

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06195

研究課題名(和文) 抗肥満性ホルモンFGF21の新たな発現制御・脂質代謝改善機構の解明

研究課題名(英文) Study of novel mechanisms of transcriptional regulation and lipid metabolism by FGF21

研究代表者

清水 誠 (Shimizu, Makoto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：40409008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：FGF21は肝臓で合成・分泌され、抗肥満効果を有するホルモンである。本研究では、FGF21の脂肪肝における脂質代謝制御機構、及び脂肪肝においてFGF21の発現を制御する新規転写因子の解析を行った。FGF21は核内受容体PPAR $\gamma$ を介して脂肪肝軽減効果を有することを見出した。またFGF21のプロモーター領域に新規転写因子の応答配列を同定し、そのノックアウトマウスにおいて脂肪肝によるFGF21の誘導が有為に低下することを見出した。

研究成果の概要(英文)：FGF21 is an anti-obese hormone which is synthesized and secreted from the liver. In this study, mechanisms of regulation of fatty liver by FGF21, and transcriptional regulation of FGF21 gene by a novel transcription factor were analyzed. I found that FGF21 prevents fatty liver through a nuclear hormone receptor PPAR $\gamma$ . I also found a response element of a novel transcription factor on the FGF21 promoter, and induction of FGF21 gene by fatty liver is significantly decreased by its knockout mouse.

研究分野：食品科学

キーワード：FGF21 脂肪肝 PPAR $\gamma$

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の患者数は依然として増加し続けており、その原因は運動不足や食習慣の欧米化など生活スタイルの乱れに起因する。脂肪肝は、肝臓に脂肪が過剰に蓄積し肝障害をきたす疾患である。脂肪肝は、以前はアルコール飲酒によるものが多かったが、近年、飲酒歴に依存しない脂肪肝(非アルコール性脂肪肝、NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease)が注目されている。NAFLDの原因は、肥満や糖尿病など生活習慣病などが知られている。脂肪肝は重症化すると肝炎、肝硬変など重大な肝障害に繋がり、我が国の脂肪肝患者数は約 3000 万人とも推定されている。以上の背景から、脂肪肝は重要な疾患であり、その発症・抑制機序の理解が国民の QOL を改善する上で喫緊の課題と言える。

FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) は、肝臓で発現・分泌されるホルモンである。血中に分泌された FGF21 は脂肪組織や肝臓などに選択的に発現する FGF 受容体 (FGFR) とその補助タンパク質 ( $\beta$ Klotho) を介して細胞内にシグナルを伝達し、糖脂質代謝を制御する。白色脂肪組織では、FGF21 によりホルモン感受性リパーゼなどの発現増加を介した脂肪酸分解経路が活性化、またグルコーストランスポーター (GLUT1) を介した糖取込みが促進される。肝臓では FGF21 により脂肪酸酸化やケトン体合成が活性化される。個体レベルでは、FGF21 は高脂肪食による体重増加やインスリン抵抗性を改善することが報告されている。このことから、FGF21 は抗肥満の標的分子として注目されており、FGF21 の模倣薬による体重増加抑制能がヒトでも確認されている。以上の背景から FGF21 は抗肥満性ホルモンであり、その発現・血中レベルの増加による肥満症の改善効果が期待されている。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで肝臓の FGF21 の発現が脂肪肝・肝障害の危険因子である酸化ストレスや小胞体ストレスで増加することを報告した (Shimizu et al. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2015. 他)。また、これらのストレスシグナルは転写因子 ATF4 (activating transcription factor 4) を活性化し、FGF21 のプロモーター領域に存在する 3 か所の応答エレメントに作用し発現を亢進することを報告した (Maruyama, Shimizu et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016)。一方、肥満や脂肪肝により FGF21 の発現が増加することが報告されている。このことから、FGF21 による脂肪肝抑制のフィードバック制御の存在が予想された。脂肪肝における FGF21 の作用メカニズムは不明な点が多い。また、最近我々は FGF21 の発現を制御する新規転写因子 (転写因子 X) を同定した。興味深いことに、

この転写因子は脂肪肝モデルマウス (メチオニン・コリン欠乏食やフルクトースなど) で発現が増加することを発見した。

以上の点から、本研究では下記に示す項目を目的として研究を実施した。

FGF21 による脂肪肝制御機構の解析  
新規転写因子による FGF21 の遺伝子発現制御機構の解析  
脂肪肝による新規転写因子の発現調節機構の解析

## 3. 研究の方法

(1) FGF21 による脂肪肝制御機構の解析  
メチオニン・コリン欠乏食は短期で脂肪肝を誘発できる食餌であり、また肝臓の FGF21 の発現が顕著に増加する。このことからメチオニン・コリン欠乏食を脂肪肝モデル食として本実験で使用した。FGF21 欠損マウス (京都大学・伊藤信行教授より入手) とアデノウイルスを用いた FGF21 過剰発現マウスに、脂肪肝誘発食 (メチオニン・コリン欠乏食) を与え、肝臓などの各組織を回収した。肝臓より有機溶媒を用いた脂質抽出を行い、トリグリセリド量を解析した。また、組織より RNA またはタンパク質を調製し、リアルタイム PCR もしくはウェスタンブロット法を用いた発現解析を行った。

(2) 転写因子 X による FGF21 の遺伝子発現制御機構の解析

FGF21 のプロモーター領域を含むルシフェラーゼプラスミド及び転写因子 X の発現プラスミドを構築した。このプラスミドをヒト肝培養細胞 (HuH7 細胞) へ導入し、レポーターアッセイによる解析を行った。プロモーター領域の様々な欠失体を作製し、応答領域の同定を試みた。転写因子 X のプロモーターへの結合は、ゲルシフトアッセイにより解析した。また転写因子 X を発現するアデノウイルスを作製し培養細胞を用いた遺伝子発現解析を行った。

(3) 脂肪肝による転写因子 X の発現調節機構の解析

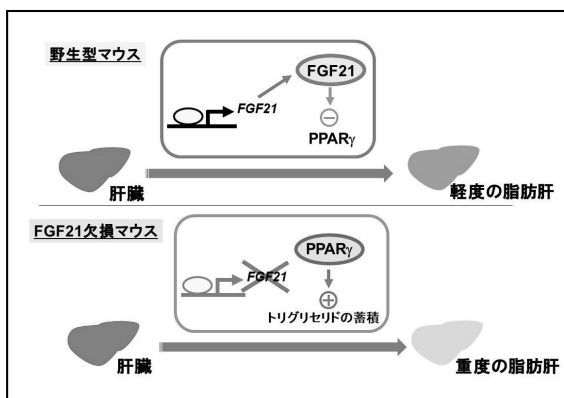
転写因子 X のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを構築し、ヒト肝培養細胞 (HuH7 細胞) を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、脂肪肝による転写因子 X の発現制御機構を解析した。脂肪肝を模倣するため、培地に脂肪酸を添加してプロモーター活性を評価したが良好な結果が得られなかった。そのため、脂肪肝での機能が報告されている転写因子などによる制御も検討した。

## 4. 研究成果

(1) FGF21 による脂肪肝制御機構の解析

FGF21 の脂肪肝における脂質代謝制御機構の解明のため、FGF21 欠損マウスを用いた解析を行った。野生型及び FGF21 欠損マウスに、脂肪肝誘発食（メチオニン・コリン欠乏食）を与えエネルギー代謝に関与する各臓器を回収した。脂質解析の結果、FGF21 欠損マウスの肝臓トリグリセリド量が有意に増加した。次に FGF21 を発現するアデノウイルスを脂肪肝誘発マウスに投与し、同様の解析を行った。その結果、欠損マウスとは対照的に肝臓トリグリセリド量が減少した。このことから、FGF21 はメチオニン・コリン欠乏食による脂肪肝を改善することが示された。

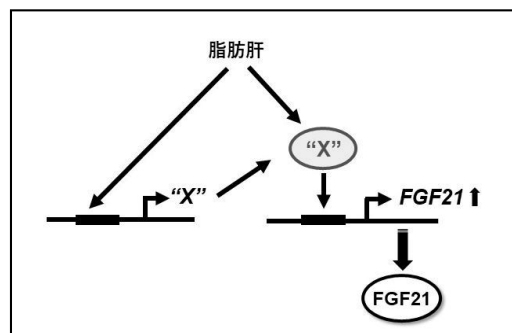
次に FGF21 の脂肪肝抑制効果のメカニズムを解明するため、肝臓の RNA 及びタンパク質を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、肝臓の脂質分解・輸送に関与する遺伝子（Lipoprotein lipase など）の発現が FGF21 欠損マウスにおいて有意に増加した。これらの遺伝子は脂肪酸をリガンドとする核内受容体 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) の標的であることが報告されている。ウェスタンブロットとリアルタイム PCR による解析の結果、FGF21 欠損マウスでは PPAR $\gamma$  の発現が有意に増加することを見出した。さらに PPAR $\gamma$  の阻害剤を投与した結果、肝臓トリグリセリド量が有意に低下した。以上の結果から、FGF21 は PPAR $\gamma$  を介して脂肪肝を改善するメカニズムが示唆された（下図）。



## （ 2 ） 転写因子 X による FGF21 の遺伝子発現制御機構の解析

最近我々が発見した FGF21 の新規発現制御因子(転写因子 X)による機能解析を行った。ルシフェラーゼアッセイを用いて FGF21 のプロモーター領域に転写因子 X の応答配列を同定した。さらにゲルシフト法を用いた解析の結果、転写因子 X は FGF21 の応答配列に結合することを明らかにした。アデノウイルスを用いて転写因子 X を過剰発現実験させ、FGF21 以外の標的遺伝子を探索した。新たに同定した標的遺伝子の一つは、転写因子 X による FGF21 の発現亢進を抑制した。この結果より、転写因子 X にはネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

メチオニン・コリン欠乏食を摂取させたマウス肝臓の遺伝子発現解析の結果、転写因子 X は FGF21 と同様に脂肪肝により発現が亢進することを見出した。転写因子 X 欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食摂取させると、野生型マウスと比較して FGF21 の発現が有意に低下した。以上の結果から、転写因子 X は脂肪肝に応答する因子であり、メチオニン・コリン欠乏食による FGF21 の発現亢進に重要であることが示された（下図）。



## （ 3 ） 脂肪肝による転写因子 X の発現調節機構の解析

転写因子 X の発現を制御する既知の転写因子に関してメチオニン・コリン欠乏食摂取のマウス肝臓での解析を行った。その結果、一つの転写因子の発現が脂肪肝で増加することを見出した。現在、ルシフェラーゼアッセイを用いて転写因子 X の詳細な発現制御機構の解析を進めている。

## 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 5 件)

Maruyama, R., Shimizu, M., Hashidume, T., Inoue, J., Itoh, N., Sato, R. (2018) FGF21 alleviates hepatic endoplasmic reticulum stress under physiological conditions *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, in press (査読有り)

Hashidume, T., Kato, A., Tanaka, T., Miyoshi, S., Itoh, N., Nakata, R., Inoue, H., Oikawa, A., Nakai, Y., Shimizu, M., Inoue, J., Sato, R. (2016) Single ingestion of soy -conglycinin induces increased postprandial circulating FGF21 levels exerting beneficial health effects *Sci. Rep.* 6, 28183. doi: 10.1038/srep28183. (査読有り)

Maruyama, R., Shimizu, M., Li, J., Inoue, J., Sato, R. (2016) Fibroblast growth factor 21 induction by activating transcription factor 4 is regulated through three amino acid

response elements in its promoter region *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 929-934. doi: 10.1080/09168451.2015.1135045.( 査読有り )

Maruyama, R., Shimizu, M., Ishijima, T., Nakai, Y., Inoue, J., Sato, R. (2016) Searching for novel ATF4 target genes in human hepatoma cells by microarray analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1149-1154. doi: 10.1080/09168451.2016.1146072.( 査読有り )

Shimizu, M., Morimoto, H., Maruyama, R., Inoue, J., Sato, R. (2015) Selective regulation of FGF19 and FGF21 expression by cellular and nutritional stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 61,154-160. doi: 10.3177/jnsv.61.154. ( 査読有り )

〔学会発表〕(計 5件)

清水 誠、梅村 真理子、高橋 勇二、井上 順、佐藤 隆一郎、抗肥満ホルモン FGF21 の新規発現制御因子の同定、日本農芸化学会、2018年

丸山 竜人、清水 誠、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎、FGF21 はアミノ酸欠乏性脂肪肝を抑制する、日本農芸化学会、2016年

清水 誠、丸山 竜人、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎、FGF21 は PPAR $\gamma$  を介して脂肪肝を抑制する、第 89 回日本生化学会、2016年

Ryuto Maruyama, Makoto Shimizu, Jun Inoue, Nobuyuki Itoh, Ryuichiro Sato, FGF21 ameliorates methionine- choline deficient diet-induced fatty liver, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015

丸山 竜人、清水 誠、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎、メチオニン-コリン欠乏食誘導性脂肪肝における FGF21 の機能解析、第 37 回日本分子生物学会、2014年

〔図書〕(計 1件)

清水 誠、非栄養素の分子栄養学 建帛社、(2017) 抗肥満ホルモン FGF21 の転写制御と機能性食品成分、第 8 章 123-129

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-bioc hem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 誠 (SHIMIZU, Makoto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号: 40409008

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 隆一郎 (SATO, Ryuichiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号: 50187259

(4) 研究協力者

なし