

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	佐々木 さやか
論文題目	心臓に高発現するFgf16の心筋細胞増殖および圧負荷性心肥大や線維化における役割		
（論文内容の要旨） 線維芽細胞増殖因子（Fgf）は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞において、増殖活性や分化誘導などの多様な生物活性をもつ細胞間シグナル因子である。これまでにFgfが成体において血管新生、創傷治癒、胎児において四肢形成、中胚葉誘導、脳形成に関与することが明らかにされており、これらの知見が遺伝子治療や再生医療の分野でも注目されている。現在、Fgfファミリーとして22種類のFgfがヒト及びマウスにおいて同定されている。このうち、Fgf10、Fgf16～23の9種類のFgfは申請者の所属研究室で単離、同定された。申請者は、この中でFgf16に着目し遺伝子欠損マウスの作製、解析を行い生理的機能の解明を試みた。 第一章 マウスの胎生期の心臓においてFgf16は心筋細胞の増殖に必要である マウスFgf16は、胎生期から成体に至るまでの心臓において主に発現していた。また、成体での心重量体重比が野生型(WT)マウスに比べFgf16欠損(KO)マウスにおいて有意に減少していた。一般に、脊椎動物の心筋細胞の増殖は生後間もなく停止し、心筋細胞数は胎児期の増殖により決定される。そこで、成体における心臓の縮小原因を検討するため、胎生期の心筋細胞の増殖活性を検討した結果、Fgf16 KOマウスの心筋細胞増殖活性はWTマウスに比べ有意に減少していた。以上の結果より、Fgf16が胎生期の心筋細胞の増殖を促進することがわかった。 第二章 Fgf16はAngiotensin IIにより誘導される圧負荷性心肥大や線維化を抑制する 上記の研究により、Fgf16が成体の心臓においても発現することを明らかにしたが、成体におけるFgf16の生理的機能は解明されていない。一方、心臓に発現する因子の中でも生理的条件下では大きな役割を持たないものの、病態時に重要な役割を持つものがいくつか存在することが知られている。そこで、生後10週齢のWTマウス及びFgf16 KOマウスにAngiotensin II（Ang II）の持続的皮下投与による圧負荷刺激下におけるFgf16の機能解析を行うことにした。 心重量体重比はAng II投与後のWTマウスに比べFgf16 KOマウスにおいて有意に増加していた。一方、脈拍や心室壁の厚みに差は見られなかったが、拡張期左室内径はAng II投与後のWTマウスに比べFgf16 KOマウスにおいて増加傾向が、心機能パラメーターに低下傾向が見られた。また、心肥大関連因子である心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳性ナトリウム利尿ペプチド、ミオシン重鎖βの心臓における発現は、Ang II投与後のWTマウスに比べFgf16 KOマウスにおいていずれも増加傾向が見られた。以上の結果より、Fgf16が圧負荷により生じる心肥大や心機能の低下を抑制することがわかった。 さらに、Ang II投与後のWTマウスに比べFgf16 KOマウスにおいて心臓の線維化が有意に増			

加していた。また、線維化関連因子であるコラーゲン1a、結合組織増殖因子、ペリオスチンの心臓における発現は、Ang II投与後のWTマウスに比べ*Fgf16* KOマウスにおいて、有意に増加しており、マトリクスメタロプロテイナーゼ2の発現にも増加傾向が見られた。以上の結果より、*Fgf16*が圧負荷により生じる線維化を抑制することがわかった。

圧負荷により生じる心肥大や線維化において、多くの心肥大・線維化関連因子が関与することが知られている。なかでも*Tgfβ1*は、圧負荷によりその発現が著しく増加し、心肥大や線維化を促進する主要な因子であることが報告されている。そこで、Ang II投与後の心臓における*Tgfβ1*の発現を検討した結果、WTマウスに比べ*Fgf16* KOマウスにおいて有意に増加していた。以上の結果より、*Fgf16*は*Tgfβ1*の発現を調節し、圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することがわかった。

次に、心肥大や線維化に関与する重要な細胞内シグナル経路として知られるMAPK経路を検討した結果、Ang II投与後のWTマウスに比べ*Fgf16* KOマウスにおいてERKのリン酸化に増加傾向が見られた。一方、p38のリン酸化に差は見られなかった。以上の結果より、*Fgf16*はERKのリン酸化を抑制し、圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することがわかった。

以上、申請者は*Fgf16*が胎生期において心筋細胞増殖を促進しており、成体においては圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することを明らかにした。本研究は、心臓形成や心疾患に対する治療薬開発に有用な知見を提供するものと期待される。

(論文審査の結果の要旨)

多機能性細胞間シグナル分子の代表的なものとして線維芽細胞増殖因子 (Fgf) が良く知られている。Fgfは当初、線維芽細胞に対する細胞増殖因子として発見されたが、その後の研究により、様々な細胞に対して、細胞増殖活性や分化誘導能などを示す多機能性細胞間シグナル分子であることが明らかにされている。その生理的作用として、成体では血管新生、創傷治癒、代謝調節、胎生期において四肢形成、中胚葉誘導、脳形成等の形態形成に関与することが明らかにされている。さらに、Fgfのこれらの生物活性、生理的役割から、Fgfの遺伝子治療や再生医療の分野での応用が期待されている。現在、Fgfは22種類の遺伝子からなる大きな遺伝子ファミリーを形成し、ヒト、マウスをはじめとする多くの脊椎動物に普遍的に存在することが明らかにされ、脊椎動物の機能に重要な役割を果たしていることが期待されている。これらのFgfの内、Fgf16は申請者が所属する研究室で単離、同定されたものである。しかし、Fgf16の生理的役割は不明であった。申請者は、この機能不明なFgf16に着目し、個体レベルでの機能解析が可能なマウスを用い、Fgf16遺伝子欠損マウスの作製、解析を行い、その生理的機能の解明を試みた。

申請者はFgf16がマウス胎生期から成体に至るまで、主として心臓に高発現していることを明らかにした。さらに、Fgf16欠損マウスの成体での心重量体重比が野生型マウスに比べFgf16欠損マウスにおいて有意に減少していることを明らかにした。マウスの心筋細胞の増殖は生後間もなく停止し、心筋細胞数は胎児期の増殖により決定されることが明らかにされている。そこで、申請者は成体における心臓の縮小原因を明らかにするため、胎生期の心筋細胞の増殖活性を検討し、Fgf16 欠損マウスの心筋細胞増殖活性は野生型マウスに比べ有意に減少していること明らかにした。申請者のこの研究成果により、Fgf16が胎生期の心筋細胞の増殖を促進することが初めて解明された。

一方、Fgf16が成体の心臓においても発現することを明らかになったため、申請者は成体におけるFgf16の生理的機能は解明を試みた。まず、申請者は通常条件下でのFgf16遺伝子欠損マウスの機能を調べたが、その機能に大きな異常は観察されなかった。そこで、申請者は病態時にFgf16の心臓機能における役割を解明することを試みた。Angiotensin IIは高血圧症を誘導し、Angiotensin II投与マウスは圧負荷心筋症の良いモデルとして知られている。申請者は生後10週齢の野生型マウス及びFgf16 欠損マウスにAngiotensin II の持続的皮下投与による圧負荷刺激下におけるFgf16の心臓における機能解析を行った。

申請者は心重量体重比がAngiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいて有意に増加していることを明らかにした。さらに、申請者は脈拍や心室壁の厚みに差は見られなかったが、拡張期左室内径はAngiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいて増加傾向が、心機能パラメーターに

低下傾向があることを明らかにした。また、申請者は心肥大関連因子である心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳性ナトリウム利尿ペプチド、ミオシン重鎖 β の心臓における発現がAngiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいていずれも増加傾向があることを明らかにした。このように、申請者はFgf16が圧負荷により生じる心肥大や心機能の低下を抑制することを解明し、Fgf16の機能解析研究の進展に大きく貢献した。

さらに、申請者はAngiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいて心臓の線維化が有意に増加していることを明らかにした。さらに、申請者は線維化関連因子であるコラーゲン1a、結合組織増殖因子、ペリオスチンの心臓における発現を調べ、Angiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいて、有意に増加し、マトリクスメタロプロテイナーゼ2の発現にも増加傾向が見られることを明らかにした。これらの申請者の研究成果はFgf16が圧負荷により生じる線維化を抑制することを解明し、Fgf16の心臓の線維化のメカニズム解明に重要な手がかりを与えた。圧負荷により生じる心肥大や線維化において、多くの心肥大・線維化関連因子が関与することが知られている。なかでもTgf β 1は、圧負荷によりその発現が著しく増加し、心肥大や線維化を促進する主要な因子であることが明らかにされている。申請者はAngiotensin II投与後の心臓におけるTgf β 1の役割を解明するために、その発現を調べた。結果、野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいてTgf β 1の心臓における発現が有意に増加していることが明らかになった。これらの申請者の研究成果により、Fgf16はTgf β 1の発現を調節し、圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することが明らかになった。さらに、申請者は心肥大や線維化に関与する重要な細胞内シグナル経路として知られるMAPK経路を検討し、Angiotensin II投与後の野生型マウスに比べFgf16 欠損マウスにおいてERKのリン酸化に増加傾向が見られ、一方、p38のリン酸化に差は見られないことを明らかにした。これらの研究成果により、Fgf16はERKのリン酸化を抑制し、圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することが解明された。

以上、申請者はFgf16が胎生期では心筋細胞増殖を促進し、成体では圧負荷により生じる心肥大や線維化を抑制することを明らかにした。本研究成果は、心臓形成や心疾患に対する治療薬開発に有用な知見を提供するものと期待される。

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24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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 25年 3月 31日以降