

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504016

研究課題名(和文) 脂肪酸 酸化系の臓器特異性に関する基盤構築

研究課題名(英文) The basic investigation on the organ differences of fatty acid beta-oxidation system

研究代表者

白田 信光 (USUDA, Nobuteru)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30135123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高脂血症による引き起こされる動脈硬化と脂肪肝は、虚血心疾患や肝硬変などの重篤な生活習慣病のリスクファクターとなる。細胞内における脂質代謝の改善により、高脂血症の予防と治療が行える可能性がある。ミトコンドリア脂肪酸酸化系は全ての脂肪酸を異化し、エネルギー産生で中心的な役割を演ずるが、未解明の部分が多い。全身臓器・培養細胞を材料として、分布とPPARを介する代謝制御について調べ、生理的な意義を研究した。

研究成果の概要(英文)：Hyperlipidemia is one of the causes of arteriosclerosis and fatty liver, which are risk factors of ischemic heart diseases and hepatic cirrhosis. The improvement of fatty acid metabolism can prevent and treat hyperlipidemia. All kinds of fatty acid are catabolized by mitochondrial fatty acid beta-oxidation system, which play central roles in energy production, however, needs further elucidation. Its physiological significance was investigated by studying the localization and the metabolic regulation by transcription factors PPARs, by employing whole body tissues and primary cultured cells from various organs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：栄養科学 脂肪酸 酸化系 臓器特異性

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病、特に 2 型糖尿病においては、高血糖に高脂血症が伴い、結果として動脈硬化がもたらされ、虚血心疾患のリスクファクターとなっている。さらに、高脂血症により引き起こされる脂肪肝は肝硬変などのさらに重篤な病態へすすむ。投薬とともに食事・運動による統合的治療により、いまや国民病ともいえるメタボリック症候群の早期病態において、高脂血症の是正により国民の健康度が圧倒的に改善される可能性がある。

脂質改善効果を示す治療機序は、細胞外でおこる血中リポ蛋白の改善を中心に考えられている。一方、細胞内においては、心臓系の脂質沈着における細胞内代謝の重要性を考慮する必要性が示されている。脂肪酸酸化系 (FAOS) は、肝細胞において、エネルギー産生に加え産物であるケトン体による他臓器へのエネルギー源の供与を行う。ミトコンドリアとペルオキシゾームの 2 種の細胞小器官に存在する代謝系であり、全ての脂肪酸に共通した異化代謝系である。

2 つの細胞小器官にそれぞれ 2 系統の計 4 つの脂肪酸酸化系が局在して、脂肪酸の構造に対応する代謝を行う。その異常は肝臓を含む様々な臓器に脂肪沈着をもたらす。ペルオキシゾームの系については、全身の細胞における分布、核内受容体 PPAR を介した酵素誘導機構が明らかになってきているが、意外なことに、圧倒的に重要と考えられるミトコンドリア脂肪酸酸化系について、肝臓以外の臓器については、調節機構・基質特異性、その有無さえも十分調べられていないといえる。

## 2. 研究の目的

肝臓外の臓器において、脂肪酸酸化系を視点として脂質質異化エネルギー産生機構を、分子・細胞レベルにおいて明らかにし、高脂血症・臓器内脂質沈着是正における脂肪酸酸化系の栄養学的な学術基盤を形成することを目指す。動物組織と培養細胞を用いて、細胞内：栄養代謝系の動態、細胞外：栄養代謝産物の濃度、細胞間：細胞機能維持における相互作用の解析を、脂肪酸酸化系を中心に行う。具体的には、全身の肝臓および肝臓外臓器・培養細胞について、脂肪酸酸化系酵素の抗体アレイ (約 30 種類の脂肪酸酸化系および関連する蛋白質群) を用い、酵素蛋白質の分布を定量的に解析する。各種の初代培養細胞 (肝細胞、アストロサイト、神経細胞、セルトリ細胞、線維芽細胞) を用いて *in vitro* probe assay IVPA 法により脂肪酸酸化能を測定して、臓器特異性を検出する。初代培養細胞、神経幹細胞等からの分化誘導実験により臓器特異性の成立過程を調べる。ラットの初代培養細胞を対象として、脂肪酸酸化系の PPAR を介する代謝制御の臓器差を検討した。さらに、脂肪酸酸化系酵素欠損症のヒト線維芽細胞を対象として、

PPAR を介する代謝制御がヒト細胞においても可能であるか検討する。以上によってミトコンドリアとペルオキシゾームの脂肪酸酸化系の臓器特異性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### A. 材料

1. 各種臓器：肝臓と肝臓外臓器、全身臓器をラットより採取する。胎生から老化に至る各階の組織を用いる。

2. ラット培養細胞：初代培養が可能な様々なラット細胞と FAOS の薬剤による誘導が報告されている肝臓癌細胞 H4-II-E-C3 を用いた。初代培養細胞：アストロサイト、神経細胞、セルトリ細胞、線維芽細胞

3. ヒト線維芽細胞：ヒト皮膚から初代培養線維芽細胞を得た。

4. 神経幹細胞：分化過程を調べる確立した方法として、神経幹細胞から神経細胞・星状膠細胞・希突起膠細胞に分化する過程での PPAR、FAOS 発現と脂肪酸代謝能の変化を調べる。

B. 個体と培養細胞への薬剤投与：薬剤等により個体と培養細胞の脂肪酸酸化系を制御してエネルギー産生・細胞障害性との関係を知る。脂肪酸酸化系を中心とした遺伝子発現における bezafibrate とその他の PPAR アゴニストである DEHP, ciprofibrate, clofibrate の効果を検討した。

### C. 解析方法

(1) 分子レベルでの網羅的代謝解析

酵素蛋白：脂肪酸代謝酸化系酵素等に対する抗体群 (抗体パネル) を使用したウエスタンブロット法による網羅的酵素蛋白検出

遺伝子発現の検出：qt-PCR, DNA microarray, RNA-seq による網羅的遺伝子発現の定量。

(2) 代謝能の測定：種々の構造の脂肪酸を用いた酵素活性測定、培地中の代謝産物の測定。

(3) 形態：抗体パネルを使用した免疫組織化学

(4) 細胞レベルでの脂肪酸代謝能解析：IVPA 法：細胞培養培地をブドウ糖・遊離脂肪酸フリーとして、carnitine と脂肪酸を添加して一定時間培養後、産生される培地中の C8 acylcarnitine をペルオキシゾーム、C14、C16 acylcarnitines をミトコンドリア脂肪酸酸化系の指標として、タンデムマス質量分析装置により網羅的に代謝産物を検出し、代謝機能を調べる。非放射性同位元素を用いた。ATP 産生能：ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用して細胞内 ATP を測定し細胞のエネルギー産生の指標とする。

## 4. 研究成果

(1) ラット全身臓器におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系の分布：約 30 種類の抗体

を用いて、ウェスタンブロットを行い酵素量の半定量を行った。第3段目の酵素、HADH を例示する(図1)。調べた全ての酵素が全身の器官に分布した。しかし、神経系では例外的に検出不能であった。アイソザイムが3種類知られている。TFP と HADH2 であるが、TFP は HADH と同様に神経系では検出不能であった。一方、HADH2 は神経系にも分布した(図2)。ミトコンドリア脂肪酸酸化系は、中枢神経系を除く全身の器官に共通する代謝系であることが示された。中枢神経系には、ミトコンドリア脂肪酸酸化系は存在しないといわれてきているが、HADH2 の存在(図3)は新たに、中枢神経系におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系の存在意義の再検討の必要性を示していると考えられる。

図1：全身臓器における HADH 酵素蛋白量

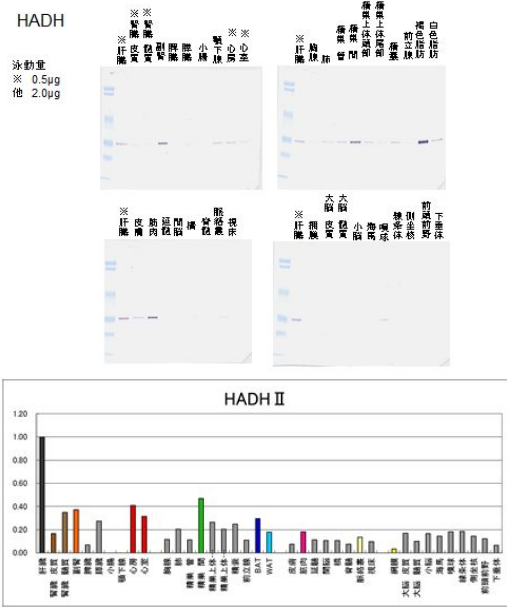


図2：全身臓器における HADH2 酵素蛋白量

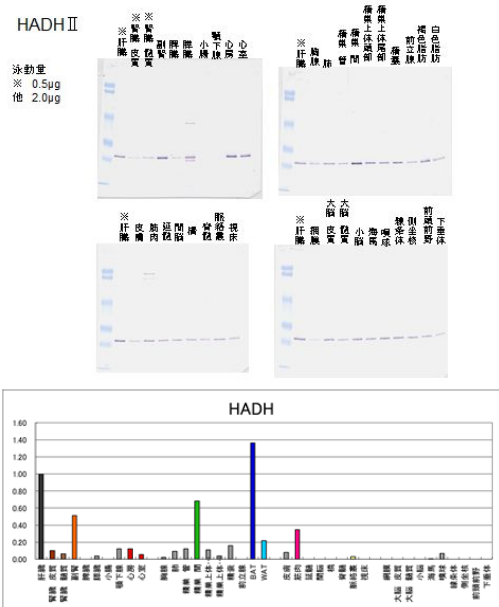
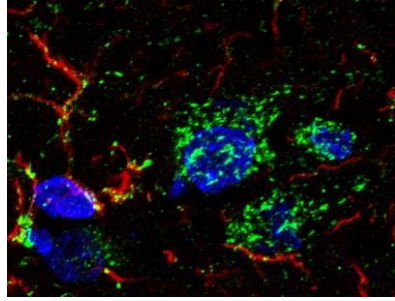


図3：大脳皮質における HADH2 の局在



(2) ラット初代培養細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系:初代培養が可能な4種類の細胞(図1-4)についてによる酵素量測定、蛍光抗体法、qt-PCR 法による遺伝子発現量の定量、IVPA 法を行った。ミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素蛋白質・遺伝子発現は、4種類の細胞に共通して陽性であった。量的には、繊維芽細胞・セルトリ細胞・星状神経膠細胞では肝臓組織の5から10分の1程度である(図5, 7)。一方、神経細胞においては、ごく微量で20分の1程度であり(図6, 8) 蛍光抗体法も陰性であった。IVPA 法は4種類の細胞でいずれも陽性であった(図9)。HADH2 については、神経細胞において蛍光抗体法・ウェスタンブロット法・qt-PCR は陽性であった。神経幹細胞では、初代培養細胞神経細胞に比べ酵素量は多く、初代培養細胞神経細胞においては突起の伸長とともに酵素量が減少した。

図1：繊維芽細胞 酵素 T1 の局在

図2：セルトリ細胞 酵素 T1 の局在

図3：星状神経膠細胞 酵素 T1 の局在

図4：神経細胞 酵素 HADH2 の局在

図1

図2

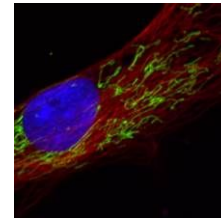
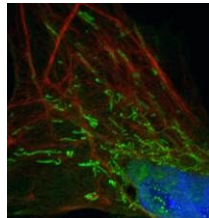


図3

図4

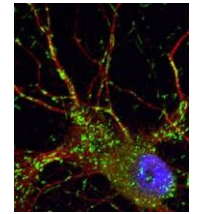
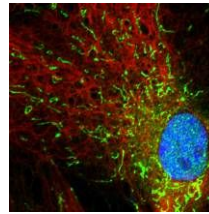


図5：星状神経膠細胞の酵素量

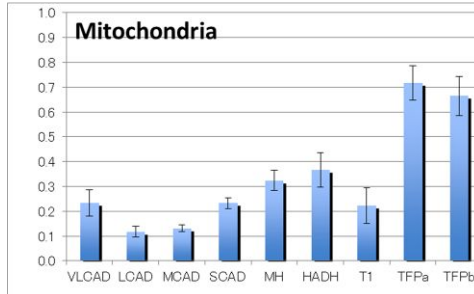


図 6 : 神経細胞の酵素量

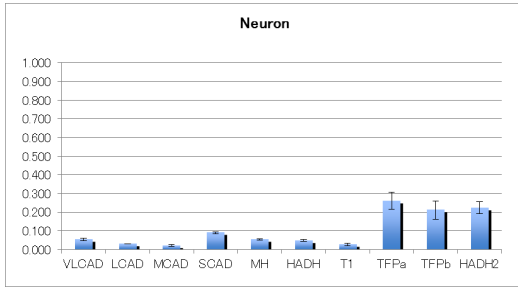


図 7 : 星状神経膠細胞の遺伝子発現

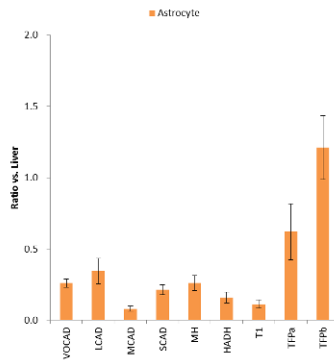


図 8 : 神経細胞の遺伝子発現

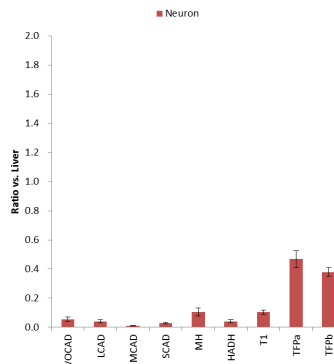
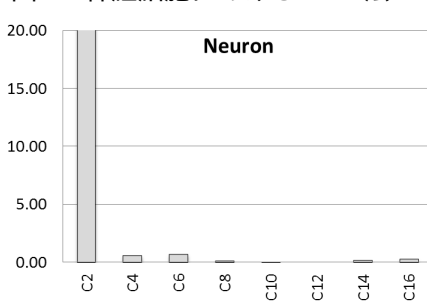


図 9 : 神経細胞における IVPA 法



(3) ラット初代培養細胞繊維芽細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系誘導：培養細胞への薬剤投与を行った。複数の peroxisome proliferators を投与して比較すると、酵素蛋白質については bezafibrate 投与による TFP の誘導がはっきり示されたが、他の酵素についてははっきりした増加はなかった。遺伝子発現については bezafibrate では CPT1 の誘導が示されたものの、TFP の誘導は示されなかった(図 1)。意外なことに ciprofibrate (図 2) による誘導は観察されないなど、薬剤による差が大きかった(表 1)。

peroxisome proliferators によるミトコンドリア脂肪酸酸化系誘導は肝臓外の組織・細胞において引き起こされるものの、その範囲については今後のさらなる研究を要する。  
図 1 : Bezafibrate 投与時の各酵素の遺伝子発現の qt-PCR による解析

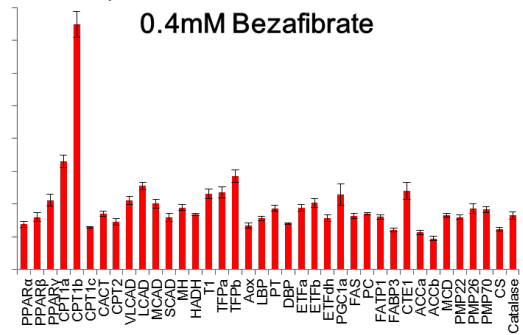


図 2 : Ciprofibrate 投与時の各酵素の遺伝子発現の qt-PCR による解析

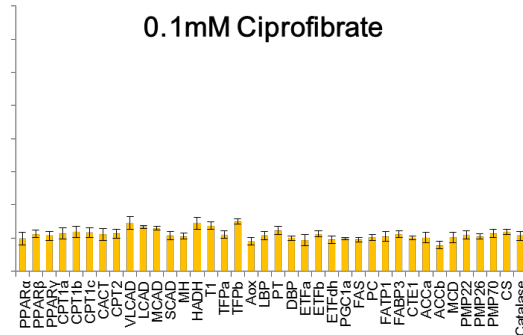


表 1 : 各種 peroxisome proliferators により誘導される酵素遺伝子の差

	CPT1a	PPARa	PPARg	PCG1a	T1	TFPb	ETFa	ETFb	Catalase
Bezafibrate	++					+			
Clofibrate*									
Ciprofibrate*									
Fenofibrate*		++	++			+	+	+	+
WY14643*	++			+	+				+

(4) ヒト初代培養細胞繊維芽細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系誘導：qt-PCR により bezafibrate 投与時の遺伝子発現を調べると、ミトコンドリア脂肪酸酸化系の酵素遺伝子は一通り誘導される傾向があるが、その程度は小さかった(図 1)。ラットの初代培養細胞繊維芽細胞で観察された、酵素蛋白質 TFP と遺伝子 CPT1 の誘導は、ヒトでは示されなかった。さらに広範に遺伝子発現を検索するために、RNA-seq により網羅的な解析を行ったが、目立った発現量増加を示す遺伝子は観察されなかった。qt-PCR と RNA-seq の結果を比較すると、qt-PCRの方が RNA-seq に比べて感度が高いことが示された(表 1)。これらの解析をミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素欠損症の細胞についても行ったが、bezafibrate で顕著な誘導を受ける酵素遺伝子は現在のところ示されていない。bezafibrate がミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素欠損症の患者さんの症状改善と培養線維芽細胞における IVPA 法において有効になるような変化は、ミトコンドリア脂肪酸

酸化系のどこに作用するかについて今後のさらなる研究を要する。

図 1 : Bezafibrate 投与時の各酵素の遺伝子発現の qt-PCR による解析

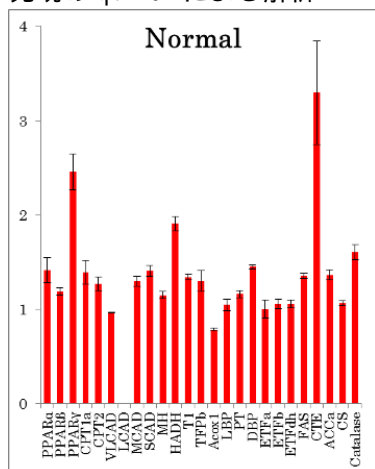


表 1 : 酵素遺伝子発現解析における qt-PCR と RNA-seq の感度の差

	qt-PCR	RNA-seq
VLCAD	0.96 ± 0.00794	1.135
MCAD	1.3 ± 0.1046	1.159
SCAD	1.41 ± 0.1108	0.924
MH	1.15 ± 0.0774	1.079
HADH	1.91 ± 0.1518	1.496
T1	1.34 ± 0.0654	0.999
TFPb	1.3 ± 0.22	1.184

#### (5) 研究の進行状況

研究の範囲：細胞内(栄養代謝系の動態) B. 細胞外(栄養代謝産物の濃度) C. 細胞間(細胞機能維持における相互作用の解析)の3領域の解析を計画したが、C. 細胞間については、期間内に行う事ができなかった。今後の課題としたい。

研究の材料：神経幹細胞：神経幹細胞から神経細胞・星状膠細胞・希突起膠細胞に分化する過程における特性を調べる事を計画した。神経幹細胞からの分化については、星状膠細胞についてはほぼ均一に分化させることが可能であったが、神経細胞と希突起膠細胞についての分化誘導については均一とは言い難く、特に神経細胞については、出現する細胞数が極少数で解析に用い得なかった。材料を2種類の細胞に変更した。一つは、初代培養神経細胞において、未成熟ラット脳から得られる細胞において神経突起が伸長して細胞が成熟する過程、もう一つは、線維芽細胞からダイレクトリプログラミングにより得られる神経細胞、に変更してにおける脂肪酸酸化能の変化を検討中である。

解析方法：非放射性同位元素を用いた代謝経路の解析について、ラベルした脂肪酸を細胞に取り込ませてタンデム MS 解析で追跡することにより、ケトン体産生・利用を含む細胞内代謝経路の詳細を調べる事を計画したが、進行が遅れている。

論文投稿：初代培養細胞を用いた研究が、投稿近くなっているが、二つの問題から足踏みをしているが、早く論文完成をしたいと考えている。まず、IVPA 法が直接に脂肪酸酸化系の活性を表現しているかの検討がさらに必要となっている。次に、培養細胞への薬剤投与について、bezafibrate を含むいわゆる peroxisome proliferators とよばれる薬剤は共通して PPAR を介しペルオキシゾーム脂肪酸酸化系の遺伝子・タンパク質を誘導することが知られる。次に、脂肪酸酸化系酵素欠損症の患者さんに bezafibrate を投与すると代謝・症状が改善する。また、培養繊維芽細胞に bezafibrate を培地に添加して IVPA 法を行っても代謝正常化の所見が得られる。これら代謝改善の根拠を peroxisome proliferators によるミトコンドリア脂肪酸酸化系の誘導に求めようしてきたが、最も強力な peroxisome proliferator である ciprofibrate を培養細胞に投与しても、IVPA 法が改善しない。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計14件)

Kohda M, Moriyama Y 他(35人中5番目) A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. PLoS Genet. 査読有, 12(1):e1005679, 2016. doi : 10.1371 / journal.pgen.1005679.

Osuka K, Usuda N, 他(7人中3番目) Activation of STAT3 in endothelial cells of chronic subdural hematoma outer membranes. World Neurosurgery, 査読有, 印刷中 URL: [http:// link.springer.com /journal/268](http://link.springer.com/journal/268)

Aoyama M, Usuda N, 他(7人中3番目) Expression of mitogen-activated protein kinases in chronic subdural hematoma outer membranes. Neurotrauma. 32(14), 1064-70, 2015. doi : 10.1089 / neu.2014.3594.

Tanaka Y, Usuda N, 他(6人中5番目) Collagen fibers induce expansion of receptive field of pacinian corpuscles. Advanced Robotics. 29(11), 735-41, 2015. DOI : 10.1080 / 01691864.2014.1003194

Makino K, Usuda N, 他(8人中4番目) Increased ICP promotes CaMKII-mediated phosphorylation of neuronal NOS at Ser847 in the hippocampus immediately after subarachnoid hemorrhage. Brain Res. 7(1616), 19-25, 2015. doi : 10.1016 / j.brainres.2015.04.048.

Uehara N, Moriyama Y, 他(21人中7番目) New genetic MT-ND6 and NDUFA1 mutations

in mitochondrial respiratory chain disorders. Ann Clin Transl Neurol. 1(5), 361-9, 2014. doi : 10.1002 / acn3.59.

Ohtake A, Moriyama Y, 他 (14人中12番目) Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders : exome sequencing for disease gene identification. Biochim Biophys Acta. 1840, 1355 - 359. 2014. doi : 10.1016 / j.bbagen.2014.01.025.

Fukao T, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, 他(17人中10, 11, 12番目)The first case in Asia of 2 - methyl - 3 - hydroxyl butyryl - CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. J Hum Genet. 59,609-14,2014. doi : 10.1038 / jhg.2014.79.

[学会発表](計14件)

森山陽介、深澤元晶、新美元、臼田信光、連続スライスSEMと組織化学的手法を用いた三次元超微構造観察技術によるペルオキシソーム分裂・増殖の解析、第31回医学生物学顕微鏡技術学会、2015年6月20日、愛知県名古屋市、名古屋市立大学

Yohsuke Moriyama, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Motoaki Fukasawa, Nobuteru Usuda, SBF-SEM Observation on histochemically stained specimens-three dimensional analyses of peroxisomal proliferations. IGER International symposium on frontiers in biological research with advanced electron microscope technologies, 2015年1月15日、愛知県名古屋市、名古屋大学

森山陽介、臼田信光、宮崎直幸、村田和義、深澤元晶、組織化学的手法を応用したSBF-SEMによるペルオキシソーム分裂の三次元超微構造観察、生理研究学会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」、2014年11月13日、愛知県岡崎市、岡崎コンファレンスセンター

臼田信光、深澤元晶、厚沢季美江、松澤綾美、古居みどり、橋本隆、山口清次、初代培養神経細胞および星状膠細胞のミトコンドリア脂肪酸酸化系の免疫組織化学とIVPAによる解析、第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2014年9月27日、長野県松本市、松本市中央公民館

深澤元晶、臼田信光、厚沢季美江、古居みどり、橋本隆、山口清次、初代培養Sertoli細胞の組織化学的特徴とミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素の免疫組織化学、第55回日本組織細胞化学会総会・学術

集会、2014年9月27日、長野県松本市、松本市中央公民館

深澤元晶、臼田信光、厚沢季美江、古居みどり、橋本隆、山口清次、初代培養繊維芽細胞のミトコンドリア脂肪酸酸化系の免疫組織化学とIVPAによる解析、第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2014年9月27日、長野県松本市、松本市中央公民館

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

臼田信光 (USUDA Nobuteru)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：30135123

### (2)研究分担者

深澤元晶 (FUKASAWA Motoaki)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：70387728

森山陽介 (MORIYAMA Yohsuke)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：00452532

厚沢季美江 (ATSUZAWA Kimie)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：60387727  
平成26年7月27日、退職につき削除

### (3)連携研究者

橋本隆 (HASHIMOTO Takashi)  
藤田保健衛生大学・医学部・客員教授  
研究者番号：80009935

山口清次 (YAMAGUCHI Seiji)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号：60144044

深尾敏幸 (FUKAO Toshiyuki)  
岐阜大学・医学部・教授  
研究者番号：70260578

田中雅嗣 (TANAKA Masashi)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・研究所・教授  
研究者番号：60155166

下村敦司 (SHIMOMURA Atsushi)  
北海道医療大学・心理学部・教授  
研究者番号：50340237