

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：85502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659064

研究課題名(和文) 受容体応答性の改変による機能選別型変異 FGF19 の糖脂質代謝調節作用の解析

研究課題名(英文) Regulation of glucose and lipid metabolism through specific receptor-responsive FGF19 protein

研究代表者

宮田 昌明 (Miyata, Masaaki)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・教授

研究者番号：90239418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖作用を持たない変異型 FGF19-7 を作製した。FGF19-7 は HepG2 細胞での CYP7A1 mRNA の発現を FGF19 に比べて僅かしか減少させなかった。FGF19-7 はマウスに投与しても FGF19 で観察される肝臓の細胞増殖の亢進を示さなかった。メチオニン・コリン欠乏食を 6 週間マウスに摂取させ脂肪性肝炎を誘発させた。この時 FGF19 あるいは FGF19-7 を 40 nmol/kg で 4 日間投与すると血清中の ALT 活性、肝内のトリグリセリド、遊離脂肪酸が両者で同程度、有意に減少した。この結果より細胞増殖作用を有しない FGF19-7 でも脂肪性肝炎を FGF19 と同程度に予防することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to prepare mutant FGF19 protein (FGF19-7) that lacks the activity of cell proliferation. FGF19-7 treatment slightly decreased CYP7A1 mRNA levels in HepG2 cells. Treatment of mice with FGF19-7 did not stimulate the number of Ki-67 positive cells that is a marker of cell proliferation. Mice were fed a methionin- and choline- deficient (MCD) diet for 6 weeks and co-treated with FGF19 or FGF19-7 (40 nmol/kg) for 4 days. Serum ALT and hepatic triglyceride and free fatty acid levels were markedly increased in mice fed MCD diet. These levels were significantly decreased in the mice co-treated with FGF19 or FGF19-7 to a similar extent. These results suggest that treatment with FGF19-7 lacking the activity of cell proliferation protects against MCD diet-induced steatohepatitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：FGF19 脂肪性肝疾患 脂質代謝 細胞増殖 FGF19受容体

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast growth factor (FGF)19は糖脂質代謝調節を行うエンドクリンホルモンで糖尿病や脂質代謝異常の予防・治療に応用可能だと考えられているが、細胞増殖作用も有し、発がん性が危惧されていた。そこでタンパク質工学を利用して糖脂質代謝調節作用を有し細胞増殖作用を有しない変異型 FGF19 を作製し、上記疾患への応用が出来ないか検討した。

2. 研究の目的

Fibroblast growth factor (FGF)19はペプチドホルモンで肝臓のグリコーゲン、タンパク合成を亢進することで血中グルコースレベルを低下させる事、肝臓の中性脂肪代謝を低下させることより糖尿病や脂質代謝異常症への応用の可能性が考えられている。ところが FGF19 はこれら作用のほかに胆汁酸代謝抑制や細胞増殖作用が認められることが臨床適用を考える上で問題となっている。本研究ではタンパク質工学的手法により FGF19 の受容体応答性を改変して胆汁酸代謝抑制や細胞増殖作用を有しない機能選別型変異 FGF19 を作製して糖脂質代謝改善作用を評価し、糖尿病や脂質代謝異常症の治療薬開発のための基礎的情報を提供する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) mRNA レベルの定量

Real-time PCR は Power SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems) を使用し、ABI PRISM 7000 を用いて行った。反応は、95 で 10 分処理後、変性を 95 で 15 秒間、アニーリングおよび伸長反応を 60 で 1 分間とした。

(2) 動物への処理

7週齢の C57BL/6N 雄性マウスに固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) および水道水を自由に摂取させた。Methionin choline deficient (MCD)(Research Diet) 食のコントロール食 (Research Diet) で 1 週間順化させた後、MCD 食の給餌を 8 週間行った。マウスへの FGF19 の皮下投与は注射器 (テルモシリンジ 1 mL、27 G 注射針) を用いて摂食開始 6 週間後より 1 日 1 回 2 週間にわたって行った。

(3) 血漿中肝障害マーカーの解析

血漿中の alanin aminotransferase (ALT) 活性は、トランスアミナーゼ CII-テストワコーを用いて、alkaline phosphatase (ALP) 活性はアルカリホスファ B-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

(4) 肝内の脂質含量の解析

肝重量の 2 倍量 (v/w) のバッファー (75 mM KPi-KCl (pH 7.4)) で調整したホモジネートに、さらに 3 倍量の抽出バッファー (75 mM KPi-KCl (pH 7.4), 2% Triton X-100) を加えてよく懸濁した後、10 分間静置し、65 で 30 分間加温した。その後、遠心して得られた上清について、トリアシルグリセロール、総コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度は、それぞれトリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコーおよび NEFA C-テストワコー (和光純薬)

を用いて測定した。

(5) 肝臓の病理組織解析

採取した肝臓の一部を 10%ホルマリンに 2-3 日浸漬して組織固定した後、80%エタノールに置換し、さらに 1 日後に 95%エタノールで置換して脱水を行った。組織切片作製、HE 染色および Sirius red 染色は東北大学大学院医学研究科に委託した。得られた組織標本は、LEICA DFC450 C および LEICA DMLB (ナカライマイクロシステムズ) で撮影し、Leica Application Suite v4.2 (ナカライマイクロシステムズ) にて画像処理した。

(6) FGF19 タンパクの調製

FGF19 発現ベクターを含む大腸菌 Origami2(DE3) を IPTG 存在下培養し、集菌後緩衝液中で超音波処理した遠心上清を大腸菌ライセートとした。大腸菌ライセートから組換え FGF19 タンパクを Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を用いて精製した。

4. 研究成果

(1) 変異型 FGF19 タンパクの作製

FGF19 は FGF receptor (FGFR)1c を活性化すると糖脂質代謝調節作用を発揮する一方で FGFR4 を活性化すると細胞増殖作用や胆汁酸合成抑制作用を発揮すると考えられている。これまでの FGF19 の構造と機能の関係の知見から FGF19 の C 末端領域の b-klotho 応答領域を欠失させると FGFR1c, 2,3 の活性化能が消失し、糖脂質代謝調節機能を失うことが知られている。一方 FGF19 の N 末端領域を FGF21 の対応するアミノ酸配列で置換すると FGFR4 の活性化能が消失し、細胞増殖能、胆汁酸合成の抑制機能が消失するとされている。そこで図. 1 に示したような C 末端領域を欠失した FGF19dCTD と N 末端領域を FGF21 と置換した FGF19-7 発現プラスミドを作製し、大腸菌 Origami2(DE3) にトランスフォームして、発現タンパクを Ni-NTA Agarose を用いて精製し、SDS-PAGE により単一なレベルのタンパクを得た。FGF19dCTD は糖脂質代謝調節作用が、FGF19-7 は細胞増殖作用、胆汁酸合成抑制作用が欠損していることが期待された。

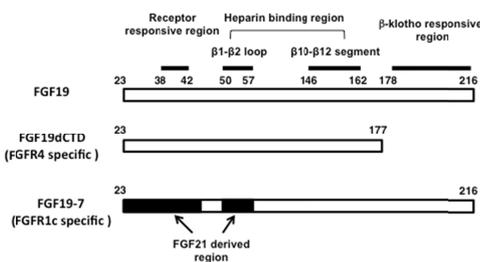


図 1. 野生型と変異型 FGF19 の構造

(2) 変異型 FGF19 の細胞中での機能評価

変異型 FGF19 タンパク質の機能評価のためヒト肝癌由来の HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞に培地中の濃度が 0.1, 0.5, 5 pmol/ml になるように FGF19, FGF19dCTD, FGF19-7 を処理して胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1mRNA

レベルを測定した。FGF19 は FGFR4 を活性化させて CYP7A1 mRNA の発現を抑制するとされている。FGF19 は 0.1 pmol/L の濃度で CYP7A1 mRNA 発現を有意に低下させた(図 2)。一方で FGFR4 のみの活性化機能を有していると考えられる FGF19dCTD では 5 pmol/L で顕著な CYP7A1 の減少が認められた。FGF19-7 でも 5 pmol/L の処理で CYP7A1 mRNA レベルの減少が認められたが減少レベルは低かった。以上の事より FGF19-7 については FGFR4 の活性化機能が減弱していると考えられた。

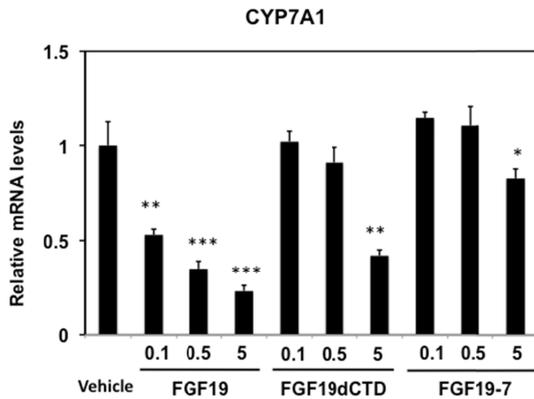


図 2. FGF19、変異型 FGF19 処理した HepG2 細胞中の CYP7A1 mRNA レベル

さらに直接細胞増殖作用を明らかにするためマウスに 3 日間 FGF19 と変異型 FGF19-7 を 40 nmol/kg の用量で皮下投与して、肝臓の細胞増殖を解析した。肝臓組織を細胞増殖マーカーの Ki-67 抗体で免疫染色し、Ki-67 陽性細胞を計測した。野生型 FGF19 投与で Ki-67 陽性細胞の割合は 8 倍以上に有意に増加したが、変異型

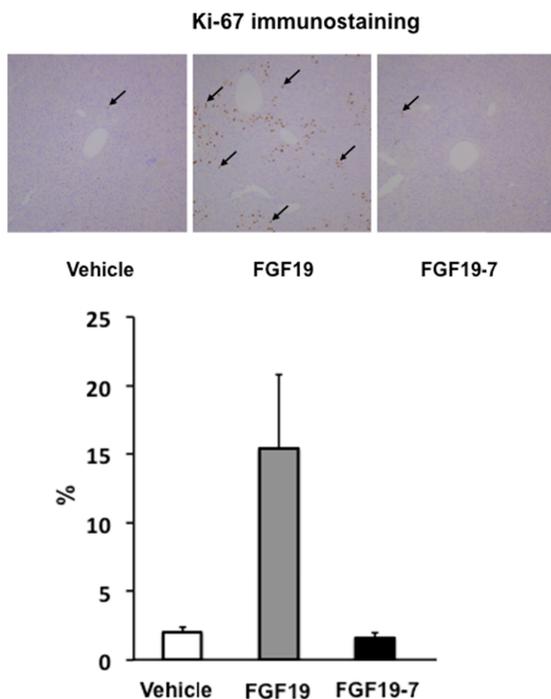


図 3. 肝臓組織の Ki-67 免疫染色とその陽性細胞の割合

FGF19-7 投与の場合では増加は認められなかった。これらの結果より変異型 FGF19-7 は細胞増殖作用を欠失していると考えられた。

(3) 脂肪性肝疾患モデルマウスに対する効果

FGF19 の投与がメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食により誘発された脂肪性肝疾患モデルの肝臓障害マーカーを減弱させる事をすでに明らかにしている。そこで本実験では MCD 食により誘発される脂肪性肝疾患に対する FGF19 と変異型 FGF19-7 投与の影響を比較した。FGF19 の投与は皮下に 40 nmol/kg で 4 日間行った。メチオニン・コリン欠乏食摂取により血清中の ALT 活性は増加したが、FGF19 と変異型 FGF19-7 投与により有意に ALT が減少したが、野生型 FGF19 と変異型 FGF19-7 の間で有意な ALT レベルの差異は認められなかった(図 4)。

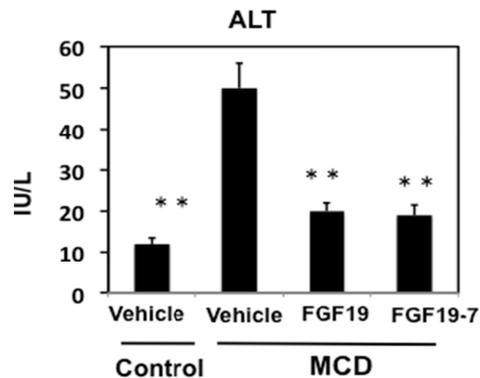


図 4. MCD 食摂取マウスへの FGF19、変異型 FGF19-7 処理による肝障害マーカーの変動

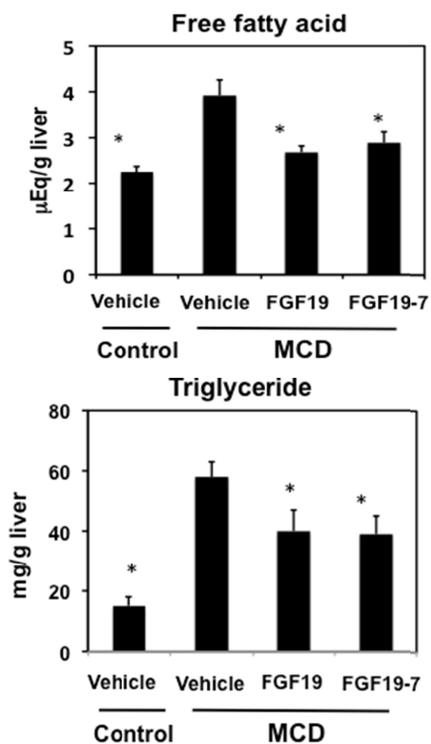


図 5. MCD 食摂取マウスへの FGF19、変異型 FGF19-7 処理による肝脂質レベルの変動

さらに肝臓内の脂質レベルを測定したところ、トリグリセリドと遊離脂肪酸のレベルがMCD食摂取によって有意に増加した。MCD食摂取マウスにFGF19あるいは変異型FGF19-7を投与すると増加したトリグリセリドと遊離脂肪酸レベルの有意な減少が認められたが、FGF19と変異型FGF19-7投与群間において有意な差異は認められなかった。

さらに肝細胞増殖のレベルを解析するため肝臓の組織を細胞増殖マーカーのKi-67抗体で免疫染色し、Ki-67陽性細胞数を計測した。MCD食摂取したマウスではKi-67陽性細胞数が顕著に増加していたが、FGF19と変異型FGF19-7の投与でKi-67陽性細胞の有意な減少が認められたが、FGF19と変異型FGF19-7の間で有意な差異は認められなかった。肝臓の細胞周期関連遺伝子のmRNAレベルを解析したところMCD食摂取で、Foxm1, Nek2, Cdc20のmRNAレベルの有意な増加が認められ、FGF19投与でNek2, Cdc20 mRNAレベルの有意な減少が認められたが、変異型FGF19-7投与では有意な減少は認められなかった。肝臓の繊維化関連の遺伝子の発現を解析したところMCD食を摂取させると測定した全ての遺伝子(Acta2, Tgfb1, Mmp2, Timp1, Vcam1, Col1a1, Col1a2)で有意なmRNAレベルの増加がみとめられ繊維化が進行していることが示唆された(表1)。ところが、FGF19あるいはFGF19-7の追加投与によってはActa2を除いて有意なmRNAレベルの減少は認められなかった。以上のことよりFGF19は脂肪性肝疾患を改善あるいは予防する事が示され、細胞増殖作用を有するFGFR4活性化能を欠いた変異型FGF19-7でも野生型FGF19と同様な脂肪性肝疾患の予防効果を示すことが示唆された。

表1. MCD食摂取マウスへのFGF19、変異型FGF19-7処理による繊維化関連遺伝子の発現変動

Gene	CE-2		MCD	
	Vehicle	Vehicle	FGF19	FGF19-7
Acta2	1.00 ± 0.21 ^{**}	5.38 ± 1.15	2.96 ± 0.43 ^{**}	2.85 ± 1.24 ^{**}
Tgfb1	1.00 ± 0.14 ^{**}	2.95 ± 0.33	2.58 ± 0.29	2.57 ± 0.50
Mmp2	1.00 ± 0.10 [*]	6.61 ± 3.48	8.36 ± 2.95	6.18 ± 3.54
Timp1	1.00 ± 0.07 ^{**}	9.14 ± 2.37	8.43 ± 3.18	7.83 ± 3.74
Vcam1	1.00 ± 0.19 ^{**}	4.66 ± 0.73	3.59 ± 1.32	3.44 ± 0.88
Col1a1	1.00 ± 0.06 ^{**}	11.2 ± 2.0	9.61 ± 2.83	8.55 ± 3.19
Col1a2	1.00 ± 0.15 ^{**}	7.65 ± 2.96	6.29 ± 1.41	6.21 ± 2.56

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 5件)

M. Miyata, T. Hata, Y. Yamazoe and K. Yoshinari SREBP-2 negatively regulates FXR-dependent transcription of FGF19 in human intestinal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 477-482 (2014)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.126.

M. Miyata, H. Yamakawa, K. Hayashi, H. Kuribayashi, Y. Yamazoe and K. Yoshinari

Ileal apical sodium-dependent bile acid transporter protein levels are down-regulated through ubiquitin-dependent protein degradation induced by bile acids *Euro. J. Pharmacol.* 714, 507-514 (2013)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.06.036.

H. Kuribayashi, M. Miyata, H. Yamakawa, K. Yoshinari and Y. Yamazoe Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal FXR signaling *Eur. J. Pharmacol.* 697, 132-138 (2012)
DOI:10.1016/j.ejphar.2012.09.048.

M. Miyata, T. Hata, H. Yamakawa, T. Kagawa, K. Yoshinari and Y. Yamazoe. Involvement of multiple elements in FXR-mediated transcriptional activation of *FGF19* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 41-47 (2012)
DOI:10.1016/j.jsbmb.2012.04.008.

宮田昌明, 山添康 胆汁酸-FGF系による脂質代謝調節への腸管からのシグナル *The Lipid* 23, 266-271 (2012)
http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J07_23_3_46-51.html

[学会発表](計 10件)

宮田昌明, 畑竜也, 山添康, 吉成浩一 SREBP-2はヒト消化管由来細胞でFGF19のFXR依存的な転写を負に調節する 日本農芸化学会 2014年会 2014.3.28 東京

宮田昌明, 松澤 瞳, 境田 裕美, 山添康, 吉成 浩一 FGF19は非アルコール性脂肪性肝疾患モデル *Fxr* 欠損マウスの病態を改善する 2013 環境トキシコロジーフォーラム 2013.9.14 福岡

宮田昌明, 山川泰輝, 林 謙次郎, 吉成浩一, 山添 康 腸内細菌による胆汁酸代謝変換は回腸の胆汁酸吸収輸送担体の発現を制御する 2013年度 日本農芸化学会合同広島大会 2013.9.6 広島

宮田昌明, 畑 竜也, 山添 康, 吉成浩一 LS174T細胞のFXRシグナルは活性型SREBP2により抑制的に調節される 日本薬学会第133回年会 2013.3.28

宮田昌明, 消化管 FGF15/19シグナルによる肝機能の調節 薬物代謝・分子毒性学仙台セミナー-基礎研究から創薬・臨床へ- 2013.2.16 仙台

宮田昌明, 山川泰輝, 林 謙次郎, 山添康 回腸胆汁酸トランスポーターASBTの発現は腸内細菌代謝型胆汁酸シグナルに依存したコピキチン/タンパク質分解系で負に調節される 第34回胆汁酸研究会 2012.12.1 名古屋

宮田昌明, 山川泰輝, 林 謙次郎, 吉成浩一, 山添 康 腸内細菌による胆汁酸の

代謝変換がユビキチン/ライソゾーム分解系を介する回腸 Asbt の抑制的な発現調節に関する 第 27 回日本薬物動態学会 2012.11.22 東京

M. Miyata, H. Yamakawa, Y. Yamazoe
Antibacterial drug treatment causes enhanced levels of hepatic bile acid through alteration of ileal bile acid transporter expression The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology 2012.7.20 Sendai, Japan.

宮田昌明、山川泰輝、山添 康 抗菌薬投与による肝内胆汁酸レベルの上昇の機序—回腸胆汁酸吸収トランスポーター発現の解析 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012.7.17 仙台

栗林 秀明、宮田昌明、山川泰輝、吉成浩一、山添 康 肝胆汁酸合成の抑制に関するマウス回腸 FGF15 発現の新規調節機序 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012.7.17 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 昌明 (MIYATA MASAOKI)

水産大学校 食品科学科 教授

研究者番号：90239418