

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小林 雄太朗
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 980 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Clozapine-dependent inhibition of EGF/neuregulin receptor (ErbB) kinases.
(EGF/ニューレグリン受容体キナーゼのクロザピン依存的抑制)

論文審査委員 主査 教授 平島 正則
副査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 近藤 英作

博士論文の要旨

背景

クロザピンは一般的な抗精神病薬に対して治療抵抗性を示す統合失調症患者にも有効であり、この薬理効果はモノアミン阻害活性では説明できない独特なものである。これまでの研究で、いくつかの抗精神病薬化合物は Src キナーゼや Akt キナーゼ等のタンパク質のリン酸化を調節することが指摘されていた。今回、申請者は上皮成長因子(Epidermal growth factor ; EGF)などの受容体である ErbB チロシンキナーゼがクロザピンの薬理作用における分子標的になっているという仮説を立て、その独特な薬理活性を説明しようとした。

方法

抗精神病薬の細胞増殖または生存障害作用を測るために、クロザピン(Adooq Bioscience 社製)などの抗精神病薬 30 μ M をアストログリオーマ U87MG と表皮癌細胞株 A431 細胞に添加し、その 48 時間後に生存細胞数を計測した。ErbB キナーゼへの薬理作用を推定するため、ラット胎児脳の大脳皮質から調整した初代培養神経細胞と U87MG、A431 細胞を 3~100 μ M の抗精神病薬で前処理した後、30 ng/mL の EGF(ヒゲタ醤油社製)またはニューレグリン-1(Peprotech 社製)を添加し、その 5 分後に細胞からタンパクを回収した。In vivo のクロザピンの作用を推定するために、クロザピンを成体ラットの腹腔内に 20 mg/kg の濃度で投与した。投与から 1 時間後にラットの脳を摘出し、脳内タンパクを抽出した。タンパク濃度はマイクロ BCA キット(Thermo Fisher Scientific 社製)で計測し、ウェスタンブロッティングによって ErbB1-4 のリン酸化レベルを測定した。In vitro kinase assay のコントロール酵素として、組換え技術で産生された酵素 ErbB1(SignalChem 社製)と ErbB2(Thermo Fisher Scientific 社製)、ErbB4 (Thermo Fisher Scientific 社製)を使用した。これらの酵素を含む反応バッファーに、1~100 μ M のクロザピンを添加し、キナーゼ反応を開始させた。クロザピンによる ErbB キナーゼの阻害率は、抗リン酸化チロシン抗体を用いた酵素免疫測定法により基質となったポリチロシンペプチドのリン酸化レベル低下率として算定した。

結果

30 μ M のクロザピンとハロペリドールによって U87MG と A431 の生存は阻害された。これらの細胞はモノ

アミン伝達を行わないため、クロザピンとハロペリドールによる生存障害作用はモノアミン伝達の阻害ではないことが明らかになった。培養細胞株 U87MG と A431、初代培養神経細胞において、EGF によって誘導される ErbB1 のリン酸化は 30 μM のクロザピンによって抑制されたが、同じ濃度の他の抗精神病薬では抑制されなかった。ニューレグリン-1 によって誘導される ErbB4 のリン酸化は、10 μM のクロザピンまたは 30 μM のハロペリドールによって抑制された。ラットへのクロザピン急性投与実験において、20 mg/kg のクロザピンは脳内の ErbB4 のリン酸化を有意に抑制していた。過去の文献によると、その方法、用量のラットにおけるクロザピンの血液中と脳内の濃度はそれぞれ 2.2 μM と 47 μM と推定された。クロザピンの ErbB 受容体キナーゼに対する直接的な影響を検討するために申請者らは、さらに in vitro kinase assay を行った。In vitro においては、3-30 μM のクロザピンが ErbB1 と ErbB2、ErbB4 受容体キナーゼによるチロシンのリン酸化酵素活性を有意に減少させた。この In vitro 有効濃度は in vivo において ErbB4 阻害効果を発揮していたクロザピン濃度と一致する。このことから、クロザピンは ErbB キナーゼ分子に直接作用していると推定された。

考察

本研究において、申請者はモノアミン阻害活性によって説明できないクロザピンの新しい活性を明らかにした。ただし、本実験で用いたクロザピンの濃度は、薬理的にみて比較的高濃度である。従って、本研究の in vitro 系実験において効果を発揮したクロザピン濃度 10-30 μM が統合失調症の患者脳において臨床的に可能な到達濃度であるかは、重要な論点となる。実際、臨床の現場ではクロザピンは時に大量に患者に処方される場合があり (50-600 mg/day)、その血中濃度は 0.3-7.8 μM に達すると報告されている。さらにクロザピンの患者脳内濃度は脳組織の親油性と蓄積性から、血液中濃度を大幅に上回ると報告されている。従って、本実験において ErbB キナーゼ阻害を呈したクロザピンの濃度はクロザピンを服用している患者の脳内においても、到達し得る濃度と推定されるのである。ErbB キナーゼシグナルの亢進は統合失調症の脳神経病態に関連していると言われている。申請者の研究室のこれまでの研究から、ErbB キナーゼ阻害作用を持つ抗がん剤は、統合失調症様症状を示しているモデル動物に対して、抗精神病薬作用を持つことが報告されている。従って、数 μM のクロザピンによる ErbB 受容体キナーゼの阻害作用は、クロザピン特有の抗精神病薬作用の一部を反映しているかもしれない。

審査結果の要旨

クロザピンは一般的な抗精神病薬に対して治療抵抗性を示す統合失調症患者にも有効であり、モノアミン阻害活性では説明できない独特な薬理作用機序の存在が示唆されていた。申請者は上皮成長因子 (Epidermal growth factor ; EGF) などの受容体である ErbB チロシンキナーゼがクロザピンの分子標的になっている可能性について検討した。

今回の実験では抗精神病薬のクロザピン、オランザピン、ハロペリドール、リスペリドンの作用を比較解析した。細胞はモノアミン伝達を行わないアストログリオーマ U87MG 細胞と表皮癌細胞株 A431 細胞、あるいはラット胎児脳の大脳皮質から調整した初代培養神経細胞を用いた。クロザピンとハロペリドールによって U87MG 細胞と A431 細胞の生存は阻害された。クロザピンのみが U87MG 細胞と A431 細胞、初代培養神経細胞における EGF 誘導性の ErbB1 リン酸化を抑制した。ニューレグリン-1 誘導性 ErbB4 リン酸化は、クロザピンまたはハロペリドールによって抑制された。ラットへクロザピン (20 mg/kg) を投与すると脳内の ErbB4 リン酸化を有意に抑制した。in vitro kinase assay によって、クロザピンが ErbB1 と ErbB2、ErbB4 受容体キナーゼ分子に直接作用してチロシンのリン酸化酵素活性を有意に減少させることが示された。

本研究において、抗精神病薬クロザピンのモノアミン阻害活性によって説明できない新しい活性として

ErbB 受容体キナーゼの阻害作用が示唆された。ErbB キナーゼシグナルの亢進は統合失調症の脳神経病態に関連していると言われており、本結果はクロザピン特有の抗精神薬理作用の一部を明らかにした点で意義は高く、博士論文としての価値を認める。