

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年05月31日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791308

研究課題名（和文）非定型抗精神病薬の神経突起促進作用に関する研究

研究課題名（英文）Study on potentiation of neurite outgrowth by an atypical antipsychotic

研究代表者

石間 環 (ISHIMA TAMAKI)

千葉大学・社会精神保健教育研究センター・特任研究員

研究者番号：00597130

研究成果の概要（和文）：アリピプラゾールは PC12 細胞において濃度依存的に神経成長因子（NGF）によって誘発された神経突起伸長を促進した。5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 は、アリピプラゾールの作用を一部ブロックした。ドパミン D₂ 受容体アンタゴニストであるスルピリドではこの効果はなかった。いくつかの一般的なシグナル経路の阻害剤も、アリピプラゾールの作用をブロックした。プロテオミクス技術を用いたところ、アリピプラゾールは培養細胞で熱ショックタンパク質 Hsp90 α のレベルをかなり上昇させることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Aripiprazole significantly potentiated nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth in PC12 cells, in a concentration-dependent manner. The 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635, but not the dopamine D₂ receptor antagonist sulpiride, blocked the effects of aripiprazole, although, only partially. Specific inhibitors of several common signaling pathways also blocked the effects of aripiprazole. Using proteomic analysis, we found that aripiprazole significantly increased levels of the heat shock protein Hsp90 α in cultured cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

1. 研究開始当初の背景

PC12 細胞は神経成長因子（NGF: nerve growth factor）を添加することにより、神経に分化し、神経突起を伸ばす事は古くから知られており、国内外で多くの研究者が神経可塑性（神経突起作用）の研究に使用してい

る。代表研究者は、精神神経疾患の治療薬として使用されている抗うつ薬フルボキサミンおよび認知症治療薬ドネペジルが NGF 誘発神経突起作用を増強する事を見出し、これらの作用に小胞体に存在するイノシトール 3 リン酸受容体（IP₃ 受容体）や細胞内の多くのシ

グナル伝達系が重要な役割を果たしている事を報告した。また、精神神経疾患の治療薬として期待されている第二世代抗生物質ミノサイクリンに NGF 誘発神経突起促進作用があることを見出したが、他の第二世代抗生物質テトラサイクリンにはこのような作用は無い事を報告した。さらに、最新のプロテオミクス技術を用いて、両剤によって発現が異なるタンパクを探索したところ、タンパク合成に関わる翻訳開始因子が重要な役割を果たしている事を発見した。

一方、アリピプラゾールは世界中で使用されている非定型抗精神病薬の一つであり、他の非定型抗精神病薬がドパミン受容体とセロトニン受容体を拮抗する作用を有するのに対して、アリピプラゾールはドパミン受容体に対して部分アゴニストとして作用している。近年、海外において統合失調症以外の多くの精神神経疾患（気分障害、ADHD、発達障害など）への適応が進められているが、本薬剤の詳細な作用メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

これまでの研究成果（精神神経疾患治療薬と神経突起促進作用）を踏まえて、非定型抗精神病薬アリピプラゾールの神経突起促進作用の細胞内シグナル伝達系の詳細なメカニズムを解明し、精神神経疾患の新しい治療ターゲットを探索する事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

PC12 細胞はラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (pheochromocytoma) 由来で、NGF によって交感神経様に分化し、分化・突起伸展のモデル細胞として幅広く用いられている細胞である。通常の PC12 の状態では、丸い形の細胞が多いが、ここに NGF を添加すると、

neuronal differentiation と neurite outgrowth を起こして、神経突起が伸びることが知られている。

実験プロトコルは、はじめに細胞をまいて、その 24 時間後に培地交換を行った。NGF とさまざまな薬剤を加えたものと培地交換を行った。NGF は高濃度だと神経突起を伸ばすが、今回の研究ではアリピプラゾールの効果を評価する目的で、極めて低濃度の 2.5ng/ml の NGF を添加した。NGF が存在しないと細胞は分化しない。

さらに 4 日後に神経突起伸長を有する細胞数を数える。細胞体の直径よりも神経突起を伸ばした細胞を、神経突起伸長を起こした細胞として数え、さらに全体の細胞数を数えて割合を出した。

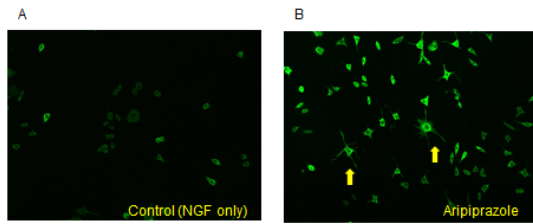
次に RNA interference (RNAi) 実験の場合、まず細胞をまいた 24 時間後に small interfering RNA (siRNA) を transfection させた。siRNA とは低分子の二本鎖 RNA で、これは RNA 干渉、RNAi と呼ばれる現象に関与しており、mRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制するものである。この transfection に 4~6 時間かかるので、そのあと培地交換を行った。このときに少量の NGF とアリピプラゾールを加えた培地と交換し、同様に 4 日後に細胞数を数えた。

4. 研究成果

MAP-2 (Microtubule-Associated Protein-2) の免疫細胞化学を実施した結果、アリピプラゾールを添加すると、神経突起を伸ばした細胞が著明に増加することが観察された(図 1)。

次に、アリピプラゾールが濃度依存的に神経突起を伸ばすかどうかを実験した。アリピプラゾールは濃度依存的に神経突起を有する

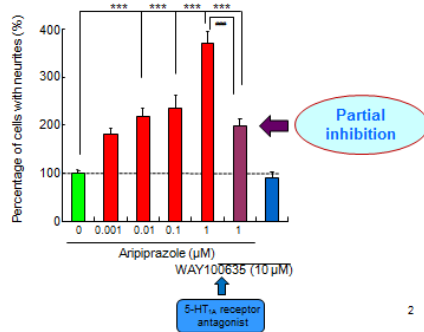
図1 Representative photographs of MAP-2 immunocytochemistry in PC12 cells



1

細胞を増加した。5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストである WAY-100635 を添加すると、アリピプラゾールの効果が阻害された。コントロールと比較すると完全に 100%には戻っておらず、5-HT_{1A} 受容体を介する効果は部分的であった (図 2)。

図2 Role of 5-HT_{1A} receptor on the potentiation of NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by aripiprazole

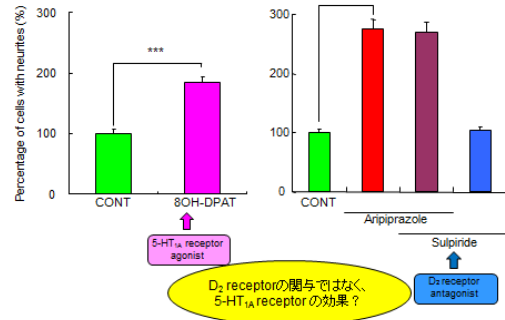


2

さらに、5-HT_{1A} アゴニスト 8-OH-DPAT を加えて実験を行った。8-OH-DPAT はコントロールに対して約 200%弱、神経を伸ばした。一方、ドパミン D₂ 受容体アンタゴニストであるスルピリドを加えて実験した。まずコントロールに対してアリピプラゾール単独では神経突起を伸ばしたが、これにスルピリドを加えても何の変化もみられなかった。スルピリド単独でも特に神経を伸ばすことも無かったため、アリピプラゾールの神経突起促進作用は、D₂ 受容体の関与ではなく 5-HT_{1A} 受容体が関与していることが示唆された (図 3)。

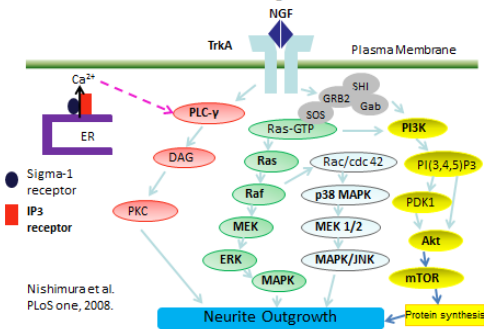
さらに詳細なメカニズムを調べるために、細胞内シグナル経路について調べた。

図3 Effects of 5-HT_{1A} receptor agonist and dopamine D₂ receptor antagonist on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells



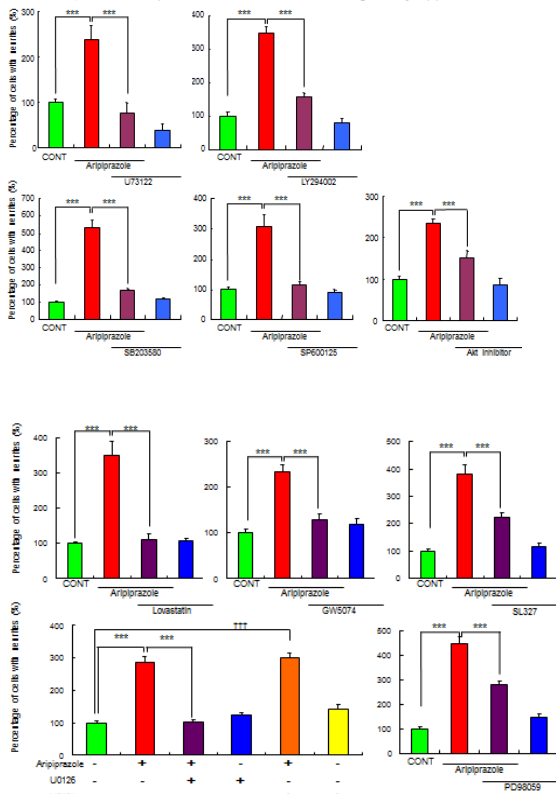
NGF は TrkA という受容体に結合し、様々な経路を通して最終的に神経突起を伸ばすのではないかとされている (図 4)。

図4 Cellular signaling pathway for NGF-induced neurite outgrowth



まず、PLC-γ, PI3K, p38MAPK, JNK, Akt の関与について調べた。細胞内の選択的な阻害薬によってアリピプラゾールの効果が阻害されたが、阻害薬単独では影響を与えなかった。また、同様に Ras, Raf, MEK1/2, MAPK についても調べた。アリピプラゾール単独では神経突起をそれぞれ伸ばしたが、それぞれの阻害剤を加えたものは、その効果が阻害された。U0124 は U0126 と、ほとんど同じ構造の物質であるが、MAPK に対する阻害作用を持たない薬剤である (図 5)。さらに近年、難治性のうつ病に即効性抗うつ効果があるといわれているケタミンの効果には mTOR が重要であるという報告があるので、mTOR の関与について調べた。mTOR の選択的な阻害剤としてラパマイシンを用いた。アリピプラゾールでは神経突起が伸びたが、ラパマイシンを加え

図5 Effects of the specific inhibitors of PLC- γ , PI3K, p38MAPK, JNK, AKT, Ras, Raf, MEK1/2, and MAPK on potentiation of NGF-induced neurite outgrowth by aripiprazole



たときはその効果が阻害された。しかし、ここではコントロールに対して完全には効果が100%まで戻っていないため、アリピプラゾールの作用には、一部 mTOR 系が関与していることが示唆された。

さらに小胞体の IP₃ 受容体が神経突起伸長に際して重要な役割を持つことが報告されているので、IP₃ 受容体アンタゴニストである Xestosponginc と 2-APB を用いて調べた。アリピプラゾールでは神経突起を伸ばしたが、その阻害剤ではその効果が阻害された。

mTOR の下流では蛋白合成が起こり、最終的に神経突起伸長が起こるのではないかと考えられている。さらに具体的にどのような蛋白質が合成されているのか、次にプロテオミクス技術を用いて新規ターゲットを探索した。二次元電気泳動でアリピプラゾールを加えた細胞とそのコントロール細胞に関して、両者を比較して蛋白質発現が 2.7 倍異なる Spot を見つけた。この Spot を切り出して PMF

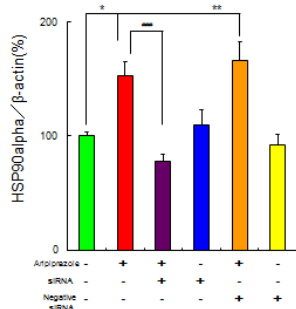
分析を行ったところ、この Spot が Heat Shock Protein (HSP) の 90 α だということが判明した。HSP とは、熱ストレスや薬剤などの刺激にさらされたときに発現が上昇し、細胞を保護する分子シャペロンの一類である。

HSP ファミリーには HSP60, HSP70, HSP90 などがある。中でも HSP90 は、厳選された蛋白質だけを対象にし、蛋白質の成熟を助ける分子シャペロンの一つである。HSP90 には、HSP90 α と HSP90 β という二つのアイソフォームが存在し、アミノ酸配列の相同性は高いが、刺激に対する反応性は若干異なる。今回見つかったのは HSP90 α である。さらに HSP90 が神経突起伸長を引き起こすことが報告されている。

この HSP90 α の蛋白質の発現そのものがアリピプラゾールによって起きるのかどうかを、Western blotting によって確認した。アリピプラゾールを加えると、HSP90 α が増加した。細胞に Heat Shock Protein 90 α の siRNA を加えると蛋白質合成が阻害された。siRNA 単独だと何の影響も無かった。また、siRNA を加えることによる影響をみるために、ネガティブである何の影響も起こさないという siRNA を加えて実験したが、何の影響も無かった。

さらに HSP90 α が増えることによって、最終的に phenotype として神経突起が伸びているのかということを確認するために、神経伸長を有する細胞数を定量した。コントロール 100%のときに対して、アリピプラゾールでは神経突起は伸ばしたがこれを HSP90 α の siRNA で阻害すると、その神経突起伸長は阻害された。siRNA 単独では何の影響も及ぼさず、ネガティブに関しても、アリピプラゾールと同時に投与ではアリピプラゾールの効果が観察された。さらにネガティブ単独では何の影響も無かった(図6)。

図6 Increase of HSP90alpha protein by aripiprazole



7

以上の結果より、アリピプラゾールは濃度依存的に NGF 誘発神経突起伸長作用を促進することが判った。またその作用には 5-HT_{1A} 受容体が一部関与していることが判った。アリピプラゾールの神経突起伸長促進作用には、IP₃ 受容体や多くの細胞内シグナル伝達系が関与していた。プロテオーム解析を用いてアリピプラゾール処置により増加する蛋白質として、HSP90 α を見出し、アリピプラゾールの神経突起伸長促進作用に関係していることが示唆された。

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 2 件)

1. Ishima T., Iyo M., Hashimoto K. (2012) Neurite outgrowth mediated by the heat shock protein HSP90 α : a novel target for the antipsychotic drug aripiprazole. Translational Psychiatry, 2: e170.
DOI: 10.1038/tp.2012.97. [査読有]
2. Ishima T., Hashimoto K. (2012) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by ifenprodil: role of sigma-1 receptor and IP₃ receptors. PLoS One May 24; 7 (5): e37989.

DOI: 10.1371/journal.pone.0037989.

[査読有]

[学会発表] (計 1 件)

1. Tamaki Ishima, Masaomi Iyo and Kenji Hashimoto (2012) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by aripiprazole. 28th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. 2012年6月3-7日. Stockholm Sweden.

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/shakai/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石間 環 (ISHIMA TAMAKI)

千葉大学・社会精神保健教育研究センター・特任研究員

研究者番号:00597130