

|             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| 氏 名         | やま うち はじめ<br>山 内 肇                          |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (薬 学)                                   |
| 学 位 記 番 号   | 薬 博 第 647 号                                 |
| 学位授与の日付     | 平 成 20 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 | ゼブラフィッシュ Fgf21 の造血因子としての役割とその作用メカニズム<br>の解明 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 中 山 和 久 教 授 竹 島 浩

## 論 文 内 容 の 要 旨

線維芽細胞増殖因子 Fgf は様々な細胞に対して増殖および分化活性を示す分泌性シグナル因子である。その生理活性は血管形成、腫瘍形成、創傷治癒、神経生存維持など多種多様であり、これを解明することは発生生物学などの基礎的研究だけでなく再生医療、創薬科学など臨床的な研究においても非常に有用な知見を与えるものである。

Fgf21 は当研究室で新規に単離・同定された Fgf である。Fgf21 はこれまでの解析でラット成体の肝臓に高発現することが知られていたが詳細な機能については不明であった。よって申請者は Fgf21 の機能を明らかにすることを目的として、実験動物として簡便かつ迅速に機能阻害実験が可能でありヒトと同等の遺伝子を持つなど個体レベルでのモデル動物として優れた特徴を有するゼブラフィッシュを用いて解析を行った。

### 第一章 ゼブラフィッシュ Fgf21 の単離・同定

ゼブラフィッシュやヒトを含む脊椎動物において Fgf 相同体のアミノ酸配列は高度に保存されている。そこで DNA データベース上に登録されているゼブラフィッシュ遺伝子断片からヒト FGF21 と同一性を有する配列を発見し、全翻訳領域の塩基配列を決定したところ 194 アミノ酸をコードしていた。さらにこの遺伝子はゼブラフィッシュ染色体上においてヒト FGF21 が染色体上で近接している遺伝子のゼブラフィッシュ相同体と同様に近接していた。このことから申請者が単離・同定した遺伝子はヒト FGF21 のゼブラフィッシュ相同体であると考えられた。

次に、ゼブラフィッシュにおける Fgf21 の機能を解析するため *Fgf21* mRNA に対するモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) をゼブラフィッシュ受精卵に導入しその機能を阻害した。その結果、体軸が異常に湾曲した表現型を示した。さらに、赤血球の検出を行ったところ *Fgf21* MO 胚では赤血球が欠失していた。また、機能回復実験として *Fgf21* mRNA 翻訳領域全長を作製し *Fgf21* MO と同時に導入した結果、この表現型は顕著に機能を回復した。一方で、野生型胚に Fgf 受容体阻害剤である SU5402 を一時的に処置したところ、*Fgf21* MO 導入胚と同様に赤血球を欠失していた。以上の結果は、Fgf21 が血管形成あるいは血液細胞生成に関与している可能性を示唆している。

### 第二章 造血因子としての Fgf21

*Fgf21* MO 導入胚における血管形成の影響を検討した。野生型および *Fgf21* MO 導入胚の血管への蛍光色素の導入による血管造影、および血管内皮細胞マーカーである *flk1* の発現解析を行い比較検討した結果、*Fgf21* MO 導入胚において血管は mRNA レベルでも異常は見られず正常に形成されていた。このことから Fgf21 は血管形成には関与せず血液細胞生成特異的に関与していることが明らかとなった。

さらに、ゼブラフィッシュ *Fgf21* の発生過程における発現パターンを解析した結果、胎児期造血において血液細胞を生成する部位に隣接する脊索に発現が見られた。このことはゼブラフィッシュの脊索より発現した *Fgf21* が造血部位に作用することで胎児期造血に関与していることを示唆している。

### 第三章 造血機構における Fgf21 の作用メカニズム

血液細胞の分化過程は脊椎動物間で高度に保存されている。中胚葉より誘導を受けたヘマンギオブラストは血管内皮細胞または造血幹細胞へ分化する。その後、造血幹細胞は前駆細胞を経て赤血球、骨髄球（顆粒球，マクロファージ），リンパ球へと分化する。これらの分化過程へのFgf21の関与を調べるために，Fgf21 MO導入胚における各細胞のマーカー解析を行った。その結果，ヘマンギオブラストマーカー*scl*および造血幹細胞マーカー*gata2*の発現に変化は見られなかった。一方で赤血球前駆細胞マーカー*gata1*および骨髄球前駆細胞マーカー*pu.1*の発現が野生型よりも大幅に減少し，リンパ球前駆細胞マーカー*rag1*は変化が見られなかった。以上の結果は，Fgf21は胎児期の前期，すなわちヘマンギオブラストマーカーおよび造血幹細胞の形成には関与していないが胎児期の後期，すなわち造血幹細胞から赤血球，骨髄球への運命決定に関与している可能性を示唆している。

次に，Fgf21の細胞増殖活性と細胞生存維持活性を調べた。まず，抗リン酸化ヒストンH3抗体を用いた免疫組織化学染色で野生型およびFgf21 MO導入胚で増殖中の細胞を比較検討したところ両者に差は見られなかった。またTUNEL染色によって細胞死の検出を行ったが両者に差は見られなかった。以上の結果からFgf21は血液細胞への増殖活性および生存維持活性は無く運命決定特異的に作用していることが明らかとなった。

Fgfはその受容体であるFgfrに結合することによって作用を及ぼすことができる。そこで，Fgfr MOを受精卵に導入し検討を行った。その結果，Fgfr2 MO導入胚においてFgf21 MO胚と同様に赤血球の欠失が見られた。このことは，Fgf21はFgfr2を介して赤血球形成に関与していることを示唆している。

これまで，哺乳動物でFgf21の造血機構における具体的な作用については報告されていない。当研究室が実験モデル動物のゼブラフィッシュを用いた解析で得られた知見では，Fgf21は血液細胞の増殖作用には関与せず分化運命決定特異的に関与していることが明らかとなった。このことから，白血病や貧血症などにより赤血球が減少した状態からFGF21を添加することにより過剰な増殖を伴わない赤血球の回復が期待できる。本研究は造血機構におけるFgf21の役割を解明するのみならず，造血系疾患の病因解明や予防，今後の治療法研究に重要な役割を果たすものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

線維芽細胞増殖因子Fgfは様々な細胞に対して増殖および分化活性を示す分泌性シグナル因子である。その生理活性は血管形成，腫瘍形成，創傷治癒，神経生存維持など多種多様であり，これを解明することは発生生物学などの基礎的研究だけでなく再生医療，創薬科学など臨床的な研究においても非常に有用な知見を与えるものである。

Fgf21はこれまでの解析でラット成体の肝臓に高発現することが知られていたが詳細な機能については不明であった。よって申請者はFgf21の機能を明らかにすることを目的として，実験動物として簡便かつ迅速に機能阻害実験が可能でありヒトと同等の遺伝子を持つなど個体レベルでのモデル動物として優れた特徴を有するゼブラフィッシュを用いて解析を行った。

DNAデータベース上に登録されているゼブラフィッシュ遺伝子断片からヒトFGF21と相同性を有するゼブラフィッシュFgf21を同定した。ゼブラフィッシュにおけるFgf21の機能を解析するためFgf21 mRNAに対するモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド（MO）をゼブラフィッシュ受精卵に導入しその機能を阻害した。その結果，体軸が異常に湾曲した表現型を示した。さらに，赤血球の検出を行ったところFgf21 MO胚では赤血球が欠失していた。また，機能回復実験としてFgf21 mRNA翻訳領域全長を作製しFgf21 MOと同時に導入した結果，この表現型は顕著に機能を回復した。

Fgf21 MO導入胚における血管形成の影響を検討した。野生型およびFgf21 MO導入胚の血管への蛍光色素の導入による血管造影，および血管内皮細胞マーカーである*flk1*の発現解析を行い比較検討した結果，Fgf21 MO導入胚において血管はmRNAレベルでも異常は見られず正常に形成されていた。このことからFgf21は血管形成には関与せず血液細胞生成特異的に関与していることが明らかとなった。さらに，ゼブラフィッシュFgf21の発生過程における発現パターンを解析した結果，胎児期造血において血液細胞を生成する部位に隣接する脊索に発現が見られた。

血液細胞の分化過程は脊椎動物間で高度に保存されている。中胚葉より誘導を受けたヘマンギオブラストは血管内皮細胞または造血幹細胞へ分化する。その後，造血幹細胞は前駆細胞を経て赤血球，骨髄球（顆粒球，マクロファージ），リンパ球へと分化する。Fgf21 MO導入胚における各細胞のマーカー解析を行った。その結果，ヘマンギオブラストマーカー*scl*

および造血幹細胞マーカー *gata2* の発現に変化は見られなかった。一方で赤血球前駆細胞マーカー *gata1* および骨髄球前駆細胞マーカー *pu.1* の発現が野生型よりも大幅に減少し、リンパ球前駆細胞マーカー *rag1* は変化が見られなかった。以上の結果は、Fgf21 は胎児期の前期、すなわちヘマンギオブラストマーカーおよび造血幹細胞の形成には関与していないが胎児期の後期、すなわち造血幹細胞から赤血球、骨髄球への運命決定に関与している可能性を示唆している。

Fgf21 の細胞増殖活性と細胞生存維持活性を調べた。野生型および *Fgf21* MO 導入胚で増殖中の細胞を比較検討したところ両者に差は見られなかった。また細胞死の検出を行ったが両者に差は見られなかった。以上の結果から Fgf21 は血液細胞への増殖活性および生存維持活性は無く運命決定特異的に作用していることが明らかとなった。

Fgf21 は血液細胞の増殖作用には関与せず分化運命決定特異的に関与していることが明らかとなった。このことから、白血病や貧血症などにより赤血球が減少した状態から FGF21 を添加することにより過剰な増殖を伴わない赤血球の回復が期待できる。本研究は造血機構における Fgf21 の役割を解明するのみならず、造血系疾患の病因解明や予防、今後の治療法研究に重要な役割を果たすものと期待される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22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。