

機関番号：16401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790627

研究課題名 (和文) 中枢性交感神経-副腎髄質系賦活に対する脳内カンナビノイドの抑制作用
機構の解明研究課題名 (英文) Inhibitory role of brain endocannabinoid in central activation of
sympatho-adrenomedullary outflow

研究代表者

清水 孝洋 (TAKAHIRO SHIMIZU)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：00363276

研究成果の概要 (和文) : ストレス反応に関与する交感神経-副腎髄質 (SA) 系の脳内賦活制御機構を脳内エンドカンナビノイド (eCB) (いわゆる脳内大麻) との関連で解析した。結果、麻醉下ラットにおいて、中枢性 SA 系賦活時に脳内で eCB の 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) が産生され、これが本賦活反応に対し、(1) 脳内アラキドン酸前駆物質として促進性に関与する一方、(2) 脳内 eCB として抑制性にも関与する、という、脳内 2-AG の二方向性の役割が明らかとなった。今回の成果より、脳内大麻を標的としたストレス反応制御薬物の開発が期待される。

研究成果の概要 (英文) : We examined the roles of brain endocannabinoid (eCB) in regulation of central activation of sympatho-adrenomedullary (SA) outflow using anesthetized rats. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), an eCB, was endogenously generated in the brain during the central activation of SA outflow. This 2-AG played a promotional role as a precursor of arachidonic acid and also an inhibitory role as an eCB in the activation. These findings suggest that brain 2-AG has bidirectional roles in the central activation of SA outflow. Taken together, brain eCB can be a beneficial target for therapeutic drugs to modulate the outflow.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：中枢性交感神経-副腎髄質系、ホスホリパーゼ C、ジアシルグリセロールリパーゼ、2-アラキドノイルグリセロール、モノアシルグリセロールリパーゼ、アラキドン酸、脳内大麻、エンドカンナビノイド

1. 研究開始当初の背景

生体が種々のストレスに曝露された際、その刺激は脳内神経伝達物質の変動に変換され、様々なストレス反応が惹起される事が知

られている。このストレス反応に関わる中枢神経系からの出力系に交感神経-副腎髄質 (SA) 系があり、この系の過剰な活性化は高血圧症、消化性潰瘍、免疫機能低下による発癌などを引き起こす。よって、ストレス性疾

患に対する原因療法・予防医学的治療法の開発には、SA系賦活の中枢性制御機構を明らかにする必要がある。

代表者の所属グループではこれまで、血液中のカテコールアミン [ノルアドレナリン (NA) 及びアドレナリン (Ad)] を指標にし、SA系賦活の中枢性制御機構について、アラキドン酸 (AA) の活性代謝物であるプロスタノイドとの関連で解析し、以下の成績を得ている。

(1) ラット脳室内への AA 投与により血中カテコールアミンが増加し、その反応がプロスタノイド合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害薬インドメタシンの脳室内前処置により消失した (Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2000)。

(2) プロスタノイドのうち、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の脳室内投与により血中 NA が増加し、トロンボキサン A₂ (TxA₂) アナログ中枢性投与により血中 NA 及び Ad が増加した (Murakami et al., Eur. J. Pharmacol., 2002)。

(3) ストレスに関連する脳内神経伝達物質 [コルチコトロピン放出因子 (CRF)、アルギニン-バソプレシン (AVP)、ボンベシン (BB) 及びヒスタミン] の脳室内投与により血中カテコールアミンが増加し、それら反応が COX 阻害薬の脳室内前処置によりいずれも消失した (Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2001; Okada et al., Eur. J. Pharmacol., 2002; Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2006; Lu et al., Eur. J. Pharmacol., 2008)。

以上の成績から、炎症メディエーターとして多彩な生理作用を有するプロスタノイド (特に PGE₂ 及び TxA₂) が脳内で中枢性 SA 系賦活に関与する事が示唆された。

そこで代表者らは、SA 系の中枢性賦活に関わるプロスタノイドの前駆物質、AA の脳内における生成経路を解析してきた。一般に、生体膜リン脂質からの AA 遊離にはホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) が関与する事が広く知られている。実際、PLA₂ 刺激薬のメリチン脳室内投与による血中カテコールアミン増加反応が、PLA₂ 阻害薬メパクリン脳室内前処置により抑制される事を報告している (Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2000)。しかしながら、前述した CRF、AVP、BB 及びヒスタミンによる血中カテコールアミンの増加はメパクリン脳室内前処置の影響を受けなかった一方、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬 U-73122 及びジアシルグリセロール (DAG) リパーゼ阻害薬 RHC-80267 の脳室内前処置によりそれぞれ有意に抑制された (Okada et al., Eur. J. Pharmacol., 2003; Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2004, 2005, 2007)。さらに、

AVP による血中カテコールアミンの増加はモノアシルグリセロール (MAG) リパーゼ阻害薬 MAFP の脳室内前処置によっても有意に抑制される事を、本研究課題の申請年に報告した (Shimizu and Yokotani, Eur. J. Pharmacol., 2008)。

以上の成績から、脳内で生体膜リン脂質から PLC を介して DAG が生成され、さらに DAG から DAG リパーゼにより 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) が生成、さらに 2-AG から MAG リパーゼにより AA が遊離する経路 (脳内 PLC/DAG/2-AG/AA 経路) が、中枢性 SA 系賦活に関与する可能性が示唆された。

興味深い事に、この経路により生ずる 2-AG は、マリファナの受容体として知られるカンナビノイド CB 受容体の内因性リガンド (エンドカンナビノイド: eCB) であり、神経伝達に対し抑制性に機能する事が報告されている (Sugiura and Waku, Chem. Phys. Lipids., 2000; Di Marzo, Trends in Pharmacol. Sci., 2006)。さらに代表者らは、AVP による血中カテコールアミンの増加が CB₁ 受容体遮断薬の AM251 脳室内前処置により有意に増強される事、及び CB 受容体刺激薬の WIN55212-2 脳室内前処置により有意に抑制される事、を本研究課題の申請年に報告した (Shimizu and Yokotani, Eur. J. Pharmacol., 2008)。

以上の事から、中枢性 SA 系賦活により脳内で生成される 2-AG が、本系賦活に対し AA の前駆物質として促進性に関与するのみならず、脳内 eCB (いわゆる脳内大麻) として CB₁ 受容体を介し抑制性にも関与する、という二方向性の役割を有する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景及びこれまでの研究成果をもとに、本研究課題では

(1) 脳内 eCB である 2-AG の中枢性 SA 系賦活に対する役割、特に抑制性の役割について明らかにする事

(2) 2-AG による抑制性作用の作用点を脳内 PLC/DAG/2-AG/AA 経路との関連で明らかにする事

を目的とした。

3. 研究の方法

実験にはウレタン麻酔下の雄性ラットを用いた。経時的な動脈血採血及び麻酔中の持続的な補液 (生理食塩水静注) のため、鼠径動脈と静脈にそれぞれカテーテルを留置した。術後、脳定位固定装置に頭部を固定し、側脳室への薬物投与の小孔を頭蓋骨にドリルを用いて開けた (Shimizu et al., Eur. J.

Pharmacol., 2004)。

3時間経過後、微細なステンレスカニューレを用いて、脳室内へ種々のストレス関連神経伝達物質を投与した。投与後経時的に動脈血を採取し、血漿中のカテコールアミン (NA 及び Ad) をアルミナ抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に定量する事で、SA 系賦活の程度を評価した (Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2004)。さらに、各種刺激薬・遮断薬・阻害薬 (CB₁ 受容体刺激薬、CB₁ 受容体遮断薬、MAG リパーゼ阻害薬、カンナビノイド取込み阻害薬) の脳室内前処置が、ストレス関連神経伝達物質の脳室内投与による血中カテコールアミン増加に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

上記の通り、各種ストレス関連神経伝達物質の脳室内投与による血中カテコールアミン増加に、脳内 PLC、DAG リパーゼ及びプロスタノイド (AA の活性代謝物) が関与する事を明らかにしてきた (Yokotani et al., Eur. J. Pharmacol., 2001; Okada et al., Eur. J. Pharmacol., 2002, 2003; Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2004, 2005, 2006, 2007; Lu et al., Eur. J. Pharmacol., 2008)。これら成績、及び AA が細胞膜リン脂質の *sn*-2 位に主に存在する事より、PLC 産物である DAG から AA が産生されるものと考えられる。この際、(1) DAG の *sn*-2 位のエステル結合が *sn*-2 選択的 DAG リパーゼにより加水分解されて直ちに AA が産生される経路 [図 (A)]、及び、(2) DAG の *sn*-1 位のエステル結合が *sn*-1 選択的 DAG リパーゼにより加水分解されて 2-AG が生じ、2-AG がさらに MAG リパーゼにより加水分解されて AA が産生される経路 [図 (B)]、が考えられる。

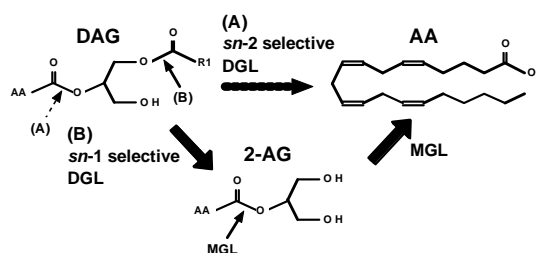


図. DAG からの AA 産生経路

DAG から AA が直接産生される経路 (A)、及び、2-AG を介して DAG から AA が産生される経路 (B)、が考えられる (AA、アラキドン酸; 2-AG、2-アラキドノイルグリセロール; DAG、ジアシルグリセロール; DGL、DAG リパーゼ; MAG、モノアシルグリセロール; MGL、MAG リパーゼ)。

しかしながら、これまで用いてきた DAG リ

パーゼ阻害薬の RHC-80267 は *sn*-1/*sn*-2 選択的 DAG リパーゼいずれも阻害するため、(1) と (2) の経路を区別する事ができなかった。そこではじめに、脳内 2-AG が中枢性 SA 系賦活時に AA 前駆物質として機能するか否かを、MAG リパーゼ阻害薬 MAFP 及び JZL184 を用いて解析した。ストレス関連ペプチドの CRF 及び BB の脳室内投与による血中カテコールアミン増加は、MAFP 及び JZL184 の脳室内前処置により抑制された (Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2010, 2011)。さらに、2-AG 自身の脳室内投与によっても血中カテコールアミンが増加し、この増加反応も MAFP 脳室内前処置により抑制された (Shimizu and Yokotani, Eur. J. Pharmacol., 2008)。加えて、2-AG の脳室内投与による血中カテコールアミン増加が、インドメタシン (COX 阻害薬) の脳室内前処置によっても抑制された (投稿準備中)。

以上の実験成績から、中枢性 SA 系賦活時に脳内で 2-AG が産生され、これが AA 前駆物質として本系賦活に対し促進性に関与している事が明らかとなった。

この AA 前駆物質として機能する 2-AG は、上記の通り代表的な脳内 eCB (脳内大麻) である事が知られており、神経活動に対してネガティブ・フィードバック様の神経興奮抑制作用を有する事が示されている (Di Marzo, Trends in Pharmacol. Sci., 2006)。すなわち、興奮した神経の後シナプスにおいて細胞膜リン脂質から PLC 及び *sn*-1 選択的 DAG リパーゼを介して産生された 2-AG はシナプス間隙に遊離され、前シナプスに存在する CB₁ 受容体に逆行性に作用して神経伝達物質の遊離を抑制する。さらにシナプス間隙に遊離された 2-AG は細胞内へ取込まれて AA とグリセロールに速やかに分解され、この抑制シグナルが不活性化される。

そこで、eCB シグナルを増強または抑制する各種薬物が中枢性 SA 系賦活に与える影響を解析した。ここでは、eCB シグナルを増強する薬物として、CB₁ 受容体刺激薬の ACEA 及びカンナビノイド取込み阻害薬の AM404 を、eCB シグナルを抑制する薬物として、CB₁ 受容体遮断薬の AM251 をそれぞれ用いた。結果、ACEA 及び AM404 の脳室内前処置は CRF 及び BB の脳室内投与による血中カテコールアミン増加を抑制した一方、AM251 の脳室内前処置はこれら増加反応を増強した (Shimizu et al., Eur. J. Pharmacol., 2010, 2011)。

これら実験成績より、中枢性 SA 系賦活に対し、脳内 eCB (おそらく 2-AG) が脳内 CB₁ 受容体を介して抑制性に関与する事が明らかとなった。

以上本研究課題の成果をまとめると、中枢

性 SA 系賦活時に脳内で産生された 2-AG が、AA 前駆物質として本賦活に対し促進性に関与する一方、脳内 eCB として脳内 CB₁ 受容体を介し抑制性にも関与する、という、中枢性 SA 系賦活に対する脳内 2-AG の二方向性の役割が明らかとなった。

SA 系賦活制御と脳内 eCB との関連については、いくつか報告が散見されるものの、CB 受容体刺激薬の中枢性投与による交感神経系の興奮作用 (Padley et al., Br. J. Pharmacol., 2003)、圧受容器を介する交感神経系抑制の増強 (Brozoski et al., Brain Res., 2005) など、これまで統一した見解が得られていなかった。また、これら報告の多くは外来性に投与した CB 受容体刺激薬の影響を検討したもので、中枢性 SA 系賦活制御に対する脳内「エンド」カンナビノイドの役割については明らかではなかった。本研究課題の成果より、中枢性 SA 系賦活に対し脳内 eCB が抑制性に関与する事が世界で初めて明らかとなり、脳内 eCB の新たな生理的役割を示す事ができた。しかも脳内 2-AG は eCB としての抑制性の役割のみならず AA 前駆物質としての促進性の役割も有する、ユニークな分子として中枢性 SA 系賦活の制御に関与する事がわかった。

なお、本研究課題では目的の (2) で掲げた 2-AG の抑制性作用の作用点については詰める事ができなかった。しかしながら、上述した脳内 2-AG による逆行性の神経興奮抑制作用、及び後シナプスの PLC/*sn*-1 選択的 DAG リパーゼを介して 2-AG が産生される事を踏まえると、少なくとも脳内 PLC/DAG/2-AG/AA 経路の上流が抑制性作用の作用点である事が予想される。今後、脳内 eCB による中枢性 SA 系賦活抑制作用機構をより詳細に解明してゆく必要がある。

また本研究課題の成果より、中枢性 SA 系賦活の抑制、ひいてはストレス関連疾患の治療・発症予防には脳内 eCB シグナルを増強する薬物が有効であると考えられる。しかしながら、CB₁ 受容体刺激薬の場合、本受容体は脳内の広範に分布するため、その刺激薬も脳内の広範な部位に作用し、大麻が有する多彩な生理作用 (幻覚、陶酔感、自発運動量低下など) を引き起こす可能性がある。これに対し、カンナビノイド取込み阻害薬は、eCB の代謝回転が亢進している部位に限局的に作用し、シナプス間隙からの eCB の消失を遅延させるため、中枢性 SA 系賦活時に活性化される部位を選択的に抑制する利点がある。よって、「カンナビノイド取込み阻害薬」が精神性副作用の少ない治療薬として期待できる。

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 4 件)

① Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Endogenously generated 2-arachidonoylglycerol plays an inhibitory role in bombesin-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 658, 2011, 123-131.

② Shimizu T, Tanaka K, Hasegawa T, Yokotani K. Brain $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors are involved in the secretion of noradrenaline and adrenaline from adrenal medulla in rats. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 654, 2011, 241-248.

③ Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Possible inhibitory roles of endogenous 2-arachidonoylglycerol during corticotropin-releasing factor-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in anesthetized rats. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 641, 2010, 54-60.

(高知大学学術情報リポジトリ : <http://hdl.handle.net/10126/4650>)

④ Shimizu T, Yokotani K. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated β_3 -adrenoreceptors. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 387, 2009, 294-299.

(高知大学学術情報リポジトリ : <http://hdl.handle.net/10126/3153>)

[学会発表] (計 9 件)

① 清水孝洋、盧連依、横谷邦彦. 内因性に生成された脳内 2-アラキドノイルグリセロールはボンベシンによる中枢性副腎髄質系賦活に対し二方向性の役割を示す. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 2 月 15 日、学会誌上開催.

② Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Endogenously generated 2-arachidonoylglycerol plays an inhibitory role in the bombesin-induced activation of central adrenomedullary

outflow in rats. 5th International Peptide Symposium, 6 December 2010, Kyoto.

③ 清水孝洋、横谷邦彦. 脳内エンドカンナビノイドの中枢性交感神経-副腎髄質系賦活における抑制性制御. 第38回薬物活性シンポジウム、2010年11月12日、札幌.

④ 清水孝洋、横谷邦彦. 脳内エンドカンナビノイドはカンナビノイド CB₁ 受容体を介してボンベシンによる中枢性副腎髄質系賦活を抑制的に制御する. 第63回日本自律神経学会総会、2010年10月22日、横浜.

⑤ Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Possible inhibitory roles of endogenous 2-arachidonoylglycerol during corticotropin-releasing factor-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in anesthetized rats. Keystone Symposia Conference: Bioactive lipids: Biochemistry and Diseases, 9 June 2010, Kyoto.

⑥ Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Endogenously generated 2-arachidonoylglycerol plays an inhibitory role in corticotropin-releasing factor-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in rats. The 14th International Congress of Endocrinology, 29 March 2010, Kyoto.

⑦ 清水孝洋、盧連依、横谷邦彦. 内因性に生成された 2-アラキドノイルグリセロールはコルチコトロピン放出因子による中枢性交感神経-副腎髄質系賦活に対し抑制性作用を示す. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日、大阪.

⑧ 清水孝洋、横谷邦彦. 脳内エンドカンナビノイドはコルチコトロピン放出因子による中枢性交感神経-副腎髄質系賦活を抑制的に制御する. 第62回日本自律神経学会総会、2009年11月6日、和歌山.

⑨ 清水孝洋、横谷邦彦. 急性寒冷曝露ラットの褐色脂肪組織において交感神経によるアドレナリン β_3 受容体の活性化により CIDEA (cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A) の発現低下が惹起される. 第13回活性アミンに関するワークショップ、2009年8月28日、津.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 孝洋 (TAKAHIRO SHIMIZU)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：00363276