

平成 30 年 10 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18706

研究課題名(和文) タンパク質低栄養が誘導するFGF21の新しい脂質代謝制御機構

研究課題名(英文) A novel mechanism of regulation of lipid metabolism by protein malnutrition-induced Fgf21

研究代表者

増澤・尾崎 依 (OZAKI-MASUZAWA, Yori)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：70614717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質低栄養は肝臓への脂肪蓄積を誘導する。一方、タンパク質低栄養時にはFgf21の発現が増加し、増加したFgf21は肝臓への脂肪蓄積を抑制する。本研究はFgf21-KOマウスを用い、タンパク質低栄養時にFgf21が肝臓の脂肪蓄積を抑制するメカニズムについて解析した。その結果、タンパク質低栄養時には脂肪組織においてFgf21依存的にUcp-1が発現誘導されることを見出した。一方、増加したUcp-1は肝臓脂肪蓄積の抑制には関与しない可能性を示した。また、Fgf21による肝臓脂肪蓄積の抑制は肝臓からのTAG放出の促進を介さないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein malnutrition promotes hepatic steatosis. Meanwhile, protein malnutrition up-regulates Fgf21 expression, which suppresses hepatic steatosis. This study was undertaken to elucidate the mechanism of the protective effect of Fgf21 against hepatic steatosis under protein malnutrition conditions. We showed that Fgf21 is required for up-regulation of Ucp-1 in adipose tissues under protein malnutrition conditions. However, increased Ucp-1 is not required for the protective effect of Fgf21 against hepatic steatosis. Moreover, the protective effect of Fgf21 against hepatic steatosis is not mediated by reduced liver TAG secretion since Fgf21 does not influence liver TAG secretion under protein malnutrition conditions.

研究分野：食品科学，栄養生理学

キーワード：FGF21 低タンパク質食 タンパク質低栄養

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は動物の体の主要な構成成分であるばかりでなく、成長や代謝を制御する因子としても機能している。エネルギーは充足しているもののタンパク質が不足した“タンパク質低栄養”は、成長期の動物において成長遅滞を引き起こす一方、低栄養にも関わらず、肝臓で脂肪の蓄積を誘導して脂肪肝を形成する。ヒトにおいても、タンパク質が欠乏した“クワシオルコル”と呼ばれる栄養失調の患者が脂肪肝を呈し、VLDLによる肝臓からの脂質輸送の低下が一因である可能性が示されているが、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。

申請者はこれまでに、タンパク質低栄養は1日で肝臓の線維芽細胞増殖因子(FGF)21の遺伝子発現を大きく誘導することを見出し、血中FGF21濃度も顕著に増加することを示した。また、培養肝細胞を用いた実験により、肝臓はアミノ酸欠乏に直接応答してFGF21を増加させる事も明らかにした。さらに、低タンパク質食摂取時に誘導されるFGF21が成長遅滞や肝臓脂肪蓄積の要因であるかどうか、*Fgf21*ノックアウト(KO)マウスを用いて解析した。その結果、タンパク質低栄養条件下で誘導されるFGF21は成長遅滞の要因ではないこと、また、トリグリセリド(TAG)およびコレステロールの蓄積を伴う脂肪肝の形成と、内臓脂肪の蓄積を抑制していることを明らかにした(Ozaki *et al.*, 2015)。

FGF21に関連する学術論文は近年急激に増加しているにも関わらず、その機能に関する理解はいまだに断片的である。特に脂質代謝における作用に関しては、相反する報告が多く議論が分かれている。すなわち、*Fgf21*過剰発現動物やFGF21投与などによる実験から、FGF21が脂質の分解を促進するとの報告がある(Inagaki *et al.*, 2007; Hotta *et al.*, 2009 他)。一方、FGF21は絶食下やケトン食摂取時、および肥満動物や培養脂肪細胞において、脂質分解を抑制するという報告もあり、GH誘導性の脂質分解を抑制することも示されている(Badman *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009 他)。肝臓での脂質代謝に着目した場合も同様で、*Fgf21*-KOは肝臓TAG蓄積量に影響しない一方、FGF21投与は高脂肪食により誘導された脂肪肝を改善する(Coskun *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009 他)。このようにFGF21の全身の脂質代謝における機能は複雑で、いまだ統一的な見解が得られるには至っていない。一方、申請者はタンパク質低栄養時に誘導される内因性のFGF21が肝臓の脂肪蓄積を強く抑制していることを初めて明らかにした。この現象はタンパク質栄養に応答した脂質代謝制御というFGF21の新たな機能を示すものである。

申請者はこれまでに、タンパク質低栄養がFGF21の肝臓における遺伝子発現と血中濃度を大きく増加させることを見出し、脂肪蓄積を誘導する因子ではないかと予想した。し

かし、*Fgf21*ノックアウトマウスを用いた解析により、増加したFGF21が逆に肝臓への脂肪蓄積を抑制していることをはじめて示した。この結果から、タンパク質低栄養によるシグナルはこれまで考えられていた以上に強力に肝臓脂肪の蓄積を誘導しているが、同時に増加するFGF21によりその大部分が抑制されているという、タンパク質栄養による脂質代謝制御の全く新しい機構を想定するに至った。

一方、寒冷刺激時の白色脂肪組織(WAT)の褐色化にはFGF21を要することが知られるが(Fisher *et al.*, 2012)、申請者はタンパク質低栄養がWATの脱共役タンパク質(UCP)-1遺伝子発現を誘導する事を明らかにし、低タンパク質食摂取はWATの褐色化を誘導すると予想した。さらに、タンパク質低栄養は肝臓において、アディポサイトカインの一種であるレプチンの受容体の遺伝子発現を大きく増加させることも見出し、タンパク質低栄養がレプチン感受性を増加させている可能性も考えられた。

2. 研究の目的

先行研究の結果から、申請者はタンパク質低栄養により増加したFGF21は直接肝臓に作用するのみならず、脂肪組織を動員して脂質代謝を制御する、という新たな仮説をもつに至った。そこで本研究は、タンパク質低栄養が誘導するFGF21がどのような機構で肝臓の脂肪蓄積を抑制するか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝臓の脂質代謝関連因子の発現に及ぼす影響

4週齢のC57BL/6系統の野生型(WT)および*Fgf21*-KOオスマウスに、20%のカゼインを含む対照食(20P)、あるいは20Pと等エネルギーで5%のカゼインを含む低タンパク質食(5P)を9日間自由摂取させた。10日目に肝臓を採取し、脂肪酸の合成・分解・脂質の取り込みおよび輸送に関連する種々の遺伝子の発現量を測定した。

(2) 白色脂肪の褐色化および褐色脂肪の活性化に及ぼす影響

(1)と同様の条件で飼育したWTおよび*Fgf21*-KOマウスにおいて、鼠蹊部白色脂肪組織(ingWAT)および褐色脂肪組織(BAT)における*Ucp-1*遺伝子の発現量を測定した。

(3) *Ucp-1*を介して肝臓TAG蓄積を抑制する可能性の検討

タンパク質低栄養時に増加する*Fgf21*が体熱産生の亢進を介して肝臓TAG蓄積を抑制する可能性を検討した。室温(22°C)、および*Ucp-1*の発現が抑制される30°Cにて、5週齢のWTおよび*Fgf21*-KOマウスに20Pあるいは5Pを10日間給餌した。11日目に肝臓を

採取し、脂質含量を測定した。

(4) アディポサイトカインの発現に及ぼす影響

WT および *Fgf21*-KO マウスに 5P あるいは 20P を給餌し、脂肪組織における種々のアディポサイトカイン遺伝子の発現量、肝臓における受容体遺伝子の発現量を測定した。また、*Fgf21* をノックダウンした 3T3L1 脂肪細胞をアミノ酸欠乏培地で培養し、アディポネクチン遺伝子の発現量を測定した。

(5) 肝臓コレステロール合成の抑制を介する可能性の検討

スタチンを投与してコレステロール合成を抑制した *Fgf21*-KO マウスに 5P を給餌し、*Fgf21* がコレステロール合成を抑制することで肝臓へのコレステロールの蓄積を抑制するかどうかを検討することを試みた。

(6) 肝臓からの TAG 放出に及ぼす影響

WT および *Fgf21*-KO マウスに、20P あるいは 5P を 19-21 日間給餌した。リポプロテインリパーゼ阻害剤の Triton WR-1339 を 500mg/kg bw, あるいは等量の PBS を尾静脈投与し、0, 1, 2, 4 および 8 時間後に採血して血漿中の TAG 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 肝臓の脂質代謝関連因子の発現に及ぼす影響

Fgc-1a の遺伝子発現量が 5P 群で減少し、その減少率は WT と比較して *Fgf21*-KO 群で高かった。よって、タンパク質低栄養が誘導する *Fgf21* は脂質分解を促進する可能性が考えられた。

(2) 白色脂肪の褐色化および褐色脂肪の活性化に及ぼす影響

5P 摂取は WT マウスの ingWAT および BAT における *Ucp-1* 遺伝子の発現を誘導したが、この誘導は *Fgf21*-KO により完全に抑制された (図 1)。したがって、タンパク質低栄養により発現誘導される *Fgf21* は *Ucp-1* の発現上昇に必要であることが示され、体熱産生の亢進を介して肝臓脂肪の蓄積を抑制する可能性が考えられた。

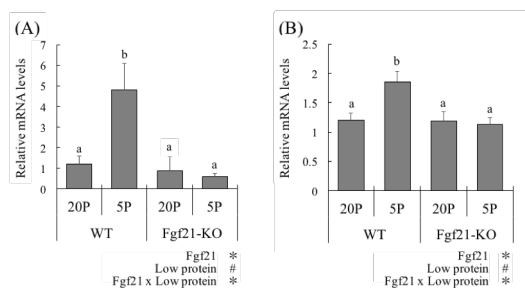


図 1. 対照食 (20P) あるいは低タンパク質食 (5P) を摂取した WT および *Fgf21*-KO マウスにおける (A) ingWAT および (B) BAT の *Ucp-1* 遺伝子の発現量。

(3) *Ucp-1* を介して肝臓 TAG 蓄積を抑制する可能性の検討

30°C では、*Fgf21* の有無に関わらず 22°C で生じる 5P 摂取による肝臓 TAG 蓄積の増加が減弱する傾向を示した (図 2)。したがって、*Fgf21* を介して発現誘導される *Ucp1* は肝臓脂肪蓄積の抑制には関与しない可能性が考えられた。

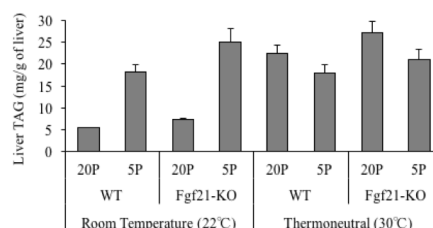


図 2. 室温 (22°C) あるいは *Ucp-1* の発現が抑制される 30°C において、対照食 (20P) あるいは低タンパク質食 (5P) を摂取した WT および *Fgf21*-KO マウスの肝臓 TAG 蓄積量。

(4) アディポサイトカインの発現に及ぼす影響

WAT において、レプチンおよび *Nrg4* 遺伝子の発現量には群間に差はなかった。また、肝臓のレプチン受容体遺伝子の発現量は *Fgf21* の有無に関わらず 5P 摂取により有意に増加した。一方、アディポネクチンの遺伝子の発現量は ingWAT および epiWAT において 5P 摂取により増加し、その増加は有意ではないが *Fgf21*-KO によりキャンセルされる傾向を示した。また、3T3L1 脂肪細胞におけるアディポネクチンの遺伝子発現はアミノ酸欠乏により増加し、この増加も *Fgf21* のノックダウンによりキャンセルされる傾向を示した。以上の結果より、脂肪細胞ではタンパク質・アミノ酸欠乏に反応して増加する *Fgf21* がオートクリン的に作用してアディポネクチンの遺伝子発現を増加させる可能性が考えられた。

(5) 肝臓コレステロール合成の抑制を介する可能性の検討

種々の濃度・タイミング・回数・期間にてマウスにスタチンを投与したが、マウスへのスタチン投与の効果が確認できず本実験を行うことができなかった。

(6) 肝臓からの TAG 放出に及ぼす影響

Triton WR-1339 の投与により血漿 TAG 濃度は経時的に増加したが、いずれの時間においても *Fgf21* および 5P 食摂取の影響は認められなかった (図 3)。したがって、*Fgf21* による肝臓脂肪蓄積の抑制は肝臓からの TAG 放出の促進を介さないことが示唆された。

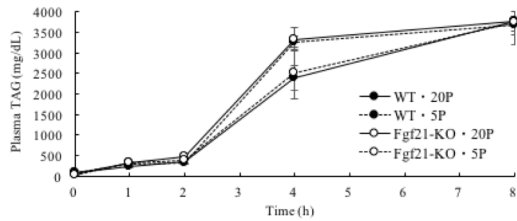


図 3. 対照食 (20P) あるいは低タンパク質食 (5P) を摂取した WT および *Fgf21*-KO マウスにおける, Triron WR-1339 投与後の血中 TAG 濃度の推移.

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 Miura A, Ishiguro K, Koizumi K, Yaita Y, Ozaki-Masuzawa Y, Hosono T, Seki T (2017). Effects of pharmacological inhibition of plasminogen binding on liver regeneration in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81, 2105-2111. 査読有.
DOI: 10.1080/09168451.2017.1372180
- ② Horiuchi M, Takeda T, Takanashi H, Ozaki-Masuzawa Y, Taguchi Y, Toyoshima Y, Otani L, Kato H, Sone-Yonezawa M, Hakuno F, Takahashi S-I, Takenaka A (2017). Branched-chain amino acid supplementation restores reduced insulinotropic activity of a low-protein diet through the vagus nerve in rats. *Nutrition & Metabolism* 14:59. 査読有.
DOI: 10.1186/s12986-017-0215-1

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小坂浩輝, 川端航太, 増澤 (尾崎) 依, 小西守周, 伊藤信行, 細野崇, 竹中麻子, 関泰一郎. タンパク質低栄養により誘導される FGF21 が脂質代謝と体熱産生に及ぼす影響について. 第 72 回日本栄養・食糧学会大会, 2018 年 5 月 12 日, 岡山県立大学 (岡山県・総社市).
- ② 大塩優衣, 高橋遼大, 増澤依, 小西守周, 伊藤信行, 竹中麻子. Fibroblast growth factor21 による肝臓コレステロール蓄積抑制機構の解析. 第 72 回日本栄養・食糧学会大会, 2018 年 5 月 12 日, 岡山県立大学 (岡山県・総社市).
- ③ 竹中麻子, 服部裕太, 佐藤遼太, 関亜理砂, 竹之内柚貴乃, 増澤 (尾崎) 依. タンパク質欠乏がラット肝臓 VLDL 受容体発現に

およぼす影響. 日本アミノ酸学会第 11 回学術大会, 2017 年 10 月 1 日, 京都府立大学 稲盛記念会館 (京都府・京都市).

- ④ 大塩優衣, 高橋遼太, 増澤 (尾崎) 依, 竹中麻子. FGF21 が肝臓コレステロールを低下させる機構の解析. 日本農芸化学会関東支部 2017 年度支部大会, 2017 年 9 月 2 日, 筑波大学 (茨城県・つくば市).
- ⑤ 増澤 (尾崎) 依, 戸田友美子, 永田真理, 原昇平, 野口真行, 小西守周, 伊藤信行, 細野崇, 竹中麻子, 関泰一郎. タンパク質低栄養が誘導する FGF21 による肝臓脂肪蓄積抑制機構の解析. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 2017 年 5 月 21 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市).
- ⑥ 島村紘平, 増澤 (尾崎) 依, 竹中麻子. アミノ酸欠乏による fibroblast growth factor 21 発現増加機構の解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学 (京都府・京都市).
- ⑦ 竹中麻子, 高橋遼太, 増澤 (尾崎) 依, 井上佳奈, 長谷川由希子, 小西守周, 伊藤信行. タンパク質欠乏により増加する fibroblast growth factor 21 がマウスのインスリン分泌におよぼす影響. 日本アミノ酸学会 10 周年記念大会 (JSAAS 2016), 2016 年 9 月 13 日, 東京大学 伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区).

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増澤 (尾崎) 依 (OZAKI-MASUZAWA, Yori)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号: 70614717