

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860054

研究課題名(和文) 糖尿病・肥満に伴う慢性炎症における脂肪酸受容体GPR120の分子機序の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of GPR120 in chronic inflammation in diabetes and obesity-related metabolic disorders.

研究代表者

原 貴史 (Hara, Takafumi)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：90546722

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)：GPR120は、これまでにエネルギー代謝との関連から解析が進んでいる。近年、糖尿病や肥満に関連する炎症応答との関連が示唆されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。これまでにGPR120は、マクロファージにおける発現が報告されていたが、今回、GPR120が樹状細胞に発現し、特定のサブセットに局在していることを確認した。また、樹状細胞における炎症惹起が、GPR120のリガンド刺激により抑制されることが示唆された。GPR120遺伝子改変マウスの解析からは、GPR120が樹状細胞の分化や炎症関連疾患の病態制御に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Free fatty acid receptors (FFARs) are G-protein coupled receptor activated by fatty acids. GPR120 is one of the FFARs specifically activated by medium- to long-chain fatty acids such as omega-3 fatty acids like DHA and EPA. It is reported that GPR120 plays important roles in the regulation of energy metabolism and inflammatory responses, however, the molecular mechanisms of GPR120 on the inflammatory responses remain to be elucidated in detail. DNA expression database analysis suggested that GPR120 is expressed on macrophages and dendritic cells. The expression of GPR120 mRNA in mouse dendritic cells was enriched in a certain of DC subpopulation. The inflammatory responses in dendritic cells activated by the stimulation of lipopolysaccharides were suppressed by the stimulation of endogenous GPR120 ligands. The analysis of inflammatory disease model using GPR120KO mice suggested that GPR120 might play important role in the regulation of disease severity.

研究分野：分子薬理学

キーワード：脂肪酸受容体 脂肪酸 炎症反応 糖尿病 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

食習慣の欧米化や不規則な生活リズムなど生活習慣の多様性などに伴い、糖尿病や肥満症に代表されるエネルギー代謝疾患(メタボリックシンドローム)患者は、その予備軍も含め増加の一途を辿っている。これまでに、代謝疾患に対して世界中で精力的な研究が行われているが、依然として疾患メカニズムの詳細な解析や、新たな治療薬の開発に対する要求は高く、多方面からの取り組みがなされている。

最近の研究において、代謝疾患の疾患メカニズムに炎症応答が密接に関わることが示唆され、新たな分子メカニズムと治療標的としての有用性に注目が集まっている。

GPR120 は、脂肪酸を内因性のリガンドとする G タンパク質共役型受容体ファミリーに属し、特に中・長鎖脂肪酸によって活性化されることが知られている。これまでに GPR120 は、腸管や脂肪組織における発現が報告されており、エネルギー代謝との関連から解析が進み、特に肥満症との関連が報告されていた。また、マクロファージにおける発現が確認され、炎症応答との関連が示唆されている。GPR120 の内因性リガンドである、リノレン酸やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのオメガ-3 系の長・中鎖不飽和脂肪酸には、疫学的にも炎症反応の調節作用など、様々な健康増進作用が知られており、GPR120 がこれらの作用を仲介する新たな分子メカニズムの一つであると共に、疾患制御にも密接に関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

GPR120 は、これまでにエネルギー代謝との関連から解析が進んでおり、肥満との関連が報告されていた。また、免疫応答への関与も報告され始めているが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。そこで、炎症惹起や免疫応答に重要な役割を有する免疫応答細胞に着目し検討を行った。これまでに GPR120

は、マクロファージに発現していることが報告されていた。そこで脂肪酸をリガンドとする G タンパク質共役型受容体である、GPR120 について免疫応答との関わりからその生理学的機能を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

動物実験

GPR120 遺伝子改変マウスを用いた実験は、所属機関の倫理規定に従い適切に行った。

病態モデルマウスの作成

・デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎マウスモデル

デキストラン硫酸ナトリウムを 1-1.5%水溶液として、マウスに 7-10 日間摂取させた後、通常の飲用水に交換し、さらに 7-14 日間観察と種々の検討を行った。

・AOM-DSS 誘導性大腸がんマウスモデル
アゾキシメタン(AOM)を腹腔内投与し、24 時間後から 1-1.5%DSS 水溶液をマウスに自由摂取させた。DSS 水溶液は 5-7 日間摂取させ、その後 14 日間通常の水を摂取させるサイクルを 3 回行った後、種々の解析を行った。

腸管からの樹状細胞の分離

マウスの腸管を摘出し、腸管内容物をリン酸塩バッファー(PBS)による洗浄で取り除いたのち細切し、EDTA を含むハックスバッファー (HBSS)により、上皮細胞を剥離させた。残った組織を、コラゲナーゼを含む HBSS を用いて、37 °C、0.5-1 時間、攪拌しながらインキュベートし消化した。コラゲナーゼで消化しきれなかった組織をフィルターを用いて取り除き、残った腸管の消化液を密度勾配遠心法により分離し、細胞画分を得た。

セルソーティング

樹上細胞のサブセットは、既知の複数の細胞表面マーカータンパク質の発現を指標として特徴付けを行った。マーカータンパク質の染色は、種々の蛍光団で標識された抗体を用いて行った。

骨髄細胞からの樹状細胞への分化

マウス大腿骨、腓骨から骨髄を回収し、赤血球溶解液にて赤血球を取り除き、骨髄細胞を得た。得られた骨髄細胞は、顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)を含む培養液を用いて7-10日間刺激を行った。培養2日目にGM-CSFを含む培養液を等量加え、その後1日おきに培地を半量ずつGM-CSFを含む新鮮な培地に交換した。培養7-10日目に、浮遊している骨髄由来細胞のみを回収し、CD11c抗体と磁気ビーズを用いてCD11c陽性細胞を濃縮した。

4. 研究成果

長鎖脂肪酸受容体(GPR120)の免疫細胞における発現パターンを検討することを目的として遺伝子発現の解析をおこなった。これまでに長鎖脂肪酸受容体は腸管および脂肪に高発現することが報告されていたが、これらの組織に分布する免疫細胞とGPR120の発現について報告はなかった。遺伝子発現の公共データベースを利用してGPR120の発現を解析したところ、これまでに報告されているマクロファージに加えて、樹状細胞におけるGPR120の発現が高いことが示唆された。

そこで、腸管組織から樹状細胞の表面マーカーを指標に樹状細胞をサブセットごとに分取し mRNA 発現を検討したところ、特定の樹状細胞のサブセットにおいてGPR120の発現が高いことが確認された。樹状細胞のサブセット間における発現の違いについてはこれまで報告がなく、新たな知見であった。またこのサブセットは、主に炎症性サイトカイン等を分泌することで炎症応答に関与することが報告されていることから、GPR120が関与する炎症性サイトカインの分泌パターンやそのシグナル伝達経路については引き続き検討中である。

< GPR120の骨髄由来樹状細胞の活性化機構への関与 >

樹状細胞の活性化機構に対する長鎖脂肪酸受容体の作用を検討するために、in vitroで骨髄細胞をGM-CSFの刺激により樹状細胞に分化させ、炎症惹起時の表面抗原マーカーの発現を検討した。Lipopolysaccharide (LPS) 刺激において活性化した樹状細胞は、内因性リガンドである脂肪酸や、GPR120合成アゴニストの刺激において抑制される結果が示された。また、この抑制作用はGPR120遺伝子欠損マウス由来の骨髄から分化させた樹状細胞では低下していたことから、GPR120が確かに骨髄細胞由来の樹状細胞において外来抗原に対する活性化を抑制する方向に働いていることが示唆された。以前の報告では、マクロファージに発現するGPR120が炎症抑制機能を有することが報告されており、今回の結果はそれと良く合致するものであった。また、樹状細胞の重要な機能であるT細胞の活性化機構に対して、不飽和長鎖脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)は、樹状細胞に作用しT細胞の活性化を抑制することが報告されている。DHAが示すこの作用の一部にGPR120が関わっている可能性が考えられるため、より広範な免疫応答への関与が示唆される。

< 腸炎および大腸がんモデルマウスによる検討 >

樹状細胞におけるGPR120の機能について、上述のGPR120を高発現するサブセットが腸炎や、大腸がんにおける病態に関与することが示唆されたため、GPR120遺伝子改変マウスを用いて、薬剤誘導性の腸炎及び大腸がんモデルを作成し解析を行った。まず予備検討として、骨髄移植法を用いてGPR120遺伝子改変マウス由来の骨髄より分化する樹状細胞が野生型マウス内においてどのような分布を示すのかを検討を行ったところ、GPR120遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞は野生型に比較して、その細胞数が減少する傾向が示唆された。このことからGPR120が

樹状細胞の分化にも関連している可能性が示唆された。

DSS 誘導性の腸炎誘導モデルにおいては、GPR120 遺伝子欠損マウスにおいて、DSS 負荷後の体重減少が有意に大きいことが確認された。また、AOM 腹腔内投与後に DSS 負荷を繰り返すことにより大腸がんを誘発させるモデルにおいては、GPR120 遺伝子欠損マウスにおいて生じるポリープ数が有意に多いことが確認され、その際の炎症性サイトカイン mRNA の発現も有意に上昇していた。従って、GPR120 遺伝子欠損により樹状細胞における炎症応答の抑制作用が消失することで、免疫・炎症応答が増悪する方向に傾く可能性を示唆していると考えられる。今後、腸管に分布する樹状細胞における GPR120 の機能と今回の検討で確認された病態の悪化について、T 細胞の活性化を含めた包括的な免疫応答の理解によって、より詳細な GPR120 の機能を明らかにする必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
<http://p.bunri-u.ac.jp/lab22/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 貴史 (HARA, Takafumi)
徳島文理大学・薬学部・講師
研究者番号：90546722