

令和元年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05326

研究課題名(和文) インクレチン分泌機構の統合的理解：GIPならびにGLP-1分泌の共通点と相違点

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of incretin secretion: similarities or differences of GIP and GLP-1 secretion

研究代表者

稲垣 暢也 (Inagaki, Nobuya)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30241954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡・共焦点顕微鏡を用いた検討で、脂肪摂取によるFABP5のK細胞核内から核外への局在変化が示唆された。FABP5欠損マウスK細胞ではRegulator of G protein signaling 4 (RGS4)の発現が上昇していることが明らかとなった。GPR120とGPR40は双方とも油脂摂取時のGIP分泌に関与しているが、GPR120はCCK分泌を介して間接的にGIP分泌を制御していることが明らかとなった。またL細胞で高い発現を示す炭酸脱水酵素8 (Carbonic anhydrase 8; Car8)が脂肪酸刺激に対するGLP-1分泌を負に制御することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満・2型糖尿病患者の数は増加の一途をたどっており、全世界的に重要な健康問題であるが、有効かつ安全性の高い治療法は未だ確立されていないのが現状である。本研究で注目しているインクレチンはその治療標的として大変有望であり、GIP制御に関わる重要な分子としてFABP5に、GLP-1分泌制御に関与するものとしてCar8に着目し、作用機構の解明に着手している。本研究の結果、薬剤によるFABP5、Car8の制御を介してインクレチン分泌制御が可能となれば、糖尿病・肥満症の新たな治療法の開発、創薬につながる事が期待され研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We examined FABP5 localization in K-cells before and after oral fat intake using electron microscopy and confocal microscopy. FABP5 was present both in the nucleus and in the cytoplasm of K-cells before loading. In contrast, 60 minutes after fat loading, the intranuclear localization has disappeared. The expression of Regulator of G protein signaling 4 (RGS4) was found to be elevated in the K cells of FABP5-deficient mouse. We clarified that both GPR120 and GPR40 are involved in GIP secretion after fat intake. It is suggested that GPR40 expressed in K-cells directly sense LCFA, and in contrast, GPR120 expressed in I-cells indirectly regulates GIP secretion in the presence of bile via CCK secretion. We also obtained results suggesting that carbonic anhydrase 8 (Car8), which shows high expression in L-cells, negatively regulates GLP-1 secretion in response to fatty acid stimulation.

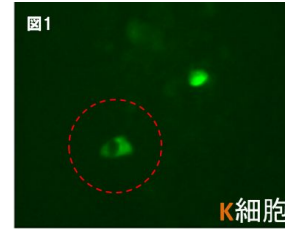
研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：インクレチン分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Gastric inhibitory polypeptide(GIP)と glucagon-like peptide- (GLP-1) は炭水化物や脂質、たんぱく質などの栄養素の摂取によってそれぞれ腸管内分泌 K 細胞ならびに L 細胞から分泌され、膵細胞上の受容体を介してインスリン分泌を促進するインクレチンである。申請者はこれまでに、高脂肪食の経口摂取が GIP 分泌を強力に促進し、肥満を誘導することを明らかにしてきた(Naito R, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008, Nasteska D, et al Diabetes 2014)。脂質摂取が GIP 分泌を強く促進する機序を明らかにする目的で、GIP 遺伝子部位に GFP を挿入することにより K 細胞が GFP で標識されたノックインマウス (GIP-GFP マウス) を作製し (Suzuki K, et al. J. Biol. Chem., 2013) (図 1)、単離した小腸 K 細胞の網羅的遺伝子解析を行うことにより、K 細胞に特異的に発現する遺伝子を単離・同定した。特に脂肪酸結合たんぱく質の一つである fatty acid binding protein 5 (FABP5)(Sibue K, et al. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2015) や脂肪酸の受容体として知られる G 蛋白質共役受容体の一つ GPR120 (Iwasaki K, et al. Endocrinology 2015) が K 細胞特異的に発現し、これらの欠損マウスでは脂質の単回経口投与による GIP 分泌が有意に抑制されることから、FABP5 や GPR120 が脂質摂取(急性刺激)による GIP 分泌に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに最近、申請者らは脂質摂取による GIP 分泌促進には胆汁が同時に存在することが必須であることも報告した。しかしながら、FABP5 や胆汁がどのようなメカニズムで脂質摂取による GIP 分泌を修飾するのかについては全く明らかではない。また GIP を分泌する K 細胞が上部小腸に分布しているのに対して、GLP-1 を分泌する L 細胞は下部小腸や大腸に多く分布している。さらに、GIP は脂肪摂取によって強力に分泌が誘導されるのに対して、GLP-1 分泌はアミノ酸によってより分泌刺激を受けやすいなど、分泌特性も異なる (Harada N, et al. J. Diabetes Investig. 2011, Yamane S, et al J. Diabetes Investig. 2012) が、K 細胞と L 細胞の分布や特性の違いなどの詳細についてはいまだに不明な点も多い。



### 2. 研究の目的

FABP5・胆汁の GIP 分泌修飾メカニズムを明らかにする。また、L 細胞の遺伝子発現プロファイルと K 細胞と比較し、K 細胞と L 細胞の特性の共通点と相違点を明確にする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 脂肪誘導性 GIP 分泌における FABP5 作用メカニズムの解明

FABP5 の細胞内局在に関する組織学的検討

脂肪摂取後の K 細胞における FABP5 細胞内局在の変化を明らかにするため、野生型マウス (n=3) に対し 16 時間の絶食後に経口脂肪負荷を行い、負荷前と負荷後一定時間 (30 分後、60 分後、120 分後) で上部小腸を摘出、一次抗体を抗 FABP5 抗体、二次抗体を immunogold とした pre-embedding immunogold silver staining を行い電子顕微鏡で観察した。またさらに GIP-GFP ノックインマウス (n=3) に同様の脂肪負荷および糖負荷を行った後、小腸を摘出し、一次抗体として抗 FABP5 抗体および抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

慢性的 FABP5 欠損に伴う K 細胞の質的変化の検討

慢性的な FABP5 作用の欠失による K 細胞の質的変化を評価するため、K 細胞のマイクロアレイ解析により、発現プロファイルを FABP5 欠損マウス、野生型マウスで比較した。

#### 2) 脂質による GIP 分泌における胆汁および脂肪酸受容体の関与に関する検討

脂肪摂取時 GIP 分泌における脂肪酸受容体 (GPR120、GPR40) の役割に関しては、未検討であった。GPR120 ノックアウトマウス (GPR120KO)、GPR40 ノックアウトマウス (GPR40KO) にコーン油を経口摂取させた際の GIP 分泌を評価した。

#### 3) L 細胞の遺伝子発現プロファイルおよび発現遺伝子の機能検討

名古屋大学の林良敬博士との共同研究により、グルカゴン(Gcg)遺伝子に GFP をノックインした L 細胞可視化マウス (Gcg-GFP ノックインマウス) (Hayashi Y, et al. Mol Endocrinol. 2009) を用いて L 細胞を単離回収し、マイクロアレイ解析を行って L 細胞に特異的に発現する分子を同定する。マウス腸管腫瘍株 STC-1 を用いて同定分子の siRNA によるノックダウンや発現プラスミドによる強発現下の GLP-1 遺伝子発現量や GLP-1 分泌量を評価し、同定分子の GLP-1 遺伝子発現や分泌への関与を確認する。同定分子の欠損マウスおよび強発現マウスを用いて腸管内の L 細胞数や L 細胞内 GLP-1 発現量を評価する。

## 4. 研究成果

### 1) 脂肪誘導性 GIP 分泌における FABP5 作用メカニズムの解明

FABP5 の細胞内局在に関する組織学的検討  
 FABP5 は負荷前には K 細胞の核内・細胞質両方に存在していたが、脂肪負荷 60 分後には核内の局在は消失していた(図 2)。さらに免疫組織染色標本を共焦点顕微鏡で観察したところ、脂肪負荷後 60 分で FABP5 核内染色性の一過性低下を認めた(図 3)。経口糖負荷後の観察では、FABP5 の細胞内局在変化は認めなかった(図 4)。

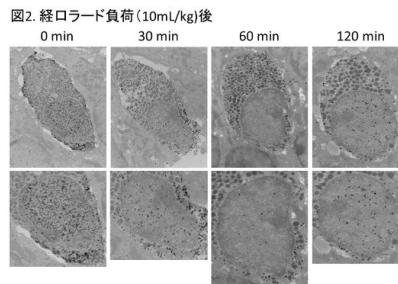


図2. 経口ラード負荷(10mL/kg)後  
0 min 30 min 60 min 120 min  
脂肪摂取後60分で、核に局在するFABP5が減少

慢性的 FABP5 欠損に伴う K 細胞の質的変化の検討

特に脂肪酸受容体や脂肪酸トランスポーター、SREBPs (Sterol regulatory element-binding proteins)、ChREBP (Carbohydrate Responsive Element

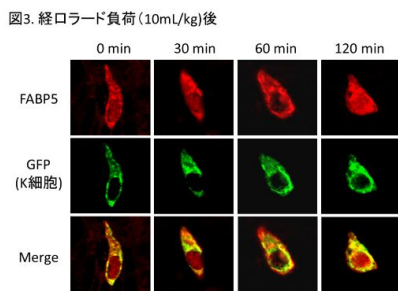


図3. 経口ラード負荷(10mL/kg)後  
0 min 30 min 60 min 120 min  
ラード負荷60分後に、FABP5抗体による核の染色性低下

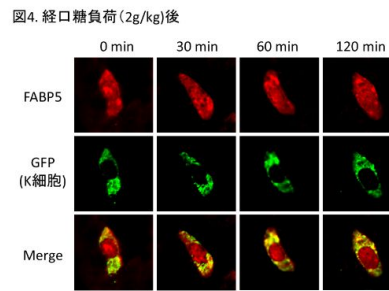


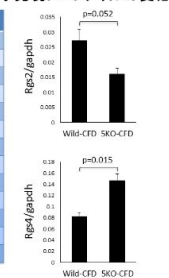
図4. 経口糖負荷(2g/kg)後  
0 min 30 min 60 min 120 min  
グルコース負荷では、核・細胞質の染色性に経時的変化なし

Binding Protein)、PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors)など脂肪酸摂取や代謝・栄養状態の感知、細胞応答に関連する分子の発現に着目したが、明らかな発現の差は認めなかった。一方 GTPase-activating protein (GAP) としての作用により、G の活性を負に制御するタンパク群のひとつである G タンパク質シグナル伝達調節因子 4 (Regulator of G protein signaling 4: RGS4)の発現が、FABP5 欠損マウスの K 細胞で野生型マウスの K 細胞よりも有意に高く、real-time PCR による検討でも同様の結果であった(図 5)。脂肪酸受容体の下流シグナルを、FABP5 が RGS4 を介して制御している可能性が示唆されたが、詳細な機序に関してさらなる解析に着手している。

図5. FABP5欠損によるK細胞内の遺伝子発現プロファイルの変化

Signal (n=3)	野生型	FABP5欠損
Slc27A2(Fatp2)	246.9801	339.1281
Slc27A4(Fatp4)	611.4328	515.6967
Fabp1	7796.783	7346.122
Fabp2	7896.346	7305.259
Fabp5	6074.667	60.50887
Fabp6	4709.947	3137.13
Srebf1(Srebp1)	114.7014	120.8791
Srebf2(Srebp2)	241.4204	161.5615
Ppara	214.0269	212.4694
Ppard	248.3787	255.4651
Pparg	104.6198	129.5131
Rgs2	215.1718	132.6411
Rgs4	655.4719	1222.135067

\* p<0.05



### 2) 脂質による GIP 分泌における胆汁および脂肪酸受容体の関与に関する検討

GPR120 ノックアウトマウス (GPR120KO)、GPR40 ノックアウトマウス (GPR40KO) にコーン油を経口摂取させた際の GIP 分泌は、野生型マウス (WT) に比べて、それぞれ 50%、20%に低下していた(図 6)。さらに GPR120KO、GPR40KO では WT と比べ、脂肪摂取後の CCK 分泌の有意な低下と胆嚢収縮の障害を認めた。CCK アナログの投与により、GPR120KO ではコーン油摂取時の GIP 分泌が回復したのに対し、GPR40KO では部分的な回復に留まった(図 7)。なお GPR120KO、GPR40KO の K 細胞数、K 細胞の GIP 含量、GPR119、TGR5、FXR の mRNA 発現量は WT と比べて有意な差を認めなかった。これらの結果から、GPR120 と GPR40 は双方ともコーン油摂取時の GIP 分泌に関与しているが、その機序は異なり、GPR120 は CCK 分泌・胆汁分泌を介して間接的に GIP 分泌を制御していることが示唆された (Sankoda A et al., *Endocrinology*. 158(5):1172-1180. 2017)。

図6. コーン油(10mL/kg)経口投与後の血中GIP濃度

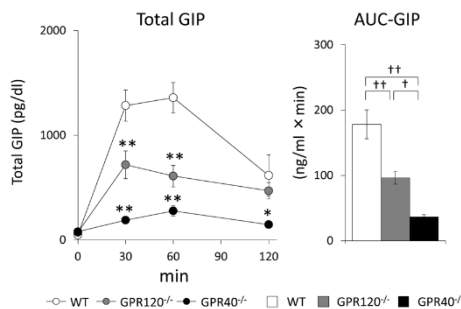
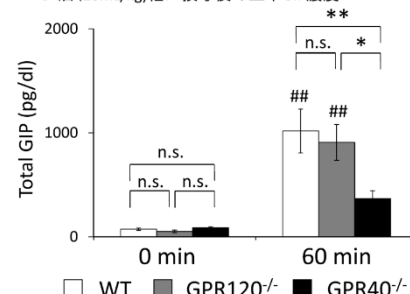


図7. CCKアナログ投与下でのコーン油(10mL/kg)経口投与後の血中GIP濃度



### 3) L 細胞の遺伝子発現プロファイルおよび発現遺伝子の機能検討

L 細胞のマイクロアレイ解析の結果から、L 細胞に

において高い発現を認める炭酸脱水酵素 8 (carbonic anhydrase 8: Car8) に関して機能解析に着手している。Car8 は中枢神経系において IP3 受容体を介した小胞体からのカルシウム流出制御に関わることが報告されている。すでに腸管内分泌細胞株である STC-1 で、Car8 をノックダウンすることで長鎖脂肪酸刺激による GLP-1 分泌が増強、過剰発現により減弱することを確認していた。今後は下記の検討を予定している。

腸管内分泌細胞株 STC-1 を用いて (in vitro)

Car8 による GLP-1 分泌制御経路の検討  
PLC-IP3R 経路の関与を PLC 阻害薬、IP3 受容体阻害薬を用いて検討する。

Car8 による STC-1 細胞内カルシウム濃度制御の評価  
Car8 のノックダウン、過剰発現時の細胞内カルシウム濃度を、蛍光プローブ Fura2 を用いて測定する。

5 . 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 4 件)

Suzuki K, Iwasaki K, Murata Y, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Shibue K, Joo E, Sankoda A, Fujiwara Y, Hayashi Y, Inagaki N. Distribution and hormonal characterization of primary murine L cells throughout the gastrointestinal tract. *J Diabetes Investig*. 2018 Jan;9(1):25-32. doi: 10.1111/jdi.12681.

Sankoda A, Harada N, Iwasaki K, Yamane S, Murata Y, Shibue K, Thewjitcharoen Y, Suzuki K, Harada T, Kanemaru Y, Shimazu-Kuwahara S, Hirasawa A, Inagaki N. Long-Chain Free Fatty Acid Receptor GPR120 Mediates Oil-Induced GIP Secretion Through CCK in Male Mice. *Endocrinology*. 2017 May 1;158(5):1172-1180. doi: 10.1210/en.2017-00090.

Shimazu-Kuwahara S, Harada N, Yamane S, Joo E, Sankoda A, Kieffer TJ, Inagaki N.

Attenuated secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) does not alleviate hyperphagic obesity and insulin resistance in ob/ob mice. *Mol Metab*. 2017 Jan 19;6(3):288-294. doi: 10.1016/j.molmet.2017.01.006.

Joo E, Harada N, Yamane S, Fukushima T, Taura D, Iwasaki K, Sankoda A, Shibue K, Harada T, Suzuki K, Hamasaki A, Inagaki N. Inhibition of Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor Signaling in Adipose Tissue Reduces Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Mice. *Diabetes*. 2017 Apr;66(4):868-879. doi: 10.2337/db16-0758.

〔学会発表〕(計 8 件)

池口絵理 渋江公尊 Yotsapon Thewjitcharoen 山根俊介 原田範雄 原田貴成 藤原雄太鈴木和代 大和田祐二 稲垣暢也 脂肪酸結合タンパク 5 (FABP5) の腸管内分泌 K 細胞における局在に関する検討 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 (名古屋) 2017/5/18-20

三小田亜希子 原田範雄 岩崎可南子 山根俊介 村田由貴 金丸良徳 鈴木和代 渋江公尊 原田貴成 城尾恵里奈 平澤明 稲垣暢也. 長鎖脂肪酸受容体 GPR120 と GPR40 は異なる機序で脂肪摂取時の GIP 分泌に関与する 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 (名古屋) 2017/5/18-20

Shunsuke Yamane. FABP5 is an essential modulator of fatty acid-induced GIP secretion in enteroendocrine K cells 3rd Korea-Japan Diabetes Forum (釜山) 2017/5/12

Kimitaka Shibue, Yotsapon Thewjitcharoen, Shunsuke Yamane, Norio Harada, Takanari Harada, Yuta Fujiwara, Kazuyo Suzuki, Yu Wang, Keiko Furuta, Yuji Owada, Nobuya Inagaki. Subcellular Translocation of Fatty Acid-Binding Protein 5 (FABP5) in Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP)-Producing K-Cells: Re-Emerging Role of Transmission Electron Microscope ENDO2017 (Orlando, Florida) 2017/4/1

Sankoda A, Harada N, Iwasaki K, Yamane S, Murata Y, Shibue K, Thewjitcharoen Y, Suzuki K, Harada T, Kanemaru Y, Shimazu-Kuwahara S, Hirasawa A, Inagaki N. Long chain free fatty acid receptor GPR120 mediates oil-induced GIP secretion through CCK in mice. Asia Islet Biology and Incretin Symposium (AIBIS) 2017/3/3-4

Harada N, Yamane S, Inagaki N. Role of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Asia Islet Biology and Incretin Symposium (AIBIS) 2017/3/3-4

原田範雄 山根俊介 稲垣暢也. Effect of fat intake on GIP secretion from enteroendocrine K cells 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016/5/19-21

渋江公尊 Thewjitcharoen Yotsapon 山根俊介 原田範雄 原田貴成 藤原雄太 鈴木和代 大和田祐二 稲垣暢也. 脂肪酸結合タンパク FABP5 を介した GIP 分泌制御機構の解明-免疫電顕法を用いた腸管内分泌 K 細胞の微細形態評価に関する研究 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016/5/19-21

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。