

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790717

研究課題名（和文）新規 FGF-2 阻害分子の同定・機能解析と臨床応用

研究課題名（英文）Identification and characterization of a novel FGF-binding protein and its possibilities for clinical application.

研究代表者

山中 康成（YAMANAKA YASUNARI）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90402859

研究成果の概要： 新規 FGF-2 結合蛋白質 (FGF-BP3) は成体の前頭葉眼窩野に特異的に発現し、その遺伝子改変マウスは新奇環境下で不安様行動を示した。このとき前頭葉眼窩野において ERK のリン酸化と初期誘導遺伝子 c-fos の発現が減弱していた。つまり FGF-BP3 は FGF-ERK シグナルに関与し、不安を司る前頭葉の高次機能を制御していた。本研究の結果から、遺伝子とところを繋ぐ成果が得られたとともに、FGF-BP3 が不安障害に対する薬剤開発の対象分子になりうる可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

胎生後期に神経幹細胞やニューロン前駆細胞はおもに大脳脳室の周囲で増殖と分化を繰り返している。その増殖と分化の機序は体外と体内では異なり、体外では神経幹細胞やニューロン前駆細胞は FGF-2 に反応して増殖するが、FGF-2 の遺伝子改変マウスの解析から体内では FGF-2 は上記細胞の増殖に必要ではなく、分化と移動に関わることが明らかとなっていた。中枢神経系の発生に関わる分子機構を解

明するためには、体内に存在する神経幹細胞やニューロン前駆細胞を直接的に単離・同定することが課題であった。これまでに神経幹細胞に比較的選択的に発現している Nestin 遺伝子の遺伝子改変マウスで解析が試みられてきたが、この遺伝子の発現様式の特異性が低いため、体内に存在する神経幹・前駆細胞の単離につながらず、それらの表面分子の種類と発現時期にもとづく細胞系譜は明らかにされていなかった。また、中枢神経系特異的な FGF-2 阻害性物質は、癌幹細胞の概念にもと

づいた癌に対する画期的薬剤の開発につながる。

本研究代表者は、神経幹・前駆細胞が豊富に存在する大脳脳室の周囲に高発現する遺伝子群を広くスクリーニングする目的で、cDNA microarrayを用いた発現解析を行った。既知と機能未知の遺伝子がそれぞれ 114 個と 58 個得られた。新規遺伝子群 58 個を対象にして in situ hybridization と Northern blotting で発現臓器と発現時期を解析した結果、目的に合致した新規遺伝子 1 個 (FGF-BP3) を単離することができた。さらに本遺伝子を LacZ 遺伝子で置換した遺伝子改変マウス (FGF-BP3^{lacZ/lacZ}) を作製した。

2. 研究の目的

(1) FGF-BP3 蛋白質の構造解析

FGF-BP3 蛋白質は、N 末端にシグナルペプチドを有し C 末端に FGF 結合ドメインを有する分泌蛋白質である。免疫沈降法から FGF-2 と直接結合することを確認し、さらに NIH/3T3 細胞において FGF-2 による ERK のリン酸化が減弱し、FGF-2 依存性増殖を抑制したことから、本研究では FGF-2 反応性脳腫瘍に対する増殖抑制効果を調べる。さらに、中和活性を有する抗体を作製することで、新たな薬剤開発への基盤を整備する。

(2) FGF-BP3 遺伝子を発現する細胞とその局在の同定

胎生期中枢神経系では LacZ 陽性細胞は Nestin, RC2, GLAST といった神経幹細胞・前駆細胞のマーカー分子と、増殖する細胞に発現する Ki67 が陽性で、一方 Dcx, Tuj, MAP2, Mash1, NG2 といった特定の成熟細胞のマーカー分子は陰性であったので、LacZ 遺伝子を発現する細胞を単離することで、体内のニューロン前駆細胞の性状を解析する。

さらに成体マウスにおける発現部位を同定することで、FGF-BP3 遺伝子が成体中枢神経系の機能で果たす役割を調べる。

(3) FGF-BP3 遺伝子改変マウスの表現型を軸にした機能解析

FGF-BP3 変異マウスの成体中枢神経系に大きな構造変化は示さないが、その機能としての行動を解析することで FGF-BP3 遺伝子が高次機能に果たす役割を調べる。

3. 研究の方法

(1) FGF-BP3 蛋白質の精製と FGF-2 との結合実験

昆虫細胞における高発現系を確立し組換え蛋白質 (FGF-BP3-His₆) を精製する。これを用いて FGF-2 との Far-Western blotting を行う。

(2) FGF-BP3 蛋白質に対する中和抗体作製
上記の精製した組換え蛋白質をウサギに免疫し抗体を作製する。

(3) FGF-2 反応性脳腫瘍の検索

脳神経外科から供与を受けた脳腫瘍細胞で FGF-BP3 を高発現する細胞株を検索する。また、FGF-2 反応性の脳腫瘍細胞株に FGF-BP3 蛋白質を投与し、増殖能や形態変化を調べる。

(4) FGF-BP3 遺伝子の発現部位の同定

胎生期および成体の FGF-BP3^{lacZ/+}マウスから脳切片を作製し、LacZ 染色を行う。

(5) FGF-BP3 遺伝子の発現細胞の単離

LacZ 遺伝子の蛍光発色基質 (CMFDG) を細胞に取り込ませてフローターで単離し、長期培養を試みる。

(6) FGF-BP3 遺伝子改変マウスの表現型解析

FGF-BP 変異マウスに対し 14 種類の行動実験を行い、行動特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) FGF-BP3 が FGF-2 と直接結合することを示した。

昆虫細胞を用いた高発現系を確立するとともに組換え蛋白質 (FGF-BP3-His₆) を精製した。FGF-2 に対し FGF-BP3-His₆ を overlay する Far-Western blotting と、FGF-BP3-His₆ に対し ¹²⁵I-FGF-2 を overlay する Far-Western blotting を行い、ともに FGF-BP3 蛋白質と FGF-2 の結合を確認した。

これまでの実験結果では免疫沈降法で FGF-2 と共沈することがわかっていたので、上記結果と併せて FGF-BP3 は FGF-2 と直接結合することを示した。

(2) FGF-BP3 蛋白質に対する中和抗体は得られなかった。

上記の精製した組換え蛋白質を 3 匹のウサギに免疫し抗体を作製したが、特異性の高い IgG 抗体は得られなかった。

(3) FGF-BP3 は FGF-2 反応性脳腫瘍に効果を来たさなかった。

脳神経外科から供与を受けた脳腫瘍細胞のなかで FGF-BP3 を高発現する細胞株は見せなかった。さらに FGF-2 反応性脳腫瘍株に対して FGF-BP3 蛋白質を投与したが、増殖能を抑制することはなく、形態変化は来たさな

かった。

(4) FGF-BP3 遺伝子は成体大脳の前頭葉眼窩野に局限して発現することを見出した。

成体のFGF-BP3^{lacZ/+}マウスに対してLacZ染色を行った結果、前頭葉眼窩野 (orbitofrontal cortex) に局限して発現し、他の前頭葉内側部や海馬には発現しないことを新たに見出した。

(5) FGF-BP3 遺伝子の発現細胞を単離したが長期培養に適さなかった。

LacZ 遺伝子の蛍光発色基質(CMFDG)を細胞に取り込ませてセルソーターで単離したが、viability が悪く長期培養の系を確立することはできなかった。

(6) FGF-BP3 遺伝子改変マウスが不安様行動を示すことを見出した。

FGF-BP 変異マウスに対し14種類の行動実験を行い、open field test, light-dark transition test, novelty-induced hypophagia test において野生型に比して新奇環境下で不安様行動を強く示すことを見出した。

Open field test では、FGF-BP 変異マウスは野生型マウスに比して明所の中心部における滞在時間の減少を認め、探索行動を抑制した ($p < 0.05$)。

Light-dark transition test (J Vis. Exp. 1:104, 2006)では、FGF-BP変異マウスは野生型マウスに比して、明所での滞在時間が減少し、探索行動を抑制した ($p < 0.05$)。

Novelty-induced hypophagia test (Science 301: 805-808, 2003)では、FGF-BP 変異マウスは野生型マウスに比して、新奇環境下に置くと、好んで食する食べ物への探索行動が抑制された ($p < 0.01$)。

以上の結果は、当初予想した展開とは異なる結果であった。

さらに、FGF-BP3 遺伝子が発現する成体大脳の前頭葉眼窩野において、新奇環境下に曝された FGF-BP 変異マウスでは初期誘導遺伝子 c-fos の発現が減弱することを免疫染色法により見出した。一方で、前頭葉内側部や扁桃体では減弱を認めなかった。また、同部位において ERK のリン酸化が減弱することも同じく免疫染色法で明らかとなった。さらにこれを Western blotting で確認した。

以上の結果は、前頭葉における情動活動に必要な FGF-ERK シグナルに対して FGF-BP3 の関与を示したもので、行動を司る脳機能の解明へと展開を遂げた。

ERKシグナルはこれまでニューロンの分化・生存・形態などのほか、情動や認知に関わることが知られ、さらに臨床ではうつ病患者の脳で減弱することが知られていた (Hum. Mol. Genet. 15: 3024-3033, 2006)。また、FGFシグナルもうつ病患者の脳で減弱することが知られていた (PNAS 101:15506-15511, 2006)。

一方、前頭葉眼窩野の機能は長年謎とされており (Cerebral Cortex 10: 205, 2000)、恐怖反応を抑える重要な働き (Nature Rev. Neurosci. 5: 844-852, 2004) など情動にかかわる役割は近年着目され始め (Ann.N.Y.Acad.Sci. 1121:72-86, 2007)、うつ病患者の脳で前頭葉眼窩野の関与は指摘されていた (Mol. Psychiatry 5:482-8, 2000)。特に、前頭葉眼窩野は扁桃体や視床下部との回路を通じて自律神経系を制御することで、不安という情動を制御していることが示唆されていた (BMC Neurosci. 4:25, 2003)。

FGF-BPの研究は、脳科学とはまったく分野が異なり、FGF-BP1,2 (Nature Med. 3: 1137-40, 1997 など多数) に次いで配列の相同性から最近 FGF-BP3 が同定され、血管透過性を制御する機能を有することが報告されていたが (JBC 283: 28329-28337, 2008)、高次脳機能への関与はまったく知られていなかった。

このように、本研究結果はこれまでの知見に合致しつつ、遺伝子、脳機能、行動のそれぞれのレベルを統合することで、行動やこころを生み出す脳の研究や臨床医学へと、分野を超えて今後波及していくものと考えている。

本研究のように遺伝子改変マウスを用いて遺伝子、脳機能、行動のそれぞれのレベルを統合していく方法は、脳・行動の機構解明の中心的方法となりつつある (Nature 455: 894-902, 2008)。前頭葉眼窩野に特異的に発現する FGF-BP3 の発見と、他に先駆けて開発した欠損マウスを通じて、これまで謎とされてきた前頭前野の機能を説明し、行動を司る脳機能の分子機構の理解につながった。

一方、日本においてうつ病発症が推測される小児は小学生全体の 1.6%、中学生全体の 4.6% (成人とほぼ同等) で (北海道大学の大規模調査、第 27 回日本精神科診断学会)、小児科の診療に喫緊の課題となりつつあり、FGF-BP3 による小児うつ病の診断と新たな治療法の開発は臨床においても今後期待される。

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2件)

1. Yamanaka Y, Heike T, Kumada T, Shibata T, Takaoka Y, Kitano A, Shiraishi K, Kato T, Nagato M, Okawa K, Furushima K, Nakao K, Nakamura Y, Taketo MM, Aizawa S, Nakahata T:

Loss of Borealin/DasraB leads to defective cell proliferation, p53 accumulation and early embryonic lethality.

Mech. Dev. 125:441-450, 2008.

2. Awaya T, Kato T, Shibata T, Yamanaka Y, Nakahata T:

Deterioration on magnetic resonance imaging despite good clinical recovery after viral encephalitis.

Pediatr. Neurol. 38:218-220, 2008.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山中 康成 (YAMANAKA YASUNARI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90402859

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし