

## ケトン体合成能の変化に注目した環境ストレスによる心疾患リスク上昇メカニズムの解明

有馬勇一郎

熊本大学大学院生命科学研究部 循環器内科

### 【研究の背景】

さまざまな成人病が胎児期の状況に影響されうるといふ、成人病胎児発祥起源説 (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD) は、疫学研究により明らかになった事実である。現在世界では 3 割、日本では 1 割の出生児が低出生体重児として生まれており、今後出生時低体重が抱える成人後リスクは看過できない問題となる。しかしながら、疫学研究の結果を説明するリスクの上昇機序についてはほとんど解明されておらず、病態メカニズムに基づいた対応策を講じることができていない。申請者はこれまで心臓・冠循環の発生をテーマとして研究を行い、今回胎生期にカロリー制限を施すことで出生児低体重マウスを作成する実験を立ち上げており、DOHaD の機序を解明することを目指して実験を計画した。

### 【目 的】

低体重マウスモデルを用いて、動脈硬化リスク・循環器疾患リスクが上昇するメカニズムを明らかにする。

### 【方 法】

胎生中期 (E14) から後期 (E18) にかけて、ICR マウスに対して標準飼料 CE-2 (日本クレア; 344.9kcal/100g, タンパク 24.9%, 脂肪 4.6%, NFE 51%) の総摂取量を 50% に制限し、低体重胎仔を作出した。作成したマウス新生仔の肝臓、心臓についてメタボローム解析、Real-Time PCR (RT-PCR) を行い発現代謝産物、転写産物の発現量を比較した。候補遺伝子として注目した HMGCS2 については、CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウトマウスの作成を行い、表現型の解析を行った。

### 【結 果】

50% カロリー制限により、有意差を持って低体重胎仔の作出に成功した (出生児体重; カロリー制限群  $n=56$   $1.27 \pm 0.16$ g, 対照群  $n=58$   $1.51 \pm 0.14$ ,  $p < 0.001$ )。低出生体重マウスは出生後に血中ケトン体濃度が低下しており、RT-PCR の結果ケトン体合成の律速段階酵素である HMGCS2 の発現が心臓・肝臓において低下していることが明らかとなった。また、Oil Red 法を用いて新生仔期の脂肪沈着を比較した結果、低体重マウスにおいて有意に脂肪蓄積が増加し、新生仔期において既に非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 様の所見を呈していることが明らかになった。

続いて、CRISPR/Cas9 システムを用いてケトン体合成の律速酵素である HMGCS2 のノックアウトマウスを作成し、新生仔期の表現型を評価した。ケトン体の一種である  $\beta$  ヒドロキシ酪酸 (3OHB) の血中濃度を測定し、ノックアウトマウスで有意に低下していることが確認できた (3OHB: wild-type (WT)  $1.35 \pm 0.14$  mmol/L, KO  $0.24 \pm 0.05$  mmol/L,  $p < 0.0001$ )。加えて肝臓重量を比較した所、新生仔期の HMGCS2 ノックアウトマウスにおいて肝臓重量が有意に増加していることを確認し (Liver weight: wild-type (WT)  $87.6 \pm 3.4$  mg, KO  $123.9 \pm 10.1$  mg,  $p < 0.05$ )、脂肪沈着が著しく増加していることが確認された。肝臓組織を用いてメタボローム解析を施行すると、KO マウス肝臓では解糖系が抑制されている一方で、アセチルチル CoA は増加しており、脂肪酸異化の亢進が示唆された。フラックスアナライザーを用いて酸素消費量測定を行うと KO マウス肝細胞において有意に低下しており、ミトコンドリア機能不全が示唆されたため電子顕微鏡による観察を行うと KO マウス肝臓において著しいミト

ミトコンドリアの変性所見を認めた。

### 【考 察】

一連の検討より、低体重マウスにおけるケトン体合成不全が、生後の脂肪肝形成素因の獲得に関与することが明らかとなった。その機序として、ケトン体合成不全に伴うアセチル CoA の蓄積と、ミトコンドリア機能障害が *de novo* lipogenesis に寄与している可能性が示唆された。一連の結果により全身でのケトン体合成不全が及ぼす傾向は明らかとなったが、同時に心臓においても新生仔期に一過性にケトン体合成能が高まること、低体重マウスでは心臓でのケトン体合成能も障害されていることが確認されている。引き続き心臓におけるケトン体合成能の意義を明らかにするため、新たに *HMGCS2*<sup>flax/flax</sup> マウスを作成しており、心筋細胞特異的なケトン体合成不全がどのように表現型に寄与するのかを検討している。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

一連の解析により、ケトン体合成能が単にケトン体としてのエネルギー供給といった側面だけではなく、細胞内脂肪酸不可の緩和に寄与していることが明らかとなった。本メカニズムを応用することにより、NAFLD/NASH といった異所性脂肪沈着の改善を目指した研究を展開することが期待される。

また、今年度はケトン体合成の意義を明らかにするために肝臓に注目した解析を行ったが、心臓においても新生児期の心臓はケトン体合成能を有すること、低体重マウスモデルではケトン体合成能が心臓においても低下することを確認している。これまでの検討により、新生児期の心筋細胞は代謝様式が解糖系から脂肪酸異化へと変化する時期でもあり、同時期におけるケトン体合成能の低下は細胞内ミトコンドリア機能の低下および酸化ストレスの上昇といった状態を招くことが考えられる。人における取り組みとして、心臓カテーテル検査時の大動脈基部・冠静脈洞からのサンプリングにより、心臓におけるケトン体の利用効率の測定に成功した (Arima et. al., JACC in press)。

### 【参考・引用文献】

**Arima Y\***, Izumiya Y, Ishida T, Takashio S, Ishii M, Sueta D, Sakamoto K, Fujisue K, Kaikita K, Tsujita K. Myocardial ischemia suppresses ketone body utilization. *J Am Coll Cardiol. in Press.*