

—— 研究助成報告 ——

ケトン食による代謝変化の網羅的検討： 新たな創薬ターゲットを目指して

秋 山 麻 里

要旨：難治てんかんの一部にケトン食療法が有用であるが、その作用機序は十分解明されていない。本研究では、(1) ケトン食療法にともなう早期の代謝変化の網羅的検討、(2) ケトン食療法の有効性を事前予測可能な代謝物の探索、を目的とした。ケトン食療法を行った難治てんかん患者11例で、ケトン食開始前・導入直後の血漿および尿検体に対し、メタボローム解析（GC-MS/MS, LC-MS/MS）を行った。ケトン食療法開始後に有意に増加していた代謝物は、ケトン体、脂肪酸とその抱合産物、脂質が主体であったが、これらの上流に位置する中間代謝物の増加も認めた。今後、これらの物質の神経作用を検討することにより、新薬開発につながる事が期待される。一方、ケトン食開始3か月時点での発作減少率をもとに、有効例と無効例に分け、ケトン食開始前検体の代謝プロファイルの差異を検討したが、有意差のある代謝物は得られなかった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022；33：41-48

Key Words：難治てんかん、メタボローム解析、ケトン体、アミノ酸、有機酸

序論

従来の抗てんかん薬の作用機序は、イオンチャネルや興奮・抑制性神経伝達物質、シナプス伝達が主なターゲットであった。ところが、ケトン食による代謝変化に関する理論的考察を基に、乳酸脱水素酵素（LDH）阻害剤がてんかん発作抑制作用を示すことが近年報告された¹⁾。これにより、代謝を主なターゲットとした新規抗てんかん薬開発の可能性が示されたが、ケトン食療法による代謝の変化は幅広く、LDH阻害作用以外にも未知の作用機序が潜んでいるものと考えられる。

難治てんかんの一部にケトン食療法が有用であるが、その作用機序は十分解明されていない。また、ケトン食療法は患者と家族にとっては負担が強いため、有効性を事前に予測する手段があれば極めて有用と考えられる。さらに、ケトン食療法の有効例と無効例の間に代謝プロ

ファイルの差異が見つかれば、ケトン食の作用機序に関するヒントが得られる可能性もある。

本研究では、網羅的代謝物解析（メタボローム解析）を活用し、(1) ケトン食療法にともなう代謝変化の包括的検討、(2) ケトン食療法の有効性を事前予測可能な代謝物の探索、を目的とした。

方法

岡山大学病院または共同研究医療機関において、ケトン食療法を行った難治てんかん患者を被験者とし、血液と尿を採取した。検体採取時期は、ケトン食開始前、開始2～4週後、開始2～3か月後、開始半年後、開始1年後とした。本研究は岡山大学倫理委員会で承認済みである（承認番号：研1604-009）。

可能な限り食餌の影響を排除するために、検体採取前の絶食時間は原則4時間以上としたが、一部絶食時間が2～3時間の検体が含まれた。

血液検体は、EDTA-2Na試験管（株式会社SRL, PN5試験管）に採取後速やかに氷冷し、採取後2時間以内に $2000 \times g$, 4°C で20分間冷却遠心した。冷却遠心後の上清（血漿）を分注し、採取後4時間以内に凍結した。凍結温度が -70°C 以下のディープフリーザでなかった場合、採取後8時間以内にディープフリーザへ移動した。

尿検体は、採取後速やかに氷冷し、採取後2時間以内に $2000 \sim 3000 \times g$, 4°C で5分間冷却遠心した。冷却遠心後の上清を分注し、上記と同様に -70°C 以下で凍結した。

検体は岡山大学病院に集約したのち、東北大学東北メディカル・メガバンク機構にてメタボローム解析（GC-MS/MS, LC-MS/MS）を行った。

GC-MS/MS解析における検体の前処理方法はNishiumiらの方法²⁾に従い、分析機器はGC/MS TQ 8040（島津社製）を用いた。代謝物ピークは、代謝物に特異的なプリカーサーイオン、プロダクトイオン、保持時間データを利用して自動的に同定し、次いで手作業による確認を行った。本研究で用いた代謝物データベースには、333物質由来の475ピークが含まれている³⁾。

LC-MS/MS解析では、分析機器はACQUITY UPLC I-ClassおよびXevo TQ-XS（Waters社製）、測定キットはMxP[®]Quant 500（Biocrates社製）を用いた。本キットは最大630代謝物をターゲットとしている。

尿検体では、代謝物濃度のクレアチニン補正を行った。得られた血漿・尿の代謝物濃度データに対し、MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)を用いて統計解析を行った。

代謝物濃度データは正規性を増すために対数変換を行い、代謝物毎に平均値が0、分散が1になるようスケーリングを行った。二群間の差異の検討方法として、代謝物毎にノンパラメトリック単変量検定（対応のある場合はWilcoxon signed-rank test, 対応のない場合はMann-Whitney検定）を行い、検定の多重性を考慮してfalse discovery rate (FDR) < 0.05 の代謝物

を有意な変化をみとめた代謝物と判定した。次に、多変量解析として部分的最小二乗判別分析（PLS-DA）を行い、群間差に寄与する度合いの高い（variable importance for prediction [VIP] score ≥ 1.5 ）代謝物を決定した。

結果

ケトン食開始前と導入直後（開始2～4週後）の検体が得られた11症例を解析対象とした。ケトン食開始時年齢は、0歳8か月～17歳3か月（中央値3歳11か月）であった。てんかん病型は、West症候群が5例、Dravet症候群が3例、全般てんかん（特定のてんかん症候群に属さない）、Lennox-Gastaut症候群、焦点てんかん（特定のてんかん症候群に属さない）、が各1例であった。ケトン食開始3か月時点での、ベースライン（ケトン食開始前4週間）からの発作減少率は、著効（ $\geq 75\%$ ）が2例、有効（ $50 \sim 75\%$ ）が6例、無効（ $< 50\%$ ）が3例であった。発作抑制に至った症例はなかった。

■ケトン食による早期の代謝変化

まず、ケトン食による早期の代謝変化を検討するために、ケトン食開始前と導入直後（開始2～4週後）のペア検体を解析した。GC-MS/MSでは11例（22検体）を解析した。LC-MS/MSでは一例が解析に間に合わず、10例（20検体）を解析した。

血漿のGC-MS/MSデータでは、定量された165種の代謝物のうち11種が、単変量検定にて有意な変化を認めた（Wilcoxon signed-rank test, FDR < 0.05 ）（Tab. 1）。このうち、5種（3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、3-ヒドロキシイソ酪酸、アセチルグリシン、2-ヒドロキシ酪酸）で有意かつ2倍以上の増加、2種（グリオキシル酸、シスチン）で、有意かつ1/2以下への減少を認めた（Fig. 1）。一方、多変量解析（PLS-DA）では、前述の5種のほか、デカン酸、オクタン酸、シトラマル酸などが有意に増加（VIP score ≥ 1.5 ）していた（Fig. 2）。

尿のGC-MS/MSデータでは、定量された175種の代謝物のうち11種が、単変量検定にて有意な変化を認めた（Wilcoxon signed-rank test,

Tab. 1 ケトン食開始後に有意に変化した代謝物（血漿検体, GC-MS/MS解析）
 ケトン食開始後に増加している代謝物を太字で、その他はケトン食開始後に減少している代謝物を示す。（Wilcoxon signed-rank test, false discovery rate [FDR] <0.05）

	p value	$-\log_{10}(p)$	FDR
3-ヒドロキシ酪酸	0.000977	3.0103	0.026855
3-ヒドロキシイソ酪酸	0.000977	3.0103	0.026855
アセト酢酸	0.000977	3.0103	0.026855
アセチルグリシン	0.000977	3.0103	0.026855
グリオキシル酸	0.000977	3.0103	0.026855
ブシコース	0.000977	3.0103	0.026855
2'-デオキシウリジン	0.001953	2.7093	0.035807
2-ヒドロキシ酪酸	0.001953	2.7093	0.035807
シスチン	0.001953	2.7093	0.035807
シトラマル酸	0.00293	2.5332	0.043945
馬尿酸	0.00293	2.5332	0.043945

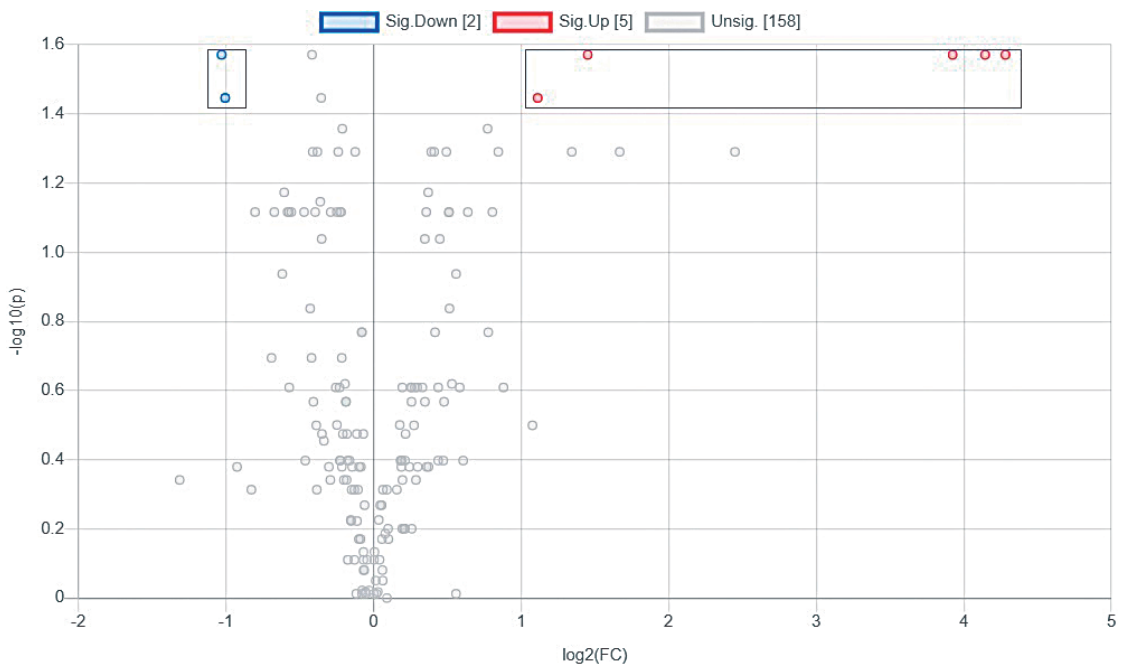


Fig. 1 ケトン食開始後の代謝物（血漿検体, GC-MS/MS解析）の変化
 Volcano plotで示す。X軸はFold change (FC) の二進対数表示, Y軸はp値の常用対数表示を表す。
 ケトン食前に比べ、開始後検体において、有意かつ2倍以上増加していた代謝物、および、有意かつ
 1/2以下に減少していた代謝物をそれぞれ四角で囲む。

FDR<0.05) (Tab. 2)。このうち6種で、有意
 かつ2倍以上の増加を認めた (Fig. 3)。増加し
 ていた代謝物の内訳は、血漿で有意に増加して
 いたものに加え、3-アミノイソ酪酸、3-ヒドロ

キシプロピオン酸が含まれた。一方、多変量解
 析 (PLS-DA) では、前述の6種のほか、2-アミ
 ノ酪酸、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸、3-
 ヒドロキシイソ吉草酸などが有意に増加してい

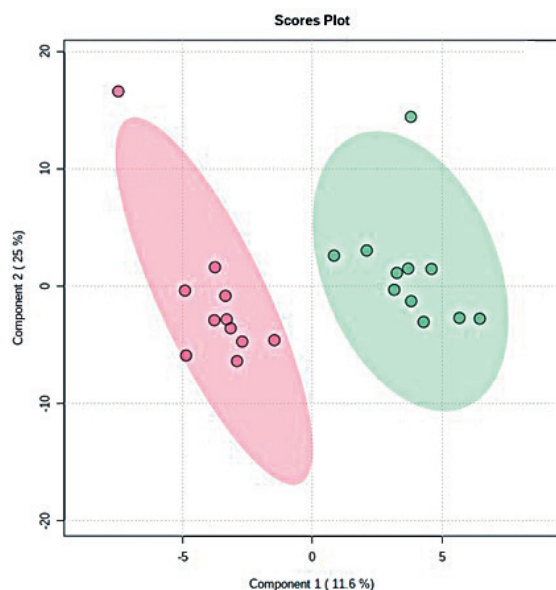


Fig. 2 ケトン食開始前・後の代謝物（血漿検体，GC-MS/MS解析）多変量解析（左）部分最小二乗判別分析（PLS-DA）。ケトン食前を緑，ケトン食開始後を赤で示している。二群は明確に分離されている。（右）群間差への寄与が大きい（VIP scores ≥ 1.5 ）代謝物を示す。ケトン食開始後に増加した代謝物を太字で，その他は減少した代謝物を示す。単変量検定と多変量解析で共通して上昇がみられた代謝物に★をつけた。

	VIP scores
★アセト酢酸	3.0944
★3-ヒドロキシイソ酪酸	2.9659
★3-ヒドロキシ酪酸	2.8056
デカン酸	2.5223
★アセチルグリシン	2.4502
★2-ヒドロキシ酪酸	2.2538
馬尿酸	2.0664
オクタン酸	2.0445
グルコサミン	1.9523
★シトラマル酸	1.9139
グリオキシル酸	1.8927
イソロイシン	1.8489
シスチン	1.8165
N-アセチルリジン	1.8079
ガラクトース	1.7379
マンニトール	1.7227
アジピン酸	1.7167
尿酸	1.6821

Tab. 2 ケトン食開始後に有意に変化した代謝物（尿検体，GC-MS/MS解析）
ケトン食開始後に増加している代謝物を太字で示す。（Wilcoxon signed-rank test, false discovery rate [FDR] < 0.05 ）

	p value	$-\log_{10}(p)$	FDR
2-ヒドロキシ酪酸	0.000977	3.0103	0.042725
3-ヒドロキシ酪酸	0.000977	3.0103	0.042725
3-ヒドロキシイソ酪酸	0.000977	3.0103	0.042725
アセチルグリシン	0.000977	3.0103	0.042725
3-アミノイソ酪酸	0.001953	2.7093	0.048828
3-ヒドロキシプロピオン酸	0.001953	2.7093	0.048828
グリセロール-3-リン酸	0.001953	2.7093	0.048828

た（Fig. 4）。

血漿のLC-MS/MSデータでは，定量された329種の代謝物のうち45種が，単変量検定にて有意に変化していた（Wilcoxon signed-rank test, $FDR < 0.05$ ）。単変量検定，PLS-DAの両方で有意に増加している代謝物は，大部分がトリグリセリド，ジグリセリドといった脂質類，

またはアシルカルニチン（3-ヒドロキシブチリルカルニチン，アセチルカルニチン，ステアロイルカルニチン）であった。また，3-アミノ酪酸の増加，および，シスチン，グルタミン酸といったアミノ酸の増減を認めた。

一方，尿のLC-MS/MSデータでは，定量された66種の代謝物のうち，有意に変化している

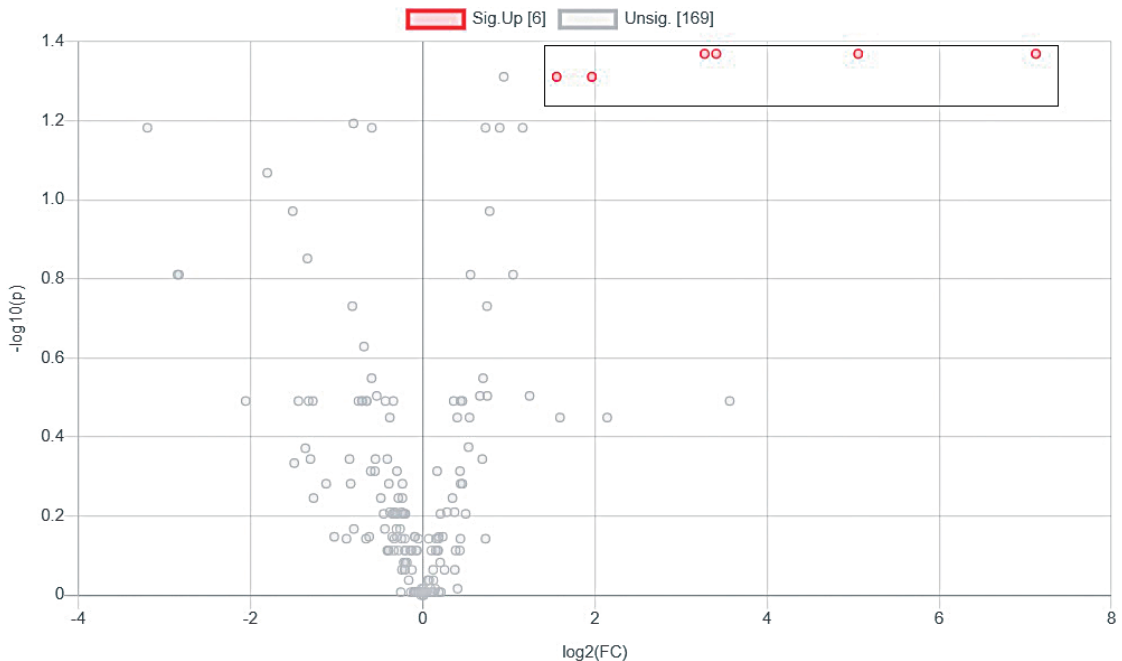
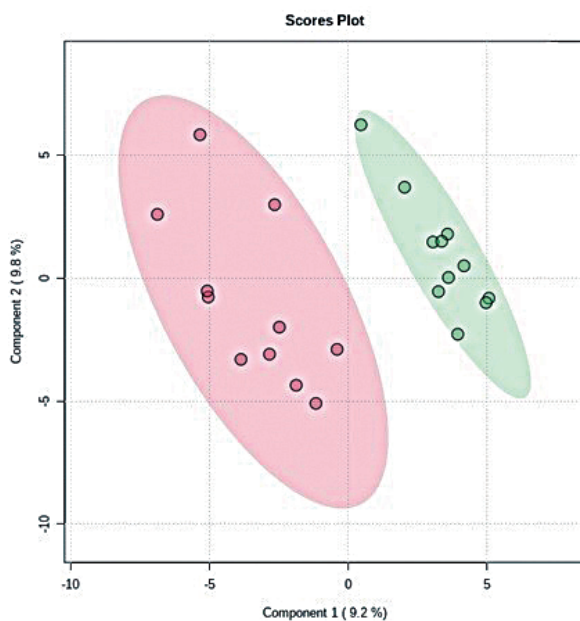


Fig. 3 ケトン食開始後の代謝物（尿検体，GC-MS/MS解析）の変化
Volcano plotで示す。X軸はFold change (FC) の二進対数表示，Y軸はp値の常用対数表示を表す。
ケトン食前に比べ，開始後検体において，有意かつ2倍以上増加していた代謝物を四角で囲む。



	VIP scores
★3-ヒドロキシ酪酸	3.5133
★3-ヒドロキシイソ酪酸	3.2782
★アセチルグリシン	2.8968
★2-ヒドロキシ酪酸	2.8889
カテコール	2.527
タガトース	2.2786
2-アミノピメリン酸	2.1592
クエン酸	2.0698
★3-アミノイソ酪酸	1.9569
マンニトール	1.9224
★3-ヒドロキシプロピオン酸	1.9216
グルコース	1.9026
2-アミノ酪酸	1.8904
セバシン酸	1.8172
グリセリン酸	1.8167
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸	1.7915
スベリン酸	1.6749
3-ヒドロキシイソ吉草酸	1.5218
酒石酸	1.5059
3-ヒドロキシアントラニル酸	1.504

Fig. 4 ケトン食開始前・後の代謝物（尿検体，GC-MS/MS解析）多変量解析
（左）部分最小二乗判別分析（PLS-DA）。ケトン食前を緑，ケトン食開始後を赤で示している。二群は明確に分離されている。（右）群間差への寄与が大きい（VIP scores ≥ 1.5 ）代謝物を示す。ケトン食開始後に増加した代謝物を太字で，その他は減少した代謝物を示す。単変量検定と多変量解析で共通して増加がみられた代謝物に★をつけた。

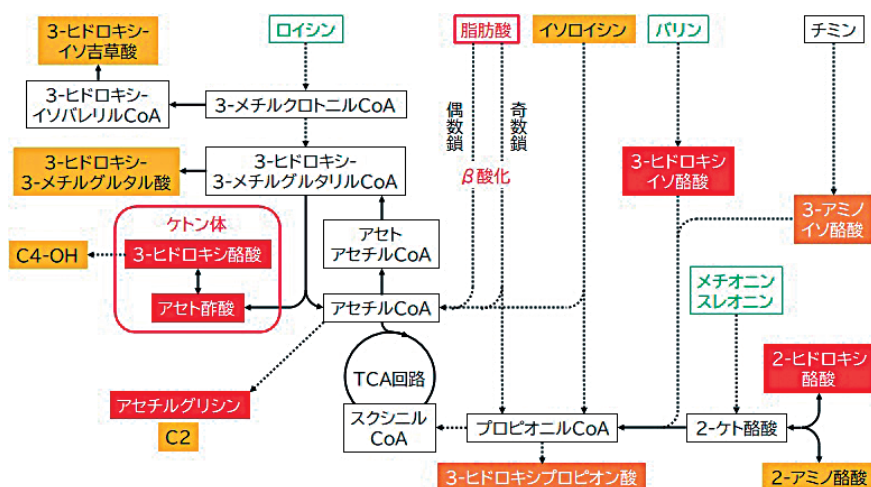


Fig. 5 ケトン食後に増加していた代謝物のまとめ

赤：単変量検定と多変量解析の両方で有意差が検出されたもの（血漿と尿両方）
 濃いオレンジ：単変量検定と多変量解析の両方で有意差が検出されたもの（尿のみ）
 薄いオレンジ：単変量または多変量解析で有意差が検出されたもの（血漿または尿）
 緑：有意差が検出されなかったもの 黒：測定対象外
 C4-OH, 3-ヒドロキシブチリルカルニチン；C2, アセチルカルニチン

代謝物は3-アミノ酪酸のみであった。

■有効例と無効例の開始前検体の代謝プロファイルの差異

ケトン食開始3か月時点での、ベースライン（ケトン食開始前4週間）からの発作減少率をもとに、有効例（発作減少率50%以上）と無効例（発作減少率50%未満）に分け、ケトン食開始前検体の代謝プロファイルの二群間の差異を検討した。

ケトン食開始後3か月の時点の有効例は8例、無効例は3例であった。血漿、尿検体のいずれの解析においても、二群間で差異のある代謝物は得られなかった。

考察

ケトン食開始前に比べて、開始後検体で有意に増加していた代謝物について考察する（Fig. 5）。

まず、ケトン体である3-ヒドロキシ酪酸とアセト酢酸、および、各種脂肪酸の増加を認めたが、これらはケトン食開始による当然の変化といえる。

アセチルグリシン、アセチルカルニチンが増加していることから、アセチルCoA増加が推察される。これは、低炭水化物の状況下で大量に脂肪酸が供給されるため、脂肪酸のβ酸化が亢進した結果と考えられる。同様に、β酸化亢進により、奇数鎖脂肪酸由来のプロピオニルCoAが増加したと推察され、結果的に3-ヒドロキシプロピオン酸が増加したと考えられた。

また、脂肪酸のβ酸化が亢進した結果、アセチルCoAが増加し、アセチルCoAからアセトアセチルCoA、3-ヒドロキシ-メチルグルタリルCoAを経て、ケトン体産生に向かう。3-ヒドロキシ酪酸より3-ヒドロキシブチリルカルニチンが産生されて増加したと考えられた。また、3-ヒドロキシ-メチルグルタリルCoAが増加した結果、3-ヒドロキシ-メチルグルタル酸が増加したと考えられた。

さらに、3-ヒドロキシイソ吉草酸の増加を認めた。これは、ケトン性アミノ酸であるロイシンの代謝経路において、中間代謝物である3-ヒドロキシ-メチルグルタリルCoAが著増したために、すぐ上流の3-メチルクロトニルCoAも増加し、別経路の3-ヒドロキシイソバレリルCoA

を経て3-ヒドロキシイソ吉草酸の増加に至ったと考えられた。

前述のとおり、脂肪の β 酸化亢進によりプロピオニルCoA増加が推察されるが、その結果として、プロピオニルCoAに至るバリンやチミンの中間代謝物である3-ヒドロキシイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸が増えたと考えられた。同様の機序で、2-ケト酪酸の増加が推測され、結果としてその上流にある2-ヒドロキシ酪酸、2-アミノ酪酸が増加したと考えられた。

以上より、ケトン体や脂肪酸以外で、ケトン食開始後に有意に増加していた代謝物は、3-ヒドロキシイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-ヒドロキシ酪酸、2-アミノ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸、3-ヒドロキシイソ吉草酸であり、2-ケト酪酸の増加も推測された。これらは分岐鎖アミノ酸の分解産物、 γ -アミノ酪酸(4-アミノ酪酸)・乳酸(2-ヒドロキシプロピオン酸)・ピルビン酸(2-ケトプロピオン酸)などの類似物質であるが、これらの抗てんかん作用はこれまで十分検討されていない。Kadowakiらは2-ケト酪酸が興奮性シナプス後電流を抑制することを報告している⁴⁾。今後、これらの代謝物の神経作用を検討することにより、新薬開発につながる可能性があり、期待される。なお、ケトン食後に減少した代謝物については、今後意味合いを検討予定である。

一方、有効例と無効例の比較では、症例数が少なく、かつ、有効例が多数を占めたため、二群間で有意差を認める代謝物はみつからなかった。

今後は、3か月以上ケトン食を継続し、中～長期検体が得られている症例の代謝変化を解析・検討する予定である。また、本研究を継続し、症例を増やすことにより、有効例・無効例に代謝プロファイルに差がでるか引き続き検討したい。

おわりに

本研究では、ケトン食療法開始前後のヒト臨床検体(血漿、尿)を対象としたメタボローム解析を活用し、(1)ケトン食療法にともなう代

謝変化の包括的検討、(2)ケトン食療法の有効性を事前予測可能な代謝物の探索、を行った。ケトン食療法にともなう早期の代謝変化として、従来知られていた脂質類とケトン体の変化のみならず、分岐鎖アミノ酸の分解産物や γ -アミノ酪酸・乳酸・ピルビン酸などの類似物質にも変化がみとめられ、今後神経作用の検討候補になり得ると考えられた。ケトン食療法の有効性の事前予測については、症例数が少なく、かつ有効例に偏っていたため、結果が得られなかった。

謝辞

すべての検体のメタボローム解析をしていた帝京大学薬学部臨床分析学(元東北大学東北メディカル・メガバンク機構)三枝大輔先生、また、本研究に参加いただいたすべての患者さん、先生方に厚く御礼を申し上げます。最後に、研究助成を頂きました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に心より御礼申し上げます。

文献

- 1) Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T. Epilepsy treatment. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* 2015 ; **20** : 1362-7.
- 2) Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, Yoshie T, Kibi M, Izumi Y, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One* 2012 ; **7** : e40459.
- 3) Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, Unno Y, Sakai T, Okamoto K, et al. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget* 2017 ; **8** : 17115-17126.
- 4) Kadowaki A, Sada N, Juge N, Wakasa A, Moriyama Y, Inoue T. Neuronal inhibition and seizure suppression by acetoacetate and its analog, 2-phenylbutyrate. *Epilepsia* 2017 ; **58** : 845-857.

