

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02719

研究課題名(和文) ケトン食由来代謝産物に基づく難治性てんかん治療薬の開発

研究課題名(英文) Drug development for intractable epilepsy based on ketogenic diet-derived metabolites

研究代表者

井上 剛 (Inoue, Tsuyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40370134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン食療法は、既存薬が効かない難治性てんかんに有効であり、アルツハイマー病等の神経疾患への有効性も示唆されている。本研究では、ケトン食療法に基づく治療薬開発を目指し、以下3項目を実施した。まず第一に、ケトン食の主要代謝産物である ヒドロキシ酪酸に着目し、その作用点として電位依存性カルシウムチャネル 1サブユニットを決定した。第二に、ケトン食による抗てんかん作用を担う乳酸脱水素酵素に関し、その LDHA サブユニットがてんかん発作で増加することを明らかにした。最後に、アルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能障害を ヒドロキシ酪酸が予防することを見出し、その作用メカニズムを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の治療薬が効かない「難治性神経疾患」の患者は、新しい作用機序を持つ新薬開発を必要としている。ケトン食療法は、難治性てんかんを代表とする神経疾患に有効であるが、厳しい食事制限ゆえに継続するのが難しく、「ケトン食療法に基づく治療薬」が望まれている。そこで本研究では、ケトン食によって産生される代謝産物を中心に、治療薬開発に必要な創薬標的分子の同定・検証実験を進め、3つの研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The ketogenic diet treatment is effective for drug-resistant intractable epilepsy, and also potentially effective for other neurological disorders such as Alzheimer diseases. We addressed the following three issues in this study, towards the drug development based on the ketogenic diet. First, we focused on γ -hydroxybutyrate, a main metabolite of the ketogenic diet, and determined the α_1 subunit of voltage-dependent calcium channels that is inhibited by γ -hydroxybutyrate. Second, we found that seizures in mice increase the LDHA subunit in the brain, which is a constituent of LDH enzymes that are responsible for the antiepileptic effects of the ketogenic diet. Finally, we found that γ -hydroxybutyrate protects cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer diseases, and investigated the protection mechanism.

研究分野：病態神経科学

キーワード：ケトン食 治療薬開発 難治性てんかん 乳酸脱水素酵素 電位依存性カルシウムチャネル ヒドロキシ酪酸 アルツハイマー病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳神経の過剰な電気活動によって引き起こされる神経疾患である。それゆえ、既存のてんかん治療薬は、その過剰な電気活動を抑えるよう、電気を制御する分子（イオンチャネルやシナプス受容体）に作用するようにつくられてきた。この電気制御分子を狙うてんかん創薬は理にかなっているものの、てんかん患者の約3割には既存の治療薬が奏功しないことが知られている (Kwan and Brodie, *N Engl J Med*, 2000)。現在、この「難治性てんかん」に有効な新しいてんかん治療薬が必要とされている。

一方で、この薬が効かない難治性てんかんに対し、「ケトン食療法」と呼ばれる食事療法が有効であることが知られている。ケトン食療法とは、高脂肪・低炭水化物からなる「ケトン食」を摂取し続けることで抗てんかん作用が得られる食事療法である。その歴史は古く、1920年代に開発されたが、数多くのてんかん治療薬が開発された現在においても、既存薬が奏功しない難治性てんかん患者に有効性を示すことが報告されている (Neal et al, *Lancet Neurol*, 2008)、すなわち、ケトン食療法の作用点と既存薬の作用点が異なることを意味しているため、その分子メカニズムが注目されている (Lutas and Yellen, *Trends Neurosci*, 2013; Rho, *Neurosci Lett*, 2017; Sada and Inoue, *Front Cell Neurosci*, 2018)。

しかしながら、ケトン食療法にも問題点がある。ケトン食療法では厳しい食事制限が課されるため、この食事療法を継続するのは難しい。つまり、ケトン食療法の作用メカニズムを明らかにし、その作用機序に基づく治療薬を開発できれば、患者は厳しい食事制限から解放されることになる。「ケトン食療法に基づくてんかん治療薬」は、画期的新薬となりうる。

研究代表者はこれまで新薬開発を目指し、ケトン食がなぜ難治性てんかんに効くのか、その作用メカニズムに関して研究を進めてきた。まず、ケトン食によって生じるエネルギー代謝変化により神経抑制が生じ、それを担う分子として「乳酸脱水素酵素」を見出した (Sada et al, *Science*, 2015)。本報告において、乳酸脱水素酵素の阻害により神経抑制が引き起こされ、*in vivo* でも抗てんかん作用を示すことを見出した。さらに、この乳酸脱水素酵素を創薬標的分子とし、既存抗てんかん薬スチリペントールの化学構造を改変することで、ケトン食療法に基づく治療薬開発が可能であることを示した。

さらに研究代表者は、ケトン食由来代謝産物であるアセト酢酸に着目し、その作用分子として「電位依存性カルシウムチャネル」を見出した (Kadowaki et al, *Epilepsia*, 2017)。本報告において、アセト酢酸が電位依存性カルシウムチャネルを阻害し、興奮性シナプス伝達を減弱させることで、抗てんかん作用を示すことを見出した。さらに、電位依存性カルシウムチャネルをより強く阻害するように化学構造を改変することで、既存薬が効かない難治性てんかんモデルに対しても薬効を示す「アセト酢酸の構造類似体」を見出した。

2. 研究の目的

上述してきたように、難治性てんかん患者は「ケトン食療法に基づく治療薬」を必要としている。そして研究代表者はこれまで、ケトン食に基づく治療薬開発を目指し、乳酸脱水素酵素を狙うてんかん創薬 (Sada et al, *Science*, 2015) や、ケトン食由来代謝産物の構造改変によるてんかん創薬 (Kadowaki et al, *Epilepsia*, 2017) を進めてきた。興味深いことに、ケトン食は難治性てんかんのみならず、軽度認知障害やアルツハイマー病患者の認知機能改善にも効果があることが知られている (Reger et al, *Neurobiol Aging*, 2004)。そこで本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させるべく、以下3項目を実施した。

- (1) ケトン食由来代謝産物である「ヒドロキシ酪酸」に着目したてんかん創薬研究
- (2) 代謝酵素である「乳酸脱水素酵素」を狙うてんかん創薬研究
- (3) ヒドロキシ酪酸によるアルツハイマー病様症状の予防作用に関する研究

3. 研究の方法

海馬スライス標本からのパッチクランプ測定：海馬を含むマウス脳スライス標本を、ピプラトームを用いて作製した。本スライス標本は人工脳脊髄液下で維持し、近赤外線微分干渉顕

顕微鏡で海馬 CA1 錐体細胞を可視化し、電位固定モードでパッチクランプ測定を行った。カルシウム電流を単離するため、tetrodotoxin と QX-314 によりナトリウム電流、cesium、tetraethylammonium、4-aminopyridine によりカリウム電流、picrotoxin と CGP-55845 により GABA 電流を遮断した。

海馬硬化症モデルを用いた抗てんかん作用評価と生化学的評価： てんかん発作を誘導するために、麻酔下で微量のカイニン酸をマウス海馬内に投与し、てんかん脳波記録用の金属電極を設置した。阻害剤を海馬内投与する際は、同側海馬に試薬投与用カニューレも設置した。このマウスは、カイニン酸投与から数週間後に特徴的な海馬形態変化と自発的発作を生じ、既存薬に抵抗性であることから、海馬硬化を伴う内側側頭葉モデルとして確立されている (Riban et al, *Neuroscience*, 2002)。この海馬硬化症モデルを用いて、抗てんかん作用を *in vivo* で評価した。さらに、本モデルから海馬を取り出し、ウェスタンブロット等の生化学的実験に供与した。

アルツハイマー病モデルを用いた認知機能評価： アミロイド 蛋白質をマウスに投与するため、麻酔下で側脳室カニューレを両側性に設置した。手術から回復後、新規物体認識試験を用いて認知機能を評価した。新規物体認識試験では、初日にある物体を呈示して記憶させた後 (既知物体) 翌日にその既知物体と新規物体を呈示した際の物体探索時間から記憶能力を評価した。アミロイド 蛋白質は初日に脳室投与して記憶障害を誘導し、ヒドロキシ酪酸等は初日に腹腔投与して記憶障害予防作用を評価した。

4. 研究成果

(1) ケトン食由来代謝産物である「ヒドロキシ酪酸」に着目したてんかん創薬研究

研究代表者はこれまで、ケトン食由来代謝産物であるアセト酢酸が、電位依存性カルシウムチャネルを阻害し、抗てんかん作用を示すことを報告してきた (Kadowaki et al, *Epilepsia*, 2017)。しかし、他のケトン食由来代謝産物でも電位依存性カルシウムチャネルが阻害されるかは分かっていない。また、電位依存性カルシウムチャネルは 1 サブユニットで特徴づけられることが知られており、P/Q 型、N 型、L 型、R 型、T 型に分類されるが、どのサブユニットに作用しているかも不明であった。

そこで本項目では、主要なケトン食由来代謝産物であるヒドロキシ酪酸の作用を評価したところ、アセト酢酸と同様に電位依存性カルシウムチャネルを阻害することが明らかとなった。そこで次に、P/Q 型阻害剤である ω -Agatoxin IVA、N 型阻害剤である ω -Conotoxin GVIA、L 型阻害剤であるジヒドロピリジン系、R 型阻害剤である SNX-482 を用いることで、ヒドロキシ酪酸による電位依存性カルシウムチャネル阻害を担う 1 サブユニットを決定した。最後に、その 1 サブユニットを海馬硬化症モデルにおいて阻害すると、*in vivo* でも抗てんかん作用が生じたことから、創薬標的分子としての有用性が示唆された。

(2) 代謝酵素である「乳酸脱水素酵素」を狙うてんかん創薬研究

研究代表者はこれまで、ケトン食による抗てんかん作用を担う代謝酵素として「乳酸脱水素酵素」を同定し、本分子を創薬標的分子とする治療薬開発方法を報告してきた (Sada et al, *Science*, 2015)。しかし、乳酸脱水素酵素を阻害すると抗てんかん作用が生じることは明らかにしたが、てんかん発症時に乳酸脱水素酵素がどのように変化するかは明らかになっておらず、治療薬開発を進める上での問題点となっていた。

そこで本項目では、慢性的にてんかん発作を呈する海馬硬化症モデルを用い、海馬における乳酸脱水素酵素のサブユニット発現量変化に関して生化学的に評価した。乳酸脱水素酵素は、LDHA と LDHB の 2 つのサブユニットからなる酵素である。ウェスタンブロット解析により、海馬硬化症モデルでは LDHA の発現量が上昇するのに対し、LDHB の発現量は変化しないことが分かった。海馬内の乳酸量も上昇していた。さらに、海馬内の LDHA を阻害すると、海馬硬化症モデルで生じるてんかん発作が抑えられた (Sada et al, *Epilepsia*, 2020)。これらの結果は、「てんかん発症により LDHA 発現量が上昇し、LDHA 阻害によりてんかん発作が抑えられる」ことを示しており、創薬標的分子としての有用性が強化された。

(3) ヒドロキシ酪酸によるアルツハイマー病様症状の予防作用に関する研究

ケトン食療法はこれまで、難治性てんかんの治療法として注目されてきたが (Neal et al, *Lancet Neurol*, 2008)、一方でアルツハイマー病 (Reger et al, *Neurobiol Aging*, 2004) や自閉スペクトラム症 (Lee et al, *Physiol Behav*, 2018) にも有効であるという臨床報告がある。そこで本項目では、主要なケトン食由来代謝産物である ヒドロキシ酪酸に着目し、アルツハイマー病症状である認知機能障害に対する作用を研究した。その結果、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド 蛋白質の脳室内投与により、マウスは記憶障害を呈するが、 ヒドロキシ酪酸の投与により記憶障害が防がれることを見出した。血中濃度の測定により、記憶障害予防作用に必要な ヒドロキシ酪酸濃度も明らかにした。さらに、 ヒドロキシ酪酸による記憶障害予防作用を担うメカニズム解析にも取り組んだ。

<引用文献>

- (1) Kadowaki A et al. (2017) Neuronal inhibition and seizure suppression by acetoacetate and its analog, 2-phenylbutyrate. *Epilepsia* 58, 845-857.
- (2) Kwan P, Brodie MJ. (2000) Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342, 314-319.
- (3) Lee RW et al. (2018) A modified ketogenic gluten-free diet with MCT improves behavior in children with autism spectrum disorder. *Physiol Behav* 188, 205-211.
- (4) Lutas A, Yellen G. (2013) The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends Neurosci* 36, 32-40.
- (5) Neal EG et al. (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 7, 500-506.
- (6) Rho JM. (2017) How does the ketogenic diet induce anti-seizure effects? *Neurosci Lett* 637, 4-10.
- (7) Reger M et al. (2004) Effects of β -hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. *Neurobiol Aging* 25, 311-314.
- (8) Riban V et al. (2002) Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 112, 101-111.
- (9) Sada N et al. (2015) Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* 347, 1362-1367.
- (10) Sada N, Inoue T. (2018) Electrical control in neurons by the ketogenic diet. *Front Cell Neurosci* 12, 208.
- (11) Sada N et al. (2020) Upregulation of lactate dehydrogenase A in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 61, e37-e42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sada Nagisa, Suto Shogo, Suzuki Mana, Usui Shoichiro, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Upregulation of lactate dehydrogenase A in a chronic model of temporal lobe epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 e37-e42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/epi.16488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sada N, Inoue T	4. 巻 12
2. 論文標題 Electrical control in neurons by the ketogenic diet.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci	6. 最初と最後の頁 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2018.00208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇野 綾華, 中村 拓哉, 井上 剛
2. 発表標題 アミロイド オリゴマーは自発行動下での長期記憶を障害する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 剛
2. 発表標題 ケトン食の作用機序解明から治療薬創製に向かって
3. 学会等名 第52回日本てんかん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------