

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

山下 佑介

専攻分野：最新医学研究コース

コース：

指導教授：熊井 俊夫

主論文の題目：

非定型抗精神病薬アリピプラゾールの神経細胞に対する抗酸化作用

共著者：

皆川 貴美乃、セドキーナ アンナ、那和 雪乃、松井 宏晃、熊井 俊夫

緒言

統合失調症の病態発現には酸化ストレスの関与が示唆されており、近年、非定型抗精神病薬のアリピプラゾールが神経細胞において抗酸化作用を有することが報告された。しかし、その機序には未解明な部分が多い。今回我々は、アリピプラゾールの神経細胞に対する作用を調べるために、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いてショットガンプロテオミクス解析を行った。そこで同定された抗酸化酵素の peroxiredoxin(Prx) 1 と 6、さらにその他の抗酸化酵素の発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した。

方法・対象

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は、10% Fetal bovine serum および 1% Penicillin-Streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。50 μM アリピプラゾールを培養液に添加し 24 時間インキュベートした。コントロールとしてアリピプラゾールの溶媒である dimethylsulfoxide を 0.5% (v/v) となるように添加した。タンパク質抽出後にトリプシン消化を行った後、脱塩と精製をしたサンプルを用いて液体クロマトグラフ質量分析法によるショットガンプロテオミクス解析を行った。また、ウエスタンブロット法を用いて抗酸化酵素である Prx1、Prx6、catalase、glutathione peroxidase (GPx)、superoxide dismutase (SOD) 1、SOD2 のタンパク質発現を検討した。

結果

アリピプラゾール添加及び非添加 SH-SY5Y 細胞中のタンパク質発現をショットガンプロテオミクス解析法により検討した結果、アリピプラゾール添加細胞において、抗酸化酵素である Prx1 と Prx6 が同定された。

さらに、ウエスタンブロット法を用いて Prx1 と Prx6 の発現検討を行った。その結果、Prx6 はコントロールと比較してアリピプラゾール添加 SH-SY5Y 細胞で 2.9 ± 0.26 倍の有意なタンパク質発現増加が認められた ($p < 0.01$)。これに対し Prx1 のタンパク質発現に変化は認められなかった。他の抗酸化酵素であるカタラーゼと GPx、SOD1、SOD2 のタンパク質発現についてもタンパク質発現検討を行った結果、SOD1 はコントロールと比較してアリピプラゾール添加細胞において 1.7 ± 0.1 倍の有意なタンパク質発現増加を認めた ($p < 0.05$)。一方でカタラーゼ、GPx、

SOD2 のタンパク質発現については有意な差を認めなかった。

考察

抗精神病薬は、統合失調症の病態発現機序に関与すると考えられているドーパミンやセロトニンの受容体への結合阻害活性を指標に開発されているが、それらの作用のみでは陰性症状や認知機能障害といった陽性症状以外の臨床症状に対しては十分な治療効果を確保できない。統合失調症の病態発現機序に酸化ストレスの関与が示されていることから、近年では、抗酸化物質 N-acetyl cysteine (NAC) の併用が陰性症状の軽減に有効である可能性が報告されるなど、統合失調症の治療における抗酸化物質の有用性が示唆されている。

本研究では、非定型抗精神病薬であるアリピプラゾールの神経細胞における抗酸化作用の一端を明らかにするために、ショットガンプロテオミクス解析で同定された抗酸化酵素の Prx1 と Prx6 に着目した。今回行ったショットガンプロテオミクス解析法はタンパク質の定性的解析であるため、結果の評価に際し、アリピプラゾール添加細胞で特異的に同定されたタンパク質を発現増加しているタンパク質であると仮定した。そのため、ウェスタンブロット法を用いてタンパク質発現の半定量的解析を行った。Prx1 についてはアリピプラゾール添加及び非添加細胞間でタンパク質発現に有意差は認められなかったが、Prx6 はアリピプラゾールの添加により有意な発現増加が認められた。また、 O_2^- を直接消去する抗酸化酵素である SOD1 についてもアリピプラゾール添加により発現増加が認められた。これらの結果から、ペルオキシダーゼの Prx6 及び O_2^- を直接消去する抗酸化酵素の SOD1 が、アリピプラゾールの神経細胞に対する抗酸化作用に関わる可能性が示された。

今後は、酸化ストレス下でのアリピプラゾール添加時の神経細胞内で

の Prx6 の発現変化などを調べ、Prx6 を介したアリピプラゾールの抗酸化作用の細胞内シグナル伝達機構を明らかにしたい。

結論

アリピプラゾールは、SH-SY5Y 細胞に対して、 O_2^- を消去する SOD1 と H_2O_2 を消去する Prx6 の 2 段階での抗酸化酵素の発現増加により抗酸化作用を示す可能性が示された。