

<令和元年度助成>

母親のケトジェニック食の摂取と ケトン体代謝異常が仔の生活習慣病発症へ及ぼす影響の解明

上番増 喬

(徳島大学大学院 医歯薬学研究部)

1. 背景

胎生期の栄養状態と出生後の健康状態の関連性における重要な発見は、胎生期の母体環境が、成人期以降の疾病発症に影響を及ぼすことの発見である。すなわち、胎生期に低栄養状態などの好ましくない環境に曝されることによりエピゲノム修飾の変化を伴う何らかのマイナスの影響を生じ、加えて出生後にマイナスの環境要因が負荷されることで、後天的に糖尿病などの生活習慣病の発症リスクを増大させることが想定されている。しかしながら、その分子基盤は不明である。

わが国の低出生体重児（出生体重 2,500 g 未満）の出生割合はこの 35 年で約 2 倍に増加し、2016 年には全体の 10.6%と OECD 加盟国で最多となっている。この背景には、女性（20 歳から 39 歳）の 20%が BMI18.5 以下のやせであるという現状が存在し、成人女性の栄養不良が指摘されている¹⁾。実際に日本の妊婦のエネルギー摂取量は、平均で必要量の 80%程度しか満たしておらず、さらに、妊婦の 4%は 1,000 kcal しか摂取していない。その結果、飢餓による重篤なケトosisが出現している。また、近年、低糖質食の摂取が科学的根拠の乏しいまま流行しており、糖質摂取の不足に伴う高ケトン体血症の発生増加とその健康への影響が危惧されている。しかしながら、胎生期の高ケトン体血症が仔の出生後の疾病発症へ及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では、高ケトン体血症を生じる 2 つのモデルを用いて、周産期の高ケトン体血症が仔の代謝異常に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、ケトン体とその代謝過程が有する役割を明ら

かにするために、ケトン体代謝異常を生じるマウスモデルの確立を目指した。

2. 研究成果

2-1 1.3 ブタンジオール摂取による高ケトン体血症が産子数や仔の DNA メチル化に及ぼす影響の検討

1.3 ブタンジオール (1.3-BD) は、体内でケトン体である beta-hydroxy butyrate (B-OHB) に変換されることが知られている。本検討においても、20%の 1.3-BD 溶液を投与することで、対照群 (Con) と比較して血漿総ケトン体濃度が有意に増加した (Con : 0.11 ± 0.02 mM, 1.3-BD : 0.64 ± 0.16 mM (平均値 \pm 標準誤差)、 $p < 0.05$)。そこで、20%の 1.3-BD を 6 週間飲水投与し、持続的に高ケトン体血症を生じさせた雌性 C57BL/6J マウスと DNA のメチル化に伴い遺伝子発現が変化し、毛色に変化する雄性 Agouti viable yellow (Avy) マウスを交配し、産子数、仔の体重および Avy 遺伝子発現を検討した。その結果、出生時体重に有意な違いはなかったものの、1 匹当たりの産子数は 1.3-BD 群 (8.5 ± 0.2) において Con 群 (6.9 ± 0.4) よりも有意に高値を示した (図 1a, b)。仔の DNA メチル化に対する影響を肝臓における agouti 遺伝子の mRNA 発現量で比較した結果、毛色の違いによって agouti 遺伝子の発現量は有意な差を示したものの、Con 群と 1.3-BD 群の agouti-mRNA の発現量は、有意な変化は見られなかった (図 1c, d)。以上のことから、1.3-BD 投与による妊娠前の母体の高ケトン体血症は、出生時体重には影響せず、産子数を増加させた。また、Avy 遺

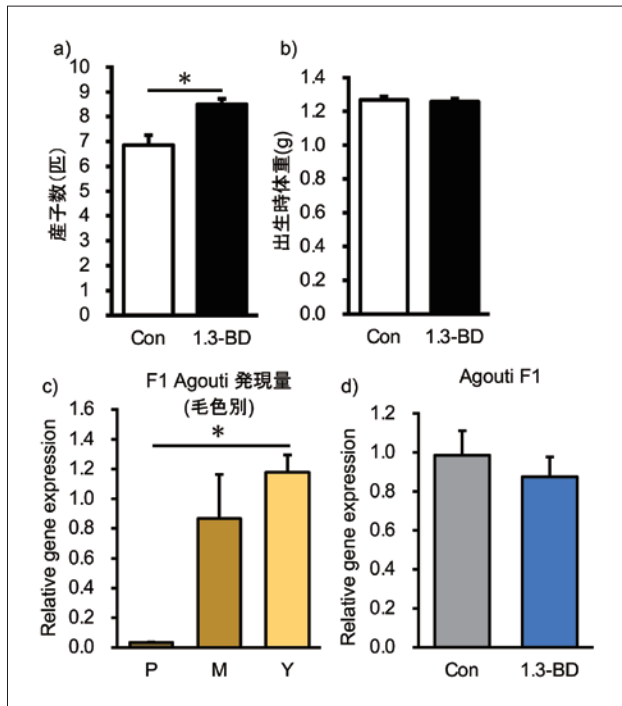


図1 妊娠前の1,3-BD投与による産子数、出生時体重、Avy遺伝子発現への影響

a, b) 20%の1,3-BDを6週間投与し、交配したマウスの産子数(a)と出生時体重(b)。c, d) 毛色別のAgouti遺伝子発現量(c)と各群の仔マウスのAgouti遺伝子発現量(d)。P, M, Yは毛色を示す。P: psude agouti, M: motty, Y: yellow. * : p < 0.05.

伝子の発現には影響しなかったことから、DNAのメチル化への有意な影響は確認できなかった。本実験の問題点として、1,3-BD投与により、マウスの食事摂取量が低下し、体重が減少したことが挙げられる(図2a, b)。食餌摂取量の低下は、仔の成長や代謝異常発症に関連するため、次に異なる手法で高ケトン血症を生じるマウスについて検討した。

2-2 ケトジェニック食摂取が仔の代謝に及ぼす影響の検討

これまでの研究で用いられてきたケトジェニック食(KD)は、対照食(Control diet: CD)と比較して、タンパク質含有量が低い。しかし、母親のタンパク質摂取量の違いは仔の将来の疾病発症に影響を与える。本研究ではタンパク質エネルギー比が20%のCDと22%のKDを作成し、母体のKD摂取が仔の糖・脂質代謝に与える影響について検討した。

KD摂取がケトン体産生を増加させるか調べるために、マウスにCDまたはKDを自由摂取させた。投与開始から7日目の血漿総ケトン体濃度はCD群で 0.39 ± 0.06 mM、KD群で 1.38 ± 0.26 mMであり、KD群で有意に高値を示した。またKD摂取により、CD摂取と比較して血漿グルコース濃度、血漿トリグリセリド(TG)濃度、血漿総コレステロール(T-cho)濃度、血漿遊離脂肪酸濃度に有意な差はなく、肝臓中TG濃度は有意に高値を示した(図3a~f)。肝臓における脂肪酸取り込みに関与する遺伝子、脂肪酸酸化、ケトン体産生に関与するmRNA発現はCD群に比べKD群で高値を示し、反対に脂肪酸産生に関与する遺伝子のmRNA発現は低値を示した(図3g, h)。以上の結果より、KD摂取により肝臓におけるケトン体産生は亢進し、産生されたケトン体は血中に放出され高ケトン血症を生じたと考えられる。

母体のKD摂取が仔の糖・脂質代謝に与える影響

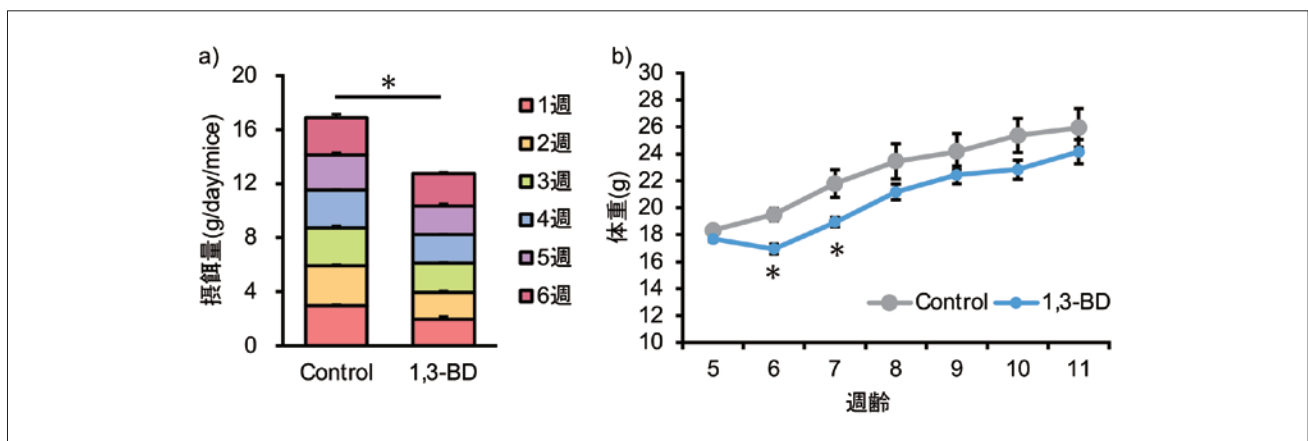


図2 妊娠前の1,3-BD摂取による摂餌量と体重推移
a) 1,3-BD投与期間中の各群の摂餌量を積み上げ棒グラフで示した。
b) 1,3-BD投与期間中の各群の体重変化。
* : p < 0.05.

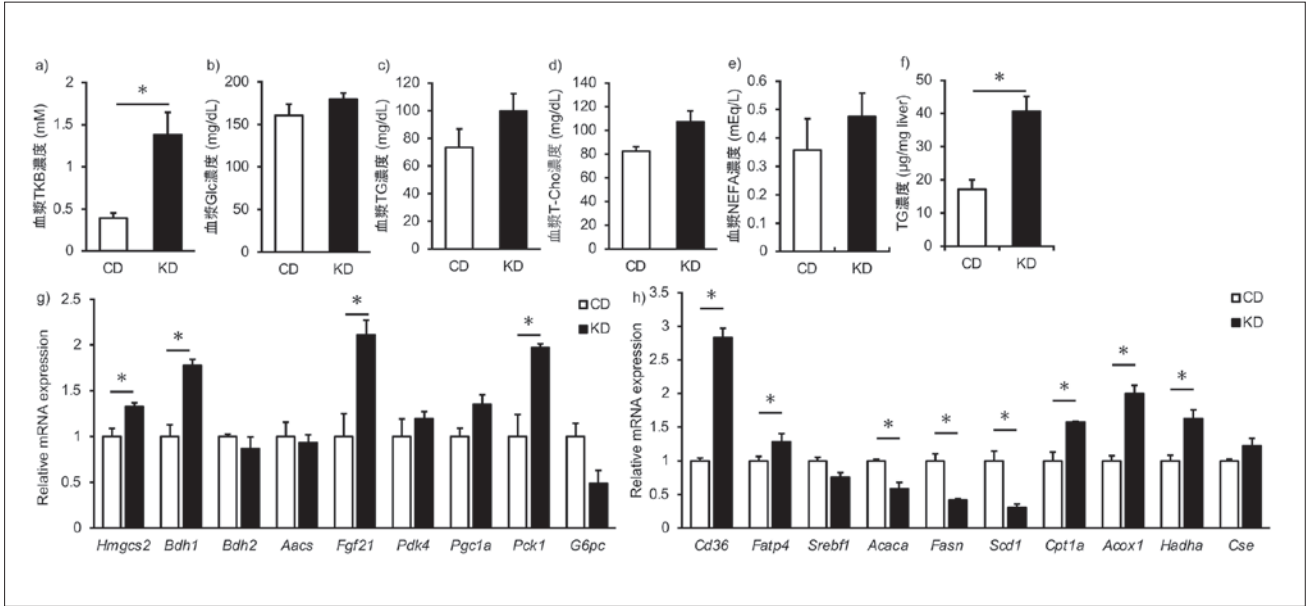


図3 KD 摂取が脂質代謝に及ぼす影響

a ~ f) CD または KD を 3 週間自由摂取したマウスの血漿総ケトン体 (TKB) 濃度 (a)、血漿グルコース (Glc) 濃度 (b)、血漿トリグリセリド (TG) 濃度 (c)、血漿総コレステロール (T-cho) 濃度 (d)、血漿遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度 (e)、肝臓中 TG 濃度 (f)。
 g, h) CD または KD を 3 週間自由摂取したマウスの肝臓におけるケトン体代謝、糖新生関連遺伝子 (g) および脂質代謝関連遺伝子 (h) の mRNA 発現量。
Hmgcs2: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2, *Bdh1*: 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type1, *Bdh2*: 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2, *Aacs*: acetoacetyl-CoA synthetase, *Fgf21*: fibroblast growth factor 21, *Pdk4*: pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4, *Pgc1a*: peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1 alpha, *Pck1*: phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, *G6pc*: glucose-6-phosphatase, catalytic, *Cd36*: CD36 molecule, *Fatp4*: solute carrier family 27 member 4, *Srebf1*: sterol regulatory element binding transcription factor 1, *Acaca*: acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha, *Fasn*: fatty acid synthase, *Scd1*: stearoyl-Coenzyme A desaturase 1, *Cpt1a*: carnitine palmitoyltransferase 1a, *Acox1*: acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl, *Hadha*: hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha, *Cse*: cystathionase (cystathionine gamma-lyase).
 *: p < 0.05.

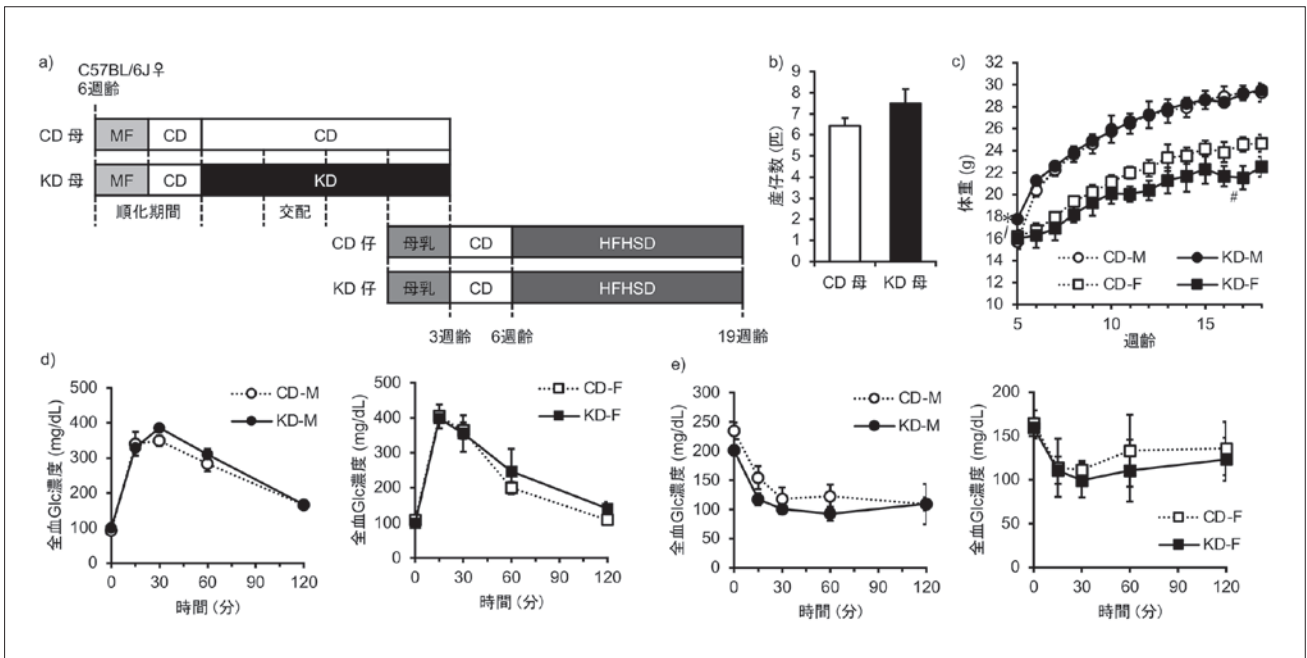


図4 周産期のKD 摂取が産子数および仔の高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) 摂取後の体重変化、耐糖能、インスリン感受性に及ぼす影響
 a) 実験工程の模式図。MF: 通常食、CD: コントロール食、KD: ケトジェニック食、HFHSD: 高脂肪高ショ糖食。
 b) 各食餌摂取後、交配し妊娠した雌マウスの産子数。
 c) 各群の母マウスから生まれた仔が HFHSD を摂取した期間中の体重変化。M: 雄マウス、F: 雌マウス。
 d) 仔マウスが 15 週齢時点で実施した経口糖負荷試験 (OGTT) 中の血糖値の変動パターン (左図: 雄マウス、右図: 雌マウス)。
 e) 仔マウスが 17 週齢時点で実施した腹腔内インスリン負荷試験 (ITT) 中の血糖値の変動パターン (左図: 雄マウス、右図: 雌マウス)。
 #: p < 0.05.

を調べるために、妊娠前、妊娠中、授乳中を通して母マウスに CD または KD を投与した (図 4a)。母マウスには 2 群間で累計エネルギー摂取量に差がないように、食餌の投与量を調節した。雄性 Avy マウスとの交配を行うと、CD 群 7 匹、KD 群 6 匹が妊娠した。妊娠した KD 群 6 匹のうち 2 匹は分娩が起きなかった。産仔数は 2 群間で有意な差はなかった (図 4b)。

CD または KD を摂取した母マウスから生まれた Avy と Black の仔マウスのうち、Avy の仔マウスは 4 週齢で解剖し、サンプルを採取した。Avy の仔マウスの 4 週齢での体重、肝臓重量、相対的肝臓重量は、雌雄共に 2 群間で有意な差はなく、両群間で毛色の違いも認められなかった。Black の仔マウスには代謝異常を誘導するため、6 週齢から 19 週齢まで高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) を投与した。投与期間中の食餌摂取量は両群間で有意な違いはなく、KD 群の雌マウスにおいて 17 週齢時の体重が低値を示した (図 4c)。仔マウスの糖代謝について調べるた

めに、15 週齢で経口糖負荷試験 (OGTT)、17 週齢で腹腔内インスリン負荷試験 (ITT) を実施した。OGTT の結果より、空腹時全血グルコース濃度、各時点での全血グルコース濃度、血糖値の上昇曲線下面積は雌雄共に 2 群間で有意な差はなかった (図 4d)。また、ITT の結果より、各時点での全血グルコース濃度、血糖値の減少曲線下面積は雌雄共に 2 群間で有意な差はなかった (図 4e)。仔マウスを 19 週齢で解剖し、解析した結果、相対的肝臓重量は CD 群の雄マウスと比較して KD 群の雄マウスで有意に高値を示した (図 5a)。肝臓 T-Cho 濃度と血漿 TG 濃度は CD 群の雄マウスと比較して KD 群の雄マウスで有意に高値を示し、雄マウスで脂質代謝異常を生じている可能性が示唆された (図 5b, c)。一方雌マウスにおいては、肝臓 TG 濃度や相対的性腺周囲脂肪組織重量が CD 群の雌マウスと比較して KD 群の雌マウスで有意に低値を示した (図 5d, g)。さらに、脂肪組織を染色し、脂肪細胞の面積を計測すると CD 群と比較して KD 群で低値を示し、脂質の

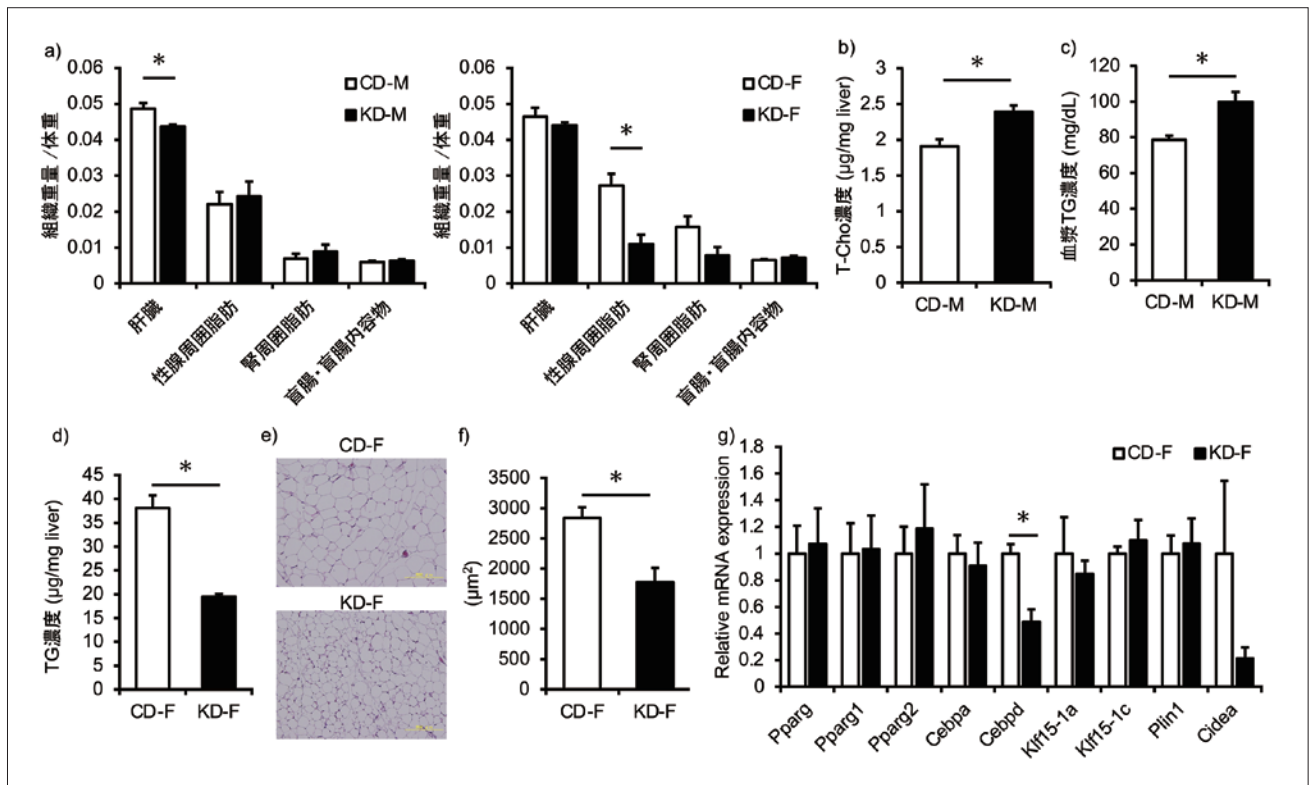


図 5 周産期の KD 摂取が仔の脂質代謝に及ぼす影響

a) HFHSD を摂取した仔マウスの 19 週齢時の組織重量 (左図: 雄マウス、右図: 雌マウス)。
 b) HFHSD を摂取した仔マウスの 19 週齢時の雄マウスの肝臓中 T-Cho 濃度 (b)、雄マウスの血漿 TG 濃度 (c)、雌マウスの肝臓中 TG 濃度 (d)、雌マウスの脂肪組織の H&E 染色像 (e) と脂肪細胞の平均面積 (f)、脂肪組織における分化・増殖・脂肪滴形成に関与する遺伝子の mRNA 発現 (g)。Pparg: peroxisome proliferator activated receptor gamma, Pparg1: Pparg isoform 1, Pparg2: Pparg isoform 2, Cebpa: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha, Cebpd: Cebp, delta, Klf15: Kruppel-like factor 15, Plin1: perilipin 1, Cidea: cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A.
 *: p < 0.05.

蓄積が抑制されていた (図 5e, f)。興味深いことに、脂肪細胞の分化や増殖に関する遺伝子の mRNA 発現は両群間で有意な違いはなく、その他の要因がこの現象に関与している可能性が示された。

以上の結果を総合すると、母体の KD 摂取は、出産時に分娩異常を引き起こすこと、成体子孫の高脂肪高シヨ糖食摂取による脂質代謝の変化において、性別により異なる影響を引き起こす可能性が示された。今後の詳細な検討を行うことによってこれらの作用機構を明らかにするが必要である。

2-3 ケトン体代謝異常を生じるマウスモデルの確立

ケトン体のうち B-OHB は、グルコースの代替エネルギー源としての働きだけでなく、HDAC 阻害作用など、様々な役割を有している。B-OHB 脱水素酵素 (BDH) はアセト酢酸と B-OHB の変換を触媒する酵素であり、BDH1 をノックアウトしたマウスの肝臓では、B-OHB 濃度が低下するだけでなく、様々な代謝経路が影響を受けることが知られている²⁾。この

BDH1 には相同性の高い BDH2 が存在する。本検討では、BDH2 の生体内でのケトン体代謝およびその他の代謝へ及ぼす役割について遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

BDH2 遺伝子欠損 (KO) がケトン体代謝に及ぼす影響を検討するために、摂食群と 16 時間絶食群に分け、ケトン体濃度を検討した。血漿、肝臓、腎臓中のケトン体濃度の内、摂食時の腎臓において野生型 (WT) 群に比べて KO 群で総ケトン体濃度が有意に高値を示した (図 6a)。BDH2 遺伝子欠損がケトン体代謝以外の代謝機構へ及ぼす影響を明らかにするために、肝臓および腎臓の代謝産物の網羅的解析を行った。肝臓では 92 種類の代謝産物中で WT 群と KO 群の摂食群、絶食群において代謝産物の組成や濃度に違いは見られなかった。一方、腎臓では摂食群と絶食群で代謝産物の組成に違いが見られた (図 6b)。さらに代謝産物の統計的解析を行った結果、腎臓では 88 種類の代謝産物中、摂食群において choline、inosine、glutathione (GSSG) の 3 つの代謝産物で WT 群と KO 群に有意差が見られ、絶食群で

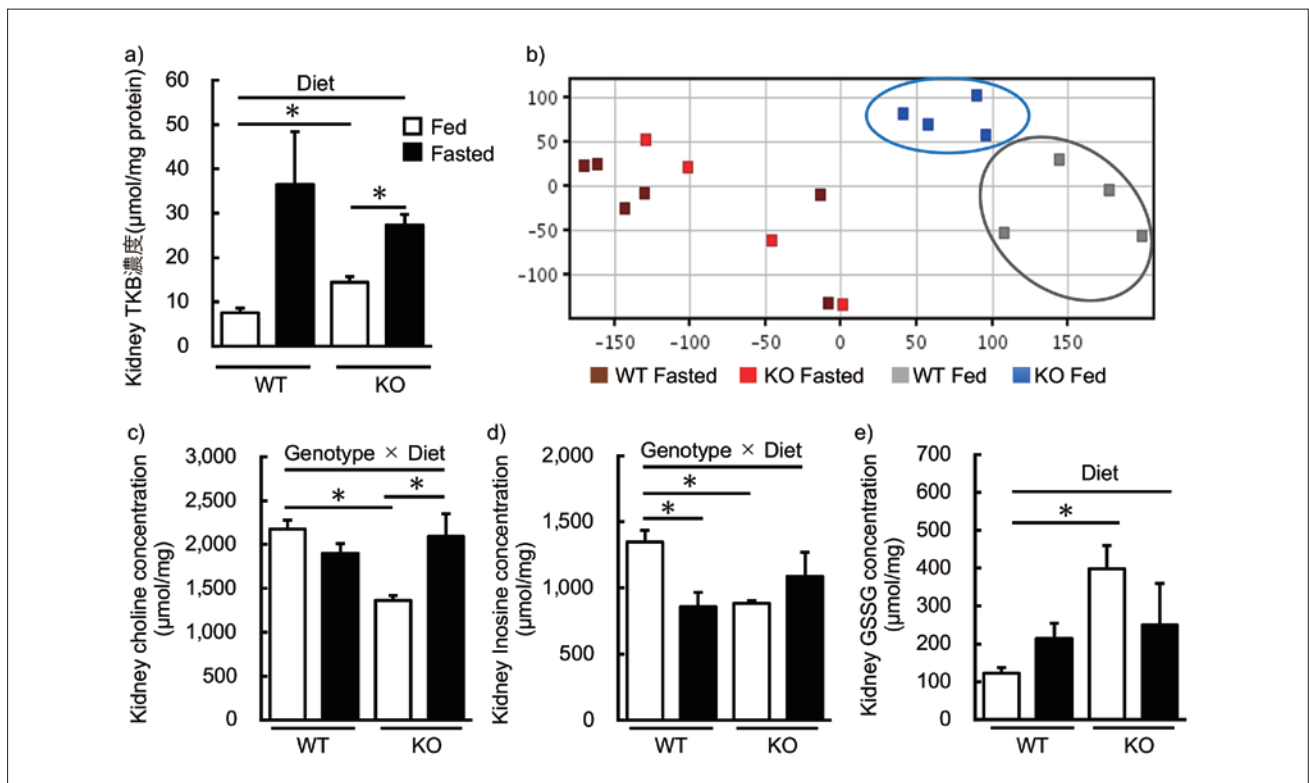


図 6 BDH2 遺伝子の欠損が、腎臓の各種代謝に及ぼす影響

a) BDH2-KO マウスと WT マウスの腎臓中総ケトン体濃度。Fed: 摂食時、Fasted: 16 時間絶食時。

b) BDH2-KO マウスと WT マウスの腎臓中の代謝産物の主成分分析。

c ~ e) B の解析で有意な差を示したコリン (c)、イノシン (d)、GSSG (e) の濃度。

*: $p < 0.05$. Diet: Effect of feeding condition ($p < 0.05$), Genotype: Effect of genotype ($p < 0.05$), Genotype \times Diet: Interactive effect ($p < 0.05$).

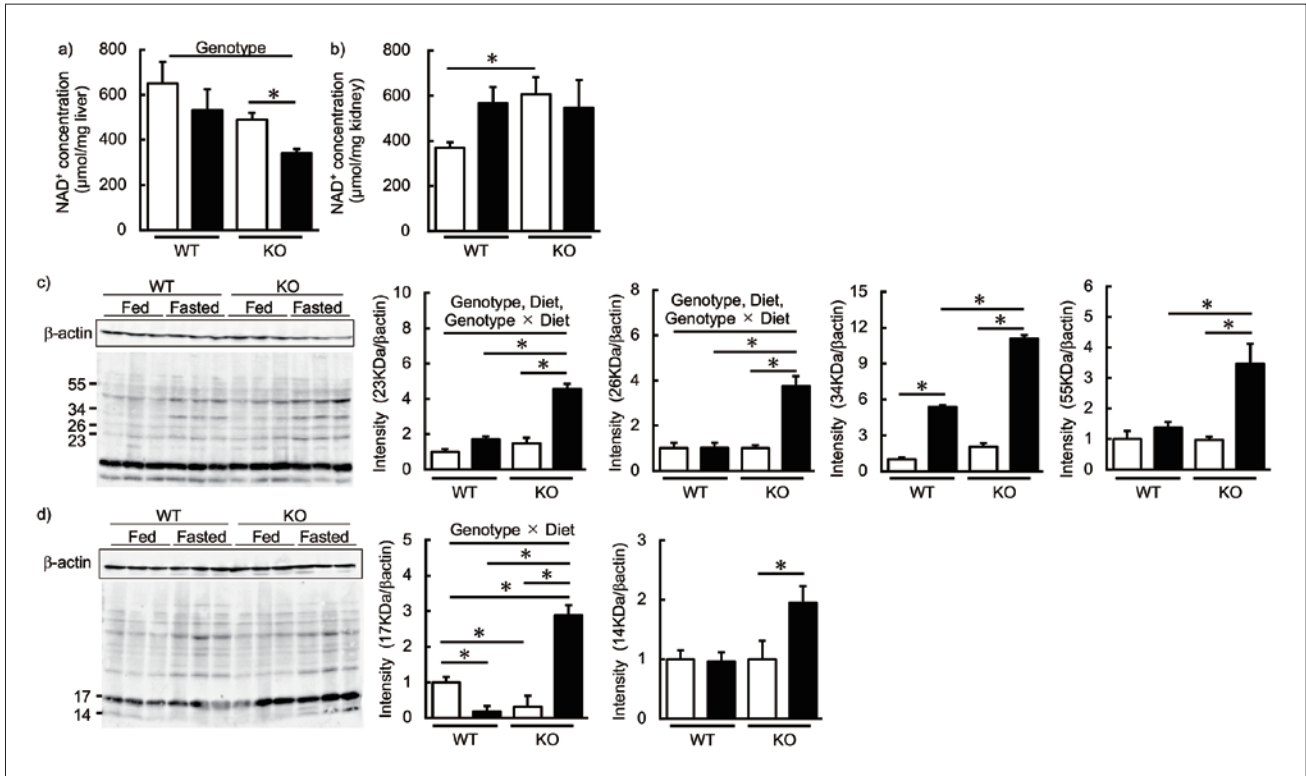


図7 BDH2 遺伝子の欠損が、肝臓と腎臓の NAD⁺濃度およびタンパク質のアセチル化に及ぼす影響

a, b) BDH2-KO マウスと WT マウスの肝臓中 (a) および腎臓中 (b) の NAD⁺濃度。

c, d) BDH2-KO マウスと WT マウスの肝臓中 (c) および腎臓中 (d) のアセチル化タンパク質のバンド図 (左) と有意な違いのあった質量のバンドの強度 (右図)。

* : p < 0.05. Diet: Effect of feeding condition (p < 0.05), Genotype: Effect of genotype (p < 0.05), Genotype × Diet: Interactive effect (p < 0.05).

は有意差は見られなかった (図 6c ~ e)。

BDH2 は NAD⁺ および NADH を代謝することでアセト酢酸と B-OHB の変換を行う。そこで WT 群と KO 群において摂食時または絶食時での NAD⁺ 濃度を比較した。肝臓では WT 群と比較して KO 群で NAD⁺ 濃度が低値を示し、腎臓では摂食時に WT 群に比べて KO 群において NAD⁺ 濃度が高値を示した (図 7a, b)。NAD⁺ 代謝はタンパク質のアセチル化と関連することが報告されている³⁾。Sirtuin ファミリーは NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素であり、タンパク質のリジン残基のアセチル化を調節する。そこで NAD⁺ 濃度の組織ごと濃度の違いと BDH2 遺伝子欠損による NAD⁺ 濃度の変化が持つ生物学的意義を調べるために、NAD⁺ と関連の深いタンパク質のリジン残基のアセチル化度合いを比較した。その結果、絶食時に肝臓では 55kDa、34kDa、26kDa、23kDa の 4 つの質量で、腎臓では 17kDa、14kDa の 2 つの質量のタンパク質のリジン残基が WT 群と比較して KO 群で強くアセチル化されていた (図 7c, d)。

以上の結果より、BDH2 遺伝子の欠損は、摂食時の腎臓においてケトン体やその他の代謝に影響を及ぼすこと、さらに、NAD⁺ 濃度調節およびタンパク質のアセチル化にも影響を及ぼすことが確認された。今後、このマウスを用いて妊娠期のケトン体代謝異常が出生後の仔の疾病発症に及ぼす影響を検討することを目指している。

3. 考察

本研究では、高ケトン体血症を生じる 2 つのモデルを用いて、母親の高ケトン体血症が仔に及ぼす影響を検討した。1.3-BD を用いた研究では、産子数が対照群と比較して 1.3-BD 群で有意に高値を示したのに対して、KD を用いた実験では、KD 群で産子数が多い傾向にあるものの、有意な違いはなかった。KD の投与期間 3 週間と比較して 1.3-BD は投与期間が 6 週間と長かったため、長期間の高ケトン体血症が産子数に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、

2つの実験に共通して Avy 遺伝子の発現や毛色の変化は認められなかった。Avy 遺伝子領域は出生までにメチル化度合いが調節され、出生後も維持されることから、胎生期の高ケトン体血症が DNA メチル化に及ぼす影響は普遍的ではないことが考えられる。今後、仔マウスで認められた表現型を決定する遺伝子の mRNA 発現量と変化のあった遺伝子の発現調節領域の DNA メチル化、およびヒストン修飾を検討することで、高ケトン体血症がエピゲノム修飾に及ぼす影響を明らかにすることができる。また、仔の脂質代謝に対する影響は雌雄差があったため、雌雄差に関与する遺伝子群の関与が疑われ、性ホルモンを含めた検討を企画している。

BDH2 ノックアウトマウスを用いた研究では、特に腎臓において、BDH2 の欠損が様々な代謝機構に影響することが明らかとなった。この影響の中には、生体内の様々な機能調節に影響する NAD⁺代謝が含まれており、今後詳細に検討することによりケトン体代謝異常が生体に及ぼす影響を明らかにすることができる。さらに、ケトン体産生に関与する遺伝子の変異マウスと、KD 食摂取実験を組み合わせることで、高ケトン体血症が仔に及ぼす影響をより詳細に明らかにすることができる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に厚く御礼申し上げます。特に、新型コロナウイルス感染症の流行により実験を継続することが困難になった際、研究期間を延長するなど柔軟な対応をしていただき、感謝いたします。加えて BDH2 変異マウス系統を提供していただいたウェルカム・トラスト・サンガー研究所マウス遺伝学プロジェクト (サンガー MGP) およびその資金提供者に感謝します⁴⁻⁷⁾。また、マウス系統の提供を受けた INFRAFRONTIER/EMMA パートナーのヘルムホルツ・ツェントラム・ミュンヘンにも感謝します。

参考文献

- 1) Ogawa K et al. *Sci Rep.* 2018 Aug 1;8(1):11574.
- 2) David B Stagg et al. *Mol Metab.* 2021 Nov; 53:101269.
- 3) Zhiyao Fu et al. *Metabolism.* 2022 Oct; 135: 155275.
- 4) White J K et al. *Cell* 2013 Jul 154(2), 452-464.
- 5) Skarnes W.C et al. 2011. *Nature* Jun 474, 337-342.
- 6) Bradley A et al. 2012 *Genome* Oct 23(9-10), 580-586.
- 7) Pettitt SJ et al. 2009 *Nature methods* Jul 6(7), 493-495.

Effects of maternal intake of a ketogenic diet and abnormal ketone body metabolism on the development of lifestyle-related diseases

Takashi UEBANSO

Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

In recent years, low-carbohydrate diets have become popular despite a lack of scientific evidence, and the increased incidence of hyperketonemia associated with inadequate carbohydrate intake and its impact on health have become a concern. The purpose of this study was to determine the effects of perinatal hyperketonemia on metabolic abnormalities in offspring using two models that produce hyperketonemia: 1,3-butanediol (1,3-BD) ingestion and ketogenic diet (KD) feeding. The ingestion of 1,3-BD prior to conception resulted in higher fecundity. However, KD feeding did not affect litter size, and the effect on litter size varied by model. There were no significant differences in either birth weight or agouti gene expression in the offspring, reflecting DNA methylation levels in both the 1,3-BD and KD feeding models. Female offspring derived from mothers who consumed a KD showed lower hepatic triglyceride concentrations, perigonadal fat weight, and adipocyte cross-sectional area, despite similar energy intake from the diet. In contrast, hepatic total cholesterol concentrations and plasma triglyceride concentrations were higher in male offspring of the KD group. These results suggest that the effects of perinatal KD feeding on the lipid metabolism of offspring may differ by sex. Furthermore, abnormal ketone body metabolism occurred in the kidneys of β -hydroxybutyrate dehydrogenase 2 knock out mice. Several metabolic changes were observed in these mice, such as NAD^+ concentrations and lysine acetylation substrates in protein. In the future, we plan to use these mice to study the effects of abnormal ketone metabolism during gestation on the development of disease in the offspring after birth.