

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07087

研究課題名(和文) 多価不飽和脂肪酸貯蔵量の減少が及ぼす生体への影響 —新たな視点からのアプローチ—

研究課題名(英文) The effects of endogenous PUFA restriction on biological functions

研究代表者

桑田 浩 (Kuwata, Hiroshi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：80286864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ACSL4遺伝子欠損マウスやACSL4ノックダウン細胞を用いることで、生体内多価不飽和脂肪酸(PUFA)含有量が低下した際に生体に及ぼす影響を解析し、PUFAの生体内での役割について明らかにすることを目指した。その結果、1) ACSL4の欠損により、リポ多糖による炎症反応が増強され、これに生理活性脂質の産生の増強が関与している可能性、また、2) ヒト腎上皮細胞由来HK-2細胞でACSL4の発現を低下させた解析では、本細胞ではこれまでの報告と異なる経路でフェロトーシス/フェロトーシス様の細胞死が誘導されることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多価不飽和脂肪酸の生体や細胞内での利用が、すべての細胞で共通の機構で行われるのではなく組織や細胞の種類で異なること、また、PUFAを介する細胞死の機構も細胞間で異なることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify the biological functions of polyunsaturated acid (PUFA) using Acs14 knockout mice and human tubular epithelial cells. This study showed that ACSL4 deficiency enhanced the inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, which may involve enhanced production of bioactive lipid mediator(s). It also showed that the ferroptosis/ferroptosis-like cell death observed in human renal epithelial HK-2 cells was mediated by a different pathway from that previously reported.

研究分野：衛生薬学、脂質生化学、生化学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 長鎖アシルCoA合成酵素4 PUFA ACSL4 リポ多糖 フェロトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人を対象とした疫学調査において、食品から摂取する脂質の“質”(含有脂肪酸の組成)が冠動脈性心疾患や脳卒中などの生活習慣病に由来する疾患の発症に影響を与えることが示されている。しかし、脂質の“質”が如何にして生命に影響を与えるかについては、完全には理解されておらず、この疑問を解明することは、様々な生体機能の制御機構の解明につながると考えられている。

2. 研究の目的

食品から摂取した必須脂肪酸などの長鎖脂肪酸は、多くの場合、長鎖アシル CoA 合成酵素 (ACSL) により長鎖アシル CoA に変換されたのち、脂質の合成やエネルギー産生など様々な生体反応に利用される。ACSL4 は、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を基質とする酵素であり、アラキドン酸 (AA) をはじめとする PUFA の生体内での利用に重要な酵素である。AA はエイコサノイドの前駆体としてリン脂質中に貯蔵されており、この貯蔵の機構に ACSL4 が関与していると考えられている。これまで、我々の解析で、ACSL4 発現を低下させた細胞では刺激依存的なエイコサノイド産生量が増加することを見出し、ACSL4 は刺激依存的に遊離した AA の再取り込みに関与していることを報告してきた。その一方で、ACSL4 欠損によりエイコサノイド産生が低下する細胞も存在することも知られており、AA 代謝における ACSL4 の役割は細胞の種類により異なる可能性がある。また近年、ACSL4 は生体膜リン脂質の PUFA 含有量の維持に関与することで、鉄・脂質過酸化を介する細胞死であるフェルトーシスに関与することが示されており注目を集めている。したがって、ACSL4 による PUFA 代謝は、生理活性脂質産生調節や細胞死の調節に深く関与する可能性が高いが、本酵素の PUFA 代謝における役割については不明な点が多く残されている。本研究では、ACSL4 遺伝子欠損マウスや ACSL4 ノックダウン細胞を用いることで、生体内 PUFA 含有量が低下した際に生体に及ぼす影響を解析し、PUFA の生体内での役割について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 野生型 (WT) および *Acs14* 遺伝子欠損 (*Acs14*KO) マウスにリポ多糖 (LPS) を投与することで全身性炎症反応を惹起させ、投与後の生存率及び各種パラメーターを比較した。また、*Acs14* の組織発現についても解析をおこなった。

(2) ヒト腎上皮細胞由来 HK-2 にコントロール及び ACSL4 siRNA をトランスフェクションし、ACSL4 を一過性にノックダウンした。細胞内アシル CoA 含有量、及び各種リン脂質の組成を LC-MS/MS により解析し、ACSL4 のノックダウンにより変化する生体内分子を検索した。また、本細胞における細胞死に対する ACSL4 の役割についても解析した。

4. 研究成果

(1) リポ多糖投与によるマウスの生体反応に対する ACSL4 の役割

*Acs14*KO マウス及び WT マウスに LPS を投与すると、*Acs14*KO マウスは WT マウスと比較して LPS 投与後 24 時間以内での死亡率が有意に増加した。したがって、ACSL4 の欠損は、LPS に対する感受性を高めることが明らかとなった。LPS 投与後の血中におけるエイコサノイド産生量を解析したところ、一部のエイコサノイドの産生量が WT と比べ *Acs14*KO マウスで有意に増加した、または増加する傾向があった。*Acs14*KO マウスで観察された LPS 投与による死亡率の増加は、非選択的シクロオキシゲナーゼ阻害剤の前処理により抑制された。したがって、*Acs14*KO マウスで観察されたエンドトキシンに対する感受性の増加の一部にエイコサノイド産生の増加が関与することが示唆された。現在、この研究成果について詳細な検討を進め、論文投稿の準備を進めている。

(2) ヒト腎上皮細胞由来 HK-2 細胞の細胞死における ACSL4 の役割¹

ACSL4 の組織内発現を免疫組織染色法により解析した結果、マウスの腎臓の上皮細胞に強く発現していることを見出した。そこで、腎上皮細胞における ACSL4 の機能に着目し、本酵素をノックダウンした際の影響の解析を行った。ヒト腎上皮細胞由来 HK-2 細胞に ACSL4 の siRNA のトランスフェクションにより一過的 ACSL4 の発現レベルを低下させたのち、LC-MS/MS により細胞内の長鎖アシル CoA 量およびリン脂質量の変化を解析した。その結果、ACSL4 のノックダウンによ

り、コントロール細胞と比較して、AA、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)などの PUFA (炭素数 20 以上で不飽和二重結合を 2 つ以上有する脂肪酸)に由来するアシル CoA の量が有意に低下した。一方、飽和脂肪酸、炭素数 18 以下の不飽和脂肪酸に由来するアシル CoA 量は、ACSL4 のノックダウンにより減少しなかった。これらの結果は、リコンビナント ACSL4 タンパク質を用いた ACSL4 の基質特異性の解析結果と一致していた²。また、ACSL4 のノックダウンによるこれらの長鎖アシル CoA 量への影響は、ACSL4KO マウスから調製した骨髄由来マクロファージと同様であった。次に、ACSL4 のノックダウンによる影響を解析した。その結果、ACSL4 のノックダウンでは、DHA を含有するリン脂質の量が有意に低下したが、予想外なことにその他の PUFA 含有リン脂質の量は影響を受けなかった。この結果は、ACSL4 欠損マウス由来のマクロファージにおいて、PUFA 含有リン脂質の量が、アシル CoA 量の変化と類似していたことと矛盾している²。したがって、細胞中の PUFA 含有リン脂質量の調節は ACSL4 由来のアシル CoA で調節されるというよりは、リン脂質再アシル化酵素群(ホスホリパーゼ A_{1/2}、ACSL、リゾリン脂質-アシル CoA アシルトランスフェラーゼ群など)などにより複合的に制御されており、その制御機構は細胞の種類により異なる可能性が考えられた。

フェロトーシスは、鉄・脂質過酸化を介する細胞死で、従来のプログラム細胞死とは異なる新たな細胞死の機構として注目されている。この細胞死に関わる脂質過酸化の標的である AA やアドレン酸(C22:4)を含有するホスファチジルエタノールアミンの生合成に ACSL4 関与することが報告されている^{3,4}。そこで、フェロトーシス誘導剤による HK-2 細胞の細胞死に対する ACSL4 のノックダウンの影響を解析した。その結果、前述の様に本細胞で ACSL4 をノックダウンしても AA やアドレン酸含有リン脂質の量は減少しないにも関わらず、フェロトーシス誘導剤である RSL-3 や FIN56 により誘導される細胞死は抑制されることが明らかとなった。また、RSL-3 や FIN56 による HK-2 細胞の細胞死は、フェロトーシス阻害剤であるフェロスタチン-1 で抑制されたのに加えて、ネクロトーシス阻害剤であるネクロスタチン-1 の処理によっても抑制された。したがって、腎臓上皮細胞由来 HK-2 細胞におけるフェロトーシス/フェロトーシス様の細胞死は、従来のフェロトーシスとは異なる ACSL4 依存的な経路を介して引き起こされている可能性が考えられた。

以上のより、PUFA の代謝は組織や細胞種により大きく異なっており、多価不飽和脂肪酸の生体への影響を解明するには、より多くの細胞や組織での影響に関する解析を、それらを総合的な評価が必要である。

引用文献

- 1 Kuwata, H., Tomitsuka, Y., Yoda, E. & Hara, S. Role of ACSL4 in the chemical-induced cell death in human proximal tubule epithelial HK-2 cells. *Biosci Rep* **42**, doi:10.1042/bsr20212433 (2022).
- 2 Kuwata, H. *et al.* Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* **1864**, 1606-1618, doi:10.1016/j.bbalip.2019.07.013 (2019).
- 3 Doll, S. *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature chemical biology* **13**, 91-98, doi:10.1038/nchembio.2239 (2017).
- 4 Kagan, V. E. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature chemical biology* **13**, 81-90, doi:10.1038/nchembio.2238 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuwata Hiroshi, Tomitsuka Yuki, Yoda Emiko, Hara Shuntaro	4. 巻 42
2. 論文標題 Role of ACSL4 in the chemical-induced cell death in human proximal tubule epithelial HK-2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	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） 10.1042/BSR20212433	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 -
1. 著者名 Kurotaki Anri, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro	4. 巻 44
2. 論文標題 Substrate Specificity of Human Long-Chain Acyl-CoA Synthetase ACSL6 Variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1571 ~ 1575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00551	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 -
1. 著者名 Ochiai Tsubasa, Sasaki Yuka, Yokoyama Chieko, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro	4. 巻 35
2. 論文標題 Absence of prostacyclin greatly relieves cyclophosphamide induced cystitis and bladder pain in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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） 10.1096/fj.202101025R	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 SASAKI YUKA, KUWATA HIROSHI, AIDA ERI, OCHIAI TSUBASA, KAMEI DAISUKE, NAKATANI YOSHIHITO, HARA SHUNTARO	4. 巻 41
2. 論文標題 Gene Deletion of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Suppresses Chemically Induced Skin Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1307 ~ 1314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.14888	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 Ochiai Tsubasa, Sasaki Yuka, Kuwata Hiroshi, Nakatani Yoshihito, Yokoyama Chieko, Hara Shuntaro	4. 巻 546
2. 論文標題 Coordinated action of microsomal prostaglandin E synthase-1 and prostacyclin synthase on contact hypersensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 124 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.004	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 Sasaki Yuka, Kuwata Hiroshi, Akatsu Moe, Yamakawa Yuri, Ochiai Tsubasa, Yoda Emiko, Nakatani Yoshihito, Yokoyama Chieko, Hara Shuntaro	4. 巻 153
2. 論文標題 Involvement of prostacyclin synthase in high-fat-diet-induced obesity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostaglandins & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106523 ~ 106523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2020.106523	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 Yoda Emiko, Hachisu Keiko, Kuwata Hiroshi, Nakatani Yoshihito, Hara Shuntaro	4. 巻 43
2. 論文標題 Gene Deletion of Calcium-Independent Phospholipase A ₂ (iPLA ₂) Suppresses Adipogenic Differentiation of Mouse Embryonic Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1375 ~ 1381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00321	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 Kuwata Hiroshi, Nakatani Eriko, Shimbara-Matsubayashi Satoko, Ishikawa Fumihiro, Shibamura Motoko, Sasaki Yuka, Yoda Emiko, Nakatani Yoshihito, Hara Shuntaro	4. 巻 1864
2. 論文標題 Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.07.013	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 Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro	4. 巻 144
2. 論文標題 Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostaglandins & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106363 ~ 106363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2019.106363	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 Shimbara-Matsubayashi Satoko, Kuwata Hiroshi, Tanaka Nobutada, Kato Masaru, Hara Shuntaro	4. 巻 42
2. 論文標題 Analysis on the Substrate Specificity of Recombinant Human Acyl-CoA Synthetase ACSL4 Variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 850 ~ 855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00085	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 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kamata Ryo, Sampilvanjil Ariunaa, Ito Junya, Nakagawa Kiyotaka, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro, Mizuta Koichi, Sakuma Yasunaru, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2334-2	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 1件)

1. 発表者名 桑田 浩、原 俊太郎
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸の活性化の阻害が炎症応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第 21 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 長鎖アシル CoA 合成酵素 4 の欠損はLPS 誘発ショックを増強する
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑田 浩、原 俊太郎
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸選択的長鎖アシルCoA合成酵素、ACSL4の生体内機能の解析
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑田 浩、小栗 百葉、原 俊太郎
2. 発表標題 炎症反応における長鎖アシルCoA合成酵素 4 の役割
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kuwata and Shuntaro Hara
2. 発表標題 The in vivo roles of long-chain acyl-coenzyme A synthetase 4 in phospholipid remodeling.
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑田 浩、原 俊太郎
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸選択的アシル CoA 合成酵素欠損が及ぼす生体への影響
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑田 浩、落合 翔、原 俊太郎
2. 発表標題 生体内における長鎖アシルCoA合成酵素 4 の役割
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
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