

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32651
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790303
研究課題名（和文） 脳内代謝と中枢神経活動を結ぶ橋渡しとしてのATP・アデノシンの役割
研究課題名（英文） ATP/adenosine as a critical link between altered metabolism and neuronal activity
研究代表者 川村 将仁 (KAWAMURA MASAHIKO) 東京慈恵会医科大学・医学部・助教 研究者番号：10408388

## 研究成果の概要（和文）：

我々は ATP・アデノシンは脳内代謝変化を感受し、それを神経活動修飾に結びつける橋渡しの役割を担っているのではないかと仮説を立てた。その仮説を元にケトン食療法を代表とする抗てんかん食事療法に着目し、食事療法による脳内代謝変化が及ぼす中枢神経作用における ATP およびアデノシンの関与を解明することを目的とした。電気生理学的手法による知見により、ケトン食療法による抗けいれん作用は ATP 放出によるアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の活性化を介していることが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

The “cause-and-effect” relationship between altered metabolism and the neurological conditions are not fully understood yet. We hypothesized that ATP/adenosine might play a specific role in modulating neuronal activity to produce the anticonvulsant effects of the ketogenic diet. We found that ketogenic diet-induced antiseizure effect is caused by ATP release with the subsequent activation of adenosine A<sub>1</sub> receptors.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アデノシン受容体、ケトン食療法、てんかん

## 1. 研究開始当初の背景

ATP および、その加水分解物である ADP・アデノシンをリガントとする各種プリン受容体が発見されてから、それらプリン受容体の活性化を介した神経活動修飾機構の研究が盛んに進められてきた。特に近年、細胞外 ATP・アデノシンが神経細胞とグリア細胞を結ぶ neuro-gliotransmitters として機能することが報告されてから、ATP に関する研究はさらに活発化している。一方、ATP が細胞内においてはエネルギー供給源であることはもはや常識と言えるほどの事実である。

とても素朴な疑問として、「なぜ我々は貴

重なエネルギー源である ATP をわざわざ細胞外に放出してまで神経伝達物質・神経修飾物質として利用するのだろうか？」という問いがある。現在までに報告されているプリン受容体の活性化は、神経因性疼痛・虚血・脳障害など病態生理学的条件下で引き起こされることが多い。そのため、ある細胞が不可逆的变化に陥った時にその緊急的状況を脱出するために貴重なエネルギーである ATP を利用して神経細胞の修飾および防御を行っているのではないかとつまり“肉を切らせて骨を断っているのではないかと”考えることもできる。しかし、アデノシン受容体を介した睡眠覚醒調節、さらには細胞外 ATP・アデ

ノシン濃度が増加する条件としてこれまで報告されている、低酸素・虚血・低グルコース濃度、温度変化・pH変化・けいれん・運動などは必ずしも全てが不可逆的变化を起こすものばかりではない。我々は、これら全ての事象に共通に関わるキーワードは実は不可逆的变化ではなく「脳内代謝変化」ではないかと仮定してみた。外傷・けいれん等の中枢神経疾患では脳内代謝変化および異常が起こることが報告されており、虚血にいたっては代謝異常そのものとも言える。さらに酸素・グルコース・温度・pHこれらは全て代謝に必要な不可欠な因子である。それらを考えるに、我々は脳内代謝変化と神経修飾を結びつける鍵こそが ATP・アデノシンではないかとの仮説を立てた。その根拠としては以下が挙げられる。

(1) 前述のように、細胞外 ATP およびアデノシン濃度を増加する状況の多くは脳内代謝変化を伴う。

(2) 代謝変化の最終産物である ATP には、gap junction hemichannels・Cl channels・vesicles とそれを細胞外に放出するための機構、ならびに細胞外に放出された ATP、および加水分解後のアデノシンを受容し神経修飾を行うための細胞外プリン受容体の発現、と脳内代謝変化を神経修飾に結びつけるために必要な全ての機構が備わっている。

(3) 既に我々は、パッチクランプ法を用いて記録電極内液中の ATP の濃度を操作することにより異なる細胞内 ATP 濃度において記録を行い、海馬 CA3 錐体細胞内の ATP 濃度が高濃度存在する時は、細胞外グルコース濃度低下により pannexin-1 チャネルが開口し ATP が細胞外に放出され、アデノシンに加水分解された後アデノシン<sub>A1</sub>受容体を活性化し CA3 錐体細胞に過分極を引き起こすことを報告している。この基礎的知見は、脳内代謝のまさに主役とも言える細胞内 ATP および細胞外グルコース濃度を操作することがプリン受容体の活性化を介して神経活動を修飾しうることを実験的に示している。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、ケトン食療法をモデルとする食事療法に着目し、それによる脳内代謝変化が及ぼす神経活動修飾が ATP およびアデノシンを介していることを証明し、その機序を解明することを目的とする。その理由として以下が挙げられる。

(1) 脳内代謝の変化および異常は、虚血、脳腫瘍、てんかん等の数多の中枢神経疾患において報告されているが、我々はまだそれら代謝変化と疾患の間にある cause-and-effect の関係すら未解明である。その中で一つの例外としてケトン食療法を代表とする抗てん

かん食事療法が挙げられる。これらの食事療法は、食事により人為的に脳内代謝を変化させることが中枢神経作用を発現するという点において、脳内代謝変化が神経修飾を引き起こすことを我々に示唆している。

(2) 前述のように代謝変化と神経修飾をリンクする因子として ATP およびアデノシンは重要な役割を担っていると考えられる。

(3) ケトン食療法は高脂肪、低炭水化物食により擬似絶食状態を引き起こす抗てんかん食事療法であり、臨床治験および動物実験において抗けいれん作用を有することが報告されているが、その作用機序は未解明である。近年、我々はケトン食療法の抗けいれん作用に対する細胞外 ATP の放出およびアデノシン受容体の関与を示唆してきた。

(4) ケトン食療法は低血糖、血中ケトン体増加、それによる脳内 ATP 濃度増加を引き起こすことが報告されており、研究開始当初の背景の (3) にて述べた実験的な細胞内 ATP 濃度増加および細胞外グルコース濃度低下と近似の環境変化を引き起こす。そのためケトン食療法施行下では、我々が報告した基礎的知見である ATP 放出およびアデノシン受容体活性化を介した海馬 CA3 錐体細胞の過分極と同様の神経修飾機構が働いていることが強く予想される。CA3 錐体細胞に過分極を引き起こすことは、海馬神経細胞の興奮性を抑制し、抗けいれん作用を持つと考えられる。

本研究計画ではケトン食療法施行下のラットおよびマウスにおける抗けいれん作用に対する細胞外プリンの関与を電気生理学的、薬理的、分子生物学的に検討・解明する。

## 3. 研究の方法

### 急性海馬スライス標本の作製

4-8 週齢の離乳後のラットおよびマウスにコントロール食もしくはケトン食療法（ケトン比 8:1）を 2-3 週間施行後、isoflurane 麻酔下に断頭し大脳を摘出、氷冷下にて厚さ 400  $\mu\text{m}$  の海馬を含む冠状断脳切片を作成し、30 min、37°C 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バー中に移し、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, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; osmolarity 320 mOsm, pH 7.4 when saturated with 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) を 2 ml/min、32-34°C にて還流した。

### CA3 錐体細胞層からの細胞外記録

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  $\mu$ M) 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食およびケトン食療法ラットおよびマウスについて比較した。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, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucose 3 mM, sucrose 8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM) に置換して行った。

#### 4. 研究成果

コントロール食施行ラットより作成した海馬急性スライス標本では、細胞外グルコース濃度低下 (11 mM より 3 mM) にても、電気刺激誘発 bicuculline-induced bursting の area に有意な変化はなかったが、ケトン食療法施行ラットより作成した海馬スライス標本では細胞外グルコース濃度低下により bicuculline-induced bursting が有意に抑制された (図 1)。本結果によりケトン食療法施行により、コントロール食時には認められなかった低グルコース濃度感受性の抗けいれん作用が引き起こされることが示された。

このケトン食療法スライス標本における抑制作用はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の拮抗薬にて消失し (図 2)、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体ノックアウトマウスで観察されなかったことからアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の活性化を介していると考えられた。また、bicuculline-induced bursting の抑制作用は pannexin-1 チャネルの blocking peptide および K<sub>ATP</sub> チャネルの blocker にて抑制された。本研究結果により、抗てんかん食事療法であるケトン食療法が脳内代謝変化を経て、(1) 細胞外グルコース濃度低下による pannexin-1 チャネル開口を介した ATP の細胞外放出を引き起こし、(2) アデノシンに加水分解された後アデノシン A<sub>1</sub> 受容体を活性化し、(3) K<sub>ATP</sub> チャネルを開口することにより神経活動を修飾することが示された。

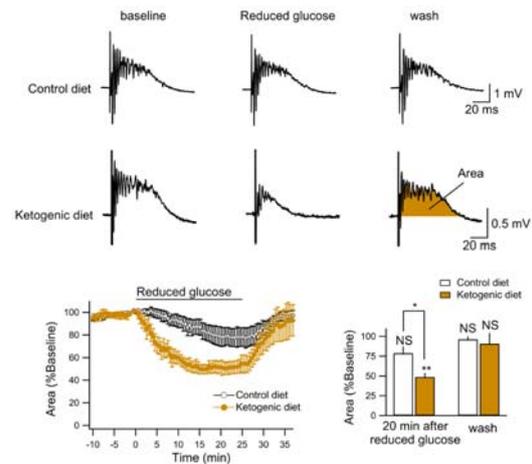


図1. ケトン食療法施行ラットからの海馬スライス標本では細胞外グルコース濃度低下により bicuculline-induced bursting が有意に抑制された。

海馬 CA3 領域における、mossy fiber 電気刺激誘発 bicuculline-induced bursting の area はケトン食療法施行ラットからの海馬スライス標本では細胞外グルコース濃度低下 (Reduced glucose; from 11 mM to 3 mM) により有意に抑制された。Control diet ラットからの海馬スライス標本では細胞外グルコース濃度低下による area の有意な変化はなかった。\* $P$ 0.05; \*\* $P$ 0.01; NS, not significantly different; control diet,  $n$ =12; ケトン食療法,  $n$ =7 (ANOVA).

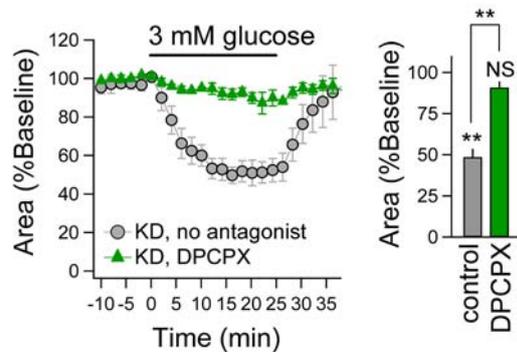


図2. ケトン食療法スライス標本における bicuculline-induced bursting 抑制は DPCPX により阻害された。

アデノシン A<sub>1</sub> 受容体の特異的アンタゴニストである DPCPX (1  $\mu$ M) はケトン食療法施行ラットからの海馬スライス標本における細胞外グルコース濃度低下依存的 bicuculline-induced bursting 抑制を有意に阻害した。\*\* $P$ 0.01; NS, not significantly different; no antagonist,  $n$ =7; DPCPX,  $n$ =5 (ANOVA).

## 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 5 件)

- 1) Masino SA, Kawamura M, Jr., Cote JL, Williams RB, Ruskin DN (2013) Adenosine and autism: a spectrum of opportunities. *Neuropharmacology* 68:116-121. (査読あり)
- 2) Masino SA, Kawamura M, Jr., Ruskin DN, Geiger JD, Boison D (2012) Purines and neuronal excitability: Links to the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 100:229-38. (査読あり)
- 3) Masino SA, Kawamura M, Jr., Plotkin LM, Svedova J, Dimario FJ, Jr., Eigsti IM (2011) The relationship between the neuromodulator adenosine and behavioral symptoms of autism. *Neurosci Lett* 500:1-5. (査読あり)
- 4) Ruskin DN, Ross JL, Kawamura M, Jr., Ruiz TL, Geiger JD, Masino SA (2011) A ketogenic diet delays weight loss and does not impair working memory or motor function in the R6/2 1J mouse model of Huntington's disease. *Physiol Behav* 103:501-507. (査読あり)
- 5) Kawamura M, Jr., Kawamura M (2011) Long-term facilitation of spontaneous calcium oscillations in astrocytes with endogenous adenosine in hippocampal slice cultures. *Cell Calcium* 49:249-258. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Kawamura M. Adenosine-mediated inhibition of excitatory transmission during ischemia at different temperatures in the hippocampus. 第86回日本薬理学会年会、2013年03月22日、福岡
- 2) Kawamura M, Jr. Metabolism and Purinergic Autocrine Regulation. (ワークショップ) Purine 2012: Adenine Nucleosides and Nucleotides in Biomedicine ~Purinergic Signalling in New Strategy of Drugdiscovery~. 2012年05月31日、福岡
- 3) 川村将仁、アデノシン受容体の活性化を介した海馬アストロサイト自発的カルシウム・オシレーション頻度の長期増強、生理研研究会「情報伝達物質としてのプリン」の意義、2011年10月22日、東岡崎
- 4) Kawamura M. Long-term facilitation of

spontaneous astrocytic calcium oscillations with endogenous adenosine in the hippocampus. 第34回日本神経科学大会、2011年9月17日、横浜

[図書] (計 2 件)

- 1) Kawamura M, Jr., Ruskin DN. (2012) Adenosine and autocrine metabolic regulation of neuronal activity. In: Adenosine: a Key Link between Metabolism and CNS Activity (Masino SA, Boison D, eds), pp 71-85. New York: Springer.
- 2) Masino SA, Kawamura M, Jr., Svedova J, Dimario FJ, Jr., Eigsti IM. (2011) Adenosine and Autism - Recent Research and a New Perspective. In: Autism - A Neurodevelopmental Journal from Genes to Behaviour (Eapan V, ed), pp 103-122. Rijeka: InTech.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川村 将仁 (KAWAMURA MASAHIRO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10408388