

氏名	たなかとしき 田中寿樹
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第638号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	長鎖遊離脂肪酸による腸管ホルモンの分泌促進作用とその機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 辻本豪三 教授 岡村均 教授 竹島浩

### 論文内容の要旨

近年、オーファンGPCRであったGPR40, GPR120などのGPCRが、遊離脂肪酸を天然リガンドとすることが明らかとされた。さらに、GPR120は腸で発現しており、腸内分泌細胞のモデルであるマウスSTC-1細胞で、長鎖脂肪酸のセンサー分子として働き、グルカゴン様ポリペプチド1 (GLP-1) 分泌を促進していることが示された。申請者はこのGPR120を介した腸管ホルモン分泌促進作用に着目し、*in vivo*および*in vitro*実験系を用いて、GLP-1およびコレシストキニン (CCK) 分泌機構について検討した。

#### 第一章 脂肪酸投与におけるGLP-1およびインスリンの分泌

現在まで、経口摂取した脂肪が直接消化管に作用し、GLP-1の分泌を促しているのかが不明であった。そこで、申請者はC57BL/6マウスを用い、脂肪酸を直接消化管内に投与し、血中GLP-1レベルを測定した。さらに、投与部位に関しても検討した。試験物質として、長鎖不飽和脂肪酸であるリノレン酸 ( $\alpha$ -LA)、中鎖飽和脂肪酸であるオクタン酸 (OA) を用いた。その結果、結腸への $\alpha$ -LAの投与は有意な血中GLP-1レベルの上昇をもたらした。一方、OAでは認められなかった。また、GLP-1分解酵素であるジペプチジルペプチダーゼIV (DPPIV) の活性阻害が認められなかったことから、 $\alpha$ -LAの投与による血中GLP-1レベルの上昇は、GLP-1分解阻害によるものではなく、GLP-1分泌の促進であることが示唆された。

次に、申請者は、 $\alpha$ -LA刺激によるGLP-1分泌の細胞内シグナル伝達を検討した。 $\alpha$ -LA, OA, 溶媒を投与し、速やかにマウスから結腸を採取し、薄切後、抗リン酸化ERK抗体および抗GLPP-1抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。 $\alpha$ -LA投与群ではGLPP-1陽性細胞におけるリン酸化ERK陽性細胞数の有意な上昇が認められた。OA投与群および溶媒投与群では有意な変化は認められなかった。この結果より、 $\alpha$ -LAは結腸において消化管に直接作用し、GLP-1含有細胞にけるERKの活性化を惹起していることが示唆された。

さらに、申請者は脂肪酸投与の糖尿病に対する効果を検討した。2型糖尿病モデルマウスであるNSYマウスに脂肪酸を経口投与し、血中GLP-1レベル、血中インスリンレベル、血糖値を測定した。 $\alpha$ -LA投与群では、血中GLP-1レベルおよび血中インスリンレベルが有意に上昇した。OAもしくは溶媒投与群では有意な変化は認められなかった。また、投与後血糖値は、 $\alpha$ -LA投与群では有意に低値を示した。本結果より、長鎖脂肪酸投与はGLP-1分泌促進、インスリン分泌促進を介して、糖尿病発症下における血糖値低下にも有用であることが示唆された。

#### 第二章 CCK分泌におけるGPR120

申請者はGLP-1とともに古くから腸管ホルモンとして知られているCCKの分泌に着目した。申請者はC57BL/6マウスを用い、脂肪酸の消化管内投与による血中CCKレベルを検討した。試験物質としては $\alpha$ -LA, OAを用いた。その結果、胃下部への $\alpha$ -LAの投与は有意なCCKレベルの上昇をもたらした。一方、その作用はOA投与および溶媒投与では認められなかった。また、空腸への投与では $\alpha$ -LAによるCCKレベルの上昇は認められなかった。この結果より、長鎖脂肪酸は

CCKの分泌促進作用を有し、その長鎖脂肪酸の作用部位は小腸上部であることが示唆された。

次に、申請者は、STC-1細胞を用いて、長鎖脂肪酸刺激によるCCK分泌促進を検討した。その結果、長鎖脂肪酸である $\alpha$ -LAおよびパルミトイル酸刺激により、CCKの分泌が有意に上昇した。中鎖脂肪酸であるOAでは有意な上昇は認められなかった。この結果より、脂肪酸はGLP-1分泌と同様にCCK分泌においても、鎖長依存的な分泌促進作用を有することが明らかとなった。

さらに、申請者は長鎖脂肪酸によるCCK分泌促進作用の機序を検討した。GPR40もしくはGPR120に対するRNAiをSTC-1細胞に導入したところ、各GPCRは有意にノックダウンされた。GPR120をノックダウンしたSTC-1細胞では、長鎖脂肪酸によるCCK分泌は有意に減少した。一方、GPR40をノックダウンしたSTC-1細胞では有意な変化は認められなかった。この結果より、長鎖脂肪酸によるCCK分泌促進作用もGLP-1分泌と同様にGPR120を介していることが明らかとなった。さらに、 $Ca^{2+}$  free buffer, L型カルシウムチャネル阻害薬（ニカルジピン）、protein kinase A阻害薬（H-89）、 $Ca^{2+}$ -ATPase阻害剤（thapsigargin）による長鎖脂肪酸のCCK分泌促進作用に対する効果を検討した。長鎖脂肪酸によるCCK分泌は $Ca^{2+}$  free buffer, ニカルジピンで有意に抑制された。一方、thapsigarginによる抑制は認められなかった。この結果より、長鎖脂肪酸によるCCK分泌促進には、L型カルシウムチャネルを介した細胞外カルシウムの細胞内流入が重要であることが明らかとなった。

以上、申請者は長鎖遊離脂肪酸による腸管ホルモンの分泌促進作用とその機構に関する研究を行い、長鎖脂肪酸が消化管においてGLP-1含有細胞に直接作用し、GLP-1の分泌を促進することを明らかとした。さらに、CCK分泌においても長鎖脂肪酸が生体内で分泌促進物質として働き、また、その作用がGPR120を介していることを明らかとした。今後は、GPR120およびGPR40の各ノックアウトマウスや特異的作動薬の開発により、腸ホルモン分泌における両受容体の役割に関して、さらなる解明が行われることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、食事中的脂肪摂取による腸管ペプチドホルモン分泌の機構を明らかにした論文である。

食事中的脂肪は消化管に作用し、コレシストキニン（CCK）やグルカゴン様ペプチド1（GLP-1）などの腸管ペプチドホルモンを分泌することが知られている。GLP-1, CCKは膵 $\beta$ 細胞におけるinsulin分泌促進作用や中枢神経系における食欲抑制作用を有することから、糖尿病・肥満治療等の分野において着目されている。脂肪酸は管腔側からの直接作用、血管側からの作用もしくは副交感神経系を介した作用のいずれかの機構でGLP-1, CCKを分泌していることが提唱されてきた。しかしながら、その機構の多くは不明であり、申請者は脂肪酸の作用機序の検討を行った。

長鎖脂肪酸を十二指腸、回腸、結腸から直接投与し、門脈血清中GLP-1濃度を測定したところ、結腸からの投与により有意な上昇が認められた。同時にinsulin濃度の上昇も認められた。このGLP-1, insulin濃度の上昇は長鎖脂肪酸特異的な作用であった。さらに、申請者は結腸からの長鎖脂肪酸投与後の結腸を用いて細胞内シグナルの一つであるERKの活性化を検討することにより、脂肪は管腔側から内分泌細胞を刺激し、GLP-1, CCKを分泌する機構を有することを明らかにした。

GLP-1は、膵 $\beta$ 細胞でのinsulin分泌を介して血糖値低下を有することが報告されている。申請者は糖尿病モデルマウスを用いた実験において、長鎖脂肪酸投与が、GLP-1およびinsulin分泌を惹起し、糖負荷による血糖値上昇を抑制する新知見を得た。これは、糖尿病治療薬開発において脂肪酸および脂肪酸受容体をターゲットとするにあたり重要な知見と言える。

一方、食事に含まれる脂肪により分泌されるCCKは古くから知られた腸管ペプチドホルモンであり、その摂食抑制作用から肥満治療等に期待されている。しかしながら、脂肪によるCCK分泌機構には未だ不明な点が多い。申請者は胃および空腸からの脂肪酸投与を行い、CCKは胃からの長鎖脂肪酸投与により分泌されることを明らかとした。また、申請者は「マウス腸内分泌モデル」細胞であるSTC-1細胞を用いてCCK分泌機構の解明を行った。STC-1におけるCCK分泌はマウスを用いた実験と同様に長鎖脂肪酸特異的に促進されることを明らかにした。STC-1細胞に共発現している長鎖脂肪酸受容体GPR120およびGPR40に対するshRNAを用いて、各遺伝子の発現抑制を行い、脂肪酸添加によるCCK分泌量変化を検討した。RT-PCRの結果よりshRNAはその対応するGPCRの発現量を有意に減少させた。各受容

体の発現量を抑制したSTC-1細胞を用いた実験の結果、長鎖脂肪酸が長鎖脂肪酸受容体GPR120を介してCCK分泌を促進することを明らかにした。また、各種阻害剤を用いてL型カルシウムチャネルを介した細胞内カルシウムの細胞内流入に依存していることを明らかにした。

本論文で申請者は脂肪によるGLP-1、CCK分泌についてこれまでよりも詳細な機構を明らかにした。特に、脂肪が管腔内からの直接刺激によりその腸管分泌能を有していることは、これら脂肪・脂肪酸受容体をターゲットとする創薬研究において非常に重要な知見になると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年1月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。