

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11594

研究課題名（和文）小腸FGF19産生・分泌を基盤とした健康長寿を目指す栄養療法

研究課題名（英文）FGF19

研究代表者

金子 一郎（Kaneko, Ichiro）

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号：40389515

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）：本研究では、小腸での食事誘導FGF19産生を促進することによるサルコペニア予防を目指した。核内受容体結合領域を含むFGF19のプロモーターをレポーターベクターにクローニングし、高感度のスクリーニング法を立ち上げた。まず、核内受容体リガンドでの試験を行ったところFGF19プロモーター活性の増加を示す化合物をいくつか同定した。それらの化合物はヒト腸管培養細胞において、FGF19発現を有意に増加させることを確認した。さらにFGF19誘導化合物を野生型マウスに投与したところ、血漿FGF15濃度の上昇がみられた。Bexaroteneを食事誘導性老化筋萎縮モデルマウスに投与し筋萎縮改善効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う栄養障害、内分泌機能の変化、酸化ストレス、活動量の低下などがサルコペニアの原因となる。加齢によりロイシン感受性の低下が発生し、骨格筋タンパク質同化が十分にできず、サルコペニアを引き起こす要因となるが、栄養とサルコペニアの関係は十分に解明されていない。抗炎症剤や抗酸化天然物が骨格筋作用に有効である可能性も示唆されているが、小腸での吸収率が低いことや、また作用機序には不明な点が多く安全性の問題もある。本研究結果は、新規FGF19誘導因子によりサルコペニアの早期予防を目指し、科学的根拠を示した食事栄養管理に基づいて健康長寿へ大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to prevent sarcopenia by promoting diet-induced FGF19 production and secretion in the small intestine. First, we conducted tests with nuclear receptor ligands and identified several compounds that increased FGF19 promoter activity. These compound significantly increased FGF19 mRNA expression in cultured human intestinal cells, and when FGF19-inducing compounds were administered to wild-type mice, an increase in plasma FGF15 concentration was observed. We administered bexarotene to diet-induced aging muscle atrophy model mice and confirmed its effect on improving muscle atrophy.

研究分野：栄養学

キーワード：FGF19

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う栄養障害、内分泌機能の変化、酸化ストレス、活動量の低下などがサルコペニアの原因となる。加齢によりロイシン感受性の低下が発生し、骨格筋タンパク質同化が十分にできず、サルコペニアを引き起こす要因となるが、栄養とサルコペニアの関係は十分に解明されていない[1]。抗炎症剤や抗酸化天然物が骨格筋作用に有効である可能性も示唆されているが、小腸での吸収率が低いことや、また作用機序には不明な点が多く安全性の問題もある。

小腸は摂食(栄養素)シグナルの刺激を受け、生体内へ情報を伝えるためのハブとなる組織である。事実、小腸 K 細胞から GIP、L 細胞から GLP-1 などの様々な活性ペプチドが分泌されており、血糖値や食欲などの生体機能を調節している[2]。栄養素は小腸を經由して吸収・供給される以外に、手術後等に静脈栄養によって供給される場合とあるが、同じように供給された場合、特に高齢者にとって前者のほうが健康を維持し予後も良く、小腸における栄養素シグナルが全身に与える影響の重要性が鑑みられる。健康であっても加齢とともに骨格筋の萎縮は進行的に起こり、生涯にわたり自立した生活と健康長寿を目指すためには、普段の食事を介した栄養素の供給に意義と価値がある。サルコペニアは、タンパク質合成を刺激する感受性の低下が関与している[3]。筋繊維は主に遅筋(赤筋:ミオシン Type I)と速筋(白筋:ミオシン Type II)に分類され、サルコペニアでは特に速筋繊維の萎縮が認められる。サルコペニア予防のためにタンパク質摂取が推奨されるが、過度なタンパク質の摂取は腎臓での負担が大きいため、慢性腎臓病予防の観点から、持続的な高タンパク質摂取は望ましくない。また高齢者では、咀嚼や嚥下・消化器障害等の事情により、十分なタンパク質摂取が望めない場合が現状である。最近、線維芽細胞増殖因子 FGF19 静脈投与により骨格筋におけるタンパク質合成が刺激されマウスの筋量・筋力が増加すること、また筋萎縮モデルマウスにおいても筋萎縮抑制作用があることが認められた[4]。

2. 研究の目的

サルコペニアとは「老化に伴う筋力低下および骨格筋量の減少」を意味し、加齢だけでなく、癌や消化器疾患、慢性腎臓病などの重症化に伴い発症しやすい。高齢者では、骨格筋代謝機能の低下が転倒や虚弱(フレイル)の密接に関与し、要介護を回避するために早期からの予防が不可欠である。また基礎代謝量が低下することによる生活習慣病への移行も懸念される。サルコペニア予防は、医療費削減、介護予防、労働意欲向上の観点からも極めて重要であり、超高齢化社会に対応できるよう早急に解決すべき喫緊の課題である。本研究では、小腸での食事誘導 FGF19 産生・分泌を促進することによるサルコペニア予防を目指す。小腸での FGF19 産生は摂食時に増加することが知られているが、誘導する特定の栄養素や天然化合物は同定されていない。FGF19 はペプチドであることから、経口刺激により効率的かつ特異的に内因性 FGF19 産生を誘導することがサルコペニア予防および生活習慣病予防に応用できると考えられる。本研究では、天然化合物を中心に FGF19 誘導因子をスクリーニングし、その後、老化筋萎縮モデル動物を用いて生理学的作用を証明する。小腸・骨格筋連関という新たな学術概念を科学的に立証し、健康寿命の延長を目指した食事栄養療法へ発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

実験 FGF19 誘導栄養素のスクリーニング(ヒト FGF19 のマウス相同分子種が FGF15)

FGF19 プロモーター(-2321- +678 bp)を HEK293 細胞由来ゲノム DNA をテンプレートとして PCR でクローニングし、pGL4 に組み込んだレポータープラスミドを作成した。このプロモーター領域には、核内受容体 VDR、FXR、PXR、RXR の結合領域があることをシーケンズ解析により明らかにした。48-well プレートにヒト培養細胞(HEK293)を播種し、上記レポータープラスミドおよび Renilla プラスミド(補正用)を各ウェルにトランスフェクション後、VDR、FXR、PXR、RXR リガンドを添加し、24 時間後に細胞を回収した。細胞抽出物におけるルシフェラーゼ活性を Dual-luciferase system(Promega USA)にて測定し、FGF19 誘導物の評価系を構築した。

実験 FGF19 mRNA 発現に及ぼす影響

ヒト腸管由来細胞(Caco2)を 6-well plate に播種し、最終 100 mM になるように活性型ビタミン D、GW、Bexarotene を添加した。24 時間後に細胞を回収し、ISOGEN II を用いて RNA を精製した。DNAase 処理した RNA から cDNA を合成し、FGF19 特異的なプライマーをオリジナルに作成し、TB Green (TaKaRa Bio. Japan)、StepOnePlus (Applied Biosystems USA) 定量 PCR にて FGF19 mRNA 発現を解析した。

実験 マウスにおける血中 FGF15 への影響

10 週齢の野生型マウス(C57BL 系統)に活性型ビタミン D、GW4064、Bexarotene をゾン

デを用いて経口投与した。ごに採血を行い、ヘパリン（抗凝固剤）を添加後 3000 rpm で 15 分遠心分離を行い、上清を血漿として回収しマイナス 80°C に保存した。血漿中 FGF15 を ELISA（Cloud-Clone Corp. USA）にて評価した。

実験 食事誘導性老化筋萎縮モデルマウスを用いた生理学的検討

FGF19 誘導化合物として Bexarotene を用い、低栄養モデルとして食事誘導性老化筋萎縮モデルマウスへの投与を行った。自発行動解析（活動量の評価）とマイクロ CT を用いた体組成測定（筋肉量及び体脂肪量の評価）、筋力の測定と各骨格筋部位ごとの重量の測定、骨格筋 RNA 精製と cDNA 合成：定量 PCR 法を用いて、筋分解マーカーである MuRF1 および MAFbx mRNA 発現の検討、腓腹筋組織凍結切片ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析を行った。

4. 研究成果

FGF19 誘導化合物のスクリーニングを行った。まず、FGF19 プロモーターを組み込んだ高感度安定レポータープラスミドを作製し、48-well プレートにてヒト培養細胞（HEK293）を使ったルシフェラーゼ活性を Dual-luciferase system にて測定し、FGF19 誘導物の評価系を構築した。

FGF19 遺伝子周辺において広域的な In Silico 解析を行い、いくつかの転写因子結合サイトや誘導候補物質をピックアップした。FGF19 誘導候補物質を上記評価系にて実験した結果、顕著に FGF19 転写活性を誘導することができる核内受容体リガンドをいくつか発見した。また、これら化合物は単独でヒト腸管培養細胞（Caco2）において、FGF19 mRNA 発現を有意に増加させることを確認した。さらに、野生型マウスへ経口投与により生理学的に血漿中 FGF15（ヒト FGF19 のマウス相同分子種が FGF15）が増加することを示した。FGF19 誘導化合物として Bexarotene による食事誘導性老化筋萎縮モデルマウスに投与した結果、筋量の増加が認められた。その際、筋分解マーカー遺伝子 MuRF1 および MAFbx mRNA が抑制されていた。Bexarotene は皮膚浸潤性 T 細胞リンパ腫の治療薬であり、安全性は認められているが、副作用として脂質代謝異常があることが報告されている。現在 Bexarotene 派生物を合成し、より FGF19 誘導活性が高く、副作用の少ない化合物を作成している。ドラッグディポジショニングの観点からも Bexarotene 類似化合物が老化予防に有益である可能性がある。

本研究で確立した FGF19 誘導栄養素のスクリーニング法を用いて、新規骨格筋合成刺激因子や栄養素のスクリーニングを行い、強力に FGF19 を産生誘導する化合物を同定していく予定である。また、筋萎縮モデルとしてよく用いられる挫骨神経切除モデルや不動モデルでは遅筋優位な萎縮が起こることから老化や低栄養による筋萎縮とは異なり、サルコペニアの正確な評価ができないことが問題となっていた。本研究で作成した食事誘導型（低タンパク食飼育）のサルコペニア様筋萎縮モデル（速筋萎縮）を独自に確立したことで、加齢による骨格筋代謝を理解する最適なモデルを開発した。またこのモデルを応用することで様々な老化研究に広い範囲で有益である可能性がある。また、特に消化器がん治療後にはサルコペニア発症が頻発することから、様々な疾患治療や重症化予防のための栄養介入に新たなブレークスルーになると考えられる。

参考文献

- [1] Katsanos et al. Am J Physiol. Endocrinol Metab, 2006
- [2] Gribble et al. Nat Rev Endocrinol, 2019
- [3] Miljkovic et al. Ann Rehabil Med, 2015
- [4] Benoit et al. Nat Med, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1. Sumire Sasaki, Yuji Shiozaki, Ai Hanazaki, Megumi Koike, Kazuya Tanifuji, Minoru Uga, Kota Kawahara, Ichiro Kaneko, Yasuharu Kawamoto, Pattama Wiriyasermkul, Tomoka Hasegawa, Norio Amizuka, Ken-ichi Miyamoto, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, Hiroko Segawa.	4. 巻 12
2. 論文標題 Tmem174, a regulator of phosphate transporter prevents hyperphosphatemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6353-6353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10409-3	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 該当する

1. 著者名 3. Aleksandra Grozic, Keaton Coker, Christopher M Dussik, Marya S Sabir, Zhela Sabir, Arianna Bradley, Lin Zhang, Jin Park, Steven Yale, Ichiro Kaneko, Maryam Hockley, Lucinda A Harris, Tisha N Lunsford, Todd R Sandrin, Peter W Jurutka.	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification of putative transcriptomic biomarkers in irritable bowel syndrome (IBS): Differential gene expression and regulation of TPH1 and SERT by vitamin D.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0275683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0275683	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 該当する

1. 著者名 Yano Y, Maeda C, Kaneko I, Kobayashi Y, Aoi W, Kuwahata M.	4. 巻 69
2. 論文標題 Cystine supplementation sustains plasma mercaptalbumin levels in rats fed low-protein diets more effectively than methionine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 122-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.20-146	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minoru Uga*, Ichiro Kaneko**, Sumire Sasaki, Megumi Koike, Kazuya Tanifuji, Kota Kawahara, Yuji Shiozaki, Peter W. Jurutka, Hiroko Segawa.
2. 発表標題 The role of intestinal Cytochrome P450 in vitamin D metabolism.
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原滉太、小池萌、佐々木すみれ、谷藤和也、塩崎雄治、金子一郎、瀬川博子
2. 発表標題 ライフステージに着目した生体内リン代謝の性差検討
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子一郎、宇賀穂、前川智香、佐々木すみれ、小池萌、谷藤和也、野沢愛、宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 腸管特異的ビタミンD受容体欠損マウスにおける骨格筋萎縮について
3. 学会等名 第73回日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇賀穂、金子一郎、佐々木すみれ、小池萌、谷藤和也、川原滉太、小宮蒼、原田和、浜口ゆき、三浦美月、塩崎雄治、瀬川博子
2. 発表標題 小腸Cytochrome P450 (CYP3A) がビタミンD活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第 54 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	塩崎 雄治 (Shiozaki Yuji) (70908748)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教 (16101)	

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