

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17815

研究課題名（和文）内在性カンナビノイド系の変調がもたらす加齢性記憶障害の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of cognitive aging caused by perturbed endocannabinoid system

研究代表者

片岡 孝介（Kataoka, Kosuke）

早稲田大学・総合研究機構・主任研究員

研究者番号：60822260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：先進国で高齢化が加速度的に進む中、脳老化に重要な内在性カンナビノイド系(ECS)に着目し、加齢性記憶障害の分子機構の解明を目指している。ECSの一つであるCB1受容体の細胞内局在依存的な生理機能に着目し、SH-SY5Y細胞を用いて、CB1受容体の活性化・不活性化がミトコンドリア機能に与える影響を検証した。その結果、CB1受容体の活性が、ミトコンドリア膜電位や形態、ATP産生量、ROS産生量、細胞死(フェロトーシス)に関与する可能性が示唆された。さらに、他の神経系の細胞株や、CB1受容体の発現が確認されている骨格筋細胞株を用いてCB1受容体とミトコンドリア品質管理機構の関係性も明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、加齢性記憶障害の分子機構解明に向けて、内在性カンナビノイド系(ECS)の一つであるCB1受容体に着目し、その細胞内局在依存的な生理機能を明らかにした。CB1受容体の活性が、ミトコンドリアの機能や細胞死に関与することを示唆した成果は、加齢性記憶障害の病態解明に新たな視点を与えるものである。また、CB1受容体の細胞内局在を考慮した創薬デザインにつながる可能性を秘めており、超高齢社会における認知症予防や治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：As the aging population rapidly increases in developed countries, I am focusing on the endocannabinoid system (ECS), which is crucial for brain aging, to elucidate the molecular mechanisms of age-related memory impairment. I investigated the cell location-dependent physiological functions of the CB1 receptor, one of the components of the ECS, using SH-SY5Y cells to examine the effects of CB1 receptor activation and inactivation on mitochondrial function. The results suggest that CB1 receptor activity may be involved in mitochondrial membrane potential, morphology, ATP production, ROS production, and cell death (ferroptosis). Furthermore, using other neuronal cell lines and skeletal muscle cell lines, where CB1 receptor expression has been confirmed, the relationship between the CB1 receptor and mitochondrial quality control mechanisms was also clarified.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：内在性カンナビノイド系 加齢性記憶障害 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国における高齢化が加速度的に進行しており、老化研究の重要性が急速に高まっている。高齢化に伴う様々な健康問題の中でも、認知機能の低下は特に大きな問題であり、加齢性記憶障害の発症メカニズムの解明と予防・治療法の開発が喫緊の課題となっている。研究実施者は、脳内で最も多く発現している G タンパク質共役型受容体である 1 型カンナビノイド受容体 (CB1 受容体) に着目し、加齢性記憶障害の分子機構の解明に取り組んできた。CB1 受容体は、大麻の主要成分であるテトラヒドロカンナビノール (THC) の受容体としても知られており、記憶、学習、情動、痛覚、食欲など、様々な生理機能の制御に関与している。

研究実施者はこれまでの研究で、CB1 受容体が従来知られていた細胞膜上だけでなく、ミトコンドリアにも発現していることを発見し、ミトコンドリアにおける CB1 受容体がミトコンドリアの品質管理機構に重要な役割を果たしていることを明らかにした。ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生の中心的な役割を担う細胞小器官であると同時に、活性酸素種の主要な産生源でもあり、その機能障害は細胞死や組織・臓器の機能不全につながる。加齢に伴うミトコンドリア機能の低下は、様々な老化関連疾患の発症・進展に関与すると考えられており、ミトコンドリアの品質管理機構の理解は老化研究において重要な位置を占めている。しかしながら、加齢性記憶障害の発症における CB1 受容体の役割、特にミトコンドリアにおける CB1 受容体の機能については未だ不明な点が多く残されている。

CB1 受容体は、細胞膜上とミトコンドリアという異なる細胞内局在に応じて、異なる生理機能を有することが報告されている。研究実施者が行った予備実験では、ミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性化が、活性酸素種の産生を伴ったミトコンドリアの断片化を抑制することが示された。一般的に、ミトコンドリアの断片化は細胞死の前兆として知られており、ミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性低下は神経細胞の生存性や機能性に悪影響を及ぼす可能性がある。一方、細胞膜局在型 CB1 受容体の活性化は、活性酸素種の産生を促進することが示された。このように、細胞膜局在型とミトコンドリア局在型の CB1 受容体は、異なる下流シグナル伝達経路を活性化することが示唆されるが、その詳細な分子メカニズムは不明である。さらに、加齢に伴い機能低下したミトコンドリアが蓄積することが知られていることから、CB1 受容体の細胞内局在を考慮に入れると、海馬神経細胞の生存性や機能性は、細胞膜局在型とミトコンドリア局在型の CB1 受容体の活性バランスによって維持されていると推測される。そして、加齢性記憶障害は、このバランスの破綻によって引き起こされる可能性がある。

以上の背景から、本研究では以下の二点を学術的な「問い」として設定した。

細胞膜局在型およびミトコンドリア局在型 CB1 受容体の下流は何か。

加齢に伴って細胞膜局在型およびミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性バランスは変化するのか。

これらの問いに答えることで、CB1 受容体の細胞内局在に着目した加齢性記憶障害の新たな分子機構の解明が期待される。また、本研究の成果は、CB1 受容体の細胞内局在を考慮した新規治療戦略の開発にもつながると考えられる。高齢化社会が急速に進行する中で、加齢性記憶障害の予防・治療法の確立は喫緊の課題であり、本研究の意義は大きいと言える。

2. 研究の目的

本研究は以下の 2 点を目的とする。

1. 細胞内局在 (細胞膜 vs. ミトコンドリア) を区別した CB1 受容体の下流を明らかにすること。
2. 加齢に伴い細胞膜局在型とミトコンドリア局在型の CB1 受容体の活性バランスが変化するのかを解明すること。

3. 研究の方法

- ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞を用いて、膜透過性の異なる CB1 受容体のアゴニストおよびインバーサアゴニストの処置により、細胞膜局在型 CB1 受容体とミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性を調節する。この処置に伴う、ミトコンドリア関連の指標や細胞生存率への影響を検討する。
- SH-SY5Y 細胞において、CB1 受容体のアゴニストおよびインバーサアゴニストがどのような細胞死を誘導するかを検討する。先行研究より、CB1 受容体がフェロトーシス様細胞死を誘導すると仮説を立てた。そこで、細胞内 Fe²⁺量の測定や鉄キレーター処理による細胞死の抑制を評価する。
- SH-SY5Y 細胞において、CB1 受容体のアゴニストおよびインバーサアゴニストを用いて、CB1

受容体活性調節が下流のシグナル経路にどのような影響を与えるかオミクス解析を実施する。

4. 研究成果

本研究では以下の4点を研究成果として得た。

1. ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、CB1 受容体の細胞内局在に着目した機能解析を行った。その結果、膜透過性 CB1 受容体インバースアゴニストである Rimonabant および AM251 は、濃度依存的に細胞死を誘導することが明らかになった。一方、非膜透過性 CB1 受容体インバースアゴニストである Hemopressin は、いずれの濃度においても細胞死を誘導しなかった。このことから、細胞内に存在する CB1 受容体、特にミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性阻害が、細胞死誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、CB1 受容体アゴニストの効果については、ACEA はいずれの濃度でも細胞死を誘導しなかったのに対し、WIN55,212-2 は高濃度においてのみ細胞死を誘導した。WIN55,212-2 は非選択的な CB1 受容体アゴニストであり、高濃度では CB2 受容体など他の標的分子への作用が関与している可能性がある。さらに、ACEA は Rimonabant および AM251 による細胞死を濃度依存的に抑制したが、WIN55,212-2 の効果は限定的であった。以上の結果から、SH-SY5Y 細胞において、ミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性化は細胞保護的に作用し、その活性阻害は細胞死を誘導することが明らかになった。
2. SH-SY5Y 細胞で得られた知見の普遍性を検証するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞およびマウス筋芽細胞 C2C12 細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、これらの細胞株においても Rimonabant は SH-SY5Y 細胞と同様の細胞死誘導効果を示した。このことから、ミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性阻害による細胞死誘導は、神経細胞特異的な現象ではなく、より普遍的な細胞応答である可能性が示唆された。
3. Rimonabant による細胞死誘導のメカニズムを探るため、SH-SY5Y 細胞を用いて各種解析を行った。まず、酸化ストレスマーカーである H2O2 産生量と NAD⁺/NADH 比を測定したが、Rimonabant はこれらのパラメータに影響を及ぼさなかった。一方、細胞内 Fe²⁺量の測定では、Rimonabant が細胞内 Fe²⁺量を有意に増加させることが明らかになった。さらに、鉄キレーターである 2,2'-bipyridine を用いた実験では、Rimonabant による細胞死が抑制された。以上の結果から、Rimonabant はフェロトーシス様の細胞死を誘導することが示唆された。フェロトーシスは非アポトーシス性の細胞死であり、最近の研究でその生理的・病理的意義が注目されている。本研究の結果は、CB1 受容体とフェロトーシスの関連性を示した初めての報告であり、CB1 受容体の新たな機能的側面を明らかにしたと言える。
4. CB1 受容体の細胞内局在依存的な下流シグナル経路を明らかにするため、SH-SY5Y 細胞において膜透過性の異なる CB1 受容体のアゴニストおよびインバースアゴニストを用いて、リン酸化プロテオーム解析を実施した。その結果、二つの異なる細胞内局在の下流において有意に異なるリン酸化イベントは少ないことが明らかとなった。

以上の研究成果から、CB1 受容体、特にミトコンドリア局在型 CB1 受容体の活性低下が、加齢性記憶障害におけるミトコンドリア機能不全やフェロトーシスを介した神経細胞死に関与している可能性が示された。本研究は、CB1 受容体の細胞内局在に着目することで、加齢性記憶障害の新たな分子機構を提示するものであり、学術的意義は大きい。また、本研究の成果は、ミトコンドリア局在型 CB1 受容体を標的とした加齢性記憶障害の新規予防・治療法の開発にもつながると期待される。高齢化社会が急速に進行する中で、加齢性記憶障害の克服は喫緊の課題であり、本研究の社会的意義も大きいと言える。今後は、本研究で得られた知見を基盤として、CB1 受容体の細胞内局在を考慮した創薬デザインによる、加齢性記憶障害の新規予防・治療法の開発を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森一明, 朝日透, 片岡孝介
2. 発表標題 ミトコンドリアにおけるカンナビノイド受容体CB1が果たす細胞内局在依存的な役割
3. 学会等名 臨床カンナビノイド学会第8回学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuaki Mori, Toru Asahi, Kosuke Kataoka
2. 発表標題 Subcellular localization-dependent function of cannabinoid CB1 receptor in mitochondria
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森一明, 朝日透, 片岡孝介
2. 発表標題 ミトコンドリア機能と細胞死における1型カンナビノイド受容体の細胞内局在依存的な役割
3. 学会等名 第42回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森一明, 朝日透, 片岡孝介
2. 発表標題 The Differential Effects of CB1 Receptor Modulation on Mitochondrial Function and Cell Death in Human Neuroblastoma Cells
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuaki Mori, Toru Asahi, Kosuke Kataoka
2. 発表標題 Cannabinoid receptor type 1-regulated cell death depending on its subcellular localization in human neuroblastoma cell
3. 学会等名 35th WORLD CONGRESS World Congress Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (国際学会)
4. 発表年 2024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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関