

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592275

研究課題名(和文) 内在性カンナビノイドの神経終末における産生機構と神経発達への影響の検討

研究課題名(英文) Examination of the endocannabinoid production pathway in nerve terminal and effects on neuronal development

研究代表者

麻生 知寿 (ASO, CHIZU)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40436308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：内在性カンナビノイドである2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)は神経細胞においてカンナビノイド(CB)1受容体を介して鎮静・鎮痛作用や神経発達に影響を与えることが知られている。ラット脳より2-AG産生活性を持つ画分を部分精製しトリプシン消化後質量分析計で解析し単一タンパクを同定した。同定されたタンパクはラット脳に多く発現しており、特に海馬、中脳、延髄に分布していることが確認された。また、2-AGの末梢神経への影響を胎生7日の鶏卵から分離した脊髄後根神経節を用いて検討した。培養液に2-AGを加えたところ、神経円錐崩壊と神経伸長減少が観察された。この現象はCB受容体の遮断薬により拮抗された。

研究成果の概要(英文)：It is known that 2-arachidonoilglycerol(2-AG) affects a sedative and an analgesic action, and neuronal development through a cannabinoid(CB) 1 receptor in the nervous system. From the rat brain, partial purification of the fraction with 2-AG production activity was carried out, and it is analyzed by mass spectrometer after trypsin digestion, and identified single protein. The protein distributed ubiquitously in the rat brain, with higher levels of expression in the hippocampus, midbrain, and medulla. Moreover, the influence of 2-AG on the peripheral nerve was considered using the spine dorsal root ganglion separated from the chicken egg on the viviparous 7th day. When 2-AG was added to the culture solution, nerve growth cone collapse and nerve extension reduction was observed. This phenomenon rivaled by the antagonist of the CB receptor

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔科学

キーワード：カンナビノイド 神経発達

1. 研究開始当初の背景

カンナビノイド受容体は、マリファナの活性成分である 9 テトラヒドロカンナビノールの受容体として発見され、2種類の内在性リガンド(アナンダミドと2-アラキドノイルグリセロール(以下2-AG))が同定されている。カンナビノイド受容体は神経系に広く分布しており、カンナビノイドの臨床薬理作用としてはマリファナが強い精神神経作用を持つことから神経系への作用がよく知られている。多発性硬化症などの神経疾患や悪性腫瘍の痛みに対する鎮痛作用、アルツハイマー病進行の予防作用、食欲増進、筋痙攣の緩和、制吐作用などの精神神経作用や、神経膠腫増殖抑制などの抗腫瘍作用も報告されている。これらの薬理作用を有していることより、カンナビノイド受容体作動薬は、オピオイドとは全く異なる経路で作用するので新たな鎮痛薬となる可能性があり、オピオイドの嘔気・便秘といった副作用がないことなどから、注目を浴びている。2-AGの産生経路は様々な想定されているが、細胞膜の構成成分であるリン脂質の中でグリセロール骨格の2位にアラキドン酸を持つものが原料であると考えられている。特に2位にアラキドン酸を含む phosphatidylcholine が細胞膜から切り出されて phospholipase C により diacylglycerol(DG)が産生され、さらに DG が DGlipase により加水分解を受けて産生される経路が有力である。

また、カンナビノイド受容体は胎生早期の神経前駆組織に発現しており、神経の分化やシナプス形成の過程においても高いレベルで増加し続けることが知られている。このことから内在性カンナビノイドは神経の発達や再生に影響を及ぼし、神経の成長発達や疼痛発生・鎮痛機構を修飾する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、2-AGの産生経路やその調節機構を明らかにすることである。さらに内在性カンナビノイドの神経細胞への影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

<実験方法その1: ラット脳からのDG lipaseの精製>

1) DGlipase活性の測定法

1-stearoyl-2-[1-14C]arachidonoyl-sn-glycerolをラット脳から分離した酵素源(ラット脳ホモジネートや精製したタンパク含有液)と assay buffer (0.125 M NaCl, 0.125 M Tris-HCl pH8.0, 1.25 mM EDTA, 6.25 mM sodium deoxycholate)とともに37℃で10分間反応させた後、反応液全体から Bligh and Dyer法を用いて脂質だけを分離する。分離した総脂質を50 µl のクロロホルム/メタノール(2:1)液に溶解しTLCプレートにスポットする。TLCプレートを展開溶媒 (benzene/diethylether/ethanol/ammonia (40:140:4:0.2, v/v/v)) で一次元展開し、乾燥後イメージングプレートに12時間暴露した後イメージングプレートをイメージアナライザーで読み取り、2-[1-14C]arachidonoyl-glycerolの放射性を測定する。単位時間あたりの2-[1-14C]arachidonoyl-glycerolの産生量をDGlipase活性とする。

2)ラット脳からの酵素源の精製

6週齢のwisterラット(オス)をエーテル麻酔下に断頭し全脳を摘出する。直ちに氷温のホモジネートバッファー(0.3 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)内に投入し、Potter-Elvehjemテフロンホモジネーターを用いてホモジネートを作成する。4℃下で遠心法により細胞分画を行う。各細胞分画のDG lipase活性を測定する。活性の高かった画分をさらに硫酸分画で分離し、活性測定を行う。さらに活性の高かつ

た画分を各種クロマトグラフィ（疎水カラム、陰イオン交換カラム、ハオドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過カラム）を用いて DGlipase活性を指標に酵素源の精製を行う。

3)部分精製酵素の特性の解析

部分精製酵素の至適pH、基質量反応性(基質量を阻害剤(DG lipase inhibitor: THL, RHC-80267)への反応性を調べる。

4)DGlipase の同定

カラムクロマトグラフィで分取した DG lipase活性を含む酵素源タンパク(複数蛋白の混合液)をトリプシンで消化し、ペプチド断片混合液を作成する。液体クロマトグラフ質量分析装置で解析し、ペプチド断片混合液に含まれる蛋白を同定する。同定された蛋白の中で、活性出現パターンと一致して出現するものを抽出し、候補タンパクとする。候補タンパクのラットcDNAを購入しほ乳類培養細胞(CHO細胞)に遺伝子導入して過剰発現させ、過剰発現させた細胞を回収し破碎後、細胞分画し105,000 × g上清を作成し活性の有無を確認する。活性の高かったタンパクを用いて、その至適H、基質量反応性(基質量を阻害剤(DG lipase inhibitor: THL, RHC-80267)への反応性を調べる。

<実験方法その2: 再生神経細胞突起の挙動におけるカンナビノイドの影響の解析>

胎生7日目の chick DRG を採取し、BPE 添加 F12 培地(100 μg/ml bovine pituitary extract, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 20 ng/ml mouse 7S NGF を含む)で20時間、37 °C で培養する。以下の各条件で培養し、2、6、12、24、48時間後の細胞突起長と成長円錐崩壊頻度を計測する。記録には、自動焦点補正タイムラップビデオシステムを用いる。

1)2-AGを培養液に0~20 μMとなるよう

に添加

2)カンナビノイド受容体アンタゴニスト:AM251で処理30分後に2-AGを培養液に0~20 μMとなるように添加

3) 2-AGを培養液に0~20 μMとなるように添加後、30分後に培養液を交換

4) DG lipase阻害薬(RHC80267, THL)を培養液に添加

4. 研究成果

内在性カンナビノイドである2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)は神経細胞においてカンナビノイド受容体を介して鎮静・鎮痛作用や神経発達に影響を与えることが知られているが、その産生機構には不明な点が多い。我々は2-AG産生に関わる酵素としてグリセロール骨格の2位にアラキドン酸を含むジアシルグリセロールの1位の脂肪酸(DG)を加水分解して2-AGを産生する酵素、DG lipaseの精製を目的とした。

6週齢のwisterラット(オス)脳より2-AG産生活性を持つタンパク画分をDG lipase活性を指標に精製した。まず、ラット脳から部分精製したタンパク画分の酵素学的性質を検討して、反応の至適pH、至適基質濃度、反応速度、阻害薬の反応性を決定した。至適pHは7.5-8、 V_{max} は 0.45 ± 0.027 μmol/min/mg protein、 K_m 値は 135 ± 24 μM、阻害薬に対するIC50はRHC 80267で8 μM、THLで10nMであった。(これらの値はこれまで報告されているDG lipaseのIC50と同じオーダーであった。)

さらに、部分精製した活性タンパク画分をトリプシンで消化し、質量分析計で解析しMASCOT searchを用いて解析したところ約100種のタンパクが同定された。その中からMASCOT scoreが高く構造的、性質的に2-AG産生能を持つと考えられるタンパク質を抽出し候補タンパクとした。候補タンパクの遺伝子を培養細胞(CHO細胞)

に遺伝子導入し過剰発現させ、部分精製で用いたのと同様な精製法で目的タンパクを精製抽出し、DGIipase 活性の有無を確認した。高い酵素活性に認められたタンパクについて、反応の至適 pH、至適基質濃度、反応速度、阻害薬の反応性に調べた。ラット脳より部分精製したタンパクと比較したところ、極めて同様の挙動であったため、このタンパクが 2-AG 産生に寄与する DGIipase として作用している可能性が高いと考えられた。また、同定されたタンパクの体内分布について Western Blotting と免疫染色を用いて調べた。同定されたタンパクは脳に多く発現しており、特に海馬、中脳、延髄に分布していることが確認された。

また、2-AG の末梢神経伸長への影響を胎 7 日の鶏卵から分離した脊髄後根神経節を用いて検討した。培養液に 2-AG を加えたところ、濃度依存的に神経円錐の崩壊と神経伸長の減少が観察された。この現象はカンナビノイド受容体の遮断薬 (AM251) により、拮抗されたので、受容体を介する現象であると考えられた。また、2-AG 添加後 30 分で培養液を交換したところ、神経円錐崩壊と神経伸長減少が軽減されたため、2-AG の神経系への影響は可逆的である可能性が示唆された。

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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

麻生 知寿 (ASOU CHIZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40436308

(2) 研究分担者

大嶋 紀安 (OHSHIMA NORIYASU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30360514

連携研究者

()

研究者番号:

