

平成 21 年 3 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790072  
 研究課題名（和文）アレルギー反応における内在性カンナビノイド受容体リガンドの役割の解明  
 研究課題名（英文）Physiological roles of an endogenous cannabinoid receptor ligand in allergy  
 研究代表者  
 岡 沙織 (OKA SAORI)  
 帝京大学・薬学部・助教  
 研究者番号 80439562

研究成果の概要：マリファナの受容体として知られるカンナビノイド受容体としてはこれまでに、主に神経系に発現している CB1 受容体と、免疫系に多く発現している CB2 受容体が報告されている。本研究では、CB2 受容体とその内在性リガンドである 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) が、アレルギー反応において促進的に働いていることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学、脂質生化学、カンナビノイド、アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

カンナビノイド受容体は、マリファナの受容体として知られている 7 回膜貫通、G 蛋白質共役型の受容体である。カンナビノイド受容体としては、これまでに、脳などの神経系に多量に発現している CB1 受容体と、炎症・免疫系に多量に発現している CB2 受容体の二つが報告されている。CB1 受容体、CB2 受容体ともに、その内在性リガンドは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)である。2-AG は、通常は生体内で比較的微量に存在するのみであるが、刺激に応じて、アラキドン酸を多く含むホス

ファチジルイノシトール等から速やかに産生され、細胞膜を容易に通過して細胞間メッセージンジャーとして機能する。また、その構造もリゾリン脂質様であることから、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) やリゾホスファチジン酸 (LPA)、血小板活性化因子 (PAF) 等に並ぶ、リゾリン脂質性メディエーターの一つであると現在では考えられるようになっていく。

2-AG は、神経系では主に神経前終末に発現している CB1 受容体に作用し、グルタミン酸や GABA といった神経伝達物質の放出を抑制することにより、神経伝達を抑制的に制御している。一方、CB2 受容体は、炎症・免疫系の細胞に多量に発現している。しかし、炎症

反応や免疫応答において、2-AG に具体的にどのような生理的あるいは病態生理的な役割があるのか、詳しいことはまだよく分かっていなかった。

これまでの研究で、研究代表者は、ホルボールエステルで誘発したマウス耳介の急性炎症モデルにおいて、2-AG 量の増大が見られること、CB2 受容体アンタゴニストを投与することにより、耳介の炎症が強く抑制されること、2-AG を耳介に塗布することによって CB2 受容体を介した耳介の腫脹が起こることを報告した。更に、ハプテン抗原によるマウス耳介の接触性皮膚炎モデルやハプテンを反復投与することにより作製した慢性の皮膚炎モデル（ヒトのアトピー性皮膚炎の動物モデル）といった、アレルギー性炎症においても 2-AG 量の著しい増加が観察されること、CB2 受容体がハプテンによるアレルギーの感作相と惹起相の双方において何らかの重要な関与をしていることを明らかにした。慢性のアレルギー反応では、好酸球がその病態に深く関わっていることが知られている。実際、上述の慢性の皮膚炎モデルにおいて、好酸球の炎症部位への浸潤に CB2 受容体が関与していることも分かった。これらの結果は、CB2 受容体とその内在性リガンドである 2-AG が炎症やアレルギー反応に促進的に働いているということを示唆するものである。

このように、CB2 受容体と 2-AG は、炎症・免疫の場で重要な関与をしていることが次第に明らかになってきているが、2-AG に具体的にどのような生理的あるいは病態生理的な役割があるのか、2-AG の生物活性の詳細、2-AG の作用の分子メカニズム、作用する細胞には他にどのようなものがあるのかといった点など、詳しいことはまだよく分かっていない。また、2-AG はどういった細胞が産生するのか、産生の引き金は何であるのか、更に 2-AG の産生機構や、その調節機構、関与する酵素についても十分なことはまだ分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、炎症反応や免疫応答、その中でも特に、アレルギー反応における、CB2 受容体とその内在性リガンドである 2-AG の役割を解明することにより、アトピー性皮膚炎やスギ花粉症などのアレルギー疾患における、2-AG と CB2 受容体の生理的意義を明らかにすることを目的として行った。

### (1) 好酸球に及ぼす 2-AG の影響

研究代表者はこれまでに、アレルギー性炎

症に重要な役割を担っている好酸球に、CB2 受容体が多量に発現していること、一方、好中球には CB2 受容体は殆ど発現していないこと、2-AG が好酸球を、CB2 受容体を介して遊走させること、を報告してきた。今回の研究では、好酸球の遊走の際に血管壁を通過するステップにおける 2-AG の役割を明らかにすることを目指した。

### (2) 樹状細胞に及ぼす 2-AG の役割

研究代表者は最近の研究で、CB2 受容体と 2-AG が、異物やアレルゲンに対する感作の成立に促進的に関与していることを明らかにした。感作の成立には、樹状細胞が重要な役割を担っているが、研究代表者のこれまでの研究で、樹状細胞の一つである表皮ランゲルハンス細胞に CB2 受容体が高発現しているという実験結果を得ている。本研究では、マウス骨髄由来の樹状細胞を用いて、感作の成立における CB2 受容体と 2-AG の具体的な役割の検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 好酸球に及ぼす 2-AG の影響

- ① ヒト好酸球性白血球細胞である EoL-1 細胞は、0.5 mM sodium butylate を加えて 5 日間培養して分化させた。
- ② 細胞の接着は、96 ウェルプレートに各種接着因子をコートし、細胞を加えてインキュベートしたのち接着した細胞を、血球計算盤を用いてカウントした。
- ③ 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する EoL-1 細胞の接着を調べる実験では、HUVEC をプレートに播種し、コンフルエントになったところで、PKH67 で蛍光標識した EoL-1 細胞を加えてアッセイを行った。
- ④ Akt、ERK、p38 MAP キナーゼ、JNK のリン酸化の検出は、細胞を 2-AG で刺激した後ライセートを調製し、ウェスタンブロット法により検出した。

### (2) 樹状細胞に及ぼす 2-AG の役割

- ① C57BL/6J マウスの大腿骨及び頸骨から骨髄細胞を採取し、GM-CSF/IL-4 存在下で培養した。2 日目と 4 日目にメディアウムを交換し、培養 7 日目に樹状細胞を回収した。得られた樹状細胞は MACS CD11c マイクロビーズを用いて 95%以上の純度に精製し、実験に用いた。
- ② CB2 受容体及び CB1 受容体の発現は、

RT-PCR 法により調べた。

- ③ 細胞の接着は、96 ウェルプレートに各種接着因子をコートし、細胞を加えてインキュベートしたのち接着した細胞を、血球計算盤を用いてカウントした。
- ④ 細胞の遊走は、Transwell を用いて 37°C で 1-4 時間培養することにより調べた。細胞は上室に、下室に 2-AG を加えた。CB2 受容体アンタゴニストである SR144528 は上室と下室の両方に加えた。下室に移動した細胞は血球計算板を用いてカウントした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 好酸球に及ぼす 2-AG の影響

今回は、好酸球における 2-AG と CB2 受容体の役割の詳細を解明する目的で実験を行った。その結果、2-AG が、CB2 受容体を介して、フィブロネクチン等の細胞外マトリックスや ICAM-1、VCAM-1 等の接着分子に対する好酸球の接着を亢進させることが分かった (図 1)。

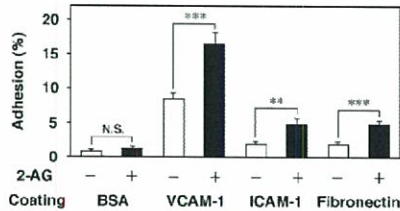


図1 2-AG による EoL-1 細胞の各種接着因子への接着亢進。(n=4, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001)。

阻害剤を用いた実験から、2-AG による好酸球の接着亢進には、PI3 キナーゼ-Akt 経路、MEK-ERK 経路が関与していること、p38 MAP キナーゼや c-Jun N-terminal キナーゼは関与していないことが分かった。実際、好酸球に 2-AG を添加することにより、CB2 受容体を介した Akt 及び ERK のリン酸化が起きていることがウエスタンブロット解析により確認された。更に、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) への EoL-1 細胞の接着に及ぼす、TNF- $\alpha$  及び 2-AG の影響を調べたところ、TNF- $\alpha$  は EoL-1 細胞の HUVEC への接着を増強させることが分かった。また、2-AG も EoL-1 細胞の HUVEC への接着を増大させることが分かった。注目すべきことに、EoL-1 細胞を CB2 受容体アンタゴニストである SR144528 で処理することにより、2-AG による接着の増強だけでなく、TNF- $\alpha$  による接着の増強も、強く抑制を受けることが分かった (図 2)。この結果は、TNF- $\alpha$  による接着の増大には、CB2 受容体とその内在性リ

ガンドである 2-AG が関与しているということを示唆するものである。

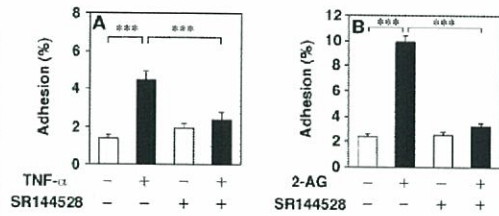


図2 TNF- $\alpha$  又は 2-AG による EoL-1 細胞の HUVEC への接着亢進に及ぼす SR144528 の影響。(n=4, \*\*\* P<0.001)。

##### (2) 樹状細胞に及ぼす 2-AG の役割

今回の研究では、マウス骨髄由来樹状細胞を用いて、樹状細胞の機能に及ぼす 2-AG と CB2 受容体の役割を調べた。初めに、CB2 受容体の発現を PCR 法により調べたところ、マウス骨髄由来の樹状細胞には CB2 受容体が高発現していることが分かった。

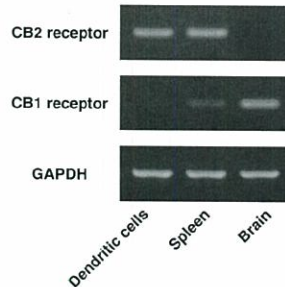


図3 マウス骨髄由来樹状細胞における CB2 受容体の発現。

次に、樹状細胞の機能に及ぼす 2-AG の影響を調べた。まず、フィブロネクチンへの接着に及ぼす影響を調べたところ、2-AG は、濃度依存的に細胞接着を亢進させることが分かった。2-AG の作用は CB2 受容体アンタゴニストで完全に抑制されたことから、CB2 受容体を介していることが分かった。また、2-AG は、CB2 受容体を介した樹状細胞のケモタキシスを引き起こすことも明らかとなった。

カンナビノイド CB1 受容体については、これまでに多数の研究がなされてきており、神経伝達の抑制的制御という重要な生理的役割を担っていることが明らかになってきた。一方、CB2 受容体については、炎症・免疫系において、炎症反応や、自然免疫あるいは獲得免疫の調節に関与していると予想されてきたが、詳しいことは不明であった。

今回の研究により、2-AG が VCAM-1 や血管内皮細胞への EoL-1 細胞の接着を増強することが明らかとなった。TNF- $\alpha$  による EoL-1 細胞の血管内皮細胞への接着増強にも CB2 受容体に関与していたことから、TNF- $\alpha$  によって、

血管内皮細胞が 2-AG 産生している可能性が示唆された。また今回、アレルギー応答の感作過程で重要な役割を担っている樹状細胞に対し、2-AG と CB2 受容体が促進的に働いていることも分かった。

2-AG とその受容体である CB2 受容体は、これらの細胞を活性化することにより、アレルギー反応などの種々の免疫応答を促進している可能性がある。

## 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 Oka, S., Toshida, T., Sugiura, T. et al. (他 3 人, 1 番目), 2-Arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphoinositol: A Possible Natural Ligand for GPR55. *J. Biochem.* **145**, 13-20. (2009) 査読有
- ② Oka, S., Nakajima, K., Sugiura, T. et al. (他 2 人, 1 番目), Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 928-934. (2007) 査読有
- ③ Oka, S., Tokumura, T., Sugiura, T. Depolarization-induced Rapid Generation of 2-Arachidonoylglycerol, an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, in Rat Brain Synaptosomes. *J. Biochem.* **141**, 687-697. (2007) 査読有
- ④ Gokoh, M., Kishimoto, S., Oka S., Sugiura, T. et al., 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

[学会発表] (計 5 件)

- ① 岡 沙織 他、2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホイノシトール: GPR55 の真の内在性リガンド、第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同学会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
- ② 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

会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜

- ③ 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、第 30 回日本分子生物学会年会/第 80 回日本生化学会大会合同学会、2007 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜
- ④ Oka, S. et al., 2-Arachidonoylglycerol-induced enhanced adhesion of human eosinophilic leukemia cells to adhesion molecules and endothelial cells., 17<sup>th</sup> Annual Symposium on the Cannabinoids, June 28, 2007, Saint-Sauveur, Quebec Canada
- ⑤ 岡 沙織 他、2-アラキドノイルグリセロールによる好酸球性白血病細胞 EoL-1 の接着増強、第 49 回 日本脂質生化学会、2007 年 6 月 6 日、北海道大学 学術交流会館

[その他]

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/eisei/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 沙織 (OKA SAORI)  
帝京大学・薬学部・助教  
研究者番号: 80439562

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者