

## 収縮保持性心不全におけるケトン体を介した心保護効果の検証

有馬勇一郎

熊本大学 国際先端医学研究拠点 心臓発生研究室

### 【研究の背景】

ケトン体による心保護作用が注目されているが、詳細な効果や機序は明らかでない。我々は、収縮保持性心不全マウスモデルの解析を進める過程で、ケトン体合成不全状態では心不全病態が重症化することを確認した。加えて、ケトン体合成不全を用いた検討において、ケトン体合成にはミトコンドリアタンパクのアセチル化を制御することで、機能を維持することを見出した<sup>1)</sup>。我々の報告を含め、これまでのケトン体代謝により、ケトン体にはエネルギー基質としての作用以外に多彩な作用を持つことを確認している。本研究では、ケトン体合成・利用それぞれのコンディショナルノックアウトマウスを用いて心不全病態を評価し、ケトン体代謝の多彩な作用をそれぞれ解析することで作用機序を明らかにする。

### 【目 的】

細胞種特異的なケトン体合成不全、利用障害マウスを作成し、収縮保持性心不全の重症度の変化およびその機序を明らかにする。

### 【方 法】

#### (1) マウスモデルの作成

肝臓特異的 *Keto-less* マウス(hKL)と心筋細胞特異的 *Keto-less* マウス、*SCOT* KO (*MHC-cre* ; ; *oxct1<sup>fllox</sup>/fllox*; *SCOT-cKO*) マウスを作成して細胞種特異的なケトン体合成不全マウスを作成する。

#### (2) 評価1: エネルギー基質としての機能

メタボロミクス分析: ガスクロマトグラフ質量分析装置を用いて、凍結組織から 400 を超える代謝物を網羅的に測定する (GC-MS / MS; TQ8050、島津株式会社)。

酸素消費率: 動物組織の場合、抽出したミトコンドリアを用いて酸素消費量を測定する (Seahorse XF HS Mini 細胞外フラックスアナライザー、Agilent Co.Ltd)。

#### (3) 評価2: シグナル伝達因子としての機能

Single nuclei RNA sequencing: 凍結組織から核を単離し、1細胞核 RNA シーケンス解析を実施する。

#### (4) 評価3: エピゲノム制御因子としての機能

Chip-Seq 解析: 凍結組織から核を単離し、ヒストン抽出後に Chip-seq 解析を実施する。これまでの検討で、ヒストンアセチル化については H3K27 が変化することを確認している。また、ケトン体そのものによるヒストン修飾である、ヒストンの  $\beta$  ヒドロキシブチリル化についても H3K9 を中心に遺伝子発現に影響することが報告されており、これらの領域に注目した解析を実施する。

【結 果】

(1) マウスモデルの作成

細胞腫特異的なケトン体合成不全マウスとして、まず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 1 Hepatic Keto-less model; hKL)。



図 1 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、致死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 2)。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。

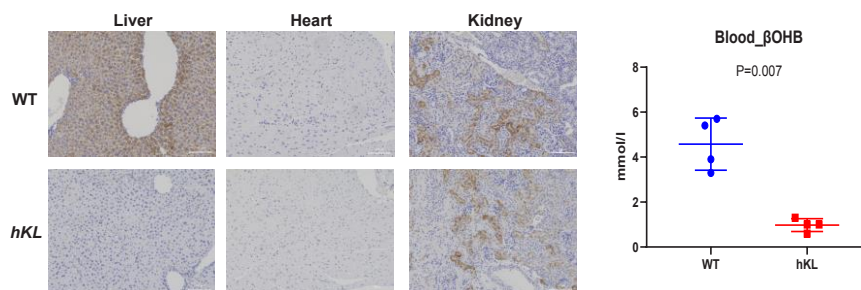


図 2 肝臓特異的なケトン体合成不全マウス

また、HFpEF マウスモデルにおいて、心筋細胞における Hmgcs2 の発現が上昇することを確認した。今年になり、新生仔期のケトン体合成が心筋の成熟に関与するという報告がなされたため、新生仔期の影響を除くため、MHC-merCremer マウスと交配し、成獣にて Hmgcs2 を心筋細胞で欠失するモデルを作成した。現在本マウスモデルを用いて HFpEF マウスを作成している。

ケトン体利用障害モデルについては、今年度に入り Oxct1 flox マウスを導入した。MHC-cre マウスとの交配により心筋特異的なノックアウトマウスの作成を進めている。

(2) 評価1: エネルギー基質としての機能

肝臓特異的なケトン体合成不全マウス (hKL) に対して、メタボロミクス解析を実施した結果、hKL マウスでピルビン酸が低下する傾向を確認した。一方、心筋芽細胞として知られる H9C2 細胞を用いて酸素消費量 OCR を測定すると、5mM のケトン体投与により OCR は低下することが確認され、ケトン体がエネルギー基質として使われるわけではないデータが得られた。

(3) 評価2: シグナル伝達因子としての機能

成獣からの一核解析 (snRNA-seq) を実施する前段階として、新生仔マウスを用いて snRNA-seq を実施した。野生型および全身の Hmgcs2 KO マウス、Hmgcs2 flox/flox と MHC-cre:Hmgcs2 flox/flox マウスの4群で比較し、解析可能なデータを得た。Seurat パッケージを用いたクラスター分類の結果、18 種類の細胞群に区別することができ、その中で心筋と思われる細胞集団は5群に分類された。野生型とケトン体合成不全モデルの間で、それぞれの群で明らかな発現遺伝子の変化は認めなかったが、細胞群の構成比率を確認すると、全身および心筋特異的なケトン体合成不全マウスにおいて、特定の心筋集団の構成比率が変化していることが確認された。

(4) 評価3: エピゲノム制御因子としての機能

ケトン体の中でもβヒドロキシ酪酸は、内因性のHDAC阻害作用を持つことが知られている。本研究ではこの作用に注目し、抽出した心筋細胞核を用いてChIP-sequencing解析を計画している。その前段階として、単離した心筋組織をホモジナイズ後、超遠心により細胞核成分を単離し、FACSにてPCMI陽性の心筋細胞核とそれ以外に分離して核を抽出した。ChIP-seq解析可能なDNAサンプルが得られ、心筋特異的なプロモーター領域であるTnnt2を例にChIP-qPCR解析を実施したところ、野生型に比べて、ケトン体合成不全マウスの心筋細胞では、H3K4、H3K9、H3K27のアセチル化が低下していることを確認した。

【考 察】

一連の検討により、ケトン体合成不全で生じるHFpEF病態変化の要因として、エピゲノム制御が関与していることが明らかとなった。近年ケトン体によるエピゲノム制御作用は腸幹細胞の維持や血球細胞の恒常性維持などに関与することが報告され、心筋における特異的な作用の解析を進める。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年ケトン体の投与による心保護作用を検証する複数の臨床試験が進行中である。本研究を通じてケトン体が生体にもたらす分子生物学的機序を明らかにすることで、単なるサプリとしての利用ではなく、病態生理に基づいた適切なケトン体の利用法を提案したい。

【参考・引用文献】

1. ○Yuichiro Arima\*, Yoshiko Nakagawa, Toru Takeo, Toshifumi Ishida, Toshihiro Yamada, Shinjiro Hino, Mitsuyoshi Nakao, Sanshiro Hanada, Terumasa Umemoto, Toshio Suda, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takehisa Watanabe, Katsuya Nagaoka, Yasuhito Tanaka, Yumiko K Kawamura, Kazuo Tonami, Hiroki Kurihara, Yoshifumi Sato, Kazuya Yamagata, Taishi Nakamura, Satoshi Araki, Eiichiro Yamamoto, Yasuhiro Izumiya, Kenji Sakamoto, Koichi Kaikita, Kenichi Matsushita, Koichi Nishiyama, Naomi Nakagata, and Kenichi Tsujita. Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation. *Nature Metabolism*, Feb;3(2):196-210, 2021. (First and corresponding author)