

学位論文題名

2-アラキドノイルグリセロールの
生理的役割に関する研究

学位論文内容の要旨

2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は、マリファナの受容体として知られているカンナビノイド受容体の内在性リガンドである。カンナビノイド受容体としては、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が、生体内における具体的な生理的役割は、これまで良く分かっていなかった。また、2-AGともう一つの内在性リガンドと言われているアナンダミドの、どちらがより重要であるのかという点もはっきりとはしていなかった。そこで、神経系及び炎症・免疫系において、カンナビノイド受容体の内在性リガンドである2-AGがどのような時に産生され、どのような生理的意義を持っているのか、また、2-AGとアナンダミドのどちらが生理的に重要なリガンドであるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

1. 神経系における2-AGの生成と意義

まず、ラット脳シナプトソームを用いて2-AGの生成とその意義を調べた。その結果、シナプトソームを脱分極させることにより、2-AGが速やかに、かつ選択的に生成することを明らかにした。生成した2-AGの約30%は速やかに細胞外に放出されていた。なお、もう一つの内在性リガンドとされているアナンダミドのレベルは極めて低く、脱分極によっても有意な変動が見られないことなども明らかとなった。また、シナプトソームの脱分極に伴って起こる2-AGの生成には、電位依存性Ca²⁺チャネル及びホスホリパーゼCが関与しているということが考えられた。次に、CB1受容体のアンタゴニストであるSR141716Aの神経伝達物質の放出に及ぼす影響を調べた。その結果、SR141716Aを加えることにより、シナプトソームからのグルタミン酸の放出が増大することが分かった。これらの結果から、脱分極に伴って生成した2-AGには、一旦起こった神経の興奮にブレーキをかけるという重要な役割があるということが強く示唆された。次に、小脳のスライスを刺激して2-AGが生成するかどうかを調べた。その結果、小脳のスライスを脱分極刺激やグルタミン酸で刺激することによって2-AGの生成が増大することが分かった。小脳では、プルキンエ細胞の樹状突起と顆粒細胞から出る平行線維との間でグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプスを多数形成しており、これが小脳における最も主要なシナプスになっている。CB1受容体は、このシナプスの前終末に多量に発現していることが知られているので、グルタミン酸で刺激することにより2-AGが速やかに生成するということが注目すべきことである。このほか、最近、2-AGのエーテル型のアナログ (noladin ether) が脳に存在しており、第三の内在性リガンドであるということが報告されているが、2-AGのエーテル型アナログはラット、マウス、ハムスター、モルモットなどの各種の動物の脳には存在していないということを蛍光HPLCによる定量分析やGC/MSによる分析によって明確に示した。

2. 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 耳介塗布による急性炎症における2-AGの生成と意義

炎症・免疫細胞に多量に発現しているCB2受容体の生理的役割にはまだ不明の点が多い。我々のグループはこれまでに、2-AGがCB2受容体を介してHL-60細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇や、MAPキナーゼの活性化、ケモカインの産生増大、アクチン重合、また、マクロファージや単球、ナチュラルキラー細胞の遊走を引き起こすことなどを明らかにしてきた。しかし、炎症反応におけるCB2受容体や2-AGの意義についてはこれまで研究がほとんどなされておらず、正確なことはまだ良く分かっていない。そこでまず、炎症部位で2-AGが生成しているかどうかを調べた。その結果、マウス耳介にTPAを塗布することによって作製した急性炎症モデルにおいて、2-AGの量が対照に比べて3倍に増大していることを見出した。一方、アナンドミドのレベルは低く、TPAを塗布することによってもその量に大きな変動は見られなかった。次に、TPAによる炎症に及ぼすCB2受容体アンタゴニストの影響を調べた。その結果、CB2受容体アンタゴニストであるSR144528を塗布することにより、耳介の腫脹は強く抑制を受けることが分かった。また、SR144528を塗布することによって、好中球の遊走因子であるロイコトリエンB₄の産生増大や好中球の浸潤も抑制されることが分かった。一方、マウスの耳介に2-AGを塗布したところ、耳介の腫脹が観察された。2-AGによって引き起こされる耳介の腫脹はSR144528により完全に抑制された。これに対し、アナンドミドは耳介の腫脹を全く引き起こさなかった。これらの結果は、TPAによって引き起こされる急性炎症において、CB2受容体とその内在性リガンドである2-AGが、炎症の進展に深く関与しているということを強く示唆するものである。

3. オキサゾロン耳介塗布による接触性皮膚炎における2-AGの生成と意義

次に、マウスの腹部をハプテン抗原の一つであるオキサゾロンで感作し、その5日後にオキサゾロンを耳介にチャレンジすることによって作製した接触性皮膚炎モデルについて調べた。その結果、オキサゾロンでチャレンジした群では、対照に比べて2-AGの量が増大することが明らかとなった。また、耳介の腫脹は、SR144528を感作時あるいはチャレンジ時にオキサゾロンとともに塗布することによって、強く抑制を受けるということも明らかとなった。CB2受容体と2-AGは、アレルゲンによる感作の成立と、チャレンジ後に引き起こされる炎症反応の双方において重要な役割を演じていることが示唆された。

4. 慢性アレルギー性炎症における2-AGの生成と意義

最後に、好酸球が関与する慢性のアレルギー性炎症にCB2受容体や2-AGが関与しているかどうかを調べた。炎症・免疫系でCB2受容体が多く発現している細胞は、Bリンパ球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなどで、多形核白血球や、Tリンパ球などにはあまり発現していないと言われてきた。しかし、多形核白血球を、好中球、好酸球などに分けて調べた例はこれまでなかった。そこでまず、好酸球にCB2受容体が発現しているかどうかを調べた。ヒト末梢血好酸球及び好中球を調製し、RT-PCR及びWestern blot法を行ったところ、好酸球にはCB2受容体が多量に発現しているということが初めて明らかとなった。一方、好中球にはCB2受容体は殆ど発現していないということが分かった。また、2-AGはCB2受容体を介してヒト末梢血由来の好酸球を効率的に遊走させるということも明らかとなった。更に、マウスの耳介にオキサゾロンを反復投与することによって作製した、好酸球の浸潤を伴う慢性アレルギー性炎症モデルにおいても、2-AG量が著しく増加するという結果が観察された。これらの結果は、2-AGが急性炎症や接触性皮膚炎だけでなく、好酸球が関与する慢性のアレルギー性炎症にも深く関与しているということを強く示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助教授 井ノ口 仁 一
副 査 助教授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

2-アラキドノイルグリセロールの 生理的役割に関する研究

2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は、マリファナの受容体として知られているカンナビノイド受容体の内在性リガンドである。これまで、内在性リガンドとして報告された 2-AG と以前から報告のあったアナンダミドのどちらが生体内で重要な働きをしているかという点、神経系に多量に発現している CB1 受容体と、炎症・免疫系に発現している CB2 受容体の生体内における具体的な生理的役割については不明のままであった。そこで神経系の細胞や炎症・免疫系の動物モデルを用いて、カンナビノイド受容体の内在性リガンドである 2-AG がどのような時に産生され、どの受容体を介してどのような生理的意義を担っているのか、また、2-AG とアナンダミドのどちらが生理的に重要なリガンドであるのかを明らかにすることを目的として一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) ラット脳シナプトソームを用いた実験を行い、シナプトゾームの脱分極刺激によってアナンダミドではなく 2-AG 選択的生成がおこることを明らかにした。この 2-AG の生成には、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル及びホスホリパーゼ C の関与が示唆された。生成した 2-AG の約 30% は細胞外に放出されること、CB1 受容体のアンタゴニストである SR141716A を用いた実験から放出された 2-AG がシナプス膜の CB1 受容体を介して抑制性伝達物質であるグルタミン酸の放出を抑制する事実を見いだした。

次に、小脳のスライスで脱分極刺激やグルタミン酸で刺激することによって 2-AG の生成が増大することが分かった。小脳では、プルキンエ細胞の樹状突起と顆粒細胞から出る平行線維との間でグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプスを多数形成している。CB1 受容体は、このシナプスの前終末に多量に発現しておりグルタミン酸刺激による 2-AG の速やかな生成という今回の発見は、2-AG の役割を考える上で注目すべきことといえる。

(2) ホルボールエステル (TPA) 耳介塗布による急性炎症における 2-AG の生成を観察し、炎症反応の進展におけるその生理的意義を明らかにした。

炎症・免疫細胞に多量に発現している CB2 受容体の生理的役割にはまだ不明の点が多い。そこでまず、炎症部位で 2-AG が生成しているかどうかを調べた。その結果、マウス耳介に TPA を塗布することによって作製した急性炎症モデルにおいて、2-AG の

量が対照に比べて3倍に増大していることを見出した。一方、アナンダミドのレベルは低く、TPAによる変動は見られなかった。次に、TPAによる炎症に及ぼすCB2受容体アンタゴニストの影響を調べた。その結果、CB2受容体アンタゴニストであるSR144528を塗布することにより、耳介の腫脹は強く抑制を受けることが分かった。また、SR144528を塗布することによって、好中球の遊走因子であるロイコトリエンB₄の産生増大や好中球の浸潤も抑制されることが分かった。これらの結果は、TPAによって引き起こされる急性炎症において、CB2受容体とその内在性リガンドである2-AGが、炎症の進展に深く関与しているということを強く示唆した。

(3) オキサゾロン耳介塗布による接触性皮膚炎における2-AGの選択的生成と、2-AGによる細胞のCB2受容体を介した炎症アレルギー反応への関与を初めて明らかにした。マウスの腹部をハプテン抗原の一つであるオキサゾロンで感作し、その5日後にオキサゾロンを耳介にチャレンジすることによって作製した接触性皮膚炎モデルについて調べた。その結果、オキサゾロンでチャレンジした群では、対照に比べて2-AGの量が増大した。また、耳介の腫脹は、SR144528を感作時あるいはチャレンジ時にオキサゾロンとともに塗布することによって、強く抑制を受けるということも明らかとなった。CB2受容体と2-AGは、アレルギーによる感作の成立と、チャレンジ後に引き起こされる炎症反応の双方において重要な役割を演じていることが示唆された。

(4) 最後に、好酸球が関与する慢性のアレルギー性炎症にCB2受容体や2-AGが関与しているかどうかを調べた。ヒト末梢血好酸球及び好中球を調製し、RT-PCR及びWestern blot法を行ったところ、好酸球にはCB2受容体が多量に発現しているということを知り、初めて明らかにした。一方、好中球にはCB2受容体は殆ど発現していなかった。また、2-AGはCB2受容体を介してヒト末梢血由来の好酸球を効率的に遊走させるということも明らかとなった。これらの結果は、2-AGが急性炎症や接触性皮膚炎だけでなく、好酸球が関与する慢性のアレルギー性炎症にも深く関与しているということを強く示唆するものである。

以上述べたように、カンナビノイドとその受容体の役割に関する多くの新知見やそれを得るために用いた新研究技法は、この分野の研究を一步前進させる貴重な貢献であるばかりか、将来の脳機能や炎症アレルギー反応に関係した疾患の新規治療法や創薬の展開にも繋がる可能性を秘めた重要な成果となっている。これらの成果は、この5年間に11報の原著論文（うちJBCなど3報の筆頭著者論文）として国際的一流誌に発表されてきた。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるに相応しいものと一致して判断した。