

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460084

研究課題名(和文) 栄養素の消化管吸収における細胞外シグナル因子FGF21の役割の解明

研究課題名(英文) The roles of the endocrine factor, Fgf21, in gastrointestinal absorption of nutrients

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外分泌因子FGF21は糖脂質代謝を調節する因子であり、その薬理作用から医療への応用が期待されている。本研究では、アマニ油の経口投与により、血中のFGF21濃度が上昇することを明らかにした。この濃度上昇はアマニ油に含まれる、リノレン酸によるものと考えられた。また、アマニ油の長期投与では、おそらくFGF21の産生を介して脂肪肝が発症することを見出した。おそらく、FGF21による脂肪分解により産生した遊離脂肪酸が肝臓に大量に流入することが脂肪肝の原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：FGF21, one of FGFs, markedly improves carbohydrate and lipid metabolism and is expected to be a new drug for metabolic diseases from its pharmacological action. In this study, we have shown that oral administration of linseed oil, one of the dietary oils, increased the level of serum FGF21 in mice. Treatment with a variety of non-esterified fatty acids of mice orally and of primary-cultured hepatocytes suggested that alpha-linolenic acid contained in the linseed oil could increase serum FGF21 levels. We also found that severe hepatic steatosis developed in mice fed linseed oil for 16 weeks compared with in those fed lard, maybe through the induction of FGF21. It is suggested that non-esterified fatty acids from adipocyte lipolysis induced by FGF21 may be the cause of hepatic steatosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外分泌因子 FGF 肝臓

### 1. 研究開始当初の背景

生体において糖・脂質代謝は厳密に制御されており、これらの制御メカニズムの破綻は、糖尿病や脂質異常症を引き起こす。すなわち、生体における糖・脂質代謝調節の分子メカニズムの解明は、生物学的にも医学的にも重要な研究課題である。

この生体の糖・脂質代謝調節作用を有する分泌因子として、線維芽細胞増殖因子(FGF) 21 が注目されている。FGF21 は筆者が単離した細胞間シグナル因子の一つであり、主に肝臓において産生される (Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N, *Biochim. Biophys. Acta.* 1492, 203-206, 2000)。この FGF21 について、高脂肪食による体重増加 (食餌性肥満) を抑制する作用や、食餌性肥満により惹起される高血糖及び脂質代謝異常症を改善する薬理作用が報告された (Murata Y, Konishi M, Itoh N, *J Nutr Metab.* 2011)。したがって、FGF21 は肥満症、糖尿病や脂質異常症に対する治療薬の候補として医療応用に向けた研究が進められている。一方、この薬理作用から、FGF21 は、生理的にも糖、脂質代謝に重要な役割を持つことが期待された。そこで、我々は独自に作成した FGF21 ノックアウトマウスを利用し、その生理的意義を明らかにする研究を進めてきた。

### 2. 研究の目的

我々は、エネルギー代謝調節における FGF21 の役割を明らかにする過程において、FGF21 ノックアウトマウスに対し、経口脂肪負荷試験を行った。その結果、予備的にはあるが FGF21 ノックアウトマウスでは、トリグリセリド負荷前の血中中性脂肪濃度は差がなかったものの、負荷後の血中中性脂肪濃度は野生型マウスに比較して著しく高値を示すことを明らかにした。本研究では、この知見に着目し、脂質の経口投与による FGF21 の産生と、その意義について、特に消化管吸収に対する意義を検討することを目的に検討を試みた。

さらに、その研究から派生して、医薬品へと応用が期待される FGF21 について、その産生を促す脂質成分の同定と、その長期投与により生体への影響、さらには FGF21 の意義についても検討を試みた。

### 3. 研究の方法

脂質の経口投与実験では、2 ヶ月齢以上の C57BL/6 マウス、もしくは FGF21KO マウスを 3 時間絶食し、その後食用油 100  $\mu$ l もしくは DMSO に溶解した脂肪酸 (0.07mg/kg) を、ゾンデを用いて経口投与した。食用油は投与 4 時間後、脂肪酸は 2 時間後に採血し、市販の ELISA キットを用いて血清 FGF21 濃度を測定した。また、アマニ油投与群に関しては、脂肪組織、肝臓などの臓器から total RNA を抽出、定量的

RT-PCR 法により FGF21 の発現を検討した。

初代培養肝細胞は、定法に従い C57BL/6 マウス肝臓をコラゲナーゼ処理することにより採取した。コラーゲンコートしたプレートに播種し、100  $\mu$ M の各種脂肪酸を添加して 2 時間後、細胞から total RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法により FGF21 の発現量を検討した。

アマニ油の長期投与では、オリエンタル酵母製 CRF-1 をベースにアマニ油を 15%、もしくはラードを 15% 含有する飼料を独自に作製し、4 週齢の野生型マウスと FGF21KO マウスに自由摂食させた。摂取から 16 週間にわたり体重変化を計測した後、屠殺し各種組織を摘出して重量を測定した後に切片化し、ヘマトキシリンエオジン染色して組織形態を観察した。

### 4. 研究成果

当初は、脂質を経口投与した後に起こる脂質の吸収に、FGF21 が関わる可能性を期待し、本実験を企画した。本実験を始める前の予備的な検討では FGF21KO マウスと野生型マウスにおいて脂質の吸収能に差が認められたものの、残念ながら再現性が得られなかった。腸管を介した栄養素の吸収には、腸内細菌叢が強く影響することが知られている。また、腸内細菌叢にはマウスの飼育されている環境が大きく影響することも知られている。本研究では、予備実験を行った動物実験施設と、科学研究費により検討を行った際の動物実験施設が異なっていた。再現性が得られなかったのは、飼育環境により生じる腸内細菌叢の差が実験結果に影響を及ぼしたものと考えている。

一方で、脂質吸収に関する研究を進める過程において、新たに食用油の種類による FGF21 産生能の差を発見し、さらに食用油に含まれる脂肪酸の種類が FGF21 の誘導に及ぼす影響を明らかにした。FGF21 は生理的な役割とともに、薬理的な意義が非常に注目を集めている。実際に FGF21 の改変体については、代謝疾患への臨床試験が複数開始されており、ヒトを対象とする際の薬理的知見が集まりつつある。このように FGF21、もしくは FGF21 の改変体を直接投与することも医療として重要な試みであると思われるが、一方で内因性の FGF21 の産生量を増加させる試みも、医学薬学的に重要な試みになると思われる。したがって、当初の目的とはやや異なるものの、FGF21 の産生を誘導する脂質について、さらにその代謝調節における意義について検討を試みた。

まず、投与される脂質の種類による FGF21 産生能の差を検討した。その結果、オリーブオイルなどに比較して、アマニ油や魚油の経口投与において FGF21 の血中濃度が一過性に著しく上昇することが明らかとなった。

食用油は、それぞれ含有する脂肪酸が異なることが知られている。そこで、食用油ごと

に FGF21 の産生能が異なる理由として脂肪酸の種類に着目した。マウスに対し、代表的な脂肪酸としてミリスチン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノレン酸、リノール酸の 7 種を経口投与した結果、ラウリン酸、リノール酸、オレイン酸、リノレン酸で有意に Fgf21 の血中濃度が上昇した。その中でもアマニ油に含まれるリノレン酸により最も血中濃度が上昇することが明らかとなった。続いて、FGF21 の主要な産生細胞である肝細胞に着目し、初代培養肝細胞に対し、リノレン酸を添加したところ、FGF21 の発現が有意に増加した。一方、リノレン酸と同じく 3 脂肪酸で魚油に含まれる DHA、EPA では FGF21 の誘導は起こらなかった。

アマニ油の経口投与において FGF21 の肝臓における発現や血中濃度が一過性に著しく上昇することが明らかとなったが、アマニ油については、長期に摂取することで肥満症における糖代謝異常に対し改善作用を発揮することが報告されている (Nutr. Res. 2013)。FGF21 は薬理作用として抗肥満症、糖代謝改善作用、脂質代謝改善作用を有することを考慮すると、アマニ油の持つ有用な薬理作用の一部、もしくは全てが FGF21 の誘導を介している可能性が期待された。そこで、FGF21KO マウスと野生型マウスに、アマニ油あるいはコントロールとして用いるラードを含む飼料で長期間飼育し、代謝に対する食用油の作用を確認しつつ、その作用における FGF21 の意義について検討した。アマニ油含有脂肪食で飼育した野生型マウスではラード食で長期飼育したさいには認められなかった脂肪肝が発症した。一方、FGF21KO マウスでは、アマニ油による脂肪肝は発症しなかった。また精巢上体脂肪重量はアマニ油の長期摂取群でラード含有食と比較して有意に減少していた。この精巢上体脂肪の重量差も FGF21KO マウスでは生じなかった。以上の結果に加え、FGF21 が脂肪分解を誘導することを考慮すると、アマニ油食負荷下では、誘導された FGF21 により脂肪組織の脂肪分解が亢進し、産生された脂肪酸が血流を介して肝臓に流入することにより脂肪肝が発症したのではないかと考えている。以上、本研究では当初の目的を達成することはできなかったが、一方で FGF21 の産生を誘導する脂肪酸の同定と、その代謝における意義の一端を明らかにすることができた。これまで FGF21 の血中濃度を上昇させることで、肥満症や代謝異常の治療に繋がることが期待されてきたが、副作用として脂肪肝の発症に繋がる可能性もあることが明らかとなった。

#### 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)

Kim SH, Kim KH, Kim HK, Kim MJ, Back SH, Konishi M, Itoh N, Lee MS. Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. *Diabetologia* 58 (4) 809-818 (2015) doi: 10.1007/s00125-014-3475-6. 査読有

Itoh N, Ohta H, Konishi M. Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 29 (6) 154. (2015) doi: 10.3389/fendo.2015.00154. 査読有

Ozaki Y, Saito K, Nakazawa K, Konishi M, Itoh N, Hakuno F, Takahashi S, Kato H, Takenaka A. Rapid increase in fibroblast growth factor 21 in protein malnutrition and its impact on growth and lipid metabolism. *Br. J. Nutr.* 114 (9) 1410-8. (2015) doi: 10.1017/S0007114515002846. 査読有

Konishi M, Nakayama Y, Masuda Y. Secreted factor, FGF21, regulates diverse biological processes. *Seikagaku*. 88(1) 86-93. (2016) DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880086. 査読有

Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima YI, Miyake A, Itoh N, Konishi M. Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. *Sci. Rep.* 7, 330. (2017) DOI: 10.1038/s41598-017-00349-8. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

藤岡 広大、松家 京介、伊藤 信行、中山 喜明、小西 守周  
不飽和脂肪酸負荷より誘導される Fgf21 の脂質代謝調節機構の解析  
第 63 回日本生化学会近畿支部例会 (2016 年 5 月 21 日、神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/micro-s/index.html>

6．研究組織

(1)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

(2)連携研究者

増田 有紀 (MASUDA YUKI)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40421284