

中鎖脂肪酸受容体 GPR84 を介した代謝調節機構の解明

2024

西田 朱里

目次

第1章：緒言	1
第1節：脂肪酸とその代謝改善効果	1
第2節：脂肪酸をリガンドとする細胞膜受容体	2
第2章：GPR84 を介した MASH 進展抑制機構の解明	3
第1節：序論	3
第2節：方法	4
第3節：結果	10
第1項：高脂肪食負荷条件における GPR84 の炎症抑制効果	10
第2項：GPR84 による MASH 進展抑制効果	12
第3項：高脂肪食摂取による内因的中鎖脂肪酸産生の確認	15
第4項：GPR84 による MASH 進展抑制機構の検討	17
第5項：MASH マウスモデルにおける中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルの意義解明	19
第6項：GPR84 アゴニストによる MASH 改善効果	21
第4節：考察	23
第3章：GPR84 を介した糖・脂質代謝制御機構の解明	25
第1節：序論	25
第2節：方法	26
第3節：結果	29
第1項：GPR84 がエネルギー代謝に及ぼす影響の検討	29
第2項：糖・脂質代謝関連ホルモンの測定と耐糖能試験	31
第3項：糖尿病モデルを用いた GPR84 欠損時の糖・脂質代謝表現型の検討	33
第4項：GPR84 と脂肪組織炎症の関連についての検討	35
第5項：GPR84 と脂肪分解の関連についての検討	38
第6項：中鎖脂肪酸食摂取条件における GPR84 の意義解明	41
第4節：考察	43
第4章：総括および結語	45
謝辞	47
発表論文目録	48
引用文献	49

略記

AMPK: AMP-Activated Protein Kinase
ANOVA: Analysis of Variance
AP: Alkaline Phosphatase
ATGL: Adipose Triglyceride Lipase
BAT: Brown Adipose Tissue
BM: Bone Marrow
BSA: Bovine Serum Albumin
BW: Body Weight
CCK: Cholecystokinin
CDAHFD: Choline-Deficient, L-Amino Acid-Defined, High-Fat Diet
cDNA: Complementary DNA
DAB: 3,3'-Diaminobenzidine
DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DEGs: Differentially Expressed Genes
DHA: Docosahexaenoic Acid
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA: Eicosatetraenoic Acid
Epi: Epididymal Adipose Tissue
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS: Fetal Bovine Serum
FCS: Fetal Calf Serum
FDR: False Discovery Rate
FFAR: Free Fatty Acid Receptor
GIP: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1
GPCR: G-Protein-Coupled Receptor
HA: Hemagglutinin
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HE: Hematoxylin-Eosin
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HFD: High-Fat Diet

HYA: 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid
IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IF: Immunofluorescence
IHC: Immunohistochemistry
ITT: Insulin Tolerance Test
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCFA: Long-Chain Fatty Acid
LKB: Liver Kinase B1
LPL: Lipoprotein Lipase
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MASH: Metabolic dysfunction Associated Steatohepatitis
MASLD: Metabolic dysfunction Associated Steatotic Liver Disease
MCFA: Medium-Chain Fatty Acid
MCT: Medium-Chain Triglyceride
mTOR: Mechanistic Target of Rapamycin
NC: Normal Chow
NEFA: Non-Esterified Fatty Acids
OGTT: Oral Glucose Tolerance Test
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PYY: Peptide YY
Peri: Perirenal Adipose Tissue
qRT-PCR: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEM: Standard Error of the Mean
Sub: Subcutaneous Adipose Tissue
T-Cho: Total Cholesterol
TG: Triglyceride
TGF α : Transforming Growth Factor Alpha
TNF α : Tumor Necrosis Factor Alpha
WAT: White Adipose Tissue
WT: Wild Type
 α -SMA: Alpha Smooth Muscle Actin

第1章：緒言

第1節：脂肪酸とその代謝改善効果

脂質は、炭水化物およびタンパク質と並び三大栄養素の一つであり、重要なエネルギー源として機能する。しかしながら食の欧米化に伴い、肥満や糖尿病など、脂質の過剰摂取により引き起こされる代謝性疾患が増加の一途をたどっている¹。このような背景から、近年では摂取する脂質の量だけでなく、脂質の質についても注目が集まっている。脂質を構成する脂肪酸は鎖長に基づいて、炭素数 12 以上の長鎖脂肪酸、炭素数 6–12 の中鎖脂肪酸、炭素数 6 未満の短鎖脂肪酸、に分類される。パルミチン酸に代表される長鎖飽和脂肪酸は、その脂肪毒性の高さから、過剰摂取によって脂肪組織での脂肪蓄積や、異所性脂肪沈着を引き起こし、肥満や脂肪肝の発症リスク因子となることが知られている²。一方、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸や α リノレン酸は体内で合成できないため必須脂肪酸に分類されるほか、同じく多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）は、心血管疾患や脳疾患の予防に寄与することが報告されており、実際にオメガ 3 脂肪酸製剤は、高脂血症の治療薬として利用されている³。さらに近年、食事に含まれる脂肪酸や体内で合成される脂肪酸に加えて、腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸についても、その代謝改善効果が報告されている。オリゴ糖などの食物繊維の摂取は、腸内細菌叢における善玉菌の割合を増加させるだけでなく、腸内での短鎖脂肪酸産生を促進し、肥満抑制をはじめとする様々な有益性をもたらすことが報告されている^{4,5}。このことから、宿主の健康に有益な微生物を摂取するプロバイオティクスに加えて、短鎖脂肪酸の産生を促進する食品成分の摂取、すなわちプレバイオティクスの重要性が指摘されている。

長鎖脂肪酸と短鎖脂肪酸の中間の鎖長を持つ中鎖脂肪酸は、ココナッツオイルやパーム核油に含まれるほか、母乳に多く含まれる脂肪酸であることから、粉ミルクの製造に使用されている。中鎖脂肪酸は鎖長が短く、長鎖脂肪酸と比較して親水性が高いため、腸管内で速やかに吸収され、門脈を介して肝臓に到達する。細胞内に取り込まれる際にもカルニチンを必要としないことから速やかに代謝され、 β 酸化を介してケトン体を産生する⁶。このような特性から、中鎖脂肪酸のエネルギーは 8.4 kcal/g であり 9 kcal/g の長鎖脂肪酸とは大きく変わらないものの、多くのコホート研究において、中鎖脂肪酸が長鎖脂肪酸と比較して体重増加リスクを低減することが示されている⁷。加えて近年、動物実験およびヒト介入試験から、中鎖脂肪酸油の摂取が摂食の抑制や脂肪燃焼の促進など、様々な効果をもたらすことが報告されている⁸。

このように脂肪酸はエネルギー源として利用されるだけでなく、様々な代謝改善効果を発揮する。近年の研究で、これら脂肪酸による代謝改善効果の作用機序として、細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体（GPCR）が示唆され始めた^{9,10}

第2節：脂肪酸をリガンドとする細胞膜受容体

脂肪酸受容体 (FFAR) として、中鎖脂肪酸受容体である GPR40 (FFAR1) および GPR120 (FFAR4) が、短鎖脂肪酸受容体である GPR43 (FFAR2)、GPR41 (FFAR3) が同定されている。GPR40 は Gs 共役型受容体であり細胞内 cAMP を上昇させるほか、Gq 共役型受容体として細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる¹¹。GPR40 は膵臓 β 細胞、腸内分泌細胞、免疫細胞、中枢神経に発現し、インスリンや腸管ホルモンの分泌、抗炎症反応、神経細胞の発達に寄与することが報告されている^{9,12,13}。Gq 共役型受容体である GPR120 は、腸管、免疫細胞、脂肪細胞に発現し、GPR40 と同様に腸管ホルモン分泌や抗炎症作用を担うほか、白色脂肪組織の分化およびベージュ化に寄与することが報告されている^{9,11,14}。

短鎖脂肪酸受容体に関しては、Gi/o および Gq 共役型受容体である GPR43 が脂肪細胞、腸管、膵臓 β 細胞、免疫細胞などで発現している^{11,15,16}。当研究室の先行研究により、GPR43 が脂肪組織においてインスリンシグナルを調節することや、LPL 活性制御により脂肪分解を促進することが示されている^{17,18}。また GPR43 は、直接的にインスリン分泌を制御するほか、腸管ホルモン分泌や抗炎症作用に寄与することも報告されている⁹。Gi/o 共役型受容体である GPR41 は頸部神経節に高発現し、交感神経活性の調節に寄与することが明らかにされているほか^{11,19}、脂肪細胞でレプチン分泌に関与することや、腸管ホルモンおよびインスリン分泌に関与することが報告されている^{20,21}。

このように FFAR として同定された GPCR が多くの代謝調節に寄与する一方、近年新たに脂肪酸をリガンドとする受容体が同定された。嗅覚受容体 Olfr78 は、Gs 共役型の短鎖脂肪酸受容体として、嗅上皮以外の末梢組織においても機能することが報告された^{22,23}。我々の先行研究においても、Olfr78 が腸管において短鎖脂肪酸をリガンドとして、食欲抑制ホルモンである PYY の分泌を促進することが示されている²⁴。

加えて、中鎖脂肪酸についてもその受容体として、Gi/o 共役型受容体である GPR84 が同定された^{11,25}。GPR84 は骨髄や免疫細胞、肺などに発現し、炎症反応の調整やマクロファージの分極といった免疫機能や肺疾患への関与が報告されている²⁶。一方で GPR84 は、中鎖脂肪酸をリガンドとする受容体として同定されているものの、生体内に存在する内因性中鎖脂肪酸の濃度は高くなく、生理的条件下において GPR84 が活性化されないことから、GPR84 は脂肪酸受容体として FFAR ファミリーとして認識されていない²⁷。そこで本研究では、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルの生理的意義を検証する一環として、内因性中鎖脂肪酸が GPR84 を活性化し得る条件を検討し、その際の GPR84 を介した代謝改善効果について説明することとした。

第2章：GPR84 を介した MASH 進展抑制機構の解明

第1節：序論

食生活の欧米化に伴う肥満の増加や、高齢化の進行にしたがって、代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（MASLD）の罹患率は増加の一途をたどっている。MASLD のうち、特に肝炎を併発した病態は代謝機能障害関連脂肪肝炎（MASH）と診断される。肝炎は肝硬変の進行を著しく促進することから、アルコールを原因としない脂肪肝炎患者のうち、20%以上が生涯のうちに肝硬変を発症することが報告されている²⁸。このように、MASH は肝硬変や肝細胞がんへ進展するリスクを有し、世界的な健康問題として認識されている。しかしながら、現在まで有効な治療法は確立されておらず、末期の MASH 患者には生体肝移植が適応される²⁹。

MASH の病態は、脂質の過剰摂取により、肝臓へ異所性脂肪が沈着することから始まる。その後、脂肪毒性により障害を受けた肝細胞が免疫細胞に貪食されることにより、炎症が引き起こされる。この過程には、小胞ストレスや腸管由来リポ多糖など、様々な要因が関与し、病態の悪化を促進する³⁰。

このように MASH は脂肪酸の流入を発症の一因とする病態であることから、生体における脂肪酸の認識・応答機構が MASH の進展抑制に寄与する可能性が考えられる。そこで本研究では脂肪酸認識受容体として、特に免疫細胞に高発現し、炎症への関与が示唆されている中鎖脂肪酸受容体 GPR84 に着目した。GPR84 が脂肪毒性に対する防御機構を有すると仮定し、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルと肝臓炎症の関係を個体・細胞レベルで評価することで、GPR84 の創薬標的としての可能性を検討した。

第2節：方法

動物試験

C57BL/6J マウスは日本 SLC から購入し、C57BL/6J 系統の *Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。C57BL/6J マウスおよび *Gpr84* 欠損マウスは、室温 24°C、湿度 40–60%、12 時間の明暗サイクルの条件で飼育した。基本飼料には、CLEA Rodent Diet CE-2 (日本クレア) を用いた。短期負荷試験では、7 週齢の雄マウスに通常食または高脂肪食 (60% kcal Fat, D12492, Research Diets) を 5 週間与えた。長期負荷試験では、4 週齢の雄マウスに高脂肪食を 12 週間与えた。MASH マウスモデルは、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食 (CDAHFD, A06071302, Research Diets) または中鎖脂肪酸を添加した CDAHFD を 10 週間与えることで病態モデルを確立した。Embelin 投与試験は、Embelin (50 mg/kg body weight, Cayman Chemical) の経口投与により実施した。

マウスの解剖は 5 時間の絶食後に実施した。OneTouch® Ultra® (LifeScan) を用いて尾静脈から血糖値を測定した後、イソフルランの吸入麻酔を行った。採血は下大静脈から行い、血液サンプルを 4°C, 7000×g で 5 分間遠心した後、上清の血漿を回収した。

動物試験は全て、京都大学動物実験委員会 (Lif-K21020) の倫理委員会で承認された指針に従って実施した。

血液生化学解析

肝臓内のトリグリセリド (triglyceride; TG) 濃度は LabAssay™ Triglyceride (FUJIFILM Wako) を用いて、TNF α 濃度はマウス TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用い、それぞれ製造元のプロトコルに従って測定した。

RNA 抽出、逆転写および定量リアルタイム PCR

組織中の RNA は RNAiso Plus (TAKARA) を用いて抽出した。抽出した RNA に対し、M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用い、cDNA への逆転写を行った。逆転写で得られた cDNA への qRT-PCR 分析には、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA) および StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。サイクル条件と使用プライマーは下記表の通りで、内部標準には 18S rRNA を用い、遺伝子発現量は 2-DDCt 法を用いて算出した。

qRT-PCR サイクル条件

	温度	時間	サイクル数
増幅	95°C	30秒	1
	95°C	5秒	40
	58°C	30秒	
	72°C	1分	
解離曲線	95°C	15秒	1
	60°C	1分	
	95°C	15秒	

qRT-PCR 使用プライマー

	forward			reverse		
<i>Gpr84</i>	5'-	AGGTGACCCGTATGTGCTTC	-3'	5'-	GTTCATGGCTGCATAGAGCA	-3'
<i>18s</i>	5'-	CTTAGAGGGACAAGTGGCG	-3'	5'-	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA	-3'
<i>Col1a</i>	5'-	CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	-3'	5'-	ACCACTTGATCCAGAAGGACCTT	-3'
<i>Tgfb1</i>	5'-	CCTGAGTGGCTGTCTTTTGACG	-3'	5'-	AGTGAGCGCTGAATCGAAAGC	-3'
<i>Acta2</i>	5'-	GTTCACTGGTGCCTCTGTCA	-3'	5'-	ACTGGGACGACATGGAAG	-3'
<i>Tnf</i>	5'-	GGCAGGTCTACTTTGGAGTC	-3'	5'-	TCGAGGCTCCAGTGAATTCG	-3'
<i>Adgre1</i>	5'-	GATGTGGAGGATGGGAGATG	-3'	5'-	ACAGCAGGAAGGTGGCTATG	-3'
<i>Cd68</i>	5'-	TCCAAGATCCTCCACTGTTG	-3'	5'-	ATTTGAATTTGGGCTTGGAG	-3'
<i>Cd14</i>	5'-	GGCGCTCCGAGTTGTGACT	-3'	5'-	TACCTGCTTCAGCCAGTGA	-3'
<i>Acs1</i>	5'-	TGCCAGAGCTGATTGACATTC	-3'	5'-	GGCATACCAGAAGGTGGTGAG	-3'
<i>Acs3</i>	5'-	CTTTGGCCCCAGCAGTAGATG	-3'	5'-	GGCTGTCACTGGCATATTTTAT	-3'
<i>Acadl</i>	5'-	TTTCCTCGGAGCATGACATTTT	-3'	5'-	GCCAGCTTTTCCAGACCT	-3'
<i>Acadm</i>	5'-	CCAGAGAGGAGATTATCCCCG	-3'	5'-	TACACCCATACGCCAATCTT	-3'
<i>Acot11</i>	5'-	AGATCATGGCTTGGATGGAG	-3'	5'-	AAAGGCGTTATTCACGATGG	-3'
<i>Acot13</i>	5'-	AGCAGCATGACCCAGAACCTA	-3'	5'-	GGAGCGTGCCAGTTTATTAGTA	-3'

組織学的解析

凍結切片に用いる肝臓は、O.C.T.コンパウンド (Sakura Finetek) に包埋し、凍結ミクロトーム (Leica) を用いて 8 µm にて切片化した。組織形態を観察する際にはヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin; HE) 染色を行い、肝細胞内の脂質含有量はオイルレッド O 染色で可視化した。免疫組織化学 (Immunohistochemistry; IHC) 解析として、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 染色と蛍光免疫 (Immunofluorescence; IF) 染色を用いた。組織切片の固定には 4% paraformaldehyde を用い、全ての組織切片は BZ-X710 (Keyence) により観察した。

HE 染色は、切片固定後、マイヤーヘマトキシリン溶液 (FUJIFILM Wako) での染色と 70% エタノールでの固定を行った。さらにエオシン (FUJIFILM Wako) の染色と 70% エタノールでの固定を行った後、100% エタノールとキシレンで脱水を行った。

オイルレッド O 染色は、切片固定後、60% イソプロパノールで脱水し、Oil Red O 溶液 (FUJIFILM Wako) で染色した。60% イソプロパノールで再度処理した後、マイヤーヘマトキシリン溶液での対比染色を行った。

DAB 染色については、切片固定後、切片に対して 0.2% Triton X-100 (Sigma) および bovine serum albumin (BSA, 1% w/v, FUJIFILM Wako) を含む phosphate buffered saline (PBS) で透過

処理を行った。BSA (5% w/v) を含む PBS でブロッキングし、一次抗体、続いて二次抗体と反応させた。一次抗体には F4/80 抗体 (1:1000, ab6640, Abcam) および α -SMA 抗体 (1:300, 19245, Cell Signaling Technology) を用い、二次抗体にはそれぞれ Goat Anti-Rat IgG Antibody, Biotinylated (1:150, BA-9400, Vector Laboratories) および Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Biotinylated (1:150, BA-1000, Vector Laboratories) を用いた。免疫反応シグナルは、Peroxidase Stain DAB Kit (Nacalai Tesque) で発色し、切片はヘマトキシリン溶液で対比染色した。

蛍光免疫染色は、組織切片に対して固定および透過処理を行った後、ブロッキング処理を実施し、一次抗体、二次抗体、および核染色の順に反応させた。一次抗体は DAB 染色で使ったものと同一とし、二次抗体には Alexa Fluor™ Plus 488 (1:200, A48262, Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor™ 568 (1:200, A11036, Thermo Fisher Scientific) を用いた。二次抗体反応後、核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:5000, 10236276001, Roche) を使用した。

肝臓マクロファージの定量は、F4/80 陽性細胞の細胞数をカウントし、DAPI による核染色で観察された細胞数における割合で算出した。MASH の病理学的評価は、MASLD activity score に基づいて行い、肝脂肪化、実質炎症、バルーニング変性のスコアの 3 項目についてそれぞれ 0-3、0-3 の 4 段階で、0-2 の 3 段階で評価した。

RNA-Seq 解析

通常食および高脂肪食を与えたマウスの肝臓から、RNAiso Plus および RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。RNA の品質および濃度は、Agilent 2100 Bioanalyzer と RNA 6000 Nano kit (Agilent) を使用して測定した。cDNA ライブラリーは TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina) で作成した。NovaSeq 6000 を用いたペアエンドシーケンスを実施し、各サンプルから約 4 Gb の 150bp ペアエンドリードを得た。得られたリードに対し、Trimomatic を用いてアダプター配列や低品質のリードを除去した。除去後のシーケンスデータの品質は FastQC で評価した。シーケンスデータについて、HISAT2 および Bowtie2 を使用してマウスゲノム (mm10) を参照し、StringTie を用いて遺伝子発現量の定量をした。得られた発現量に対し、DESeq2 による nbinomWaldTest を用いることで、群間の変動倍率 (fold change) を求め、発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes; DEGs) を算出した。DEGs の算出は以下の 2 つの基準を満たすものとした: FDR 補正済み P 値 < 0.05 (Benjamini-Hochberg) および $|\log_2(\text{fold change})| > 0.5$ 。DEGs に対するエンリッチメント解析は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベース (<http://www.genome.jp/kegg/>) を用いて実施した。RNA-Seq データは Dryad リポジトリに公開している (<https://doi.org/10.5061/dryad.m37pvmd36>)。

細胞培養条件と細胞作製

細胞は、特に記載のない限り 5% CO₂ 存在下、37°Cでの条件で、fetal bovine serum (10% v/v, FBS, Funakoshi) を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) で培養した。また全ての実験について、3 回の独立実験によりデータを取得した。

GPR84 安定発現細胞株を作製するため、Flp-In T-REx HEK293 細胞に対し、pcDNA5/FRT/TO-HA-mGPR84 および pOG44 を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。48 時間後に、blasticidin S (10 µg/mL, Funakoshi) および hygromycin B (100 µg/mL, Invitrogen) を含む培地に交換し、抗生物質によるセクションを行うことで、GPR84 を安定発現した細胞を選別した。抗生物質耐性細胞に doxycycline (10 µg/mL) を添加し GPR84 の発現を誘導した後、24 時間後に定量リアルタイム PCR および HA タグを用いた免疫染色により膜上の局在を確認することで細胞の樹立を確認した。免疫染色一次抗体には、抗 HA 抗体 (1:1000, 3F10, Roche) を、二次抗体には Alexa FluorTM 488 (1:200, A11006, Invitrogen) を使用した。

cAMP assay

GPR84 安定発現細胞を 24well プレートに 1×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養後、各ウェルを doxycycline (10 µg/mL) または対照の DMSO で処理し、更に 24 時間培養した。細胞を 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 500 µM, Sigma) を含む無血清培地で 30 分間処理し、スタベーションを実施した。続いて、forskolin (2 µM, Sigma) を添加し細胞内 cAMP 濃度を上昇させた後、各種中鎖脂肪酸 (C6:0–C14:0, Nu-Chek Prep) または Embelin で 10 分間刺激した。cAMP 濃度は、Cyclic AMP ELISA Kit (Cayman Chemical) を使用して、製造元のプロトコルに従って測定した。

TGF α shedding assay

GPR84 強制発現細胞を 6well プレートに 2×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養後、各ウェルを doxycycline (10 µg/mL) または対象として DMSO で処理し、更に 24 時間培養した。その後、AP-TGF α プラスミド (500 ng/well) との Gai3 プラスミド (100 ng/well) を用いたトランスフェクションを実施し、さらに 24 時間培養した。細胞をトリプシン処理により回収し、25°C, 200×g, 3 分間遠心した後上清を捨て、HEPES (5 mM, pH 7.4) を含む HBSS を加えることで細胞を洗浄した。再度同条件で遠心後、HEPES を含む HBSS で細胞を再懸濁した。細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに播種し 30 分間インキュベートした。HEPES および BSA (0.01% w/v, 脂肪酸およびプロテアーゼ非含有) を含む HBSS に希釈した Embelin で細胞を 1 時間処理した。続いて AP 反応液 (10 mM p-ニトロフェニルリン酸, 120 mM Tris-HCl [pH 9.5], 40 mM NaCl, および 10 mM MgCl₂) を細胞プレートに添加した。プレートの吸光度 (405 nm) をマイクロプレートリーダー (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) にて測定した後、

室温で 1 時間インキュベートし、再度吸光度を測定した。リガンド添加により誘導された AP-TGF α の放出量を、吸光度（培養液側）/吸光度（細胞側）の値を用いて算出した。

Gpr84 遺伝子欠損 RAW264.7 細胞作成および炎症誘導実験

RAW264.7 細胞 (ATCC) は、Penicillin-Streptomycin (1% v/v, Gibco) を含む培地で培養した。Gpr84 遺伝子欠損 RAW264.7 細胞 (RAW-KO 細胞) は、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。具体的には Gpr84 を標的とする sgRNA (5'-ttcgtccaagctccgaacc-3') を設計し、pSpCas9(1.1)-2xsgrRNA (80768, Addgene) に対するクローニングを実施した。RAW264.7 細胞を 60 mm dish に 2.5×10^5 細胞/dish で播種し、リポフェクタミン 2000 を用いて、組換え pSpCas9(1.1)-2xsgrRNA および pDonor-tBFP-NLS-Neo (80766, Addgene) を用いたトランスフェクションを実施した。48 時間培養後、G418 (250 μ g/mL, FUJIFILM Wako) を含む培地で培養することで、組換え細胞を選別した。10 日間の培養後、単一細胞から成長したコロニーを分離した。

RAW264.7 および RAW-KO 細胞は、パルミチン酸 (C16:0) の存在下で、カプリン酸 (C10:0) または Embelin (100 μ M) で 12 時間刺激後、細胞を回収し、RNA を抽出した。

中鎖脂肪酸測定

血漿および組織中の中鎖脂肪酸含有量は、下記の方法で測定した。内部標準として C19:0 (Nu-Chek Prep9) を添加したサンプルをメタノールでホモジナイズし、クロロホルムおよび水を加えて脂質を抽出した。これを 17°C, 2000 $\times$ g で 10 分間遠心し、中鎖脂肪酸を含む上清を回収して乾燥させた。サンプルをクロロホルム/メタノール (1:3, v/v) で再懸濁し、超高速液体クロマトグラフィー (ACQUITY UPLC, Waters) および質量分析計 (Xevo TQD MS, Waters) を備えた LC-MS/MS にて解析した。移動相にはギ酸アンモニウム水溶液 (10 mM) およびメタノールを使用し、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1 $\times$ 150 mm, 1.7 μ m, Waters) で分離した。

フローサイトメトリー

肝臓を小片に刻み、消化液 (3 mM CaCl₂, 1 mg/mL コラゲナーゼ I [FUJIFILM Wako], 1.5% BSA を含む HBSS) で 2 時間酵素処理を行った。細胞懸濁液を 70 μ m ナイロンメッシュセルストレーナー (Corning) に通した後、25°C, 50 $\times$ g, 3 分間低速遠心し、上清画分を回収後、残渣の沈殿を肝実質細胞とした。上清画分に対し、25°C, 500 $\times$ g, 8 分間遠心し、得られた細胞沈殿を非肝実質細胞とした。得られた非肝実質細胞を、パーコール密度勾配遠心分離により濃縮した。具体的には非肝実質細胞を 25% Percoll で懸濁し、70% Percoll の上層に注ぎ 25°C, 800 $\times$ g, 15 分間遠心し、中間層を回収した。この中間層を 25°C, 500 $\times$ g, 8 分間遠心し、細胞沈殿を回収後、2% Fetal Calf Serum (FCS) を含む PBS にて再懸濁した。これを再度 25°C, 500 $\times$ g, 8 分間遠心し、得られた非実質肝細胞を FACS バッファー (2% FBS および 2 mM

EDTA を含む PBS) で懸濁した。細胞懸濁液に対し、CD16/CD32 抗体 (BioLegend) で 4°C, 10 分間ブロッキングした。その後フローサイトメトリーによる細胞分離のため、BV510 標識抗 CD45 (BioLegend)、BV711 標識抗 Ly6C (BioLegend)、Alexa Fluor 488 標識抗 F4/80 (BioLegend)、PE 標識抗 CX3CR1 (BioLegend) および APC 標識抗 CD11b (BioLegend) を用い、4°C で 30 分間染色した。染色後、細胞を FACS バッファーで洗浄し、FACSAria III セルソーター (BD Biosciences) と FACSMelody (BD Biosciences) を用いて細胞をソーティングした。ソート後の細胞純度 95% 以上であった。フローサイトメトリーデータは FlowJo v10 software (BD Biosciences) を用いて解析した。

統計解析

結果は全て平均±標準誤差 (SEM) で表し、バイオリンプロットは中央値、四分位数、およびデータ範囲を示すのに用いた。統計解析には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) を使用した。データの正規性は Shapiro-Wilk 検定により評価し、2 群間の有意差は Student's *t*-test または Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析した。3 群間以上の有意差は、1 元配置分散分析 (ANOVA) 後に Dunnett 検定を行うか、Kruskal-Wallis 検定後に Dunn 検定を行うことで比較した。P 値<0.05 の場合、統計学的に有意とした。RNA-Seq データの FDR は Benjamini-Hochberg 法を用いて算出した。

第 3 節：結果

第 1 項：高脂肪食負荷条件における GPR84 の炎症抑制効果

GPR84 が代謝表現型に関与する可能性を検討するため、野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウスに高脂肪食を負荷し、脂質代謝および炎症応答について確認した。初めに、炎症マーカーである $\text{TNF}\alpha$ の血中濃度を測定したところ、通常食負荷条件下では野生型マウスと *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの間に血中 $\text{TNF}\alpha$ 濃度の有意な差は認められなかったものの、高脂肪食負荷条件下では、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、有意に高い血中 $\text{TNF}\alpha$ 濃度を示した (Fig. 1A)。そこで、これらのマウスの代謝関連臓器における *Tnf* 遺伝子の発現解析を実施した。その結果、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは肝臓において有意に高い *Tnf* の発現量を示したが、脂肪組織、筋肉、腸管においては両群間で差は認められなかった (Fig. 1B)。このことから、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおける炎症性サイトカインの高値が肝臓に起因することが示唆された。そこで肝臓の RNA-Seq 解析を実施したところ、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは炎症関連遺伝子の多くが野生型マウスと比較して有意に高値を示した (Fig. 1C)。炎症の進展は線維化を引き起こすことが知られているため、肝臓における線維化マーカーの発現についても評価したところ、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは *Colla*、*Tgfb1*、*Acta2* の発現が有意に高値を示した (Fig. 1D)。一方で、肝臓中の中性脂肪量については両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 1E)。これらの結果から、高脂肪食条件において *Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、脂質貯蓄の増加を伴わずに、肝臓での炎症および線維化が引き起こされることが示唆された。

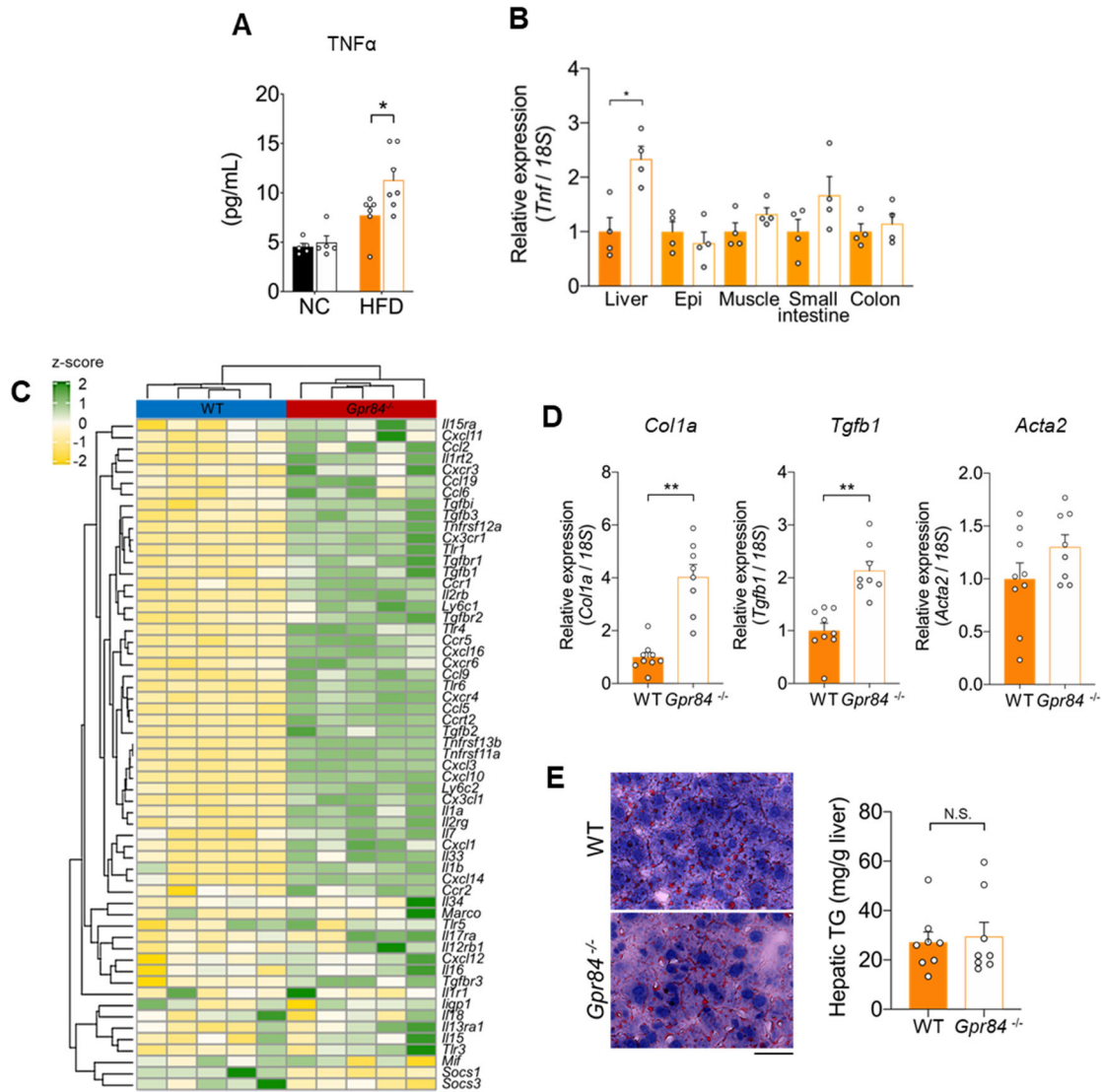


Fig. 1 GPR84 deficiency accelerates HFD-induced chronic inflammation.

(A) Plasma $TNF\alpha$ levels in wild-type (WT) and $Gpr84^{-/-}$ mice ($n = 5-7$). NC, normal chow; HFD, high fat diet (B) Expression of Tnf in mouse tissues ($n = 4$). Data are represented as relative to the gene expression in WT mice. Epi, epididymal white adipose tissue. (C) RNA-Seq transcriptome profiling in liver in WT and $Gpr84^{-/-}$ mice fed the HFD for 5 weeks. Heatmap shows results of 2-dimensional hierarchical clustering of 59 genes related to inflammation ($n = 5$ per group). (D) Expression of fibrosis-related genes in the liver ($n = 8-9$). (E) Oil Red O staining (left) and hepatic TG levels (right, $n = 8$). Scale bars: 25 μm . $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ (Mann-Whitney U test). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第2項：GPR84によるMASH進展抑制効果

第1項において、*Gpr84* 遺伝子の欠損が肝臓の炎症および線維化を引き起こすことが示唆されたため、野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウスを用い、長期間の高脂肪食負荷による MASH 病態の進展を検討した。その結果、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、肝重量が野生型マウスと比較して有意に低値を示したものの (Fig. 2A)、肝臓中の中性脂肪蓄積には両群間で差は認められなかった (Fig. 2B)。一方、炎症および線維化のマーカー遺伝子进行评估したところ、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、炎症マーカー *Tnf* および線維化マーカーである *Colla*、*Tgfb1*、*Acta2* の発現が有意に高値を示した (Fig. 2C)。組織学的解析においても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、F4/80 陽性マクロファージの数が有意に高値を示し、 α -SMA 陽性細胞の蓄積が観察された (Fig. 2D)。そこでマクロファージ関連マーカー *Adgre1*、*Cd68*、*Cd14* の発現量进行评估したところ、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して有意な高値を示し (Fig. 2E)、肝臓へのマクロファージ浸潤の亢進が確認された。MASLD activity score の評価においても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意な高値を示し (Fig. 2F)、典型的な MASH 様病態の進展が認められた。これらの結果から、*Gpr84* 遺伝子の欠損は、脂肪毒性による MASH の進行を促進させることが示唆された。

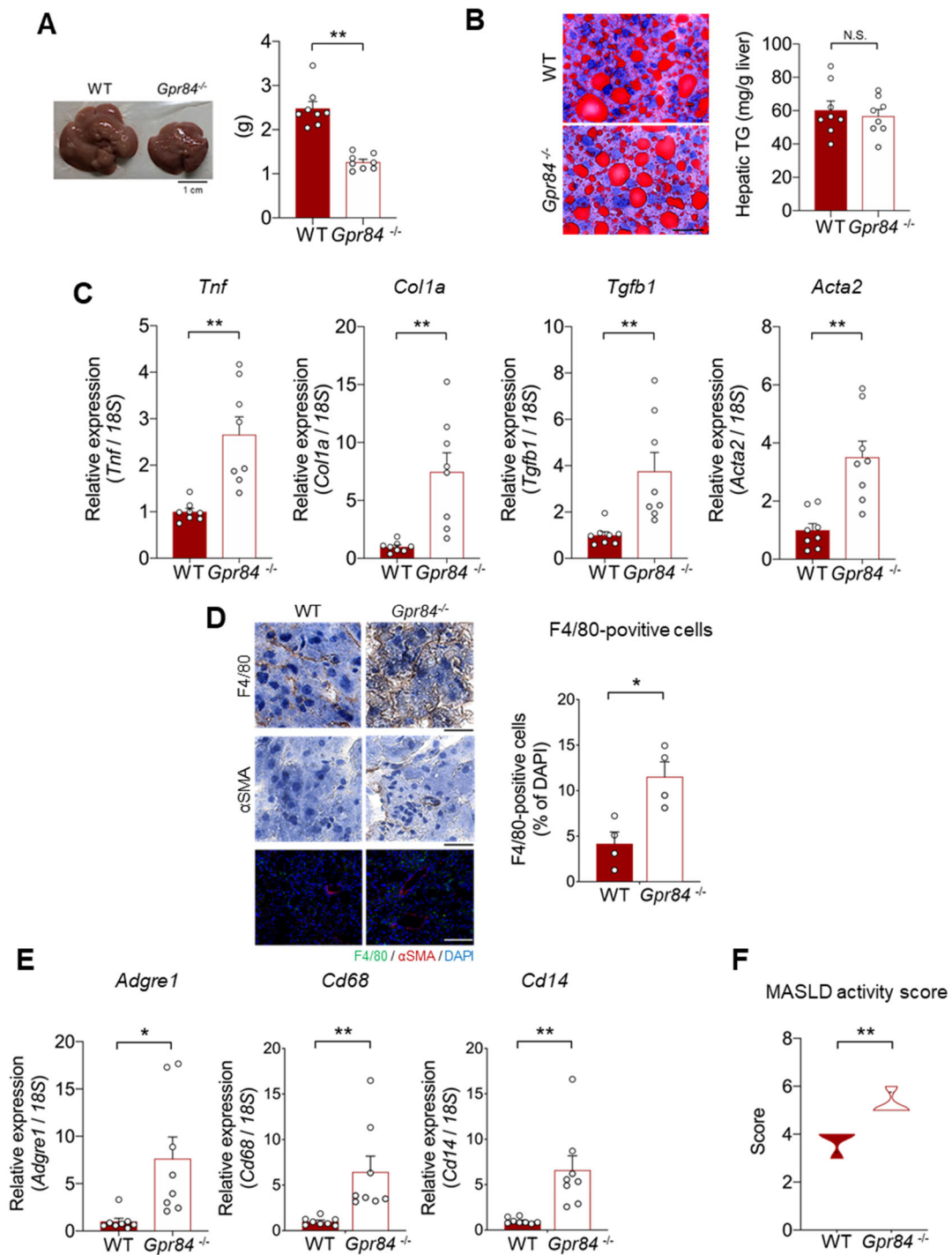


Fig. 2 HFD-fed *Gpr84*^{-/-} mice exhibit MASH.

(A) Liver weight (n = 8). (B) Oil Red O staining (left) and hepatic TG levels (right, n = 8). Scale bars: 25 μ m. (C) Expression of *Tnf* and fibrosis marker genes in liver (n = 8). (D) IHC of F4/80 and α -SMA stained with DAB or fluorescence staining in sections of liver (left, F4/80, green; α -SMA, red; DAPI, blue). F4/80-positive cell numbers (right, n = 4). Scale bars: 25 μ m (DAB staining) or 100 μ m (fluorescence staining). (E) Expression of macrophage marker genes (n = 8). (F) MASLD activity score. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test: A–D; Student's t test: E and F). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第3項：高脂肪食摂取による内因的中鎖脂肪酸産生の確認

これまでの結果から、GPR84 は高脂肪食摂取時特異的に、肝臓の炎症及び線維化を抑制することが示唆された。そこで、高脂肪食負荷条件における GPR84 活性化の機序を解明するため、GPR84 のリガンドである中鎖脂肪酸の量を肝臓内にて測定した。その結果、高脂肪食負荷群では通常食負荷群と比較して、C10:0 および C12:0 の存在量が著しく高値を示すことが確認された (Fig. 3A)。またこの時、肝臓における中鎖脂肪酸合成酵素の発現も高脂肪食負荷条件で有意に高値を示すことが示された (Fig. 3B)。先行研究において中鎖脂肪酸の EC_{50} が $8\mu M$ であると報告されていたため²⁵、次に GPR84 安定発現細胞株を用いてリガンド親和性を評価した。その結果、中鎖脂肪酸添加時に濃度依存的な cAMP 濃度の低下が観察され、中鎖脂肪酸が GPR84 のリガンドとして機能することが確認された (Fig. 3C)。C10:0 および C12:0 の GPR84 に対する EC_{50} は、それぞれ $3.5\mu M$ および $4.4\mu M$ であった。これらの結果から、通常食負荷条件下ではなく、高脂肪食負荷条件下において、肝臓における内因的な中鎖脂肪酸合成が亢進し、GPR84 が活性化されることが示された。

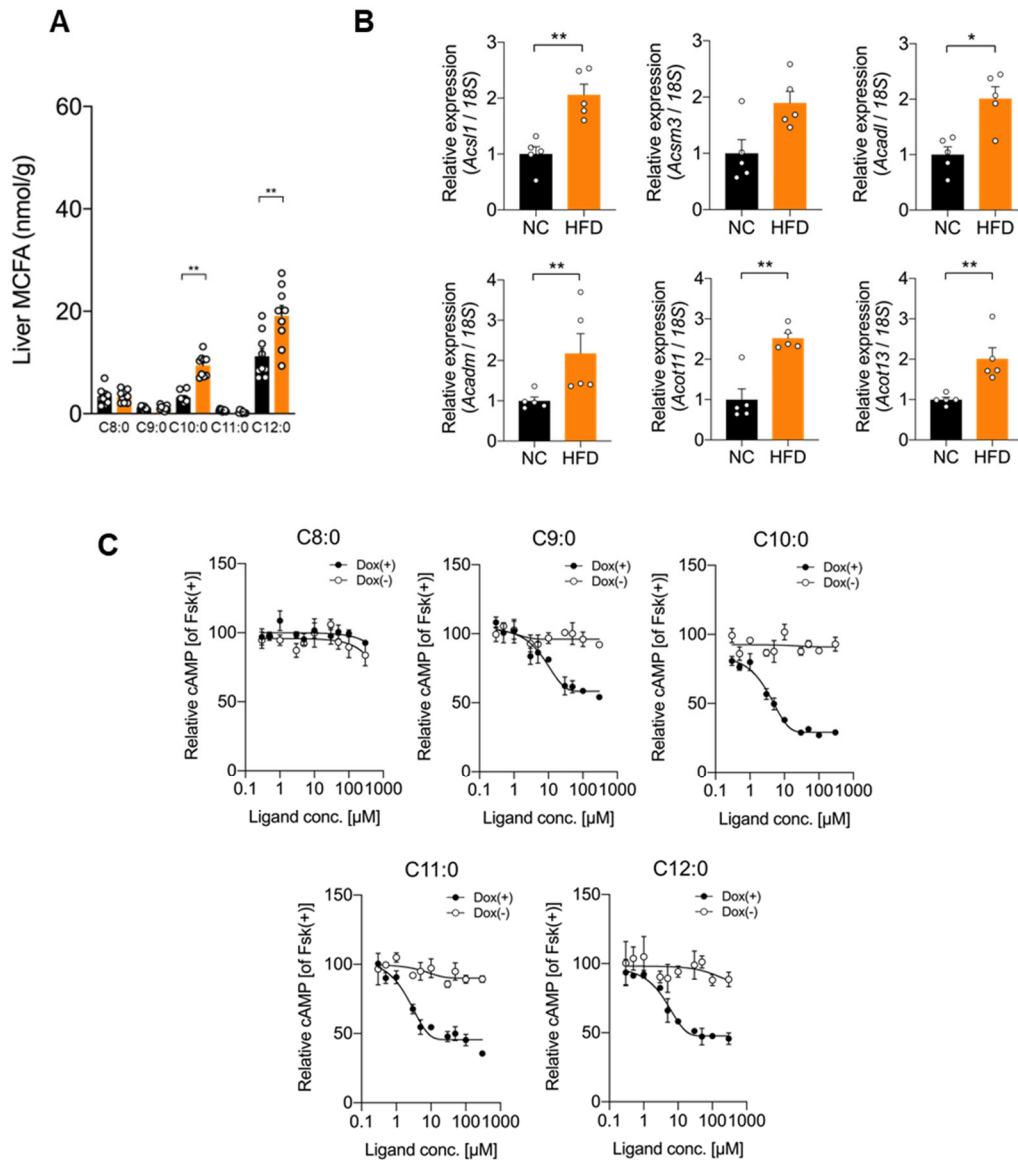


Fig3. Affinity of MCFAs for GPR84.

(A) Measurement of MCFA concentration (n = 6–9). (B) Fatty acid synthesis- and β -oxidation-related genes were determined by real-time quantitative PCR (n = 5). (C) cAMP inhibition assay for C8:0, C9:0, C10:0, C11:0, and C12:0 using mouse-GPR84-expressing HEK293 cells. Cells were cultured with or without 10 μ g/mL of doxycycline (Dox, n = 6). All data are presented as relative to forskolin-induced (Fsk-induced) cAMP levels. * P < 0.05; ** P < 0.01 (Mann-Whitney U test). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第 4 項 : GPR84 による MASH 進展抑制機構の検討

第 3 項までの結果から、高脂肪食負荷条件において内因的に産生される中鎖脂肪酸が GPR84 を活性化し、MASH の進展を抑制することが示唆された。次により詳細な機序解明を目指し、肝臓内で GPR84 が機能する細胞種を同定した。肝臓より分離したマクロファージ、クッパー細胞、肝単核細胞、肝星細胞、および肝実質細胞における *Gpr84* の発現を評価した。その結果、*Gpr84* がマクロファージに主として発現することが明らかとなった (Fig. 4A)。さらに、高脂肪食負荷条件下では通常食負荷条件下と比較して、マクロファージにおける *Gpr84* の発現が著しく上昇することが示され (Fig. 4A)、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが肝臓マクロファージの機能制御に寄与する可能性が示唆された。そこで、肝臓マクロファージの活性化を、炎症マーカーの発現を指標に評価した。その結果、高脂肪食負荷条件下でのみ、*Gpr84* 遺伝子欠損マウス由来肝臓マクロファージにおける *Tnf* 発現が野生型マウスと比較して有意に高値を示した (Fig. 4B)。一方、組織常在性クッパー細胞においては、両群間の *Tnf* 発現に差は認められなかった (Fig. 4B)。この結果より、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、骨髄由来の肝臓マクロファージが活性化した結果、肝臓での炎症反応が惹起されることが示唆された。

次に、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を用い、中鎖脂肪酸の炎症抑制効果と GPR84 を介した分子機序について検証した。野生型 RAW 細胞および *Gpr84* ノックアウト細胞にパルミチン酸添加による刺激を与えた後、GPR84 に高い親和性を持つリガンドである C10:0 を添加した。その結果、野生型 RAW 細胞では C10:0 の濃度依存的に炎症マーカー *Tnf* の発現抑制が観察された一方、*Gpr84* ノックアウト細胞ではこの抑制効果が消失した (Fig. 4C)。これらの結果から、骨髄由来マクロファージが肝臓において、GPR84 を介した抗炎症作用を発揮することで、MASH の進展を抑制するという分子機序が明らかとなった。

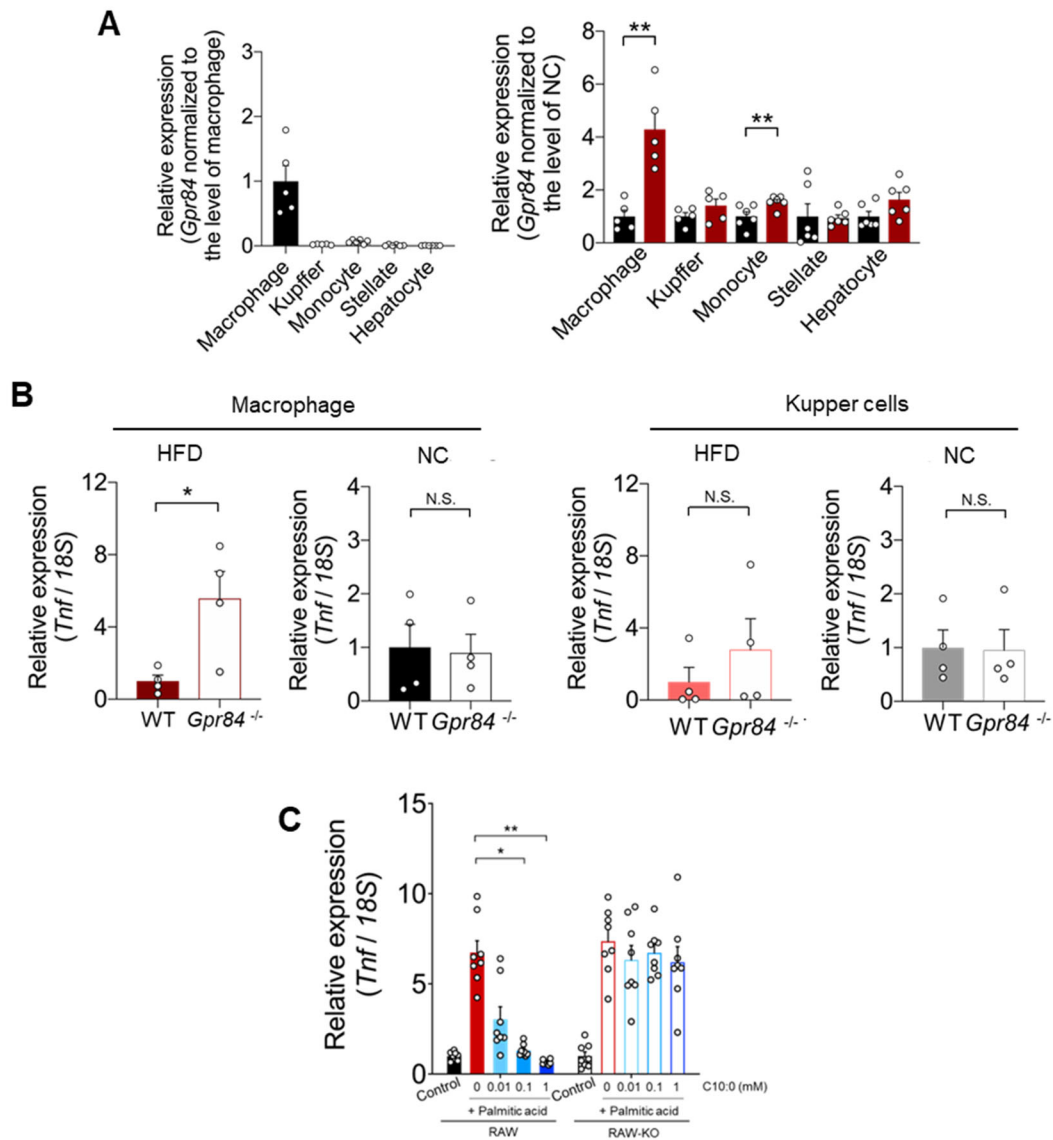


Fig. 4 GPR84 suppresses BM-derived hepatic macrophages.

(A) *Gpr84* expression in BM-derived monocytes, hepatic macrophages, Kupffer cells, hepatic stellate cells, and hepatocytes isolated from WT mice fed NC for 12 weeks (left, $n = 5-6$). Change of *Gpr84* expression after HFD feeding (right; NC- vs. HFD-fed group, $n = 5-6$). (B) *Tnf* expression in BM-derived hepatic macrophage (left) and Kupffer cells (right) from WT and *Gpr84*^{-/-} mice fed the HFD and NC for 12 weeks ($n = 4$). BM-derived hepatic macrophages, CD45+Ly6C+F4/80+CD11bhiCX3CR1+. (C) Antiinflammatory effect of MCFA-stimulated RAW264.7 and RAW-KO pretreated with palmitic acid (C16:0; 200 μ M) and followed by stimulation of capric acid (C10:0, $n = 8$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test: A, B; Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test: C). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第 5 項：MASH マウスモデルにおける中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルの意義解明

第 4 項までの結果から、GPR84 が MASH 進展を抑制する分子機序が明らかとなった。そこで本研究では次に、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食 (CDAHFD 食) を用いて MASH モデルを作成し、GPR84 による MASH 進展抑制効果について検証した。CDAHFD 食を負荷した野生型マウスでは顕著な肝硬変が確認されたが、CDAHFD 食に中鎖脂肪酸 (C10:0 および C12:0) を添加した群では肝硬変の改善が観察された (Fig. 5A)。また、組織学的解析として F4/80 および α -SMA の免疫染色を実施したところ、野生型マウスの C10:0 および C12:0 添加群では、CDAHFD 食単独群と比較して、炎症および線維化の抑制が確認された (Fig. 5B)。一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、C10:0 および C12:0 の添加による炎症および線維化抑制効果は認められなかった (Fig. 5B)。さらに、肝臓における炎症および線維化マーカーの発現を解析したところ、野生型マウスでは C10:0 および C12:0 の添加により発現が有意に低値を示した一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではその抑制効果が確認されなかった (Fig. 5C)。肝臓の中性脂肪量は、野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウスのいずれにおいても、中鎖脂肪酸添加の有無に関わらず有意差は認められなかった (Fig. 5D)。最後に肝臓の MASLD activity score を評価した結果、野生型マウスの C10:0 および C12:0 添加群ではスコアの有意な低値が認められ、MASH 病態の改善が示された一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこの改善効果は認められなかった (Fig. 5E)。これらの結果から、CDAHFD 食誘導性 MASH モデルにおいても、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが MASH の進展を抑制することが示された。

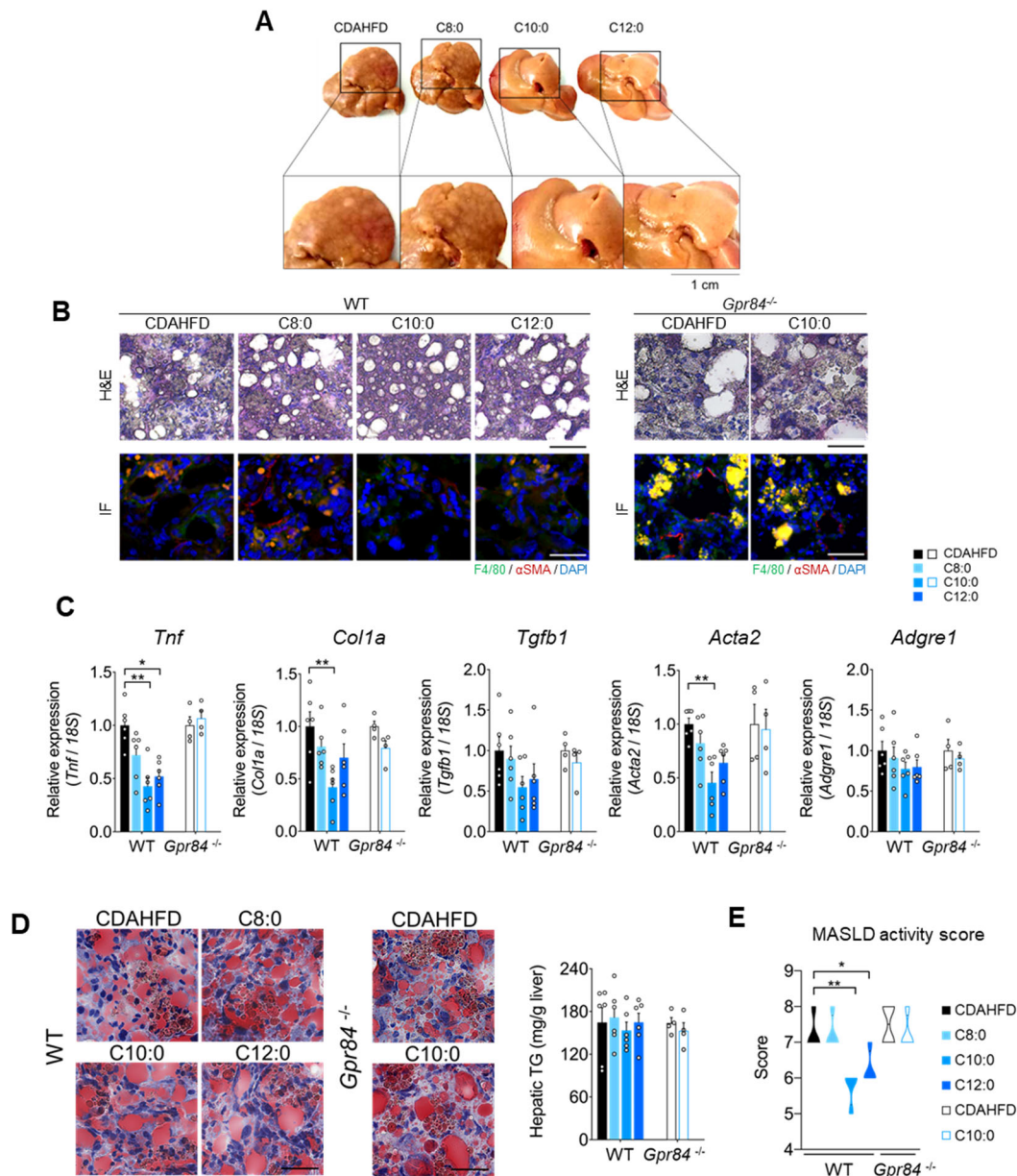


Fig. 5 MCFA intake improves MASH progression via GPR84.

(A) Anatomy of the liver in WT after CDAHFD and MCFA-supplemented (C8:0, C10:0, and C12:0) CDAHFD feeding for 10 weeks (n = 8). (B) Representative H&E staining images, and IHC of F4/80 (green), α -SMA (red), and DAPI (blue) performed in sections of the liver (left; WT, right; *Gpr84*^{-/-}). Scale bars: 50 μ m. (C) Expression of inflammation- and fibrosis-related genes in the liver (n = 4–6). (D) Oil Red O staining (left) and hepatic TG levels (right, n = 4–6). Scale bars: 50 μ m. (E) MASLD activity score after MCFA-supplemented (C8:0, C10:0, and C12:0) CDAHFD feeding for 10 weeks. * P < 0.05; ** P < 0.01 (Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test: C; ANOVA with Dunnett's test: E). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第 6 項 : GPR84 アゴニストによる MASH 改善効果

第 5 項までの結果から、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが肝臓におけるマクロファージの過活性化を抑制し、その結果として MASH の進展を抑制することが明らかになった。そこで本研究では最後に、GPR84 が MASH 治療の創薬標的として機能し得るかを検討した。まず、GPR84 のアゴニストとして報告されている Embelin³¹ を用い、GPR84 安定発現細胞株および GPR84 一過性発現細胞株を用いてリガンド親和性を評価した。その結果、Embelin が GPR84 を活性化することが確認された (Fig. 6A)。そこで第 4 項と同様の手法を用い、RAW264.7 細胞を用いた炎症誘導実験を実施した。野生型 RAW 細胞および *Gpr84* ノックアウト細胞にパルミチン酸添加による刺激を与えた後、Embelin を添加した結果、野生型 RAW 細胞では Embelin 濃度依存的に炎症マーカー *Tnf* の発現抑制が観察された。一方、*Gpr84* ノックアウト細胞ではこの炎症抑制効果が消失し、Embelin が GPR84 を介した抗炎症作用を持つことが *in vitro* で示唆された (Fig. 6B)。

次に、CDAHFD 食誘導 MASH マウスモデルにおける Embelin の効果を検討した。CDAHFD 食の負荷に加えて Embelin を投与した野生型マウスでは、CDAHFD 食単独負荷群と比較して、肝臓における炎症および線維化マーカーが有意に低値を示した。一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこの効果が完全に消失した (Fig. 6C)。MASLD activity score おいても、野生型マウスの Embelin 投与群ではスコアの有意な低値が認められ、MASH 病態の改善が示された一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこの改善効果は認められなかった (Fig. 6D)。これらの結果から、CDAHFD 食誘導性 MASH モデルにおいても、Embelin が GPR84 のアゴニストとして、MASH の進展を抑制することが示された。

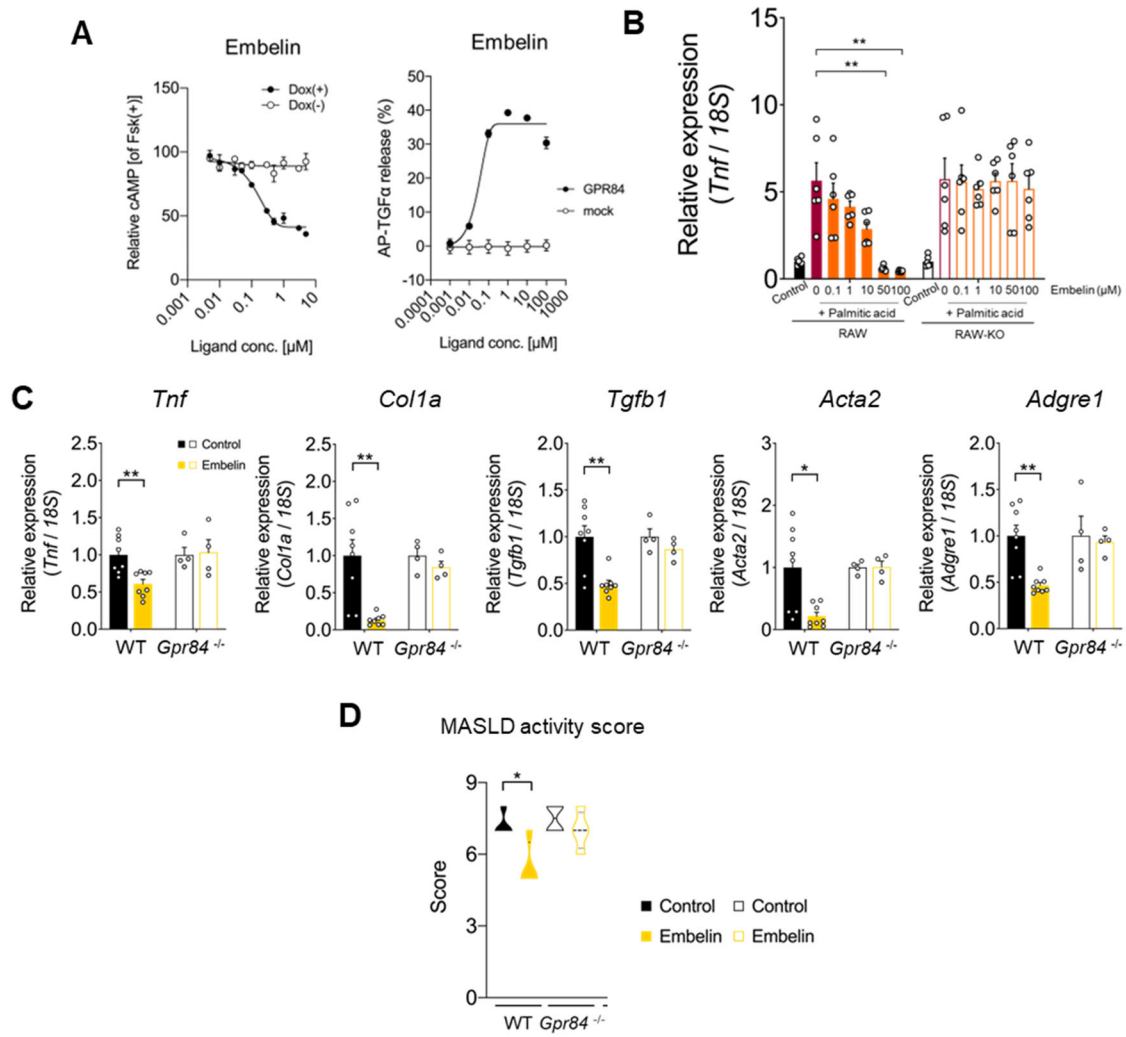


Fig. 6 GPR84 activation improves MASH.

(A) Ligand affinity of embelin for GPR84 using Tet-On/Off and TGF α shedding assay (n= 6). AP-TGF α , alkaline phosphatase-tagged TGF α . (B) Antiinflammatory effect of embelin-stimulated RAW264.7 and RAW-KO cells pretreated with C16:0 (200 μ M) and followed by stimulation of embelin (n = 6). (C) Expression of inflammation- and fibrosis-related genes in the liver (n = 4–8). (D) MASLD activity score after administration of the GPR84 agonist embelin. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test: B; Mann-Whitney U test: C, D). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第4節：考察

従来、中鎖脂肪酸の抗炎症効果が報告されていたが、その詳細な作用機序については不明な点が多い。本研究では、中鎖脂肪酸の細胞膜受容体である GPR84 に着目し、その代謝改善効果および炎症応答における役割を明らかにするため、食事誘導性肥満モデルを用いた *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの表現型解析を実施した。*Gpr84* 欠損マウスでは、高脂肪食負荷条件において肝臓の炎症が亢進し、MASH の進展が確認された。この結果は、GPR84 が高脂肪食摂取に伴う肝臓への脂肪酸流入を感知し、抗炎症作用を介して MASH 進展を抑制する可能性を示唆する。そこで本研究では、GPR84 による脂肪酸認識機構を確認するとともに、抗炎症作用の詳細な作用機序を検討した。

GPR84 による脂肪酸認識機構として、高脂肪食負荷条件下において肝臓内で長鎖脂肪酸とともに中鎖脂肪酸の産生が亢進し、GPR84 が生理的に活性化されることを明らかにした。また、肝臓マクロファージにおける *Tnf* 発現が高脂肪食負荷条件下の *Gpr84* 遺伝子欠損マウスで高値を示し、RAW264.7 細胞において中鎖脂肪酸が GPR84 を介して抗炎症効果を示したことから、抗炎症作用の詳細な作用機序として、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが肝臓マクロファージの過活性化を抑制することが確認された。超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食による MASH モデルでの実験では、C8:0 が MASH 改善効果を示さなかった一方で、GPR84 のリガンドである C10:0、C12:0、および Embelin が MASH を改善し、その効果は *Gpr84* 遺伝子欠損マウスで消失した。このことから、病態モデルにおいても GPR84 が MASH の進展を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、GPR84 は高脂肪食摂取時の脂肪毒性を感知する炎症メディエーターとして機能し、脂肪毒性による肝臓の炎症および線維化を抑制すると考えられる。

本研究において示されたマクロファージにおける GPR84 の機能は、GPR84 を介した抗炎症作用機序の重要な基盤を提供する。一方、当研究室の先行研究では、中鎖脂肪酸の単回投与が GPR84 を介して GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) 分泌を促進することを報告している³¹。GLP-1 はマクロファージによる炎症反応および線維化を抑制し、MASH の進展を防ぐ機能を持つ³³⁻³⁵。このことから、高脂肪食負荷条件においても GPR84 を介した GLP-1 分泌亢進が、MASH の進展抑制に寄与する可能性が考えられる。GPR84 を介した MASH 進展抑制効果について更なる知見を得るためには、組織特異的 *Gpr84* 遺伝子欠損マウスを用いた研究が不可欠であると考ええる。

これまでの研究において、中鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT; Medium Chain Triglyceride) が抗炎症作用を持つことが報告されており³⁶⁻³⁸、本研究では中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルがこの作用機序の一端を担う可能性を示した。一方で、GPR84 は一部の研究において炎症促進受容体としても報告されており³⁹⁻⁴¹、炎症における GPR84 の機能には相反する知見が存在する。しかしながらこれらの研究では、中鎖脂肪酸ではなく合成アゴニストを用いた検討が中心であり、GPR84 の生理的機能については不明であった。さらに合成アゴニストを用いた検討では、異なるアゴニストが誘導する下流シグナルの違いが、炎症

応答への影響に寄与する可能性がある。例えば GPR84 阻害剤である PBI-4050 は特発性肺線維症の第II相臨床試験において有用性が報告されたものの⁴²、この化合物は GPR84 だけでなく GPR40 も活性化する他、LKB1/AMPK/mTOR 経路にも関与している。また、GPR84 阻害剤 GLPG1205 は潰瘍性大腸炎および突発性肺線維症という二つの炎症性疾患に対する効果が報告されたものの⁴³、第 II 相臨床試験では有効性が示されず、炎症性疾患の治療標的としての利用は進展していない^{39, 44}。そこで本研究では GPR84 の炎症応答への寄与を、中鎖脂肪酸という生理的リガンドに着目して検討し、最後に Embelin による MASH 抑制効果を報告した。これらの知見を基に、GPR84 を単なる炎症促進受容体ではなく、生体環境を認識して応答する免疫調節受容体として再評価したいと考える。

最後に、創薬標的としての GPR84 の可能性について考察する。本研究では、高脂肪食負荷により肝臓内の中鎖脂肪酸濃度が上昇する一方で、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食誘導 MASH モデルでは中鎖脂肪酸濃度が上昇しないことを見出した。この結果に一致して、高脂肪食を摂取した *Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、肝臓の炎症と線維化が野生型マウスと比較して増加し、MASH の進展が見られた一方で、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量食では両群間で炎症や線維化マーカー、MASLD activity score に有意差は認められなかった。これらの結果から、中鎖脂肪酸が上昇する生体環境においてのみ、中鎖脂肪酸-GPR84 経路の抗炎症作用が発揮されることが示唆された。今後、MCT 摂取や GPR84 アゴニストの投与が、MASH および肝硬変進行を抑制する可能性について、更なる研究が期待される。

第3章：GPR84 を介した糖・脂質代謝制御機構の解明

第1節：序論

近年、肥満および糖尿病が世界的な課題として注目されている。肥満の有病率は急激に増加しており、1975 年から 2016 年にかけて肥満を呈する成人の数は 6 倍に増加し、2030 年には 15 億人に達すると予測されている⁴⁵。加えて肥満は脂肪蓄積および慢性炎症を介してインスリン抵抗性を引き起こすことから、2 型糖尿病の主要な要因となる⁴⁶。これらの代謝性疾患は、心血管疾患や代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（MASLD）を含む多くの合併症を誘発することから、肥満や糖尿病に対する新たな予防法および治療法の開発が急務とされる。

このような背景のなか、食事中の油脂の質への関心が高まっており、なかでも多価不飽和脂肪酸や中鎖脂肪酸が注目を集めている。オメガ 3 多価不飽和脂肪酸の代表成分であるエイコサペンタエン酸（EPA）およびドコサヘキサエン酸（DHA）は、脂肪酸酸化を促進し、慢性炎症を抑制することで、代謝性疾患のリスクを低減することが報告されている^{47,48}。また、当研究室の先行研究では、オメガ 6 多価不飽和脂肪酸であるリノール酸由来の腸内細菌代謝物 HYA が GPR40 および GPR120 を介して糖・脂質代謝や炎症を改善する作用を持つことが示されている⁴⁹。

中鎖脂肪酸もまた、様々な介入試験および動物試験において、抗肥満効果や糖および脂質代謝の改善に寄与することが報告されており⁵⁰、中鎖脂肪酸受容体である GPR84 がこれら代謝改善効果を媒介する可能性が示唆される。さらに本研究の第2章では、高脂肪食条件において肝臓での中鎖脂肪酸合成が増加し、内因性の中鎖脂肪酸が GPR84 を介して MASH 進展を抑制することが示された。そこで第3章では、肝臓で作られた中鎖脂肪酸が血流を通じて末梢組織に到達し、GPR84 を介して機能を発揮する可能性に着目した。特に当研究室の先行研究では、GPR84 が即時的な GLP-1 分泌の制御に関与することが示されており³¹、高脂肪食条件下において GPR84 が糖および脂質代謝を制御する可能性が示唆される。従って本研究では、特に糖・脂質代謝における GPR84 の役割を明らかにすることを目的とした。

第2節：方法

動物試験

動物飼育条件、遺伝子欠損マウスの作出および高脂肪食負荷試験は、第2章に記載の方法で実施した。中鎖脂肪酸食負荷試験では、4週齢の雄マウスに以下に示される MCT (MCT; Medium Chain Triglyceride) 食を12週間与えた。本食餌はラードまたは中鎖脂肪酸油 (TriC10; decanoic acid triglyceride; tricaprins, TCI) を用いて調製した。試験期間中は毎週、体重および摂食量を測定し、摂食量は1日平均摂取量として示した。筋肉サンプルについては大腿骨のヒラメ筋を採取した。

MCT 食組成

Ingredient	Control	MCT
	Lard	TriC10
gm(%)		
Casein	20.000	20.000
Cystine	0.300	0.300
β-Corn Starch	26.746	26.746
α-Corn Starch	13.200	13.200
Sucrose	10.000	10.000
Cellulose Powder	5.000	5.000
Soybean Oil	2.000	2.000
Lard	18.000	-
TriC10	-	18.000
AIN-93G Mineral Mix	3.500	3.500
AIN-93 Vitamin Mix	1.000	1.000
Choline Bitartrate	0.250	0.250
tert-Butylhydroquinone	0.004	0.004
Total	100.000	100.000

経口糖負荷試験 (OGTT; oral glucose tolerance test) およびインスリン負荷試験 (ITT; insulin tolerance test)

耐糖能を評価するため、マウスに対し16時間絶食を実施した後、グルコース (2 g/kg body weight) を胃内投与した。血糖値は投与前および投与後15分、30分、60分、90分、120分に測定した。インスリン負荷試験では、マウスに対し3時間絶食を実施した後、インスリン (0.75 mU/g body weight, Sigma-Aldrich) を腹腔内投与した。血糖値は投与前および投与後15分、30分、60分、90分、120分に測定した。

血液生化学解析

マウスの血中遊離脂肪酸濃度 (NEFA; Non-esterified Fatty Acid) および総コレステロール濃度は LabAssay™ NEFA (FUJIFILM Wako) および LabAssay™ Cholesterol (FUJIFILM Wako) を用い、製造元のプロトコルに従って測定した。血糖値は OneTouch® Ultra® を用いて測定した。血中インスリンは LBIS™ Mouse Insulin ELISA Kit (FUJIFILM Wako) を用いて、血中コレシストキニン (CCK; cholecystokinin) は Cholecystokinin EIA Kit (Merck Millipore) を用いて、血中グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP; glucose dependent

insulinotropic polypeptide) は Rat/Mouse GIP (total) ELISA (Merck Millipore) を用いて、また血中グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1; glucagon-like peptide-1) は Glucagon Like Peptide-1 (Active) ELISA (Merck Millipore) を用いて測定した。血中 GLP-1 の分解を防ぐため、解剖時には血液サンプルに DPP IV Inhibitor (Merck Millipore) を添加した。

脂肪酸測定

血漿中の脂肪酸含有量は、下記の方法で測定した。内部標準として C17:1 (Nu-Chek Prep) を添加したサンプルをメタノールでホモジナイズし、クロロホルムおよび 0.5 M 塩化カリウムを加えて脂質を抽出した。これを 17°C, 500×g で 10 分間遠心し、脂肪酸を含む下清を回収して乾燥させた。サンプルをクロロホルム/メタノール (1:3, v/v) で再懸濁し、超高速液体クロマトグラフィー (ACQUITY UPLC, Waters) および質量分析計 (Xevo TQD MS, Waters) を備えた LC-MS/MS にて解析した。LC-MS/MS 条件は第 2 章と同一とした。

RNA 抽出、逆転写および定量リアルタイム PCR

組織からの RNA 抽出、逆転写、定量リアルタイム PCR は、第 2 章に記載の方法で実施した。使用プライマーを以下に示す。

qRT-PCR プライマー条件

	forward			reverse		
<i>18s</i>	5'-	CTTAGAGGGACAAGTGCGC	-3'	5'-	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA	-3'
<i>Tnf</i>	5'-	GGCAGGTCTACTTTGGAGTC	-3'	5'-	TCGAGGCTCCAGTGAATTCG	-3'
<i>Adgre1</i>	5'-	GATGTGGAGGATGGGAGATG	-3'	5'-	ACAGCAGGAAGGTGGCTATG	-3'
<i>Pnpla2</i>	5'-	CGCAATCTCTACCGCCTCTC	-3'	5'-	ATCCTCCTCTCCAGCCCTCT	-3'
<i>Adrb3</i>	5'-	GGCCCTCTCTAGTTCCCAG	-3'	5'-	TAGCCATCAAACCTGTTGAGC	-3'
<i>Acaca</i>	5'-	CTTCCTGACAAACGAGTCTGG	-3'	5'-	CTGCCGAAACATCTCTGGGA	-3'
<i>Srebf1</i>	5'-	GGAGCCATGGATTGCACATT	-3'	5'-	GGCCCGGGAAGTCACTGT	-3'
<i>Pparg</i>	5'-	TCAGCTCTGTGGACCTCTCC	-3'	5'-	ACCCCTTGCATCCTTCACAAG	-3'

RNA-Seq 解析

高脂肪食を与えたマウスの脂肪組織から、RNAiso Plus および RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出した。RNA の品質および濃度は、Agilent 2100 Bioanalyzer と RNA 6000 Nano kit を使用して測定した。cDNA ライブラリーは NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit (Illumina) および NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) で作成し、NovaSeq 6000 を用いたペアエンドシーケンスを実施し、各サンプルから約 4 Gb の 150 bp ペアエンドリードを得た。得られたリードに対し、Trimmomatic を用いてアダプター配列や低品質のリードを除去した。除去後のシーケンスデータの品質は FastQC で評価した。シーケンスデータについて、STAR を使用してマウスゲノム (NCBI GRCm39) を参照し、遺伝子発現量の定量をした。得られた発現量に対し、RSEM (バージョン 1.3.3) および edgeR を用いることで、群間の変動倍率 (fold change) を求め、発現変動遺伝子 (DEGs) を算出した。

DEGs の算出は以下の 2 つの基準を満たすものとした: FDR 補正済み P 値 < 0.05 (Benjamini-Hochberg) および $|\log_2(\text{fold change})| > 0.5$ 。DEGs に対するエンリッチメント解析は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベース (<http://www.genome.jp/kegg/>) を用いて実施した。RNA-Seq データは Dryad リポジトリに公開している (<https://doi.org/10.5061/dryad.c866t1gg4>)。

組織学的解析

凍結切片に用いる精巣上体脂肪組織は、凍結ミクロトームを用いて 12 μm にて切片化した。組織形態を観察する際には HE 染色を行い、免疫細胞の可視化には蛍光免疫染色を用いた。一次抗体には F4/80 抗体 (1:1000) および α -SMA 抗体 (1:300) を用い、二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor™ Plus 488 (1:200) および Alexa Fluor™ 568 (1:200) を用いた。核は DAPI で染色し、組織観察には BZ-X710 を用いた。各染色は、第 2 章に記載の方法で実施した。

統計解析

結果は全て平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で表した。統計解析には GraphPad Prism を使用した。データの正規性は Shapiro-Wilk 検定により評価し、2 群間の有意差は Student's *t*-test または Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析した。3 群間以上の有意差は、Tukey-Kramer 検定を用いた。多重比較検定には Bonferroni 補正を用いた 2 元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。P 値 < 0.05 の場合、統計学的に有意とした。RNA-Seq データの FDR は Benjamini-Hochberg 法を用いて算出した。

第3節：結果

第1項：GPR84がエネルギー代謝に及ぼす影響の検討

先行研究により、中鎖脂肪酸が GPR84 を介して糖代謝を改善することが報告された³¹。そこで本研究では初めに、野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウスに対し、5 週間の高脂肪食負荷試験を実施し、内因性中鎖脂肪酸の濃度上昇を誘導した。その結果、高脂肪食負荷群では通常食負荷群と比較して、血中中鎖脂肪酸濃度が有意に上昇した (Fig. 1A)。野生型マウスと *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの間には、血中中鎖脂肪酸濃度に差は認められなかった (Fig. 1A)。一方、長鎖脂肪酸の測定では、C16:0、C18:1、C18:2 について、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスで高値を示す傾向が認められた (Fig. 1A)。次に、高脂肪食負荷に伴う野生型マウスと *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの体重変化を評価したところ、通常食負荷条件においては両群間で体重差は認められなかったが、高脂肪食負荷条件においては、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスの体重が野生型マウスと比較して有意に低値を示した (Fig. 1B)。この体重差がどの臓器に起因するかを確認した結果、高脂肪食負荷条件において *Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、脂肪組織重量が有意に低値を示すことが明らかとなった (Fig. 1C)。一方、肝重量、脾臓重量、盲腸重量、筋重量に関しては、両群間で有意差は認められなかった (Fig. 1D)。摂餌量についても野生型マウスと *Gpr84* 遺伝子欠損マウス間で有意差は見られなかった (Fig. 1E)。これらの結果から、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと同等の摂取カロリーにもかかわらず、顕著な肥満抵抗性を示し、その主因として脂肪組織重量の減少が示唆された。

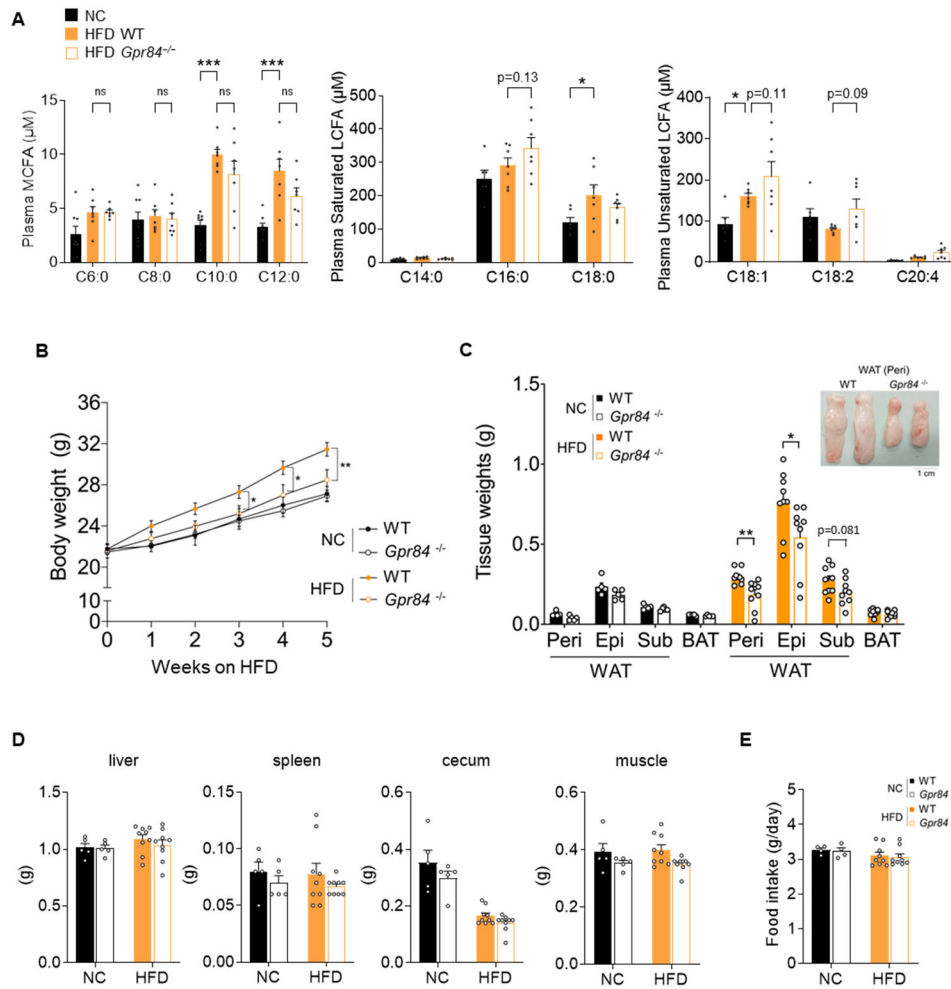


Fig. 1 *Gpr84*^{-/-} mice show reduced weight gain under HFD feeding.

(A) Plasma MCFA and LCFA concentration in WT and *Gpr84*^{-/-} mice fed with NC or HFD for 5 weeks (n = 7–8). (B) Body weight changes and (C) adipose tissue weight in WT and *Gpr84*^{-/-} mice after 5 weeks fed with NC or HFD (n = 5–8). Epi, epididymal adipose tissues; Peri, perirenal adipose tissues; Sub, subcutaneous adipose tissues; WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue. (D) Tissue weight (n = 5–8). (E) Food intake (n = 4–9). ****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05 (Tukey–Kramer test: A; Mann-Whitney *U* test: C, D, E; two-way ANOVA with the Bonferroni: B.) All data are presented as the mean ± SEM.

第2項：糖・脂質代謝関連ホルモンの測定と耐糖能試験

第1項の結果より、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは高脂肪食負荷条件において肥満抵抗性を示し、血中長鎖脂肪酸濃度が高値を示す傾向が認められた。そこで糖および脂質代謝に関する詳細なパラメータを測定し、体内の代謝変動を解析した。その結果、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは高脂肪食負荷条件において、血糖値、総コレステロール、遊離脂肪酸が有意に高値を示した (Fig. 2A, B, D)。一方で、血中中性脂肪値に有意差は認められなかった (Fig. 2C)。また、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスが糖および脂質代謝異常を示すことから、血中インスリン濃度を測定した結果、高脂肪食負荷条件下で有意に低値を示した (Fig. 2E)。さらに、インスリン分泌を促進する腸管ホルモンである GLP-1 についても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは有意に低値を示した (Fig. 2F)。一方、CCK および GIP の血中濃度には、野生型マウスとの間で有意差は認められなかった (Fig. 2G, H)。

高脂肪食負荷条件下での、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおける血中インスリン濃度の低値を受け、耐糖能試験として経口糖負荷試験 (OGTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を実施した。その結果 OGTT において、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、グルコース負荷後の血糖値が有意な高値を示した (Fig. 2I)。ITT においても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスはインスリン投与後に、血糖値が有意な高値を示した (Fig. 2J)。これらの結果から、高脂肪食負荷条件における *Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、インスリン分泌の低下およびインスリン抵抗性の増大により、耐糖能が著しく悪化することが示された。

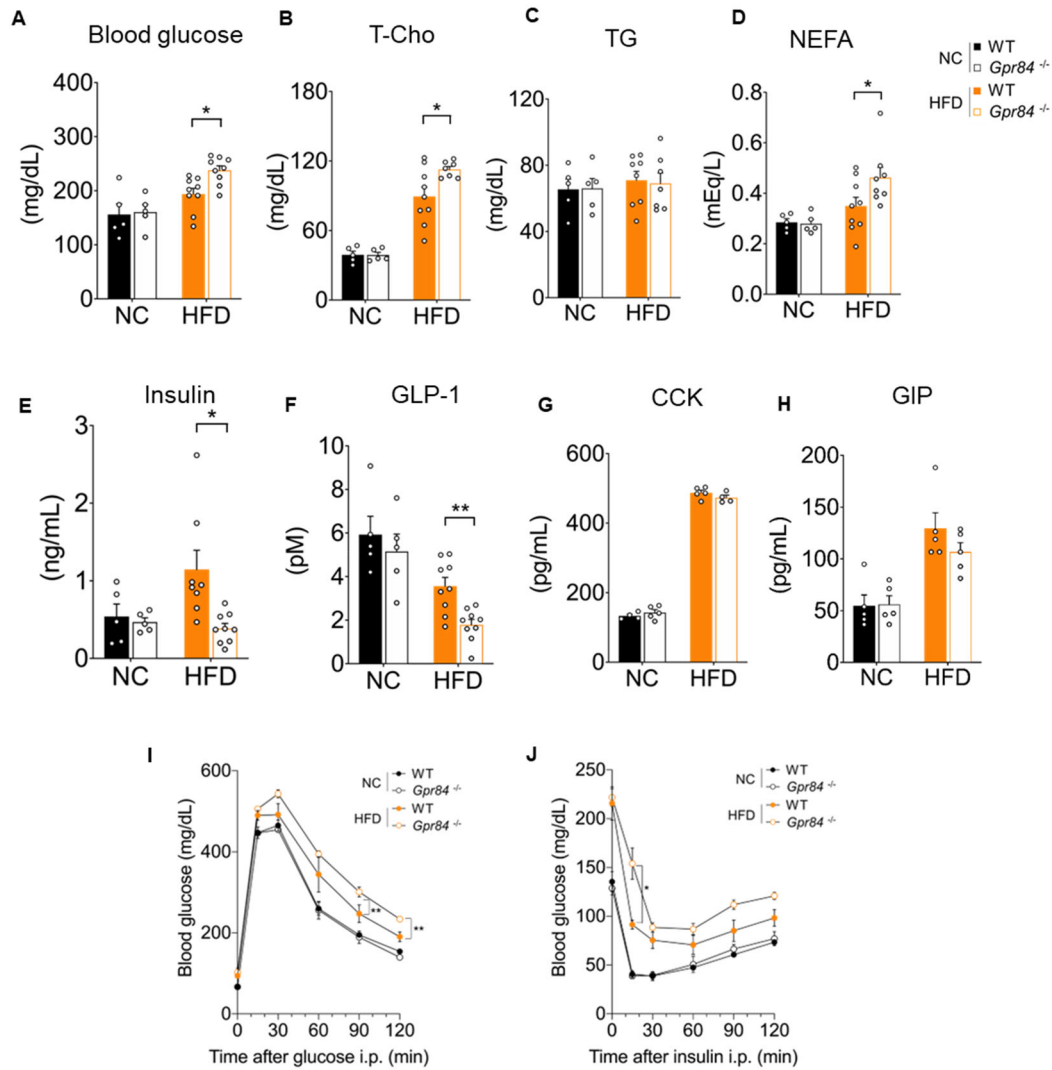


Fig. 2 *Gpr84*^{-/-} mice show dysfunction of glucose homeostasis under HFD feeding.

(A) Blood glucose, (B) plasma total cholesterol (T-Cho), (C) plasma triglycerides (TGs), and (D) plasma non-esterified fatty acids (NEFAs) (n = 5–9). (E) Plasma insulin levels, and (F) Plasma GLP-1 levels in WT and *Gpr84*^{-/-} mice following NC or HFD feeding for 5 weeks (n = 5–9). (G) Plasma CCK levels and (H) Plasma GIP levels in WT and *Gpr84*^{-/-} mice following NC or HFD feeding for 5 weeks (n = 4–5). (I) Oral glucose tolerance test (OGTT) and (J) insulin tolerance test (ITT) (n = 5–6). ***p* < 0.01; **p* < 0.05 (Mann-Whitney *U* test: A, E, H; Student's *t* test: B–D, F, G; two-way ANOVA with the Bonferroni: I, J.) All data are presented as the means ± SEM.

第3項：糖尿病モデルを用いた GPR84 欠損時の糖・脂質代謝表現型の検討

高脂肪食の長期摂取により、肥満および2型糖尿病の症状が誘導されることが報告されている¹⁹。そこで本研究では、12週間にわたる長期高脂肪食負荷試験を実施し、野生型マウスと *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの表現型を比較した。初めに、血中中鎖脂肪酸濃度を測定した結果、5週間負荷条件下と同様に、高脂肪食摂取により血中中鎖脂肪酸濃度が有意に上昇することが確認された (Fig. 3A)。また、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、血中の飽和および不飽和長鎖脂肪酸濃度が有意に高値を示し、5週間負荷条件にて認められた傾向が長期負荷において顕著となった (Fig. 1A, 3A)。さらに *Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、長期高脂肪食負荷条件において体重増加が抑制され、脂肪組織重量が有意に低値を示した (Fig. 3B, C)。また、長期高脂肪食負荷条件下では肝臓重量についても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスで有意な低値が確認された (Fig. 3D)。一方、脾臓、盲腸、筋重量に関しては、両群間に有意差は認められず (Fig. 3D)、摂餌量も同等であった (Fig. 3E)。加えて、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して有意に高い血糖値および有意に低いインスリン値を示した (Fig. 3F, G)。腸管ホルモンである GLP-1 についても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは有意に低値を示した (Fig. 3H)。以上の結果から、長期高脂肪食負荷による2型糖尿病モデルにおいても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは顕著な肥満抵抗性および脂肪組織重量の低下を示す一方で、糖および脂質代謝に異常をきたすことが示された。

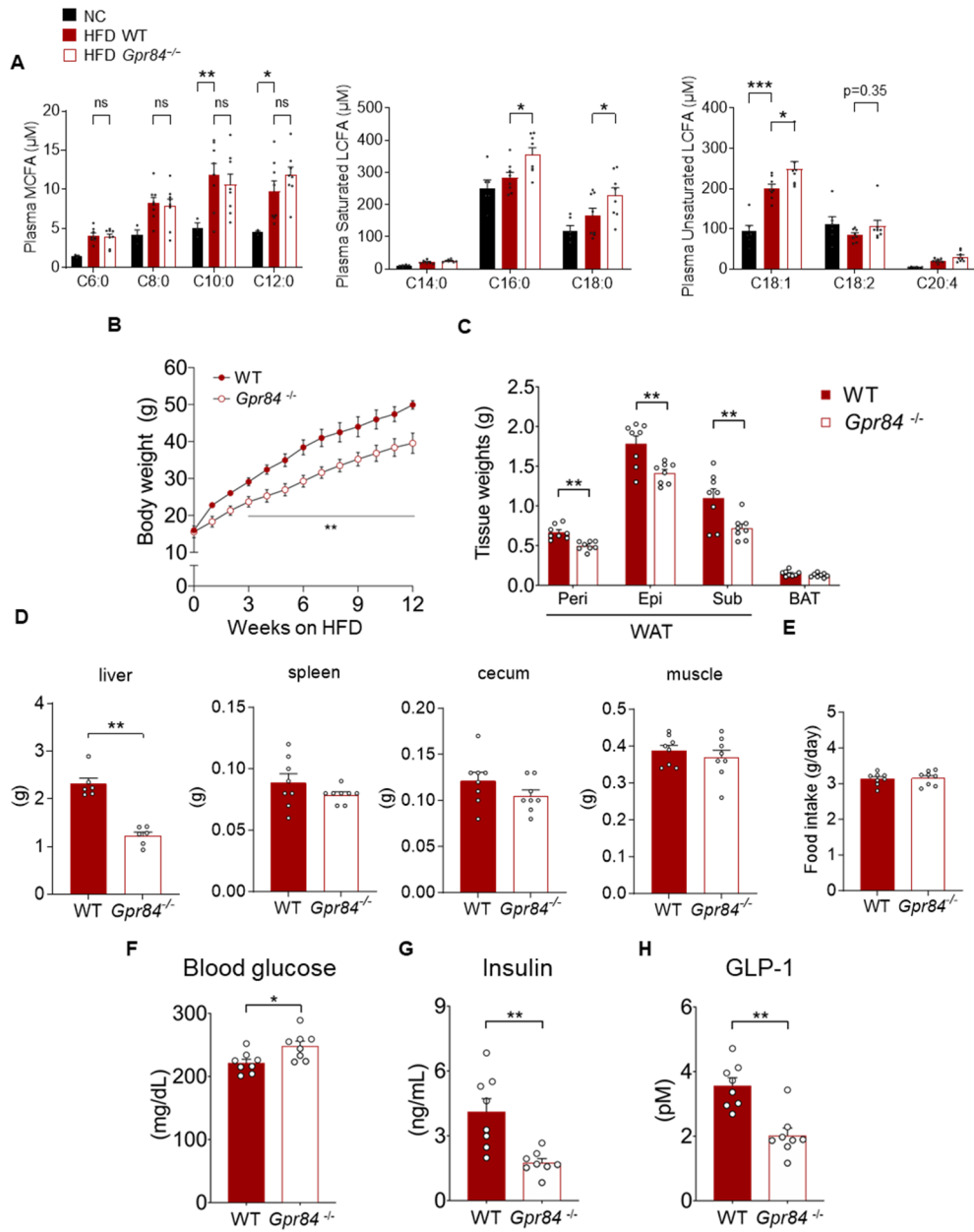


Fig. 3 *Gpr84*^{-/-} mice show severe dysfunction of glucose homeostasis under long-term HFD feeding.

(A) Plasma MCFA and LCFA concentration in WT mice fed HFD for 12 weeks ($n = 3-8$). (B) Body weight changes and (C) adipose tissue weight in WT and *Gpr84*^{-/-} mice during HFD feeding ($n = 7-8$). Epi, epididymal; Peri, perirenal; Sub, subcutaneous; BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue. (D) Tissue weight ($n = 6-8$), (E) Food intake ($n = 8$), and (F) Blood glucose level ($n = 8$). (G) Plasma insulin and (H) plasma GLP-1 levels ($n = 8$). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test: A; two-way ANOVA with the Bonferroni: B; Student's t test: C-H.) All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第 4 項：GPR84 と脂肪組織炎症の関連についての検討

第 3 項までの結果から、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは高脂肪食負荷条件下で糖および脂質代謝異常を呈し、その原因として GLP-1 分泌低下によるインスリン分泌不全および、全身的なインスリン抵抗性が関与していることが明らかとなった。次に本研究では、*Gpr84* 遺伝子欠損によるインスリン抵抗性の分子機序を検討した。GPR84 は炎症反応に関与することが報告されており、本論文の第 2 章においても、GPR84 が肝臓におけるマクロファージの過活性を抑制することが報告されている。そこで本研究では、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおける脂肪組織の炎症反応が糖および脂質代謝異常に寄与している可能性を検討した。その結果、予想に反して、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、脂肪組織における *Tnf* および *Adgre1* の発現が野生型マウスと比較して有意に低値を示した (Fig. 4A)。さらに、脂肪組織の組織学的解析においても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、F4/80 および α -SMA 陽性細胞が野生型マウスと比較して減少していることが確認された (Fig. 4B)。加えて、RNA-Seq 解析の結果、脂肪組織における多数の炎症関連遺伝子の発現が *Gpr84* 遺伝子欠損マウスで低値を示すことが明らかとなった (Fig. 4C, D)。これらの結果から、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは脂肪組織における炎症が抑制されることが示された。

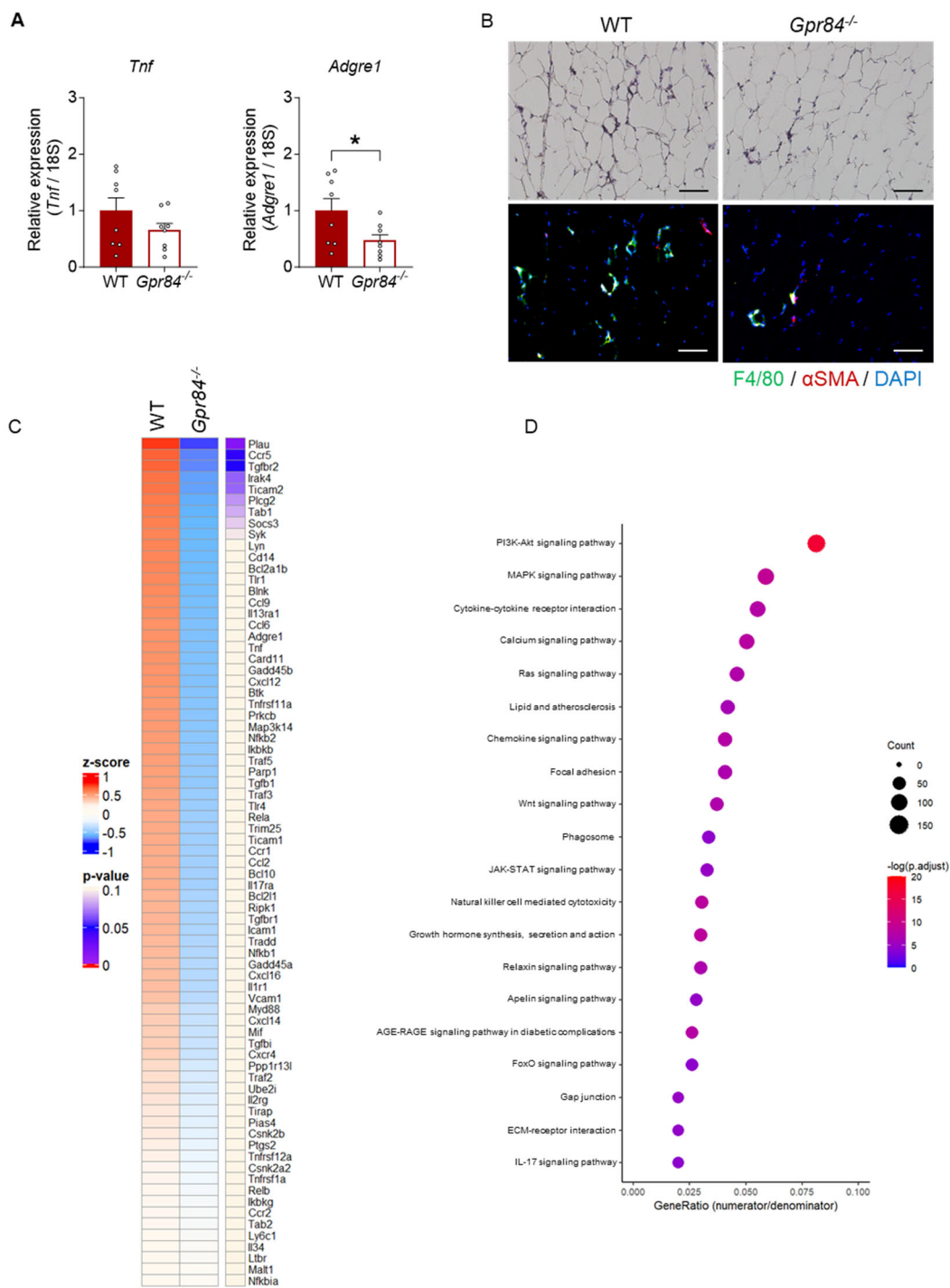


Fig.4 *Gpr84*^{-/-} mice show improvement in inflammatory response under long-term HFD feeding.

(A) *Tnf* and *Adgre1* mRNA expression in WAT (n = 8). (B) IHC of F4/80 and α -SMA stained with fluorescence staining in sections of WAT (F4/80, green; α -SMA, red; DAPI, blue). Scale bar: 100 μ m. (C) RNA-Seq transcriptome profiling in WAT of WT and *Gpr84*^{-/-} mice fed HFD for 12 weeks. Heatmap shows the results of two-dimensional hierarchical clustering of 75 genes associated with inflammation (n = 4 per group). (D) Top 20 enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of differentially expressed genes (DEGs). *p*-values were adjusted for multiple testing using Bonferroni correction. **p* < 0.05 (Student's *t*-test: A). All data are presented as the mean $\pm$ SEM.

第 5 項：GPR84 と脂肪分解の関連についての検討

第 4 項の結果より、*Gpr84* 遺伝子欠損による糖および脂質代謝異常の表現型には、炎症応答が関与しないことが示唆された。そこで次に、過剰な脂肪分解により産生された遊離脂肪酸が、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスのインスリン抵抗性に関与する可能性を検討した。野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウスの脂肪組織を対象に RNA-Seq 解析を行った結果、脂肪分解関連遺伝子および脂肪酸合成関連遺伝子の多くが、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおいて有意に高発現していることが明らかとなった (Fig. 5A, B)。さらにリアルタイム PCR による詳細な遺伝子発現解析の結果、脂肪分解酵素 ATGL をコードする *Pnpla2* および、脂肪分解を促進するアドレナリン受容体をコードする *Adrb3* の発現が、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスで有意に高値を示した (Fig. 5C)。加えて、脂肪酸合成を制御するアセチル CoA カルボキシラーゼ (*Acaca*)、脂質合成の主要転写因子である *Srebf1*、および脂肪分化マーカーの *Pparg* の発現についても、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおいて有意に高値を示した (Fig. 5C)。一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおける、これら脂質代謝関連遺伝子の発現上昇は、肝臓および筋肉では認められなかった (Fig. 5D, E)。以上の結果から、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスの脂肪組織では、脂肪分解と脂肪酸合成の両方が亢進しており、これが糖および脂質代謝異常に関与している可能性が示唆された。

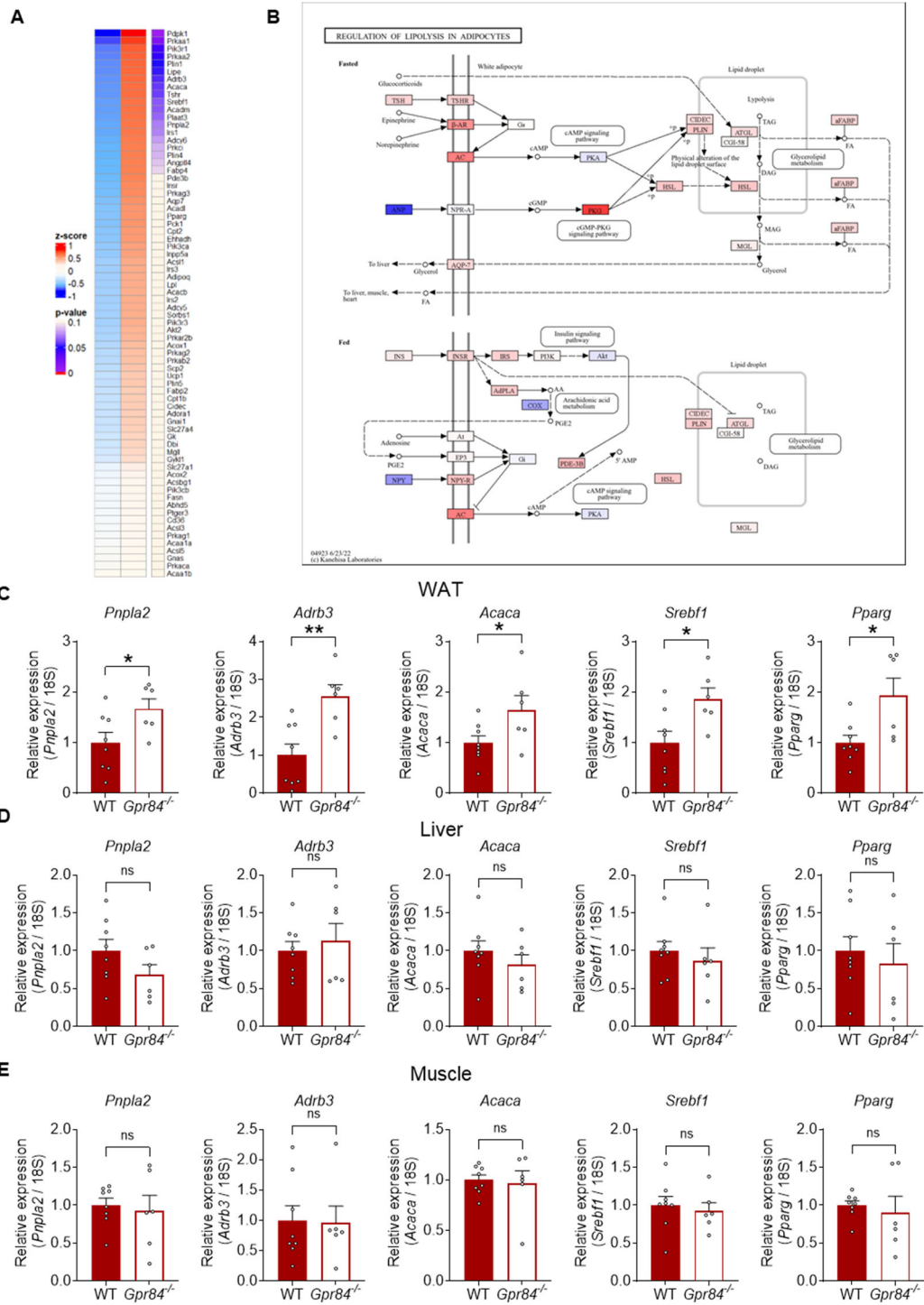


Fig. 5 *Gpr84*^{-/-} mice show dysfunctions of lipid metabolism under long-term HFD feeding.

(A) RNA-Seq transcriptome profiling in WAT of WT and *Gpr84*^{-/-} mice fed HFD for 12 weeks. Heatmap shows the results of two-dimensional hierarchical clustering of 72 genes associated with lipid metabolism (n = 4 per group). (B) KEGG pathway analysis related to lipid metabolism. (C–E) mRNA expression levels of lipid metabolism-related genes in WAT (C), liver (D), and muscle (E) measured in WT and *Gpr84*^{-/-} mice during HFD feeding (n = 6–8). ***p* < 0.01, **p* < 0.05 (Student's *t* test: C–E.) All data are presented as the mean ± SEM.

第 6 項：中鎖脂肪酸食摂取条件における GPR84 の意義解明

第 3 項までの結果から、高脂肪食負荷条件下で産生される中鎖脂肪酸が GPR84 を介して GLP-1 およびインスリン分泌を促進し、糖および脂質代謝を改善することが示された。また、第 4 項および第 5 項では、*Gpr84* 遺伝子欠損によるインスリン抵抗性は、脂肪組織の炎症ではなく、脂肪分解亢進を含む脂肪組織のターンオーバー異常に起因することが示唆された。そこで本項では、20% Lard 食および構成脂肪酸をカプリン酸 (C10:0) に置換した中鎖脂肪酸食を用い、中鎖脂肪酸による代謝改善効果が GPR84 に依存するかを確認した。12 週間の負荷後、血中中鎖脂肪酸濃度を測定した結果、中鎖脂肪酸食負荷群において血中 C10:0 濃度が有意に上昇した (Fig. 6A)。野生型マウスでは、中鎖脂肪酸食負荷により摂餌量の変化を伴わずに体重増加が抑制されたが、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこの効果は認められなかった (Fig. 6B, C)。さらに、野生型マウスでは中鎖脂肪酸食負荷により血糖値が有意に低下したが、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこの効果が消失していた (Fig. 6D)。血中脂質に関しても、野生型マウスでは中鎖脂肪酸食負荷により、血中遊離脂肪酸および総コレステロールが有意に低値を示したが、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこれらの効果は確認されなかった (Fig. 6E, F)。さらに血中インスリン濃度および GLP-1 濃度を測定した結果、野生型マウスでは中鎖脂肪酸食負荷によりインスリン抵抗性が改善され、インスリン分泌の抑制と GLP-1 分泌の増加が確認された。一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスではこれら表現型がいずれも消失した (Fig. 6G, H)。これらの結果から、中鎖脂肪酸食による代謝改善効果の多くは GPR84 を介した機序に起因することが示された。

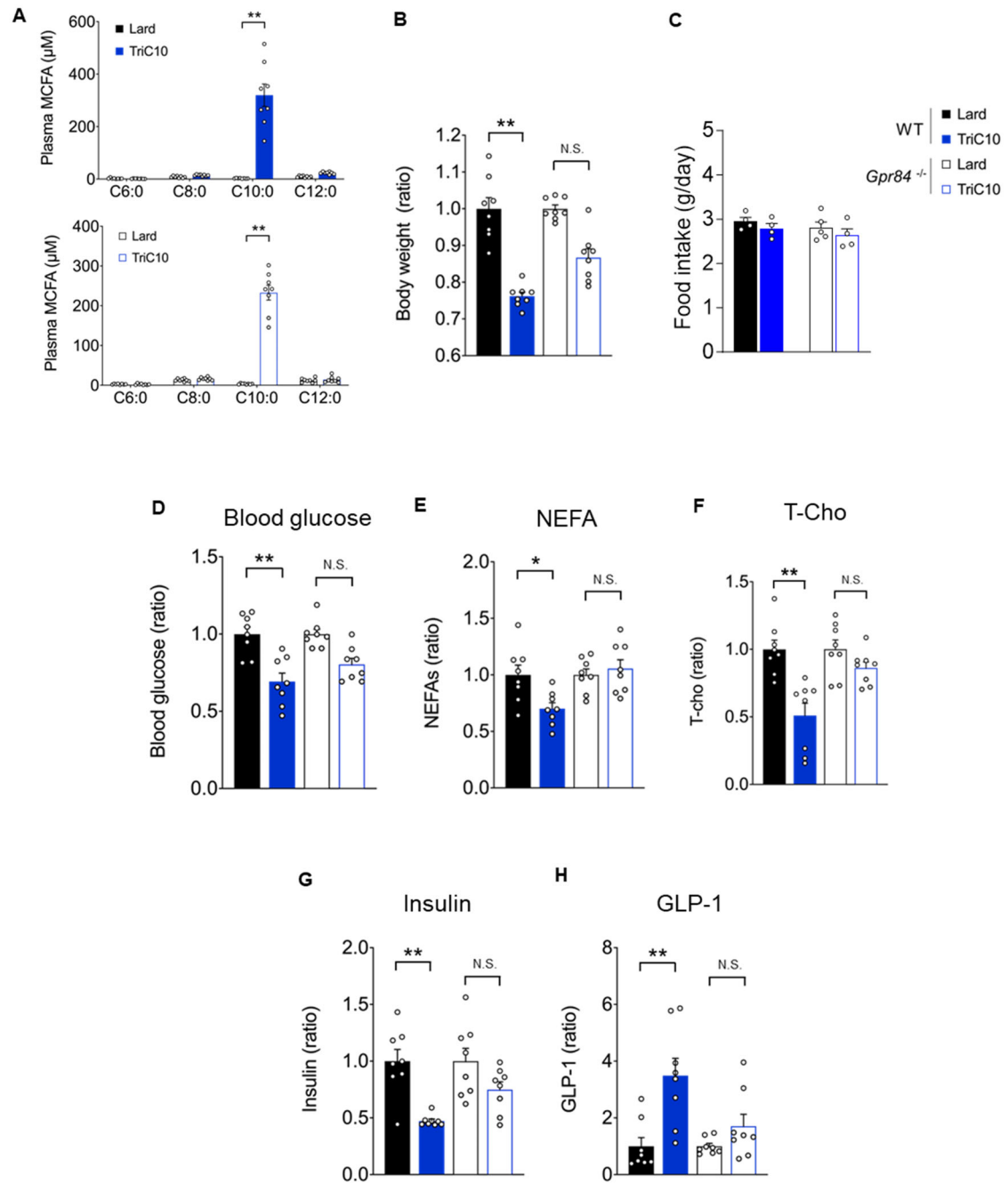


Fig.6 Metabolic benefits of MCT intake are partially mediated by GPR84 activation.

(A) Plasma MCFA concentration of mice fed with TriC10-supplemented HFD (n = 8). (B) Body weight gain for 12 weeks in Lard- or MCT diet-fed mice (n = 8). (C) Food intake (n = 4–5). (D) Blood glucose levels in Lard- or MCT diet-fed mice at 16 weeks of age (n = 8). (E) Non-esterified fatty acids (NEFAs), and (F) total cholesterol (T-cho) levels in Lard- or MCT diet-fed mice. (G) Plasma insulin and (H) plasma GLP-1 levels (n = 8). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test: A, F–H; Student's t test: B–E.) All data are presented as the means $\pm$ SEM.

第4節：考察

第2章の研究により、高脂肪食負荷条件下では内因性中鎖脂肪酸の産生が亢進し、これが肝臓マクロファージにおける GPR84 を介して MASH の進展を抑制することが示された。また先行研究では、中鎖脂肪酸の単回投与による GPR84 依存的な GLP-1 分泌が報告されている³¹。これらを踏まえ、第3章では食事誘導性肥満条件下における中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルの代謝改善効果について検討した。

短期および長期の高脂肪食負荷条件において、血中 C10:0 および C12:0 が GPR84 の活性化に十分な濃度まで上昇することが確認された。この時、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ肥満抵抗性を示したものの、糖代謝および脂質代謝の顕著な悪化が確認された。そこで、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスがインスリン作用不全を呈する可能性を考え、血中インスリン測定と耐糖能試験を実施した。その結果、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、高脂肪食負荷にも関わらず、通常食負荷時と同程度のインスリンしか分泌せず、さらに全身のインスリン抵抗性が顕著に悪化しており、重度の糖尿病に類似した表現型を示すことが判明した。さらに *Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、腸管ホルモン GLP-1 の顕著な低値を示したことから、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスで確認されたインスリン分泌不全と、それに伴う糖および脂質代謝異常の一因として、GLP-1 分泌低下が示唆された。

一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおけるインスリン分泌不全は重篤なものであり、その全てが GLP-1 分泌に起因するかについては検討の余地が残る。GPR84 は膵臓には高発現を示さず、先行研究における *ex vivo* の検討からも、野生型マウスおよび *Gpr84* 遺伝子欠損マウス由来膵島への中鎖脂肪酸刺激で、インスリン分泌に有意な差は見られなかった⁵¹。このことから、GPR84 は膵臓以外の組織において間接的にインスリン分泌を制御する可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、腸管や他の組織における、組織特異的 *Gpr84* 遺伝子欠損マウスを用いた研究が必要である。また、長期高脂肪食負荷条件下で、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスの肝重量が低値を示した点は、第2章で確認された結果とも一致しており、肝臓の線維化が進むにつれて顕れる表現型と考えられる。

さらに OGTT および ITT の結果より、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、インスリン分泌だけでなく、インスリン抵抗性についても悪化していることが明らかとなった。GPR84 は腸管に留まらず、種々の免疫細胞や脂肪組織にも発現しており、これらの臓器は、炎症関連ホルモンやアディポカインの産生を通じて、末梢組織でのインスリン抵抗性に深く関与する。そこで *Gpr84* 遺伝子欠損によるインスリン抵抗性の原因臓器についても検討を行った。第2章で示された GPR84 の炎症抑制効果を踏まえ、第一の仮説として、GPR84 が脂肪組織での炎症を抑制することで、糖および脂質代謝異常を抑制している可能性を検討した。しかしながら予想に反して、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスの脂肪組織ではむしろ炎症が抑制される結果となった。本結果は、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスの肥満抵抗性により、脂肪組織での脂肪蓄積が抑制され、脂肪毒性による炎症が軽減されたためと考えられる。

そこで次に、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおける血中遊離脂肪酸の濃度上昇が、末梢組織で

のインスリン抵抗性を惹起する可能性を検討した。実際に高脂肪食条件下、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、血中遊離脂肪酸および、各種長鎖脂肪酸が有意な高値を示していた。そこで、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスは、脂肪組織において過剰に脂肪分解が起きていると考え、脂肪分解および脂肪酸合成遺伝子発現量を評価した。その結果、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、脂肪分解および脂肪酸合成の両方が顕著に促進していることが判明した。このことから *Gpr84* 遺伝子欠損マウスでは、脂肪組織のターンオーバー異常により、血中の遊離脂肪酸が上昇し、末梢でのインスリン抵抗性が引き起こされる可能性が示唆された。

最後に本研究では、中鎖脂肪酸食を用いて GPR84 による代謝改善効果を直接検討した。Lard 食負荷条件下と比較して中鎖脂肪酸食負荷条件下では、野生型マウスにおいて糖および脂質代謝が改善したものの、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおいては、その効果が消失した。一方、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスにおいても、体重などの一部表現型については、代謝改善傾向が見られている。この理由として、本試験で飼料に添加しているカプリン酸が GPR84 のみならず、GPR40 を含めた他の中鎖脂肪酸受容体を活性化することが考えられる。しかしながら多くの代謝改善効果が *Gpr84* 遺伝子欠損マウスで消失したことから、カプリン酸の糖および脂質代謝改善効果については、主に GPR84 を介していると考えられる。

一部の先行研究において、本研究と同様に中鎖脂肪酸食負荷条件下で、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスが糖および脂質代謝異常を示すことが報告されているものの、これら研究では *Gpr84* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの間に体重および脂肪組織重量の差は認められないとされている^{51,52}。しかしながら、これらの研究では飼料の中鎖脂肪酸源としてココナッツオイルが用いられており、本研究で使用した餌と比較すると、中鎖脂肪酸の中でも特に C10:0 の含有量が少ない可能性がある。加えてこれらの研究では、血中および組織中の中鎖脂肪酸濃度が測定されておらず、GPR84 リガンド量の違いが、結果の相違を生む可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、本研究は中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが糖および脂質代謝の恒常性維持に重要であることを示しており、GPR84 を標的とした代謝性疾患に対する新規治療法の開発が期待される。

第4章：総括および結語

本研究において著者は、エネルギー代謝における中鎖脂肪酸受容体 GPR84 の役割について検討し、以下の知見を得た。

1. 高脂肪食負荷条件下、肝臓における中鎖脂肪酸合成酵素の発現増加に伴い、肝臓中の中鎖脂肪酸濃度が上昇し、GPR84 の活性化を引き起こす。
2. 高脂肪食条件下、肝臓のマクロファージにおいて GPR84 の発現が増加し、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルが MASH の進展を抑制する。
3. 高脂肪食条件下、肝臓に加えて血中の中鎖脂肪酸濃度も上昇する。
4. 中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルは腸管ホルモン GLP-1 の分泌促進を介して、インスリン分泌を調節することで、糖・脂質代謝改善に寄与する。
5. 高脂肪食条件下、GPR84 は脂肪組織のターンオーバーを正常に保つことで、インスリン抵抗性の増悪を抑制する。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は医薬品の標的分子として最大の受容体群であり、既存の医薬品のうち 30%以上が GPCR を標的としている⁵³。このように GPCR は多様な機能を有する重要な受容体群である一方、ヒトゲノムにコードされる約 800 種の GPCR のうち、100-150 の受容体がオーファン受容体として分類されており、これらのリガンドや生理機能は不明である。GPCR が生体内環境を認識する機序の解明は、GPCR を介した生体恒常性維持機構の理解と、新規創薬標的の探索に重要な意義を持つ。

GPR84 は 2006 年に中鎖脂肪酸をリガンドとする受容体として同定されたものの、生理的条件下における中鎖脂肪酸濃度では、GPR84 の活性化に至らないことから、GPR84 は未だ脂肪酸受容体として認識されていない。そこで本研究において、中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルの生理的意義を検討した結果、高脂肪食摂取時などの特定の栄養環境に応じて、内因性の中鎖脂肪酸産生が亢進し、これが GPR84 を介した MASH 進展抑制や、糖および脂質代謝の正常化に寄与することを見出した。本研究結果は、GPR84 が生理的条件下においても脂肪酸を認識し、脂肪酸受容体として機能することを示している。

ヒトにおいては通常、中鎖脂肪酸濃度は低く維持されており、この濃度上昇は肝臓での異所性脂肪沈着や、過剰な脂肪分解などの異常状態を示す。そのため、GPR84 は中鎖脂肪酸濃度上昇の感知を通じて、脂質代謝異常を早期に認識し、マクロファージの過活性や、過剰な脂質分解を抑制することで、生体恒常性を維持していると考えられる。脂肪酸受容体には、中鎖脂肪酸受容体に加えて長鎖脂肪酸受容体も存在するが、C16:0 や C18:0 といった長鎖脂肪酸は、通常血中で高濃度に維持されており、本研究の第3章においても、高脂肪食による濃度増加は中鎖脂肪酸と比較して小さいことが示された。一方、中鎖脂肪酸は高脂肪食負荷時にその濃度が倍増しており、脂肪酸の濃度増加を代謝異常のシグナルとしてとらえる際には、中鎖脂肪酸受容体が適していると考えられる。

さらに GPR84 の発現部位については、従来、免疫細胞および肺での高発現が確認されており、肝臓における発現については明確な報告が存在していなかった。本研究の第 2 章では、GPR84 が肝臓においてマクロファージ特異的に高発現することを初めて明らかにし、GPR84 の MASH 進展抑制機能を報告するに至った。加えて近年、骨格筋や褐色および白色脂肪組織においても GPR84 が豊富に発現することが報告され⁵¹、本研究の第 3 章では、GPR84 が脂肪組織のリモデリングに寄与することが示唆された。これらの研究成果は、GPR84 が MASH などの炎症性疾患、さらには肥満および糖尿病などの全身的な代謝性疾患の発症機序において重要な役割を果たすことを示しており、GPR84 が創薬標的として有用である可能性を支持している。今後、GPR84 の組織特異的な機能解析や GPR84 アゴニストを用いた臨床研究の進展により、代謝性疾患の新規治療戦略の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究に際しまして、研究の場を与えてくださり、多大なるご指導と適切なお助言を賜りました、京都大学大学院 薬学研究科 教授 木村郁夫先生に深く御礼申し上げます。並びに、直接のご指導を賜りました、近畿大学大学院 産業理工学部 准教授 北野隆司先生、東京農工大学大学院 農学府 テニユアトラック准教授 宮本潤基先生に心より感謝申し上げます。

また、日々有益な議論をはじめ、公私共に数々の面でお世話になりました研究室の皆様、長年にわたる研究生活を支え温かく見守ってくれた父、母に深く感謝いたします。

本研究の一部は、日本学術振興会に助成を受けて行われたものです。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

1. Ohue-Kitano R*, Nonaka H*, Nishida A*, Masujima Y, Takahashi D, Ikeda T, Uwamizu A, Tanaka M, Kohjima M, Igarashi M, Katoh H, Tanaka T, Inoue A, Suganami T, Hase K, Ogawa Y, Aoki J, Kimura I (*equally contribution).
“Medium-chain fatty acids suppress lipotoxicity-induced hepatic fibrosis via the immunomodulating receptor GPR84”
JCI Insight. 2023;8(2): e165469.
2. Nishida A, Ohue-Kitano R, Masujima Y, Nonaka H, Igarashi M, Ikeda T, Kimura I.
“Medium-chain fatty acid receptor GPR84 deficiency leads to metabolic homeostasis dysfunction in mice fed high-fat diet”
FASEB BioAdvances. 2024; 6:526–538.

引用文献

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137–149.
2. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid–induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3077–3082.
3. Mozaffarian D, Wu JH. Omega–3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(20):2047–2067.
4. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva–Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short–Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016;165(6):1332–1345.
5. Watanabe K, Yamano M, Masujima Y, Ohue–Kitano R, Kimura I. Curd intake changes gut microbial composition, short–chain fatty acid production, and bile acid transformation in mice. *Biochem Biophys Res.* 2021; 27:101095.
6. Bach AC, Babayan VK. Medium–chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr.* 1982;36(5):950–962.
7. St–Onge MP, Jones PJ. Physiological effects of medium–chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr.* 2002;132(3):329–332.
8. Jadhav HB, Annappure US. Triglycerides of medium–chain fatty acids: a concise review. *J Food Sci Technol.* 2023;60(8):2143–2152.
9. Kimura I, Ichimura A, Ohue–Kitano R, Igarashi M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2020;100(1):171–210.
10. Nishida A, Ando Y, Kimura I, Miyamoto J. Involvement of Gut Microbial Metabolites Derived from Diet on Host Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5562.
11. Inoue A, Raimondi F, Kadji FMN, Singh G, Kishi T, Uwamizu A, Ono Y, Shinjo Y, Ishida S, Arang N, Kawakami K, Gutkind JS, Aoki J, Russell RB. Illuminating G–Protein–Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell.* 2019;177(7):1933–1947.
12. Hidalgo MA, Nahuelpan C, Manosalva C, Jara E, Carretta MD, Conejeros I, Loaiza A, Chihuailaf R, Burgos RA. Oleic acid induces intracellular calcium mobilization, MAPK phosphorylation, superoxide production and granule release in bovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(2):280–286.
13. 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.* 2003;422(6928):173–176.
14. Hara T, Kimura I, Inoue D, Ichimura A, Hirasawa A. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2013; 164:77–116.

15. Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi KC, Feng DD, Chen C, Lee HG, Katoh K, Roh SG, Sasaki S. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*. 2005;146(12):5092–5099.
16. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282–1286.
17. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashiwara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013; 4:1829.
18. Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Mukouyama H, Nishida A, Watanabe K, Igarashi M, Irie J, Tsujimoto G, Satoh-Asahara N, Itoh H, Kimura I. Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(47):23813–23821.
19. Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):8030–8035.
20. Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, Yanagisawa M. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(4):1045–1050.
21. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16767–16772.
22. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, Wan LX, Rey F, Wang T, Firestein SJ, Yanagisawa M, Gordon JI, Eichmann A, Peti-Peterdi J, Caplan MJ. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(11):4410–4415.
23. Chang AJ, Ortega FE, Riegler J, Madison DV, Krasnow MA. Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature*. 2015;527(7577):240–244.
24. Nishida A, Miyamoto J, Shimizu H, Kimura I. Gut microbial short-chain fatty acids-mediated olfactory receptor 78 stimulation promotes anorexigenic gut hormone peptide YY secretion in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 557:48–54.
25. Wang J, Wu X, Simonavicius N, Tian H, Ling L. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34457–34464.
26. Aktar R, Rondinelli S, Peiris M. GPR84 in physiology—Many functions in many tissues. *Br J Pharmacol*. 2024;181(10):1524–1535.

27. Luscombe VB, Lucy D, Bataille CJR, Russell AJ, Greaves DR. 20 Years an Orphan: Is GPR84 a Plausible Medium–Chain Fatty Acid–Sensing Receptor? *DNA Cell Biol.* 2020;39(11):1926–1937.
28. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review [published correction appears in JAMA. 2020; 323(16): 1619.
29. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol.* 2024; 81: 492–542.
30. Kang GG, Trevaskis NL, Murphy AJ, Febbraio MA. Diet–induced gut dysbiosis and inflammation: Key drivers of obesity–driven NASH. *iScience.* 2022;26(1):105905.
31. Nonaka H, Ohue–Kitano R, Masujima Y, Igarashi M, Kimura I. Dietary Medium–Chain Triglyceride Decanoate Affects Glucose Homeostasis Through GPR84–Mediated GLP–1 Secretion in Mice. *Front Nutr.* 2022; 9:848450.
32. Gaidarov I, Anthony T, Gatlin J, Chen X, Mills D, Solomon M, Han S, Semple G, Unett DJ. Embelin and its derivatives unravel the signaling, proinflammatory and antiatherogenic properties of GPR84 receptor. *Pharmacol Res.* 2018; 131:185–198.
33. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, Hazlehurst JM, Guo K; LEAN trial team; Abouda G, Aldersley MA, Stocken D, Gough SC, Tomlinson JW, Brown RM, Hübscher SG, Newsome PN. Liraglutide safety and efficacy in patients with non–alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double–blind, randomised, placebo–controlled phase 2 study. *Lancet.* 2016;387(10019):679–690.
34. Kawakubo M, Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Saka–Tanaka M, Kanamori Y, Yoshioka N, Yamashita S, Goto M, Itoh M, Shirakawa I, Kanai S, Suzuki H, Sawada M, Ito A, Ishigami M, Fujishiro M, Arima H, Ogawa Y, Suganami T. Dipeptidyl peptidase–4 inhibition prevents nonalcoholic steatohepatitis–associated liver fibrosis and tumor development in mice independently of its anti–diabetic effects. *Sci Rep.* 2020;10(1):983.
35. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratzliff V, Sanyal AJ, Sejling AS, Harrison SA; NN9931–4296 Investigators. A Placebo–Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2021;384(12):1113–1124.
36. Bertevello PL, De Nardi L, Torrinhas RS, Logullo AF, Waitzberg DL. Partial replacement of ω –6 fatty acids with medium–chain triglycerides, but not olive oil, improves colon cytokine response and damage in experimental colitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36(4):442–448.
37. Kono H, Enomoto N, Connor HD, Wheeler MD, Bradford BU, Rivera CA, Kadiiska MB, Mason RP, Thurman RG. Medium–chain triglycerides inhibit free radical formation and TNF–alpha production in rats given enteral ethanol. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278(3): G467–G476.
38. Kono H, Fujii H, Ogiku M, Tsuchiya M, Ishii K, Hara M. Enteral diets enriched with medium–chain triglycerides and N–3 fatty acids prevent chemically induced experimental

- colitis in rats. *Transl Res*. 2010;156(5):282–291.
39. Chen LH, Zhang Q, Xie X, Nan FJ. Modulation of the G-Protein-Coupled Receptor 84 (GPR84) by Agonists and Antagonists. *J Med Chem*. 2020 Dec 24;63(24):15399–15409.
 40. Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, Onozawa Y, Iino I, Maeda H, Komai T, Oda T. Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10684–10691.
 41. Zhang Q, Chen LH, Yang H, Fang YC, Wang SW, Wang M, Yuan QT, Wu W, Zhang YM, Liu ZJ, Nan FJ, Xie X. GPR84 signaling promotes intestinal mucosal inflammation via enhancing NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(8):2042–2054.
 42. Khalil N, Manganas H, Ryerson CJ, Shapera S, Cantin AM, Hernandez P, Turcotte EE, Parker JM, Moran JE, Albert GR, Sawtell R, Hagerimana A, Laurin P, Gagnon L, Cesari F, Kolb M. Phase 2 clinical trial of PBI-4050 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2019;53(3):1800663.
 43. Jenkins L, Marsango S, Mancini S, Mahmud ZA, Morrison A, McElroy SP, Bennett KA, Barnes M, Tobin AB, Tikhonova IG, Milligan G. Discovery and Characterization of Novel Antagonists of the Proinflammatory Orphan Receptor GPR84. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(5):1598–1613.
 44. Strambu IR, Seemayer CA, Fagard LMA, Ford PA, Van der Aa TAK, de Haas-Amatsaleh AA, Modgill V, Santermans E, Sondag EN, Helmer EG, Maher TM, Costabel U, Cottin V. GLPG1205 for idiopathic pulmonary fibrosis: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Eur Respir J*. 2023;61(3):2201794.
 45. World Obesity Atlas 2023(accessed on 28 November 2024). Available online: <https://www.worldobesity.org/news/world-obesity-atlas-2024>
 46. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, Yin X, Xu Q. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 14:1161521.
 47. Todorčević M, Hodson L. The Effect of Marine Derived n-3 Fatty Acids on Adipose Tissue Metabolism and Function. *J Clin Med*. 2015; 5(1): 3.
 48. Xyda SE, Vuckovic I, Petterson XM, Dasari S, Lalia AZ, Parvizi M, Macura SI, Lanza IR. Distinct Influence of Omega-3 Fatty Acids on the Plasma Metabolome of Healthy Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; 75(5): 875-884.
 49. Miyamoto J, Igarashi M, Watanabe K, Karaki SI, Mukouyama H, Kishino S, Li X, Ichimura A, Irie J, Sugimoto Y, Mizutani T, Sugawara T, Miki T, Ogawa J, Drucker DJ, Arita M, Itoh H, Kimura I. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 4007.
 50. Huang L, Gao L, Chen C. Role of Medium-Chain Fatty Acids in Healthy Metabolism: A Clinical Perspective. *Trends Endocrinol Metab*. 2021; 32(6): 351-366.
 51. Montgomery MK, Osborne B, Brandon AE, O'Reilly L, Fiveash CE, Brown SHJ, Wilkins

- BP, Samsudeen A, Yu J, Devanapalli B, Hertzog A, Tolun AA, Kavanagh T, Cooper AA, Mitchell TW, Biden TJ, Smith NJ, Cooney GJ, Turner N. Regulation of mitochondrial metabolism in murine skeletal muscle by the medium-chain fatty acid receptor Gpr84. *FASEB J.* 2019;33(11):12264–12276.
52. Du Toit E, Browne L, Irving-Rodgers H, Massa HM, Fozzard N, Jennings MP, Peak IR. Effect of GPR84 deletion on obesity and diabetes development in mice fed long chain or medium chain fatty acid rich diets. *Eur J Nutr.* 2018;57(5):1737–1746.
53. Sriram K, Insel PA. G Protein–Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol.* 2018; 93:251–258.