

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06639

研究課題名(和文) 肥満に対して環境因子および生体内ケトン体利用経路が果たす生理・病理的寄与の解明

研究課題名(英文) The physiological and pathological contributions of environmental factors and ketone body utilization to obesity.

研究代表者

山崎 正博 (Yamasaki, Masahiro)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80328921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、環境由来物質である臭化難燃剤が肥満とそれに伴う代謝異常に關与する可能性が報告されている。申請者らが見出したケトン体利用酵素(AACS)は、脂肪細胞の肥大化や食事誘導性肥満に關与することが明らかになっている。本研究では、広く使用されている臭化難燃剤であるTBBP-Aが培養脂肪細胞に与える影響を検討した。その結果、TBBP-Aは未分化な脂肪細胞の脂質ケトン体利用経路を活性化し、同時に褐色脂肪細胞的因子の誘導とケトン体放出量の上昇をもたらした。これらの結果は、臭化難燃剤TBBP-Aがケトン体利用経路と脂質分解の双方に影響を与え、そのバランスを乱す環境由来物質である可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、臭化難燃剤として広く使用されているTBBP-Aが、脂肪細胞の脂質-ケトン体に代謝に影響を与え、環境由来物質である可能性が明らかとなった。また、その指標が従来は脂質代謝の余剰物質としてしか見られなかったケトン体であること、申請者らのグループが独自に見出したケトン体利用酵素AACSがそれに深く關与することは、本研究の独自性を示すとともに、既存の研究グループでは明らかにし得なかったデータを多く含んでいることを示している。従って、今回明らかになったTBBP-Aの新たな作用の詳細な検討は、環境汚染が人間にもたらす新たなリスクを解明していくうえで、極めて大きな社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have suggested that exposure to brominated flame retardants (BFR) may play a pivotal role in the development of obesity and metabolic disorder in liver. Ketone bodies produced by β -oxidation are utilized by acetoacetyl-CoA synthetase (AACS), the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme. Previously, we reported that gene expression of AACS is upregulated in high-fat diet-induced obesity. Here, we examined the effects of BFR, tetrabromobisphenol A (TBBP-A), on gene expressions in adipocyte cell lines. Treatment with TBBP-A did not reveal any remarkable effects on lipid accumulation and mRNA expression of AACS and lipogenic factors in differentiated cells. In contrast, in undifferentiated cells, mRNA expression was upregulated for the lipid and ketone body utilizing factors and brown adipose tissue (BAT) related factors. These results suggest that TBBP-A may dysregulate lipid metabolism during ketone body utilization via AACS in undifferentiated adipocytes.

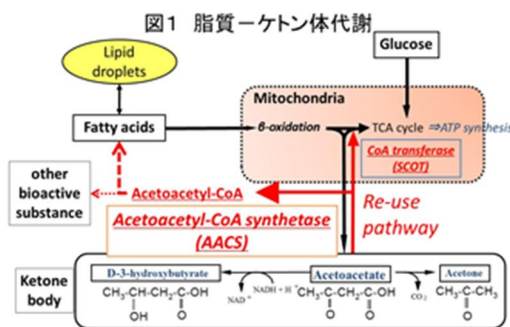
研究分野：分子生物学

キーワード：臭化難燃剤 アセトアセチルCoA合成酵素 脂肪細胞 褐色脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は糖尿病をはじめとした多くの代謝性疾患の病因となる生活習慣病最大のリスクファクターとして知られるが、肥満の程度と疾病リスクは性差や人種によって大きく異なる。この肥満と生活習慣病のリスクの関連性の強弱を決定づける鍵となる因子(キーファクター)はいくつか候補があるものの、不明な部分が多く残されている。申請者は、血中に存在するケトン体とその利用経路がキーファクターの一つではないかと考えている。

ケトン体は、糖尿病や飢餓など細胞内で糖質の利用が出来ない異常時に、脂質代謝が代替的に上昇する結果血中に放出される代謝副産物として捉えられてきた。しかし近年、ケトン体が生理状態でも積極的に利用されることが明らかとなってきている。我々はこれらのケトン体利用過程で重要な役割を果たす酵素として acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) を新規に同定した()。AACS は、ケトン体であるアセト酢酸を特異的に活性化する新規のリガーゼである。従来、ケトン体代謝酵素として知られていた CoA 転移酵素 (SCOT) と異なり、申請者が注目する AACS はサイトゾルに局在する。そのため、AACS は細胞内のケトン体をサイトゾルに存在する生体物質の合成経路、例えばコレステロールや脂質、アセチル基を有する物質などに振り分ける新たな経路への導入酵素であると考えられる(図1参)



実際に申請者らの研究により、本酵素は肝臓・脳・脂肪組織などの脂質代謝の盛んな組織に存在しており、プラバスタチンやコレステラミン等の高コレステロール血症の治療薬によって誘導されること()、肝臓での遺伝子発現を抑制することで血中コレステロール量が有意に減少すること()が明らかになっている。さらに、本酵素遺伝子は脂肪細胞分化中期に発現が大きく誘導され、この際に脂肪酸代謝を制御する転写因子 C/EBP- が関与することが明らかとなった()。以上のことから、本酵素はコレステロールや脂肪酸などの脂質の代謝に深く関わる酵素であると言える。

肥満と AACS の関係性については、高脂肪食性肥満において雄の皮下脂肪組織で肥満の度合いに応じて AACS 遺伝子の発現上昇が起きているが、遺伝的肥満モデルである Zucker fatty rat の脂肪組織では逆に発現量が減少することを明らかにしている()。さらに、AACS は脂肪組織において夜間に発現量が増大し、昼間には減少するサーカディアンリズムを持つことや、本酵素が皮下部脂肪組織の遺伝子発現に顕著な性差が存在することなど、環境に発現が左右されるも明らかにした()。また、脂肪組織において、雄では性的成熟に伴い著しい発現上昇を見せ、男性ホルモンにより遺伝子発現が誘導されることも明らかにしている()。従って、本酵素が肥満の程度や生活習慣病の発症率の性差にも重要な役割をもつ可能性が高い。一方、脳でも摂食中枢である弓状核で発現が特異的に減少すること、培養神経細胞である N41 細胞でレプチンシグナルにより発現誘導されることを明らかにしている()。

以上のことから、本酵素を介したケトン体利用経路が、生体内外の環境を反映し、肥満の成因に深く関与する因子であることが予想される。

(2) 最近乳幼児期に有機臭素系難燃剤 (BFR : Brominated Flame Retardant) に暴露することが肥満の増悪に関わるという報告がある。 BFR は電子基板や建材など樹脂製品などに添加されることで、対象物を容易には燃えないようにするハロゲン化合物であり、先行して使用されていた塩素系難燃剤と比べ環境負荷が低いことから世界中で使用されている。一方で脂溶性が高いことなどから、hexabromo-cyclododecan (HBCD) のように肝毒性などが高く使用に寄生がかかっている者も多い。実際、HBCD は肥満の増悪に関与するという報告がある()。先に述べたように、脂質合成に関わる AACS が脂肪組織において成長に伴い発現誘導されることを合わせて考えると、AACS は BFR のような脂質に富む組織の毒性に関わる環境汚染物質の感受性因子である可能性が考えられた。そこで、複数の BFR について、培養細胞を用いて AACS に影響するものがないかスクリーニングを行ったところ、tetrabromobisphenol-A (TBBP-A) が脂肪細胞における AACS の遺伝子発現を誘導する作用を持つ可能性が示された。 TBBP-A は BFR の中でも広く使用されており、性ホルモンや甲状腺ホルモンなど幾つかのホルモンに影響する報告があるものの、基本的に低毒性の BFR として知られている。一方で、TBBP-A は土壌や水中、ハウスダストなど広く環境中から検出されており、その人体への影響を精査することは社会的にも意義があると考えている。

2. 研究の目的

現在までに申請者の研究グループでは、BFR の一種である TBBP-A は脂肪組織においてケトン体利用酵素 AACS の遺伝子発現を誘導することを明らかにしており、同時に複数の脂質代謝

酵素がそれに連動する可能性も明らかにしてきた。一方、申請者は AACS を介したケトン体利用経路は、過食や運動不足などエネルギー過多の状態にあるときにバイパスとして活性化し、酸化で生じたケトン体によるケトシスを防ぐとともに、脂肪酸の分解・再合成のサイクルを意図的に繰り返し、ある意味で“ATP の無駄遣い”を意図的に起こすことで、余剰なエネルギーをより効率的に消費する役割があると仮説を立てている。

従来、余剰な栄養分はクエン酸を経て脂質に変換されるとされてきた。しかし、AACS を介したケトン体利用経路は、余剰な脂質の消費で生じるケトン体をサイトゾルで直接活性化出来ることから、多くの酵素と介在因子を要するクエン酸経路に比べて脂質代謝の変動に即応できる経路である可能性が高い。

以上の見解を踏まえ、申請者は本研究において、環境因子、特に臭化難燃剤 TBBP-A に着目し、培養脂肪細胞を中心に TBBP-A が AACS を中心とした脂質-ケトン体代謝経路や、脂肪細胞の分化関連因子に与える影響の解析を行うことで、TBBP-A が環境由来因子として生体に与える影響を明らかにすることを主たる目的として以下の実験を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 臭化難燃剤が脂肪細胞の遺伝子発現に与える影響の検討：複数の臭化難燃剤が脂肪細胞における脂質蓄積と AACS の遺伝子発現に与える影響を培養脂肪細胞 3T3-L1 および ST-13 細胞を用いて検討した。10%仔牛血清 (CS) 添加 DMEM/F12 培地で維持した各脂肪芽細胞に対し、10%ウシ胎児血清 (FBS) に交換の上で IBMX/Dex を 48 時間処理することで分化を誘導し (induction 群) その後 10%FBS 及び Insulin 添加培地下で 4 日間培養後、臭化難燃剤 (テトラプロモビスフェノール A : TBBP-A、及びデカプロモジフェニルエーテル : DBDE) を 48 時間処理し、RT-PCR 法にて各種遺伝子発現を検討した。

対照として、同期間 10%CS 添加培地で培養した ST-13 及び 3T3-L1 脂肪芽細胞 (control 群) 並びに脂質を蓄積しないマウス皮膚メラノーマ細胞である B16F10 細胞、白血病細胞株である HL60、破骨細胞系である RAW264、神経芽細胞腫由来の Neuro-2a 細胞を用いた。

(2) 脂肪細胞からのケトン体放出に関する検討：分化誘導後もしくは未分化な状態の ST-13 脂肪細胞に対し、上記と同様に TBBP-A を 48 時間処理した後、培養上清を回収し、酵素測定法を用いて培地中の総ケトン体量を測定した。また、細胞処理前の血清添加培地についても同様に測定を行って差を求めることで、TBBP-A 処理 48 時間における細胞からのケトン体産生あるいは消費量に対する臭化難燃剤の影響を検討した。

(3) ケトン体代謝酵素発現抑制下での脂肪細胞に与える臭化難燃剤の影響の検討：アデノ随伴ウイルスベクターを用いた AACS ノックダウン培養細胞系、及び CRISPR-Cas9 系を用いた AACS ノックアウトマウスの構築を目指した。

4. 研究成果

(1) 培養脂肪細胞 3T3-L1 および ST-13 細胞を用いて TBBP-A について詳細に検討を行ったところ、成熟脂肪細胞で AACS の遺伝子発現、脂肪滴の質的・量的変化は認められなかった (Fig. 1)。

更に、この時 AACS や CoA 転移酵素 (SCOT) 脂肪酸合成酵素 (FAS) などとも検討したが、堅調な影響は認められなかった。

一方、未分化な脂肪芽細胞では、AACS の遺伝子発現が有意に上昇した。しかし、もう一つのケトン体利用酵素である SCOT の発現には TBBP-A の影響は認められなかった。更に、脂肪細胞の油滴形成に関わるペリリピン-1 や FAS の発現も誘導されたことから、TBBP-A によって脂肪細胞の脂質-ケトン体経路が全般に誘導される可能性が明らかになった。その際、脂肪細胞分化マーカー (PPAR γ) は変動が認められなかったことから、これらの影響は TBBP-A が脂肪細胞の分化を促したことによる二次的な影響である可能性は低いと考えられる。対照として用いた皮膚系統の B16F10 細胞、骨系統の RAW264 細胞、血球系統の HL60 細胞、および神経系統の Neuro-2a 細胞 () では、TBBP-A による顕著な影響は認められなかった。

更に、脂肪細胞の分化に関わる因子について検討を行ったところ、未分化な白色脂肪細胞株である ST-13 細胞であるにもかかわらず、TBBP-A により褐色脂肪細胞における脂質液滴融合と脂質蓄積を制御する CIDEA (Cell Death Inducing DFFA Like Effector A) や、褐色脂肪細胞特異的因子の転写制御に関わる LSD-1 (lysine-specific demethylase 1)、PRDM-16 などの遺伝子発現が誘導

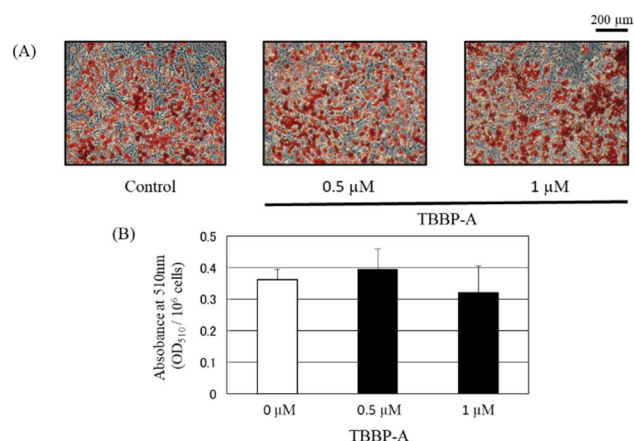


Fig.1 Effects of TBBP-A on lipid accumulation and ketone body metabolism in differentiated adipocytes

ST-13 cells were differentiated using MIX-medium and treated with BFRs for 48 hr. A: Oil red-O staining was performed to differentiate lipid droplets in cells treated with TBBP-A or PBS (control).

B: Quantification of the stained lipid droplets was performed using the eluted Oil red O stain and measuring absorbance at 510 nm. Each bar represents the mean ± SD (n = 4).

された (Fig.3)。また、これらの因子の下流にある脱共役タンパク質 (UCP) ファミリーの 1, 3 の発現も誘導されており、TBBP-A が前駆脂肪細胞の褐色脂肪細胞化 (ベージュ化) を引き起こす可能性が示唆された。

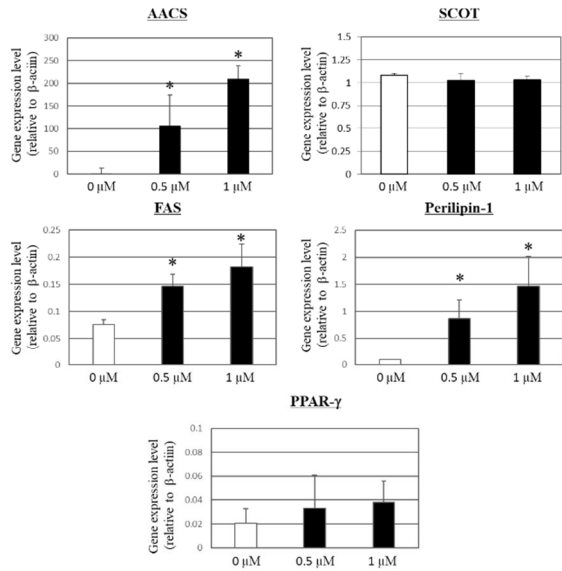


Fig.2 Effects of TBBP-A on lipid and ketone body metabolism in un-differentiated adipocytes
RT-PCR analysis for AACS and other enzymes in undifferentiated ST-13 cells treated with TBBP-A or PBS.

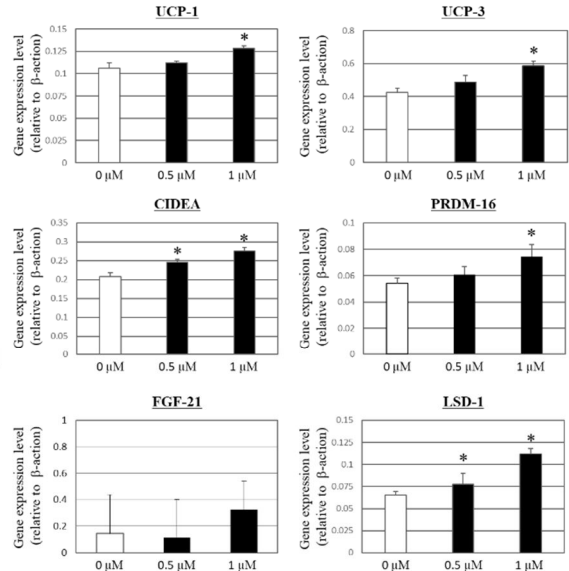


Fig.3 Effects of TBBP-A on gene expressions of BAT specific factors in undifferentiated adipocytes
A: RT-PCR analysis for BAT specific factors in undifferentiated ST-13 cells treated with TBBP-A or PBS (0 μM). β-actin was used for standardizing amount of gene expression levels.

(2) TBBP-A が脂肪細胞のベージュ化に関わるのであれば、内在脂質の酸化に伴い生じるケトン体の産生量も上昇すると考えられる。しかし、Fig.3 に示したように肝細胞でケトン体産生を促すことが知られている FGF-21 は、脂肪細胞である ST-13 細胞では TBBP-A の影響を受けなかった。そこで、実際に TBBP-A 処理中の培地へのケトン体放出量を測定した。その結果、分化誘導した ST-13 細胞由来の培養上清では、総ケトン体含量に有意な影響は認められなかったが、未分化な ST-13 細胞由来の培養上清では、TBBP-A の濃度に依存的に総ケトン体含量の増加が認められた (Fig.4)。

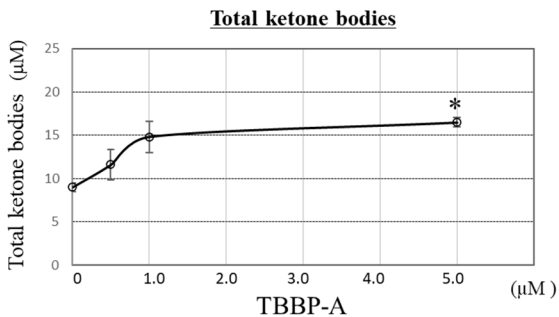


Fig.4 Effects of TBBP-A on gene expressions of BAT specific factors in undifferentiated adipocytes
The concentration of total ketone bodies (μM) in culture medium of cells treated with TBBP-A for 48 hr. Each bar represents the mean ± SD (n = 4). *p < 0.05 compared with 0 μM TBBP-A.

これらの結果から、TBBP-A は未分化な脂肪細胞において、AACS-FAS 経路を介して脂質合成へケトン体を誘引するとともに、UCPs の発現誘導による脂質消費も促し、そのトータルバランスとして細胞外へのケトン体放出量を上昇させる可能性が示唆された。

ここまでのデータは、本年に BPB report 誌に纏めて報告した ()。

(3) 申請者の研究グループでは、CRISPR-Cas9 系を用いた AACS ノックアウトマウスを構築し、AACS 欠損が生体に与える影響を検討している。実際、肝臓においては、レグミンなどの翻訳後修飾などに影響する可能性を明らかにしている ()。また、海外との共同研究より、ヒトにおいて小児脳症で AACS 遺伝子の変異があることも見出しており () TBBP-A が AACS を介して他の組織に影響を与えている可能性も考えられる。そこで、本実験系を用いた初代培養系細胞による検討を行った。しかし、得られた胎児由来線維芽細胞 (MEF) が少なく、十分な n 数が採れなかったため、明確なデータは得られなかった。これは、AACS 欠損マウスは周産期に死亡する例が多く、雌雄の比率にも偏りがあることに起因しており、現在その点を含めて実験系の再検討を行っている。

以上の結果は、本邦で使用されている臭化難燃剤である TBBP-A が、未分化な脂肪細胞において脂質 - ケトン体代謝を活性化するとともに、脂肪細胞のベージュ化を誘発する因子である可能性を示唆している。褐色脂肪細胞では、白色脂肪細胞と異なり脂質の β 酸化による消費が盛んであり、それに伴うケトン体の産生も盛んである。TBBP-A によって、褐色脂肪組織特異的因子が発現誘導されるだけでなく、実際に細胞外へのケトン体放出も向上させたことは注目すべき結果である。即ち、ケトン体利用酵素である AACS と脂肪酸合成酵素 FAS の発現上昇と、UCP の酸化活性化によるケトン体生成が、TBBP-A により同時に活性化しているということ、更に

そのバランスがケトン体生成側に傾いていることが、本研究から明らかになった。これらのことは、未分化な脂肪細胞において、本来の代謝系とは大きく異なる、異所性の脂質代謝が促されている可能性を強く示唆している。

また本研究で得られた知見は、TBBP-Aは脂肪細胞の分化段階によって肥満毒性が違う可能性も示唆している。即ち、脂肪組織内において、その脂溶性の高さから成熟脂肪細胞に蓄積した臭化難燃剤 TBBP-A は、周辺の未分化な細胞群に対して持続的に作用し、ケトン体だけでなく他の因子の血中放出へ影響する可能性が高く、これによって筋肉を始めとする他の組織に対してインスリン抵抗性の誘引などを引き起こしている可能性も考えられる。

以上、本研究により本邦で使用されている臭化難燃剤 TBBP-A が、脂質・ケトン体代謝経路に影響する環境由来物質である可能性が示唆された。今後は本研究を継続していく上で、他の組織との関係性を明らかにするため、*in vivo* の実験系の構築を早急に行う予定である。

< 引用文献 >

- T. Fukui et al. *Eur. J. Biochem.* (1982)
- H. Sato et al. *Biochem Pharmacol* (2002)
- S. Hasegawa et al. *Mol. Genet. Metabol.* (2012)
- S. Hasegawa et al. *Biochim. Biophys. Acta* (2008)
- M. Yamasaki, et al. *European J. Lipid Sci. and Tech.* (2007)
- M. Yamasaki et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005)
- M. Yamasaki et al. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes* (2008)
- R. Narishima et al. *Obesity* (2009)
- R. Yanagisawa et al. *Environ Health Perspect.* (2014)
- Hasegawa S. et al, *BBRC* (2018)
- M. Yamasaki et al. *BPB report* (2021)
- Hasegawa S. et al, *FEBS Lett.* (2016)
- T.U.J. Bruun et al., *Genet. Med.* (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Shinya, Imai Masahiko, Yamasaki Masahiro, Takahashi Noriko, Fukui Tetsuya	4. 巻 495
2. 論文標題 Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 652 ~ 658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.11.068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Masahiro, Hasegawa Shinya, Imai Masahiko, Fukui Tetsuya, Takahashi Noriko	4. 巻 4
2. 論文標題 Browning Effect of Brominated Flame Retardant, TBBP-A, on Undifferentiated Adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 41 ~ 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.4.1_41	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 正博, 長谷川 晋也, 今井 正彦, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 (TBBP-A) が分化前後の脂肪細胞の脂質 - ケトン体代謝経路へ与える影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 正博, 長谷川 晋也, 今井 正彦, 高橋 典子
2. 発表標題 培養脂肪細胞へ臭化難燃剤 (TBBP-A) が与える影響の細胞分化前後での比較検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 正博, 松本 莉奈, 宮脇 祐太, 守屋 俊治, 八柄 雅子, 長谷川 晋也, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤TBBP-Aによる白色脂肪細胞の質的变化とケトン体利用経路への影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 正博, 清田 龍毅, 春園 莉咲, 新聞 由希乃, 宮地 さき, 今井 正彦, 長谷川 晋也, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤TBBP-Aによる白色脂肪細胞の脂質-ケトン体代謝経路への影響の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 正博, 長谷川 晋也, 今井 正彦, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 (TBBP-A) が前駆脂肪細胞の脂質 - ケトン体代謝経路へ与える影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 正博, 長谷川 晋也, 今井 正彦, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤 (TBBP-A) が前駆脂肪細胞の脂質-ケトン体代謝経路へ与える影響の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 正博, 長谷川 晋也, 今井 正彦, 高橋 典子
2. 発表標題 臭化難燃剤TBBP-Aが培養脂肪細胞の脂質・ケトン体代謝に対して与える影響の検討
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------