

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 内ヶ島 基 政

### 学 位 論 文 題 名

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

【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 を介した逆行性シナプス伝達抑制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、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、DGLα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、DGLαの上流に位置する Gαq/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シナプス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 $\alpha$ 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】本研究では、線条体内のシナプスのうち、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 2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制の分子基盤が整っていることを明らかにした。一方、抑制性シナプスと興奮性シナプスの間ではその分子基盤は異なっており、抑制性シナプスでは 2-AG に対する感受性が高いが、2-AG の合成酵素である DGL $\alpha$  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、mGluR5、M1 の分子局在およびそれらの 2-AG 伝達に対する機能的寄与も両シナプス間で異なっており、大脳皮質からのグルタミン酸刺激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が各々のシナプスにおける 2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制に異なる調節を与えることで、中型有棘ニューロンの興奮性が精緻に制御されていると考えられた。

歯状回の興奮性シナプスである顆粒細胞-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 がシナプスを形成している苔状細胞終末のみならず、MGL の分解を逃れることにより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。このような 2-AG を介したシナプス間クロストークは、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ニューロンの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に関連する分子は線条体と歯状回シナプスにおいて整っていたが、各々のシナプスにおける CB1、G $\alpha$ q/11 タンパク共役型受容体、DGL $\alpha$ 、MGL の発現分布様式は異なっており、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構はシナプスに依存した制御を受けていると考えられる。これらの新知見は、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制による脳機能の理解だけでなく神経回路選択的な治療応用などに有効であると考えられた。