

白血球系細胞におけるカンナビノイド CB2受容体の 役割に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

大麻 (*Cannabis sativa* L.) を摂取すると、時間および空間感覚の混乱、幻覚、視覚および聴覚の鋭敏化、陶酔感、食欲亢進、離人感など、精神神経系を中心に様々な症状が現れる。これらの作用は、大麻の主要活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) を中心とする種々のカンナビノイドと総称される化合物によるものであると考えられている。カンナビノイドの作用機序は長い間不明であったが、1980年代の後半になって、受容体を介して作用していると考えられるようになった。カンナビノイドに対する受容体として、現在までに2種類の受容体遺伝子がクローニングされている。一つはカンナビノイド CB1 受容体で、もう一つはカンナビノイド CB2 受容体である。CB1 受容体は主に神経系の細胞に発現しており、神経伝達の抑制的制御に関わる役割を演じていると考えられている。一方、CB2 受容体は主として炎症・免疫系の細胞に発現しているが、その生理的役割はまだよく分かっていない。本研究は、免疫系の細胞を用いて、カンナビノイド CB2 受容体の炎症・免疫系の細胞における役割の解明を目的とするものである。

【結果と考察】

1. HL-60細胞におけるカンナビノイド受容体の発現と情報伝達系

まず、HL-60細胞にカンナビノイド受容体が発現しているかどうかを調べ、脳や脾臓の場合と比較した。Northern blotの結果より、HL-60細胞にはCB1受容体は殆ど発現していないが、CB2受容体は多量に発現していることがわかった。

次に、情報伝達系について調べた。HL-60細胞を、100 nMの活性型ビタミンD₃である1,25- α -dihydroxy vitamin D₃ (1,25-(OH)₂VD₃)で5日間処理してマクロファージ様の細胞に分化させ、カンナビノイド受容体の内在性リガンドである2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) を加えて0.5-10分間刺激した。その後、Western blot法により各種情報伝達系タンパク質のリン酸化が起こるかを検証した。その結果、2-AGがAkt, ERK1/2およびp38 MAPKの速やかなリン酸化を引き起こすことが明らかになった。一方、JNK1/2のリン酸化に及ぼす2-AGの影響はわずかなものでしかなかった。

2. マクロファージ様に分化させたHL-60細胞の形態とアクチン重合に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響

次に、細胞の形態とアクチンの重合に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を調べた。HL-60細胞を100 nMの1,25-(OH)₂VD₃で5日間処理してマクロファージ様の細胞に分化させ、1 μ Mの2-AGで刺激したところ、一過的に突起が出現するなど細胞の形態に変化が起こることが分かった。また、2-AGで細胞を処理することにより、アクチンの速やかな重合が起こることも明らかとなった。アクチンの重合は他のカンナビノイド受容体アゴニストで刺激した場合にも観察された。一方、CB2受容体のアンタゴニストであるSR144528やGi/oタンパク質共役型受容体の不活化剤である百日咳毒素 (PTX) で前処理することにより、アクチン重合の促進は完全に阻害された。このことから、2-AGによるアクチン重合の促進はCB2受容体とGi/oを介したものであることが示唆された。

3. マクロファージ様に分化させたHL-60細胞及びヒト単球の接着に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響

次に、細胞接着に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を調べた。分化させたHL-60細胞をfibronectinでコートした96 well plateに播種し、2-AGや各種リガンドで5分間刺激した後、plateに接着した細胞数を計測した。その結果、2-AGや合成カンナビノイドであるWIN55212-2で処理することにより、細胞のfibronectinへの接着が促進することが明らかとなった。一方、CB2受容体のアンタゴニ

ストであるSR144528, PTX および細胞内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AMで前処理することにより, 細胞接着の促進は完全に阻害された. このことから, 2-AGによる細胞接着の促進には, CB2受容体, Gi/o および細胞内カルシウムが関与していると考えられた. 2-AGによる細胞接着の促進はヒト末梢血単球についても観察された.

4. マクロファージ様に分化させたHL-60細胞及びヒト単球の遊走に及ぼす2-AGの影響

次に, 細胞の運動性に及ぼす2-AGの影響を調べた. 分化させたHL-60細胞を5 μ mの小孔を有するTranswell[®]の上室に入れ, 1 μ Mの2-AGを下室に入れ, 4時間インキュベートし, 遊走した細胞数を計測した. その結果, 2-AGは細胞の上室から下室への遊走を効率よく引き起こすことが明らかとなった. また, SR144528やPTXで前処理することにより, 2-AGによる細胞の遊走は強く阻害された. この結果から, 2-AGによる細胞の遊走は, CB2受容体, Gi/oを介したものであることが分かった. 2-AGによる遊走はヒト末梢血単球についても観察された.

5. マクロファージ様に分化させたHL-60細胞の異物貪食に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響

次に, 貪食に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を調べた. HL-60細胞をマクロファージ様の細胞に分化させ, オプソニン化したzymosan蛍光粒子を各種リガンドとともに1時間のインキュベート後に, 計測した. その結果, 2-AGや2-AG etherを加えることにより, 細胞の貪食活性が亢進することが分かった. SR144528やPTXの前処理によって貪食活性の亢進が阻害を受けたことから, 2-AGによる細胞の貪食活性の亢進はCB2受容体, Gi/oを介したものであることが分かった.

6. ナチュラルキラー様細胞の細胞傷害活性に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響

次に細胞傷害活性に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を調べた. HL-60細胞などの他にナチュラルキラー様白血病細胞株であるKHYG-1細胞がCB2受容体を発現している. この細胞をPKH67で染色し, CB1受容体, CB2受容体いずれも発現していないヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562細胞と混合すると, 標的細胞であるK562細胞がKHYG-1細胞によって傷害を受けることがフローサイトメトリーによって確認できる(傷害を受けた細胞はpropidium iodideで染色される). この系を使い, カンナビノイド受容体アゴニストの細胞傷害性に及ぼす影響を調べたところ, KHYG-1細胞の細胞傷害活性は, カンナビノイド受容体アゴニストを共存させると亢進することが明らかとなった.

今回得られた研究結果を総合すると, 2-AGはCB2受容体を介して, マクロファージ等のアクチン重合や接着, 遊走, 貪食, 細胞傷害性等を亢進させることにより, 炎症やアレルギーの進展に深く関与している可能性があると考えられる.

【まとめ】

- 1) マクロファージ様に分化させたHL-60細胞に, 2-AGを加えて刺激することにより, ERK1/2やAkt, p38 MAPキナーゼなどの情報伝達系タンパク質のリン酸化が起こることが明らかとなった.
- 2) マクロファージ様に分化させたHL-60細胞に, 2-AGを始めとするカンナビノイド受容体リガンドを加えて刺激することにより, アクチン重合が促進されることが明らかとなった.
- 3) マクロファージ様に分化させたHL-60細胞およびヒト単球に, 2-AGを始めとするカンナビノイド受容体リガンドを加えて刺激することにより, 細胞のfibronectinに対する接着が促進することが明らかとなった.
- 4) マクロファージ様に分化させたHL-60細胞およびヒト単球は, 2-AGに対して遊走することを示した.
- 5) マクロファージ様に分化させたHL-60細胞のオプソニン化zymosanに対する貪食は, 2-AGを始めとするカンナビノイド受容体リガンドによって亢進することを示した.
- 6) CB2受容体を発現しているKHYG-1細胞のK562細胞に対する細胞障害活性は, カンナビノイド受容体リガンドによって亢進することが明らかとなった.

【参考文献】

- 1) Gokoh, M., Kishimoto, S., Oka, S., Mori, M., Waku, K., Ishima, Y., Sugiura, T. (2005) *Biochem. J.* **386**, 583-589.
- 2) Gokoh, M., Kishimoto, S., Oka, S., Metani, Y., Sugiura, T. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 6473-6478.
- 3) Gokoh, M., Kishimoto, S., Oka, S., Sugiura, T. (2007) *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1199-1205.
- 4) Kishimoto, S., Gokoh, M., Oka, S., Muramatsu, M., Kajiwara T., Waku, K., Sugiura, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 24469-24475.
- 5) Kishimoto, S., Kobayashi, Y., Oka, S., Gokoh, M., Waku, K., Sugiura, T. (2004) *J. Biochem.* **135**, 517-524.
- 6) Oka, S., Ikeda, S., Kishimoto, S., Gokoh, M., Yanagimoto, S., Waku, K., Sugiura, T. (2004) *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1002-1009.
- 7) Kishimoto, S., Muramatsu, M., Gokoh, M., Oka, S., Waku, K., Sugiura, T. *J. Biochem.* (2005) **137**, 217-223.
- 8) Kishimoto, S., Oka, S., Gokoh, M., Sugiura, T. (2006) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **140**, 3-7.

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 木 原 章 雄
副 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 准教授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

白血球系細胞におけるカンナビノイド CB2受容体の 役割に関する研究

大麻 (*Cannabis sativa* L.) を摂取すると、時間および空間感覚の混乱、幻覚、視覚および聴覚の鋭敏化、陶酔感、食欲亢進、離人感など、精神神経系を中心に様々な症状が現れる。これらの作用は、大麻の主要活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) を中心とする種々のカンナビノイドと総称される化合物によるものであると考えられている。カンナビノイドの作用機序は現在では受容体を介して作用していると考えられるようになり、カンナビノイド CB1 受容体とカンナビノイド CB2 受容体という 2 種類の受容体遺伝子がクローニングされている。CB1 受容体は主に神経系の細胞に発現しており、神経伝達の抑制的制御に関わる一方で、CB2 受容体は主として炎症・免疫系の細胞に発現しているが、その生理的役割はまだよく分かっていない。申請者の研究室では、このカンナビノイド受容体の内在性リガンドが 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) であること、2-AG が HL-60 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことなどを見いだしており、このことは CB2 受容体が免疫系の細胞において重要な役割を担っていることを示唆していた。そこで申請者は、免疫系の細胞を用いて、種々のアプローチにより、カンナビノイド CB2 受容体の炎症・免疫系の細胞における役割の解明を目指した。

申請者はまず、HL-60 細胞にカンナビノイド受容体が発現しているかどうかを検討し、CB1 受容体は殆ど発現していないが、CB2 受容体は多量に発現していることを示した。次に、HL-60 細胞を、100 nM の活性型ビタミン D3 で処理してマクロファージ様の細胞に分化させ、2-AG が Akt, ERK1/2 および p38 MAPK の速やかなリン酸化を引き起こすことを明らかにした。

次に、申請者は細胞の形態とアクチンの重合に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を検討し、1 μ M の 2-AG で刺激することで、一過的に突起が出現する

など細胞の形態に変化が起こること，2-AGで細胞を処理することにより，細胞内アクチンの速やかな重合が起こることを示した．次に，細胞接着に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を検討し，2-AGや合成カンナビノイドであるWIN55212-2で処理することにより，細胞のfibronectinへの接着が促進することを明らかにした．また，2-AGによる細胞接着の促進はヒト末梢血単球についても観察されたことも明らかにしている．さらに，in vivoの条件に近い血管内皮細胞への接着にも，2-AGが関与することも示している．次に，細胞の運動性に及ぼす2-AGの影響を検討し，他のカンナビノイド受容体リガンドでは遊走がわずかしき引き起こさないが，2-AGは顕著に方向性の存在するケモタキシスを誘導することを示した．また，2-AGによる遊走はヒト末梢血単球についても観察されることも示している．次に，HL-60細胞のオプソニン化zymosan食食に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響を検討し，2-AGや2-AG etherを加えることにより，細胞の食食活性が亢進することを明らかにした．いずれの細胞応答も，CB2受容体のアンタゴニストであるSR144528やGi/oタンパク質共役型受容体の不活化剤である百日咳毒素で前処理することにより，抑制を受けたことから，2-AGによるこれらの応答は一貫してCB2受容体とGi/oを介したものであることを示している．

さらに，細胞傷害活性に及ぼすカンナビノイド受容体リガンドの影響も検討しており，これはHL-60細胞などの他にCB2受容体を発現していることで知られる，ナチュラルキラー様白血病細胞株であるKHYG-1細胞を用いている．フローサイトメトリーの実験系を用い，カンナビノイド受容体アゴニストの細胞傷害性に及ぼす影響を検討し，KHYG-1細胞の細胞傷害活性は，カンナビノイド受容体アゴニストを共存させると亢進することを明らかにした．

本論文は全体を通して，2-AGはCB2受容体を介して，マクロファージ等のアクチン重合や接着，遊走，食食，細胞傷害性等を亢進させることにより，炎症やアレルギーの進展に深く関与している可能性があることをよく考察している．よって，申請者は博士（薬学）の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた．