

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590676

研究課題名(和文) 突然死・薬物関連死における内因性カンナビノイド関与の可能性の検討

研究課題名(英文) Involvement of the endocannabinoid system in sudden death or drug-related death

研究代表者

磯部 一郎 (ISOBE ICHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30315907

研究成果の概要(和文)：神経系・循環器系・免疫系などで重要な生理機能を担っている内因性カンナビノイドシステムに対する、薬物等の影響を明らかにすることを目的に、培養グリア系細胞を用いて、ドーパミン・エタノール等の内因性カンナビノイド関連遺伝子発現に与える影響について検討したところ、内因性カンナビノイドに対する受容体や分解酵素などの mRNA 発現量に一定の変化が認められた。これらの薬剤では細胞内シグナル伝達系にも種々の変化が惹起され、遺伝子発現変化の機序として注目される。

研究成果の概要(英文)：The endocannabinoid system plays several important roles in the central nervous system, the circulation system and the immune system. The aim of this study is to investigate the effects of some drugs such as dopamine and ethanol on the gene expression of the endocannabinoid-related genes, using cell culture systems of the glial cells. We found that expressions of some endocannabinoid-related genes were changed with dopamine or ethanol, and these drugs also affected the cellular signal transduction systems, which suggests that the observed gene-expression changes might be attributed to certain alteration of some undefined signal-transduction-systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：突然死・薬物関連死・内因性カンナビノイドシステム・アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

(1)法医学実務で遭遇する突然死や薬物関連死のなかには、原因の特定が困難な事例が少なくない。病的突然死の場合には、肉眼的および顕微鏡的検索において組織に形態的異常を認めないことが少なくない。近年、敗血症や肝硬変患者に発症する急性循環不全には、内因性カンナビノイドが関与する場合は

あることが報告されており、原因の明らかでない急死例の中には、内因性カンナビノイドシステムが関与した事例が含まれている可能性が考えられる。

(2)薬物関連死では、低用量で死亡したと考えられる場合、その毒性機序が問題となる。低用量でも重篤な障害をきたす機序としては、

アナフィラキシーショックがあるが、それでは説明できない事例も少なくない。人工股関節手術で使用される骨セメントにより重篤な血圧低下を発症する場合があります、この病態に内因性カンナビノイドが関与するとの報告がある。他の薬物などでも同様の現象が惹起される可能性が考えられる。

(3)内因性カンナビノイドシステムは、カンナビノイド受容体として同定された CB1・CB2、内因性カンナビノイド ANA (anandamide)・2-AG (2-arachidonoyl-glycerol)、内因性カンナビノイド合成酵素および分解酵素、などから構成され、リガンドや受容体の発現量や発現部位、酵素活性の変化などを併いながら、その生理的機能を統合的に果たしていると考えられている。これまでに神経系・循環器系・免疫系などにおける重要な働きが報告されており、例えば CB1 は中枢神経系で多く発現し、神経細胞のシナプス前部では、シナプス後部で産生された内因性カンナビノイドのシグナルを受け取り、過剰な伝達物質放出を抑制する機能を果たしているとされる。シナプスにはアストロサイトもその突起を伸ばし、CB1 を発現するとともに内因性カンナビノイドも産生して、カンナビノイドシステムを介したシナプス機能調節に関与していると考えられる。

2. 研究の目的

(1)これまで原因不明とされていた突然死の発症機序の中に内因性カンナビノイドが関与している可能性を示唆する報告が蓄積されつつある状況に鑑み、生体バランスを調整する内因性カンナビノイドシステムと病態との関連を明らかにすることを本研究の大局的な目的とした。

(2)本研究では、主に中枢神経系における内因性カンナビノイドシステム、特にこれまであまり検討されていないアストロサイトの内因性カンナビノイドシステムについて、どのような要因・因子が、どのような影響を与えるかという点について、培養実験系を用いて検索した。

3. 研究の方法

(1)ラット胎児より調製した初代培養アストロサイトと、ラットグリオーマ細胞より樹立された細胞株 C6 を用いて、内因性カンナビノイドの合成および分解に係る諸酵素 (ANA の産生及び代謝には N-acyl-phosphatidylethanolamine-phospholipase D (NAPE-PLD)及び fatty acid amide hydrolase (FAAH)が、2-AG では phospholipase C β 4 (PLC β 4)、 diacylglycerol lipase (DAGL)、および monoacylglycerol

lipase (MGLL)) と受容体 CB1・CB2 の mRNA 発現に対するドーパミンアゴニストやエタノール等の薬物の影響を Realtime PCR により解析した。

(2)C6 細胞における CB1 のタンパク質発現について、市販の抗体を用いて、免疫細胞化学的方法により蛍光顕微鏡にて解析した。

(3)ドーパミンアゴニストやエタノール等の薬剤で C6 細胞を刺激した際の細胞内シグナル伝達系の変動について、タンパク質リン酸化酵素の ERK (extracellular signal-regulated kinase)などのリン酸化の程度を Western Blot 法により解析した。

4. 研究成果

(1)初代培養ラットアストロサイトによる内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子発現について、以下の結果を得た。

①アストロサイトをドーパミン (100 μ M) で 24 時間刺激したところ、図 1 に示すように、多くの遺伝子がドーパミンにより発現低下を示した。PLC β 4 のみが発現上昇を示した。その後の検討で、ドーパミンによる発現変化により再現性が認められるのは、CB1 と MGLL であった。3 時間刺激では、明らかな発現変動は認められなかった。

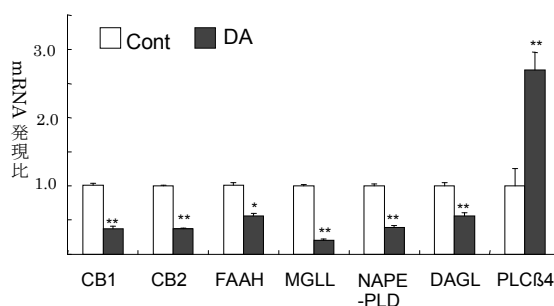


図1 アストロサイトにおける内因性カンナビノイド関連遺伝子の発現とドーパミンの影響 (n=3, *p<0.05, **p<0.01)

②ドーパミンによる CB1 発現減少について、図 2 に示すように濃度依存性が認められた。

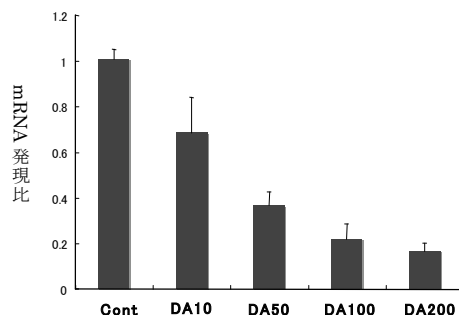


図2 アストロサイトにおける CB1 発現に対するドーパミン濃度の影響 (n=3, DA10 のみ n=2, ** p<0.01)

③ドーパミン受容体 D1 タイプに特異的な SKF38363(100 μ M) と D2 タイプ特異的な bromocriptine(100 μ M) でアストロサイトを 24 時間刺激したところ、PLC β 4 を除いた関連遺伝子すべてで SKF および Bromocriptine により発現低下が認められた (図 3)。この結果は、ドーパミンによる各遺伝子の発現低下の結果と整合的なものと考えられる。

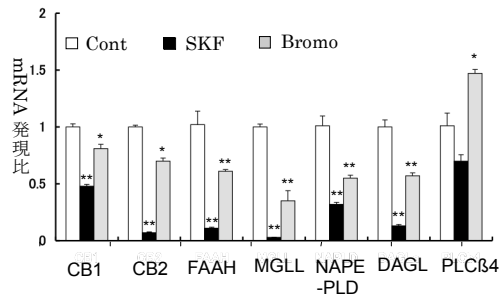


図 3 アストロサイトにおける D1 および D2 タイプドーパミン受容体特異的アゴニストの影響 (n=3, *,P<0.05, **,P<0.01)

(2)初代培養アストロサイトには、少数のミクログリア、オリゴデンドロサイトなどの混入に対する反応性の影響を除外することが困難であること、初代培養の性質上、毎回の実験における細胞の状態が一定でない可能性があることなどが、結果の再現性に影響を与える可能性がある。そこでラットグリオーマ細胞由来の安定的株化細胞である C6 を用いて、その内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子に対する薬剤の影響を検討した。

①C6 細胞における内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の mRNA 発現に対するドーパミンの影響(100 μ M, 24 時間刺激)を検討したところ、CB1・MGLL ではアストロサイトと同様にその発現が低下した。一方、PLC β 4 でもドーパミンにより発現が低下した (図 4)。

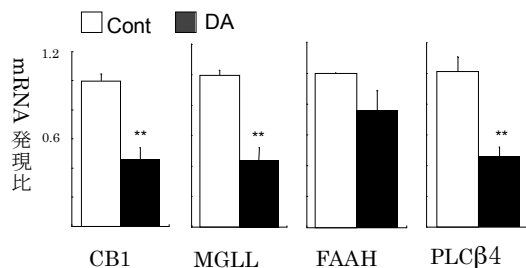


図 4 C6 における内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現に対するドーパミンの影響 (n=3, **,p<0.01)

②C6 における D1 および D2 タイプ特異的アゴニストの影響を検索したところ、SKF では明らかな変化はなく、Bromocriptine で発現上昇が認められた (図 5)。これはアストロサイトの場合と異なり、ドーパミンによる変化との整合性が明らかでなく、その変化の発現機序についてさらに検討が必要であると思われた。

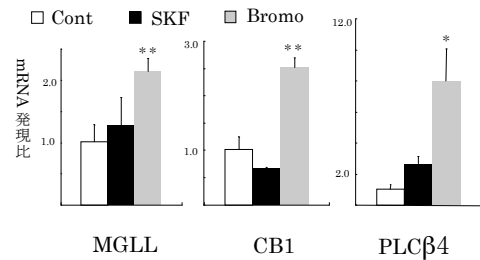


図 5 C6 における D1 および D2 タイプドーパミン受容体特異的アゴニストの影響 (n=3, *,P<0.05, **,P<0.01)

③ C6 におけるエタノールの影響について、エタノール 60mM で 24 時間刺激したところ、CB1 および MGLL の発現が上昇した。

④C6 において、ドーパミン受容体などのアデニル酸シクラーゼ活性に影響する細胞内シグナル伝達系と内因性カンナビノイド関連遺伝子の発現変化との関連を検討するため、dibutyryl cyclic AMP(1mM)で 24 時間刺激したところ、ドーパミンと同様に CB1 の発現低下が認められた。このことからドーパミンによる CB1 などの発現低下はアデニル酸シクラーゼを活性化する D1 タイプ受容体を介している可能性が考えられた。

⑤ C6 において内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現に影響することが示唆されたドーパミンおよびエタノールについて、細胞内のシグナル伝達系のタンパク質リン酸化酵素の活性との関連について、リン酸化タンパク質特異的抗体によるウエスタンブロット法で解析した。その結果、ERK(extracellular signal-regulated kinase)の活性が刺激後 30 分で、エタノールでは顕著に上昇し、ドーパミンでは抑制された (図 6)。

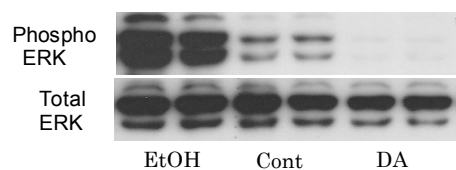


図 6 ドーパミン(100 μ M)、エタノール (60mM)の ERK リン酸化に対する影響 (30分刺激)

⑥今回の研究では、これまでにあまり検討されていないアストロサイトの内因性カンナビノイドシステムについて、その関連遺伝子の発現状態に、ドーパミンやエタノールが影響を与えることが示唆された。また、これらの薬剤により ERK の活性が変化するため、これと遺伝子発現の変化に何らかの関連がある可能性も考えられる。一方、今回の実験系では、必ずしも高い再現性を示す結果のみではなく、不安定な現象も認められた。このような現象には、未だ特定できていない培養細胞の状態を規定する何らかの因子の相違が結果の揺らぎの原因となっている可能性もある。これらの点に関して今後更に検討を進めていきたいと考えている。

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)

①Nakatome M, Orii M, Hamajima M, Hirata Y, Uemura M, Hirayama S, Isobe I.

Methylation analysis of circadian clock gene promoters in forensic autopsy specimens. Leg Med 2011;13:205-9 査読有り.

②中留真人, 濱島 誠, 平田ゆかり, 磯部 一郎, 山本琢磨, 的場梁次. 心臓ナトリウムイオンチャネルコード遺伝子 (SCN5A) 転写調節領域におけるディプロタイプ解析. DNA 多型 2010; 18: 268-271. 査読なし.

③Nakatome M, Yamamoto T, Isobe I, Matoba R. Diplotype analysis of the human cardiac sodium channel regulatory region in Japanese cases of sudden death by unknown causes. Leg Med. 2009; 11(6): 298-301. 査読有り.

④磯部 一郎. 法医学の実証性と方法. 現代医学 2008; 56: 307-316. 査読なし.

[学会発表] (計7件)

①磯部 一郎, 平田ゆかり, 折井みなみ, 濱島 誠, 中留真人: 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遺伝子の発現とドーパミンの影響. Neuro2010、第53回日本神経化学学会大会. 2010年9月4日, 神戸.

②中留真人, 折井みなみ, 濱島 誠, 平田ゆかり, 植村美里, 平山沙也香, 磯部 一郎: 法医学検例における時計遺伝子プロモ

ーター領域のメチル化解析. 日本 DNA 多型学会第19回学術集会. 2010年11月18日, 三島.

③中留真人, 折井みなみ, 濱島 誠, 平田ゆかり, 植村美里, 平山沙也香, 磯部 一郎: 法医学検試料を用いたメチル化情報解析に関する基礎的検討. 第32回日本法医学会中部地方集会, 2010年10月23日; 富山.

④磯部 一郎, 平田ゆかり, 折井みなみ, 中留真人, 濱島 誠: 培養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遺伝子の発現変動. 第42回藤田学園医学学会総会. 2010年10月7日; 豊明.

⑤磯部 一郎, 平田ゆかり, 濱島 誠: 薬毒物のカンナビノイドシステムへの影響へ培養アストロサイトにおけるカンナビノイド受容体発現の検討. 第93次日本法医学学会総会. 2009年5月14日; 大阪.

⑥磯部 一郎, 平田ゆかり, 濱島 誠, 中留真人: 培養ラットアストロサイトにおける内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子発現に対するドーパミンの影響. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月23日; 神戸.

⑦平田ゆかり, 濱島 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発現に対するドーパミンの影響. 第41回藤田学園医学学会総会. 2009年10月1日; 豊明.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 一郎 (ISOBE ICHIRO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 30315907

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

五十嵐 一雄 (IGARASHI KAZUO)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号: 80098467
濱島 誠 (HAMAJIMA MAKOTO)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号: 20189608
平田 ゆかり (HIRATA YUKARI)
藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：50156676
中留 真人 (NAKATOME MASATO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：90263251
(H21 より連帯研究者)