

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08520

研究課題名（和文）DNAメチル化に注目した低出生体重児の成人後循環器疾患リスク上昇機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of increased risk of adult onset cardiovascular disease in low birth weight infants focusing on DNA methylation

研究代表者

有馬 勇一郎 (Arima, Yuichiro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：60706414

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）：低出生体重マウスモデルを用いた検討の結果、新生仔期には全身でケトン体合成が亢進していることが明らかとなった。ケトン体は飢餓時のエネルギー源として知られる一方、近年エピゲノムにも影響を及ぼすことが報告されている。そこで、DNAメチル化などのエピゲノム変化にケトン体代謝が関与している可能性を考え、ケトン体合成の律速段階酵素であるHMG-CoA synthase2(Hmgcs2)のノックアウトマウスの作成を進めた。Hmgcs2 KOマウスは致死的表現型を示さないものの、脂肪肝が悪化し、ケトン体合成にミトコンドリアを保護する作用があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、偶然にもケトン体代謝の新たな機能を知ることができた(Arima Y, Nature Metabolism 2021)。現在このモデルを用いてDNAメチル化やヒストン修飾の変化を解析中である。今後ケトン体代謝によるエピゲノム制御機構が明らかになることで、周産期環境ストレスがどのように遺伝子発現に影響し、将来の表現型に変化を加えるのか、明確な分枝基盤に基づいて説明することが可能となる。またケトン体代謝については健康や老化の観点からも注目されており、これらの健康長寿研究にたいしても、新たな解析ツールとして有用である。

研究成果の概要（英文）：As a result of studies using a low birth weight mouse model, we clarified that ketone body synthesis was enhanced throughout the body during the neonatal period. While ketone bodies are known as an energy source during starvation, recent report reveals its impacts to the epigenetic modifications. Therefore, considering the possibility that ketone body metabolism is involved in epigenome changes such as DNA methylation, we proceeded with the creation of knockout mice for HMG-CoA synthase 2 (Hmgcs2), which is a rate-determining step enzyme for ketone body synthesis. Although the Hmgcs2 KO mouse did not show a lethal phenotype, it was revealed that fatty liver was exacerbated and that ketone body synthesis had a mitochondrial protective effect.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ケトン体代謝

## 1. 研究開始当初の背景

Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD)学説は高血圧、虚血性心疾患、糖尿病、慢性腎臓病といった成人後の生活習慣病が周産期環境に影響されるという概念である。特に低出生体重児と成人後生活習慣病リスクとの関連について報告が多く、Barkerらが1986年に低出生体重であることが将来の虚血性心疾患の罹患リスクを上昇させることを明らかにした報告に由来する(Barker et al., Lancet 1986)。これまでに大規模な疫学研究が欧米でなされており、出生時体重 2500g 未満では約 3 割、2300g 未満では約 5 割虚血性心疾患のリスクが上昇することが報告されている (Rick-Edwards et al., BMJ 1997)。

最近の報告では世界で生まれる子供の 16%は低出生体重児と増加傾向にある (UNICEF 世界子供白書 2016)。本邦においては出産年齢の高齢化や妊婦のやせ(低栄養)などの要因もあり、低出生体重児の出生割合は全出生児のおよそ 1 割に達している(平成 30 年 我が国の人口動態(政府統計)より)。加えて日本は諸外国と比べて新生児の救命生存率が著しく高いという特徴があり、これは高度先進医療の進歩による恩恵でもあるが、同時に循環器疾患を含めた生活習慣病罹患のハイリスク群が将来にわたって増加することを意味する。しかしながら、DOHaD 学説は疫学研究による知見が先行しており、特に循環器領域においてその機序を明らかにした報告はない。

これまでの妊娠中にカロリー制限を施すことで、出生児体重が有意に低下する低出生体重マウスモデルの作成に成功した。加えて、得られたサンプルを用いて RNAsequencing 解析を実施した結果、低出生体重マウスモデルの特徴として、新生児期のケトン体合成能が低下していることを確認した。ケトン体代謝は飢餓時のエネルギー基質としてしられるが、近年エピゲノム修飾因子としての働きを持つことも注目されている。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、新生児期のケトン体合成の意義を明らかにすることを目指しながら、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノム修飾に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

ケトン体合成の律速段階酵素である HMG-CoA synthase2 (Hmgcs2)に注目し、CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウトマウスを作成し、表現型の解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 新生児期のケトン体合成の意義

Hmgcs2 KO マウスは胎生期に明らかな異常所見は認めず、メンデルの法則通りに生まれた。しかしながら、新生児期より著しい異所性脂肪沈着が進行し、光学顕微鏡及び電子顕微鏡により形態を確認した結果、肝細胞に多量の小滴性の脂肪滴が沈着していることを確認した。小滴性の異所性脂肪沈着は、ミトコンドリア機能不全を合併することが多いということが知られていた為、電子顕微鏡でミトコンドリアを確認すると電子密度の低下やクリステの変性した所見が確認された。続いて、単離した肝細胞を用いて酸素消費量を比較すると、Hmgcs2 KO マウスは野生型と比較して有意に酸素消費量が低下していることを確認し、ミトコンドリア機能異常があることを確認した。

メタボローム解析を行うと、予想通り ATP や NADH などの合成のうは Hmgcs2 KO マウスで低下し、クエン酸サイクル内においてもコハク酸、リンゴ酸、フマル酸が KO で低下していることが確認されたが、アセチル CoA は KO マウスで有意に増加していることが確認された。クエン酸サイクルに入る原料となるアセチル CoA が増加しているにもかかわらず、サイクル内の中間代謝物は低下しているという現象を一元的に説明できる原因を検討するために、翻訳後修飾の関与に注目して検討した。単離したミトコンドリアを抗アセチル化リジン抗体で評価すると、Hmgcs2 KO マウスのミトコンドリアタンパクでは有意にアセチル化が亢進していることを確認した。また、プロテオミクス解析を利用して、アセチル化タンパク質の網羅的解析を行った結果、ミトコンドリア関連タンパクが特異的にアセチル化されていることが確認された。興味深いこととして、ミトコンドリアタンパクのアセチル化を誘導する酵素の発現上昇は確認されず、重複した機能を有するペルオキシソームにおいてはアセチル化の亢進は認められなかった。これらの結果から、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化が亢進する機序として、酵素非依存的なタンパク質のアシル化(non-enzymatic protein acylation)が関与している可能性が考えられた。また、ヒストンタンパク質では逆に脱アセチル化が亢進しており、HDAC 活性が Hmgcs2 KO マウスで上昇していることが確認された。

一般的にミトコンドリアタンパクのアセチル化は、機能低下の要因となることが報告されている。実際に本研究においても、ミトコンドリアタンパクのアセチル化がクエン酸回路における

酵素連続反応の低下に影響することが確認された。本研究を通じて、ケトン体代謝には単にエネルギー基質を供給するという機能だけでなく、細胞内のアセチル CoA をケトン体へと変換することで、細胞内（ミトコンドリア内）のアセチル CoA 濃度を調整していることを発見した (Arima et. al., Nature Metabolism 2021)。新生児期はそれまで胎盤経由で糖を中心としたエネルギー供給を受けていた状態から、授乳によって脂肪酸負荷が一気に高まる時期である。ケトン体合成はそうした時期に活性化されることで、発達途上のミトコンドリアを脂肪酸の過度な負荷から守る働きがあると考えられた(図1)。

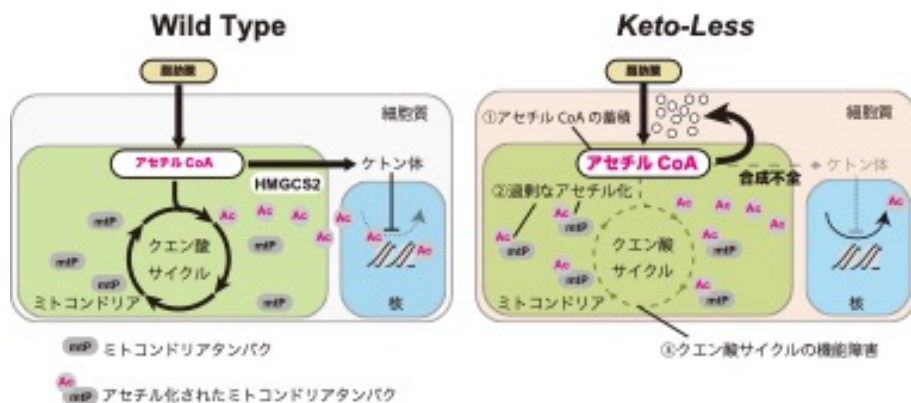


図1 ケトン体合成によるミトコンドリア保護

興味深いことに、核タンパクではミトコンドリアタンパクとは対照的に、脱アセチル化が亢進している。ケトン体合成不全状態においては、核における HDAC 活性が亢進していることが確認され、おそらく  $\beta$  ヒドロキシ酪酸の欠乏により、内因性の HDAC 阻害作用が失われたことが影響していると考えられる。今回の研究を通じて、ケトン体代謝の新たな機能を発見することができた。

さらに、今回の研究にてコンディショナルノックアウトマウスの作成にも成功し、肝臓特異的なノックアウトマウスを用いて、成長後の循環器疾患として注目されている心不全のモデルを用いた検討を行った。

## (2)高脂肪食負荷と高血圧処置の併用により病的な心肥大が生じる

HFpEF 病態を再現するため既報に則り (Schiattarella et. al., Nature 2019)、8 週齢の野生型マウスに対して 60% 高脂肪食と 0.5g/L  $\gamma$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を 15 週間負荷した (2-Hit model)。15 週後の時点において、対照群である通常食・通常飲水マウスと比較して、2-Hit model を加えたマウスは有意に体重増加・血圧上昇を認めた(図 2)。通常飼育群 (CTRL) と比較して、60% 高脂肪食と 0.5g/L L-NAME 含有水を投与した 2-Hit モデルでは、有意な血圧上昇と体重増加を認め、高血圧と肥満を合併したモデルとして妥当であることが示された。

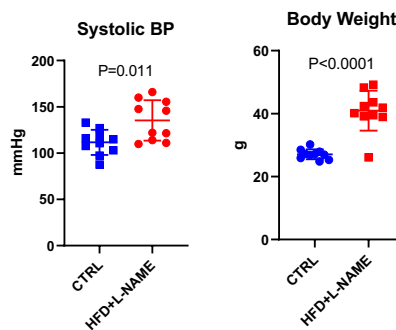


図 2 2Hit モデル

## (3)2-Hit model により病的な心筋肥大が生じる

2-Hit model を 15 週間加えた時点において、心臓超音波検査を実施すると、負荷群において有意な心室中隔壁肥厚を認めた。加えて、採取した心臓組織を用いて免疫組織染色を実施した結果、2-Hit model においては有意に心筋断面積が拡大しており(図 3)、心筋肥大が生じていることが明らかになった。加えて血管密度の測定では 2-Hit model において血管密度の減少を認め、生理的心肥大ではなく病的な心肥大が生じていることが確認された。

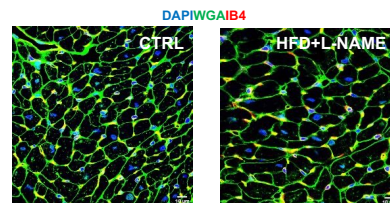
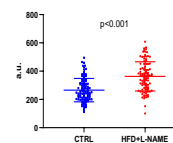


Figure 3: Cross Sectional Area



## (4)2-Hit model ではケトン体合成が亢進する

病的な心筋肥大が生じるようになった 2-Hit モデルにおいて、血中・組織中の  $\beta$  ヒドロキシ酪酸濃度を測定すると、有意な上昇を認めた(図 4)。また採取した肝臓を用いて Hmgcs2 のタンパク量の発現を確認した結果、有意な上昇を認めた(図 5)。以上より、2-Hit モデルでは肝臓における

図 3 心不全モデル

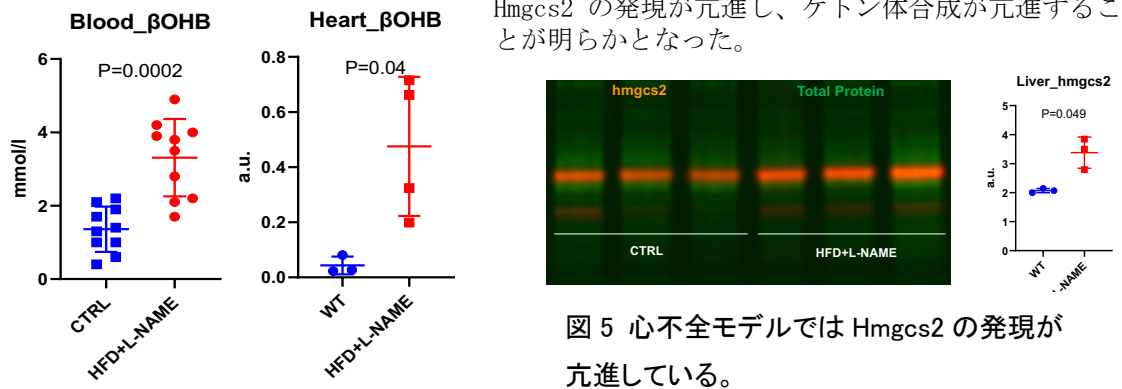


図 4 心不全モデルではケトン体濃度が上昇している

**(5) 肝臓特異的なケトン体合成不全マウスの作成**

一連の実験結果から 2-Hit モデルではケトン体合成が亢進することが明らかとなった。Hmgcs2 は肝臓だけでなく、腎臓や腸の幹細胞などでも発現しており、肝外性のケトン体合成と肝臓におけるケトン体合成の作用を区別するため、肝臓特異的なケトン体合成不全マウスの作成を試みた。

我々が独自に樹立した Hmgcs2 flox マウスと、Albumin Cre マウス (Alb-cre マウス) を交配し、Hepatocyte 特異的なケトン体合成不全マウスを作成した (図 6 Hepatic Keto-less model; hKL)。



図 6 肝臓特異的なケトン体合成不全マウス

hKL マウスは全身のケトン体合成不全マウスと同様、致命的な表現型は示さず、成獣まで生存可能であった。成獣組織の肝臓・心臓・腎臓を用いて免疫組織染色を実施すると、hKL マウスでは肝臓の Hmgcs2 の発現が消失する一方で、腎臓における発現は維持されていることが確認された。また心臓ではコントロールマウス (Hmgcs2 flox/flox) でも Hmgcs2 タンパクの発現は確認されなかったが、空腹時のケトン体血中濃度は全身の KO マウスと同等に低下していた。(図 7)。興味深いことに、肝臓特異的なケトン体合成不全マウスにおける血中ケトン体濃度は、全身のケトン体合成不全モデルとほぼ変わりなく、血中のケトン体濃度はほぼ肝臓でのケトン体合成により供給されていることが今回の研究で明らかとなった。

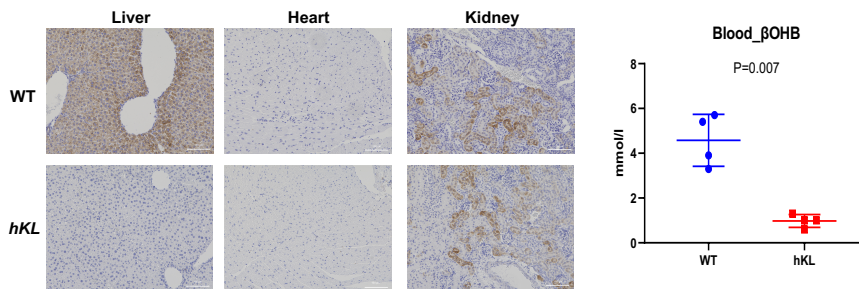


図 7 図 11 肝臓特異的なケトン体合成不全

一連の解析により、ケトン体代謝の新たな機能を発見することができ、かつ全身および局所でのケトン体合成不全マウスの創出に成功した。現在このマウスモデルを用いてヒストン修飾や DNA メチル化の変化の検証を進めており、DOHaD 学説の理解に繋がる発見を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arima Yuichiro et. al.,	4. 巻 3
2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-021-00342-6	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 Arima Yuichiro, Fukuoka Hideoki	4. 巻 20
2. 論文標題 Developmental origins of health and disease theory in cardiology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2020.02.003	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ケトン体合成の新たな作用を発見 ケトン体合成によるミトコンドリア保護 <a href="https://www.amed.go.jp/news/release_20210219.html">https://www.amed.go.jp/news/release_20210219.html</a> ケトン体合成の新たな作用を発見~ケトン体合成によるミトコンドリア保護~ <a href="https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20210219">https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20210219</a>
---

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
---------	---------