

機関番号：37111  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790255  
 研究課題名（和文）  
 代謝センサー分子 AMPK に着目した統合失調症治療薬誘発エネルギー代謝異常発現機序  
 研究課題名（英文）  
 A role for AMP-activated protein kinase in the mediation of metabolic disturbances induced by olanzapine  
 研究代表者  
 山内 淳史（YAMAUCHI ATSUSHI）  
 福岡大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：90341453

## 研究成果の概要（和文）：

非定型抗精神病薬オランザピン（OLA）は統合失調症治療において有用であるが、代謝性有害作用が頻発することが問題となっており、発現機序解明が急務である。本研究では代謝センサー分子 AMPK に着目し、以下の成果を得た。（1）OLA は視床下部 AMPK の活性化および摂食関連神経ペプチドを介して、食欲増進、体重増加作用を示す。（2）OLA は肝グリコーゲン分解促進および合成阻害により高血糖を惹起する。（3）OLA による脂質増加作用には AMPK-SREBP 経路が関与している。これらの成果は OLA 誘発代謝性有害作用回避対策を構築する上で、重要な基礎情報を提供するものである。

## 研究成果の概要（英文）：

Olanzapine (OLA) is known to be advantageous with respect to outcome and drug compliance in patients with schizophrenia. However, OLA has unwanted effects, including a higher incidence of weight gain and metabolic disturbances. In this study, we demonstrated that (1) neuropeptides-mediated activation of hypothalamic AMPK and subsequent enhancement of orexigenic signal may mediate hyperphagia and weight gain induced by chronic treatment with OLA, (2) OLA enhanced glycogenolysis in hepatocyte contributes to the development of hyperglycemia, (3) AMPK-SREBP pathway is responsible for OLA-induced hyperlipidemia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：抗精神病薬、副作用、代謝異常、AMPK

## 1. 研究開始当初の背景

非定型抗精神病薬は、統合失調症の陽性症状だけでなく従来の定型抗精神病薬では治療困難な陰性症状にも効果を示す。さらに抗

ドパミン作用に起因する錐体外路症状が少ないことが特徴で、統合失調症治療は非定型抗精神病薬を中心に据える治療へと変化しつつある。しかし非定型抗精神病薬は、有効

性、治療継続性、錐体外路症状の発現低減の点で優れているが、体重増加、糖代謝および脂質代謝異常といったエネルギー代謝の副作用発現率が高い。本邦においても、2002年、オランザピン治療開始後、糖尿病性ケトアシドーシスによる2例の死亡例が報告され、緊急安全性情報が発表された。同時期にクエチアピン、ペロスピロン、リスベリドンについても糖代謝異常の安全性情報が発表されている。

以上、今後主流となる非定型抗精神病薬の治療の成否は、エネルギー代謝異常の副作用管理が鍵となる。代謝異常の危険因子として、糖尿病既往あるいは家族歴、肥満などが挙げられているが、発現機序は全く不明である。

そこで申請者らは、このエネルギー代謝異常の発現機序を明らかとし、それに基づく副作用管理法構築の端緒を開くべく本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

AMPK (AMP 活性化プロテインキナーゼ) は“fuel gauge”と呼ばれ、細胞内のエネルギー代謝を調節するセンサーとして機能することが明らかとなってきた。AMPK は細胞内 AMP/ATP 比を監視し、エネルギー低下状態で活性化して下流のエネルギー産生系のシグナルを増強する。末梢においては、糖取り込み亢進、解糖系・脂肪酸酸化の促進によるエネルギー産生、視床下部摂食中枢においては、食欲増進を惹起する。これらの機能は糖尿病や脂質代謝異常の成因として注目を集めており、創薬の標的分子の1つとなっている。

そこで申請者は、以下の仮説を立案した。

- i. 非定型抗精神病薬は AMPK の活性化を直接的あるいは間接的に抑制する。
- ii. 末梢では、GLUT 輸送能の低下、SREBP1c の活性化、インスリンシグナルの減弱などをもたらす、血糖値上昇、脂肪蓄積、インスリン抵抗性が発現する(末梢エネルギー過剰)。
- iii. 中枢では、血液脳関門での AMPK 抑制が GLUT1 機能低下によるグルコース脳内移行障害をもたらす、視床下部のエネルギー低減化および AMPK 活性化を惹起し、食欲増進がおこる(中枢エネルギー微調節障害→微細低減化)。
- iv. 中枢エネルギーの微減化による食欲増進・肥満は末梢エネルギー過剰状態を増悪し、エネルギー代謝異常が成立する。

本研究は、この仮説に基づき、非定型抗精神病薬が AMPK を中心としたエネルギー代謝機能分子に及ぼす影響を明らかにし、新たなエネルギー代謝異常成立機構を提案する

ことで、副作用回避・軽減策の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット体重・摂食量に及ぼす影響および視床下部 AMPK 活性化状態の解析

実験には6週齢の Sprague Dawley 系雌性ラットを用いた。2mg/kg の OLA (OLA 群)、または蒸留水 (control 群) を2週間連続して経口投与した。連続投与開始前、投与開始後1、2週間後に経口糖負荷試験 (OGTT) を行った。連投期間中1日1回、各ラットの体重・摂食量を測定した。

2週間投与後に視床下部を採取し、ウエスタンブロット法を用い AMPK のリン酸化状態を測定した。

### (2) 視床下部細胞 GT1-7 を用いた摂食関連神経ペプチド mRNA 発現量に及ぼす影響

GT1-7 cell (マウス視床下部由来の不死化神経培養細胞) は通常培地(10%FBS-DMEM)、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で継代培養し、細胞を維持した。

6well プレートに細胞 (10x10<sup>4</sup> cells/2ml) を播種し(細胞を採取する72hr前)、任意の濃度の OLA を10min、30min、60min、24hr、48hr 処理 (OLA 処理群) した。

細胞内 AMPK および ACC タンパク質量は、ウエスタンブロット法にて測定した。また、AgRP、POMC 遺伝子発現量は全 RNA を RNeasy Mini Kit を用いて精製し、Real-Time RT-PCR 法にて測定した。

### (3) 肝グリコーゲン代謝に及ぼす影響

実験にはヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いた。グリコーゲン分解実験は、まず培地中に D-[U-<sup>14</sup>C] glucose を添加後24時間培養し RI ラベル化グリコーゲンを合成した。グルコースを含まない緩衝液で3時間培養した後、細胞を溶解し細胞中に残存するグリコーゲンをエタノールで沈殿させ、放射活性を測定した。合成終了2時間前に任意の濃度の OLA を添加し、約5時間処理を行った。グリコーゲン合成実験は、培地中に D-[U-<sup>14</sup>C] glucose を添加後、3時間培養しグリコーゲンを合成した。分解実験と同様に、細胞中のグリコーゲンの放射活性を測定した。

### (4) 肝脂質代謝に及ぼす影響

(3) と同様に実験にはヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いた。OLA を1~25μM 濃度になるように調整して添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で24時間毎に溶液を交換し24、48時間培養した。

それぞれの時間に、Oil-red O 染色を用い細胞内脂質の量を測定した。また、Western blot 法を用い AMPK、ACC のリン酸化状態および SREBP-1 タンパクの発現量を求めた。

#### 4. 研究成果

(1) ラット摂食量および体重ともに Control 群と比較して OLA 群は有意に増加した (図 1 A-D)。このときのラット視床下部リン酸化 AMPK 量は、OLA 群で有意に上昇していた (図 2)。

(2) OLA 処理群のリン酸化 AMPK タンパク質量は、対照群と比較して、24hr、48hr で有意に増加した。同様にリン酸化 ACC タンパク質量も 48hr 処理で有意に増加した。また OLA 処理 48 時間では、摂食亢進ペプチド AgRP 遺伝子発現量が増加し、摂食抑制ペプチド POMC 遺伝子発現量が減少していた。

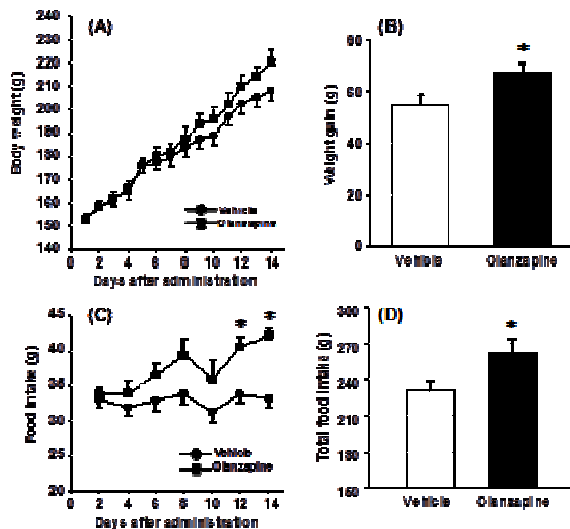


図1 ラット体重および摂食量に及ぼす OLA の影響

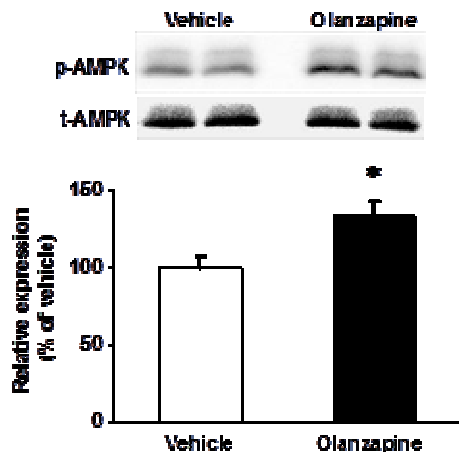


図2 視床下部リン酸化 AMPK 量に及ぼす影響

(3) HepG2 に OLA を任意の濃度で 5 時間処理した際の細胞内グリコーゲン量は control 群と比較して用量依存的に減少した。グリコーゲン合成量は control 群と比較して insulin 処理により有意に増加した。この insulin 依存的グリコーゲン合成は、OLA 処理により有意に抑制された。また OLA 単独処置では control 群と比較して差は認められな

かった。

(4) HepG2 に OLA を任意の濃度で 48 時間処理した際の細胞内脂質の量は control 群と比較して OLA 25 $\mu$ M において有意に増加した (図 3)。AMPK のリン酸化タンパクは control 群と比較して OLA 処理において有意に減少した (図 4)。また SREBP-1 タンパクは control 群と比較して有意に増加した (図 5)。

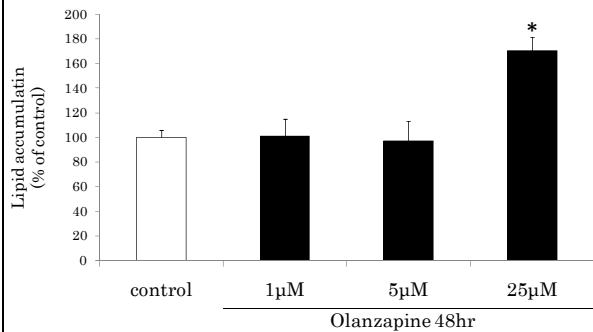


図3 肝細胞内脂質蓄積量に及ぼす影響

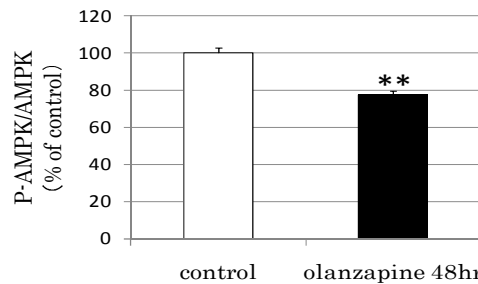


図4 肝リン酸化 AMPK 量に及ぼす影響

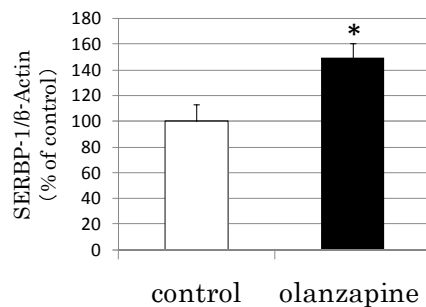


図5 肝 SREBP-1 量に及ぼす影響

以上、当初の仮説とは異なり、OLA は中枢で AMPK 活性上昇による摂食促進を、また末梢では AMPK 抑制による脂質蓄積を惹起していることが示唆された。OLA の作用が臓器特異的である点は、今後の検討課題である。本研究では、OLA 誘発代謝異常の責任分子として AMPK の関与を明らかにし、今後の副作用対策を構築する上で重要な実験証拠を提出した点において意義深いものである。

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 1 件)

① Ei Sejima, Atsushi Yamauchi et al. A role for hypothalamic AMP-activated protein kinase in the mediation of hyperphagia and weight gain induced by chronic treatment with olanzapine in female rats. Cellular and Molecular Neurobiology 2011 査読有 (in press)

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 三根真悟、植松大智、中釜健吾、勢島英、西奥剛、首藤英樹、山内淳史、片岡泰文. 視床下部由来神経細胞 GT1-7 の摂食関連神経ペプチドに対するオランザピンの影響. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 (誌上開催) 横浜

② 江口清子、植松大智、勢島英、大島優、首藤英樹、山内淳史、片岡泰文. AMPK-SREBP 経路を介した抗精神病薬オランザピンの肝細胞脂質代謝への影響. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 22 日 (誌上開催) 横浜

③ 中釜 健吾、山内淳史 他 オランザピンによる体重・摂食量増加作用における視床下部 AMPK 活性の役割 第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年 3 月 18 日 大阪

④ 藤本 景一、山内淳史 他 HepG2 細胞のグリコーゲン代謝に及ぼすオランザピンの影響 第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年 3 月 17 日 大阪

⑤ A Yamauchi et al. Effect of Olanzapine on Glucose Transport System in 3T3-L1 Adipocytes. アジア神経精神薬理学会 (AsCNP) 2009 年 11 月 13 日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 淳史 (YAMAUCHI ATSUSHI)  
福岡大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90341453

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：