

氏名（本籍）	成島 遼太	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第144号	
学位授与年月日	平成23年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	肥満とレプチンシグナル異常が生体内のケトン体利用に与える影響	
論文審査委員	主査	教授 福井 哲也
	副査	教授 辻 勉
	副査	准教授 輪 千浩史

論文内容の要旨

近年の日本における新たな疾病要因として注目されているものに、食事に占める脂質の割合や中高年を中心とした肥満者数の増加など、生体エネルギー代謝に関わる問題が挙げられる。特に肥満は、単に脂肪細胞の肥大化や細胞数の増加が起こっている状態のことでなく、生体の恒常性の維持に必要な生理活性物質の分泌の異常、またそれと連動した、生体組織における様々なエネルギー代謝の異常も伴うことから、生活習慣病の主要なリスクファクターとして位置づけられている。例えば、脂肪組織より分泌されるレプチンの感受性は複数の組織で肥満時に低下することが報告されており、これにより脳で摂食やエネルギー代謝のシグナルに障害が生じると共に、エネルギー消費器官である筋肉において脂質代謝の減少や異所性の脂質蓄積が起こり、それに起因するインスリン抵抗性が惹起される。また、肥満時の血中遊離脂肪酸の上昇は、それ自体が筋組織などの糖・脂質代謝異常を起こす、いわゆる「脂肪毒性」を誘発することも示唆されている。

生体内における脂肪酸は通常、ミトコンドリアにおける β -酸化により代謝されるが、肥満時のようにエネルギー供給が過多の際には生成するアセチル CoA が TCA サイクルで処理されずアセト酢酸などのケトン体としてミトコンドリア外へ放出される。このことから、長年ケトン体は脂質代謝が亢進する際の副産物としての局面が強調されてきた。しかし近年、脳を始めとする様々な組織においてケトン体がエネルギー源として積極的に利用されることが明らかとな

り、このエネルギー産生経路で働くミトコンドリアのケトン体利用酵素、succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT)の生理的意義が研究されている。

一方、ケトン体をエネルギー源としてではなく、生体成分の合成基質として利用するサイトゾル内経路の存在も以前から予測されてきたが、我々が新たなケトン体利用酵素として単離精製することに成功した acetoacetyl-CoA synthetase (AACS)が、この経路を司るケトン体活性化酵素であることが明らかとなった。ケトン体であるアセト酢酸はこの酵素により CoA エステルとなり、同じサイトゾルに存在する脂肪酸合成系やコレステロール合成系へと供給される。実際、AACS は脂肪組織・肝臓・脳といった脂質代謝が盛んな組織に高発現していることを我々は明らかにしている。さらに興味深いことに、AACS は雄の皮下部脂肪組織で肥満により、その遺伝子発現が特異的な影響を受けることが明らかになった。特に食餌性肥満と遺伝性肥満を比較すると両者には対照的な影響が認められたことから、AACS が肥満の成因に関わる因子である可能性が予想された。同時にこのことは、肥満による代謝異常に重要な役割を果たす中枢系やエネルギー消費組織である骨格筋等の末梢組織においても AACS 及びケトン体を中心とした代謝系酵素の発現が影響を受けている可能性を示すものである。

そこで、レプチン受容体異常により遺伝性肥満を示す Zucker fatty (ZF) rat を用いて脳におけるケトン体代謝への影響を検討した。まず、痩せ型である Zucker lean rat の脳冠状切片を用いて、AACS の詳細な遺伝子発現分布を検討した。その結果、AACS は大脳皮質、海馬だけでなく、視床下部の腹内側核 (VMH) 及び弓状核 (ARC) においても強く発現していた。この発現分布は脂肪酸合成の律速酵素である acetyl-CoA carboxylase (ACC)-1 や、もう一方のケトン体代謝酵素である SCOT とは明らかに異なっていたが、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR) とは類似していた。これと比較して、肥満型である ZF rat においては、AACS の遺伝子発現は大脳皮質では肥満による影響が認められなかったが、視床下部の VMH、ARC では有意に減少していた。一方、SCOT は視床の第三脳室隣接部でのみわずかに減少しているものの、VMH、ARC においては顕著な変動は認められなかった。また、HMGCR、ACC-1 の発現には全領域で影響が認められなかった。

VMH 及び ARC は食欲中枢として知られている領域である。これらの領域で AACS が強い

発現を示し、かつ遺伝性肥満により領域特異的な発現抑制を受けていたことから、AACS を介したケトン体利用経路が食欲調節に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。また、HMGCR と発現分布が類似していることから、AACS により活性化したケトン体はコレステロールやその後の代謝産物であるニューロステロイドなどの生合成に利用される可能性が、さらに VMH や ARC はシグナル伝達能を有するロングフォーム型のレプチン受容体(LR-b)が強く発現している領域であることから、AACS の遺伝子発現がレプチンシグナルにより制御を受けている可能性も考えられた。

レプチンシグナルは中枢における食欲制御だけでなく、筋組織を中心とした末梢における脂肪酸消費の亢進も起こすことが知られている。そこで、次に末梢組織のケトン体代謝に対する影響について、脂肪酸消費とそれに伴うケトン体産生が起きる筋組織を用いて検討した。

まず、食餌性肥満を示す高脂肪食負荷ラット及び遺伝性肥満を示す ZF rat の 2 種の異なる肥満モデル動物の骨格筋での検討を行った。その結果、6 週間高脂肪食を摂取させたラットでは、血糖値及び血中ケトン体量が通常食群より高値を示した。このとき AACS の遺伝子発現には高脂肪食摂取による変動は認められなかったが、SCOT は有意に減少した。一方、ZF rat では血糖値には有意な変化がなく、血中ケトン体は低値を示した。このとき AACS の遺伝子発現は有意に減少したが、SCOT には有意な変動は認められなかった。次に、マウス筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた *in vitro* の系により検討を行ったところ、AACS の遺伝子発現はレプチンにより濃度依存的に上昇した。一方、SCOT の発現には影響は認められなかった。AACS 発現が減少していた ZF rat はレプチンシグナル不全により肥満となることから、骨格筋における AACS の遺伝子発現はレプチンシグナルにより維持されていると考えられた。このことから、レプチンは骨格筋において脂肪酸消費だけではなく、AACS を介したケトン体から脂肪酸への再利用系も誘導することで、高脂肪食などによる血中におけるケトン体量の増加に対応している可能性が考えられた。

ここまでの結果から、レプチンが中枢神経系である視床下部でも AACS の遺伝子発現を制御している可能性が類推された。そこで、ZF rat と同様に LR-b 遺伝子に異常がある

db/db マウス、及びレプチン遺伝子に異常がある *ob/ob* マウスを用いて、レプチンと AACS の関連性を検討した。

その結果、AACS の遺伝子発現は *db/db* 及び *ob/ob* マウスの両群共に視床下部の VMH と ARC で領域特異的に減少することがわかった。さらに、LR-b が発現している脳胎仔初代培養細胞、及び視床下部神経培養細胞株である N41 細胞にレプチンを処理し、遺伝子発現の変動を検討したところ、AACS は処理 24 時間後で有意な上昇が認められた。また、その発現上昇はレプチン濃度に依存的であった。一方、SCOT は両細胞共に有意な変動は認められなかった。これらの結果より、視床下部における AACS の遺伝子発現もレプチンシグナルにより正に制御されている可能性が示唆された。

レプチンは骨格筋及び視床下部において、タンパク質リン酸化酵素、AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性を制御し、その細胞内シグナルカスケードを介してエネルギー代謝の亢進作用を示すと考えられている。特に中枢においては、AMPK を阻害することにより食欲抑制を引き起こすことが報告されている。そこで、レプチン-AMPK シグナル経路が AACS の遺伝子発現の制御に関わる可能性を検討するために、AMPK 活性化剤である AICAR 及び阻害剤である compound C の影響を N41 細胞を用いて検討した。その結果、AACS の遺伝子発現は vehicle 群と比較して、AMPK 活性化剤により 28%減少し、阻害剤により約 4.5 倍上昇した。一方、SCOT は阻害剤によりわずかに上昇するのみで大きな影響は認められなかった。これらの結果より、レプチンによる AACS の遺伝子発現の制御には、AMPK を介したシグナル伝達経路が関わっている可能性が示唆された。

レプチンは脂肪細胞由来のアディポカインの中でもエネルギーの摂取量と消費量の双方に関与する肥満抑制ペプチドであることから、肥満と生活習慣病に対する最も重要な因子の一つである。実際、シグナル伝達不全によるレプチン抵抗性はヒトの肥満においても認められる。従って、レプチンにより AACS の遺伝子発現が正に制御されていることは、AACS を介したケトン体利用経路が肥満時にその増悪を抑制する方向に働く可能性を想起させるものである。また、レプチンには神経保護作用があることが報告されている。AACS は脳内において、コレステロール合成系と類似した細胞局在性を示したことから、レプチンによりケトン体からニュー

ロステロイドに至る系が活性化することで、保護作用が生じる可能性も考えられる。

以上の本研究より得られた知見は、中枢及び末梢における AACGS 及びケトン体利用の制御がエネルギーバランスの維持における新しいターゲットとなる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

脂肪酸は生体内ではミトコンドリアにおける β -酸化により代謝されるが、肥満時のようにエネルギー供給が過多の際には、その代謝産物であるアセチル CoA は TCA サイクルの処理能力を超えて蓄積されるため、その多くがケトン体へと変換されてミトコンドリア外へ放出される。また、重度の糖尿病においては、脂質動員により過剰に生成したケトン体によって血液アシドーシスが起ることが知られている。これらのことから、長年ケトン体は脂質代謝の亢進に伴う異常代謝産物としての局面が強調されてきた。しかし近年、脳を始めとする様々な組織においてケトン体がエネルギー源として積極的に利用されることが知られるようになり、このエネルギー産生経路にはミトコンドリアのケトン体利用酵素、succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT) が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、ケトン体をエネルギー源としてではなく、生体成分の合成基質として利用するサイトゾル内経路の存在も以前から予測されてきたが、申請者の所属する教室で新たなケトン体利用酵素として見いだした acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) が、この経路を司るケトン体活性化酵素であることが明らかとなった。ケトン体であるアセト酢酸はこの酵素により CoA エステルへと活性化され、同じサイトゾルに存在する脂肪酸合成系やコレステロール合成系に供給される。実際、AACS は脂肪組織・肝臓・脳といった脂質代謝が盛んな組織に高発現していることが明らかとなっているが、生合成基質としてのケトン体利用の生理的意義は、エネルギー源としての利用に比べて多様な側面を有するため、未解明の部分も多い。そこで申請者は、現在までに知られている予備的知見、すなわち、皮下部脂肪組織において AACS の遺伝子発現が食餌性肥満では上昇する一方で遺伝性肥満では逆に減少するため AACS が肥満の成因に関わる因子である可能性が考えられること、さらには余剰なエネルギーの蓄積を担う脂肪組織だけではなく、末梢の代謝調節を行う脳やエネルギー消費組織である骨格筋においても AACS を介したケトン体利用経路が肥満による影響を受けている可能性が考えられることなどを踏まえ、*in situ* hybridization 法及び Northern blot 法を用いて、肥満が与える脳及び骨格筋のケトン体代謝への影響の解明を試み以下の結果を得た。まず、遺伝性肥満を示す Zucker fatty (ZF) rat の脳切片を用いて検討し、脳における AACS の遺伝子発現は、肥満により視床下部でのみ領域特異的に減少することを見だし、視床下部が食欲中枢として知られていることから、AACS

を介したケトン体利用が肥満時の食欲調節に関与する可能性を示した。また、骨格筋における AACCS の発現も ZF rat で有意に減少することを確認するとともに、ケトン体のエネルギー利用に関わる酵素である SCOT の場合は、脳、骨格筋共に遺伝性肥満による影響を受けないことを明らかにした。さらに、ZF rat はレプチン受容体 (LR-b) のシグナル伝達不全により肥満を示すことから、C2C12 培養筋芽細胞を用いて検討し、レプチンは SCOT には影響を与えず、AACCS の発現のみを上昇させることを見いだした。すなわち、レプチンは骨格筋においてケトン体の産生を伴う脂質の β -酸化を活性化することから、レプチンによりケトン体のサイトゾルにおける AACCS を介した再利用系が誘導されることで、骨格筋から血中への過剰なケトン体の放出が抑制されている可能性を明らかにした。さらに、ZF rat と同様に LR-b に変異を持つ *db/db* マウス、リガンドであるレプチンに変異を持つ *ob/ob* マウスを用いて、レプチンと AACCS の関連性を検討し、AACCS の遺伝子発現は両肥満マウスで共に視床下部で領域特異的に減少すること、さらに、胎仔脳初代培養細胞、及び視床下部由来培養神経細胞株である N41 細胞を用いて検討し、レプチンは AACCS の発現を上昇させるが、SCOT には影響を与えないことを示した。さらに、レプチンは視床下部において、AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性を阻害することにより食欲抑制作用を示すことが報告されていることから、N41 細胞に対して AMPK 活性化剤 (AICAR) 及び阻害剤 (compound C) を処理して AACCS 発現への影響を検討し、AACCS は AICAR により減少、compound C により大きく上昇すること、SCOT はそのような影響をほとんど受けないことを明らかにした。これらの結果より、AACCS の遺伝子発現はレプチンにより制御・維持されており、そのシグナルは LR-b から AMPK を介したシグナル伝達経路が関わっている可能性を示した。レプチンは、エネルギー摂取と消費の双方に関与する肥満抑制ホルモンであり、レプチンにより AACCS が正に制御されていることは、AACCS を介したケトン体利用が肥満の抑制に関わる可能性を示すものである。本研究は脂質代謝におけるケトン体の位置づけに関する概念を大きく変えるものであるとともに、これにより得られた知見は、従来あまり注目されていなかったケトン体利用の制御が生体におけるエネルギーバランスの維持に重要であり、AACCS がその経路における新たな治療や診断に対するターゲットとなる可能性を示唆するものである点で、現代社会における予防薬学・衛生薬学の重要課題である生活習慣病の発症メカニズムの解明およびその予防に関する重要な知見を含んでいると考えられる。よって博士（薬学）の学位に相応しいものと判断した。