

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21208

研究課題名（和文）新規の脂肪酸受容体GPR164による腸管を起点とした生体機能制御機構

研究課題名（英文）The roles of a novel free fatty acid receptor GPR164 in maintaining intestinal homeostasis

研究代表者

池田 貴子（Ikeda, Takako）

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60948686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪酸受容体は生体内の栄養環境を認識し、エネルギー代謝や免疫機能など様々な生体機能を制御する。本研究では、新規の脂肪酸受容体であるGPR164の腸管における機能について検討した。培養細胞であるCaco-2細胞やGPR164遺伝子欠損マウスを用いた検討により、GPR164は腸管バリアなど、腸管の恒常性維持に関わる重要な因子であることが明らかとなった。これまで、GPR164遺伝子欠損マウスを用いた報告は無く、本研究により機能がほとんど知られていないGPR164の、生体における役割を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPR164は機能未知な脂肪酸受容体であることから、腸管バリア機能制御という生体での機能を明らかにできたという点において学術的意義の高い研究であると考えられる。また、腸は腸管局所だけでなく、全身の生体機能に大きく影響を与えることから、GPR164は様々な生体機能に関与する可能性がある。GPR164はこれまで最も創薬の標的とされてきたGPCRであることから、GPR164と疾患との関りを明らかにすることは、治療標的を提示することに繋がり、社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Free fatty acid receptors play an important role in regulating energy metabolisms and immune systems. In this study, I investigated the function of a novel free fatty acid receptor, GPR164, in maintaining intestinal homeostasis using Caco-2 cells or GPR164 knockout mice. As a result, I reveal that GPR164 is a crucial for the intestinal barrier function. To my knowledge, there are no previous reports described the function of GPR164 using GPR164 knockout mice. Therefore, this study provides new understanding of the physiological functions of GPR164.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：脂肪酸受容体 腸管機能制御

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸受容体は、栄養環境の変化により生み出される脂肪酸を適切に認識し、細胞内へとそのシグナルを伝えることで生体の様々な機能を制御する。このことから、脂肪酸は単なる生体のエネルギー源ではなく、生体の恒常性維持に関わる重要なシグナル分子であると認識されるようになった。脂肪酸はその炭素鎖長から、短鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸に分類され、各々異なる脂肪酸受容体を活性化することで、様々な生理作用を発揮する。中でも、食物繊維を基質として腸内細菌の発酵により生み出される短鎖脂肪酸は、GPR41 や GPR43 などの短鎖脂肪酸受容体を活性化することで、エネルギー代謝や免疫機能を改善することが知られている。これら脂肪酸受容体は G タンパク質共役型受容体であり、これまで最も創薬の標的とされてきた分子であることから、代謝性疾患や炎症性疾患などの治療標的として期待されている。このような背景の中、新規の脂肪酸受容体として GPR164 が同定された。GPR164 は当初、嗅覚受容体として同定されたが、末梢組織にも広く発現することや脂肪酸により活性化されることから、新規の脂肪酸受容体として、現在その機能に注目が集まっている。これまで、GPR164 はインクレチンである GLP-1 (glucagon like protein-1)や食欲抑制ホルモンである PYY (peptide YY)などの分泌に関わることが報告されており、糖代謝や肥満を改善する可能性が示唆されている。しかし、これらの報告は *in vitro* の実験により示されたものであり、生体内における GPR164 の機能については不明であった。また、GPR164 のリガンドについては、リガンドスクリーニングが行われており、酪酸や吉草酸、ノナン酸などにより GPR164 は活性化することが示されていた。しかし、吉草酸やノナン酸など、これまで報告されているリガンドの多くは十分な生体内濃度が存在しないと考えられた。以上のことから、GPR164 の生体機能を明らかにするためには、生体内でリガンドとして機能する脂肪酸を同定し、GPR164 遺伝子欠損マウスなどのマウス個体を用いた検討が必要であった。

## 2. 研究の目的

これまで、GPR164 は腸管に発現し、腸管ホルモンの分泌に関わることが報告されていた。さらに、GPR164 のリガンドとして報告されている酪酸は腸管において高濃度に存在することから、GPR164 は腸管の機能を制御する可能性が考えられた。そのため、本研究では腸管における GPR164 の機能に着目し、解析を行う事とした。腸管は上皮細胞、内分泌細胞、杯細胞などの様々な細胞種で構成されており、腸管バリア機能やホルモン分泌など生体の重要な機能を担っている。これらの機能異常は、腸管局所に留まらず、全身の生体機能を大きく損ねることから、腸管における GPR164 の機能を明らかにすることは、腸管を起点とした全身の生体恒常性維持の分子機序を明らかにすることに繋がる可能性がある。そこで本研究では、GPR164 による腸管機能の制御、特に腸管バリア機能に対する GPR164 の生理的意義とその分子機序の解明を目的に検討した。

## 3. 研究の方法

腸管における GPR164 の機能を明らかにするため、以下のような方法を用いて検討した。腸管の形態観察は、マウス個体から腸管切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により行った。また、各種タンパク質の発現については、組織免疫染色法やウェスタンブロット法により検討した。遺伝子の発現解析は定量的 PCR で、網羅的な遺伝子発現解析は RNA

sequence で、それぞれ行った。RNA sequence 解析から得られたデータをもとに、KEGG パスウェイ解析を行い、遺伝子の発現変化が大きいシグナル伝達経路を同定した。また、阻害剤投与実験はマウスに腹腔内投与することで行った。個体における腸管バリア機能は、FITC-デキストランをマウスに経口投与し、血中の FITC 量を測定することで評価した。用いたマウス個体は野生型及び GPR164 遺伝子欠損マウスである。

In vitro の実験においては、Caco-2 細胞を用いて行った。GPR164 遺伝子欠損細胞は CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。腸管バリア機能は経上皮電気抵抗値(TER)を指標に評価した。リガンドスクリーニングはドキシサイクリン依存的に GPR164 の発現を誘導できる HEK293 細胞を作製し、脂肪酸刺激を行った後の細胞内 cAMP の量を測定し、リガンドを同定した。

#### 4. 研究成果

生体における腸管での GPR164 の発現を調べるため、マウスから回腸、空腸、盲腸、大腸を採取し、各組織における *Gpr164* 遺伝子の発現を調べた。その結果、腸管組織において *Gpr164* 遺伝子は広く発現していることが分かった。腸管は、食物の摂取により様々な脂肪酸に触れるが、腸管の部位により、各種脂肪酸濃度は大きく異なる。そこで、GPR164 過剰発現細胞を用いて、リガンドアッセイを行った。GPR164 を活性化するのに十分な生体内濃度が存在すると思われる脂肪酸で刺激を行い、細胞内 cAMP 濃度を測定した結果、酪酸や中鎖脂肪酸により活性化されることが明らかとなった。このことから、GPR164 は短・中鎖脂肪酸受容体であることが分かった。酪酸は、腸内細菌が産生する代謝産物であり、大腸において特に高濃度に存在する。そこで、野生型または GPR164 遺伝子欠損マウスから大腸を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色により形態観察を行った。その結果、GPR164 遺伝子欠損マウスでは大腸組織に異常が認められ、組織免疫染色法によってもタンパク質の発現に大きな違いがみられた。次に、大腸の形態異常やタンパク質の発現が、腸管機能に影響を与えるかを調べるため、Caco-2 細胞を用いて検討を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて *Gpr164* 遺伝子を欠損させた Caco-2 細胞を作製し、本細胞を長期培養した際の単層形成に対する影響を調べた。単層が形成された際に生じる経上皮電気抵抗値(TER)を指標に、腸管バリアに対する影響を検討したところ、GPR164 遺伝子欠損細胞では、野生型と比べて TER の値が大きく変化した。このことから、GPR164 は腸管バリア機能に影響を与えることが分かった。そこで次に、生体における腸管バリア機能について検討した。FITC-デキストランをマウスに経口投与し、血中の FITC の蛍光強度を測定したところ、GPR164 遺伝子欠損マウスでは腸管バリア機能に異常がみられた。これまでの検討から、GPR164 は腸管バリア機能に重要な働きを持つことが示唆されたことから、GPR164 はどのような経路を介して腸管バリア機能を制御するのかを次に調べた。GPR164 遺伝子の欠損により、発現に変化のある遺伝子を網羅的に調べるため、RNA sequence 解析を行い、さらに本データをもとに KEGG パスウェイ解析を行った。その結果、腸管バリア機能の制御に繋がると考えられるシグナル伝達経路を同定した。このことから、本シグナル伝達経路の阻害剤を用いて検討した結果、阻害剤投与により、GPR164 遺伝子欠損マウスでみられた組織像の異常が軽減されることが分かった。以上より、GPR164 は腸管バリア機能の制御を介して腸管恒常性を維持する重要な分子であることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Takako, Nishida Akari, Yamano Mayu, Kimura Ikuo	4. 巻 239
2. 論文標題 Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108273 ~ 108273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2022.108273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池田貴子、木村郁夫
2. 発表標題 新規脂肪酸受容体GPR164による腸管恒常性維持機構
3. 学会等名 日本食品免疫学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田貴子、木村郁夫
2. 発表標題 脂肪酸受容体による生体恒常性の維持機構
3. 学会等名 日本生理学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池田貴子、西田朱里、山野真由、木村郁夫	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨床化学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 短鎖脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝と生理作用	

1. 著者名 池田貴子、西田朱里、木村郁夫	4. 発行年 2024年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 5
3. 書名 腸内細菌の代謝産物のはたらき	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関