

令和元年6月21日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21714

研究課題名(和文) -Klotho/FGF15システムの新規標的分子の同定と胎児発育への寄与の解明

研究課題名(英文) Identification of novel target molecules of beta-Klotho/FGF15 system and their contributions to fetal growth in mice

研究代表者

小林 加奈子 (Kobayashi, Kanako)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・その他

研究者番号：10724106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： -Klotho/FGF15システムは成体マウスにおいては、標的分子の転写制御を介して胆汁酸合成を負に制御する。 -klothoとFgf15はともに胎生期から発現しているが、機能的な連関の有無は不明であった。本研究によって、卵黄嚢に発現する -Klothoが胚からのFGF15シグナルの受容に重要であることが示された。さらに、網羅的遺伝子発現解析により -Klotho/FGF15システムが胎生期に制御している遺伝子群と代謝経路を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低出生体重児は成人後に代謝疾患を発症するリスクが高いことが知られているが、胎児の発育を制御するメカニズムには不明な点が多い。本研究では、胎生期において -Klotho/FGF15システムが制御する遺伝子と代謝経路を明らかにした。 -klotho欠損マウス胚とFgf15欠損マウス胚がいずれも発育抑制を呈することから、 -Klotho/FGF15システムの下流にある分子や代謝経路を解析することで胎児の発育制御に関わる新たなメカニズムが明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： -Klotho/FGF15 system negatively regulates bile acid synthesis via transcriptional control of target molecules in adult mice. -klotho and Fgf15 are expressed in embryonic stage, but whether they have functional association or not has been unclear. This study showed that -Klotho expressed in yolk sac is important to receive FGF15 signal from embryo. Moreover, RNA-sequencing analysis revealed genes and metabolic processes regulated by -Klotho/FGF15 system during embryonic stage in mice.

研究分野：栄養学、代謝学

キーワード： -Klotho FGF15 胎児発育

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

β -Klotho は肝臓、脂肪組織、膵臓、脳に発現する I 型膜タンパク質である^{1,2}。 β -klotho 欠損 (β -kl^{-/-}) マウスは胆汁酸合成亢進、脂質異常症、および離乳時より体重抑制を示す³。胆汁酸合成については、肝臓の β -Klotho が小腸から分泌される FGF15 のシグナルを介して、胆汁酸合成経路の律速酵素である CYP7A1 の遺伝子発現を抑制する臓器連関的なメカニズムが明らかにされている^{4,5} (β -Klotho/FGF15 システム: 図 1)。実際に、 β -kl^{-/-}マウスの肝臓で β -Klotho 発現を回復させると胆汁酸・脂質代謝が正常化する。しかし、体重は肝臓での β -Klotho 発現レスキューでは回復しないことから、体重の制御に必要なのは肝臓以外の臓器に発現する β -Klotho であることが示されている⁵。

β -kl^{-/-}マウスの体重抑制のメカニズムは明らかではないが、胎生 9.5 日目で β -kl^{-/-}胚はコントロールである β -kl^{+/-}胚よりも小さいことから、出生後の体重抑制は胎生期の発育に起因することが示唆される。胎生 10 日目のマウス胚において、 β -klotho は肝臓原基と卵黄嚢に発現する¹。胎生 10 日目頃までマウス胚は胎盤ではなく卵黄嚢を介して母体からの栄養供給を受ける⁶ことから、卵黄嚢の β -klotho が胚への栄養供給に関わる可能性が考えられる。*Fgf15* は胎生 9.5 日目の胚では主に神経管と脳に発現する⁷が、興味深いことに *Fgf15* 欠損 (*Fgf15*^{-/-}) 胚も発育抑制を呈する。胎生期における β -Klotho と FGF15 の機能連関の有無は不明であるが、これらのデータから『胎生期において β -Klotho と FGF15 は標的分子の発現制御を介して胚 (胎児) の発育に關与する (図 2)』との仮説に至った。

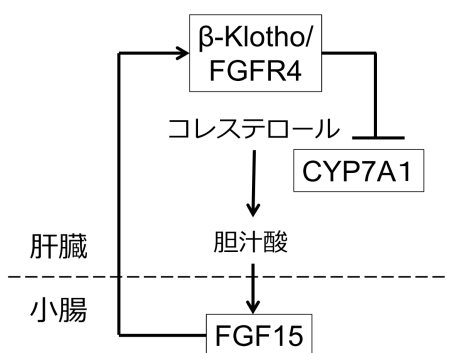


図 1. 成体における β -Klotho/FGF15 システム

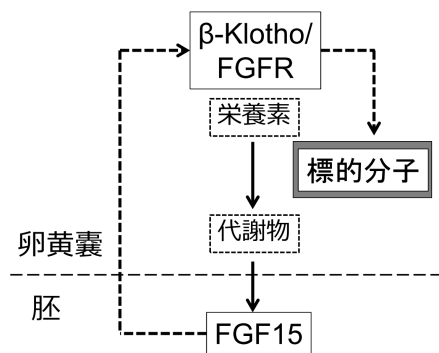


図 2. 胎生期における β -Klotho/FGF15 システム (仮説)

2. 研究の目的

本研究では、 β -Klotho/FGF15 システムの新たな機能を明らかにすることを目的として、胎生 9.5 日目における β -Klotho/FGF15 システムの標的分子の同定と機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 標的分子候補の探索

胎生期における β -Klotho/FGF15 システムの標的分子を同定するため、まず β -kl^{-/-}卵黄嚢と同腹の β -kl^{+/-}卵黄嚢から RNA を抽出し、RNA シーケンスにより β -klotho 依存的に発現が変動する遺伝子のリストを作成した。

標的分子の発現変化の挙動は β -kl^{-/-}卵黄嚢と *Fgf15*^{-/-}卵黄嚢で一致すると考えられるため、リストアップされた遺伝子の *Fgf15*^{-/-}卵黄嚢における遺伝子発現レベルを定量 PCR 法で検証した。卵黄嚢の機能および β -kl^{-/-}胚、*Fgf15*^{-/-}胚における発育抑制を考慮し、栄養の代謝や輸送に関わる分子を中心に標的分子候補の絞り込みを行った。 β -kl^{-/-}卵黄嚢と *Fgf15*^{-/-}卵黄嚢で挙動が一致

しなかった遺伝子は、 β -Klotho/FGF15 システムに依存しないと判断し、標的分子の候補リストから除外した。

(2) 機能解析

β -Klotho/FGF15 システムの破綻が胚に与える影響を明らかにするため、標的分子候補の制御下にある栄養素を妊娠マウスに投与し、胚側の *Fgf15* と標的分子の遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 胎生期における β -Klotho と FGF15 の機能関連

成体マウスでは、肝臓の β -Klotho が欠損すると胆汁酸合成が増加し、胆汁酸によって FXR が活性化され、小腸での *Fgf15* 遺伝子発現が亢進する⁴。本研究ではまず、胎生 9.5 日目のマウス胚における *Fgf15* の発現レベルを定量 PCR 法で検討した。 β -kl^{-/-}胚ではコントロールである β -kl^{+/-}胚よりも *Fgf15* 発現が高く、成体マウスと同様に β -klotho 欠損によって *Fgf15* 発現亢進が生じることを見出した。

次に、卵黄嚢と肝臓原基のどちらの β -Klotho が FGF15 シグナルの受容に必要であることを明らかにするため、アルブミンプロモーターの制御下でマウス β -klotho を発現するトランスジェニックマウス (Tg) と β -kl^{-/-}マウスを交配し、肝細胞特異的に β -klotho 発現をレスキューしたマウス (β -kl^{-/-}Tg) を作製した。 β -kl^{-/-}Tg 卵黄嚢における β -klotho 発現量は β -kl^{+/-}卵黄嚢の 3% 以下であったが、 β -kl^{-/-}Tg 胚における β -klotho 発現量は β -kl^{+/-}胚と同程度であった。 β -kl^{-/-}Tg 胚における *Fgf15* 発現を定量 PCR 法で検討したところ、*Fgf15* 発現量の増加傾向が見られたことから、FGF15 シグナルの受容には卵黄嚢の β -Klotho が必要であることが示された。

(2) 卵黄嚢において β -Klotho 依存的に発現が変化する遺伝子群の同定

成体マウスにおいて、 β -Klotho/FGF15 システムの標的分子は β -Klotho と同じ臓器に発現する、転写レベルの制御を受ける、 β -kl^{-/-}マウスと *Fgf15*^{-/-}マウスで同じ挙動を示す、という特徴を有する。したがって、胎生期における β -Klotho/FGF15 システムの標的分子は FGF15 シグナルの入力先である卵黄嚢に発現していると考えられた。

RNA シーケンスの結果、 β -kl^{-/-}卵黄嚢において約 1700 個の遺伝子の発現が有意に変動することが明らかになった。また、これらの中には成体マウスにおける β -Klotho/FGF15 システムの標的である胆汁酸合成経路の酵素は含まれていなかったことから、 β -kl^{-/-}胚における *Fgf15* 発現の亢進は胆汁酸-FXR 非依存的なメカニズムに因ることが示唆された。

(3) 胎生期において β -Klotho/FGF15 システム依存的に変化する代謝経路の特定

β -Klotho 依存的に発現が変動する遺伝子のリストにおいて、単独ではなく関連する複数の遺伝子で変化が見られたのが、ビタミン A 輸送と脂質代謝であった。それぞれの関連遺伝子の発現パターンを定量 PCR 法で確認したところ、 β -kl^{-/-}卵黄嚢および β -kl^{-/-}Tg 卵黄嚢で RNA シーケンスと一致する結果が得られた。さらに、*Fgf15*^{-/-}卵黄嚢での発現挙動も一致していた。

ビタミン A は、器官形成期において欠乏・過剰のいずれもが胚の発育に異常をもたらすことが報告されている。加えて、ビタミン A は成体マウスにおいて胆汁酸非依存的に小腸での *Fgf15* 発現を誘導することが明らかにされている⁸。これらの報告から、母体から卵黄嚢を介して供給されるビタミン A 量が過剰になると胚で *Fgf15* 発現が誘導され、卵黄嚢の β -Klotho にシグナルを入力することでビタミン A 輸送関連分子の遺伝子発現を抑制するネガティブフィードバック

ク制御が働いているのではないかと考えられた。

そこで、ビタミン A の影響を明らかにするため、コントロール飼料の 50 倍のビタミン A (レチノールパルミチン酸エステル) を含む過剰飼料を胎生 0.5 日目から 9.5 日目まで妊娠マウスに与え、胚における *Fgf15* 遺伝子発現を検討した。実験には雄の β -*kl*^{-/-}Tg マウスと交配した雌の β -*kl*^{+/-} マウスを使用した。ビタミン A 過剰の条件下では、 β -*kl*^{-/-} 胚における *Fgf15* 発現量は増加すると予想していたが、*Fgf15* 発現のさらなる亢進は観察されなかった。卵黄嚢の遺伝子発現について調べたところ、 β -*kl*^{-/-} 卵黄嚢では β -*kl*^{+/-} 卵黄嚢よりもビタミン A を非活性型へ変換する酵素である *Cyp26a1* 発現が高い傾向が見られた。このことから、妊娠期間を通じて母体をビタミン A 過剰条件に曝露したことで *Cyp26a1* 発現が誘導され、ビタミン A 毒性をキャンセルする代償機構が働いたのではないかと考えられた。

混餌による慢性投与ではビタミン A に対する応答性を観察できなかったため、過剰量のビタミン A を単回経口投与する急性応答での検討に切り替えた。予備実験として、妊娠 ICR マウスにレチノールパルミチン酸エステル 100 mg/kg を経口投与し、経時的に採材を行った。その結果、投与 1 時間後にビタミン A 投与群で胚の *Fgf15* 発現が増加し、4 時間後に卵黄嚢においてビタミン A 輸送関連分子の発現の減少が見られた。この条件で *Fgf15*^{-/-} 胚におけるビタミン A 応答性を検討したが、卵黄嚢におけるビタミン A 代謝関連分子の発現の変化は再現されなかった。マウスの系統によってビタミン A に対する閾値や応答に要する時間が異なる可能性も考えられるが、慢性応答・急性応答のいずれでも胚へのビタミン A 供給が β -Klotho/FGF15 システムの制御下にあることを直接的に示すデータは得られなかった。

次に、脂質代謝について検討したところ、卵黄嚢だけでなく胚でも β -*klotho* 欠損により脂質代謝に関わる遺伝子の発現が変化することが分かった。さらに、Oil Red O 染色において β -*kl*^{-/-} 卵黄嚢では β -*kl*^{+/-} 卵黄嚢よりも広範囲に脂質の蓄積が観察された。これらの結果から、胎生期における β -Klotho/FGF15 システムの制御の対象は脂質代謝である可能性が強く示唆された。

(4) まとめ

成体マウスにおいて、肝臓の β -Klotho と小腸の FGF15 は協調して肝臓での胆汁酸合成を負に制御する。 β -Klotho は卵黄嚢、FGF15 は胚の脳・神経管で高発現を認めるが、胎生期における機能は不明であった。本研究により、卵黄嚢の β -Klotho が胚からの FGF15 シグナルの受容に必要であることが示された。さらに、胎生期において β -Klotho/FGF15 システムが胆汁酸代謝とは独立に脂質代謝制御に関わることを初めて見出した。

< 引用文献 >

1. *Mech Dev.* 2000;98(1-2):115-9., 2. *Nat Med.* 2013;19(9):1147-52. 3. *J Clin Invest.* 2005;115(8):2202-8., 4. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(4):1666-71. 5. *FASEB J.* 2016;30(2):849-62., 6. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(8):593-600., 7. *Brain Res Bull.* 2002;57(3-4):297-9., 8. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14486-94.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。