

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22746

研究課題名(和文)強い空腹後の摂食時におけるマウス回腸FGF15の発現低下の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms underlying re-feeding-dependent repression of ileal Fgf15 expression following starvation

研究代表者

片渕 剛 (KATAFUCHI, Takeshi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50300976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では14日間の摂食同調による強い空腹後の摂食によるマウス回腸FGF15の発現低下には転写因子が作用しているのではないかと仮定し、摂食前、摂食3時間後のマウスの回腸のRNAシーケンス法を用いて探索したところ、21個の転写因子が変動していることが分かった。更にFXRのアゴニストであるコール酸食を与えてFGF15の発現量を測定したところ、FGF15の発現は上昇するが摂食による低下比は通常食と変わらなかったため、胆汁に含まれるFXRの天然アンタゴニストであるミュリコール酸の関与の可能性は低くなった。またFGF15の発現低下に必要な摂食同調は1日であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FXRアゴニストは非アルコール性肝炎等の疾患の治療薬としての期待が高まっているが、FGF15/19の発現量は主として核内受容体FXRにより調節されるため、そこにはFGF15/19を介した薬効が含まれていると考えられる。本研究は摂食とFGF15/19の発現の関係が明らかになりつつある。従って本研究は食後どのタイミングにおいて投薬をするのが治療効果を最大にするのか、などのFXRアゴニストの薬剤開発における有用な情報を提供できるため、その成果は社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：In this study I hypothesized that a transcription factor is involved in the postprandial reduction of ileal FGF15 expression level after 14 day food entrainment, and performed RNA sequencing using the mouse ileal RNAs under starvation and 3h-post feeding. I then identified 21 transcription factors changing the expression levels 3h after the feeding. Furthermore, I observed no proportional change in the postprandial reduction of ileal FGF15 expression level even by feeding a meal containing cholic acid, suggesting that the involvement of muricholic acid, a natural FXR antagonist in the bile, in the reduction is unlikely. I also found that 1-day food entrainment is enough to observe the reduction of FGF15 level.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：FGF15 胆汁酸 回腸 farnesoid X receptor RNAシーケンス 摂食 絶食

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast Growth Factor 15 (FGF15)は回腸で産生され、胆汁酸刺激による farnesoid-X-receptor (FXR)と呼ばれる核内受容体の活性化を介して発現が上昇するホルモンである。FGF15は肝臓に作用して胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1の発現を抑制するため、回腸の胆汁酸刺激により胆汁酸合成を抑制するためのフィードバック因子と認識されている。マウスを用いた先行実験で栄養剤の経口投与直後に回腸 *Fgf15* 発現量上昇が観察されているため「FGF15は摂食直後に産生が上昇するホルモン」と考えられてきた。しかし私が20時間絶食したマウスに給餌して回腸 FGF15 発現量を測定したところ、給餌直後からの発現量の著しい低下という先行研究とは正反対の結果が得られた。更に FGF15 の標的遺伝子である肝臓の *Cyp7a1* 発現量は給餌直後から著明に上昇したことから、FGF15は実際に給餌後に血中に分泌されて肝臓に作用していることが示された(図1)。

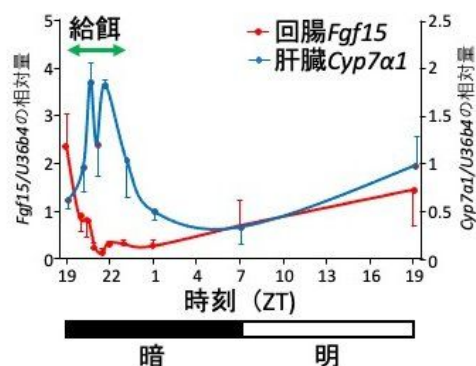


図1：摂食同調後の回腸*Fgf15* (赤)及び肝臓*Cyp7a1* (青)発現量の経時的変化。給餌時間は緑矢線で示す。N=5

2. 研究の目的

FGF15及びヒトのオルソログである FGF19は、食後腸内を通過する胆汁酸による FXR の活性化に伴い上昇し、胆汁酸合成を抑制すると考えられているが、食後より多くの胆汁酸の合成が必要となる時間において合成が低下するのは生理学的に矛盾している。本研究では先行実験のデータを基に「FGF15は摂食直後に産生が上昇するホルモン」という仮説を立て、「胆汁酸により活性化した FXR」とは関係の低い何らかの転写因子が作用が給餌後の摂食により変動し、その転写因子が FGF15 の遺伝子発現調節領域に作用してその発現を低下させているものと推定した。この転写因子を同定するため、給餌前及び給餌3時間後のマウス回腸から回収した RNA を用いて RNA シークエンスを行い、FGF15 の低下に伴って回腸内で変動する転写因子を探索した。また RNA シークエンスから得られたデータを基に FGF15 発現量と摂食の相関関係の解析を行なった。

3. 研究の方法

最初にマウスに飼育室消灯から4時間のみ餌を与える操作を2週間続け、最後の日に餌を与える直前と餌を与えてから3時間後の回腸を回収した。同時に概日リズムによる変動を除外するコントロールとして餌を与える時間に餌を与えずに3時間放置したマウスからも回腸を回収し、そこから抽出した RNA を用いて RNA シークエンスを行った。その後データの分析を行い、FGF15 発現と並行して発現が減少した転写因子を選択し、リアルタイム PCR 法で実際に有意に増加、または減少していることを確認した。また RNA シークエンスの結果とデータベースを活用して FGF15 発現変動と最も関連の深いと考えられる転写因子の抽出を行った。更にこれら転写因子をクローニングして、FGF15 の遺伝子発現調節領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合させたプラスミドを作成し、これらを共発現させることでそれら転写因子の FGF15 の遺伝子発現調節領域への作用を検討した。最後に4時間のみ餌を与える操作が最低何日必要であるかを決定するために、この操作を1日、3日、8日、14日行い、マウス回腸における FGF15 の発現量を測定した。

4. 研究成果

給餌直前、給餌3時間後のマウス回腸から RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った。そのデータを基に GSEA や KEGG のデータベースの解析を行ったが、FGF15 (またはヒトオルソログである FGF19) に注釈された情報がデータベース上に少ないこともあり、発現量の変動と相関のある転写因子に関する有用な情報を得ることは出来なかった。そこで自ら給餌直前と比較して給餌3時間で $p < 0.05$ 且つ2倍以上 (または $1/2$ 以下) の変動を示した転写因子を選択した。その結果、1000 個以上知られている転写因子の中から、FGF15 発現調節との関連が既に示されているものを含め計 21 個が同定できた (図2 赤点)。更に1日の摂食同調で FGF15 発現量が低下することを明らかにした (図3)。

次に FGF15 発現調節の解析を行うため以下の複雑なレポーターベクターを作成した。Fgf15 遺伝子は転写開始点の上流に vitamin D 受容体結合部位、exon 2/exon 3 間の intron に FXR 結合部位が存在するなど重要な転写因子結合部位が分かれて存在するため、転写開始点の約 1 kb 上流を含む FGF15 遺伝子中の exon 1/exon 2 を含む配列を除去し、そこにルシフェラーゼに組み込んだ。そのプラスミドを、上記 21 個の転写因子のうち FGF15 の遺伝子発現調節領域への作用する可能性が高いと考えられた ATF3 及び KLF15 を発現ベクターに組み込んだプラスミドと共に細胞に共発現させてルシフェラーゼ活性を測定したが、共発現によるルシフェラーゼ活性の変動は見られなかった。今後は残り 19 個の転写因子の解析を行っていく予定である。

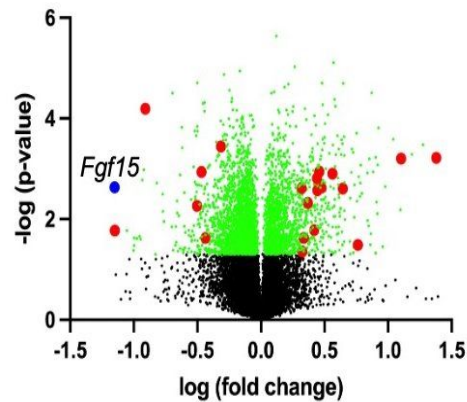


図2: 給餌前と給餌3時間後の回腸遺伝子発現変動の Volcano Plot 緑点が $p < 0.05$ の変動を示した遺伝子、青点が *Fgf15*、赤点が転写因子を示す (絶食継続3時間後に $p < 0.05$ の変動を示した転写因子は概日リズムによるものとして赤点から除外)

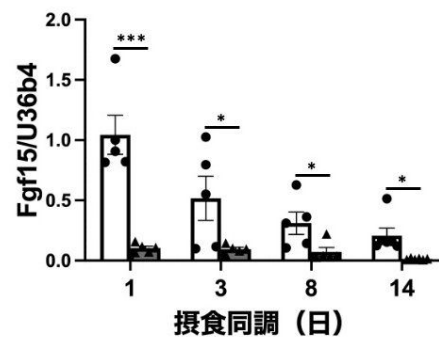


図3: 摂食同調日数の給餌前と給餌3時間後の回腸 *Fgf15* 発現変動に対する影響 白棒が給餌前の回腸 *Fgf15* 発現量、灰棒が給餌3時間後の回腸 *Fgf15* 発現量を示す。(各値は U36b4 発現量により補正) 各点は $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ を表す。N=5~6; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 片淵剛、横島誠	4. 巻 80
2. 論文標題 エクササイズと脂肪酸代謝	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日大医学雑誌	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Takeshi Katafuchi, Joseph Albanesi
2. 発表標題 INHIBITION OF GUANYLYL CYCLASE-B ACTIVITY BY S1P IS MEDIATED THROUGH S1P2/RHO- and S1P3/RHO-DEPENDENT PATHWAYS
3. 学会等名 第95回薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>本大学医学部生体機能医学系生化学分野 https://www.med.nihon-u.ac.jp/~biochem/index.html</p>

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
---------	---------