

(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対し、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、神経細胞生存維持、胎児において四肢形成、中胚葉誘導、脳形成に関与してい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 ファミリーとしては 22 種類の Fgf がヒト及びマウスにおいてそれぞれ同定されており、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、同定されている。申請者はその中で生理的な機能が未知の 2 分子、*Fgf16*、*Fgf21* に着目した。*Fgf16* はこれまでに薬理作用として前駆褐色脂肪細胞、及び心筋細胞に対して増殖活性を持つことが報告されている。一方で *Fgf21* は肝臓由来の内分泌因子で、薬理作用として脂肪分解作用を有することが報告されている。しかし、両者の生理的な機能に関する報告はされておらず、申請者は遺伝子欠損マウスを作製、解析することで、生理的な機能の解明を試みた。

#### 第一章 マウス *Fgf16* の生理的な機能の解明

まずマウス *Fgf16* の発現パターンを検討したところ、胎児期の褐色脂肪組織と胎児期から成体に至るまでの心臓において発現していた。そこで *Fgf16* の生体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 *Fgf16* 欠損マウスを作製し、褐色脂肪組織及び心臓に特に着目して表現型解析を行った。まず褐色脂肪組織についてであるが、*Fgf16* 欠損マウスの褐色脂肪組織に形態上の明らかな異常や、脂肪滴の蓄積の異常が認められなかったことから、*Fgf16* は少なくとも褐色脂肪組織の形成に必須でないことが明らかとなった。また心臓について解析を行った結果、*Fgf16* 欠損マウスの心臓は野生型と比較して有意に縮小していた。さらに *Fgf16* 欠損マウスの心臓について詳細な解析を行ったところ、心筋細胞のサイズには野生型マウスとの差が無いが、心筋細胞数が野生型マウスと比較して有意に減少していることがわかった。一般に脊椎動物の心臓は生後間もなく心筋細胞の増殖が止まるため、心筋細胞数は主に胎児期の増殖により決定されることが知られている。そこで、*Fgf16* 欠損マウス胎児の心筋細胞の増殖活性を検討したところ、野生型マウスと比較して有意に減少していた。以上の結果より *Fgf16* が胎児期の心筋細胞の増殖において重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに、*Fgf16* 欠損マウスにおける心臓の縮小が心機能に影響を及ぼしていることを期待し、成体 *Fgf16* 欠損マウスの血圧や心機能パラメーターについて検討したが、異常は見られなかった。しかし、心臓の繊維化に関与することが知られている *BNP* の発現が野生型と比較して有意に低かった。この結果により *Fgf16* が *BNP* の発現を調節している可能性が明らかになった。

## 第二章 マウス Fgf21 の生理的な機能の解明

これまでに Fgf21 は肝臓由来の内分泌因子であり、薬理作用として脂肪分解作用を有することが報告されている。申請者は生理的な機能を解明する目的で、*Fgf21* 欠損マウスを作製し表現型解析を行った。*Fgf21* 欠損マウスは野生型マウスと比較して体重の増加傾向が見られ、白色脂肪組織 (WAT) の重量増加が見られた。また WAT を組織学的に検討したところ、脂肪細胞サイズの増加が認められた。摂食量やエネルギー消費量についても検討したが、野生型マウスとの差は見られなかった。また WAT において重要な脂肪分解酵素である、*hormone-sensitive lipase (Hsl)*、*Adipose triglyceride lipase (Atgl)* の発現について検討したところ、*Fgf21* 欠損マウスにおいて有意な発現低下が見られた。さらに脂肪分解酵素の活性について検討したところ、*Fgf21* 欠損マウスにおいて有意な活性低下が見られた。以上の結果により Fgf21 が WAT において脂肪分解を促進することが明らかになった。

また *Fgf21* の肝臓における発現は絶食後に著しく誘導されることが報告されている。絶食時の体内では、最初に肝グリコーゲン分解や糖新生により糖質のエネルギー供給が起こり、次いで WAT でトリグリセリドが脂肪酸に分解され、血中に放出される。そして肝臓で代謝されてケトン体として脳や筋肉でのエネルギー源となる。絶食により *Fgf21* の発現誘導が見られたことから、絶食後の WAT における脂質代謝についても検討した。その結果、野生型マウスでは絶食により WAT 重量の低下は見られず、脂肪分解はほとんど誘導されていなかった。一方で *Fgf21* 欠損マウスでは WAT 重量が絶食により減少しており、脂肪分解が誘導されていた。以上の結果により Fgf21 は絶食時に脂肪分解を抑制することが明らかになった。

これまでの研究で Fgf21 は肝臓におけるケトン体産生に必須であるという可能性が報告されている。そこで、申請者は絶食後のケトン体産生について検討した。その結果絶食後の *Fgf21* 欠損マウスの血中ケトン体濃度は野生型マウスと同様に絶食により著しく誘導され、肝臓におけるケトン体産生関連因子の発現量も野生型マウスと同程度であった。以上の結果により Fgf21 はケトン体産生において少なくとも必須ではないことが明らかになった。

以上、申請者は Fgf16 が胎児期の心筋細胞の増殖において重要な役割を有することを明らかにした。また Fgf16 が *BNP* の発現を調節する可能性を示した。さらに、Fgf21 が通常時には白色脂肪組織における脂肪分解を促進し、逆に絶食時には抑制することを明らかにした。また Fgf21 が肝臓でのケトン体産生に必須ではないことを明らかにした。本研究は、心臓形成及び脂質代謝メカニズムの解明、心疾患や脂質代謝関連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。

|      |          |
|------|----------|
| ふりがな | ほった ゆうへい |
| 氏 名  | 堀 田 祐 平  |

(論文審査の結果の要旨)

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対し、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。現在 Fgf ファミリーとしては 22 種類の Fgf がヒト及びマウスにおいてそれぞれ同定されており、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、同定されている。申請者はその中で生理的な機能が未知の 2 分子、*Fgf16*、*Fgf21* に着目した。*Fgf16* はこれまでに薬理作用として前駆褐色脂肪細胞、及び心筋細胞に対して増殖活性を持つことが報告されている。一方で *Fgf21* は肝臓由来の内分泌因子で、薬理作用として脂肪分解作用を有することが報告されている。しかし、両者の生理的な機能に関する報告はされておらず、申請者は遺伝子欠損マウスを作製、解析することで、生理的な機能の解明を試みた。

ジーンターゲット法により *Fgf16* 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行った。*Fgf16* 欠損マウスの心臓は野生型と比較して有意に縮小していた。さらに *Fgf16* 欠損マウスの心臓について詳細な解析を行ったところ、心筋細胞のサイズには野生型マウスとの差が無いが、心筋細胞数が野生型マウスと比較して有意に減少していることがわかった。そこで、*Fgf16* 欠損マウス胎児の心筋細胞の増殖活性を検討したところ、野生型マウスと比較して有意に減少していた。以上の結果より *Fgf16* が胎児期の心筋細胞の増殖において重要な役割を果たすことが明らかになった。一方、成体 *Fgf16* 欠損マウスの血圧や心機能パラメーターに異常は見られなかった。しかし、心臓の繊維化に関与することが知られている *BNP* の発現が野生型と比較して有意に低かった。この結果により *Fgf16* が *BNP* の発現を調節している可能性が明らかになった。

さらに、*Fgf21* 欠損マウスを作製し表現型解析を行った。*Fgf21* 欠損マウスは野生型マウスと比較して体重の増加傾向が見られ、白色脂肪組織 (WAT) の重量増加が見られた。また WAT を組織学的に検討したところ、脂肪細胞サイズの増加が認められた。摂食量やエネルギー消費量についても検討したが、野生型マウスとの差は見られなかった。さらに WAT における脂肪分解酵素の活性につい

て検討したところ、*Fgf21* 欠損マウスにおいて有意な活性低下が見られた。以上の結果により *Fgf21* が WAT において脂肪分解を促進することが明らかになった。

また *Fgf21* の肝臓における発現は絶食後に著しく誘導されることが報告されている。絶食後の WAT における脂質代謝についても検討した。その結果、野生型マウスでは絶食により WAT 重量の低下は見られず、脂肪分解はほとんど誘導されていなかった。一方で *Fgf21* 欠損マウスでは WAT 重量が絶食により減少しており、脂肪分解が誘導されていた。以上の結果により *Fgf21* は絶食時に脂肪分解を抑制することが明らかになった。

これまでの研究で *Fgf21* は肝臓におけるケトン体産生に必須であるという可能性が報告されている。そこで、申請者は絶食後のケトン体産生について検討した。しかし、*Fgf21* 欠損マウスの肝臓におけるケトン体産生関連因子の発現量も野生型マウスと同程度であった。以上の結果により *Fgf21* はケトン体産生において少なくとも必須ではないことが明らかになった。

以上、申請者は *Fgf16* が胎児期の心筋細胞の増殖において重要な役割を有することを明らかにした。さらに、*Fgf21* が通常時には白色脂肪組織における脂肪分解を促進し、逆に絶食時には抑制することを明らかにした。本研究は、心臓形成及び脂質代謝メカニズムの解明、心疾患や脂質代謝関連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のあるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 27 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。