

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293056

研究課題名(和文) 眠気と脂質代謝：カルニチンの効果

研究課題名(英文) Sleepiness and l-carnitine: mechanism of action and clinical efficacy of l-carnitine

研究代表者

本多 真 (HONDA, Makoto)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：50370979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：眠気と脂質代謝：カルニチンの効果
主観指標を用いたL-カルニチン過眠改善効果について、奏功基盤を動物での基礎検討と客観指標を用いた臨床研究で検討した。L-カルニチンは中枢・末梢ともにCPT1活性指標を改善させ、ドパミン系などの脳内の遺伝子発現や代謝産物を変化させ、実際に休息期特異的に睡眠の増加をもたらした。臨床研究と共通し睡眠段階遷移指標での睡眠安定化作用が示唆された。4割程度にL-カルニチン反応群が存在し、その判別法を検討した。

研究成果の概要(英文)：Sleepiness and L-carnitine: mechanism of action and clinical efficacy
We previously report the favorable effect of L-carnitine on the sleepiness of narcolepsy patients. We tried to address the mechanism and correlates of the efficacy of L-carnitine using animal model and objective measure on clinical study. L-carnitine improved CPT1 activity marker in brain and peripheral, and altered gene expression and metabolome such as dopamine and related genes. Sleep in narcolepsy-model mice actually improved during resting (light) period. About 40% of hypersomnia can benefit from L-carnitine. We tried to discriminate the L-carnitine responders in hypersomnia patients using clinical symptoms or EEG measures.

研究分野：睡眠医学 精神医学

キーワード：脂肪酸代謝 カルニチン ナルコレプシー 睡眠脳波

1. 研究開始当初の背景

眠気は身近なものだが、その生物学的基盤は未解明である。眠り込みやすさ (sleep propensity) を反映する反復睡眠潜時検査 (MSLT) の平均入眠潜時と、8つの日常生活場面でうとうとする頻度を尋ねる主観的なエプワース眠気尺度が臨床場面では汎用されるが、その一致率が低い (Johns JSleepRes2000,2002)。ナルコレプシーは中枢性過眠症の代表で、重度の眠気 (居眠りの反復) を呈する疾患である。ナルコレプシーおよび関連過眠症を対象とした全ゲノム遺伝子関連解析により、脂肪酸代謝にかかわる CPT1B と CRAT が見いだされた。ナルコレプシー患者を対象として、脂肪酸酸化の律速酵素である CPT1 の機能促進作用をもつ L-カルニチンを経口摂取させる臨床研究 (主要 endpoint は睡眠日誌) を行ったところ、主観的評価に基づく日中居眠り時間に有意な短縮が確認された。しかし L-カルニチンによる眠気改善の機序として、脂肪酸代謝賦活がどう寄与するのか、睡眠覚醒中枢を含む脳にどのような変化をもたらされるのか不明であった。臨床研究の結果を見直すと、L-カルニチン有効群の3割に夜間睡眠の主観的改善があることが判明した。そこで L-カルニチンは夜間睡眠安定化作用をもち、眠気改善をもたらす可能性が考えられた。

現状では中枢性過眠症の治療法はドパミン作働性の中枢神経刺激薬 (交感神経賦活や、依存・耐性の副作用が問題になっている) による対症療法にとどまっている。本研究によって、脂肪酸代謝指標が新たな眠気の指標となり、また眠気の基盤にあることが判明すれば、上述の診断面、治療面において臨床応用につながる。診断面では客観的で新たな眠気の指標となりうること、そして L-カルニチンなどで脂肪酸代謝を賦活することで改善する眠気をもつ一群を同定できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

中枢性過眠症の代表で、重度の眠気を呈するナルコレプシーには脂肪酸代謝異常が存在する。ナルコレプシー患者を対象として、脂肪酸酸化の律速酵素である CPT1 の機能促進作用をもつ L-カルニチンを経口摂取させる臨床研究を行ったところ、主観的評価に基づく日中居眠り時間に有意な短縮が確認された。

本研究では L-カルニチン投与の効果について、動物を用いた基礎検討を通じて脳内の分子レベルでの変化を検討して奏功基盤を検討するとともに、客観的指標である動物睡眠脳波を用いて表現型としての睡眠覚醒の変化を検証することを第1の目的とした。基礎検討の成果を応用し、脳波記録による客観指標を endpoint に含めた臨床研究を行って、L-カルニチンの奏功機序の背景に迫り、眠気の客観的な末梢指標確立を目指すこと、さら

にカルニチン有効群の特徴を明らかにして、L-カルニチン responder を判別する指標を探索して、臨床場面に役立てることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

ナルコレプシーモデルマウスとして、生後2週間でオレキシン神経細胞の9割あまりが変性消失するオレキシン-アタキシン3マウス (Atx 0rx) を用い、対照として littermate となる野生型マウスと比較しつつ、L-カルニチン投与に伴う CPT1 活性指標、脳内遺伝子発現、脳内代謝物、動物脳波睡眠の変化を検討した。なお先天性代謝異常の screening に用いられるタンデムマス法で各アシルカルニチン分画を定量し、CPT1 の基質 (CO=遊離カルニチン) と産物 (t[C16]+t[C18]=炭素鎖数16-18の長鎖脂肪酸のカルニチンエステル合計値) の比をとることで CPT1 活性指標とした。CPT1 活性=CO/(t[C16]+t[C18]) である。この活性指標は CPT1 活性が高まって産物が増えると分母が増加するため、指標は低下するという関係がある。

末梢 (赤血球) と脳 (大脳皮質) における CPT1 活性指標の関連

まず Atx 0rx マウスで脂肪酸代謝異常があるのか、L-カルニチン経口投与で CPT1 活性指標が本当に改善するのか、そして臨床応用を見据えて動物脳での CPT1 活性指標が末梢 RBC での指標と関連するかを検証した。

野生型および Atx 0rx マウスに L-カルニチンを飲水中に溶解して経口摂取させた群とそうでない群を作り、血液と脳組織を採取した。タンデムマス法によってアシルカルニチン分画を定量し、CPT1 活性指標を算出し L-カルニチンの効果を検討した。

L-カルニチン投与による脳内遺伝子発現解析

休息期 (L 期) および活動期 (D 期) にマウスを sacrifice し、すばやく脳組織を摘出して視床下部組織を同定・切離し凍結保存した。視床下部組織から RNA を抽出し Agilent 社の chip を用い複数個体から pooled RNA を作成したうえで、網羅的遺伝子発現解析 (microarray) を行った。また RNA の一部は random hexamer を用いて cDNA を作成、ABI 社の system により定量的 RT-PCR を行った。microarray の結果について LD 期ごと、野生型とナルコレプシーモデルマウス (Atx 0rx)、そして L-カルニチンの有無という3つの条件で、8つの結果について解析を行った。特に野生型と Atx 0rx に共通し L-カルニチン特異的な変動を示す pathway を探索し、該当遺伝子を定量的 PCR 法で検証した。

L-カルニチン投与による脳内代謝物変化 RNA 抽出と同様に野生型および Atx 0rx マウスを L 期と D 期に sacrifice し、視床下部と中脳を含む脳幹部領域を切り出してただちに凍結、HMT 社に委託してメタボローム解析

を行った。特に覚醒神経系(ドパミンを含む)の変化に注目して検討し、遺伝子発現と一致しない結果が得られたため、ドパミンの投射先である大脳皮質および脊髄の組織について、HPLCを用いたカテコラミンの定量分析も行った。[HPLCについては分担研究者がroutineで動かしている実験系が存在する]

L-カルニチンによる動物脳波睡眠の変化
マウス頭蓋骨に脳波/筋電図電極を埋め込み、1週間の回復期後に24時間継続して脳波測定を行う。L-カルニチン投与前および投与後1週間の脳波記録を8秒1エポックとして睡眠段階判定を行い、1時間ごとにNREM REM 覚醒の量をまとめるとともに、睡眠段階の遷移数も計算して解析に用いる。これはカルニチン投与に伴う睡眠安定性の変化を評価する脳波指標として用いた。なおL-カルニチン急性投与実験として、休息期(13:00)の腹腔内1回投与の前後それぞれ24時間の睡眠脳波解析も行った。睡眠段階遷移の変化が見られたため、臨床研究での解析指標として応用することとした。

(2) 臨床研究

ナルコレプシー典型例に対するL-カルニチンの効果: PSGでの予備検討

予備的検討として、ナルコレプシー典型3例を対象に8週間L-カルニチン680mgを服薬してもらい、その前後で入院しての終夜睡眠ポリグラフ検査(PSG)を施行した。睡眠学会認定技師による判定を行い、睡眠効率(総睡眠時間/総記録時間)、各睡眠段階割合、無呼吸等の評価は診断検査と同様に行って算出し、30秒1エポックとする睡眠段階判定について、睡眠段階遷移の数を計算、総睡眠時間で除して睡眠段階遷移指数を算出した。なお動物睡眠脳波と比べヒト睡眠脳波段階は複雑であり、睡眠安定性をより精度高く評価するため、睡眠段階が変わらなかったものは除外し、睡眠段階が変化したものの数を睡眠時間で除する形として検討に用いた。PSG検査と並行して簡易型脳波計との一致率を検討し、80%以上というよい一致をみたため、次の本研究で利用することとした。

簡易型睡眠計を用いた臨床研究とL-カルニチン反応群の特徴検討

過眠症(ナルコレプシーおよび近縁過眠症)20症例(ナルコレプシー典型15例、亜型5例)に対するL-carnitine有効性を、質問紙による主観的評価(生活全般およびQOL尺度(活力)、情動脱力発作、夜間睡眠の変化)および客観的指標(睡眠脳波変化)について検証した。カルニチン服用中に他の薬剤は変更しないことを条件とした。また脳波検査翌日外来受診時に採血もおこなって、過眠症と関連する脂肪酸代謝関連の遺伝子多型(CPT1B, CRAT)を同定、またCPT1活性化指標についての同定を行った。さらにL-carnitine responder群の特徴を検討して、臨床応用する際の判別に使う手がかりの探索を行った。

解析は1の予備検討の3例と合わせて行った。なお2回のPSG検査を行うことが、検査施設と症例の日程調整上困難、さらに費用面の問題もあるため、在宅で睡眠脳波計測が簡易型脳波計(sleep scope)を用いて検討を行った。その後、過眠症の睡眠脳波は健常者と異なる可能性が指摘され、簡易型脳波計の過眠症での妥当性検証を行うため、40余例でPSGと簡易型脳波計並行記録を行って、一致率が70%程度にとどまることを確認している。

エネルギー代謝異常と睡眠安定性検討

L-カルニチン有効群の判別のために、睡眠段階遷移指数が高い、すなわち睡眠不安定性を示す群の臨床的特徴の探索も行った。特にナルコレプシー患者の中には覚醒時につよい甘味欲求を示す一群がある。頻回に甘味欲求を覚える群では、睡眠中の(脂肪酸代謝由来の)エネルギー供給が不十分である可能性を考え、甘味欲求群の睡眠安定性を睡眠段階遷移指数を用いて検証した。睡眠・食事・服薬の条件を統制したデータ収集のため、神経研究所附属晴和病院の睡眠外来を受診し過眠症疑いで鑑別診断検査(PSG+MSLT)を行う症例に研究協力を依頼した。

4. 研究成果

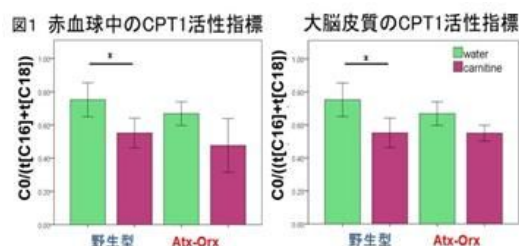
(1) 動物実験

ナルコレプシーのモデルとして、オレキシン産生細胞が生後に変性消失するアタキシン3-オレキシンマウス(Atx-Orx)も使い、野生型マウス(Wt)とともにL-カルニチンを投与して検討に用いた。なおCPT1活性指標として $CO/(t[C16]+t[C18])$ 比を用いた。(方法参照)

末梢(赤血球)と脳(大脳皮質)における

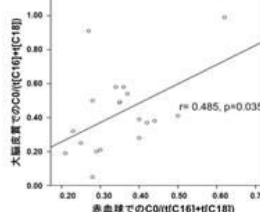
CPT1活性指標の関連

L-カルニチン投与により、野生型マウスのCPT1活性指標はL-カルニチン投与で改善した。Atx-Orxも有意ではないが同様の変化を示した。[図1]



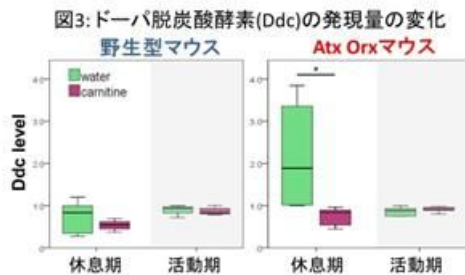
また同一動物で大脳皮質と末梢RBCでのCPT1活性指標を算出したところ、臓器ごとにCPT1活性指標のばらつきがあるが、両者に有意な相関関係があることを見出した。[図2]

図2: 中枢と末梢のCPT1活性指標関連



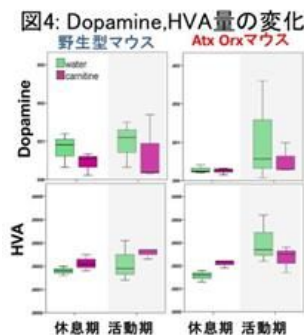
L-カルニチン投与による脳内遺伝子発現解析

視床下部組織から抽出した RNA を用いて、網羅的遺伝子発現解析 (microarray) を行い、pathway 解析で選択された dopamine 関連遺伝子発現量を定量的 PCR 法で検証を行った。すると L-カルニチン経口投与により、休息期のドパミン関連遺伝子発現量 (ドーパ脱炭酸酵素、ドパミントランスポーター1、VMAT2 など) が減少すること、特にナルコレプシーモデルマウス (Atx-Orx) は、休息期に dopamine 関連遺伝子発現量が高い傾向があったが、L-カルニチンで野生型と同レベルにまで抑制された。ナルコレプシーにおける夜間睡眠の不安定性の基盤としてドパミン関連遺伝子の発現上昇があり、L-カルニチンは夜間睡眠改善を通じて症状改善に有効である可能性が考えられた。[図3]



L-カルニチン投与による脳内代謝物の変化

L-カルニチン経口投与の中樞への効果を確認するため、マウス脳幹部 (中脳視床下部を含む) を用いたメタボローム解析を行って脳内代謝産物の変化を検討した。全体として、野生型の休息期に、L-カルニチン投与による明瞭な代謝物で量的増加が多く物質で確認された。遺伝子発現解析で見いだされたドパミン経路に対応して、ドパミンとその代謝産物 (HVA) の結果を示す [図4]。L-カルニチンは脳幹部のドパミン量を休息期に減少させ、睡眠安定化の一要因と考えられた。Atx Orx マウスでは図3の結果と異なり、ドパミン自体がカルニチン投与の有無にかかわらず低値であった。

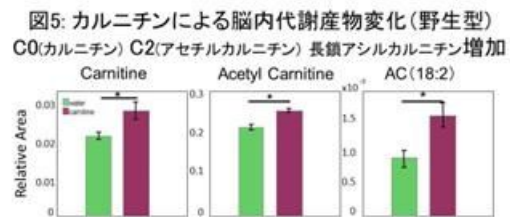


産生増加が視床下部中脳にとどまらず、投射先に放出される可能性が考えられたため、神経投射先でのドパミン量を HPLC 法で測定した。大脳皮質では Atx Orx マウスでは休息期も活動期も常にドパミン量は高かった。野生

型でも Atx Orx マウスでも、カルニチン投与で大脳皮質のドパミン量は休息期も活動期も低下することが確認された。

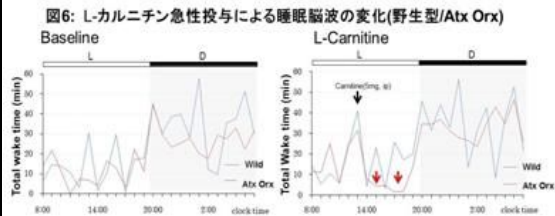
一方、下降性投射先として脊髄を用いて HPLC 法でドパミン量を測定すると、L 期のみでカルニチン投与でドパミン量が増加することが見いだされた。脊髄でのドパミン量増加は、周期性四肢運動障害の治療と共通するものであり、睡眠の質の改善に結びつく可能性が考えられた。

なお予想通り L-カルニチン経口摂取で脳内のカルニチンやアセチルカルニチン (C2) は増加、CPT1 活性改善にともない酵素 CPT1 の産物の濃度が上昇した (図は例として C18:2 (リノール酸カルニチンエステル) を示す)。L-カルニチンは経口摂取であっても、脳の脂質代謝が実際に変化することが判明した。[図5]



L-カルニチン投与による動物脳波睡眠の変化

まず急性効果を検討するため、野生型と Atx Orx マウスに、休息期 13:00 に L-カルニチン 5mg を腹腔内投与し、投与前と後の 24 時間の睡眠段階を比較した。1 時間のうち覚醒と判定された時間を一日の時間ごとに示した (個体差あり代表例について示す)。[図6]



特に Atx Orx マウスで休息期の覚醒量が大きく減少し (23.3% → 10.1%)、レム睡眠 (REM) は不変、ノンレム睡眠 (NREM) 量が増加した。睡眠安定性の評価指標として、睡眠段階遷移確率を算出すると NREM から NREM への遷移が増加し NREM や REM から覚醒 (WAKE) への移行が減少することが確認された。[表1]

これは L-カルニチンによりナルコレプシーモデルマウスに睡眠安定化 (覚醒への移行減少) をもたらすことを示唆する。

表1: 睡眠stage遷移確率(%)

Baseline			L-carnitine			
	WAKE	NREM	REM	WAKE	NREM	REM
WAKE	22.3	1.43	0	9.78	1.26	0
NREM	1.31	69.08	0.82	1.18	82.34	0.55
REM	0.20	0.57	4.29	0.12	0.43	4.34

なお個体差が大きいいため、L-カルニチン経口投与での検討では統計的有意差には至らなかった。

動物実験の結果のまとめ：

1. L-カルニチンは、中枢でも末梢でも CPT1 活性指標を改善させ、末梢指標がある程度中枢での変化を反映しうることを示した。
2. L-カルニチンの奏功基盤のひとつとして、脳内の遺伝子発現パターンや代謝産物の変動が実際にみられ、特に休息期のドパミン神経系の活動がナルコレプシーモデル動物(Atx Orx)で特に高いが、野生型でも Atx Orx でも L-カルニチンによってドパミン神経系の活動が抑制されることを見出した。夜間睡眠の安定化に寄与する可能性を示唆する結果である。
3. 動物睡眠脳波の検討では、特に Atx Orx マウスで L-カルニチン投与が休息期特異的に睡眠を増加させること、その背景として NREM や REM から WAKE への睡眠段階遷移が減少し、睡眠が安定化することがあると考えられた。動物実験での検討を通じて、夜間睡眠の安定性の指標として、睡眠段階遷移に注目した客観的評価法が応用可能と考えられた。

(2) 臨床研究

ナルコレプシー典型例に対する L-カルニチンの効果：PSG での予備検討

まずナルコレプシー典型 3 例に 8 週間 L-カルニチン 680mg を服薬してもらい、その前後で終夜睡眠ポリグラフ検査 (PSG) を用いた検討を行った。代表例を示す。[図 7]

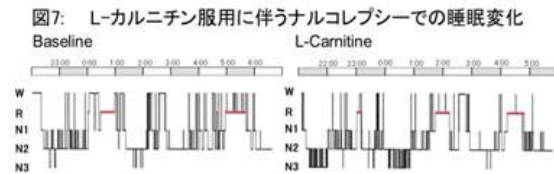


図 6 で示した動物実験と同様に、カルニチン服用後には深睡眠である睡眠段階 N3 と睡眠効率が増加、睡眠段階遷移についても NREM 睡眠の安定性と NREM, REM から WAKE への移行の減少が確認された。[表 2]

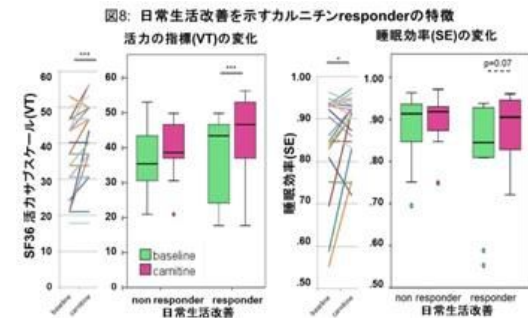
表2: 睡眠段階 遷移確率(%)

baseline	WAKE			NREM			REM		
	WAKE	NREM	REM	WAKE	NREM	REM	WAKE	NREM	REM
WAKE	10.27	4.28	1.20	4.38	2.50	0.38	4.11	65.41	0.86
NREM	4.11	65.41	0.86	2.50	74.50	0.38	1.37	0.17	12.84
REM	1.37	0.17	12.84	0.38	0.50	14.50			

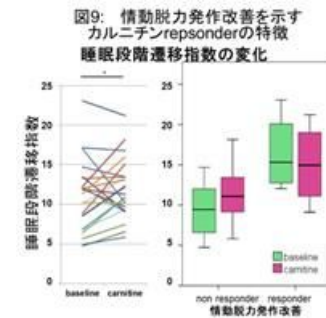
簡易型睡眠計を用いた L-カルニチン反応群の特徴検討

ナルコレプシーおよび近縁過眠症 20 例に予備検討と同様に L-カルニチン 680mg を 8 週間服用してもらい、その前後で主観的評価とともに在宅での簡易型脳波計 (sleep scope) を

用いた睡眠判定を行った。予備検討とあわせて 23 症例をあわせて解析した。対象は男/女 = 10/13、35.8 ± 7.3 歳、ナルコレプシー典型 18 例、ナルコレプシー亜型 (情動脱力発作を伴わない) 5 例である。まず L-カルニチン responder の特徴を明らかにするための検討を行った。L-carnitine は全体としては活力 (Vitality) と、睡眠脳波解析による睡眠効率 (Sleep Efficiency) を改善させる方向であった。ここで日常生活における主観的な体調を改善させた 23 例中 9 例 (39%) に注目すると、活力の有意な改善と (p < 0.001)、睡眠効率の改善傾向がはっきり示された (p = 0.07)。[図 8]



睡眠効率改善は中途覚醒割合の減少を意味しており、これが日常生活の主観的改善と心理的な QOL 尺度の改善と表裏をなすものと考えられた。また情動脱力発作を伴うナルコレプシー 18 例に限定すると、そのうち 4 例 (22%) で L-carnitine により主観的な情動脱力発作の改善が見られた。対象はすべて薬物療法中であるが、一部で情動脱力発作コントロールが不十分な症例があり、主観的な改善と睡眠段階遷移指数の減少が相関していることが判明した。[図 9]



情動脱力発作のコントロールが不十分な例では睡眠段階遷移が高い傾向があり、睡眠段階遷移指数の低下による睡眠安定化が、情動脱力発作の改善にもつながる可能性が考えられた。

なお L-カルニチン有効群の判定に CPT1 の遺伝子多型は直接関連を示さず、多因子が影響することが想定された。

なお対象者全員で解析した際に L-カルニチン服用によって有意な改善を示す睡眠変数や睡眠段階遷移指数は見いだせなかった。これは症例数が不十分であること、対象が薬物療法中であること、そして在宅での睡眠が不

規則になりがちで入院での PSG 検査と比べると様々な因子が影響したためと考えられた。被験者には6時間以上眠れる日に測定するよう指示をしていたが、実際は仕事等の都合で睡眠不足となったり、中途覚醒時に測定を中断したりという場合が混じった。

エネルギー代謝異常と睡眠安定性検討

検証に用いた対象は合計 136 例、ナルコレプシー典型例 19 例、その他の過眠症 94 例、日過眠症対照群 23 例である。もともとナルコレプシーでは夜間睡眠安定性が疾患特異的に悪いことが知られるが、ナルコレプシー典型例を甘味欲求の有無で 2 群に分けると、甘味欲求ではさらに睡眠安定性が悪く、主観的な中途覚醒時間と睡眠段階遷移指数が有意に高いことを見出した。甘味欲求群は睡眠段階遷移指数が高く、L-カルニチン responder となる可能性が考えられた。なお対照群(睡眠不足症候群)でも同様に甘味欲求群で睡眠段階遷移指数が高い傾向がみられた。

臨床研究の結果のまとめ：

臨床研究によって L-カルニチンの睡眠改善作用を客観的な脳波解析指標を用いて検討した。特に L-カルニチン有効群が 40% 存在すること、その判別をすることにより、実地の臨床応用に結びつく可能性が考えられた。睡眠効率が低く活力低下もある群、および睡眠段階遷移指数が高い群(甘味欲求群)については、L-カルニチンを試みる価値があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

Honda M, Ito W, Ueno T, Kato N, Miyagawa T. Sweet seeking and sleep stability in narcolepsy patients. 1st Asian Narcolepsy & Hypersomnolence Society Meeting, Seoul, Korea [2017/03/25]

Honda M, Sasaki K, Ueno T, Ito W, Kato N: REM transition index (# sleep stage transitions from REM/REM duration) correlates with subjective nocturnal awakenings and is an independent risk factor for Narcolepsy Type1. Sleep2016, Denver, USA [2016/06/14]

Honda M: Effect of L-carnitine on narcolepsy, 8th Asian Narcolepsy Forum/4th International Pediatric Sleep Association Congress, Taiwan [2016/03/13]

Honda M, Miyagawa T, Hazumi M, Tokunaga K, Kodama T. Effect of L-carnitine on the nocturnal sleep of narcolepsy patients. Sleep2015 Seattle, USA [2015/06/09]

本多 真 過眠を呈する睡眠障害の症状と

病態 つくばアカデミー・オブ・サイカイアトリー(TAP)学術講演会 秋葉原 UDX カンファレンス, 東京都千代田区 [2015/05/29]

Honda M: CPT1 activity is a risk factor for narcolepsy: possible contribution of dietary habit In symposium narcolepsy in Asia, World Association of Sleep Medicine, Korea [2015/03/25]

Honda M, Miyagawa T, Shigematsu Y, Kodama T, Tokunaga K. Decreased CPT1 function is associated with and a risk factor for narcolepsy and essential hypersomnia. ESRs congress 2014, Tallinn, Estonia [2014/09/19]

本多 真 ナルコレプシーの症状と病態 第 6 回 ISMSJ 学術集会 ランチオンセミナー, 神戸ファッションマート, 兵庫県神戸市 [2014/08/01]

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所睡眠プロジェクトホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/sleep.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 真 (HONDA, Makoto)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号：50370979

(2) 研究分担者

児玉 亨 (KODAMA, Toru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員
研究者番号：20195746