

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08048

研究課題名(和文)生活環境に起因する肥満の増悪におけるケトン体利用経路の寄与に関する研究

研究課題名(英文) Study on contribution of the ketone-body utilization in obese exacerbation due to environmental factors

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生活環境が肥満の増悪に関わることは広く知られているが、近年電化製品等に含まれる臭化難燃剤が一因となることが報告された。我々が独自に単離したケトン体代謝酵素 - アセトアセチルCoA合成酵素(AACS)もまた肥満に関わる因子である。そこで、本酵素と臭化難燃剤などの生活環境に関連性がある可能性を鑑み、培養脂肪細胞を用いて遺伝子レベルで検討した。その結果、臭化難燃剤であるテトラプロモビスフェノールAが、主に未分化な脂肪細胞に対してAACSや脂質代謝酵素の遺伝子発現を誘導することなどを明らかにした。このことから、臭化難燃剤は脂肪組織の質的变化を促し、組織内でも細胞ごとにその毒性が異なる可能性が想起された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that exposure to brominated flame retardants (BFR) may play a role in the development of high fat-induced 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 showed that gene expression of AACS is up-regulated by bisphenol A and high fat diet-induced obesity. Therefore, we examined effects of BFR, tetrabromobisphenol A (TBBP-A), on gene expressions in adipocyte cell lines (3T3-L1, ST-13). Treatment with TBBP-A for 24 hr was not significantly affected on lipid accumulation and mRNA expression of AACS, PPAR-gamma, SCOT and FAS in mature adipocytes. On the other hand, in non-induction adipocytes, AACS, perilipin and LSD-1 mRNA was up-regulated by TBBP-A. These results suggest that TBBP-A may cause metabolic disorders of the utilization of ketone bodies via AACS in immature adipocytes

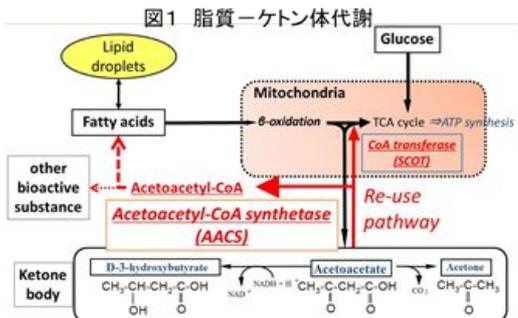
研究分野：肥満と生活習慣病の発症を結ぶ因子の分子生物学的解析

キーワード：臭化難燃剤 ケトン体利用酵素 脂肪細胞 アセトアセチルCoA合成酵素(AACS) テトラプロモビスフェノールA(TBBP-A)

1. 研究開始当初の背景

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(キープクター)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プ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た。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させ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- α 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. 研究の目的

現在までに得られている知見から、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、 β 酸化で生じたケトン体によるケトosis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。また、サーカディアンリズムがあること、高脂肪食や摂食抑制ホルモンに影響をうけることなどから、本酵素とケトン体が食習慣の乱れと脂質代謝の異常な亢進を関連付ける因子である可能性は高い。

また、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。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、環境汚染物質の感受性因子である可能性も考えられる。

以上の見解を踏まえ本研究では、肥満が生活習慣病を引き起こす過程におけるケトン体代謝経路が果たす役割の解明を目指し、環境因子、特に臭化難燃剤による影響の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 臭化難燃剤が脂肪細胞の代謝系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) 細胞内酸化ストレスに関する検討：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、アミノトリアゾール (AT) を 24 ~ 48 時間処理し、細胞内過酸化水素ストレスを誘導した。AT と同時に TBBP-A を処理する群、及び AT 処理 12 時間前より TBBP-A を前処理する群と非処理群との間での細胞粗抽出液中の過酸化脂質量をチオバルビツール酸試験法 (TBA 法) を用いて測定し、細胞内脂質の過酸化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) 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結果、本邦でも使用が許可されている TBBP-A については、脂肪滴の質的・量的変化は認められず、AACS や脂質合成に関わる脂肪酸合成酵素 (FAS)、アセチル CoA 炭酸基付加酵素 (ACC-1)、ケトン体のエネルギー利用酵素である CoA 転移酵素 (SCOT) についても遺伝子発現に変動は認められなかった。一方、DBDE については、遺伝子発現に有意差はないが、脂質蓄積量の上昇傾向が Oil red-O 染色により明らかとなった。その際各種遺伝子発現は AACS の上昇傾向が認められたが、SCOT については変動が認められなかった。脂質合成系の酵素については明確な発現変動は認められなかった。さらに、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が、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 (Fig. 1)。また、脂肪細胞の油滴形成に関わるペリリピンや油滴形成後に発現上昇するはずのアディポネクチン、褐色脂肪細胞分化に関わる LSD-1、ケトン体産生を促進する FGF-21 などについても TBBP-A による発現誘導が認められた。

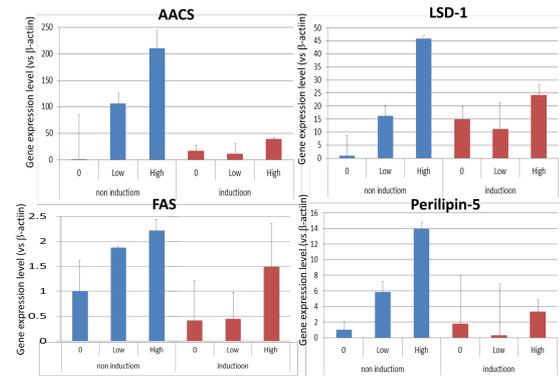


Fig. 1 Effect of TBBP-A treatment on gene expressions in ST-13 adipocytes. ST-13 cells were treated by IBMX/Dex (Induction) or non-treated (non-induction) as described in materials & methods. After 4 days, cells were treated with TBBP-A (low: 0.5 μM, High: 0.5 μM) for 48 hr and subjected to RT-PCR analysis.

その際、脂肪細胞分化マーカー (PPARγ) は変動が認められなかった。対照として用いた B16F10 細胞、RAW264 細胞 ()、HL60 細胞 () および Neuro-2a 細胞では顕著な結果は認められなかった。

(2) B16 メラノーマ細胞でアミノトリアゾール (AT) による細胞内過酸化水素ストレス上昇の実験系を用い、細胞内酸化ストレスに対する臭化難燃剤の影響を検討した。その結果、TBBP-A による細胞内の脂質過酸化の変動は検出されなかった。ただし、本結果は B16 メラノーマ細胞での実験系に比すると個々のサンプル間での数値差が大きく、実験系のさらなるブラッシュアップが必要であると思われる。

(3) AACS 発現を抑制するアデノ随伴ウイルスベクターの構築に成功し、Hep-G2 細胞および 3T3-L1 細胞において実際に抑制効果を確認できた ()。また、CRISPR-Cas9 系を用いた AACS ノックアウトマウスを構築し、AACS が肝臓において蛋白翻訳後修飾などに影響する可能性を示唆する予備的な結果を得ている (Fig. 2)。本実験系を用いた検討は、平成 30 年度より開始する予定である。

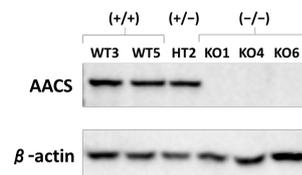


Fig. 2 AACS deficiency in liver of CC9 knockout mice

Western blotting analysis of livers excised from wild type (WT1~3) and AACS knockout mice (KO1, KO4, KO6) by CRISPR Cas9 system (CC9).

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しており()、これらの組織でも TBBP-A が影響を与えている可能性も考えられる。

以上の結果は、本邦で使用されている臭化難燃剤 TBBP-A が未分化な脂肪細胞において異常な脂質 - ケトン体代謝を促し、脂肪細胞の質的变化を誘発する可能性を示唆している。特に注目すべきは、未分化な脂肪芽細胞において、TBBP-A により褐色脂肪細胞特異的因子の遺伝子発現が誘導されることである。褐色脂肪細胞では、白色脂肪細胞と異なり脂質の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。従って、ケトン体利用酵素である AACS の発現上昇と基質であるケトン体生成が TBBP-A により同時に活性化することは、未分化な細胞におけ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、未分化細胞で有意な脂肪蓄積の増大傾向は認められなかったが、これは処理時間の関係で検出可能な量が蓄積しなかった可能性と、大部分は遊離脂肪酸として細胞外に放出されている可能性などが考えられる。この点は、今後の検討課題である。

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異なる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、ケトン体からの脂肪酸合成を促す。これによって一部は異所的に脂肪蓄積するが、残りの多くは遊離脂肪酸として血中に放出され、筋肉を始めとする他の組織に対して遊離脂肪酸由来の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が考えられる。

以上、本研究課題より本邦で使用されている臭化難燃剤が脂質・ケトン体代謝経路に影響する環境汚染物質である可能性が想起された。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)

M. Yamasaki et al., BBRC (2016)

A. Sakai et al., BBA (2017)

Hasegawa S. et al, FEBS Lett (2016)

T.U.J. Bruun et al., Genet Med. (2018)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 11 件)

1. S. Hasegawa, M. Imai, M. Yamasaki, N. Takahashi, T. Fukui, Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) **in press**
2. T.U.J. Bruun, C.L. DesRoches, D. Wilson, V. Chau, T. Nakagawa, M. Yamasaki, S. Hasegawa, T. Fukao, C. Marshall, S. Mercimek-Andrews, Prospective cohort study for identification of underlying genetic causes in neonatal encephalopathy using whole-exome sequencing, *Genet. Med.* (2017) **20** (5):486-494.
3. N. Takahashi, S. Koyama, S. Hasegawa, M. Yamasaki, M. Imai, Anticancer efficacy of p-dodecylaminophenol against high-risk and refractory neuroblastoma cells in vitro and in vivo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2017) **27**(20): 4664-4672.
4. A. Sakai, M. Imai, K. Takahashi, S. Hasegawa, M. Yamasaki, T. Ohba, N. Takahashi, Protein kinase A activation by retinoic acid in the nuclei of HL60 cells, *Biochim. Biophys. Acta* (2017) **1861** (2): 276-285
5. C. Li, M. Imai, S. Hasegawa, M. Yamasaki, N. Takahashi, Growth inhibition of refractory human gallbladder cancer cells by retinol, and its mechanism of action, *Biol. Pharm. Bull.* (2017) **40**(4):495-503.
6. C. Li, M. Imai, M. Yamasaki, S. Hasegawa, N. Takahashi, Effects of pre-and post-administration of vitamin A on the growth of refractory cancers in xenograft mice, *Biol. Pharm. Bull.*, (2017) **40**(4):486-494.
7. N. Takahashi, T. Ohba, M. Imai, S. Hasegawa, K. Takahashi, M. Yamasaki, Y. Kameoka, Retinoylation (covalent modification by retinoic acid) of Rho-GDI in the human myeloid

- leukemia cell line HL60 and its functional significance, *Biochim. Biophys. Acta* (2016) **1861**(12 Pt A):2011-2019.
8. S. Hasegawa, D. Inoue, M. Yamasaki, C. Li, M. Imai, N. Takahashi, T. Fukui, Site-specific cleavage of acetoacetyl-CoA synthetase by legumain, *FEBS Lett.* (2016) **590** (11): 1592-1601.
9. M. Yamasaki, S. Hasegawa, M. Imai, N. Takahashi, T. Fukui, High-fat diet-induced obesity stimulates ketone body utilization in osteoclasts of the mouse bone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016) **473**(2):654-661.
10. C. Li, M. Imai, T. Matsuura, S. Hasegawa, M. Yamasaki, N. Takahashi, Inhibitory Effects of Retinol Are Greater than Retinoic Acid on the Growth and Adhesion of Human Refractory Cancer Cells, *Biol Pharm Bull.* (2016) **39**(4):636-640.
11. M. Yamasaki, S. Hasegawa, H. Takahashi, Y. Kobayashi, C. Sakai, Y. Ashizawa, Y. Asai, M. Kanzaki, T. Fukui, Placental extracts induce the expression of antioxidant enzyme genes and suppress melanogenesis in B16 melanoma cells, *Nat. Prod. Res.* 29 (22): 2103-2106. (2015)

〔学会発表〕(計 5件)

臭化難燃剤 TBBP-A が培養脂肪細胞のケトン体利用経路に対して与える影響の検討
山崎正博、松本莉奈、宮脇祐太、守屋俊治、八柄雅子、松林実歩子、長谷川晋也、高橋典子
 フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017年9月、仙台
 高脂肪食によるケトン体利用経路が骨代謝に与える影響
山崎正博、今井智実、長谷川晋也、今井正彦、福井哲也、高橋典子
 日本薬学会第 137 年会、2017年3月、仙台
 骨組織のケトン体代謝に高脂肪食性肥満が与える影響
山崎正博、長谷川晋也、今井智実、今井正彦、福井哲也、高橋典子
 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016年9月、東京
 メラノーマ細胞におけるプラセンタエキスの抗酸化酵素誘導機能
山崎正博、秋山莉佐、三浦舞子、長谷川晋也、今井正彦、吉田沙樹、福井哲也、高橋典子
 日本薬学会第 136 年会、2016年3月、

横浜
 プラセンタエキスがメラニン産生細胞の抗酸化能に与える影響
山崎正博、長谷川晋也、石川夏織、神子美樹、猶岡涼、高橋典子、福井哲也
 フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015年9月、神戸

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hoshi.ac.jp/site/kyoiku/kenkyusosiki.php>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

該当者なし