

学位論文要旨

**Slc22a4 欠損による pentylenetetrazole 誘発けいれんの抑制と
untargeted metabolomics を用いたメカニズム解析**

**Decrease in pentylenetetrazole-induced seizure by Slc22a4 gene
deletion and mechanism analysis using untargeted metabolomics**

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
創薬科学専攻
分子薬物治療学研究室

西山 美沙

Abstract

Despite of number of anti-epilepsy drugs, around 20% of epilepsy patients fail to control seizure. Therefore, understanding of the disease mechanism is desired. Carnitine/organic cation transporter OCTN1 is expressed in the brain and transports an antioxidant ergothioneine (ERGO), carnitine, and spermine, all of which may be associated with epilepsy. Thereby, the present study aimed to clarify the relationship between epilepsy and OCTN1. *Ocnt1* gene knockout mice (*Ocnt1*^{-/-}) showed lower seizure score compared to wild-type mice in both acute pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure and PTZ-induced kindling models. Up-regulation of neuronal excitation markers, c-fos and Arc, and neurotrophic factor Bdnf by PTZ administration was observed in hippocampus of wild-type, but not *Ocnt1*^{-/-}. To find endogenous OCTN1 substrate that is associated with the seizure reduction in *Ocnt1*^{-/-}, untargeted metabolomics using LC-QTOFMS was conducted for hippocampus, frontal cortex, and plasma of both strains. As a result, plant alkaloid homostachydrine was identified as a novel OCTN1 substrate. Homostachydrine administration increased PTZ-induced acute seizure score, and expression of Arc in hippocampus and that of Arc, Egr1, and Bdnf in frontal cortex. Administration of OCTN1 substrate/inhibitor ERGO, on the other hand, inhibited PTZ-induced kindling and reduced plasma homostachydrine concentration. Thus, the present study showed that OCTN1 is at least partially related to PTZ-induced seizure which can be potentiated by homostachydrine, a newly identified food-derived OCTN1 substrate.

要旨

【序論】

てんかんは世界で5億人が罹患していると推測される最も一般的な脳神経疾患のひとつである。てんかんは海馬や大脳皮質を含む大脳の神経細胞の過剰な興奮によって引き起こされ、繰り返しのけいれん発作や意識消失を特徴とする。てんかんが起こるメカニズムは未だ完全には解明されておらず、てんかん患者の約20%は抗てんかん薬により発作をコントロールできない治療抵抗性である。てんかんのコントロール不良は日常生活の制限や寿命の短縮などを起こすことから、さらなるメカニズム解明が望まれている。膜輸送体 carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 は脳の神経細胞、ミクログリア、神経幹細胞に機能的に発現し、食餌由来抗酸化物質 ergothioneine (ERGO) やスペルミン、カルニチン、アセチルコリンを輸送する。酸化ストレスはてんかんの発症や進行に関与しており、スペルミン、カルニチンは抗けいれん作用を示す。またアセチルコリン受容体の異常は常染色体優性夜間前頭葉てんかんの原因となる。これらのことから OCTN1 の基質はいずれもてんかんに関与する可能性があり、したがって OCTN1 はてんかんと何らかの関係があると考えた。そこで本研究は OCTN1 と実験的てんかんモデルとの関係を明らかにすることを目的とした。

【本論】OCTN1 とてんかんの関連を解明するため、野生型マウス (wild-type) と OCTN1 遺伝子欠損マウス (*Octn1*^{-/-}) に GABA 受容体アンタゴニスト pentylenetetrazole (PTZ) を投与し、てんかん研究に広く用いられる PTZ 急性けいれんモデルと PTZ-induced kindling モデルの 2 種類のてんかんモデルマウスを作製した。*Octn1*^{-/-} ではどちらのモデルにおいても wild-type に比べてけいれんのスコアが低下した (図 1)。また PTZ-induced kindling モデルでは *Octn1*^{-/-} は高い生存率を示した。PTZ を 2 回投与後、海馬を回収し、神経興奮関連遺伝子 c-fos, Arc, Egr1 と、てんかんの発症や進行に関係する神経栄養因子 BDNF の発現を定量 PCR で調べたところ、wild-type では PTZ 投与により発現上昇が見られたが、*Octn1*^{-/-} では上昇が見られなかった (図 2)。これらの結果から OCTN1 が PTZ によるけいれんに関与することが示唆された。*Octn1*^{-/-} で PTZ によるけいれんが抑制された原因を調べるため、OCTN1 が何らかのけいれん誘発物質を体内に取り込むと考え、wild-type と *Octn1*^{-/-} の海馬、大脳皮質前部、血漿について LC-QTOFMS を用いた untargeted metabolomics を行った。海馬、大脳皮質前部、血漿でそれぞれ 2,599, 2,676, 1,697 個のピークが検出された。ノイズを除いたあと wild-type と比較して *Octn1*^{-/-} で 2 倍以上もしくは 1/2 以下となったピークの中から有意差があったものを選んだところ、海馬で 4 個、大脳皮質前部で 2 個、血漿で 2 個のピークが得られた。m/z 158 のピークが *Octn1*^{-/-} の海馬、大脳皮質前部、血漿で低下していたため、parent ion と product ion のデータベースとの照合から化合物を推定したところ、homostachydrine であった。実際、homostachydrine を有機合成し、得られた標品について parent ion と product ion を調べたところ、海馬、大脳皮質前部、血漿で得られたピークと合致したことから、homostachydrine であることが確認できた。ヒト OCTN1 遺伝子とベクター (pcDNA3) のみを安定発現させた HEK293 細胞で重水素標識体 (homostachydrine-d) の取り込み試験を行った。hOCTN1 による homostachydrine-d の時間依存的、濃度依存的な取り込みが確認され、Km と Vmax がそれぞれ 236 μM、102 nmol/mg protein/min と算出された。Homostachydrine の体内動態を調べるために wild-type と *Octn1*^{-/-} に homostachydrine-d を投与し血漿濃度推移を測定した。どちらの系統においても homostachydrine-d を経口投与すると血漿中濃度の増加が見られた一方、消失相の半減期は *Octn1*^{-/-} で wild-type に比べ短かった (図 3)。また定常状態分布容積は *Octn1*^{-/-} で低く、分布の低下が示唆された Bioavailability は wild-type と *Octn1*^{-/-} で差はなく、homostachydrine

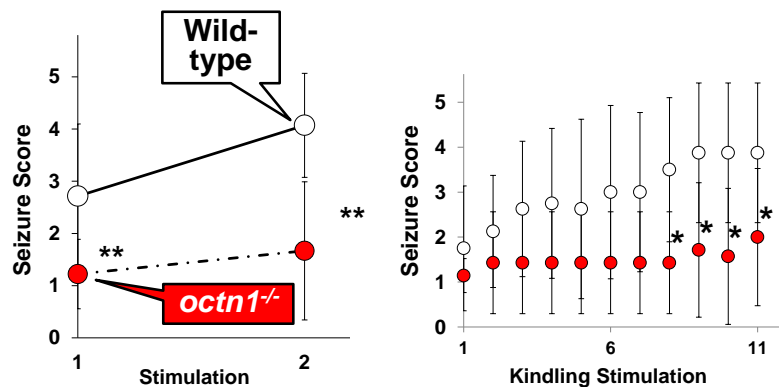


図1 PTZ誘発けいれんへのOCTN1の影響

馬、大脳皮質前部、血漿でそれぞれ 2,599, 2,676, 1,697 個のピークが検出された。ノイズを除いたあと wild-type と比較して *Octn1*^{-/-} で 2 倍以上もしくは 1/2 以下となったピークの中から有意差があったものを選んだところ、海馬で 4 個、大脳皮質前部で 2 個、血漿で 2 個のピークが得られた。m/z 158 のピークが *Octn1*^{-/-} の海馬、大脳皮質前部、血漿で低下していたため、parent ion と product ion のデータベースとの照合から化合物を推定したところ、homostachydrine であった。実際、homostachydrine を有機合成し、得られた標品について parent ion と product ion を調べたところ、海馬、大脳皮質前部、血漿で得られたピークと合致したことから、homostachydrine であることが確認できた。ヒト OCTN1 遺伝子とベクター (pcDNA3) のみを安定発現させた HEK293 細胞で重水素標識体 (homostachydrine-d) の取り込み試験を行った。hOCTN1 による homostachydrine-d の時間依存的、濃度依存的な取り込みが確認され、Km と Vmax がそれぞれ 236 μM、102 nmol/mg protein/min と算出された。Homostachydrine の体内動態を調べるために wild-type と *Octn1*^{-/-} に homostachydrine-d を投与し血漿濃度推移を測定した。どちらの系統においても homostachydrine-d を経口投与すると血漿中濃度の増加が見られた一方、消失相の半減期は *Octn1*^{-/-} で wild-type に比べ短かった (図 3)。また定常状態分布容積は *Octn1*^{-/-} で低く、分布の低下が示唆された Bioavailability は wild-type と *Octn1*^{-/-} で差はなく、homostachydrine

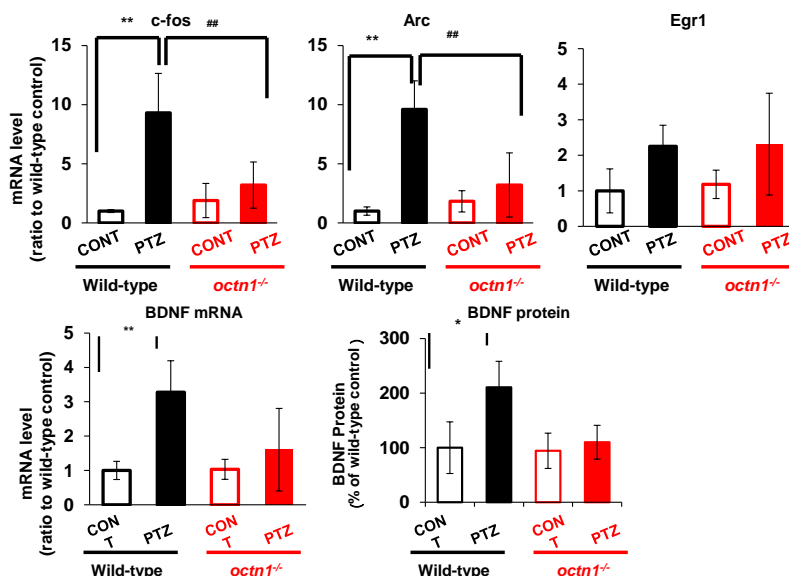


図2 PTZ投与後の海馬でのmRNA, タンパク質発現変化

が *Octn1*^{-/-} の体内で低かった原因は、吸収よりも消失過程に起因すると考えられた。これらの結果から homostachydrine が OCTN1 の新規 in vivo 基質であることが示された。homostachydrine が PTZ によるけいれんに影響を与えるかを調べるために、事前に homostachydrine を静脈内投与し、PTZ によるけいれんを評価した。Homostachydrine 投与群では、溶媒投与群に比べて、けいれんスコアの上昇が見られた。また homostachydrine の投与によって、海馬では Arc の、大脳皮質前部では Arc, Egr1, Bdnf の発現上昇が見られた。この結果から homostachydrine が PTZ 誘発性けいれんに対する増悪物質であり、*Octn1*^{-/-} でけいれんが抑制された原因の一つが homostachydrine の減少による可能性が示された。Homostachydrine は植物アルカロイドのひとつで、食餌由来の化合物であると考えられている。Homostachydrine の生理的な作用を示したのは本研究が初めてである。次に OCTN1 阻害剤の PTZ によるけいれんに対する影響を調べるために、ERGO 投与による PTZ-induced kindling への影響を検討した。

PTZ-induced kindling は ERGO 投与群で

顕著に抑制された。また ERGO 投与群では海馬、大脳皮質前部の homostachydrine 濃度が低下した。ERGO は抗酸化作用をもつため、ERGO によるけいれんの抑制作用は抗酸化作用を介している可能性がある一方、ERGO 投与により脳中 homostachydrine 濃度が低下したため homostachydrine の低下がけいれんの抑制につながった可能性も考えられる(図4)。ERGO は抗酸化作用と homostachydrine の低下作用の二つのメカニズムでてんかんに抑制的に働く可能性がある。ERGO 投与における副作用は今のところ報告されておらず、今後その有効性をさらに検証する必要がある。

【結論】

本研究により OCTN1 の遺伝子欠損が PTZ によるけいれんを抑制することを示した。またそのメカニズムとして新規 OCTN1 基質 homostachydrine がけいれん増悪物質として働く可能性を示した。OCTN1 の基質かつ阻害剤である ERGO が homostachydrine 濃度を低下させ、けいれんを抑制することも示した。本研究は、OCTN1 の抗てんかん薬ターゲットとしての可能性を提示する。今後は homostachydrine が PTZ によるけいれんを増悪させるメカニズムの解明や他のてんかんモデルを用いた検証、患者検体を用いた証明などを行い、OCTN1 の抗てんかん薬ターゲットとしての妥当性を検討していく必要がある。

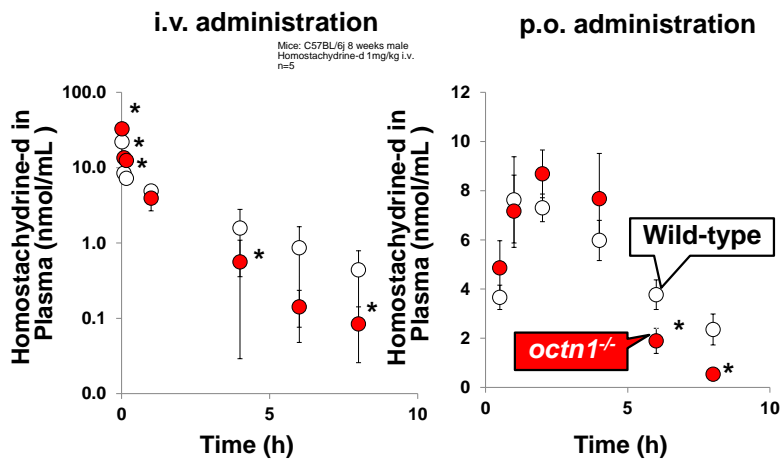


図3 homostachydrine-dの血漿中濃度推移

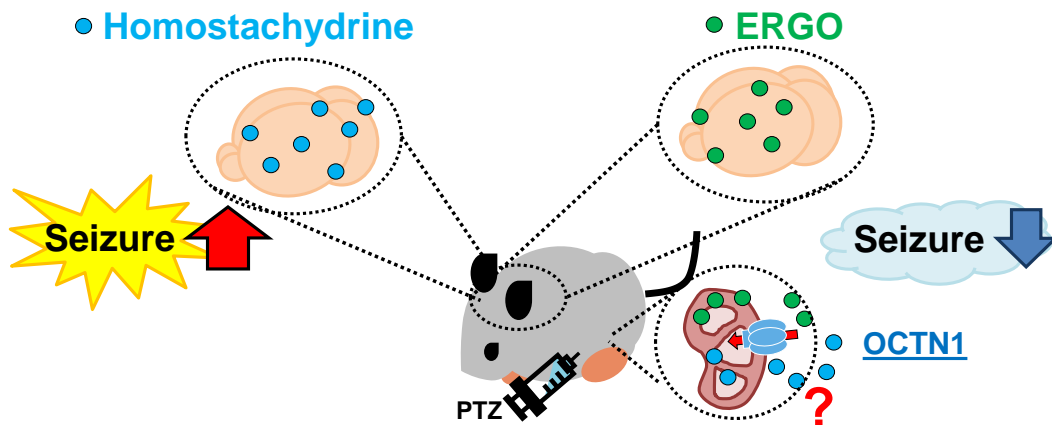


図4 HomostachydrineとERGOのPTZ誘発けいれんに対する影響

審査結果の要旨

てんかんは患者の約 20%が薬剤抵抗性を示すため、発症機序や薬剤標的分子の解明が課題である。本論文は、脳の神経細胞等に発現する膜輸送体 SLC22A4/OCTN1 に着目し、てんかんのけいれんや kindling のモデルである pentylenetetrazole (PTZ) 誘発けいれんマウスにおける役割解明を目指した。野生型(WT)と *octn1* 遺伝子欠損マウス (*octn1*^{-/-})に PTZ を単回ないし 2 回投与すると、WT ではけいれんが誘発され *octn1*^{-/-} では小さかった。神経興奮の指標となる遺伝子群や神経栄養因子の発現上昇も同様であったことから、けいれん発症の違いを裏付けた。さらに、PTZ の繰り返し投与で作製された kindling モデルでも、WT ではけいれんの増悪が見られたが、*octn1*^{-/-} ではほとんど見られなかった。両系統の違いを合理的に説明しうる OCTN1 の生体内基質探索のため、両系統の血漿と脳組織に含まれる低分子化合物を網羅的に探索したところ、血漿中や脳内濃度が *octn1*^{-/-}で低い食物由来 OCTN1 基質として homostachydrine が見出された。実際、homostachydrine の投与によって PTZ 誘発けいれんが増悪し、当該基質が OCTN1 欠損による PTZ 誘発けいれんの減少に少なくとも一部関与する可能性が示された。本論文は PTZ 誘発けいれんモデルに対し促進的に働く膜輸送体と食物由来基質を特定した点に新規性があり、創薬研究にも有益な知見と考えられるため、本論文が博士(創薬科学)論文に値すると判定された。