

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860471

研究課題名(和文) ドーパミンシグナリングと内因性カンナビノイドシステムの関連性の検討

研究課題名(英文) Investigation of relationship between dopamine signaling and endocannabinoid system

研究代表者

越智 拓(Ochi, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70527704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系において内因性カンナビノイドはシナプス逆行性に作用し、プレシナプスからの神経伝達物質の遊離を抑制することが知られている。本研究で、我々は、グリア細胞が長期間、高濃度のドーパミンに曝露されることにより、PLC 4(2-AG合成酵素)の発現上昇と、MGLL(2-AG代謝酵素)の発現低下を介して、2-AGシグナリングを上昇させることを明らかにした。これらの結果から、シナプスにおけるドーパミン濃度が長期にわたり上昇するような状況下では、グリア細胞由来の内因性カンナビノイドがドーパミンシグナリングの調節に積極的に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In the central nervous system, endocannabinoids are released from postsynaptic neuron, and retrogradely act on the receptors on the presynaptic membrane to inhibit neurotransmitter release from presynaptic neuron. In this study, we revealed that mRNA level of PLC 4 (2-AG synthetic enzyme) was up-regulated and mRNA level of MGLL (2-AG degrading enzyme) was down-regulated by dopamine treatment. Thereby 2-AG signaling of glial cell was enhanced. From these results, under the condition that dopamine concentration rises for a long term at the synapse, it is suggested that glial endocannabinoid system is involved in the regulation of the dopamine signaling.

研究分野：法医学

キーワード：内因性カンナビノイド 内因性カンナビノイドシステム ドーパミン グリア細胞

### 1. 研究開始当初の背景

カンナビノイドは、大麻の主要活性成分である  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノールと、その構造類似体の総称である。これらカンナビノイドの生体への作用については、様々な観点から検討がなされており、その研究過程の中で、カンナビノイド受容体に作用する内因性リガンドが同定され、内因性カンナビノイド (2-AG、AEA) として注目されている。このような内因性カンナビノイドおよびそれらが作用する受容体 (CB1、CB2)、内因性カンナビノイドの合成と代謝に關与する酵素 (NAPE-PLD、FAAH、DAGL、PLC 4、MGLL) によって構成されるシステムが内因性カンナビノイドシステム (ECS) である。この ECS は、生体内に広く存在し、様々な生理機能に影響を及ぼしている。特に中枢神経系において、内因性カンナビノイドはシナプス後膜から遊離し、逆行性にシナプス前膜に存在する受容体に作用することで各種神経伝達物質の遊離を抑制することが知られている。このようなシナプスには、グリア細胞も存在し、ECS を介したシナプスの機能調節に關与していると考えられている。

### 2. 研究の目的

我々は中枢神経系における ECS 機能を規定する要素の一つとして、グリア細胞における ECS 関連遺伝子の発現状態に着目し、それらに影響を与える因子の探索を行っている。本研究では、様々な依存性薬物の薬理作用や薬物依存形成に深く關与していることが示唆されるドーパミン (DA) を ECS に影響を与える因子と仮定し、DA シグナリングと ECS との関連性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞調整

mRNA 発現解析用サンプルとして、培養ラットグリオーマ細胞 (C6) を播種した後、DA および DA 受容体アゴニストを用いて処理した。処理開始から 0、24、48、72 時間で細胞を回収した。また、質量分析用サンプルとして、C6 を播種し、DA にて前処理後、カルシウムイオノホアを用いて処理し、培養上清を回収した。

#### (2) リアルタイム PCR

回収したサンプルから total RNA を精製し、DNase 処理後、RT-PCR 反応により cDNA を合成した。その後、リアルタイム PCR を用いて ECS 関連因子の遺伝子発現量を測定した。なお、内在性コントロール遺伝子として HPRT を用いた。

#### (3) Western blotting

10% SDS-PAGE を用いてタンパクを分離し、PVDF メンブレンに転写した。市販の抗体を用い、C6 における DA 受容体サブタイプの発現状況を確認した

#### (4) 質量分析

回収したサンプルから内因性カンナビノイドを固相抽出後、シリル化し、GC/MS を用いて定量した。なお、内部標準物質として methyl heneicosanoate を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) ECS 関連因子の遺伝子発現に対する DA 処理の影響

0~100  $\mu$ M DA で C6 を 0~72 時間処理した場合における ECS 関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定した。100  $\mu$ M DA 処理により PLC 4 の発現が有意に上昇し、MGLL の発現が有意に低下した (図 1)。また、これらの発現変化は、24 時間処理から 72 時間処理まで継続していた。一方、その他の ECS 関連因子の遺伝子発現に明らかな発現変化は認められなかった。

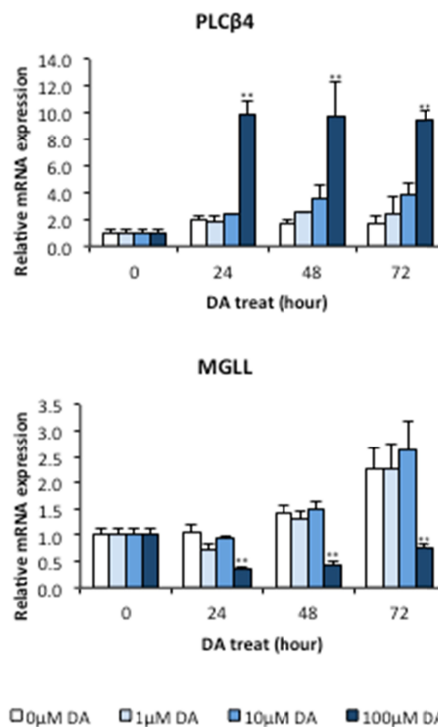


図 1. DA 処理による PLC 4、MGLL の発現変化  
C6 を 0、1、10、100  $\mu$ M DA で 0、24、48、72 時間処理した。データは平均値  $\pm$  SE で示す (n=3)。  
\*\*P<0.01(vs. 0  $\mu$ M DA)。

#### (2) PLC 4 および MGLL の発現変化に対する DA 受容体の関与の検討

上記の検討で認められた遺伝子発現変化 (PLC 4 の発現上昇と MGLL の発現低下) が、DA の受容体を介した作用であるか否かを確認することとした。まず、C6 における DA 受容体サブタイプの発現状況を Western blotting によって確認したところ、D1 様受容体として D1 の発現を認め、D2 様受容体として D3 と D4 の発現を認めた (図 2)。

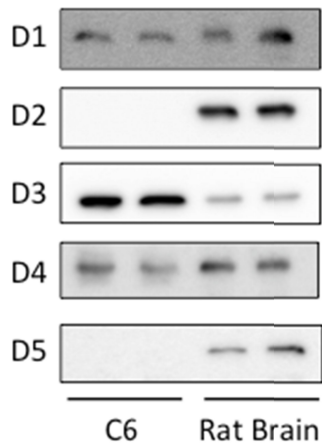


図2. C6におけるDA受容体サブタイプ発現状況  
通常培養条件下におけるC6からタンパクサンプルを精製した。また陽性コントロールとしてWistarラットの脳から精製したタンパクサンプルを用いた。

さらに、D1様受容体選択的アゴニストとしてSKF38393 (SKF)を用い、またD2様受容体選択的アゴニストとしてQuipirole (QNP)を用いてC6を0~72時間処理し、PLC 4とMGLLの発現変化をリアルタイムPCRで検討した。その結果、SKF処理によってDA処理と同様の遺伝子発現変化が認められ(図3)、QNP処理では有意な発現変化を認めなかった(図4)。

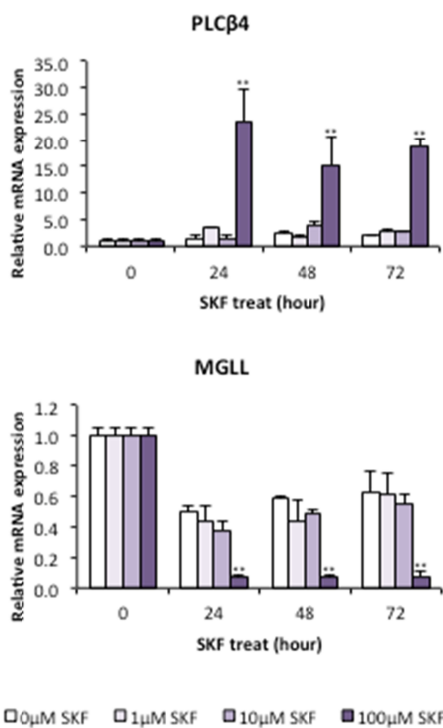


図3. SKF処理によるPLC 4、MGLLの発現変化  
C6を0、1、10、100 μM SKFで0、24、48、72時間処理した。データは平均値±SEで示す(n=3)。\*\*P<0.01(vs.0 μM SKF)。

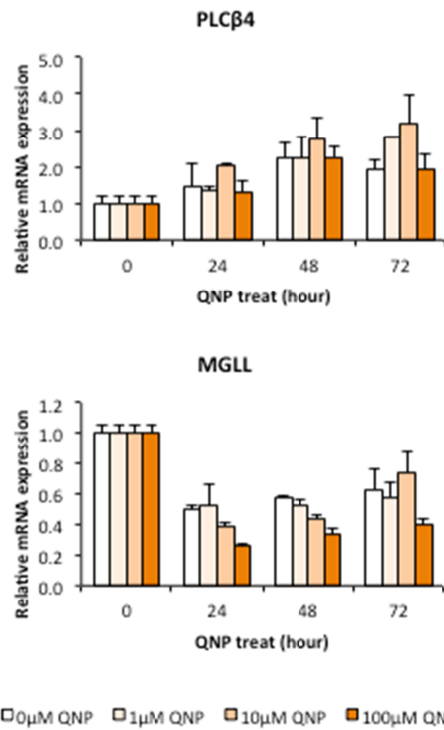


図4. QNP処理によるPLC 4、MGLLの発現変化  
C6を0、1、10、100 μM QNPで0、24、48、72時間処理した。データは平均値±SEで示す(n=3)。

### (3)内因性カンナビノイド代謝回転に対するDA処理の影響検討

DAおよびSKFで発現変化が認められるPLC 4とMGLLはそれぞれ内因性カンナビノイドの一つである2-AGの合成酵素と代謝酵素である。従って、DA処理によってC6における2-AGの代謝回転に変化が生じる可能性が示唆された。そこで、C6を100 μM DAで24、48、72時間前処理後、カルシウムイオノホアA23187で処理し、2-AGの合成を誘導し、DAの2-AGの代謝回転への影響を検討した。なお、コントロール群は、0 μM DAで同様に前処理後、A23187で処理した。24、48、72時間の前処理後、A23187によって誘導される2-AGは、コントロール群ではそれぞれ32.3 ± 10.0、34.4 ± 1.1、38.8 ± 0.2 ng/mg proteinであり、DA前処理群ではそれぞれ43.6 ± 9.8、49.9 ± 1.0、91.7 ± 7.8 ng/mg proteinであった。24時間前処理ではコントロール群とDA前処理群とで有意差を認めないが、48および72時間前処理ではDA前処理群において有意に高くなった(図5)。

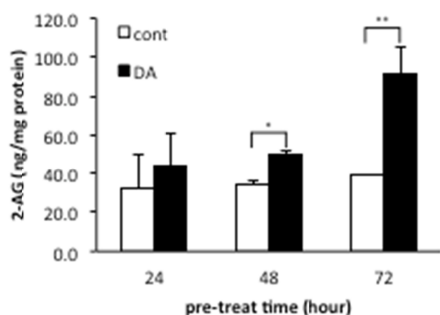


図5. 培養上清中に誘導される2-AG  
0  $\mu$ M DA (cont) あるいは100  $\mu$ M DA (DA) にて24、48、72時間前処理した後、10  $\mu$ M A23187 にて10分間処理した。データは平均値  $\pm$  SE で示す (n=3)。\*\*P<0.01(vs.cont), \*P<0.05(vs.cont)。

以上の結果から、長期間高濃度の DA に曝露されるような状況下では、グリア細胞は D1 受容体を介して DA 濃度の上昇を感知し、2-AG の合成酵素である PLC 4 の発現量を上昇させるとともに、2-AG の代謝酵素である MGLL の発現量を低下させることを介し、2-AG シグナリングを亢進させるということが示唆される (図6)。

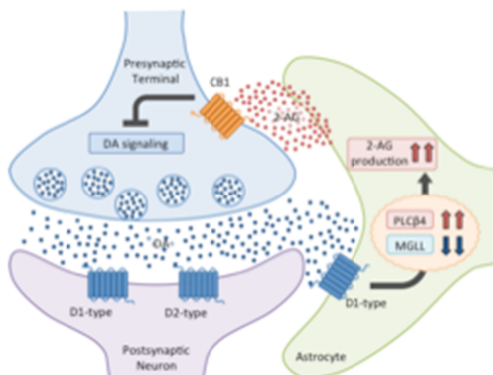


図6. グリア細胞の ECS を介した DA シグナリング調節機構の模式図

## 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0件)

[学会発表](計5件)

越智拓、平田ゆかり、浜島誠、磯部一郎、長期高濃度ドーパミン曝露はグリア細胞におけるエンドカンナビノイドシグナリングを強化する、第41回日本医用マススペクトル学会年会、2016.9.15-16、ウインク愛知(愛知)

Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Ichiro Isobe, Astrocytes regulate dopamine signaling through

endocannabinoid system, 54th Annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2016.8.28-9.1, Brisbane(Australia)

越智拓、平田ゆかり、浜島誠、磯部一郎、内因性カンナビノイドシステムを介したグリア細胞によるドーパミンシグナリング調節機構、第100次日本法医学会学術全国集会、2016.6.15-17、きゅりあん(東京)

越智拓、平田ゆかり、浜島誠、中留真人、磯部一郎、内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現制御における MAPK 経路の関与、第57回日本神経化学会、2014.9.29-10.1、奈良県文化会館(奈良)

Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Masato Nakatome, Ichiro Isobe, MAPK pathway regulates CB1 and TRPV1 mRNA expression in C6 rat glioma cell line, 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2014.6.16-20, Fukuoka(Japan)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
越智拓 (OCHI, Hiroshi)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：70527704

(2)研究分担者  
無し

(3)連携研究者  
無し

(4)研究協力者  
無し