

低出生体重児の食塩感受性高血圧リスク上昇メカニズムの検証 : 新生児期におけるケトン体合成の意義

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

概要 Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) 学説は高血圧, 糖尿病, 虚血性心疾患といった成人後の生活習慣病が胎生期の状況に影響されるという概念で, 近年ゲノムワイドの研究でも出生児低体重が高血圧リスクとなることが報告されている。しかしながら, なぜ高血圧リスクが上昇するのかというメカニズムについては未解明な点が多く, 高血圧リスク上昇における食塩感受性高血圧の関与を検討した報告はない。

申請者は循環器疾患 DOHaD 学説の発症メカニズムを明らかにするため, マウスを用いて低出生体重モデルを作成し, 低出生体重マウスは成長後高血圧を呈すること, 対照群と比較してネフロンが肥大することを確認した。そこで低出生体重マウスの血圧リスク上昇のメカニズムを明らかにするため, 低出生体重として生まれるとどのような変化が生じるのか, 新生児期に注目した解析を行った。

マイクロアレイ法を用いた転写産物の比較の結果, 低体重マウスモデルではケトン体合成の律速段階酵素である HMG-CoA synthase2 が低下していることが明らかとなった。そこで, 新生児期のケトン体合成の特徴を評価した結果, 新生児期は常に血中ケトン体濃度が高いことを確認した。続いて, 新生児期のケトン体合成の意義を明らかにするため, CRIPR/Cas9 法を用いて Hmgcs2 のノックアウトマウス (Keto-less マウス) を作成し, 表現型を検討した。Keto-less マウスは出生時点においては顕著な表現型は示さなかったが, 授乳開始後より急速に脂肪肝が進行し, ミトコンドリア機能障害を合併することが明らかとなった。クエン酸サイクルにおける酵素連続反応の低下を認めたため, アセチル化プロテオミクス解析を追加して検討した結果, アセチル化の亢進するタンパク質についてオントロジー解析を実施すると, ミトコンドリアに関連するタンパクが上位に検出され, ミトコンドリアタンパク特異的にアセチル化が亢進していることが確認された。

一連の結果より, 新生児期のケトン体合成には, ミトコンドリアへのアセチル CoA の蓄積を緩和し, ミトコンドリアタンパクに過度なアセチル化が加わることを回避する作用があることが明らかとなった。今後はこの遺伝子改変マウスを駆使して, 食塩感受性高血圧形成過程におけるケトン体代謝の意義について検証する。また, ケトン体は腎臓においても近位尿細管を中心に強く発現することが知られており, 今後腎臓特異的なケトン体合成不全マウスモデルを作成して, 表現型の解析に取り組む。

1. 研究目的

世界で生まれる子供の 16% は, 出生児体重が 2,500 g 未満の低出生体重児である (UNICEF 世界子供白書 2016)。Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) 学説は高血圧, 糖尿病, 虚血性心疾患といった成人後の生活習慣病が胎生期の状況に影響されるとい

う概念で, 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⁽¹⁾。近年ゲノムワイドの研究でも出生児低体重が高血圧リスクとなることが報告され⁽²⁾, 疫学的エビデンスは明白である一方, なぜリスクが上昇するのかというメカニズムについては未解明な点が多く, 高血

圧リスク上昇における食塩感受性高血圧の関与を検討した報告はない。

申請者は循環器疾患のリスク層別化、心筋代謝解析といった臨床研究を行う一方で⁽³⁻⁶⁾、DOHaD 学説の発症メカニズムを明らかにするため、マウスを用いて低出生体重モデルを作成した。低出生体重マウスモデルを解析する過程で、低出生体重マウスは成長後高血圧を呈すること、対照群と比較してネフロンが肥大することを確認した。そこで低出生体重マウスの血圧リスク上昇のメカニズムを明らかにするため、低出生体重マウスに食塩負荷を施すことで、食塩感受性高血圧の関与を明らかにするとともに、低出生体重として生まれるとどのような変化が生じるのか、新生児期に注目した解析を行った。

2. 研究方法

2.1 低体重マウスの作成

ICR マウスの胎生中期より 50%の総カロリー制限を施すことで、安定的に出生時体重の軽いマウス(低体重マウス)を作出することができるようになった。遺伝子改変マウス等で頻用される B6 系統では、得られる個体数が少なく出生時体重のばらつきが大きいことが問題であったが、B6 由来の受精卵を ICR 系統の仮親に移植することにより、B6 系統でも低体重マウスを作出することに成功した。また、カロリー制限以外の方法として、出産予定日 1~2 日前に帝王切開により胎児を娩出し、里親により飼育させるモデルを作成しており、本法により早産モデルにおける血圧変動も評価した。

2.2 低体重マウスにおけるネフロン形成の評価

低出生体重マウスの高血圧形成機序として、発育遅延に伴うネフロン形成不全(ブレンナー仮説)が示唆されているが、本研究モデルを用いてブレンナー仮説を改めて検証するとともに、食塩負荷によりどのように変化するかを検証した。

2.3 新生児期におけるケトン体合成能の評価

低体重マウスで認められる高血圧の分子メカニズムを明らかにするため、マイクロアレイ解析を行い、対照群と低体重マウスでの遺伝子発現を比較した。その結果、生後 3 日目の低体重マウスでケトン体合成の律速段階酵素である HMG-CoA synthase2 (HMGCS2) の発現が低下していることを確認し、タンパクレベルでも発現が減少していることを確認した。そこで、ケトン体合成の律速段階酵素であ

る HMGCS2 に注目し、ノックアウトマウスを作成して表現型の検討を行った。

3. 研究結果

3.1 低体重マウスモデルの作成

マウス妊娠 11 日目から 17 日目にかけて、通常摂餌状態より 50%カロリーを制限した給餌を行うことで、出生時体重の有意な現象を確認した(出生児体重;カロリー制限群 n=56 1.27±0.16g, 対照群 n=58 1.51±0.14, p<0.001)。カロリー制限に伴う母体への影響を除くため、出産後は里親により飼育させると、離乳時期には当初の体重差は消失することを確認した。

3.2 低体重マウスにおけるネフロン形成の評価

低体重マウスモデルにおけるネフロン形成能と発達過程を比較するため、ネフロン前駆細胞である Six2 陽性細胞について低体重マウスモデルと対照群で比較した。その結果、six2 陽性細胞の分布については、低体重マウスと対照群で有意な差は認めなかった。続いて、低体重マウスと対照群の成獣におけるネフロン形態を比較した、一部の低体重マウスでは、ネフロン分布の低下とともに、糸球体の肥大を確認したが、個体によるばらつきが多く有意な差は得られなかった。低体重マウスを用いた一連の検討では、特に成獣期の評価においてばらつきが大きく評価が困難となる。そのため、特定の分子に焦点を絞って検討した方が良いと考え、低体重マウスと対照群の新生仔組織を用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果、低体重マウスモデルにおいて、ケトン体合成の律速段階酵素である Hmgcs2 の発現が低下していることを確認し、ケトン体代謝に注目した解析を行う方針とした。

3.3 新生児期にケトン体合成は亢進する

本研究を開始するにあたり、新生児期のケトン体合成の特徴を理解するため、胎児期(胎性 18.5 日)、新生児期(生後 7 日)、成獣期におけるケトン体合成能を評価した。いずれのサンプリングも自由摂餌状態で実施したが、胎児期と成獣期の血中ケトン体濃度は低く抑えられている一方で、新生児期は常に血中ケトン体濃度が高いことを確認した。

3.3 ケトン体合成不全マウスの作成

続いて、新生児期のケトン体合成の意義を明らかにするため、CRIPR/Cas9 法を用いて Hmgcs2 のノックアウトマウス(Keto-less マウス)を作成した。Keto-less マウスは 1 遺

伝子の破壊マウスであるが、血中および組織中の β ヒドロキシ酪酸濃度は野生型の 10 分の 1 以下に低下し、機能的にもケトン体合成不全マウスの作成に成功した。

3.4 ケトン体合成不全マウスは新生児期に著しい脂肪肝が生じる

Keto-less マウスは出生時点においては顕著な表現型は示さなかったが、授乳開始後より急速に脂肪肝が進行することが明らかとなった。組織学的検討では、脂肪肝の種類も小滴性脂肪的が肝細胞に蓄積するパターンであり、ミトコンドリアの形態以上や、酸素消費量の低下を合併することが明らかになった。成獣において、Hmgs2 に対するアンチセンスオリゴを用いた既報と比較すると、新生児期では急速に脂肪肝が進行しており、新生児期は生理的なケトン体合成が異所性脂肪沈着の緩和に重要な働きを持つことが示された。

3.5 ケトン体合成不全マウスはミトコンドリア機能障害を合併する

Keto-less マウスではクエン酸回路の酵素連続反応が低下する一方で、アセチル CoA は蓄積していた。Keto-less マウスにおいてミトコンドリア機能異常を示唆する所見を認めたため、メタボローム解析を実施して代謝産物を比較した。ATP や NADPH などとともに、クエン酸、フマル酸、リンゴ酸などのクエン酸回路の中間代謝産物が Keto-less マウスで有意に低下していることを確認したが、一方でアセチル CoA は Keto-less マウスで蓄積しており、クエン酸サイクルにおける酵素連続反応が障害されている可能性が示唆された。

3.5 ケトン体合成不全に伴いミトコンドリアタンパク質の過度なアセチル化が生じる

クエン酸サイクルにおける酵素連続反応の低下の原因を探るため、RNA-seq や定量プロテオミクスを用いて検討したが、介在酵素の低下は確認できなかった。そこで、アセチル CoA が蓄積していたことから翻訳後修飾に注目して検討を行うと、Keto-less マウスより単離したミトコンドリアタンパクにおいて、有意にアセチル化が亢進していることを確認した。アセチル化プロテオミクス解析を追加して、アセチル化の亢進するタンパク質についてオントロジー解析を実施すると、ミトコンドリアに関連するたんぱくが上位に検出され、ミトコンドリアタンパク特異的にアセチル化が亢進していることが確認された。

3.6 β ヒドロキシ酪酸の欠乏によりヒストンタンパクでは脱アセチル化が亢進する

一連の結果より、ミトコンドリアタンパクではアセチル化の亢進が生じていることが示されたが、同時に実施した解析では核では脱アセチル化が進んでいることを確認した。機序を検討するため HDAC 活性を評価すると、Keto-less マウスの核抽出タンパクでは HDAC 活性が有意に亢進していることが確認され、 β ヒドロキシ酪酸の投与によって HDAC 活性が濃度依存的に低下することが確認された。島津らの報告において、 β ヒドロキシ酪酸には内因性の HDAC 阻害作用があることが報告されており、核におけるヒストンタンパク脱アセチル化の亢進は β ヒドロキシ酪酸が減少したことで HDAC 活性が亢進したためと考えられた。

4. 考察

一連の結果より、新生仔期の肝臓においてケトン体合成は、ミトコンドリアへのアセチル CoA の蓄積を緩和し、ミトコンドリアタンパクに過度なアセチル化が加わることを回避する作用があることが明らかとなった⁽⁷⁾(図 1)。Keto-less マウスの表現型が授乳後より急速に顕在化する点から、授乳に伴い増加する脂肪酸負荷が誘因の一つであると考えられる。また、ミトコンドリアにおいてアセチル化が亢進する一方で、核においてはヒストンタンパクの脱アセチル化が亢進しており、細胞小器官において異なるふるまいを示す点が興味深い結果となった。Keto-less マウスを用いて心不全病態を作出すると、TAC モデルでは顕著な表現型が出現しない一方で、HFpEF マウスモデルでは Keto-less マウスにおいて心筋断面積の拡大や、血管密度の減少といった表現型の差が生じることを確認している。HFpEF マウスにおいて表現型が顕著となる理由として、高脂肪食負荷によりケトン体合成が亢進していることが原因として考えられ、肥満に関連する疾病において、ケトン体の影響が強く出ると考えられる。現在これらの知見に基づき、腎臓における表現型の解析を同時並行で進めている。現時点で明らかな形態異常は確認できていないが、近年 β ヒドロキシ酪酸を介して mTOR の活性制御を介して、糖尿病性腎症モデルにおける腎保護作用が報告されており⁽⁸⁾、これらのメカニズムが新生児期の腎臓にも作用しているかを検討する必要がある。

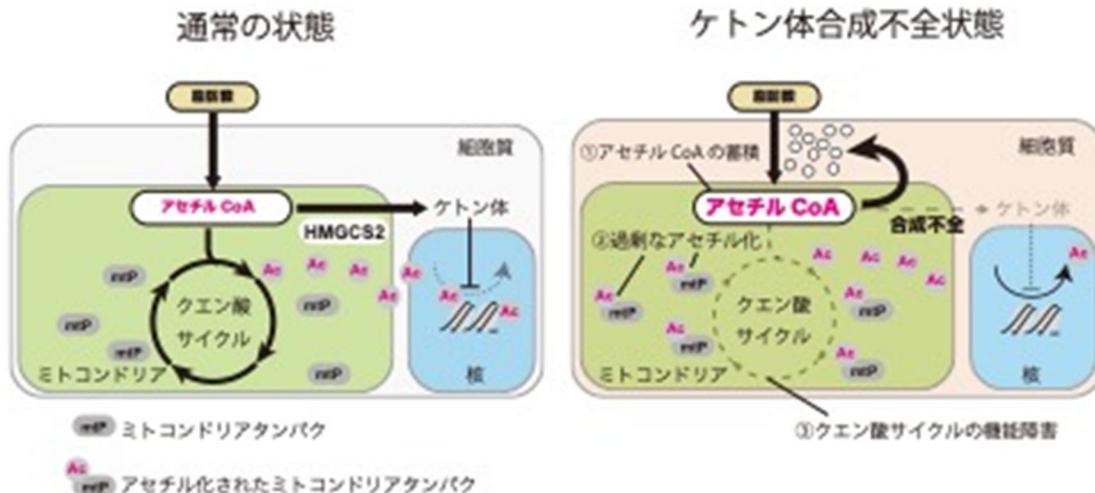


図 1: 新生児期におけるケトン体合成の意義

新生児期は授乳に伴いケトン体合成が更新する。ケトン体合成不全状態では、脂肪酸異化に伴って産生されるアセチル CoA がケトン体へと変換されないため、①アセチル CoA が蓄積する。さらに、過剰なアセチル CoA は②ミトコンドリアタンパクにアセチル化修飾を加えることで、③酵素連続反応の低下をもたらす。

5. 今後の課題

当初の計画では低体重マウスモデルを用いた成獣期の解析に注力する予定であったが、マウスモデルのばらつきが大きいことから再現性の高いデータを取ることが困難であった。そのため、アプローチを変更して最も強い差を確認したケトン体代謝に注目する方針として、マウスモデルの作成から新生児期の肝臓における表現型を確認することができた。

今後はこの遺伝子改変マウスを駆使して、成獣期の解析を行い、食塩感受性高血圧形成過程におけるケトン体代謝の意義について検証する。また、ケトン体は腎臓にお

いても近位尿管を中心に強く発現することが知られている。これまでの研究により、我々は Hmgcs2 のコンディショナルノックアウトマウスも作成しており、今後腎臓特異的なケトン体合成不全マウスモデルを作成して、表現型の解析に取り組みたい。

なお、本研究申請の主題である DOHaD 学説は、ケトン体代謝以外にも様々な周産期環境ストレスが影響を及ぼすため、将来的にはより広い範囲の時期・分子メカニズムを対象とした解析を進めていきたい。そうすることにより、生育歴に困難を抱えた方も、健康で豊かな生活を送ることのできる社会を実現できると考えている(図 2)。

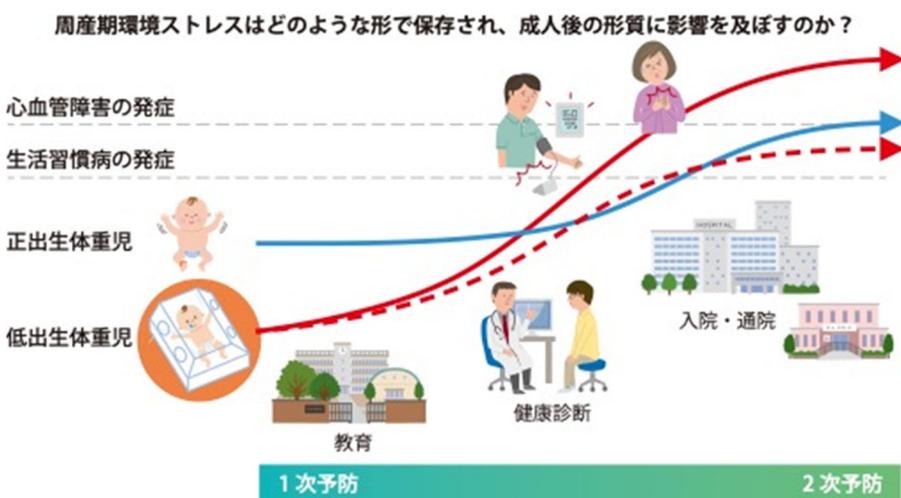


図 2: DOHaD 学説の正しい理解に基づく将来展望

低出生体重時に代表される周産期環境ストレスを抱えて生まれた子供は、健康に成長したように見えても高血圧のリスクが上昇していることが知られている(青実線と赤実践)。周産期環境ストレスがどのような形で保存され、成長後の高血圧リスクに影響を及ぼしているのかを詳細に検討することで、適切な予防・治療法を提案し、生育歴に困難を抱えた方も豊かに過ごすことのできる社会を目指したい。

6. 文献

- (1) D J Barker and C Osmond. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 10;1:1077-81, 1986
- (2) Momoko Horikoshi et. al., Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. *Nature* 13;538(7624): 248-252, 2016
- (3) Yusuke Kanemaru, Yuichiro Arima, Koichi Kaikita, Takuya Kiyama, Shozo Kaneko, Miwa Ito, Hiroshige Yamabe, Kota Motozato, Kenshi Yamanaga, Koichiro Fujisue, Daisuke Sueta, Seiji Takashio, Satoshi Araki, Hiroki Usuku, Taishi Nakamura, Takashi Fukunaga, Satoru Suzuki, Yasuhiro Izumiya, Kenji Sakamoto, Hirofumi Soejima, Eiichiro Yamamoto, Hiroaki Kawano, Hisanori Kanazawa, Kenichi Tsujita. Elongation of the high right atrium to coronary sinus conduction time predicts the recurrence of atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation. *International Journal of Cardiology*. 300:147-153, 2020.
- (4) Yuichiro Arima, Yasuhiro Izumiya, Toshifumi Ishida, Seiji Takashio, Masanobu Ishii, Daisuke Sueta, Koichiro Fujisue, Kenji Sakamoto, Koichi Kaikita, Kenichi Tsujita. Myocardial Ischemia Suppresses Ketone Body Utilization. *Journal of American College of Cardiology* 73(2):246-247, 2019.
- (5) Yuichiro Arima, Koichi Kaikita, Masanobu Ishii, Miwa Ito, Daisuke Sueta, Yu Oimatsu, Kenji Sakamoto, Kenichi Tsujita, Sunao Kojima, Kazuko Nakagawa, Seiji Hokimoto Hisao Ogawa. Assessment of platelet-derived thrombogenicity with the total thrombus-formation analysis system in coronary artery disease patients receiving antiplatelet therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14(4):850-859, 2016
- (6) Yuichiro Arima, Seiji Hokimoto, Tomonori Akasaka, Koichi Mizuno, Koichi Kaikita, Kentaro Oniki, Kazuko Nakagawa, Hisao Ogawa. *Journal of Cardiology* 65(6):494-500, 2015
- (7) 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, Yasuhiro 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
- (8) Issei Tomita, Shinji Kume, Sho Sugahara, Norihisa Osawa, Kosuke Yamahara, Mako Yasuda-Yamahara, Naoko Takeda, Masmi Chin-Kanasaki, Tatsuroh Kaneko, Eric Mayoux, Michael Mark, Motoko Yanagita, Hisakazu Ogita, Shin-ichi Araki, Hiroshi Maegawa. SGLT2 inhibition mediates protection from diabetic kidney disease by promoting ketone body-induced mTORC1 inhibition. *Cell Metabolism* 33(3):404-419, 2020(3)

Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension in Low-Birth Weight Babies

Yuichiro Arima

Kumamoto University

Summary

The Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) theory is the concept that post-adult lifestyle-related diseases such as hypertension, diabetes, and ischemic heart disease are affected by fetal conditions. Especially, hypertension is one of the most prominent non-communicable diseases, which relate to the DOHaD theory. There are many robust epidemiological evidences, however, underlying mechanisms are unclear.

In order to clarify the pathogenic mechanism of the DOHaD theory of cardiovascular disease, we created a low birth weight model using calorie restriction or preterm delivery. We conducted an analysis focusing on the neonatal period to see what kind of changes occur when born as low birth weight.

Microarray analysis revealed that HMG-CoA synthase 2 (Hmgcs2), which is a rate-limiting enzyme for ketone body synthesis, is decreased in the low-weight mouse model. We found that the blood ketone body concentration was always high in the neonatal period. Subsequently, in order to clarify the significance of ketogenic body synthesis in the neonatal period, Hmgcs2 knockout mice (Keto-less mice) were created using the CRIPR/Cas9 system, and the phenotype was examined. Although Keto-less mice did not show a remarkable phenotype at birth, it was revealed that fatty liver progressed more rapidly than after the start of lactation. We also found that mitochondrial dysfunction was complicated. Since a decrease in the continuous enzyme reaction in the citric acid cycle was observed, we performed the acetylation-specific proteomics analysis. Ontology analysis revealed that mitochondrial proteins were strongly acetylated.

A series of results revealed that neonatal ketone body synthesis has the effect of alleviating the accumulation of acetyl-CoA in mitochondria and avoiding excessive acetylation of mitochondrial proteins. In the future, we will verify the significance of ketone body metabolism in the process of salt-sensitive hypertension formation by making full use of this genetically modified mouse. In addition, it is known that ketone bodies are strongly expressed in the kidney, mainly in the proximal tubule, and in the future, we will create a kidney-specific ketone body synthesis deficiency mouse model and work on phenotypic analysis.