

令和元年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09778

研究課題名(和文) 脂肪酸結合タンパク5 (FABP5) によるGIP分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of regulatory mechanism of GIP secretion by fatty-acid binding protein 5 (FABP5)

研究代表者

山根 俊介 (Yamane, Shunsuke)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90582156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：経口脂肪摂取前後のK細胞内FABP5局在を電子顕微鏡・共焦点顕微鏡を用いて検討したところ、負荷前は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。FABP5欠損マウスK細胞では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GIPはその治療標的として大変有望であり、その制御に関わる重要な分子としてFABP5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の阻害が脂肪誘導性GIP分泌や脂肪摂取時の体重増加を抑制することが明らかとなれば、FABP5を標的とした肥満症の新たな治療法の開発、創薬につながることを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. Based on our results, 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.

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) は、糖質や脂肪の経口摂取に反応して、腸管内分泌 K 細胞から分泌されインスリン分泌を促進するインクレチンの一つである。GIP 受容体は脂肪細胞にも存在し、脂肪組織へのエネルギー蓄積に関与すること (Miyawaki K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999) (Naitoh R, et al. *Biochem Biophys Res Commun*.2008)、また肥満状態における代償性のインスリン分泌増加に GIP シグナルが深く関与すること (Harada N, et al. *Am J Physiol*. 2008) が当教室からの報告により明らかとなっている。このような作用から GIP は脂肪組織に対する直接作用とインスリン増加を介した間接作用によって高脂肪食摂取時の肥満形成を促進すると考えられる(図 1)。また日本人健常者を対象とした申請者の検討により、脂質に富む食事では過度に GIP 分泌が惹起されることが示唆された (Yamane S, et al. *J Diabetes Invest*. 2012)。従来、GIP を産生する K 細胞の単離・解析ができないことが大きな障壁となり、脂肪摂取により刺激される GIP 分泌の機序や、慢性的な高脂肪食摂取による GIP 分泌増強のメカニズムに関しては、解明が進んでいなかった。当教室では green fluorescent protein (GFP) を GIP 遺伝子部位に挿入した GIP-GFP ノックイン (GIP<sup>gfp/+</sup>) マウスを作製し、K 細胞の可視化と単離を可能にした。申請者はこのマウスを用いて脂肪酸結合タンパク 5 (FABP5) が K 細胞に発現していること、脂肪摂取による GIP 分泌には胆汁が必須であり、胆汁存在下での脂肪誘導性 GIP 分泌制御に FABP5 が関与していること、また高脂肪食投与下において FABP5 が食事誘導性肥満を GIP 依存性に制御していることを明らかにした (Shibue K et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015)。

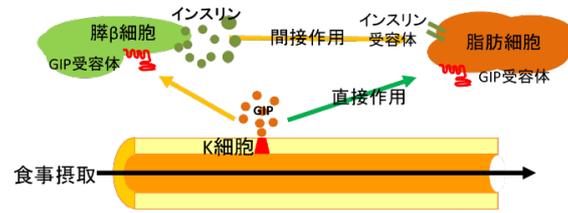


図1: GIPの直接作用と間接作用による肥満誘導

## 2. 研究の目的

本研究では FABP5 および胆汁の関与による GIP 分泌制御機構の詳細な解析・解明を目的とした。

## 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。

## 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)。

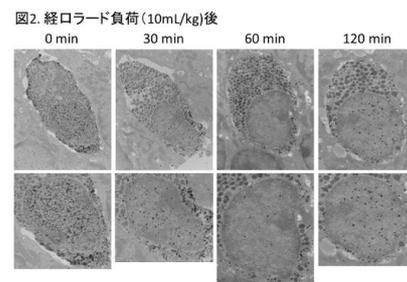
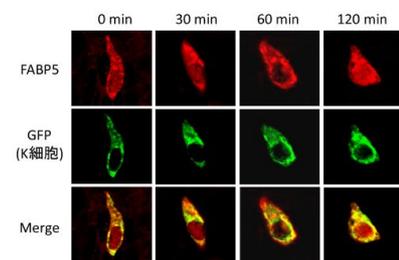


図2. 経口脂肪負荷 (10mL/kg) 後、核に局在する FABP5 が減少

## 慢性的 FABP5 欠損に伴う K 細胞の質的变化の検討

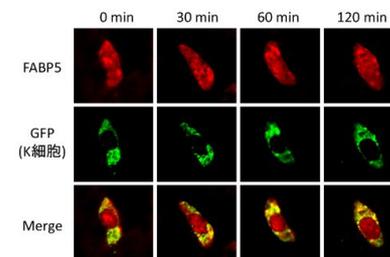
特に脂肪酸受容体や脂肪酸トランスポーター、SREBPs (Sterol regulatory element-binding proteins)、ChREBP (Carbohydrate Responsive Element

図3. 経口ロード負荷 (10mL/kg) 後



ロード負荷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



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



## 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)。

## 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.

図6. コーン油 (10mL/kg) 経口投与後の血中GIP濃度

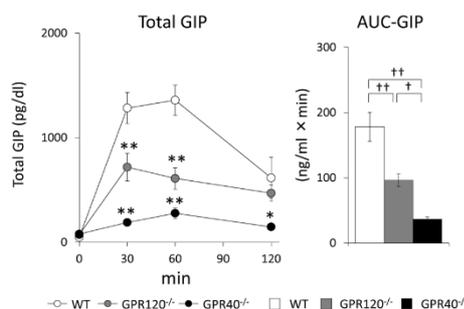
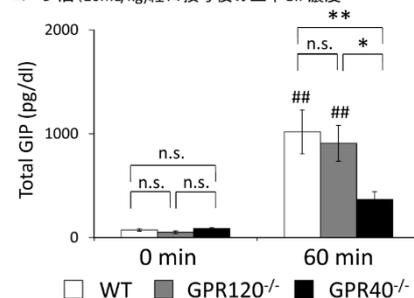


図7. CCKアナログ投与下でのコーン油 (10mL/kg) 経口投与後の血中GIP濃度



Attenuated secretion of glucose-dependent insulintropic 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 Insulintropic 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。