

氏 名	向 井 秀 幸
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 712 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	FGF15/19- $\beta$ Klotho 内分泌系の種特異性の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 高橋 将文 (委 員) 教授 秋元 哲 講師 土屋 裕義

## 論文内容の要旨

### 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  $\beta$ 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- $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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 8Klotho の配列を組み合わせたキメラ 8Klotho 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 8Klotho のアミノ酸配列を評価した。

【動物実験】8klotho 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 8Klotho 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 8Klotho 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 8Klotho-FGFR4 複合体に結合を認めたが、FGF15 はマウス 8Klotho と FGFR4 との複合体にのみ結合を認め、ヒト 8Klotho 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 8Klotho 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】8Klotho KO マウスの出生率が低く (68 : 160 : 25、8Klotho<sup>+/+</sup>/8Klotho<sup>+/-</sup>/8Klotho<sup>-/-</sup>)、8klotho KO マウスにヒト 8Klotho AAV を投与するも肝臓でのヒト 8Klotho の遺伝子発現レベルが内在性の 8Klotho の 1/10 以下と非常に低いことが判明した。また、ヒト 8Klotho AAV を投与した 8klotho 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 8Klotho 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 8Klotho も利用できる一方、FGF15 は共受容体としてマウス 8Klotho のみを必要とすることを示した。ヒト 8Klotho は FGF15 の FGFR4-8Klotho 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 8Klotho のアミノ酸配列の存在部位についてマウス・ヒト 8Klotho キメラ蛋白質を作製して評価した。その結果マウス 8Klotho 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 αKlotho 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 8Klotho 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 8Klotho AAV を投与した 8Klotho 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 8Klotho 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 8Klotho 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 8Klotho KO かつヒト 8Klotho 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、FGF15/19-8Klotho 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 8Klotho 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 8Klotho 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 8Klotho)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。

## 論文審査の結果の要旨

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いる。このうち、FGF19 (齧歯類では FGF15) は、小腸から産生されて肝細胞の 8Klotho/FGFR4 複合体を介してシグナルを伝達し、Cyp7a1 の発現を減少させて胆汁酸合成を抑制することが知られている。申請者は、これまでの報告から FGF15/19-8Klotho 内分泌系に種の特異性が存在するという仮説を持ち、その分子基盤の解明のために本研究を行った。

申請者は、ヒトおよびラット肝細胞 (HepG2 および H4IIE)を用いた解析により、FGF19 はラットとヒト両方の 8Klotho を利用できるが、FGF15 は共受容体としてマウス 8Klotho のみが利用可能であることを明らかにした。このことは、FGF15 が齧歯類の肝細胞のみで活性があり、ヒト肝細胞においては機能できないことを示している。また、マウス・ヒト 8Klotho キメラタンパク質を作製し、マウス 8Klotho 中の独立した 3 か所の領域のアミノ酸配列が FGF15 との結合に重要であることも示した。さらに、申請者は、8Klotho 欠損マウスを作製して肝臓にヒト 8Klotho AAV による遺伝子導入する実験を行ったが、AAV 投与後の肝臓におけるヒト 8Klotho の発現量が低かったため、残念ながら FGF19 投与による影響を評価できなかった。このため、今後はヒト 8Klotho 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 8Klotho KO かつヒト 8Klotho 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。

本研究の目的は明確で、研究方法も妥当であり、FGF15/19-8Klotho 内分泌系の種特異性の分子機序を明らかにした新規性の高い研究であると評価した。また、本研究の成果は、薬剤の代謝評価等に使用されているヒト肝臓キメラマウスの問題やその改善の方策を示唆しており、将来的な医療への応用につながることが期待される。以上のことから、審査員全員一致で本学位論文は博士論文に相応しいと判断した。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験において、申請者は研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で要領よく説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) 細胞実験と動物実験で精製方法の異なる FGF15/19 を用いているが、なぜか
- 2) マウス・ヒト 6Klotho キメラタンパク質の作製では、どのような根拠のもとに切断（結合）部位を設定したのか
- 3) FGF15/19-6Klotho 内分泌系の齧歯類とヒトでの相違に関して、進化の面ではどのように考えられるか
- 4) 6Klotho 欠損マウスの作製方法やこのマウスの出生率が予想よりも低かった理由、性差による違いなどについて
- 5) AAV に関して、AAV8 セロタイプを選択した理由、作製方法や投与方法、実験を行ったタイムコース、対照群の有無などについて

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答した。一部の質問に関しては、検討されていない、あるいはこれから検討予定とのことで、申請者自身の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、一部の指摘事項について、適切に修正かつ加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。