

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07095

研究課題名(和文) 栄養不足状況からの急激な栄養補給に伴う生理的变化の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of physiological changes associated with rapid nutritional supplementation from undernourished situations

研究代表者

小西 守周 (Konishi, Morichika)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00322165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、マウスにおいて2日程度の絶食後にグルコースを自由摂取させると、再摂食直後の肝臓においてケモカインであるCXCL1の産生が亢進し、その結果好中球の浸潤を伴う一過性の肝傷害が生じることを明らかにした。また、再摂食直後には、内分泌因子FGF21の肝臓からの産生が亢進し、このFGF21が肝細胞からのCXCL1の産生を誘導している可能性が示唆された。一方、この絶食再摂食の栄養変化を繰り返し行っても肝傷害が悪化することはなかったが、未熟なT細胞の増加による胸腺の増大が観察された。すなわち、絶食再摂食という栄養変化が、T細胞を介する個体免疫に大きく影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養不良や、急激な栄養補給は、個体の生理に大きく影響するものと考えられている。人において長期にわたる栄養不良状態から、急激に栄養補給を行うとRefeeding症候群と呼ばれる一連の病態が生じることが知られており、栄養状態の急激な変化の影響を明らかにすることは基礎生理学としても医学薬学としても非常に重要である。本研究では、Refeeding症候群でも一部認められる栄養補給直後の肝傷害について、そのメカニズムを明らかにできた。本研究の知見は、同症候群の予防法の開発につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that ingestion of free glucose following a prolonged fasting period of approximately 2 days in mice resulted in increased production of the chemokine CXCL1 in the liver immediately after refeeding, resulting in transient liver injury with neutrophil infiltration. Immediately after refeeding, hepatic production of FGF21, an endocrine factor, increased, suggesting that FGF21 may induce hepatic CXCL1 production. On the other hand, repeated changes in nutrition following fasting and refeeding did not worsen liver injury. On the other hand, when repeated, an increase in immature T cells caused an increased volume in the thymus. Therefore, it was suggested that nutritional changes such as fasting and refeeding may greatly affect T cell-mediated immunity in individuals.

研究分野：分子生物学

キーワード：絶食 再摂食 糖質 肝細胞傷害 胸腺 FGF21

1. 研究開始当初背景

慢性的な栄養不足の状況から急激に栄養を摂取したとき(以下 Refeeding と呼ぶ)には、単なる栄養状態の回復というだけでなく、個体において特徴的かつ様々な生理的变化が生じることが期待される。実際、臨床では、この生理的变化の中に Refeeding 症候群と呼ばれる、個体の生命維持を脅かす現象、例えば、神経学的には昏睡や麻痺、循環器では心不全、呼吸器では呼吸不全、その他肝炎や溶血などが含まれる。Refeeding 症候群の進行の状況によっては、心停止を含む致死的な合併症による死亡例も報告されていることから、臨床上非常に重大な問題と考えられており、ガイドラインや治療法を含めその対応が検討されていた(中尾ら, 四国医誌; 68 巻, 23-28, 2015)。一方、この Refeeding 症候群の原因としては、急激な血糖増加に伴う高インスリン血症や、細胞内ミネラルの欠乏などが考えられているが、その詳細なメカニズムについては完全には明らかにされていなかった。

一方、2000 年以降、従来は形態形成や癌などにおいて重要な役割を果たすものと考えられてきた線維芽細胞増殖因子(FGF)が、生体の代謝調節においても重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。FGF はマウスやヒトにおいては 22 種類存在することが明らかにされており、そのほとんどは産生細胞から分泌されたのちに、特異的な細胞膜貫通型の FGF 受容体を介して作用する。それぞれの FGF のノックアウトマウスの解析などを通じ、生体では、22 種類が独自の生理的意義を担うことが明らかになりつつある。この 22 種類の FGF の中で、研究代表者が同定した肝臓由来の内分泌因子 FGF21 は、研究代表者を含め世界中で研究が進められ、絶食や肥満症発症時などにおいて代謝改善因子として機能することが明らかにされている。したがって、その生理的意義や薬理作用により、現在、FGF21 はメタボリックシンドロームの成因解明や治療法の開発において非常に注目を集める因子となっている(Itoh N, Ohta H, Konishi M, Front Endocrinol; 6, 154, 2015、小西, 中山, 増田, 生化学; 88 巻, 86-93, 2016)。また、代謝のみならず、研究代表者が独自に作製した FGF21 ノックアウトマウスの解析により神経回路の修復や個体免疫など、さらに幅広い生理現象にも関与することが明らかになりつつあった(Hotta Y et al., Endocrinology; 150, 4625-4633, 2009、Nakayama Y et al., Sci Rep; 7, 330, 2017、Kuroda M et al., J. Clin. Invest; 127, 3496-3509, 2017)。したがって、FGF21 の生理機能を明らかにする試みは、医学薬学的な見地から、非常に重要な取り組みとして認識されていた。

2. 研究の目的

研究代表者は FGF21 の肝臓における発現や血中 FGF21 濃度の上昇が誘導される代謝条件を検討する過程で、マウスにおいて比較的長期にわたる 2 日程度の絶食後にグルコースを自由摂取させると、絶食時や通常食飼育条件下に比較して FGF21 の産生と血中濃度の著しい上昇が起こることを明らかにした。すなわち、Refeeding という状況において FGF21 が何らかの生理的意義を担う可能性が示唆された。また、この絶食後の糖質の再摂取は、Refeeding 症候群の発生状況にも類似していることから、FGF21 の産生誘導が Refeeding 症候群に重要な意義をもつ可能性も期待された。

先に述べたように Refeeding という代謝環境の急激な変化が個体に及ぼす影響は非常に大きいものと予想されたにもかかわらず、Refeeding による生体変化を明らかにし、そのメカニズムを分子レベルで検討するといった試みはほとんどなされていなかった。そこで、本研究は、慢性的な栄養不足の状況から急激にエネルギーを摂取したときに起こる生理的な変化を実験動物レベルで検討すること、さらにそのメカニズムの解明の一環として分泌因子 FGF21 の意義を検討することを大きな目的とした。

具体的には、実験動物としてマウスを用い、糖質の Refeeding により生じる生体変化の中でも、すでに報告がある肝傷害(Oarada M et al., Nutrition; 31, 757-765, 2015)に着目して、Refeeding 時に肝臓において発現上昇する FGF21 との関わりを検討することとした。さらに、絶食再摂食を繰り返すことで肝傷害が悪化する可能性についても検討を試みることにした。

3. 研究の方法

7~11 週齢の C57BL/6 バックグラウンドの Fgf21 ノックアウトマウスおよび C57BL/6 マウス(WT マウス)を、Oarada らの報告(Oarada M et al., Nutrition; 31, 757-765, 2015)に従い、それぞれ通常食(CE-2, CLEA Japan, Inc.)を自由摂食する群、46 時間の絶食負荷ののちにグルコース含有寒天を 8 時間自由摂食させる群、そのまま絶食を 8 時間続ける群の 3 群に分け、Fgf21 などの発現や血中濃度、加えて代謝パラメーターや肝傷害に関わるとされる好中球、マクロファージなどのマーカー遺伝子の発現などについて比較検討を行った。加えて、肝臓の新鮮凍結切片を作成し、好中球マーカーである Ly6g を標的とした免疫染色を行った。さらに、株化ヒト肝実質細胞 HepG2 を 100ng/ml の組換え FGF21 タンパク質で刺激し、ケモカイン CXCL1 の発現の変化を検討した。

加えて、上記の Refeeding の実験方法を発展させ、6 週齢の Balb/c マウス、C57BL/6 マウスに対し、1 週間において 2 日間の絶食ののちに 5 日間通常食を自由摂食させることを、4 週間繰り返すこととした。

返すことも行った。4 週目の通常食自由摂食期間の 2 日後に屠殺し、肝臓を含む臓器を回収し、組織重量や遺伝子発現に関して検討を行った。

4. 研究成果

肝臓、脂肪重量を確認したところ Control に比べ絶食群群で減少し、またグルコース再摂食群で回復が見られた。一方、グルコースの再摂食群において、血清 AST、ALT が著しく上昇することを確認した。一般に肝傷害時にはマクロファージや好中球が浸潤し、細胞に傷害を与えることが報告されている。そこで、マクロファージマーカーとして F4/80、好中球マーカーとして Ly6g をマーカーに、PCR 解析により両細胞の関与を検討した。F4/80 は、グルコース再摂食群で増加することはなかったが、一方で、Ly6g はグルコース再摂食群で著しく増加していた。また、好中球の浸潤は、Ly6g を指標とした免疫染色においても確認された。以上の結果からグルコース再摂食群で、好中球の浸潤が認められ、おそらくその結果肝傷害が誘発されることが期待された。今回の実験結果と同様に、好中球の誘引により炎症が引き起こされるものとして、アルコール性肝障害が上げられる。アルコール性肝障害のメカニズムとして、肝実質細胞から好中球を誘引するケモカイン Cxcl1 が放出される事が報告されている (Roy YS et al., Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol; 309, G30-41, 2015)。そこで、好中球の浸潤に関する Cxcl1 について再摂食時の肝臓における発現を検討した。その結果、好中球が浸潤していたグルコース再摂食群の肝臓において、Cxcl1 の発現の上昇が見られた。

続いて、この肝傷害に対するマウスの再摂食による FGF21 の産生について調べた結果、グルコースの再摂食による肝臓における FGF21 遺伝子発現の増加、血清中の FGF21 濃度の上昇を見出した。この発現、血中濃度変化をもとに、再摂食時の肝機能障害において FGF21 が関与する可能性を、独自に作製した FGF21 ノックアウトマウスを使用して検討した。肝臓重量、精巣上体脂肪とともに、WT と FGF21 ノックアウトマウス群の間に差は見られなかったものの、AST、ALT については、著しく上昇した WT マウスのグルコース再摂食群と比較して、FGF21 ノックアウトマウスのグルコース再摂食群では上昇は少なく、肝傷害が抑制されていることが明らかとなった。前述したように、好中球の肝組織への浸潤が肝傷害の原因と考え、FGF21 ノックアウトマウスについて調べたところ、Cxcl1、Ly6g 共に FGF21 ノックアウトマウスではグルコース再摂食による増加が見られなかった。さらに免疫染色によっても好中球の浸潤が WT にくらべ FGF21 ノックアウトマウスで抑制されていることが確認できた。

以上の結果から、再摂食で誘導された FGF21 が肝細胞に作用し、Cxcl1 の発現を誘導することで肝臓への好中球の浸潤が生じ、それが肝傷害へと寄与する可能性が示唆された。そこで、実際に肝細胞に対する FGF21 の作用を検討した。肝細胞としてはヒト肝ガン由来細胞株である HepG2 を用い、組換え FGF21 タンパク質の処置による CXCL1 の誘導を確認したところ、処置後すぐに CXCL1 の発現が誘導されることを見出した。

前述のように絶食からの再摂食で肝傷害が生じることが明らかとなったので、引き続きこの絶食再摂食のサイクルを繰り返すことで、さらに肝傷害が悪化するかどうかを検討した。Balb/c マウスに対し、2 日の絶食に引き続き 5 日間の自由摂食を 4 度繰り返し、自由摂食を 4 週間行ったものと比較したところ、絶食再摂食の処置により最終の体重は軽微に減少していた。また、白色脂肪組織の重量はやや増加し、一方褐色脂肪組織重量や肝臓重量には影響はなかった。また、前述したように糖質の再摂食では、再摂食直後に好中球の肝臓への浸潤が認められたが、両マウスとも肝臓における Ly6g の産生増加は観察されなかった。さらに血中の AST や ALT 濃度の上昇も認められなかった。C57BL/6 でも同様の実験を行ったところ、Ly6g は有意な上昇はみられなかった。以上の結果から、糖質の再摂食で生じる肝傷害は一過性のものであり、摂食期間が十分与えられれば肝傷害は悪化することはないものと期待された。

一方で、この絶食再摂食を繰り返す検討では、Balb/c マウス、C57BL/6 マウスの両マウスにおいて胸腺が増大することが明らかになった。一方、同じ免疫器官である脾臓は Balb/c マウスで減少し、一方 C57BL/6 マウスでは変化が認められなかった。胸腺は骨髄から流入する前駆 T 細胞が成熟 T 細胞に分化する器官であるが、Balb/c マウスを用いた解析では、胸腺内の未成熟な T 細胞 (CD4⁻ CD8⁻ T 細胞及び CD4⁺ CD8⁺ T 細胞) の数が増加していることが明らかとなった。一方で、成熟した T 細胞 (CD4⁻ CD8⁺ T 細胞もしくは CD4⁺ CD8⁻ T 細胞) には影響は認められなかったことから、絶食再摂食を繰り返すことで、骨髄からの前駆 T 細胞の流入が増加したのではないかと考えている。胸腺は老化やストレスで退縮する器官であり、その退縮が個体免疫の機能低下の一つの原因であると言われている。今回の研究成果は栄養学的なアプローチで T 細胞代謝を制御できる可能性を示したものであり、今後胸腺のストレスによる退縮を抑制する新たな方法の開発につながるものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Aoi, Han Song-iee, Araki Masaya, Nakagawa Yoshimi, Ohno Hiroshi, Mizunoe Yuhei, Kumagai Kae, Murayama Yuki, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100930 ~ 100930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Y, Kumagai K, Han SI, Mizunoe Y, Araki M, Mizuno S, Ohno H, Matsuo K, Yamada Y, Kim JD, Miyamoto T, Sekiya M, Konishi M, Itoh N, Matsuzaka T, Takahashi S, Sone H, Shimano H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Starvation-induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e21663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002784RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱本あかり、吉野美波、岡田瞳美、迎武紘、増田有紀、中山喜明、小西守周
2. 発表標題 Refeeding時の肝臓におけるFgf21の意義
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------