

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590343

研究課題名（和文）

繊維芽細胞増殖因子（FGF）21の代謝機能発現機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of function of FGF21 on metabolism

研究代表者

山本 雅哉（YAMAMOTO MASAYA）

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20446115

研究成果の概要（和文）：

FGF21の機能発現に重要と考えられる $\beta$  Klothoの動態に特に着目した。

安定発現株による実験から、

- 1) グルコース濃度に応じた $\beta$  Klotho分子の成熟・動態の変化を明らかにした。
  - 2) 食後を想定した高グルコース処理で30分以内の成熟型 $\beta$  Klothoの発現増強を認めた。
- 内因性 $\beta$  Klothoを発現する分化誘導したcaco2細胞から、
- 1) 高グルコース濃度がFGF21による刺激応答を選択的に増強する事を示した。
  - 2)  $\beta$  Klothoが主に顆粒状に細胞質に分布する事を示した。

研究成果の概要（英文）：

$\beta$  Klotho was focused on, due to the importance to FGF21 function

According to the analysis of the HEK293 cell expressing  $\beta$  Klotho stably,

- 1)  $\beta$  Klotho shifts the molecule size and amount along with the glucose concentration.
- 2) High glucose treatment leads  $\beta$  Klotho molecule size shift and amount in 30 min.

According to differentiated caco2 cell, which induce endogenous  $\beta$  Klotho expression,

- 1) High glucose condition selectively enhances FGF21 signaling
- 2)  $\beta$  Klotho distributes mainly in cytosol as a vesicular like pattern.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
2010年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
2011年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：繊維芽細胞増殖因子、情報伝達、代謝調節

## 1. 研究開始当初の背景

従来 FGF は増殖・分化に関わる因子として理解されてきた。ところが、生理的条件下でどの FGF 受容体とも結合出来ない偽遺伝

子と考えられていた FGF19 サブファミリーに代謝に関わる機能のある事が遺伝子改変動物を用いた実験からわかってきた。しかし、受容体と結合出来ない FGF が如何に機能を

発現するか、そのメカニズムの解明が期待された。

我々は **Klotho** ファミリー分子が選択的に **FGF** 受容体と複合体を形成し、**FGF19** サブファミリーによる細胞内への情報伝達を可能にする事を見出した。

一方、分化・増殖に関わる情報伝達系が如何に代謝に関わるアウトプットを誘導出来るのか、また、共役因子が存在する事が如何に機能に関わるのか、以前提示される課題は多い。

我々は従来の **FGF** 機能と代謝型 **FGF** を差別する因子として、**FGF** 受容体と結合する共役因子 **Klotho** ファミリー分子に着目した。

## 2. 研究の目的

糖・脂質代謝に関わる事が明らかにされつつある「**FGF21** の代謝機能発現機構の解析」を目的とした。**FGF** 刺激に対する応答の差異が分化した細胞の染色体レベルで制御されている可能性もあるが、**FGF21** の情報伝達を特異的に可能にする **Klotho** ファミリー分子、 $\beta$  **Klotho** がこの制御機構で果たす役割は大きいと考えた。また **FGF21** が液性因子として機能する事は、近年周知される代謝異常疾患の創薬シーズとしての可能性も高いと考えられる。

## 3. 研究の方法

$\beta$  **Klotho** の動態と情報伝達の関わりを異なる糖濃度の培養条件下で比較検討した。

本研究の開始時点では、内因性の  $\beta$  **Klotho** を発現する培養細胞の取り扱いが難しかったため、各種 **Klotho** ファミリー分子の安定発現細胞株を樹立し  $\beta$  **Klotho** 分子の成熟、局在、また、**FGF21** 刺激時の情報伝達能などの検討を進めた。また、平行して内因性  $\beta$  **Klotho** を発現する培養細胞のスクリーニングも行い、安定発現細胞株で得られた結果の再現を試みた。

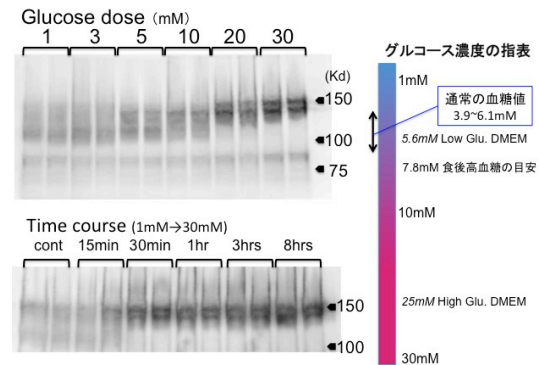
## 4. 研究成果

$\beta$  **Klotho** を **HEK293** 細胞に遺伝し導入、安定発現する培養細胞樹立し、異なるグルコース濃度で一晩インキュベートした後に  $\beta$  **Klotho** の検出を試みた。その結果、グルコース濃度 5-10 mM にて成熟型  $\beta$  **Klotho** と思われるバンドが認められ、20 mM 以上で高分子型バンドを検出し、30 mM では成熟型・高分子型バンドの量的な増加を認めた。

また食後を想定し、培地中の糖濃度を上昇した後の  $\beta$  **Klotho** 動態の経時変化を追ったところ、糖添加後 30 分程で成熟型・高分子

型バンドの出現を認めた (図 1)。

図 1 : グルコース濃度変化と  $\beta$  **Klotho** の動態

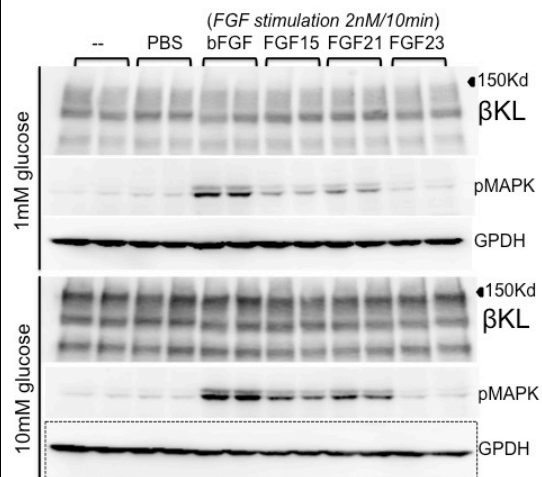


こうした糖濃度の変化が **FGF** リガンドによる刺激に影響するか検討した。 $\beta$  **Klotho** を安定発現する **HEK293** 細胞をおのおのの糖濃度で一晩培養、各種 **FGF** で刺激し、細胞内へのシグナル伝達の強度を **MAPK** のリン酸化の度合いで評価した (図 2)。

低グルコース濃度で弱かった **FGF** 依存的な **MAPK** のリン酸化が高糖濃度では増強している事が分かった。しかし、**bFGF**、**FGF15** にも同様の傾向が観察され、**FGF21** 特異的な現象か更なる検討が必要と思われた。

幸い、内因性  $\beta$  **Klotho** を発現誘導する細胞株、**caco2** 細胞を見出し、同細胞を用いた内因性  $\beta$  **Klotho** の挙動・反応性を検討した。

図 2 : 異なるグルコース濃度と **FGF** 反応性



**caco2** 細胞はコンフルエントの状態です、3 週間培養を続けると小腸上皮を模した形態・機能、たとえば糖輸送能などを持つに至る。 $\beta$  **Klotho** は小腸でも発現が認められ、

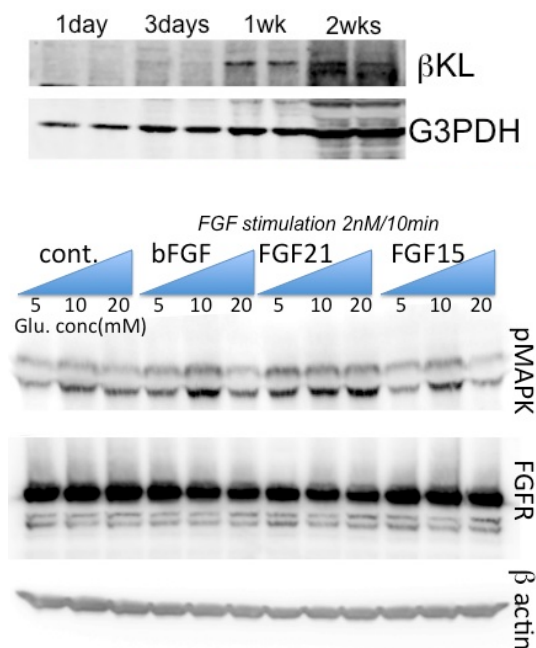
糖・脂質代謝に関わる FGF21 の機能を考えると、個体中での機能を想定・解析する上でも重要な知見と思われる。

$\beta$  Klotho は caco2 細胞において、分化誘導後 2 週間をピークに発現が誘導されることを見出した (図 3)。

この条件に分化誘導した caco2 細胞を異なる糖濃度で 2 晩インキュベートし、それぞれ FGF リガンドで刺激したところ下図 (図 3) のような結果を得た。

安定発現株で観察した刺激応答同様 10 mM でそれぞれの FGF 刺激に対する応答性が亢進している事が確認される一方、20 mM にグルコース濃度を上げたところ、bFGF、FGF15 刺激応答が減衰する一方で、FGF21 の反応は増強する傾向が見られた。

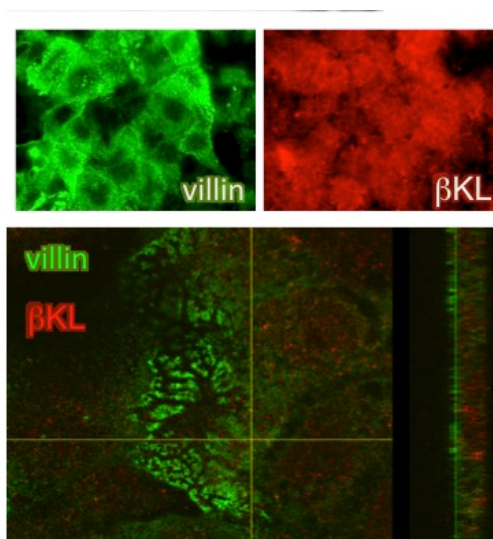
図 3 : 分化した caco2 細胞の異なるグルコース濃度下での刺激応答性



分化誘導した caco2 細胞を抗 villin 抗体で免疫染色したところ、報告通りに villin が微絨毛様に陽性反応を示していることを見出した。一方、 $\beta$  Klotho は顆粒状の陽性反応を示し、villin で示される分化形質がより顕著な細胞でより陽性反応が強い傾向を認めたが、両者の陽性反応は必ずしも共局在していなかった。

共焦点顕微鏡を用い、Z 軸で観察すると villin の陽性反応が頭頂側に分布するのに対し、 $\beta$  Klotho は大部分が細胞質に散在している様子が観察された。

図 4 : 分化した caco2 細胞における  $\beta$  Klotho の発現分布



## 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)

Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, Haga J, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas* 41:245-252(2012)

Miyamoto K, Iwadate M, Yanagisawa Y, Ito E, Imai J, Yamamoto M, Sawada N, Saito M, Suzuki S, Nakamura I, Ohki S, Saze Z, Kogure M, Gotoh M, Omicronbara K, Ohira H, Tasaki K, Abe M, Goshima N, Watanabe S, Waguri S, Takenoshita S. Cathepsin L is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Oncol* 39 : 1109-1115(2011)

Tanaka S, Sakamoto K, Yamamoto M, Mizuno A, Ono T, Waguri S, Kimura J. Mechanism of statin-induced contractile dysfunction in rat cultured skeletal myofibers. *J Pharmacol Sci* 114: 454-463(2010)

Chen MZ, Zhu X, Sun HQ, Mao YS, Wei Y, Yamamoto M, Yin HL. *J Biol Chem*. 284:23743-23753. (2009)

[学会発表] (計 7 件)

Yamamoto M, Yin H. Hypertonic Stress

Increases Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Levels by Activating PIP5KI  $\beta$ . International symposium on Autophagy and Cell Death. 2009年7月4日：東京

なし

(3) 連携研究者

なし

Ymamoto M, Waguri S. Distribution analysis of  $\beta$ Klotho in liver and pancreas. アメリカ細胞生物学会 2009年12月8日：サンディエゴ

山田茜、亀高愛、山本雅哉、曾友深、小松雅明、和栗聡. Atg3 欠損マウス線維芽細胞株で見られたオートファゴソーム様構造の形態学的解析、第115回日本解剖学会全国学術集会. 2010年3月30日：盛岡

浅井笑子、山本雅哉、上田和毅、和栗聡. ラット皮膚創傷治癒過程における MAP1LC3 の免疫組織学的動態解析. 第115回日本解剖学会全国学術集会. 2010年3月30日：盛岡

山本雅哉 マウス組織における  $\beta$ Klotho の発現分布解析 第55回東北・北海道連合支部学術集会. 2009年9月26日：仙台

亀高愛、山田茜、澤田直樹、山本雅哉、曾友深、小松雅明、和栗聡. Atg3 欠損マウス線維芽細胞株におけるオメガソームマーカー DFCP1 の局在解析. 第56回東北・北海道連合支部学術集会. 2010年9月25日：旭川

山本雅哉、佐々木理、和栗聡. 培養細胞を用いた  $\beta$ klotho の動態・局在解析 第57回解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会. 2011年9月10日：盛岡

[図書] (計0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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20446115

### (2) 研究分担者