

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 新規肥満治療薬開発を目指した不飽和脂肪酸シグナル系の網羅的解析

研究代表者 淡路 健雄 (医学部 薬理学教室)

## 緒言

食餌の西洋化, 魚食より肉食へのシフトに伴いメタボリックシンドロームを含む肥満が公衆衛生上の問題点としてクローズアップされてきている。肥満は脳・心血管障害の重大なリスクファクターであり, 他の成人病発症ともリンクしている。

我々がクローニングし, その天然リガンドを同定した新規オーファン受容体GPR120<sup>1)</sup>はG-protein coupled receptor (GPCR)に含まれる。このGPR120受容体(現在FFAR4と名称が決定されている)は $\omega$ 3長鎖不飽和遊離脂肪酸( $\alpha$ リノレン酸・DHA・EPAなど)をリガンドとする受容体であり, 細胞内シグナル伝達機構を活性化し, 更にグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)を分泌することを明らかにした<sup>1)</sup>。GLP-1は現在知られている最も強力なインクレチン(消化管由来のインスリン分泌促進作用を持つ因子)の一つであり, またFFAR4は腸管に局在する遊離不飽和脂肪酸受容体であることから, このFFAR4-GLP-1分泌連関は摂食行動, 脂質代謝, 食欲中枢制御, インスリン分泌等の生体代謝・内分泌において重要な生理的役割を担う事が認められている。近年, 共同研究者の平澤らは, 2011年にNatureにFFAR4受容体の変異が食餌性の肥満の原因になりうることをヒトとノックアウトマウスで証明し, FFAR4受容体作用薬は肥満治療薬開発の重要なターゲットの一つであると考えられている<sup>2)</sup>。

一方, FFAR4はこれまで知られていた三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と異なる $\beta$ -アレスチンを介する細胞内情報伝達機構を活性化し, 抗炎症作用を示しこれが新しいインスリン抵抗性改善に関わるという報告がなされている<sup>3-6)</sup>。特にFFAR4は, そのヒトにおけるスプライシングバリエーションの一部が三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と共役しないことが報告されている<sup>6)</sup>。このことは, FFAR4の生理機能・病態における $\beta$ -アレスチンを介する細胞内情報伝達機構の重要性を示唆しているものと考えられる。しかしながらFFAR4- $\beta$ -アレスチンのシグナル系を検討する有効な手段は現在まで報告されていない。本研究者は, FFAR4を含む不飽和脂肪酸受容体の新規刺激薬や薬理特性について報告してきた<sup>1, 7, 8)</sup>。また, 刺激薬の

候補と考えられる一部が特異な特性を持つことを見出している。これはこのこれまで知られていた三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と異なる細胞内情報伝達機構を活性化し, 薬物においては偏った比率で情報伝達機構活性化を起こす一連の薬物を示す「バイアスドリガンド」という概念と一致していることが想定された。

本年度は, 新規抗糖尿病薬として期待されているFFAR4関連薬開発の基盤となる, 受容体刺激薬-受容体共役の分子メカニズムについて検討を行ない, 新しい創薬候補ならびにFFAR4の生理機能の解明に有用な薬物を見出したので報告する。

## 材料と方法

## 1) DNAコンストラクト

HEK293/Flip-In培養細胞内でマウスFFAR4及びFFAR4/venusを発現するコンストラクトを作成した。それぞれのコンストラクトにはTet-on発現システムを用い任意に発現可能なように設計を行なった。

## 2) 培養細胞と遺伝子導入

HEK293/Flip-In細胞を用いた。この細胞は, Tet(ドキシサイクリン)によりプロモーターが発現できるように設計されており, また導入サイトにはシングルコピーで導入できるように設計されている。それぞれマウスFFAR4及びFFAR4/venus遺伝子発現ベクターとOG41ベクターの共導入を行ない, ハイグロマイシン存在下で選択を行ない, それぞれの安定発現細胞を確立した。

## 3) ERKリン酸化の検討

HEK293-FFAR4を35mmシャーレで培養を行ない, ドキシサイクリン投与48時間目に $\alpha$ リノレン酸(FFAR4の生体内刺激薬)およびバイアスドリガンド候補(Compound-A)を投与し, ウェスタンブロット法を用い $\beta$ -アレスチンの下流にあるERKのリン酸化の時間経過を観察した。

## 4) 細胞内カルシウム濃度の測定

HEK293-FFAR4をガラスボトム35mmシャーレで培養を行ない, ドキシサイクリン投与48時間目にFura2-AMのローディングを行ない, 顕微蛍光測定装置で $\alpha$ リノレン酸(FFAR4の生体内刺激薬)およびCompound-Aの投与に

よる細胞内カルシウム濃度の変化を記録した。

### 5) 受容体細胞内移行の可視化検討

HEK293-FFAR4/Venusをガラスボトム 35 mmシャーレにて培養を行ない、ドキシサイクリン投与 48 時間目に顕微蛍光測定装置で $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与によるFFAR4の細胞内移行の評価を行なった。

## 結果

### ERKリン酸化

ERKのリン酸化は $\beta$ -アレスチンシグナルの下流に存在するため、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与による $\beta$ -アレスチンの活性化の指標と考えられるためERKリン酸化の時間経過を測定した。ドキシサイクリン非投与群(FFAR4発現非誘導群)において両薬剤共に有意なERKリン酸化は観察されなかった。一方ドキシサイクリン投与によるFFAR4発現を誘導群に於いては、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与により直ちにERKのリン酸化が認められた。その最大反応はベースの5倍程度と試薬の違いによる差は認められなかった。 $\alpha$ リノレン酸投与群においては、活性化は一時的であった。投与後20分においてほぼ、刺激前の値に戻っていた。一方、Compound-A投与群においてはERKのリン酸化は20分目まで継続し、60分値においてもベースの4倍であった。これらの反応は、ドキシサイクリン投与によるFFAR4発現を誘導することに生じており、FFAR4に依存したリン酸化であると考えられた。

### 受容体細胞内移行の可視化検討

このERKのリン酸化が受容体・細胞機能に生理的に共役しているか確認するためにカルシウムシグナル非依存的・ $\beta$ -アレスチン依存的な受容体の細胞内移行を検討した。受容体の可視化を行なうためHEK293-FFAR4/Venus細胞を実験に用いた。ドキシサイクリン非投与群において細胞表面に有意な蛍光を認めず、ドキシサイクリン負荷により細胞表面に蛍光を認めFFAR4/Venus由来の蛍光であると考えられた。この蛍光は、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与により細胞表面から細胞質への移行を認め、観察した投与後30分に於いて両群間に有意な差は認められなかった(図1)。

### 細胞内カルシウム濃度の変化

FFAR4はGqと共役しておりPLCの活性化を介してIP<sub>3</sub>の産生、細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことが知られている。ドキシサイクリン非投与群においては、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与において有意なカルシウム濃度の上昇を認めなかった。内因性のGqと共役しているATP受容体のATPの刺激においては細胞内カルシウムの上昇を引き起こした。ドキシサイクリン負荷により $\alpha$ リノレン酸の投与は細胞内カルシウムの上昇を認めた。一方我々が見出したCompound-Aの投与においてはどの濃度においても有意なカルシウム濃度の上昇は観察されなかった(図2)。

## 結語

我々が見出したCompound-AはFFAR4に対して三量体Gタンパク質 $\alpha$ サブユニットを介するカルシウムシグナルを生じないが、 $\beta$ -アレスチンを介するERK活性化を起こすことを見出した。これはGPCRで報告されているバイアスドリガンドの特性と一致すると考えられた。FFAR4を介するERKのシグナル系はTNFを介するインスリン抵抗性の改善を選択に発揮し、新しい糖尿病の治療戦略に有用である可能性が示された(図3)。

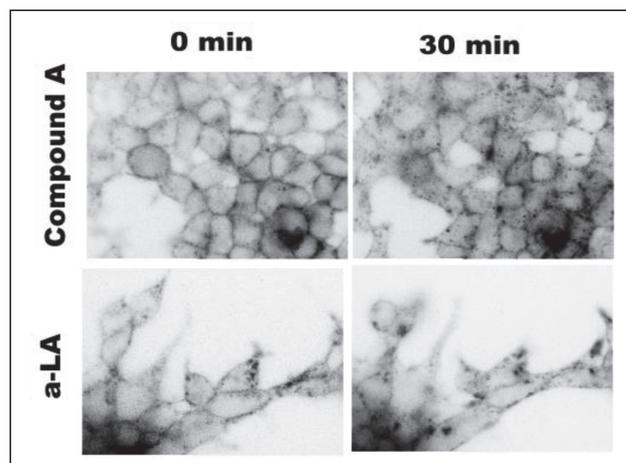


図 1.

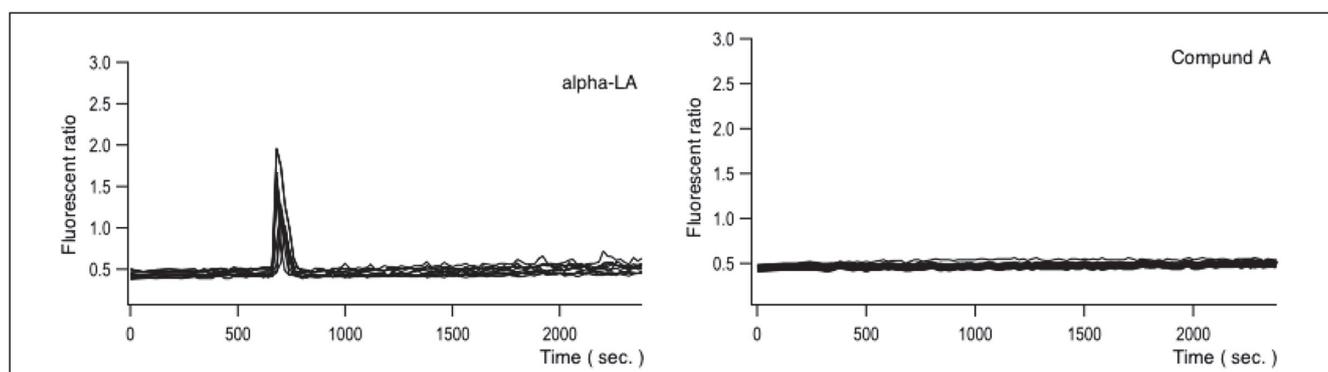


図 2.

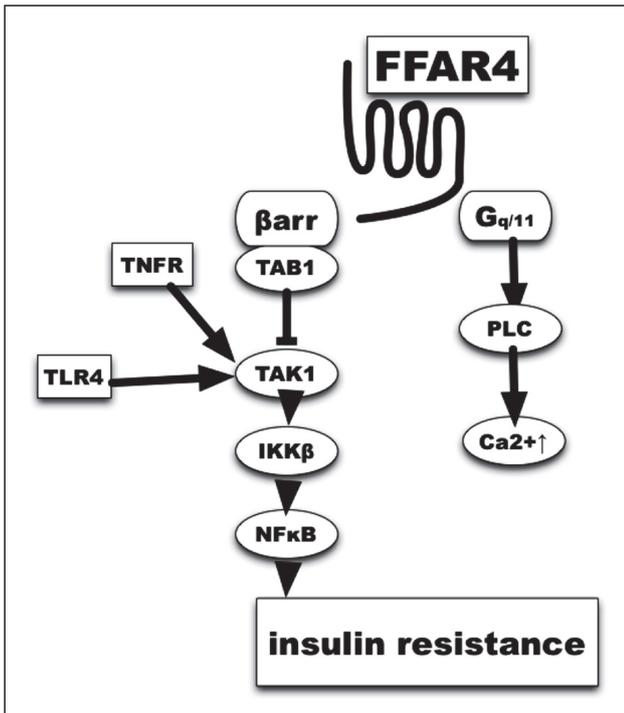


図 3.

## 参考文献

- 1) Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005 Jan;11(1):90-4.
- 2) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 2012 Feb 19;483(7389):350-4.

- 3) Yore MM, Syed I, Moraes-Vieira PM, Zhang T, Herman MA, Homan EA, et al. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell* 2014 Oct 9;159(2):318-32.
- 4) Oh da Y, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessenheiner AR, et al. AGpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med* 2014 Aug;20(8):942-7.
- 5) Butcher AJ, Hudson BD, Shimpukade B, Alvarez-Curto E, Prihandoko R, Ulven T, et al. Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determines arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4. *J Biol Chem* 2014 Jun 27;289(26):18451-65.
- 6) Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010 Sep 3;142(5):687-98.
- 7) Takeuchi M, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Hirano T, Suzuki T, et al. FFA1-selective agonistic activity based on docking simulation using FFA1 and GPR120 homology models. *Br J Pharmacol* 2013 Apr;168(7):1570-83.
- 8) Sun Q, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Adachi T, Awaji T, Ishiguro M, et al. Structure-activity relationships of GPR120 agonists based on a docking simulation. *Mol Pharmacol* 2010 Nov;78(5):804-10.

## 研究成果リスト

## 論文発表

投稿準備中