

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：34512  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790111  
 研究課題名（和文） 代謝調節因子 Fgf21 の脂肪組織における役割とそのメカニズムの解明  
 研究課題名（英文） The role and mechanisms of Fgf21 as the metabolic regulator in white adipose tissue  
 研究代表者  
 小西 守周 (KONISHI MORICHIKA)  
 神戸薬科大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：00322165

## 研究成果の概要（和文）：

高脂肪低炭水化物食（ケトン食）により、肝臓でのケトン体産生が誘導され、前進に置くエネルギー代謝が影響を受けることが知られている。このケトン食飼育時の肝臓において Fgf21 の発現が誘導されることから、ケトン食飼育時に置く Fgf21 の役割についてノックアウトマウスを用いて検討した。今回の結果より、ケトン食は白色脂肪組織を通じて全身のインスリン抵抗性を惹起することが明らかとなった。さらに、Fgf21 がこの白色脂肪組織におけるインスリン感受性の減弱を誘導することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

A low-carbohydrate, high-fat ketogenic diet (KD) induces hepatic ketogenesis and is believed to affect energy metabolism in mice. As hepatic *Fgf21* expression was markedly induced in mice fed KD, we examined the effects of KD feeding on metabolism and the roles of Fgf21 in metabolism in mice fed KD using *Fgf21* knockout mice. The present findings indicate that KD feeding impairs insulin sensitivity in mice due to insulin resistance in white adipose tissue. In addition, our findings indicate that Fgf21 induced to express by KD is a negative regulator of adipocyte insulin sensitivity in adaptation to a low-carbohydrate malnutritional state.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Fgf、白色脂肪組織、ケトン食、糖代謝、インスリン抵抗性、Fgf21

## 1. 研究開始当初の背景

全身に存在する白色脂肪組織は、生体の余剰なエネルギーをトリグリセリドとして蓄積する組織である。加えて、白色脂肪組織の主要な構成細胞である白色脂肪細胞は様々なアディポサイトカインと言われる分泌因子を分泌し、様々な臓器に働きかけ、全身のエネルギー代謝を積極的に調節している。また、白色脂肪細胞においてトリグリセリドが過剰に蓄積した状況が肥満症である。過剰にト

リグリセリドを蓄積し肥大化した白色脂肪細胞では、アディポサイトカインの産生、分泌異常が起こり、全身の糖代謝、脂質代謝に異常が起こることが明らかにされつつある。従って、白色脂肪組織機能を調節するメカニズムの解明は基礎生物学としても、また肥満症や肥満症に起因する様々な病態の発症メカニズムの理解や治療法の開発においても重要である。

Fgf (fibroblast growth factor) は様々な臓

器、器官の形成に重要な役割を果たす細胞間シグナル因子であり、現在 22 種類の Fgf と 7 種類の Fgf 受容体が同定されている 22 種類の Fgf は、それぞれ独自の発現様式と受容体親和性を示す。これまで申請者は白色脂肪組織の形成や機能における Fgf シグナリングの役割の解明を試みてきた。その結果、Fgf10 や Fgf 受容体 2 が、脂肪細胞分化や脂肪細胞の肥大化に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。さらに、申請者らが単離した Fgf21 について、国外の研究グループにより、肝臓由来の内分泌因子として白色脂肪細胞に作用しトリグリセリドの蓄積を抑制する薬理作用を有する可能性が示唆されたことから、申請者は、Fgf21 の脂肪組織における生理的役割を明らかにするため、ノックアウトマウスの作成を行った。このノックアウトマウスに関して、脂肪組織や代謝関連組織に焦点を絞り解析を行い、Fgf21 が、通常食下では脂肪細胞におけるトリグリセリドの分解を促進すること、一方、トリグリセリドの分解が進む絶食下では、分解を抑制することを見いだした。

## 2. 研究の目的

高脂肪低炭水化物食（ケトン食）飼育においても Fgf21 の肝臓における発現が亢進することが報告されており、また申請者自身もこの結果を確認している。個体のエネルギー代謝は、通常時は糖質中心で行われているのに対し、ケトン食飼育下では脂質中心の代謝へと移行することが知られている。従って、Fgf21 は糖質主体の代謝経路から脂質中心の代謝経路への移行において、重要な役割を果たす可能性が示唆された。そこで、本研究では、既に作成済みの Fgf21 ノックアウトマウスをケトン食で飼育することにより、糖脂質代謝の切り替えにおける Fgf21 の役割について明らかにする。

## 3. 研究の方法

8 週齢の野生型マウス及び Fgf21 ノックアウトマウスについて、高脂肪低炭水化物食（ケトン食）により 6 日間、あるいは 2 週間飼育した。処置中、食餌量、体重、血糖値の変化を計測した。さらに、処置終了後にと殺し、肝臓や脂肪組織を中心とした代謝関連組織の重量、血中代謝産物濃度の計測を行った。また、代謝関連組織の切片を作成し、形態を野生型のものと比較した。以上の解析により、ケトン食により、糖質中心から脂質中心への代謝変化における Fgf21 の役割について検討を行った。

さらに、ケトン食飼育後の糖代謝について、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を行

い、グルコース耐性とインスリン感受性を検討した。さらに白色脂肪組織や肝臓、骨格筋における Akt のリン酸化も検討した。また、糖代謝、脂質代謝を調節しているホルモン群の血中濃度の変化を ELISA 法により比較検討した。さらに変化の見られた活性について、そのメカニズムを明らかにするために、関連する酵素群やその発現に関わる転写因子群の発現を定量的 RT-PCR 法やウェスタンブロット法により検討した。

## 4. 研究成果

### ケトン食負荷時の代謝変化について

まず、C57BL/6 野生型マウスをケトン食により 6 日間、あるいは 14 日間飼育し、ケトン食による代謝変化を検討した。血中ケトン対濃度は 6 日のケトン食飼育で著しく増加した。14 日の飼育による血中ケトン値は 6 日の値と同程度であったことから、6 日の飼育によって生体の代謝変化が十分に起こるものと考えられた。一方、体重変化は、ケトン食飼育により、通常食飼育に比較しやや体重の上昇が抑制されたものの、ケトン食と通常食において、体重の有意なさは認められなかった。加えて、血中の代謝産物に関しても、ケトン食負荷時と通常食飼育時での差を検討した。血中遊離脂肪酸濃度やトリグリセリド濃度はケトン食で変化しなかったが、血糖値は 6 日のケトン食負荷時に有意に減少した。この血糖値の低下は、おそらく、ケトン食負荷により、個体の糖質供給が減少していることによるものと考えられた。一方、血中インスリン濃度は、血糖値に合わせて減少することはなく、むしろ上昇する傾向を示した。以上の結果より、6 日間のケトン食飼育により、十分に代謝変化が起こること、さらにはケトン食飼育によりインスリンを含めた血糖調節に変化が起こることが示唆された。

### ケトン食飼育による耐糖能およびインスリン感受性の変化について

前章より、6 日間のケトン食負荷により、血糖値は低下するものの、血中インスリン濃度は低下しないことが示された。この結果により、ケトン食飼育により耐糖能やインスリン感受性に変化を生じている可能性が示唆される。そこで、ケトン食飼育した C57BL/6 マウスにおいて糖負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行い、耐糖能、インスリン感受性を検討した。GTT においては、6 日間、14 日間のケトン食飼育により、糖負荷後の血糖降下が悪化することが示された。ITT では、6 日間のケトン食飼育により、インスリンによる血糖降下作用が減弱することが示された。以上の結果より、ケトン食飼育下のような糖質供給が枯渇する状況下で

は、おそらく糖質の利用を制限する為に、個体のインスリン感受性が減少することが明らかになった。

#### ケトン食時負荷時の肝臓における Fgf21 の発現と、血中濃度変化

ケトン食負荷時における Fgf21 の発現と血中濃度を検討した。ケトン食負荷 6 日において、肝臓 Fgf21 濃度は約 20 倍程度まで増加した。14 日では、6 日目に比較してやや減少している傾向があるものの、通常食飼育しているマウスの肝臓における発現に対し、有意かつ著しい上昇が観察された。血中濃度についても、肝臓の発現とパラレルに変動することが示された。以上の結果より、ケトン食負荷による代謝変化に Fgf21 が関わる可能性が期待された。

#### ケトン食により飼育した Fgf21 ノックアウトマウスにおける代謝変化

前章の実験結果から、Fgf21 ノックアウトマウスを 6 日間ケトン食で飼育し、ケトン食負荷時における Fgf21 の役割について検討を試みた。まず、体重や組織重量の検討では、ケトン食飼育した Fgf21 ノックアウトマウスとケトン食飼育した野生型マウスでは、差は認められなかった。また、血中ケトン対濃度も差がなく、肝臓におけるケトン体産生に関わる酵素などの発現にも差は認められなかった。この結果は、Fgf21 はケトン食負荷時におけるケトン体産生に必須ではないことを示している。一方、血糖値はケトン食飼育した Fgf21 ノックアウトマウスにおいて、ケトン食飼育した野生型マウスと同程度だったものの、血中インスリン濃度は有意に減少が認められた。この結果から、ケトン食飼育により惹起されるインスリン抵抗性が改善されたものと考え、ケトン食飼育したノックアウトマウスに対し GTT と ITT を行った。その結果、Fgf21 ノックアウトマウスでは、ケトン食により起こる耐糖能傷害やインスリン感受性の低下が認められなかった。この結果により、Fgf21 がケトン食負荷時において肝臓において誘導され、糖の供給不足状況に対応するためにインスリン感受性を下げることが示唆された。

#### ケトン食飼育によりインスリン感受性が減少する臓器の検索

血糖値の調節に関わる組織としては、肝臓、筋肉、白色脂肪組織が知られている。そこで、まず通常食飼育した野生型マウスと、ケトン食飼育した野生型マウスにインスリンを投与した。15 分後に前述の臓器を摘出し、Akt のリン酸化を指標にインスリンシグナルを検討した。肝臓や、筋肉においてはケトン食負荷によりインスリンシグナルの減弱は観

察されなかったが、白色脂肪組織においてインスリンシグナルの減弱が観察された。したがって、ケトン食飼育により白色脂肪組織において糖の取り込みが減弱する可能性が示唆された。

同じ検討を、ケトン食飼育した野生型マウスとケトン食飼育した Fgf21 ノックアウトマウスと比較した。その結果、ケトン食により減弱した白色脂肪組織のインスリン感受性が、ノックアウトマウスでは回復した。この結果により、Fgf21 がケトン食負荷時において白色脂肪組織のインスリン感受性を下げることにより、糖質の利用を制限する可能性が示唆された。

#### 肝臓における糖新生における Fgf21 の役割

ITT において、インスリンの投与により減少する血糖値が回復するときには、肝臓において糖新生が起こることが知られている。そこで、ケトン食負荷時に誘導される Fgf21 により肝臓の糖新生が調節される可能性を考え、検討を試みた。糖新生に関わる転写因子や酵素の肝臓における発現を検討したが、野生型とノックアウトマウスでは差は認められなかった。また、糖新生に関わるホルモン（成長ホルモン、グルカゴン、糖質コルチコイド）にも差は認められなかった。以上の結果より、Fgf21 は白色脂肪組織には作用するものの、肝臓の糖新生には影響しないことが示唆された。

#### 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 4 件）

1. Kim KH, Jeong YT, Oh H, Kim SH, Cho JM, Kim YN, Kim SS, Kim do H, Hur KY, Kim HK, Ko T, Han J, Kim HL, Kim J, Back SH, Komatsu M, Chen H, Chan DC, Konishi M, Itoh N, Choi CS, Lee MS.

*Nature Medicine*, 2013, 19, 83-92 doi: 10.1038/nm.3014

“Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing **Fgf21** as a mitokine.”

2. Ohta H, Konishi M, Itoh N  
*Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, 2011, 11, 302-309

“FGF10 and FGF21 as regulators in adipocytes development and metabolism.”

3. Oishi K, Konishi M, Murata Y, Itoh N  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, 412, 302-309 doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.125.

“Time-imposed daily restricted feeding

induces rhythmic expression of Fgf21 in white adipose tissue.”

4. Chen W, Hoo RL, Konishi M, Itoh N, Lee P, Ye H, Lam KSL, Xu A

*J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 34559–34566  
doi: 10.1074/jbc.M111.285965.

“Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes.”

[学会発表] (計 4 件)

- ① 増田 有紀, 筒井 沙耶, 神田 由紀子, 太田 紘也, 小西 守周, 伊藤 信行  
「Fgf21 の胸線内 CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化、成熟における役割」第 35 回日本分子生物学会年会
- ② 西尾 恭史, 村田 雄亮, 小西 守周, 伊藤 信行  
「Fgf21 は低炭水化物高脂質食負荷時にインスリン抵抗性を惹起する。」第 35 回日本分子生物学会年会
- ③ 嶋田 将也, 村田 雄亮, 中村 尋俊, 黒川直樹, 小西 守周, 伊藤 信行  
「Fgf21 は低炭水化物高脂質食負荷時に白色脂肪組織においてインスリン抵抗性を惹起する」BMB2011
- ④ 小西 守周, 村田 雄亮, 嶋田 将也, 黒川直樹, 増田 有紀, 伊藤 信行  
「高脂肪低炭水化物食負荷時の Fgf21 の生理的役割」第 32 回日本肥満学会

## 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・准教授

研究者番号：00322165

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし