

令和元年5月27日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16014

研究課題名(和文) 出生児低体重モデルにおける心筋再生・病態応答能の検討

研究課題名(英文) Cardiovascular adaptation mechanisms in murine low birth weight model

研究代表者

有馬 勇一郎 (Arima, Yuichiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：60706414

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)： 今回の研究により、ケトン体合成が新生児期に亢進していることが確認された。生後3日目をピークとしてケトン体合成の律速段階酵素であるHmgcs2の発現量が上昇しており、病的モデルである出生時低体重モデルにおいてはHmgcs2の発現が有意に低下していることが確認された。周産期におけるケトン体合成能の意義を明らかにする為、CRISPR/Cas9法を用いてケトン体合成不全マウス(Hmgcs2 KO)を作成して評価した結果、出生後より急速に異所性脂肪沈着が亢進しミトコンドリアタンパクの過剰なアセチル化による機能低下を生じることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、出生後に増強するケトン体合成能が肝臓における異所性脂肪沈着を抑え、保護的に働く作用があることが確認された。また、ケトン体合成により、ミトコンドリアタンパクの過度なアセチル化が抑えられ、ミトコンドリア機能の維持に寄与していることが確認された。出生時低体重の状態ではケトン体合成能が低下していることは臨床上も報告されており、ケトン体による臓器保護的な役割が明らかになることで、生後の過度な脂肪酸負荷の防止などといった予防策を立てることが可能となる。

研究成果の概要(英文)： Ketogenesis was activated in postnatal period, we confirmed the high expression of Hmgcs2, rate-limiting enzyme for ketogenesis, during postnatal period and also found the expression of hmgcs2 was suppressed in murine low birth weight model.

To clarify the role of perinatal ketogenesis, we newly generated Hmgcs2 KO mice using CRISPR/Cas9 technique. Hmgcs2 KO mice represented rapid progression of ectopic lipid deposition during the neonatal period and accompanied with hyperacetylation of mitochondrial proteins.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ケトン体 異所性脂肪沈着 ミトコンドリア アセチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

ケトン体は $\beta$ ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、アセトンより構成される代謝物質で、飢餓時のエネルギー源として知られる (Krebs, 1966)。ケトン体は主に肝臓において産生され、他の臓器で消費されるが、ケトン体の合成と利用は様々な因子により制御されている。ケトン体はエネルギー基質としての重要性とともに、 $\beta$ ヒドロキシ酪酸などはシグナル因子や内因性のHDAC 阻害作用なども報告されており、多面的な働きが注目されている (Puchalska and Crawford, 2017)

ケトン体合成と消費の役割分担は、組織特異的な代謝酵素の発現により制御されている。ケトン合成はアセチル CoA を基質として利用した縮合反応により合成され、ミトコンドリアタンパクである 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (Hmgcs2) が律速段階酵素として機能する。

過去の報告では、アンチセンスオリゴを用いたマウス成獣に対するケトン体合成不全モデルに対して、高脂肪食を負荷すると NAFLD 様の異所性脂肪沈着が報告されている (Cotter et al., 2014)。一方で、胎児期や幼児期などの環境においてはケトン体合成が大きく変動することも報告されているが、その意義は明らかでない。

#### 2. 研究の目的

周産期環境におけるケトン体合成の意義を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 法を用いてケトン体合成の律速段階酵素である Hmgcs2 の機能喪失マウスを作成した。作成したマウスの組織を回収し、メタボローム解析やウェスタンブロット法による生化学的解析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### 周産期のケトン体合成能の特徴

マウスモデルを用いて自由摂餌下に採血を行い、血中ケトン体濃度を比較した。自由摂餌状態ではマウス胎仔及び成獣での血中濃度は低く抑えられていたが、新生仔期のマウスにおいては、胃が母乳で満たされているにも関わらず、有意に高いケトン体濃度を示した。Hmgcs2 の発現に注目し、幼獣及び成獣期における mRNA、タンパクの発現を検討すると、出生後より急速に Hmgcs2 の発現が上昇することが明らかとなった。以上の結果から、新生仔期においてはエネルギー基質の供給という目的以外で、ケトン体合成が機能している可能性が示唆された。

##### 心臓におけるケトン体合成能の評価

過去の報告においても、新生児期の心臓においてケトン体合成が生じるとの報告があったが、その詳細は不明であった。我々は、新生児期のマウス心臓を経時的に解析し、生後3日目ピークとしてケトン体合成の律速段階である Hmgcs2 遺伝子の転写活性が増強することを確認した。また、免疫組織染色法により評価した結果、Hmgcs2 は心筋細胞特異的に発現していることが確認され、心臓におけるケトン体合成は、心筋細胞において生じていることが確認された。また、出生時低体重モデルマウスにおいては出生後のケトン体合成能が有意に低下していることが確認され、妊娠中環境ストレスがケトン体代謝に影響を及ぼすことが明らかとなった。

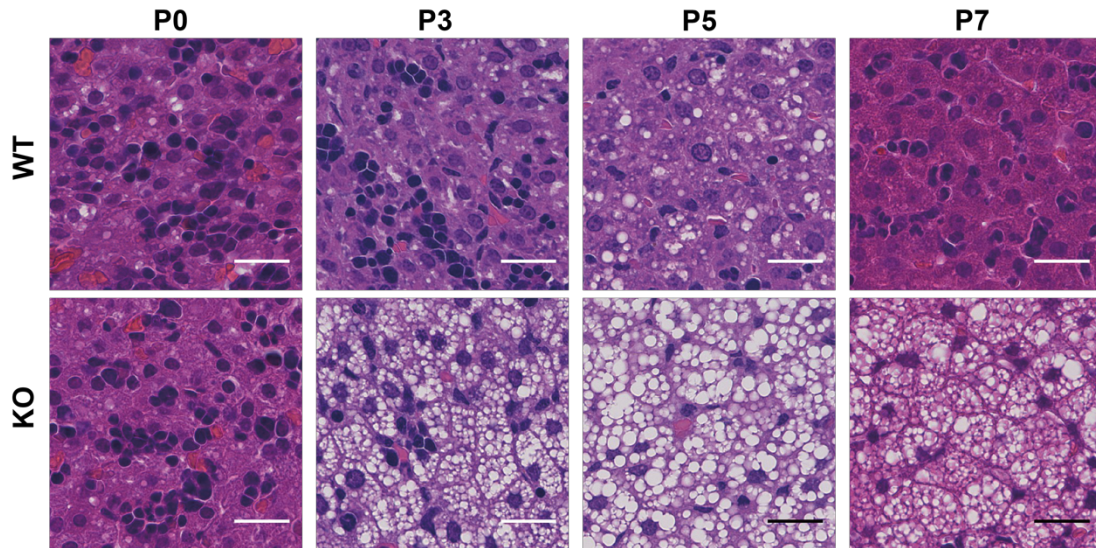
##### ケトン体合成不全マウスモデルの作成

周産期におけるケトン体合成能の意義を明らかにするため、律速段階酵素である Hmgcs2 を標的として、CRISPR/Cas9 法を用いたノックアウトマウスの作成を行った。2<sup>nd</sup> ATG 近傍にガイド RNA を作成して導入した結果、10bp と 14bp が欠失した、2種類の deletion mutant を樹立した (Hmgcs2 KO)。Hmgcs2 に対するウェスタンブロットにより、Hmgcs2 KO マウスでは Hmgcs2 タンパクが発現していないことを確認し、機能的な評価を確認するため血中・組織中ケトン体濃度を測定した結果、Hmgcs2 KO マウスでは有意にケトン体濃度が低下していることが確認された (Whole blood; WT  $1.25 \pm 0.08$  mmol/L, n=6, KO  $0.113 \pm 0.03$  n=8, Serum; WT  $1.62 \pm 0.11$  mmol/L, n=10, KO  $0.0 \pm 0.0$  mmol/L, n=11, Liver tissue; WT  $1564 \pm 60.1$  mmol/g, n=5, KO  $179 \pm 21.5$  mmol/g, n=5)。以上の結果から、ケトン体合成不全マウスモデルを作成することに成功したが、出生率を評価すると野生型と Hmgcs2 KO マウスに明らかな出生率の差は認めず、少なくともケトン体合成不全状態は、胎性期に致死的な影響をもたらさないことが確認された。

##### 生後のケトン体合成不全は、急速な異所性脂肪沈着を引き起こす

続いて、出生後の評価を行うため、新生仔期の肝臓を経時的に評価した。出生直後 (P0) において、肝臓の外観及び組織所見に明らかな差は認められなかったが、Hmgcs2 KO マウスの肝臓は授乳開始後より急速に腫大し、顕著な異所性脂肪沈着を定することが明らかとなった。電子顕微鏡にて Hepatocyte の形状を確認すると、Hmgcs2 KO マウスの Hepatocyte では小滴の脂肪滴が核の変位を伴わずに大量に蓄積しており、小滴性の脂肪沈着所見であることが明らかとなった。(図1)。

図 1



### Hmgcs2 KO マウスの肝臓は、ミトコンドリア機能が障害される

組織所見で認められた小滴性の脂肪沈着は、ミトコンドリア機能異常に合併することが知られていたため、より詳細な検討を行うため、生後3日目のサンプルを用いてメタボローム解析を実施した。その結果、解糖系は大きく抑制されている一方で、アセチル CoA は Hmgcs2 KO マウスで有意に上昇しており、 $\beta$ 酸化由来の蓄積が示唆された。しかしながら、TCA サイクル内の代謝産物は Hmgcs2 KO マウスで有意に低下しており、ミトコンドリア機能不全に矛盾しない結果が得られた。続いて代謝関連タンパクの量的変化についても検討するため、*in vitro* proteome-assisted MRM for Protein Absolute Quantification (iMPAQT)法を用いて代謝関連タンパクの量を比較した結果、当初の予想に反して、ミトコンドリアタンパクは野生型マウスより Hmgcs2 KO マウスの方が多いことが確認された。

### Hmgcs2 KO マウスの肝臓では、ミトコンドリアタンパクのアセチル化が亢進する。

Hmgcs2 マウスではミトコンドリア機能が低下しているにも関わらず、タンパク量は多いという結果が確認されたため、機能低下の原因として翻訳後修飾による影響を検証した。野生型及び Hmgcs2 KO マウス肝臓より抽出したミトコンドリアタンパクに対して、アセチル化リジン交代でウェスタンブロットを行うと、KO マウスで有意にミトコンドリアタンパクのアセチル化が亢進していることが確認された。

### 考察

以上の検討により、我々は新生児期におけるケトン体合成能の生理的意義として、ミトコンドリアタンパクの過度のアセチル化を緩和し、機能を保護する働きがあることを確認した。生後環境の変化の中で、胎盤由来のグルコースメインのエネルギーから、母乳由来の脂肪酸を多く含んだ栄養環境へと変化する。このような大きな変化の中で、急激に増加する炭素負荷の一部を、ケトン体へと変換することで、ミトコンドリア内でのアセチル CoA の蓄積を回避し、保護的に作用する可能性が示唆された(図2)。

また同様の現象は、肝細胞に限らずそのほかの臓器においても生じている可能性が示唆される。今回の研究では心筋細胞におけるケトン体合成能も確認できており、肝細胞と同様に解糖系から脂肪酸異化へと代謝状態が大きく変化する中で、ケトン体合成が干渉的な作用をもたらしている可能性が示唆された。加えて、出生児低体重マウスモデルにおいてケトン体合成能が低下していることも確認されており、今後は合成能低下の機序について、エピゲノム制御の面や翻訳後修飾の影響に注目した解析を進める。

今後の方針としては、翻訳後修飾によるミトコンドリア機能の変化をより詳細に検討するとともに、肝外性ケトン体合成の意義を明らかにする為、臓器特異的な Hmgcs2 コンディショナル KO マウスを作成し、表現型の解析を行う。

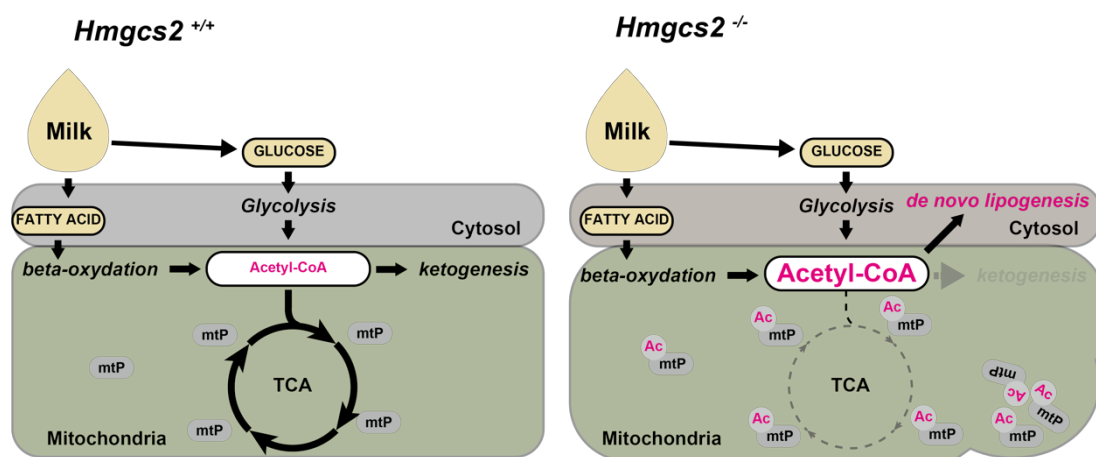


図2 本研究の概念図

ケトン体合成は脂肪酸負荷を緩和して、ミトコンドリア機能保護的に作用する。

<引用文献>

Krebs, H.A. (1966). The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv Enzyme Regul* 4, 339-354.

Puchalska, P., and Crawford, P.A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab* 25, 262-284.

Cotter, D.G., Ercal, B., Huang, X., Leid, J.M., d'Avignon, D.A., Graham, M.J., Dietzen, D.J., Brunt, E.M., Patti, G.J., and Crawford, P.A. (2014). Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J Clin Invest* 124, 5175-5190.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

**Arima Y\***, Nishiyama K, Izumiya Y, Kaikita K, Hokimoto S, Tsujita K. Fetal Origins of Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 41-48, 2018 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 1 件)

第 8 3 回日本循環器学会学術集会 2019年3月30日、パシフィコ横浜、日本  
Yuichiro Arima, Epigenetic Modification by Perinatal Environmental Stress and its Lifelong Effects to Cardiovascular Diseases

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumadai-junnai.com>

6. 研究組織

該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。