

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790075

研究課題名（和文） 神経細胞の運命決定における Fgf シグナルの役割と
その分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） The roles of Fgf signaling in development of neurons.

研究代表者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40346044

研究成果の概要（和文）：Fgf19 は MAPK 経路を活性化することにより神経前駆細胞の GABA 作動性介在ニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化に対して促進的に働くことが示唆された。また、Fgf16 および Fgf22 も前脳における GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化に関与している可能性が示された。さらに、Fgf22 は中脳と小脳領域の細胞増殖及び細胞の生存維持に関与しているだけでなく、中脳及び小脳に発現している遺伝子の発現を調節することにより、その領域の特性決定にも関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The specification of GABAergic interneurons and oligodendrocytes by Fgf19 signaling may be mediated through Fgfr1- and Fgfr4-MAPK pathways. It is suggested that *Fgf16* and *Fgf22* are also involved in the specification of GABAergic interneurons and oligodendrocytes generated in the ventral telencephalon and diencephalon. Furthermore, *Fgf22* is involved in cell proliferation and cell survival during embryonic brain development. *Fgf22* is also essential for development of the ventral telencephalon and diencephalon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：FGF、ゼブラフィッシュ、脳・神経形成、GABA 作動性ニューロン

1. 研究開始当初の背景

FGF family としては現在 22 種類の FGF が human/mouse で同定されている。このうち、*FGF19* はヒト及びマウスにおいて胎生期の脳に発現しているが、*Fgf19* KO mice が胎生 12.5 日目までに死亡するため、マウスを用いた脳形成過程における *Fgf19* の機能解明は困難である。そこで申請者は、神経外胚葉選択的に機能阻害が行える zebrafish に着目して、

zebrafish *Fgf19* を同定し、脳に発現していることを見出した。さらに、*Fgf19* の機能を阻害した zebrafish 胚の解析から *Fgf19* が脳発生過程の初期において神経上皮細胞の増殖と生存維持に関与しており、終脳及び間脳の領域の特性決定に必要であることを明らかにした。また、*Fgf19* は前脳において Fgf3、Fgf8 シグナルの下流ではなく、Hh シグナル伝達経路の下流で *dlx2* の発現

を制御することにより、GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化に関与していることも明らかにした。*Fgf3* 及び *Fgf8* も前脳における GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化に必要であったが、*Fgf19* の方がより必要性が高いことも示した。GABA 作動性ニューロンへ分化する予定の神経上皮細胞はある条件下で、グルタミン酸作動性ニューロンに分化する。*Fgf19* 機能阻害 zebrafish 胚において GABA 作動性ニューロンが消失していることから、*Fgf19* がグルタミン酸作動性ニューロンから GABA 作動性ニューロンへの分化転換に関与している可能性が期待される。神経変性疾患の大きな特徴は神経脱落、神経細胞死が個々の疾患に特徴的な神経細胞に選択的に発症する点である。従って、各神経変性疾患の発症には各神経細胞の特異性が関与していると考えられ、中枢神経系の多種多様な神経細胞が発生過程においてその細胞特異性を獲得する機構を理解することは脳の生理的機能の理解のみならず、神経変性疾患の発症機構の解明につながる。しかし、神経幹細胞の増殖・分化の分子機構は明らかにならず、神経幹細胞の増殖・分化の制御機構の解明は神経再生を誘導する薬剤の開発を進展させる可能性がある。*Shh* と *Fgf8* は *in vitro* で神経幹細胞をドパミン(DA)作動性ニューロンへ分化させることができ、またドミナントネガティブ *Fgf* 受容体の解析からも *Fgf* シグナルが DA 作動性ニューロンの分化に関与していることが報告されている。しかし、*Fgf8* を欠損した zebrafish 胚では DA 作動性ニューロンの存在が確認されている。従って、DA 作動性ニューロンの分化に関与している *Fgf* リガンドについては不明な点が多い。申請者は *Fgf19* が DA 作動性ニューロンの分化に関与している可能性を示唆する知見も得ている。Zebrafish *Fgf19* の前脳における発現は *Fgf3*、*Fgf8* シグナルではなく *Hh* シグナル伝達経路によって制御されていることより、*Fgf8* と *Fgf19* は DA 作動性ニューロンへの分化に協調的に作用している可能性が期待される。

2. 研究の目的

Fgf19 機能阻害ゼブラフィッシュ胚において GABA 作動性ニューロンが消失していることから、*Fgf19* がグルタミン酸作動性ニューロンから GABA 作動性ニューロンへの分化転換に関与している可能性が期待される。また、GABA 作動性ニューロンの分化に *Fgf19*、*Fgf3*、*Fgf8* が協調的に作用していることから、DA 作動性ニューロンの分化にも複数の *Fgf* が協調的に作用している可能性が考えられる。そこで本研究では、神経上皮細胞からグルタミン酸作動性ニューロンお

び GABA 作動性ニューロンへの運命決定における *Fgf19* と *Fgf8* など他の *Fgf* との関係および *Fgf* 受容体を介した細胞内シグナル伝達経路を調べることにより、GABA 作動性ニューロンの分化の分子機構を明らかにし、てんかんなどの脳神経疾患の発症機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 脳形成過程において *Fgf19* により活性化される細胞内シグナル伝達経路の検討

Fgfr はチロシンキナーゼ型受容体であり、その下流の代表的な細胞内シグナル伝達経路としては MAPK 経路が知られている。そこで、*Fgf19* がこの MAPK 経路を活性化することにより脳形成に関与しているか検討するため、正常胚および *Fgf19* 機能阻害胚の前脳において MAPK 経路が活性化されているか否か検討した。指標として MAPK 経路の構成因子である ERK1/2 のリン酸化について抗体を用いて検出した。

(2) 神経上皮細胞の GABA 作動性ニューロン及びオリゴデンドロサイトへの分化における *Fgf16* の役割の解明

Zebrafish *Fgf16* も 24 時間胚の前脳に発現していることを見出している。終脳腹側領域と腹側視床からは主に GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトが発生する。そこで、*Fgf16* 機能阻害胚における GABA 作動性ニューロンのマーカー *gad1* とオリゴデンドロサイトのマーカー *olig2* の発現パターンを解析することにより、両細胞への分化に *Fgf16* が関与しているか検討した。

(3) 神経上皮細胞の GABA 作動性ニューロンへの分化における *Fgf22* の役割の解明

Fgf22 の発現解析を行い、*Fgf22* 機能阻害胚 (MO 胚) の表現型について解析を行った。さらに、*Fgf3*、*8* 機能阻害胚の前脳における *Fgf22* の発現パターンを解析した。

(4) 中脳・小脳形成過程における *Fgf22* の役割の解明

Fgf22 MO 胚では前脳の形成不全に加え、中脳後脳境界領域の形成不全及び中脳と小脳の縮小が観察された。そこで、中脳及び小脳領域における細胞増殖活性及び細胞死について検討した。さらに、中脳及び小脳領域に発現する *otx2*、*mbx*、*her5*、*eng2* の発現パターンを検討した。

4. 研究成果

(1) 脳形成過程において *Fgf19* により活性化される細胞内シグナル伝達経路の検討

Fgf19がMAPK経路を活性化することにより脳形成に関与しているか検討するため、Fgf19機能阻害胚の前脳においてMAPK経路が活性化されているか否か検討した。指標としてMAPK経路の構成因子であるERK1/2のリン酸化について抗体を用いて検出したところ、受精後22時間の正常胚では前脳領域でMAPK経路が活性化していることが明らかになった。さらにFgf19機能阻害胚についても検討を行ったところ、前脳領域ではMAPK経路の活性化が認められなかった。従って、Fgf19はFgfr1あるいはFgfr2を介してMAPK経路を活性化することにより神経前駆細胞のGABA作動性介在ニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化に対しては促進的に働き、ドパミン作動性ニューロンへの分化に対しては抑制的に働くと考えられる。

(2) 神経上皮細胞のGABA作動性ニューロン及びオリゴデンドロサイトへの分化におけるFgf16の役割の解明

Fgf16機能阻害胚におけるGABA作動性ニューロンのマーカー(gad1)とオリゴデンドロサイトのマーカー(olig2)の発現パターンを解析することにより、両細胞への分化にFgf16が関与しているか検討した。その結果、終脳と腹側視床の両方においてgad1とolig2の発現が著しく減少していた。従って、Fgf16も前脳におけるGABA作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化に関与していることが示された。

(3) 神経上皮細胞のGABA作動性ニューロンへの分化におけるFgf22の役割の解明

Fgf22の発現解析を行った結果、24時間胚において終脳、中脳後方領域及び耳胞に発現していた。さらに、Fgf22機能阻害胚(MO胚)では前脳の形成不全が観察された。また、Fgf3、8機能阻害胚の前脳におけるFgf22の発現は増加していた。Fgf3、8は前脳においてGABA作動性ニューロンの分化に関与していることが報告されている。従って、Fgf22も前脳におけるGABA作動性ニューロンの分化に関与している可能性が示唆された。

(4) 中脳・小脳形成過程におけるFgf22の役割の解明

Fgf22 MO胚では前脳の形成不全に加え、中脳後脳境界領域の形成不全及び中脳と小脳の縮小が観察された。そこで、中脳及び小脳領域における細胞増殖活性及び細胞死について検討した結果、受精後16時間のMO胚の中脳において増殖細胞の数が減少して

いた。さらに、受精後16時間のMO胚の中脳及び小脳領域におけるアポトーシスが顕著に増加しており、Fgf22が神経細胞の生存維持にも関与していることが示された。また、中脳及び小脳領域に発現するotx2、mbx、her5、eng2の発現パターンを検討した結果、これらの遺伝子の発現量が減少していた。従って、Fgf22は中脳と小脳領域の細胞増殖及び細胞の生存維持に関与しているだけでなく、中脳及び小脳に発現している遺伝子の発現を調節することにより、その領域の特性決定にも関与していることが明らかになった。

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 4件)

- ① S. Sasaki, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Miyake, N. Itoh., “The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology”, Genetic Disease, 査読有, 2011, in press
- ② A. Miyake, H. Miwa, Y. Kouta, A. Shimada, Y. Yamashita, Y. Nakayama, H. Yamauchi, M. Konishi, N. Itoh., “A novel neural-specific BMP antagonist, Brorin-like, of the Chordin family.”, FEBS Lett., 査読有, 583, 2009, 3643-3648
- ③ A. Miyake, Y. Takahashi, H. Miwa, A. Shimada, M. Konishi, N. Itoh., “Neucrin is a novel neural-specific secreted antagonist to canonical Wnt signaling.”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 390, 2009, 1051-1055
- ④ H. Yamauchi, N. Miyakawa, A. Miyake, N. Itoh., “Fgf4 is required for left-right patterning of visceral organs in zebrafish.”, Dev. Biol., 査読有, 332, 2009, 177-185

[学会発表] (計 2件)

- ① 三宅 歩、新野智香、伊藤信行
脳形成における zebrafish neucrin の機能解析
第33回 日本分子生物学会年会

2010年12月7日 神戸ポートアイランド

② 新野智香、三宅歩、伊藤信行

網膜形成における新規分泌性タンパク質の
機能解析

第32回 日本分子生物学会年会

2009年12月12日 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/idenshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40346044

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し