

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430013

研究課題名(和文)カンナビノイドと他の脂質メディエーターとのクロストーク

研究課題名(英文)Cross-talk between endocannabinoids and other lipid mediators

研究代表者

少作 隆子(OHNO-SHOSAKU, Takako)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60179025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：主要な内因性カンナビノイドである2-AGおよびその代謝産物が脳機能にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、ラット培養海馬ニューロンを用いた電気生理学的実験およびマウスの3レバー・オペラント課題の行動解析を行い、以下の結論を得た。(1)2-AGおよびその代謝産物は、カンナビノイドCB1受容体を介さずにシナプス活動を上昇させる。(2)CB1受容体の基礎的活性はシナプス活動の維持に寄与している。(3)2-AG/CB1受容体シグナルは、行動の柔軟性に関与している。

研究成果の概要(英文)：Roles of the major endocannabinoid 2-AG and its metabolites in brain functions were examined by measuring electrical activities of rat cultured hippocampal neurons and analyzing the performance of mice on three-lever operant task. We found that 2-AG and its metabolites increase the synaptic activity in a CB1-independent manner, that the ligand-independent basal activity of CB1 receptors supports synaptic activity, and that the endocannabinoid system involving 2-AG and CB1 receptors plays a role in behavioral flexibility.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳・神経 ニューロン 神経科学 カンナビノイド シナプス活動 行動柔軟性

1. 研究開始当初の背景

内因性カンナビノイドがシナプス伝達調節を担う逆行性シグナルの実体であることが2001年に初めて明らかになって以来、カンナビノイドを介するシナプス可塑性の分子メカニズムや脳機能における役割についての全貌解明が急速に進んでいる。一方、内因性カンナビノイドは、アラキドン酸やプロスタグランジンを含む多くの脂質メディエータの前駆物質でもあることから、脳内でのこれらのシグナルを介する働きにも関与すると考えられる。しかし、そのような「脂質メディエータの前駆物質としての役割」については、ほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

本研究では、主要な内因性カンナビノイドである2-AGおよびその代謝産物が脳機能にどのような影響を及ぼすのかを調べ、2-AGの働きを全貌を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養海馬ニューロンを用いた電気生理学的手法により、2-AGおよびその代謝産物のニューロン活動におよぼす影響を調べた。
(2) マウスの3レバー・オペラント課題の行動解析により、内因性カンナビノイド・シグナルの脳機能における役割を調べた。

4. 研究成果

(1) 2-AG投与の効果

我々はすでに、培養海馬ニューロンを用いて、2-AG合成経路とCB1カンナビノイド受容体を阻害した条件で2-AGを投与すると、シナプス活動が促進されることを見出していた(図1)。そこで、そのメカニズムを明らかにするために、静止膜電位(図2)、活動電位(図3)、膜の各イオンコンダクタンス(図4)、Ih電流(図5)、興奮性および抑制性シナプス後電流の振幅(図6、図7)、微小シナプス後電流の発生頻度(図8)などに対する2-AG投与の効果調べた。その結果、微小興奮性シナプス後電流の発生頻度が2-AG投与により上昇する(図8)ことが判明したが、その他の要素の変化は検出できなかった。



図1

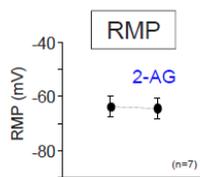


図2

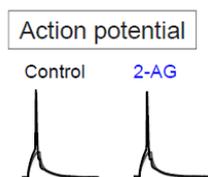


図3

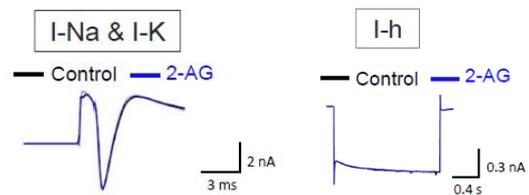


図4

図5

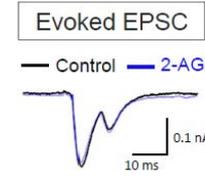


図6

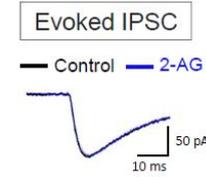


図7

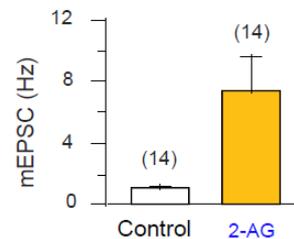


図8

(2) 2-AG分解産物の関与

上記の2-AG投与の効果は、2-AGそのものによるのか、あるいはその代謝産物によるのかを明らかにするために、2-AG代謝経路の酵素に対する阻害剤の効果調べた。その結果、2-AGを加水分解してアラキドン酸を生成する酵素であるMGLの阻害剤により、2-AGの効果は部分的に抑制されることを見出した(図9)。また、アラキドン酸投与は、2-AG投与の場合と同様に、シナプス活動を上昇させる作用があることが確かめられた(図10)。以上より、2-AGは、主にその分解産物であるアラキドン酸を介してニューロンの興奮性を上昇させ、シナプス活動を促進させると考えられた。

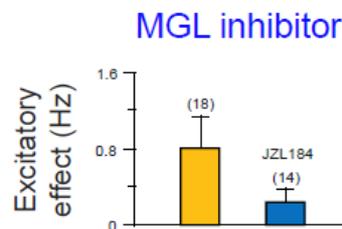


図9

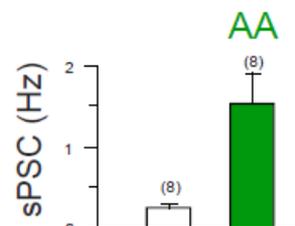


図10

(3) 2-AG 放出の CB1 受容体非依存性効果
 上記の 2-AG 投与の効果 (CB1 受容体を介さずに興奮性を上昇させる効果) が生理的に起こりうるのかを確かめるために、CB1 受容体を阻害した条件下で、自発性シナプス後電流の発生頻度を種々条件下で測定し、2-AG 合成酵素阻害剤処理の有無で比較した。その結果、活動が低い条件下では両群で差はみられなかったが、活動が高い条件下では、処理群の方が自発性シナプス後電流の発生頻度が有意に低いという結果が確かめられた (図 11)。よって、CB1 受容体が働かない条件下では、ニューロンの活動が高まり 2-AG が放出されると、活動はさらに高まる、という正のフィードバックが働く可能性が示唆された。

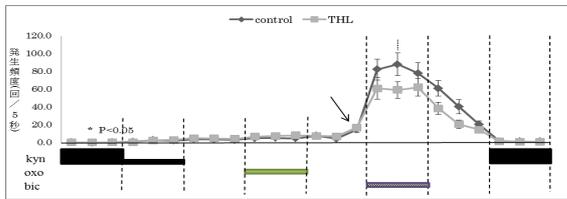


図 11

(4) CB1 受容体の活性化の効果

上記の (1) ~ (3) では、CB1 受容体を介さない作用について調べてきた。そこで次に、2-AG を含む内因性カンナビノイドの CB1 受容体を介する効果について調べた。シナプス後電流の発生頻度を種々条件下で測定し、CB1 受容体阻害剤処理の有無で比較したところ、活動が低い場合も高い場合も、処理群の方が発生頻度が著しく低いという、予想外の結果が得られた (図 12)。この結果は、CB1 受容体の活性化がシナプス活動の維持に寄与している可能性を示すものである。

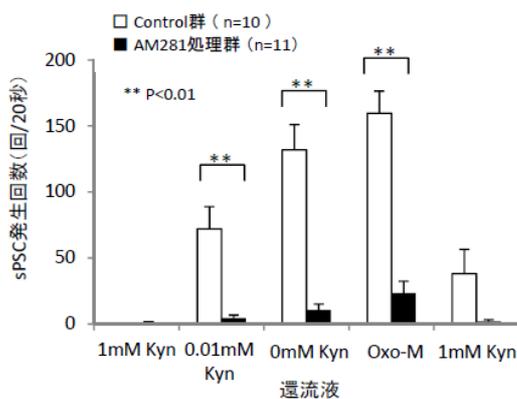


図 12

(5) シナプス活動の維持における 2-AG の関与
 上記の (4) で得られた「CB1 受容体の活性化によるシナプス活動の維持」に関与する内因性カンナビノイドが 2-AG なのかアナンダミドなのかを明らかにするために、CB1 受容体阻害剤の代わりに 2-AG 合成阻害剤 (THL) を用いて同様の実験結果が得られるのかどう

か調べた。その結果、同様の作用はないことが判明した (図 13)。よって、「シナプス活動の維持」に関与する内因性カンナビノイドは 2-AG ではないと結論した。

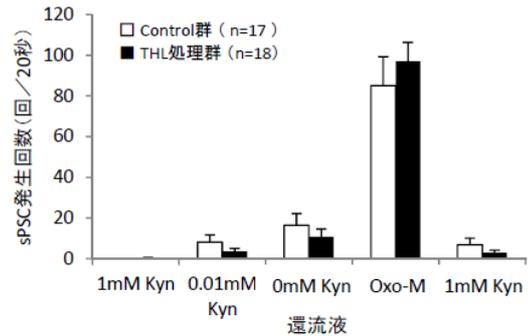


図 13

(6) シナプス活動維持におけるアナンダミドの関与
 そこで次に、「CB1 受容体の活性化によるシナプス活動の維持」に関与する内因性カンナビノイドがアナンダミドである可能性について検討した。アナンダミドの合成経路は複雑で、それを阻害する方法がないため、代わりにアナンダミド投与の効果調べた。その結果、アナンダミドにはシナプス活動を維持する作用がない (図 14) ことが判明し、「シナプス活動の維持」に関与する内因性カンナビノイドはアナンダミドではないと結論した。

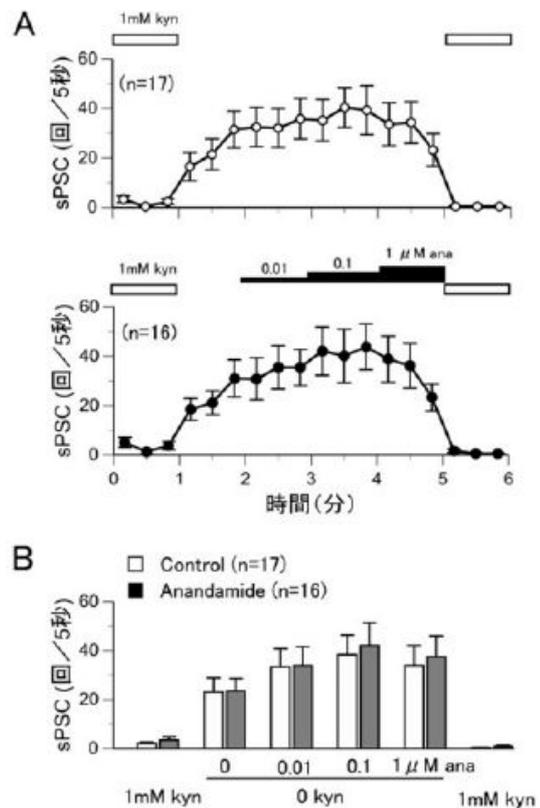


図 14

(7) CB1 受容体の基礎的活性の関与
 上記の(5)と(6)より、内在のカンナビノイドの関与が否定されたため、次に、「内在性のリガンドが存在しない状態での受容体の基礎的活性」の役割について検討した。CB1 受容体アンタゴニストとして、逆アゴニスト作用のある AM281 と、逆アゴニスト作用のない NESS を用い、自発性シナプス後電流の発生頻度におよぼす影響を調べた。AM281 処理の場合は、発生頻度の低下がみられたのに対し、NESS 処理の場合は、発生頻度はむしろ高まる傾向がみられた(図 15)。したがって、CB1 受容体の基礎的活性がシナプス活動の維持に参与していると結論した。

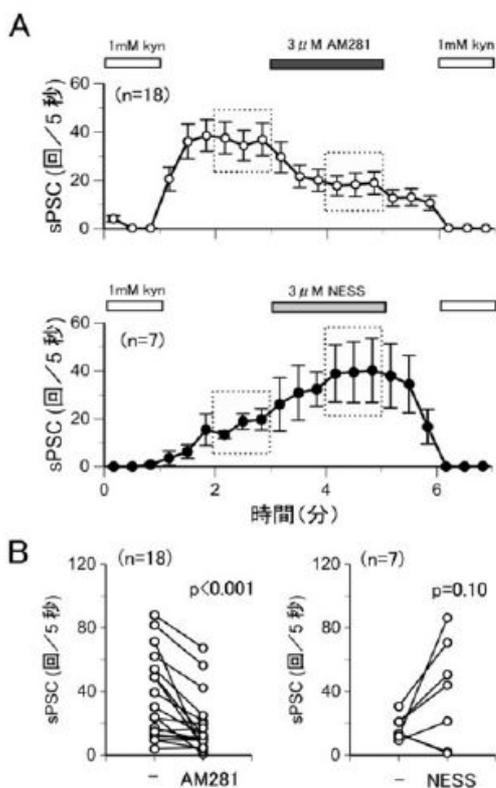


図 15

(8) CB1 欠損マウスと DGL 欠損マウスの比較
 上記(7)の実験より、CB1 受容体の基礎的活性の重要性が指摘されたことから、これまでの CB1 受容体欠損マウスの結果の解釈を再考する必要が生じた。我々はすでに、レバー押し行動の解析より、CB1 受容体欠損マウスでは、環境の変化により行動を変える柔軟性が低下していることを見出していた。我々はこの結果より、内因性カンナビノイド系(内因性カンナビノイド CB1 受容体シグナル)が行動の柔軟性に参与している、と結論していた。しかし、内因性カンナビノイドは参与せず、CB1 受容体の基礎的活性が行動の柔軟性に参与する可能性を否定することはできない。そこで、内因性カンナビノイドの関与を調べるため、2-AG 合成酵素 DGL の欠損マウスの行動解析を行った。その結果、DGL 欠

損マウスは、CB1 欠損マウスと同様に、行動の柔軟性が低下していることが判明した(図 16)。以上の結果は、2-AG CB1 受容体シグナルは行動の柔軟性に参与していることを示している。

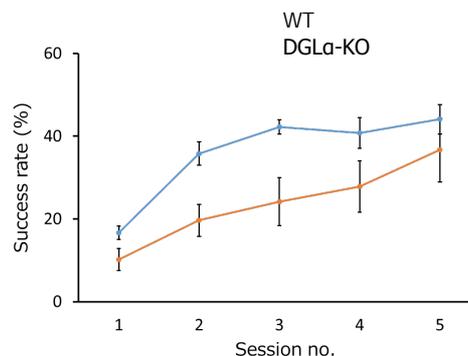


図 16

(9) テオブロミン摂取マウスの行動解析
 テオブロミン摂取マウスの行動解析の実験結果は、さらに、CB1 欠損マウスで見られた行動柔軟性の低下が、CB1 受容体の基礎的活性の消失によるものでないことを示した。CB1 受容体の基礎的活性は cAMP を低下させる作用があるため、その消失により cAMP は上昇傾向にあると考えられる。しかし、cAMP 濃度を上げる作用のあるテオブロミン摂取マウスでは、CB1 欠損マウスの場合とは対照的に、レバー押し行動は良好であった(図 17)。

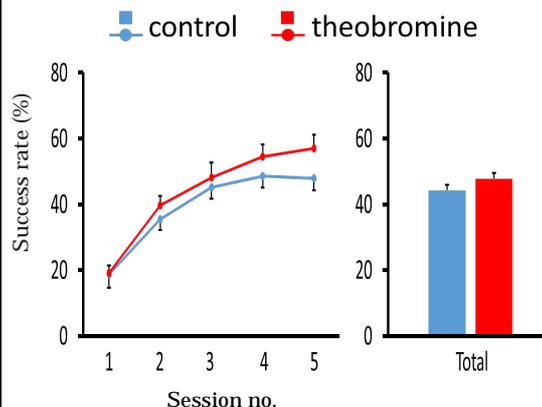


図 17

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 5 件)

Yoneda M, Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Tanigami H, Yachie A, Ohno-Shosaku T, Shido O. Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *J Nutr Biochem.* 39:110-116, 2017 (査読有)

DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.002.

Yoneda M, Tabata Y, Echigo R, Kikuchi Y, Ohno-Shosaku T. Availability of three-lever operant task as mouse model for studying motor sequence and skill learning. *Tsuruma Health Sci Soc Kanazawa Univ* 39 (2): 113-122, 2016 (査読有)
http://hdl.handle.net/2297/44373

Sugawara Y, Kikuchi Y, Yoneda M, Ohno-Shosaku T. Electrophysiological evidence showing muscarinic agonist-antagonist activities of N-desmethylozapine using hippocampal excitatory and inhibitory neurons. *Brain Res.* 1642:255-62, 2016 (査読有)
DOI: 10.1016/j.brainres.2016.03.054.

Soltész I, Alger BE, Kano M, Lee SH, Lovinger DM, Ohno-Shosaku T, Watanabe M. Weeding out bad waves: towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 16(5):264-77, 2015 (査読有)
DOI: 10.1038/nrn3937.

Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 29:1-8, 2014 (査読有)
DOI: 10.1016/j.conb.2014.03.017

[学会発表](計 9件)

米田 貢、運動学習における内因性カンナビノイド 2-AG と CB1 受容体の関与、第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日～23 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)(発表予定)

谷上 颯、マウスの運動学習および BDNF 発現量に対するテオプロミン摂取の効果、第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日～23 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)(発表予定)

米田 貢、2-AG 合成酵素 DGL 欠損マウスは CB1 受容体欠損マウスと同様のレバー押し学習障害を示す、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、アクティビティ浜松(静岡県浜松市)

米田 貢、3 レバーオペラント課題を用いたマウスの運動学習および適応行動に対するテオプロミン摂取の効果、第 39 回神経科学大会、2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

谷上 颯、3 レバーオペラント課題を用いたマウスの運動学習および適応行動に対するテオプロミン摂取の効果、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日～24 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

少作 隆子、活動依存的に放出された 2-AG による CB1 受容体を介さないシナプス活動の亢進、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

米田 貢、1 レバー、3 レバー及びリバー 3 レバー課題における CB1 受容体ノックアウトマウスの適応行動の障害、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

米田 貢、運動学習における CB1 受容体の役割: 3 レバー・オペラント課題を用いて、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

少作 隆子、2-アラキドノイルグリセロールと関連物質によるシナプス伝達調節、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

少作 隆子(OHNO-SHOSAKU, Takako)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号: 60179025

(2) 研究分担者

米田 貢(YONEDA, Mitsugu)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号: 70334787

(3) 連携研究者

菊池 ゆひ(KIKUCHI, Yui)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号: 00749137

杉本 直俊(SUGIMOTO, Naotoshi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 80272954

(4) 研究協力者

越後 亮介(ECHIGO, Ryosuke)
菅原 優翔(SUGAWARA, Yuto)
谷上 颯(TANIGAMI, Hayate)
太田 哲生(OTA, Tetsuo)