

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17974

研究課題名(和文) ビオチンによる 酸化調節因子ACC2制御機構解明とメタボリック症候群予防への応用

研究課題名(英文) Clarification of the regulatory mechanism of ACC2, a regulator of beta-oxidation, by biotin and its application to the prevention of the metabolic syndrome

研究代表者

湯浅 正洋 (Yuasa, Masahiro)

神戸大学・人間発達環境学研究科・助教

研究者番号：00756174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタボリックシンドローム(MS)の予防・改善を目指し、ビオチンによる酸化調節(阻害)因子アセチルCoAカルボキシラーゼ2(ACC2)作用抑制およびそのメカニズムを明らかにした。

短期的な超高濃度のビオチン経口投与はラット肝臓のACC2遺伝子発現量を減少させたが、長期的かつ安全な濃度のビオチン経口投与ではこの現象は観察されなかった。両条件でも脂肪消費量と血漿アディポネクチンの増加や、体脂肪の低減などがみられることから、ビオチンによるMS病態予防・改善効果は見込めるが、その機序に関わるのは肝臓ACC2のみではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来的には、MSや生活習慣病の予防のためのビオチンによる栄養療法の提案に資すると考える。現在、食品成分によるMSの予防・改善効果に関する検討が多数行われているが、高濃度での継続的な摂取が肝機能障害を生じさせるなどの副作用がある成分も存在する。一方、本研究で採用したビオチン濃度はヒトにおける過剰症が生じない濃度であり、動物実験レベルでは肝機能マーカーを変動させないことが確認されている。このような安全性を踏まえると、ヒトの健康維持・増進に対しても展開可能な栄養療法として、ビオチンが利用できると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of biotin-induced inhibition of -oxidation regulator acetyl CoA carboxylase 2 (ACC2) to prevent and improve metabolic syndrome (MS).

Short-term oral administration of high-dose biotin reduced ACC2 gene expression in the rat liver, but long-term oral administration of safe-dose biotin did not change the hepatic ACC2 gene expression. In both of these experiments, an increase in fat oxidation and plasma adiponectin, and a decrease in white adipose tissue were induced; therefore, biotin may be effective in preventing and improving MS; but the liver ACC2 is not the only factor involved in this mechanism.

研究分野：基礎栄養学

キーワード：ビオチン アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)2 カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 酸化 エネルギー消費量 脂肪消費量 肝臓 褐色脂肪組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MS) は、脂質異常症・2 型糖尿病・循環器疾患などの生活習慣病の発症リスクを上昇させることで、ヒトの生命・健康に悪影響を及ぼす。わが国の特定検診受信者数に対する MS 該当者の割合は 26.2% に上り (平成 27 年度 厚生労働省)、非常に身近な健康問題である。生活習慣病の一次予防や医療費軽減の点から、わが国の MS 該当者数減少への取り組みは早急に推進すべき課題である。

アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 1 および ACC2 は、アセチル CoA をマロニル CoA に変換するピオチン依存性酵素である。ACC1 は細胞質に存在し、脂肪酸合成のためのマロニル CoA を供給している。一方、ACC2 はミトコンドリア外膜に局在しており、ACC2 により産生されるマロニル CoA はミトコンドリアに存在するカルニチンパルミトイル基転移酵素 1 (CPT1) に結合することでその活性を強力に阻害することが知られている。以上より、ACC2 はミトコンドリア内への脂肪酸の輸送を阻害することで、酸化を間接的に制御している。この点に着目して、MS 予防のための栄養療法確立を目的として、肝臓 ACC2 発現・活性低下を介した酸化亢進作用を有する栄養素・食品成分の探索が行われている。その例として、茶カテキンにより、ACC2 発現低下を介して酸化が亢進することが示されている (Lee et al., *Food Nutr Res*, 2017)。一方で、茶カテキンには肝臓解毒作用を担う SYP3A および P 糖タンパク質の活性阻害 (Chung et al., *Biopharm Drug Dispos*, 2009) やヘム鉄の吸収阻害 (Ma et al., *J Nutr*, 2010) が認められるなど、継続的摂取による健康被害が生じる懸念もあり、これに変わる ACC2 発現低下作用のある栄養素あるいは食品成分の同定が求められている。

水溶性ビタミンの 1 つであるピオチンはカルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、脂肪酸合成、分岐鎖アミノ酸代謝に関与している。日本人の食事摂取基準 2015 年版では 50  $\mu$ g/日の目安量が示されており、一方でヒトに対する 10~200 mg/日の投与 (食事摂取基準の 200~4,000 倍量) による過剰症等は観察されておらず、サプリメントとしても 10 mg/日程度のものが既に市販されている。以上より、ピオチンはヒトが健康に生きるための必須栄養素であるとともに、継続的に摂取するには極めて安全な栄養素であると考えられる。

研究代表者は、ピオチン添加飼料 (2,000 mg/kg 飼料:0.20%) を SD 系雄性ラットに 3 週間与えたところ、脂肪消費量・肝臓 CPT 酵素活性の上昇と、白色脂肪組織重量・肝臓 ACC2 の mRNA 発現量が低下することを見出している。以上より、ピオチンは肝臓 ACC2 発現低下を介して酸化亢進させる可能性があり、MS 予防・改善のための新規栄養療法として応用できる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景・研究成果をもとに、本研究では日常的なピオチン摂取による生体における酸化調節因子 ACC2 作用低下の有無を明らかにする。ピオチン投与濃度はより現実的な濃度を設定し、肝臓以外の標的組織の有無について検討する。また、ピオチンが MS 予防・改善に効果的か否かを明確にする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高濃度ピオチンの短期経口投与が脂肪消費量と肝臓 ACC2 発現に及ぼす影響

先行研究の再現性の確認と追加実験を兼ね、高濃度ピオチンの短期経口投与が脂肪消費量や肝臓 ACC2 遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにした。5 週齢の SD 系雄性ラットに、対象飼料とピオチン添加飼料 (0.05%, 0.10% および 0.20%) を与え、自由摂食下で 3 週間飼育した。飼育 2 週目に呼気ガス分析を行いエネルギー代謝への影響を確認すると共に、飼育終了後 (3 週目) の白色脂肪重量を秤量した。肝臓では、ACC2 と酸化関連酵素の遺伝子発現量、CPT 活性およびピオチン蓄積量を明らかにした。これらの検討に加え、肝臓中性脂肪濃度と肝臓のエネルギー代謝に関わる血漿ホルモン濃度を測定した。

#### (2) 安全な濃度のピオチンの長期経口投与が脂肪消費量と肝臓 ACC2 発現に及ぼす影響

5 週齢の SD 系雄性ラットに、対象飼料とピオチン添加飼料 (0.004%, 0.020% および 0.080%) を与え、自由摂食下で 9 週間飼育した。分析項目は (1) と同様とした。

#### (3) 安全な濃度のピオチンの長期経口投与によるエネルギー消費量上昇のメカニズムの解明

(2) ではピオチン投与により脂肪消費量よりもエネルギー消費量が特異的に上昇したことから、そのメカニズムの一部を検討した。(2) と同様の条件のラット試料を用い、肝臓以外の主要なエネルギー産生組織である褐色脂肪組織、白色脂肪組織および筋肉における CPT 活性を測定し、ピオチンがどの組織でエネルギー代謝を活性化するかを確認した。次に、CPT 活性が上昇していた肝臓と褐色脂肪組織において、ACC2 や酸化を担う酵素の遺伝子発現を測定した。褐色脂肪組織における熱産生亢進の可能性が確認されたため、ピオチンが交感神経系に及ぼす影響の一部を検討した。

#### (4) ピオチン投与による肝臓への毒性に関する検討

ヒトにおけるビオチン投与を想定した場合、毒性の有無を確認すべきである。そこで、肝毒性の有無の一部を評価するために、(1)(2)のラットの血漿と肝臓を用いて、血漿 AST・ALT 活性と肝臓の繊維化・炎症・酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1)高濃度ビオチンの短期経口投与が脂肪消費量と肝臓 ACC2 発現に及ぼす影響(Yuasa et al., *J Nutr Sci Vitaminol*, in press)

飼育 2 週目において、0.20%群の RQ の有意な低値と脂肪消費量の有意な上昇が確認され、精巢周辺白色脂肪組織重量が低下した。肝臓 ACC2 遺伝子発現量はビオチン投与量依存的に低下し、すべてのビオチン投与群の CPT 活性が上昇したことから、ビオチンは肝臓における ACC2 発現量の抑制と CPT 活性上昇を介して、脂肪消費量を上昇させる可能性が再確認された。次に肝臓における脂肪酸の酸化を担う遺伝子の発現量を解析したが、群間で差はみられなかった。一方、肝臓においては 0.10%群と 0.20%群でビオチンの有意な蓄積が確認された。ビオチンは臓器や細胞内に蓄積すると、ヒストンへのビオチンの結合(ヒストンのビオチン化)量が増加すること(Sone et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2016)、グアニル酸シクラーゼ(GC)とプロテインキナーゼ G(PKG)によるシグナル伝達を活性化すること(Zempleni et al., *Biofactors*, 2009)が知られており、ビオチンはこれらの経路に影響して種々の遺伝子発現量を変化させると考えられている。本研究でも、肝臓へのビオチン蓄積がみられたことから、ビオチンによる ACC2 遺伝子発現量の減少は、ヒストンのビオチン化量の上昇や、GC と PKG を介したシグナル伝達の活性化のいずれかを介して生じたと推察される。今後、肝臓におけるこれらの経路に対するビオチン蓄積の影響を明らかにする必要がある。

他方、肝臓中性脂肪濃度がビオチン投与量依存的に減少し、0.20%群の血漿アディポネクチン濃度の有意な上昇がみられた。血漿インスリンとレプチン濃度に差がなかったことから、ビオチン投与による肝臓における脂肪酸の酸化活性化には、肝臓へのビオチン蓄積のみでなく血漿アディポネクチン濃度の上昇も関与したと推察される。ビオチン投与時にはこれらが総合的に影響して、脂肪消費量の上昇、白色脂肪組織重量と肝臓中性脂肪濃度の低下をもたらす可能性が確認されたことから、ビオチンは MS 病態の一部を予防・改善するために有用であると考えられる。

(2)安全な濃度のビオチンの長期経口投与が脂肪消費量と肝臓 ACC2 発現に及ぼす影響

飼育 2・4・8 週目の 0.080%群におけるエネルギー消費量の有意な上昇と、2・4 週目における脂肪消費量の有意な上昇が確認された。安全な濃度のビオチン投与は、短期的にも長期的にもエネルギー消費量を亢進させること、これが主に脂肪消費量の上昇に基づくことが示唆された。(1)の検討と同様に、0.080%群では白色脂肪組織重量と肝臓中性脂肪濃度の減少、血漿アディポネクチンと肝臓 CPT 活性の上昇が認められた。しかし、(1)の検討とは異なり、肝臓の ACC2 遺伝子発現量やビオチン濃度に群間で差はみられなかった。(1)で考察した通り、肝臓 ACC2 遺伝子発現量の減少には肝臓へのビオチン蓄積が関与する可能性があることから、飼料へのビオチン添加量として 0.080%までであれば、肝臓への顕著なビオチン蓄積は生じず、結果として ACC2 遺伝子発現量を変動させないと推察される。以上のように、肝臓 ACC2 の遺伝子発現量の低下は、ビオチンを安全な濃度を超えた分量で与えた場合にのみ観察される現象であることが示唆された。

(3)安全な濃度のビオチンの長期経口投与によるエネルギー消費量上昇のメカニズムの解明

(2)の検討で 0.080%群におけるエネルギー消費量が上昇していたことから、エネルギー代謝を担う他の臓器に対するビオチンの影響を評価した。エネルギー代謝を担う主要な臓器のうち、0.080%群の肝臓と褐色脂肪組織の CPT 活性が有意に上昇していたが、白色脂肪組織と筋肉では群間で差はみられなかった。肝臓と褐色脂肪組織における脂肪酸の酸化を担う酵素の遺伝子発現量は、肝臓では群間で差がみられないのに対し、0.080%群の褐色脂肪組織では種々の遺伝子発現量が増加した。また、熱産生に関わる PGC-1 と UCP1 の遺伝子発現量が 0.080%群で上昇していることが確認された。以上より、安全な濃度のビオチン投与により、特に褐色脂肪組織の熱産生を活性化することが明らかとなった。

ビオチンによる褐色脂肪組織の熱産生の活性化のメカニズムをさらに探るために、交感神経系への影響を確認した。しかし、血漿ノルアドレナリン濃度と褐色脂肪組織の  $\beta$ 3 アドレナリン受容体の遺伝子発現量には群間で差は認められなかった。(1)と(2)でも考察した通り、臓器や細胞へのビオチンの蓄積は GC と PKG を介したシグナル伝達やヒストンのビオチン化を促進する場合があります。結果的に種々の遺伝子発現が変動することが予想される。0.080%群において、褐色脂肪組織のビオチン濃度が顕著に上昇していたことから、BAT における種々の遺伝子発現量の変動は、ビオチンが BAT に蓄積して直接作用したためである可能性が示唆された。なお、0.080%群では白色脂肪組織や筋肉でもビオチン蓄積量が有意に上昇していたことから、CPT 活性には変化は無いものの、これらの臓器における酸化亢進の有無を今後明らかにし、全身でのビオチンの作用を確認する必要があると考えられる。

(4)ビオチン投与による肝臓への毒性に関する検討

(1)(2)のすべてのビオチン投与群で、血漿 AST・ALT 活性と肝臓の繊維化・炎症・酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量の上昇は認められず、本研究のビオチン投与量は少なくとも肝臓

に対して毒性が生じる可能性は小さいことが明らかとなった。今後は肝臓組織所見や、生殖生理機能や胎児発育などのビオチンが関与する生理機能への影響を確認する必要がある。

#### (5) まとめ

以上の検討により、ビオチンは高濃度（0.20%以上）で短期的な投与時においてのみ、肝臓の ACC2 遺伝子発現量を低下させ、結果的に肝臓 酸化の活性化と脂肪消費量の上昇などの影響をもたらすことが示唆された。一方、肝臓 ACC2 遺伝子発現量が変化しなかった 0.080% ビオチン投与群においても脂肪消費量やエネルギー消費量の上昇が生じたことから、肝臓の ACC2 遺伝子発現を含むビオチンによる肝臓脂質代謝への影響とそのメカニズムは、ビオチン投与濃度により異なることが明らかとなった。一方、本研究では安全な濃度のビオチン投与により、特に褐色脂肪組織の熱産生亢進により、エネルギー消費量が上昇することが確認された。また、ビオチン投与はこれら代謝亢進作用の結果、肝臓中性脂肪濃度や白色脂肪組織重量の低下をもたらしたことから、MS 病態のうち少なくとも脂質代謝の改善に有用な可能性が示された。今回のビオチン投与濃度は少なくとも肝毒性の点では安全である可能性が高く、本研究成果はビオチンによる MS 病態の予防・改善のための栄養療法を確立するための一助となり得ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yuasa M, Kawabeta K, Uemura M, Koba K, Sawamura H, Watanabe T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Dietary high-dose biotin intake activates fat oxidation and hepatic carnitine palmitoyltransferase in rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 湯浅正洋, 高土友恵, 川邊田晃司, 石見百江, 古場一哲
2. 発表標題 ビオチンはエネルギー消費を亢進する
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅正洋, 高土友恵, 川邊田晃司, 石見百江, 古場一哲
2. 発表標題 ビオチン摂取がラットのエネルギー代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuasa M, Takashi T, Kawabeta K, Iwami M, Koba K.
2. 発表標題 Effect of dietary biotin intake on fat oxidation and body fat mass in rats.
3. 学会等名 20th ARAHE Biennial International Congress 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本ビタミン学会（担当部分の著者：湯浅正洋，渡邊敏明）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672（担当部分：pp. 263-266）
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典（担当部分：2.8.5 栄養学 [ 栄養疫学 ] in 2.8 ピオチン）	

〔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
---------	---------