

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591355

研究課題名(和文) 脂質の消化・吸収・蓄積を調節する新規統一的制御原理とその分子実体の解明

研究課題名(英文) A novel regulatory machinery for the digestion, absorption and accumulation of dietary lipids

研究代表者

田中 智洋 (Tanaka, Tomohiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20402894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) beta Klothoノックアウトマウス(KO)や肝細胞特異的トランスジェニックマウスを用いた研究の結果、肝細胞に発現するbeta Klothoは、胆汁酸のみならず脂質・リポタンパク質代謝恒常性に必要かつ十分であった。(2) KOにおける体重減少と食餌性肥満への抵抗性は、肝臓や脂肪組織でのbeta Klotho発現レスキューによって消失しなかった。すなわち体重の制御には、肝臓・脂肪組織以外の臓器(中枢神経系など)におけるbeta Klothoが重要であることが示された。(3) KOは血漿アミノ酸濃度異常を呈したが、これは脂肪細胞におけるbeta Klotho発現レスキューで正常化した。

研究成果の概要(英文)：(1) Studies using beta Klotho knockout mice (KO) and hepatocyte-specific transgenic mice have shown that liver beta Klotho is both necessary and sufficient for lipid and lipoprotein homeostasis as well as for bile acid regulation. (2) Decreased body weight and resistance to diet-induced obesity in KO were not rescued by liver or adipocyte rescue of beta Klotho expression, suggesting that body weight regulation by beta Klotho is attributable to its expression in tissues other than these cells. (3) Amino acid dysregulation was found in KO mice, which was rescued by an adipocyte-specific rescue of beta Klotho expression.

研究分野：代謝学

キーワード：脂質 シグナル伝達 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

β Klotho は成体においては肝臓、膵臓、白色および褐色脂肪組織に高いレベルの発現を示す 1 型膜タンパク質である。肝臓に発現する β Klotho は、小腸で胆汁酸依存的に合成・分泌される内分泌型 FGF、FGF15/19 の受容体構成分子として働き、FGF15/19 による胆汁酸合成の律速酵素 Cyp7a1 の遺伝子発現を抑制することにより胆汁酸合成のネガティブフィードバック機構を媒介する。

胆汁酸は脂質や脂溶性ビタミンの吸収のための消化管内腔における食物由来脂質のミセル化に必須であるのみならず、コレステロールからの Cyp7a1 による胆汁酸合成はコレステロールの最大かつほぼ唯一のクリアランス経路である。しかし、 β Klotho ノックアウトマウスの体内脂質動態についてはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、脂質の消化吸収や、トリグリセライドやコレステロールの体内における最適分配の観点から、 β Klotho の分子機能が哺乳類個体の脂質恒常性に及ぼす影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

β Klotho は成体においては肝臓、膵臓、白色および褐色脂肪組織に高レベルの発現を示すことから、これら各臓器における新しい分子機能を解明するべく、次の研究を行った。

(1) 肝臓における脂質代謝に及ぼす影響を探るため、全身性の β Klotho ノックアウトマウスと、アルブミンプロモーターを用いて肝細胞特異的に β Klotho を発現させたトランスジェニックマウスを交配し、肝臓でのみ β Klotho 発現をレスキューしたマウスを用いて、各臓器の遺伝子発現の網羅的解析、肝臓におけるメタボローム解析、放射性同位元素ラベル体の酢酸や VLDL を投与することによる体内脂質フラックスの解析などを行い、詳細な脂質代謝静態・動態の解析を行った。

(2) 膵臓における役割を調べるため、膵臓における β Klotho 結合タンパクの探索を行うと同時に、ラットに対する膵管カニュレーションの技法を用いて FGF15/19 投与後の動物の膵液を経時的に回収し膵液タンパク質の組成を分析した。

(3) 全身性の β Klotho ノックアウトマウスや、これと aP2 プロモーターを用いて β Klotho を脂肪細胞特異的に発現させたマウスを交配し、脂肪組織でのみ β Klotho 発現をレスキューしたマウスを用いて、血漿や肝臓、白色および褐色脂肪組織のメタボローム解析を行い、脂肪組織に発現する β Klotho が制御する代謝産物の同定を目指した。

4. 研究成果

各組織に発現する β Klotho の機能を左記の方法により詳細かつ丹念に解析することにより、それぞれ下記の事実を明らかにすることに成功した。

(1) β Klotho ノックアウトマウスでは、特に低脂肪（高炭水化物）食による飼育下で、低トリグリセライド血症が認められた。リポタンパク質分画の検討では、VLDL や LDL などのトリグリセライド含量の高い低比重リポタンパク質の減少が著明であった。一方、胆汁酸合成の直接的基質であるコレステロールについては、有意差が認められなかった。 β Klotho ノックアウトマウスの低トリグリセライド血症の原因に迫るため、チロキサポール投与による VLDL 放出測定、 3 H ラベル体 VLDL の投与による血漿 VLDL クリアランスの測定、肝臓への取り込みなどの検討を行い、肝臓への取り込みの亢進が低トリグリセライド血症の原因であることを突き止めた。一方、コレステロール代謝については、肝臓での *de novo* 合成を担う HMG CoA synthase、HMG CoA reductase 等の遺伝子発現の亢進、acetyl CoA や HMG CoA 濃度の増加、 3 H ラベル体酢酸を用いたトレーサー実験における *de novo* 合成の亢進が示されたことから、代償的コレステロール合成の亢進が、 β Klotho ノックアウトマウスが低トリグリセライド血症にもかかわらず低コレステロール血症を呈さない原因であると考えられた。

(2) FGF15/19 を投与した後に膵液を回収したところ、膵消化酵素群の分泌が亢進していることがラットで示された。 β Klotho ノックアウトマウスを用いた検討を試みたが、マウスでは採取可能な膵液量が極めてわずかであったため、安定的な量の膵液をアッセイに用いることができず、個体差が極めて大きくなった。そのため、CRISPR/Cas9 システムを用いた β Klotho ノックアウトラットを新たに作製することとし、FGF15/19 による膵消化酵素分泌促進作用の β Klotho 依存性についてはこのノックアウトラットの完成を待つこととなった。この点については今後課題を残す結果である。

(3) GC/MS、LC/MS、CE/MS によるメタボロミクスを行ったところ、 β Klotho ノックアウトマウスにおいては血漿および白色脂肪組織でのアミノ酸濃度異常が認められた。この変化は一般に肥満や糖代謝異常に合併するような分岐鎖アミノ酸（必須アミノ酸）の濃度よりもむしろ、アスパラギン酸やグルタミン酸などの非必須アミノ酸の濃度において顕著であった。トランスジェニックによる脂肪組織での β Klotho 発現のレスキューは上記アミノ酸濃度異常のほとんどを正常化させたことから、脂肪組織内のアミノ酸濃度、さらには血漿中のアミノ酸濃度の

制御には脂肪細胞における β Klotho の発現が必須であることが示された。一方、脂肪組織の β Klotho は *in vivo* で Slc ファミリーのアミノ酸トランスポーターと結合していることを既にわれわれは証明しており、これと併せて理解することにより、哺乳類個体のアミノ酸恒常性における β Klotho の機能的意義を示すことができたと考えている。今後はこのアミノ酸トランスポーターとの分子間相互作用のさらなる検討と、トランスポーターノックアウトマウスの表現型と β Klotho ノックアウトマウスの表現型の類似性の検討を行う予定である。

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9件)

H. Sakan, K. Nakatani, O. Asai, A. Imura, T. Tanaka, S. Yoshimoto, N. Iwamoto, N. Kurumatani, M. Iwano, Y. Nabeshima, N. Konishi, Y. Saito
Reduced Renal α -Klotho Expression in CKD Patients and Its Effect on Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism
PLOS ONE, 9(1): e86301. doi:10.1371/journal.pone.0086301, **2014**

S. Masuda, T. Tanaka, H. Masuzaki, K. Nakao, S. Taguchi
Overexpression of Leptin Reduces the Ratio of Glycolytic to Oxidative Enzymatic Activities without Changing Muscle Fiber Types in Mouse Skeletal Muscle
Biol. Pharm. Bull. 37(1): 169-173, **2014**

O. Asai, K. Nakatani, T. Tanaka, H. Sakan, A. Imura, S. Yoshimoto, K. I. Samejima, Y. Yamaguchi, M. Matsui, Y. Akai, N. Konishi, M. Iwano, Y. Nabeshima, Y. Saito.
Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion.
Kidney Int. 81(6):539-547, **2012**

田中智洋

肥満の分子機構 - 摂食調節機構破綻の病態生理学とレプチン抵抗性 -
腎と透析 (東京医学社) Vol.78 No.4 : 485-491, 2015

田中智洋
F G F 2 1
医学のあゆみ (医歯薬出版) Vol.250 No.9 : 829-830, 2014

井上雅文、田中智洋
最新肥満症学 - 基礎・臨床研究の最前線 -
.肥満と肥満症基礎研究の進歩 レプチン抵抗性の概念と分子基盤
日本臨牀 72(増刊4)(日本臨牀社) : 47-56, 2014

田中智洋、鍋島陽一
老化関連疾患における Klotho の病態的意義と診断・治療への展望
内分泌・糖尿病・代謝内科(科学評論社) 37(2) : 148-155, 2013

田中智洋、鍋島陽一
Klotho による代謝恒常性制御
実験医学(羊土社) Vol.31 No.5(増刊) : 76-82, 2013

田中智洋、鍋島陽一
心腎連関解明の新しい分子標的 Klotho
Cardiovascular Frontier Vol.3 No.1 : 30-37, 2012

[学会発表](計28件)

田中智洋
Clinical and pathophysiology of nutrient sensing and disposal
浜松医科大学 解剖学講座 (細胞生物学分野) メディカルフォトニクス研究センター
システム分子解剖学研究室 セミナー室、
2015年2月9日(月)

Clinical Seminar for Diabetes 招請講演
田中智洋
ホルモンと栄養素がかたちづくる物質の流れの生理と病態
宮崎大学医学部附属病院 7F 共通カンファレンスルーム、2014年12月2日(火)

第 22 回糖尿病セミナー-UP-TO-DATE 招
請講演

田中智洋

Klotho による栄養代謝制御の全貌解明
を目指して

岡山、2012 年 9 月 13 日

T Tanaka

Liver-dependent and -independent
functions of Klotho regulate lipid
homeostasis and body weight in
mice

The Conference on Bioactive Peptides for
Cell-Cell Communication 2014, Kyoto,
2014/9/12

K Kobayashi, T Tanaka, Y Nabeshima
Distinct Roles of Intra- and Extrahepatic
-Klotho in Regulating Plasma

Triglyceride Level and Body

Weight in Mice

International Congress of Endocrinology,
Chicago, 2014/06/22

T Tanaka, K Kobayashi, M Washida, Y
Nabeshima

Hepatocyte Klotho Regulates Lipid
Homeostasis but not Body Weight in
Mice

32th Annual Scientific Meeting of The
Obesity Society, Boston, 2014/11/4

T Sonoyama, T Tanaka, M Inoue, Y
Ogino, T Guo, K Nakao

Transcriptome analysis of arcuate
nucleus from mice fed a high-fat diet

The Conference on Bioactive Peptides for
Cell-Cell Communication 2014, Kyoto,
2014/9/10-12

M Inoue, T Tanaka, T Sonoyama, K
Nakao

Contribution of dietary linoleic acid
intake to the pathogenesis of obesity; in
vivo evidence in mice and
potential mechanisms

The Conference on Bioactive Peptides for
Cell-Cell Communication 2014, Kyoto,
2014/9/10-12

T.Tanaka, K.Kobayashi, M.Washida,
Y.Nabeshima

A trade-off between cholesterol and
triglyceride biosynthesis – a study using
klotho knockout & transgenic mice
Keystone Symposia (C3, Lipid Pathways
in Biology and Disease) Dublin,
2014/3/22

T.Tanaka, H Masuzaki, K Hosoda, K
Nakao

A combination of dietary fat and nicotine
administration enhances
endocannabinoid CB1 receptor
expression in hypothalamic nuclei in
mice

31th Annual Scientific Meeting of The
Obesity Society, Atlanta, 2013/11

田中智洋

肥満に伴う視床下部障害の分子病理学

Molecular pathology of the hypothalamic
injury in obesity –an omics-based study
第 20 回アディポサイエンス・シンポジウ
ム (大阪) 8/22,2015

田中智洋

肝細胞の Klotho による血漿脂質の制御
生理学研究所研究会 臓器相関による生体
制御システムとその変容の仕組み(岡崎市)
9/28, 2014

園山拓洋、田中智洋、沢田啓、井上雅文、
河野裕翔、中尾一和

高脂肪食負荷による食欲制御機構破綻のメ
カニズム解明の試み～トランスクリプトー
ム解析を中心として～

第 32 回 内分泌代謝学サマーセミナー(山
梨) 7/11,2014

田中智洋

Aging Science Update - Klotho による
栄養代謝恒常性の制御

第 56 回老年医学会学術集会 Aging
Science Forum (福岡) 6/12,2014

R Maeda, Y Nabeshima, K Kobayashi, T
Tanaka, A Imura, Y Nabeshima

- and -Kloths in health and
diseases

第 36 回日本分子生物学会年会(神戸) 12/6,
2013

田中智洋

脂肪細胞の栄養因子センサーについて
生理学研究所研究会 細胞センサーの分子
機構・相互関連・ネットワーク研究会（岡
崎市） 11/29, 2013

田中智洋、小林加奈子、鷺田美和、鍋島陽
一

脂質恒常性制御における肝細胞の
Klotho の役割
第 88 回日本内分泌学会学術総会（東京）
2015/4/24

小林加奈子、田中智洋
脂質恒常性における Klotho 依存的胆汁
酸制御の意義
第 4 回 Metabolism Scientific Forum（東
京） 2014/12/20

小林加奈子、田中智洋、鷺田美和、鍋島陽
一

体重と脂質恒常性における Klotho 依存
性胆汁酸制御の意義（若手研究奨励賞審査
対象演題）
第 35 回日本肥満学会（宮崎） 2014/10/24

田中智洋
動物個体の代謝研究への挑戦 - 統合オミ
ックスによる物質の流れの生理学を目指し
て
成人病の病因・病態の解明に関する研究助
成 第 20 回研究発表会(TMFC) (大阪)
2014/7/12

園山拓洋、田中智洋、沢田啓、井上雅文、
河野裕翔、中尾一和
高脂肪食負荷マウスの視床下部弓状核のト
ランスクリプトーム解析
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会（大
阪） 2014/5/24

園山拓洋、田中智洋、沢田啓、井上雅文、
城孝尚、河野裕翔、中尾一和
高脂肪食負荷マウス視床下部弓状核のト
ランスクリプトーム解析
第 87 回日本内分泌学会学術総会（福岡）
2014/4/26

河野裕翔、田中智洋、園山拓洋、井上雅文、
城孝尚、中尾一和
マウス視床下部における FGF15・FGF 受
容体の発現解析
第 34 回日本肥満学会（東京） 2013/10/12

小林加奈子、田中智洋、鍋島陽一
血中脂質レベルと体重の制御における肝
臓・肝臓外の Klotho の役割
第 34 回日本肥満学会（東京） 2013/10/12

田中智洋
Klotho による血清脂質と体重の制御
成人病の病因・病態の解明に関する研究助
成 第 19 回研究発表会(TMFC) (大阪)
2013/7/6

田中智洋
ベータクロトールによる代謝制御の全貌解明
を目指して
第 1 回 AAA (Academy of Aging and
Cardiovascular-Diabetes Research) (東
京) 2013/6/9

田中智洋 鍋島陽一
生活習慣病における Klotho の意義 -
脂質代謝に着目した新たな展開 -
第 14 回 糖尿病と生活習慣病治療研究会
（京都） 2013/6/1

田中智洋
脂肪細胞における Klotho 機能の探索
THE 4th Brainstorming Medical
Conference（東京） 2012/5/27（一般演
題口演）

〔図書〕(計 2 件)

田中智洋（分担執筆）
診断と治療社 最新内分泌代謝学
編集主幹 中尾一和 2013
第 7 章 肥満症とやせ
摂食調節 pp431-436

田中智洋（分担執筆）
（分担執筆）メタボリックシンドローム
シリーズ
レプチンのトランスレショナルサイエン
ス メタボリックシンドロームの治療戦略
監修 松澤祐次、編集 中尾一和 2012
第 5 章 レプチンのトランスレショナル
サイエンス - レプチン実用化に向けて -
1)レプチンの発見 意義とその特徴
pp130-136

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智洋 (TANAKA TOMOHIRO)
京都大学大学院医学研究科・特定准教授
研究者番号：20402894

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：