慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	アストロサイトによるin vivoケトン体生合成機構の解明
Sub Title	Elucidation of the mechanism of in vivo ketogenesis by astrocytes
Author	中原, 仁(Nakahara, Jin)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	神経疾患の治療や予防、或いは将来的な神経系の再生医療において、脳代謝の制御は重要な課題となる。昨今、脳の発生や再生、神経疾患の病態において、ケトン体が脳代謝の要として機能し、神経保護的に作用していることが示唆されている。他方、アストロサイトはケトン体代謝関連酵素を高率に発現し、in vitroにおいてケトン体を生合成することが示されている。本研究は主にin vivoにおけるケトン体生合成を軸とした、脳総体におけるアストロサイトの機能的意義の解明を通じてその医学的展開を目指すものである。本研究において、アストロサイトによるケトン体生合成をin vivoで評価する基盤となるモデルマウスを作出するべく、アストロサイト特異的にケトン体生合成を停止させたconditional KOマウス(conditional mitochondrial HMG-CoA synthase (HMGCS2) KOマウス)を作製した。現在同マウスの解析を進めており、アストロサイトの機能的意義の解明を進めている。
Notes	研究種目：若手研究(A) 研究期間：2010～2012 課題番号：22689028 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22689028seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2010～2012
課題番号：22689028

研究課題名（和文）　アストロサイトによるｉｎ　ｖｉｖｏケトン体生合成機構の解明

研究課題名（英文）　Elucidation of the mechanism of in vivo ketogenesis by astrocytes

研究代表者
中原　仁（NAKAHARA JIN）
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：60537950

研究成果の概要（和文）：神経疾患の治療や予防、或いは将来的な神経系の再生医療において、脳代謝の制御は重要な課題となる。昨今、脳の発生や再生、神経疾患の病態において、ケトン体が脳代謝の要として機能し、神経保護的に作用していることが示唆されている。他方、アストロサイトはケトン体代謝関連酵素を高率に発現し、in vitro においてケトン体を生合成することが示されている。本研究は主に in vivo におけるケトン体生合成を軸とした、脳総体におけるアストロサイトの機能的意義の解明を通じてその医学的展開を目指すものである。本研究において、アストロサイトによるケトン体生合成を in vivo で評価する基盤となるモデルマウスを作出するべく、アストロサイト特異的にケトン体生合成を停止させた conditional KO マウス（conditional mitochondrial HMG-CoA synthase (HMGCS2) KO マウス）を作製した。現在同マウスの解析を進めており、アストロサイトの機能的意義の解明を進めている。

研究成果の概要（英文）：Regulation of brain metabolism is critical in the treatment or prevention of neurological diseases or in future regenerative medicine in central nervous system. Recently, ketone bodies were shown to have a pivotal role in brain metabolism and act as a neuro-protectant during brain development, regeneration or in pathophysiology of neurological diseases. In the current research, we aim to elucidate the functional role of astrocytes, with a focus on their ketogenesis mechanism in vivo, in order to translate the research findings from bench to bedside. For this purpose, a conditional KO mice whom ketogenesis by astrocytes were specifically disturbed (conditional mitochondrial HMG-CoA synthase (HMGCS2) KO mice) were developed. The analysis of the mice is currently on-going for the elucidation of functional significance of astrocytes in CNS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
総　計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学
キーワード：神経分子病態学

１．研究開始当初の背景

脳神経疾患に因る障害を抱えた患者に対する現存治療法は乏しく、新規治療法の開発は神経学上の重要な課題である。ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞技術の応用として、外来性神経細胞を移植することによる神経再生が魅力的な戦略として台頭しており、その将来性には大きく期待される。しかしながら、脳神経系の構造的・機能的複雑さを鑑みるに、単に新しい神経細胞を移植するのみで自然と神経機能が再生すると期待するのは困難と申請者は考えている。脳神経系を解剖学的に俯瞰するならば、神経細胞は全体の 1 割を占めるに過ぎない存在である（Pfrieger FW *et al.* Cell **83**:671-4 (1995)）。無論神経機能上の神経細胞の重要性は言うを待たないが、一方で、残り 9 割をも占めるグリア細胞の存在は構造的にも機能的にも無視することができない。

グリア細胞のうち約 1/3 を占めるのは、オリゴデンドロサイトである。この細胞は神経軸策を髄鞘で被包する役割（髄鞘化）を担っており、この髄鞘化により跳躍伝導が可能になるばかりでなく、神経伝導に要するエネルギー量が大幅に節約できるようになる。逆にこのオリゴデンドロサイトや髄鞘が障害されれば、脳神経機能に深刻な影響が出ることは容易に想像される。髄鞘を失った神経軸策はエネルギー需給の不均衡も一因となって神経変性を起こすことが知られている（Waxman SG *et al.* Nat Rev Neurosci **7**:932-41 (2006)）。また更に昨今の解析では髄鞘の崩壊を主徴とする多発性硬化症などの古典的脱髄疾患に加えて、脳血管障害、アルツハイマー病、統合失調症などの、従来神経細胞固有の病態と考えられてきた脳神経疾患においてもオリゴデンドロサイトないし髄鞘の機能的異常が示唆されている（Fields RD. Trends Neurosci **31**:361-70 (2008)）。

これらを背景として、申請者は過去 10 年以上に渡り、その病態に脱髄が関与する上述の脳神経疾患の新規治療戦略としての髄鞘再生療法の開発に注力してきており、特に内在性に残存するオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）の薬剤による分化誘導を通じた再髄鞘化によって、脱髄神経伝導の再加速化や神経保護を可能にし、上記の多岐に渡る脳神経疾患に対する低侵襲性の再生医療を確立するべく研究を展開している（Nakahara J *et al.* Exp Opin Ther Targets: **13**:1375-1386 (2009)）。この過程で申請者は、内在性 OPC の分化誘導の基礎を確立し（Nakahara J *et al.* Dev Cell **4**:841-52 (2003)、Nakahara J *et al.* J Neuropathol Exp Neurol **65**:582-91 (2006)、Nakahara J *et al.* J Clin Invest **119**:169-181 (2009)、中原仁他. 日本国特許第 4214249 号 (2008)）、それら基礎研究に基づき医薬品の開発を既に開始している（(独)医薬基盤研究所・平成 21～23 年度「保健医療分野における基礎研究推進事業」・総括研究代表者中原仁）。

これら研究を進める中で、髄鞘の 80%を占める脂質が殆ど全て脳内で *de novo* 生合成されており、この過程が髄鞘化の律速段階となる事実が報告された（Saher G *et al.* Nat Neurosci **8**:468-75 (2005)）。この報告は、脳の発達段階では成長後の恒常状態とは異なる特殊な脳代謝条件が生じていることも示唆しており、これを受けて申請者は、仮に申請者の希求する上述の髄鞘再生医薬の臨床応用が予定通り進んだとしても、その新規医薬が最大の効果を発現するために必要な脳代謝条件が得られず、その効果が不十分に終わるのではないか、という新しい課題に直面した。

この課題は、現在当学が中心となって進行している、iPS 細胞などの幹細胞を用いた神経再生医療においても同様であると考えられる。即ち、移植細胞の分化成熟を助けるべく、被移植側の脳代謝条件がこれを支持できなければ（本来そういった未熟細胞が分化成熟するに適した、脳の発達段階の脳代謝条件を成体において再現できなければ）、好ましい結果は得られない可能性が高いと考えられる。或いはまた、生活習慣の変化や高齢社会の台頭に相まって増加している脳血管障害などの疾患の予防や治療においても同様に脳代謝制御は重要な課題である。

この新しい課題への取り組みの第一歩として、申請者は、脳総体として「再生に好ましい脳代謝条件」は脳の発達段階にその大きなヒントが隠されていると推定し、生後発達過程にある幼少期マウス脳（生後 7 日目）と、成体のマウス脳（生後数カ月）を、メタボローム解析（代謝物質の網羅的解析）に付した。結果、生後の発達過程において著増していたのは、解糖系代謝物質ではなくケトン体であった（ケトン体の一種である β-hydroxybutyrate（β-OHB）が約 6 倍脳内で増加していた（未発表データ））。また、成体に薬剤を用いて化学脱髄を起こさせ、その再髄鞘化過程（再髄鞘化に必要な細胞は多数残存しているが、この再生過程は生後発達段階での初期髄鞘化に比べて圧倒的に緩徐に進行する）に同様のケトン体が増加するかを確認したが、有意な反応は認められず、ケトン体の供給不足が律速段階になっている可能性が示唆された（未発表データ）。他方、in vitro のオリゴデンドロサイト培養時にケトン体を加えると、比較的低濃度（数 mM オーダー以下）でもその生存を助け、分化を促進させる結果が得られた（未発表データ）。

以上の予備実験データから、β-OHB を含む

ケトン体は脳の再生過程に寄与し得る重要な代謝物質であると想定された。ケトン体が脳にとって有意義な物質である証左は上記以外にも報告されている。例えば小児の難治性癲癇の治療として、1920 年代より血中ケトン体を 1mM 程度まで増加させる高脂質食（Ketogenic diet）は臨床応用されており（Zupec-Kania BA *et al.* Nutr Clin Pract **23**:589-96 (2008)）、β-OHB は Alzheimer 病および Parkinson 病モデルマウスで神経保護効果を示すこと（Kashiwaya Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA **97**:5440-4 (2000)）、動物の学習記憶を増強させること（Zou XH *et al.* Biomaterials **30**:1532-41 (2009)）などが示唆されている。また実際に Parkinson 病患者に対する高脂質食の Phase I 臨床試験が行われ、UPDRS スコアの改善を認めている（VanItallie TB *et al.* Neurology **64**:728-30 (2005)）。或いはまた Alzheimer 病患者に、血中 β-OHB を増加させる経口薬剤 AC-1202 を投与する Phase II 臨床試験が行われ、ADAS-Cog スコアの改善を認めている（Henderson ST *et al.* Nut Metab **6**:31 (2009)）。これらの作用機序の仮説として、β-OHB はブドウ糖に比して単位酸素消費量当たりのエネルギーが高く脳神経系を賦活化できる可能性があることなどが提示され（Gasior M *et al.* Behav Pharmacol **17**:431-9 (2006)）、或いは Bcl-2/Bax 比を調節することで直接神経細胞死を抑制することが示唆されているが（Cheng B *et al.* Auton Neurosci **134**:38-44 (2007)）、詳細は判明していない。

他方、一般にケトン体生合成は肝細胞のみで行われると理解されていたが、*in vitro* でアストロサイトは脂肪酸やロイシンから肝細胞に匹敵する量のケトン体を生合成することが示された（Auestad N *et al.* J Neurochem **56**:1376-86 (1991)、Bixel MG *et al.* J Neurochem **65**:2450-61 (1995)）。更にアストロサイトは脂肪酸からケトン体を生合成する際に律速となる CPT-I や HMG-CoA Synthase、Carnitine などを高率に発現することが示されている（Guzmán M *et al.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **70**:287-92 (2004)）。加えてこれら代謝経路が神経細胞やオリゴデンドロサイトに比して、圧倒的有意にアストロサイトで稼働していることがトランスクリプトームの比較で明らかになった（Cahoy JD *et al.* J Neurosci **28**:264-78 (2008)）。しかしながら、*in vivo* におけるアストロサイトのケトン体生合成の程度、或いはその生理的意義については明らかになっていない。脳の中で、絶対的少数の神経細胞や髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトは、謂わばアストロサイトの海に埋もれるような状態で存在している。しかるにアストロサイトのケトン体生合成を中心とする脳代謝制御機構の解明は生物学的のみならず医学的に大きな意義を持つ。

２．研究の目的

脳神経系再生医療において、或いは脱髄疾患や脳血管障害を含む多くの神経疾患の治療や予防において、脳代謝の制御は重要な課題である。ヒト脳を構成する細胞のうち、神経細胞は僅か 1 割に過ぎず、圧倒的大多数は脳代謝の要となるアストロサイトである。脳の発生や再生、神経疾患の病態において、ケトン体が脳代謝の要として機能し、神経保護的に作用することが昨今示唆されている。他方、アストロサイトはケトン体代謝関連酵素を高率に発現し、in vitro においてケトン体を生合成することが示された。本研究では主に in vivo におけるケトン体生合成を軸とした、脳総体におけるアストロサイトの機能的意義の解明を通じて、その医学的展開を目指す。

３．研究の方法

アストロサイトによるケトン体生合成の状況、或いはその機能的意義を解明するべく、アストロサイトによるケトン体生合成を in vivo で評価するための遺伝子改変マウスを作成する。具体的には、ケトン体生合成の律速酵素となっている、mitochondrial HMG-CoA synthase (HMGCS2)を、アストロサイトのみで欠損させた conditional KO マウスを、Cre-loxP 技術を使用して作成する。アストロサイト特異性を得るために市販の GFAP-Cre マウスを使用し、HMGCS2 を欠損させるべく、loxP-[mitochondrial HMG-CoA-synthase (HMGCS2)]-loxP マウスを本研究で新たに作成し、両者を掛け合わせることでアストロサイト特異的にケトン体生合成を停止させた conditional KO マウスとする。本マウスの解析によりアストロサイトのケトン体生合成にかかる機能的意義の解明を目指す。

４．研究成果

GFAP-Cre マウスは、米国 Jackson Lab.より輸入し、contamination を防ぐために胚移植による SPF 化を実施し、SPF 基準に適合する GFAP-Cre マウスとした。新たに作成する loxP-[mitochondrial HMG-CoA-synthase (HMGCS2)]-loxP マウスについては、定法により遺伝子改変用ベクターを構築、ES 細胞へエレクトロポレーションにて同遺伝子を導入し、組み換え ES 細胞を樹立した。正常胚とのアグリゲーションによりキメラマウスを作成し、キメラマウスの交配によりヘテロマウスを作成した。Germline transmission を確認し、Neo 配列の除去を FLP マウスを用いて実施し、Flox マウスを

作成した。GFAP-Cre マウスと Flox マウス（loxP-[mitochondrial HMG-CoA-synthase (HMGCS2)]-loxP マウス）を掛けあわせ、アストロサイト（GFAP 発現細胞）特異的に、ケトン体生合成を停止させた Conditional KO マウスを作成した（平成 24 年度）。現在その phenotype について詳細な解析を進めている。

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２件）

① Jin Nakahara, Michiko Maeda, Sadakazu Aiso, Norihiro Suzuki. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendrogliopathy. Clinic Rev Allerg Immunol 42:26-34 (2012). DOI 10.1007/s12016-011-8287-6 査読あり

② Jin Nakahara, Sadakazu Aiso, Norihiro Suzuki. Autoimmunity versus oligodendrogliopathy: The pathogenesis of multiple sclerosis. Arch Immunol Ther Exp 58:325-333 (2010). DOI 10.1007/s0005-010-0094-x 査読あり

〔学会発表〕（計６件）

① 中原仁、髄鞘化を促進する髄鞘脂質前駆体の探索－多発性硬化症の新規治療戦略開発を目指して、第 54 回日本神経学会総会、2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日、東京。

② Jin Nakahara 、Novel experimental remyelination therapy for multiple sclerosis 、Pan-Asian Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis、2012 年 9 月 13～15 日、中国・北京。

③ 中原仁、オリゴデンドロサイトパチーと新たな髄鞘再生戦略、第 53 回日本神経学会総会、2012 年 5 月 22～25 日、東京。

④ 中原仁、Research for the development of central nervous system remyelination medicines、第 88 回日本生理学大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011 年 3 月 28～30 日、横浜。

⑤ Jin Nakahara、Why remyelination fails in multiple sclerosis and how could we overcome?、NeuroTalk 2010、2010 年 6 月 25～28 日、シンガポール。

⑥ 中原仁、Blueprint for the development of remyelination medicines for multiple sclerosis、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 20～22 日、東京。

〔その他〕
http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/nakahara/

６．研究組織
(1)研究代表者
中原　仁（NAKAHARA JIN）
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：60537950