

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650183

研究課題名（和文）GPCR を介する食物繊維によるメタボリック症候群抑制仮説の検証

研究課題名（英文）Significant roles of G protein-coupled receptors in anti-metabolic syndrome activities of dietary fibers

研究代表者

佐伯 茂 (SAEKI SHIGERU)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授

研究者番号：60211926

研究成果の概要（和文）：G タンパク質共役型レセプターGPCR41 が短鎖脂肪酸をリガンドとし、肥満遺伝子レプチンの発現を亢進させることが発見された。従って、難消化性である食物繊維によるメタボリック症候群抑制作用は、食物繊維から生成する短鎖脂肪酸が GPCR41 を介してレプチン産生を亢進させるために発現する可能性が考えられた。本研究では、実験動物に食物繊維を与えると、脂肪組織の GRP41、レプチン遺伝子の発現量が増加することを観察し、上記の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that short-chain fatty acids which are ligands of an orphan G protein-coupled receptor GPR41 stimulate leptin expression in both a mouse adipocyte cell line and mouse adipose tissue in primary culture. We speculated that short-chain fatty acids by fermentation of dietary fibers in the lower intestine would be ligands of GPR41 and contribute to the anti-metabolic syndrome activities of dietary fibers. In the present studies, we found that the expressions of GPR41 and leptin mRNAs in adipose tissue were higher in rats fed a diet with dietary fibers than in those without dietary fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：食物繊維、短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

高齢化が加速する現代社会において、生活習慣病の克服は生活科学に課せられた重要な研究課題であり、生活習慣病の克服無しに健全な社会を構築することは出来ない。生活習慣病は脂質代謝異常、糖尿病、高血圧、肥満症などが挙げられ、それぞれが軽度であっ

ても重複して発症すると最終的に致死をもたらす心血管疾患の発症頻度が相乗的に増加する。このような病態がメタボリック症候群と呼ばれる。従来、脂肪組織はエネルギーを貯蔵するだけの受動的な臓器であると考えられていたが、脂肪組織から摂食やエネルギー代謝を制御するレプチン等のアディポ

サイトカインが産生・分泌することが明らかとなり、脂肪組織が生活習慣病やメタボリック症候群の発症や進展に影響を与えていると考えられている。

レプチンは食事成分の影響を受けるが、食物繊維がレプチン産生を調節し、メタボリック症候群抑制作用を有することが知られている。レプチンは、1994年にロックフェラー大学のフリードマンらがポジショナルクローニングによって脂肪細胞から発見したアディポサイトカインであり、摂食抑制作用、エネルギー消費促進作用を有する。従って、食物繊維のメタボリック症候群抑制作用は、レプチンを介して発現する可能性がある。レプチン遺伝子は、カテコールアミン、アデノシン、エンドセリンによって転写調節され、カテコールアミン、アデノシン、エンドセリンは G タンパク質共役型レセプター(GPCR: G-protein coupled receptor)を介して調節される。

GPCR は G 蛋白質と共役してリガンドのシグナル伝達を担うレセプターであり、ヒトゲノム全体で 700 から 800 近く存在し、非常に広範囲の細胞内情報伝達を担っている。GPCR は G 蛋白質と共役してリガンドのシグナル伝達を担うレセプターであり、非常に広範囲の細胞内情報伝達を担っていることから、新薬開発の標的分子となっている。事実、GPCR を標的とする医薬品は全体の 50% 以上を占め、世界の売上げの 25% 以上を占めている。しかし、GPCR はヒトゲノム全体で 700 から 800 近く存在するにもかかわらず、リガンドが同定された GPCR は一部であり、殆どは内因性リガンドが不明なレセプター、いわゆるオーファンレセプターである。更に、リガンドが同定された GPCR でさえ、それらが関与する生命現象は充分には解明されておらず、GPCR に関する研究は未開拓の研究領域である。

2004 年、テキサス大学サウスウェスタン医学センターの柳沢正史らは、GPCR の一つである GPR41 のリガンドが驚くべきことに短鎖脂肪酸であり、脂肪細胞株や脂肪組織由来の初代培養細胞において、短鎖脂肪酸が GPR41 に結合してレプチンの発現を亢進させることを発見した(Proc Natl Acad Sci USA., 101(4):1045-50, 2004)。食物繊維が短鎖脂肪酸を産生し、GPR41 のリガンドが短鎖脂肪酸であることを考え合わせると、食物繊維のメタボリック症候群抑制作用は、GPR41 を介して発現する可能性が高いと推論できる。

食物繊維由来の短鎖脂肪酸が GPCR のリガンド分子であることは、食物繊維に未知の有益な生理作用が存在する可能性を示唆し、本研究課題は食物繊維研究の新分野を開拓する可能性がある。事実、短鎖脂肪酸は

GPR41 のリガンドとなるだけでなく GPR43 のリガンドとして機能し、脂肪細胞の分化に関与することも報告されている(Endocrinology, 146(2):5092-5099, 2005)。

また、レプチン遺伝子の発現は、カテコールアミン、アデノシン、エンドセリンによって転写調節され、カテコールアミン、アデノシン、エンドセリンは GPCR によって制御させる。食物繊維由来の短鎖脂肪酸が GPCR のリガンドとなるならば、カテコールアミン、アデノシン、エンドセリンを介する新たな生理作用が食物繊維に存在することが予想される。これらのことより、食物繊維と GPCR との相互作用を明らかにすることが食物繊維研究の新たな突破口になると期待できる。

2. 研究の目的

テキサス大学サウスウェスタン医学センターの柳沢正史らは、G タンパク質共役型レセプターGPCR の一つである GPR41 のリガンドが驚くべきことに短鎖脂肪酸であり、脂肪細胞株や脂肪組織由来の初代培養細胞において、短鎖脂肪酸が GPR41 に結合してレプチンの発現を亢進させることを発見した。この発見は、食物繊維が有するメタボリック症候群抑制作用の分子機構を解明する強力な手掛であると考えられる。即ち、私達は、“難消化性である食物繊維は、消化管下部において腸内細菌によって資化されて短鎖脂肪酸を産生し、腸管から吸収された短鎖脂肪酸が GPR41 に結合するとレプチン遺伝子の転写を促進してレプチン産生を亢進させ、食物繊維による一連のメタボリック症候群抑制作用が発現する”、と考えた。そこで、本研究では、この点を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

5 週齢 Wister 系雄ラットを固形飼料で 5 日間順化した後 3 群(各 7 匹)に分け、コントロール群にはタンパク質源をカゼインとする 5%セルロース含有無コレステロール飼料、対象群には 5%セルロースまたは 5%ペクチン含有高コレステロール飼料(1%コレステロール、0.25%胆汁酸)の何れかを 5 日間与えて飼育した。実験最終日に、麻酔下で血液、肝臓、副睾丸周囲脂肪を摘出した。

血清中のコレステロール、トリグリセライド、リン脂質濃度は市販のキットを用いて酵素法により測定した。肝臓脂質は Folch らの方法によって抽出した。まず、肝臓を 72 時間凍結乾燥した後、均一に粉碎し、0.3g をスクリーキャップ付き試験管に入れた。各試験管にクロロホルムとメタノールを 2 : 1 に混合した試薬を 6mL 加え、1 時間毎に vortex しながら、常温に 4 時間置いた。各試験管に 0.9% NaCl 4mL を静かに加えた後、冷蔵庫で

一晚放置した。試験管を3,000rpmで10分間遠心分離した後、上層を吸引除去し、ろ紙にて下層(クロロホルム層)を受けて、新しい試験管に移した。得られたクロロホルム層から500 μ Lをチューブに移して乾燥させ、イソプロパノール1000 μ Lで溶解した後、肝臓中のコレステロール、トリグリセライド、リン脂質濃度を市販のキットを用いて酵素法により測定した。

肝臓、副睾丸周辺脂肪100mgから総RNAをTrizol Regent(Invitrogen, San Diego, CA)により抽出した。cDNAの合成は、Superscript IIITM Reverse Transcriptase(Invitrogen, San Diego, CA)、10mMのdNTP mix、5 \times First stand buffer、0.1MのDTTと各種組織のRNAを用いた。Real Time PCRの測定は各種cDNA、2.5 μ Mのsenseとantisenseのプライマー、滅菌蒸留水、SYBER Green Realtime PCR Master Mix(Applied Biosystem, San Diego, CA)を添加して、Real Time PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection system(Applied Biosystem, San Diego, CA)により測定を行った。

4. 研究成果

飼料摂取量は、5%セルロース含有高コレステロール飼料では低下しなかったが、5%ペクチン含有高コレステロール飼料で有意に低下した。これらのことからペクチンに摂食抑制作用があることが示唆された。

脂肪組織のGPR41遺伝子の発現量は、有意差は無いものの5%セルロース含有高コレステロール飼料で約半分に低下し、5%ペクチン含有高コレステロール飼料では約1.5倍に増加した。これらのことから、ペクチンはGPR41遺伝子発現量を亢進させることが示唆された。同様に、脂肪組織のレプチン遺伝子の発現量は、有意差は無いものの5%セルロース含有高コレステロール飼料で約0.6倍に低下し、5%ペクチン含有高コレステロール飼料では約1.4倍に増加した。アディポネクチン遺伝子発現についても有意差はないものの同様の傾向が見られた。

血清と肝臓コレステロール濃度は、5%セルロース含有高コレステロール飼料で著しく有意に上昇したが、5%ペクチン含有高コレステロール飼料で有意に低下した。これらのことから、ペクチンは脂質代謝を正常化させる作用があることが示唆された。肝臓のコレステロールと胆汁酸合成の中心的な転写調節因子であるLXR遺伝子の発現量には実験群で差は見られなかった。しかし、肝臓のコレステロール合成律速酵素HMG-CoA reductase遺伝子の発現量はコレステロール摂取時に何れも有意に低く、肝臓の胆汁酸合成律速酵素CYP7A遺伝子の発現量は5%ペクチン含有高コ

レステロール飼料でのみ有意に上昇した。

以上の結果より、ペクチン摂取により脂肪組織でのGPR41とレプチン遺伝子の発現量が並行して変動する傾向が見られたが、今後は、コレステロールと胆汁酸を添加しない飼料、消化管内での短鎖脂肪酸の発存量、ペクチン投与期間、ペクチン以外の食物繊維、などについて検討する必要があると考える。また、コレステロール代謝に関しては、飼料に添加したコレステロールはCYP7A遺伝子の発現量を亢進させるが、胆汁酸はCYP7A遺伝子の発現量を逆に抑制する。このように相反した2つの因子を実験系に導入したことが本実験結果の解釈を複雑にしている。従って、今後は、コレステロールと胆汁酸を添加しない飼料、コレステロールのみを添加した飼料、胆汁酸のみを添加した飼料、などについて検討する必要があると考える。

また、GPR41が交感神経節に豊富に存在し、摂食状態では短鎖脂肪酸がGPR41を介して交感神経を活性化し、エネルギー消費を増大させる作用があることが報告されている。逆に、絶食状態では、エネルギー代替物質として産生されるケトン体が、GPR41を通じて交感神経を抑制し、エネルギー消費を抑えたと考えられている。

本研究では検討できなかったが、近年、GPR41と同じくGタンパク質共役型レセプターGPCRの一つであるGPR43のリガンドが、短鎖脂肪酸であることが近年発見された。GPR43は免疫組織、腸管、脂肪組織に発現し、免疫組織では炎症の調節に関与し(Nature 461, 1282-1286, 2009)、腸管ではインスリン分泌を亢進させる消化管ホルモンであるインクレチンGLP-1の分泌促進を介し、耐糖能を改善させることが報告されている(Diabetes, 61, 364-371, 2012)。京大の辻本らの研究グループは、脂肪組織におけるGPR43機能について報告している(NATURE COMMUNICATIONS, 4:1829, 2013)。GPR43欠損マウスでは通常食では、体重、脂肪重量が増加し、肥満傾向を示した。一方、GPR43を脂肪組織特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは痩せる傾向を示し、高脂肪食負荷による肥満型糖尿病の誘導には抵抗性を示すことが確認された。GPR43を脂肪組織特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを無菌状態で飼育する、あるいは抗生物質処置により体内の腸内細菌叢を消失させると、正常の表現型を示した。しかしながら、他のグループは、GPR43欠損マウスに高脂肪食負荷すると、インスリン感受性の亢進と、肥満に対する抵抗性が認められたと報告している(Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 300, E211-E220, 2011)。両者の実験結果の相違は、マウスの遺伝的バックグラウンドや腸管細菌叢の差による可能性が考えられ

るが、GPR41 や GPR43 のアゴニストの創製が治療薬の開発に発展する可能性が期待される。

更に、ある種の食物繊維には体外への胆汁酸能があり、肝臓の胆汁酸合成は代償的に亢進する。肝臓で新たに生成された胆汁酸が、胆汁酸をリガントとする G タンパク質共役型レセプターGPCR である TGR5 を活性化してエネルギー代謝を亢進させ、脂肪肝、肥満を改善させる作用があること、TGR5 を介してインクレチン GLP-1 分泌が亢進し、糖尿病を改善させることが報告された (PLoS One, 7(8): e38286, 2012)。

以上のことより、食物繊維は、消化管の腸内細菌による資化によって短鎖脂肪酸を生成し、短鎖脂肪酸は GPR41 を介してレプチン産生を亢進することで摂食とエネルギー代謝を制御し、また短鎖脂肪酸は GPR43 を介してエネルギー代謝とインクレチン分泌を制御すること、および食物繊維によって新たに産生された胆汁酸は、TGR5 を介してエネルギー代謝とインクレチン分泌を制御することが示唆され、今後は、これらの点について検討する必要があると考える。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 茂 (SAEKI SHIGERU)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・
教授
研究者番号：60211926

(2) 研究分担者

福村 智恵 (FUKUMURA TOMOE)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・
講師
研究者番号：80336792

(3) 連携研究者

なし