

氏 名	山 田 穂 高
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 523 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 黒 尾 誠 (委 員) 教 授 山 田 俊 幸 准教授 海老原 健

論文内容の要旨

1 研究目的

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。脂肪酸は大きく飽和、不飽和脂肪酸に分類され、前者は炎症性に、後者は抗炎症性に作用すると考えられている。生体内での脂肪酸の生理的メカニズムについて、飽和脂肪酸は Toll like receptor 4 (TLR4) を介して自然炎症を引き起こすこと、さらに脂肪酸は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) のリガンド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、中鎖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高発現し長鎖鎖脂肪酸をリガンドとして生理作用を示すとされている。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。まず始めに、第 1 部：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細胞炎症と内因性制御機構を検討した。続いて、第 2 部：脂肪酸の善玉作用としての膵 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を検討した。さらに第 3 部：既存薬剤である不飽和脂肪酸 eicosapentaenoic acid (EPA) の脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズムを検討した。

2 研究方法

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

脂肪細胞の培養細胞株として分化 3T3-L1 細胞を用いた。飽和脂肪酸としてアルブミンと結合させたパルミチン酸 (250 μ M、24 時間刺激) を用いた。パルミチン酸刺激の前処置には High-density lipoprotein (HDL)、apolipoprotein A-I (apo A-I、5 μ g/mL、6 時間)、Methyl- β -cyclodextrin (M β CD、10 μ mol/mL、30 分) を用いた。脂肪細胞の脂質ラフト・非ラフトは Detergent-free 法を用いて分離した。遺伝子のノックダウンには small interfering RNA (siRNA) を用い、mRNA の発現はリアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) で、蛋白質発現はウェスタンブロットで検討した。脂質ラフトは Alexa Fluor549-コレラトキシン B (CTB) で染色した。

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

膵 β 細胞及びランゲルハンス島はオス Wistar ラット膵臓からコラゲナーゼ法で分離した。イン

スリン分泌実験はバッチインキュベーション法を用いた。単離膵 β 細胞は ATP 感受性カリウム (KATP)チャネル電流以外の内向き電流、即ち非選択性陽イオンチャネル (NSCC)電流を測定するために -70mV に電位固定し、パッチクランプ法で電流を測定した。GPR40 受容体作動薬として fasiglifam ($10\mu\text{M}$)を用いた。Transient receptor potential canonical (TRPC)チャネルの阻害薬 BTP2 ($10\mu\text{M}$)、TRPC3 チャネルの選択的阻害薬 Pyr3 ($10\mu\text{M}$)を用いた。その他 phospholipase C (PLC)阻害薬、Protein kinase C (PKC)阻害薬を用いてシグナル伝達経路の検討を行った。ランゲルハンス島内 cAMP 測定及び fura-2 蛍光画像解析で細胞質内カルシウムイオン濃度測定を実施した。

第3部) 不飽和脂肪酸 EPA の脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズムの検討

脂肪細胞は 1)の実験同様 3T3-L1 細胞を用い、パルミチン酸($250\mu\text{M}$ 、24 時間)で刺激した。EPA は 50mM で 6 時間前処置に用いた。tumor growth factor β (TGF- β) activated kinase 1 (TAK1)と TGF- β activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1)の複合体形成は共免疫沈降で検討した。GPR120 は siRNA でノックダウンした。動物実験では C57BL/6J マウスをコントロール (chow)食、高脂肪高ショ糖 (HFHS)食、HFHS 食+EPA (5%wt/wt)の 3 群に分けて 4 週齢から 24 週間飼育した。精巣上体周囲脂肪の crown-like structure (CLS)形成評価及び血管間質成分 (SVF)を分離し、遺伝子発現を評価した。

3 研究成果

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

3T3-L1 細胞をパルミチン酸で刺激すると、細胞膜上の TLR4 の局在は非脂質ラフトから脂質ラフトに変化した。HDL 及び apo A-I で前処置するとこのパルミチン酸誘導性 TLR4 トランスロケーションは抑制された。炎症性サイトカイン IL-6、TNF- α mRNA の発現増加も抑制した。またパルミチン酸刺激は NF- κB のリン酸を亢進させたが、HDL 及び apo A-I 前処置で抑制された。脂質ラフトを M β CD で破壊するとパルミチン酸刺激 TLR4 トランスロケーションは抑制され、脂質ラフトの CTB 蛍光も低下した。HDL の抗炎症作用はコレステロールトランスポーター ABCG-1 及び SRB-1 のノックダウン、apo A-I の抗炎症作用は ABCA-1 のノックダウンによりそれぞれ消失した。

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

ラット単離 β 細胞を -70mV に電位固定して、 5.6mM グルコース下で tolbutamide ($100\mu\text{M}$)を先行還流後、fasiglifam ($10\mu\text{M}$)を還流すると、NSCC 電流の増加が観察された。 2.8mM グルコース下で fasiglifam を還流し細胞膜電位を測定したところ脱分極が見られたが、活動電位の発生はみられなかった。Fasiglifam は 16.7mM グルコース下ではインスリン分泌を促進したが、 2.8mM ではインスリン分泌に影響を与えなかった。PLC 阻害薬、PKC 阻害薬の投与で fasiglifam による NSCC 電流増加は抑制された。さらに、TRPC 阻害薬 (BTP2、 $10\mu\text{M}$)、TRPC3 選択的阻害薬 (Pyr3、 $10\mu\text{M}$) 投与で fasiglifam による NSCC 電流増加はキャンセルされた。 8.3mM グルコース下で fasiglifam を還流するとカルシウム濃度の増加が観察されたが、Pyr3 投与で有意に抑制された。インスリン分泌実験においても、BTP2、Pyr3 投与により fasiglifam によるインスリン分泌増加作用は抑制された。

第3部) 不飽和脂肪酸 EPA の脂肪細胞 GPR120 を介する抗炎症メカニズムの検討

3T3-L1 細胞をパルミチン酸刺激すると MCP-1、TNF- α mRNA 発現が増加していたが、EPA の前処置で抑制された。GPR120 を siRNA でノックダウンすると EPA の抗炎症作用は抑制された。EPA はパルミチン酸誘導性の JNK 及び NF- κB のリン酸化を抑制する傾向を確認した。パルミチン酸刺

激、EPA 処置で TAB1 の蛋白発現に変化は見られなかったが、TAB1-TAK1 複合体形成が増加しており、EPA 前処置で抑制された。動物実験では、精巣上体周囲脂肪組織において EPA は CLS 形成を抑制し、脂肪細胞径を有意に小型化した。SVF の解析で、EPA は M1 マクロファージマーカー CD11c の mRNA 発現を抑制し、脂肪細胞分画では MCP-1 の mRNA 発現を抑制した。さらに EPA は脂肪組織において HFHS による JNK 及び NF- κ B のリン酸化亢進を抑制していた。

4 考察

飽和脂肪酸パルミチン酸は脂肪細胞炎症に TLR4 の脂質ラフトへのトランスロケーションを引き起こし、自然炎症を惹起することが示唆された。M β CD の検討から特に脂質ラフトからのコレステロール引き抜きが HDL 及び apo A-I の抗炎症作用に関わっていると考えられた (第 1 部)。他方、膵 β 細胞 GPR40 受容体刺激は KATP チャネル非依存的に内向き電流を増加させ、PLC/PLC/TRPC チャネルを活性化した。これにより細胞質内にカルシウムを取り込み、インスリン分泌を増加させている機序が明らかとなった。また cAMP/PKA 経路非依存性であると考えられた (第 2 部)。さらに既存の高脂血症治療薬で不飽和脂肪酸 EPA はマクロファージ以外に脂肪細胞 GPR120 を介して抗炎症作用を持つことが示唆され、EPA の抗炎症作用の機序の一端を示した。EPA は第 1 部でも述べたパルミチン酸誘導性の自然炎症に GPR120 を介して拮抗していると考えられた。EPA の C57BL/6J マウスへの投与は HFHS 誘導性の脂肪組織 MCP-1 の発現を低下させ、M1 マクロファージの浸潤を抑制している可能性があると考えられた (第 3 部)。

5 結論

一連の研究で脂肪酸の質の違い (リポクオリティ) が生体に与える善玉、悪玉作用を検討した。飽和脂肪酸は脂肪組織に自然炎症を惹起するが、不飽和脂肪酸は GPR120 を介して抗炎症性に作用する。GPR40 刺激は TRPC を開口し、インスリン分泌を促進していた。脂肪酸受容体研究は受容体の多くが GPCR であることから、今後の新たな治療標的として重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、脂肪酸の作用とそのメカニズムについて、分子レベル、細胞レベル、個体レベルで明らかにすることを目的としている。特に、飽和脂肪酸の炎症惹起作用、中鎖脂肪酸のインスリン分泌増加作用、および不飽和脂肪酸の抗炎症作用のメカニズムについて解析している。まず、脂肪細胞において飽和脂肪酸が非感染性炎症を惹起するには、細胞表面の TLR4 が lipid raft へとリクルートされることが必要なことを明らかにした。次に、中鎖脂肪酸の受容体である GPR40 のアゴニストを用いて、GPR40 刺激によるインスリン分泌増加作用には、PLC-PKC シグナルを経由したカルシウムチャネル (TRPC3) の活性化が必要であることを明らかにした。さらに、脂肪細胞における不飽和脂肪酸の抗炎症作用には、マクロファージの場合と同様に、不飽和脂肪酸の受容体である GPR120 からの細胞内シグナルによって TLR4 下流の細胞内シグナルが抑制される必要があることを示した。

以上の成果は、脂肪酸の質 (飽和・不飽和、長鎖・中鎖・短鎖) によってその作用が異なるメカニズムについて新たな知見を提供している。既知の事実から新しい仮説を設定し、これを検証

するための実験が注意深くデザインされている。これらの研究成果は、既に英語原著論文として 2 報が受理され、1 報が revise 中である。提出された論文も、単なる原著論文の寄せ集めではなく、その背景となる視点から再構成してまとめてあり、用いた実験手技も内容も高度である。

論文中に数個のタイプミスがあったので、それを修正するように指示した。

最終試験の結果の要旨

最終試験に際しては、審査委員からの質問に全て適切に答えており、関連する過去の論文にも精通し、十分な学識も有している。審査委員からは、山田氏がこの研究をさらに発展させ、臨床応用へ繋げることを期待している旨の発言があった。

以上の観点から、審査委員の全員が、本論文は学位論文として相応しく、申請者は学位に値する学識が備わっているという結論で一致した。