

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19700542  
 研究課題名 (和文) 生活習慣病での脂溶性リガンド受容体機能の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of the function of lipophilic ligand receptor  
 on life style disease  
 研究代表者  
 足達 哲也 (ADACHI TETSUYA)  
 神戸大学・医学部・助教  
 研究者番号： 60345014

研究成果の概要： 生活習慣病ターゲット臓器として代表的な脂肪、骨格筋、肝臓について、脂溶性化合物をリガンドとする G-タンパク質共役受容体の機能解析を行った。脂肪細胞において GPR120 のリガンドである  $\alpha$ -linolenic acid で刺激することによって、ERK のリン酸化が亢進するとともに、分化促進が認められた。一方 GPR30 のリガンドであるエストラジオール刺激において、脂肪、骨格筋、肝臓細胞の ERK リン酸化が亢進は認められた。しかしながら脂肪および骨格筋細胞の分化への寄与は認められなかった。脂溶性リガンドのさらなる機能について検討が必要である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード： GPCR, GPR120, GPR30, ERK, 分化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学およびゲノム科学の進歩により、生物活性を引き起こすさまざまな受容体が同定されてきている。活性分子の多くは受容体を介して生物活性を有することが言われており、多くの創薬のターゲットにもなっている。受容体の中でも特に G-タンパク質共役受容体 (GPCR) は、主たる創薬のターゲットとして注目され続けている。最近、特定の脂肪酸をリガンドとする GPCR が見いだされてきている。例えば、膵  $\beta$  細胞に存在

しインスリン分泌を惹起するもの (GPR40; Ito et al., Nature. 2003)、脂肪細胞に存在しレプチン分泌を惹起するもの (GPR41; Xiong et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2004) が報告されている。一方、我々の研究グループでは消化管に新規脂肪酸受容体 GPR120 が発現していることを見いだした。また、この受容体を介して消化管ホルモンのグルカゴン様ペプチド (GLP-1) 分泌が惹起されることを新しく見いだした (Hirasawa, Adachi et al., Nat. Med. 2005)。また、脂肪酸以外の

脂溶性化合物をリガンドとする GPCR も知られてきており、このことから生体内脂溶性物質が GPCR のリガンドとなり、さまざまな細胞機能に影響することが考えられる。特に生活習慣病のターゲット臓器に脂溶性化合物をリガンドとする GPCR が存在を確認していることから、何らかの機能を有しているものと考えられる

## 2. 研究の目的

生活習慣病ターゲット臓器での脂溶性物質をリガンドとする GPCR について、その機能を明らかにすることを目的とした。

具体的には、

- (1) 生活習慣病ターゲット臓器での GPCR 発現の検討
  - (2) 脂溶性リガンド刺激とシグナル伝達解析
  - (3) カルシエル化リガンドを用いた効率的 GLP-1 分泌性の検討
- について、研究を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 生活習慣病、特に糖尿病のターゲット臓器として、脂肪組織、骨格筋および肝臓が挙げられる。これら臓器について、先行研究や発現データベースを参考にすることにより、脂溶性物質をリガンドとする GPCR の実際の発現の有無について解析を行った。
- (2) 脂肪細胞モデル 3T3-L1、骨格筋細胞モデル C2C12 および肝細胞モデル Huh-7.5 を用いて、脂溶性リガンドを刺激することによって、GPCR からの情報伝達系について検討を行った。特に、3T3-L1 および C2C12 はともに分化機能を有するので、分化過程における脂溶性リガンドの作用について検討を行った。また、C2C12 は、コンフルエント後に、培養液中の血清濃度を低下させることで分化を開始し、3T3-L1 と同様、分化過程において脂溶性リガンド刺激を施した。具体的には、3T3-L1 は 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 500  $\mu\text{M}$  3-methyl-2-isobutylxanthine, 5  $\mu\text{g/ml}$  insulin を用いて分化を開始し、分化過程において脂溶性リガンド刺激を施した。これら細胞について、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化について、リン酸化 ERK 抗体を用いて解析を行った。また、3T3-L1 については分泌されるアディポネクチン量を ELISA にて測定した。

(3) GPR120 のリガンドである  $\alpha$ -linolenic acid (LA) を効率よく消化管下部まで送達するために、カルシエル技術を用いて LA を豊富に含むエゴマ油をコーティングしたものを利用し、C57BL/6J マウスにおける効率的な消化管ホルモン GLP-1 分泌性を検討した。具体的には、LA 当量として 3  $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$  のエゴマ油、カルシエル化エゴマ油および溶媒として用いたポリエチレングリコール 400 (PEG) を経口投与し、一定時間 (0, 30, 60, 120, 180, 360, 600 分) 後に、門脈より採血を行い、血中 GLP-1 レベルを ELISA で測定した。

## 4. 研究成果

- (1) 脂溶性物質をリガンドとする GPCR について、その GPCR が発現する細胞について検討したところ、GPR120 は脂肪細胞に、また、女性ホルモンのエストロゲンといったステロイドをリガンドとする GPR30 は脂肪細胞、骨格筋細胞、肝臓細胞および膵  $\beta$  細胞に存在することを見い出した。
- (2) 3T3-L1 細胞を分化させ、分化過程において脂肪酸の  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -LA) で刺激し、分化の経過およびアディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌について検討を行った。 $\alpha$ -LA 刺激によって、3T3-L1 細胞の脂肪への分化が促進され、同時に分化過程 (分化開始から7および14日後) において GPR120 に発現も上昇した。また  $\alpha$ -LA 刺激によって、 $\alpha$ -LA 刺激が ERK のリン酸化を促進した (図 1)。さらに  $\alpha$ -LA 刺激により、アディポネクチン分泌の促進も認められた (図 2)。この結果から、GPR120 のリガンドである  $\alpha$ -LA が、脂肪細胞において分化促進に機能するとともに、アディポサイトカインの分泌を亢進させることが示唆された。

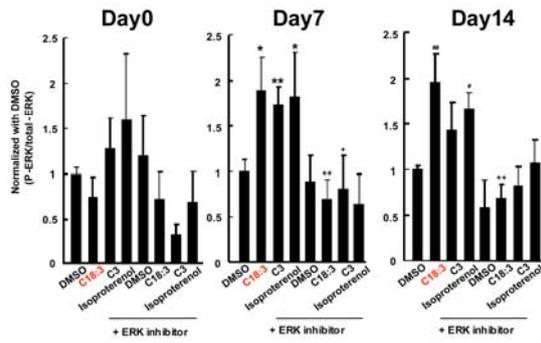


図 1. 3T3-L1 の分化過程における各種リガンド刺激での ERK リン酸化  
DMSO; Dimethylsulfoxide (溶媒), C18:3;  $\alpha$ -linolenic acid (LA), C3; Acetic acid  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. DMSO

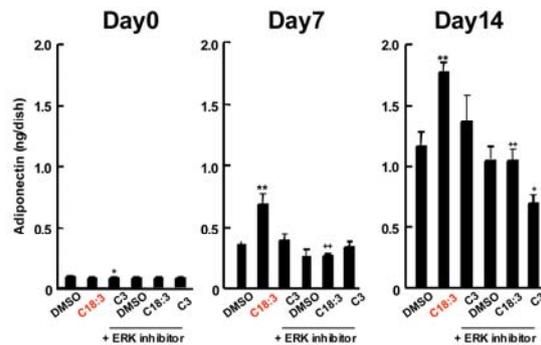


図 2. 3T3-L1 の分化過程における各種リガンド刺激でのアディポネクチン分泌量  
DMSO; Dimethylsulfoxide (溶媒), C18:3;  $\alpha$ -linolenic acid (LA), C3; Acetic acid  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. DMSO

脂肪細胞モデル 3T3-L1、骨格筋細胞モデル C2C12、肝細胞モデル Huh-7.5 において、エストロゲンをリガンドとする GPR30 の発現を確認した。これらの細胞について、生体内脂溶性物質として性ホルモンである  $17\beta$ -Estradiol (E2)、Dehydrotestosterone 処理を施した。その結果、 $1\ \mu\text{M}$  E2 処理において、各細胞で ERK のリン酸化の促進が認められた。分化機能を有する 3T3-L1 および C2C12 について、 $1\ \mu\text{M}$  E2 処理を行ったが、分化への作用は認められなかった。今後はこれら細胞についてエストロゲンの詳細な作用について検討を行う必要がある。

(3) カルシエルコーティング LA を、C57BL/6 マウスに投与したところ、非コーティングエゴマ油に比して、GLP-1 の持続的な分泌亢進が確認された (図 3)。本研究により、カルシエル化を用いた LA およびその類縁体の製剤化により、消化管ホルモンの効果的を促すことによって、糖尿病の治療および予防につなげられる可能性が示された。

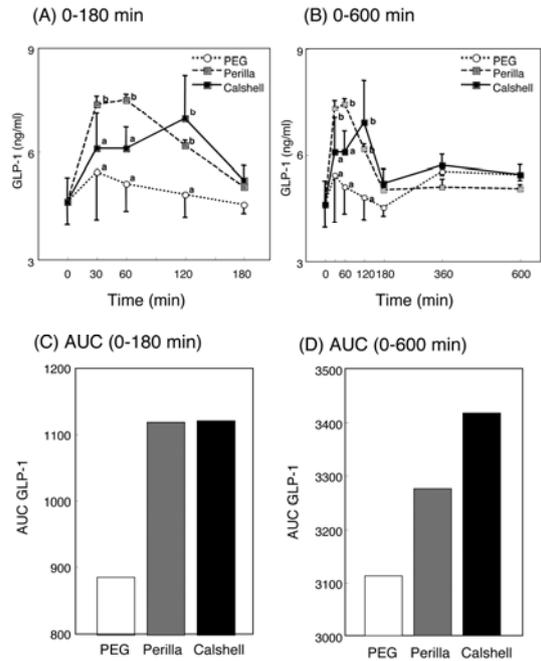


図 3. カルシエル化エゴマ油投与による GLP-1 分泌性  
(A, B) 投与後における経時的血中 GLP-1 レベル (A) 0-180 分間、(B) 0-600 分間、(C) A における時間曲線下面積 (AUC GLP-1)、(D) B における時間曲線下面積  
PEG; ポリエチレングリコール 400, Perilla; エゴマ油, Calshell; カルシエル化エゴマ油  
(A, B) 異なる記号間で  $P < 0.05$

## 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4件)

1. Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, Adachi T, Tsujimoto G. Free fatty acid receptors and drug discovery. Biol Pharm Bull. 31: 1847-51, 2008 査読あり
2. Adachi T, Yanaka H, Kanai H, Nozaki M, Takahara Y, Tsuda M, Jonouchi T, Tsuda K, Hirasawa A, Tsujimoto G. Administration of perilla oil coated with Calshell increases glucagon-like peptide secretion. Biol Pharm Bull. 31: 1021-3, 2008 査読あり
3. Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 377: 515-22, 2008 査読あり
4. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 377: 523-7, 2008 査読あり

[学会発表] (計2件)

1. 伊賀朋世, 足達哲也, 輿水崇鏡, 平澤明, 辻本豪三 長鎖脂肪酸のGPR120 を介したアディポネクチン分泌促進作用  
第17回日本循環薬理学会 2007年11月30日 大阪大学医学部銀杏会館
2. Iga T, Adachi T, Tanaka T, Roh SG, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G. Adiponectin secretion is stimulated by free fatty acids through GPR120.  
第12回アディポサイエンス研究会、2007年8月18日 千里阪急ホテル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

足達 哲也 (ADACHI TETSUYA)  
神戸大学・医学部・助教  
研究者番号：60345014

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし