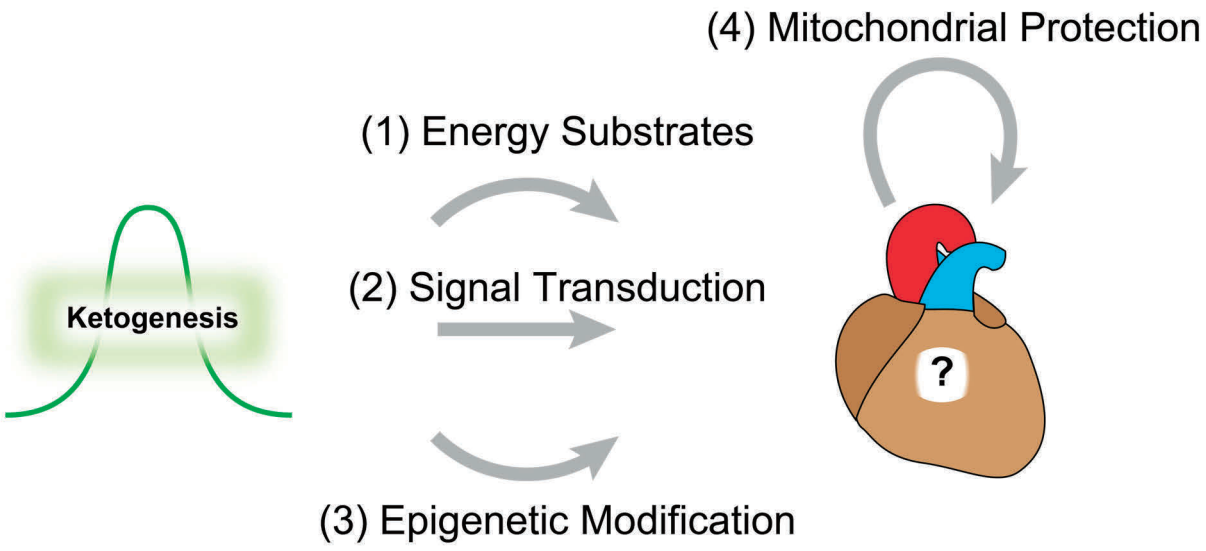
19　ケトン体の多面的作用に基づいた循環器制御機構の解明	有馬　勇一郎

【目的】ケトン体は飢餓時のエネルギー源として知られる代謝産物であるが、近年多面的作用を持つことが明らかとなり注目されている。我々は、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を作製し、ケトン体代謝の新たな機能として、ミトコンドリアを保護する作用があることを明らかにした。また、核においてはケトン体の一つであるβヒドロキシ酪酸の欠乏に伴い、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の阻害作用が減弱してヒストンの脱アセチル化が亢進することも確認し、これらの結果は、ケトン体が単に空腹時のエネルギー基質として機能するだけでなく、ミトコンドリアの機能やエピゲノム構造を制御することで、多面的な作用をもたらしていることを示した。今回の研究では心臓を対象として、ケトン体代謝の持つ多面的作用の何が循環器制御機構に重要であるかを検証することを目指し、研究を進めた。

【方法】新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、ケトン体合成不全マウスを用いて新生仔期における心筋成熟能を評価した。また、心筋成熟に関わる機序として、ミトコンドリア機能や転写制御・ヒストン修飾の変化を、それぞれメタボロミクス解析、一核解析、ChIP-sequencing 解析を実施して検証した。

【結果】Real time PCR 法を用いてケトン体代謝が変化する時期を検討した結果、新生仔期の生後 3 日から 5 日目にかけて心筋細胞で広範囲に Hmgcs2 が発現し、ケトン体合成が亢進することを確認した。続いて、新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、ケトン体合成不全マウスを用いて表現型を解析した結果、野生型と比較してケトン体合成不全マウスでは有意に心筋の成熟が遅延していることが確認された。最近の報告にてミトコンドリア機能障害がケトン体合成不全による心筋成熟不全の原因になるとの報告があったが、我々の検討では明らかなミトコンドリア機能障害は確認できなかった。そこで、心筋成熟不全の背景にある未知の分子メカニズムを明らかにするため、1 細胞解析を実施した結果、成熟した心室心筋において発現する Tnnt2 などの遺伝子発現が有意に低下していることが確認された。心筋成熟過程における Tnnt2 の発現は、ヒストンタンパクのアセチル化修飾により制御されることが知られていたため、心筋細胞特異的な ChIP-seq 解析を実施した結果、野生型と比較して、心筋細胞特異的に H3K27 のアセチル化が低下していることが確認された。以上の経過より、新生仔期のケトン体合成は、ヒストン修飾を介して心筋細胞の成熟に寄与している可能性が示唆された。

ケトン体代謝による多面的な作用



19. ケトン体の多面的作用に基づいた循環器制御機構の解明

有馬　勇一郎

熊本大学 国際先端医学研究機構 心臓発生研究室

Key words：ケトン体代謝，βヒドロキシ酪酸，ミトコンドリア，エピゲノム

緒　言

ケトン体は飢餓時のエネルギー源として知られる代謝産物であるが、近年多面的作用を持つことが明らかとなり注目されている［1］。我々は、新生児期は空腹・満腹にかかわらずケトン体合成能が亢進していることを発見し、空腹非依存的なケトン体合成の意義を明らかにするため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を作製し、独自にケトン体合成不全マウス（*Keto-less* マウス）を樹立した。*Keto-less* マウスは出生時点においては顕著な表現型を示さないが、生後急速に脂肪肝が進行する。原因を検討した結果、ケトン体合成不全状態では、ケトン体の基質となるアセチル CoA がミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリアタンパクをアセチル化することでミトコンドリア機能を阻害することを見出した［2］。加えて、核においてはケトン体の一つであるβヒドロキシ酪酸の欠乏に伴い、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の阻害作用が減弱してヒストンの脱アセチル化が亢進し、ケトン体そのものによるヒストン修飾であるβヒドロキシブチリル化が低下していることも確認した。これらの結果は、ケトン体が単に空腹時のエネルギー基質として機能するだけでなく、ミトコンドリアの機能やエピゲノム構造を制御することで、多面的な作用をもたらしていることを示している。

今回の研究では心臓を対象として、ケトン体代謝の持つ多面的作用の何が循環器制御機構に重要であるかを検証することを目指し、研究を進めた。

方　法

新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、全身および心筋細胞特異的なケトン体合成不全マウス（*MHC-cre;Hmgcs2 flox/flox*）を作出し、新生仔期における心筋成熟能を評価した。また、研究途中の 2022 年に新生児期のケトン体合成が心筋成熟に寄与するという報告が別グループより発表されたため（Chong et. al., Cell Discovery 2022）、本論文において言及されたミトコンドリア機能の評価を追加して行った。また、我々独自の視点として転写制御・エピゲノム修飾に注目した解析を行うため、生後 7 日目の心臓を用いた single nucleus RNA-sequencing（snRNA-seq）解析を実施し、クロスリンク法および CUT&Tag 法での Chromatin immunoprecipitation sequencing（ChIP-seq）を行った。

結　果

1．ケトン体合成不全状態では心筋成熟が遅延する

ケトン体が最も必要となる時期を同定するため、経時的なケトン体合成能の評価を進めた。まず、胎児期の血中ケトン体濃度は、母体の血中濃度とほぼ同じで、Real time PCR 法で評価すると胎児肝臓の Hmgcs2 発現は抑制されていた。この結果から胎児期の胎児血中ケトン体濃度は、母体からのケトン体の意向によりもたらされるものであると考えられた。続いて、生後新生児期におけるケトン体合成能の評価を進めた。生後より Hmgcs2 の発現は肝臓だけでなく心臓においても出現することが確認され、生後 3 日から 5 日目にかけて心筋細胞で広範囲に Hmgcs2 が発現するこ

とを確認した。

続いて、新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、*Hmgcs2*KO マウス及び心筋細胞特異的なケトン体合成不全マウス（*MHC-cre;Hmgcs2*$^{flox/flox}$）を用いて表現型を解析した。両マウスともメンデルの法則通りに出生し、胎児期にてあきらかな表現型は確認されなかった。心筋細胞は出生後に成熟し、成熟する過程で細胞分裂能を失う。そこで、細胞分裂の指標であるリン酸化ヒストン 3（pH3）を指標として、心筋成熟能の評価を行った結果、*Hmgcs2* KO マウスでは野生型と比較して有意に pH3 陽性細胞が増加していることが確認された（図 1）。以上の結果は生後 1 週間の間に進行する心筋の成熟が、正常に進行していないことを示唆する所見であった。

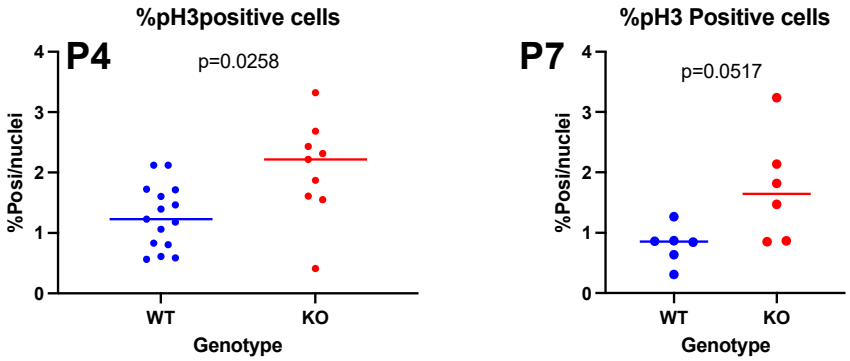


図 1. 新生仔心筋における分裂能の比較

通常心筋細胞は成熟する過程で分裂能を失うため、pH3 で標識される分裂細胞の割合が低下する。しかしながら、Hmgcs2 KO （KO）は、野生型（WT）と比較して pH3 陽性細胞の割合が有意に増加しており、正常な心筋の成熟が遅延している可能性が示唆された。統計処理は Welch の *t* 検定で実施した。

2. ケトン体合成不全マウスの心筋組織では、顕著なミトコンドリア機能障害を認めない

我々がケトン体合成不全マウスの表現型を組織染色で確認した頃に、同様の報告が他グループよりなされ、我々が過去に報告したケトン体合成不全によるミトコンドリアタンパクの機能障害が原因となると示された［3］。本研究の継続の是非に関わる重要な報告であったため、我々も野生型と *Hmgcs2*KO マウスの電子顕微鏡撮影と、メタボロミクス解析を実施したが、既報で報告されたようなミトコンドリアの形態異常や、エネルギー産生能の低下は確認されなかった。以上より、既報では示されていない新たなメカニズムが、ケトン体合成不全にともなう心筋成熟不全の要因になっていると考え、転写制御に注目した解析を進める方針とした。

3. 1 細胞 RNA シーケンス解析による心筋細胞の特性評価

免疫染色で確認された心筋成熟不全が、転写産物のレベルでも生じているか確認するため、心筋より単離した核を用いて snRNAseq を実施した。野生型マウスと *Hmgcs2* KO マウスの間で、明らかな心筋クラスターの消失・増加などは認めなかったが、心室心筋のクラスターで確認すると、成熟した心筋にて強く発現することが知られる Tnnt2、Atp2a2 などの発現が、野生型と比較して *Hmgcs2* KO で低下していることが確認された。

4. ケトン体合成不全マウスでは心筋細胞のヒストン脱アセチル化が亢進する

snRNA-seq で変化することが確認された *Tnnt2* や *Atp2a2* などの遺伝子は、心筋成熟の過程でヒストンタンパクのアセチル化により制御されることが報告されている［4］。加えて、過去の報告にてケトン体のなかでもβヒドロキシ酪酸は、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を阻害する作用があることが知られていたため［5］、ヒストンタンパクのアセチル化に変化が生じている可能性を考え、ChIP-seq 解析を行った。心筋から単離した核を、心筋核膜表面に発現する PCM1 特異的抗体にて標識後、FACS にて単離し、PCM1 陽性と PCM1 陰性の核を用いてそれぞれ ChIP-seq 解

析を行った。PCM1 陰性の核において、H3K27Ac の明らかな変化は認められなかったが、PCM1 陽性の心筋由来の核において、H3K27Ac のアセチル化が顕著に低下していることが確認された（図 2）。

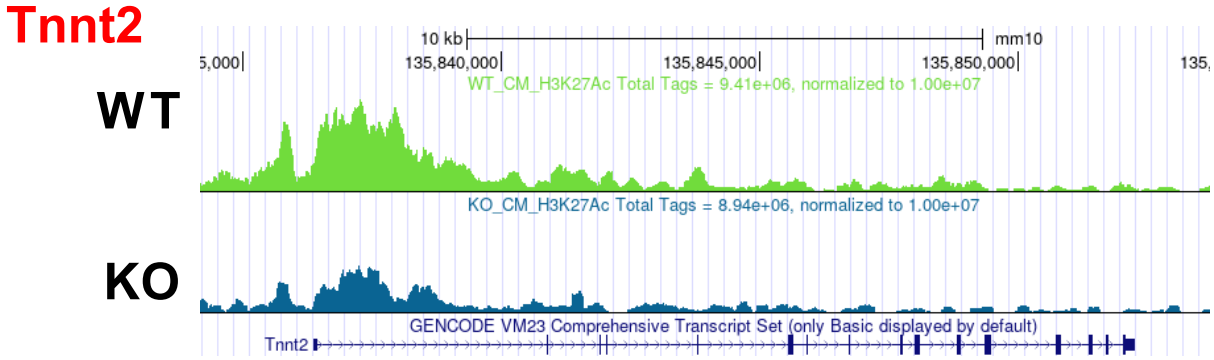


図 2. H3K27Ac に対する ChIP seq 解析

生後 7 日目の心筋組織から心筋細胞核を単離し、H3K27Ac で ChIPseq 解析を実施した。Tnnt2 の領域に注目して確認すると、野生型（WT）ではプロモーター領域を中心に強いピークを認める一方、*Hmgcs2* KO（KO）では WT と比較してピークが減少していることが確認された。

考　察

一連の研究結果より、新生仔期に生じるケトン体合成は心筋の円滑な成熟を促すことが確認された。加えて、その背景にある機序は、古典的なケトン体代謝の機能として知られるエネルギー基質としての作用や、ミトコンドリアを介した作用でなく、HDAC 阻害を介したヒストン修飾によるものであることが示された。現在この、“ケトン体のよるエピゲノム修飾機構を介した心筋成熟の促進”、という仮説を確立するため、ヒストンタンパクアセチル化を標的とした介入実験をすすめている。

共同研究者・謝辞

本研究は IRCMS 技術補佐員、木村康代氏、江角千晴氏、長廣恵氏らの協力のもとに進めることができた。

文　献

1） Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. Cell Metab. 2017 Feb 7;25(2):262-284. PMID: 28178565 DOI: 10.1016/j.cmet.2016.12.022.

2） Arima Y, Nakagawa Y, Takeo T, Ishida T, Yamada T, Hino S, Nakao M, Hanada S, Umemoto T, Suda T, Sakuma T, Yamamoto T, Watanabe T, Nagaoka K, Tanaka Y, Kawamura YK, Tonami K, Kurihara H, Sato Y, Yamagata K, Nakamura T, Araki S, Yamamoto E, Izumiya Y, Sakamoto K, Kaikita K, Matsushita K, Nishiyama K, Nakagata N, Tsujita K. Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation. Nat Metab. 2021 Feb;3(2):196-210. PMID: 33619377. DOI: 10.1038/s42255-021-00342-6.

3） Chong D, Gu Y, Zhang T, Xu Y, Bu D, Chen Z, Xu N, Li L, Zhu X, Wang H, Li Y, Zheng F, Wang D, Li P, Xu L, Hu Z, Li C. Neonatal ketone body elevation regulates postnatal heart development by promoting cardiomyocyte mitochondrial maturation and metabolic reprogramming. Cell Discov. 2022 Oct 11;8(1):106. PMID: 36220812 DOI: 10.1038/s41421-022-00447-6.

4) Gilsbach R, Preissl S, Grüning BA, Schnick T, Burger L, Benes V, Würch A, Bönisch U, Günther S, Backofen R, Fleischmann BK, Schübeler D, Hein L. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. Nat Commun. 2014 Oct 22;5:5288. PMID: 25335909, DOI: 10.1038/ncomms6288.
5) Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV Jr, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E. Suppression of oxidative stress by β-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. Science. 2013 Jan 11;339(6116):211-4. PMID: 23223453 DOI: 10.1126/science.1227166.