

氏名（本籍）	大塚博樹	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1139号	
学位授与日付	令和2年7月15日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Deficiency of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting.	
審査委員	（主査）教授	矢部 大介
	（副査）教授	國貞 隆弘
		教授 前川 洋一

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ケトン体であるアセト酢酸(AcAc)と3ヒドロキシ酪酸(3HB)は、飢餓や感染罹患時など糖質が枯渇する状況において重要なエネルギー源となる。ケトン体代謝は肝臓におけるケトン体産生と肝臓外組織におけるケトン体利用からなる。3ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(3-hydroxy-butylate dehydrogenase:BDH1)はミトコンドリアに存在し、肝臓においてNADH依存性にAcAcから3HBへの変換を触媒する一方、肝臓外組織においてAcAcから3HBへの変換を触媒する。BDH1は、ケトン体産生の最終段階とケトン体利用の最初の段階に関わるが、BDH1を介さず肝臓からAcAcが放出され、肝臓外組織において利用されることから、ケトン体産生・利用にBDH1は必ずしも必須ではない。しかし、ケトン体代謝が亢進する場合、AcAcより3HBが増加することからも、ケトン体代謝調節におけるBDH1の重要性が示唆される。ケトン体産生に関係する多くの酵素の欠損症患者が報告される一方、現在までヒトにおけるBDH1欠損症の報告はなく、BDH1欠損症患者の発見に向け、本研究ではCRISPR/Cas9システムにより*Bdh1*遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、病態研究を行なった。

### 【対象と方法】

C57BL/6N雌とB6D2F1雄からCRISPR/Cas9によりKO胚を作製し、成長したKOマウスをC57BL/6Jに交配しKOマウスを樹立し、戻し交配を行いながら雌マウスを用いて病態解析を行った。*Bdh1*遺伝子のexon2上に設計されたガイドRNA近傍の遺伝子配列のシークエンス、肝臓破砕液を用いたイムノブロット(ウサギポリクローナル抗BDH1抗体を一次抗体に使用)によりKOを確認した。絶食負荷試験は8週齢の野生型(WT)およびKOマウスを用いて実施し、0, 16, 24, 48時間に尾静脈採血にて血糖測定を行い、排尿があれば濾紙で尿検体を採取した。トリブromoエタノール腹腔内投与による麻酔下に、心穿刺による血液検体採取と肝臓切離を実施した。血清中の総ケトン体(TKB)、AcAc、3HB、遊離脂肪酸(NEFA)の測定、尿中の有機酸分析を行い、肝臓は病理解析を行うとともに肝臓破砕液を用いて中性脂肪、コレステロール含有量を測定した。

### 【結果】

KOマウスは翻訳開始メチオニンコドンのアデニン及びアデニンから数えて58番目から63番目までの6塩基を欠失しており、下流にインフレームの翻訳開始点は認めなかった。またイムノブロットは、WTマウス由来の肝臓破砕液では5 $\mu$ gのタンパク質で検出可能なBDH1分子に相当するバンドが、KOマウス由来の肝臓破砕液では80 $\mu$ gのタンパク質を用いても検出されなかった。KOマウスは成長に問題はなく明らかな外表異常や異常行動は認めず、繁殖可能かつ出生数や性別に偏りを認めなかった。

体重の推移は3週齢から8週齢までWTマウスとKOマウスで有意な差異を認めず、血糖値やNEFAも同様であった。絶食負荷試験ではWTマウス、KOマウスともに48時間の飢餓に耐え生存したが、KOマウスはWTマウスより血糖が低下しにくかった。KOマウスではWTマウスに比して有意な差を認めないもののNEFAが高い傾向にあった。KOマウスではWTマウスに比して3HBの上昇を全く認めることはなく、一方でAcAcが上昇傾向にあった。KOマウスではWTマウスに比してTKBが有意に低値であった。尿中有機酸分析ではKOマウスはWTマウスに比して3HB排泄が有意に低下していたが、それ以外に特徴的な所見は認めなかった。肝臓の病理解析ではWTマウス、KOマウスともに食餌下で少量の脂肪沈着を認めたが、24時間の絶食負荷によりKOマウスはWTマウスと比して重度の脂肪肝を呈し、肝臓破砕液中の中性脂肪もKOマウスでWTマウスと比較して有意な上昇を認めた。総コレステロールはKOマウスとWTマウスで明らかな差異を認めなかった。

#### 【考察】

BDH1欠損症は未だヒトで発見されていない疾患である。本研究においてKOマウスは食餌下では大きな問題なく成長した。現在までに判明しているBDH1の役割はケトン体の産生・利用に関わることであり、食餌下では生体内でのケトン体の産生・利用が抑制されているので問題は生じないと考えた。対照的に生化学的な変化は絶食負荷で現れた。KOマウスはWTマウスと同様に低血糖を呈したが血糖低下に抵抗性を示し、重度の脂肪肝を呈した。絶食負荷による3HB上昇を認めず、これよりBDH1は3HB合成の主たる酵素と考えられた。AcAc上昇はKOマウスの方が大きかったが有意差はなく、これはWTマウスの3HB上昇と比べると1/10程度であった。これらの結果より、肝臓からのケトン体放出はKOマウスの方が少ないことが示唆された。KOマウスで代償性に放出されるAcAcが少ない理由については今後の研究課題である。またKOマウスでは、肝臓のケトン体産生経路としてミトコンドリア内でNADH/NAD<sup>+</sup>比が上昇し、アセチルCoAが貯留することが考えられる。それにより中性脂肪生成へ進むことや、ピルビン酸代謝や解糖系のNAD依存性酵素が機能低下することによる血糖低下の差に反映されていると考えた。ヒトBDH1欠損症は未だ発見されていない疾患だが、3HBの産生・利用障害に起因する病態が発症すると推測され、飢餓でもケトosisにならずAcAc/3HB比は高くなり、脂肪肝をきたすことが想定される。ケトン体測定は広く普及しており、小児の嘔吐を繰り返す患者や感染症の患者にはよく行われる検査である。尿ケトンはAcAcを測定し、血液のケトンは3HBを測定しているため、BDH1欠損症では尿ケトン陽性と血中ケトン陰性を呈すると考えられる。

#### 【結論】

KOマウスは通常食餌下では明らかな異常なく成長するが、絶食負荷に対して血中3HBの上昇を認めず、血中AcAcの上昇傾向と脂肪肝を呈した。従って、未だ同定されていないヒトBDH1欠損症患者は、通常無症状で、飢餓時に著明なAcAc/3HB比の上昇と脂肪肝を認めると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 大塚博樹は、ケトン体代謝において重要な役割を担う*Bdh1*遺伝子欠損マウスをCRISPR/Cas9法を用いて作成し、その病態解析を通して、*Bdh1*遺伝子欠損が飢餓時のAcAc/3HB比の上昇と脂肪肝を生じることを見出した。本研究成果は、未だ同定されていないヒトBDH1欠損症患者を同定する指標を提示した点で、先天代謝異常症の診断・治療に少なからず貢献するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Hiroki Otsuka, Takeshi Kimura, Yasuhiko Ago, Mina Nakama, Yuka Aoyama, Elsayed Abdelkreem, Hideki Matsumoto, Hidenori Ohnishi, Hideo Sasai, Masatake Osawa, Seiji Yamaguchi, Grant A Mitchell, Toshiyuki Fukao: Deficiency of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting.  
Journal of Inherited Metabolic Disease (in press) doi: 10.1002/jimd.12243.