

高脂肪食嗜好性における内因性カンナビノイドの役割に関する研究

樋口 聖

福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

The role of endocannabinoids in preference for high-fat diet

Sei Higuchi

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

The aim of this study is to investigate the role of hypothalamic 2-arachidonoylglycerol (2-AG), a lipid mediator and endocannabinoid, in the preference for high-fat diet (HFD). The 3, 7-day HFD intake induced the preference for HFD and the temporal increment of hypothalamic 2-AG. The 2-week HFD intake induced a preference for a HFD and the permanent increment of hypothalamic 2-AG with activated hypothalamic astrocytes via activation of cannabinoid (CB₁) receptors. From this evidence, we propose that there may be two stages for the development of a preference for a HFD, such as acquisition process (temporary increment of 2-AG) and maintenance process (activation of astrocytes with permanent increment of 2-AG). Hypothalamic 2-AG has a key role in the developing a preference for a HFD.

Key-word: endocannabinoids, hypothalamus, preference, high-fat diet, astrocytes

【背景】

脂肪を多く含むもの（高脂肪食）は、生物にとって魅力的な食品であり好んで摂食される。このように、特定のものを好み親しむことは「嗜好」と呼ばれている。しかし、高脂肪食が魅力的な嗜好品である一方で、高脂肪食に対する嗜好性は脂肪分の過剰摂食を引き起こし、肥満、糖尿病、脂質異常症や非アルコール性脂肪肝（NASH）などの生活習慣病や心筋梗塞、脳血管障害などの重篤な疾患を招く危険性がある。実際に若年期から高脂肪食を偏食し、中年期以降も高脂肪食を過剰に摂食していると考えられる欧米では、生活習慣病や心筋梗塞、脳血管障害などの重篤な疾患が大きな健康問題となっている。また、元来、我が国では米食を中心としたバランスのとれた食生活を送ってきたが、近年では国際情勢などの変化から食生活が欧米化し脂質を摂食する割合が増加してきている。その結果、我が国においても生活習慣病や心疾患、脳血管障害の罹患者数は増加の一途をたどり、大きな社会問題となっている。これらのことから、食生活の変化や生活習慣病、心疾患、脳血管障害の罹患者数の増加は高脂肪食に対する嗜好性が深く関与していると考えられる。そこで、本研究では高脂肪食に対する嗜好性形成のメカニズムを解明することを目的としている。

近年、嗜好には脳内の報酬系が関与していることがさまざまな研究から明らかとなってきた。脳内の報酬系に影響を与える物質として大麻が古くから知られている。大麻中には60種類以上のカンナビノイド化合物が含まれており、主な精神作用を示す活性本体は Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) である

ことが知られている (1)。THCはカタレプシーや鎮痛，陶酔感などの気分・情動の変化，思考の異常，摂食促進作用などの薬理作用を引き起こす。また，THCが体内に存在する結合部位として，1990年にMatsudaらによってCB₁受容体，1993年にMunroらによってCB₂受容体が同定された(2,3)。CB₁受容体は主に中枢神経に発現していることが知られている。

大麻が脳内で精神作用を示す一方で，生体内で大麻様の働きをする物質(内因性カンナビノイド)が同定されている。CB受容体に対する内因性のリガンド，つまり内因性カンナビノイドとして，1992年にDevaneらによりブタの脳からN-Arachidonoyl ethanolamide (Anandamide, AEA)が同定され，1995年にはSugiuraらがラットの脳，Mechoulamらがイヌの小腸からCB₁，CB₂のFull agonistである2-Arachidonoylglycerol (2-AG)を同定した(4-6)。カンナビノイドの生理作用として，中枢神経系で食欲促進や報酬系における機能的役割の一端を担っていると言われていた。実際，内因性カンナビノイド(Endocannabinoids, eCBs)の脳内濃度は食欲抑制ホルモンであるレプチン(Leptin)量やインスリン濃度に影響を受けることや，THCや2-AGの投与によって摂食量が増加する報告がなされている(7)。CB₁受容体の欠損やCB₁受容体遮断薬であるSR141716AやAM251がエタノールやスクロース，甘味物質，高脂肪食の摂食を抑制することから，生体内でカンナビノイドシステムが摂食行動だけでなく，報酬系にも関与していることが示唆されている(7)。しかしながら，これらの報告はいずれも，CB₁受容体遮断薬やCB₁受容体欠損動物を用いたものであり，報酬系に伴う内因性カンナビノイドの変化を検討した報告はほとんどない。

内因性カンナビノイドは上述のように生体内で摂食行動や報酬系に働くだけでなく，脳内のアストロサイトの機能にも影響を与えていることが知られている(8)。グリア細胞は神経系を構成する神経細胞ではない細胞の総称で，神経細胞の10倍程度存在すると考えられている。アストロサイト(Astrocyte, 星状膠細胞)は中枢神経系に存在するグリア細胞(Glial cell)の1種である。最近になってグリア細胞も種々の神経伝達物質受容体が発現していることや，刺激依存的に細胞内のカルシウム濃度を増加させグルタミンやATPなどの神経伝達物質，サイトカイン等の生理活性物質を遊離することが報告され，中枢神経系の神経の成熟やシナプス新生，血管新生など可塑的变化に重要な役割を果たしている事実が明らかとなってきた(9)。特に，中枢で最も多く存在するグリア細胞であるアストロサイトは，その中心的な役割を担っていると考えられており，カンナビノイドとの相互関係を始めとする多種多様な作用が報告されている。例えば，アストロサイト細胞膜上には，CB₁受容体，CB₂受容体が存在し，脳内の内因性カンナビノイドにより分化・増殖が促進され，グリア細胞線維性酸性タンパク質(Glial-Fibrillary-Acidic-Protein, GFAP)が増加すること，さらに，ATPの存在下で2-AGを合成すること，AEAの合成，放出能を持つことも報告されている(10)。また，メタンフェタミンなどの薬物依存形成時に，プロテインキナーゼCを介してアストロサイトが変化し，大脳でシナプス間のグルタミン酸濃度の増加もしくは，グルタミン酸やドパミンの感受性を増加させ報酬系を活性化していることが報告されている(11)。また，依存性薬物の反復投与によりアストロサイトの特異的マーカーであるGFAPが脳内で増加することや，アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターと薬物依存に関する研究が報告されている(12,13)。このように，脳内カンナビノイドシステムとアストロサイトには神経活動を通じた，何らかの関与があると考えられている。これまで，嗜好性や報酬系のメカニズムとしては，中脳の腹側被蓋野や，側座核のドパミン神経系の活性化が主に考えられてきた(14)。しかし，近年，CB₁受容体が視床下部に多く存在していることや，視床下部が報酬系に関与していることを示す報告がなされている(15)。これらのことから，報酬系の研究において，腹側被蓋野や側座核以外の脳部位や，カンナビノイドシステムとアストロサイトを含めた検討を行う必要がある。

高脂肪食に報酬効果があることや、カンナビノイドの関与を示唆する報告は存在しているが、内因性カンナビノイドの役割を詳細に検討したものは存在しない。そこで、我々は CB 受容体の Full agonist である 2-AG に注目し、高脂肪食嗜好性の形成メカニズムを詳細に検討した。本研究では、まず高脂肪食嗜好性の評価を行動薬理的に検討した。次に、高脂肪食嗜好性に伴う 2-AG の変化を GC/MS で測定した。高脂肪食嗜好性に対する CB₁ 受容体の関与については、CB₁ 受容体拮抗薬 O-2050 を用いた。また、アストロサイトと高脂肪食嗜好性の関係を検討するために、Western Blotting およびアストロサイト代謝阻害薬 Fluorocitrate (FC) を用いた。

【実験材料および実験方法】

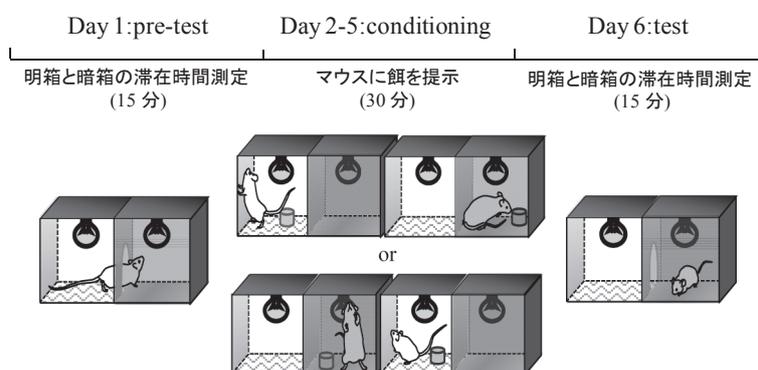
実験動物ならびに飼育方法

実験動物は 25~30 g の ICR 系雄性マウスを用いた。餌は標準食 (Standard-diet; SD) もしくは高脂肪食 (High-fat diet; HFD) を水と共に自由に摂食させた。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会 (Experimental animal care and use committee) に準じた。

嗜好性の評価

嗜好性の評価には条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned Place Preference test: CPP test) を用いた。下図に示すような明箱と暗箱の二つの箱に行き来可能な仕切りを設置した状態で、マウスを装置内に入れ、明箱と暗箱の滞在時間を 15 分間測定した (Pre-test : Day 1)。この時の測定値を Pre 値とした。続いて、二つの間の仕切りを塞いだ状態で、滞在時間の少ない箱を選定し、高脂肪食処置箱とし、箱内にマウスと HFD を共に 30 分間入れ、条件付けを行った (Conditioning : Day 2-5)。一方、滞在時間の大きな箱は標準食処置箱とし、30 分間、マウスと SD を共に入れた。Day 2 と Day 4 に HFD とマウスを滞在時間の少ない箱に入れ、Day 3 と Day 5 に SD とマウスを滞在時間の多い箱に入れる、または、Day 3 と Day 5 に HFD とマウスを滞在時間の少ない箱に入れ、Day 2 と Day 4 に SD とマウスを滞在時間の多い箱に入れ、条件付けを行った。Day 6 に pre-test と同様に、二つの箱の間に行き来可能な仕切りを設置した状態で、15 分間、二つの箱の滞在時間を測定した (test : Day 6)。この時の測定値を post 値とした。

最終的な HFD に対する報酬効果の指標として、マウスの嗜好性の変化 (Preference score) を用いた。Preference score は test と pre-test での高脂肪食処置箱の滞在時間の差から求めた。Preference score の値がプラスであれば、HFD に対する嗜好性の発現を認め、変化がないもしくはマイナスであれば、HFD に対する嗜好性がないと評価した。



CPP装置のスケジュールと概略図

2-AGの測定

Folch法を用いてマウスの脳サンプルから脂質成分を抽出した。得られた脂質成分から固相抽出法により2-AGを得た。得られた2-AGをTrimethylsilyl (TMS) しGC/MSにて測定した。

アストロサイトの発現の評価

マウスの脳をホモジネートし、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を抗GFAP抗体を用いてwestern blotting法で評価した。

CB₁受容体の関与

マウスにCB₁受容体拮抗薬O-2050 (10 mg/kg, i.p.)を投与し、CPPtestを用いて高脂肪食嗜好性を評価した。

アストロサイトの関与

マウスの視床下部にカニューレを埋め込み、アストロサイト代謝阻害薬Fluorocitrate (FC)を投与し、CPPtestを用いて高脂肪食嗜好性を評価した。

【結果・考察】

高脂肪食嗜好性の行動評価と2-AGの関係

HFD摂取に伴うCPPtestの結果をFig. 1に示した。HFDを3日間摂食することでpreference scoreが有意に増加した。HFDの42日間摂食まで検討した結果3,7,14,28,42日間のHFD摂食は継続して有意にpreference scoreが高かった。

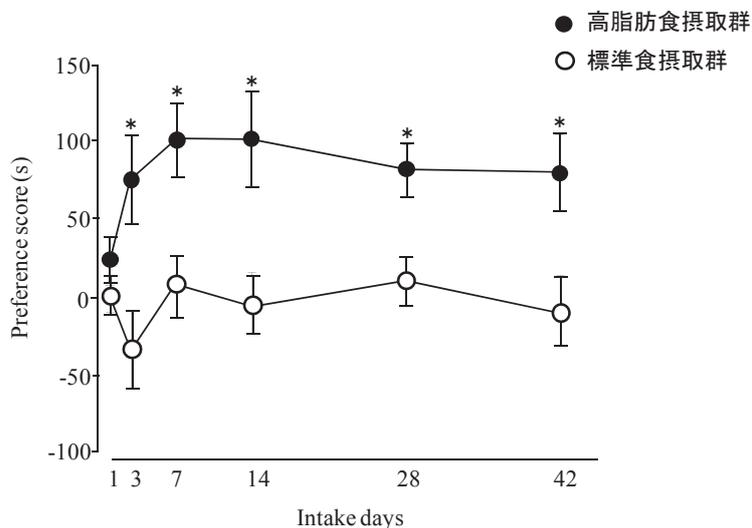


Fig. 1 HFD摂取後の嗜好性の変化

CPP testのtestに伴う視床下部の2-AG濃度をFig. 2に示した。HFD摂食後3,7日目CPP testのtestを行うことで視床下部の2-AGが有意に増加していた。また、HFD摂食後14,28,42日目はtest前から2-AG濃度が高く、test後も高かった。一方、SD群はtestを行っても視床下部の2-AG濃度は変化しなかった。

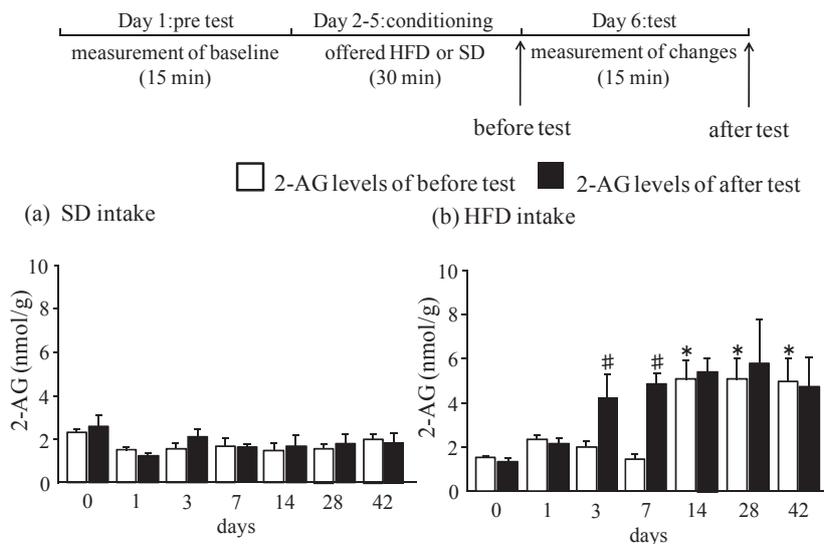


Fig. 2 CPPtestに伴う視床下部の2-AG濃度の変化

CPP testは薬物の精神依存、身体依存の評価方法の1つとして知られている(16)。また、実験操作が比較的簡便であり、最終的な評価を行うtestが15分という短時間で依存性評価が可能である。さらに、CPP testは最も信頼性の高い依存性・報酬系の試験であることが知られ、薬物だけでなく脂や食べ物に対する報酬系の評価にも用いられている(17)。そこで、CPP testを行う前にあらかじめHFDを摂食させ、どのくらいのHFD摂食期間が嗜好性を惹起するのかを検討した。その結果、HFDを3日間摂食することでSD群と比較し、preference scoreが有意に増加した。このことから、3日間のHFD摂食が嗜好性を惹起することが明らかとなった。このことから、3日間のHFD摂食による刺激が生体に何らかの影響を与え、嗜好性を形成させていると考えられる。したがって、HFD摂食による生体内の変化および、CPP testに伴うカンナビノイドの変化を検討した。

CPP testでHFDに対して嗜好性を持つマウスはday 2-5の条件づけで、HFDで条件付けした箱を記憶し、day 6(test)にHFDの報酬記憶からHFDで条件付けした箱に滞在するようになると考えられる。したがって、摂食や自律神経の中枢である視床下部に注目しtest前後の2-AGを測定した。その結果、HFD摂食後3, 7日目のマウスの視床下部で、testを行うことで2-AG濃度が有意に増加した。しかし、HFD摂食14日目以降はtest前から2-AG濃度が高く、test後も同様の値を示した。一方、SD摂食群では摂食期間に関係なくtest前後の視床下部内の2-AG濃度に変化は無かった。このことから、嗜好性が形成された始めたマウスにtestを行うことで、HFDに対する報酬記憶がニューロンを刺激し、2-AGが一過性に放出されたと考えられる。また、HFD摂食後3, 7日目は全脳で2-AGの量は増加していないことから、視床下部特異的であると考えられる。その他の2-AGが一過性に増加する原因としてオピオイドとのクロストークが関係していることも考えられる。Mizushigeらはラットにコーンオイルを毎日同時刻に摂取させ、コーンオイルが与えられる時間を記憶させたところ、コーンオイル摂食前からエンドルフィンの前駆体であるPOMCのmRNAが増加し、コーンオイル摂食後30分後に脳脊髄液中のエンドルフィン濃度が増加することを報告している(18)。オピオイドとカンナビノイドは同じ細胞に発現しお互いに影響し合いクロストークを行っていることが知られている(19)。したがって、これらのメカニズムが嗜好性形成時に起き一過性に2-AGの放出を増加させている可能性が考えられる。しかし、詳細なメカニズムは不明であることから、嗜好性の伴う2-AGの一過性の増加の要因についてはさらなる検討が必要である。一方、

HFD 摂食 14 日目以降 test 前から視床下部での 2-AG 度が高い理由として、全脳でも 14 日目以降 2-AG 濃度が高いことから、HFD 摂食による生体内の恒常性の変化が考えられる。

高脂肪食嗜好性と CB_1 受容体の関係

高脂肪食嗜好性に対する CB_1 受容体拮抗薬 O-2050 の影響を Fig. 3 に示した。O-2050 (10 mg/kg i.p.) の単回投与 (test day) は 3 日間 HFD 摂食により嗜好性を抑制したが、14 日間 HFD 摂食による嗜好性は抑制しなかった。しかし、O-2050 の 14 日間連投 (14 days) は 14 日間 HFD 摂食による嗜好性を抑制した。

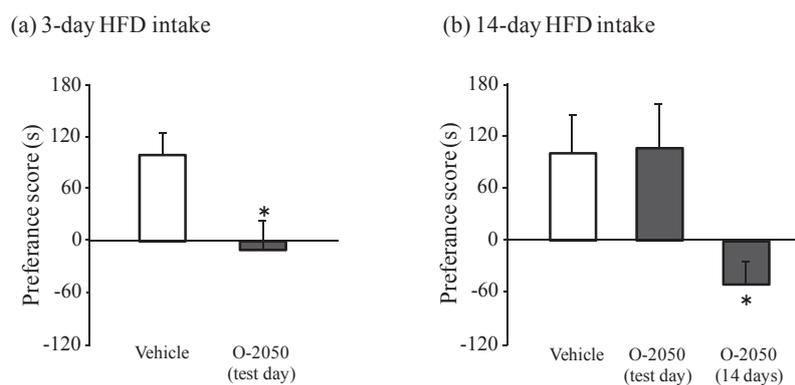


Fig. 3 高脂肪食嗜好性に対する O-2050 の影響

CPP test の test に伴う 2-AG の変化が 3, 14 日目に見られることから、HFD 摂食後 3, 14 日目に対する O-2050 の影響を検討した。その結果、3 日間の HFD 摂食により形成された嗜好性は O-2050 単回投与によって抑制された。このことから、3 日間の HFD 摂食による嗜好性は HFD に対する摂食のモチベーションから一過性に 2-AG が放出され、 CB_1 受容体を活性化することで嗜好性が獲得されることが考えられる。したがって、O-2050 が一過性に増加した 2-AG と CB_1 受容体の結合を阻害することで嗜好性が抑制されたと考えられる。一方 14 日間の HFD 摂食により形成された嗜好性は O-2050 の単回投与では抑制されず、14 日間の O-2050 連続投与によって抑制された。このことから、O-2050 を連続投与することで慢性的な 2-AG の刺激を抑制し、嗜好性形成を抑制したことが考えられた。このように、HFD 摂食後 3 日目以降と 14 日目以降では、2-AG の挙動および O-2050 の作用が異なることから脳内で何らかの変化が起きている可能性が考えられる。

高脂肪嗜好性とアストロサイトの関係

HFD 摂取後 3 日目と 14 日目の GFAP 量を Fig. 4 に示す。3 日間の HFD 摂取は GFAP 量に影響はなかった。一方、14 日間の HFD 摂取後に、GFAP 量が優位に増加していた。さらに、O-2050 の 14 日間連続投与は GFAP の増加を抑制した。

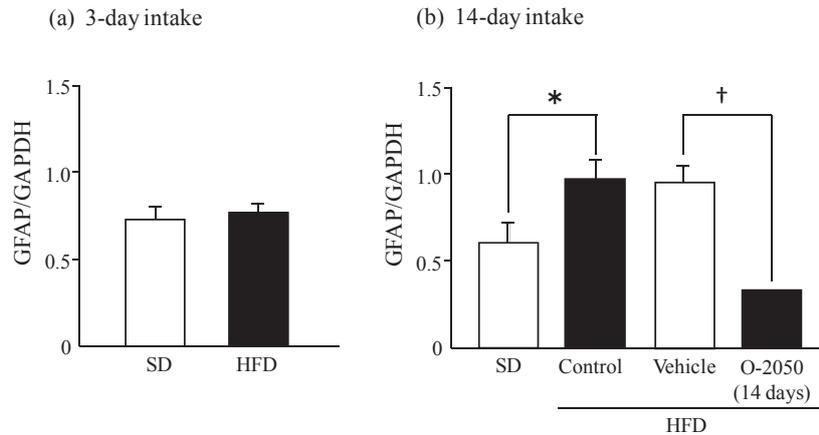


Fig. 4 HFD摂取後3日目と14日目のGFAP量の変化とCB₁受容体の関与

HFD嗜好性に対するFCの影響をFig. 5に示した。FCは3日間のHFD摂食によって増加した preference scoreには影響を与えなかった。一方、FC 1 nmolの投与は14日間HFDを摂食することで増加した preference scoreを有意に減少させた。

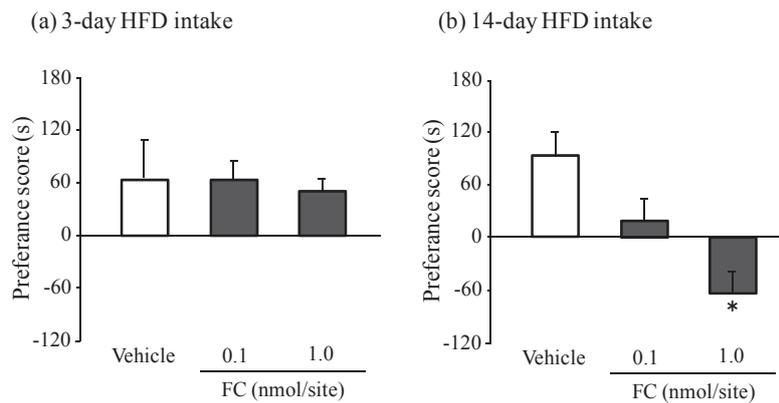


Fig. 5 FCと高脂肪食嗜好性の関係

HFDを14日間摂取することでGFAP量が優位に増加し、O-2050の14日間連続投与でGFAP量の増加が抑制されたことから、CB₁受容体を介してGFAPが増加したことが考えられる。HFDを14日間摂食することで活性化したアストロサイトは、2-AGが常にアストロサイト上のCB₁受容体を刺激したことによるものと考えられる。カンナビノイドシステムを介してアストロサイトが活性化することはAguadoらによって報告されており、我々の結果はこの報告を支持するものとなった(20)。この結果から、2-AGを介したアストロサイトの活性化が嗜好性の固定に関与していることが示されたがアストロサイトが直接、嗜好性に関与しているかは不明である。

そこで、アストロサイトと高脂肪食嗜好性の直接的な関与を検討するために、FCを用いた。FCはグリア選択的にTCA回路のアコニターゼを阻害し、代謝をとめることで一時的にグリア細胞の活動を止めることが知られている(21)。14日間HFDを摂食したマウスにFCを投与し、CPP testを行ったところ、1 nmol/siteのFCは嗜好性を抑制した。一方、3日間HFDを摂食したマウスに同様にFCを投与したところ、嗜好性には影響がなかった。したがって、嗜好性において、アストロサイトが直接、嗜好性を調節して

いることが明らかとなった。視床下部には、報酬系に重要な役割を果たしているオレキシン神経が多く分布している (22)。また、オレキシン神経は報酬系で最も重要な役割を果たしている腹側被蓋野や側坐核に投射されている (23)。オレキシン神経は視床下部から脳にも分布しており、さらにグルタミン酸作働性神経であることも報告されている。一方で、アストロサイトはシナプス間のグルタミン酸濃度を調節し神経活動を調節していることが知られている (9)。これらのことから、14日間HFDを摂食することで増加したアストロサイトがシナプス間のグルタミン酸濃度を調節することで報酬系が活性化され、腹側被蓋野や側坐核でのドーパミン神経が活性化され嗜好性が固定されている可能性がある。

【結論】

本研究から得られた結果から嗜好性形成には高脂肪食摂食に対する高いモチベーションから一過性に視床下部で2-AG濃度が増加する「嗜好性の獲得期」と、慢性的に2-AG濃度が高くなりCB₁受容体を介してアストロサイトが活性化する「嗜好性の固定期」があると定義づけた (Fig. 6)。これらのことから、肥満などの治療に対してカンナビノイドシステムもしくは、カンナビノイドシステムを介したアストロサイトの活性化を標的とした治療方法が新たな戦略となる可能性がある。近年では、中枢に薬物を送達させるために経鼻投与し直接薬物を脳内に送達させたり、プロドラック化や能動的排泄抑制を目的とした輸送系阻害剤の併用などの製剤工夫により薬物を目的部位に送達させる研究がおこなわれている。したがって、中枢のカンナビノイドシステムやアストロサイトをターゲットとした製剤開発は今後の生活習慣病に関連した疾患の治療において重要な課題となるかもしれない。また、今回の研究から慢性的にHFDを摂食することで脳の形態が変化し、嗜好性が依存のような状態になることを明らかにしたことから、幼少期からの食の教育、つまり食育が今後ますます重要なものとなってくると考えられる。

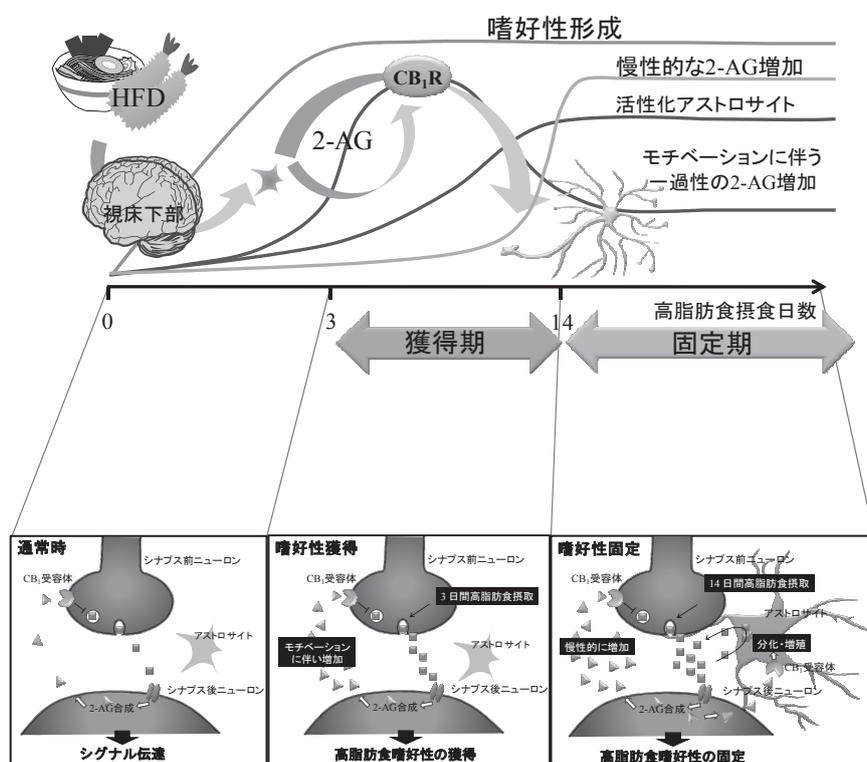


Fig. 6 嗜好性形成のプロセス (仮説)

【参考文献】

1. R. Mechoulam, Y. Gaoni, *J Am Chem Soc* **87**, 3273 (Jul 20, 1965).
2. L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **346**, 561 (Aug 9, 1990).
3. W. A. Devane, F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin, A. C. Howlett, *Mol Pharmacol* **34**, 605 (Nov, 1988).
4. T. Sugiura *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 89 (Oct 4, 1995).
5. R. Mechoulam *et al.*, *Biochem Pharmacol* **50**, 83 (Jun 29, 1995).
6. W. A. Devane *et al.*, *Science* **258**, 1946 (Dec 18, 1992).
7. V. Di Marzo, A. Ligresti, L. Cristino, *Int J Obes (Lond)* **33 Suppl 2**, S 18 (Jun, 2009).
8. C. Calatozzolo *et al.*, *Neurol Sci* **28**, 304 (Dec, 2007).
9. T. Fellin, *J Neurochem* **108**, 533 (Feb, 2009).
10. N. Stella, *Glia* **48**, 267 (Dec, 2004).
11. P. W. Kalivas, *Nat Rev Neurosci* **10**, 561 (Aug, 2009).
12. M. Narita *et al.*, *J Neurochem* **93**, 1383 (Jun, 2005).
13. T. Nakagawa *et al.*, *Eur J Pharmacol* **419**, 39 (May 4, 2001).
14. P. W. Kalivas, N. D. Volkow, *Am J Psychiatry* **162**, 1403 (Aug, 2005).
15. M. Perello *et al.*, *Biol Psychiatry* **67**, 880 (May 1, 2010).
16. T. Suzuki, Y. Shiozaki, Y. Masukawa, M. Misawa, H. Nagase, *Jpn J Pharmacol* **58**, 435 (Apr, 1992).
17. T. M. Tzschentke, *Prog Neurobiol* **56**, 613 (Dec, 1998).
18. T. Mizushige *et al.*, *Life Sci* **84**, 760 (May 22, 2009).
19. D. Cota, M. H. Tschop, T. L. Horvath, A. S. Levine, *Brain Res Rev* **51**, 85 (Jun, 2006).
20. T. Aguado *et al.*, *J Neurosci* **26**, 1551 (Feb 1, 2006).
21. B. Hassel, R. E. Paulsen, A. Johnsen, F. Fonnum, *Brain Res* **576**, 120 (Mar 27, 1992).
22. T. Nambu *et al.*, *Brain Res* **827**, 243 (May 8, 1999).
23. J. Fadel, A. Y. Deutch, *Neuroscience* **111**, 379 (2002).