

原 著 ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における低栄養
誘発性オートファジーに対する
propofol の神経保護効果

昭和大学医学部薬理学講座 (医科薬理学部門)

近藤 泰之 青 暢子
辻 まゆみ* 小口 勝司

抄録: Propofol は, GABA 受容体を活性化し麻酔作用を示す静脈内麻酔薬である。現在, 麻酔作用のほかに, 脳虚血後などにおける脳細胞保護作用が注目されている。神経保護作用の機序として, 大脳の代謝や酸素消費の抑制作用および酸化ストレスやアポトーシスの抑制作用が, 認められているが, 詳細は不明のままである。一方, オートファジーは細胞器やタンパク質の再利用を起こす恒常性機構で, 飢餓時の生存システムとして, 臓器や個体の恒常性の維持に必須の生命現象である。また, オートファジーはアポトーシスのようなプログラム細胞死を調整することができ, それによりさまざまな疾患に影響する。そこで, 本研究ではヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い低栄養誘発性オートファジーに対する propofol の細胞保護作用の有無とその作用機序を明白にすることを目的とした。SH-SY5Y 細胞を FBS 不含有培養液にて培養し, オートファジーを誘発した。Propofol は 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M 濃度を, 1 ~ 24 時間処置した。アポトーシスの評価として caspase-3 活性を測定し, オートファジーの評価として細胞質 p62 およびオートファゴソーム内 LC3-II を測定した。さらに c-jun N-terminal kinase (JNK) リン酸化能および AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性を測定し, 細胞内 Ca^{2+} レベルの変動を観察した。低栄養培養液によりオートファジーを誘発した細胞は, FBS 含有培養液にて培養した細胞に比べ, 細胞質内 p62 は低下し, LC3-II の増加および caspase-3 活性, AMPK, JNK リン酸化を促進した。しかしながら, propofol 処置は, 低栄養によるオートファジー誘発で減少した細胞内 p62 を抑制した。さらに, オートファジー誘発により増加した LC3-II, caspase-3 活性, AMPK, JNK リン酸化は propofol 処置により減少した。また, 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ レベルは propofol 処置により減少した。以上より, propofol は低栄養誘発性オートファジーに対し, 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を減少させ, AMPK 活性化および JNK リン酸化能を抑制することで, phagophore 形成を抑制しオートファジー誘発による細胞傷害を抑制した。Propofol はアポトーシスや酸化ストレスに対する細胞保護作用を示すだけでなくオートファジー誘発による細胞傷害に対しても細胞保護作用を示し, propofol が多面的作用を有することが示された。

キーワード: 低栄養誘発性オートファジー, propofol, 神経保護作用

Propofol は, GABA アゴニストであり, 手術中, 全身麻酔の維持と鎮静のために広く使われる短時間作用性, 静脈内麻酔薬である。また, 近年, 麻酔作用のほかに, 脳虚血後などにおける脳細胞保護作用が注目され報告されている¹⁻³⁾。Propofol は, GABA 受容体を刺激し, 神経細胞への Cl^- の流入を促進することにより神経細胞の細胞膜の過分極を引き起こ

し神経活性の抑制をする。その作用により, 大脳の代謝や酸素消費を抑制するため, 脳梗塞において神経保護作用を示すことが報告されている。また, propofol は, 細胞内フリーラジカルのスカベンジャーとなり酸化ストレスを軽減し, 細胞保護作用に働いている^{4,5)}。脳梗塞時には, 細胞外のグルタミン酸濃度が上昇し, NMDA 受容体を過刺激することで

*責任著者

神経死を引き起こすと言われている。Propofol はフリーラジカルを一掃することによりグルタミン酸の取り込み機能を修復し、NMDA 受容体刺激を抑制し神経保護作用を示した²⁾。また、propofol は、アポトーシス細胞死を抑制し、細胞保護作用を示すことが報告されている^{1,6)}。

オートファジーは、プログラム細胞死に関連した細胞応答の1つであり、飢餓時の生存システムとして、臓器や個体の恒常性の維持に必須の生命現象である^{7,8)}。オートファジーは不要となった細胞質成分を、消化することにより恒常性の維持に貢献するが、神経細胞の過剰なオートファジーは、神経細胞に損傷を与える^{6,9)}。

Propofol のオートファジーに対する近年の研究は散見されている。ラット脳虚血モデルへの propofol 処置は、オートファジーを抑制し海馬の梗塞サイズの狭小化を示し¹⁾、*in vitro* 実験では、過酸化水素誘発性オートファジー心筋細胞傷害に対し、propofol は細胞保護作用を示した¹⁰⁾。しかしながら、低酸素培養によりオートファジーを誘発した COS-7 細胞に対して propofol は、オートファジーを促進した¹¹⁾。Propofol はオートファジーに対し、さまざまな作用を示すようである。

オートファジーの実験において、細胞を緩衝液のみでインキュベーションした栄養飢餓誘発性オートファジー *in vitro* モデルを用いてのオートファジー誘発性細胞傷害作用の報告は多くある。しかし、生体では全く栄養分がなくなることは、考えづらいため、より生体に近い状態でのオートファジー誘発を考え、栄養素の過度な飢餓状態での過剰なオートファジー誘発でなく、本研究では、低栄養でオートファジーを誘発し、低栄養誘発性オートファジーに対する propofol の細胞保護作用の有無とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

研究方法

1. 研究材料と細胞培養

SH-SY5Y 細胞（ヒト神経芽細胞：EC-94030304：The European Collection of Cell culture：ECACC, London, UK）を購入し、10% Fetal Bovine Serum (FBS：Life technologies, Inc.：Carlsbad, USA), Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 含有 D-MEM/Ham's F12 Medium

(和光純薬工業株式会社、大阪) で、5% CO₂, 37°C にて培養した。オートファジー促進作用を示す rapamycin は、Abcam Biochemicals, (Cambridge, UK) より購入した。Propofol (2, 6-diisopropylphenol), dimethylsulfoxide (DMSO), dithiothreitol (DTT) は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。C-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor である SP600125, protease inhibitor cocktail (PIC) 含有, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), deoxyribonuclease (DNase) は、Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) より購入した。Propofol と rapamycin は DMSO で 1 mM を作製し、冷凍保存し実験の時に適宜濃度調節をした。

2. オートファジーの誘発および薬物処置

オートファジーは、FBS 不含 (FBS (-)) の D-MEM Ham's F-12 medium で SH-SY5Y 細胞を 1 ~ 24 時間培養し誘発した。FBS (-) のみで培養した細胞を FBS (-) control とし、FBS 含有 D-MEM Ham's F-12 medium で培養した細胞を FBS (+) control とした。Propofol および rapamycin は FBS (-) の D-MEM Ham's F-12 medium で各濃度に調節し、培養液と交換した。また、SP600125 は薬物処置の 1 時間前に前処置し、その後 propofol または rapamycin と共処置した。

3. Caspase-3 活性の測定

SH-SY5Y 細胞 2.5×10^5 cells/well を 6 穴の collagen coated dish (ASAHI GLASS Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 24 時間培養した。Propofol (0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μ M), rapamycin (2.0 μ M), SP600125 (JNK-inhibitor) (1.0 μ M) で 24 時間培養し、細胞をかきとり、PBS (137 mmol/l NaCl, 8.1 mmol/l Na₂HPO₄, 2.68 mmol/l KCl, 1.47 mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) にて洗浄し、Cell lysis buffer (DTT 含有) で細胞質溶液を抽出した。細胞質溶液は caspase-3 の基質である N-acetyl-DEVD-7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin (Ac-DEVD-AFC：Kamiya Biomedical Co., WA, USA) を用いて活性測定をした。

4. オートファゴソーム内 LC3-II の測定

SH-SY5Y 細胞 4×10^4 cells/well を 96 穴の collagen coated dish (ASAHI GLASS Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 24 時間培養した。Propofol (1.0 μ M, 5.0 μ M) で 3 時間培養後、accutase で細胞を dish よりはがし、Muse Autophagy LC3 Kit (Merck Millipore

Corporation, Germany) のプロトコールに従い、細胞内オートファゴソームを抽出し、抗 LC3/Alexa FluorR555 抗体を用いてオートファゴソーム内蛍光輝度を Muse cell analyzer (Merck Millipore Co., MA, USA) にて測定した。

5. 細胞内 p62 測定

SH-SY5Y 細胞の 5.0×10^5 cells/ml を 6 穴の collagen coated dish (ASAHI GLASS Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 24 時間培養した後、propofol (0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M), rapamycin (2.0 μ M), SP600125 (JNK-inhibitor) (1.0 μ M) で培養し、細胞をかきとり、遠心した。上澄みを捨て、PBS にて洗浄し、RIPA cell lysis buffer (PIC, PMSF, DNase 含有) を加え細胞質溶液を得た。細胞質溶液は p62 ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., NY, USA) のプロトコールに従い測定した。また、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) で蛋白定量を行った。

6. AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性測定

SH-SY5Y 細胞 2.5×10^5 cells/well を 6 穴の collagen coated dish (ASAHI GLASS Co., Ltd., Tokyo, Japan) で 1 日培養した。その後、propofol (0.5, 1.0, 5.0 μ M), rapamycin (2.0 μ M) で 1 時間, 6 時間, 24 時間培養し、細胞をかきとり、遠心した。上澄みを捨て、PBS にて洗浄し、cell lysis buffer (PMSF, leupeptin, pepstatin, DTT 含有) を加え細胞質溶液を得た。細胞質溶液は AMPK Kinase Assay Kit (Cyclex Co.Ltd, Nagano, Japan) のプロトコールに従い測定した。また、細胞質溶液は Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) で蛋白定量を行った。

7. MAPK リン酸化能の測定

SH-SY5Y 細胞 1.0×10^5 cells/well を 96 穴の collagen coated dish (ASAHI GLASS Co., Ltd.: Tokyo Japan) で 24 時間培養した。Propofol (0.5, 1.0, 5.0 μ M), rapamycin (2.0 μ M), SP600125 (1.0 μ M) で 1 時間培養した。その後、PBS で洗浄後、固定液で固定した。固定後、洗浄し、Cell-Based JNK (T183/Y185) ELISA kit (Ray Biotech Inc., GA, USA) にてリン酸化された JNK および total JNK を測定した。JNK のリン酸化能はリン酸化 JNK と total JNK の数値の比で比較検討した。

8. 細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 測定

$[Ca^{2+}]_i$ 測定は、カルシウム蛍光指示薬 Fura-2 AM を用いた¹²⁾。SH-SY5Y 細胞は HEPES-Tyrode buffer/0.1% BSA (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 12 mM $NaHCO_3$, 5.6 mM D-glucose, 0.49 mM $MgCl_2$, 0.37 mM NaH_2PO_4 , 25 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 0.1% BSA) で溶解した 4 μ M Fura-2 で、60 分間、37°C で loading した。細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 動態変化は Meta Xpress Image Acquisition (Molecular Devices Co., CA, USA) で、Fura-2AM の蛍光シグナルを測定した。

9. 統計・解析

統計処理として、3 群以上の比較 (多重比較) は、one-way ANOVA で群間に違いがあるかどうか検定し、次に、FBS (-) control をコントロールとして Dunnett's test を行った。また、2 群比較は unpaired Student t-検定を行い、それぞれ $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. Caspase-3 活性に対する propofol の作用

Caspase-3 はアポトーシス活性経路におけるエフェクター・カスパーゼであり、その増加はアポトーシスの亢進を示す。Fig. 1 に propofol (0.5 ~ 10.0 μ M) を 24 時間処置後の caspase-3 活性を示した。FBS (+) control は FBS (-) control に比べ、有意な減少を示し、アポトーシス促進が見られた。また、mTOR 阻害剤でありオートファジー促進作用が報告されている rapamycin (2 μ M) の処置¹³⁾ は、FBS (+) control と比較すると caspase-3 活性の増加が見られた。Propofol (1.0 μ M, 5.0 μ M) 処置は FBS (-) control と比較し有意な減少を示し、アポトーシス抑制作用が認められたが、propofol (10.0 μ M) 処置では caspase-3 活性抑制作用は見られなかった。これより、以降の実験では、propofol は 0.5 ~ 5.0 μ M を用いることとした。

図を示していないが、3 時間という短時間培養においても、caspase-3 活性は、FBS (-) control で 42.60 ± 2.47 nmol/mg protein/hr を示し、FBS (+) control は、 27.13 ± 3.79 nmol/mg protein/hr を示し、caspase-3 活性減少が認められた ($p < 0.05$)。3 時間培養においても、培養液中の FBS 除去という低栄養条件でアポトーシス細胞傷害が誘発されていた

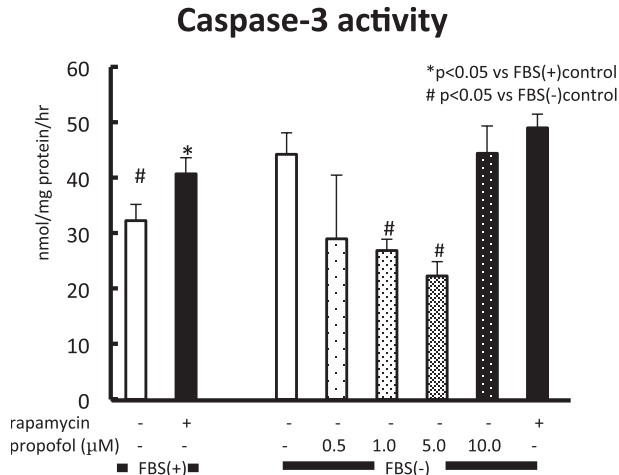


Fig. 1 低栄養誘発性オートファジー神経細胞における caspase-3 活性に対する propofol の作用
Caspase-3 活性は、基質 Ac-DEVD-AFC を用いて測定した。FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 24 時間培養後の各 caspase-3 活性値は、mean ± S.E.M. (n = 6-24) で表示した。Propofol (0.5 μM, 1.0 μM, 5.0 μM, 10.0 μM) は FBS (-) 培養液に溶解した。
#: p < 0.05 vs FBS (-) control (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test), * : p < 0.05 vs FBS (+) control (Student t-test).

ため、FBS 除去培養は、緩衝液のみでの培養という過度な栄養飢餓よりもマイルドであるが、神経細胞傷害モデルとして有用であると思われた。また、3 時間インキュベーションにおける FBS (-) propofol は、1 μM 処置では、33.37 ± 0.32 nmol/mg protein/hr, 5 μM 処置では、26.53 ± 2.24 nmol/mg protein/hr (p < 0.05) と FBS (-) control (42.60 ± 2.47 nmol/mg protein/hr) に比べ、有意な減少が認められた。以前、われわれは thapsigargin 誘発性小胞体ストレスを介するアポトーシスに対する propofol の作用について実験した。Propofol (1.0 μM, 5.0 μM) は、thapsigargin により活性化された caspase-3 を有意に抑制した¹⁴⁾。Propofol は小胞体ストレス誘発性細胞傷害のみでなく、オートファジーを介する細胞傷害をも抑制した。

2. LC3-II に対する propofol の作用

Fig. 2 に propofol (1.0 μM, 5.0 μM) を 3 時間処置後のオートファゴソーム内 LC3-II を示した。マクロオートファジーにおいては、LC3-I が、フォスファチジルエタノールアミン (PE) に共有結合すると LC3-II となり、隔離膜/オートファゴソーム膜に繋ぎ止められる。LC3-II の量はオートファ

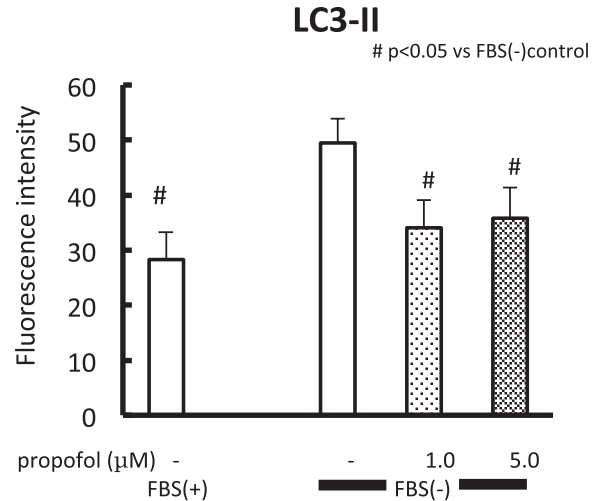


Fig. 2 低栄養誘発性オートファジー神経細胞における オートファゴソーム内 LC3-II に対する propofol の作用

細胞内 LC3-II は、anti-LC3 Alexa Fluor555 conjugated antibody を用い、オートファゴソームを抽出し、オートファゴソーム内の蛍光輝度を測定した。FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 24 時間培養後のオートファゴソーム内 LC3-II 値は、mean ± S.E.M. (n = 6) で表示した。Propofol (1.0 μM, 5.0 μM) は FBS (-) 培養液に溶解した。

#: p < 0.05 vs FBS (-) control (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test).

ゴソーム形成と正の相関を示すため、LC3-II は、オートファジーのマーカーとして頻用されている¹⁵⁾。本実験では、抗 LC3/Alexa Fluor555 抗体を用いて、オートファゴソームを抽出後、オートファゴソーム内の蛍光輝度を測定した。FBS (-) control に比べ、FBS (+) control は、蛍光輝度の有意な減少が見られた。FBS 除去による低栄養状態はオートファジーを促進させた。しかしながら、FBS (-) control に比べ、propofol (1.0 μM, 5.0 μM) 処置は、オートファゴソーム内蛍光輝度の有意な減少が見られ、propofol により低栄養誘発性オートファジーは抑制された。

3. 細胞内 p62 に対する propofol の作用

P62 はセクエストローム 1 として知られており、偏在性に発現する細胞内タンパク質である。細胞内 p62 の低下は、p62 がオートファゴソーム形成部位に局在したためにオートファジーが充進したものと推測され、細胞内 p62 の増加はオートファジーが抑制していると推測されている¹⁶⁻¹⁸⁾。Fig. 3 に低栄養誘発性オートファジー細胞に対する propofol (0.5

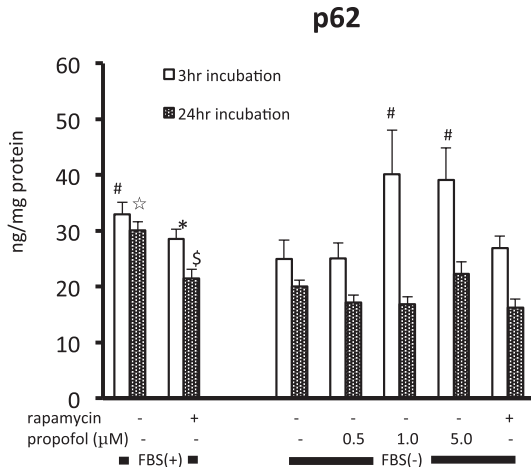


Fig. 3 低栄養誘発性オートファジー神経細胞における細胞内 p62 に対する propofol の作用

細胞内 p62 は、オートファゴソーム形成部位に局在し、オートファジーにより消費代謝される。細胞内 p62 の減少はオートファゴソーム形成のために消費されオートファジーの促進が推測される。FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 3 時間、24 時間培養後の細胞内 p62 値は、mean \pm S.E.M. (n = 6-58) で表示した。Propofol (1.0 μ M, 5.0 μ M) は FBS (-) 培養液に溶解した。

: $p < 0.05$ vs FBS (-) control (3 時間培養) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test), ☆ : $p < 0.05$ vs FBS (-) control (24 時間培養) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test),

* : $p < 0.05$ vs FBS (+) control (3 時間培養 : Student t-test), S : $p < 0.05$ vs FBS (+) control (24 時間培養 : Student t-test).

~ 5.0 μ M) による細胞内 p62 への作用を示した。FBS (+) control と比較して、rapamycin 処置 (FBS (+)) は、3 時間、24 時間ともに細胞内 p62 が有意に減少し、オートファジーの亢進が示された。FBS (+) control に比べ、FBS (-) control は、3 時間、24 時間ともに細胞内 p62 が有意に減少し、オートファジーの亢進が示された。また、FBS (-) control に比べ、propofol (1.0 μ M, 5.0 μ M) の 3 時間処置は、有意な p62 の増加が見られ、オートファジーの抑制が見られたが、24 時間処置では、有意な差は見られなかった。

4. AMPK 活性に対する propofol の作用

Fig. 4 に propofol 処置による AMPK 活性への作用を示した。FBS (+) control は培養時間と共に AMPK の活性上昇が見られた。FBS (-) control は、FBS (+) control に比べ、活性上昇が見られた。AMPK は AMP/ATP 比の上昇にともない活性化さ

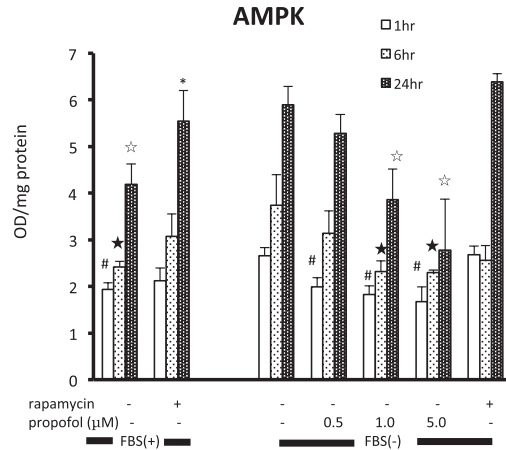


Fig. 4 低栄養誘発性オートファジー神経細胞における AMPK 活性に対する propofol の作用

AMPK 活性は、phospho-serine specific monoclonal antibody を用いて測定した。FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 1, 6, 24 時間培養後の AMPK 活性は、mean \pm S.E.M. (n = 6-12) で表示した。Propofol (0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M) は FBS (-) 培養液に溶解した。

: $p < 0.05$ vs FBS (-) control (1 時間培養) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test), ☆ : $p < 0.05$ vs FBS (-) control (6 時間培養) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test), ☆ : $p < 0.05$ vs FBS (-) control (24 時間培養) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test), * : $p < 0.05$ vs FBS (+) control (24 時間培養 : Student t-test).

れるために、低栄養状態で、AMPK の活性上昇が生じたと思われる。FBS (-) control に比べ、FBS (-) propofol (0.5 μ M) は、1 時間処置で有意な減少が見られ、FBS (-) propofol (1.0 μ M, 5.0 μ M) 処置は、1 時間、6 時間、24 時間インキュベーションで、有意な減少が見られた。しかし、FBS (-) rapamycin 処置では、有意な差は認められなかった。

5. MAPK リン酸化能に対する propofol の作用

Fig. 5 に FBS (-) 培養液にて SH-SY5Y 細胞を培養 1 時間後の MAPK リン酸化能を示した。FBS (-) control は、FBS (+) control に比べ、JNK リン酸化の有意な増加が見られた。また、propofol (0.5 ~ 5.0 μ M) の phosphate-JNK/JNK は、FBS (-) control 1.42 ± 0.19 に比べ、0.5 μ M propofol 0.72 ± 0.03 ($p < 0.05$), 1.0 μ M propofol 0.73 ± 0.05 ($p < 0.05$), 5.0 μ M propofol 0.84 ± 0.08 ($p < 0.05$) と有意に JNK のリン酸化を抑制した。しかしながら、FBS (-) 培養液にて SH-SY5Y 細胞を培養 1 時間後の ERK および p38 リン酸化能の有意な変化は見

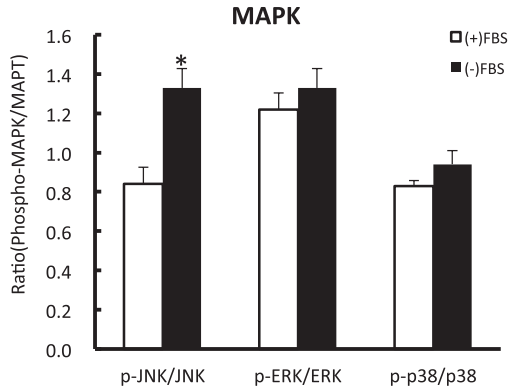


Fig. 5 低栄養誘発性オートファジー神経細胞における MAPK リン酸化能

MAPK (JNK, ERk, p38) のリン酸化は、リン酸化した MAPK (JNK, ERk, p38)/total MAPK (JNK, ERk, p38) 比で表示した。FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 1 時間培養後の各 MAPK リン酸化能は、mean ± S.E.M. (n = 6-14) で表示した。

*: p < 0.05 vs FBS (+) control (Student t-test).

られなかった。

6. JNK inhibitor 前処置による p62 に対する propofol の影響

低栄養状態で JNK リン酸化が、増加したことより、Fig. 6 に JNK inhibitor 前処置による p62 に対する propofol (0.5 ~ 5.0 μM) の作用を示した。FBS (+) control に比べ、FBS (+) SP600125 (JNK inhibitor) 前処置では、細胞内 p62 の有意な増加が見られ、オートファジー抑制作用が見られ、JNK がオートファジー促進作用を示すものと推測された。また、FBS (-) propofol 1.0 μM 処置による細胞内 p62 の増加は、SP600125 (JNK inhibitor) 前処置で、さらなる増加が認められ、JNK 阻害により、オートファジー抑制が生じたと考えられた。

7. [Ca²⁺]_i に対する propofol の影響

Fig. 7 に、propofol 処置による [Ca²⁺]_i への作用を示した。[Ca²⁺]_i は FBS (-) propofol 5 μM 処置は、FBS (-) control に比べ、処置後 20 秒後から 250 秒まで、各タイムポイントで、約 10% の有意な減少 (t-test: p < 0.05) が見られた。

考 察

Propofol は臨床では幅広い濃度で使用されており、麻酔維持や、集中治療室では血中濃度で 2 ~ 6 μg/ml (10 ~ 30 μM) で管理される。しかしなが

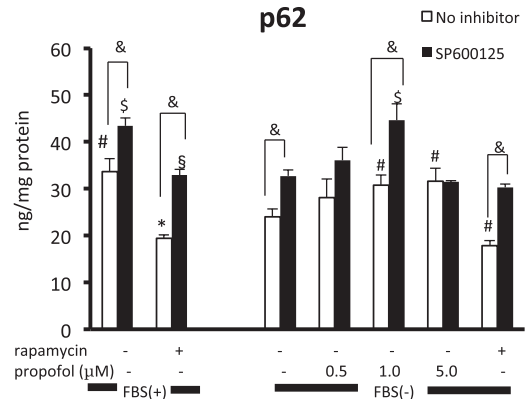


Fig. 6 低栄養誘発性オートファジー神経細胞の p62 に対する JNK inhibitor の作用

FBS 不含培養液 (FBS (-)) で 6 時間培養後の細胞内 p62 値は、mean ± S.E.M. (n = 6-30) で表示した。Propofol (0.5 μM, 1.0 μM, 5.0 μM) は FBS (-) 培養液に溶解した。

: p < 0.05 vs FBS (-) control (without SP600125) (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test),

§ : p < 0.05 vs FBS (-) SP600125 (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test),

* : p < 0.05 vs FBS (+) control (without SP600125: Student t-test),

§ : p < 0.05 vs FBS (+) SP600125 (Student t-test),

& : p < 0.01 comparison between with and without SP600125 (Student t-test).

ら、propofol は血中タンパクとの結合率が高く、50%が赤血球と 48%が血清タンパクと結合しているため、free propofol は 1.2 ~ 1.7%になる¹⁹⁾。そのため、今回の実験で使用した propofol 0.5 μM から 5.0 μM は、臨床使用時の血中濃度と近似していると思われる。今回の実験において、caspase-3 活性は FBS (-) propofol 1.0 μM, 5 μM 処置では、FBS (-) control に比べ、有意な減少が見られ、アポトーシス抑制作用が認められたが、FBS (-) propofol 10 μM では、抑制作用は見られなかった。臨床使用濃度よりも高濃度の propofol では、細胞傷害作用が生じる可能性も考えられる^{20, 21)}。

オートファジーは、細胞死に関連した細胞応答であるが、飢餓時の生存システムとして、恒常性維持に必須な生命現象である。オートファジーは栄養飢餓により細胞内の至る所でランダムに誘導され、取り囲んだ細胞質成分や細胞小器官を分解する非特異的分解機構だと考えられてきた。しかし、近年、細胞内で何らかの障害 (細胞外または細胞内ストレスや信号) に反応して、飢餓、成長因子欠落、ER スト

レス)を受け、有害となったミトコンドリアや、細胞内に侵入してきた病原菌などを選択的に分解、無毒化し、積極的に細胞内の恒常性の維持のために働いていることが分かってきている。これらオートファジーの破綻は、がん化や細菌感染、神経変性疾患などを引き起こすことが報告されており、オートファジーが生存機構だけではなく、さまざまな疾患において重要な役割を担っていることが知られている²²⁾。

栄養飢餓状態では、AMP/ATPが上昇し、AMPK活性が増加する。低栄養状態およびエネルギー喪失での主なオートファジー誘発経路は、mTORC1(哺乳類ラパマイシン標的タンパク質複合体1)の抑制による、ULK1-Atg13-FIP200複合体の活性化される経路である²³⁻²⁵⁾。mTORはrapamycinの標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼで、細胞の分裂や生存などの調節に中心的な役割を果たすと考えられている。mTORに幾つかの他のタンパク質が結合して複合体(mTORC1, mTORC2)を形成する。RapamycinはFKBP12タンパク質に結合し、mTORに結合して、mTORC1を阻害する。mTORC1は、糖やアミノ酸などの栄養素やエネルギー状態、増殖因子などの情報を統合し、エネルギー産生や細胞分裂や生存などを調節している。mTORC1は、増殖因子や成長因子やホルモンなどによって細胞増殖のシグナルが来たときに、栄養素とエネルギーの供給が十分であることを判断し、タンパク質や脂質の合成を促進して細胞増殖を実行するスイッチを入れるため、がん細胞では増殖作用を示す。mTOR阻害剤のrapamycinは抗がん作用を示すことが報告されている²⁶⁾。さらに、ULK1はBeclin1-PI3 kinase class III-Vps34-Vps15複合体と共に小胞体上にPI3Pを産生し、phagophore形成が開始され、成熟したオートファゴソーム形成が誘発される。実際、今回の実験においても、低栄養状態であるFBS(-) controlは、FBS(+)-controlに比べ、AMPKの増加が見られた。

また、低栄養状態において、propofol処置はAMPKを抑制した。AMPKはCaMKK β によりリン酸化されるが、CaMKK β は、Ca²⁺により活性化することが報告されている^{27, 28)}。Fig. 7に示したように、本実験において、propofolは細胞内[Ca²⁺]_iを低下させた。われわれは、以前、thapsigarginに

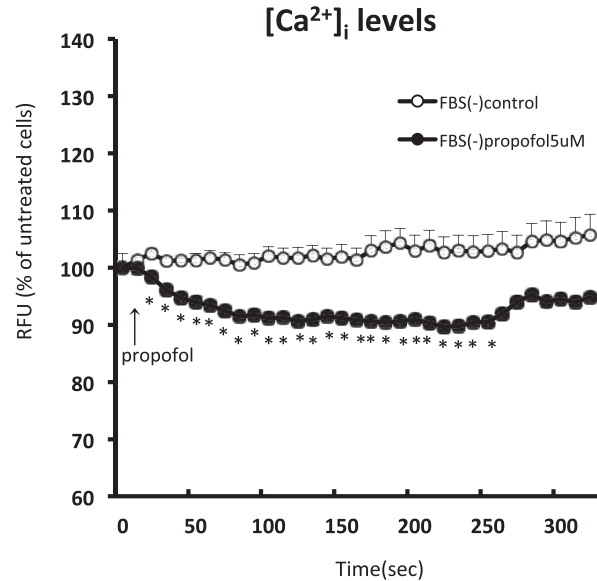


Fig. 7 Measurement of [Ca²⁺]_i levels
細胞質内 [Ca²⁺]_iは、カルシウム指示薬 Fra-2AM を用いて測定した。SH-SY5Y 細胞は FBS 不含培養液で培養後、5 μM propofol を処置し、[Ca²⁺]_i は、mean ± S.E.M. (15 画面) で表示した。
*: p < 0.05 vs FBS (-) control (各タイムポイント: Student t-test)。

よる細胞内 [Ca²⁺]_i 増加を propofol が抑制することを報告した¹⁴⁾。Propofol は小胞体膜上の IP3 受容体に作用し、小胞体からの [Ca²⁺]_i 遊離を抑制すると考えられている。AMPK が Ca²⁺ により活性化するのであれば、propofol による細胞内 [Ca²⁺]_i の減少が、AMPK を抑制したのかもしれない。

最も有名なオートファジー基質の1つであるSQSTM1/p62は、栄養飢餓状態で、最初に分解されるが、長時間の重篤な飢餓状態では、SQSTM1/p62は発現し、回復するため、SQSTM1/p62の発現レベルがオートファジー活性と必ずしも反対に相関しないことが報告された²⁹⁾。しかしながら、本実験では、低栄養状態でのオートファジー誘発のために、24時間培養していても、p62の増加は観察されなかった。

一方、今回の実験において、低栄養状態にした1時間後のMAPK活性では、p38, ERKリン酸化は有意な差は見られず、JNKリン酸化が有意に増加した。また、propofol 1.0 μM処置はJNKリン酸化を抑制し、JNK阻害剤の前処置では細胞質内p62の有意な増加が認められ、オートファジー抑制作用

が見られた。従来, JNK1 は, UV 照射, 熱ショックなど細胞へのさまざまな刺激により, 活性化される MAPK であり, 抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 をリン酸化し³⁰⁾, 不活化させアポトーシスを促進させるが, 本実験において, JNK リン酸化が低栄養状態においてオートファジー誘導に関わることが認められた。栄養飢餓によるオートファジー誘導は mTOR 活性の抑制が主な経路と考えられていたが, JNK 活性も関与していると思われる。

ERK および p38 のリン酸化は, 低栄養状態 1 時間後では, 有意な変化は見られなかった。MAPK の変化は早期に生じることが多いため, 1 時間よりもさらに早い時間に変化が生じてしまった可能性が考えられた。さらなる研究では, 低栄養後の MAPK 活性については, 早期のインキュベーション時間について検討する必要があると思われる。

以上より, propofol は低栄養誘発性オートファジーに対し, 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を減少させ, AMPK 活性および MAPK の JNK 活性を抑制することにより, phagophore 形成を抑制し, autophagic プロセスを著しく減弱し, 神経細胞傷害抑制作用を示すと思われた。Propofol による細胞保護作用機構の 1 つとして, オートファジーによる細胞傷害の抑制作用も示すことが示唆された。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Cui DR, Wang L, Qi AH, *et al.* Propofol prevents autophagic cell death following oxygen and glucose deprivation in PC12 cells and cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One (Internet)*. 2012;7:e35324. (accessed 2013 Apr 17) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035324>
- 2) Velly LJ, Guillet BA, Masmejean FM, *et al.* Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters. *Anesthesiology*. 2003; 99:368-375.
- 3) Qi S, Zhan RZ, Wu C, *et al.* The effects of thiopental and propofol on cell swelling induced by oxygen/glucose deprivation in the CA1 pyramidal cell layer of rat hippocampal slices. *Anesth Analg*. 2002;94:655-660.
- 4) Murphy PG, Davies MJ, Columb MO, *et al.* Effect of propofol and thiopentone on free radical mediated oxidative stress of the erythrocyte. *Br J Anaesth*. 1996;76:536-543.
- 5) Rahardjo TM. Propofol effect on stress response and free radicals in patient during surgery and sedation procedure. *Indones Biomed J*. 2015;7:147-152.
- 6) Wen YD, Sheng R, Zhang LS, *et al.* Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*. 2008;4:762-769.
- 7) Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30:214-226.
- 8) Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, *et al.* The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2004;18:3004-3009.
- 9) Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, *et al.* Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol*. 2008;172:454-469.
- 10) Ha JH, Noh HS, Shin IW, *et al.* Mitigation of H₂O₂-induced autophagic cell death by propofol in H9c2 cardiomyocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28:19-29.
- 11) Yoon JY, Kim CH, Yoon JU, *et al.* Propofol induces cellular protective autophagy in hypoxic cultured COS-7 cells. *Eur J Anaesthesiol Suppl*. 2013;51:143.
- 12) Wang JM, Brinton RD. Allopregnanolone-induced rise in intracellular calcium in embryonic hippocampal neurons parallels their proliferative potential. *BMC Neurosci (Internet)*. 2008;9(Suppl.2):S11. (accessed 2014 Feb 19) <http://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2209-9-S2-S11>
- 13) Jung CH, Ro SH, Cao J, *et al.* mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 2010;584:1287-1295.
- 14) Nakajima A, Tsuji M, Inagaki M, *et al.* Neuroprotective effects of propofol on ER stress-mediated apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol*. 2014;725:47-54.
- 15) Fujita N, Hayashi NM, Fukumoto H, *et al.* An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell*. 2008;19:4651-4659.
- 16) Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, *et al.* P62/sqstm1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171:

- 603-614.
- 17) Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, *et al.* Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.* 2005;24:1810-1820.
 - 18) Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, *et al.* Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009;452:181-197.
 - 19) Servin F, Desmots JM, Farinotti R, *et al.* Pharmacokinetics of propofol administered by continuous infusion in patients with cirrhosis. Preliminary results. *Anesthesia.* 1988;43 (Suppl):23-24.
 - 20) Liang WZ, Jan CR, Lu CH. Investigation of 2,6-diisopropylphenol (propofol)-evoked Ca^{2+} movement and cell death in human glioblastoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2012;26:862-871.
 - 21) Tsuchiya M, Asada A, Arita K, *et al.* Induction and mechanism of apoptotic cell death by propofol in HL-60 cells. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46:1068-1074.
 - 22) 蔭山 俊, 小松雅明. オートファジーと疾患. 領域融合レビュー (Internet). 2014;3:e006. (accessed 2015年7月1日) <http://leading.lifescience-db.jp/3-e006>
 - 23) Lee JH, Koh H, Kim M, *et al.* Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2007;447:1017-1020.
 - 24) Mirouse V, Swick LL, Kazgan N, *et al.* LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress. *J Cell Biol.* 2007;177:387-392.
 - 25) Shida Y, Hans-Uwe S. Apoptosis regulation by autophagy gene 5. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;63:241-244.
 - 26) Seto B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Trans Med (Internet)* . 2012;1:29. (accessed 2013 Oct 30) <http://www.clintransmed.com/content/1/1/29>
 - 27) Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1016-1023.
 - 28) Tamas P, Hawley SA, Clarke RG, *et al.* Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca^{2+} in T lymphocytes. *J Exp Med.* 2006;203:1665-1670.
 - 29) Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy.* 2014;10:431-441.
 - 30) Wei Y, Pattingre S, Sinha S, *et al.* JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008;30:678-688.

PREVENTION OF NUTRITIONAL DEFICIENCY-INDUCED AUTOPHAGY BY PROPOFOL IN HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS

Yasuyuki KONDO, Yoko AO,
Mayumi TSUJI and Katsuji OGUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Abstract — Propofol, a GABA agonist, a short-acting intravenous anesthetic agent, is widely used for anesthesia and sedation. In addition to its anesthetic effect, propofol shows a neuroprotective property on a nervous system under the ischemic state. It was reported that propofol suppresses program cell death, however, the mechanisms of the neuroprotection remain unclear. Autophagy is a homeostatic cellular mechanism for the turnover of organelles and proteins. During nutritional deficiency, autophagy promotes cell survival through the recycling of metabolic precursors. Furthermore, autophagy can regulate programmed cell death such as apoptosis and thereby influence disease pathogenesis. The aim of the present study was to clarify the molecular details of the neuroprotection with propofol against nutritional deficiency-induced autophagy and cell injury in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were cultured in serum-free medium to induce autophagy. Autophagic cells were treated with propofol (0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M) for 1-24 hours. Cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), the specific marker of apoptosis (caspase-3 activity), and the biomarkers of autophagy (p62 and LC3-II) were analyzed. Furthermore, activities of c-jun N-terminal kinase (JNK) and AMP-activated protein kinase (AMPK) were measured. Nutritional deficiency-induced autophagic cells significantly decreased p62 and increased LC3-II, activities of caspase-3, AMPK and JNK. When SH-SY5Y cells were treated with propofol (1.0, 5.0 μ M), these biomarker were significantly suppressed. Furthermore, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was decreased by treatment with propofol. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduction with propofol might have suppressed AMPK activity, and that prevented nutritional deficiency-induced autophagy. These results demonstrate that propofol at clinically relevant concentration suppressed the nutritional deficiency-induced autophagy and cell injury in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Propofol prevented not only the neuroprotective property against oxidative stress and apoptosis but also autophagy-induced cell injury. This prevention may explain the pleiotropic effects of propofol that benefit the nervous system.

Key words: autophagy, propofol, neuroprotection

〔受付：1月8日，受理：1月22日，2016〕