

機関番号： 24303
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21700692
 研究課題名（和文） 代謝異常疾患における脂溶性リガンドの作用機序の解明
 研究課題名（英文） Discovery of the function of lipophilic ligand on metabolic disease

研究代表者
 足達 哲也 (ADACHI TETSUYA)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号： 60345014

研究成果の概要（和文）： 代謝異常疾患の標的臓器である脂肪組織、骨格筋、肝臓および心臓に発現する脂溶性物質をリガンドとする受容体の機能解明を目的とした。エストロゲンをリガンドとする GPR30 は、脂肪細胞、骨格筋、肝臓、単離心筋初代培養細胞および代謝異常疾患でリスクが上昇するといわれる心筋梗塞などで認められる心臓線維芽細胞において、その発現が認められた。心筋細胞および線維芽細胞に 17 β -エストラジオール刺激を行った結果、ERK のリン酸化の亢進が認められた。本研究によって、心臓においてエストロゲンが GPR30 を介した non-genomic 作用をもつことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is the discovery of the function of lipophilic ligand receptors in metabolic disorder-related organ, such as adipose tissue, skeletal muscle, liver and heart. GPR30, membrane receptor of estrogen, was expressed in adipose tissue, skeletal muscle, liver, primary cardiac myocytes and cardiac myofibroblasts, which are detected in myocardial infarction. Administration of 17 β -estradiol induced the phosphorylation of ERK on myocytes and myofibroblasts. These results suggest that estrogen possesses the non-genomic effect via GPR30 in heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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, GPR30, ERK, 心臓

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 β 細胞に存在

レ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。またこれまで申請者の所属グループでは、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)。GLP-1 などの消化管ホルモンは膵β細胞に作用しレインスリン分泌を惹起する因子としてインクレチンと呼ばれ、抗糖尿病性物質として世界的に注目されている。申請者は、平成 17~18 年度科学研究費補助金若手研究 (B) 「消化管新規脂肪酸受容体 GPR120 の栄養生理学的機能解析」で、消化管に脂肪酸を投与することによって、GLP-1 およびインスリン分泌惹起、糖尿病モデル動物での血糖値低下を確認した (Adachi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm, 2006)。また、平成 19~20 年度科学研究費補助金若手研究 (B) 「生活習慣病での脂溶性リガンド受容体機能の解析」では、消化管に効率よくリガンドを送達するために、カルシウム素材の新しい殻としてカルシウムを用い、GPR120 のリガンドであるα-リノレン酸を豊富に含む油脂をコーティングすることで、高効率に GLP-1 分泌性を示すことを明らかにした (Adachi et al., Biol. Pharm. Bull, 2008)。さらに同研究プログラムにおいて、脂肪細胞で発現する GPR120 のリガンド刺激により、脂肪分化が亢進すること (Gotoh, Adachi et al., Biochem. Biophys. Res Comm, 2007) を見いだした。これまでの研究から、脂肪酸リガンドとその受容体が生体内の代謝機構に作用することが認められた。

上述のように、申請者は脂肪酸をリガンドとする GPCR の機能解析について研究を進めてきている。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、例えば、GPR30 はエストロゲンといったステロイドをリガンドとする GPCR も見出されてきている。

2. 研究の目的

近年、メタボリックシンドローム患者の急増が問題視されてきており、メタボリックシンドロームの増悪には、脂肪組織、骨格筋細胞、肝臓および心血管系などの臓器の代謝異常による、トータルボディでの代謝のアンバランスが関与するとされている。また、代謝異常の進行によって糖尿病、脂質異常症に加え、心血管系のリスク上昇などが臨床研究に

おいて報告されてきている。上述の臓器における代謝調節には多くの受容体からのシグナル伝達が考えられることから、代謝異常疾患の標的臓器である脂肪組織、骨格筋、肝臓および心臓に発現する脂溶性物質をリガンドとする受容体の機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂溶性リガンド受容体の発現解析

ペントバルビタール麻酔下において、Wistar 雄性ラットより、脂肪組織、ひらめ筋、肝臓および心臓を摘出し、Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を PrimeScript RTase (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて逆転写を行った。脂溶性リガンド受容体として、GPR120、GPR40、GPR41、GPR43 および GPR30 について、リアルタイム PCR 法 (ABI Prism 7300, Life Technologies, Tokyo, Japan) にて発現解析を行った。使用したプライマーは、GPR120 Forward, GCAGATGAACGCTCTCACAG; GPR120 Reverse, TACCTGGCACCAGCAGTTAG; GPR40 Forward, AAGAGGAACAGTGACGAGAGG; GPR40 Reverse, CTCCAGAGGTGGCTGCTACT; GPR41 Forward, TTTGCCGATGTGAGGGAGGTG; GPR41 Reverse, AGTAGGTGGACGCTGATGAAG; GPR43 Forward, GACTTGTCTGTTGTTGCTGCTG; GPR43 Reverse, CGTTCTATGCTGATGCCCGCC; GPR30 Forward, TTCCTCTCCTGCCTCTACACC; GPR30 Reverse, ATCAGGGAGTCGGCCACCAGG; 18S Forward, TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTT; 18S Reverse, GGACATCTAAGGGCATCACAG

(2) 心筋細胞および心臓線維芽細胞の培養過程における GPR30 の発現解析

ペントバルビタール麻酔下において、生後 2 日の Wistar ラットより、心臓を摘出し、コラゲナーゼを用いて、細胞を分散させた。分散させた細胞をプリプレATING することによって、新生仔初代心筋細胞と心臓線維芽細胞を分離し、別々に培養を行った。培養 1、2、3、5、7、10 および 14 日後に細胞を回収し、上述と同様に RNA 抽出、逆転写、リアルタイム PCR を行った。

(3) 心筋細胞および心臓線維芽細胞のエストロゲン刺激における細胞内シグナル伝達系の解析

培養 7 日後の心筋細胞および心臓線維芽細胞を Hanks 液で 2 時間処理後、10 μM

17 β -estradiol の Hanks 液で 15 分刺激した。刺激後、RIPA 緩衝液で細胞を溶解させ、タンパクサンプルを得た。GPR30 からの情報伝達系について検討を行うために、Extracellular signal- regulated kinase (ERK) のリン酸化について、リン酸化 ERK 抗体および総 ERK 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いてウェスタンブロッティング解析を行った。

(4) 心筋細胞および心臓線維芽細胞のエストロゲン刺激における細胞増殖活性の解析

7 日間培養後の心筋細胞および心臓線維芽細胞を、10 μ M 17 β -estradiol (チャコール処理血清含有、フェノールレッドフリー DMEM) で、0、3、5、7 および 10 日間刺激した。各日において、WST-1 アッセイを行い、細胞増殖活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 脂溶性リガンド受容体の発現

脂溶性リガンド受容体の、GPR120、GPR40、GPR41、GPR43 および GPR30 について、ラット脂肪組織、ひらめ筋、肝臓および心臓における発現を検討した (Table 1)。GPR120 および GPR43 は脂肪組織では発現が認められたが、その他の組織では検出感度以下であった。GPR40 は本検討組織で検出感度以下であった。GPR41 は脂肪組織、心臓で発現が認められた。GPR30 は本検討組織で発現が認められた。

Table 1. 脂溶性リガンド受容体の発現

	脂肪組織	ひらめ筋	肝臓	心臓
GPR120	+	ND	ND	ND
GPR40	ND	ND	ND	ND
GPR41	+	ND	ND	+
GPR43	+	ND	+	ND
GPR30	+	+	+	+

+: Positive, ND: not detected

(2) 心筋細胞および心臓線維芽細胞の培養過程における GPR30 の発現解析

培養 1、2、3、5、7、10 および 14 日後における心筋細胞および心臓線維芽細胞での GPR30 の発現を検討した。両細胞とも培養日数に従って GPR30 の発現上昇が認められた (Fig. 1)。

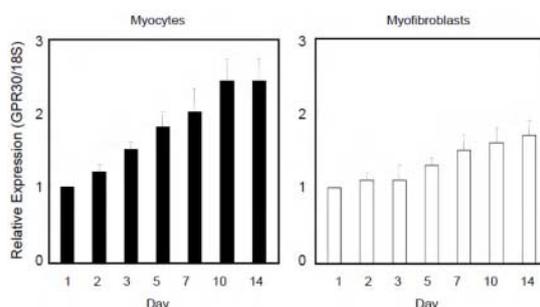


Fig 1. 心筋細胞および心臓線維芽細胞における GPR30 mRNA の発現

(3) エストロゲン刺激における心筋細胞および心臓線維芽細胞の ERK リン酸化

培養 7 日後の心筋細胞および心臓線維芽細胞について、10 μ M 17 β -estradiol (E2) 刺激における GPR30 からの ERK リン酸化を検討した。心筋細胞および心臓線維芽細胞ともに、E2 刺激において、リン酸化 ERK (phospho-ERK) の上昇が認められた (Fig. 2)。

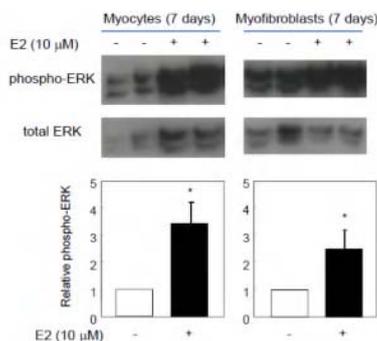


Fig 2. 心筋細胞および心臓線維芽細胞の 17 β -Estradiol (E2) 刺激における Extracellular signal- regulated kinase (ERK) のリン酸化
*P<0.05 vs. E2(-)

(4) エストロゲン刺激における心筋細胞および心臓線維芽細胞の細胞増殖活性

培養 7 日後の心筋細胞および心臓線維芽細胞について、10 μ M E2 を 0、3、5、7 および 10 日間刺激し、各日において、WST-1 アッセイを行い、細胞増殖活性を測定した。心筋細胞において、E2 刺激により細胞増殖の亢進が認められた。一方、心臓線維芽細胞においては、E2 刺激において細胞の増殖性の抑制が認められた (Fig. 3)。

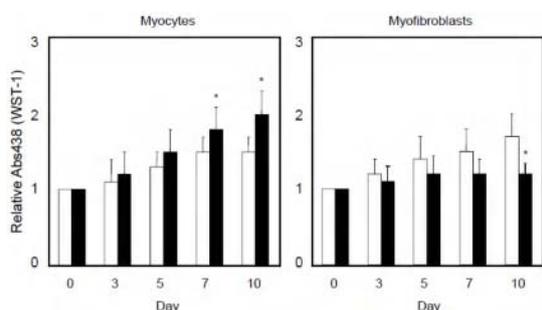


Fig. 3. 心筋細胞および心臓線維芽細胞の17β-Estradiol (E2) 刺激における細胞増殖アッセイ (WST-1アッセイ)
*P<0.05 vs. E2(-)

(5) 考察

代謝異常疾患の標的臓器である脂肪組織、骨格筋、肝臓および心臓に発現する脂溶性物質をリガンドとする受容体である、GPR120、GPR40、GPR41、GPR43、GPR30の発現について検討を行った。本研究において、エストロゲンをリガンドとするGPR30について、脂肪細胞、骨格筋、肝臓、心筋細胞および心臓線維芽細胞において、その発現が認められた。エストロゲンは核内受容体であるエストロゲン受容体 (ERαおよびERβ)による genomic 作用に加え、膜型受容体 GPR30 を介した non-genomic 作用を有するが、本検討において、代謝異常疾患の標的臓器である脂肪組織、骨格筋、肝臓および心臓において、GPR30 が発現することが認められ、エストロゲンの新規作用の可能性が考えられる。そこで、代謝異常疾患でリスクが上昇するといわれる循環器系疾患の要である心臓に注目し、初代心筋細胞および心筋梗塞などで認められる心臓線維芽細胞における、GPR30 の機能解析を行った。心筋細胞および心臓線維芽細胞において、培養経目的にGPR30の発現上昇が認められ、E2の急性刺激における、ERKのリン酸化の亢進が認められた。心筋細胞および心臓線維芽細胞においてエストロゲンがGPR30を介した non-genomic 作用をもつことが示唆された。また、E2の長期刺激において、心筋細胞では細胞増殖性の亢進が認められた一方で、心臓線維芽細胞においては増殖の抑制が認められた。この現象については genomic 作用—non-genomic 作用の両者が関連するものと考えられるが、そのメカニズムについては今後の課題である。

本研究により、代謝異常疾患でリスクが上昇するといわれる循環器系疾患の要である心臓について、心筋細胞・心臓線維芽細胞での脂溶性リガンド受容体 GPR30 が E2 を受容することによってシグナル伝達を活性化し、

E2 の心筋細胞・心臓線維芽細胞で non-genomic 作用を有することが示唆された。

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3件)

1. Sun Q, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Adachi T, Awaji T, Ishiguro M, Suzuki T, Miyata N, Tsujimoto G. Structure-Activity Relationships of GPR120 Agonists Based on a Docking Simulation. *Mol Pharmacol.* 78: 804-810, 2010
2. Matsunaga T, Gu N, Yamazaki H, Adachi T, Yasuda K, Moritani T, Tsuda K, Nishiyama T, Nonaka M. Association of Estrogen receptor-α gene polymorphisms with cardiac autonomic nervous activity in healthy young Japanese males. *Clinica Chimica Acta.* 411: 505-509, 2010
3. Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Sadakane K, Itsubo C, Iga T, Adachi T, Koshimizu TA, Hashimoto T, Asakawa Y, Tsujimoto G. Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 380: 247-255, 2009

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足達 哲也 (ADACHI TETSUYA)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：60345014

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし