

## 学位論文題名

## 神経系における酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)

## の分布と損傷による変化

## —神経成長因子(NGF)との比較—

## 学位論文内容の要旨

神経栄養因子と総称される一群の物質は、発生初期の神経細胞の生存、分化、シナプス形成などの分化成熟、機能の保持、損傷後の神経再生、そして神経細胞死に至るまで神経細胞の一生をコントロールしていると考えられている。代表的な神経栄養因子である神経成長因子(NGF)は末梢では交感神経、知覚神経、脳では主に前脳基底核のコリン作動性神経に作用することが明らかになっている。一方、既知の細胞成長因子の中にも神経栄養因子様の活性を持つ因子があることが知られるようになった。そのひとつである線維芽細胞成長因子(FGF)は、本来中胚葉由来細胞に増殖刺激活性を持つ因子として分離されたもので、酸性(aFGF)と塩基性(bFGF)があり、両者のアミノ酸配列には約55%のホモロジーがある。両者の *in vitro* での神経栄養因子様活性は NGF の場合と比べて多くの種類の神経細胞においてみられ、特異性は低いと考えられている。また FGF の神経系での詳細な分布さえ明らかでない。最近、bFGF の *in vivo* でのラット脳海馬采切断後の神経細胞死の抑制作用が報告されたが、aFGF については脳内での生理機能についてもまったく不明である。本研究では、まず aFGF の高感度酵素免疫測定法を確立した。これを用いてラットにおける脳内分布、発達に伴う変化を調べ、aFGF が生後のラット脳内で部位特異的、時期特異的に分布していることを明らかにした。さらに免疫組織染色により、ラット橋・延髄では aFGF は神経細胞に局在することを見いだした。次に、脳および末梢神経損傷時の NGF および aFGF の動態を検討し、これらの因子の損傷後の動態がまったく異なることを見いだした。

脳内の aFGF の機能を探るためにまず必要なのは脳の発達との関係であるが、信頼性の高い定量系がなく、この方面の情報は極めて限られていた。そこで最初に、サンドイッチ法による酵素免疫測定法(EIA)を用いて aFGF の定量系を確立した。この EIA により、aFGF は 0.2ng/

mlより検出された。bFGF や脳内に存在する可能性のある種々の成長因子類とも交差反応性を示さず、このEIAはaFGFに特異的であることが確認された。さらに、ラット脳抽出液中の免疫活性物質の分子量は精製ウシaFGFと同じ約18Kであり、その希釈曲線はウシaFGFのそれと一致したことから、このEIAがラット脳内aFGFレベルの測定に適用できることが示された。確立したEIAを用いて正常ラット脳内aFGFを定量した。この結果、生後2日齢では脳内すべての部位でaFGFレベルは低く ( $<10\text{ng/g}$ )、その後8~21日齢にかけてとくに橋・延髄において著しいレベル上昇が見られ、その後もその高レベルが維持された。49日齢では橋・延髄で高レベル ( $75-90\text{ng/g}$ )、中脳、間脳で比較的高レベル ( $30-40\text{ng/g}$ )を示し、その他の前頭葉皮質、梨状葉皮質、海馬、嗅球、小脳、線条体では加齢に伴う上昇が見られるものの、低レベル ( $5-15\text{ng/g}$ )にとどまった。次に免疫組織化学的手法を用いて、aFGFの特異抗体でラット脳切片を染色した。この結果、橋・延髄および小脳にある特定の神経細胞や神経線維様構造物が染色され、aFGFが神経細胞に局在することが明らかになった。

脳は損傷を受けた場合に神経栄養因子の合成量が高めることでその後の神経再生や機能修復を有利に導くと考えられており、損傷脳においてさまざまな成長因子や栄養因子様活性が検出されている。しかしこれらの活性は個々の因子として同定、定量されてはおらず、その動態ははっきりしていない。そこで次にラット脳に損傷を与え、これに伴うNGFおよびaFGFの動態について検討した。大脳皮質の部分的吸引除去を施すと、組織除去部位への浸出液中に、損傷4時間後よりNGFが検出され、16時間後に最高値を示した。その後6日まで比較的高レベルを維持し、30日後には元のレベルまで低下した。一方、この浸出液中にはaFGFも検出されたが、その時間経過はNGFの場合とは明らかに異なり、損傷後10日から30日にかけて増加傾向にあった。正常脳では神経細胞がNGFを合成していると考えられている。しかし、損傷脳で広く観察される反応性アストロサイトの出現のタイムコースと損傷後のNGFのレベル上昇のそれが類似していること、培養アストログリア細胞が細胞増殖依存的にNGFを分泌することを考えあわせると、損傷脳では、神経細胞の他に反応性アストロサイトもNGFを合成、分泌していると推定される。またNGFレセプター（低親和性）はラット成体脳内では主に前脳基底野コリン作動性神経に存在し、大脳皮質にはほとんど見られない。ところがこの損傷後約24時間に組織除去された部位に近接する皮質にレセプター抗体陽性物質が出現した。これらのことから損傷時には正常時とは異なるNGF合成、分泌、さらに応答の機構が働くと推測される。一方、別の脳損傷として皮質に凍結損傷を加えたラットについても検討した。成熟ラットの場合、損傷を受けた組織中でNGFレベルの増加が認められた。しかし、同様の凍結損傷をグリア細胞がまだ分化していない胎児期

に行った場合は NGF の増加は認められなかった。これらの結果から、損傷後の NGF 合成に反応性アストロサイトも関与することが示唆された。一方、aFGF はその分泌機構が不明であり、通常細胞外へは分泌されないとされている。したがって吸引除去損傷後の浸出液に見い出された穏やかなレベル上昇は、損傷後に二次的に引き起こされた神経細胞死によって細胞外へ放出されたものかもしれない。このように、aFGF は NGF とはまったく異なる損傷応答を示すことが示唆された。これらの損傷脳で増加した NGF および aFGF は、その後の神経機能再生を有利に導くものと思われる。

末梢神経系では、NGF は標的組織で合成、分泌され、神経終末よりレセプターを介して取り込まれ、細胞体へと逆行輸送されて作用を発現する。一方、損傷時には損傷部位を中心に新たに合成誘導が起こることが知られている。しかし、末梢神経系においても aFGF の神経栄養因子としての解明はほとんどなされていない。そこで末梢神経として坐骨神経の損傷後の動態を aFGF について NGF と比較しつつ検討した。坐骨神経の切断後、NGF レベルが切断部位より末梢側で二相性に増加するのは対照的に、aFGF レベルは末梢側でのみ著しい低下が見られた。この末梢側でのレベル低下は坐骨神経挫滅後にも同様にみられるが、10週後には元のレベルに回復していた。これらのことより、aFGF は坐骨神経内を NGF のように逆行輸送されているのではないことが明らかになった。また免疫組織染色の結果から、aFGF が坐骨神経内で神経軸索に存在することが明らかとなった。おそらく aFGF は、坐骨神経内にその軸索をのばす交感神経、知覚神経、あるいは運動神経等の神経細胞体で合成され、その軸索内にも分布しているものと思われる。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	栗原 堅三
副査	教授	野村 靖幸
副査	助教授	三宅 教尚
副査	助教授	徳光 幸子

本学位論文申請者は、長年神経成長因子に関する研究を行ってきたが、今回神経系における賛成線維芽細胞成長因子の分布と役割に関する研究をまとめ学位論文として提出した。

神経栄養因子としては、NGFが最も詳細に研究されてきた。一方、既知の細胞成長因子の中にも神経栄養因子様の活性を持つ因子があることが知られるようになった。そのひとつである線維芽細胞成長因子（FGF）は、本来中胚葉由来細胞に増殖刺激活性を持つ因子として分離されたもので、酸性（aFGF）と塩基性（bFGF）があり、両者のアミノ酸配列には約55%のホモロジーがある。最近、bFGFのin vivoでのラット脳海馬采切断後の神経細胞死の抑制作用が報告されたが、aFGFについては脳内での生理機能についてもまったく不明であった。

本論文の第一章では、aFGFの高感度定量法を確立した。脳内のaFGFの機能を探るためにまず必要なのは脳の発達との関係であるが、信頼性の高い定量系がなく、この方面の情報は極めて限られていた。そこで本申請者は、最初にサンドイッチ法による酵素免疫測定法（EIA）を用いてaFGFの定量系を確立した。このEIAにより、aFGFは0.2ng/mlより検出された。bFGFや脳内に存在する可能性のある種々の成長因子類とも交差反応性を示さず、このEIAはaFGFに特異的であることが確認された。

本論文の第二章では、確立したEIAを用いて正常ラット脳内aFGFを定量した。この結果、生後2日齢では脳内すべての部位でaFGFレベルは低く（<10ng/g）、その後8～21日齢にかけてとくに橋・延髄において著しいレベル上昇が見られ、その後もその高レベルが維持された。次に免疫組織化学的手法を用いて、aFGFの特異抗体でラット脳切片を染色した。この結果、橋・延髄および小脳にある特定の神経細胞や神経線維様構造物が染色され、aFGFが神経細胞に局在することが明らかになった。

本論文の第三章では、脳損傷時における神経栄養因子を取り扱っている。脳は損傷を受けた場合に神経栄養因子の合成量を高めることでその後の神経再生や機能修復を有利に導くと考えられている。そこでラット脳に損傷を与え、これに伴うNGFおよびaFGFの動態について検討した。大脳皮質の部分的吸引除去を施すと、組織除去部位への浸出液中に、損傷4時間後よりNGFが検出され、16時間後に最高値を示した。その後6日まで比較的高レベルを維持し、30日後には元のレベルまで低下した。一方、この浸出液中にはaFGFも検出されたが、その時間経過はNGFの場合とは明らかに異なり、損傷後10日から30日にかけて増加傾向にあった。正常脳では神経細胞がNGFを合成していると考えられている。損傷脳では、神経細胞の他に反応性アストロサイトもNGFを合成、分泌していると推定した。このように、損傷時には正常時とは異なるNGF合成、分泌、さらに応答の機構が働くと推測した。

一方、aFGFはその分泌機構が不明であり、通常細胞外へは分泌されないとされている。したがって吸引除去損傷後の浸出液に見い出された穏やかなレベル上昇は、損傷後に二次的に引き

起こされた神経細胞死によって細胞外へ放出された可能性がある。このように、aFGFはNGFとはまったく異なる損傷応答を示すことが示唆された。これらの損傷脳で増加したNGFおよびaFGFは、その後の神経機能再生を有利に導くものと考察している。

第四章では、末梢神経損傷と神経栄養因子の関係を取り扱っている。末梢神経として坐骨神経の損傷後の動態を、aFGFについてNGFと比較しつつ検討した。坐骨神経の切断後、NGFレベルが切断部位より末梢側で二相性に増加するのとは対照的に、aFGFレベルは末梢側でのみ著しい低下が見られた。この末梢側でのレベル低下は坐骨神経挫滅後にも同様にみられるが、10週後には元のレベルに回復していた。これらのことより、aFGFは坐骨神経内をNGFのように逆行輸送されているのではないことが明らかになった。おそらくaFGFは、坐骨神経内にその軸索をのばす交感神経、知覚神経、あるいは運動神経等の神経細胞体で合成され、その軸索内にも分布しているものと推定している。

第五章では、各種のアミノアルキルエステル誘導体を用いて、ラット脳内のNGF誘導を検討している。この結果、これらの化合物の投与によりラット脳内NGFレベルの有意な増加が認められ、薬剤により脳内NGF合成が制御できる可能性が示された。

以上のように、本論文は神経におけるaFGFの分布と役割に関する多くの新しい知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいものと判断した。