

研究ノート

日本人における、脂肪酸受容体変異と脂質摂取量、肥満および GLP-1分泌量の関連について

沖嶋 直子

Correlations of Fat Intake, Obesity, Plasma Concentration of GLP-1, and Fatty Acid
Receptor in Japanese

OKISHIMA Naoko

要 旨

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GPR120の一塩基多型(R270H)の肥満への影響が報告されている。しかし、日本人におけるこの多型の肥満との関連や、脂質摂取量等の栄養素摂取状況とこの多型の関連は不明である。そこで、この多型と日本人の肥満の関連を探るため、過去に減量指導を行ったBody Mass Index(BMI)25以上の者24名を対象とし、GPR120(R270H)の解析を行うと共に血漿レプチンならびにGLP-1濃度を定量した。食事摂取状況はBDHQを用いて分析した。血漿レプチン濃度はH型ホモで4265pg/L、H型ホモの被験者に最も近いBMIを持つR型ホモ2名で9001~10761pg/LとH型ホモが低かったが、血漿GLP-1濃度はH型ホモが5.4pmol/Lに対しR型ホモで6.42~6.72pmol/Lと大きな違いは見られなかった。BDHQからはH型ホモにおいてR型ホモよりも過食が示唆されたが、今回の対象者においては、GPR120を介して分泌されるGLP-1は両者で分泌量に違いが少なく、血漿レプチン低値等他の理由が示唆された。

キーワード

GPR120 (R270H) 肥満 脂質摂取量 GLP-1

目 次

- I. 緒言
- II. 研究方法
- III. 結果
- IV. 考察
- V. 結語

文献

I. 緒言

遊離脂肪酸をリガンドとする受容体GPR120が脂質摂取量や肥満に及ぼす影響について報告されている。GPR120は食餌中の中・長鎖脂肪酸、特に、特にn-3系多価不飽和脂肪酸をリガンドとするGPCR (Gタンパク質共役型受容体) であり、ヒトやマウスの腸管に高発現していることが明らかとなっている¹⁾。腸管の他、脂肪細胞、肺、味蕾を含む全身の多くの組織で発現していることも確認されている¹⁾。

この受容体はヒトゲノム計画の進展により、ゲノム配列情報からGPR40等と共に発見されたが、発見当初はそのリガンドが不明なオーファン受容体であった。その後リガンドが遊離脂肪酸であることが明らかになり、その局在や機能が明らかになるにつれて脂質摂取や肥満、食欲調節と関連することが明らかとなっていった²⁾。

GPR120の生理機能としては、グルカゴン様ペプチド (GLP) -1分泌促進やインスリン感受性の上昇、抗炎症作用が明らかにされている。GPR120に遊離脂肪酸が結合することにより、GLP-1やコレシストキニンを分泌すること³⁾、マウス直腸へ遊離脂肪酸を直接投与することにより血漿GLP-1やインスリン濃度が上昇すること⁴⁾、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などn-3系遊離脂肪酸による刺激が抗炎症作用を示すこと⁵⁾ が報告されている。

IchimuraらはGPR120ノックアウト (KO) マウスと野生型マウスにそれぞれ通常食あるいは高脂肪食を与えたところ、通常食では体重増加に有意差は見られなかったが、高脂肪食を与えたマウスでは、KOマウスの体重増加が野生型マウスと比較して有意に高かったことを報告している。さらに、欧州人を対象とした研究では、GPR120の1次構造上の270番目のアルギニン (R) がヒスチジン (H) に置換されているGPR120 (R270H) (National Center of Biotechnology Informationにおけるdb SNP

ID rs116454156) では、Hアレルを持つヒトに肥満が有意に多いことを明らかにした⁶⁾。

このように、マウスではこの遺伝子をノックアウトし、高脂肪食を与えると肥満になることが判明しているが、ヒトにおけるこの多型と脂質摂取量やその他の栄養素摂取量との関連については明らかになっていない。また、遺伝子の多型や変異は人種間で違いがみられるが、日本人においてこの多型の詳細についてはほとんど明らかとなっていない。このような背景から、執筆者がこれまでに肥満と遺伝子多型について研究を行った被験者について、GPR120 (R270H) および脂質摂取量とその質、その他エネルギー源となる栄養素摂取量について検討したので報告する。

II. 研究方法

1. 対象者と倫理的配慮

執筆者が2008年度から2013年度まで減量指導を行っていたBody Mass index (BMI) 25以上の者から、血液サンプル、体格データおよび減量指導前の簡易型自記式食事歴法記入表 (brief-type self-administered diet history questionnaire, BDHQ) による食事調査結果が揃っている者24名を対象とした。研究開始前に、研究内容や苦痛の可能性、個人情報保護の方法、対象者への研究が終了した後も10年間はデータと血液サンプルを保存し、新たな知見が得られた時に再解析すること等について書面と口頭による説明を行い、1日以上熟考期間を持たせた上で、署名および捺印した同意書の提出をもって被験者とした。個人情報を保護するため、BDHQ結果や体重、遺伝子型タイピング結果は全て連結可能匿名化にて管理し、これらのデータは執筆者の指紋認証の必要な外付けHDに保存した。本研究は松本大学研究倫理委員会の承認を受け実施した。

2. ゲノムDNA抽出およびGPR120 (R270H)のタイピング

研究開始時に採取し、-80℃にて保存していた血液サンプルからゲノムDNAを抽出した。抽出試薬にはPrepMan Ultra Reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用い、マニュアル通りに操作した。抽出したDNAを鋳型として、TaqMan 法にてGPR120 (R270H)のタイピングを行った。この変異から5'および3'側いずれも300塩基対程度の塩基配列を、UCSC Genome browserにて検索し、GPR120 (R270H)に近接する変異や多型、リピート配列をマスキングした配列を用いて Custom TaqMan SNP Genotyping Assays, Human (ThermoFisher Scientific)にてプライマープローブ配列作成、オリゴDNA合成を外部委託した。このプライマープローブセットを用いてTaqMan法に則った試薬調製、Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー (ThermoFisher Scientific)によるPCR反応を行い、反応終了後のPCRプレートを Applied Biosystems 7300 Realtime PCR system (ThermoFisher Scientific)にて蛍光色素FAMおよびVICの蛍光強度を読み取り解析を行った。なお、試薬消耗品は全てThermoFisher Scientificの推奨品を使用した。

3. 血漿レプチン濃度およびGLP-1濃度のEnzyme linked Immunosolvent Assay (ELISA)法による定量

研究開始時に採取し、速やかに4℃で冷却しながら遠心分離を行い採取した血漿サンプルは、ELISAによる定量を行うまで-80℃にて保存した。GLP-1、レプチンいずれもペプチドホルモンであったため、実験操作中のペプチド分解を防ぐため、氷上で解凍する際にアプロチニン(和光純薬株式会社、大阪)を1000KIU/tubeで添加した。こ

れを試料として血漿レプチンあるいはGLP-1濃度をELISA法にて定量した。

レプチンの定量には、Human Leptin測定キット-IBL (免疫生物研究所、群馬)を、GLP-1の定量にはGLP-1, Active form Assay Kit-IBL (免疫生物研究所)を用いた。いずれもキット付属の取扱説明書の通りに操作した。吸光度はマイクロプレートリーダー (InfiniteF200, TECAN, Zürich, Switzerland)にて主波長450nm、副波長630nmにて測定した。標準品の吸光度から検量線を作成し、血漿中のレプチンおよびGLP-1濃度を求めた。

4. 食事調査

対象者の減量指導開始前に実施した、BDHQ結果を基に、栄養素および食品摂取量の把握を行った。

Ⅲ. 結果

ジェノタイプング結果を図1に示す。24名の対象者のうち、1名がH型ホモ(変異型ホモ)であった。この対象者はBMIが39.0 (kg/m²)と高度な肥満であった。他の23名中21名はR型ホモ(野生型ホモ)で2名はタイピング不能であった。H型ホモと同等のBMIを持つR型ホモの被験者がいなかったため、今回検討を行ったR型ホモの被験者(BMI 25.1~34.7 (kg/m²))のうち、H型ホモの被験者と最もBMIが近かった2名の被験者[33.3 (kg/m²)および34.7 (kg/m²)]と、血漿レプチン、GLP-1濃度および食事摂取状況の比較を行った。

3名の基本情報を表1に、各被験者のエネルギーおよび栄養素摂取状況を表2に示した。H型ホモではエネルギー充足率が233% (推定エネルギー必要量1981kcal/日に対し、4616kcal/日摂取と推定)であり、推定エネルギー必要量の2倍を超えるエネルギーを摂取していた。一方、R型ホモの2名は88 (推

定エネルギー必要量2125kcal/日に対し、1866 kcal/日) ~119% (推定エネルギー必要量2144 kcal/日に対し、2546kcal/日)であった。

三大栄養素別エネルギー摂取比率(糖質:脂質:たんぱく質)は、H型ホモが62.2:23.8:13.5と摂取比率は適正範囲内であった。R型ホモでは70.0~72.9:13.1~15.8:10.1~11.2であり、適正範

囲内ではあったがH型ホモより脂質およびたんぱく質の比率が低かった。脂質摂取量については、H型ホモが121.8g/日なのに対し、R型ホモでは27.1~44.7g/日であり、エネルギー摂取量と同様に、H型ホモがR型ホモより過剰であった。

また、各脂肪酸の摂取比率については、飽和脂肪酸がH型ホモで26.1%であったのに対し、R型ホ

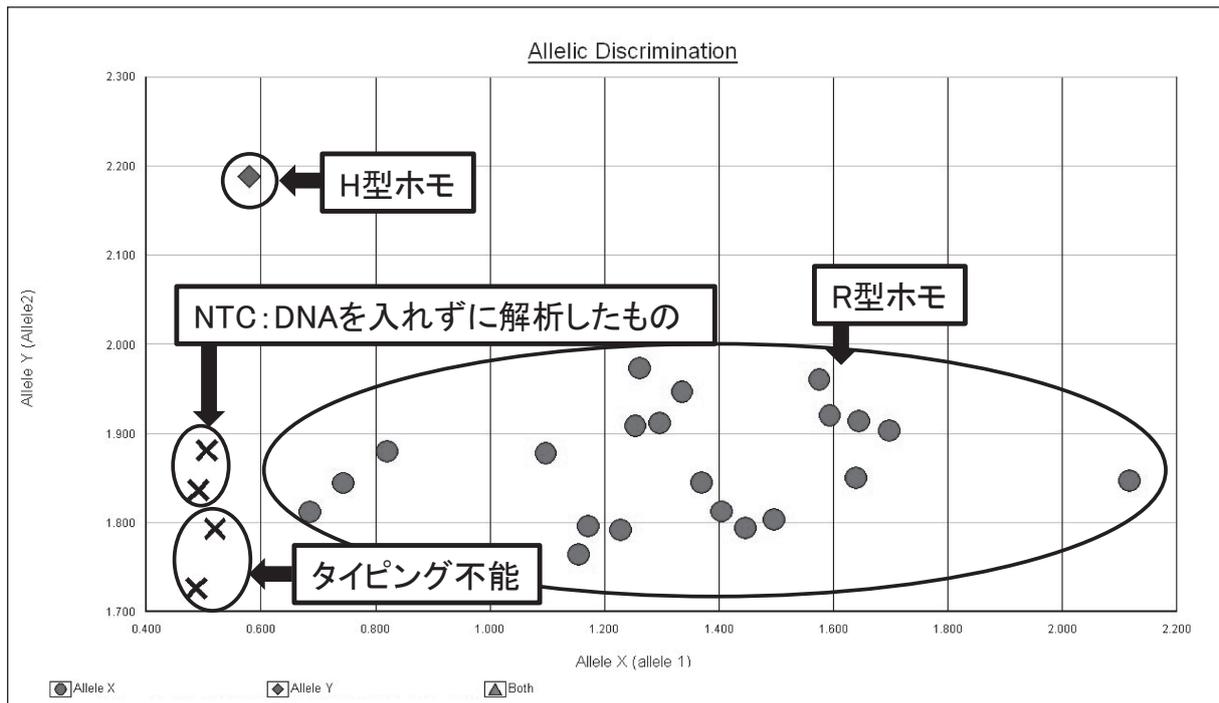


図1. GPR120 (R270H) タイピング結果

表1 被験者の基本情報

遺伝子型	性別	年齢(歳)	身長(cm)	体重(kg)	BMI	推定エネルギー必要量(kcal/日)	エネルギー摂取量(kcal/日)	エネルギー充足率(%)
H型ホモ	女性	34	149.5	87.2	39	1981	4616	233
R型ホモ①	女性	20	158.5	87.1	34.7	2125	1866	88
R型ホモ②	女性	19	150.0	75.0	33.3	2144	2546	119

表2 三大栄養素摂取量およびエネルギー比

遺伝子型	たんぱく質摂取量	たんぱく質エネルギー量	たんぱく質エネルギー比	脂質摂取量	脂質エネルギー量	脂質エネルギー比	糖質摂取量	糖質エネルギー量	糖質エネルギー比
単位	g/日	kcal	%	g/日	kcal	%	g/日	%	
H型ホモ	156.1	624.3	13.5	121.8	1096	23.8	717.8	2871	62.2
R型ホモ①	46.8	187.2	10.0	27.1	244	13.1	340.3	1361	72.9
R型ホモ②	71.5	286	11.2	44.7	402	15.8	445.6	1782	70.0

モでは21.9~24.6%と低い傾向を示した。一価不飽和脂肪酸はH型ホモで34.0%であったのに対し、R型ホモでは36.6~37.0%と高い傾向を示した。多価不飽和脂肪酸は、H型ホモで24.6%であったのに対し、R型ホモで25.8~28.7%と高い傾向を示した(表3)。

各被験者のレプチンおよびGLP-1濃度を表4に示す。血漿レプチン濃度はH型ホモで4265pg/Lであったのに対し、R型ホモでは9001~10761pg/Lと、H型ホモがR型ホモの半分以下の濃度であった。血漿GLP-1濃度はH型ホモが5.4pmol/Lであったのに対し、R型ホモでは6.42~6.72pmol/Lと、H型ホモで若干低い傾向を示した。

IV. 考察

今回見出された1名のH型ホモは、表1に示した通り34歳の女性で、BMIは39.0(kg/m²)と高度な肥満であった。同等のBMIを持つ被験者がR型ホモには存在しなかったため、R型ホモの被験者のうち、一番肥満度が高かった被験者と、そ

れに次いで肥満度が高かった被験者を対照としてBDHQ調査結果を比較した。

その結果、エネルギー充足率はH型ホモで233%と、R型ホモの88~119%と比較しておよそ2倍であった。栄養素別エネルギー摂取比率では、脂質エネルギー比率はH型ホモで高く、R型ホモでは低い傾向を示した。脂肪酸摂取状況では、H型ホモではR型ホモと比較して飽和脂肪酸摂取比率が高く一価、多価脂肪酸摂取比率が低い傾向を示した。これらの結果から、日本人においても、GPR120(R270H)がH型の場合、エネルギーの過剰摂取傾向、特に飽和脂肪酸への嗜好性が高くなり、不飽和脂肪酸への嗜好性が低くなることが推察された。GPR120KOマウスと野生型マウスに高脂肪食を与えると、KOマウスの体重増加が野生型より著しかったことが報告されており⁶⁾、データは示されていないが摂食量が増加している可能性があった。また、GPR120KOマウスではリノール酸等の不飽和脂肪酸の嗜好性が低下し、味蕾細胞を用いた実験からも、リノール酸、 α -リノレン酸、DHA投与後の反応がKOマウスで低下していることが報

表3 脂質の種類別摂取量および摂取比

遺伝子型	動物性脂質摂取量	動物性脂質比	植物性脂質摂取量	植物性脂質比	飽和脂肪酸摂取量	飽和脂肪酸比	一価不飽和脂肪酸摂取量	一価不飽和脂肪酸比	多価不飽和脂肪酸摂取量	多価不飽和脂肪酸比
	g/日	%	g/日	%	g/日	%	g/日	%	g/日	%
H型ホモ	43.0	35.3	78.8	64.7	31.75	26.1	41.44	34	30.03	24.6
R型ホモ①	10.8	39.9	16.3	60.1	6.67	24.6	10.04	37	6.98	25.8
R型ホモ②	18.4	41.2	26.3	58.8	9.77	21.9	16.34	36.6	12.84	28.7

表4 血中生理活性物質濃度

遺伝子型	レプチン (pg/L)	GLP-1 (pmol/L)
H型ホモ	4265	5.4
R型ホモ①	10761	6.42
R型ホモ②	9001	6.72
正常値	7300-8100*	4.9-31.0 [#]

* 文献12より引用

[#] 文献13より引用

告されており⁷⁾、その結果と今回のBDHQ結果は合致していたと考えられる。ただし、BDHQによるエネルギー摂取量の推定は、過少申告、過大申告の可能性を意識する必要がある。今回、R型ホモではいずれの被験者も脂質エネルギー比が低値であったことから脂質摂取量につながる食品の摂取頻度を過少申告していたことが考えられた。さらに、エネルギー充足率が88%と算出されたH型ホモ①については、脂質のみならずエネルギー摂取量自体を過少申告していたか、あるいは、執筆者による減量指導開始前から、脂質を中心にエネルギー源を控える自己流ダイエットを行っていた可能性が考えられた。

食欲は、様々なホルモンや生理活性物質、グルコースや遊離脂肪酸などの化学物質の他、交感神経系、副交感神経系によってもコントロールされている。特に、ホルモンや生理活性物質においては、レプチンやインスリン、グルカゴン等により抑制され、グレリンやニューロペプチドY (NPY)、オレキシン等によって促進される⁸⁾。本研究では、その中からGPR120によりその分泌が促されることが明らかとなっているGLP-1に加え、レプチンの血漿中濃度を定量した。レプチンは、脂肪組織で特異的に産生、分泌されるホルモンであり、摂食抑制作用や、交感神経活動亢進、体温上昇、酸素消費量増加を通じたエネルギー消費量増加作用がある⁹⁾。GLP-1は消化管ホルモンの1種であり、GPR120に遊離脂肪酸が結合することで分泌が促進される。GLP-1には、グルコース依存性インスリン分泌促進、ランゲルハンス島β細胞保護および増殖作用、グルカゴン分泌抑制、胃内滞留物の小腸への輸送抑制の他、中枢性食欲抑制作用があり、現在ではインクレチン関連薬としてGLP-1の分解を抑制する薬 (DPP-4阻害薬) やGLP-1受容体作用薬 (体内で分解されにくいGLP-1アナログ) が糖尿病治療薬としても活用されている¹⁰⁾。今回、GPR120 (R270H) のH型ホモのGLP-1分泌量がR型ホモよりも低いと予想し分析した。しかし、GLP-1分泌量はH型ホモで5.4

pmol/LとR型ホモの平均値 (6.57pmol/L) より18%低い値を示した程度であり、むしろレプチン濃度がR型ホモの50%以下という結果となった。今回の被験者については、GPR120 (R270H) がGLP-1分泌に及ぼす影響については明確な結果を得られなかった。むしろ、この被験者においては、レプチン濃度の低下により摂食が促進され続けていることがエネルギー摂取過剰の原因であると考えられた。

次に、この遺伝子型の日本人における発現頻度を求めた。H型の頻度を計算すると、タイピング出来た者23名中1名がH型ホモであったことからMinor allele frequencyは0.04 (百分率で4%) であった。他施設からの報告では、Waguriらが、健康診断受診者1338名を対象として調査した結果、H型ホモはおらず、1名のヘテロを見出していた¹¹⁾。この結果から導き出されるMinor allele frequencyは0.0004 (百分率では0.4%) であり、多型ではなく変異のレベルであった。執筆者の結果で頻度が高かったのは対象者数が少なかったためであると考えられ、日本人におけるH型の頻度としてはWaguriらの調査結果がより現実的であり、日本人においては、GPR120 (R270H) は遺伝子多型ではなく遺伝子変異であり、しかもその頻度は極めて低いものであると推察された。

Ichimuraらの報告では、フランスおよびドイツの肥満者 (6942名) およびその家族で標準体重の者 (7654名) のGPR120 (R270H) のタイピングを行った結果、欧州人におけるMinor allele frequencyは、肥満者本人で0.024 (百分率では2.4%)、その家族で標準体重の者では0.013 (百分率では1.3%) であったことから、欧州人では日本人と違い、GPR120 (R270H) が遺伝子多型であり、肥満者でその頻度が高くなることから、肥満に影響していることが推察されている⁵⁾。

Waguriらは、ヘテロであった受診者のBMIを調べたところ、BMIは25.7 (kg/m²) と軽度の肥満であったと報告している¹¹⁾。執筆者が見出した被験

者はH型ホモであり、結果で示した通り脂質摂取量のうち飽和脂肪酸の摂取率が多くなっていた。このことから、Hアレルが1つであるヘテロでは肥満への影響は少ないが、Hアレルが2つになることで肥満へより影響する可能性が考えられた。

V. 結語

今回の研究結果および他施設の結果から、欧州人と異なり、日本人においてはGPR120 (R270H)におけるHアレルの頻度は極めて低く遺伝子変異のレベルであること、ヘテロでは肥満に及ぼす影響が限定的であるが、R型ホモではよりこの遺伝子変異の影響が強く表れ、脂質摂取量や肥満へ及ぼす影響が大きくなる可能性が示唆された。このメカニズムについては、GLP-1の分泌低下が予想されたが、血中GLP-1濃度測定結果には明確な差が見られず、GLP-1分泌量の低下以外の要因もあることが示唆された。

謝辞

本研究は、平成25年度および26年度 松本大学 学術研究助成を受け実施した。また、本研究を行うにあたって、平成25年度卒業生である石曾根未幸さんが卒業研究の一環で携わってくれたことに深謝する。

文献

- 1) 平澤明, 原貴史, 市村敦彦, 辻本豪三, 「消化管脂肪酸受容体とその生理作用」『薬学雑誌』131, 1683-1689 (2001).
- 2) Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S. and Tsujimoto G. "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120" *Nat. Med.*, 11, 90-94 (2005).
- 3) Paeker H.E., Habib A.M., Rogers G.J., Gricc F.M. and Reimann F. "Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells" *Diabetologia*, 52, 289-298 (2009).
- 4) Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S. and Tsujimoto G. "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120" *Nat. Med.*, 11, 90-94 (2005).
- 5) Oh D.Y., Talukdar S., Bee E.J., Imamura T., Morinaga H., Fan W.Q., Li P., Lu W.J., Watkins S.M. and Olefsky J.M. "GPR120 in an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin sensitizing effects" *Cell*, 142, 687-698 (2010).
- 6) Ichimura A., Hirasawa A., Tsujimoto G., Froguel P. et al., "Sysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human" *Nature*, 483, 350-354 (2012).
- 7) Cartoni C., Yasumatsu K., Ohkuri T., Shigemura N., Yoshida R., Godinot N., Couter J.I. Ninomiya Y. and Damak S. "Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120" *J. Neurosci.*, 30, 8376-8382 (2010).
- 8) 児島将康, 齋藤祐見子: 実験医学(増刊), 29, 656-664 (2011).
- 9) 吉田俊秀: 日本女性心身医学会雑誌, 6, 169-172 (2001).
- 10) 田中千賀子, 加藤隆一, 成宮周編, NEW薬理学改定第7版, 南江堂, pp536 (2017).
- 11) Waguri T., Goda T., Kasezawa N. and Yamanaka-Kobayashi K. "The combined effects of genetic variations in the GPR120 gene and dietary fat intake on obesity risk" *Biomed. Res.*, 34, 69-74 (2013).
- 12) Murakami K., Sasaki S., Takahashi Y., Uenishi K., Yamasaki M., Hayabuchi H., Goda T., Oka J., Baba K., Ohki K., Watanabe R. and Sugiyama Y. "Nutrient and food intake in relation to serum leptin concentration among young Japanese women" *Nutrition*, 23, 461-468 (2007).

- ¹³⁾ S.Calanna, M.Christensen, J.J.Holst, B.Laferrère, L.L.Gluud, T.Vilsbøll and F.K.Knop." Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies" *Diabetologia*, 56, 965-972 (2013).