

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15884

研究課題名(和文) 内因性カンナビノイドシステムを介したドーパミンシグナリング調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of control mechanism of dopamine-signaling by endocannabinoid system

研究代表者

越智 拓(Ochi, Hiroshi)

藤田医科大学・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ドーパミン神経モデル細胞として、神経成長因子によって神経様細胞に分化させたPC12細胞を用い、これらの細胞におけるドーパミン分泌に対する内因性カンナビノイド2-AGの影響について検討した。

分化させたPC12細胞では、カンナビノイド受容体CB1の発現が上昇していることが明らかとなった。これらの細胞に対し、ヘキサナルで処理するとドーパミンの放出が促進され、このドーパミンの放出は2-AGの共処理により有意に抑制された。このドーパミン放出の抑制機構には、2-AGによるカンナビノイド受容体を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制するメカニズムが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、内因性カンナビノイドシステム的作用により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制することで、ドーパミン神経モデル細胞からのドーパミン放出が抑制されることが明らかとなった。

ドーパミンが深く関与する中枢神経系機能の一つに脳内報酬系がある。通常、脳内報酬系は欲求が満たされた場合に活性化され、その個体に快の感覚を与える神経系であるが、様々な依存性薬物によっても直接的に刺激されることが知られている。このような異常な脳内報酬系機能の亢進に対し、内因性カンナビノイドシステムの活性化を介してドーパミンシグナリングを制御することで、依存性薬物の作用だけでなく依存形成を抑制できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of endocannabinoid 2-AG on dopamine release. We used differentiated-PC12 cells with nerve growth factor as model of dopaminergic neuron. We observed up-regulation of expression of cannabinoid receptor CB1 in these cells. The dopamine release from these cells and increase in intracellular calcium were promoted with hexanal treatment. These promoted dopamine release and elevation of intracellular calcium were significantly suppressed with 2-AG co-treatment.

Generally, it is known that release of neurotransmitters from pre-synapse terminal is caused by the elevation of intracellular calcium. Because Gi protein is coupled with cannabinoid receptor, intracellular calcium is suppressed by activation of cannabinoid receptor. Therefore, it was suggested that suppression of dopamine release is attributed to inhibitory mechanism of intracellular calcium dynamics via activation of cannabinoid receptor by 2-AG.

研究分野：法医学

キーワード：内因性カンナビノイド ドーパミン PC12

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内因性カンナビノイドシステムとは、内因性カンナビノイドおよびそれらが作用する受容体、内因性カンナビノイドの合成と分解に関与する酵素によって構成されるシステムである。このシステムは、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ことが明らかとなってきた。内因性カンナビノイドシステムが関与する生理機能の一つに脳内報酬系がある。

脳内報酬系とは、主に中脳腹側被蓋野から側坐核や前頭皮質へと投射される神経系であり、ドーパミンが主要な神経伝達物質として作用している。本来、この神経系は、摂食や飲水など欲求が満たされたときに活性化され、その個体に快の感覚を与える神経系であるが、覚醒剤などをはじめとする依存性薬物によっても直接活性化されることが知られており、このような依存性薬物の反復使用によって脳内報酬系が長期間刺激されることで、中枢神経機能に異常をきたし、薬物依存状態に陥ると考えられている。

中枢神経系は、ニューロンとグリア細胞から構成されており、ニューロンはシグナル伝達の中心的な役割を担っている。一方グリア細胞は、ニューロンの補助的な機能を担っているだけでなく、グリア細胞自身が様々な神経伝達物質を放出することでニューロンの機能調節に積極的に関与していることが明らかとなっている。

そこで我々は、中枢神経系における内因性カンナビノイドシステムの機能を規定する要素の一つとして、グリア細胞における内因性カンナビノイドシステム関連因子の発現状態に着目し、先行研究において、培養ラットグリオーマ細胞に対する高濃度ドーパミン処理により、内因性カンナビノイド合成酵素の発現上昇および分解酵素の発現低下を介し、同細胞の内因性カンナビノイド 2-AG の産生が上昇することを明らかにした。

2. 研究の目的

本来、内因性カンナビノイドは、中枢神経系においてシナプス逆行性に作用し、各種神経伝達物質の放出を抑制するように作用する。そこで本研究では、培養細胞モデルを用い、内因性カンナビノイドシステムによるドーパミンシグナリング調節機構を解明することを目的とし、グリア細胞由来の内因性カンナビノイドシステムを介したドーパミンシグナリングの調節機構について考察することとした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞調整

ラット副腎髄質褐色腫由来の PC12 細胞に対し、神経成長因子を用いて分化させた細胞をドーパミン神経モデル細胞として用いた。

(2) Western Blotting

ドーパミン神経モデル細胞の分化に伴うカンナビノイド受容体の発現状況を確認した。10% SDS-PAGE にて回収したタンパクサンプルを分離し、PVDF 膜に転写した。市販の抗体を用い、カンナビノイド受容体の発現を検出し、その検出強度を数値化後、比較検討した。

(3) 質量分析

ドーパミン神経モデル細胞におけるドーパミン放出能を確認した。試薬を用いてドーパミン放出を誘導した後、回収した培養上清サンプルから固相抽出にてドーパミンを抽出し、誘導体化後、GC/MS を用いて定量した。なお、最終的なドーパミン量は細胞の総タンパク量で補正した。

(4) 細胞内カルシウムイオン測定

ドーパミン神経モデル細胞においてドーパミン放出が誘導される条件下での細胞内カルシウムイオン濃度の変化と、これらの変化に対する内因性カンナビノイド 2-AG の影響について検討した。カルシウム指示薬として、Fluo4 を用いた。

4. 研究成果

(1) ドーパミン神経モデル細胞におけるカンナビノイド受容体の発現確認

本研究で用いた PC12 細胞は、神経成長因子によって神経様細胞に分化することが知られており、この形態変化に伴って、カンナビノイド受容体の発現状況も変化する可能性が示唆される。そこで、PC12 細胞の分化に伴うカンナビノイド受容体の発現状況を確認した。PC12 細胞を 100 ng/mL NGF で分化させた細胞をドーパミン神経モデル細胞 (NGF(+)-PC12) とし、未分化の細胞を NGF(-)-PC12 とした。分化は 7 日間行い、1 日ごとにタンパクサンプルを回収した。分化に伴うカンナビノイド受容体 CB1 の発現変化を図 1 に示す。CB1 の発現は分化開始から 4 日目で最高となり、その後漸減した。一方、カンナビノイド受容体 CB2 には、分化に伴う発現変化を認めなかった (データ非掲載)。CB1 が最も高発現となる分化 4 日目の PC12 細胞において内因性カンナビノイドに対する感受性も高くなることが示唆されるため、これらの細胞を以後の検討においてドーパミン神経モデル細胞として用いることとした。

Expression of CB1 receptor in PC12 cells

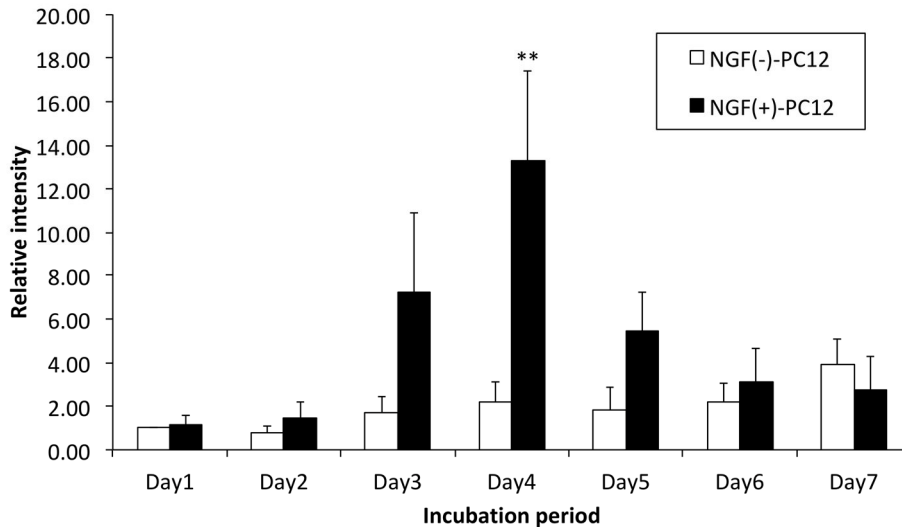


図1. 神経成長因子による PC12 細胞の分化に伴うカンナビノイド受容体 CB1 の発現変化
PC12 細胞を 0 あるいは 100 ng/mL の神経成長因子(NGF)を用いて、7 日間処理した。データは、
平均値 ± SE で示す (n=3)。 **; P<0.01 (v.s. NGF(-)-PC12)。

(2) ドーパミン放出に対する内因性カンナビノイドの影響

ドーパミン神経モデル細胞(NGF(+)-PC12)における細胞外へのドーパミン放出に対する内因性カンナビノイド 2-AG の影響について検討した。ドーパミン放出は 10mM hexanal 処理によって誘導させた。また、hexanal とともに 2-AG 共処理を行うことで、ドーパミン放出に対する内因性カンナビノイドの影響について検討した。10mM hexanal 単独処理にて細胞外に放出されるドーパミンは、 155.29 ± 31.28 ng/mg protein であり、この hexanal によるドーパミン放出は、2-AG 共処理により有意に抑制された (1nM 2-AG 共処理にて 73.85 ± 20.15 ng/mg protein、10nM 2-AG 共処理にて 41.66 ± 13.94 ng/mg protein、100nM 2-AG 共処理にて 48.66 ± 7.29 ng/mg protein) (図 2)。

Dopamine release

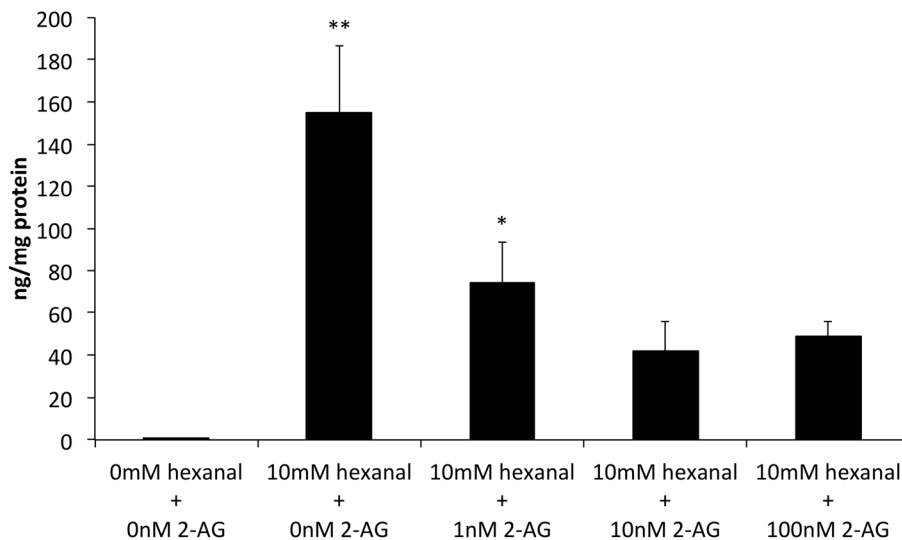


図2. ドーパミン放出に対する内因性カンナビノイド 2-AG の影響

ドーパミン神経モデル細胞 (NGF(+)-PC12) をヘキサナール+ 2-AG で処理した。データは、平均値 ± SE で示す (n=3)。 *; P<0.05、 **; P<0.01 (v.s. 0mM hexanal + 0nM 2-AG)。

(3) 細胞内カルシウムイオン濃度の変化に対する内因性カンナビノイドの影響

一般に、神経終末からの伝達物質の放出は、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって惹起されることが知られている。そこで次に、先に認められた 2-AG によるドーパミン放出の抑制に対する細胞内カルシウムイオン濃度の変化について確認した。hexanal 単独で NGF(+)-PC12 を処理した場合、細胞内カルシウム濃度は最大で $22.4 \mu\text{M}$ となり、その後漸減した。一方、hexanal と 2-AG とで共処理した場合の細胞内カルシウム濃度の最大値は、それぞれ 1nM 2-AG 共処理において $4.0 \mu\text{M}$ 、10nM 2-AG 共処理において $3.0 \mu\text{M}$ 、100nM 2-AG 共処

理において 1.5 μM となり、hexanal 単独処理の場合に比し、有意に抑制された (図 3)。

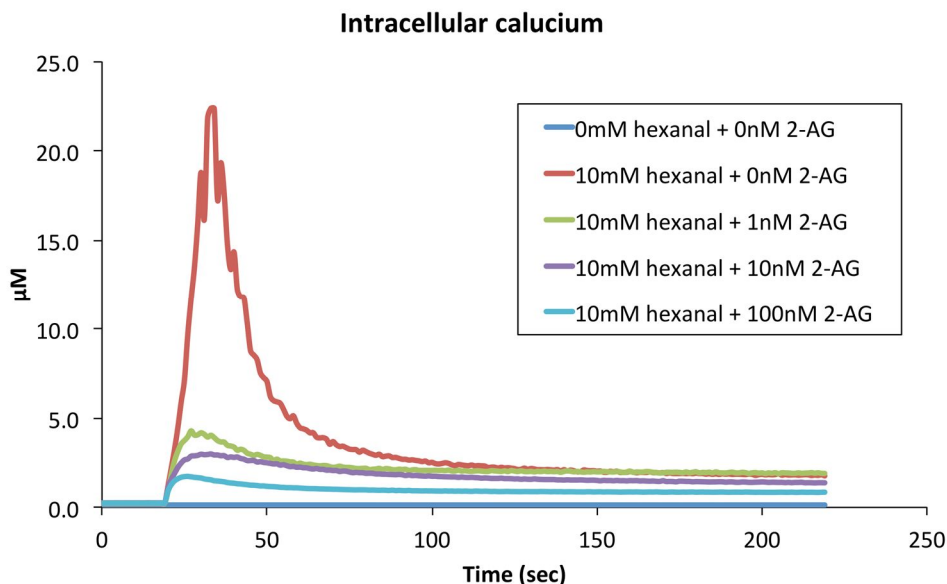


図 3 . 細胞内カルシウムイオン濃度の変化に対する内因性カンナビノイド 2-AG の影響
ドーパミン神経モデル細胞 (NGF(+)-PC12) をヘキサナール+2-AG で処理した。データは、平均値で示す (n=5)。

(4) まとめ

主要なカンナビノイド受容体として CB1 および CB2 が知られており、中枢神経系では CB1 が優位に発現していることが知られている。本研究で用いたドーパミン神経モデル細胞 (NGF(+)-PC12) では CB1 の発現上昇が認められたことから、PC12 細胞の神経様細胞への分化に伴う変化の一つとして矛盾しないものと思われる。これらの細胞において、hexanal により細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることでドーパミン放出が誘導され、hexanal 処理により放出されるドーパミンならびに細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、2-AG の共処理により抑制されることが明らかとなった。一般に、カンナビノイド受容体には Gi/o タンパクが共役しているため、同受容体の活性化に伴い細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制される。以上のことから、2-AG によるカンナビノイド受容体の活性化を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制機構が、ドーパミン分泌の抑制に関与していることが示唆される (図 4)。さらに、様々な依存性薬物の作用によってもたらされる異常なドーパミンシグナリングの亢進を内因性カンナビノイドシステムの活性化を介して制御することにより、依存性薬物の作用や依存形成自体を抑制できる可能性が示唆される。

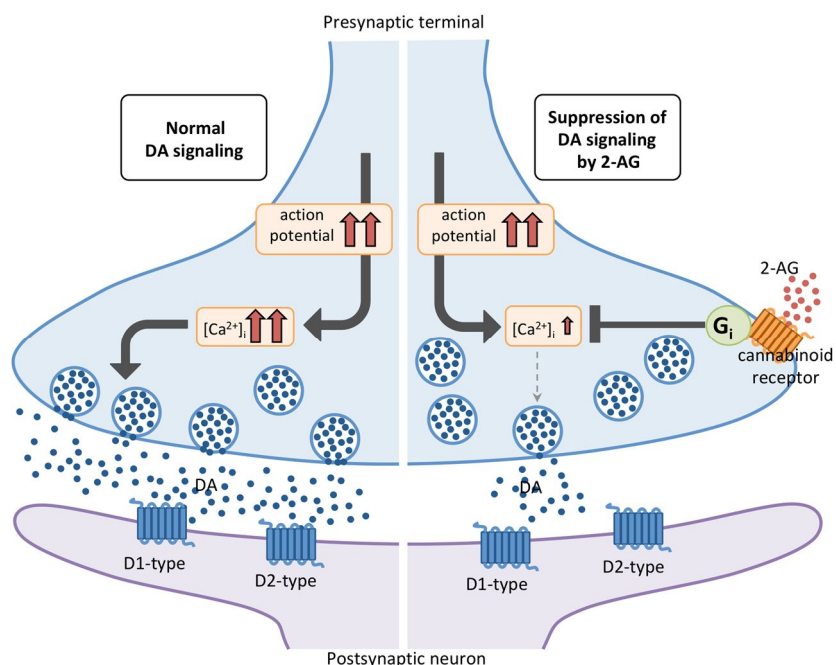


図 4 . 内因性カンナビノイド 2-AG を介したドーパミンシグナリング抑制機構の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Ichiro Isobe
2. 発表標題 Expression change of cannabinoid receptors and production of dopamine with differentiation of PC12 cells by nerve growth factor
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智 拓、平田 ゆかり、浜島 誠、磯部 一郎
2. 発表標題 エンドカンナビノイド2-AGIによるドーパミンシグナリングの抑制
3. 学会等名 第43回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智 拓、平田 ゆかり、浜島 誠、磯部 一郎
2. 発表標題 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は長期高濃度ドーパミン曝露によって強化される
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 越智 拓、平田 ゆかり、浜島 誠、磯部 一郎
2. 発表標題 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に対するドーパミン曝露の影響
3. 学会等名 第2回日本医用マスペクトル学会西部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----