

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870926

研究課題名(和文) 子宮内胎児発育と 出生後の体重制御における  $\beta$ -Klotho の役割研究課題名(英文) Role of  $\beta$ -Klotho in regulating fetal growth and body weight in mice

## 研究代表者

小林 加奈子 (Kobayashi, Kanako)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員

研究者番号：10724106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)： $\beta$ -klothoノックアウトマウス(KO)が示す胎児(胚)の発育抑制および出生後の体重減少のメカニズムを解明することを目的として、解析を行った。胎生期における  $\beta$ -klothoの発現局在を検討したところ、母体から供給される栄養の吸収・代謝を担う卵黄嚢の内胚葉細胞に主に発現していることが分かった。RNAシーケンス法による網羅的遺伝子発現解析によって、KO卵黄嚢では栄養素の代謝酵素やトランスポーターの遺伝子発現が変化することが示された。以上の結果から、卵黄嚢の  $\beta$ -Klothoが栄養素の代謝・輸送関連遺伝子の発現調節を介して、胚への栄養供給を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism underlying fetal growth restriction and reduced body weight in  $\beta$ -klotho knockout (KO) mice. Since an embryo absorbs maternal nutrients through its yolk sac before placental maturation, we hypothesized that  $\beta$ -Klotho expressed in the yolk sac plays a key role in supplying maternal nutrients to the embryo. We found that  $\beta$ -klotho mRNA was predominantly expressed in the yolk sac endoderm cells, the primary site of nutrient absorption. RNA-sequencing analysis revealed that the gene expression levels of the metabolic enzymes and the nutrient transporters were altered in the KO yolk sac. These results suggest that  $\beta$ -Klotho in yolk sac contributes to the regulation of fetal growth through modulating the expression levels of genes involved in nutrient metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード： $\beta$ -Klotho 子宮内胎児発育遅延 卵黄嚢 分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内胎児発育遅延(IUGR)児は、成人後に糖尿病や脂質異常症などの代謝疾患を発症するリスクが高いことが知られる。したがって、IUGRの予防は代謝疾患のリスクの低減につながる事が期待されるが、IUGRの発症メカニズムには不明な点が多い。

$\beta$ -Klothoは肝臓、膵臓、脂肪組織および脳の一部に発現する型膜タンパク質である。 $\beta$ -klothoノックアウト(KO)マウスは、胆汁酸合成亢進、脂質代謝異常、および体重減少を示す。これまでに、胆汁酸合成と脂質代謝の制御には肝臓に発現する $\beta$ -Klothoが必須であることが明らかになっている(FASEB J 2016; 30, 849-862)。

KOマウスにおける体重抑制のメカニズムは不明であるが、胎生12.5日目のKOマウスの胎児(胚)が同胞野生型胚よりも小さいことから、KOマウスの体重減少は胎生期の発育抑制に起因する可能性が示唆された。また、母体の栄養不良はIUGRの発症要因のひとつであるが、KO胚の発育抑制は母マウスへの摂餌制限なしでも認められたことから、原因は胚側にあると考えられた。興味深いことに、 $\beta$ -klothoは胎生10.5日目において卵黄嚢に発現することが報告されている(Mech Dev 2000; 98, 115-119)。卵黄嚢は胚を包む胚由来の器官で、胎盤が発達する胎生10日目前後まで胚への栄養供給を担う(図1)。

これらの知見より、研究代表者は「KOマウスにおける胚の発育抑制と体重減少は、卵黄嚢の $\beta$ -Klotho欠損による栄養供給の異常に起因する」との仮説に至った。

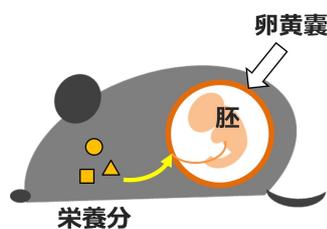


図1. 卵黄嚢は胚への栄養供給を担う

## 2. 研究の目的

本研究は、IUGR発症に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的として、上述の仮説に基づき、卵黄嚢の $\beta$ -Klothoの機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)胎生12.5日目における解析

$\beta$ -klothoの発現分布を明らかにするため、野生型胚から、卵黄嚢、胎盤、肝臓、腸を採取し、定量的PCR法で $\beta$ -klotho発現量を比較した。

卵黄嚢は内胚葉細胞、中胚葉細胞、内皮細胞で構成されている。卵黄嚢における $\beta$ -klotho発現細胞を明らかにするため、野生型胚より採取した卵黄嚢を酵素処理によって内胚葉細胞と中胚葉細胞/内皮細胞の2つに分離し、それぞれにおける $\beta$ -klotho発現をRT-PCR法で検討した。

### (2)胎生9.5日目における解析

$\beta$ -Klotho欠損が胚の発育に与える影響を明らかにするため、KO胚とコントロールである $\beta$ -klothoヘテロ(HE)胚の頭臀長および体節数を比較した。

KOおよびHEの卵黄嚢の組織サンプルを製作し、ヘマトキシリン-エオシン染色法による形態学的観察を行った。

$\beta$ -Klotho欠損が卵黄嚢の機能に与える影響を検討するため、KOおよびHEの卵黄嚢からRNAを抽出し、RNAシーケンス法による網羅的遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)胎生12.5日目における検討

$\beta$ -klothoの発現分布

RNA1 $\mu$ gあたりの $\beta$ -klotho発現量は、卵黄嚢で最も高く、次いで肝臓、腸、胎盤の順であった。

卵黄嚢における $\beta$ -klotho発現細胞

まず、卵黄嚢から分離した内胚葉細胞と中胚葉細胞/内皮細胞について、それぞれのマーカー遺伝子のRT-PCRを行い、分離が成功していることを確認した。次に、 $\beta$ -klotho特異的なプライマーセットによるRT-PCRを行った。内胚葉細胞由来の鑄型では $\beta$ -klothoの増幅を認めたが、中胚葉細胞/内皮細胞由来の鑄型からは検出されなかった。

## (2)胎生 9.5 日目における検討

### 胚の発育評価

KO 胚の頭臀長は HE 胚よりも有意に短いことが判明した。一方、体節数には差を認めなかった。また、KO 胚において、形態の異常は認められなかった。

### 卵黄嚢の形態

卵黄嚢の構造、内胚葉細胞、中胚葉細胞、および血球の形態について、KO と HE に差は認められなかった。

### 卵黄嚢における網羅的遺伝子発現解析

EdgeR を用いて、KO と HE の卵黄嚢で有意に発現量が異なる遺伝子を抽出した。これらの中には、栄養素の代謝酵素やトランスポーターが複数含まれていた。

以上の結果から、胎生 9.5 日目の時点で、すでに KO 胚の発育抑制が生じていることが明らかになった。また、*β-klotho* は主に卵黄嚢の内胚葉細胞に発現し、*β-klotho* 依存的に栄養代謝・輸送に関わる遺伝子の発現が変化することが示された。

マウスでは、母体から供給される栄養は内胚葉細胞を介して吸収・輸送され、胚に供給される。このことから、卵黄嚢の *β-Klotho* が栄養代謝・輸送関連遺伝子の発現調節を介して、胚への栄養供給を制御している可能性が示唆された。

今後は、*β-klotho* 依存的に遺伝子発現が変化する分子の機能を足掛かりとして、胚の発育制御に関わる分子メカニズムの解明を進めて行く。

## 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 1 件)

(1) Kobayashi, K., Tanaka, T., Okada, S., Morimoto, Y., Matsumura, S., Manio, M. C. C., Inoue, K., Kimura, K., Yagi, T., Saito, Y., Fushiki, T., Inoue, H., Matsumoto, M. and Nabeshima, Y. Hepatocyte *β-Klotho* regulates lipid homeostasis but not body weight in mice. *FASEB J.*, 30(2):849-62. (2016)

doi: 10.1096/fj.15-274449. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Kanako Kobayashi, Tomohiro Tanaka, Yo-ichi Nabeshima

Distinct roles of intra- and extrahepatic *β-Klotho* in regulating plasma triglyceride level and body weight in mice.

16th International Congress of Endocrinology  
2014/6/22, Chicago (USA) (査読あり)

(2) 小林加奈子、田中智洋、鷲田美和、鍋島陽一

体重と脂質恒常性における *β-Klotho* 依存性胆汁酸制御の意義

第 35 回日本肥満学会

2014/10/24, 宮崎市 (査読あり)

[図書] (計 0 件)

[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:

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

小林 加奈子 (KANAKO KOBAYASHI)

公益財団法人 先端医療振興財団  
研究員  
研究者番号:10724106

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし