

中枢神経系における2-アラキドノイルグリセロールを 介した逆行性シナプス伝達機構の 分子形態学的基盤に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】大麻 (*Cannabis Sativa*) は多幸感や抗不安感をはじめとする精神神経作用の他、鎮痛や食欲促進作用があることも知られ、一部で末期がん患者等を対象にした医療応用も行われるなど、違法薬物としての負の側面とともに正の側面も持ち合わせている。大麻の多様な作用は神経終末に分布するカンナビノイド受容体 CB1 の活性化に伴う神経伝達物質放出抑制が原因であると考えられている。一方、内因性カンナビノイド2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は、ポストシナプスでの脱分極刺激および Gαq/11 タンパク質共役型受容体刺激により、ジアシルグリセロールリパーゼα (DGLα) を介して産生され、神経終末の CB1 を介して逆行性シナプス伝達抑制を引き起こすと共に、モノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) により主な分解を受ける。この 2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構は脳の正常な機能発現に重要であり、さらには創薬標的としての可能性も秘めていることから近年注目を浴びつつある。しかしながら、その分子基盤については不明点が多い。本研究では 2-AG を介した逆行性シグナル伝達機構の分子解剖学的基盤を理解するため、マウス線条体および歯状回シナプスにおいて、2-AG の合成、伝達、分解に関与する分子局在およびシナプス形態を明らかにすることを試みた。

【材料と方法】C57BL/6N 系統の野生型、CB1 欠損型、DGLα欠損型および MGL 欠損型マウス脳を用いた。形態学的解析については脳切片を作製し、RI 標識または non-IR 標識蛍光多重 *in situ* ハイブリダイゼーション法、多重蛍光免疫染色法、免疫電子顕微鏡法を用いて分子発現および局在解析を行った。シナプス構造の解析には、連続電子顕微鏡法にて得られた電子顕微鏡写真から三次元立体再構築を行った。電気生理学的解析については急性脳スライスを作製し、ホールセルパッチクランプにて記録を行った。

【結果①：線条体における CB1 の分布】CB1 は中枢神経系において幅広い分布を示し、線条体においても比較的強い発現を認めた。線条体内の回路に着目すると、CB1 に対する免疫反応はサブスタンス P 陽性の直接路中型有棘ニューロン、エンケファリン陽性の間接路中型有棘ニューロン、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの抑制性終末に高いレベルで認められ、小胞グルタミン酸トランスポーター1 型で標識された皮質線条体路の興奮性終末においても低いレベルで認められた。これらの終末は中型有棘ニューロンとシナプスを形成していた。一方、これ以外の神経

終末において CB1 はほとんど検出されなかった。

【結果②：線条体における 2-AG 合成の分子基盤の解剖生理学的検討】線条体中型有棘ニューロンにおいて、DGL α はスパインや樹状突起、細胞体表面に分布し、スパインで最も豊富な分布を示した。2-AG の合成系において、DGL α の上流に位置する G α q/11 タンパク質共役型受容体のうち、線条体において特に強い発現を示す代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) およびムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 は、ともに中型有棘ニューロンのスパインや樹状突起、細胞体表面に分布したが、mGluR5 の発現強度はスパイン>樹状突起>細胞体であったのに対し、M1 のスパインでの発現は樹状突起や細胞体よりも低かった。さらにスパインの興奮性シナプス近傍部には mGluR5 が集積していたのに対し、M1 はそこから排除されるような分布を示した。この両者の分布の相違を反映して、内因性カンナビノイドを介した逆行性伝達抑制は樹状突起や細胞体に多く形成される抑制性シナプスにおいて mGluR5 と M1 のどちらの刺激においても増強したのに対し、興奮性シナプスでは M1 刺激のみが増強を引き起こした。これらの内因性カンナビノイドを介した逆行性伝達抑制は DGL 阻害薬により消失した。

【結果③：歯状回における 2-AG 伝達のシナプス選択性に関する形態学的検討】てんかん原性回路の一部を構成していると考えられる苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおいて、DGL α はスパインを含むポストシナプス側において幅広い分布を示し、CB1 は苔状細胞終末のみならず、終末近傍部においても集積が認められた。一方、MGL は苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおいて発現せず、その周囲に分布するアストロサイトや抑制性終末に発現した。顆粒細胞スパインの周囲の構造を連続電子顕微鏡写真の三次元立体再構築により解析したところ、顆粒細胞スパインは複数の苔状細胞終末とシナプスを介さずに広く接触していたのに対し、アストロサイトや抑制性終末による被覆は乏しかった。

【考察】線条体シナプスにおいて、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構は中型有棘ニューロン-中型有棘ニューロン間抑制性シナプス、パルブアルブミン陽性介在ニューロン-中型有棘ニューロン間抑制性シナプス、皮質線条体路興奮性シナプスにおいて備わっているが、抑制性シナプスと興奮性シナプスの間では 2-AG に対する感受性は抑制性シナプスの方で高いが、2-AG の合成酵素である DGL α は興奮性シナプスで強く発現するという相補的な分布を示すことで、2-AG 伝達のバランスをとっていると考えられる。さらに、両シナプス間では mGluR5、M1 の分子局在および 2-AG 伝達に対する機能的寄与が異なっており、それぞれが大脳皮質とアセチルコリン作動性介在ニューロンの活動性のバランスにより異なる制御を受けていると考えられた。

歯状回顆粒細胞-苔状細胞シナプスにおいては、活性化した顆粒細胞スパインから放出された 2-AG が近隣の苔状細胞終末に対してシナプス非選択的に作用することが可能な形態学的基盤が存在した。これは、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構が顆粒細胞に対する過剰な興奮性伝達を効率的に抑制することで、てんかんで見られるような異常興奮を防ぐのに寄与していると考えられた。

【結論】2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構は中枢神経系において広く備わっている神経伝達調節機構であり、脳の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、その分子形態学的基盤は脳領域あるいはシナプスごとに異なっており、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構の更なる理解が治療応用などに有効であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	神谷温之
副査	教授	渡邊雅彦
副査	准教授	遠山晴一
副査	教授	岩永敏彦
副査	教授	本間さと

学位論文題名

中枢神経系における2-アラキドノイルグリセロールを 介した逆行性シナプス伝達機構の 分子形態学的基盤に関する研究

内因性カンナビノイド 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は、神経活動依存的にポストシナプスニューロンから放出され、プレシナプスに発現するカンナビノイド CB1 受容体に作用して神経伝達物質の放出を抑制する。この逆行性伝達抑制機構は、過度なシナプス活動時の回路遮断器として正常な脳機能の維持と調節において重要な役割を果たしている。本研究では、線条体および歯状回において、2-AG を介した逆行性伝達抑制の分子形態基盤を明らかにすることを目的として行った。発表者は、まず、線条体における CB1 がプレシナプスに選択的に発現し、中型有棘ニューロンとパルブアルブミン陽性介在ニューロンの抑制性終末に強く発現し、大脳皮質由来の興奮性終末には弱く発現することを示した。次に 2-AG 合成酵素であるジアシルグリセロールリパーゼ α と 2-AG の合成を促進する 5 型代謝型グルタミン酸受容体およびムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 の発現局在を解析し、これらの合成系分子が線条体中型有棘ニューロンのポストシナプスとなる細胞要素に選択的に発現していることを示した。これらの発現局在特性から、線条体では中型有棘ニューロンを標的として特定の抑制性および興奮性シナプスに 2-AG の逆行性伝達抑制機構が備わり、中型有棘ニューロンの活動性を制御していることが明らかとなった。2-AG は拡散性分子であり、脳内ではシナプスが密に分布していることを考慮すると、2-AG の逆行性伝達抑制機構は近隣のシナプス間でクロストークする可能性が考えられた。そこで、反回性の興奮性回路が密に形成されている歯状回の苔状細胞-顆粒細胞シナプスをモデルとして、シナプス間でのクロストークの可能性について分子形態学的側面から検討した。その結果、CB1 はほとんど全ての苔状細胞軸索終末に発現しており、2-AG の発生源となる顆粒細胞のスパインにはこれ

とシナプス結合する苔状細胞終末に加え近隣の苔状細胞終末も接触していた。ゆえに、ある苔状細胞-顆粒細胞シナプスの活動により産生された 2-AG は、近隣のシナプスにも波及しその活動性に影響を与えうることを示した。

この発表に対して審査員から種々の質問がなされた。線条体における CB1 のシナプス発現とハンチントン舞踏病との関連についての質問に対して、発表者はハンチントン舞踏病の患者とモデル動物において CB1 の発現が減少しているという過去の報告例を紹介した。線条体における 2-AG の分布や濃度に関する質問に対し、発表者は脳の各領域における 2-AG の濃度測定はこれまでも行われてきたが、低分子量の脂質である 2-AG そのものの分布については未だ検出法が確立していないことを説明した。内因性カンナビノイドとドーパミンとの関連についての質問に対し、発表者はドーパミン D2 受容体刺激が内因性カンナビノイド依存的なシナプス長期抑圧を引き起こすことを説明した。2-AG の放出機構に関する質問に対して、発表者は 2-AG は貯蔵されることなく、合成と同時に放出される様式であることを説明した。2-AG を含むジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C とジアシルグリセロールリパーゼの基質であり両者の間で基質の奪い合いが行われるのではないかという質問に対し、発表者はその問題は今後の重要な検討課題の一つであると応じた。苔状細胞-顆粒細胞シナプスがてんかん原性回路であるとする根拠に関して、発表者は反回性の興奮性投射がネットワーク全体の活動性を亢進させることでてんかん原性となりうることを説明した。最後に、2-AG 伝達関連分子が特定のシナプスに集中して備わっていることの意義について問われ、発表者は 2-AG 伝達はシナプス活動に依存して行われるシグナル伝達系であることからその関連分子の局在制御にはシナプス活動が関連している可能性が考えられ、今後の重要な研究課題であると述べた。この研究成果は *Journal of Neuroscience* 誌等でも高く評価され、審査員は 2-AG を介した逆行性伝達抑制機構に関する基盤的研究であると評価し、本学位審査は終了した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。