

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07745

研究課題名(和文) ケトン食療法におけるケトン体の脳内移行調節機構の解明

研究課題名(英文) The regulation of blood-brain barrier permeability of ketone bodies in ketogenic diet.

研究代表者

川村 将仁 (Kawamura, Masahito)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10408388

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)：ケトン食療法は血中のケトン体を増加させ擬似絶食状態を引き起こす、小児てんかんの治療法である。しかし、ケトン食療法は絶食と比して効果発現までに時間がかかる短所がある。本研究ではその理由を解明することを目的とし実験を行った。ケトン食療法では絶食に比して抗けいれん作用発現、脳脊髄液中ケトン体濃度の上昇までの時間が長かった。一方、血中ケトン体濃度はケトン食療法時の方が絶食時より有意に低かった。また、血液脳関門培養細胞モデルにおいて、ケトン体の中枢移行性は低かった。ケトン食療法では、絶食と比して血中のケトン体濃度の上昇が悪く、その中枢移行性が低い結果、抗けいれん作用発現までに時間がかかると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケトン食療法は薬剤耐性てんかんに対しても有用であることが示されている。また近年は、自閉症スペクトラム障害や統合失調症などの難治性中枢神経系疾患への治療効果も示唆されており、小児てんかん以外への適応拡大も期待されている。ケトン食療法におけるケトン体の中枢移行性を含めた体内動態を解明することは、難治性中枢神経系疾患に対するケトン食療法の適応拡大への一助になるだけでなく、脳内のエネルギー供給経路を理解するために重要な基盤研究となる。

研究成果の概要(英文)：A ketogenic diet increases ketone bodies in the blood and has been used successfully to treat pediatric epilepsy by mimicking fasting. However, ketogenic diet has the disadvantage that it takes longer to cause antiepileptic effects than fasting. To elucidate the reason for this discrepancy, we examined biokinetics of ketone bodies underlies ketogenic diet and fasting. The ketogenic diet took longer than fasting for the onset of anticonvulsant effects and the increase in cerebrospinal fluid concentrations of ketone body. On the other hand, blood concentrations of ketone body were significantly lower during ketogenic diet than during fasting. The permeability of ketone body was low in the cultured cell model of the blood-brain barrier. The lower increase in blood ketone concentrations during ketogenic diet than during fasting and the low blood-brain barrier permeability of ketone bodies might delay the time to onset of anticonvulsant effects.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：ketogenic diet 小児てんかん 抗けいれん作用

1. 研究開始当初の背景

ケトン食療は、低炭水化物・高脂肪食により血中のケトン体を増加させ、擬似絶食状態を引き起こす、小児てんかんの治療法である。近年、ケトン食療が抗けいれん薬難治性の小児てんかんにも効果があることが報告され、その有効性が再認識されている。さらには、ケトン食療が統合失調症、脳腫瘍、てんかんに合併することが知られる自閉症スペクトラム障害などの難治性の中枢神経系疾患にも有用であることが実験動物を用いた研究により多数報告されており、現在ではケトン食療は単なるてんかん治療法というだけでなく、精神神経疾患合併症をも治療しうる総合的な治療法として、将来的な適応拡大が期待されている。しかし、ケトン食療は食事療法であるが故に薬物療法にはない短所がある。一つは、ケトン食療の治療効果発現までに時間がかかることが挙げられる。ケトン食療が抗けいれん作用を発現するまでには、動物実験において1週間、てんかん患者さんでは場合により1ヶ月間以上待たなければならないことが知られている。そして、もう一つの短所として、低炭水化物・高脂肪食を行う食事制限は厳しく、途中で離脱する患者が多いことが挙げられる。離脱した患者さんの中にはケトン食療の効果判定前に離脱した場合も含まれる。仮に、速やかに患者さんが抗けいれん作用を実感できていれば、離脱することなく食事療法を続けられた可能性もある。逆に、ケトン食療施行のうち、約3割の患者では効果が認められないとされている。それらの患者は効果が期待できない食事制限を効果判定のために最低1ヶ月は続けなければならない。ケトン食療を適切に、また患者の苦痛をできるだけ少なく施行するために、その治療効果が確立するまでの時間を短縮することは、私たちが考えるべき優先事項の一つである。

2. 研究の目的

本研究では、ケトン食療の効果発現までの時間が長い理由を解明することを目的とする。元々ケトン食療は、紀元前より抗けいれん作用を有することが知られていた絶食療法を模倣して、体内ケトン体を増加させる食事療法として開発された。開発された最大の目的は絶食では当然限界がある数年に渡る長期的施行を可能とすることである。一方で、時には一晩で効果があり、非常に効果発現までの時間が早い絶食療法と異なり、その効果発現までの時間が長くなった側面がある。つまり、ケトン食療は、長期継続性を獲得した反面、速攻性を失ったとも考えられる。即効性を持つ絶食療法と比較することで、ケトン食療がなぜ効果発現までに時間がかかる理由を解明できる可能性がある。そのため、絶食およびケトン食療をラットに施行し、抗けいれん作用、血中・脳脊髄液中ケトン体濃度およびグルコース濃度の経時的变化を観察することで、両者の違いを比較・検討する。また、血液 脳-関門培養細胞モデルを用いてケトン体の中枢移行性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 絶食およびケトン食療施行時の抗けいれん作用、ケトン体・グルコース体内動態の比較研究

ラット絶食およびケトン食療施行およびケトン体・グルコース測定実験

5 - 8 週齢のラットに絶食を12、15、18、21、24 時間施行後、またはケトン食療法(ケトン比6:1)を1、2、3、7日間施行後、以下の実験を行った。コントロールとして、コントロール食を食餌中の5 - 8週齢のラットを用いた。各群は isoflurane 麻酔下にて、尾静脈から静脈採取、大曹から脳脊髄液採取を行い、速やかに各測定用電極を用いた血糖測定器にてケトン体濃度およびグルコース濃度を測定した。

急性海馬スライス標本の作製

ケトン体およびグルコース濃度測定後のラットは isoflurane 麻酔下に断頭し大脳を摘出、氷冷下にて厚さ400 μm の海馬を含む冠状断脳

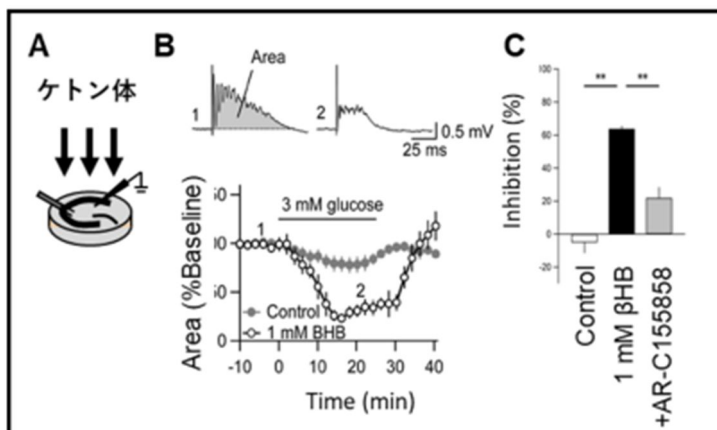


図1. 海馬スライス標本へのケトン体灌流実験

(A) 海馬スライス標本にケトン体(βHB 1 mM)を灌流後、細胞外記録を行った。(B) 4時間以上のケトン体灌流によりケトン食療法と同様のbicuculline依存性burstingに対する抗けいれん作用が観察された。(C) ケトン体灌流により有意にbicuculline依存性burstingが抑制された。また、ケトン体灌流による抗けいれん作用はAR-C155858(1 μM)の同時灌流により有意に抑制された。**, P<0.01; One-way ANOVA; n=5-8.

切片を作成し、30 min、37 incubation 後、記録まで室温で保存した。記録時はスライスを記録チャンパー中に移し、ナイロンメッシュで固定し、重炭酸緩衝人工脳脊髄液 (NaCl 126 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1.5 mM, CaCl₂ 2.4 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO₃ 26 mM; osmolarity 320 mOsm, pH 7.4 when saturated with 95% O₂ + 5% CO₂) を 2 ml/min、32-34 にて還流した。

CA3 錐体細胞層からの細胞外記録による抗けいれん作用の観察

3 M NaCl にて満たしたガラス電極を記録電極として CA3 錐体細胞層に刺入、さらにタングステン双極電極を刺激電極として歯状回門に刺入して CA3 錐体細胞層から population spike を記録した。記録安定後、細胞外液に bicuculline (10 μM) を還流することにより、実験的けいれん様反応として電気刺激誘発 bicuculline-induced bursting の記録を行い、それに対する細胞外グルコース濃度低下の作用をコントロール、絶食施行、ケトン食療法施行ラットについて観察し、抗けいれん作用の有無を比較した。細胞外グルコース濃度低下は還流液を 3 mM グルコース濃度人工脳脊髄液 (NaCl 126 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1.5 mM, CaCl₂ 2.4 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 3 mM, sucrose 8 mM, NaHCO₃ 26 mM) に置換して行った。

急性海馬スライス標本へのケトン体灌流実験

コントロール食から作製した海馬スライス標本へ 1 mM の β-ヒドロキシ酪酸を 4 時間以上灌流し (図 1A) 上記と同様の方法にて抗けいれん作用の有無を観察した。観察された抗けいれん作用が絶食・ケトン食療法と同様のアデノシン受容体を介しているかを確認するために、adenosine A₁ receptor の選択的アンタゴニストである DPCPX (1 μM) 投与による抗けいれん作用の変化を観察した。

(2) 血液 脳-関門培養細胞モデルを用いたケトン体の中枢移行性研究

培養細胞を用いた血液-脳-関門の *in vitro* 実験モデルであり、一般販売されている、ラット型 BBB キット (RBT-24H, ファーマコセル株式会社) を用いて (図 3A) ケトン体の中枢移行を *in vitro* で観察した。血中側の培養液中にケトン体として 2、4、8 mM の β-ヒドロキシ酪酸を投与、培養器内にて振とうし、30 分、3 時間、6 時間、24 時間後の脳側培養液を採取。ケトン体濃度を測定し、透過係数を計算し、ケトン体の中枢移行性を比較した。ケトン体濃度は β-ヒドロキシ酪酸 (ケトン体) アッセイキット (蛍光法) を用いて行った。また、ケトン体を移行する輸送体 MCT1 および MCT2 の抑制薬 AR-C155858 (1 μM) の投与実験、および siRNA による MCT1 のノックダウン実験を行った。

4. 研究成果

(1) 絶食およびケトン食療法時のケトン体体内動態

絶食およびケトン食療法施行によるケトン体体内動態および抗けいれん作用を経時的に比較する目的で、抗けいれん作用、血中・脳脊髄液中ケトン体濃度およびグルコース濃度の変化を比較した。絶食施行時において、抗けいれん作用は 18 時間以降に有意となった。血中ケトン体濃度は 15 時間以降コントロール食群と比較して有意に上昇していたが、脳脊髄液中ケトン体濃度は抗けいれん作用と同様に 18 時間以降で有意に上昇した。血中・脳脊髄液中グルコースは共に 12 時間以降で既にコントロール食に比較して有意に低下していた。ケトン食療法時においては、抗けいれん作用は 1-3 日間では発現せず 7 日間の施行にて有意となった。18 時間の施行で有意

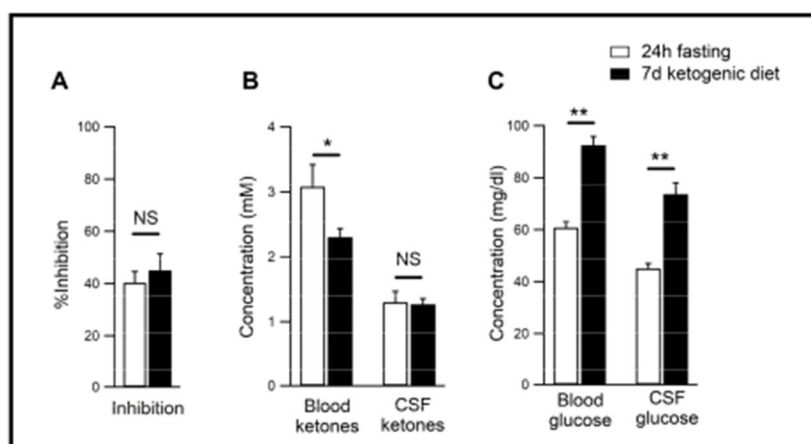


図2. 絶食時およびケトン食療法時の抗けいれん作用、ケトン体の体内動態

24時間絶食施行時 (白) および7日間ケトン食療法施行時 (黒) における抗けいれん作用 (A, Inhibition)、血中ケトン体濃度 (B, Blood ketones)、脳脊髄液中ケトン体濃度 (B, CSF ketones)、血糖値 (C, Blood glucose)、脳脊髄液中グルコース濃度 (C, CSF glucose) の比較。NS, 有意差なし; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; Unpaired *t* test; n=6-9.

となった絶食と比して明らかに抗けいれん作用発現までの時間が長かった。血中ケトン体濃度はケトン食療法 1 日間で既にコントロール食と比して有意に増加していたが、脳脊髄液中ケトン体濃度は 1-3 日間では上昇せず、7 日間において有意な増加が観察された。血中・脳脊髄液中グルコースも 1-3 日間では有意な変化がなく、7 日間において有意な低下が観察された。以上の結果より絶食およびケトン食療法共に、抗けいれん作用が発現するためには脳脊髄液中ケトン体濃度が増加する必要があると示唆された。

(2) 急性海馬スライス標本へのケトン体直接投与による抗けいれん作用の発現
 そのため、脳中のケトン体増加が抗けいれん作用を引き起こすか否かを検討する目的で、コントロール食から作製した海馬スライス標本へ1 mMのβ-ヒドロキシ酪酸を灌流し(図1A)、抗けいれん作用発現の有無を検討した。30分間および2-4時間の1 mMのβ-ヒドロキシ酪酸の海馬スライス標本の灌流においては有意な抗けいれん作用は観察されなかったが、4時間以上の灌流では有意に抗けいれん作用が認められた(図1B、C)。また、ケトン体を移行する輸送体MCT1およびMCT2の抑制薬AR-C155858(1 μM)を同時投与することで、ケトン体灌流による抗けいれん作用が有意に抑制された(図1C)。以上の結果より脳内においてケトン体がMCT1またはMCT2の輸送体を介して取り込まれ抗けいれん作用を引き起こすと考えられた。絶食およびケトン食療法施行時の抗けいれん作用発現においても脳内のケトン体濃度の増加が必要と考えられる。ケトン体体内動態を比較する目的で、絶食24時間施行時および7日間ケトン食療法施行時の抗けいれん作用、血中・脳脊髄液中ケトン体濃度およびグルコース濃度を比較した(図2)。抗けいれん作用は

有意差なく両者において認められた(図2A)。また脳脊髄液中ケトン体濃度も絶食・ケトン食療法で有意差なく同程度に増加していた(図2B)。一方、血中ケトン体濃度は絶食の方がケトン食療法より増加していた(図2B)。また血中・脳脊髄液中グルコース濃度は共に絶食の方がケトン食療法より低下していた(図2C)。ケトン食療法では絶食と同程度の抗けいれん作用および脳脊髄液ケトン体濃度上昇を発現するまでに時間がかかるが、その際に血中ケトン体濃度は絶食と比して増加はあるものの低値であり、また血中・脳脊髄液中グルコース濃度も絶食より低下しなかった。絶食と比較して低血糖が進まないため、血中のケトン体濃度の上昇が緩やかになり、そのために脳脊髄液中のケトン体濃度の上昇に時間がかかる可能性が考えられる。

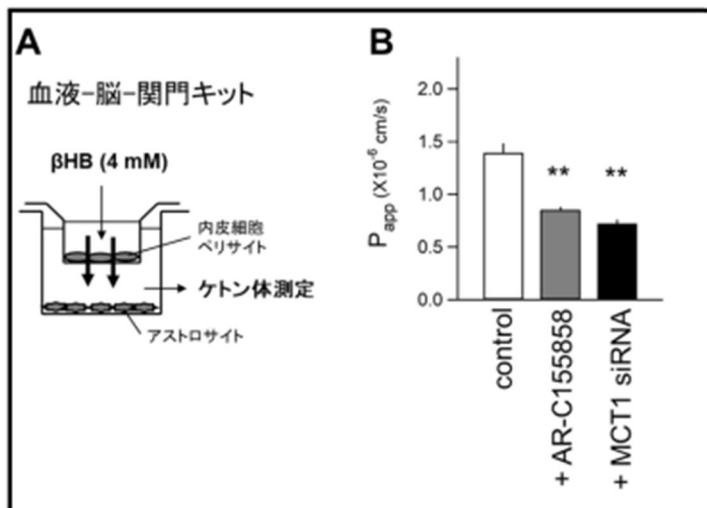


図3 BBBキットを用いたケトン体の透過性実験
 (A) BBBキットの模式図。血液側にケトン体(βHB 4 mM)を入れ、脳側へのケトン体透過性を測定。(B) ケトン体の透過係数(P_{app})は2以下と非常に低く、AR-C155858(1 μM)およびMCT1のノックダウンにより有意に抑制された。**, P<0.01; One-way ANOVA; n=5-10.

(3) 血液 脳-関門培養細胞モデルにおけるケトン体の中枢移行性

そこで、ケトン体の脳内移行性を血液 脳-関門培養細胞モデルを用いて検討した(図3A)。2、4、8 mMのβ-ヒドロキシ酪酸の中枢移行性の透過係数は有意差なく、血中側のケトン体の濃度依存性は認められなかった。また透過係数の30分間から24時間の間に経時的変化も認めなかった。一般的に血液 脳-関門培養細胞モデルにおいて中枢移行性の高低は、透過係数20以上が「very good」、10-20が「good」、2-10が「low」、2以下が「very low」と分類される。4 mMβ-ヒドロキシ酪酸の透過係数は2以下であり(図3B)、ケトン体の中枢移行性はかなり低かった。また、4 mMβ-ヒドロキシ酪酸の透過係数は、AR-C155858(1 μM)の投与、およびsiRNAによるMCT1のノックダウンにより有意に抑制され(図3B)、血液 脳-関門におけるケトン体の輸送はMCT1を介していた。また、絶食時の低血糖の程度がケトン食療法より強かったことから、グルコース濃度低下によるケトン体の中枢移行性の変化を観察したが、3日間のグルコース濃度低下(付属メディウム液濃度17 mMより7 mM)による有意な変化は観察されなかった。

(4) 結論

以上の結果より、(1)ケトン食療法の抗けいれん作用の発現は絶食と比して明確に遅いこと。(2)絶食・ケトン食療法において抗けいれん作用を発現するためには脳内のケトン体の増加が必要なこと。(3)ケトン体の脳内への移行はMCT1を介しているが、その移行性はかなり低いこと。(4)ケトン食療法では絶食と比して、低血糖の程度は緩やかであり、血中のケトン体濃度上昇も弱いことが分かった。ケトン食療法では、低血糖の発現を抑えられている一方、血中のケトン体の上昇が絶食より弱く、血液 脳-関門におけるMCT1を介したケトン体輸送が制限されているため、脳内へのケトン体移行に時間がかかる結果、抗けいれん作用の発現が遅くなると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamura Masahito, Sekino Yuko	4. 巻 19
2. 論文標題 Adenosine A1 receptor antagonist-induced facilitation of postsynaptic AMPA currents in pyramidal neurons of the rat hippocampal CA2 area	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 623 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-022-09897-9	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 Takeuchi Fumika, Nishikata Natsumi, Nishimura Mai, Nagao Kenji, Kawamura Masahito	4. 巻 15
2. 論文標題 Leucine-Enriched Essential Amino Acids Enhance the Antiseizure Effects of the Ketogenic Diet in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 637288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.637288	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 -
1. 著者名 Ruskin David N., Kawamura Masahito, Masino Susan A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Adenosine and Ketogenic Treatments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Caffeine and Adenosine Research	6. 最初と最後の頁 104 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/caff.2020.0011	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 該当する
1. 著者名 Oyama Yu, Ono Kouki, Kawamura Masahito	4. 巻 163
2. 論文標題 Mild hypothermia protects synaptic transmission from experimental ischemia through reduction in the function of nucleoside transporters in the mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107853 ~ 107853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107853	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masahito Kawamura Jr. (分担執筆)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 OXFORD UNIVERSITY PRESS	5. 総ページ数 15
3. 書名 Ketogenic Diet and Adenosine in Epilepsy - Models and Mechanisms. In: Ketogenic Diet and Metabolic Therapies Expanded Roles in Health and Disease (Susan A. Masino, ed).	

〔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
研究 分 担 者	西 晴久 (Nishi Haruhisa) (70256428)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

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
---------	---------