

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07126

研究課題名(和文) てんかん発作における異物取り込み膜輸送体の薬物治療学的意義の解明研究

研究課題名(英文) Elucidation of pharmacotherapeutic roles of xenobiotic uptake membrane transporters in epileptic seizures

研究代表者

中道 範隆 (Nakamichi, Noritaka)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10401895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作における膜輸送体OCTN1の薬物治療学的意義を解明する目的で、マウスにおいてOCTN1の遺伝子欠損やOCTN1のin vivo基質ergothioneine (ERGO)の投与がpentylenetetrazole (PTZ)誘発けいれん発作にどのような影響を及ぼすのか検討した。その結果、OCTN1の遺伝子欠損およびERGOの経口投与はいずれもPTZ誘発けいれん発作を抑制した。また、OCTN1のin vivo基質としてhomostachydrineを同定し、OCTN1はhomostachydrineの輸送を介してPTZ誘発けいれん発作を増悪させる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OCTN1の遺伝子欠損によりマウスに目立ったフェノタイプが現れないことから、OCTN1に特異性の高い阻害剤を開発することにより、副作用の少ないてんかん治療薬の開発につながることを期待される。また、食品由来成分のERGOは副作用の少ない安全な化合物であり、生体内濃度がOCTN1によって制御されることから体内動態が予測しやすく、脳移行性も高い。ERGOをシード化合物とした脳移行性の高い安全かつ体内動態を制御しやすい精神・神経疾患治療薬開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pharmacotherapeutic role of the carnitine/organic cation transporter OCTN1 in epileptic seizures, we examined the effects of the deficiency of octn1 gene and the administration of the in vivo substrate of OCTN1, ergothioneine (ERGO), on pentylenetetrazole (PTZ)-induced convulsive seizures in mice. The deficiency of octn1 gene and the oral administration of ERGO suppressed PTZ-induced seizures. A plant alkaloid homostachydrine was identified as an in vivo substrate of OCTN1. The possibility that the xenobiotic uptake transporter OCTN1 may deteriorate PTZ-induced seizures through the transport of homostachydrine was shown.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳・神経 脳神経疾患 神経科学 薬理学 輸送担体

1. 研究開始当初の背景

てんかんは全人口の1%が生産で罹患する最も一般的な脳神経疾患の一つであり、神経細胞の異常な興奮によって引き起こされる繰り返すけいれん発作を特徴とする。けいれん発作は主に glutamic acid (Glu)によって制御される興奮性シグナルと γ -aminobutyric acid (GABA)によって制御される抑制性シグナルのバランスが崩れることによって起こる。多くの患者では抗てんかん薬の使用により症状を抑制できているが、約20~30%の患者は現在の抗てんかん薬に対して抵抗性を示す。また、これらの抗てんかん薬では記憶障害や学習障害などの副作用も報告されている。そのため、従来とは異なる作用機序を持つ新規てんかん治療薬が必要とされている。

一方、我々はカルニチン/有機カチオン膜輸送体 OCTN1 の遺伝子欠損(*octn1*^{-/-})マウスを作製し、抗酸化物質 ergothioneine (ERGO)が良好な *in vivo* 基質であることを見出し、OCTN1 が小腸、肝臓、腎臓および脳において機能的に発現していることを明らかとした。しかしながら、OCTN1 が各臓器においてどのような生理的役割を有しているのかについては、ほとんど解明されていない。そこで脳における OCTN1 の生理的役割の解明に着手し、OCTN1 が神経細胞の成熟や神経幹細胞の増殖・分化、ミクログリアの活性化を制御していることを示した。さらに、神経幹細胞において OCTN1 が主要な有機カチオン膜輸送体として働く可能性を見出した。また、OCTN1 の *in vivo* 基質 ERGO は、経口摂取後に脳へと移行し、mTOR および神経栄養因子シグナルの活性化による神経新生促進を介して、抗うつ作用を発揮することを示した。以上より、脳神経系細胞において OCTN1 が特異的な役割を担っている可能性がある。しかしながら、OCTN1 の病態生理学的意義や薬物治療学的意義についてはほとんど明らかとなっていない。

臨床使用されている精神・神経疾患治療薬の多くは、情報伝達物質の受容体や再取り込み(生理的)膜輸送体に作用して神経情報伝達を調整する。これら臨床使用薬の標的となる膜タンパク質は、特定の神経伝達物質に対し高い選択性と親和性を示し、シナプスに高発現する。一方、特定の化合物に高い親和性を示さず幅広い基質認識性を有する異物取り込み膜輸送体が、神経細胞や神経幹細胞に機能的に発現することが近年報告されている。異物取り込み膜輸送体は、薬物の消化管吸収や肝代謝、腎排泄において重要な役割を果たす。したがって、高度な脳機能の維持に働く神経細胞や神経幹細胞に生体異物を取り込む膜輸送体が存在すること自体が謎である。異物取り込み膜輸送体の神経系細胞における病態生理学的意義や薬物治療学的意義の解明により、精神・神経疾患の治療に新たな知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

抗酸化物質の投与は pentylenetetrazole (PTZ)のような化学物質によって誘発されるけいれん発作を抑制する。また、てんかん患者の死後脳やてんかんモデルマウスの脳では酸化ストレスマーカーの上昇が見られる。以上の知見より、脳内の酸化ストレスはてんかん発作を増悪させると推察される。したがって、抗酸化物質 ERGO を *in vivo* 基質とする OCTN1 の遺伝子欠損により、脳内の ERGO 量が減少し、けいれん発作が悪化するものと予測されたが、予備検討において逆にけいれん発作が抑制された。そこで、膜輸送体 OCTN1 の遺伝子欠損に伴う PTZ 誘発けいれん発作の抑制が、どのようなメカニズムで起こるのか明らかにしようと考えた。OCTN1 の遺伝子欠損により目立ったフェノタイプが現れないことから、OCTN1 の阻害は副作用の少ないてんかん治療となる可能性がある。OCTN1 の遺伝子欠損に伴う PTZ 誘発けいれん発作の抑制メカニズムとして、OCTN1 の遺伝子欠損が Glu や GABA 作動性神経伝達に影響及ぼす可能性がある。Glu や GABA 作動性神経の情報伝達異常が発症に関与する精神・神経疾患は多数あり、異物取り込み膜輸送体 OCTN1 が Glu や GABA の低親和性膜輸送体として疾患の発症に防御的に働く可能性が示されれば、精神・神経疾患の発症メカニズム解明や新規治療薬の開発につながる。

本研究では、OCTN1 の *in vivo* 基質 ERGO の経口摂取によるけいれん発作抑制の可能性についても明らかにする。ERGO は、食用キノコタモギタケに多く含まれる食品由来成分であり、副作用の少ない安全な化合物である。経口摂取された薬物が神経系細胞内で作用するためには、消化管吸収された後、血液脳関門を通過し、神経系細胞内へと取り込まれる必要がある。しかしながら、水溶性の高い化合物は細胞膜透過性が低いいため、経口摂取後にほとんど神経系細胞内まで到達しない。一方、ERGO の血中および臓器中濃度を制御している膜輸送体 OCTN1 は神経系細胞を含む生体内に幅広く発現しているため、ERGO は水溶性化合物にも関わらず経口摂取後に神経系細胞内へと送達される。実際に、マウスに1日約22 mg/kg の ERGO を2週間経口摂取させることにより、抗うつ効果が得られている。これはヒトに外挿すると、体重70 kg のヒトが1日約100 mg の ERGO を経口摂取することになり、容易に日常摂取可能な量で ERGO の脳機能改善効果が期待できる。加えて、生体内濃度が OCTN1 によって制御されるので、体内動態が予測しやすく、併用薬がある場合でも薬物相互作用を予測しやすい。したがって、本研究において水溶性低分子化合物 ERGO によるてんかん治療の可能性を示すことにより、ERGO をシード化合物とした脳移行性の高い安全かつ体内動態を制御しやすい精神・神経疾患治療薬開発への応用が期待され

る。

以上のように、本研究では、異物取り込み膜輸送体 OCTN1 がてんかん発作にどのような影響を及ぼすのかを解明し、OCTN1 の新規てんかん薬物治療標的分子としての可能性を示すことを目的とした。

3 . 研究の方法

(1)PTZ 誘発てんかんモデルマウス

7 - 9 週齢の C57BL/6J 雄の wild-type あるいは *octn1*^{-/-} マウスに PTZ を単回あるいは 48 時間毎に反復腹腔内投与し、投与後 20 分間けいれん発作の観察を行った。けいれんの強さを 5 段階のスコア (Stage 0: 変化なし、Stage 1: 活動低下、無動、Stage 2: 2 回以上の独立したミオクローヌス、Stage 3: 正向反射を保持した全身の間代性けいれん、Stage 4: 正向反射を消失した全身の間代性または強直間代性けいれん、Stage 5: 死亡) により評価した。

(2)入眠時間および睡眠時間の測定

Wild-type あるいは *octn1*^{-/-} マウスに pentobarbital または diazepam を腹腔内投与し、正向反射が消失するまでにかかる時間を入眠時間、正向反射が消失してから回復するまでの時間を睡眠時間として評価した。

(3)ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293; HEK293)

ヒト OCTN1 遺伝子を導入した HEK293 細胞 (HEK293/OCTN1) を 10 % FBS 含有 DMEM 培地に懸濁してディッシュに播き、37 °C、5% CO₂ インキュベーター中で 3 日間培養し、実験に使用した。

(4)定量 PCR 法

マウスの海馬あるいは大脳皮質前部から、核酸抽出試薬 ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA 1 µg を逆転写酵素と反応させることにより、cDNA を調製した。この cDNA を鋳型として、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いた PCR 反応を行った。ハウスキーピング遺伝子(GAPDH あるいは 36B4)に対する相対値として目的遺伝子の発現量変化を評価した。

(5)ELISA 法

マウスの海馬ホモジネートを調製し、遠心分離後に上清を回収した。得られた上清中の脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)濃度を Mature BDNF Rapid ELISA Kit (Biosensis)を用いて測定した。

(6)PTZ, GABA, homostachydrine の測定

マウスから回収した組織の除タンパク後の上清を分析カラムにインジェクトし、PTZ と GABA は LC-MS/MS、homostachydrine は LC-TQMS を用いて測定した。

(7)アンターゲットメタボローム解析

同一ケージで 1 週間飼育した wild-type および *octn1*^{-/-} マウスから海馬、大脳皮質前部、血漿を回収した。除タンパク後の上清について、LC/QTOFMS で網羅的に測定し、アンターゲットメタボローム解析を行い、wild-type と *octn1*^{-/-} マウス間で含有量の異なる化合物を同定した。

4 . 研究成果

我々はこれまでに、OCTN1 が脳において機能的に発現しており、ERGO の細胞内取り込みを介して神経細胞の分化や成熟に関与することを明らかとした。しかしながら、OCTN1 の病態生理学的意義や薬物治療学的意義についてはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究は、膜輸送体 OCTN1 がてんかん発作にどのような影響を及ぼすのかを解明し、OCTN1 の新規てんかん薬物治療標的分子としての可能性を示すことを目的として行った。まず、OCTN1 がてんかん発作にどのような影響を及ぼすのかを明らかとするため、てんかんモデル動物の作製に繁用されている GABA 受容体アンタゴニストの PTZ を wild-type あるいは *octn1*^{-/-} マウスに投与し、PTZ によって引き起こされるけいれんを観察した。40 mg/kg の PTZ 投与後に観察されたけいれんの重症度は、wild-type に比べて *octn1*^{-/-} マウスでスコアが低かった。PTZ 投与後の海馬におけるてんかん関連遺伝子の発現を定量 PCR で検討したところ、wild-type マウスでは c-fos および Arc の発現が顕著に

増加したが、*octn1*^{-/-}マウスでは c-fos および Arc の発現増加が有意に抑制された。てんかんの発症に關する BDNF についても定量 PCR および ELISA で検討したところ、PTZ 投与により wild-type マウスでは遺伝子発現およびタンパク量のいずれも有意に増加したが、*octn1*^{-/-}マウスではその増加が抑制された。また、35 mg/kg の PTZ を 2 日に 1 回、合計 11 回投与すると、wild-type マウスでは投与を重ねるに従いけいれんスコアが増加したが、*octn1*^{-/-}マウスでは 11 回の投与期間を通じてほとんどけいれんが見られなかった。生存率は 11 回の投与後 wild-type マウスでは 50%であったのに対して *octn1*^{-/-}マウスでは 85%となり、wild-type マウスより有意に高い生存率を示した。以上より、膜輸送体 OCTN1 の遺伝子欠損は、脳神経細胞の興奮を抑えることにより PTZ 誘発けいれん発作を抑制し、PTZ の繰り返し投与に伴う致死率を低減することが明らかとなった。

OCTN1 は膜輸送体であるため、OCTN1 の遺伝子欠損に伴う PTZ 誘発けいれん発作の抑制が、wild-type と *octn1*^{-/-}マウス脳内の PTZ 濃度の差によって生じた可能性について検討した。50 mg/kg の PTZ を wild-type と *octn1*^{-/-}マウスに投与し、2, 10, 20, 30 分後の血漿と 30 分後の脳、肝臓、腎臓中 PTZ 濃度を測定したところ、両マウス間で有意な差は見られなかった。同様に、PTZ 連続投与後の組織中濃度についても検討を加えたが、けいれんスコアに差がありマウスの致死が確認される 35 mg/kg PTZ 5 回投与 30 分後の脳、血漿、肝臓、腎臓での PTZ 濃度についても、wild-type と *octn1*^{-/-}マウス間で差は見られなかった。次に、神経細胞近傍での局所的な PTZ 濃度の変化が *octn1*^{-/-}マウスでのけいれん抑制の原因である可能性を検討した。Wild-type と *octn1*^{-/-}マウスに 35 mg/kg PTZ を投与し、マイクロダイアリシスを用いて脳細胞外液中 PTZ 濃度を測定したところ、両マウス間で差は見られなかった。したがって、膜輸送体 OCTN1 の遺伝子欠損に伴う PTZ 誘発けいれん発作の抑制は、脳を含む PTZ の組織中濃度変化に起因するものではないことが示された。

PTZ の組織中濃度の差以外に *octn1*^{-/-}マウスで PTZ 誘発けいれん発作が抑制されるメカニズムを解明するため、PTZ の標的である GABA 受容体の発現量や機能を wild-type と *octn1*^{-/-}間で比較した。GABA 受容体の発現量を調べるため、GABA 受容体サブユニットの mRNA 発現量を定量 PCR で測定したところ、てんかんの発症に關する海馬と大脳皮質前部で GABA 受容体サブユニットの発現量に両マウス間で違いは見られなかった。次に、wild-type と *octn1*^{-/-}に GABA 受容体アゴニストの pentobarbital または diazepam を投与し、入眠時間と睡眠時間を測定したところ、いずれの薬物による入眠時間と睡眠時間も両マウス間で差はなかった。マイクロダイアリシスを用いて GABA の脳細胞外液中濃度を測定したが、定常状態および高カリウム溶液適用後のいずれにおいても両マウスの細胞外 GABA 濃度に差は見られなかった。したがって、膜輸送体 OCTN1 は GABA 受容体の発現量や機能、脳細胞外液中 GABA 濃度に影響を及ぼさず、PTZ 誘発けいれん発作を抑制すると考えられる。

そこで次に、膜輸送体 OCTN1 が PTA 誘発けいれん発作の増悪に關する未同定の化合物を輸送する可能性について検討することにした。Wild-type と *octn1*^{-/-}マウスから回収した海馬、大脳皮質前部、血漿サンプルを LC/QTOFMS で網羅的に測定し、アンターゲットメタローム解析を行い、OCTN1 の *in vivo* 基質候補化合物として植物アルカロイドの homostachydrine を同定した。脳、血漿、肝臓、腎臓、膵臓、心臓、肺、脾臓、小腸、いずれにおいても homostachydrine 濃度は wild-type マウスと比較して *octn1*^{-/-}マウスで低かった。OCTN1 が homostachydrine を直接輸送することを確認するために、HEK293/OCTN1 を用いて取り込み実験を行ったところ、時間依存的な homostachydrine の細胞内への取り込みが確認された。また、この homostachydrine の取り込みは ERGO 存在下では抑制された。植物アルカロイドの homostachydrine が膜輸送体 OCTN1 の *in vivo* 基質となることを見出された。

膜輸送体 OCTN1 の *in vivo* 基質である homostachydrine および ERGO が PTZ 誘発けいれん発作に及ぼす影響について検討を加えた。Homostachydrine を wild-type マウスに投与すると、海馬や大脳皮質前部の homostachydrine 濃度は上昇し、PTZ 誘発けいれん発作が増悪した。一方、ERGO を wild-type マウスに投与すると、海馬や大脳皮質前部の homostachydrine 濃度は低下し、PTZ 誘発けいれん発作は抑制された。したがって、膜輸送体 OCTN1 は homostachydrine の輸送を介して PTZ 誘発けいれん発作を増悪させる可能性がある。

以上より、膜輸送体 OCTN1 の阻害や ERGO の投与は、けいれん発作を増悪させる homostachydrine の組織中濃度減少を介してけいれん発作を抑制する可能性が示された。OCTN1 の遺伝子欠損によりマウスに目立ったフェノタイプが現れないことから、OCTN1 に特異性の高い阻害剤を開発することにより、副作用の少ないてんかん治療薬の開発につながることを期待される。また、食品由来成分の ERGO は副作用の少ない安全な化合物であり、生体内濃度が OCTN1 によって制御されることから体内動態が予測しやすく、脳移行性も高い。ERGO をリード化合物とした脳移行性の高い安全かつ体内動態を制御しやすい精神・神経疾患治療薬開発への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nishiyama Misa, Nakamichi Noritaka, Yoshimura Tomoyuki, Masuo Yusuke, Komori Tomoe, Ishimoto Takahiro, Matsuo Jun-ichi, Kato Yukio | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Homostachydrine is a Xenobiotic Substrate of OCTN1/SLC22A4 and Potentially Sensitizes Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurochemical Research | 6. 最初と最後の頁 2664 ~ 2678 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-020-03118-8 | 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 Nakamichi Noritaka, Nakao Shunsuke, Nishiyama Misa, Takeda Yuka, Ishimoto Takahiro, Masuo Yusuke, Matsumoto Satoshi, Suzuki Makoto, Kato Yukio | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Oral Administration of the Food-Derived Hydrophilic Antioxidant Ergothioneine Enhances Object Recognition Memory in Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 220 ~ 233 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200212102710 | 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 Nakamichi Noritaka, Nakao Shunsuke, Masuo Yusuke, Koike Ayaka, Matsumura Naoto, Nishiyama Misa, Al-Shammari Aya Hasan, Sekiguchi Hirotaka, Sutoh Keita, Usumi Koji, Kato Yukio | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Hydrolyzed Salmon Milt Extract Enhances Object Recognition and Location Memory Through an Increase in Hippocampal Cytidine Nucleoside Levels in Normal Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medicinal Food | 6. 最初と最後の頁 408 ~ 415 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jmf.2018.4285 | 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 Nakamichi Noritaka, Matsumoto Yuta, Kawanishi Takumi, Ishimoto Takahiro, Masuo Yusuke, Horikawa Masato, Kato Yukio | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Maturational Characterization of Mouse Cortical Neurons Three-Dimensionally Cultured in Functional Polymer FP001-Containing Medium | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1553 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00307 | 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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nishiyama Misa, Nakamichi Noritaka, Yoshimura Tomoyuki, Masuo Yusuke, Matsuo Jun-ichi, Kato Yukio |
| 2. 発表標題 Untargeted metabolomics approach identified a novel OCTN1/SLC22A4 substrate potentiating pentylenetetrazole-induced seizure |
| 3. 学会等名 New Frontier in Neuroscience 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nishiyama Misa, Yoshimura Tomoyuki, Masuo Yusuke, Ishimoto Takahiro, Nakamichi Noritaka, Matsuo Jun-ichi, Kato Yukio |
| 2. 発表標題 Identification of substrates in the brain of OCTN1/SLC22A4 based on untargeted metabolomics |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計1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 |
|---------|---------|
|---------|---------|