

表 題 脂肪酸の質の違い、作用受容体の違いが決める生理・
病理作用の解明：膵β細胞 GPR40 と
脂肪細胞 GPR120 の機能解析

論文の区分 博士論文

著 者 名 山田 穂高

担当指導教員氏
名 原 一雄・教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
総合医学
内科系総合医学

2017 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

1. 序論	p3
2. 第1部 飽和脂肪酸パルミチン酸の脂肪細胞炎症と内因性制御機構の検討	p6
2-1. 研究背景	
2-2. 材料と方法	
2-3. 結果	
2-4. 考察	
2-5. 結語	
3. 第2部 膵 β 細胞の脂肪酸受容体 GPR40 を介するインスリン分泌メカニズムの検討	p24
3-1. 研究背景	
3-2. 材料と方法	
3-3. 結果	
3-4. 考察	
3-5. 結語	
4. 第3部 不飽和脂肪酸 eicosapentaenoic acid の脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズムの検討	p43
4-1. 研究背景	
4-2. 材料と方法	

4-3. 結果

4-4. 考察

4-5. 結語

5. 総括・・ p66

6. 謝辞・・ p68

7. 参考文献・・ p69

1. 序論

脂肪酸は生体内において細胞膜を構成するのみならず、細胞内シグナル伝達物質あるいはエネルギー源としての役割をもち、生体内恒常性維持に重要な役割を担っている(1)。脂肪酸にはいくつかの分類が存在し、二重結合の有無や位置で飽和、不飽和脂肪酸に、また脂肪酸の鎖長で短鎖もしくは中長鎖脂肪酸に分けられる。この脂肪酸の質の違いが、生体内での異なる生理作用に結び付いている。パルミチン酸は食事に含まれる飽和脂肪酸であり、その過剰摂取は肥満や2型糖尿病発症のリスクを高める(2)。一方で多価不飽和脂肪酸である omega-3 脂肪酸摂取量が多いと、逆に心血管イベント発症を抑制することが疫学的に知られており(3-5)、大規模臨床試験で omega-3 脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) 投与がイベント発症を抑制することが確かめられた(6)。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は最近 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。G 蛋白共役型受容体 40 (GPR40)は膵β細胞に発現し、中長鎖脂肪酸をリガンドとしてインスリン分泌を促進する。G 蛋白共役型受容体 120 (GPR120)はマクロファージや脂肪細胞に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(7)。飽和脂肪酸は生体に Toll-like receptor 4 (TLR4)を介して無菌性炎症を引き起こし、自然免疫を賦活化し、炎症の慢性化に関与する可能性が指摘されている(8)。このように種々の脂肪酸の生理作用にはどの受容体を介する作用なのかという理解も重要な視点となる。しかし、脂肪酸の炎症惹起作用 (悪玉作用)や抗炎症作用(善玉作用)については未だ不明な点が残されている。本研究ではこの

「脂肪酸質の違いによる悪玉、善玉作用のメカニズム」を解明すべく、研究を行う事とした (図 1)。まず第 1 部では飽和脂肪酸の代表であるパルミチン酸の悪玉作用である脂肪組織炎症と内因性制御機構を検討した。続いて第 2 部では、脂肪酸の善玉作用としての膵 β 細胞の脂肪酸受容体を介するインスリン分泌メカニズムを検討した。さらに第 3 部では既存の薬剤である不飽和脂肪酸 EPA の脂肪細胞での新たな抗炎症メカニズムを検討した。

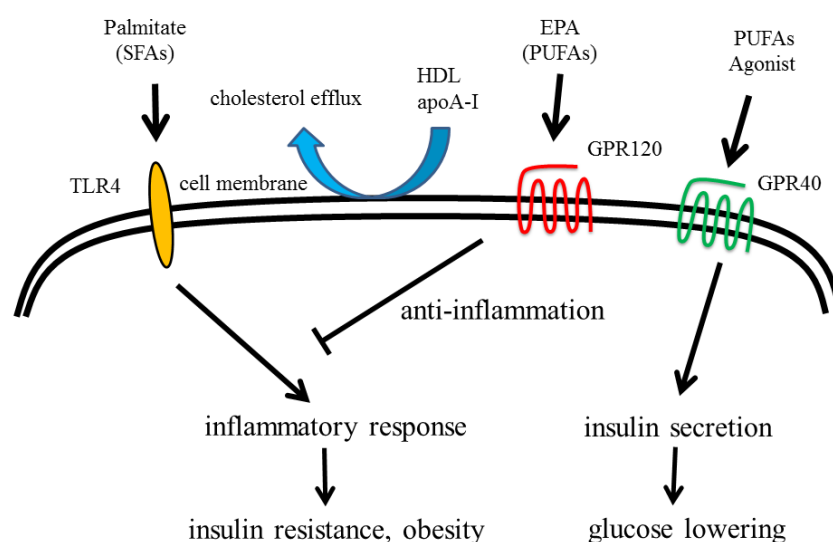


図 1. 生体内での脂肪酸の質、作用受容体が決める「善玉」「悪玉」作用の解明を目指す研究展開のイメージ

パルミチン酸を代表とする飽和脂肪酸はマクロファージ TLR4 等の受容体を介して慢性無菌性炎症 (自然炎症)を引き起こす。不飽和脂肪酸はマクロファージ GPR120 を介して抗炎症作用を持ち、膵 β 細胞 GPR40 を介してインスリン分泌を促進し抗糖尿病的に作用すると考えられている。ApolipoproteinA-I 等は細胞膜からコレステロールを引き抜き、炎症を抑制する。しかしこれらの脂肪酸作

用の詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では脂肪酸の生理・病理作用をさらに深く理解すべく、飽和脂肪酸パルミチン酸が引き起こす脂肪細胞炎症とその制御 (第 1 部)、膵 β 細胞 GPR40 を介するインスリン分泌機構 (第 2 部)、脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズム (第 3 部) に焦点を当てて、実験を行った。

2. 第 1 部

飽和脂肪酸パルミチン酸の脂肪細胞炎症と内因性制御機構の検討

2-1. 研究背景

肥満は 2 型糖尿病や心血管イベント発症の確立された危険因子である(9)。脂肪組織における炎症は脂肪細胞からの炎症性サイトカインやケモカインの分泌を亢進させ、インスリン抵抗性、免疫担当細胞の活性化を誘導する(10)。近年、パルミチン酸等の飽和脂肪酸がパターン認識受容体である Toll-like receptor や NOD-like receptor を介して、脂肪細胞に無菌性の自然炎症を惹起させることが明らかとなってきた (11-13)。実際、長鎖飽和脂肪酸であるパルミチン酸は脂肪細胞培養株である 3T3-L1 細胞において、炎症性液性因子 serum amyloid A (SAA) 3 及びケモカインである単球走化性因子 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現を亢進させることが報告されている(14)。一方、脂肪細胞に発現する Toll-like receptor 4 (TLR4)はインスリン抵抗性の惹起や、慢性脂肪組織炎症形成に重要な役割を果たしていると想定されている。脂肪細胞において TLR4 を small interfering RNA (siRNA)を用いてノックダウンすると、パルミチン酸誘導性の MCP-1 や SAA3 の mRNA 発現上昇が抑制される (14)。生体内における抗炎症機構として High-density lipoprotein (HDL)及び HDL 構成アポリポ蛋白である apolipoprotein A-I (apoA-I)があり、マクロファージの末梢細胞からのコレステロール逆転送を介して、抗動脈硬化的に作用することが知られているが(15, 16)、脂肪細胞における HDL、apoA-I の抗炎症作用メカニズムは不明な点が多い。先行研究において、HDL、apoA-I は 3T3-L1 細胞のパルミチン酸誘導性の炎症性サ

イトカインの mRNA 発現亢進に対して拮抗的に作用することが報告されている (17, 18)。また ApoA-I は同じく 3T3-L1 細胞において、パルミチン酸による TLR4 シグナルの亢進とそれに続く炎症性核内転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化を抑制する (19)。パルミチン酸の脂肪組織炎症惹起メカニズムとして、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 4 (Nox4) の細胞膜上の局在変化がある。Nox4 は細胞膜上の非脂質ラフトに存在しており、パルミチン酸刺激時に脂質ラフトへトランスロケーションし、活性酸素 Reactive Oxygen Species (ROS) を産生し細胞障害を引き起こすことが知られている (20)。HDL 及び apoA-I の詳細な抗炎症メカニズムとして、HDL 及び apoA-I が脂肪細胞膜、特に脂質ラフトからのコレステロールを引き抜き、さらにパルミチン酸が引き起こす Nox4 の非脂質ラフトから脂質ラフトへのトランスロケーションを抑制することが報告された (17)。脂質ラフトは細胞膜上のコレステロールに富む細胞膜ドメインで、細胞内外のシグナル伝達に関わる蛋白やイオンチャネルが存在するシグナル伝達の足場 (プラットフォーム) として機能していると考えられている (21, 22)。脂肪細胞において TLR4 と脂質ラフトの関連性はまだ不明な点が多く残されている。本研究の目的は脂肪細胞において、1) 飽和脂肪酸パルミチン酸が TLR4 の脂質ラフト・非ラフトの局在に影響を与えるか、さらに 2) HDL 及び apoA-I が TLR4 を介する自然炎症を抑制するかを検討することである。

2-2. 材料と方法

細胞培養

脂肪細胞培養細胞株である3T3-L1細胞 (3T3-L1 murine pre-adipocyte)は American Type Tissue Culture Collection から購入し、既報の方法によって成熟脂肪細胞に分化させ実験に供した(17, 20)。要約すると、まず3T3-L1 murine pre-adipocytesを10% Fetal Bovine Serum (FBS)含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)培地で培養した。3T3-L1 murine pre-adipocytesがコンフルエントに達した後、インスリン (5 μ g/mL、Sigma-Aldrich)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (0.5 mM、Sigma-Aldrich)及びデキサメサゾン (2.5 μ M、Sigma-Aldrich) 含有培地に変更し、分化誘導を行った。分化誘導48時間経過後に、インスリン (5 μ g/mL)含有培地に培地交換し、その後48時間毎に培地交換を行った。完全に分化した3T3-L1脂肪細胞は各種処理を行い、後述する方法によりRNA及び蛋白質を抽出した。

リアルタイム定量 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

3T3-L1細胞のRNA分離にはDirect-zolTM RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH)を用いた。Complementary DNAはReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて作成し、RT-qPCRはQuantStudioTM 12K FlexリアルタイムPCRシステムでKOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて行った。各種mRNA発現量は内在性コントロールGAPDHを用いて補正し、結果は相対値で結果を表記した。全てのサンプルはtriplicateで測定した。表1にRT-qPCRで用いたプライマー塩基配列を示す (Sigma-Aldrich)。

表1. RT-qPCRで用いたプライマー塩基配列

Gene	Forward	Reverse
<i>Tnf-α</i>	AAGGCTGCCCCGACTACG	AGGTTGACTTTCTCCTGGTATGAG
<i>Il-6</i>	CACTTCACAAGTCGGAGGCT	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
<i>Tlr4</i>	ATGGCATGGCTTACACCACC	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
<i>Abca-1</i>	CGTTTCCGGGAAGTGTCTTA	GCTAGAGATGACAAGGAGGATGGA
<i>Abcg-1</i>	TTCCCCTGGAGATGAGTGTC	CAGTAGGCCACAGGGAACAT
<i>Srb-1</i>	GCAAATTTGGCCTGTTTGT	GATCTTGCTGAGTCCGTTCC
<i>Gapdh</i>	AGCCTCGTCCCGTAGACAAA	ACCAGGCGCCCAATACG

Tnf- α : tumor necrosis factor- α , *Il-6*: interleukin-6, *Mcp-1*: monocyte chemoattractant

protein-1, *Tlr4*: toll-like receptor 4, *Abca-1*: ATP-binding cassette transporters A1,

Abcg-1: ATP-binding cassette transporters G1, *Srb-1*: Scavenger receptor class B

member 1, *Gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

細胞処理

パルミチン酸 (Sigma-Aldrich)は脂肪酸フリーの bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)と結合させ、実験に用いた。分化した 3T3-L1 細胞を 250 μ M のパルミチン酸で 24 時間刺激、または 50 μ g/mL の HDL (健常者から超遠心で分離) もしくは 50 μ g/mL の apoA-I (Sigma-Aldrich)で 6 時間前処置した後に、パルミチン酸刺激を行った。Methyl- β -cyclodextrin (M β CD、Sigma-Aldrich) は 10 μ mol/mL で 30 分間の前処置とした。コントロール処理にはパルミチン酸と結合していない BSA を用いた。ATP-binding cassette transporters A1 (ABCA-1)、ATP-binding cassette transporters G1 (ABCG-1)及び Scavenger receptor class B member 1 (SRB-1) の遺伝子ノックダウンには以下の siRNA を添付のプロトコールに従って用いた; mouse ABCA-1 siRNA (SR423449)、ABCG-1 siRNA (SR418897)、SRB-1 siRNA

(SR416342、いずれも OriGene Technologies)。SiRNA による遺伝子ノックダウン効率は、RT-qPCR を用いて確認を行った。

Detergent-free 法による脂質ラフトの分離方法

細胞膜脂質ラフトと非ラフトの分離は既報の detergent-free 法に従って行った (17)。各種刺激・処理が加えられた 3T3-L1 細胞は Lysis buffer (0.5 M NaHCO_3 +0.25M sucrose、pH 11) で回収し、ホモジネート (15 回)を行った。その後、20 秒間 30 回の超音波破碎を行った。1000 g×10 分の遠心後、上清 (ライセート)を密度勾配遠心分離媒体 60% OptiPrep (Sigma-Aldrich)に加え、最終密度を 35%になるように調製した (ライセート含有 35% OptiPrep)。さらに 60% OptiPrep を Density gradient buffer (0.25 M NaHCO_3 +0.25M sucrose、pH 11)で希釈し、20%、30% の濃度勾配を作成し、密度の軽い順に、遠心チューブ (Quick-seal、Beckman Coulter)に重層した。最後に上記で作成したライセート含有 35% OptiPrep を遠心チューブに重層し、60000 rpm×90 分の超遠心 (Optima™ XE、Beckman Coulter、ロータータイプ: 70.1Ti、4°C)後、チューブ底面に 18 ゲージ針を穿刺し、1mL シリンジを用いて下層から 1 mL ずつ、合計 8 分画を採取し (下層から Fraction No. 1 から 8 とした)、ウェスタンブロットに供した。

ウェスタンブロット

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて各分画のサンプルの蛋白量を測定した。核内転写因子解析用の核蛋白サンプルは Universal

Magnetic Co-IP kits (Active Motif)を用いて抽出した。サンプルは 1.5mL 遠心チューブ内で SDS sample buffer (Wako)と混合し、100 °C、3 分間加熱した。加熱後のサンプルは SDS ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE)にアプライし、電気泳動を行い polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。5% スキムミルクでブロッキング後、メンブレンを以下の一次抗体と反応させた；抗 TLR4 抗体 (Invitrogen、1:500)、抗 caveolin-1 抗体 (Cell Signaling、1:1000)、抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling、1:1,000)、抗 NF- κ B-p65 抗体 (Cell Signaling、1:1000)、抗 phospho-NF- κ B-p65 抗体 (Cell Signaling、1:1000)。信号の検出は Western Sure ECL substrate (LI-COR Biosciences)と反応後、C-DiGit[®] Blot Scanner (LI-COR Biosciences)を用いて行った。

コレステロール含量測定

3T3-L1 細胞をパルミチン酸刺激群 (250 μ M、24 時間)と、M β CD (10 μ mol/mL、30 分)、HDL もしくは apoA-I (50 μ g/mL、6 時間)で前処置後パルミチン酸刺激を行った群で、コレステロール含量を Total Cholesterol Assay Kit (Cell Biolabs. Inc.)を用いて、添付のプロトコールに従って測定した。

脂質ラフトの可視化

脂質ラフトを可視化するために、3T3-L1 細胞を 1 μ g/mL の濃度の Alexa Fluor 549-conjugated cholera toxin subunit-beta (CTB、Invitrogen)で染色の後、4% パラホルムアルデヒドで固定した (4°C、15 分)。最後に CTB で染色した 3T3-L1 細

胞の蛍光を光学顕微鏡 (BX51、Olympus、倍率 200 倍、カメラ : DP72)で観察した。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表記した。2 群間の比較には unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

2-3. 結果

HDL 及び apoA-I の 3L3-L1 細胞における TLR4 の局在変化に与える影響

脂質ラフトの分離はラフト構成蛋白質である Caveolin-1 を用いたウェスタンブロットで確認し、Fraction No. 7-8 が脂質ラフト、Fraction No. 1-2 が非脂質ラフトと考えられた。TLR4 はパルミチン酸非刺激時には非脂質ラフトに局在していた。パルミチン酸処刺激 (250 μ M、24 時間)、TLR4 は脂質ラフトへトランスロケーションしていた。HDL、apoA-I (50 μ g/mL、6 時間) 及び M β CD (10 μ mol/mL、30 分)前処置を行ったところ、パルミチン酸刺激による TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーションは抑制された (図 2A)。M β CD は脂質ラフトからコレステロールを引き抜く薬物であることから、HDL、apoA-I についても脂質ラフトからのコレステロール引き抜きが抗炎症的に作用していること、特に TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーションの抑制が重要である可能性が示唆された。

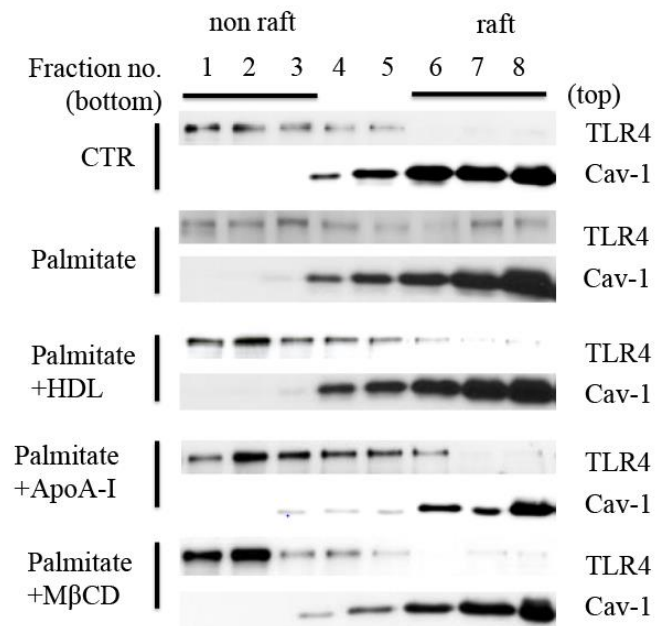


図 2. HDL 及び apoA-I は 3T3-L1 細胞においてパルミチン酸誘導性の TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーションを抑制する

3T3-L1 細胞をパルミチン酸 (250 μ M) で 24 時間刺激した。HDL 及び apoA-I の前処置は各々 50 μ g/mL の濃度で 6 時間行った。M β CD は 10 μ mol/mL で 30 分間の前処置とした。TLR4 の細胞膜上局在及び脂質ラフトを含む fraction の確認には TLR4 及び脂質ラフト構成蛋白 Caveolin-1 のウェスタンブロットで確認した。

HDL、 apoA-I 及び M β CD 前処置のパルミチン酸刺激による炎症性サイトカイン mRNA 発現に与える影響

パルミチン酸刺激後、炎症性サイトカインである IL-6 及び TNF- α の mRNA 発

現が増加していた。24 時間パルミチン酸刺激前に M β CD で前処置 (10 μ mol/mL、30 分)することにより、IL-6 及び TNF- α の mRNA 発現増加は抑制された (図 3 A、B)。同様に HDL、apoA-I で前処置 (50 μ g/mL、6 時間)することで、パルミチン酸誘導性の IL-6 及び TNF- α の mRNA 発現増加は抑制されることが確認された。パルミチン酸刺激、および HDL、apoA-I で前処置後の TLR4 mRNA 発現レベルを検討したところ、有意な変化は認められなかった (図 3C)。3T3-L1 細胞の核蛋白を抽出し、パルミチン酸刺激及び HDL、apoA-I 前処置の NF- κ B p65 のリン酸化への影響を検討した。2 時間のパルミチン酸刺激は NF- κ B p65 のリン酸化を亢進させたが、HDL、apoA-I の前処置で抑制された (図 3D)。次に脂質ラフトに特異的に結合する CTB を用いて、24 時間パルミチン酸刺激の脂質ラフト蛍光への影響を検討した。パルミチン酸で 3T3-L1 細胞を刺激すると CTB 蛍光の増強が認められた。M β CD で脂質ラフトからコレステロールを薬理的に引き抜くとパルミチン酸刺激による CTB 蛍光増加は抑制された (図 3E)。この結果は、パルミチン酸刺激により脂質ラフトが増加、即ち TLR4 がトランスロケーションする炎症の場が増加していると考えられた。次に、まず M β CD が 3T3-L1 脂肪細胞からコレステロールを引き抜いているかを確認した。24 時間のパルミチン酸刺激で 3T3-L1 細胞のコレステロール含量は増加していたが、M β CD 前投与で抑制されることを確認した (図 3F)。さらに HDL、apoA-I の前処置はパルミチン酸刺激によるコレステロール含量増加を抑制した (図 3G)。以上の結果から、HDL、apoA-I は脂質ラフトからのコレステロールを引き抜き、TRL4 の脂質ラフトへのトランスロケーションを抑制していると考えられた。

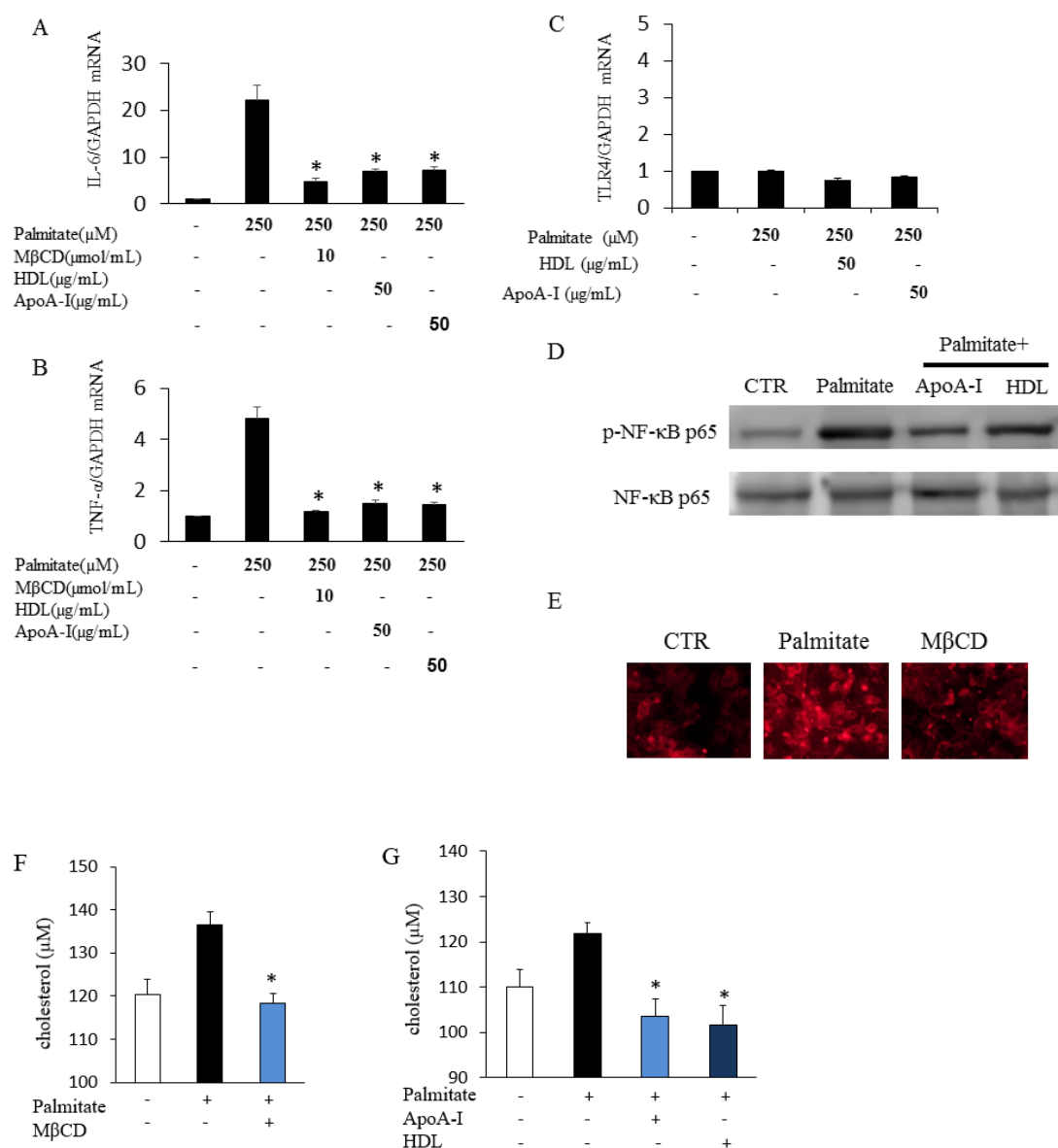


図 3. HDL 及び apoA-I は 3T3-L1 細胞においてパルミチン酸誘導性炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現増加を抑制する

パルミチン酸刺激及び MβCD、HDL 及び apoA-I 前処置の IL-6 (図 3A)及び TNF-α (図 3B) mRNA 発現レベルに与える影響と TLR4 mRNA 発現レベル(図 3C)の比較。n = 3、*p < 0.05 vs. パルミチン酸刺激群。各 mRNA 発現レベルは内部コントロール GAPDH で補正し、相対値で表示した。HDL 及び apoA-I の

NF- κ B p65 のリン酸化に対する影響 (図 3D)。M β CD のパルミチン酸による脂質ラフト形成に与える影響 (CTB で染色)(図 3E)。パルミチン酸刺激の 3T3-L1 細胞におけるコレステロール含量と、HDL 及び apoA-I での前処置後のコレステロール含量の変化 (図 3F、G)。n = 5-6、*p < 0.05 vs. パルミチン酸刺激群。

HDL 及び apoA-I の抗炎症作用の特異的トランスポーター依存性の検討

先行研究で、HDL および apoA-I のコレステロール引き抜き (コレステロールの逆転送)には、各々特異的トランスポーターが関与することが報告されている。

即ち、HDL の機能発揮には SRB-1 と ABCG-1 が、apoA-I には ABCA-1 が必要である(12, 17)。そこで我々は、脂肪細胞でこれらのトランスポーターの機能をノックダウンしたときの HDL および apoA-I による TLR4 の脂質ラフト (fraction No. 7-8)へのトランスロケーション抑制作用に与える影響について検討した。

ABCA-1 の siRNA 処置により apoA-I の TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーション抑制作用が消失した (図 4A)。SRB-1 及び ABCG-1 に対する siRNA 投与によって、HDL の TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーション抑制作用が消失した (図 4B)。一方で非脂質ラフト分画 (fraction No. 1-2)における ABCA-1 に対する siRNA 投与 (図 4C) 及び、SRB-1 及び ABCG-1 に対する siRNA 投与 (図 4D)の影響を検討したところ、TLR4 の局在に変化はみられなかった。SiRNA による SRB-1、ABCA-1 及び ABCG-1 遺伝子ノックダウン効率は RT-qPCR で確認を行い、遺伝子発現抑制が認められた (図 4E)。以上の結果より、脂肪細胞におけるパルミチン酸誘導性の TLR4 トランスロケーション抑制作用にも HDL およ

び apoA-I の特異的トランスポーターの存在が重要であることが示唆された。

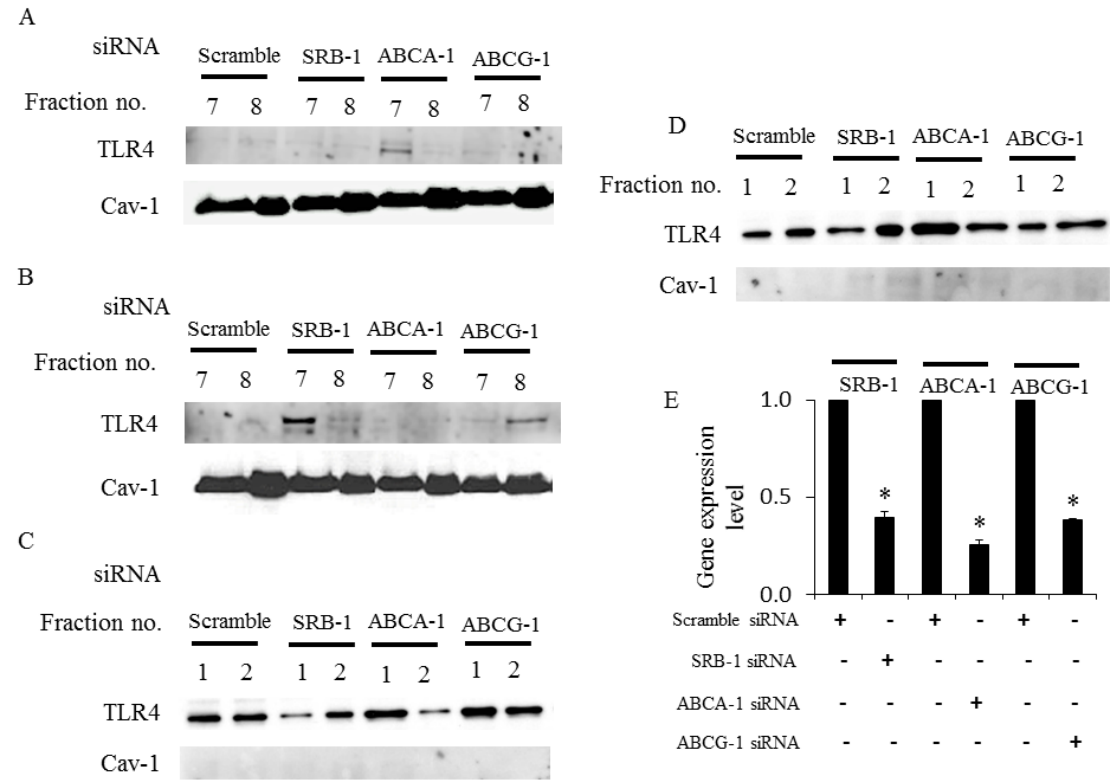


図 4. HDL 及び apoA-I の TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーション抑制作用は特異的トランスポーター依存性である

3T3-L1 細胞の SRB-1、ABCG-1、ABCA-1 の機能を siRNA でノックダウンした。

apoA-I を前処置後にパルミチン酸を投与した細胞 (図 4A)、 HDL を前処置後にパルミチン酸を投与した細胞 (図 4B)における HDL 及び apoA-I の脂質ラフト分画 (fraction No. 7-8)に与える影響。 apoA-I を前処置後にパルミチン酸を投与した細胞 (図 4C)、 HDL を前処置後にパルミチン酸を投与した細胞 (図 4D)における HDL 及び apoA-I の非脂質ラフト分画 (fraction No. 1-2)に与える影響。 SiRAN 効果は RT-qPCR によって確認した (図 4E)。 n = 3、 *p < 0.05 vs. scramble

siRNA。

HDL 及び apoA-I の抗炎症作用の特異的トランスポーター依存性の検討

最後に、HDL 及び apoA-I の炎症性サイトカイン発現抑制効果も前実験結果同様に、特異的トランスポーター依存性かどうかを検討した。その結果、apoA-I のパルミチン酸誘導性 IL-6、TNF- α mRNA 発現増加抑制作用は ABCA-1 への siRNA 投与によって(図 5A、B)、HDL の作用は SRB-1 及び ABCG-1 への siRNA 投与で(図 5C、D)、打ち消されることを確認した。

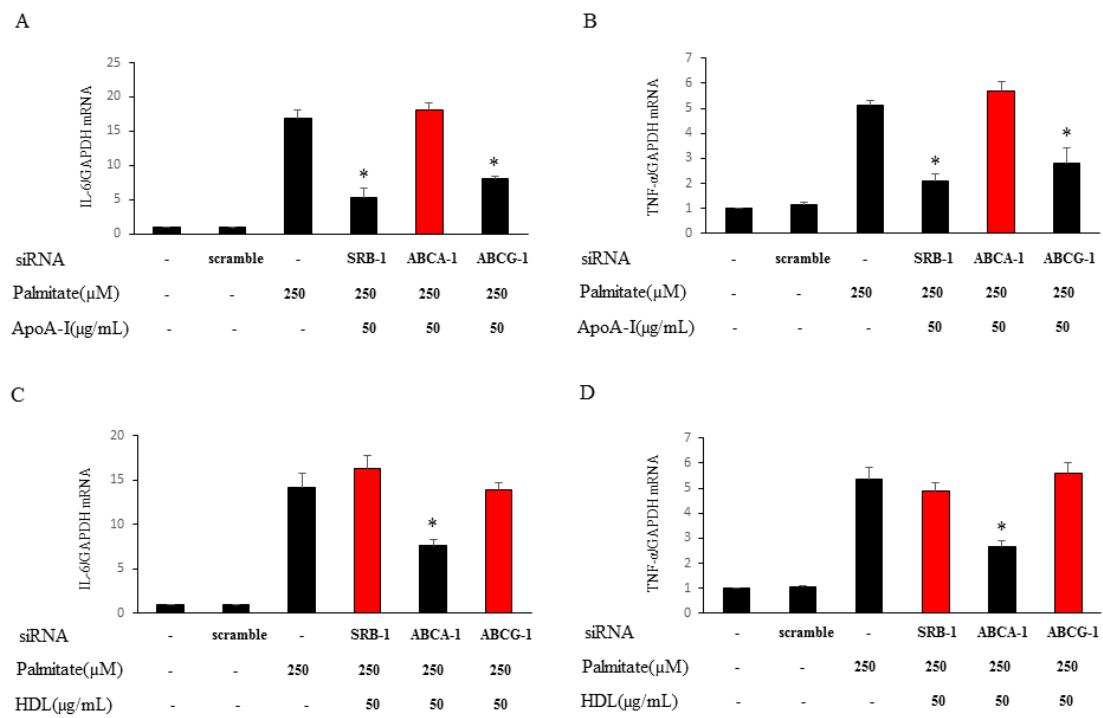


図 5. HDL 及び apoA-I のパルミチン酸誘導性炎症性サイトカイン抑制作用は特異的トランスポーター依存性である

3T3-L1 細胞の SRB-1、ABCG-1、ABCA-1 の機能を siRNA でノックダウンした。

apoA-I を前処置後にパルミチン酸を投与した群 (図 5A、B)、 HDL を前処置後にパルミチン酸を投与した群 (図 5C、D)における HDL 及び apoA-I の抗炎症作用の検討。n=3、*p<0.05 vs. パルミチン酸刺激群。Il-6、TNF- α mRNA 発現レベルは内部コントロール GAPDH で補正し、相対値で表示した。

2-4. 考察

本研究は HDL 及び HDL 構成アポリポ蛋白である apoA-I が 3T3-L1 細胞において、パルミチン酸誘導性の TLR4 の非脂質ラフトから脂質ラフトへのトランスロケーションを抑制し、炎症性サイトカインの発現を抑制し、抗炎症作用を発揮することを明らかにした。さらに HDL、apoA-I のパルミチン酸誘導性の TLR4 トランスロケーション抑制作用では、HDL は SRB-1、ABCG-1 に、apoA-I は ABCA-1 に依存することが明らかとなった。マクロファージや B 細胞、好中球といった古典的免疫担当細胞においては、TLR4 のリガンドである lipopolysaccharide (LPS)刺激によって脂質ラフトへ TLR4 のトランスロケーションが引き起こされ、この TLR4 の局在の変化が炎症惹起に必要なプロセスであることが知られている(23)。本研究は、脂肪細胞においてもこのパルミチン酸刺激による TLR4 のトランスロケーションが炎症惹起に重要である可能性を示した。肥満状態では血中の飽和脂肪酸が上昇しており、これが臓器慢性炎症を引き起こすと考えられている。本実験結果は飽和脂肪酸により誘導される脂肪組織炎症の一つのメカニズムの一端を示している。複数の先行研究では、パルミチン酸を含む飽和脂肪酸が TLR4 を介する炎症性シグナルを亢進させること(24)

が、 膵 β 細胞(25)、 単球(26)、 脂肪細胞(14, 17, 20) あるいは血管内皮細胞(27) において示されている。Han らは 3T3-L1 細胞において、TRL4 遺伝子の silencing によってパルミチン酸誘導性の SAA3 及び MCP-1 の mRNA 発現が抑制されることを報告している(14)。Han らの検討でも我々の結果と同様に 3T3-L1 細胞を 250 μ M パルミチン酸を含む 5mM または 25mM グルコース培地で 7 日間刺激した前後で TLR4 の mRNA 発現量は変化していなかった(14)。他の研究では、マクロファージ培養細胞株である RAW264.7 において、LPS 刺激は TLR4 の蛋白発現量には影響しないが、TLR4 の下流のアダプター蛋白である myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88)や TIR-domain-containing adaptor-including IFN- β (TRIF)との複合体形成が亢進していることが報告されている(28)。さらに Wong らは TLR4 が脂質ラフトにトランスロケーションし、MyD88 との複合体 (2 量体)を形成し、NADPH oxidase を介する ROS の産生を亢進させることを明らかにしている(29)。本研究の結果からも、TLR4 のシグナル伝達において、TLR4 の mRNA 発現以上に、TLR4 の細胞膜上の局在の変化がより重要なのではないかと推察している。しかし、LPS 刺激とパルミチン酸刺激で同様の TLR4 シグナル伝達が行われているか、パルミチン酸刺激においてはどのアダプター蛋白との複合体形成が重要かは不明であり、今後の検討を要する。さらに最近、肝臓由来の分泌蛋白である Fetuin-A が遊離飽和脂肪酸のキャリアーとして作用し、Fetuin-A と結合した飽和脂肪酸が TLR4 のシグナル伝達を促進させる可能性があることが報告された(30)。Fetuin-A は血清中に数十 mg/dL レベルの高濃度で存在するため、FBS が添加されているメディウムで TLR4 等の自然炎症惹起を

観察する場合、結果の解釈に注意が必要と考えられる。Fetuin-A フリーの条件下でパルミチン酸刺激した場合の TLR4 の細胞膜上局在の変化が起こり得るかについても今後の検討が必要である。

M β CD で薬理的に脂質ラフトからコレステロールを引き抜いて脂質ラフトを破壊した場合、LPS や飽和脂肪酸誘導性の TLR を介する炎症性シグナル伝達が抑制されることが知られている。この事実は脂質ラフトが TLR4 のシグナル伝達場として重要であることを示唆している(31-33)。本研究においても、M β CD で脂肪細胞の脂質ラフトコレステロールを引き抜くことが、抗炎症的に作用することを確認した。パルミチン酸が 3T3-L1 細胞においてコレステロール含量を増加させるが、M β CD での前処置によってコレステロール蓄積が低下することを確認している。HDL 及び apoA-I も脂肪細胞からコレステロールを引き抜くことが分かった。この結果は、24 時間のパルミチン酸刺激 (250 μ M) で増加した細胞膜コレステロール含量を HDL 及び apoA-I 投与が抑制する既報と矛盾しない(17)。CTB 染色においても、パルミチン酸処理で脂質ラフトの蛍光強度が増強している結果と併せて考えると、ラフトは炎症惹起の場として重要な役割を演じていると考えられる。上記に加え、本研究でマクロファージや血管内皮細胞においてだけでなく(34, 35)、脂肪細胞においても HDL 及び apoA-I の抗炎症作用に、HDL は SRB-1 と ABCG-1 が、apoA-I には ABCA-1 が深く関わっていることを示した。

Abca-1 と *Abcg-1* 遺伝子のダブルノックアウトマウスのマクロファージにおいて、細胞膜上の TLR4 とその下流のアダプター蛋白である myeloid differentiation

protein 2 の複合体形成が亢進し、炎症性サイトカインの発現も亢進していることが明らかとなっている(36)。この炎症性サイトカイン遺伝子発現亢進はマクロファージ TLR4 やその下流アダプター蛋白 MyD88/TRIF のノックダウンで抑制されることがわかった。これらの既報や我々の結果から、HDL と apoA-I は様々な細胞膜表面から、特に脂質ラフトからの、コレステロール引き抜きが TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーション抑制を介して生体内の飽和脂肪酸等による無菌性炎症を抑制している可能性があると考えられる。しかし、TLR4 の脂質ラフトへトランスロケーションするメカニズムの詳細は不明であり、脂質ラフトと TLR4 誘導性の炎症の関連についてさらなる検討が必要である。

最近、SAA によって HDL の抗炎症作用が失われることが報告された。硝酸銀を静脈内投与されたマウスから分離された HDL は 3T3-L1 細胞において、パルミチン酸誘導性の炎症を抑制できなかったことが明らかとなった。実際、全身性の炎症性疾患 (膠原病)である systemic lupus erythematosus 患者から分離された HDL も抗炎症作用が失われていたことが分かった(37)。HDL や apoA-I は in vivo で炎症状態下に存在すると、その正常な抗炎症効果が失われる可能性があり、HDL や apoA-I の作用の質に大きな影響を与え得ると考えられる(16)。肥満、糖尿病あるいは慢性腎臓病など様々な HDL が修飾を受け得る状態下での HDL の生理作用の検討や、いかなる介入が HDL の抗炎症作用を改善できるかの検証も臨床上重要な検討課題と考えられる。

2-5. 結語

本研究は、HDL と apoA-I が飽和脂肪酸であるパルミチン酸による脂肪細胞炎症を抑制することを明らかにした。これらの知見はパルミチン酸による脂肪組織炎症と HDL と apoA-I による無菌性炎症制御作用の新たなメカニズムを提起するものである。

謝辞

本研究の実施に当たり、自治医科大学附属さいたま医療センター循環器病臨床医学研究所実験補助員の大谷多栄子氏、深谷晴恵氏に謝意を表します。本研究の一部は平成 26 年度自治医科大学大学院医学研究科若手スタートアップ研究費による支援によって行われたことを付記します。

3. 第2部

膵β細胞の脂肪酸受容体 GPR40 を介するインスリン分泌メカニズムの検討

3-1. 研究背景

G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は2型糖尿病の重要な創薬ターゲットである(38)。G 蛋白共役型受容体 40 (GPR40)は膵β細胞に高発現していることが知られており (39, 40)、GPR40 の受容体刺激はグルコース依存性インスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion; GSIS)を促進させることから2型糖尿病の治療薬として開発が続けられている(41-43)。GPR40 は Gq 蛋白に共役すると考えられており、中長鎖不飽和脂肪酸をリガンドとする。GPR40 受容体刺激は phospholipase C (PLC)を活性化し、PLC が phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (PIP₂)を加水分解し、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) 及び diacylglycerol (DAG)の産生が増加する。産生された IP₃ は小胞体の IP₃ 受容体に結合し、小胞体内部からのカルシウムの動員を促進、細胞質内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i)を増加させる(38, 44-48)。DAG は protein kinase D1 のリン酸化を介して F-actin のリモデリングを引き起こし、GSIS を促進させる(49)。一方で、消化管ホルモンインクレチンである glucagon-like peptide 1 (GLP-1)や glucose-dependent insulintropic polypeptide は膵β細胞の Gs 蛋白と共役する GPCR のリガンドとして作用し、adenylate cyclase を活性化し、細胞質内の cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)の産生を促進する。cAMP は protein kinase A (PKA)及び exchange protein directly activated by cAMP 2 (EPAC2)を活性化し、インスリン分泌を促進させることが知られている(50)。最近我々はこの

cAMP/EPAC2 経路の活性化が非選択性陽イオンチャネル (nonselective cation channel; NSCC)である transient receptor potential (TRP) melastatin 2 (TRPM2)チャネルを開口させ、細胞が外からカルシウムを流入させ、細胞膜の脱分極を促進させることを見出した(51)。一般に、膵 β 細胞膜の脱分極にはグルコースが細胞内に取り込まれ、adenosine triphosphate (ATP)が産生され、ATP 感受性カリウム (KATP)チャネルが閉口し、外向き電流が減少することによって細胞膜を脱分極させる。これに引き続いて電位依存性カルシウムチャネルが開口し、 $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、インスリン開口分泌を引き起こすとされている。我々の報告は、外向き電流 KATP チャネルの閉口のみならず、GLP-1 刺激が内向き電流である NSCC 電流 (背景電流)を増加させ、脱分極を増強するというものである(51)。 TRPM2 チャネルは膵 β 細胞に存在することが知られており(52)、 実際 TRPM2 チャネルノックアウトマウスではグルコース刺激及び GLP-1 刺激によるインスリン分泌が減弱することも報告されている(53)。しかし、GPR40 受容体刺激が NSCC 電流に影響を及ぼすかどうかは不明である。そこで、1) GPR40 受容体シグナルが NSCC 電流を増加させるかどうか、2)そうであれば、どのような種類の NSCC 電流が増加しているのかを検討することを目的に研究を計画した。

3-2. 材料と方法

ランゲルハンス島分離と単離 β 細胞調製

8-12 週齢のオスの Wistar ラットもしくは 4-6 週齢のオス C57BL/6J マウスを CLEA Japan より購入した。動物飼育については日本生理学会の動物飼育ガイド

ラインに沿って行い、動物実験計画については自治医科大学の許可を得た後行った。ランゲルハンス島の分離・回収については既報の方法に従って行った(54, 55)。要約すると、まず動物にペントバルビタール (100 mg/kg)を腹腔内投与することで麻酔し、開腹した。顕微鏡下に総胆管を同定し、HEPES-added Krebs-Ringer bicarbonate buffer (HKRB)に予め溶解しておいたコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich)を総胆管開口部より逆行性に注入した。HKRB の組成は 129 mM NaCl、5 mM NaHCO_3^- 、4.7 mM KCl、1.2 mM KH_2PO_4 、2 mM CaCl_2 、1.2 mM MgSO_4 、and 10 mM HEPES (pH 7.4)である。コラゲナーゼが膵体尾部まで注入できていることを確認し、摘出後 HKRB に移し、37°C、15 分間恒温槽でインキュベーションを行った。その後 800 回転、30 秒の遠心を 3 回行い、沈殿物をシャーレに移し、実体顕微鏡下でランゲルハンス島をピペットで用手的に回収した。インスリン分泌実験に供するために 1.5ml エッペンドルフチューブにサイズをマッチさせた 10 個のランゲルハンス島を分注した。またランゲルハンス島を Ca^{2+} -free HKRB 中で攪拌し、単離 β 細胞を調製し電気生理学実験に供した。インスリン分泌実験には 0.01% bovine serum albumin (fatty acid free、Sigma-Aldrich)入りの HKRB を用いた。

インスリン分泌測定と cAMP 測定

サイズマッチした 10 個のラットランゲルハンス島の入った 1.5mL のエッペンドルフチューブをまず 37°C で 1 時間、2.8mM グルコース (Ca^{2+} -free HKRB、1mL)でインキュベーション (static incubation)を行った。上清を破棄し、2.8mM から

16.7 mM グルコース濃度の範囲でインキュベーションを行い (test incubation)、インスリン分泌測定のため上清を回収した。GPR40 の選択的受容体作動薬として、fasiglifam (10 μ M、AdooQ BioScience)を用いた。その他、TRP チャネルの阻害薬として、TRP canonical (TRPC) チャネルの選択的阻害薬 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative 2 (BTP2、10 μ M; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)及び TRPC3 チャネルの選択的阻害薬 (Pyr3、10 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いた。PLC の阻害薬として、U73122 (2 μ M、Sigma-Aldrich)を PLC 阻害薬の陰性コントロールとして U73343 (2 μ M、Sigma-Aldrich)を、さらに PKA の阻害薬として H89 (10 μ M、Sigma-Aldrich)を用いた。上清中に分泌されたインスリン量はマウスおよびラットインスリン enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Morinaga Institute of Biological Science)を用いて測定した。cAMP 測定実験では、また 5.6 mM グルコース下で 1 時間の test incubation 直前に 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine を添加し、cAMP は既報に従い enzyme immunoassay kit (GE Healthcare)を用いて測定した(56)。

単離 β 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 測定

ラットから単離した β 細胞をカバーガラス上に播種した。 β 細胞質内 $[Ca^{2+}]_i$ は fura-2 蛍光画像解析で測定した(51, 55)。事前に蛍光色素 fura2-AM を導入した β 細胞に 36°C に加温した HKRB を還流し、340/380 nm の励起光を用い、510 nm での蛍光強度比を測定した (cooled charge-coupled device camera)。蛍光強度比画像は Aquacosmos system (Hamamatsu Photonics)を用いて描画した。データ解析に

当たって 2.8mM から 8.3mM グルコースに濃度を変化せたときに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が確認でき、さらに実験の最後に還流した 100 μ M の tolbutamide に反応した細胞を β 細胞としてカウントした。

電気生理学実験

細胞膜電流 (whole-cell current) は 0.1% dimethylsulfoxide に溶解した amphotericin B (200 μ g/mL) を吸引した pipette (ガラス電極) を用い、perforated whole-cell voltage-clamp mode で測定した。電流は amplifier (Axopatch 200B; Axon Instruments) で記録し、pCLAMP10.2 software を用いて解析した。Pipette は Narishige より購入し、pipette solution (40 mM K_2SO_4 , 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, and 10 mM HEPES) を満たした状態で電気抵抗が 3-5 $M\Omega$ のものを使用した。5.6mM グルコースの HKRB を還流液として用いた。NSCC 電流を測定するために、単離 β 細胞膜電位を -70 mV に電位固定し、さらに 100 μ M の tolbutamide を還流し、KATP チャネル電流を遮断した条件下で実験を行った。これによって KATP チャネル電流以外の電流、即ち NSCC 電流の測定を可能とした。また tolbutamide 還流の影響を除外するために、tolbutamide-free の還流液で単離 β 細胞を -80 mV に電位固定した条件でも電流を測定した。細胞膜電位の測定は current-clamp mode でおこなった。電位測定実験において 2.8mM もしくは 5.6mM グルコースの HKRB を還流液として使用した。電気生理学実験には fasiglifam (10 μ M) 以外に、TRP チャネル非選択的阻害薬 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB、10 μ M、Wako) に加え BTP2 (10 μ M)、Pyr3 (10 μ M) を用いた。また protein kinase C (PKC) 阻害薬とし

て、Gö6983 (1 μ M、Wako)及び Gö6976 (1 μ M、Merck Millipore)を用いた。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差として表記し、2 群間のデータ比較は paired または unpaired t-test で行った (GraphPad Prism version 5.0)。p <0.05 を統計学的に有意と判断した。

3-3. 結果

GPR40 選択的受容体アゴニスト fasiglifam の非選択性陽イオンチャネル (NSCC)電流および膜電位に与える影響

まず、fasiglifam が KATP チャネル非依存性の NSCC 電流を増加させるかどうかを検討した。ラット単離 β 細胞を 5.6 mM グルコース下で -70 mV に電位固定し、tolbutamide (100 μ M)を先行還流した条件で fasiglifam (10 μ M)を還流すると、有意に内向き電流を増加させた (図 6A、B)。この条件下では KATP チャネルは完全に閉口していると考えられるため、fasiglifam で増加した内向き電流は NSCC 電流と考えられた。Tolbutamide の影響を排除するために、 β 細胞を -80 mV に電位固定し、tolbutamide-free の還流液を用いて同様の実験を行ったところ、有意な内向き電流の増加が観察された (図 6C)。この結果は tolbutamide が fasiglifam の電流増加に影響していないことを示している。図 6D に電流-電圧曲線 (current-voltage relationship curve; I-V curve)を示す。I-V curve から算出した逆転電流は -12 mV であった。この逆転電流値は過去の NSCC 電流の逆転電流に矛盾しない結

果であった ($-20 \sim 0$ mV)(57)。

次に fasiglifam の細胞膜電位に与える影響を検討した。2.8 mM グルコース下で fasiglifam (10 μ M)は静止膜電位を有意にかつ可逆的に脱分極させた (-66.5 ± 2.9 mV vs. -50.5 ± 3.7 mV、 $p = 0.0005$)が、インスリン分泌を誘発する活動電位の発生は見られなかった (図 6E、F)。

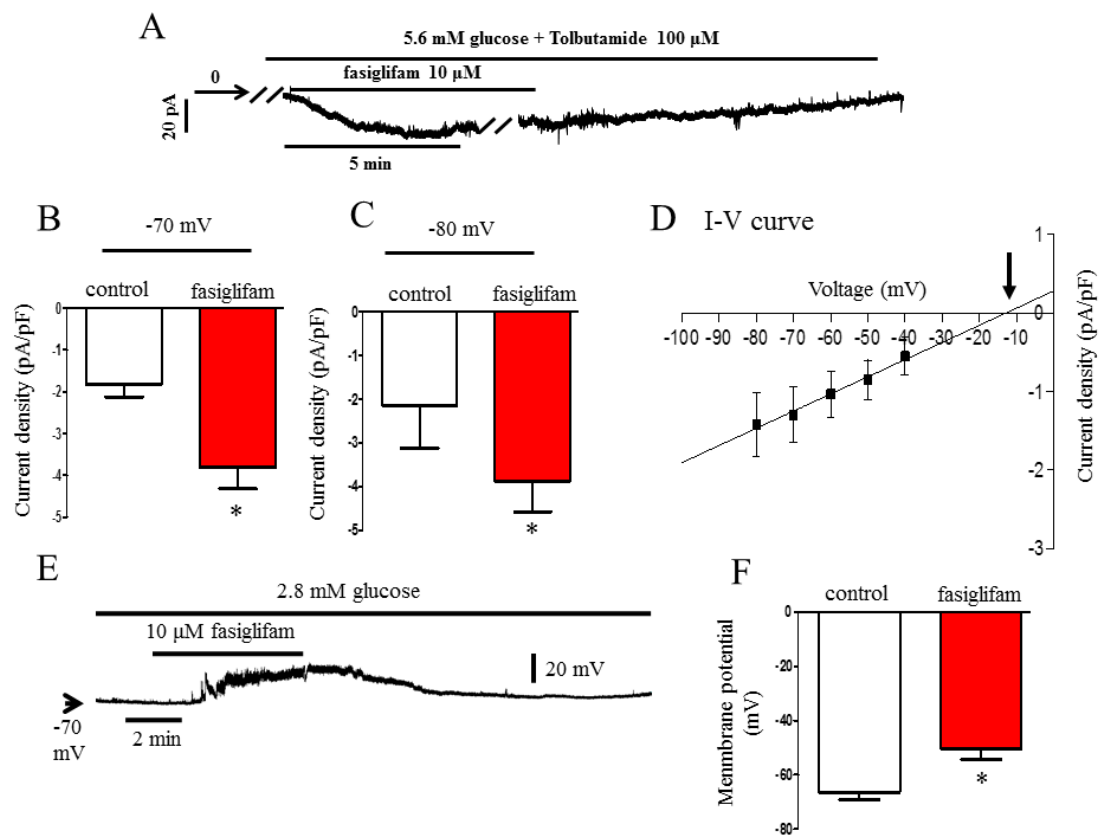


図 6. Fasiglifam はラット単離 β 細胞において、非選択性陽イオンチャネル (NSCC)電流を増加させ、静止膜電位を脱分極させる

細胞膜を -70 mV に電位固定し、tolbutamide (100 μ M)を先行還流した単離ラット β 細胞に、fasiglifam (10 μ M)を還流し、パッチクランプ法で電流を測定した (図 6A、B)。また tolbutamide-free にして、 -80 mV に電位固定して同様の実験を行

った (図 6C)。電流-電圧曲線 (current-voltage relationship curve; I-V curve)から算出した逆転電流は-12 mV であった (矢印) (図 6D)。2.8mM グルコース下で、fasiglifam (10 μ M)を還流し、単離 β 細胞膜電位を測定した (6 図 E、F)。2 群間の比較は paired t-test を用いて検定した。Fasiglifam 非還流状態を control とした。全て n = 5、*p < 0.05 vs. control。

インスリン分泌実験では、8.3 mM 及び 16.7 mM の高グルコース条件下で fasiglifam 添加群の方が有意にインスリン分泌を促進したが、2.8mM の低グルコース下では、インスリン分泌は増加しなかった (図 7)。

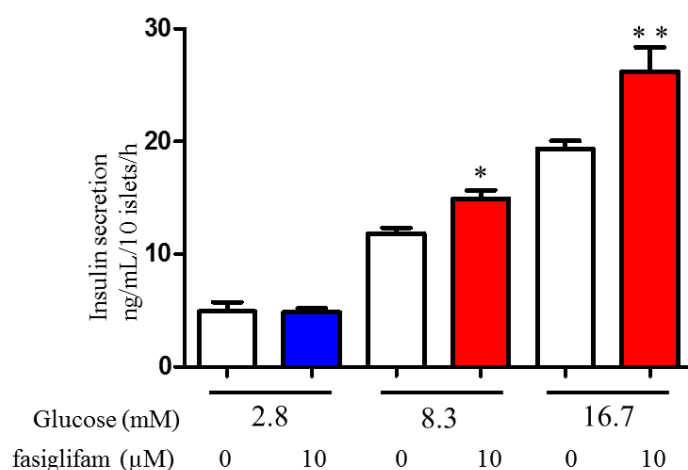


図 7. Fasiglifam の高グルコース及び低グルコース下でのインスリン分泌に与える影響

各 1.5mL エッペンドルフチューブにサイズマッチさせた 10 個のラットランゲルハンス島を採取し、2.8mM、8.3mM、16.7mM グルコース濃度下で fasiglifam

(10 μ M)の有無で 1 時間インキュベーションを行い、上清のインスリン濃度を ELISA で測定した。2 群間のインスリン濃度の差異は unpaired t-test で検定した。n = 5 -7、*p < 0.05 vs. 8.3mM グルコース、**p < 0.05 vs. 16.7mM グルコース。

Fasiglifam の GPR40 を介するシグナル下流のインスリン分泌経路の検討

我々のグループはこれまで、インクレチンホルモン GLP-1 が TRP チャンネルの一つである TRPM2 チャンネルを活性化し、細胞内のカルシウム濃度を増加せることを報告してきた(51)。本実験で GPR40 を介する背景電流の増加が TRP チャンネルを活性化するかどうかを、TRP チャンネルの非選択的阻害薬 2-APB 及び選択的 TRPC チャンネル阻害薬 BTP2 を用いて検討した。2-APB 及び BTP2 は fasiglifam 誘導性の NSCC 電流の増加を抑制した (図 8A、B)。さらに TRPC3 チャンネルの選択的阻害薬である Pyr3 も fasiglifam が増加させる NSCC 電流増加を抑制した (図 8C)。これらの結果から fasiglifam は TRPC3 チャンネルを開口させ、NSCC 電流を増加させていることが示唆された。既報において GPR40 の下流のシグナルとして PLC が考えられている(46, 58)。そこで、PLC 阻害薬 U73122 を用いて検討したところ、fasiglifam 誘導性の電流増加は抑制された (図 8D)。さらに、異なる 2 種の PKC 阻害薬によっても fasiglifam による NSCC 電流増加は抑制された (図 8E、F)。次に fura-2 蛍光画像解析で β 細胞の細胞質内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)の動態を検討した。8.3 mM グルコース下で、10 μ M の fasiglifam は $[Ca^{2+}]_i$ を増加させたが、10 μ M の Pyr3 の先行還流によって fasiglifam による $[Ca^{2+}]_i$ 増加

は有意に抑制された (図 9A、B)。インスリン分泌においても、U73122、BTP2 及び Pyr3 の共インキュベーションで fasiglifam によるインスリン分泌増加作用は抑制された (図 10A、B)。以上の結果から fasiglifam は PLC-PKC 経路を介して TRPC3 チャンネルを開口させ、 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ、インスリン分泌を促進していると考えられた。

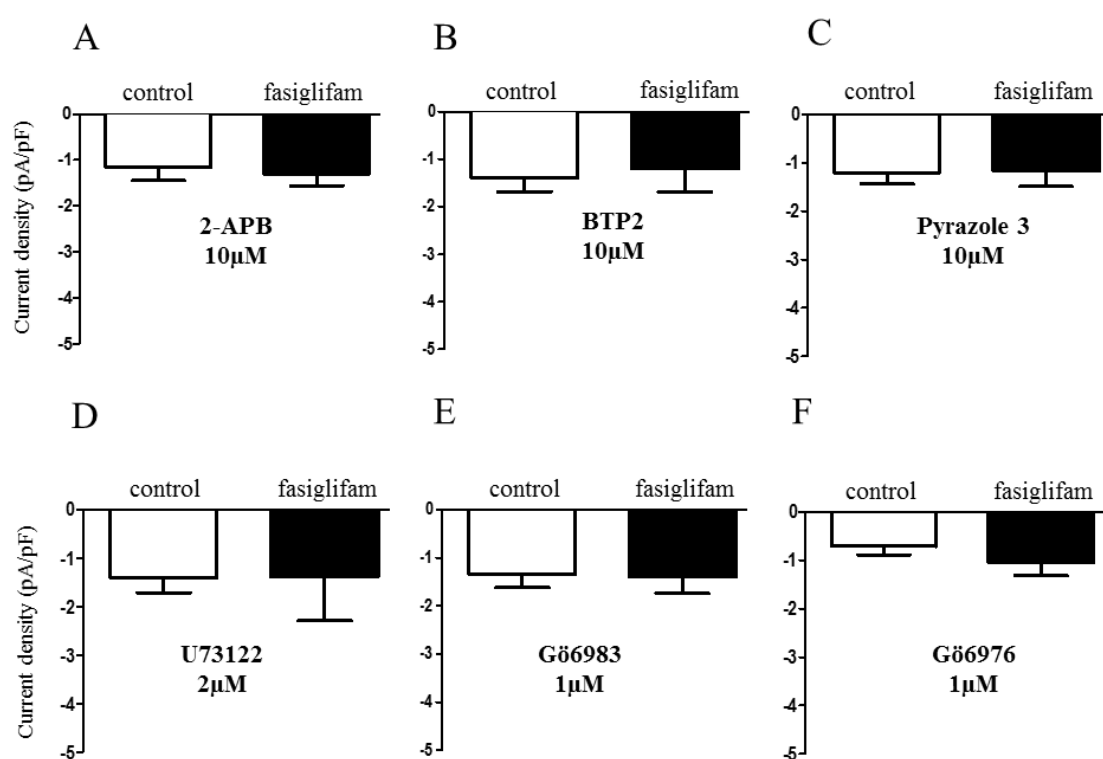


図 8. Fasiglifam による非選択的陽イオンチャネル (NSCC)電流は phospholipase C (PLC)阻害薬、protein kinase C (PKC)阻害薬及び TRP チャンネル阻害薬で抑制される

TRP チャンネルの非選択的阻害薬 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB、10 μ M)、選択的 TRP canonical (TRPC)チャンネル阻害薬 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole

derivative 2 (BTP2、10 μ M)及びTRPC3チャネルの選択的阻害薬Pyrazole-3 (Pyr3)が Fasiglifam (10 μ M)誘導性の NSCC 電流増加に与える影響 (図 8A-C)。また PLC 阻害薬 (U73122、2 μ M)及び PKC 阻害薬 (Gö6983、Gö6976、各々1 μ M)が Fasiglifam 誘導性 (10 μ M)の NSCC 電流増加に与える影響 (図 8D-F)。全て n = 5、ラット単離 β 細胞。

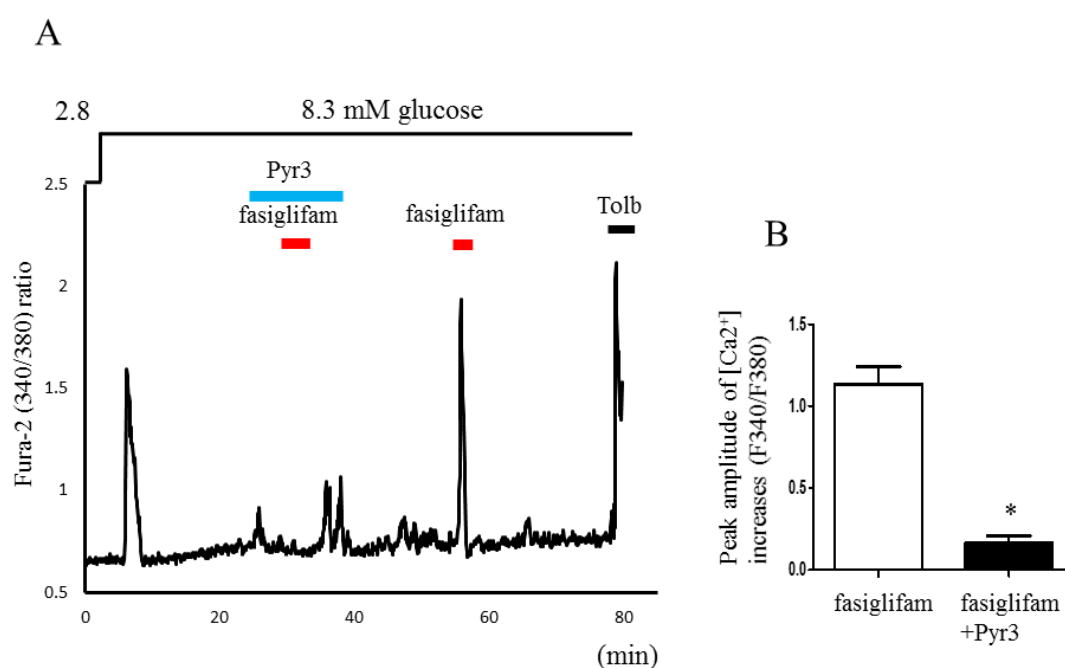


図 9. Pyazole-3 は fasiglifam による単離 β 細胞内カルシウムイオン濃度増加を抑制する

Fasiglifam (10 μ M)による単離 β 細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の動態を fura-2 蛍光画像解析で検討した (8.3mM グルコース下)。また TRPC3 チャネルの選択的阻害薬 Pyrazole-3 (Pyr3、10 μ M)が fasiglifam によるカルシウム動態変化に与え

る影響を検討した(図 9A、B)。2 群間のカルシウムイオン濃度の差異は **paired t-test** で検定した (図 9B)。n = 16、*p < 0.05 vs. fasiglifam (10μM)、ラット単離 β 細胞。

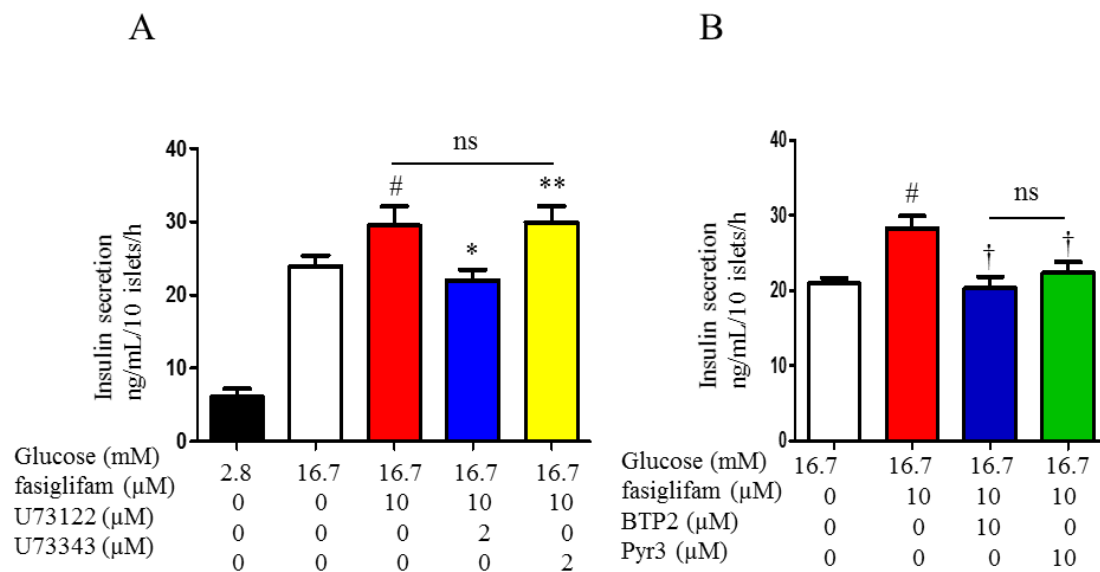


図 10. Fasiglifam によるインスリン分泌増加は **phospholipase C (PLC)**阻害薬及び **TRPC3** チャネルの選択的阻害薬によって抑制される

各 1.5mL エッペンドルフチューブにサイズマッチさせた 10 個のラットランゲルハンス島を採取し、16.7mM グルコース、10μM fasiglifam の条件下に、PLC 阻害薬 (U73122、2μM)、TRPC チャネルの選択的阻害薬 (BTP2、10μM)及び TRPC3 チャネルの選択的阻害薬 (Pyr3、10μM)を添加し 1 時間共インキュベーションを行い、上清のインスリン濃度を ELISA で測定した。U73122 の陰性コ

ントロールとして U73343 (2 μ M)を用いた。2 群間のインスリン濃度の差異は unpaired t-test で検定した。n = 4 -14、*p < 0.05 vs. fasiglifam (16.7mM グルコース)、**p < 0.01 vs. fasiglifam+U73122 (16.7mM グルコース) (図 10A)、† < 0.01 vs. fasiglifam (16.7mM グルコース) (図 10B)、#p < 0.05 vs. control (16.7mM グルコース) (図 10A、B)。ns; 有意差なし。

Fasiglifam の cAMP/PKA 経路に与える影響

cAMP/PKA 経路がインスリン分泌機構において重要な役割を果たしていると考えられているため、GPR40 シグナルが cAMP 経路に影響を与えるかどうかを検討した。GPL-1 受容体作動薬 exendin-4 は 5.6mM グルコース下でラットランゲルハンス島内の cAMP 濃度を上昇させた。一方で、fasiglifam は cAMP 濃度に影響を与えなかった (図 11A)。さらに、PKA 阻害薬 H89 の共インキュベーションは fasiglifam によるインスリン分泌促進に影響を与えなかった (図 11B)。以前我々が報告した GLP-1 が活性化させる cAMP/TRPM2 チャネル経路に fasiglifam が影響を与えるかを TRPM2 チャネルノックアウトマウスより採取した単離 β 細胞を用いて検討した。C57BL/6J マウスより単離した β 細胞に fasiglifam を還流すると有意な NSCC 電流の増加がみられた。TRPM2 チャネルノックアウトマウスの β 細胞に fasiglifam を還流した場合も同様に NSCC 電流の増加が観察された (図 12)。以上の結果から、GPR40 シグナルは cAMP/PKA 非依存的な経路でインスリン分泌を促進し、インクレチンが活性化する TRPM2 チャネルにも影響を与えないと考えられた。

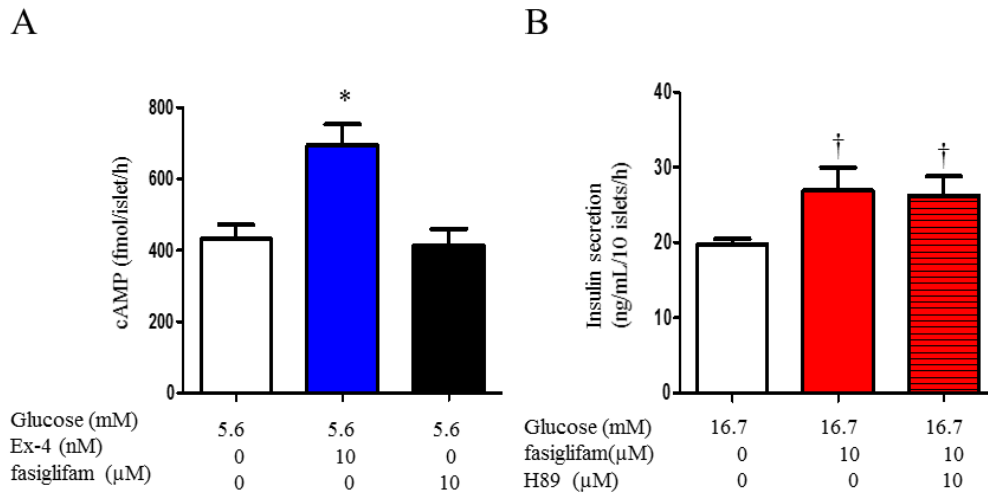


図 11. Fasiglifam 誘導性のインスリン分泌に cAMP 経路は影響を与えない

各 1.5mL エッペンドルフチューブにサイズマッチさせた 10 個のラットランゲルハンス島を採取し、5.6 mM グルコース下で、fasiglifam (10μ)、exendin-4 (Ex-4、10 nM)と共に 1 時間インキュベーションを行い、cAMP 含量 (fmol/islet/h) を測定した (図 11A)。protein kinase A (PKA)阻害薬 (H89、10μM)の fasiglifam 誘導性のインスリン分泌増加に与える影響を 1 時間のインキュベーションを行い比較した (図 11B)。2 群間のインスリン濃度の差異は unpaired t-test で検定した。全て n = 5。*p < 0.05 vs. 5.6 mM グルコース (図 11A)。†< 0.01 vs. 16.7mM グルコース (図 11B)。

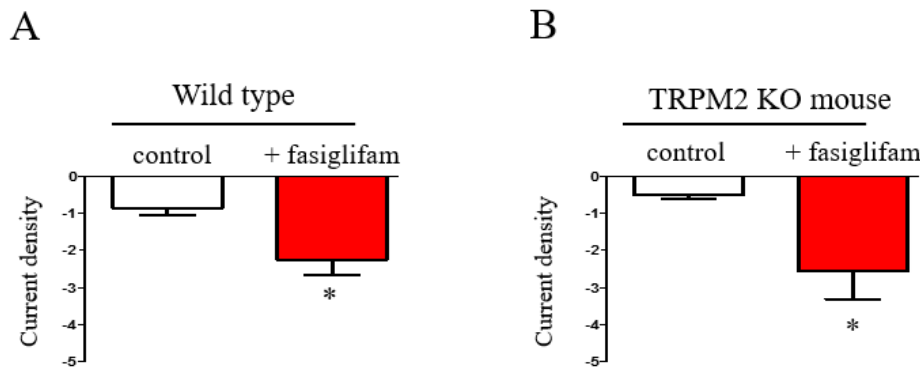


図 12. Fasiglifam は TRPM2 チャンネルノックアウトマウス β 細胞において非選択的陽イオンチャネル電流 (NSCC)を増加させる

膜電位を -70mV に電位固定し、 5.6mM グルコース下で tolbutamide ($100\mu\text{M}$)を先行還流した単離 β 細胞に fasiglifam ($10\mu\text{M}$)を還流し、NSCC 電を測定した (図 12A、B)。wild type (C57BL/6J)マウスと TRPM2 チャンネルノックアウトマウスから単離した β 細胞を用いた。Fasiglifam 非還流状態を control (5.6mM グルコース)として、paired t-test を用いて検定した。全て $n = 5$ 、* $p < 0.05$ vs. control。

3-4. 考察

中長鎖脂肪酸は GPR40 に結合し、PLC を活性化し、 PIP_2 から DAG と IP_3 を産生することが知られている。本実験では GPR40 受容体刺激は TRPC3 チャンネルを開口し、NSCC 電流を増加させ、細胞膜を軽度脱分極させておくことで、KATP チャンネルと共働して β 細胞のグルコーン応答性を高めていることを示した。この知見は β 細胞の脱分極応答が KATP チャンネル閉口による外向き電流の減少のみではなく、TRP チャンネルを介して増加する内向き背景電流の増加も重要な役割を果たしていることを示唆している。本実験で初めて GPR40 刺激が背景電流

の一種 TRPC3 チャンネルを活性化し、GSIS を促進させることが明らかとなった。

これまで膵 β 細胞には TRPA1、TRPC1、TRPC4-C6、TRPV1、TRPV2-V5 及び TRPM2-M5 チャンネルなど様々なタイプの TRP チャンネルが存在することが知られていた(59)。PLC の阻害が長鎖脂肪酸であるオレイン酸誘導性のインスリン分泌を抑制することが報告されており(46, 58)、本研究で示した PLC 阻害薬 U73122 が fasiglifam による NSCC 電流を抑制し、fasiglifam 誘導性のインスリン分泌を減弱させる結果と矛盾しないものである。PLC により産生される DAG 及び IP_3 が受容体作動性 (receptor-operated) TRP チャンネルや ストア作動性 (store-operated) TRP チャンネルに影響を与える可能性も知られていた(60)。このストア作動性のメカニズムの実態は最近 stromal interaction molecule 1 (STIM1)-Orai1 系であることが明らかにされた(61, 62)。PLC 阻害で fasiglifam 誘導性の TRPC チャンネル電流が抑制されることから、PLC は TRPC チャンネルの上流の分子であると考えられる。GPR40/PLC 経路の下流シグナル詳細解明にはさらなる研究が必要である。

本実験結果では、GPR40 シグナルは cAMP 依存性経路に影響を与えなかった。cAMP 依存性経路はインクレチンホルモンによるインスリン分泌増加に必須の経路であり、TRPM2 チャンネルを活性化させる(51)。GLP-1 受容体は G_s 共役型の GPCR であり、adenylate cyclase を活性化し、細胞質内 cAMP の産生を増加させ、PKA 及び EPAC を活性化する(38)。この cAMP/TRPM2 チャンネル経路は細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ、細胞膜を脱分極させる。この TRPM2 チャンネル活性化による細胞膜脱分極はグルコースに代謝による K_{ATP} チャンネル閉口と共働して、イ

ンスリン分泌を増強すると考えている。本実験結果では PKA 阻害薬は fasiglifam によるインスリン分泌増強作用に影響を与えず、TRPM2 チャネルノックアウトマウスより採取した β 細胞において fasiglifam は NSCC 電流を増加させた。また fasiglifam は cAMP の産生を増加させなかったことから、GPR40/PLC 経路は cAMP 経路非依存的にインスリン分泌を増加させると考えられる。実際いくつかの先行研究においても GPR40 アゴニストや長鎖脂肪酸は細胞質内 cAMP 産生を増加させないことが報告されており(63-66)、本実験結果とも矛盾しない。他方、GPR40 を介するインスリン分泌増強には膵 β 細胞 L-type Ca^{2+} チャネル (LTCC) の関与を示唆する研究もある。長鎖脂肪酸オレイン酸による GPR40 刺激は、ラット β 細胞において細胞外からのカルシウム流入を増加させ、その作用は LTCC 阻害薬前投与で消失することが報告されている(46)。実際ラットランゲルハンス島や β 細胞培養細胞株での検討でも GPR40 刺激によるインスリン分泌は LTCC 阻害薬投与により抑制される(46, 58, 66)。KATP チャネルのみならず、 PIP_2 代謝を介する phosphatidylinositol/PLC 経路が細胞膜上の GPCR と相互作用し、シグナルを伝達する可能性も指摘されている(67)。これらの先行研究および本実験結果から、従来から想定されている IP_3 を介する ER からのカルシウム放出機構よりも、細胞外からのカルシウム流入がより GPR40 刺激によるインスリン分泌機構に深く関与していると考えられる。また GPR40/PLC シグナルによる DAG の産生や、 PIP_2 代謝による PIP_2 濃度の低下が直接的に TRPC3 チャネルを活性化させている可能性も残されている。また GPR40 シグナルにおける LTCC と TRPC3 チャネルの相互連関についても未だ明らかでないため、今後の検討が必要であ

る。

PKC は脂肪酸によるインスリン分泌に関与すると考えられており、PKC 阻害薬の投与によって脂肪酸誘導性のインスリン分泌が抑制されるという報告が存在する(68)が、そのメカニズムは不明であった。本研究は PKC 阻害薬投与によって fasiglifam 誘導性の NSCC 電流が抑制されることを示した。この結果は PKC が TRPC チャンネルを開口させることで細胞内カルシウムの増加に関与している事を示唆していると考えられる。

最近 Shigeto らは、 β 細胞において生理的レベル(1~10 pM)の GPL-1 が本実験で示したのと同様の Gq/PLC/PKC 経路を介して、TRPM4/TRPM5 チャンネルを活性化し、内向き電流を増加させることを報告し、cAMP 非依存的であると考察している(69)。Shigeto らのグループの報告を考えると、GRP40 シグナルは、生理的濃度で活性化されとしている Gq/PLC/PKC 経路を共通路に持つことになり、したがって GPR40 は TRPC3 チャンネルのみならず、TRPM4/TRPM5 チャンネルにも影響を与えている可能性も考えねばならないことになる。しかも、GPL-1 は cAMP 経路依存的にインスリン分泌を惹起するというこれまでの定説(50)や我々が先に報告した GPL-1 受容体/TRPM2 チャンネル経路の結果(51)と矛盾することとなる。今回実験で用いた fasiglifam は 10 μ M であり、これは生理的血中脂肪酸濃度の数倍であり、濃度の差の影響も今後の検討課題と考える。現時点で GPR40 と GLP-1 が活性化する経路の相違や共通点についてはまだ議論の余地があると言え、Gq 共役型の GPCR と NSCC 電流の増加のメカニズムについてはさらなる研究が必要である。

3-5. 結語

本研究で、GPR40 シグナルが PLC/PKC 経路を介して TRPC3 チャネルを活性化させ、KATP チャネル閉口と共働してインスリン分泌を増加させているという新規インスリン分泌経路を見出した。TRP チャネルの活性化は 2 型糖尿病の治療ターゲットになる可能性がある。

謝辞

本研究の実施に当たり、自治医科大学附属さいたま医療センター循環器病臨床医学研究所実験補助員の大谷多栄子氏、深谷晴恵氏に謝意を表します。また研究にご協力頂きました、自治医科大学生理学講座統合生理学部門の出崎克也准教授、矢田俊彦教授に深謝申し上げます。本研究の一部は平成 28 年度自治医科大学大学院医学研究科研究奨励賞の支援によって行われたことを付記します。

4. 第3部

不飽和脂肪酸 eicosapentaenoic acid の脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズムの検討

4-1. 研究背景

肥満はメタボリックシンドロームの病態の中心で、確立した心血管イベントの危険因子である(70)。肥満は慢性炎症を引き起こし、インスリン抵抗性を引き惹起する(71, 72)。肥満状態では、血中の遊離脂肪酸、特にパルミチン酸に代表される飽和脂肪酸が増加しており種々の組織に対して Toll-like receptor 4 (TLR4) や tumor necrosis factor receptor (TNFR)を介して脂肪毒性を呈することが知られている(73)。一方で、eicosapentaenoic acid (EPA)に代表される omega-3 (ω-3)不飽和脂肪酸は抗炎症作用を持つ。実際、日本人脂質異常症患者への EPA の投与は、冠動脈疾患発症を抑制することが報告されている(6)。このように、脂肪酸はその質によって炎症作用・抗炎症作用の両作用を併せ持つと言える。最近 Oh らは G 蛋白共役型受容体 120 (GPR120、Free Fatty Acid Receptor 4: FFAR4)が ω-3 脂肪酸の受容体として機能し、マクロファージの GPR120 への作用を介して肥満マウスにおけるインスリン抵抗性を改善することを報告した (74)。また同じ ω-3 脂肪酸である docosahexaenoic acid (DHA)がマクロファージにおいて、lipopolysaccharide (LPS)誘導性の TNFR や TLR4 を介するシグナル伝達を抑制し、nuclear factor-κB (NF-κB)の活性化を抑制することが知られている(74, 75)。GPR120 はマクロファージに加えて、脂肪細胞及び腸管内分泌細胞に高発現して

いる(74, 76)。腸管内分泌細胞に発現する GPR120 の活性化はインクレチンホルモン glucagon-like peptide-1 の分泌を促進し、インスリン分泌を促進させる(76)。しかし、EPA の脂肪細胞 GPR120 を介する生理作用はまだ不明な点が多い。そこで 1) EPA が脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症作用の検討及び、2) EPA の投与が食誘導性肥満マウスの脂肪組織炎症へ与える影響の検討を目的として本研究を計画した。

4-2. 材料と方法

脂肪酸の調製

パルミチン酸 (Sigma-Aldrich) は脂肪酸非含有 bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) と結合させ用いた。EPA sodium salt (EPA-Na) は Nu-Chek Prep, Inc. から購入し、細胞処理に用いた。EPA 含有の培養液は既報に従って調製した(77)。動物に給餌する高純度の EPA は Mochida Pharmaceutical Company, Ltd. の好意によって本実験用に供与されたものを用いた。

細胞処理と回収

マウス培養脂肪細胞である 3T3-L1 murine pre-adipocyte を American Type Tissue Culture Collection から購入し、既報の方法に従い分化させた (分化方法は第 1 部 2. 材料と方法 細胞培養の項と同様)(17)。完全に分化した 3T3-L1 脂肪細胞を 250 μ M のパルミチン酸で 30 分、60 分、または 24 時間刺激を行った。コントロール処理にはパルミチン酸と結合していない BSA を用いた。EPA-Na 処置 (前

処置)はパルミチン酸刺激前に 50 mM で 6 時間行った。3T3-L1 脂肪細胞はフォスファターゼ阻害薬及びプロテアーゼ阻害薬 (共に nacalai tesque)入りの RIPA buffer で回収し、蛋白質抽出に供した。

動物実験

4 週齢のオス C57BL/6J マウスを CLEA Japan より購入した。動物実験は日本生理学会の動物飼育ガイドラインに沿って行い、動物実験計画については自治医科大学の許可を得た後に行った。飼育条件は空調のある飼育室で 1 ケージ 4 匹、12 時間おきの明暗サイクルで水・餌は自由飲水・摂餌とした。マウスはコントロール食群 (MF diet [chow]、ORIENTAL YEAS CO.,LTD)、高脂肪高ショ糖 (high fat/high sucrose; HFHS)食群 (30% fat、20% sucrose)、EPA (5% wt/wt)混餌 HFHS 食群の 3 群に分け、4 週齢から 24 週間飼育した。飼育期間終了時にペントバルビタールを腹腔内投与し (100 mg/kg)、安楽死させた後、解剖し、臓器を摘出した。

血清学的検査

血漿インスリン及びアディポネクチンをマウスインスリン ELISA キット (Morinaga)、アディポネクチン Bio-Plex Pro (BIO RAD)を用いて測定した。飼育開始 12 週、18 週に尾静脈血を用い 6 時間絶食後の空腹時血糖値を測定した (Terumo Medisafe Mini Glucometer)。他の検査項目の測定は Nagahama Life Science Laboratory (Shiga、Japan)に依頼した。インスリン抵抗性指標として Homeostasis

model for insulin resistance (HOMA-IR)を以下の式で算出した：空腹時血糖値 (mg/dL) × 空腹時血漿インスリン値 (ng/mL)/405。

脂肪組織からの血管間質分画 (Stromal vascular fraction)の分離

精巢上体周囲脂肪組織から血管間質分画 stromal vascular fraction (SVF)を既報の方法に若干の修正を加えて分離した(10, 78)。要約すると摘出した脂肪組織を細断 (<2 mm)、collagenase (Sigma-Aldrich)を含む Krebs-Henseleit-HEPES buffer (20 mg/mL の BSA、2.8 mM グルコース、37°C、pH 7.4)に浸し、シェーカーで45分間インキュベーションを行った。その後、孔径 40μm のメッシュに通し、1000g で8分間遠心した。遠心後のペレットを SVF として、浮遊細胞を脂肪細胞として回収した。分離・回収した細胞は RNA の抽出に用いた。

リアルタイム定量 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

3T3-L1 脂肪細胞及びマウス脂肪組織から分離した脂肪細胞から Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research)を用いて RNA を抽出した。Complementary DNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて作成した。TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems)を用いて RT-qPCR を行った。Primer-probe は表 2 に示す。mRNA 発現レベルは 内部コントロール GAPDH で補正し、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて相対値で表示した(79)。GPR120 遺伝子のノックダウンには mouse GPR120 siRNA (Santa cruz)を添付プロトコールに従って行った。ノックダウン効率の評価には ウェスタンブロットを用いた。

表 2. 本実験に用いた Taq Man® Gene Expression ID

Taq Man Gene	Assay ID
<i>Mcp-1</i>	Mm00441242_m1
<i>Tnf-α</i>	Mm00443258_m1
<i>CD11c</i>	Mm00498701_m1
<i>CD206</i>	Mm01329362_m1
<i>IL-6</i>	Mm00446190_m1
<i>IL-10</i>	Mm01288386_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

Mcp-1: monocyte chemoattractant protein-1, *Tnf- α* : tumor necrosis factor- α , *IL-6*:

interleukin-6, *IL-10*: interleukin-10, *Gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ウェスタンブロットと共免疫沈降

細胞のライセートは既報に従い調製した(17)。また核蛋白質サンプルは Universal Magnetic Co-IP kits (Active Motif)を用いて添付のプロトコールに従って抽出した。Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて各サンプルの蛋白質量を測定した。サンプルは 1.5mL 遠心チューブ内で SDS sample buffer (Wako)と混合し、100 °C、3 分間加熱した。加熱後のサンプルは SDS ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE)にアプライし、電気泳動を行い polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。5%スキムミルクでブロッキング後、メンブレンを以下の一次抗体と反応させた；抗 tumor growth factor β (TGF- β) activated kinase 1 (TAK1)抗体、抗 TGF- β activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1)抗体、抗 phospho-interferon regulatory factor 3 (IRF3)抗体、抗 total c-Jun NH2-terminal

kinase (JNK)抗体、抗 phospho-JNK 抗体、抗 NF- κ B-p65 抗体及び phospho-NF- κ B-p65 抗体。以上の抗体はすべて Cell signaling (希釈倍率 1:1000)より購入した。抗 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) 抗体は Invitrogen (希釈倍率 1:500)より、抗 GPR120 抗体 (希釈倍率 1:1000)は Abcam より購入した。TAK1 と TAB1 の蛋白相互連関を評価するために Universal Magnetic Co-IP kits (Active Motif)を用いて共免疫沈降を行い、ウェスタンブロットを行った。二次抗体、Western Sure ECL substrate (LI-COR Biosciences)と反応後、信号の検出は C-DiGit[®] Blot Scanner (LI-COR Biosciences)を用いて行った。

組織学的解析

マウス腹腔内から大動脈を摘出し、10%ホルマリンで固定した。その後動脈硬化面積を評価するために sudan-IV で染色した。大動脈弁の凍結切片は弁輪部動脈硬化を評価するために oil-red O で染色した。動脈硬化面積 (%)は Photoshop Element 14 を用いて算出した。精巣上体脂肪組織へのマクロファージ浸潤の評価を行うため、脂肪組織をマクロファージ表面マーカーである抗 MAC-2 抗体を用いて免疫染色した。Crown-like structure (CLS)の形成数の評価は各標本の弱拡大 5 視野の CLSs を数え、平均値を算出した (Olympus BX-51、 $\times 100$)。脂肪細胞径は各視野 100 個 ($\times 100$)の脂肪細胞径を測定し、平均値を算出した。

統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の比較は unpaired t-t 検定を用いて

行った。相関解析には Spearman の順位相関係数を用いた。統計解析には GraphPad Prism version 5 (GraphPad software Inc.)を用いて行った。p <0.05 を統計学的に有意と判断した。

4-3. 結果

***In vitro* 実験：3T3-L1 細胞を用いた GPR120 を介する抗炎症機序の検討**

まず 3T3-L1 脂肪細胞における GPR120 の蛋白質レベルでの発現をウェスタンブロットで検討した。分化した 3T3-L1 脂肪細胞には GPR120 蛋白が発現しており、EPA 及びパルミチン酸刺激でその発現量は変化しなかった。分化前の pre-adipocyte には GPR120 蛋白の発現は認められなかった (図 13A)。次に GPR120 遺伝子をノックダウンし、実験を行った (図 13B)。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 (図 13C、D)。

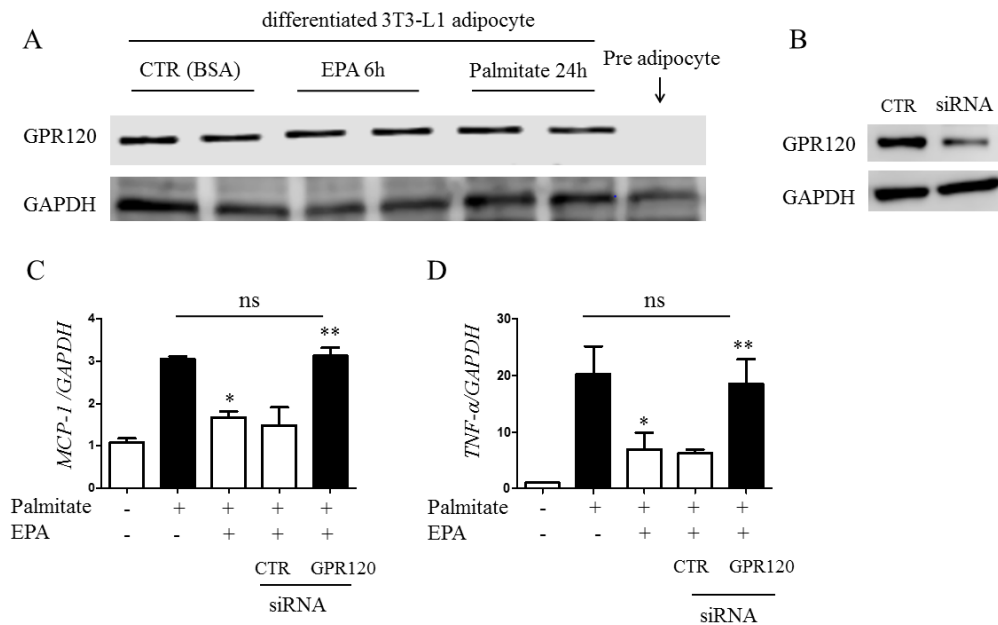


図 13. EPA は 3T3-L1 細胞においてパルミチン酸誘導性の MCP-1 及び TNF- α の mRNA 発現を抑制する

3T3-L1 細胞の分化前後における GPR120 蛋白発現 (図 13A)と GPR120 siRNA の導入 (図 13B)。50mM、6 時間の EPA 前処理が 250 μ M、24 時間のパルミチン酸誘導性 MCP-1 及び TNF- α の mRNA 発現に与える影響を GPR120 のノックダウンの有無で比較した。n = 3、*p < 0.05 vs. パルミチン酸刺激。**p < 0.05 vs. EPA+パルミチン酸刺激 CTR siRNA。CTR; scramble siRNA。ns; 有意差なし。

続いて、パルミチン酸刺激の TLR4 及び TNFR 下流のシグナルである IRF3 リン酸化、TRAF6 発現レベル及び JNK リン酸化と核内転写因子 NF- κ B p65 リン酸化へ与える影響を検討した (図 14A)。EPA の前処置はパルミチン酸刺激による IRF3 のリン酸化を有意に抑制し、JNK のリン酸化を抑制する傾向 (p = 0.06)にあった (図 14B、C)。TRAF6 の発現に対しては影響を与えなかった (図 14D)。

また NF- κ B p65 のリン酸化を抑制する傾向 ($p = 0.05$)が認められた (図 14E)。以上の結果から EPA はパルミチン酸が活性化するとされる TLR4/TNFR 経路に対して拮抗的に作用し抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

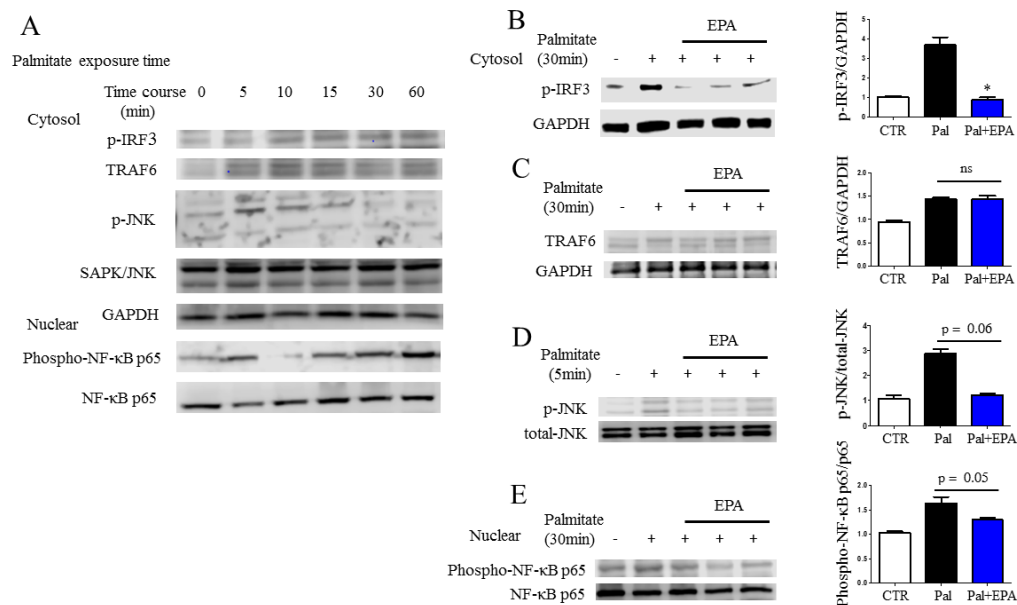


図 14. EPA はパルミチン酸誘導性の NF- κ B 活性化シグナルを抑制する

パルミチン酸刺激による NF- κ B 活性化に至るシグナルのタイムコースの検討 (図 14A)。パルミチン酸刺激及び EPA 前処置が IRF3 のリン酸化 (図 14B)、TRAF6 の活性化 (図 14C)、JNK のリン酸化 (図 14D) 及び NF- κ B p65 のリン酸化 (図 14E) に与える影響の検討。これら蛋白発現レベルは 内部コントロール GAPDH、total-JNK 及び NF- κ B p65 で補正した。n = 3。* $p < 0.05$ vs. パルミチン酸刺激 (5 分または 30 分)。ns; 有意差なし。CTR; control。

TAB1 及び TAK1 は TLR4 及び TNFR を介する炎症性シグナル伝達の鍵分子と考えられている(75)。マクロファージにおいて、パルミチン酸や LPS が TLR4 や

TNFR に結合すると、TAK1-TAB1 複合体が形成され JNK、NF- κ B シグナルが活性化される。 ω -3 脂肪酸が GPR120 に結合すると、GPR120 が細胞質内に移行し、 β -arrestin 及び TAB1 と複合体を形成するため、TAK1-TAB1 複合体形成が抑制される(74)。そこで、脂肪細胞でも EPA による GPR120 受容体刺激が TAK1-TAB1 複合体形成に影響を与えるかを検討した。パルミチン酸刺激は TAB1 の蛋白発現量に影響を与えなかった。(図 15A)。次に、共免疫沈降を用いて TAK1-TAB1 複合体の形成を評価した。TAK1 の一次抗体で免疫沈降を行い、抗 TAB1 抗体でウェスタンブロットを行った。30 分の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 (図 15B)。

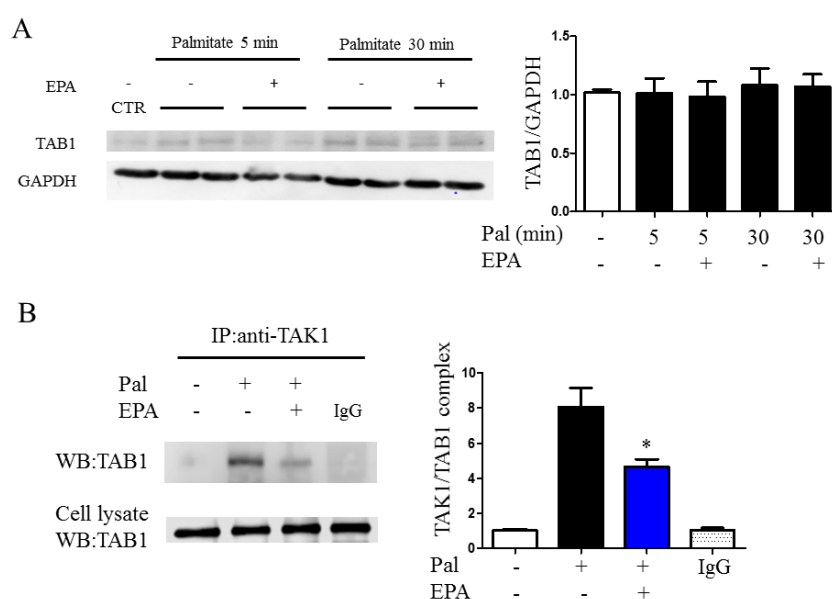


図 15. EPA はパルミチン酸誘導性の TAK1-TAB1 複合体形成を抑制する

3T3-L1 細胞におけるパルミチン酸刺激 (5 分もしくは 30 分) 及び EPA 前処置の TAB1 蛋白発現に与える影響 (図 15A)。共免疫沈降によるパルミチン酸刺激 (30 分) 及び EPA 前処置の TAK1-TAB1 蛋白複合体形成に与える影響の検討 (図

15B)。TBA1 の発現は内部コントロール GAPDH で、共免疫沈降による TAK1-TAB1 複合体形成はライセートの TAB1 発現で補正した。n = 3。*p < 0.05 vs. パルミチン酸刺激 (30 分)。CTR; control mouse IgG。

In vivo 実験；マウスを用いた EPA の脂肪組織炎症に与える影響の検討

続いて、マウスへの EPA 混餌投与が HFHS 食による脂肪組織変化に与える影響を検討した。24 週間飼育後の血中代謝パラメータ (6 時間絶食後採血)を表 3 に示す。EPA は HFHS 食による総コレステロール、肝酵素、空腹時血糖値の上昇を抑制した。さらに EPA は HFHS 食による食餌誘導性体重増加を抑制し、体重当たりの肝重量増加を抑制した (% g/body)が、精巣上体脂肪組織重量には影響を与えなかった (図 16A-C)。EPA は 24 週時点での空腹時血糖及びインスリン抵抗性指標 HOMA-IR を HFHS 群と比較して抑制していた (図 16D-E)。さらに EPA 混餌群では HFHS 食群に比して血漿アディポネクチンレベルが有意に上昇していた (図 16F)。

表 3.3 群間の空腹時代謝パラメータ

	コントロール 食 (n = 10)	HFHS 食 (n = 13)	HFHS 食 + EPA (n = 8)
TC (mg/dL)	67 ± 3.1	181 ± 14 [*]	81 ± 9.6 [#]
TG (mg/dL)	28 ± 3.7	13 ± 1.6 [*]	12 ± 2.0
HDL-C (mg/dL)	38 ± 2.1	63 ± 3.9 [*]	50 ± 5.5
NEFA (μEq/L)	884 ± 99	630 ± 47 [*]	625 ± 79
ALT (IU/L)	9.4 ± 1.9	122 ± 23 [*]	32 ± 11 [#]
Plasma glucose (mg/dL)	106 ± 9	126 ± 4 [*]	79 ± 5 [#]
Insulin (ng/mL)	1.58 ± 0.02	7.06 ± 0.41 [*]	4.15 ± 0.83 [#]
HbAc (%)	4.58 ± 0.05	4.51 ± 0.05	4.52 ± 0.05

平均値 ± 標準誤差。TC、総コレステロール；TG、中性脂肪；HDL-C、high-density lipoprotein コレステロール；NEFA、nonesterified fatty acid；ALT、alanine aminotransferase；HbA1c、glycated hemoglobin；HFHS、high-fat/high-sucrose 食群；EPA、5% (wt/wt) eicosapentaenoic acid 給餌群、^{*}p < 0.05 vs. コントロール食群 (chow)。[#]p < 0.05 vs. HFHS 食群。

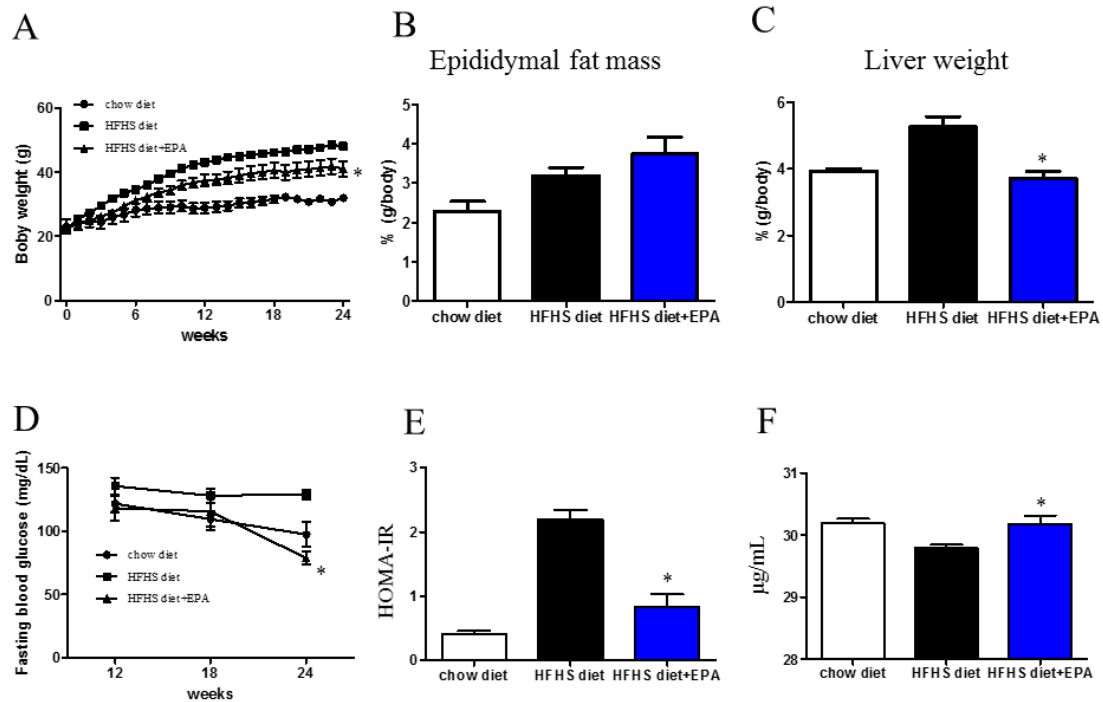


図 16. EPA の HFHS 食誘導性肥満マウスに与える影響

3 群間の経時的体重の推移 (図 16A)、体重当たりの精巣上体周囲脂肪組織 (図 16B)及び肝重量 (図 16C)の比較。飼育 12 週、18 週及び 24 週時点での空腹時血糖値 (6 時間絶食後)の推移 (図 16D)。EPA のインスリン抵抗性指標 HOMA-IR (図 16E)および血漿アディポネクチン濃度に与える影響 (図 16F)。各群 $n = 8-13$ 。

* $p < 0.05$ vs. HFHS 食群。

食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織への EPA 投与の影響を組織学的に検討した。まず脂肪組織での CLS 形成を評価した。CLS 形成は死細胞 (アポトーシスあるいはネクローシス)を MAC-2 陽性マクロファージが取り囲んでいる組織像

で、脂肪組織炎症の起点として重要と考えられている病理である(80)。

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 (図 17A-G)。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 ($r = 0.80$ 、 $p < 0.001$ 、図 17H)。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 ($r = 0.72$ 、 $p < 0.001$ 、図 17I)。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 (図 17J)。EPA の肝臓に対する影響も検討した。HFHS 食群では肝細胞の脂肪化、CLS の形成が認められたが、EPA 投与によりこれらの変化は抑制されていた (図 18)。

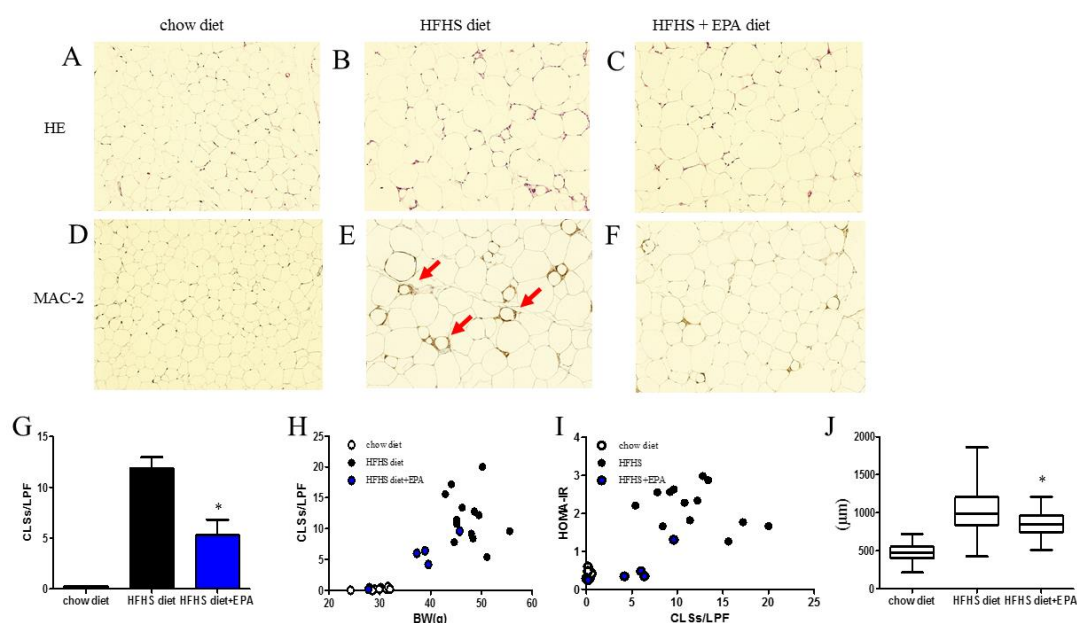


図 17. EPA は HFHS 食による脂肪組織 CLS 形成を抑制する

マウス精巢上体脂肪組織における CLS 形成の組織学的検討 (図 17A-F)。CLS 数

は MAC-2 陽性細胞が王冠様に脂肪細胞を取り囲んでいる状態 (図中の赤矢印、図 17E)を カウントした。EPA の HFHS による CLS 形成数に与える影響の検討 (図 17G)。マウス体重と CLS 形成数の相関 (図 17H)及び CLS 形成数と HOMA-IR との相関 (図 17I)の解析。EPA の HFHS による脂肪細胞径変化 (μm)へ与える影響の検討 (図 17J)。n = 5-13。*p < 0.05 vs. HFHS 食群。

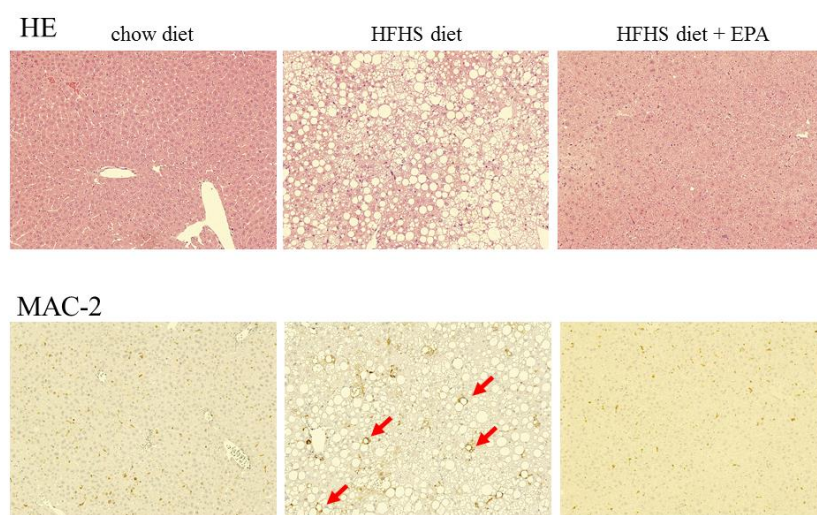


図 18. EPA は HFHS 食による脂肪肝を抑制する

3 群の肝組織における肝脂肪化の程度 (上段 HE 染色)とマクロファージの浸潤、CLS 形成(赤矢印)の程度(下段 MAC-2 染色)を組織学的に比較した。

EPA の大動脈弁輪部、大動脈における動脈硬化形成への影響を検討したが、HFHS 食では明らかな動脈硬化巣形成は見られず (図 19A-D)、3 群間で差は見られなかった (図 19D)。

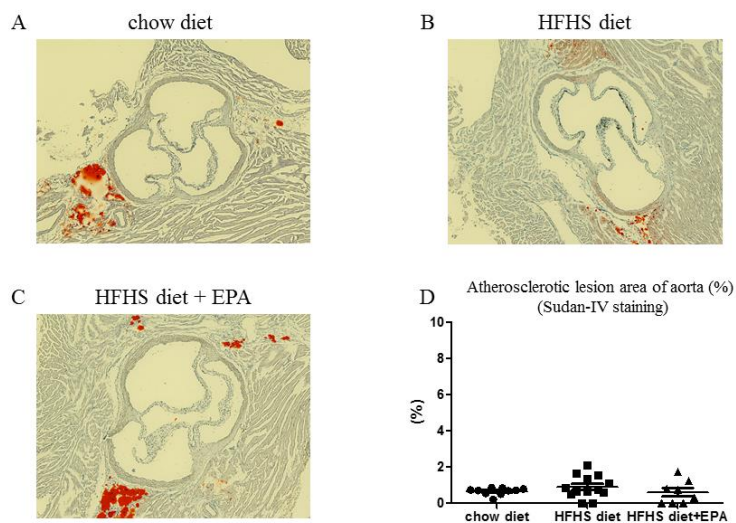


図 19.3 群間の大動脈弁動脈硬化 (図 19A-C)と大動脈動脈硬化面積の検討 (図 19D)。大動脈弁動脈硬化は Oil-Red O 染色で、大動脈動脈硬化面積は Sudan-IV 染色 (%)で評価した。n = 8-13 (D)。動脈硬化面積 (%)は 3 群間分布を示した。

次に脂肪組織における炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン及び adipose tissue macrophage (ATM) マーカーの mRNA 発現レベルを比較検討した。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- α の mRNA 発現も EPA 投与によって

抑制されていた (図 20A-F)。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 (図 20G-L)。

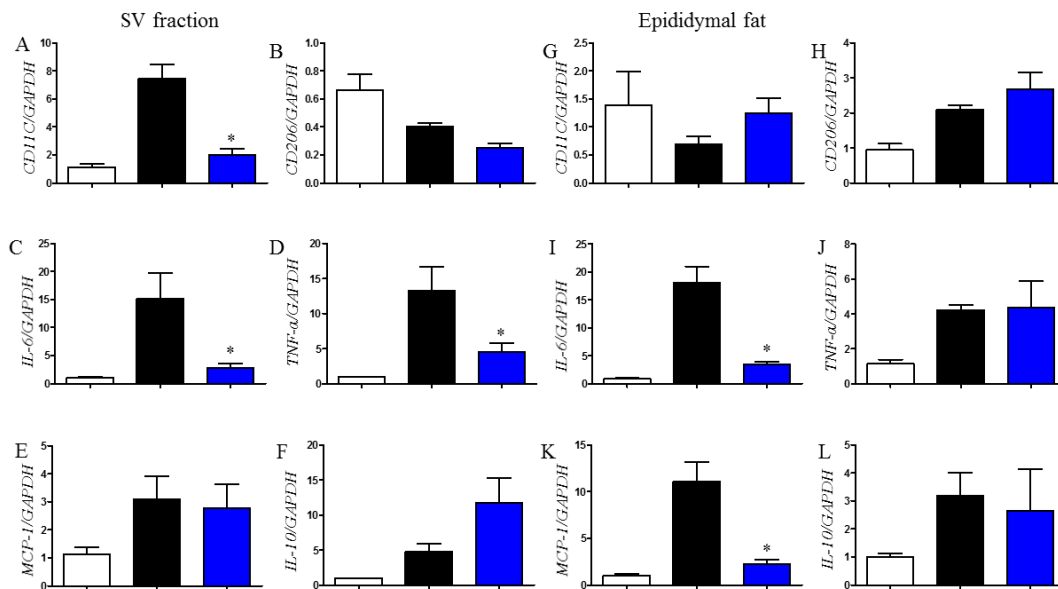


図 20. EPA は HFHS 誘導性肥満マウス脂肪組織での M1 マクロファージを減少させ、MCP-1 mRNA 発現を抑制する

EPA の HFHS 食による肥満マウス血管間質分画 (SVF)における M1 マクロファージマーカー (CD11c) 、M2 マクロファージマーカー (CD206)及び炎症性サイトカイン mRNA 発現に与える影響の検討 (図 20A-F)。 脂肪細胞分画における炎症性 (IL-6、TNF- α 、 MCP-1)及び抗炎症性サイトカイン (IL-10)mRNA 発現レベルの比較 (図 20G-L)。 n = 3。 *p < 0.05 vs. HFHS 食群。

最後に精巣上体周囲脂肪組織において、HFHS 食による TLR4 及び TNFR 刺激が活性化す NF- κ B シグナル経路への EPA 投与の影響をウェスタンブロットで検

討した。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- κ 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 (図 21)。

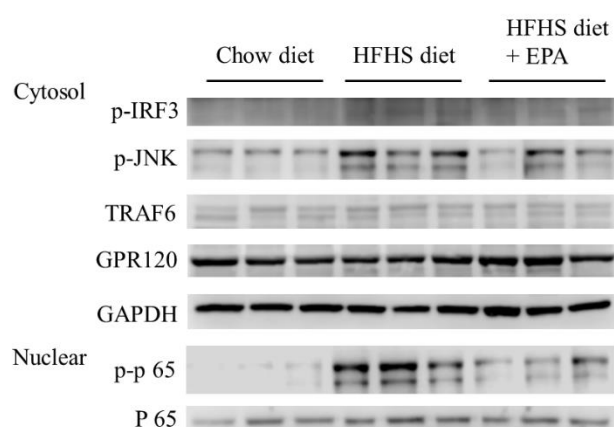


図 21. EPA は HFHS による炎症性シグナル JNK 及び NF- κ B のリン酸化を抑制する

マウス精巣上体周囲脂肪組織の IRF3 リン酸化、JNK リン酸化 及び TRAF6 蛋白発現及び核内転写因子 NF- κ B p65 リン酸化に与える影響をウェスタンブロットで検討した。n = 3。

4-4. 考察

本研究において、培養脂肪細胞において EPA がパルミチン酸刺激で誘導される MCP-1 及び TNF- α の mRNA 発現亢進を GPR120 を介して抑制することを示した。特に EPA はパルミチン酸による TAK1-TAB1 複合体形成を抑制していた。

HFHS 食による食餌誘導性肥満マウスにおいて、EPA 投与は脂肪組織で CLS 形成を抑制し、NF- κ B のリン酸化を抑制することが分かった。EPA 等の ω -3 脂肪酸はマクロファージにおいて GPR120 に作用し、抗炎症作用を示すことが知られている(74)。いくつかの先行研究で、EPA が培養マクロファージにおいてパルミチン酸誘導性の MCP-1 及び TNF- α の mRNA 発現を抑制することが報告されている(14, 77)。本研究結果から EPA による GPR120 シグナルが脂肪細胞においても抗炎症的に作用していることが示唆された。パルミチン酸は飽和脂肪酸の代表で、血管内皮細胞(27)、肝細胞(81)、脂肪細胞(14) 及び膵 β 細胞(25)に傷害を与え、脂肪毒性として知られている。パルミチン酸等の飽和脂肪酸は TLR4 のリガンドの一つと考えられており、飽和脂肪酸に富む食事は生体に慢性炎症とインスリン抵抗性を引き起こす(14, 25)。TLR4 のシグナル伝達はマクロファージ細胞質において TAK1 及び TAB1 の複合体を形成し、NF- κ B を活性化するが、 ω -3 脂肪酸は TAK1-TAB1 複合体形成を抑制する(74)。本実験では、培養脂肪細胞においてパルミチン酸刺激や EPA 投与で TAB1 の蛋白発現量は変化しなかった。本実験結果からは GPR120 を介する抗炎症性シグナルには TAB1 の発現量よりも TAK1-TAB1 複合体の形成がより重要である可能性を示していると考ええる。最近、小腸上皮細胞においても、GPR120 の選択的アゴニストが TAK1-TAB1 複合体形成を抑制することが報告された(82)。これらを合わせて考えると、GPR120 を介する抗炎症作用には広く TAK1-TAB1 複合体形成抑制が関与している可能性がある。実際、ヒト培養脂肪細胞において GPR120 をノックダウンすると同じく ω -3 脂肪酸 DHA の TNF- α mRNA 発現抑制作用が減弱することが報告

されている(83)。本実験結果もこの先行研究に矛盾しない結果である。

EPA のマウスへの投与実験では、高脂肪食誘導性の脂肪肝(84)、肥満(85)、動脈硬化(86)等の改善作用が知られている。本実験結果でも 24 週の EPA 投与が HFHS 食によるマウス体重増加、肝酵素、インスリン抵抗性の上昇を改善していた。

CLS は M1 マクロファージが壊死に陥った脂肪細胞を取り囲んだ病理像でヒトでもマウスでも観察される(80)。M1 マクロファージは骨髄由来のマクロファージで、肥満状態では脂肪組織に常在する M2 マクロファージに代わって炎症性 M1 のマクロファージが浸潤し、マクロファージの極性変化が起きる。Fujisaka らはアンギオテンシン II 受容体拮抗薬である降圧薬 telmisartan やチアゾリジン系経口血糖降下薬 pioglitazone が肥満マウス脂肪組織での CLS 形成を抑制し、マクロファージの極性を炎症性の M1 から M2 にシフトさせることを示した。この先行研究では telmisartan や pioglitazone が有する Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 活性化作用が脂肪組織マクロファージ極性を変化させ脂肪細胞のサイズを小型化したことが抗炎症的に作用し、CLS 形成を抑制したと考察している(78, 87)。肥満のヒトにおいても、12 週間の omega-3-acid ethyl ester 投与で脂肪組織での CLS 形成及び MCP-1 mRNA 発現が減少したことが示された (88)。実際、3T3-L1 細胞を EPA 処理すると培地中へのアディポネクチンの分泌が上昇することや、EPA に富む餌をマウスに給餌すると血漿中アディポネクチンレベルが上昇することも報告されている(89, 90)。Chambrier らはヒト培養脂肪細胞でも EPA を 50 μ M、6 時間投与すると PPAR γ mRNA 発現が増加することを見出している (91)。本実験結果で EPA を HFHS 食に混餌投与すると脂肪

細胞が小型化し、血漿中のアディポネクチンが上昇することを観察している。

EPA の投与は肥満状態において脂肪細胞を小型化することでアディポネクチンレベルを上昇させ抗炎症性に作用する可能性もある。アディポネクチン上昇が GPR120 刺激と関連するかは不明であり、今後の検討課題である。さらに、*In vivo* における EPA のアディポネクチン上昇作用の有無にはまだ議論の余地がある。

先に示した肥満のヒトへの omega-3-acid ethyl ester 投与は脂肪細胞のサイズ変化や血中アディポネクチンレベルへの影響が見られていない(88)。これら *in vivo* における結果の差異の原因は明らかではないが、動物実験で給餌される EPA の量は本実験でも用いたように 5% (wt/wt) 程度かそれ以上の量である。ヒトがこれに相当する EPA を経口的に摂取するのは現実的ではない。従って、脂肪酸のような栄養素を与える実験においてはその給餌量(生理的量か、薬理学的量か)が結果に与える影響を加味する必要があると考えられる。

他方、EPA の脂肪細胞でのケモカイン MCP-1 の mRNA 発現低下作用が脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤を抑制し、インスリン抵抗性を改善した可能性が考えられる。本実験結果では EPA 投与が SVF での M1 マクロファージマーカー CD11c の mRNA 発現を抑制していたことから、実際浸潤していたマクロファージの極性が EPA 投与で変化したことが推察される。いくつかの先行研究においても EPA 投与が培養脂肪細胞でパルミチン酸誘導性の MCP-1 mRNA 発現を抑制することや(14)、HFHS 食による脂肪組織での MCP-1 mRNA 発現増加を抑制することが報告されている(85)。Oh 等は ω -3 脂肪酸投与による抗炎症作用がマクロファージ特異的 GPR120 ノックアウトマウスでは減弱していたことから、

GPR120 の抗炎症作用はあくまでマクロファージを介する作用であると考察している(74)。EPA の脂肪細胞への直性作用によって MCP-1 の発現が低下しているのか、そうであれば GPR120 の関与も含めてそのメカニズムはどのようなものか、今後追加の検討が必要である。

本実験では HFHS による肥満マウスの脂肪組織炎症を EPA が抑制することを示した。Sato らは HFHS 食への 20 週間の EPA 混餌投与が体重増加を抑制し、脂肪組織での MCP-1 mRNA 遺伝子発現を抑制することを示しており、我々の結果と矛盾しない。しかし単に高脂肪 (high-fat; FH)食マウスに対して EPA 混餌は体重増加、MCP-1 の発現レベルには影響を与えなかった (85)。蔗糖摂取はメタボリックシンドロームや非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の独立した危険因子であることが知られている(92, 93)。HFHS 食は HF 食以上にマウスに重症脂肪肝と肝細胞への中性脂肪の蓄積を来す(85)。本研究でも EPA 投与肝組織において HFHS 食による肝脂肪化や CLS 形成を抑制することを観察している。この結果は血清学的に HFHS による肝酵素の上昇を EPA が抑制していた事実と矛盾しないものである。従って、EPA のインスリン抵抗性改善作用には脂肪肝抑制を介する機序の寄与も考えられる。この様に EPA の投与は全身の代謝への影響を考えなければならない。臓器特異的な EPA 投与や GPR120 シグナルの影響の検討には標的臓器特異的な GPR120 ノックアウトマウスなどを用いるなどの検討を加える必要がある

4-5. 結語

本実験では EPA は培養脂肪細胞で GPR120 を介して TAK1-TAB1 複合体形成を抑制し抗炎症的に作用することを示した。さらに、EPA 投与は HFHS 食誘導性肥満マウスの脂肪組織で MCP-1 mRNA の発現抑制、CLS の形成を抑制し、マクロファージの極性変化が重要な役割を果たしていることを示した。これらの知見は、脂肪細胞 GPR120 の制御が炎症やインスリン抵抗性の病態改善の治療ターゲットになり得ると考えられた。

謝辞

本研究の実施に当たり、自治医科大学附属さいたま医療センター循環器病臨床医学研究所実験補助員の大谷多栄子氏、深谷晴恵氏、小林千鶴氏、高原智子氏、神保幸美氏に謝意を表します。また変研究の一部は平成 26 年度自治医科大学大学院若手スタートアップ研究費の支援によって行われたことを付記します。

5. 総括

脂肪酸の生理学はこの 10 数年の受容体の発見・同定 (その多くはオーファン受容体であった)により格段に進歩した。その多くが GPCR であったために、今日脂肪酸受容体を介する生理作用は創薬ターゲットにもなっている。第 1 部では飽和脂肪酸パルミチン酸の脂肪細胞への無菌性炎症に TLR4 が関わっており、さら脂質ラフトへのトランスロケーションがその初期反応として重要であることが示唆された。脂質ラフトからのコレステロールの引き抜きはパルミチン酸誘導性の TLR4 のトランスロケーションを抑制し、HDL や apoA-I が内因性の抗自然炎症作用を持っていると考えられる。飽和脂肪酸の代表であるパルミチン酸の脂肪毒性作用の機序の一端であり、生体にとって好ましくない「悪玉」作用であると言える。一方、飽和脂肪酸であれ不飽和脂肪酸であり長鎖脂肪酸は膵β細胞 GPR40 のリガンドとして作用し、短期的刺激はインスリン分泌を促進する。これは脂肪酸鎖長による生理作用の差異を示すものである。実際、短鎖脂肪酸は GPR40 の受容体のリガンドにはならないと考えられている。GPR40 受容体作動薬は数社が開発中であり、今後臨床の現場に登場することが期待されている薬剤の一つである。GPR40 受容体刺激によるインスリン分泌促進作用は脂肪酸の「善玉」作用の側面である。一方ですでに临床上使用されている ω-3 脂肪酸である EPA の抗炎症作用の詳細についても長く未解明であった。2010 年に Olefsky

らのグループが ω -3 脂肪酸の受容体が GPR120 と同定した(74)。GPR120 も肥満、糖尿病治療において有望な創薬ターゲットとなっており、今後のさらなる作用メカニズムの解析が望まれる。単に脂肪酸といっても、このようにその質、即ちリポクオリティによって生理作用が大きく異なることが理解される。

脂肪酸代謝は生体に取り込まれると、様々な代謝物へ変化し、各々異なる生理活性をもつことが分かってきた。従って、今日の脂肪酸代謝の解析方法もメタボローム解析を始めとした網羅的解析手法が主流となっている。今回本論文にまとめた研究は 1 つの脂肪酸とその作用の 1 対 1 の関係を見るものであり、多岐に渡る代謝物へ変化する脂肪酸代謝の生物学的意義を解析するには限界があるとも言える。今後はオミックス解析等をうまく用いて、そこから演繹的に研究を深化させていきたいと考える。

6. 謝辞

大学院での研究を遂行するにあたり、御指導を頂きました、指導教官である総合医学1(内分泌代謝科)教授原一雄先生、また前指導教官で自治医科大学名誉教授石川三衛先生(現国際医療福祉大学教授)、加計正文先生(現さいたま市民医療センター院長)に深く感謝申し上げます。また研究の要所において助言を頂きました自治医科大学附属さいたま医療センター前センター長川上正舒先生(現練馬光が丘病院院長)、自治医科大学客員教授河野幹彦先生(現常陸大宮済生会病院院長)に謝意を表します。

7. 参考文献

1. Brookheart RT, Michel CI, Schaffer JE: As a matter of fat. *Cell metabolism*, 10: 9-12, 2009
2. Kien CL: Dietary interventions for metabolic syndrome: role of modifying dietary fats. *Current diabetes reports*, 9: 43-50, 2009
3. Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssönen K, Lakka TA, Salonen JT: Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation*, 102: 2677-2679, 2000
4. Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D, Manson JE: Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *Jama*, 287: 1815-1821, 2002
5. Daviglus ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB: Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *The New England journal of medicine*, 336: 1046-1053, 1997
6. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K: Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet (London, England)*, 369: 1090-1098, 2007
7. Moran BM, Flatt PR, McKillop AM: G protein-coupled receptors: signalling and regulation by lipid agonists for improved glucose homeostasis. *Acta diabetologica*, 53: 177-188, 2016
8. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH: Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, 244: 211-215, 2016
9. Seijkens T, Kusters P, Chatzigeorgiou A, Chavakis T, Lutgens E: Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? *Diabetes*, 63: 3982-3991, 2014
10. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R: CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*, 15: 914-920, 2009
11. Grant RW, Dixit VD: Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity (Silver Spring, Md)*, 23: 512-518, 2015
12. Tall AR, Yvan-Charvet L: Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature*

- reviews Immunology*, 15: 104-116, 2015
13. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116: 3015-3025, 2006
 14. Yeop Han C, Kargi AY, Omer M, Chan CK, Wabitsch M, O'Brien KD, Wight TN, Chait A: Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes*, 59: 386-396, 2010
 15. Rye KA, Barter PJ: Cardioprotective functions of HDLs. *Journal of lipid research*, 55: 168-179, 2014
 16. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR: Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*, 13: 48-60, 2016
 17. Umemoto T, Han CY, Mitra P, Averill MM, Tang C, Goodspeed L, Omer M, Subramanian S, Wang S, Den Hartigh LJ, Wei H, Kim EJ, Kim J, O'Brien KD, Chait A: Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1. *Circulation research*, 112: 1345-1354, 2013
 18. Cheng AM, Handa P, Tateya S, Schwartz J, Tang C, Mitra P, Oram JF, Chait A, Kim F: Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF-kappaB activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PloS one*, 7: e33917, 2012
 19. Sultana A, Cochran BJ, Tabet F, Patel M, Torres LC, Barter PJ, Rye KA: Inhibition of inflammatory signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes by apolipoprotein A-I. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2016
 20. Han CY, Umemoto T, Omer M, Den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, Buller CL, Sweet IR, Pennathur S, Abel ED, Chait A: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 287: 10379-10393, 2012
 21. Brown DA, London E: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *The Journal of biological chemistry*, 275: 17221-17224, 2000
 22. Lingwood D, Simons K: Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, NY)*, 327: 46-50, 2010

23. Plociennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzecka K, Kwiatkowska K: Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72: 557-581, 2015
24. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH: Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of lipid research*, 53: 2002-2013, 2012
25. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R: Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell metabolism*, 15: 518-533, 2012
26. Pilon NJ, Li YE, Fink LN, Brozinick JT, Nikolayev A, Kuo MS, Bilan PJ, Klip A: Nucleotides released from palmitate-challenged muscle cells through pannexin-3 attract monocytes. *Diabetes*, 63: 3815-3826, 2014
27. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW: Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*, 100: 1589-1596, 2007
28. Zou J, Feng D, Ling WH, Duan RD: Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24: 1117-1122, 2013
29. Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH: Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*, 284: 27384-27392, 2009
30. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S: Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature medicine*, 18: 1279-1285, 2012
31. Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, Drain PF, Wang X, Sasidhar M, Nabel EG, Takahashi T, Lukacs NW, Ryter SW, Morita K, Choi AM: Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *The Journal of experimental medicine*, 203: 2377-2389, 2006
32. Olsson S, Sundler R: The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Molecular immunology*, 43: 607-612, 2006
33. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K: Mediators of innate

- immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science*, 115: 2603-2611, 2002
34. Westerterp M, Tsuchiya K, Tattersall IW, Fotakis P, Bochem AE, Molusky MM, Ntonga V, Abramowicz S, Parks JS, Welch CL, Kitajewski J, Accili D, Tall AR: Deficiency of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Endothelial Cells Accelerates Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 36: 1328-1337, 2016
 35. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR: ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circulation research*, 114: 157-170, 2014
 36. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S, Ishibashi M, Li R, Wang N, Tall AR: Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*, 118: 1837-1847, 2008
 37. Han CY, Tang C, Guevara ME, Wei H, Wietecha T, Shao B, Subramanian S, Omer M, Wang S, O'Brien KD, Marcovina SM, Wight TN, Vaisar T, de Beer MC, de Beer FC, Osborne WR, Elkon KB, Chait A: Serum amyloid A impairs the antiinflammatory properties of HDL. *The Journal of clinical investigation*, 126: 266-281, 2016
 38. Ahren B: Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 8: 369-385, 2009
 39. Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K: Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia*, 49: 962-968, 2006
 40. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M: Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422: 173-176, 2003
 41. Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K: GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*

Obes Metab, 14: 271-278, 2012

42. Kaku K, Araki T, Yoshinaka R: Randomized, double-blind, dose-ranging study of TAK-875, a novel GPR40 agonist, in Japanese patients with inadequately controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 36: 245-250, 2013
43. Burant CF, Viswanathan P, Marcinak J, Cao C, Vakilynejad M, Xie B, Leifke E: TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 379: 1403-1411, 2012
44. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M: Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*, 55 Suppl 2: S16-23, 2006
45. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI: The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 278: 11303-11311, 2003
46. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T: Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289: E670-677, 2005
47. Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V: GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*, 56: 1087-1094, 2007
48. Leech CA, Dzhura I, Chepurny OG, Kang G, Schwede F, Genieser HG, Holz GG: Molecular physiology of glucagon-like peptide-1 insulin secretagogue action in pancreatic beta cells. *Progress in biophysics and molecular biology*, 107: 236-247, 2011
49. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V: G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia*, 55: 2682-2692, 2012
50. Drucker DJ: The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*, 3: 153-165, 2006
51. Yosida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Takei M: Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes*, 63: 3394-3403, 2014
52. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M: TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin

- secretion. *The EMBO journal*, 25: 1804-1815, 2006
53. Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M: Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes*, 60: 119-126, 2011
 54. Nakazaki M, Kakei M, Koriyama N, Tanaka H: Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 44: 878-883, 1995
 55. Dezaki K, Damdindorj B, Sone H, Dyachok O, Tengholm A, Gylfe E, Kurashina T, Yoshida M, Kakei M, Yada T: Ghrelin attenuates cAMP-PKA signaling to evoke insulinostatic cascade in islet beta-cells. *Diabetes*, 60: 2315-2324, 2011
 56. Damdindorj B, Dezaki K, Kurashina T, Sone H, Rita R, Kakei M, Yada T: Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet beta-cells. *FEBS Lett*, 586: 2555-2562, 2012
 57. Leech CA, Habener JF: A role for Ca²⁺-sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 47: 1066-1073, 1998
 58. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD: Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 97-104, 2005
 59. Uchida K, Tominaga M: The role of TRPM2 in pancreatic beta-cells and the development of diabetes. *Cell Calcium*, 56: 332-339, 2014
 60. Liu D, Zhu Z, Tepel M: The role of transient receptor potential channels in metabolic syndrome. *Hypertens Res*, 31: 1989-1995, 2008
 61. Putney JW: Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev*, 231: 10-22, 2009
 62. Balla T: Regulation of Ca²⁺ entry by inositol lipids in mammalian cells by multiple mechanisms. *Cell Calcium*, 45: 527-534, 2009
 63. Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C: Reduction in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology*, 147: 674-682, 2006
 64. Song WJ, Mondal P, Li Y, Lee SE, Hussain MA: Pancreatic beta-cell response to increased metabolic demand and to pharmacologic secretagogues requires EPAC2A. *Diabetes*, 62: 2796-2807, 2013
 65. Walters HJ, Diakogiannaki E, Mordue JM, Tadayyon M, Smith SA, Morgan NG: Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic beta-cells exposed to palmitate. *Apoptosis : an*

- international journal on programmed cell death*, 11: 1231-1238, 2006
66. Yang M, Chisholm JW, Soelaiman S, Shryock JC: Sulfonylureas uncouple glucose-dependence for GPR40-mediated enhancement of insulin secretion from INS-1E cells. *Mol Cell Endocrinol*, 315: 308-313, 2010
 67. Kakei M: Receptor-operated regulation of ATP-sensitive K⁺ channels via membrane phospholipid metabolism. *Curr Med Chem*, 10: 235-243, 2003
 68. Schmitz-Peiffer C, Biden TJ: Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes*, 57: 1774-1783, 2008
 69. Shigeto M, Ramracheya R, Tarasov AI, Cha CY, Chibalina MV, Hastoy B, Philippaert K, Reinbothe T, Rorsman N, Salehi A, Sones WR, Vergari E, Weston C, Gorelik J, Katsura M, Nikolaev VO, Vennekens R, Zaccolo M, Galione A, Johnson PR, Kaku K, Ladds G, Rorsman P: GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest*, 125: 4714-4728, 2015
 70. Matsuzawa Y: Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*, 86: 131-141, 2010
 71. Boutens L, Stienstra R: Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*, 59: 879-894, 2016
 72. Gregor MF, Hotamisligil GS: Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, 29: 415-445, 2011
 73. Holzer RG, Park EJ, Li N, Tran H, Chen M, Choi C, Solinas G, Karin M: Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation. *Cell*, 147: 173-184, 2011
 74. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM: GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142: 687-698, 2010
 75. Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O: Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 32: 543-550, 2011
 76. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G: Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine*, 11: 90-94, 2005
 77. Nakakuki M, Kawano H, Notsu T, Imada K: Eicosapentaenoic acid suppresses palmitate-induced cytokine production by modulating long-chain acyl-CoA synthetase 1 expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 227: 289-

296, 2013

78. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K: Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58: 2574-2582, 2009
79. Jia L, Vianna CR, Fukuda M, Berglund ED, Liu C, Tao C, Sun K, Liu T, Harper MJ, Lee CE, Lee S, Scherer PE, Elmquist JK: Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature communications*, 5: 3878, 2014
80. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*, 46: 2347-2355, 2005
81. Egnatchik RA, Leamy AK, Noguchi Y, Shiota M, Young JD: Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism: clinical and experimental*, 63: 283-295, 2014
82. Anbazhagan AN, Priyamvada S, Gujral T, Bhattacharyya S, Alrefai WA, Dudeja PK, Borthakur A: A novel anti-inflammatory role of GPR120 in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*, 310: C612-621, 2016
83. Rodriguez-Pacheco F, Gutierrez-Repiso C, Garcia-Serrano S, Alaminos-Castillo MA, Ho-Plagaro A, Valdes S, Garcia-Arnes J, Gonzalo M, Andrade RJ, Moreno-Ruiz FJ, Rodriguez-Canete A, Martinez-Ferriz A, Garcia-Fuentes E: The pro-/anti-inflammatory effects of different fatty acids on visceral adipocytes are partially mediated by GPR120. *European journal of nutrition*, 2016
84. Suzuki-Kemuriyama N, Matsuzaka T, Kuba M, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Isaka M, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Miyajima K, Nakae D, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H: Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PloS one*, 11: e0157580, 2016
85. Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y: Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes*, 59: 2495-2504, 2010
86. Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y, Nagai R: Orally

- administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 197: 524-533, 2008
87. Fujisaka S, Usui I, Kanatani Y, Ikutani M, Takasaki I, Tsuneyama K, Tabuchi Y, Bukhari A, Yamazaki Y, Suzuki H, Senda S, Aminuddin A, Nagai Y, Takatsu K, Kobayashi M, Tobe K: Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology*, 152: 1789-1799, 2011
 88. Spencer M, Finlin BS, Unal R, Zhu B, Morris AJ, Shipp LR, Lee J, Walton RG, Adu A, Erfani R, Campbell M, McGehee RE, Jr., Peterson CA, Kern PA: Omega-3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance. *Diabetes*, 62: 1709-1717, 2013
 89. Lefils-Lacourtablaise J, Socorro M, Geloën A, Daira P, Debard C, Loizon E, Guichardant M, Dominguez Z, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N: The eicosapentaenoic acid metabolite 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J3 increases adiponectin secretion by adipocytes partly via a PPARgamma-dependent mechanism. *PloS one*, 8: e63997, 2013
 90. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J: Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 49: 394-397, 2006
 91. Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Hainque B, Riou JP, Laville M, Vidal H: Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obesity research*, 10: 518-525, 2002
 92. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Hu FB: Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*, 121: 1356-1364, 2010
 93. Bray GA, Popkin BM: Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes care*, 37: 950-956, 2014