

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790896

研究課題名 (和文) てんかんモデル動物におけるグリアイメージングの有用性に関する研究

研究課題名 (英文) The utility of glial molecular imaging in epileptic animal brain.

研究代表者

細井 理恵 (HOSOI RIE)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30291446

研究成果の概要 (和文)：リチウム-ピロカルピン (Li-P) てんかんモデルラットにおいて  $^{14}\text{C}$ -酢酸の取込みの著明な増加を明らかにした。またこの増加は成熟ラット (8 週齢) でのみ認められ、幼弱ラット (3 週齢) ではけいれん発作が生じているにも関わらず  $^{14}\text{C}$ -酢酸の取込みは変化しないことが明らかとなった。またメチルエチルケトン (MEK) やジエチルケトン (DEK) といったケトン体が広範なスペクトルにおいて抗けいれん作用を示すことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Glial energy metabolism in rat brain was markedly enhanced during a prolonged seizure induced by lithium-pilocarpine (Li-P) model. Glial metabolism was measured with  $^{14}\text{C}$ -acetate. The increase of brain uptake was observed in adult (8 weeks old) rat brain.  $^{14}\text{C}$ -acetate uptake in young (3 weeks old) rat brain was not changed during status epilepticus (SE), whereas both local cerebral blood flow and glucose metabolism were increased in young rat brain during SE. The anticonvulsant effects of acetone have been reported in various animal models of epilepsy. We also demonstrated that ketone bodies, methyl ethyl ketone (MEK) and diethyl ketone (DEK), suppressed SE that was induced by Li-P in rat. And MEK and DEK showed broad-spectra anticonvulsant effects in both chemically- and electroshock-induced experimental seizure models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：グリア、酢酸、ケトン、リチウムピロカルピン

## 1. 研究開始当初の背景

多くの精神疾患において、神経細胞のみではなくグリア細胞も重要な役割を果たしていると考えられる。てんかん発作時には、グリア細胞は過剰に細胞外に放出された  $\text{K}^+$ イオンや興奮性神経伝達物質であるグル

タミン酸の除去等で重要な役割を担っていると思われる。また、グリア代謝を抑制することによりてんかん様のけいれんが生じることや、グリアの代謝を選択的に抑制した状況下ではカイニン酸等により誘発されるてんかんが増悪することも報告されている。ま

た、てんかん患者およびてんかんモデル動物においてグリオシスが生じていることが報告されている。近年ではてんかん患者においてグリア細胞の構造的な変化のみではなく、機能的変化も生じることが報告されている。しかしながら、てんかん発作時のグリア代謝そのもの変化については未だ報告はない。

これまでに我々は<sup>14</sup>C-酢酸の取込みがラット脳内におけるグリアの代謝を反映することを明らかにしている。さらに、ラットにおいて一過性の脳虚血-再灌流後に著明な<sup>14</sup>C-酢酸取込みの低下を認め、虚血-再灌流後の脳においてグリア代謝が短時間の内に大きく変化していることを明らかにした。

また、てんかん発作についてはリチウム-ピロカルピン (Li-P) てんかんモデルラットにおいて<sup>14</sup>C-酢酸の取込みが著明に増加し、グリア代謝が亢進することを明らかにした。

さらに、Li-P てんかんモデルラットにアセトンを前処置すると、てんかん発作の発症を約 50%の割合で抑制した。この時、てんかん発作が抑制されたラットでは Li-P により亢進した<sup>14</sup>C-酢酸の取込みは抑制され、一方でてんかん発作が抑制されなかったラットでは<sup>14</sup>C-酢酸の取込みは亢進したままであった。難治性てんかんに対してケトン食療法が選択されることがあるが、その作用機序については不明であった。しかし、アセトンによるてんかん発作の抑制および<sup>14</sup>C-酢酸取込みの抑制は、アセトンがてんかん発作の発症、さらにはグリア細胞の代謝にも深く関与していることを示している。

## 2. 研究の目的

(1) Li-P てんかんモデルラットにおける<sup>14</sup>C-酢酸取込みの変化について検討し、抗てんかん薬の効果判定とバイオマーカーとして<sup>14</sup>C-酢酸が有用であるか否か明らかにする。また、局所脳血流量、糖代謝等の既存の指標との比較を行う。

(2) 作用機序の異なるてんかんモデルにおける<sup>14</sup>C-酢酸取込みの有用性を検討し、てんかん発症のメカニズムとグリア代謝の関係を探る。

(3) 発達過程におけるグリア代謝の変化とてんかん発作発症の閾値の関連を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Li-P てんかんモデルラットを用いててんかん発作時における脳の循環代謝を検討した。標識化合物にはグリア代謝の指標である<sup>14</sup>C-酢酸、糖代謝の指標である<sup>14</sup>C-デオキシグルコース (DG)、神経細胞の代謝の指標と考えられている<sup>14</sup>C-乳酸、および局所脳血流の

指標である<sup>14</sup>C-IMP を用いた。

(2) アセトンおよび炭素鎖を増やしたメチルエチルケトン (MEK)、ジエチルケトン (DEK) の抗けいれん作用について検討した。

(3) 薬物誘発性、電気刺激誘発性のけいれんモデルにおける脳内のエネルギー代謝と行動科学的所見についての関連を検討した。

(4) 発達過程のラットにおけるてんかん発作と標識化合物の取り込みの関連について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) Li-P モデルラットにおいて、ピロカルピン投与 30 分後より status epilepsy (SE) が生じ、数時間に渡り激しい発作が間欠的に続いた。<sup>14</sup>C-酢酸の取込みは SE 初期には全く変化せず、最も激しく SE が生じたピロカルピン投与 2 時間後において 200%まで増加し、24 時間後にはコントロールレベルまで回復することが明らかとなった。さらに、ピロカルピン投与 2 時間後における<sup>14</sup>C-IMP、<sup>14</sup>C-DG、<sup>14</sup>C-乳酸の取込みも増加したが、<sup>14</sup>C-DG のみ橋-延髄領域は変化しない等、トレーサにより領域による差異が認められた。

(2) アセトンのみではなく、MEK や DEK にも Li-P てんかんモデルラットにおける抗けいれん作用を認めた。<sup>14</sup>C-酢酸、<sup>14</sup>C-IMP、<sup>14</sup>C-DG の取込み増加も MEK により抑制された。このようにケトン体によるてんかん抑制作用は脳の循環代謝と関連しており、MEK の作用機序の解明により新たな治療薬の可能性が示された。

また Li-P てんかんモデルラットにおける<sup>14</sup>C-アセトンの体内動態についての検討を行った。<sup>14</sup>C-アセトンは 8 週齢の正常ラットにおいて投与 120 分後において約 0.15% dose/g tissue 取り込まれた。しかしながら Li-P てんかんモデルラットとの有意な取り込みの差は認められなかった。

(3) マウスに薬物誘発性 (ペンチレンテトラゾール、カイニン酸)、および電気刺激誘発性のけいれんを生じさせ MEK、DEK 投与の影響を検討したところ、両化合物は検討を加えたすべての急性期けいれんモデルに対し有意に発作の発現を抑制することが明らかとなった。またペンチレンテトラゾールによるキンドリング発現に対する影響をマウスを用いて検討したところ、MEK もしくは DEK をペンチレンテトラゾール処置前に投与した群ではキンドリングの発現を有意に抑制することが明らかとなった。さらにキンドリング群では<sup>14</sup>C-DG の取り込みが有意に低下 (60%) していたが、MEK を投与した群では<sup>14</sup>C-DG の取り込みはコントロール群と同程度

まで回復していた。てんかん形成期の脳のエネルギー代謝の変化にMEKなどのケトン体が影響を与えていることが明らかとなった。

(4)3週齢のラットを用いてLi-P てんかんモデルを作成した。幼弱ラットにおいてはLi-PによるSEの感受性は8週齢と比較し、非常に高いことが判明した。SE中の幼弱ラットのトレーサの取込みは $^{14}\text{C}$ -IMP、 $^{14}\text{C}$ -DGについては8週齢と同様に増加したが、 $^{14}\text{C}$ -酢酸は変化せず、幼弱ラットと成熟ラットにおいてはてんかん発作時のグリア代謝が異なっていることが明らかとなった。これより小児と成人におけるてんかん発作およびその後の病態の差異にグリアが関連している可能性が示された。

また、幼弱ラットにおける $^{14}\text{C}$ -酢酸取込みの基質濃度依存性を検討したところ、成熟ラットでは基質濃度が増加するにつれ顕著に取込みが亢進したのに対し、幼弱ラットでは亢進の割合が非常に低いことが明らかとなった。

$^{14}\text{C}$ -乳酸の取込みも検討を加えた。 $^{14}\text{C}$ -乳酸はモノカルボン酸の一種で、幼弱期にはより高い割合で脳のエネルギー基質として利用されることが報告されている。成熟ラットではLi-P群は $^{14}\text{C}$ -乳酸の取込みは非常に高値を示したのに対し、幼弱ラットではてんかん発作が生じていても $^{14}\text{C}$ -乳酸の取込みは $^{14}\text{C}$ -酢酸と同様に変化しなかった。

これより幼弱ラットではてんかん時に糖の代謝は増加するが、モノカルボン酸(酢酸・乳酸)の代謝は変化しないことが明らかとなった。正常時においても幼弱ラットの脳ではモノカルボン酸がエネルギー産生に寄与する割合が大きいと推定され、それ以上の亢進ができないことが考えられる。さらに成熟ラット脳においても、グルコースの酸化的代謝(好氣的代謝)については正常時で既に飽和していると推定されており、てんかん時にみられる $^{14}\text{C}$ -DG(糖代謝トレーサ)の増加は嫌氣的代謝過程である解糖のみを反映していると推定された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9件)

1. Hasebe N, Abe K, Sugiyama E, Hosoi R, Inoue O. Anticonvulsant effects of methyl ethyl ketone and diethyl ketone in several types of mouse seizure models. *Eur J Pharmacol.* 2010;642(1-3):66-71. 査読有

2. Momosaki S, Imamoto N, Hosoi R, Sawada

Y, Abe K, Zhang MR, Inoue O. PK11195 might selectively suppress the quinolinic acid-induced enhancement of anaerobic glycolysis in glial cells. *Brain Res.* 2010;1340:18-23. 査読有

3. Hosoi R, Kitano D, Momosaki S, Kuse K, Gee A, Inoue O. Remarkable increase in  $^{14}\text{C}$ -acetate uptake in an epilepsy model rat brain induced by lithium-pilocarpine. *Brain Res.* 2010 ;1311:158-65. 査読有

4. Yamada A, Momosaki S, Hosoi R, Abe K, Yamaguchi M, Inoue O. Glucose utilization in the brain during acute seizure is a useful biomarker for the evaluation of anticonvulsants: effect of methyl ethyl ketone in lithium-pilocarpine status epilepticus rats. *Nucl Med Biol.* 2009;36(8):949-54. 査読有

5. Yamada A, Yamamoto K, Imamoto N, Momosaki S, Hosoi R, Yamaguchi M, Inoue O. Lactate is an alternative energy fuel to glucose in neurons under anesthesia. *Neuroreport.* 2009 ;20(17):1538-42. 査読有

6. Inoue O, Sugiyama E, Hasebe N, Tsuchiya N, Hosoi R, Yamaguchi M, Abe K, Gee A. Methyl ethyl ketone blocks status epilepticus induced by lithium-pilocarpine in rats. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):872-8 査読有

7. Sugiyama E, Matsuki Y, Momosaki S, Hosoi R, Hasebe N, Abe K, Inoue O. Inhibitory effect of methyl ethyl ketone upon the enhancement of cerebral blood flow during status epilepticus induced by lithium-pilocarpine. *Neurosci Lett.* 2009 ;462(3):300-2. 査読有

8. Hirose S, Momosaki S, Sasaki K, Hosoi R, Abe K, Gee A, Inoue O. De-coupling of blood flow and metabolism in the rat brain induced by glutamate. *Ann Nucl Med.* 2009 ;23(3):293-300. 査読有

9. Hosoi R, Matsuyama Y, Hirose S, Koyama Y, Matsuda T, Gee A, Inoue O. Characterization of  $^{14}\text{C}$ -acetate uptake in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 2009;1253:69-73. 査読有

[学会発表] (計 12件)

1. 三船祐輔、野口翔嗣、桃崎壮太郎、細井理

恵、井上修 てんかんモデルラットの脳エネルギー代謝に及ぼす MK-801 の影響 第 130 年会 日本薬学会 2010/3/28 岡山

2. 細井理恵、永井あゆ美、桃崎壮太郎、井上修 SNP によるラット脳への代謝基質の取込みの変化と麻酔の影響について 第 130 年会 日本薬学会 2010/3/28 岡山

3. 桃崎壮太郎、山田明史、澤田義一、細井理恵、井上修 メチルエチルケトンによるケイレン発作抑制作用と糖代謝について 第 49 回 日本核医学会総会 2009/10/1 旭川

4. 細井理恵、桃崎壮太郎、井上修 マウス脳における [18F]FDG 取込み亢進におよぼす麻酔の影響について 第 49 回 日本核医学会総会 2009/10/1 旭川

5. 井坂早予子、細井理恵、安田和幸、小林薫、井上修 電気けいれん療法の基礎検討 ～ラットの脳循環代謝の変容～ 第 129 年会 日本薬学会 2009/3/26 京都

6. 泉優香、三船祐輔、桃崎壮太郎、細井理恵、井上修 発達過程におけるてんかんモデルラットの脳循環代謝および酢酸代謝について 第 129 年会 日本薬学会 2009/3/26 京都

7. 桃崎壮太郎、広瀬慎一郎、佐々木和成、細井理恵、井上修 グルタミン酸注入による神経障害時の脳循環・代謝に関する検討 第 129 年会 日本薬学会 2009/3/26 京都

8. 杉山恵理子、松木祐依奈、桃崎壮太郎、細井理恵、長谷部伸嘉、阿部浩司、井上修 リチウムピロカルピンてんかんモデルにおけるメチルエチルケトンのケイレン抑制作用と血流画像 第 8 回 放射性医薬品・画像診断薬研究会 2008/12/6 京都

9. 小林薫、安田和幸、井坂早予子、細井理恵、井上修、本橋伸高 電気けいれん・反復性経頭蓋磁気刺激療法による脳機能画像変化に関する研究 第 41 回精神神経系薬物治療研究報告会 2008/12/5 大阪

10. 細井理恵、桃崎壮太郎、合瀬恭幸、福田肇、樋掛正明、林拓也、渡部浩司、三宅義徳、飯田秀博、井上修 イボテン酸注入早期のラット脳における糖代謝の亢進と酸素代謝について 第 48 回 日本核医学会総会 2008/10/24 千葉

11. 桃崎壮太郎、佐藤千文、植松美喜、細井理恵、井上修 病態モデルラット脳における

[14C]Benzyl acetate の取込みに関する検討 第 48 回 日本核医学会総会 2008/10/24 千葉

12. 杉山恵理子、細井理恵、桃崎壮太郎、井上修  
メチルエチルケトンによるケイレン発作抑制作用と [14C]酢酸の取り込み 第 48 回 日本核医学会総会 2008/10/24 千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細井 理恵 (HOSOI RIE)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30291446