

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500466

研究課題名(和文) 脳内カンナビノイド系が変化するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms for changes of endocannabinoid system in the brain

研究代表者

少作 隆子 (OHNO-SHOSAKU, Takako)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60179025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスとカンナビノイドの関係、およびそれらの脳機能における役割を調べるため、培養細胞を用いた電気生理および生化学実験、マウスを用いた行動実験、ヒトを対象とした選択課題を行い、以下の結果を得た。グルココルチコイドは、ニューロンの興奮性を上昇させ、カンナビノイド受容体発現量を低下させる。内因性カンナビノイド2-AGにはニューロンの興奮性を上昇させる作用がある。カンナビノイド受容体欠損マウスでは大脳基底核依存性学習が障害されている。気分障害患者では大脳基底核が関与する選択課題の遂行に変化がみられる。以上の結果はストレスによる脳機能変化にカンナビノイド系が関与するという仮説と矛盾しない。

研究成果の概要(英文)：Using various methods ranging from electrophysiology and molecular biology to behavioral testing with rodents and humans, we examined the interaction between stress and endocannabinoid system and their contributions to brain function. Our findings are as follows: (1) glucocorticoid-treatment increases neuronal excitability, and also decreases expression of CB1 cannabinoid receptors; (2) the endocannabinoid 2-AG has a CB1-independent excitatory action on neurons; (3) basal ganglia-dependent motor learning is impaired in CB1-knockout mice, and (4) learning strategy in probabilistic selection task depending on basal ganglia is altered in patients with mood disorders. These results are not inconsistent with the hypothesis that endocannabinoid system is involved in stress-induced alterations in brain function.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：脳・神経 ニューロン 神経科学 カンナビノイド ストレス 大脳基底核

1. 研究開始当初の背景

(1) 2001年に、我々を含む3つの研究グループが独立に、カンナビノイドが逆行性シグナルの実体であることを初めて明らかにして以来、脳のさまざまな領域において、カンナビノイドが逆行性シグナルとして働き、シナプス伝達の調節に寄与していることが次々と報告され、この機構が脳に広く見られる普遍的なものであることが明らかとなった。また、カンナビノイド依存性シナプス可塑性のメカニズムの解明も進み、それがどのような脳機能に関与しているかについても次第に明らかになりつつあった。

(2) 一方、これらの一連の研究とは別に、カンナビノイド系それ自体が変化しうることを示す研究が出始めていた。例を挙げると、電気生理学的方法を用いて、てんかん発作、マリファナの摂取、ストレスなどにより脳内カンナビノイド系が変化する可能性が示唆されていた。また、生化学的方法を用いて、カンナビノイド系を構成する主要分子であるCB1受容体、カンナビノイド合成酵素(DGL)、分解酵素(MGL)の発現量がさまざまな環境要因により変化することを示唆する論文が報告されていた。しかし、このような「カンナビノイド系の変化」については、論文の数は増えつつあるが、そのメカニズムを含めた全貌解明にはほど遠い状態であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究の当初の目的は、カンナビノイド系の機能に影響を及ぼす因子を探索し、最終的に何が変化するのかを明らかにし、その変化をもたらすメカニズムを解明すること、カンナビノイド系自体が変化することにどのような生理的意義があるのかについて調べることであった。

(2) しかし、実験を進めるにしたがい、予想外の結果となったこともあり(研究成果の(1)参照)研究計画を見直すこととなった。上記の目的をさらに発展させ、ストレスによりカンナビノイド系が変化することにより脳機能が変化する可能性を検討するために、ニューロン活動に対するストレスホルモンの影響、ニューロン活動に対するカンナビノイドの影響、大脳基底核機能におけるカンナビノイド系の役割、ストレスによる大脳基底核機能の変化、を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 目的のため、ラット海馬ニューロンおよびヒト神経膠芽腫(U87細胞)をさまざまな条件下で培養し、カンナビノイド受容体CB1の発現量をRT-PCR法を用いて測定し、発現量に影響を及ぼす因子を探索した。

(2) 目的のため、ラット培養海馬ニューロンをストレスホルモンであるグルココルチコイド(コルチコステロン)存在下で1-数日間培養し、ニューロンの興奮性がどのように変化するのかを調べた。興奮性の変化は、グルタミン酸受容体の弱いアンタゴニストであるキヌレイン酸を1mMから徐々に下げ、自発性シナプス後電流の発生頻度がどのように変化するのかを指標にして調べた。

(3) 目的のため、ラット培養海馬ニューロンの自発性シナプス後電流発生頻度を指標にして、ニューロンの興奮性に対する内因性カンナビノイド(2-アラキドノイルグリセロール、2-AG)の影響を調べた。

(4) 目的のため、大脳基底核依存性学習課題として3レバーオペラント学習課題を用い、野生型マウスとCB1受容体欠損マウスの行動を比較した。

(5) 目的のため、ヒトの大脳基底核依存性学習課題として、Probabilistic Selection Taskを用い、健常者と気分障害患者の課題成績を比較した。

4. 研究成果

以下の(1)~(5)は、「研究の方法」の(1)~(5)に対応している。

(1) 我々はこれまで、培養海馬ニューロンを用いた電気生理実験においては、ニューロンとグリアの混合培養系を用いてきた。グリアが存在する方が、ニューロンの機能が保たれると判断したからである。CB1受容体が主にニューロンに発現しているなら、混合培養系であっても、ニューロンのCB1発現量の変化を調べることは可能と考えていた。しかし、実際にCB1発現量を調べたところ、ニューロンを多く含む混合培養系とグリアのみの培養系のCB1発現量の差がわずか(10-15%減)であり、CB1受容体がグリアにも多く発現されていることが明らかとなった。よって、当初の実験計画である「ニューロンのCB1発現量に影響を及ぼす因子の探求」は困難となった。

そこで、グリア系株細胞(ヒト神経膠芽腫由来)を用い、CB1発現量に影響をおよぼす因子の探求を行ったところ、ストレスホルモンであるグルココルチコイドおよび低酸素処理により(学会発表)CB1発現量が低下することを見出した。

(2) ラット培養海馬ニューロンをコルチコステロン存在下で1-数日間培養すると、自発性シナプス後電流の発生頻度が有意に高くなることを見出した(図1)。電気生理学的手法を用いて、コルチコステロンの急性投与の効果(主に興奮性上昇作用)を報告している論文は多く存在するが、数日間処理させた

後の効果を電気生理学的に調べたものはほとんどない。よって、本研究の結果は興味深く、ストレスホルモンの持続的上昇時の脳内の変化を考える上で重要である。

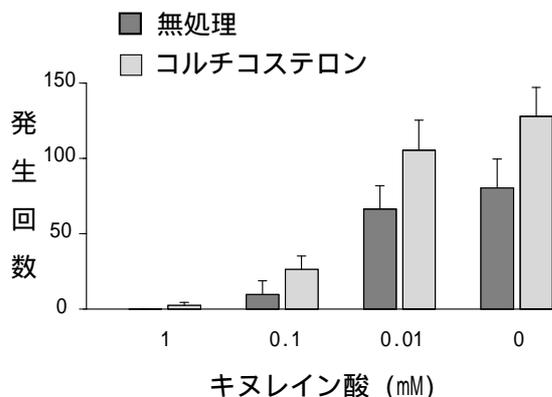


図1. コルチコステロンの効果

(3) ラット培養海馬ニューロンの自発性シナプス活動に対する 2-AG の作用を調べたところ、驚いたことに、CB1 受容体を介する抑制作用の他に、CB1 受容体を介さない興奮作用があることを見出した。この発見は、これまでのカンナビノイド系の働きを大きく変えるものであり、当初の予定にはなかったが、そのメカニズムの解明を試みた。

まず、「2-AG の CB1 受容体を介さない興奮作用」を高い再現性で示すことのできる実験条件を探した。その結果、CB1 受容体阻害剤 (AM281) および 2-AG 合成酵素阻害剤 (THL) で前処理した細胞を用い、キヌレイン酸を含まない条件下で 1 μ M 2-AG を投与すると、自発性シナプス後電流の発生頻度が 10 倍以上となること判明した (図2)。よって、この条件を用いて以下の実験を行った。

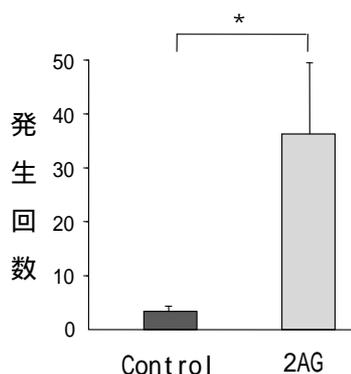


図2. 2-AG の効果

グリアは CB2 受容体を多く発現しており、また、グリア内のカルシウム濃度変化がグリアとニューロン間のシグナル伝達に与える可能性が示唆されている。そこで、2-AG の興奮上昇作用に対するグリアの関与を調べるため、CB2 受容体阻害剤およびカルシウム

ポンプ阻害剤 (thapsigargin) の効果を調べたところ、両薬剤とも無効であり、2-AG の興奮作用にはグリアは関与しないと考えられた (学会発表)。

次に、2-AG の興奮作用が、2-AG そのものによるのか、あるいは、2-AG の代謝産物によるものなのかを明らかにするために、2-AG の分解酵素であるモノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) の阻害剤の効果を調べたところ、MGL 阻害剤の前処理により 2-AG の興奮作用が小さくなること判明した。よって、2-AG の分解産物が興奮作用を引き起こすと考えられた (学会発表)。現在、アラキドン酸の効果を検討中である。

この研究は、新規採用課題である基盤研究 (C) のテーマとして継続研究の予定である。

(4) CB1 受容体は大脳基底核に高密度に分布しており、手続き記憶などの大脳基底核依存性の運動学習においてカンナビノイド系が重要な役割を担っている可能性が高い。しかし、その可能性を検討した研究はこれまでほとんどない。そこで、大脳基底核依存性課題として 3 レバーオペラント学習課題を用い、野生型マウスと CB1 受容体欠損マウスの行動を比較した。その結果、CB1 受容体欠損マウスではこの課題の成績がきわめて悪いことが判明した (図3) (学会発表)。よって、大脳基底核依存性の運動学習においてカンナビノイド系が重要な役割を担っている可能性が強く示唆された。

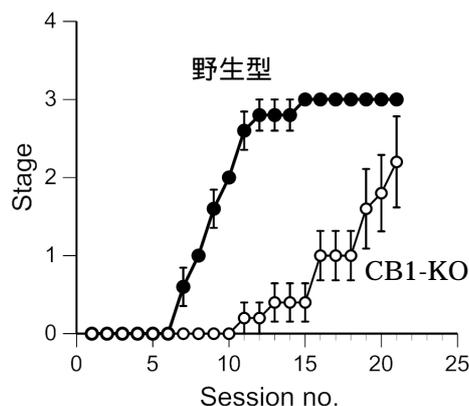


図3. 3 レバー課題の学習曲線

(5) Probabilistic Selection Task は、ヒトを対象とした強化学習の学習傾向を調べる課題として用いられている (Science 306:1940-1943, 2004)。この課題を用いると、正の報酬がもたらされた場合にその選択をより選ぶようになる「Go 学習」と、負の報酬がもたらされた場合にその選択をより避けるようになる「NoGo 学習」のどちらがより優位であるのかを調べることができる。また、この課題は大脳基底核依存性であることが知られている。そこで、ストレスにより発症すると思われる「気分障害」の患者群と健康

群とで、この課題の結果を比較した。

Go 学習の指標として用いられる「Choose A」の値は、健常群と患者群とで差はみられなかった。しかし、NoGo 学習の指標として用いられる「Avoid B」は患者群で有意に小さかった。以上の結果は、気分障害患者では強化学習の学習方略が変化していることを示唆するものである。

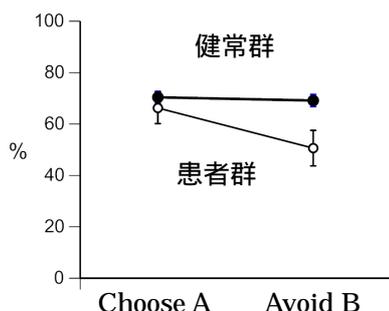


図 4. Probabilistic Selection Task

(6) 以上の断片的な結果より、「ストレスにより、グルココルチコイドおよび 2-AG の興奮作用やその他のメカニズムを介してカンナビノイド系が変化すると、大脳基底核依存性の強化学習やその他のカンナビノイド依存性の脳機能が変化する」という仮説を立てた。この仮説の検証は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 2014 (in press). doi: 10.1016/j.conb.2014.03.017.

Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Kita Y, Sano Y, Shimizu T, Di Marzo V, Kano M. Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol* 591:4765-76, 2013.

Sugawara Y, Echigo R, Kashima K, Minami H, Watanabe M, Nishikawa Y, Muranishi M, Yoneda M, Ohno-Shosaku T. Intracellular calcium level is an important factor influencing ion channel modulations by PLC-coupled metabotropic receptors in hippocampal neurons. *Brain Res* 1512:9-21, 2013.

Echigo R, Sugimoto N, Yachie A, Ohno-Shosaku T. Cannabinoids inhibit

peptidoglycan-induced phosphorylation of NF- κ B and cell growth in U87MG human malignant glioma cells. *Oncol Rep* 28:1176-80, 2012.

〔学会発表〕(計 6 件)

少作隆子、2-アラキドノイルグリセロールと関連物質によるシナプス伝達調節、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜(神奈川県)(発表予定)

米田貢、運動学習における CB1 受容体の役割: 3 レバー・オペラント課題を用いて、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜(神奈川県)(発表予定)

杉本直俊、低酸素環境下でのがん細胞の動向、第 91 回日本生理学会大会サテライト企画、第 9 回環境生理学プレコングス、2014 年 3 月 15 日、国民宿舎 レインボー桜島(鹿児島県)

少作隆子、内因性カンナビノイド 2-AG のカンナビノイド受容体を介さない神経活動促進作用、Neuro2013、2013 年 6 月 20-23 日、国立京都国際会館(京都府)

少作隆子、内因性カンナビノイド 2-AG のカンナビノイド受容体を介さない作用、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27-29 日、タワーホール船堀(東京都)

越後亮介、ヒト神経膠腫 U87 細胞における CB1 受容体を介したカンナビノイドの TLR2 誘発性炎症反応の抑制作用、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計 1 件)

少作隆子、2-アラキドノイルグリセロールの逆行性シグナルとしての役割、医学のあゆみ(医歯薬出版)248 号 13 巻 1009-1013、2014 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

少作 隆子 (OHNO-SHOSAKU, Takako)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 60179025

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし