

総説特集：「うま味と味覚嗜好性」

腸内環境感受による消化管ホルモン分泌調節機構

坪井 貴司・原田 一貴

(東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系)

小腸上皮に存在する小腸内分泌L細胞は、消化管内の様々な物質、血中に含まれる生理活性物質や神経伝達物質を感知して、消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) を分泌する。近年の分子生物学やイメージング手法の発展により、GLP-1分泌を制御する機構の詳細が明らかになってきた。特に蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングによって得られた知見を元にして、小腸内分泌L細胞の腸内環境感受による消化管ホルモン分泌機構について考察する。

キーワード：インクレチン、インスリン、グルカゴン様ペプチド-1、小腸内分泌L細胞、ライブセルイメージング

はじめに

我々が摂取した食物の成分を最初に感知するのは舌の味蕾の内部に存在する味細胞である。味細胞では、味覚受容体やイオンチャネルが味覚センサーとして機能し、味覚情報を脳へ伝達する。その結果、摂食行動を引き起こす。一方、消化管には、味細胞と同様に味覚センサーが発現しており、食物に含まれる成分にตอบสนองして消化管ホルモンを分泌する内分泌細胞が存在する。これらは消化管内分泌細胞と呼ばれ、胃のX/A様細胞、小腸の δ 細胞、K細胞、L細胞などがある。中でも小腸下部に多く存在する小腸内分泌L細胞（以下、L細胞）は、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) を分泌する。

GLP-1は、膵 β 細胞に作用してグルコース濃度依存的に起こるインスリン分泌を増強する以外にも¹⁾、迷走神経系や中枢神経系に作用し、食欲を抑制する²⁾。そのため、GLP-1受容体アゴニストやGLP-1を分解するジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4: DPP-4) に対する阻害剤は、2型糖尿病治療薬として用いられている^{3, 4)}。

一方、L細胞からのGLP-1分泌を食習慣の改善によって向上できれば、より低コストの2型糖尿病治療の確立につながる可能性がある。そこで、L細胞が食物に含まれるどのような物質を感知してGLP-1を分泌するのか、その詳細な分子機構の解明が試みられてきた。

L細胞からのGLP-1分泌

L細胞は、主に小腸下部の空腸から回腸に存在しており、微絨毛を持つ頂端部が管腔側に、基底部が毛細血管や迷走神経に面した「開放型」細胞である。そのためL細胞からのGLP-1分泌は、管腔側と基底膜側の両方面からの分泌調節因子によって制御される。

このGLP-1は、膵 α 細胞から分泌されるグルカゴンと類似したペプチド構造を持つことから「腸管グルカゴン」(enteroglucagon)と当初呼ばれていた。GLP-1は、前駆体タンパク質であるプログルカゴンからプロホルモン変換酵素1/3によって切断され産生される⁵⁾。

食後に血中GLP-1濃度が上昇することから、管腔内に存在する食物由来成分が分泌制御因子ではないかと考えられ、その作用機序の解明が行われてきた。例えば生体にとって最も重要なエネルギー源であるグルコースは、GLP-1分泌促進作用を持つ⁶⁾。種々の脂肪酸やアミノ酸もGLP-1分泌を促進する^{7, 8)}。さらに食物由来成分以外にも、摂食により胆のうから管腔内へ分泌される胆汁酸がGLP-1分泌を促進することや⁹⁾、腸内細菌によって産生されるインドールがGLP-1分泌を抑制することも明らかになった¹⁰⁾。

基底膜側由来の分泌制御因子としては、副交感神経由来のアセチルコリンが、GLP-1分泌を促進する¹¹⁾。一方、小腸内分泌S細胞や膵 δ 細胞から分泌されるソマトスタチンは、GLP-1分泌を抑制する¹²⁾。さらに腸クロム親和性細胞から分泌されるセロトニンは、GLP-

Incretin hormone secretion from enteroendocrine cells by gastrointestinal environment sensing

Takashi Tsuboi, Kazuki Harada

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8902, Japan

TEL/Fax: 03-5465-8208 E-mail: takatsuboi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

1 分泌を促進する¹³⁾。

これらの研究は、マウス個体や L 細胞由来株細胞を用いた GLP-1 の生化学的測定、パッチクランプ法などの電気生理学的解析、蛍光カルシウム指示薬を用いたカルシウムイメージング法などによって行われてきた。一方我々は、細胞膜近傍の蛍光分子を特異的に観察できる全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy: TIRFM) を用いてホルモン分泌の動態や¹⁴⁾、cAMP、cGMP、グルコースといった細胞内シグナル分子やエネルギー分子の動態を可視化できる生細胞イメージング技術を駆使し¹⁵⁻¹⁷⁾、これまで腸内環境感受による消化管ホルモン分泌調節機構の一端を明らかにしてきた。

蛍光イメージング手法を用いた GLP-1 分泌メカニズム

1. L-オルニチン依存性 GLP-1 分泌機構の解析

マウス L 細胞由来細胞株 GLUTag 細胞を用いて、アミノ酸が GLP-1 分泌へどのような影響を与えるのか解析を行った。GLP-1 は、プログルカゴンからプロセシングによって切り出されるため、蛍光タンパク質を直接 GLP-1 に融合させることは困難である。そこで、分泌顆粒に局在すると考えられる他のペプチドホルモンに GFP を融合して細胞に遺伝子導入し、抗 GLP-1 抗体を使ってその細胞内局在を比較した。その結果、組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: tPA) が GLP-1 と高い共局在率を示した。tPA-GFP を遺伝子導入した GLUTag 細胞を TIRFM で観察すると、tPA-GFP 由来の蛍光が輝点として観察され、輝点の蛍光強度が一過的に上昇したのち、拡散しながら消失する開口分泌反応が可視化された。

そこで L-オルニチンを GLUTag 細胞に投与すると、tPA-GFP の開口分泌頻度が増加し、その頻度は GLP-1 分泌量とも高い相関を示した。また蛍光カルシウム指示薬を用いた観察から、L-オルニチン投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇した。RT-PCR 法により、GLUTag 細胞にアミノ酸受容体の一種 GPRC6A (G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A) が mRNA レベルで発現していることを見出し、GPRC6A のアンタゴニストによって $[Ca^{2+}]_i$ および GLP-1 分泌量が抑制された。さらに、低分子干渉 RNA (small interference RNA: siRNA) によって GPRC6A の発現を抑制した場合も、同様に $[Ca^{2+}]_i$ および GLP-1 分泌量が抑制された。以上のことから、L-オルニチン依存的な GLP-1 分泌は、GPRC6A により制御されていることが明らかとなった¹⁸⁾。

2. リゾホスファチジルイノシトール依存性 GLP-1 分泌機構の解析

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール (lysophosphatidylinositol: LPI) は、細胞移動や開口分泌に関与しており、肥満症や糖尿病患者において血中濃度上昇が認められている¹⁹⁾。さらに、LPI を感受する G タンパク質共役型受容体 GPR55 は、膵 β 細胞においてインスリン分泌に関与する²⁰⁾。しかし、L 細胞における GPR55 の発現や、インスリン分泌を制御するホルモンである GLP-1 と LPI の関係は未解明であった。

我々は LPI の投与により GLUTag 細胞内で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することを見出した。また GLUTag 細胞およびマウス急性単離初代培養小腸において、LPI 投与による GLP-1 分泌量の増加を見出した。さらに RT-PCR 法により、GLUTag 細胞において GPR55 の発現を mRNA レベルで見出した。GPR55 のアンタゴニスト投与や、siRNA を用いた GPR55 の発現抑制により、LPI による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された。

また、イオンチャネルの一種 transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TRPV2) を阻害、または siRNA によって発現抑制すると、LPI による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および GLP-1 分泌が抑制された。GFP を融合させた TRPV2 (TRPV2-GFP) を GLUTag 細胞に遺伝子導入し、TIRFM を用いて観察を行ったところ、LPI の投与に伴う細胞膜の蛍光強度上昇が観察され、TRPV2 の細胞膜への移行が示唆された。またこの反応は、GPR55 の阻害によって抑制された。

以上の結果は、L 細胞において、LPI により GPR55 が活性化され、TRPV2 が細胞膜へ移行することで持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、GLP-1 分泌を促進することを示唆する²¹⁾。

3. キニーネおよび S-エクオールによる GLP-1 分泌制御機構の解析

苦味物質であるキニーネを経口投与したラットでは、体重増加抑制効果が見られ、その効果は苦味による食欲減退とは異なるものだと報告されている²²⁾。また、S-エクオールは大豆イソフラボンのダイゼインが *Lactococcus garvieae* などの乳酸菌に代謝されて生じる物質で、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進することが報告されている²³⁾。そこで、消化管に取り込まれたキニーネや腸内で産生された S-エクオールが、GLP-1 分泌の促進を介して体重増加抑制やインスリン分泌を引き起こしている可能性を考え、キニーネおよび S-エクオールが GLP-1 分泌に与える影響の解明を試みた。

GLUTag 細胞においてキニーネや S-エクオールの投

腸内環境感受による消化管ホルモン分泌調節機構

与により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られたにもかかわらず、GLP-1の分泌量は増加しなかった。TIRFMを用いてtPA-GFP顆粒の動態を解析すると、キニーネやS-エクオール投与によって顆粒が細胞膜に接近するものの、細胞膜に係留されたまま膜融合に至らなかった。

蛍光標識ファロイジンを用いたGLUTag細胞のアクチン染色の結果、キニーネやS-エクオールによりアクチン重合が促進していることが示唆された。アクチン重合によりGLP-1分泌顆粒の膜融合が抑制され、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみではGLP-1分泌は起こらないことが示唆された。膵β細胞からのインスリン分泌において、分泌時には $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみだけでなく、細胞内cAMP濃度 $[cAMP]_i$ 上昇も起こることが知られている。そこで、GLP-1分泌においても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇だけでなく $[cAMP]_i$ 上昇も必要である可能性が考えられた。我々が最近開発した赤色蛍光タンパク質cAMPセンサーPink Flamindo¹⁵⁾をGLUTag細胞に導入し、アデニル酸シクラーゼの活性化剤フォルスコリンをキニーネに続けて投与した際の $[cAMP]_i$ 動態を解析したところ、キニーネ単体では観察されなかった $[cAMP]_i$ 上昇が誘発され、GLP-1分泌反応が増加した。

以上のことから、キニーネやS-エクオールは $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすが、同時にアクチン重合を促進し、GLP-1分泌には至らないこと、またGLP-1の分泌には $[Ca^{2+}]_i$ と $[cAMP]_i$ の両者が協同的に上昇する必要があることが示唆された^{24, 25)}。

まとめ

我々のこれまでの研究結果から、小腸内分泌L細胞からのGLP-1分泌は、 Ca^{2+} やcAMPなどの細胞内シグナル分子だけでなく、細胞骨格やイオンチャネルによって厳密に制御されていることが明らかになった(図1)。今後は、今回見出された現象が生体中の消化管内分泌細胞においても起こっているかを検証するために、体内深部の消化管や内分泌器官での*in vivo*イメージング法を確立するなどし、これまで解明できなかった腸内環境感受による消化管ホルモン分泌機構の解明を目指したい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、東京大学大学院総合文化研究科坪井研究室の修了生、特に大屋愛実、阪口秀和、佐田尚子と国立成育医療研究センター研究所の中村和昭の各氏の協力のもとに行われた。またマウスを用いた実験については、東京大学動物実験指針に基づき、動物実験委員会の承認を得て行った。

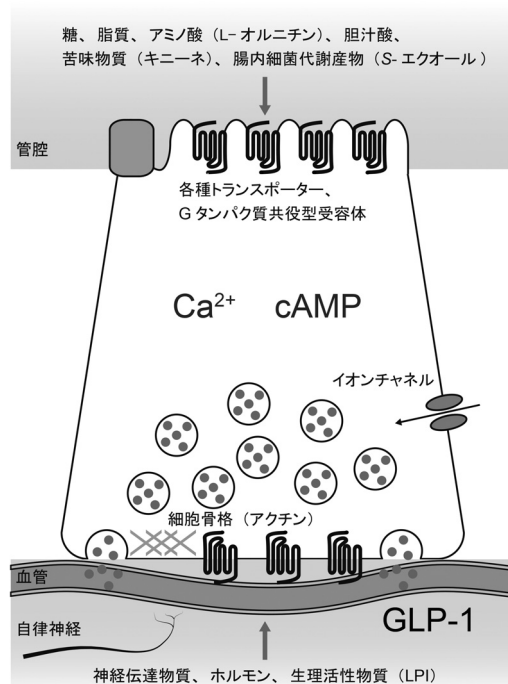


図1 小腸内分泌L細胞におけるGLP-1分泌制御機構の模式図

管腔および基底膜側由来の様々な生理活性物質をL細胞上の受容体などが感知し、 Ca^{2+} やcAMPなどの細胞内シグナル分子、細胞骨格、イオンチャネルの協同作用によってGLP-1分泌が厳密に制御される。

文献

- 1) Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, Pipeleers D, Gremlich S, Thorens B and Schuit F: Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* 45, 257-261 (1996)
- 2) Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen J A, Maestre O, Gomez R, Munoz R M, Eng J and Blazquez E: Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49, 709-717 (2000)
- 3) Eng J, Kleinman W A, Singh L, Singh G and Raufman J P: Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267, 7402-7405 (1992)
- 4) Villhauer E B, Brinkman J A, Naderi G B, Burkey B F, Dunning B E, Prasad K, Mangold B L, Russell M E and Hughes T E: 1-[[[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]

- 2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J Med Chem* 46, 2774-2789 (2003)
- 5) Bell G I, Santerre R F and Mullenbach G T: Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302, 716-718 (1983)
 - 6) Reimann F, Habib A M, Tolhurst G, Parker H E, Rogers G J and Gribble F M: Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8, 532-539 (2008)
 - 7) Conigrave A D and Brown E M: Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract II. L-Amino acid sensing by calcium-sensing receptors: implications for GI physiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 29, G753-G761 (2006)
 - 8) 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. *Nature Medicine* 11, 90-94 (2005)
 - 9) Brighton C A, Rievaj J, Kuhre R E, Glass L, Schoonjans K, Holst J, Gribble F M and Reimann F: Bile acids trigger GLP-1 release predominantly by accessing basolaterally located G protein-coupled bile acid receptors. *Endocrinology* 156, 3961-3970 (2015)
 - 10) Chimere C, Emery E, Summers D K, Keyser U, Gribble F M and Reimann F: Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep* 9, 1202-1208 (2014)
 - 11) Anini Y, Hansotia T and Brubaker P L: Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* 143, 2420-2426 (2002)
 - 12) Hansen L, Hartmann B, Mineo H and Holst J J: Glucagon-like peptide-1 secretion is influenced by perfusate glucose concentration and by a feedback mechanism involving somatostatin in isolated perfused porcine ileum. *Regul Pept* 118, 11-18 (2004)
 - 13) Ripken D, van der Wielen N, Wortelboer H M, Meijerink J, Witkamp R F and Hendriks H F J: Nutrient-induced glucagon like peptide-1 release is modulated by serotonin. *J Nutr Biochem* 32, 142-150 (2016)
 - 14) Tsuboi T, Zhao C, Terakawa S and Rutter G A: Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Curr Biol* 10, 1307-1310 (2000)
 - 15) Harada K, Ito M, Wang X, Tanaka M, Wongso D, Konno A, Hirai H, Hirase H, Tsuboi T and Kitaguchi T: Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. *Sci Rep* 7, 7351 (2017)
 - 16) Matsuda S, Harada K, Ito M, Takizawa M, Wongso D, Tsuboi T and Kitaguchi T: Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5 α . *ACS Sens* 2, 46-51 (2017)
 - 17) Mita M, Ito M, Harada K, Sugawara I, Ueda H, Tsuboi T and Kitaguchi T: Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells. *Anal Chem* 91, 4821-4830 (2019)
 - 18) Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F M and Tsuboi T: The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J Biol Chem* 288, 4513-4521 (2013)
 - 19) Moreno-Navarrete J M, Catalan V, Whyte L, Diaz-Arteaga A, Vazquez-Martinez R, Rotellar F, Guzman R, Gomez-Ambrosi J, Pulido M R, Russell W R, Imbernon M, Ross R A, Malagon M, Dieguez C, Fernandez-Real J M, Fruhbeck G and Nogueiras R: The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61, 281-291 (2012)
 - 20) McKillop A M, Moran B M, Abdel-Wahab Y H A and Flatt P R: Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol* 170, 978-90 (2013)
 - 21) Harada K, Kitaguchi T, Kamiya T, Aung KH, Nakamura K, Ohta K and Tsuboi T: Lysophosphatidylinositol-induced activation of the cation channel TRPV2 triggers glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine L cells. *J Biol Chem* 292, 10855-10864 (2017)
 - 22) Cettour Rose P, Bezençon C, Darimont C, Le Coutre J and Damak S: Quinine controls body weight gain without affecting food intake in male C57BL6 mice. *BMC Physiol* 13, 5 (2013)
 - 23) 堀内寛子, 白井理絵, 原田直樹: インスリン分泌に及ぼすエクオールに関する研究. 大豆たんぱく質研究 17, 169-173 (2014)
 - 24) Harada K, Sakaguchi H, Sada S, Ishida R, Hayasaka Y and Tsuboi T: Bitter tastant quinine modulates glucagon-like peptide-1 exocytosis from clonal GLUTag enteroendocrine L cells via actin reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* 500, 723-730 (2018)

腸内環境感受による消化管ホルモン分泌調節機構

25) Harada K, Sada S, Sakaguchi H, Takizawa M, Ishida R and Tsuboi T: Bacterial metabolite *S*-equol modulates glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine

L cell line GLUTag cells via actin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* 501, 1009-1015 (2018)

<著者紹介>

坪井 貴司 (つぼい たかし)

2001年 浜松医科大学大学院医学系研究科博士課程修了 博士(医学)
2001年 ブリストル大学医学部博士研究員
2004年 ブリストル大学医学部米国青少年糖尿病研究財団(JDRF)研究員
2005年 独立行政法人理化学研究所基礎科学特別研究員
2007年 東京大学大学院総合文化研究科准教授
2017年 東京大学大学院総合文化研究科教授



原田 一貴 (はらだ かずき)

2014年 東京大学教養学部生命・認知科学科 卒業
2019年 東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了 博士(学術)
2019年 東京大学大学院総合文化研究科助教



