

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05652

研究課題名(和文)遊離脂肪酸受容体によって制御されるエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of regulatory mechanisms of energy homeostasis via free fatty acids receptors

研究代表者

市村 敦彦 (Atsuhiko, Ichimura)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：10609209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、体内で脂肪酸をリガンドとしその感知とエネルギー代謝制御を担う脂肪酸受容体の生理機能の解明を目指して研究を行った。脂肪酸受容体のうちでも、中鎖遊離脂肪酸を受容体とするGPR120に着目し、組織特異的な生理機能を解明するべく、部位特異的欠損マウスの作出を試みた。その結果、GPR120のエクソン1をはさんでLoxP配列が挿入されたGPR120 floxedマウスの取得に成功した。また、このマウスと全身におけるCre発現マウスの交配によりGPR120全身欠損マウスの取得にも成功した。今後、進行中の各種脂肪組織や単球における欠損マウスの取得と解析を通じてさらなる研究の発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the physiological functions of fatty acid receptors responsible for sensing and controlling energy metabolism. Among fatty acid receptors, we focused on GPR 120, which is a medium long-chain free fatty acid receptor, and attempted to create tissue-specific gene deficient mice to elucidate tissue-specific physiological functions. As a result, we have generated GPR 120 floxed mouse with LoxP sequence inserted with exon 1 of GPR 120 genomic sequences. We also have successfully obtained GPR120 systemic deficient mice by crossing GPR120 floxed mice with systemic Cre expressing mice. In the future, further research development is expected through acquisition and analysis of deficient mice in various adipose tissues and monocytes in progress.

研究分野：分子薬理学

キーワード：脂肪酸 受容体 GPCR エネルギー代謝 肥満 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

GPR40 ファミリー (GPR40, 41, 43) や GPR120 等の遊離脂肪酸 (短鎖、中鎖、長鎖) を天然リガンドとする受容体群が見出されたことで、“遊離脂肪酸受容体”という概念が確立され、脂肪酸が単なる栄養源としてだけでなく、シグナル伝達物質として様々な生理機能を担っていることが明らかにされてきた。これらの受容体は、食事に含まれる遊離脂肪酸や、体内で合成される遊離脂肪酸のうち、特定の鎖長・不飽和度のもを特異的に認識することで生理機能を発揮することから、“外部環境と生体内ホメオスタシスのコミュニケーション”を司っていると想定される。そのため、脂肪酸受容体は、食事に含まれる物質からのシグナルを感知して生体機能を制御するセンサーとして機能しており、脂肪酸受容体が中核となるエネルギー代謝制御システムが存在すると想定される。

本研究を開始するまでに、長鎖遊離脂肪酸受容体 GPR120 に注目し、これを欠損したマウスを作出して解析した結果、脂肪細胞に発現している GPR120 が外部環境である高脂肪食に応じて脂肪細胞分化を制御し、全身のエネルギー代謝を調整していることを見出した。GPR120 を全身で欠損したマウスは、高脂肪食負荷に依存して肥満し、糖尿病様の糖代謝異常を示すことが分かった。更に、ヒトにおける GPR120 非同義アミノ酸置換変異 (R270H) が GPR120 の機能不全を引き起こすとともに、肥満と相関することを見出し、最近報告した (Ichimura A. et al., Nature, 483: 350-354, 2012)。GPR120 はエネルギー代謝調節を担う脂肪酸受容体として注目されており、マクロファージで発現する GPR120 が  $\omega$ 3 脂肪酸の抗炎症効果を媒介しており、インスリン抵抗性の改善に資することが報告されている (Oh D Y et al., Cell, 142: 687-98, 2010)。この生理機能を利用し、低分子化合物による GPR120 の活性化により、肥満時の炎症、インスリン抵抗性、脂肪肝を改善できることが示されている (Oh D Y et al., Nat Med. 20: 942-7, 2014)。他方、短鎖脂肪酸受容体である GPR41 が交感神経に発現しており、腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸や、飢餓時等に生じるケトン体が GPR41 を介して交感神経を直接制御することで、エネルギーのホメオスタシスを維持していることも見出していた (Kimura I. et al., PNAS, 108: 8030-8035, 2011)。このように、個々の脂肪酸受容体が果たしている役割は徐々に明らかになってきているものの、GPR120 を始めとした脂肪酸受容体の担う生理機能の詳細と全容は未だ不明であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、未解析の組織を含めた GPR120 の生理機能を組織特異的に解明することを試みた。脂肪酸受容体組織特異的欠損動物を解析することにより、脂肪酸受容体が担っているエネルギー代謝調節機構の全容

と生理・病態における役割を解明し、脂肪酸受容体を標的とする治療薬創成へ資することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

GPR120 の発現部位のうち、エネルギー代謝に寄与が大きいと考えられる組織における特異的遺伝子欠損マウスを作出し、その表現型を解析することにより、GPR120 の組織特異的な機能を解明するとともに、全身のエネルギー代謝に対してもっとも重要な組織を同定することを試みた。具体的には GPR120 の遺伝子配列のうちエクソン 1 を LoxP 配列で挟んだタゲティングベクターを作製し、それを遺伝子組換えによりマウスゲノム DNA に組み込むことにより、生殖系列に変異遺伝子をもった遺伝子組換えマウスを作出する。薬剤耐性遺伝子を除去し、外来遺伝子として LoxP 配列のみをもつマウスを取得する。GPR120 は、白色および褐色脂肪組織、マクロファージに代表される単球細胞、腸管などに発現しそれぞれの組織や細胞において生理機能を発揮することにより全身のエネルギー代謝を調節していると考えられる。当初は白色脂肪組織における遺伝子欠損のみを想定していたが、研究期間中に GPR120 が褐色脂肪細胞や白色脂肪組織中に出現する褐色脂肪様細胞において熱産生に関与することが報告された。これらの知見に基づき、一種類の組織でのみ遺伝子欠損を行うよりも、複数の組織での欠損マウスを並行して解析することが必要であるとの着想を得た。そこで、白色脂肪組織特異的 CRE 発現マウスとして AdipoQ-Cre マウス、褐色脂肪組織特異的 CRE 発現マウスとして UCP1-Cre マウス、単球細胞特異的 CRE 発現マウスとして Lyz2-Cre マウスをジャクソンラボラトリーより入手した。これらのマウスを作出した GPR120 floxed マウスと交配し、それぞれの組織で特異的に GPR120 を欠損した部位特異的遺伝子欠損マウスの作出を試みた。更に、これらのマウスの対照群とすることを目的とし、全身の細胞において CRE を発現する CAG-Cre マウスとの交配も同様に行い、全身にて GPR120 を欠損したマウスを作出した。

これらと並行して、GPCR などの細胞膜受容体への刺激に応じて小胞体からカルシウムを放出する際、電荷のバランスを取ることによって持続的なカルシウム放出を補助するカウンターイオンチャンネル TRIC-B に着目した。本カルシウムイオンチャンネルの遺伝子変異がヒトにおいて骨形成不全症の原因となっていることが報告されていることから、TRIC-B チャンネルは骨形成時になんらかの生理的役割を担っているものと想定された。しかしながら、多様なヒト変異体の病態からみでは分子病態学的解析は困難であったため、独自に作出した *Tric-b* 欠損マウスを解析することにより、TRIC-B チャンネルが骨形成において果たしている役割の解明を行った

更に、軟骨細胞における細胞内カルシウム

制御機構に着目し、その分子機構並びに生理機能との関連について調べた。

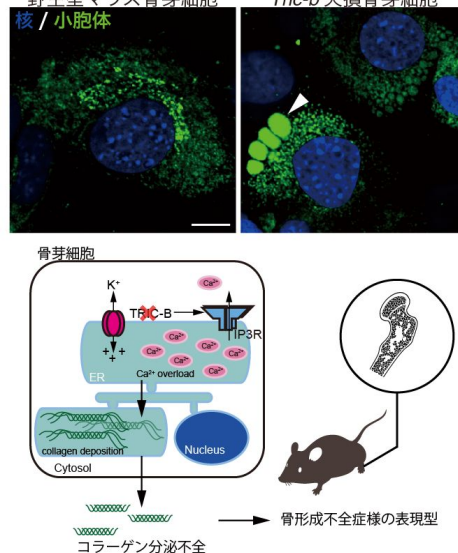
#### 4. 研究成果

GPR120 のゲノム配列からエクソン 1 の両端を標的とした相同性組み換えを行うことによって、GPR120 エクソン 1 を LoxP 配列ではさんだマウスの取得した。本マウスから薬剤耐性遺伝子を除去し、外来遺伝子として LoxP のみを持つ GPR120floxed の作出に成功した。この GPR120floxed マウスを、全身で CRE リコンビナーゼを発現する CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配することにより、全身において GPR120 を欠損した系列を樹立した。GPR120floxed マウスと GPR120 全身 KO マウスに対して 60%高脂肪食を 5 週齢から負荷し 16 週齢に至るまで体重を計測したところ、過去の検討結果と同様に、高脂肪食負荷した状態下において、GPR120 全身欠損マウスにおいては野生型よりも統計学的に有意な体重増加を示した。このとき、肝臓及び脂肪組織重量においても有意な差が認められた。これらのことから、過去の報告同様に、新規に作出した GPR120 全身欠損マウスにおいても、生活習慣病様の表現型が出現することが明らかとなった。続いて、GPR120 を白色脂肪組織、褐色脂肪組織及び単球系免疫細胞において特異的に欠損したマウスを作出するため、それぞれ AdipoQ-Cre トランスジェニックマウス、UCP1-Cre トランスジェニックマウス及び Lyz2-Cre トランスジェニックマウスをジャクソンラボラトリーより購入して繁殖を行った。その上で、GPR120floxed マウスと交配を行い、それぞれの組織特異的 GPR120 欠損マウスの取得及び解析を実施している。

ヒト骨形成不全症の原因遺伝子として報告されていたものの、病理学的メカニズムは不明であった小胞体カOUNTERイオンチャンネル TRIC-B の骨形成における生理機能について、遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。Tric-b 欠損マウスは肺胞上皮のサーファクタント分泌不良による新生致死性を示すとともに、ヒト変異患者同様全身性の骨密度低下も呈する。この変異マウスでは軟骨内骨化とともに膜内骨化も障害されており、骨芽細胞の機能低下または破骨細胞の機能亢進が強く疑われた。初代培養骨芽細胞を用いた実験から、Tric-b 欠損により骨芽細胞のコラーゲン合成が障害されることが示された。即ち、Tric-b 欠損骨芽細胞では IP<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup> 放出が抑制され、小胞体に Ca<sup>2+</sup> が過剰貯留することが原因となり、小胞体が膨潤化するとともに未成熟コラーゲンが貯留する。これらの表現型は、Tric-b cDNA の強制発現により回復することも確認した。コラーゲン翻訳後修飾を担う小胞体内腔酵素群は Ca<sup>2+</sup> 感受性であり、Tric-b 欠損による Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇により障害され、小胞体ストレス応答を伴う未修飾コラーゲン貯留が引き起こされるものと推定

される。そのため、Tric-b 欠損マウスでは骨基質コラーゲン量が低下し、石灰化の工程が障害されることになる (下図)。

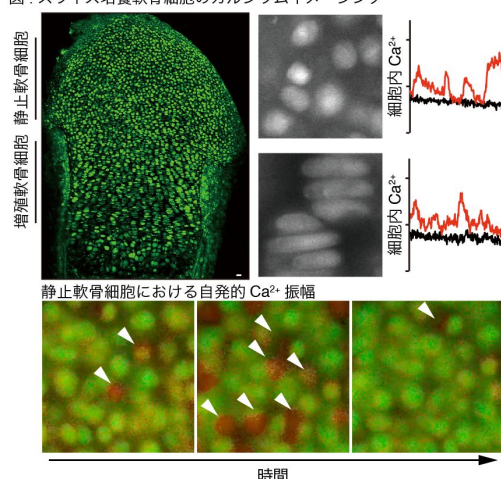
図：小胞体イオンチャンネル欠損マウスの表現型  
野生型マウス骨芽細胞 Tric-b 欠損骨芽細胞



以上の成果を *Science Signaling* 誌にて発表し (Zhao C & Ichimura A et al., *Sci Signal.* 2016)、総説にて解説を行った (Ichimura & Takeshima, *Biol Pharm Bull.*, 2016)。

Tric-b 欠損マウスの軟骨細胞にも異所的な細胞死が観られるなど野生型マウスと比較して異常が観察されたため、次に軟骨細胞における細胞内 Ca<sup>2+</sup> 制御と生理機能における TRIC-B の生理機能を解明しようと試みた。この過程において、軟骨細胞における正常な Ca<sup>2+</sup> 動態やその生理機能の詳細が不明であること、及び、培養細胞系や初代培養細胞を用いた既存の実験系だけではこれらの解明が困難であることを認識するに至った。そこで、マウス大腿骨端の軟骨組織を薄切し、Ca<sup>2+</sup> インジケータを導入した上で、水深レンズを装備した蛍光顕微鏡でリアルタイムかつ経時的に観察する新たな実験系を構築した (下図)。

図：スライス培養軟骨細胞のカルシウムイメージング



この新たな手法を用いることで、これまで技術的制約により困難であった軟骨細胞の形態と組織中の位置や、遺伝子発現の情報

をふまえた Ca<sup>2+</sup>動態の解析が可能となった。本手法を用いて野生型マウスの軟骨細胞を観察した結果、自発的かつ不規則な Ca<sup>2+</sup>振幅が観られることを見出した。関連候補分子の薬理的スクリーニングと遺伝子網羅的発現解析により、これまで軟骨における Ca<sup>2+</sup>動態制御について報告のなかった二価カチオンチャネル TRPM7 が自発的 Ca<sup>2+</sup>振幅の制御を担っていることを明らかとした。また、これらの分子機構を通じた細胞内カルシウム制御によって軟骨細胞の増殖や段階的な機能的成熟の一部を制御していることを明らかとした。

#### 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 11 件)

1. Koshimizu T, Honda K, Nagaoka-Uozumi S, Ichimura A, Kimura I, Nakaya M, Sakai S, Shibata K, Ushijima K, Fujimura A, Hirasawa A, Kurose H, Tsujimoto G, Tanoue A, Takano Y, Complex formation between the vasopressin 1b receptor,  $\beta$ -arrestin 2 and the  $\mu$ -opioid receptor underlies morphine tolerance, *Nature Neuroscience* 2018 Jun;21(6):820-833. doi: 10.1038/s41593-018-0144-y
2. Miyazaki Y<sup>†</sup>, Ichimura A<sup>†</sup>, Sato S, Fujii T, Oishi S, Sakai H, Takeshima H. <sup>†</sup>, contributed equally, The natural flavonoid myricetin inhibits gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase., *Eur J Pharmacol.* 2018 Feb 5;820:217-221.
3. Takei D, Nishi M, Fukada S, Doi M, Okamura H, Uezumi A, Zhang L, Yoshida M, Miyazato M, Ichimura A, Takeshima H., Gm7325 is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells. *Biomed Res.* 2017;38(3):215-219.
4. Honjo K, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Shimazu H, Eiamboonsert S, Dhahri D, Ichimura A, Dan T, Miyata T, Takeda K, Sakamoto K, Hattori K, Heissig B., Plasminogen activator inhibitor-1 regulates macrophage-dependent postoperative adhesion by enhancing EGF-HER1 signaling in mice. *FASEB J.* 2017 Jun;31(6):2625-2637.
5. Ichimura A, Takeshima H, TRIC-B Mutations Causing Osteogenesis Imperfecta, *Biological Pharmaceutical Bulletin* Vol. 39 (2016) No. 11 p. 1743-1747,
6. 市村敦彦, 趙成珠, 竹島浩, TRIC-B 遺伝子変異による骨形成不全症 Osteogenesis imperfect caused by TRIC-B mutations, *医学のあゆみ*
7. Zhao C<sup>†</sup>, Ichimura A<sup>†</sup>, Qian N, Iida T, Yamazaki D, Noma N, Asagiri M, Yamamoto K, Komazaki S, Sato C, Aoyama F, Sawaguchi A, Kakizawa S, Nishi M, Takeshima H., <sup>†</sup>, contributed equally, Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci Signal.* 2016 May 17;9 (428):ra49.
8. Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, Ichimura A, Nakajima A, Kimura I., Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 25;17(4):450.
9. Placencio VR, Ichimura A, Miyata T, DeClerck YA., Small Molecule Inhibitors of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Elicit Anti-Tumorigenic and Anti-Angiogenic Activity. *PLoS One.* 2015 Jul 24;10(7):e0133786.

10. *PLoS One*. 10(4):e0124510. 2015 April, Pelisch N, Dan T, **Ichimura A**, Sekiguchi H, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T., Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5484 Attenuates Demyelination and Axonal Degeneration in a Mice Model of Multiple Sclerosis.
11. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, **Ichimura A**, Kimura I., Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation. *Nutrients*. 14;7(4):2839-2849. 2015 Apr

〔学会発表〕(計6件)

1. 宮崎侑, **市村敦彦**, 佐藤駿, 藤井拓人, 大石真也, 酒井秀紀, 竹島浩, フラボノイドミリセチンは胃の H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase を抑制する, 日本薬学会 第 138 回年会, 2018 年 3 月 25-28 日, 金沢
2. Nianchao Qian, Atsuhiko Ichimura, Daisuke Takei, Hua Zhu, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Spontaneous Ca<sup>2+</sup> fluctuations mediated by TRPM7 channels in growth plate chondrocytes, Biophysical society 62nd Annual Meeting, 2018 年 2 月, San Francisco, USA
3. 趙成珠, 市村敦彦, 山本浩司, 竹島浩, TRIC-B チャネルの骨形成と骨芽細胞における生理機能の解析, 日本薬学会 第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, 横浜
4. 銭年超, 市村敦彦, 朝霧成拳, 竹島浩, TRIC-B チャネルの骨形成と破骨細胞における生理機能の解析, 日本薬学会 第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, 横浜

5. Chengzhu Zhao, Nianchao Qian, Atsuhiko Ichimura, Daiju Yamazaki, Masataka Asagiri, Koji Yamamoto, Shinji Komazaki, Miyuki Nishi, and Hiroshi Takeshima, Compromised Collagen Production in Tric-b-knockout Osteoblast, Biophysical society 60th Annual Meeting, 2016 年 2 月, LOS ANGELES, USA

6. 市村 敦彦, ストレスに適応する生体恒常性の制御機構の解明と創薬応用, 京都大学学祭融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット 第 5 回シンポジウム, 2015 年 12 月 25 日, 京都

〔図書〕(計1件)

Atsuhiko Ichimura\*

Chapter Title: Polymorphic Variation in FFA Receptors: Functions and Consequences  
*Free Fatty Acid Receptors book series Handbook of Experimental Pharmacology* (<http://www.springer.com/series/164>), 2017;236:133-158.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

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

取得状況(計 件)

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

〔その他〕

ホームページ等  
研究者紹介ページ  
<http://k-connex.kyoto-u.ac.jp/ja/researcher/atsuhiko-ichimura>  
研究成果の紹介  
<http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/re>



6 . 研究組織

(1)研究代表者

市村 敦彦 (ICHIMURA, Atsuhiko)  
京都大学・大学院薬学研究科・特定助教  
研究者番号: 10609209

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

( )