

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07966

研究課題名(和文) 乳酸脱水素酵素を標的とする難治性てんかん制御剤の開発

研究課題名(英文) Drug development for intractable epilepsy by targeting lactate dehydrogenase

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：既存薬が有効でない「難治性てんかん」の制御機構を明らかにし、創薬開発へと繋げるため、本研究では以下3項目を実施した。まず第一に、難治性てんかんに有効な「ケトン食療法」に着目し、抗てんかん作用を示す乳酸脱水素酵素阻害剤を同定した。第二に、アセト酢酸(ケトン食の代謝産物)が電位依存性カルシウムチャネルを阻害することを見出し、抗てんかん作用を有するアセト酢酸類似体も同定した。最後に、難治性てんかんモデルマウスの発作制御に、アセチルコリンが関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We addressed the following three issues in this study, in order to clarify the mechanisms that control "drug-resistant intractable epilepsy" and to develop new antiepileptic drugs based on the mechanisms. First, we focused on "ketogenic diet treatment" that is effective for the drug-resistant epilepsy, and identified a lactate dehydrogenase inhibitor that suppresses seizures in vivo. Second, we found that acetoacetate (a ketogenic diet-derived metabolite) inhibits voltage-dependent calcium channels, and then identified an acetoacetate analog that suppresses seizures in vivo. Finally, we found that acetylcholine is involved in the seizure control in a mouse model of drug-resistant epilepsy

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 乳酸脱水素酵素 スチリペントール ケトン体 電位依存性カルシウムチャネル 興奮性シナプス アセチルコリン

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳神経細胞の過剰な電気興奮によって特徴づけられる神経疾患であり、その有病率は約1%と高い。てんかんの治療では、治療薬が一般に用いられており、これらの治療薬には過剰な電気活動を抑える作用が求められる。実際、てんかん治療薬の作用分子は、神経電気活動の発生を制御する分子であるイオンチャネルやシナプス受容体である。しかしながら、てんかん患者の約3割には、これらの既存薬が奏功しない (Kwan and Brodie, *N Engl J Med*, 2000)。この「難治性てんかん」に効く新薬が必要とされている。

興味深いことに、この難治性てんかんに「ケトン食療法」と呼ばれる食事療法が有効であることが知られている。ケトン食療法では、高脂質・低炭水化物からなる食事(ケトン食)を継続的に摂取することで、抗てんかん作用が得られる (Neal et al, *Lancet Neurol*, 2008)。この食事療法は1920年代に開発された後、抗てんかん薬の誕生により次第に使われなくなったが、薬が効かない「難治性てんかん」にも有効であることが分かり、現在でも使用されている。しかしながら、ケトン食は偏った食事であるため適用が難しく、「ケトン食療法に基づく治療薬」が期待されている。

これらの背景を踏まえ、これまでケトン食の作用機構(てんかん制御機構)に関して、国内外で研究が行われてきた。ケトン食により、血中では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。このケトン体の作用分子に関してこれまで研究が進められ、ATP感受性カリウムチャネルの活性化 (Ma et al, *J Neurosci*, 2007) や小胞型グルタミン酸トランスポーターの阻害 (Juge et al, *Neuron*, 2010) が報告されている。また、ケトン食による抗てんかん作用を担う分子として、アデノシンA₁受容体 (Masino et al, *J Clin Invest*, 2011) が報告されている。これらは、神経電気活動を直接的に制御するイオンチャネル・シナプス受容体・神経伝達物質トランスポーターに属する分子である。

一方で我々は最近、ケトン食による抗てんかん作用を担う分子として、代謝酵素である乳酸脱水素酵素を見出した (Sada et

al, *Science*, 2015)。乳酸脱水素酵素を阻害すると神経抑制が引き起こされ、*in vivo*でも抗てんかん作用が観察された。さらに、既存抗てんかん薬スチリペントールに乳酸脱水素酵素の阻害作用を見出すだけでなく、その化学構造を改変することで、乳酸脱水素酵素阻害作用と抗てんかん作用を併せ持つスチリペントールの部分構造も決定した。

2. 研究の目的

(1) 抗てんかん薬の新規有効成分となる原薬を見出す上で重要となるのは、疾患をコントロールできる生体内分子(創薬標的分子)と、それに作用する化合物(シード化合物)である。創薬標的分子とシード化合物を用いてスクリーニングすることで、新薬候補を同定することが可能となる。

研究背景に示したように、我々はこれまで、創薬標的分子として乳酸脱水素酵素を用い、シード化合物としてスチリペントール部分構造を用いることで、ケトン食療法に基づく治療薬が開発可能であることを提唱した (Sada et al, *Science*, 2015)。そこで本研究では、提唱した創薬方針に沿って、難治性てんかん治療薬の候補化合物を同定することを目的とする。

(2) ケトン食療法に基づく治療薬を創製する上で、創薬標的分子の候補となる「ケトン食の新たな作用点」を見出すことは重要である。ケトン食時に上昇する血中ケトン体の作用点として、これまでATP感受性カリウムチャネルや小胞型グルタミン酸トランスポーターが見出されている。そこで本研究では、ケトン体の新たな作用分子を見出すだけでなく、それを創薬標的として治療薬開発を進めるのに必要なシード化合物を同定することも目的とする。本研究では特に、シナプス伝達の中核分子である電位依存性カルシウムチャネルに着目する。

(3) 薬が効かない「難治性てんかん」に有効な治療薬を創製するという観点からみると、ケトン食に限らず、難治性てんかんを制御する新たな方法を見出すことも重要である。そこで本研究では、薬剤抵抗性を示す「海馬硬化症を伴う側頭葉てんかん」のモデルマウスを用い、本モデルが発するてんかん発作の制御機構を解析することを目的とす

る。本研究では特に、海馬の主要な神経修飾物質であるアセチルコリンに着目する。

3. 研究の方法

- (1) 化合物ライブラリ等からの乳酸脱水素酵素阻害剤の探索は、酵素活性評価法を用いて実施した。さらに、見出した乳酸脱水素酵素阻害剤の *in vivo* 抗てんかん作用評価では、マウス海馬へのカイニン酸微量投与によって作製した「海馬硬化症モデルマウス」を使用した。海馬硬化症を伴う側頭葉てんかんは薬剤抵抗性として知られており、本モデルマウスも薬剤抵抗性であることが報告されている (Riban et al, *Neuroscience*, 2002)。
- (2) ケトン体及びその類似体の神経作用に関しては、マウス海馬からのスライスパッチクランプ法を用いて評価した。海馬 CA1 ピラミダル細胞から記録し、Na⁺ と K⁺ 電流を阻害することで電位依存性 Ca²⁺ 電流を単離した。また CA1 ピラミダル細胞における興奮性シナプス電流 (グルタミン酸作動性シナプス電流) は、抑制性シナプス電流である GABA_A 電流の阻害下で Schaffer collateral を刺激することで誘発した。一方、ケトン体及びその類似体の *in vivo* 抗てんかん作用に関しては、前述の海馬硬化症モデルマウスを用いて評価した。
- (3) 覚醒マウスの海馬におけるアセチルコリン濃度の測定には、我々がこれまで開発してきたアセチルコリンセンサーを用いて行った。本センサー電極は、サブ μ M レベルのアセチルコリン濃度を測定できる高感度センサーであり、マウス海馬に適用可能な大きさまで微小化したものを用いた。またアセチルコリン制御剤による抗てんかん作用に関しては、前述の海馬硬化症モデルマウスを用いて評価した。

4. 研究成果

- (1) 我々のこれまでの研究成果 (Sada et al, *Science*, 2015) に基づき、創薬標的分子として「乳酸脱水素酵素」を用い、シード化合物として「スチリペントールの部分構造」を用いることで、乳酸脱水素酵素阻害作用を持つスチリペントール類似体を探索した。

具体的には、乳酸脱水素酵素の酵素活性をプレートリーダーを用いて発色により評価するスクリーニングシステムを構築し、化合物ライブラリ等を用いて新規の乳酸脱水素酵素阻害剤を探索した。その結果、スチリペントールより強力に乳酸脱水素酵素を阻害するスチリペントール類似体を複数同定した (PCT/JP2016/053764)。

次に、同定した乳酸脱水素酵素阻害剤 (スチリペントール類似体) に関して、*in vivo* 抗てんかん作用を調べた。その結果、海馬硬化症モデルマウスが自発的に呈するてんかん発作を抑えることができるスチリペントール類似体を同定した。さらに本化合物に関し、投与量と抗てんかん作用との関係も評価した。

- (2) ケトン食時に血中で増加するケトン体として、アセト酢酸と ヒドロキシ酪酸が知られている。そこで、海馬神経細胞に対するアセト酢酸の作用を、スライスパッチクランプ法を用いて調べたところ、アセト酢酸が電位依存性カルシウムチャネルを阻害することを見出した。また、てんかん様活動を呈している海馬スライス標本において、アセト酢酸が興奮性シナプス伝達を阻害することも見出した。

次に、アセト酢酸より強力に電位依存性カルシウムチャネルを阻害するアセト酢酸類似体を探索したところ、2-フェニル酪酸を見出した。2-フェニル酪酸はアセト酢酸と同様の作用を示し、てんかん様活動を呈している海馬スライス標本において興奮性シナプス伝達の阻害効果が増強された。さらに、アセト酢酸および2-フェニル酪酸を海馬硬化症モデルマウスに *in vivo* で投与したところ、アセト酢酸はてんかん発作を抑えるが、2-フェニル酪酸はさらに強くてんかん発作を抑えることが分かった。

最後に、てんかん発作を抑える際の2-フェニル酪酸の投与量と、その際の脳内濃度に関して評価したところ、脳内濃度が約0.3 mM では抗てんかん作用は見られず、約2 mM で抗てんかん作用が見られることが分かった。さらにこれらの脳内濃度は、2-フェニル酪酸がスライス標本において興奮性シナプス伝達を阻害する濃度と同等であった (Kadowaki et al, *Epilepsia*, 2017)。

(3) 難治性てんかんとして知られる「海馬硬化症を伴う側頭葉てんかん」の制御機構を明らかにすべく、そのモデルマウスを解析した。慢性てんかんモデルである海馬硬化症モデルマウスでのてんかん焦点に、各種制御剤を直接投与できる *in vivo* 評価系を確立し、アセチルコリン制御剤を投与したところ、自発的なてんかん発作が抑えられることが明らかとなった。さらに、我々がこれまで開発してきたアセチルコリンセンサーを当該てんかんモデルに適用し、てんかん活動と脳内アセチルコリン濃度の同時測定を行い、てんかん発作時のアセチルコリン挙動を解析した。

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 1 件)

1. Kadowaki A, Sada N, Juge N, Wakasa A, Moriyama Y, Inoue T (2017) Neuronal inhibition and seizure suppression by acetoacetate and its analog, 2-phenylbutyrate. *Epilepsia*, 58: 845-857. (査読有)
DOI: 10.1111/epi.13718

[学会発表](計 6 件)

1. 井上 剛:「代謝酵素(乳酸脱水素酵素)による神経抑制とてんかん抑制」, 第 95 回日本生理学会大会, 2018 年 3 月 28-30 日, サポートホール高松 (香川県・高松市)
2. 佐田 渚, 門脇 敦志, 井上 剛:「抗てんかん薬開発に向けたケトン体の構造改変」, 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年 7 月 20-23 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
3. 安永 佑佳, 佐田 渚, 藤井 佐規子, 勝孝, 井上 剛:「覚醒マウスの海馬における緊張状態に依存したアセチルコリン変動」, 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
4. 井上 剛:「ケトン食の抗てんかん作用メカニズム」, 第 16 回日本抗加齢医学会総会, 2016 年 6 月 10-12 日, パシフィコ横

浜 (神奈川県・横浜市)

5. 井上 剛, 佐田 渚:「海馬アストロサイト-ニューロン乳酸経路による電気制御」, 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 28-31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
6. 藤井 佐規子, 浦川 健太, 佐田 渚, 若狭 綾香, 勝孝, 井上 剛:「アセチルコリンは海馬硬化症モデルのてんかんを制御する」, 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 28-31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

[図書](計 1 件)

1. Sada N, Inoue T (2016) Lactate dehydrogenase: a novel metabolic target. In: Ketogenic diet and metabolic therapies. (Masino SA. Ed.) Oxford University Press, New York, pp. 281-288. (査読有)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

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: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/053764

出願年月日: 2016 年 2 月 9 日

国内外の別: 外国

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