

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460950

研究課題名(和文) GPR40による食事中脂肪の感知における小腸陰窩内微小環境の役割

研究課題名(英文) Bile acid and gut luminal environment modulates fatty-acid sensing by GPR40

研究代表者

山本 明子 (YAMAMOTO, AKIKO)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授

研究者番号：60402385

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)：食事性の脂質は上部小腸の神経内分泌細胞であるI細胞からCCKの分泌を促す。遊離脂肪酸がGPR40センサーである事は今や明らかである。しかしながら、GPR40の効果的なリガンドとして働くためにどのような構造形成が必要なのか、脂肪酸センシングに適した腸内環境など明らかではない。本研究では胆汁酸や腸内環境が脂肪酸センシングに与える影響を明らかにするために、C12細胞にPGPR40を導入した細胞を用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：The presence of ingested fat in the proximal small intestine induces secretion of CCK from a type of enteroendocrine cells: I-cells. It is now clear that GPR40 is the functional sensor of FFAs of CCK cells (I cells). However, we still need to clarify (1) the precise structural requirements (size of aggregates or micelles, etc.) of FFAs as effective ligands of GPR40 and (2) the roles of gut luminal environment for proper fatty-acid sensing. In this study, to clarify the cellular mechanisms by which bile acids and gut luminal environment influence fatty-acid sensing mechanisms, we examined the combined effects of fatty acids and bile acids on $[Ca^{2+}]_i$ in PC12 cells expressing GPR40.

研究分野：膵臓、消化管

キーワード：GPR40 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

Manchester 大学の McLaughlin らは、I 細胞のモデル細胞である STC-1 細胞 (マウス腸管内分泌腫瘍由来の cell line) において、C12 脂肪酸である dodecanoic acid は CCK 分泌を起こすが、C10 以下の脂肪酸では CCK 分泌を起こさないことを明らかにした (McLaughlin *et al. J Physiol* 1998)。また、ヒトにおいても、上部小腸に炭素数が 12 以上の脂肪酸が入ると血中 CCK が上昇することを明らかにした (McLaughlin *et al. Gastroenterology* 1999)。しかし、I 細胞が脂肪酸を感知する機構 (受容体) は不明であった。

最近、脂肪酸の受容体であることが明らかになった G protein-coupled receptors (GPCRs) である GPR40 は比較的広い範囲の飽和脂肪酸や生体内で普遍的に存在するオレイン酸 (C18:1) やリノール酸 (C18:2)、EPA (C20:5) や DHA (C22:6) などといった不飽和脂肪酸で活性化される。そのため、GPR40 は食事から得られる脂肪酸の主なセンサーではないかと推測されており、小腸における発現が確かめられている。

McLaughlin らは STC-1 細胞からマウス GPR40 の cDNA を作成し *Xenopus laevis* oocyte に異種発現させたところ、炭素数が 4 以上の脂肪酸を加えると Ca^{2+} -依存性 Cl⁻コンダクタンスの増加が見られた (Stewart, McLaughlin, *et al. AmJ Physiol Cell Physiol* 2005) と報告している。

小腸粘膜上の環境は、胆汁酸、胃の H^+ 分泌や膵臓の HCO_3^- 分泌による pH の影響等絶えず変化しており、GPR40 を介するシグナルが修飾される可能性がある。脂肪酸の存在様式 (ミセル化とサイズ、イオン化) の変化による間接的な作用と直接作用の両者が推定される。本研究は、細胞外/管腔内環境 (胆汁酸、pH) が、GPR40 による脂肪酸のセンシングに及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

(1) 上部小腸にある I 細胞の GPR40 に脂肪酸が結合すると、コレシストキニン (CCK) が分泌され脂肪の分解吸収の準備が整う。小腸粘膜上の環境の変化が GPR40 を介するシグナルを修飾するという仮説を立てた。細胞内 Ca^{2+} 変動や細胞内 pH など測定し、脂肪酸と胆汁酸の作用を解析する。また、細胞外環境の変化の一つとして細胞外液の pH を変化させて、脂肪酸の細胞内 Ca^{2+} 変動に与える影響や細胞内 pH に脂肪酸が与える影響を検討した。

(2) GPR40 を介する細胞内 Ca^{2+} 応答が胆汁酸や外部環境により変化し、この反応の違いは、胆汁酸や pH が、脂肪酸のミセル化やサイズなどの存在様式に影響していると仮定した。脂肪酸と胆汁酸の混合溶液における粒子サイズ (および形状) を混合溶液の pH も

変化させて測定した。

(3) 脂肪酸/胆汁酸が実際に生理機能に影響を及ぼすかどうかについて小腸陰窩を単離し、マイクロパーフュージョンを行い、神経内分泌細胞内の Ca^{2+} シグナリングに脂肪酸や胆汁酸が及ぼす影響を検討した。(下写真はミニブタ十二指腸)



3. 研究の方法

(1) マウスの GPR40 を PC12 細胞に遺伝子導入した安定発現系の細胞 (PC12-mGPR40-細胞) を作成し、Fura-2 を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する脂肪酸の影響を検討した。

(2) PC12-mGPR40-細胞を用いて、胆汁酸 (CA; コール酸) 存在下に C18 脂肪酸を加え、胆汁酸と脂肪酸の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する影響を検討した。

(3) PC12-mGPR40-細胞を用いて、細胞外液の pH (pH8, 6, 4) を変化させ、pH の変化が脂肪酸の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に与える影響を検討した。

(4) PC12-mGPR40-細胞において、BCECF を用いて細胞内 pH を測定し、脂肪酸 (C12 および C18) が細胞内 pH に与える影響を検討した。また、細胞外液の pH (pH8, 6, 4) を変化させ、pH の変化が脂肪酸の細胞内 pH に与える影響を検討した。

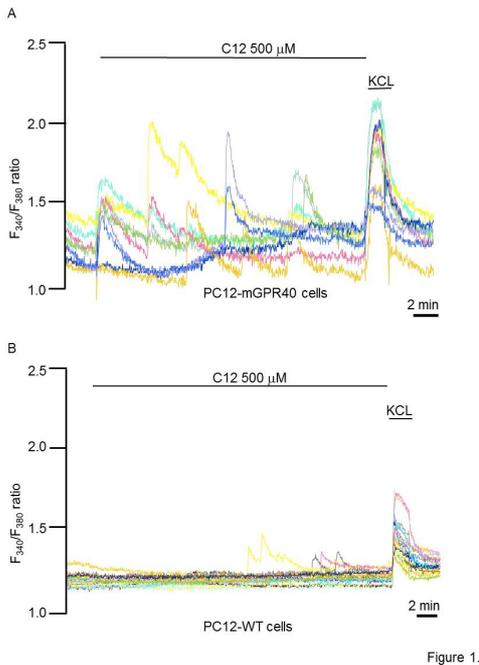
(5) 脂肪酸と胆汁酸の相互作用を検討するために、ミセルの大きさが pH により異なるかどうかを検討するために脂肪酸 (C12) と胆汁酸の混合溶液における粒子サイズを溶液の pH を変化させて、Dyna Pro (PROTEIN SOLUTIONS) を用いて測定した。

(5) 脂肪酸/胆汁酸が実際に生理機能に影響を及ぼすかどうかについて小腸陰窩を単離し、マイクロパーフュージョンを行い、神経内分泌細胞内の Ca^{2+} シグナリングに脂肪酸や胆汁酸が及ぼす影響を検討した。

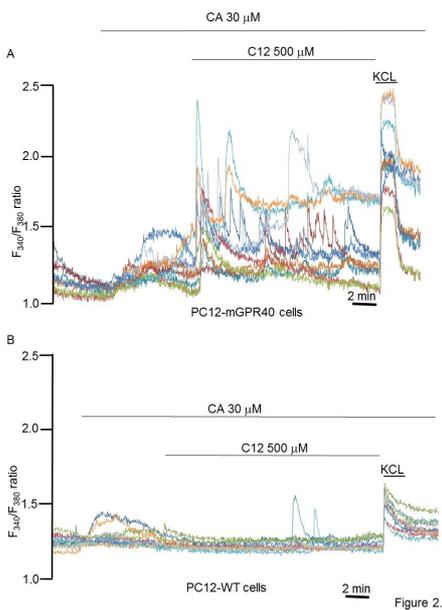
4. 研究成果

(1) マウスの GPR40 を PC12 細胞に遺伝子導入した安定発現系の細胞 (PC12-mGPR40-細胞) を作成し、この細胞を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する脂肪酸の影響を検討した。PC12-mGPR40-細胞では C12 脂肪酸を加えると $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した (Fig. 1A) が、一方、PC12-wild type 細胞では $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は見られなかった (Fig. 1B)。このように、GPR40 を介する脂肪酸の作用が確認された。C18 脂肪酸を加えると小さな $[Ca^{2+}]_i$

の上昇を認めるのみであった (Fig.3A)



(2) 胆汁酸 (CA; コール酸) 存在下に C12 脂肪酸を加えると Ca^{2+} oscillation が出現した (Fig.2A) が、GPR40 を遺伝子導入していない PC12 -wild type 細胞では見られなかった (Fig.2B)



このように、GPR40 を介する脂肪酸と胆汁

酸の相互作用が確認された。
一方 C18 脂肪酸を PC12-mGPR40-細胞に加えても Ca^{2+} oscillation は起こらなかったが、胆汁酸を加えることによって、C18 脂肪酸の小さな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が大きくなった

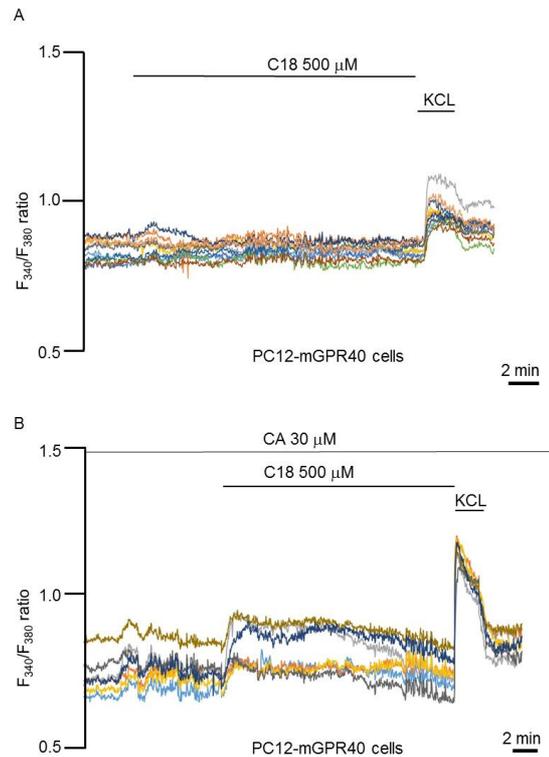


Figure 3.

(3) 脂肪酸と胆汁酸の相互作用を検討するために、ミセルの大きさが pH により異なるかどうかを検討するために脂肪酸 (C12) と胆汁酸の混合溶液における粒子サイズを溶液の pH を変化させて、測定した。ミセルの大きさと pH との関係に一定の傾向は認めなかった。

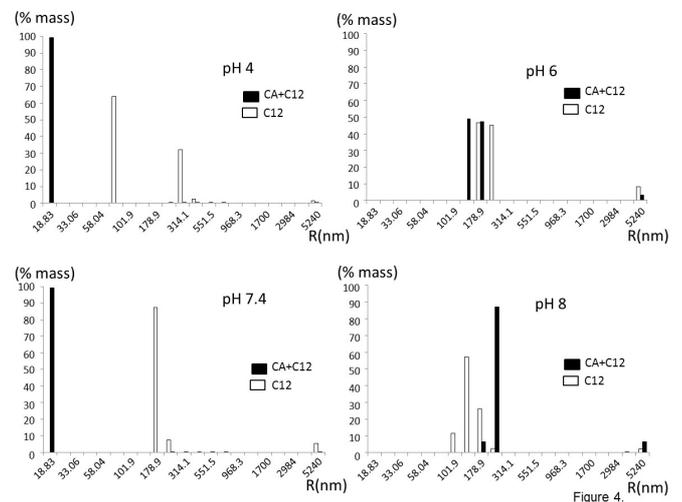


Figure 4.

(4) PC12-mGPR40-細胞を用いて、細胞外

液の pH (pH8, 6, 4) を変化させ、C18 脂肪酸投与における $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。細胞外液 pH8 では、Fig.3A に示す細胞外液 pH7.2 に比して大きな一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 反応を認めた (Fig.5C)。細胞外液 pH6 では、pH7.2 と同様に小さな $[Ca^{2+}]_i$ であった (Fig.5B)。細胞外液 pH4 では、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認めなかった (Fig.5A)。その細胞外液の pH の変化は、脂肪酸の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に影響することがわかった。

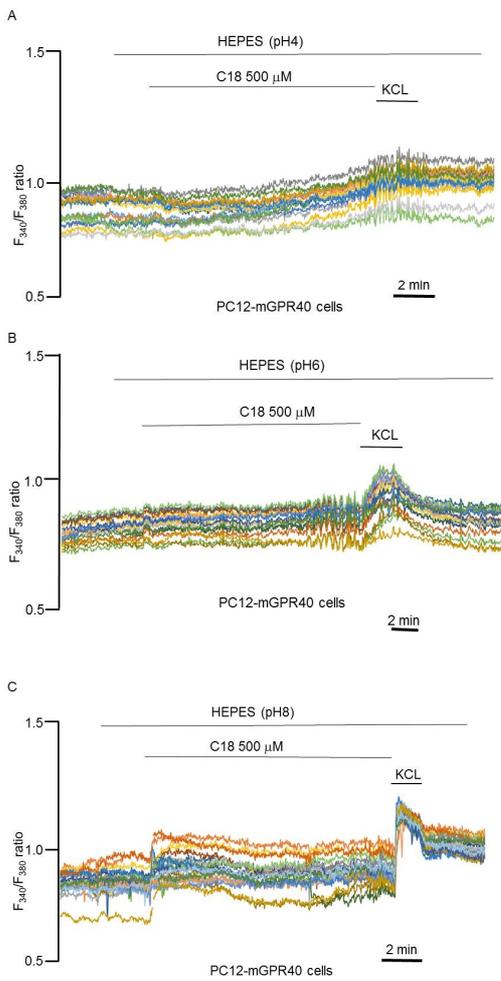


Figure 5.

(5) PC12-mGPR40-細胞において、脂肪酸 (C12 および C18) を投与し、BCECF を用いて細胞内 pH を測定した。pH7.2 (Fig.6B) においては、C12 を投与すると、緩やかに続く pH の低下を認め、C18 を投与すると、わずかに pH の低下を認めるのみであった (Fig.7)。C12 の投与において、細胞外液の pH (pH8, 6, 4) を変化させ、細胞内 pH を測定した。細胞外液を pH8 に変えると、

pH7.2 と同様に緩やかな軽度の細胞内 pH の低下を認めるのみであったが (Fig.6A)、pH6、pH4 での酸性条件では細胞内 pH は大きく急速に低下した (Fig.6C, D)。

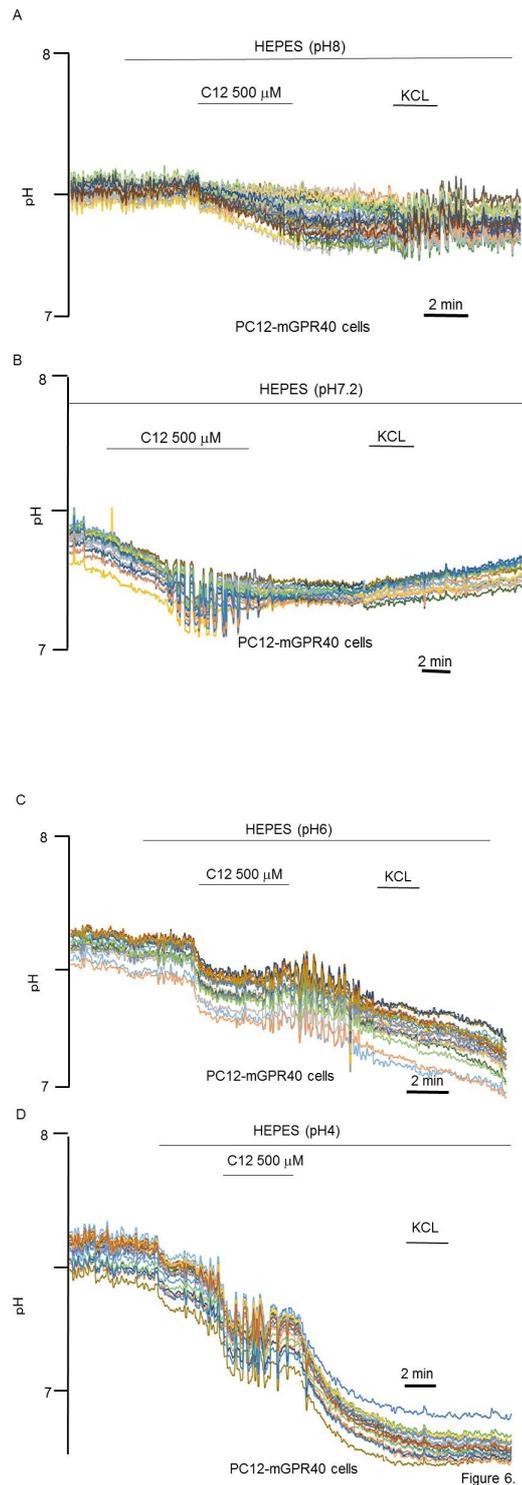


Figure 6.

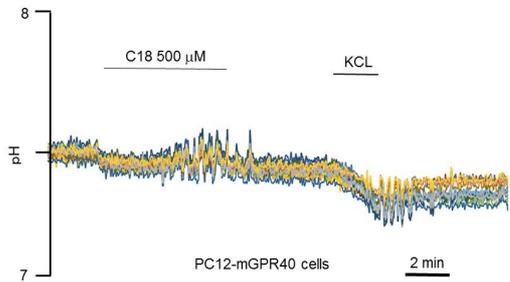
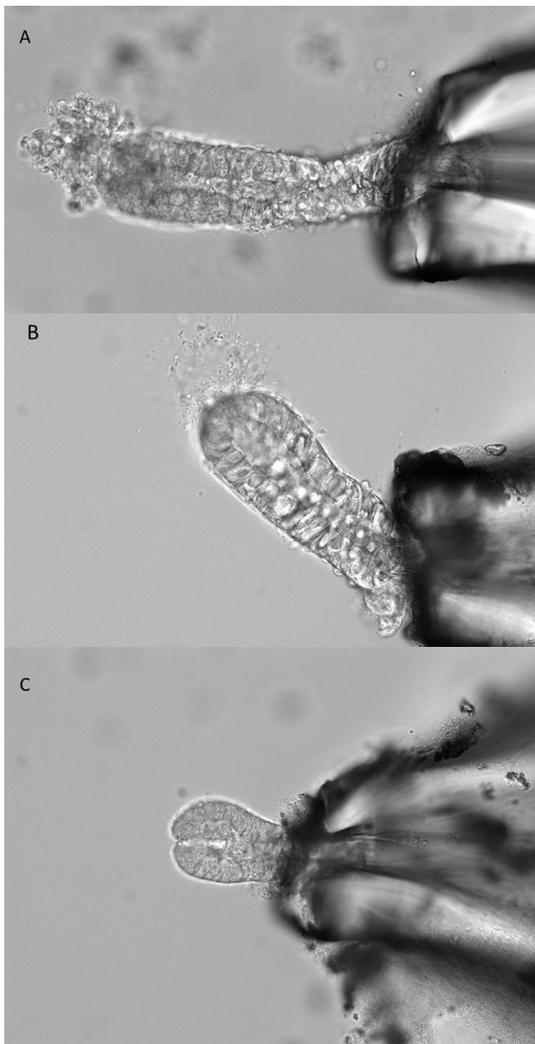


Figure 7.

(6) 脂肪酸/胆汁酸が実際に生理機能に影響を及ぼすかどうかについて検討するために陰窩を単離し、マイクロパーフュージョンを行った。ヤギ大腸(A)、ミニプタ直腸(B)、マウス直腸(C)については、マイクロパーフュージョンに成功し、細胞内 pH の測定に成功した。ミニプタに関しては、十二指腸陰窩を単離し、マイクロパーフュージョンに成功した。FURA2 を用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ の測定に成功した。胆汁酸の投与は一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こした。この細胞が神経内分泌細胞である可能性が高いと思われる。



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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

【新しい視点に立った膵内外分泌相関】
膵の内外分泌相関 研究の源流から
成瀬達, 柴田時宗, 鈴木厚, 傍島裕司,
山本明子, 石黒洋 胆と膵 35: 311-31,
2014.

Functional characteristics of L1156F-CFTR
associated with alcoholic chronic
pancreatitis in Japanese. S. Kondo, K. Fujiki,
S.B. Ko, A. Yamamoto, M Nakakuki, Y. Ito,
N. Shcheynikov, M. Kitagawa, S. Naruse, H.
Ishiguro. *Am J Physiol Gastrointest Liver*
Physiol. 309: G260-G269, 2015. 査読有り
(DOI: 10.1152/ajpgi.00015.2014.)

〔学会発表〕(計 4 件)

小腸生理機能の基礎医学的解明 ワーク
ショップ 9「脂肪酸と胆汁酸の同時投与
は GPR40 発現細胞の Ca^{2+} oscillation を引
き起こす」山本明子, 石黒洋 第 98 回
日本消化器病学会総会 2013.

消化器疾患と胆汁酸 ワークショップ 8
「GPR40 の脂肪酸センシングと胆汁酸」
山本明子, 石黒洋 第 54 回日本消化器
病学会大会 DDW-Japan 2013 (神戸)

腸内環境が脂肪酸のセンシングメカニ
ズムに及ぼす影響 山本明子, 中莖みゆき,
山口 誠, 近藤志保, 洪 繁, 北川元二,
石黒洋 生理研研究会「上皮膜輸送の
多層的コントロールによる生体の恒常性
維持機構」(岡崎)

小腸上皮におけるグルコース吸収の数理
モデル 山口誠, 山本明子, 谷口いつか,
石黒洋 第 120 回日本解剖学会総会・全
国学術集会 第 92 回日本生理学会大会
合同大会(神戸) 2015

〔図書〕(計 1 件)

運動と消化吸収 消化管運動 ニュー運
動生理学(宮村実晴 編) 石黒洋, 山
本明子 p348-355 真興交易医書出版部
(東京) 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 明子 (YAMAMOTO AKIKO)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・
准教授
研究者番号: 60402385

(2) 研究分担者

石黒 洋 (ISHIGURO HIROSHI)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・
教授

研究者番号：90303651

(3)連携研究者
()

研究者番号：