

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590137

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームの誘発におけるケトン体代謝調節の役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of ketone body-utilization on obesity-induced metabolic syndrome

研究代表者 福井 哲也

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90111971

研究成果の概要（和文）：本研究は、脂質代謝の副産物として捉えられていたケトン体の利用経路がメタボリックシンドロームに伴う生体内代謝の異常に如何なる役割を果たすのかを明らかにする目的で、ケトン体の新規利用酵素であるアセトアセチル CoA 合成酵素（AACS）の中枢および末梢組織における遺伝子発現が肥満とそれに伴って変動する血中因子によって受ける影響を検討した。その結果、本酵素は遊離脂肪酸や交感神経刺激によって発現が変動することが明らかになった。また、特に注目すべきこととして、瘦身ホルモンとして知られるレプチンが本酵素の誘導を介して神経細胞や筋肉細胞のケトン体利用経路を活性化している可能性が新たに明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the role of ketone body-utilization on metabolic disorders, we investigated obesity-induced alterations in the gene expression levels of the newly ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase (AACS), in peripheral tissues or central nerve system. As a result, we found that AACS gene expression was affected by treatment with free fatty acid and isoproterenol in white adipocytes. Moreover, we found the possibility that leptin up-regulates ketone body-utilization in neuro-cells and myocytes via activating the AACS transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：メタボリックシンドローム、ケトン体、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

1) 食事に占める脂質の割合が多いことは、肥満とメタボリックシンドロームの発生につながる。このような脂質の過剰摂取の状態では、脂質のβ酸化による消費の亢進に伴い、アセト酢酸を始めとするケトン体の産生量

が増大する。また、糖尿病や飢餓時など脂質が代償的に使用される際にも増加することから、ケトン体は余剰な代謝産物と捉えられがちであった。しかし近年、このケトン体が通常の生理状態でも異化・同化の両経路を通じて積極的に利用されることが明らかとな

ってきている。

2) 我々はこのケトン体の生理的利用に重要な酵素として新規にアセトアセチル CoA 合成酵素 (acetoacetyl-CoA synthetase: AACCS) を哺乳類より単離した。従来知られていたケトン体の代謝酵素、CoA 転移酵素 (SCOT) がミトコンドリアに局在し ATP 産生に関わっているのに対して、AACCS はサイトゾルに局在するため、ケトン体を脂肪酸やコレステロールなどの生体物質の合成経路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。このことから、本酵素を介してケトン体が生体内で合成基質として利用されていることが示唆された。

3) 本研究課題開始時点で、本酵素 AACCS については、発現部位が脂質合成の盛んな組織 (脳・肝臓・脂肪組織) に高発現すること、脂肪組織において遺伝子の発現量に顕著な性差があること、高脂肪食による食餌性肥満時に雄性ラットの皮下脂肪組織で特異的な発現上昇が認められ、特に肥大化した成熟脂肪細胞で顕著な遺伝子発現が認められること、などが明らかになっていた。脂質の過剰摂取によるメタボリックシンドロームの状態では、血中脂質や血糖量だけでなく、血中ケトン体量の増大も引き起こされている。AACCS は高脂肪食摂取に伴い脂肪組織で特異的に発現が亢進することから、増加したケトン体を基質として代謝する経路が肥満の増悪とメタボリックシンドロームの病態と関わっている可能性が予想された。

2. 研究の目的

肥満の原因は脂質の過剰な摂取など外因性の要因と、中枢神経系の摂食調節や末梢組織のエネルギー代謝経路の先天的な異常などの内因性の要因がある。本研究は、肥満による AACCS の遺伝子発現の誘導が、肥満の原因の違いと関連付けられるものであるかを検討することで、ケトン体代謝経路が肥満やメタボリックシンドローム時の脂質代謝異常やその増悪に関与するものかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 脂肪細胞における脂肪酸代謝の亢進が AACCS の発現に対して与える影響の検討

培養脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) に対し、パルミチン酸及びリノール酸、及びイソプロテレノールを 100 μ M 添加し、24 時間後に各種遺伝子の発現をノーザンブロット法を用いて比較検討する。

2) 脳神経系における AACCS の発現領域の検討
高脂肪食を 12 週摂取させたラット・マウス (食餌性肥満動物) および遺伝性肥満モデル動物 (Zucker fatty ラット、*ob/ob* および *db/db* マウス) より得た脳組織の新鮮凍結

切片を用い、in situ hybridization 法により AACCS および各種代謝酵素遺伝子の発現を検討する。

3) レプチンシグナル経路が与える影響の検討

培養細胞 (N41 神経細胞、C2C12 筋芽細胞) に対しレプチンを投与し 24 時間後に各種遺伝子の発現をノーザンブロット法を用いて比較検討する。また、レプチンシグナル経路阻害薬である STAT inhibitor peptide 及び compound C、同経路活性化剤である 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR) を添加し、24 時間後の各種遺伝子の発現をノーザンブロット法を用いて比較検討する。

4. 研究成果

1) 遊離飽和脂肪酸 (パルミチン酸) 及び不飽和脂肪酸 (リノール酸) 処理により、本酵素発現が有意に上昇した (図 1)。

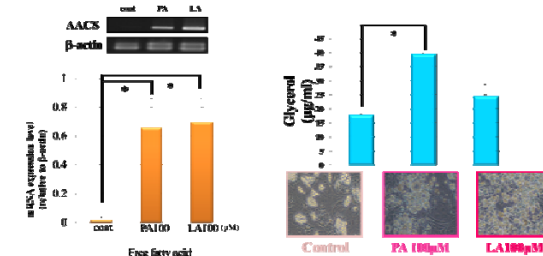


図1 遊離脂肪酸が脂肪細胞(3T3-L1細胞)に与える影響

左図:パルミチン酸(PA)、リノール酸(LA)によるAACCS遺伝子発現変動

右図:パルミチン酸(PA)、リノール酸(LA)による中性脂質分解量の変動

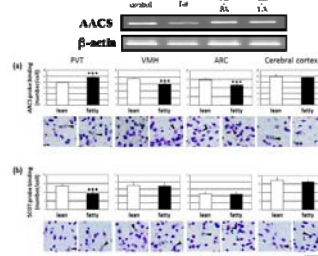


図3 脳神経系において遺伝性肥満 (Zucker fatty rat) が AACCS 遺伝子発現に与える影響

PVT: 室傍核後部

VMH: 腹内側核

ARC: 室傍核

一方、細胞内の脂肪酸分解を交感神経作動薬 (Iso-proterenol) 処理により誘導したところ、逆に発現が低下したが、外来的に遊離脂肪酸を併用投与したところ、打ち消された (図 2)。

2) 脳中枢系に

における本酵素遺伝子への肥満による影響を検討したところ、脂肪組織と異なり、高脂肪食による食餌性肥満時には影響は認められなかった。一方、Zucker fatty ラット、*ob/ob* および *db/db* マウスといった食欲抑制ホルモンであるレプチンの情報伝達不全による遺伝性肥満モデル動物では、視床下部の腹内側核及び弓状核で領域特異的な発現減少が認められた (図 3)。

これらの領域の神経細胞にはレプチン受容体が発現していることから、本酵素遺伝子の

発現に対するレプチンの影響を、胎児脳初代培養細胞および神経細胞 (N41 細胞) を用いて検討した。

その結果、本酵素発現はレプチンの濃度および処理時間に依存的に有意に上昇した (図4)。

3) 脂質のβ酸化による消費を司る骨格筋組織についても同様の検討を行った。その結果、脳と同様食餌性肥満の影響は認められない一方で、レプチンの情報伝達不全による遺伝子肥満モデル動物では本酵素発現が有意に減少していた (図5)。

また、C2C12筋芽細胞を用いてレプチンタンパク質への応答性を検討したところ、濃度依存的に本酵素の発現が誘導された (図6)。

図6 レプチンが筋肉細胞のケトン体代謝関連酵素の遺伝子発現に与える影響

以上のことから、レプチンは中枢・末梢ともAACSを介したケトン体利用経路を誘導することが明らかになった。

4) レプチンシグナル伝達経路を同定するために、各種シグナル伝達の阻害・活性化剤を用いて検討を行った (図7)。

その結果、神経細胞 (N41 細胞) では、AACS 遺伝子発現はAMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化剤 (AICAR) により減弱し、阻害剤 (compound C) により活性化した。

一方、筋芽細胞 (C2C12 細胞) では逆に AICAR で上昇し、compound C で減弱した。また、いずれの細胞系においても STAT-3 阻害ペプチドは AACS 遺伝子の発現に影響を与えなかった。これらのことから、レプチンは中枢・末梢ともに STAT-3 ではなく AMPK を介したシグナル伝達経路を介してケトン体代謝を活性化していることが示唆された。

5) レプチンは中枢では食欲抑

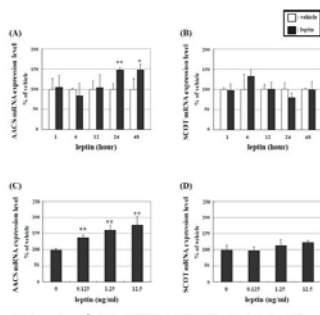


図4 レプチンが神経細胞のケトン体代謝関連酵素の遺伝子発現に与える影響

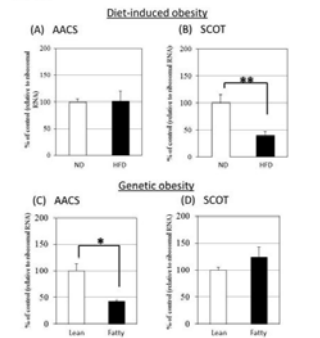


図5 原因の異なる肥満が骨格筋のケトン体代謝関連酵素の遺伝子発現に与える影響の違い

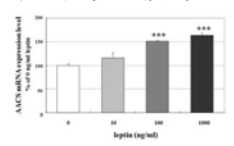


図6 レプチンが筋肉細胞のケトン体代謝関連酵素の遺伝子発現に与える影響

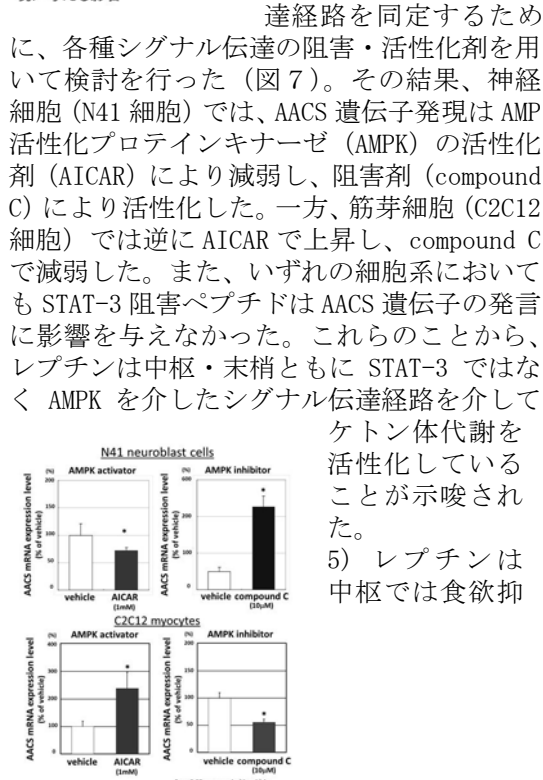


図7 レプチンが筋肉細胞のケトン体代謝関連酵素の遺伝子発現に与える影響

制を引き起こし、末梢では脂肪酸のβ酸化による消費を活性化することが知られている。特に後者の脂質消費活性化は AMPK シグナル経路を介していることが報告されている。本研究より得られた結果より、AACS は細胞外の脂肪酸とその消費の増大に伴って発現誘導され、その誘導には痩身に利するホルモンであるレプチンが関与することが明らかとなった。また、このレプチンシグナル経路に異常が起きることによって肥満を呈する場合、AACS の脳や筋肉における発現が正常時の水準に比べ低いことも明らかとなった。以上、本研究により AACS とそれを介したケトン体利用経路がレプチン耐性による肥満の際に代謝異常を増悪させている可能性を示唆する重要な知見が得られた。

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 6 件)
 1) R. Narishima, M. Yamasaki, S. Hasegawa, S. Yoshida, S. Tanaka, T. Fukui
 Leptin controls ketone body utilization in hypothalamic neuron. *Neurosci. Lett.* 査読有(2011) 490: 185-190
 2) R. Narishima, M. Yamasaki, S. Yoshida, S. Hasegawa, T. Fukui
 Differential effects of two types of obesity on ketone body utilization in skeletal muscle *J. Health Sci.* 査読有(2011) 57: 93-98
 3) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui and Y. Maitani
 Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis *Cancer Science* 査読有(2010) 101: 941-947.
 4) Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani
 The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 (2009) 32: 755-759.
 5) M. Yamasaki, S. Hasegawa, H. Yamanaka, R. Narishima, T. Fukui
 Ketone Body Utilization is Regulated by Male-specific Factors in Rat Subcutaneous Adipocytes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 査読有 (2009)17: 170-174.
 6) R. Narishima, M. Yamasaki, S. Hasegawa,

T. Fukui

Genetic obesity affects neural ketone body utilization in the rat brain.

Obesity 査読有(2009) 17: 611-615.

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 田島亜由美、長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、形体形成期におけるケトン体利用経路の特異性、日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- 2) 小野間理恵、山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、代謝活性化による脂肪細胞のケトン体利用の変動、日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- 3) 久米紘幹、長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、Neuro-2 細胞の分化段階におけるケトン体利用調節、日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- 4) 成島遼太、山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、脳内ケトン体利用に対するレプチンシグナルの影響、日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- 5) 長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、3T3-L1 脂肪細胞の分化段階におけるアセトアセチル CoA 合成酵素の役割、日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- 6) 山崎正博、古木崇太、田中慎也、長谷川晋也、福井哲也、脂肪細胞のケトン体利用に対する男性ホルモンの制御作用の検討、日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- 7) 山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、脂肪細胞の脂肪滴蓄積におけるケトン体利用酵素の役割、フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月 5 日、那覇
- 8) 長谷川晋也、久米紘幹、山崎正博、福井哲也、神経細胞におけるケトン体利用酵素の Sp1 による転写調節、日本薬学会大会、2010 年 3 月 28 日、岡山
- 9) 野田和希、長谷川晋也、松岡 賢、山崎正博、福井哲也、肝臓のコレステロール生合成におけるケトン体利用酵素の役割、日本薬学会大会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 10) 山崎正博、小林由佳、成島遼太、長谷川晋也、福井哲也、脂肪細胞のケトン体利用経路に対するレプチンシグナルの影響、日本薬学会大会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 11) 田中慎也、野々村磨つ、山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、酸化的ストレスによる脂肪細胞における脂質-ケトン体経路の変動、日本薬学会大会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 12) 成島遼太、山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、レプチンシグナルによる脳神経系のケトン体利用の制御、日本薬学会大会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 13) 田中慎也、野々村磨つ、山崎正博、長谷川晋也、福井哲也、酸化的ストレスに伴う脂肪細胞の脂質-ケトン体利用経路の変動、フ

ォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京

14) 渡辺聡、平良淳誠、川田美穂、廣瀬祥子、福田早紀、米澤夏南江、福井哲也、フルクトースにより誘発される生活習慣病におけるレドックスバランスの関与、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京

15) 野田和希、長谷川晋也、松岡 賢、山崎正博、福井哲也、肝臓のコレステロール生合成におけるケトン体利用酵素の役割、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京都

16) 長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、神経細胞におけるケトン体利用酵素の Sp1 による転写調節、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京都

17) 成島遼太、山崎正博、尾崎章太郎、長谷川晋也、福井哲也、脳内ケトン体利用に対するレプチンシグナルの影響、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京

18) 野田和希、長谷川晋也、松岡 賢、山崎正博、福井哲也、肝臓のコレステロール生合成におけるケトン体利用酵素の役割、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

19) 長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、神経細胞におけるケトン体利用酵素の SP1 および SREBP-2 による転写調節、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

20) 渡辺 聡、川田美穂、廣瀬祥子、福田早紀、米澤夏南江、福井哲也、フルクトース過剰摂取による生活習慣病の発症初期段階における尿酸の役割、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

21) 星 正通、長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、小胞体ストレス応答におけるケトン体利用経路の役割、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日、静岡

22) 長谷川晋也、山崎正博、福井哲也、神経細胞におけるケトン体利用酵素の SREBP-2 による転写調節、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日、静岡

23) 山崎正博、成島遼太、長谷川晋也、福井哲也、レプチンシグナル経路が脳神経系のケトン体利用に与える影響の検討、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日、静岡

24) 渡辺 聡、柿原亜美、中谷由香里、前原啓、吉田紗矢香、福井哲也、フルクトース誘発生活習慣病におけるレドックスのアンバランスに対するストレス応答としての尿酸の増加、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日、静岡

25) S. Hasegawa, M. Yamasaki, T. Fukui、

Transcriptional regulation of ketone body utilizing enzyme by Sp-1 in neuroblastoma cells, Experimental biology 2011、平成 23 年 4 月 11 日、Washington

26) M. Yamasaki, S. Hasegawa, R. Narishima, T. Fukui、Ketone body utilization is regulated by leptin signaling in hypothalamic neuron, Experimental biology 2011、平成 23 年 4 月 12 日、Washington

27) 山崎正博, 成島遼太, 尾崎正太郎, 長谷川晋也, 福井哲也、レプチンシグナルが視床下部におけるケトン体利用に与える影響、フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 23 年 10 月 28 日、金沢

28) 山崎正博、肥満による生体内代謝異常の新たなターゲット～細胞内ケトン体利用酵素、acetoacetyl-CoA 合成酵素～、日本応用酵素協会研究発表会（招待講演）、平成 23 年 11 月 14 日、大阪

29) S. Hasegawa, M. Yamasaki, T. Fukui、Ketone body-utilizing enzyme has a crucial role in cholesterol biosynthesis in the mouse liver、第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 14 日、横浜

30) 前田晃奈, 長谷川晋也, 野田和希, 山崎正博, 福井哲也、コレステロール生合成におけるケトン体利用酵素の役割、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 29 日、北海道

31) 長谷川晋也, 山崎正博, 福井哲也、神経突起伸長におけるケトン体利用酵素の役割、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 29 日、北海道

32) 山崎正博, 成島遼太, 尾崎正太郎, 今井智実, 長谷川晋也, 福井哲也、筋肉におけるケトン体利用経路が受ける影響の肥満の成因による違い、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 30 日、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 哲也 (FUKUI TETSUYA)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90111971

(2) 研究分担者

山崎 正博 (YAMASAKI MASAHIRO)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80328921

(3) 連携研究者

なし

