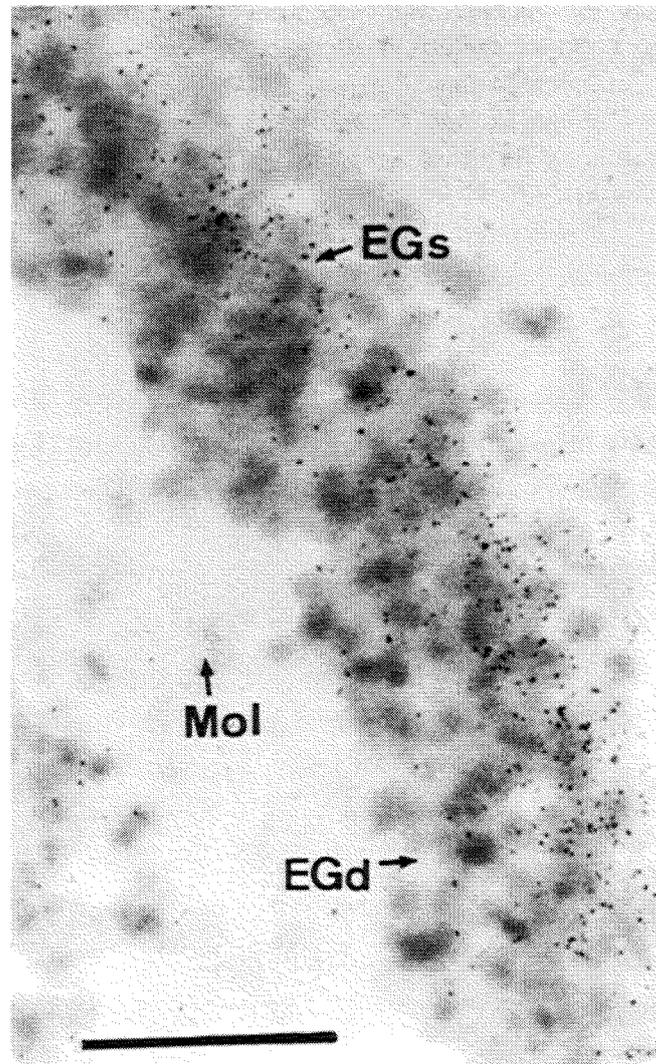


Fig. 3-3 Cellular localization of FGFR-4 mRNA in the external granule layer of the rat cerebellum (P11). The coronal section of the rat cerebellum was hybridized with the ³⁵S-labeled FGFR-4 antisense RNA probe. The labeled section was counterstained with cresyl violet. Black grains show the localization of FGFR-4 mRNA. EGs, superficial zone of the external granule layer; EGd, deep zone of the external granule layer; Mol, molecular layer. Scale bar = 50 μ m.

考察

FGFによるFGFR-1, -2, -3の活性化は、様々なタイプの細胞の増殖を誘導するが、FGFR-4を介する細胞増殖の報告はまだない。FGFR-1あるいはFGFR-4を発現させた細胞を比較した場合、FGFR-1を活性化した時のみ細胞の生存維持及び増殖が誘導される(65)。また、FGFR-4の活性化に関与しているシグナル分子は、FGFR-1の場合とは異なっていた(66)。FGFR-4の活性化により、ホスホリパーゼC γ の弱いリン酸化が起こることのみが報告されている(67)。このことは、FGFR-4のみがFGF受容体ファミリーの中で異なるシグナル伝達経路を持っていることを示唆している。

本研究で、著者は生後の発達過程におけるFGF受容体ファミリーmRNAのラット脳内発現分布を検討し、FGFR-4 mRNAのみが生後の発達過程の初期において、一過性に小脳皮質の外顆粒層の増殖領域の顆粒細胞に中程度に発現していることを明らかにした。

また、著者らの研究室では、リガンドであるFGFファミリーmRNAの生後発達過程におけるラット脳内発現分布についても *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討しており、FGF-5 mRNA が小脳皮質の内顆粒層全域の顆粒細胞においてFGFR-4 mRNA が高発現している時期と同時期に一過性に発現していることを明らかにしている。その他の現在までに報告されている既知のFGFについては、生後発達過程の小脳皮質においてこのような一過性の発現は認められなかった。さらに、FGF-5がFGFR-4に結合することも明らかにしている。

小脳皮質の顆粒細胞は出生直後では小脳皮質の表面にあり、活発に増殖してまず外顆粒層を形成する。その後、生後7日目頃から分化して、平行線維を出しながら外顆粒層からプルキンエ細胞層下に移動し、次に内顆粒層を形成する。この顆粒細胞の増殖と移動のピークは生後11日目まで続き、平行線維は分子層としてプルキンエ細胞層上に残る。そして、生後約21日目には外顆粒層は完全に消失して内顆粒層が厚くなり、小脳の形態が完成すると報告されている(68)。

本研究で、この小脳皮質の顆粒細胞の増殖と移動の最も盛んな時期である生後11日目前後にFGFR-4 mRNA が外顆粒層の顆粒細胞で強く発現していることが明らかになり、また、ほぼ同時期にFGF-5 mRNAが内顆粒層の顆粒細胞で発現しているという報告から、FGF-5がFGFR-4を刺激し、外顆粒層の顆粒細胞の増殖を促進することにより、小脳皮質の形態形成に関与している可能性が示唆された。

実験方法（第二章）

1. 動物

実験には雄性Wistar系ラット(2日、7日、11日、15日、49日齢)を用いた。

2. 脳の取り出しおよび切片作製

第一章実験方法 2. および 5. に同じ。

3. FGF受容体ファミリーの鋳型DNAの調製とプローブの標識

第一章実験方法 6. に同じ。

4. ISH法による検討

第一章実験方法 7. に同じ。

総括および結論

本研究において著者は、FGF受容体の脳内発現に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

1. ラットから4種類のFGF受容体 (FGFR-1~FGFR-4) の膜貫通領域をコードしているcDNAフラグメントを単離し、ラットにおいてもFGF受容体が4種類存在することを明らかにした。
2. FGF受容体のうちFGFR-1 mRNAは、脳内で広範囲に発現していたが、特に、海馬の歯状回及びCA1、CA2、CA3野、脚橋被蓋核、橋核、小脳などの特定の神経核の神経細胞と考えられる細胞で強い発現が認められた。従って、FGFはFGFR-1を介して神経細胞一般の機能に関与しているものと考えられる。
3. FGFR-2とFGFR-3 mRNAは、それぞれ脳内全域にわたってオリゴデンドロサイトとアストロサイトに発現していることから、FGFR-2はオリゴデンドロサイトの機能を、FGFR-3はアストロサイトの機能をそれぞれ制御している可能性が示唆された。
4. FGFR-4 mRNAは、内側手綱核のコリン作動性ニューロンにのみ選択的に発現していることから、FGFR-4は内側手綱核の塩・水分バランスをコントロールする神経メカニズムに関与しているものと考えられる。
5. 脳に発現しているFGF受容体ファミリーのイムノグロブリン様ドメインIII領域のアイソフォームは、4種類ともすべてIIIc型であることを明らかにした。
6. ラットの生後の脳発達過程の初期において、4種類のFGF受容体のうち、FGFR-4 mRNAのみが小脳皮質の外顆粒層の増殖領域の顆粒細胞で、一過性に強く発現していた。このFGFR-4 mRNAが発現している時期は、小脳皮質の顆粒細胞の増殖と移動の最も盛んな時期であることから、FGFR-4は小脳皮質の形態形成に関与しているものと思われる。

本研究の成果は、FGFとFGF受容体の対応関係の解明に有用な知見となるだけでなく、脳内におけるFGFの生理的機能の解明に寄与するものである。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただき、終始御指導・御鞭撻を賜りました京都大学薬学部伊藤信行教授に深く感謝致します。また、多くの貴重な御助言を賜りました京都大学薬学部佐藤公道教授、尾崎恵一助手、南 雅文助手、並びに、藪内一輝博士に心から感謝の意を表します。

さらに、種々の御助言を賜りました京都大学薬学部藤林康久助教授、ならびに本研究に御協力を頂きました矢崎直子修士、細井陽介修士、並びに、京都大学薬学部遺伝子薬学教室の方々に心から感謝致します。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

- 1) Yazaki, N., Hosoi, Y., Kawabata, K., Miyake, A., Minami, M., Satoh, M., Ohta, M., Kawasaki, T. and Itoh, N.
Differential expression patterns of mRNAs for members of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-1—FGFR-4, in rat brain
Journal of Neuroscience Research 37, 445-452 (1994)
- 2) Itoh, N., Yazaki, N., Tagashira, S., Miyake, A., Ozaki, K., Minami, M., Satoh, M., Ohta, M. and Kawasaki, T.
Rat FGF receptor-4 mRNA in the brain is expressed preferentially in the medial habenular nucleus
Molecular Brain Research 21, 344-348 (1994)
- 3) Miyake, A., Minami, M., Satoh, M., Ohta, M. and Itoh, N.
Transient expression of FGF receptor-4 mRNA in the rat cerebellum during postnatal development
Molecular Brain Research 31, 95-100 (1995)
- 4) Miyake, A., Hattori, Y., Ohta, M. and Itoh, N.
Rat oligodendrocytes and astrocytes preferentially express fibroblast growth factor receptor-2 and -3 mRNAs
Journal of Neuroscience Research 45, 534-541 (1996)
- 5) Miyake, A. and Itoh, N.
Rat fibroblast growth factor receptor-4 mRNA in the brain is preferentially expressed in cholinergic neurons in the medial habenular nucleus
Neuroscience Letters 203, 101-104 (1996)

引用文献

1. Baird, A., & Klagsbrun, M. *Cancer Cells* 3, 239-243 (1991)
2. Burgess, W. H., & Maciag, T. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 575-606 (1989)
3. Morrison, R. S., Sharma, A., De, Vellis, J., & Bradshaw, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7537-7541 (1986)
4. Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, M., Sato, B., Matuo, H., & Matsumoto, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8928-8932 (1992)
5. Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T., & Kurokawa, T. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4251-4259 (1993)
6. Chellaian, A., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J., & Ornitz, D. M. *J. Biol. Chem.* 269, 11620-11627 (1994)
7. Yamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S., & Itoh, N. *J. Biol. Chem.* 271, 15918-15921 (1996)
8. Smallwood, P. M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J. P., Hendry, S. H., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Nathans, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9850-9857 (1996)
9. McWhirter, J. R., Goulding, M., Weiner, J. J. A., Chun, J., & Murre, C. *Development* 124, 3221-3232 (1997)
10. Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, M., Arakawa, T., & Itoh, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)
11. Aaronson, S. A., Bottaro, D. P., Miki, T., Ron, D., Finch, P. W., Fleming, T. P., Ahn, J., Taylor, W. G., & Rubin, J. S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 62-77 (1991)
12. Coulier, F., Ollendorff, V., Marics, I., Rosnet, O., Batoz, M., Planche, J., Marchetto, S., Pebusque, M-J., deLapeyriere, O., & Birnbaum, D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 53-61 (1991)
13. Dickson, C., Fuller-Pace, F., Kiefer, P., Acland, P., MacAllan, D., & Peters, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 18-26 (1991)
14. Yoshida, T., Sakamoto, H., Miyagawa, K., Sugimura, T., & Takeda, M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 27-37 (1991)
15. Goldfarb, M., Bates, B., Drucker, B., Hardin, J., & Haub, O. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 38-52 (1991)

16. Gospodarowicz, D. *Methods Enzymol.* 147, 107-119 (1987)
17. Tagashira, S., Ozaki, K., Ohta, M., & Itoh, N. *Mol. Brain Res.* 30, 233-24 (1995)
18. Unsicker, K., Reichert-Preibsch, H., Schmidt, R., Pettmann, B., Labourdette, G., & Sensenbrenner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5459-5463 (1987)
19. Walicke, P. A. *J. Neurosci.* 8, 2618-2627 (1988)
20. Lee, P. L., Johnson, D. E., Cousens, L. S., Fried, V.A., & Williams, L.T. *Science* 245, 57-60 (1989)
21. Ruta, M., Howk, R., Ricca, G., Drohan, W., Zabelshansky, M., Laureys, G., Barton, D. E., Francke, U., Schlessinger, J., & Givol, D. *Oncogene* 3, 9-15 (1988)
22. Isacchi, A., Bergonzoni, L., & Sarmientos, P. *Nucleic Acids Res.* 18, 1906 (1990)
23. Itoh, N., Terachi, T., Ohta, M., & Kurokawa-Seo, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 680-685 (1990)
24. Johnson, D. E., Lee, P. L., Lu, J., & Williams, L. T. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4728-4736 (1990)
25. Dionne, C. A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J. M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W. H., Jaye, M., & Schlessinger, J. *EMBO J.* 9, 2685-2692 (1990)
26. Hattori, Y., Odagiri, H., Nakatani, H., Miyagawa, K., Naito, K., Sakamoto, H., Katoh, O., Yoshida, T., Sugimura, T., & Terada, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5983-5987 (1990)
27. Keegan, K., Johnson, D. E., Williams, L. T., & Hayman, M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1095-1099 (1991)
28. Jaye, M., Schlessinger, J. & Dionne, C. A. *Biochim. Biophys. Acta* 1135, 185-199 (1992)
29. Partanen, J., Vainikka, S., Korhonen, J., Armstrong, E., & Alitalo, K. *Prog. Growth Factor Res.* 4, 69-83 (1992)
30. Pettmann, B., Weibel, M., Sensenbrenner, M., & Labourdette, G. *FEBS Lett.* 189, 102-108 (1985)
31. Eccleston, P. A., & Silberberg, D. H. *Dev. Brain Res.* 353, 315-318 (1985)
32. Dautigny, A., Alliel, P. M., D'Auriol, L., Dinh, D. P., Nussbaum, J. L., Galbert, F., & Jolles, P. *FEBS Lett.* 188, 33-36 (1985)

33. Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M., & Vaughn, J. E. *Brain Res.* 266, 97-119 (1983)
34. Oh, J. D., Woolf, N. J., Roghani, A., Edwards, R. H., & Butcher, L. L. *Neuroscience* 47, 807-822 (1992)
35. Brice, A., Berrard, S., Raynaud, B., Ansieau, T., Coppola, M. J., Weber, M. J., & Mallet, J. *J. Neurosci. Res.* 23, 266-273 (1989)
36. Dell, K. R., & Williams, L.T. *J. Biol. Chem.* 267, 21225-21229 (1992)
37. Ornitz, D. M., & Leder, P. *J. Biol. Chem.* 267, 16305-16311 (1992)
38. Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., & Goldfarb, M. *J. Biol. Chem.* 271, 15292-15297 (1996)
39. Mattson, M. P., Murrain, M., Guthrie, P. B., & Kater, S. B. *J. Neurosci.* 9, 3728-3740 (1989)
40. Anderson, K. J., Dam, D., Lee, S., & Cotman, C. W. *Nature* 332, 369-361 (1988)
41. Wanaka, A., Johnson, Jr., E. M., & Milbrandt, J. *Neuron* 5, 267-281 (1991)
42. Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. *EMBO J.* 6, 1347-1354 (1991)
43. Horlick, R. A., Stack, S. L., & Cooke, G. M. *Gene* 120, 291-295 (1992)
44. Gerfen, C. R. in *Methods in Neurosciences* (Conn, P. M., ed) Vol. 1, pp. 79-97, Academic Press, San Diego (1989)
45. Hattori, Y., Yamasaki, M., Konishi, M., & Itoh, N. *Mol. Brain Res.* 47, 139-146 (1997)
46. Wilcox, B. J., & Unnerstall, J. R. *Neuron* 6, 397-409 (1991)
47. Emoto, N., Gonzalez, A-M., Walicke, P. A., Wada, E., Simmons, D. M., Shimasaki, S., & Baird, A. *Growth Factors* 2, 21-29 (1989)
48. Pettmann, B., Labourdette, G., Weibel, M., & Sensenbrenner, M. *Neurosci. Lett.* 68, 175-180 (1986)
49. Woodward, W. R., Nishi, R., Meshul, C. K., Williams, T. E., Coulombe, M., & Eckenstein, F. P. *J. Neurosci.* 12, 142-152 (1992)

50. Unsicker, K., Grothe, G., Ludecke, G., Otto, D., & Westermann, R. in *Neurotrophic Factors* (Loughlin, S. E., and Fallon, J. H. eds) 313-338, Academic Press, San Diego (1993)
51. Elde, R., Cao, Y., Cintra, A., Brelje, C., Pelto-Huikko, M., Junttila, T., Fuxe, K., Pettersson, R. F., & Hokfelt, T. *Neuron* 7, 349-364 (1991)
52. Lengvari, I., Koves, K., & Halasz, B. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 21, 75-83 (1970)
53. Faull, R. L. M., & Mehler, W. R. in *The Rat Nervous System* (Paxinos, G., ed) Vol. 1, pp. 129-168, Academic Press, Sydney (1985)
54. Contestabile, A., & Flumerfelt, B. A. *J. Comp. Neurol.* 196, 253-270 (1981)
55. Contestabile, A., Villani, L., Fasolo, A., Franzoni, M. F., Gribaudo, L., Oktedalen, O., & Fonnum, F. *Neuroscience* 21, 253-270 (1987)
56. Gispen, W. H., Schotman, P., & De Kloet, E. R. *Neuroendocrinol.* 9, 285-296 (1972)
57. Chomoczynski, P., & Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987)
58. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467 (1977)
59. Yazaki, N., Hosoi, K., Kawabata, A., Miyake, A., Minami, M., Satoh, M., Ohta, M., Kawasaki, T., & Itoh, N. *J. Neurosci. Res.* 37, 445-452 (1994)
60. Asai, T., Wanaka, A., Kato, H., Masana, Y., Seo, M., & Tohyama, M. *Mol. Brain Res.* 17, 174-178 (1993)
61. Peters, K., Ornitz, D., Werner, S., & Williams, L. *Dev. Biol.* 155, 423-430 (1993)
62. Miyake, A., Hattori, Y., Ohta, M., & Itoh, N. *J. Neurosci. Res.* 45, 534-541 (1996)
63. Itoh, N., Yazaki, N., Tagashira, S., Miyake, A., Ozaki, K., Minami, M., Satoh, M., Ohta, M., & Kawasaki, T. *Mol. Brain Res.* 21, 344-348 (1994)
64. Miyake, A., & Itoh, N. *Neurosci. Lett.* 203, 101-104 (1996)
65. Wang, J., Gao, G., & Goldfarb, M. *Mol. Cell. Biol.* 14, 181-188 (1994)
66. Vainikka, S., Partanen, J., Bellosta, P., Coulier, F., Basilico, C., Jaye, M., & Alitalo, K. *EMBO J.* 11, 4273-4280 (1992)
67. Shaoul, E., Reich-Slotky, R., Berman, B., & Ron, D. *Oncogene* 10, 1553-1561 (1995)

68. Altmann, J. *J. Comp. Neurol.* 145, 353-398 (1972)