

線維芽細胞成長因子及びそのフラグメントはラットの の夜間摂食を抑制する

李, 愛軍
九州大学医学部生理学第一講座

<https://doi.org/10.15017/7324201>

出版情報：福岡醫學雑誌. 85 (1), pp.21-28, 1994-01-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



線維芽細胞成長因子及びそのフラグメントは ラットの夜間摂食を抑制する

九州大学医学部生理学第一講座 (指導: 堀 哲郎教授)

李 愛 軍

Intracerebroventricular Infusions of Fibroblast Growth Factor and Its Fragments Suppress Nocturnal Feeding in Rats

Ai-Jun Li

Department of Physiology, Faculty of Medicine (Director: Prof. T. Hori)
Kyushu University 60, Fukuoka 812

Acidic fibroblast growth factor₁₋₁₄₀ (aFGF₁₋₁₄₀), basic FGF₁₋₁₄₆ (bFGF₁₋₁₄₆) and several aFGF fragments were injected into the 3rd ventricle of rats to investigate their acute effects on the nocturnal food intake. Infusions of aFGF₁₋₁₄₀ and bFGF₁₋₁₄₆ immediately before the onset of darkness significantly suppressed the food intake for 12 hrs in a dose-dependent manner. The potency of aFGF₁₋₁₄₀ to inhibit the feeding was 1.5 times greater than that of bFGF₁₋₁₄₆. While an infusion of aFGF₁₁₄₋₁₄₀ (a C-terminal fragment) had no effect on the feeding, that of aFGF₁₋₁₅ (a N-terminal fragment) suppressed the food intake, although its potency corresponded to about 1/80 of the same molar concentration of aFGF₁₋₁₄₀. An infusion of the other aFGF fragments containing N-terminals (aFGF₁₋₂₉, aFGF₁₋₂₀) or aFGF₉₋₂₉ had no effect on the food intake. However, [16Ala]aFGF₁₋₂₉, in which the cysteine residue at the position 16 was replaced with alanine, significantly depressed the food intake. Its potency was about 1/20 that of aFGF₁₋₁₄₀. These results suggest that aFGF₁₋₁₄₀ and bFGF₁₋₁₄₆ participate in the central regulation of food intake, and that the amino-terminal portion of aFGF is critical for its action on feeding regulation.

はじめに

線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor, FGF) は 1974 年にウシの脳および下垂体から見いだされ, BALB/c3T3 細胞などの線維芽細胞に対し, 強い増殖作用を示すことから命名された⁸⁾. ヘパリンに対して強い親和性を持つことから, ヘパリン結合性成長因子 (heparin-binding growth factor, HBGF) とも呼ばれ, 酸性 FGF (aFGF), 塩基性 FGF (bFGF), Int-2, hst/ks, FGF-5, FGF-6 およびケラチノサイト成長因子 (KGF) などがこれまでに FGF ファミリーとして同定されている³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾. これらの FGF ファミリーの中で最も研究されているのが, それぞれ 140 個と 146 個のアミノ酸配列からなる aFGF および bFGF で, 分子量が約 16,000 Da であり, 両者は 55% のホモロジーをもっている²⁾³⁾. FGF の生物活性は標的細胞の細胞膜にある受容体を介して発現し,

現在までに少なくとも 4 種類 (flg/FGFR-1, bek/FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4) の FGF 受容体が同定されている¹³⁾²⁶⁾²⁷⁾³²⁾. このうち, FGFR-4 は aFGF にのみ強い結合性を持つが, 他の 3 種については aFGF および bFGF のいずれも結合しうる²⁶⁾.

aFGF および bFGF は種々の中胚葉由来の細胞の分化や増殖に関与していることがよく知られている²⁾³⁾. 最近, 中枢神経系にも広く分布していることが明らかになっており⁴⁾, その中枢作用が注目されている. 例えば, 大脳皮質や海馬の培養神経細胞の生存や樹状突起の成長および伸展を bFGF が促進することが *in vitro* の実験で明らかになっている²²⁾²⁴⁾. また *in vivo* では, bFGF の投与により海馬采-脳弓切断によるラット中隔野のコリン作動性ニューロンの逆行性変性が防止され¹⁾, aFGF の脳室内持続投与は, 頸動脈結紮によるスナネズミの海馬 CA1 ニューロンの虚血性細胞死を防ぐ³⁵⁾. さらに aFGF および bFGF は海馬

CA1 ニューロンの長期増強を促進することもラットの海馬スライス標本で証明されている¹⁰⁾³⁶⁾⁴²⁾。

aFGF および bFGF が中枢性の摂食行動調節作用を持つことも最近明らかになっている。ラット脳脊髄液中の aFGF および bFGF の濃度は、摂食 2 時間後に約 1000 倍に上昇し、摂食の代わりに、ブドウ糖を腹腔内投与しても脳脊髄液中の aFGF は用量依存的に増加する⁹⁾。また、aFGF をラット脳室内に投与すると摂食量が抑制される⁹⁾³⁹⁾。さらに「摂食中枢」である視床下部外側野 (lateral hypothalamic area, LHA) ニューロンに aFGF を電気泳動的に直接投与すると、ブドウ糖感受性ニューロンだけが活動を抑制される⁹⁾²⁴⁾。これらのことは aFGF および bFGF が中枢性摂食調節に重要な役割を果たしていることを示唆する。

上述したように FGF が種々の中枢作用をもつことは次第に明らかにされているが、その有効生物活性部位については不明の点が多い。bFGF の 3T3 細胞に対する分裂作用は、70 番目から 122 番目の配列に関与し³⁷⁾、また bFGF のヘパリンに対する結合能力は C 末端が重要な役割を果たしていることが明らかになっている³⁹⁾。一方、aFGF については、N 末端の aFGF₁₋₁₅ が aFGF 全構造と同様に海馬 CA1 ニューロンの長期増強を促進することが知られている³⁶⁾。これらのことは FGF の生理作用発現とそのアミノ酸配列に特異的な関係があることを示唆するが、その詳細な構造-活性相関は明らかでない。

本研究では、aFGF および bFGF をラットの第 3 脳室に投与し、その摂食行動に対する効果を比較検討し、さらに 6 種の aFGF フラグメントを脳室内に投与し、aFGF アミノ酸配列中の摂食調節作用に対する有効活性部位の同定を行った。

実験方法

1. 実験動物

雄性 Wistar 系ラット (250-300 g) を用いた。明暗 12 時間 (明期は 0700-1900) サイクル、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温環境で、ラットを 1 ケージ当たり 1 匹ずつ飼育した。餌 (粉末型 CE-2, 日本クレア) と水は薬物を注入する 1830 から 1900 の間以外は自由に与えた。

2. 投与薬物

本研究には次の薬物を用いた: aFGF₁₋₁₄₀ (ウシ脳由来 aFGF₁₋₁₄₀, $1 \mu\text{g}$ aFGF₁₋₁₄₀ あたり bovine serum albumin (BSA) $50 \mu\text{g}$ 添加, R & D system Inc., U. S. A., 以下 aFGF と略する), bFGF₁₋₁₄₆ (リコンビナントヒト bFGF₁₋₁₄₆, 武田薬品, 以下 bFGF と略す

る), 合成 aFGF₁₋₁₅ および合成 aFGF₁₁₄₋₁₄₀ (ウシ脳 aFGF₁₋₁₅ およびウシ脳 aFGF₁₁₄₋₁₄₀, 静岡県立大学矢内原昇教授より供給), 合成 aFGF₁₋₂₉, 合成 aFGF₁₋₂₀, 合成 aFGF₉₋₂₉ (ウシ脳 aFGF₁₋₂₉, aFGF₁₋₂₀ および aFGF₉₋₂₉, ペプチド研究所) および合成 [16 Ala] aFGF₁₋₂₉ (ウシ脳 aFGF₁₋₂₉ の 16 番目のシステイン残基をアラニンに変換したもの, ペプチド研究所)。各実験において同じ用量の生理食塩水を, [16 Ala] aFGF₁₋₂₉ の場合は熱不活性化溶液 (100°C で, 3 時間以上加熱したもの) をそれぞれ対照溶液として注入した。

3. カニューレ留置手術

ネプタール麻酔下 (40 mg/kg , 腹腔内投与) で、ラットを脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨に直径約 2 mm の穴を開け、23 ゲージのステンレス製ガイドカニューレ (長さ 18.0 mm, 外径 0.64 mm, 内径 0.39 mm) をラットの脳地図²⁸⁾ により、十字縫合から後方 0.2 mm, 深さ 7.5-8.0 mm, 正中位に留置した。2 個のステンレス製ねじをアンカーとして両側の頭頂骨に装着し、歯科用セメントでガイドカニューレを固定した。手術後、29 ゲージのステンレス製ワイヤー (長さ 18.0 mm) をガイドカニューレに挿入し、ポリエチレン製キャップでカバーした。手術後 1 週間の回復期間をおいた。

4. 薬物投与方法および摂食量の測定

摂食量を 3 日間以上測定し、安定した基礎摂食量を示すことを確認したのち、無麻酔無拘束下で 1830-1900 の間に薬物を第 3 脳室内に投与した。ポリエチレンチューブ (長さ 60 cm) の 1 端を 29 ゲージのステンレス製注入用カニューレにつなぎ、他端をハミルトンマイクロシリンジに装着した。注入直前にガイドカニューレ内の 29 ゲージのワイヤーを除去し、注入用カニューレを挿入した。試薬は $10 \mu\text{l}$ の溶液として、微量注入器 (KN-201, 夏目製作所) を用い、第 3 脳室投与に 10 分間かけて注入した。餌箱内の粉末飼料を 1900, 2200 および 0700 の時点で測定し、それぞれ 3 時間 (1900-2200) および 12 時間 (1900-0700) 摂食量を計測した。

5. 組織学的検索

実験終了後、ラットを過量のネプタールで深く麻酔し、2% ポンタミンスカイブルー・ 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液 $5 \mu\text{l}$ を第 3 脳室内へ薬物注入方法と同様の方法で投与した。ついで 10% の中性ホルマリン溶液 (100 ml) を、左心室から灌流し、脳を摘出した。さらに一日以上 10% の中性ホルマリン溶液内で固定し

て、凍結前額断連続切片 (50 μ m) を作製し、顕微鏡下で、カニューレ先端の位置を確認した。さらに、(1)薬物投与前に 29 ゲージワイヤーをはずしたとき、脳脊髄液がガイドカニューレより滲出すること、(2)ポンタミンスカイブルーで脳室全体の内壁が染色されていること、(3)脳内の出血や脳炎の徴候が見られないこと、の 3 つの基準に適合したラットだけを採用した。

6. 統計学処理

総ての測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。注入前日と注入日の測定値を paired *t* test で検定し、*p* < 0.05 を有意とした。

結 果

1. aFGF および bFGF 脳室内投与の摂食に対する作用

aFGF (50 および 200 ng/rat) を第 3 脳室内に投与すると、摂食量が有意に減少した (Fig. 1A)。対照生理食塩水溶液の投与 (*n* = 5) は摂食量には効果なかった。注入前日と比べ、50 ng/rat (*n* = 6) の投与は 12 時間摂食量を 4.0 ± 1.1 g (17.3 ± 1.0 から 13.3 ± 0.7 g, *p* < 0.01) 減少させ、200 ng/rat (*n* = 6) の投与は 3 時間摂

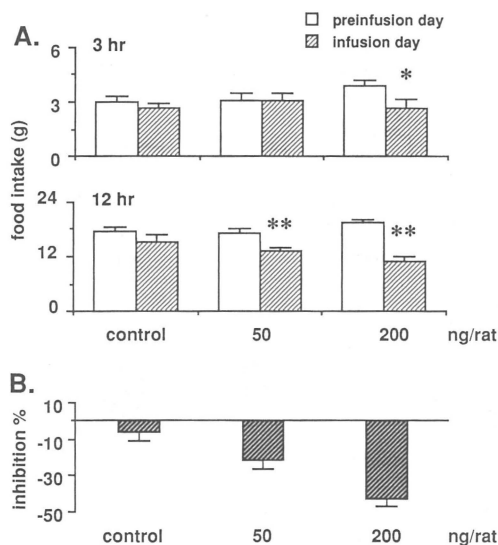


Fig. 1 Effects of aFGF infused into the 3rd cerebral ventricle on food intake for 3 hr (upper) and 12 hr (lower) after infusion (A). The percentage inhibition of food intake for 12 hr is indicated in bottom (B). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with that in the preinfusion day.

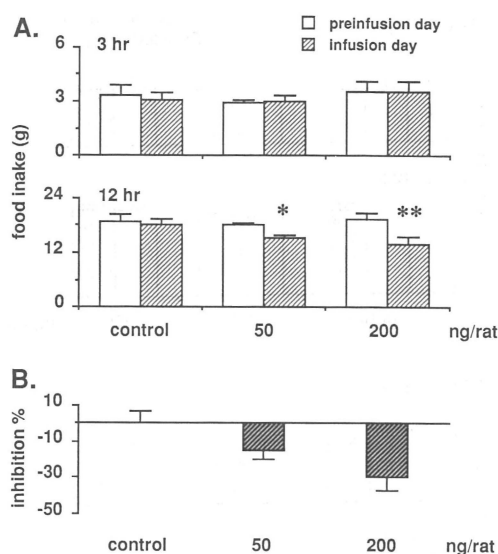


Fig. 2 Effects of bFGF infused into the 3rd cerebral ventricle on food intake (A). Other description as for Fig. 1.

食量を 1.3 ± 0.4 g (3.9 ± 0.3 から 2.7 ± 0.5 g, *p* < 0.05), そして 12 時間摂食量を 8.4 ± 1.0 g (19.4 ± 0.6 から 11.1 ± 0.9 g, *p* < 0.01) 減少させた。注入前日の 12 時間摂食量と比較すると、50 および 200 ng/rat の投与による摂食抑制は用量依存的で、それぞれ 21.8 ± 5.2 および $42.7 \pm 4.6\%$ の減少であった (Fig. 1B)。一方、同じ用量の bFGF の脳室内投与で 3 時間摂食量は有意に抑制されなかったが、12 時間摂食量は有意に抑制された (Fig. 2A)。注入前日の 12 時間摂食量と比べると、50 (*n* = 5) および 200 ng/rat (*n* = 6) の bFGF に対してそれぞれ 2.9 ± 1.0 (18.0 ± 0.6 から 15.1 ± 0.7 g, *p* < 0.05) および 5.8 ± 1.4 g (19.6 ± 1.0 から 13.8 ± 1.8 g, *p* < 0.01) の減少がみられ、12 時間量に対する抑制は用量依存的で、それぞれ 15.6 ± 5.0 および $30.0 \pm 6.9\%$ であった (Fig. 2B)。一方、生理食塩水の投与 (*n* = 6) は摂食量に効果はなかった。

2. aFGF₁₋₁₅ および aFGF₁₁₄₋₁₄₀ の脳室内投与の摂食に対する効果

aFGF の摂食調節作用に対する作用の活性部位を検討するために、N 末端の aFGF₁₋₁₅ および C 末端の aFGF₁₁₄₋₁₄₀ を第 3 脳室内に投与し、その摂食に及ぼす効果を検討した。200 ng/rat の aFGF₁₋₁₅ (*n* = 6) の脳室内投与では摂食量は変化しなかったが、400 ng/rat (*n* = 5) 投与では 3 時間および 12 時間摂食量が有意

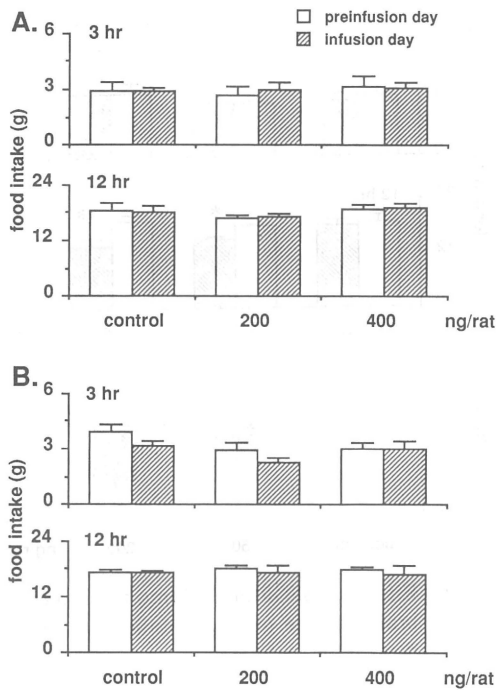


Fig. 4 Effects of aFGF₁₁₄₋₁₄₀ (A) and aFGF₁₋₂₉ (B) infused into the 3rd cerebral ventricle on food intake. No significant difference was found between the preinfusion and infusion day in any measured period.

に減少した (Fig. 3A), 注入前日量と比べると, 400 ng/rat の投与により 3 時間および 12 時間量がそれぞれ 1.3 ± 0.2 (3.1 ± 0.2 から 1.8 ± 0.2 g, $p < 0.01$) および 2.4 ± 0.5 g (18.6 ± 0.2 から 16.2 ± 0.6 g, $p < 0.01$) 減少した. 400 ng/rat の aFGF₁₋₁₅ の投与では, 12 時間摂食量は $12.8 \pm 3.0\%$ 減少した (Fig. 3B). 一方, 生理食塩水投与は摂食量に影響しなかった. aFGF₁₋₁₅ の摂食抑制作用と対照的に, 200 (n=6) および 400 ng/rat (n=5) の aFGF₁₁₄₋₁₄₀ の投与は, 生理食塩水の投与と同様摂食量に影響を及ぼさなかった (Fig. 4A). さらに, 図には表示していないが, 800 ng/rat (n=4) の aFGF₁₁₄₋₁₄₀ の投与でも摂食量は変化なかった.

3. aFGF₁₋₂₉, aFGF₉₋₂₉, aFGF₁₋₂₀ および [16 Ala] aFGF₁₋₂₉ の第 3 脳室内投与の摂食に対する効果

より強力な摂食抑制活性を持つ aFGF フラグメントを同定するために, aFGF₁₋₂₉, aFGF₉₋₂₉, aFGF₁₋₂₀ および [16 Ala] aFGF₁₋₂₉ を第 3 脳室に投与した. aFGF₁₋₂₉ (200 および 400 ng/rat, n=6) の脳室内投与は 3 時間摂食量にも 12 時間摂食量にも効果はな

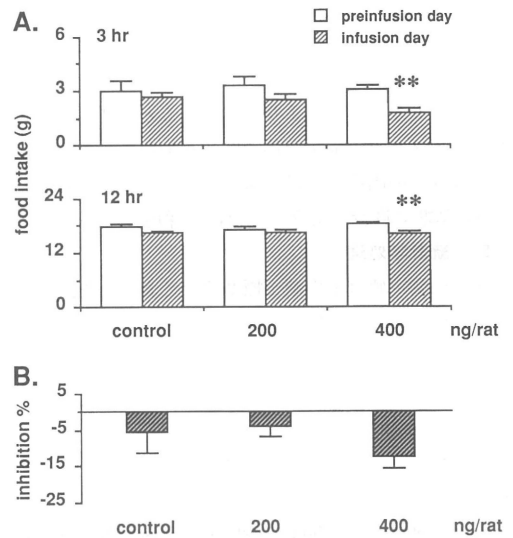


Fig. 3 Effects of aFGF₁₋₁₅ infused into the 3rd cerebral ventricle on food intake (A). Other description as for Fig. 1.

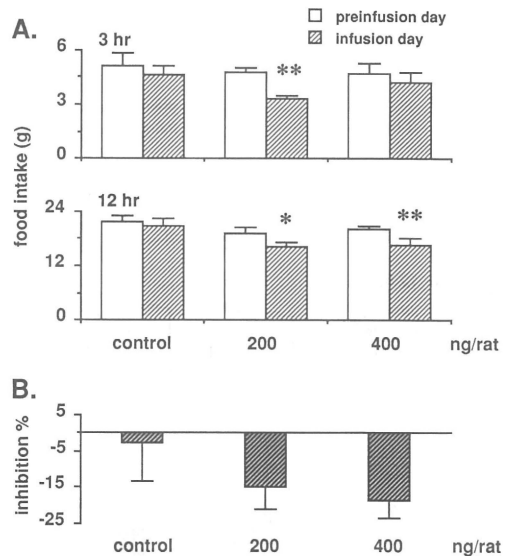


Fig. 5 Effects of [16Ala] aFGF₁₋₂₉ infused into the 3rd cerebral ventricle on food intake (A). Other description as for Fig. 1.

った (Fig. 4B). さらに図には表示していないが, 800 ng/rat の aFGF₁₋₂₉ (n=3) 投与も摂食量には影響しなかった. 一方, aFGF₁₋₂₉ の 16 番目のシステイン残基をアラニンに変えた [16 Ala] aFGF₁₋₂₉ は, 200 (n=6) および 400 ng/rat (n=6) の投与で摂食量を有意に抑制

した (Fig. 5A). 200 ng/rat の[16 Ala]aFGF₁₋₂₉投与は3時間摂食量を 1.5 ± 0.3 g (4.8 ± 0.2 から 3.3 ± 0.2 g, $p < 0.01$), 12時間摂食量を 3.0 ± 1.2 (19.2 ± 1.1 から 16.2 ± 1.1 g, $p < 0.05$) 減少させ, 400 ng/rat の投与では12時間摂食量が 3.5 ± 0.8 g (20.0 ± 0.9 から 16.5 ± 1.7 g, $p < 0.01$) 減少した. 200 および 400 ng/rat の[16 Ala]aFGF₁₋₂₉投与後の12時間摂食量は, 注入前日量と比較し, それぞれ 14.9 ± 6.3 および $18.7 \pm 4.8\%$ 減少した (Fig. 5B). 一方, 加熱不活性化した[16 Ala]aFGF₁₋₂₉ (400 ng/rat, $n=5$) の脳室内投与は摂食量には影響を及ぼさなかった. さらに, aFGF₉₋₂₉ ($1 \mu\text{g/rat}$, $n=5$ および $4 \mu\text{g/rat}$, $n=6$) の脳室内投与も摂食量には効果はなく, それぞれ投与前日が 18.5 ± 1.2 および 18.0 ± 0.4 g に対して 16.7 ± 1.0 および 17.3 ± 0.5 g であり, 有意の差はなかった. また aFGF₁₋₂₀ ($4 \mu\text{g/rat}$, $n=6$) の脳室内投与も, 投与前日が 18.7 ± 0.4 g に対して 18.2 ± 0.9 g であり, 効果なかった.

考 察

本研究において, aFGF および bFGF の第3脳室内投与によりラットの夜間摂食量が用量依存的に抑制されることが明らかになった. この aFGF の摂食抑制作用はこれまでの報告⁹⁾³³⁾と一致しており, さらにその摂食抑制作用が投与の翌日には回復すること, またデータには示していないが, 熱で不活性化した aFGF および bFGF は無効なこと, 運動量には影響しなかったことなどから, この摂食抑制作用が非特異的な毒性作用でなく, 摂食行動に対する直接的な作用であることが示唆される. ラット脳脊髄中の aFGF は摂食後2時間で, 10 pg/ml から 10 ng/ml に上昇し, bFGF も同様に上昇する²⁴⁾. 本研究に用いた aFGF および bFGF の最小有効濃度は 50 ng/rat (3 pmol) であり, ほぼ生理的な濃度といえる. すなわち, 摂食後に脳内に増加する aFGF および bFGF が内因性満腹物質として摂食抑制に関与している可能性が強い. 摂食調節物質であるインスリン, グルカゴンおよびカルシトニンなども摂食後, 脳脊髄液中に著明に増加し, 脳内投与で摂食抑制作用を示すが¹²⁾²⁹⁾³⁰⁾, 現在のところ aFGF はこれらの満腹物質の中で有効濃度が最も低い.

aFGF の 50 および 200 ng/rat 脳室内投与は, 前日の12時間摂食量と比べ, それぞれ 21.8 および 42.7% 摂食量を抑制した (Fig. 1B). 一方同量の bFGF はそれぞれ 15.6 および 30.0% の抑制を示した (Fig. 2B). したがって, aFGF のほうが bFGF に比べ, 約

1.5 倍強力な摂食抑制作用をもつことになる. *In vitro* では bFGF は aFGF より, 通常 10 - 100 倍強い成長促進作用を持つことが知られている⁹⁾. しかし, 視神経切断後の網膜神経節細胞の変性を aFGF は bFGF に比べより強力に防止する⁴⁰⁾. また aFGF は培養海馬支脚ニューロンの生存を促進するが, bFGF には作用がない⁴⁵⁾. これらのことは, 本研究も含めて, aFGF がある種の神経細胞に対しては bFGF より強力な生物学的作用を持っていることを示している.

視床下部の摂食中枢である LHA および満腹中枢である視床下部腹内側核 (ventromedial hypothalamus, VMH) は摂食行動の抑制にもっとも重要な脳内部位であり, とくに両中枢内にある化学感受性ニューロンは摂食の制御に重要な役割を果たしている¹⁵⁾²³⁾. ^{125}I -aFGF および ^{125}I -bFGF を側脳室内に投与すると, LHA のニューロンの細胞体が標識されることから⁵⁾, LHA ニューロンが FGF 受容体を有していることが示唆される. また, Matsuo らは FGF 受容体の FGFR-1 が LHA のニューロンに存在することを免疫組織化学法により明らかにした²⁰⁾. aFGF を直接 LHA ブドウ糖感受性ニューロンに電気泳動的に投与すると, 数分間の潜時の後に, ニューロンの活動が 10 分間にわたって持続的に抑制される⁹⁾²⁴⁾. さらにこの抑制はプロテインキナーゼ C を介していることも明らかになっている²⁴⁾. また bFGF もブドウ糖感受性ニューロンに対して同様の作用を持つことがわれわれの予備実験で明らかになっている. これに対して, VMH では ^{125}I -aFGF や ^{125}I -bFGF により標識される細胞⁵⁾や抗 FGFR-1 抗体陽性細胞²⁰⁾は見いだされていない. また aFGF を VMH のニューロンに投与しても, ニューロン活動は変化しない⁹⁾²⁴⁾. さらにわれわれは予備実験で抗 aFGF 抗体の LHA 投与が摂食量を増加させることを見いだしている. 増殖促進作用や成長作用などの生物活性に対する抗 aFGF 抗体や抗 aFGF₁₋₁₅抗体の aFGF の抑制効果はまだ知られていないが, aFGF とこれらの抗体との免疫学的結合は確かめられている¹¹⁾⁴³⁾. bFGF の 3T3 細胞における DNA 合成促進作用やウシ血管内皮細胞の増殖作用や遊走能の促進, さらに PC 12 細胞の神経突起の伸長促進作用などを抗 bFGF 抗体が抑制することも報告されている¹⁴⁾²¹⁾³¹⁾³⁴⁾. これらのことから, 予備実験で用いた抗 aFGF 抗体が内因性の aFGF の生理的摂食抑制機能の発現を阻害した結果, 摂食量が増加したことが示唆される. 以上のことは, aFGF および bFGF の標的部位が視床下部, とくに LHA であること, さらにその摂食抑制作用

の少なくとも一部はLHAブドウ糖感受性ニューロンの抑制を介している可能性を示している。

本研究では、aFGFのC末端のaFGF₁₁₄₋₁₄₀には摂食調節作用がなかったが、N末端のaFGF₁₋₁₅は有意に摂食を抑制した。ただし同じモル濃度では効果がaFGFの1/80であった。これに対して、より長いN末端配列のaFGF₁₋₂₉、aFGF₉₋₂₉およびaFGF₁₋₂₀には摂食に影響がなかった。FGFファミリーにはすくなくとも二つのシステイン残基が存在し、aFGFとbFGFにおいてはこれらのシステイン残基が分裂作用、安定性、ヘパリン依存性などに影響することが知られている¹⁶⁾²⁵⁾³⁸⁾。aFGF群のアミノ酸配列中のシステイン残基は16と83番目にあり、さらにヒト型とウシ型のaFGFはそれぞれ117と47番目にもシステイン残基を持っている⁶⁾⁷⁾。aFGF₁₋₂₉、aFGF₉₋₂₉、aFGF₁₋₂₀は摂食抑制効果がなかったが、これらのフラグメントでは16番目のシステイン残基が分子間でジスルフィド結合をつくり、構造的変化を起こしている可能性がある。ヒト型aFGFはジスルフィド結合の形成により、3T3細胞に対する分裂作用が消失する¹⁶⁾。またaFGFのシステイン残基をセリンに変換すると、3T3細胞に対する分裂作用が修飾される²⁵⁾。本研究では、aFGF₁₋₂₉に対して、16番目のシステインをアラニンに変換してジスルフィド結合を形成しないようにした[16Ala]aFGF₁₋₂₉はaFGFの1/20の効果で、aFGF₁₋₁₅より強力な摂食抑制作用を示した。これらの結果は、aFGFの摂食調節作用がN端側にあり、一個のアミノ酸の変化によりペプチドの摂食抑制作用が劇的に変わることから、システイン残基がaFGFの分裂作用だけでなく、摂食調節作用においても重要な役割を果たしていることを示唆している。

総 括

aFGF、bFGFおよび6種のaFGFフラグメントを暗期直前にラットの第3脳室内に投与し、その後12時間夜間摂食量に対する中枢性作用を検討した。

1) aFGFおよびbFGF(それぞれ50および200 ng/rat)の脳室内投与は用量依存的に夜間摂食量を減少させた。さらに、12時間摂食量における摂食抑制作用を比較すると、aFGFはbFGFより約1.5倍強力であった。

2) aFGFのN末端のaFGF₁₋₁₅(400 ng/rat)脳室内投与は摂食量を有意に減少させたが、そのC末端のaFGF₁₁₄₋₁₄₀投与は摂食量には影響がなかった。

3) aFGF₁₋₂₉(200および400 ng/rat)、aFGF₉₋₂₉(1

および4 μg/rat)およびaFGF₁₋₂₀(4 μg/rat)の脳室内投与は摂食には影響しなかった。一方、16番目のシステイン残基をアラニンに置換した[16Ala]aFGF₁₋₂₉(200, 400 ng/rat)の投与は摂食量を有意に抑制した。さらにその12時間夜間摂食量に対する摂食抑制作用はaFGF₁₋₁₅より強力であった。

4) 以上の結果から、aFGFおよびbFGFは中枢性の満腹物質であること、aFGFのアミノ酸配列のN末端およびその配列中のシステイン残基が摂食調節に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

稿を終るに当たり終始御指導、御校閲を賜りました九大医学部生理学教室堀 哲郎教授ならびに大村 裕名誉教授に深く謝意を表します。またつねに御助言、ご援助を頂きました富山大学工学部佐々木和男助教授、九大医学部生理学教室栗生修司助教授、片瀬俊彦講師ならびに富山医科薬科大学和漢薬研究所武藤 正君に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Anderson KJ, Dam D, Lee S, and Cotman CW: Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons *in vivo*. *Nature* 322: 360-361, 1988.
- 2) Baird A, and Böhlen P: Fibroblast growth factors, In Sporn MB and Roberts AB (ed): *Peptide Growth Factors and Their Receptors II*. pp. 1-64, Springer-Verlag Heidelberg, 1990.
- 3) Baird A, and Walicke PA: Fibroblast growth factors. *Br. Med. Bull.* 45: 438-452, 1989.
- 4) Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Clepper R, Gospodarowicz D, Böhlen P, and Guillemin R: Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6507-6511, 1985.
- 5) Ferguson IA, and Johnson Jr EM: Fibroblast growth factor receptor-bearing neurons in the CNS: Identification by receptor-mediated retrograde transport. *J. Comp. Neurol.* 313: 693-706, 1991.
- 6) Gimenez-Gallego G, Conn G, Hatcher V, and Thomas KA: The complete amino acid sequence of human brain-derived acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 611-617, 1986.
- 7) Gimenez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C, Rios-Candelore M, DiSalvo J, and Thomas KA: Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 230: 1385-1388, 1985.
- 8) Gosodorowicz D, Neufeld G, and Schweiger-

er L: Fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 46: 187-204, 1986.

9) Hanai K, Oomura Y, Kai Y, Nishikawa K, Shimizu N, Morita H, and Plata-Salamán CR: Central action of acidic fibroblast growth factor in feeding regulation. *Am. J. Physiol.* 256: R217-R223, 1989.

10) Hisajima H, Saito H, Abe K, and Nishiyama N: Effects of acidic fibroblast growth factor on hippocampal long-term potentiation in fasted rats. *J. Neurosci. Res.* 31: 549-553, 1992.

11) Iguchi K, Inoue T, Ooshima K, and Yanaihara N: Immunochemical studies of acidic fibroblast growth factor (aFGF) using anti-synthetic peptide antisera. In Yanaihara N (ed): *Peptide Chemistry* 1989. pp 285-290, Protein Research Foundation Osaka, 1989.

12) Inokuchi A, Oomura Y, Shimizu N, and Yamamoto T: Central action of glucagon in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 250: R120-R126, 1986.

13) Kornbluth S, Paulson KS, and Hanafusa H: Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5541-5544, 1988.

14) Kurogawa M, Doctrow SR, and Klagsbrun M: Neutralizing antibodies inhibit the binding of basic fibroblast growth factor to its receptor but not to heparin. *J. Biol. Chem.* 264: 7686-7691, 1989.

15) Le Magnen J: Body energy balance and food intake: a neuroendocrine regulatory mechanism. *Physiol. Rev.* 63: 314-386, 1983.

16) Linemeyer DL, Menke JG, Kelly LJ, DiSalvo J, Soderman D, Schaeffer M-T, Ortega S, Gimenez-Gallego G, and Thomas KA: Disulfide bonds are neither required, present, nor compatible with full activity of human recombinant acidic fibroblast growth factor. *Growth Factor.* 3: 287-298, 1990.

17) Lobb RR, Harper JW, and Fett JW: Purification of heparin-binding growth factors. *Analytic. Biochem.* 154: 1-14, 1986.

18) Marchese C, Rubin J, Ron D, Faggioni A, Torrisi R, Messina A, Frati L, and Aaronson SA: Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *J. Cell Physiol.* 144: 326-332, 1990.

19) Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Mattei M-G, Coulie F, Planche J, De Lapeyriere O, and Brinbaum D: Characterization of the HST-related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor family. *Oncogene* 4: 335-340, 1989.

20) Matsuo A, Tooyama I, Isobe S, Oomura Y,

Akiguchi T, Hanai K, Kimura J, and Kimura H: Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor receptor-1 in the rat brain. *Neuron* in press, 1993.

21) Matsuzaki K, Yoshitake Y, Matsuo Y, Sasaki H, and Nishikawa K: Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity: invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9911-9915, 1989.

22) Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, and Bradshaw RA: Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7537-7541, 1986.

23) Oomura Y, Ooyama H, Sugimori M, Nakamura T, and Yamada Y: Glucose inhibition of the glucose-sensitive neuron in the rat lateral hypothalamus. *Nature (Lond.)* 247: 284-286, 1974.

24) Oomura Y, Sasaki K, Suzuki K, Muto T, Li A, Ogita Z-I, Hanai K, Tooyama I, Kimura H, and Yanaihara N: A new brain glucosensor and its physiological significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 278S-282S, 1992.

25) Ortega S, Schaeffer M-T, Soderman D, DiSalvo J, Linemeyer DL, Gimenez-Gallego G, and Thomas KA: Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability, and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 266: 5842-5846, 1991.

26) Partanen J, Makela T, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, and Alitalo K: FGFR4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* 10: 1347-1354, 1991.

27) Pasquale EB: A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5812-5816, 1990.

28) Paxinos G, and Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic New York, 1982.

29) Plata-Salamán CR, and Oomura Y: Calcitonin as a feeding suppressant: localization of central action to the cerebral III ventricle. *Physiol. Behav.* 40: 501-513, 1987.

30) Plata-Salamán CR, Oomura Y, and Shimizu N: Dependence of food intake on acute and chronic ventricular administration of insulin. *Physiol. Behav.* 37: 717-734, 1986.

31) Reilly TM, Taylor DS, Herblin WF, Thoolen MJ, Chiu AT, Watson DW, and Timmermans PBMWM: Monoclonal antibodies directed against basic fibroblast growth factor which inhibits biological activity *in vitro* and *in vivo*.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 736-743, 1989.
- 32) Ruta M, Burgess W, Givol D, Epstein J, Neiger N, Kaplow J, Crumley G, Dionne C, Jaye M, and Schlessinger J: Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the *fms*-like gene (FLG). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 8722-8726, 1989.
- 33) Saint Hilaire de Z, and Nicolaïdis S: Enhancement of slow wave sleep parallel to the satiating effects of acidic fibroblast growth factor in rats. Brain Res. Bull. 29: 525-528, 1992.
- 34) Sakaguchi M, Kajio T, Kawahara K, and Kato K: Antibodies against basic fibroblast growth factor inhibit the autocrine growth of pulmonary artery endothelial cells. FEBS Lett. 233: 163-166, 1988.
- 35) Sasaki K, Oomura Y, Figurov A, Li A, Yagi H, Hanai K, Tooyama I, and Kimura K: Regulation between acidic fibroblast growth factor (aFGF), long-term potentiation (LTP), and *zif* 268 gene expression. Soc. Neurosci. Abstr. 18: 520, 1992.
- 36) Sasaki K, Oomura Y, Figurov A, Yagi H, and Yamaiharu N: Acidic fibroblast growth factor (aFGF) fragment can modulate synaptic efficacy in rat hippocampal slices. Soc. Neurosci. Abstr. 19: 413, 1993.
- 37) Seddon A, Decker M, Müller T, Armellino D, Kovesdi I, Gluzman Y, and Böhlen P: Structure/activity relationships in basic FGF. Annal. New York Acad. Sci. 638: 98-108, 1991.
- 38) Seno M, Sasada R, Iwane M, Sudo K, Kurokawa T, Ito K, and Igarashi K: Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. Biochem. Biophys. Res. Commun. 151: 701-708, 1988.
- 39) Seno M, Sasada R, Kurokawa T, and Igarashi K: Carboxyl-terminal structure of basic fibroblast growth factor significantly contributes to its affinity for heparin. Eur. J. Biochem. 188: 239-245, 1990.
- 40) Sievers J, Hausman B, Unsicker K, and Berry M: Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. Neurosci. Lett. 76: 157-162, 1987.
- 41) Stock A, Kuzis K, Woodward WR, Nishi R, and Eckenstein FP: Localization of acidic fibroblast growth factor in specific subcortical neuronal populations. J. Neurosci. 12: 4688-4700, 1992.
- 42) Terlau H, and Seifelt W: Fibroblast growth factor enhances long-term potentiation in the hippocampal slice. Eur. J. Neurosci. 2: 973-977, 1990.
- 43) Tooyama I, Hara Y, Yasuhara O, Oomura Y, Sasaki K, Muto T, Suzuki K, Hanai K, and Kimura H: Production of antisera to acidic fibroblast growth factor and their application to immunohistochemical study in rat brain. Neuroscience 40: 769-779, 1991.
- 44) Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, and Guillemin R: Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 3012-3016, 1986.
- 45) Walicke P: Basic and acidic fibroblast growth factor have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. J. Neurosci. 8: 2618-2627, 1988.

(受付 1993-12-13)