

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390021
 研究課題名（和文） FGF シグナルの組織形成における役割とその分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Roles of FGF signaling in morphogenesis and their molecular mechanism
 研究代表者
 伊藤 信行（NOBUYUKI ITOH）
 京都大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：10110610

研究成果の概要：

Fgf16 遺伝子欠損マウス（Fgf16 KO マウス）を作製し、その表現形質を解析した。Fgf16 KO マウス野生型と外見上に大きな差はなかった。しかし、成体 Fgf16 KO マウスの心筋細胞数は有意に減少していた。また、胎生期の心筋細胞増殖が減少していた。一方、脈拍や血圧、短縮率や駆出率などの心機能パラメータはほぼ正常であった。しかし、BNP の発現が有意に低下した。Fgf16 は胎生期の心筋細胞増殖を促進し、成体においては BNP の発現を促進することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast growth factor (Fgf) は様々な細胞に対して多様な生理作用を示す多機能性細胞間シグナル分子であり、現在哺乳類において 22 種類が同定されている。その作用としては線維芽細胞に対する増殖活性だけでなく血管形成、腫瘍形成、創傷治癒、神経生

存維持、胎児期における形態形成など多様な生命現象に深く関与していることが知られている (1, 2)。このため Fgf の機能を解明することは生命科学に重要な知見をもたらすと考えられる。Fgf は哺乳類において 22 種類から成るファミリーを形成している。

2. 研究の目的

Fgf16 は、ラットを用いた解析により褐色脂肪組織や心臓に発現していることが確認されている (3, 4)。しかし、その詳細な機能は解明されていない。そこで、生体における *Fgf16* の機能を明らかにするため、*Fgf16* 遺伝子欠損マウス (*Fgf16* KO マウス) を作製し詳細な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR 法による *Fgf16* 発現パターンの解析

生後 8 週齢マウスの脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、胃、脾臓、胸腺、精巣、皮膚、骨格筋、褐色脂肪組織、白色脂肪組織について total RNA 及び RT-PCR 法を行い、*Fgf16* の発現パターンを解析した。また、胎生 12.5, 14.5, 16.5, 18.5 日齢及び生後 1, 7 日齢及び生後 8 週齢マウスの心臓について、total RNA 抽出及び RT-PCR 法を行い、*Fgf16* の発現パターンを検討した。さらに、生後 8 週齢マウスの心臓を心室と心房に分離し total RNA 抽出及び RT-PCR 法を行い、心臓における詳細な発現部位を検討した。また、生後 1 日齢マウスの心臓を心筋細胞と非心筋細胞に分離し total RNA 抽出及び RT-PCR 法を行い、より詳細な発現細胞を検討した。

(2) *Fgf16* KO マウスの作製

Fgf16 は X 染色体上に存在し、3 つの exon から成る。この 3 つの exon うち、exon2 の途中から exon3 の下流までを欠損するようにターゲティングベクターを設計し、ジーンターゲティング法により *Fgf16* KO マウスを作製した。また、生後 4 ヶ月齢マウスについてジェノタイプを確認した。

(3) *Fgf16* KO マウスにおける表現型解析

生後 6 ヶ月齢マウスについて、体重および肝臓、肺、腎臓、心臓の各重量を測定し、

野生型と比較検討した。また、心臓の外見上ならびに HE 染色による組織学的な形態観察を行い、野生型と比較検討した。さらに、心臓をホルマリンで固定後 KOH 処理にて心筋細胞を分離し、心筋細胞面積および心臓当たりの心筋細胞数を計測し、野生型と比較検討した。

(4) *Fgf16* KO マウスにおける心機能の検討

6 ヶ月齢マウスについて tail cuff 法による血圧測定及び心エコーを行い、心機能パラメーターである脈拍、収縮期血圧、拡張期血圧、心室中隔拡張期壁厚、左室拡張期径、左室後壁拡張期壁厚、左室内径短縮率、左室駆出率を測定し、野生型と比較検討した。

(5) *Fgf16* KO マウスにおける心筋細胞増殖能の検討

胎生 14.5, 16.5, 18.5 日齢マウスの心臓についてパラフィン切片 (6 μ m) を作製し、BrdU 取り込みを指標に心筋細胞増殖活性を野生型と比較検討した。

(6) *Fgf16* KO マウスにおける心臓特異的因子の発現解析

生後 6 ヶ月齢及び胎生 18.5 日齢マウスの心臓について、total RNA 抽出及び RT-PCR 法を行い、心臓特異的因子である *ANP*, *BNP*, *α -MHC*, *MLC2V* の発現を野生型と比較検討した。

(7) 大動脈結紮 (TAC) 後の *Fgf16* KO マウスにおける *BNP* の発現解析

生後 3 ヶ月齢マウスに 4 週間の大動脈結紮処置後、心臓について total RNA 抽出及び RT-PCR 法を行い、*BNP* の発現を検討した。大動脈結紮は行わず開胸のみ行ったマウスを Control とした。

(8) TAC 後の *Fgf16* KO マウスにおける心筋線維化の検討

TAC 及び Control マウスの心臓について、パラフィン切片 (6 μ m) を作製し、マッ

ソン・トリクロム染色により心筋線維化を検討した。

4. 研究成果

(1) RT-PCR 法による *Fgf16* 発現パターンの解析

8 週齢の成体マウスにおいて、*Fgf16* は心臓特異的に高発現していた。心臓における発現は胎生 14.5 日齢から認められ、発生と共にその発現量は増加した。さらに *Fgf16* は心房ではなく心室に高発現し、また非心筋細胞に比べ心筋細胞に発現することが明らかとなった。

(2) *Fgf16* KO マウスの作製

ジーンターゲット法により *Fgf16* KO マウスを作製し、生後 4 週齢マウスについて total RNA 抽出及び RT-PCR 法によりジェノタイプを確認したところ、野生型マウスでは 509b.p. に、ヘテロマウスでは 509b.p. と 273b.p. に、*Fgf16* KO マウスでは 273b.p. にそれぞれバンドが得られた。

(3) *Fgf16* KO マウスにおける表現型解析

Fgf16 Ko マウスは外見上正常に発育した。生後 6 ヶ月齢マウスにおいて、体重、肝臓重量、肺重量、腎臓重量に差は見られなかったが、心臓重量は野生型に比べ *Fgf16* Ko マウスにおいて有意に減少していた。

(4) *Fgf16* Ko マウスの心臓における表現型解析

生後 6 ヶ月齢の *Fgf16* Ko マウスの心臓に縮小傾向が見られた。この心臓の縮小原因を調べるため心筋細胞面積を測定したところ、野生型と *Fgf16* Ko マウスで差は見られなかった。しかし、心筋細胞数を計測したところ、野生型に比べ *Fgf16* Ko マウスにおいて有意に減少していた。

(5) *Fgf16* KO マウスにおける心機能の検討

Fgf16 の心機能への影響を検討するため、生後 6 ヶ月齢マウスについて血圧測定及び

心エコーを行った。形態的には左室拡張期径が野生型に比べ *Fgf16* Ko マウスにおいてわずかに短縮していたものの、脈拍や血圧、短縮や駆出率といった心機能パラメータに差は見られなかった。

(6) *Fgf16* KO マウスにおける心筋細胞増殖能の検討

胎生期の心臓形成過程において胎生 7.5 日齢に心臓原基が形成され、心筋細胞増殖は、胎生 11.5 日齢に緩やかなピークを迎え、その後徐々に減少し生後まもなく停止する (5)。従って、成体での心筋細胞数は胎生期の心筋細胞増殖に制御されると言える。生後 6 ヶ月齢の *Fgf16* KO マウスにおける心筋細胞数の減少原因を検討するため、BrdU 染色を行い胎生期の心筋細胞増殖活性を検討した。胎生 14.5 日齢では野生型に比べ *Fgf16* KO マウスにおいて有意に減少し、胎生 16.5, 18.5 日齢でもやや減少傾向を示した。

(7) *Fgf16* KO マウスにおける心臓特異的因子の発現解析

Fgf は多くの細胞の分化にも重要な役割を果たす。そこで胎生 18.5 日齢及び生後 6 ヶ月齢のマウスの心臓における心臓特異的因子の発現を検討した。胎生 18.5 日齢では心臓特異的因子の発現に差は見られなかったが、生後 6 ヶ月齢では *BNP* (脳性ナトリウム利尿ペプチド) の発現が、野生型に比べ *Fgf16* Ko マウスにおいて有意に低下した。

(8) 大動脈結紮 (TAC) 後の *Fgf16* KO マウスにおける *BNP* の発現解析

BNP は心臓に圧負荷が与えられた場合においてその発現は増加し、圧負荷により生じる心筋線維化を抑制する分泌性因子として報告されている (6, 7)。生後 3 ヶ月齢マウスに 4 週間の大動脈結紮を行った後、心臓について *BNP* の発現を検討したところ、

Control では野生型に比べ *Fgf16* KO マウスにおいて *BNP* の発現は減少していた。

さらに、大動脈結紮を行うことにより野生型および *Fgf16* KO マウスともに *BNP* の発現は増加したが、野生型に比べ *Fgf16* KO マウスにおいて *BNP* の発現は減少していた。

(9) T AC 後の *Fgf16* KO マウスにおける心筋線維化の検討

大動脈結紮を行った心臓の心筋線維化に対する *Fgf16* の機能を検討するため、マッソン・トリクロム染色を行ったところ、大動脈結紮を行った *Fgf16* KO マウスの心臓において、7 個体中 4 個体の割合で心筋線維化が見られた。

(10) 結論

Fgf16 は胎生 14.5 日より心房の心筋細胞に発現し、胎生期の心筋細胞増殖を促進し、成体においては *BNP* の発現を促進することが示唆された。また、心臓に圧負荷が与えられた場合において *BNP* の発現を促進し、心筋線維化を抑制する可能性が示唆された。今後、さらに *Fgf16* の機能が詳細に明らかになることで、心臓形成や心臓圧負荷時における心筋線維化メカニズムの解明、治療法の開発に有用な知見が得られるものと期待される。

参考文献

- 1.Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2001) *Genome Biol.* **2**, 3005.1-3005.12
- 2.Itoh, N. and Ornitz, D.M. (2004) *Trends Genet.* **20**, 563-569
- 3.A. Miyake *et al.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**,148-152
- 4.M. Konishi *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 12119-12122
- 5.M. Toyoda *et al.* (2003) *Dev Cell.* **5**, 85-97
- 6.Y. Nakagawa *et al.* (1995) *J Clin Invest.* **96**, 1280-128
- 7.N. Tamura *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 4239-4244

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) N. Itoh and D. M. Ornitz, Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* (査読有) 237, 18-27 (2008)
- (2) Y. Nakayama, A. Miyake, Y. Nakagawa, T. Mido, M. Yoshikawa, M. Konishi, N. Itoh, Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development. *Dev. Biol.* (査読有) 313, 752-756 (2008)
- (3) M. Konishi, H. Nakamura, H. Miwa, P. Chambon, D. M. Ornitz, N. Itoh, Role of Fgf receptor 2c in adipocyte hypertrophy in mesenteric white adipose tissue. *Mol. Cell. Endo.* (査読有) 287, 13-19 (2008)
- (4) Y. Hotta, S. Sasaki, M. Konishi, H. Kinoshita, K. Kuwahara, K. Nakao, N. Itoh, Fgf16 is required for cardiomyocyte proliferation in the mouse embryonic heart. *Dev. Dyn.* (査読有) 237, 3079-3087 (2008)
- (5) N. Itoh, The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* (査読有) 30, 1819-1825 (2007)
- (6) N. Itoh, M. Konishi, The zebrafish fgf family. *Zebrafish* (査読有) 4, 179-186 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信行 (NOBUYUKI ITOH)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号 : 10110610

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号 : 40346044

小西 守周 (MORICHIKA KONISHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号 : 00322165