

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570137

研究課題名（和文） 自然免疫系におけるエンドカンナビノイドシステムの役割の解明

研究課題名（英文） Role of endocannabinoid system in the innate immunity

研究代表者

岸本 成史 (KISHIMOTO SEISHI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究番号：60234217

研究成果の概要：

本研究では、ヒトナチュラルキラー細胞のガン細胞に対する細胞傷害活性におけるカンナビノイド受容体作用薬や阻害薬の影響について調べることにより、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害の機構にエンドカンナビノイドシステムが関与している可能性を示した。さらに、マウスの腫瘍生着モデルに対する CB2 受容体阻害薬の影響についても調べ、CB2 受容体が少なくともマウスにおける腫瘍免疫において重要な役割を演じている可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

マリファナは摂取すると時間的・空間的感覚の混乱や多幸感、幻覚、鎮痛などの強力な精神神経作用を示し、古くから占術や医術の道具、または娯楽の対象として用いられてきた薬物である。現在わが国では、大麻取締法によりその使用が厳しく規制されているが、違法使用の検挙数は近年増加しており、特に乱用者の低年齢化が社会問題化している。マリファナは精神神経作用だけでなく免疫機能の著しい低下や生殖異常を引き起こすことも

知られている。特に、免疫機能の低下はAIDSの罹患率の上昇にもつながると考えられ、近年注目されている問題である。これら精神神経作用や免疫抑制作用を担うマリファナの主要活性成分は、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) をはじめとするカンナビノイド類である。これらの作用機構は長い間不明であったが、1990年代前半にカンナビノイドと結合する2種類のGタンパク質共役型受容体が同定された。1990年にcDNAがクローニングされたCB1受容体は、脳・神経系に多量に発現し

ていることから、主にカンナビノイドの精神神経作用に関与すると考えられている (*Nature* **346** (1990))。一方、1993年には、免疫系の細胞や末梢リンパ組織に多く発現しているCB2受容体が同定され、カンナビノイドの免疫系への作用を媒介しているものと考えられている (*Nature* **365** (1993))。植物由来のカンナビノイドに対する受容体が動物体内に存在することが明らかとなったことから、内在性カンナビノイド受容体リガンドの探索が行われ、1992年にはDevaneらのグループにより、 Δ^9 -アラキドノイルグリセロール (アナンダミド) が報告された (*Science* **258** (1992))。しかしながら、アナンダミドは新鮮な脳などの組織には微量しか存在しないことや、その生合成経路が極めて効率が悪いこと (*Eur. J. Biochem.* **240** (1996)) などの理由から、研究者らのグループではアナンダミドとは異なる内在性カンナビノイド受容体リガンドの探索を行ってきた。その結果、モノアシルグリセロールの一種である2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) が、ラット脳のカンナビノイド受容体に結合すること (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215** (1995))、新鮮なラット脳にアナンダミドより遥かに多量の2-AGが存在すること (*Eur. J. Biochem.* **240** (1996))、CB1受容体を介して神経系培養細胞の活性化を引き起こすこと (*J. Biol. Chem.* **274** (1999))、CB2受容体のアゴニストとしても働くこと (*J. Biol. Chem.* **275** (2000)) を明らかにした。注目すべきことに、アナンダミドはCB1、CB2両受容体に対して部分作動薬としてしか働かないのに対し、2-AGは完全作動薬として働くことがわかった (*Eur. J. Biochem.* **240** (1996))。これらの結果から、研究者らはカンナビノイド受容体の真の内在性リガンドがアナンダミドではなく2-AGであることを提唱してきた。すなわち、生体内には2-AGがCB1/CB2受容体に作用することにより作動する内在性のカンナビノイドシステム (エンドカンナビノイドシステム) が存在し、神経系や免疫系において何らかの役割を担っていると考えられた。

脳・神経系におけるエンドカンナビノイドシステムの役割については、これまでに研究者らも含め国内外の多くの研究者により種々の検討がなされ、現在では神経の興奮に伴って後シナプスから生成する2-AGが前シナプスに存在するCB1受容体に作用することにより、神経伝達を抑制するいわゆる“逆行性神経伝達物質”として働いているという結論に至っている。一方、主にCB2受容体が発現している免疫系については、これまであ

まり研究が進んでいない。最近まで、カンナビノイドがリンパ球の増殖を抑制したり、マクロファージからのサイトカインの産生を抑制するなどの報告があったことから、CB2受容体は免疫系において抑制的な役割を演じているのではないかと漠然と考えられていたが、エンドカンナビノイドシステムが実際に免疫系においてどのような役割を担っているのかについては不明であった。そのような中、研究代表者らは2-AGがCB2受容体を介して単球やマクロファージ系の細胞を強力に遊走させることを見出した (*J. Biol. Chem.* **278** (2003))。これをきっかけに、2-AGが単球・マクロファージ系の細胞からのIL-8やMCP-1などのケモカインの産生を促進すること (*J. Biochem.* **135** (2004))、MAPキナーゼの活性化を引き起こすこと (*J. Biochem.* **129** (2001))、細胞のアクチン重合を促すことにより形態変化を引き起こすこと (*Biochem. J.* **385** (2005))、細胞接着を促進すること (*FEBS Lett.* **579** (2005)) を相次いで報告してきた。さらに最近、2-AGがナチュラルキラー細胞 (NK細胞) の遊走を引き起こすことも明らかにした (*J. Biochem.* **137** (2005))。このように2-AGがCB2受容体を介して特に自然免疫系において重要な役割を担っている細胞を活性化することがわかってきた。また研究代表者らは、好酸球の遊走を引き起こすこと、マウスの急性炎症モデルや慢性アレルギー性炎症の惹起にも2-AGおよびCB2受容体が関与していることを最近見出ししている (*J. Leukoc. Biol.* **76** (2004); *J. Biol. Chem.* **280** (2005); *J. Immunol.* **177** (2006))。研究代表者らによるこれらの成果は、それまで言われていた免疫系における2-AGとCB2受容体の役割が抑制的なものではなく、促進的なものであることを強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

これまでに得られた知見から、研究代表者らは2-AGおよびカンナビノイド受容体、特にCB2受容体が免疫反応の極めて初期の段階で重要な働きをしているのではないかと考えた。そこで本研究では、自然免疫応答においてエンドカンナビノイドとカンナビノイド受容体がどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とし、自然免疫の主たる役割を担っているNK細胞の細胞傷害能に対する各種CB受容体リガンドの影響について詳細に調べた。また、NK細胞が主に関与する腫瘍免疫におけるCB受容体アンタゴニストの効果についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

KHYG-1 細胞 (ヒト NK 細胞性白血病細胞株) は 10% ウシ胎児血清 (FBS) 及び 50 ng/ml リコンビナントヒト IL-2 を含む RPMI1640 培地中で、K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞株) 及び Colon-26 細胞 (マウス結腸癌細胞株) は 10% FBS を含む RPMI1640 培地中 (37°C 5% CO₂) で継代、維持した。

(2) RT-PCR による CB 受容体発現の確認

細胞から常法により total RNA を抽出、cDNA を合成した。合成 cDNA を鋳型として、CB1 受容体、CB2 受容体又は GAPDH 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

(3) 細胞傷害活性測定

KHYG-1 細胞を蛍光標識した K562 細胞と 20:1 の割合で混合し、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む RPMI1640 培地中で各種刺激剤の存在下、37°C で 4 時間インキュベートした。細胞を propidium iodide (PI) で染色した後、フローサイトメトリーにて傷害を受けた K562 細胞の割合を求めた。

(4) マウス腫瘍生着モデルに対する SR144528 の影響

BALB/c マウス (6 週齢・雌) の背部皮下に Colon-26 細胞 (1 x 10⁶ 個) を移植し、48 時間毎に 30 日間、ノギスを用いて腫瘍体積を測定した。CB2 受容体アンタゴニストである SR144528 (1 mg/kg 体重) あるいは生理食塩液 (対照) を SR144528 処理群又は生理食塩液処理群に対し、腫瘍移植日より 48 時間おきにそれぞれ腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) NK 細胞の細胞傷害能に対する CB 受容体及びそのリガンドの役割

ヒト NK 細胞株である KHYG-1 細胞における CB1 及び CB2 受容体 mRNA の発現を調べた結果、CB2 受容体のみが発現していることが確認された (Fig. 1)。

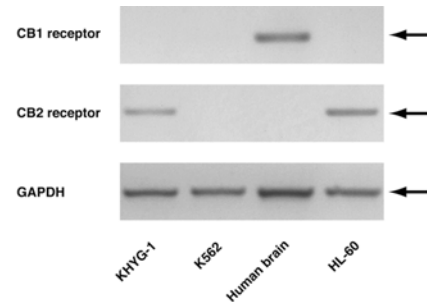


Fig. 1. Expression of the cannabinoid receptor mRNAs in KHYG-1 human leukemic natural killer cells. The expression levels of CB1 receptor and CB2 receptor mRNAs in KHYG-1 cells, K562 cells, human brain and HL-60 cells were compared by RT-PCR. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was detected as an internal control.

一方、K562 細胞は CB1 及び CB2 受容体ともに発現していなかった。KHYG-1 細胞を K562 細胞と共培養すると、標的細胞である K562 細胞が傷害を受ける。この KHYG-1 細胞の細胞傷害活性に対する CB 受容体アゴニストである CP55940 の影響について検討したところ、CP55940 の添加により KHYG-1 細胞の細胞傷害性を有意に増大させることが明らかとなった (Fig. 2)。

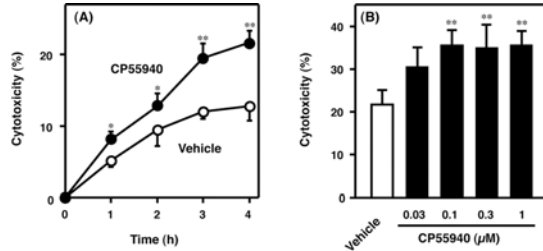


Fig. 2. CP55940, a synthetic cannabinoid receptor agonist, enhances the cytotoxicity of KHYG-1 natural killer cells. (A) Time-dependent effect of CP55940 on the cytotoxicity of KHYG-1 cells against K562 cells. KHYG-1 cells were incubated with PKH67-labeled K562 cells in the presence of CP55940 (0.3 µM) or DMSO (final 0.2%) for the indicated periods of time. (B) Dose-dependent effect of CP55940 on the cytotoxicity. KHYG-1 cells were incubated with PKH67-labeled K562 cells in the presence of various concentrations of CP55940 for 4 h. The cytotoxicity was determined as described in the Methods. The data are means ± S.D. of five determinations. * p < 0.05, ** p < 0.01.

さらに、他の CB 受容体アゴニスト (HU-210、WIN55212-2) や CB2 受容体選択的アゴニスト (HU-308) にも同様の作用が認められた。KHYG-1 細胞を CB2 受容体選択的アンタゴニストである SR144528 や百日咳毒素 (PTX) で処理することにより、CP55940 による KHYG-1 細胞の細胞傷害活性の増大が抑えられたことから、これら CB 受容体アゴニストによる KHYG-1 細胞の細胞傷害活性の増大は、CB2 受容体及び G_{i/o} タンパク質を介したものであることが確認された (Fig. 3)。また、CB2 受容体の内在性リガンドである 2-AG も KHYG-1 細胞の細胞傷害活性を増加させた (Fig. 4)。これらの結果は、NK 細胞上に発現している CB2 受容体の活性化シグナルが、NK 細胞の細胞傷害活性に促進的に働いていることを示唆するものである。

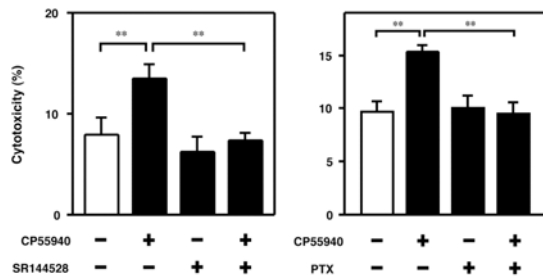


Fig. 3. Effects of SR144528 and PTX on CP55940-induced enhanced cytotoxicity of KHYG-1 natural killer cells. KHYG-1 cells were pretreated with SR144528 (3 µM) for 5 min or PTX (100 ng/ml) for 16 h, and then incubated with PKH67-labeled K562 cells in the presence or absence of CP55940 (0.3 µM) for 4 h. The cytotoxicity was determined as described in the Methods. The data are means ± S.D. of five determinations. ** p < 0.01.

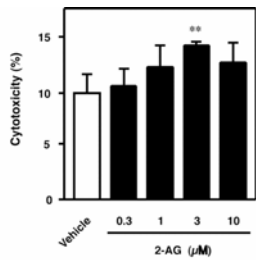


Fig. 4. Effect of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on the cytotoxicity of KHYG-1 natural killer cells. KHYG-1 cells were pretreated with meloxicam (20 μM) and NDGA (1 μM) for 16 h, and then incubated with PKH67-labeled K562 cells in the presence of various concentrations of 2-AG for 4 h. The cytotoxicity was determined as described in the Methods. The data are means ± S.D. of four determinations. ** p < 0.01.

興味深いことに、KHYG-1 細胞を CB2 受容体選択的アンタゴニスト (SR144528) 単独で処理した場合には細胞傷害活性が減弱したが、CB1 受容体選択的アンタゴニスト (SR141716A) ではそのような作用は見られなかった (Fig. 5)。内在性カンナビノイドは、NK 細胞においてオートクラインに、もしくはターゲット細胞との間でパラクラインに作用することにより、細胞傷害活性の調節に関わっている可能性がある。

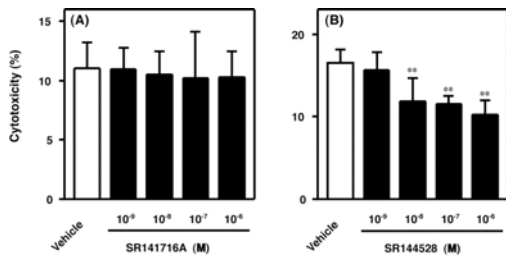


Fig. 5. Comparison of the effects of SR141716A, a CB1 receptor antagonist and SR144528, a CB2 receptor antagonist, on the intrinsic cytotoxic activity of KHYG-1 natural killer cells. KHYG-1 cells were incubated with PKH67-labeled K562 cells in the presence of various concentrations of SR141716A, a CB1 receptor-selective antagonist (A), or SR144528, a CB2 receptor-selective antagonist (B), for 4 h. The cytotoxicity was determined as described in the Methods. The data are means ± S.D. of five determinations. ** p < 0.01.

次に、 Δ^9 -THC についても検討を加えた。その結果、KHYG-1 細胞の細胞傷害活性の増大を抑制することが分かった (Fig. 6)。この結果は、 Δ^9 -THC が持っている免疫抑制作用の一部を説明するものと考えられる。

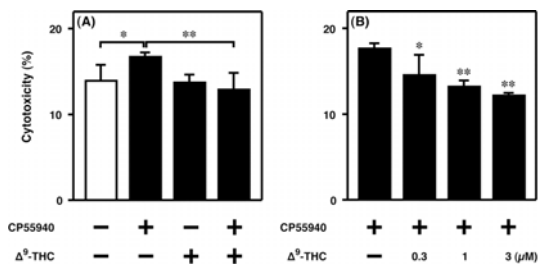


Fig. 6. Effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) on CP55940-induced enhanced cytotoxicity of KHYG-1 natural killer cells. KHYG-1 cells and PKH67-labeled K562 cells were treated with Δ^9 -THC (A): 3 μM; (B): various concentrations) or DMSO (final 0.2%), and then incubated with CP55940 (0.3 μM) for 4 h. The cytotoxicity was determined as described in the Methods. The data are means ± S.D. of five (A) or four (B) determinations. * p < 0.05, ** p < 0.01.

(2) 腫瘍免疫における CB2 受容体の役割

NK 細胞は腫瘍免疫において重要な役割を担っている細胞である。そこで、CB2 受容体が NK 細胞の細胞傷害活性調節を介して腫瘍免

疫に関与しているのか否かを明らかにするため、マウス腫瘍生着モデルにおける SR144528 の影響について検討した。BALB/c マウスの同種同系の腫瘍細胞である Colon-26 細胞を移植した後、SR144528 を投与したところ、SR144528 投与群では対照群と比べて腫瘍の成長が早まる傾向が見られた。一方、Colon-26 細胞を SR144528 で直接処理しても、細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、CB2 受容体が、マウスにおける腫瘍免疫において重要な役割を演じていることを示唆するものである (Fig. 7)。

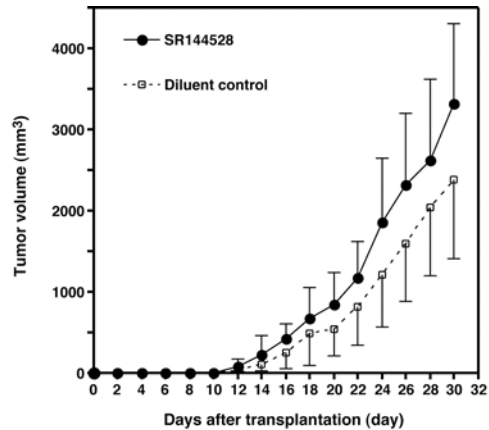


Fig. 7. Effect of administration of SR144528 on tumor growth in vivo. BALB/c mice were pretreated with i.p. injections of SR144528 (0.5 mg/kg) or diluent control (saline) for 3 h before s.c. inoculation of 1×10^6 Colon-26 cells. After tumor inoculation, mice were i.p. injected with SR144528 (0.5 mg/kg) or diluent control once per two days for 30 days. The tumor volumes were measured once per two days. (n=11 mice per group)

以上のように、CB2 受容体の活性化により、NK 細胞の細胞傷害活性が促進することが明らかとなった。我々が以前報告したように、CB2 受容体の内在性リガンドである 2-AG が NK 細胞の遊走を引き起こす事を考えあわせると、CB2 受容体及びその内在性リガンドは、NK 細胞の機能に促進的に関与している可能性が高い。本研究の結果が、NK 細胞に関わる癌やウイルス性疾患の予防や治療に役立つことを期待したい。

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 3 件)

- Hakamata, W., Sato, Y., Okuda, H., Honzawa, S., Saito, N., Kishimoto, S., Tamashita, A., Sugiura, T., Kittaka, A. and Kurihara, M. : (2S,2' R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 120-123 (2008) 査読有

- ② Gokoh, M., Kishimoto, S., Oka, S. and Sugiura, T. : 2-Arachidonoylglycerol enhances the phagocytosis of opsonized zymosan by HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1199-1205 (2007) 査読有
- ③ Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S. and Sugiura, T. : Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 928-934 (2007) 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 岸本成史 他：牛乳カゼインによる血球細胞の活性化機構, BMB2008 (2008 年 12 月 10 日) 神戸国際会議場
- ② 手塚優 他：牛乳カゼインによる HL-60 細胞の活性化機構, 第 47 回日本薬学会東北支部大会 (2008 年 10 月 26 日) 岩手医科大学
- ③ 岸本成史 他：SMP30 欠損マウスにおける光負荷時の水晶体の変化, 第 47 回日本薬学会東北支部大会 (2008 年 10 月 26 日) 岩手医科大学
- ④ 石川陽平 他：光負荷による SMP30 ノックアウトマウス水晶体の変化, 第 47 回日本白内障学会総会 (2008 年 6 月 20 日) 東京国際フォーラム
- ⑤ 岡沙織 他：G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンドの同定, 日本薬学会 128 年会 (2008 年 3 月 27 日) パシフィコ横浜
- ⑥ 杉浦隆之 他：イノシトールリン脂質由来のグリセロ脂質メディエーター, 日本薬学会 128 年会 (2008 年 3 月 26 日) パシフィコ横浜
- ⑦ 杉浦隆之 他：G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンドの同定, BMB2007 (2007 年 12 月 14 日) パシフィコ横浜
- ⑧ 岡沙織 他：G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンドによる ERK の活性化とその意義, BMB2007 (2007 年 12 月 14 日) パシフィコ横浜
- ⑨ 中島圭佑 他：G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンドによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇, BMB2007 (2007 年 12 月 14 日) パシフィコ横浜
- ⑩ 杉浦隆之 他：2-アラキドノイルグリセロールの生合成機構と生理的役割, 第 49 回日本脂質生化学会 (2007 年 6 月 5 日) 北海道大学学術交流会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 成史 (KISHIMOTO SEISHI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60234217

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者