

令和元年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07056

研究課題名(和文) 膵細胞及び脂肪細胞GPR120を介するインスリン分泌及び抗炎症機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of GPR120 in adipocytes and pancreatic beta cells

研究代表者

山田 穂高 (YAMADA, Hodaka)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70807247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：3T3-L1脂肪細胞をパルミチン酸で刺激するとMCP-1及びTNF- $\alpha$ のmRNA発現が増加し、EPA投与で抑制された。GPR120をノックダウンするとEPAによる作用は見られなくなった。EPAの前処置はパルミチン酸刺激によるNF- $\kappa$ B p65のリン酸化を抑制した。パルミチン酸刺激でTAK1-TAB1複合体形成は増加したが、EPAの投与で抑制された。動物実験ではHFHS食群の精巣上体脂肪組織ではコントロール食群と比較してCLS形成の増加が認められたが、EPA混餌で抑制された。HFHS食群脂肪組織でJNK、NF- $\kappa$ B p65のリン酸化が上昇していたが、EPA投与により抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPR120は脂肪細胞及び膵細胞に発現している。今回これらの細胞におけるGPR120の機能解析を行った。脂肪細胞の不飽和脂肪酸EPAによるGPR120刺激は飽和脂肪酸が引き起こす炎症を抑制していることを見出した。膵島を用いた実験では血糖依存性のインスリン分泌のメカニズムの一端を明らかにした。脂肪酸の質が生体、細胞に与える影響をGPR120の視点から明らかに出来た。

研究成果の概要(英文)：The anti-inflammatory effects of unsaturated fatty acids in adipocytes have yet to be elucidated. Hence, the aims of the present study were to evaluate the anti-inflammatory effects of eicosapentaenoic acid (EPA) via GPR120 in adipocytes. EPA attenuated palmitate-induced increases in inflammatory gene expression and NF- $\kappa$ B phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes. Silencing of GPR120 abolished the anti-inflammatory effects of EPA. In GPR120 downstream signal analysis, EPA was found to decrease palmitate-induced increases in TAK1/TAB1 complex expression. EPA supplementation suppressed HFHS-induced crown-like structure formation in epididymal adipose tissue and altered macrophage phenotypes from M1 to M2 in the stromal vascular fraction. Moreover, the EPA-containing diet attenuated increases in adipose p-JNK and phospho-p65 NF- $\kappa$ B levels. The present study demonstrate that EPA suppresses palmitate-induced inflammation via GPR120 by inhibiting the TAK1/TAB1 interaction in adipocytes.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：GPR120 脂肪細胞 膵細胞 インスリン抵抗性 インスリン分泌 慢性炎症

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪酸の質の違い(飽和、不飽和脂肪酸)や作用が糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームなどの病態形成に関与していると考えられているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。近年、生体内での脂肪酸の生理・生化学的作用メカニズムについて、G 蛋白共役型受容体 (GPCR)が脂肪酸の受容体として作用することが分かってきた。Gq 蛋白共役型受容体 40 (GPR40)及び GPR120 は膵β細胞に発現し、長鎖脂肪酸をリガンドとしてグルコース濃度依存性にインスリン分泌を促進する (Itoh Y, et al. Nature 422: 173-176, 2003)。GPR120 はマクロファージにも高発現し長鎖脂肪酸をリガンドとして活性化され、抗炎症作用を発揮するとされている (Oh DY, et al. Cell 142: 687-698, 2010)。

(2) 申請者は、脂肪酸の質及び作用受容体の違いが及ぼす生理作用について研究を行ってきた。これまでの研究によって、パルミチン酸が Toll-like receptor 4 (TLR4)を介して脂肪細胞に炎症を惹起すること (Yamada H, et al. Biochem Biophys Res Commun 484:403-408, 2017)、膵β細胞 GPR40 を介するインスリン分泌に非選択性陽イオンチャネルの開口 (Transient receptor potential Canonical;TRPC チャネル)が関与していること (Yamada H, et al. Sci Rep 6:25912, 2016, Ito K and Yamada H, et al. Diabetes 66:699-709, 2017, Yosida M and Yamada H, et al. Diabetes 63:3394-3403, 2014)を明らかにし、糖尿病治療の新たな治療ターゲットとなり得ることを報告してきた。

(3) 脂肪細胞には GPR120 が高発現することが報告されているが、その作用の分子メカニズムは明らかではない。さらに膵β細胞にも GPR120 が発現し、インスリン分泌を促進させることが報告されている (Moran BM, et al. Acta Diabetol.2016 53:177-188,2016)がその機序もまた不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 脂肪細胞 GPR120 シグナルを介する生理作用に抗炎症作用があるかどうかを明らかにする。具体的には、GPR120 刺激がマクロファージ同様にパルミチン酸刺激性炎症 (TNF- 受容体、TLR4 を介する炎症惹起作用)に拮抗しているかを調べる。また omega-3 脂肪酸の代表であるエイコサペンタエン酸 (EPA)や GPR120 受容体作動薬が有するとされる抗炎症作用に脂肪細胞 GPR120 が寄与しているのかも in vivo、in vitro 両面から明らかにする。

(2) 膵細胞 GPR120 は GPR40 同様 Gq 共役型であり、申請者らが過去報告した膵細胞 GPR40 を介するグルコース濃度依存性インスリン分泌機序 phospholipase C (PLC)-protein kinase PKC (PKC)-TRPC チャネル経路との異同をラット単離細胞を用いて調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の実験として、分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を用いた。遺伝子のノックダウンには small interfering RNA (siRNA)を用い、mRNA の発現はリアルタイム定量 PCR (RT-qPCR)で、蛋白質発現はウェスタンブロットで検討した。蛋白相互連関の解析には免疫沈降を用いた。In vivo 実験として、C57BL/6 マウスを用い、通常食群、高蔗糖高脂肪食群 (HFHS) (脂質 30%、蔗糖 20%)、HFHS+EPA (5% wt/wt) 混餌投与の 3 群に分け、24 週間飼育の後、臓器を摘出して解析に供した。組織の染色にはヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織染色を用いた。動物の血中のホルモンは ELISA キットを用いて測定した。

(2) 膵β細胞及びランゲルハンス島はオス Wistar ラット膵臓からコラゲナーゼ法で分離した。インスリン分泌実験はバッチインキュベーション法 (60分、2mM カルシウム存在下)を用いた。cAMP 測定実験では、5.6 mM グルコース下で 1 時間の test incubation 直前に 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine を添加し、EIA キットで測定した。

### 4. 研究成果

(1) 3T3-L1 脂肪細胞を 24 時間パルミチン酸で刺激すると、ケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 及び炎症性サイトカイン tumor necrosis factor (TNF)-α の mRNA 発現が増加した。6時間の EPA の前処置はパルミチン酸誘導性の MCP-1 及び TNF-α の mRNA 発現を抑制し、抗炎症作用を示した。3T3-L1 細胞で GPR120 をノックダウンすると EPA による抗炎症作用は見られなくなった。EPA の前処置はパルミチン酸刺激による IRF3、NF-κB p65 のリン酸化を抑制した。パルミチン酸刺激で TAK1-TAB1 複合体形成は増加したが、EPA の投与で有意に抑制された。

(2) 動物実験において HFHS 食群の精巢上体脂肪組織ではコントロール (chow) 食群と比較して CLS 形成の増加が認められたが、EPA を混餌すると CLS 形成は抑制された。全体でマウス体重 (g) と CLS 形成数 (/LPF) 間には正の相関が認められた。さらに CLS 形成数とインスリン抵抗性指標 HOMA-IR 間にも正の相関がみられた。EPA は HFHS 食による脂肪細胞の大型化を有意に抑制していた。脂肪組織から分離した SVF において、M1 マクロファージマーカーであ

る CD11c の mRNA 発現レベルは HFHS 群で上昇していたが、EPA 群で抑制されていた。さらに炎症性サイトカイン IL-6 及び TNF- $\alpha$  の mRNA 発現も EPA 投与によって抑制されていた。脂肪細胞分画において、EPA 投与は CD11c の mRNA 発現レベルには影響を与えなかったが、脂肪細胞から分泌されるケモカイン MCP-1 の mRNA 発現増加を HFHS 食群に比して抑制していた。HFHS 食群脂肪組織で JNK のリン酸化が上昇していたが、EPA 投与により抑制されていた。また核蛋白分画において、EPA 投与は HFHS 食による NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化亢進を抑制した。3 群間で GPR120 の蛋白発現レベルには明らかな変化は見られなかった。

(3)ラット膵島を用いたインスリン分泌実験で選択的 GPR120 アゴニスト(cpdA)は 8.3mM グルコース、16.7mM グルコースとグルコース濃度依存性にインスリン分泌を促進したが、2.8mM グルコース下ではインスリン分泌を促進しなかった。このインスリン分泌促進作用は PLC 阻害薬(U73122)及び PKC 阻害薬(Gö6983/6976)で阻害されたが、PKA 阻害薬(H89)では抑制されなかった。GPR120 アゴニストは 5.6mM グルコース下では cAMP を増加させなかった。GPR120 アゴニストのインスリン分泌促進作用(16.7mM グルコース下)は TRP チャネルの非選択的阻害薬 2-ABP で阻害され、TRPC チャネルの阻害薬で抑制された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Effects of Repaglinide Versus Glimperide on 1,5-Anhydroglucitol and Glycated Hemoglobin Levels in Japanese Patients With Type 2 Diabetes

**Yamada H**, Kakei M, Hara K.

J Clin Med Res. 2018;10(11):838-842. (査読あり)

The Urinary Phosphate to Serum Fibroblast Growth Factor 23 Ratio, Deemed the Nephron Index, Is a Useful Clinical Index for Early Stage Chronic Kidney Disease in Patients with Type 2 Diabetes: An Observational Pilot Study

**Yamada H**, Kuro-O M, Funazaki S, Ishikawa SE, Kakei M, Hara K.

Int J Nephrol. 2018;2018:7530923. (査読あり)

Association between urinary calcium excretion and estimated glomerular filtration rate decline in patients with type 2 diabetes mellitus: A retrospective single-center observational study

**Yamada H**, Funazaki S, Suzuki D, Saikawa R, Yoshida M, Kakei M, Ishikawa SE, Morishita Y, Hara K.

J Clin Med. 2018;7(7). (査読あり)

Spontaneous pregnancy after recovered fully from hypopituitarism caused by lymphocytic hypophysitis

Funazaki S, **Yamada H** (corresponding author), Hara K, Ishikawa SE.

Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2018;2018. pii: 18-0081. (査読あり)

Different Magnetic Resonance Imaging Manifestations of Diabetic Chorea in a Case with Hyperglycemia and Another One with Hypoglycemia

**Yamada H**, Saikawa R, Suzuki D, Matsumoto Y, Yoshida M, Hara K.

Case Reports in Clinical Medicine. 2018;7:220-224. (査読あり)

Relationship between angiotensin-like protein 8 and fasting serum triglyceride level

**Yamada H**, Kusaka I, Saikawa R, Hara K, Kakei M, Ishikawa SE.

J Clin Med Res. 2018;10(2):134-136. (査読あり)

A Case of Insulin Antibodies-induced Diabetic Ketoacidosis in an Elderly Man With Type 2 Diabetes Ameliorated with Prednisolone

Matsumoto Y, **Yamada H** (corresponding author), Kakei M, Ishikawa SE, Hara K.

Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2018;12(3): OD19-OD21. (査読あり)

A case of insulinoma with improved reactive hypoglycemia after operation

Funazaki S, **Yamada H** (corresponding author), Matsumoto Y, Hara K.

Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2018;12(1): OD04-OD06. (査読あり)

Effect of liraglutide on type B insulin resistance syndrome and insulin allergy in type 2 diabetes: A Case Report

Matsumoto Y, **Yamada H** (corresponding author), Funazaki S, Suzuki D, Kakei M, Hara K.

Diabetes Ther. 2017 Oct;8(5):1191-1194. (査読あり)

Diabetic ketoacidosis producing extreme hyperkalemia in a patient with type 1 diabetes on hemodialysis

**Yamada H**, Funazaki S, Kakei M, Hara K, Ishikawa SE.

Endocrinology, Diabetes and Metabolism Case Reports, 2017.pii: 17-0068. doi: 10.1530/EDM-17-0068. (査読あり)

Eicosapentaenoic acid shows anti-inflammatory effect via GPR120 in 3T3-L1 adipocytes and attenuates adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice.

**Yamada H**, Umemoto T, Kakei M, Momomura SI, Kawakami M, Ishikawa SE, Hara K.

Nutr Metab (Lond). 2017 May 8;14:33. doi: 10.1186/s12986-017-0188-0. eCollection 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

**山田穂高**, 鈴木大輔, 犀川理加, 船崎俊介, 天本美里, 吉田昌史, 田中隆久, 松本裕子, 豊島秀男, 原一雄: 血中 ANGPTL8 濃度は空腹時中性脂肪レベルと関連する 第 28 回臨床内分泌代謝 Update 2018 年 11 月 2-23 日 福岡/日本内分泌学会雑誌 94(2):665,2018.

**山田穂高**, 船崎俊介, 吉田昌史, 伊藤聖学, 出崎克也, 川上正舒, 矢田俊彦, 石川三衛, 加計正文, 原一雄: 膵 β 細胞 GPR40 シグナルは PLC-PKC-TrpC 経路を介してインスリン分泌を増強する 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月 24-26 日 東京/糖尿病 61(Supplement 1):S-262,2018.

**山田穂高**, 梅本 富士, 船崎 俊介, 吉田 昌史, 河野 幹彦, 川上 正舒, 加計 正文, 百村 伸一, 石川 三衛, 原 一雄: HDL、apoA-I は脂肪細胞においてパルミチン酸誘導性の TLR4 のラフトへの局在変化を抑制し、抗炎症性に作用する 第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 26-28 日 宮崎/日本内分泌学会雑誌 94(1):348,2018.

**山田穂高**, 伊藤聖学, 梅本富士, 吉田昌史, 船崎俊介, 鈴木大輔, 犀川理加, 松本裕子, 豊島秀男, 加計正文, 百村伸一, 川上正舒, 石川三衛, 原一雄: エイコサペンタエン酸の脂肪組織抗炎症メカニズムとしての GPR120 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 18-20 日 名古屋/糖尿病 60(Supplement 1):S-362,2017.

**山田穂高**, 船崎俊介, 鈴木大輔, 犀川理加, 松本裕子, 吉田昌史, 生駒亜希, 草鹿育代, 豊島秀男, 加計正文, 石川三衛, 原一雄: 血中 CPP の動態と CKD-MBD 関連因子 第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017 年 4 月 20-22 日 京都/日本内分泌学会雑誌 93(1):296,2017.

〔図書〕(計 5 件)

船崎俊介, **山田穂高**, 石川三衛 . 高プロラクチン血症 . 薬局(増刊号)2018:69(4):990-991、南山堂

**山田穂高**, 船崎俊介, 石川三衛 . アルドステロン症 . 薬局(増刊号)2018:69(4):998-1000、南山堂

**山田穂高**, 船崎俊介, 石川三衛 . 副腎不全 . 薬局(増刊号)2018:69(4):1004-1006、南山堂

**山田穂高**, 平野勉 . 高齢者糖尿病の予後増悪因子とその予防・管理 2 . 脂質異常症 . 日本臨牀 2017:75(11):1665-1670、日本臨牀社

**山田穂高**, 平野勉 . 脂質管理による合併症予防 . 診断と治療の ABC 糖尿病合併症 最新医学(別冊)2017:278-286、最新医学社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし