

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590114

研究課題名(和文) ケトン体の化学構造に基づく難治性てんかん制御剤の開発

研究課題名(英文) Development of antiepileptic compounds for intractable epilepsy based on ketone bodies

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：有効な治療薬が無い難治性てんかんに対して、ケトン食療法が有効であることが知られている。そこで本研究では、ケトン食による代謝変化(ケトン体の上昇、グルコースの減少)に着目し、その作用機序の解明と抗てんかん剤の同定を行った。ケトン体の化学構造を改変する事で、興奮性シナプス伝達を抑え、抗てんかん作用も示す化合物を見出した。さらに、ケトン食による神経抑制・抗てんかん作用の新規メカニズムも見出し、それに基づく抗てんかん剤も見出した。

研究成果の概要(英文)：It is known that ketogenic diet treatment is effective for patients with drug-resistant epilepsy. In this study, we focused on metabolic changes induced by ketogenic diets (increases in ketone bodies and decreases in glucose), examined the antiepileptic mechanisms, and explored the mechanism-based antiepileptic compounds. By changing the chemical structure of a ketone body, we found a compound that suppresses excitatory synaptic transmission and epileptiform discharges in vivo. We also found a new mechanism of neural inhibition and antiepileptic action induced by ketogenic diets, and identified the mechanism-based antiepileptic compound.

研究分野：神経生理学

キーワード：難治性てんかん ケトン食療法 グルタミン酸作動性シナプス ケトン体 乳酸 スライスパッチクラ  
ンブ法 代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳神経細胞の過剰興奮を主徴とする神経疾患であり、有病率は全人口の約1%と高い。てんかんが過剰な電気活動で特徴づけられるため、従来のてんかん治療薬は神経電気活動を制御する蛋白質(イオンチャネル、シナプス受容体等)に作用し、脳の過剰な電気活動を静めるようデザインされてきた。しかしながら、てんかん患者の約3割は、これら既存の治療薬でコントロールできない。この難治性てんかんを抑えることができる、新たな作用機序を持つ抗てんかん薬が切望されている。

この難治性てんかん患者の一部に、ケトン食療法が効果的であることが知られている。ケトン食療法とは、低炭水化物・高脂肪からなる、抗てんかん作用を持つ食事療法であり、1920年代に開発された。その後、様々な抗てんかん薬が開発されたものの、未だに約3割のてんかん患者が治療薬によりコントロールできない。そして、この有効な治療薬がない難治性てんかんに対する有効な治療法として、ケトン食療法は現在でも利用されている。

すなわち、ケトン食療法は、既存の治療薬には無い抗てんかん作用機構を持っていると想定される。このメカニズムを明らかにし、それに基づくてんかん制御剤を見出すことで、難治性てんかんに効く治療薬が誕生すると期待されている。

本研究開始の段階では、上述した研究ニーズを踏まえ、ケトン食療法による抗てんかん作用のメカニズム解明に関して研究が行われていた。ケトン食により、体内ではエネルギー体であるグルコースが減少し、ケトン体(アセト酢酸・ヒドロキシ酪酸)が上昇する。そこで、このケトン体の上昇に着目した抗てんかん作用機序に関する研究が進められていた。ケトン体の作用点として、ATP感受性カリウムチャネルが報告されており、神経抑制や抗てんかん作用を引き起こす(Ma et al, J Neurosci, 2007; Giménez-Cassina et al, Neuron, 2012)。またケトン体は、小胞型グルタミン酸トランスポーターに作用し、シナプス抑制や抗てんかん作用を引き起こすことも報告されていた(Juge et al, Neuron, 2010)。

しかし、本研究の開始段階において、ケトン食療法による作用機序の全貌は明らかになっておらず、治療薬開発に向かう研究はほぼ皆無であった。ケトン体の上昇に関しては、作用機序研究は行われていたものの、それに基づく抗てんかん剤開発研究はほとんど行われていなかった。ケトン食療法によるもう一つの代謝変化であるグルコ

ースの減少に関しては、抗てんかん作用機序も十分に明らかにされていない状況であった。

## 2. 研究の目的

(1) ケトン食により、体内ではケトン体の上昇とグルコースの減少という2つの代謝変化が生じる。ケトン体の作用として、連携研究者の森山を中心とする研究グループにより、アセト酢酸(ケトン体の1つ)が、小胞型グルタミン酸トランスポーターを阻害し、興奮性シナプス伝達を抑制することが報告されている(Juge et al, Neuron, 2010)。しかし、小胞型グルタミン酸トランスポーターに対する蛋白質レベルでの強力な阻害作用に比べ、グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するシナプスレベルの阻害作用は弱い。抗てんかん剤として開発するためには、より強力なシナプス抑制剤が必要である。

そこで本研究では、アセト酢酸の類似体から強力な興奮性シナプス伝達の抑制剤を同定する。さらに同定したシナプス伝達阻害剤をてんかんモデルマウスに投与し、*in vivo*における抗てんかん作用を実証することを目的とする。

(2) ケトン食による抗てんかん作用に関して、ケトン体の上昇にこれまで多くの関心が払われてきた。しかしケトン食は、低炭水化物によるグルコースの減少と、高脂肪によるケトン体の上昇を引き起こし、さらにその下流で様々な代謝変化を引き起こす。しかし、これらの代謝変化がどのように神経電気活動を制御するのかはほとんど分かっていない。当然のことながら、ケトン食による抗てんかん作用を、より包括的に捉える必要がある。

そこで本研究では、脳神経細胞の記録下において、ケトン食で見られるケトン体の上昇とグルコースの減少を同時に誘発し、神経電気活動がどのように変化するのか調べる。さらに、このケトン食様の代謝変化で引き起こされる神経抑制作用、および抗てんかん作用を担う生体内蛋白質も同定する。最後に、この生体内蛋白質に作用する抗てんかん剤も同定することを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 興奮性シナプス伝達に対する、アセト酢酸の類似体の作用に関して、スライスパッチクランプ法を用いて評価した。マウス海馬スライス標本において CA1 ピラミダル細胞から記録し、Schaffer collateral を

刺激した際の興奮性シナプス伝達が、アセト酢酸類似体でどのように抑制されるか評価した。次に、海馬に対してカイニン酸を投与して作製した慢性てんかんマウスモデルに対して、シナプス抑制作用を示したアセト酢酸類似体を投与し、*in vivo*での抗てんかん作用を評価した。

- (2) ケトン食様の代謝変化による神経活動変化に関しても、スライスパッチクランプ法を用いて検討した。てんかん発作に関与する海馬や大脳基底核の神経細胞から膜電位を記録し、グルコースからケトン体へのエネルギー体のスイッチによる電位変化を調べ、その電位変化を担う代謝酵素を同定した。次に、この代謝酵素を阻害すると抗てんかん作用も引き起こされるかどうか、てんかんモデルマウスを用いて検討した。最後に、この代謝酵素に作用する化合物を、酵素活性評価によって同定し、その抗てんかん作用も海馬慢性てんかんモデルを用いて評価した。

#### 4. 研究成果

- (1) アセト酢酸は、 $\alpha$ 位にカルボニル基を持つカルボン酸(ケト酪酸)である。このアセト酢酸は、海馬スライス標本上の興奮性シナプス伝達に対し、弱い阻害作用しか示さなかった。しかし、 $\beta$ 位のカルボニル基を $\alpha$ 位に動かした化合物では、より強いシナプス阻害作用を示した。さらに、トリメチル基を付加すると阻害作用は弱まったが、ベンゼン環を付加すると阻害作用は強まった。

そこで次に、このフェニル化合物を母核とし、 $\alpha$ 位の官能基を各種変化させたところ、シナプス伝達効果も顕著に変化することが分かった。特に、 $\beta$ 位に位置する官能基の特性として、脂溶性とサイズが重要な要因であることを見出した。これらの特性を踏まえ、強力なシナプス伝達抑制作用を有するフェニル化合物を同定した。

最後に、スライスパッチクランプ法によって同定したシナプス抑制剤が、実際に*in vivo*で抗てんかん作用を有するか調べた。カイニン酸誘導性の海馬慢性てんかんモデルに対して、同定したシナプス抑制剤を投与したところ、てんかん発作を顕著に抑えることが明らかとなった。

以上まとめると、アセト酢酸の化学構造を改変する事により、グルタミン作動性シナプス伝達を強力に抑え、てんかん発作も顕著に抑える化合物を同定した。

- (2) 脳スライス標本上の神経細胞から電位記録し、細胞外液(人工脳脊髄液)のエネルギー

ギー体をグルコースからケトン体へスイッチすると、過分極応答が観察された。この過分極は、乳酸の同時投与で回復した。アストロサイト(グリア細胞)から放出される乳酸は、神経細胞に取り込まれた後、乳酸脱水素酵素によりピルビン酸へと変換される(アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル)。そこで、通常的人工脳脊髄液下で、乳酸脱水素酵素を阻害したところ、過分極応答が引き起こされた。この過分極応答は、乳酸脱水素酵素の上流に位置する乳酸投与では回復しなかったが、下流に位置するピルビン酸投与で回復したことから、乳酸脱水素酵素を介する代謝経路が、神経電気活動を制御している事が明らかとなった。

そこで次に、乳酸脱水素酵素の阻害により、抗てんかん作用も引き起こされるか、てんかんマウスを用いて*in vivo*で検討した。その結果、ピロカルピン誘発性の急性てんかんモデルにおいて、乳酸脱水素酵素阻害により抗てんかん作用が引き起こされることが分かった。さらに、カイニン酸誘導性の慢性海馬てんかんモデルでも、乳酸脱水素酵素阻害により抗てんかん作用が引き起こされることが分かった。

最後に、乳酸脱水素酵素を阻害する化合物を探索した。既存のてんかん治療薬に乳酸脱水素酵素の阻害作用があるかどうか、乳酸脱水素酵素の活性評価を用いて調べたところ、Dravet症候群に適用されるスチリペントールが乳酸脱水素酵素の阻害剤であることを発見した。さらに、スチリペントールの化学構造を改変することで、乳酸脱水素酵素阻害作用を持つより強い抗てんかん剤を見出した。

以上まとめると、ケトン食様の代謝変化で引き起こされる神経抑制には、乳酸脱水素酵素を介する代謝経路が関与しており、乳酸脱水素酵素を阻害すると*in vivo*でも抗てんかん作用が観察されること、さらにこの作用機序に基づく抗てんかん剤も同定した (Sada et al, Science, 2015)。

#### 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1件)

1. Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue I (2015) Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. Science 347: 1362-1367. (査読有)  
DOI: 10.1126/science.aaa1299

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 門脇敦志、勝孝、森山芳則、井上剛:「グルタミン酸作動性シナプス伝達を制御するアセト酢酸誘導体の構造的特徴」、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
2. 吉田渚、勝孝、井上剛:「乳酸脱水素酵素によるてんかん制御」、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
3. 門脇敦志、勝孝、森山芳則、井上剛:「アセト酢酸とグルタミン酸作動性シナプス伝達の構造機能相関」、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
4. 吉田渚、勝孝、井上剛:「内因性乳酸による代謝的なてんかん制御」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
5. 若狭綾香、吉田渚、勝孝、井上剛:「乳頭体上核は海馬硬化症モデルの側頭葉てんかんを制御する」、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
6. 吉田渚、勝孝、井上剛:「代謝経路内に存在するてんかん制御分子の同定」、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

1. 名称: 乳酸脱水素酵素阻害剤およびそれを含有する医薬品  
発明者: 井上剛、吉田渚  
権利者: 岡山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-011961  
出願年月日: 平成 25 年 1 月 25 日  
国内外の別: 国内
2. 名称: 乳酸脱水素酵素阻害剤およびそれを含有する医薬品  
発明者: 井上剛、吉田渚、大槻剛巳、李順姫  
権利者: 岡山大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/051254  
出願年月日: 平成 26 年 1 月 22 日

国内外の別: 外国

3. 名称: 乳酸脱水素酵素阻害剤およびそれを含有する抗てんかん剤  
発明者: 井上剛、佐田渚  
権利者: 岡山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-023572  
出願年月日: 平成 27 年 2 月 9 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

1. プレスリリース  
ケトン食の謎を解明 新しいてんかん治療薬の開発が可能に  
[http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release\\_id277.html](http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id277.html)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
井上 剛 (INOUE TSUYOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 40370134
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
森山 芳則 (MORIYAMA YOSHINORI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 10150658