

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 FGF15/19-βKlotho 内分泌系の種特異性の解明

申 請 者 氏 名 向井 秀幸

担当指導教員氏名 黒尾 誠 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系
生体分子医学
抗加齢医学

使用文字数 3171 字

論 文 要 旨

氏名 向井 秀幸

表題

FGF15/19- β Klotho 内分泌系の種特異性の解明

1 研究目的

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor、FGF)は組織形成や代謝調節など多彩な役割を担っており、ヒトではFGF15を除く22種類のFGFが存在する。このうち、FGF19、FGF21、FGF23はホルモン(内分泌因子)として機能することからエンドクラインFGFと呼ばれる。そしてこれらエンドクラインFGFは膜蛋白質Klothoファミリーと複合体を形成するFGF受容体に結合しシグナルを伝えることが特徴である。

FGF15は遺伝子座の位置や生理機能の共通性からヒトFGF19のオルソログとされている。その分泌様式はFGF19と同様に摂食時に小腸から分泌され、肝臓において β Klothoを共受容体とするFGF受容体4(FGF receptor-4、FGFR4)に作用し、胆汁酸合成の律速酵素であるCyp7a1の発現を著しく減弱させることで胆汁酸合成を抑制する。

ヒトでの薬物動態・薬剤性肝障害等を予測・評価するために作製されたヒト肝細胞キメラマウス(ヒトの肝臓細胞を移植し置換したマウス)ではCyp7a1遺伝子の発現が高く、これに伴い恒常的に胆汁酸の過剰合成が認められ、このような肝機能異常を呈するマウスで薬物動態・薬剤性肝障害を評価することが問題視されている。これはマウス小腸で分泌されるFGF15が移植されたヒト肝細胞に作用せず、胆汁酸抑制が起きないためと考えられるが、その分子的機序に関しては未解明である。そこで、本研究ではFGF15/19- β Klotho 内分泌系に種特異性が存在するという仮説の分子基盤を多面的な手法を用いて検証し証明することを目的とした。

2 研究方法

【細胞実験】①内因性にFGFR4と β Klothoを発現する細胞としてHepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞)とH4IIE細胞(ラット肝癌由来細胞)を選択し、それぞれにFGF19、FGF15を添加しERK1/2のリン酸化を評価した。②FGFR4も β Klothoも発現していない細胞としてラット骨格筋由来L6細胞を用いて、マウスもしくはヒト β Klotho、さらにマウスもしくはヒトのFGFR4を共発現させた4つの組み合わせの受容体コンビネーションの細胞を準備した。4つの組み合わせに対してFGF15、19を添加しERK1/2のリン酸化を評価した。③HEK293細胞(ヒト胎児腎細胞)にマウスもしくはヒトのFGFR4(V5タグ付き)と、さらにマウスもしくはヒトの β Klothoを共発現させた6つの組み合わせを作製した。抗V5タグ抗体付きアガロースビーズを用いて免疫沈降を行いFGF15、FGF19の結合を評価した。④H4IIE細胞とHepG2細胞にFGF19もしくはFGF15で刺激を行い、それぞれにおけるCyp7a1遺伝子の発現抑制変動を評価した。⑤ヒトとマウス β Klothoの配列を組み合わせたキメラ β Klotho蛋白質を作製し、③と同様に免疫沈降を行いFGF15との結合に影響を及ぼすマウス β Klothoのアミノ酸配列を評価した。

【動物実験】 β klothoノックアウト(KO)マウスにAAV(アデノ随伴ウイルス)を用いてヒト β Klotho

を遺伝子導入することで肝臓のヒト化を模倣し、さらに FGF19 を投与し Cyp7a1 遺伝子の抑制の有無を評価した。

3 研究成果

【細胞実験】①FGF19 は HepG2 細胞と H4IIE 細胞のどちらにも ERK1/2 のリン酸化を誘導したが、FGF15 は H4IIE 細胞のみに誘導した。②FGF19 は 4 つ全ての組み合わせに対して ERK1/2 のリン酸化を認め、FGF15 はマウスの β Klotho の存在下でのみ ERK1/2 のリン酸化を認めた。③FGF19 はヒト・マウスの全ての組み合わせの β Klotho-FGFR4 複合体に結合を認めたが、FGF15 はマウス β Klotho と FGFR4 との複合体にのみ結合を認め、ヒト β Klotho と FGFR4 との複合体には結合を認めなかった。④FGF19 は H4IIE 細胞と HepG2 細胞の両方において Cyp7a1 遺伝子の発現を抑制し、FGF15 は H4IIE 細胞においてのみ Cyp7a1 遺伝子の発現抑制を認めた。⑤マウス β Klotho 中の独立した 3 か所の領域のアミノ酸配列が FGF15 の結合に影響を及ぼすことが考えられた。

【動物実験】 β Klotho KO マウスの出生率が低く (68 : 160 : 25、 β Klotho^{+/+} / β Klotho^{+/-} / β Klotho^{-/-})、 β klotho KO マウスにヒト β Klotho AAV を投与するも肝臓でのヒト β Klotho の遺伝子発現レベルが内在性の β Klotho の 1/10 以下と非常に低いことが判明した。また、ヒト β Klotho AAV を投与した β klotho KO マウスにおいて FGF19 投与による Cyp7a1 遺伝子の発現抑制は認められず、AAV 投与後の肝臓におけるヒト β Klotho の発現量が低いことが原因である可能性が考えられた。

4 考察

本研究では FGF19 がマウス・ヒトどちらの β Klotho も利用できる一方、FGF15 は共受容体としてマウス β Klotho のみを必要とすることを示した。ヒト β Klotho は FGF15 の FGFR4- β Klotho 複合体への結合や、FGF シグナリングの活性化、そして肝細胞での Cyp7a1 発現の抑制を不可能にしていた。このことは FGF15 が齧歯類の肝細胞のみで活性があり、ヒトの肝細胞においてその作用を発現できないことを示している。また本研究では FGF15 の結合に影響しているマウス β Klotho のアミノ酸配列の存在部位についてマウス・ヒト β Klotho キメラ蛋白質を作製して評価した。その結果マウス β Klotho 中の独立した 3 か所の領域のアミノ酸配列が FGF15 との結合に影響を及ぼすと考えられた。この 3 か所は現在考えられている α Klotho の FGF23 との結合インターフェースから予測すると当てはまる部位であり、マウス β Klotho のリガンド結合インターフェースに相当する部分のアミノ酸配列が FGF15 との結合に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。今後 FGF15 によるシグナル評価と併せて必須ドメインを明らかにしたいと考えている。

ヒト β Klotho AAV を投与した β Klotho KO マウスでは FGF19 の投与による Cyp7a1 遺伝子の発現抑制を認めなかった。AAV による導入ではヒト β Klotho の発現量が顕著に少なく、FGF19 の作用の有無と程度について評価が困難であった。そのため今後の動物実験においてはヒト β Klotho のトランスジェニックマウスを作製し、以後の交配によりマウス β Klotho KO かつヒト β Klotho が導入されたマウスを得た上で実験を進める予定である。

5 結論

本研究では、FGF15/19- β Klotho 内分泌系の種特異性がヒト肝細胞キメラマウスにおける胆汁酸合成異常の原因であることを分子的に検証、証明した。その機序は、FGF19 はマウス・ヒトどちらの β Klotho も共受容体として利用できるが、FGF15 は共受容体として厳密にマウス β Klotho を必要とするという分子基盤であった。すなわち、ヒト肝臓キメラマウスでは、小腸から分泌された FGF15 が置換されたヒト肝臓(ヒト β Klotho)に作用できず、Cyp7a1 遺伝子の過剰発現と胆汁酸の過剰合成が引き起こされる。そのため薬剤代謝研究には FGF15 遺伝子を FGF19 遺伝子に置き換えたヒト肝臓キメラマウスを作製し、より生理的な肝臓応答のもとで評価することが重要と考えられる。