

# 遺伝子改変動物を用いた脂肪酸受容体の皮膚における作用の検討

京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野

平 澤 明

Free fatty acids are not only essential nutritional components but they also function as signaling molecules. By utilizing the human genome database and G-protein-coupled receptor (GPCR) deorphanizing strategy, we successfully identified multiple receptors for free fatty acids (FFAs) which have been proposed to play a critical role in various components of metabolic regulation. Among the FFA receptors, we previously showed that GPR120, which is expressed in large intestine, adipose tissue, lung and skin, functions as a receptor for unsaturated long-chain FFAs such as alpha-linolenic acid ( $\alpha$ -LA). We also developed specific antibody against the extracellular domain of GPR120 and GPR40, respectively. We also found that GPR120-deficient mice were obese with high-fat diet feeding, suggesting that GPR120 plays an important role in lipid metabolism. Furthermore, we have been able to use these antibodies to describe for the first time and in detail the expression and localization of the GPR120 protein in a number of mouse tissues; skin, lung, large intestine and adipose tissue. This anti-GPR120 antibody and selective ligand should prove useful for further analysis of the physiological role of fatty acid receptor GPR120 in skin.

## 1. 緒 言

脂肪酸は、栄養成分として非常に重要であるのみならず、生体内での情報伝達にも重要な役割を果たすことが明らかとなっている。生体内の脂肪酸制御メカニズムとしては、細胞外の脂肪酸を細胞内へ輸送するトランスポーター、細胞内の脂肪酸結合タンパク質、核内受容体群の研究が従来から進められてきた。最近、我々を含む複数のグループにより、7回膜貫通型受容体の中に、細胞膜表面に発現し脂肪酸を検知することで生理機能の調節に重要な役割を果たす脂肪酸受容体群 (GPR120, GPR40, GPR41, GPR43) の存在が明らかにされた (Table 1)<sup>1)</sup>。我々は特に脂肪酸受容体GPR120に関して、リガンドの発見から、生理機能の解明までを系統的に研究を進めてきた<sup>2)</sup>。また、リガンドが類似する脂肪酸受容体として、GPR40も見出されたため、これと比較しつつ、解析を進めている。その過程でGPR120が、皮膚組織および毛根の周辺に存在することを見出した。脂質成分は、表皮中の細菌等による代謝により、水解され脂肪酸として存在する成分も多いため十分高い局所濃度になる可能性がある。従って、脂肪酸受容体が生理的に機能する可能性は十分ありうる。本研究では、皮膚表皮および、毛根に発現する脂肪酸受容体GPR120の生理機能の詳細を明らかにし、コスメトロジーにおける新たな役割を見出し、貢献することを目的とする。

## 2. 実 験

動物：GPR120受容体の生体内での機能解析を目的として、GPR120をノックアウトしたマウスをgene targeting法を用いて作製した。

抗体の作製：マウスGPR120受容体細胞外第2ループ内の26アミノ酸 (177-202アミノ酸) にあたるペプチドに、キャリアタンパク質としてKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を付加したものをrabbitに免疫し、その血清から抗体を精製した。抗体の反応性はELISAにより確認した。

GPR120発現細胞の作製：N末端にFLAGタグを付加したマウスGPR120受容体 (以下FLAG-mGPR120) の発現ベクターを作製し、HEK293細胞に一過性に発現させた。

抗GPR120抗体の評価：FLAG-mGPR120発現HEK293細胞を用いた、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、及び免疫染色により本抗体の特異性評価を行った。

組織分布：各組織のRNAについて、RT-PCRにより、発現解析を行った。また、GPR40、GPR120特異体抗体<sup>3, 4)</sup>を用いて免疫組織染色を行い、局在を解析した。GPR120mRNAの発現が報告されている肺において抗GPR120抗体による免疫染色を行うために、GPR120野生型マウス及びGPR120欠損型マウスから上記各組織のパラフィン切片を作製し、DAB染色を行った。肺組織においては、肺サーファクタント分泌細胞であるクララ細胞特異的な抗体である抗CC10抗体と抗GPR120抗体との連続切片染色を行った。マウス皮膚組織は表皮、真皮、皮下組織を毛乳頭を含めて切片を作成し、免疫染色により観察を行った。

表現型解析：通常食及び高脂肪食の給餌状態で野生型と遺



Role of free fatty acid receptor GPR120 in skin

Akira Hirasawa

Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences Department of Genomic Drug Discovery Science

Table 1 Free fatty acid receptors family

| Nomenclature       | <i>GPR120</i>                                            | GPR40                    | GPR41                                                | GPR43                                      | GPR84    |
|--------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------|
| Agonist(FFA)       | <b>Medium-long</b>                                       | Medium-long              | Short Chain,                                         | Short Chain,                               | Medium   |
| G protein coupling | <b>Gq/11</b>                                             | Gq/11                    | Gi/o                                                 | Gq/11, Gi/o                                | Gi/o     |
| Expression         | <b>Colon</b><br><b>Adipose tissue</b><br>Macrophage      | Pancreatic $\beta$ -cell | Adipose tissue<br>Colon<br><b>Ganglion</b>           | Adipose tissue<br>Colon<br>Neutrophils     | Spleen   |
| Physiological role | <b>GLP-1 secretion</b><br><b>Adipose differentiation</b> | Insulin secretion        | Leptin production<br><b>Peripheral nerve control</b> | Adipose differentiation<br>Immune response | IL-12p40 |

伝子欠損マウスの体重の推移を比較した。さらに、白色脂肪組織について、ヘマトキシリン・エオシン染色法及び組織免疫染色法で染色、観察した。

### 3. 結果と考察

GPR120は中長鎖遊離脂肪酸をリガンドとするGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、その生理機能は現在判明している腸管からのGLP-1分泌促進だけでなく、脂質代謝調節など多岐に渡ると推定される。今回我々はGPR120ノックアウトマウスの脂肪組織、肺及び皮膚について組織レベルおよび細胞レベルで観察し、野生型と比較した。

これまでの研究により、GPR120のmRNAは大腸、肺および脂肪細胞に強く発現することが確認されたが、タンパク質レベルでの検出、解析はほとんど行われていない。まず、我々はGPR120受容体に対する抗体を作製し、その特異性を免疫沈降、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、及び免疫染色によって確認した。

トランスフェクションにより一過性にFLAG-mGPR120を発現させたHEK293細胞の可溶画分を抗GPR120抗体または抗FLAG抗体により免疫沈降、引き続き同抗体によりウエスタンブロッティングを行った。その結果、単量体と考えられる約35kDa、二量体と考えられる約70kDa、及び多量体と考えられるスミアなバンドを検出した。さらに、抗GPR120抗体によるフローサイトメトリーおよび免疫細胞染色においても、対照細胞と比較し、GPR120発現細胞で強い蛍光シグナルの検出に成功した。これらの実験により、本抗体は免疫沈降、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、細胞免疫染色に用いることが可能であることを確認した<sup>4)</sup>。

GPR120ノックアウトマウスの皮膚および白色脂肪組織、肺、腸管について組織レベルで観察し、野生型と比較した上で組織分布を調査した。肺組織を解剖により単離し、組織切片を作製した。これらの標本について、ヘマトキシリン・エオシン染色法で染色した後観察した (Fig.1A)。肺

の組織像については野生型とGPR120ノックアウトマウスの間に顕著な差は見られなかった。免疫染色により、マウス肺においては、GPR120は終末気管支の上皮細胞に発現していることを初めて同定した。さらに、肺サーファクタント分泌細胞であるクララ細胞特異的な抗体である抗CC10抗体との連続切片免疫染色により、GPR120はクララ細胞に特異的に発現していることが示された。

また脂肪細胞においては、GPR120は大半の細胞膜上に強く発現していることを見出した。GPR120ノックアウトマウスおよび野生型の体重を、通常食の給餌時と高脂肪食の給餌時において生後5週間から16週間までの体重の推移を比較したところ、通常食を給餌している状態では野生型とGPR120遺伝子欠損マウスの間に有意な差は観察されなかった。しかし、高脂肪食を給餌して同様に比較したところ、野生型と比べ、GPR120遺伝子欠損マウスでは顕著かつ有意な体重の増加が認められた。これは、脂肪の蓄積によるものであった。また、脂肪細胞径の増加、マクロファージの浸潤も認められた (Fig.1B)。

さらに、皮膚組織についてRT-PCRを行い、皮膚にGPR120が発現していることを確認した (Fig. 2A)。免疫染色により、GPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した (Fig.2B)。毛乳頭細胞は毛髪の伸長に関わる細胞であることから、GPR120は毛髪の伸長に関与している可能性がある。皮膚組織については形態上顕著な差は認められなかった。

### 4. 総括

皮膚においてGPR120が発現していることをRT-PCRにより確認し、免疫染色によってGPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した。毛乳頭細胞は毛髪の伸長に関わる細胞であることから、GPR120は毛髪の伸長にも関与している可能性がある。また最近、脂肪酸受容体であるGPR120が脂肪センサーとして正常に機能することで、脂質生合成調節を通じて体内のエネルギー代謝のバランスを保っていることを明らかにした。この成果はNature誌

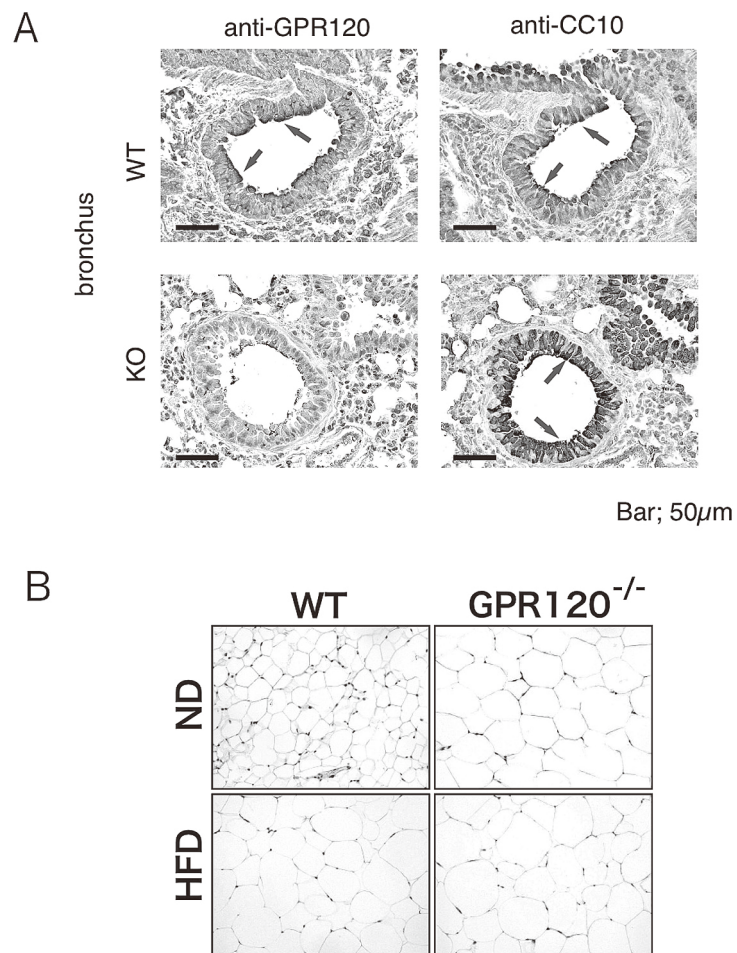


Fig. 1 A Immunohistochemical staining of sections of the lung of GPR120<sup>+/+</sup> and GPR120<sup>-/-</sup> mouse with antibodies against GPR120 and CC10.  
B H&E staining of epididymal white adipose tissue from 16-week-old GPR120<sup>-/-</sup> or wild-type (WT) mice fed a standard diet or 16-week-old mice fed a high-fat diet.

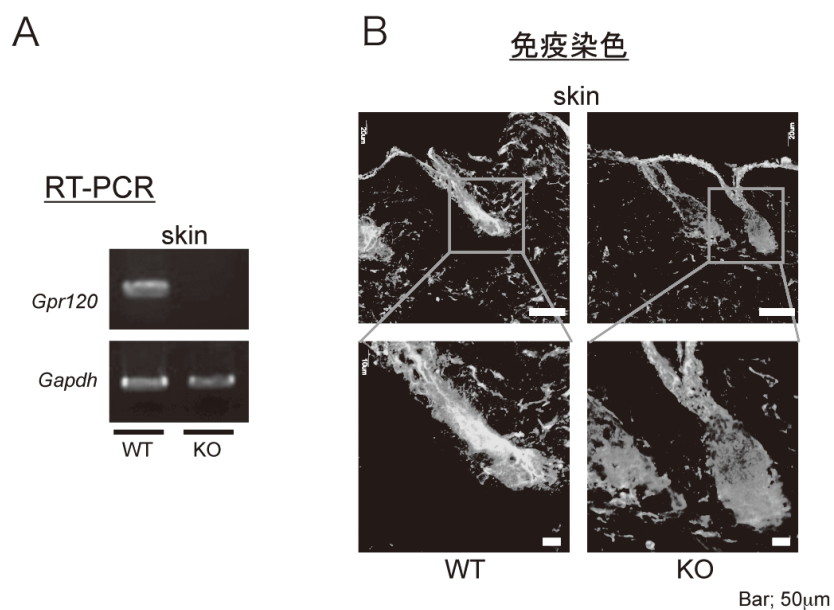


Fig. 2 A RT-PCRにより、skinにGPR120が発現していることを確認した。  
B 免疫染色により、GPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した。

に掲載された<sup>5)</sup>。

肺および皮膚では、現在のところ野生型に対して顕著な変化は観察できていないが、アレルギー感作時などでの検討によって、今後未知の機能が明らかになることが期待される。今後、ノックアウトマウスを用いた更なる解析と、特異的な化合物の開発とを組み合わせることにより、詳細な生理機能が明らかにされ、特に皮膚における機能を明らかにできるはずである。

## 5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご支援いただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

## (参考文献)

- 1) Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, *et al.*, : Free fatty acid receptors and drug discovery, *Biol Pharm Bull.*, 31, 1847-1851, 2008.
- 2) Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, *et al.*, : Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat Med.*, 11, 90-94, 2005.
- 3) Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, *et al.*, : Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1), *Biochem Biophys Res Commun.*, 365, 22-28, 2008.
- 4) Miyauchi S, Hirasawa A, Iga T, *et al.*, : Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 379, 427-434, 2009.
- 5) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, *et al.*, : Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human, *Nature.*, 483 (7389), 350-354, 2012.
- 6) Gotoh C, Hong Y H, Iga T, *et al.*, : The regulation of adipogenesis through GPR120, *Biochem Biophys Res Commun.*, 354, 591-597, 2007.
- 7) Suzuki T, Igari S, Hirasawa A, *et al.*, : Identification of G protein-coupled receptor 120-selective agonists derived from PPARgamma agonists, *J Med Chem.*, 51, 7640-7644, 2008.
- 8) Hara T, Hirasawa A, Sun Q, *et al.*, : Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1), *Mol Pharmacol.*, 75, 85-91, 2009.
- 9) Hara T, Hirasawa A, Sun Q, *et al.*, : Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 380, 247-255, 2009.
- 10) Sun Q, Hirasawa A, Hara T, *et al.*, : Structure-Activity Relationships of GPR120 Agonists Based on a Docking Simulation, *Mol Pharmacol.*, 78, 804-810, 2010.