

【要約】

Role of GPR52 in the regulation of lipogenesis in liver

(肝臓のGPR52の脂質合成制御における役割)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：三木 隆司教授)

和田 光生

GPR52 は、恒常的活性化能を有する Gs 共役型のオーファン GPCR である。生体では、線条体に高発現しており、ドーパミンシグナルを制御することによって認知機能や統合失調症の発症に関与することが報告されている。しかし、GPR52 は他の組織でも発現しているが、それらの組織での役割は不明であるため本研究ではその生理機能を明らかにすることを目的とした。

Gpr52^{-/-}マウスの表現型を解析したところ、野生型マウスと比べて痩せを示し、脂肪（精巣上体脂肪、鼠径部皮下脂肪及び褐色脂肪細胞）や肝重量が低値であることが分かった。しかしながら、*Gpr52*^{-/-}及び野生型マウスの摂餌量や自発運動量は正常であり、*Gpr52*^{-/-}マウスの痩せはエネルギー摂取量の減少や過活動によるエネルギー消費量の増加に起因しないことが示唆された。一方、生体における主要なインスリン標的組織である脂肪組織と肝臓の重量低下が認められたため、*Gpr52*^{-/-}マウスのインスリン感受性を解析した。経口糖負荷試験において *Gpr52*^{-/-}マウスは、耐糖能は正常であったものの著明にインスリン分泌が抑制されていたため、インスリン感受性の亢進が示唆された。そこで、インスリン投与後の脂肪組織及び肝臓のリン酸化 Akt をウェスタンブロットにより解析した結果、両組織とも *Gpr52*^{-/-}マウスは野生型に比べてリン酸化 Akt の有意な増加を示した。

次に、ヒト及びマウスの組織 RNA を用いて GPR52 の発現解析を実施した。ヒト組織では、既報の通り脳に高い発現を認めたものの肝臓や脂肪組織にも発現していた。ヒト肝由来細胞株 HepG2 細胞にも肝臓と同等の発現が認められ、GPR52 は肝細胞に発現することが示唆された。マウス組織でも同様に脳その他、肝臓や脂肪組織での発現が認められた。脂肪組織内の発現を詳細に調べた結果、マクロファージや血管等の stromal vascular fraction (SVF) よりも成熟脂肪細胞に発現していた。以上の結果から、*Gpr52* は肝細胞や脂肪細胞において脂質合成を制御している可能性が考えられた。そこで、脂肪組織（精巣上体脂肪、鼠径部皮

下脂肪及び褐色脂肪細胞) 及び肝臓における *de novo* 脂質合成遺伝子の発現を qPCR によって解析した。その結果、*Gpr52*^{-/-}マウス精巣上体脂肪組織において *Scd1*、*Elovl6* 等の主要な脂肪酸合成酵素やコレステロール合成の律速酵素 *Hmgcr* の発現が有意に低下していた。また、*Gpr52*^{-/-}マウスの肝臓では、*Hmgcr* の有意な発現低下が認められた。この結果から、*Gpr52*^{-/-}マウスでは精巣上体脂肪組織及び肝臓での *de novo* 脂質合成が低下していることが示唆されたため、¹⁴C-酢酸を用いた組織培養によって *ex vivo* での *de novo* 脂質合成を解析した。遺伝子発現変化と同様、*Gpr52*^{-/-}マウス脂肪組織では、野生型に比べて脂肪酸合成の低下傾向並びに有意なコレステロール合成の低下を認めた。*Gpr52*^{-/-}マウス肝臓でも同様の結果であった。

GPR52 による脂質合成制御機構を詳細に検討するため、ヒト肝由来細胞株 HepG2 細胞を用いて control siRNA (Cont-HepG2) 処理または GPR52 siRNA 処理によって内在性 GPR52 を knock-down (KD)した条件 (GPR52 KD-HepG2) で、合成 GPR52 アゴニスト (c11) による刺激を行い、細胞内 cAMP 濃度、*de novo* 脂質合成並びに脂質合成遺伝子の発現を解析した。Cont-HepG2 では c11 は濃度依存的に細胞内 cAMP 濃度を増加させたが、GPR52 KD-HepG2 では抑制され、HepG2 細胞内在性の GPR52 が機能していることが示された。次に、*de novo* 脂質合成を解析した結果、Cont-HepG2 において c11 は濃度依存的に脂肪酸合成を増加させたが、GPR52 KD-HepG2 ではその効果が消失していた。一方、コレステロール合成に関しては、Cont-HepG2 において c11 の効果はほとんど認められなかったが、GPR52 KD-HepG2 では基礎合成レベルが低下していた。これらの結果から、GPR52 の恒常的活性は *de novo* コレステロール合成促進に寄与する一方、リガンド依存的活性は *de novo* 脂肪酸合成を促進すると考えられた。さらに、詳細なメカニズムを明らかにするため脂質合成遺伝子の発現を解析した。Cont-

HepG2において c11 は濃度依存的に脂肪酸合成酵素の *SCD1* 及び *ELOVL6* の発現を増加させ、その作用は GPR52 KD-HepG2 で抑制された。このことから、リガンド依存的な GPR52 活性化は、少なくとも *SCD1* 及び *ELOVL6* を介して *de novo* 脂肪酸合成を促進することが示唆された。さらに、Cont-HepG2 での *HMGCR* の発現は c11 によって増加したのに対し、GPR52 KD-HepG2 では c11 の作用が抑制されるとともに、*HMGCR* の基礎発現レベルも低下していた。*HMGCR* 発現は、GPR52 のリガンド依存的な刺激だけでなく、GPR52 発現量によっても制御されていることが示唆され、*de novo* コレステロール合成には *HMGCR* 以外の酵素の寄与が大きい可能性が考えられた。

このように *Gpr52* は、脂肪酸合成遺伝子 (*Scd1* 及び *Elovl6*) の発現を介して *de novo* 脂肪酸合成を制御していると考えられた。そこで、*Gpr52*^{-/-}マウスは過剰な脂質摂取時に肝臓の中性脂肪 (TG) 蓄積が抑制されるのではないかとの仮説を立て、肥満やインスリン抵抗性、さらに脂肪肝が惹起される高脂肪食負荷モデルを用いて検証した。*Gpr52*^{-/-}マウスは、高脂肪食においても野生型に比べて有意な体重低下を示したものの、正常食と比較した体重増加率は野生型と *Gpr52*^{-/-}マウスで大きな違いはなく、*Gpr52*^{-/-}マウスにおいても高脂肪食により肥満が誘導された。しかしながら高脂肪食による空腹時インスリン値の上昇は、*Gpr52*^{-/-}マウスで著明に抑制されており、高脂肪食によるインスリン抵抗性誘導は減弱していた。そこで、経口糖負荷試験を実施したところ、*Gpr52*^{-/-}マウスは野生型に比べて血糖値は低下傾向を示し、血漿インスリン値は著明に低下した。したがって、*Gpr52*^{-/-}マウスは高脂肪食時のインスリン抵抗性が減弱していると考えられた。次に、脂肪肝発症に対する作用を解析した。野生型マウスの肝重量は、正常食に比べて高脂肪食によって増加したが、*Gpr52*^{-/-}マウスでは有意に抑制されていた。さらに、*Gpr52*^{-/-}マウスでは高脂肪食による肝臓中 TG 含量の増加が野

生型に比べて有意に抑制されていた。このことから、Gpr52 は高脂肪食による脂肪肝の誘導に関わっていることが示唆された。高脂肪食は、様々な脂肪酸合成酵素の遺伝子発現を誘導し、脂肪肝の発症につながるということが報告されている。そこで、Gpr52^{-/-}マウスの脂肪酸合成関連遺伝子の発現を解析した結果、野生型マウス肝臓では、高脂肪食によって Scd1 及び Elovl6 の発現が著明に増加したが、Gpr52^{-/-}マウス肝臓ではその増加が消失していた。また、野生型マウス肝臓の Acc1 及び Acc2 は、高脂肪食によって著明な増加は認められなかったが、Gpr52^{-/-}マウス肝臓でのこれらの遺伝子発現は野生型に比べて低下傾向であった。さらに、高脂肪食による Scd1 や Elovl6 発現誘導の分子機構を検討するため、これらの遺伝子の発現制御に寄与することが知られる Srebp1c 及び Pparg2 の発現量を解析した。その結果、Srebp1c 発現は Gpr52^{-/-}と野生型マウスの間で明らかな違いは認められなかったものの、興味深いことに Pparg2 発現は野生型マウス肝臓で高脂肪食によって著明に増加したのに対し、Gpr52^{-/-}マウス肝臓では、その増加が消失していた。したがって、Gpr52 は高脂肪食条件において活性化され Pparg2 発現誘導を介して *de novo* 脂肪酸合成酵素である Scd1 や Elovl6 の発現に関わっていると考えられた。

以上の結果から、GPR52 はリガンド依存的に脂肪酸合成を促進し、リガンド非依存性の恒常的活性化を介しコレステロール合成を促進すると考えられた。また、高脂肪食負荷時には、Pparg2 を介した Scd1 や Elovl6 などの *de novo* 脂肪酸合成酵素の発現誘導により、肝臓への脂肪蓄積に重要な役割を担っていることが明らかになった。