

## 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25日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590157

研究課題名（和文）第2世代抗精神病薬投与時におけるメタボリック症候群誘発機序の解明

研究課題名（英文）Possible mechanism of action of metabolic syndrome induction in patients treated with atypical antipsychotic agents

研究代表者

松野 純男 (MATZNO SUMIO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：30299094

研究成果の概要（和文）：

培養細胞を用いて、第2世代（非定型）抗精神病薬(SGAs)のメタボリックシンドローム(MS)誘発機序の検討を行った。神経細胞株を用いた検討では、運動神経系よりも交感神経系細胞株であるPC12において、オランザピンが他のSGAよりも5HT<sub>2C</sub>受容体のmRNA発現を活性化することを認め、セロトニンを介した交感神経系の刺激によりMSを誘発する可能性を示した。さらに、脂肪前駆細胞株3T3L1を用いた検討によって、オランザピンがPPAR $\gamma$ の活性化によって脂肪分化を促進することを認めた。以上のように、SGAsのうち、特にオランザピンが脂肪細胞を直接刺激して脂質の取り込みを亢進させるとともに、交感神経系を活性化するという相乗効果によって肥満を引き起こすことを、培養細胞を用いて明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the authors evaluated the effect of atypical antipsychotic agents (SGAs) on metabolic syndrome induction. Using neuroblastoma cell lines, one of SGAs, olanzapine, induced 5HT<sub>2C</sub> mRNA transcription in PC12 autonomic neuroblastoma. Furthermore, olanzapine also induced PPAR $\gamma$  translation and subsequent fat accumulation in 3T3L1 mouse adipoblastoma cell line. These results suggest that olanzapine induces metabolic syndrome by synergistic effect of both an activation of sympathetic nervous system and an elevation of direct differentiation of adipose tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：(1) 臨床薬学 (2) 第2世代抗精神病薬 (3) メタボリック症候群 (4) レプチン (5) 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の治療に用いられる第2世代

(非定型)抗精神病薬(SGAs)は、食欲亢進による体重増加、血糖値の上昇、脂質代謝

異常など、メタボリックシンドローム(MS)の症状を誘発する事が多く報告されている。統合失調症患者の平均在院日数は、癩を始めとする他の疾患と比較して圧倒的に長く、薬剤の適正使用の観点からも副作用を含めた病態の解明が臨まれている。

これまでの研究において、研究協力者である長嶺は、臨床面から本副作用について調査を行い、SGAのうち特にMS発症の頻度の高いolanzapineでインスリン抵抗性の増大と血中レムナント様リポ蛋白の増加が見られる事を報告している<sup>1)</sup>。また、松山らはインスリン抵抗性モデル動物であるobese Zuckerラット(Ob/Ob)を用いた検討において、olanzapineが血中コレステロールおよびレプチン濃度を増加させる事を報告している<sup>2)</sup>。

他方、中枢神経系とMSの関係に着目した場合、精神的ストレスが脂質代謝に対して影響を及ぼす事が報告されている。ストレスを客観的に評価する指標として、唾液中のストレスマーカーが用いられるが、その中で特にアマラーゼとコルチゾールが自律神経系と内分泌系の指標として広く用いられている。松野らは音楽療法時の脂質代謝関連遺伝子に着目し、聴取音楽の種類によってアマラーゼやコルチゾールよりも早い段階で、口腔粘膜や唾液中のレプチン受容体(OBRb) mRNA量が增大する事を示した<sup>3)</sup>。本研究を先の抗精神病薬の結果と併せて考えると、統合失調症やその治療薬、さらにはある種のストレスにおいて、脳内レプチンや末梢のレプチン受容体レベルの変化が起こり、脂質代謝に影響を与える事が考えられる。

そこで、本研究においてはまず薬物としてのSGAに焦点をあて、SGA投与により発症するMSの発症機序について、レプチンの役割に焦点を当てて解析を行う事とする。特に、SGAの中でもolanzapine(OLZ)は他の薬剤に比べてMS発症作用が強く、risperidone(RIS)はより低いものの肥満の副作用が観察される。他方、新規の抗精神病薬であるaripiprazole(ARP)はMSをほとんど発症しないと報告されており<sup>4)</sup>、こうした抗精神病薬の違いによるMS発症の違いについても解析を行う。

参考文献：

- 1) Nagamine T: Effects of risperidone and olanzapine on remnant-like lipoprotein

particle cholesterol (RLP-C) in schizophrenic patients. Neuropsychiatr. Dis. Treat., 4: 481-486 (2008)

- 2) 手塚皓久ら：非定型抗精神病薬におけるメタボリックシンドローム誘発作用～オランザピンとアリピプラゾールの比較検討～ 日本薬学会第129年会(2009)
- 3) 松野純男ら：音楽聴取が口腔粘膜の脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響 第7回日本音楽療法学会学術大会(2007)

## 2. 研究の目的

培養細胞を用いてSGAの作用機序を検討する。現在保有している運動神経系(Neuro-2a)、自律神経系(PC12)の各種神経細胞株を用いて、SGAの直接的な作用と、培養細胞上のOBRbを始めとする各種受容体の発現状況を検討する。また、脂質代謝上重要な肝臓(HepG2)、脂肪組織(3T3L1)の細胞株を用いて、脂質関連因子の発現・分泌状況なども解析する。さらに、初代培養肝細胞を用いて正常ラットとOb/Ob間での脂質代謝に対するSGAの作用の違いについても詳細に検討する。

## 3. 研究の方法

培養細胞を用いたin vitroの実験系で、SGA誘発のMS発症機序を検証する実験系を構築する。使用細胞としては脂質代謝における供給側細胞として脂肪前駆細胞(3T3L1)、肝臓細胞(HepG2)等、受容する側の神経細胞として感覚神経系(Neuro-2a)、自律神経系(PC12)の各細胞株を用い、供給側ではSGA添加時のレプチンを始めとする脂質関連遺伝子の発現状況をRT-PCRにて解析し、またそれらのタンパク質発現状況を免疫染色法によって解析する。受容側ではOBRbを始めとする受容体の発現状況を解析し、さらにSGAの標的分子であるセロトニンやドーパミン受容体の発現状況についても解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト肥満関連因子の測定法の確立

培養細胞での実験に先立ち、初年度にはヒトの唾液からmRNAを抽出し、各種肥満関連遺伝子の発現状況を調べる系を確立することを試みた。著者らは同様にストレス因子の変化を、鍼灸処理前後の患者において検討しており、本施術患者の脂質関連遺伝子について、唾液を用いて非侵襲的に定量することを試みた。

その結果、唾液から抽出したmRNA発現量をRT-PCRを用いて検討したところ、肥満抑

制に関係するホルモンであるレプチンの受容体 OBRb の発現量が、施術前後で上昇することを認めた。ストレス時には脂肪細胞からのレプチンの分泌が低下するため、反射的に受容体である OBRb の発現量が上昇するのではないかと考えられ、今後臨床では唾液中の OBRb mRNA を定量することで、MS 発症の予測につながる可能性を示した。

### (2) 神経細胞株を用いた検討

神経細胞種 Neuro-2a を用い、各抗精神病薬で処理した場合の細胞への影響および脂質関連遺伝子の発現状況を検討した。その結果、特に、神経由来細胞株である Neuro-2a 細胞においてオランザピンおよびリスペリドン添加時にレプチン受容体(LEPR)の mRNA 発現が増加する事が観察された。他方、副作用としての肥満をほとんど発現しないアリピプラゾールは、LEPR の mRNA に変化が認められず、さらに Neuro-2a の分化に伴う神経突起の伸長を抑制しており、この違いが肥満の発症に関与する可能性が示された。

さらに、運動・感覚神経系細胞株である Neuro-2a よりも、交感神経細胞株である PC12 で、SGAs に対する反応性が高いことを認めた。特にセロトニン 5-HT<sub>2C</sub> 受容体やヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の mRNA が各種 SGAs の添加によって発現が増大することを認めた。この作用は特に、臨床上最もメタボリックシンドロームの発症が問題となっている OLZ 処理群で顕著であった。これらの脳内アミンを介して交感神経系を活性化して肥満を導く可能性を認めた。

以上の結果から、OLZ をはじめとする非定型抗精神病薬は、運動・感覚神経よりもむしろ自律神経(交感神経系)を活性化することで、脂質代謝系に影響を及ぼしている可能性が示された。元々研究成果(1)で示したように、ストレスなどによって交感神経刺激が亢進された際に、肥満関連のシグナルが活性化すると考えられているため、今回示された交感神経系への関与は、臨床上の可能性と *in vitro* での実験結果を結びつける内容と考えられる。

なお、各種 SGAs においては、ドーパミン以外のヒスタミンやセロトニンなどの各種神経伝達アミン受容体への親和性が異なっていることから、今後はそれぞれの受容体からのシグナル伝達と LEPR 発現との関連性について検討を行う予定である。

### (3) 脂肪分化細胞株を用いた検討

脂肪前駆細胞 3T3L1 を用い、各抗精神病薬で処理した場合の細胞への影響および脂質関連遺伝子の発現状況を検討した。

脂肪前駆細胞株 3T3L1 に各 SGAs を添加したところ、OLZ 処理群で、脂肪細胞分化時に

著明な脂質蓄積量の亢進が認められた (Fig. 1)。脂質蓄積量の差異は OLZ > RIS > ARP の順であった。

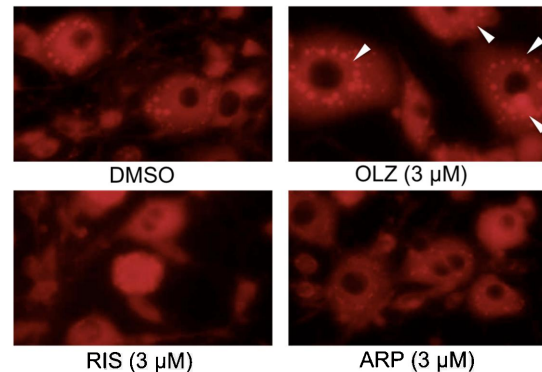


Fig. 1. Nile red staining of differentiated adipocytes. Cells were differentiated for 48 hr and consequently, medium was changed to sustained medium and treated with 3 μM of SGAs for 7 days and then stained with Nile Red (5 μg/mL).

このように OLZ において 3T3L1 細胞から脂肪細胞への分化が促進されることが示唆されたため、次に脂肪分化関連遺伝子の発現状況について検討した。その中で PPAR<sub>γ</sub> の細胞内局在を抗体染色により観察したところ、薬物添加 1 時間後では全ての薬物で PPAR<sub>γ</sub> タンパク量の上昇が認められた。さらに、24 時間後では OLZ 群のみで PPAR<sub>γ</sub> の持続的な増加が観察され、抗精神病薬である OLZ が直接的に脂肪細胞分化を促進することを見いだした (Fig. 2)。なお、フローサイトメトリーによる検討から、この活性化において、PPAR<sub>γ</sub> のタンパク量が増加していることを確認し、OLZ 処理によって、PPAR<sub>γ</sub> タンパク合成が促進されることで、脂肪細胞への分化シグナルが亢進する可能性を示した。

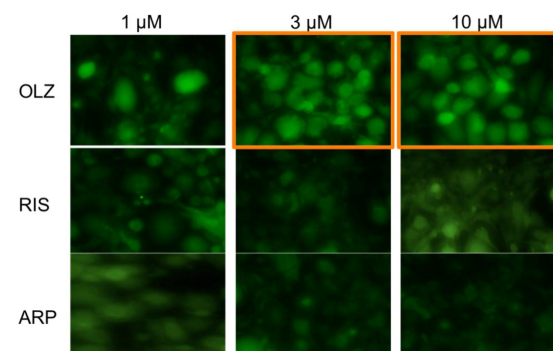


Fig. 2. PPAR<sub>γ</sub> expression in differentiating 3T3L1 cells treated with SGAs for 24 hr. Cells were differentiated with olanzapine (OLZ), risperidone (RIS) and aripiprazole (ARP) for 24 hr and then their PPAR<sub>γ</sub> expression was observed using immunofluorescence technique.

以上のように、SGAsは自律神経系を介した刺激作用だけではなく、脂肪細胞を直接刺激して脂質の取り込みを亢進させるとともに、交感神経系を活性化するという相乗効果によって肥満を引き起こすことを、培養細胞を用いた直接的な実験法を用いて明らかにした。今後はプロモーター解析などにより、実際の脂肪分化シグナルの解析を行う予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 西野愛美, 松野純男, 八木秀樹, 大鳥 徹, 松山賢治: 脂肪前駆細胞 3T3L1 を用いた非定型抗精神病薬による肥満発症機序の解明-直接的脂肪分化誘導機構と薬物ごとの作用の比較-

第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2012 年 10 月, 武庫川女子大学, 兵庫)

2. 池田智絵, 笹野晋, 渡邊一臣, 中村良平, 高松花絵, 萩中淳, 松山賢治, 松野純男: アミラーゼと身体改善度の相関モデルを利用した鍼灸整骨施術効果予測の試み

第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2010 年 10 月, 摂南大学, 大阪)

3. 池田智絵, 渡邊一臣, 中村良平, 高松花絵, 萩中淳, 松山賢治, 松野純男: 鍼灸患者ストレスの因子分析による分離と、抽出された身体快復度のアミラーゼによる定量化

第 40 回日本ペインクリニック学会関西地方会 (2010 年 5 月, 大阪国際交流センター, 大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 純男 (MATZNO SUMIO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号: 30299094

(2) 研究分担者

松山 賢治 (MATSUYAMA KENJI)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号: 00117251

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: