

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591566

研究課題名(和文) 肝臓における周産期の糖・脂質代謝ダイナミズムの検討

研究課題名(英文) Molecular dynamics of metabolism during perinatal liver development

研究代表者

近藤 宏樹 (Kondou, Hiroki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10373515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：当院倫理委員会で承認され、同意を得られた慢性胆汁うっ滞患者9名、対照患者4名の血清および肝組織を用いてFGF19シグナル経路の解析を行った。その結果、慢性胆汁うっ滞患児の血清FGF21、FGF19濃度は増加していた。またFGF19の肝細胞での異常産生を明らかにした。高胆汁酸血症においてもCYP7A1の合成は抑制されおらず、SHPも有意に高かった。FGF19受容体であるFGFR4とKLBは発現が増加し、FGFR4のリン酸化も亢進していたが、ERKのリン酸化は抑制されていなかった。以上より、慢性胆汁うっ滞下では、高FGF19血症となるが、CYP7A1発現を抑制できていないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied FGF19 signaling pathway in chronic cholestasis using blood sample and liver tissue from Biliary atresia (BA) patients. Serum concentration of bile acid was significantly higher in BA patients, and their serum and tissue concentrations of FGF19 were significantly higher in BA patients. IHC and ISH revealed that FGF19 were aberrantly synthesized in hepatocytes in BA liver. While, those target gene, CYP7A1 mRNA was not suppressed in BA patients despite of high concentration of bile acid and FGF19. Next, FXR mRNA was significantly up-regulated in hepatocytes in BA patients, and FGFR4 and KLB mRNA were also up-regulated. Further, phosphorylation of FGFR4 in BA patients was increased, then phosphorylation of ERK was decreased. Whereas, SHP mRNA, which suppress CYP7A1 was up-regulated in BA patients. These results suggest that FGF19 was aberrantly expressed in chronic cholestatic hepatocytes. however, this signal was not able to suppress CYP7A1 via ERK pathway.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児消化器病学

キーワード：FGF19

1. 研究開始当初の背景

申請者は、肝細胞機能に必須である転写因子 Hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 を中心に胎生後期の肝臓に着目して研究を行ってきた(近藤ら *Hepatology Research* 2013)。さらに申請者は、FGF23 は骨組織で産生され、リン酸やビタミンD、カルシウム代謝の制御因子であることが報告されている。申請者らも FGF23 が Na<sup>+</sup>/Pi 共輸送担体と協調して細胞内の Raf/MEK/ERK 経路を活性化することを示した(山崎, 近藤ら *J Cell Biochem* 2010)。そこで申請者は、乳児期より体重増加不良、成長障害、脂溶性ビタミン吸収障害をしばしば来す、胆汁うっ滞性肝障害罹患児における糖・脂質代謝のダイナミズムに着目し、FGF23 と同様に、肝臓で発現しホルモン様作用をもつ FGF21 と小腸で発現し肝臓に作用を及ぼす FGF19 を中心に解析を行った。研究計画は当施設倫理委員会に臨床研究計画書を提出し承認を得た。対象は、当院にて胆汁うっ滞性肝障害のため肝移植を実施した胆道閉鎖症の患児とし、肝芽腫やオルニチントランスカルバニラーゼ欠損症、肝血管腫にて肝移植を行った児を対象とした。同意を得て得られた血清と肝移植時の摘出肝を用い、各分子について mRNA レベルおよびタンパクレベルにて解析を行った。

2. 研究の目的

胆汁うっ滞性肝障害罹患児において FGF21、FGF19 の役割を検討する。

3. 研究の方法

本研究は当院倫理委員会で承認され、以下の患者に対し研究内容を説明し同意を得た。胆汁うっ滞患者として胆道閉鎖症 9 名、対照として非胆汁うっ滞患者 4 名(肝芽腫 2 名、肝血管腫 1 名、OTC 欠損症 1 名)の正常部位を使用した。血清、肝組織中の FGF21, 19 蛋白濃度を ELISA 法にて測定。レーザーマイクロダイセクション法を用いて肝小葉を切り出し抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、定量 PCR を行った。

また、FGF19 の肝組織における発現を証明するため *in situ* Hybridization および免疫染色を行った。FGF シグナル伝達分子のリン酸化に関しては、免疫沈降ウエスタンブロット法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) まず、肝移植時における慢性胆汁うっ滞患児の血清 FGF21 および FGF19 濃度の測定を行った。その結果、胆道閉鎖症群において FGF21 が対照と比較して高値を示した(図 1)。同様に、FGF19 を測定すると胆汁うっ滞の病態下で血中の胆汁酸濃度は高いにも関わらず FGF19 は高値を示し、同様に肝組織中の FGF19 濃度も高値を示した。小腸内はむしろ胆汁酸濃度は低いことが予想され、また、生理的には FGF19 の産生は肝細胞では認めない

事から、実際に FGF19 の産生細胞が肝細胞かどうか確認するために *in situ* Hybridization および免疫染色を行った。すると従来の報告にはなく、FGF19 の少なくとも一部は胆汁うっ滞肝における肝細胞が産生していることが初めて明らかとなった(図 1)。

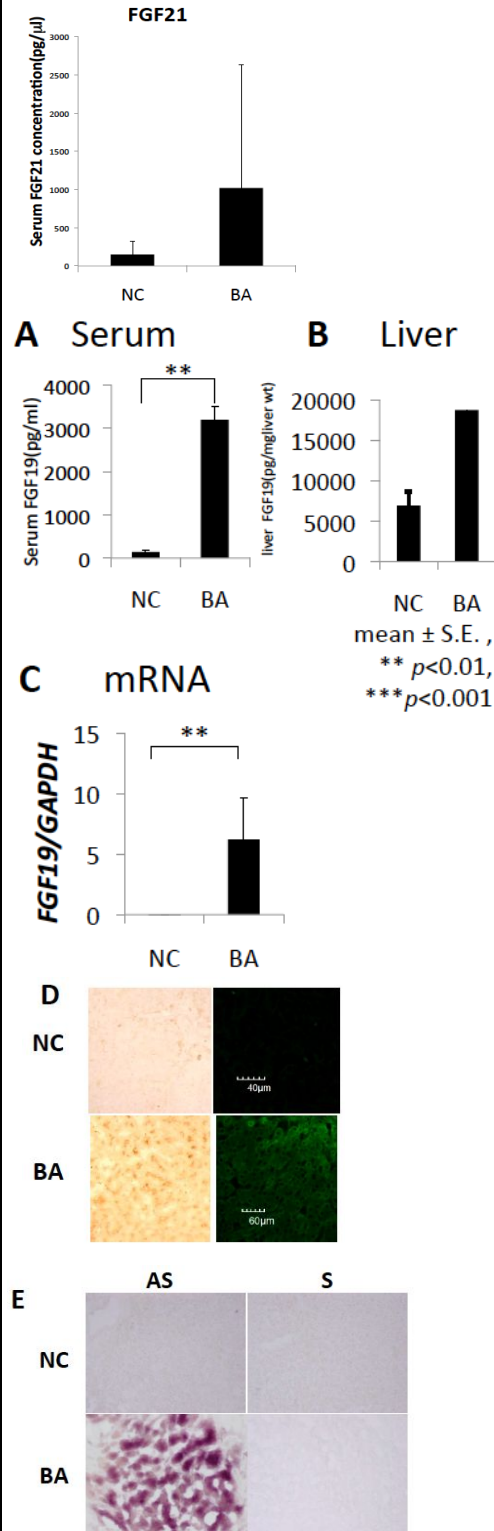


図 1 : 血清および肝臓における FGF21, FGF19 の発現

(2) 移植前の胆道閉鎖症の患者は、黄疸を伴っており、コントロールの患者と比べて、血清中の胆汁酸濃度が高かった (data not shown)。そこで、胆汁酸の律速酵素をエンコードする *CYP7A1* mRNA を測定した。胆道閉鎖症の肝細胞では胆汁うっ滞の無い児に比べて高い傾向となった。さらに、その下流に位置する *CYP8B1* mRNA は有意に高値となり、alternative pathway の *CYP27A1* mRNA も同様に高い傾向となった (図2)。

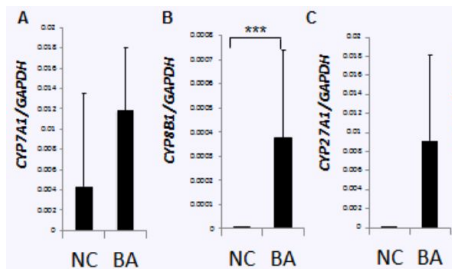


図2：肝細胞における胆汁酸合成酵素の発現

(3) 胆道閉鎖症の児における胆汁酸合成が抑制されないメカニズムを調べるために、まずは古典経路である核内転写因子 FXR/SHP について検討した。肝臓内の *FXR* mRNA は有意に高く発現し、その下流にある *SHP* mRNA も有意に高くなった。同様に *CYP7A1* の上流転写因子である *LRH-1*、*HNF4* も同様に発現増加を認めた (図3)。

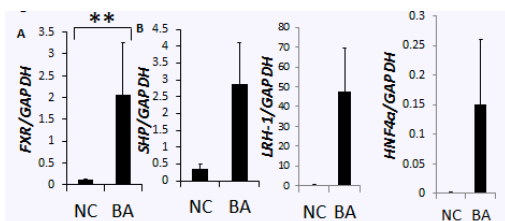


図3：胆汁酸合成酵素発現制御分子の発現

(4) 次に FGF19 を介する経路について解析した。FGF19 の下流のメカニズムを検討するために、FGF19 の受容体である *FGFR4* と *KLB* mRNA の発現量を検討した。*FGFR4* mRNA は有意に高く、*KLB* mRNA も増加していた。さらに IP-Western blotting にて *FGFR4* 受容体のリン酸化についても検討を行った。*FGFR4* は発現が増加していたが、さらにリン酸化による活性化も受けていた。

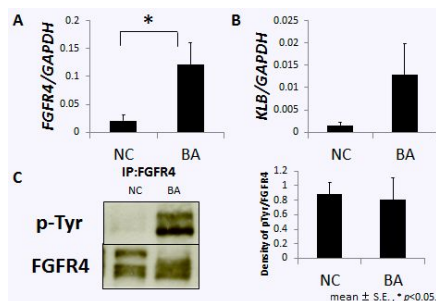


図4：肝細胞における FGFR4, KLB の解析

(5) さらにその下流にある ERK 経路を解析すると *FGFR4*/*KLB* が増加していたにも関わらず ERK のリン酸化は免疫沈降ウエスタンブロットにて免疫染色にても抑制されていた (図5)。以上より、慢性胆汁うっ滞の状況では、高 FGF19 となり肝細胞表面において FGF19 の受容体である *FGFR4* および *KLB* は発現が増加し、*FGFR4* のリン酸化も亢進するが、その下流の ERK のリン酸化は抑制されておりこのことから、ERK 経路より下流に位置する *SHP* が *CYP7A1* 発現を抑制できていないことが示唆された。

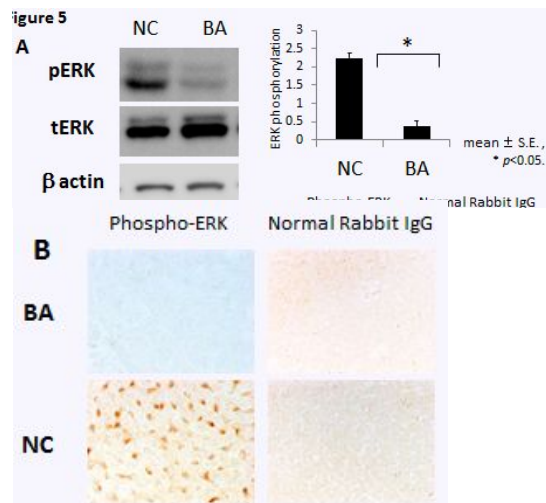


図5：胆汁うっ滞肝における ERK リン酸化

#### まとめ

肝移植時における慢性胆汁うっ滞患児の血清 FGF21 および FGF19 濃度はともに増加していた。

慢性胆汁うっ滞肝において FGF19 の少なくとも一部は肝細胞が異常に産生していることを初めて明らかにした。

高胆汁酸血症においても肝臓では胆汁酸合成律速酵素 *CYP7A1* の合成は抑制されていなかった。

核内転写因子 FXR/SHP は有意に増加し、その下流にある *SHP* も有意に高かった。同様に *CYP7A1* の上流転写因子である *LRH-1*、*HNF4* も同様に発現増加を認めた。

高 FGF19 血症の状況下において FGF19 の受容体である *FGFR4* および *KLB* は発現が増加し、*FGFR4* のリン酸化も亢進していた。

その下流の ERK のリン酸化は抑制されていなかった。

#### 結語

慢性胆汁うっ滞の状況では、高 FGF19 血症となり肝細胞表面において FGF19 の受容体である *FGFR4* および *KLB* は発現が増加し、*FGFR4* のリン酸化も亢進するが、その下流の ERK のリン酸化は抑制されておりこのことから、ERK 経路より下流に位置する *SHP* が *CYP7A1* 発現を抑制できていないことが示唆された。

この事は、慢性胆汁うっ滞における胆道閉鎖症患児の胆汁酸合成に関する病態の一つを説明している可能性がある。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/~ped/www/welcome-jp.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

近藤 宏樹(KONDOU HIROKI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号:10373515

##### (2)研究分担者

和田 和子(WADA KAZUKO)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号:30294094

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: