

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14908

研究課題名(和文) 認知機能障害の予防・治療標的としてのケトン体代謝酵素

研究課題名(英文) Ketone body-utilizing enzyme as a potential target for prevention and treatment of cognitive impairment

研究代表者

長谷川 晋也 (Hasegawa, Shinya)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60386349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症などの認知機能障害は未だ発症機序に不明な点が多く、その治療も対症療法を中心としている。我々は、ケトン体代謝酵素であるアセトアセチルCoA合成酵素(AACS)の脳・神経系における役割を検討した。脳組織において神経の発生・発達に関わる遺伝子がAACSにより調節されることを見出し、糖・脂質代謝異常の状態においては、AACSがミトコンドリアの代謝や神経の形態形成に関わる因子を調節する可能性を示した。以上の結果は、脳・神経系の機能におけるケトン体代謝の新たな役割を明らかにし、認知機能障害などの神経変性疾患に対する新たな治療法や予防法に関して、有益な基礎的知見となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症などの認知機能障害は65歳以上の高齢者において有病率が15%と推定され、認知症と正常の中間に分類される境界型の人と合わせるとその割合は28%に及ぶが、未だ発症機序に不明な点が多く、その治療も対症療法を中心としている。本研究の成果により、未だ着目されていなかったケトン体代謝が神経の正常な発生や発達に関わる可能性が示唆され、認知機能障害などの神経変性疾患の病態を解明するうえで、検討すべき機能を有することが示唆され、予防や治療法に繋がる知見となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of cognitive dysfunction, such as Alzheimer's disease, is still unclear, and its treatment is mainly symptomatic. In this study, we investigated the role of acetoacetyl-CoA synthetase (AACS), a ketone body utilizing enzyme, in the brain and nervous system. We found that AACS regulates genes involved in neural development in the brain and may affect mitochondrial metabolism and neural morphogenesis under the condition of abnormal glucose and lipid metabolism. These results provide new insights into the role of ketone body metabolism in the function of central nervous system and may provide useful basic knowledge regarding new therapeutic and preventive methods for neurodegenerative diseases such as cognitive impairment.

研究分野：衛生薬学、栄養代謝学

キーワード：ケトン体 脂質代謝 認知機能障害 脳・神経系 コレステロール トリグリセリド 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症などの認知機能障害は大部分が晩期発症型で、家族歴のない孤発例である。65 歳以上の高齢者において有病率が 15%と推定され、認知症と正常の中間に分類される境界型の人と合わせるとその割合は 28%に及ぶが、未だ発症機序に不明な点が多く、その治療も対症療法を中心としている。近年、糖尿病と診断されていない血糖値が高めな状態において、認知症のリスクが増加することが報告された。また、脂質の運搬に關与するアポリポ蛋白質 E4 はアルツハイマー病の危険因子であり、弧発性を含めた患者全般でその発現が増加することがわかり、糖・脂質代謝異常が認知症の危険因子であることが明らかになってきた。

アルツハイマー型認知症の治療は対症療法が中心であるが、栄養学的観点からその治療法について検討されている。高脂肪低糖質食の摂食はケトン体を多く産生することから、「ケトン食」とも呼ばれており、古くから難治性てんかんなどの治療方法として用いられてきた。近年、このケトン食が、アルツハイマー型認知症やそのモデル動物の治療に使用できること、また、その作用がケトン体の増加に起因することが明らかとなり、ケトン体がアルツハイマー型認知症の治療に利用できる可能性が示唆されている¹⁾。しかし、その作用メカニズムは不明な点が多いことから、全容解明が望まれている。我々は、ケトン体代謝酵素であるアセトアセチル CoA 合成酵素 (AACS) が脂質代謝に關わること²⁾、初代培養神経細胞の正常な発達に重要な役割を果たすことを明らかにしている³⁾。このことから、AACS が認知機能障害の病態やケトン食の作用に關わっている可能性が考えられるが、その役割は不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、脳組織におけるケトン体代謝の役割を明らかにすることを目的とした。ケトン体 (アセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸及びアセトン) は、糖尿病などのグルコースが利用できない状態においては、生命維持に重要な脳において代替エネルギーとして働く (Fig. 1)。ケトン体がエネルギーとして利用される際には、肝外組織のミトコンドリア画分に存在する CoA 転移酵素 (SCOT) に代謝される必要がある。しかし、SCOT が存在しない肝臓においても、ケトン体がコレステロールや脂肪酸に取り込まれることから、この代謝に關する酵素の存在が予想され、我々のグループがアセト酢酸を特異的基質とする新規酵素、AACS をラット肝臓のサイトゾル画分より単離した⁴⁾。

AACS は、ケトン体であるアセト酢酸をアセトアセチル CoA へと活性化するリガーゼであり、同じサイトゾル画分に存在するコレステロール・脂肪酸合成系のための基質供給を担っている可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、AACS の生理的意義を検討した結果、AACS のノックダウンにより初代培養神経細胞の神経マーカーの発現が減少することを明らかにした³⁾。また、てんかんなどを伴う脳障害を発症したヒト新生児の遺伝子変異を、次世代シーケンズを用いて解析した結果、AACS の 632 番目のアミノ酸がグリシンからセリンに変異していることが明らかとなった⁵⁾。以上の結果は、ケトン体やそれを代謝する AACS がアルツハイマー型認知症の発症機序の解明や治療標的として有用である可能性を示唆している。そこで、本研究ではマウス個体およびヒト培養細胞を用いて 脳・神経系における AACS の役割、脂質代謝異常と AACS の関係の 2 点について検討した。

3. 研究の方法

脳・神経系における AACS の役割

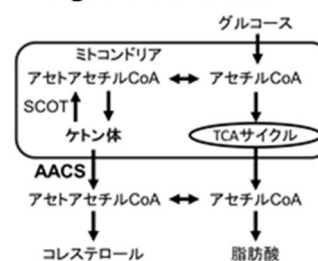
a. ケトン体代謝酵素欠損マウスの解析

CRISPR-Cas9 システムを用いて AACS の翻訳開始点を標的としたガイド RNA を設計し、遺伝子改変マウスを作製した。AACS ノックアウトマウスの脳組織を用いて、マイクロアレイ法及び real-time PCR 法により、AACS 欠損により変動した遺伝子を網羅的に解析した。

b. ヒトにおける AACS アイソフォームの単離と機能解析

ヒト成人や胎児の脳組織の RNA から cDNA を合成し、AACS をクローニングした。また、クローニングした AACS アイソフォームのタンパク質発現やケトン体代謝活性を測定した。

Fig. 1 ケトン体代謝



c. 絶食負荷マウスにおける AACCS 欠損の影響

絶食負荷 (24 時間) したマウスの血清ケトン体濃度や脂質濃度に対する AACCS 欠損の影響を検討した。また、real-time PCR 法を用いて脳組織の脂質代謝に対する AACCS 欠損の影響を検討した。

d. 高脂肪食負荷マウスにおけるケトン体代謝酵素欠損の影響

AACCS ノックアウトマウスに高脂肪食 (45kcal% 脂肪含有量) を 4 週間給餌し、血清中の脂質濃度や脳組織におけるタンパク質発現に対する AACCS 欠損の影響を検討した。

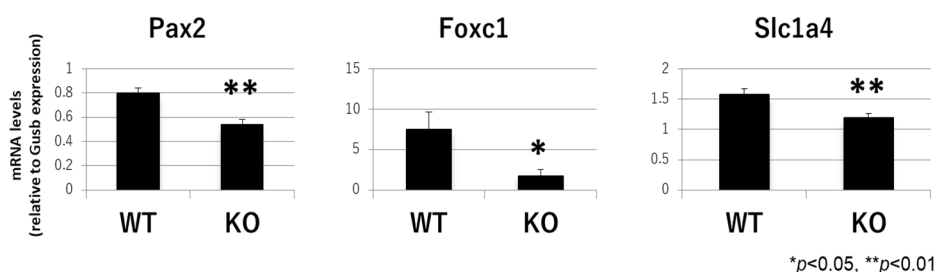
4. 研究成果

脳・神経系における AACCS の役割

a. ケトン体代謝酵素欠損マウスの解析

AACCS のノックアウトマウス (KO) では、野生型マウス (WT) と比べて体重や血中コレステロール、脂肪酸濃度に関して有意な変化は認められなかったが、血清中のケトン体濃度は有意に増加した。そこで、脳組織において AACCS 欠損により変動した遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて検討し、real-time PCR 法によりバリデーションした。その結果、中性アミノ酸トランスポーターである solute carrier family 1, member 4 (Slc1a4) や、神経の発生に重要な役割を果たす転写因子である paired box2 (Pax2)、また、小脳の正常な発達に關与する forkhead box C1 (Foxc1) の遺伝子発現が有意に減少した (Fig. 2)。以上の結果より、AACCS の欠損が神経の正常な発達に影響する可能性が示唆された。

Fig. 2



b. ヒトにおける AACCS アイソフォームの単離と機能解析

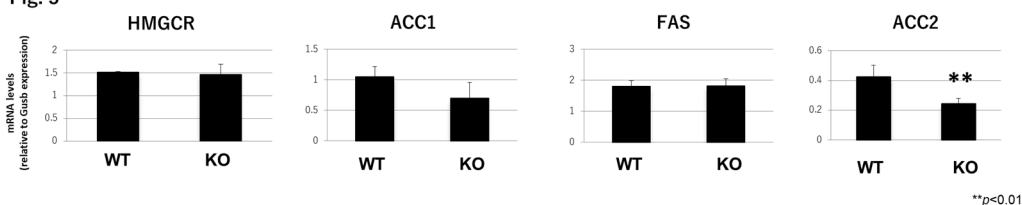
Western blotting により、ヒト成人および胎児の脳組織における AACCS のタンパク質発現を検討した。成人の脳組織においては全長の AACCS が発現していたが、胎児の脳においては全長 AACCS の発現は少なく、低分子側にシフトした AACCS のバンドが観察されたため、スプライシングバリエーションの存在が考えられた。そこで、開始コドンから 20 bps、終止コドンまでの 20 bps に対するプライマーを設計し、クローニングを試みた。その結果、エクソンの 12 番目、17 番目、またはその両方が欠損した AACCS のアイソフォームを単離した。これらのアイソフォームの各臓器における発現を、real-time PCR 法を用いて検討した結果、17 番目のエクソンが欠損した AACCS の遺伝子発現は、成人の脳や肝臓に比べて、胎児の脳において発現が多く、また、ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞の神経突起伸長過程において、その発現が神経マーカーである MAP-2 とともに増加することを明らかにした⁶⁾。以上のことから、ヒト AACCS のスプライシングバリエーションは、脳神経系の発達に關与する可能性が示唆された。また、これらのアイソフォームを過剰発現しその活性を検討した結果、エクソンを欠失したすべてのアイソフォームでケトン体代謝活性が消失した。以上の結果は、ヒトにおける AACCS はケトン体代謝以外の役割を持ち、神経細胞の発達に關与する可能性を示唆している。

糖・脂質代謝異常と AACCS の関係

c. 絶食負荷マウスにおける AACCS 欠損の影響

絶食負荷を 24 時間かけたマウスにおいて、AACCS の欠損は血清中ケトン体やコレステロール、脂肪酸の濃度に影響しなかったが、脂肪酸の β 酸化を制御するアセチル CoA カルボキシラーゼ 2 (ACC2) の発現が、脳において有意に減少した。ACC2 はミトコンドリア表面において、脂肪酸のミトコンドリア内輸送を阻害することから、AACCS の欠損は間接的に脂肪酸の β 酸化を亢進する可能性が考えられる。以上の結果より、AACCS が脂肪酸の β 酸化などのエネルギー代謝に關与する可能性を明らかにした。脳・神経系の機能維持において、ミトコンドリアのエネルギー代謝は重要な役割を果たすことから、ケトン体代謝が神経の機能維持に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

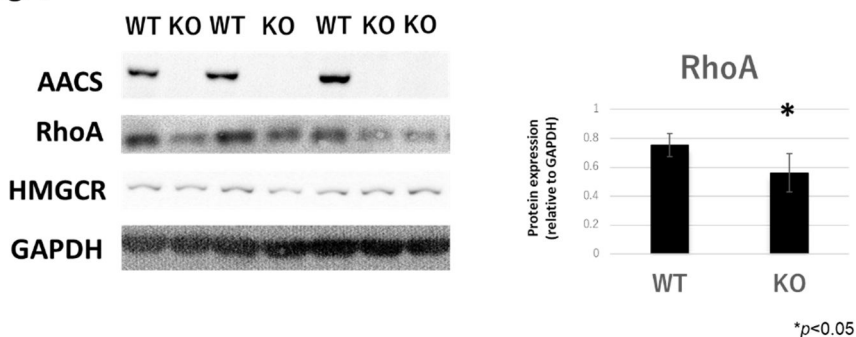
Fig. 3



d.高脂肪食負荷マウスにおけるケトン体代謝酵素欠損の影響

高脂肪食 (45kcal% 脂肪含有量) を1カ月摂食したマウスでは、野生型 (WT) と比べて AACS を欠損すると (KO)、体重に有意な変化がないものの、血清中のケトン体、コレステロールやトリグリセリドが有意に増加することが明らかになった。この結果から、AACS は生体内の脂質バランスを制御する遺伝的要因の1つであると考えられる。また、脳組織においては、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の発現に変動は認められなかったが、コレステロール合成の中間代謝物を翻訳後修飾に利用する RhoA の発現が減少することが明らかになった (Fig.4)。以上の結果は、AACS が組織内外のコレステロール・脂肪酸の代謝に影響することを示しており、AACS が脂質バランスの遺伝的要因として重要な役割を果たすと考えられる。また、これらの変化は通常食では認められなかったことから、AACS は環境変化に対する脂質代謝恒常性に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

Fig. 4



AACS を介したケトン体代謝は、その生理的意義について不明な点が多く脂質代謝における重要度も明らかになっていなかった。本研究の成果により、ケトン体は飢餓時のみ利用されているのではなく、通常の生理状態においても細胞内で代謝中間体として利用されている可能性が示唆された。また AACS 欠損の影響は、生体に何らかの負荷がかかった際に顕著となることから、AACS を介したケトン体代謝は環境変化に対する適応において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。今後、様々な環境におけるケトン体代謝欠損の影響を詳細に検討することで、認知機能障害などの神経変性疾患だけでなく、脂質代謝異常症などの新規治療法や予防法の確立が可能になると考える。

<引用文献>

- 1) Yang H, Shan W, Zhu F, Wu J, Wang Q: Ketone Bodies in Neurological Diseases: Focus on Neuroprotection and Underlying Mechanisms. *Front Neurol*, **10**, 585 (2019).
- 2) Hasegawa S, Noda K, Maeda A, Matsuoka M, Yamasaki M, Fukui T: Acetoacetyl-CoA synthetase, a ketone body-utilizing enzyme, is controlled by SREBP-2 and affects serum cholesterol levels. *Mol Genet Metab*, **107**, 553-560 (2012).
- 3) Hasegawa S, Kume H, Iinuma S, Yamasaki M, Takahashi N, Fukui T: Acetoacetyl-CoA synthetase is essential for normal neuronal development. *Biochem Biophys Res Commun*, **427**, 398-403 (2012).
- 4) Ito M, Fukui T, Kamokari M, Saito T, Tomita K: Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **794**, 183-193 (1984).

- 5) Bruun TUJ, DesRoches CL, Wilson D, Chau V, Nakagawa T, Yamasaki M, Hasegawa S, Fukao T, Marshall C, Mercimek-Andrews S: Prospective cohort study for identification of underlying genetic causes in neonatal encephalopathy using whole-exome sequencing. *Genet Med*, **20**, 486-494 (2018).
- 6) Hasegawa S, Imai M, Yamasaki M, Takahashi N: Isolation and characterization of human acetoacetyl-CoA synthetase splice variants. *Gene Reports*, **19**, (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1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	4. 巻 19
2. 論文標題 Isolation and characterization of human acetoacetyl-CoA synthetase splice variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Reports	6. 最初と最後の頁 100665 ~ 100665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.genrep.2020.100665	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 Takahashi Noriko, Kake Takamichi, Hasegawa Shinya, Imai Masahiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Effects of Post-administration of β -Carotene on Diet-induced Atopic Dermatitis in Hairless Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 793 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19092	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 Bruun TUJ, DesRoches CL, Wilson D, Chau V, Nakagawa T, Yamasaki M, Hasegawa S, Fukao T, Marshall C, Mercimek-Andrews S	4. 巻 20
2. 論文標題 Prospective cohort study for identification of underlying genetic causes in neonatal encephalopathy using whole-exome sequencing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genetics in Medicine	6. 最初と最後の頁 486-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/gim.2017.129.	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 該当する
1. 著者名 Oku T, Shimada K, Kenmotsu H, Ando Y, Kurisaka C, Sano R, Tsuiji M, Hasegawa S, Fukui T, Tsuji T	4. 巻 19
2. 論文標題 Stimulation of Peritoneal Mesothelial Cells to Secrete Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) by TNF- α : A Role in the Invasion of Gastric Carcinoma Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19123961	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脂質代謝経路に対するケトン体代謝酵素欠損の影響
2. 発表標題 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
3. 学会等名 日本生化学会 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 脳組織におけるケトン体代謝の役割
3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第30回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川晋也 今井正彦 山崎正博 高橋典子
2. 発表標題 ヒトにおけるケトン体代謝酵素の新規スプライシングバリエーションの同定
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 長谷川晋也、柳下衡平、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 胆汁酸代謝経路におけるケトン体代謝酵素の役割
3. 学会等名 日本生化学会 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 レチノイン酸により誘導されるケトン体代謝が神経細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第30回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川晋也、今井正彦、山崎正博、高橋典子
2. 発表標題 トリグリセリド代謝におけるケトン体利用酵素の役割
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

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、福井哲也、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体代謝酵素の欠損が神経細胞の発達に与える影響
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、高橋典子
2. 発表標題 ケトン体代謝を介したレチノイン酸による神経細胞の分化誘導
3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第29回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川晋也 今井正彦 山崎正博 福井哲也 高橋典子
2. 発表標題 脂質代謝におけるケトン体利用酵素の役割
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
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
---------	---------