

1-1 危険ドラッグによる有害作用の新規評価法開発に関する研究

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所・薬物依存研究部

船田正彦

総括研究報告

1. 研究目的

本研究は、危険ドラッグの有害作用予測に関する効率的な評価技術の開発を目的としている。行動薬理学、電気生理および分子生物学的手法を駆使し、危険ドラッグによる生理機能変化および精神依存形成に関する発現メカニズムを検討し、有害作用評価に利用可能なシグナルを同定する。現在までに流通が確認されている合成カンナビノイド、オピオイド系化合物およびカチノン系化合物にターゲットを絞って研究を進める。

合成カンナビノイド：合成カンナビノイドについては、慢性使用による薬物依存形成、細胞毒性、情動に対する影響を検討する。合成カンナビノイド処置により薬物依存、行動異常、条件性恐怖記憶について各種実験動物モデルを作製し、脳内神経回路、機能タンパク質、神経伝達物質の変化を解析する。

オピオイド系化合物：オピオイド系化合物については、精神依存形成における機能タンパク質の変動を検討する。その変化に基づいて、精神依存を抑制する薬物の検索を実施し、新たな治療法を開発する。

評価技術：危険ドラッグの作用発現に関与する薬物受容体や機能タンパク質を同定し、行動変化や生体シグナル変化との関連を解析し、危険ドラッグの有害作用予測のための生体マーカー検索を実施する。薬物受容体発現細胞を利用した有害作用の検出手法、薬物受容体の結晶構造を利用したコンピュータシミュレーションによる解析について検討する。また、幻覚作用については、行動解析と脳内神経機能変化を含めた総合的な評価方法の開発を試みる。

本研究を通じて、危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドやオピオイド系化合物などの中枢神経作用発現の分子基盤に基づいた乱用危険性等の有害作用を評価する総合システムの確立を目指す。

2. 研究組織

主任研究者：

船田正彦 国立精神・神経医療研究センター

分担研究者：

栗原正明 国際医療福祉大学・薬学部

橋本謙二 千葉大学社会精神保健教育研究センター

三島健一 福岡大学・薬学部・生体機能制御学教室

三輪秀樹 国立精神・神経医療研究センター

関口正幸 国立精神・神経医療研究センター

研究協力者

阿久根陽子、富山健一

国立精神・神経医療研究センター

湯山円晴 国際医療福祉大学・薬学部

藤田有子 千葉大学社会精神保健教育研究センター

入江圭一、佐野和憲、山下郁太

福岡大学・薬学部・生体機能制御学教室

國石 洋、竹内絵理

国立精神・神経医療研究センター

3. 研究成果

有害作用発現機序に関する研究

オピオイド系化合物：橋本らは、マウスにおけるモルヒネ精神依存に対する新規抗うつ薬 R-ケタミンの効果調べた。場所嗜好性試験を用いて、モルヒネの報酬効果に対する R-ケタミンの効果調べた結果、R-ケタミンはモルヒネの報酬効果の形成を抑制することが判った。一方、R-ケタミン自体は、場所嗜好性試験において、報酬効果を示さなかった。本結果より、R-ケタミンはモルヒネ等のオピオイド系薬物の依存の治療薬として有効であることが示唆された。

合成カンナビノイド：関口らは、恐怖神経回

路に対する合成カンナビノイドの作用検討を実現するための光遺伝学的手法の開発を行なった。マウス大脳皮質聴覚野ニューロンに光で活性化する陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2 (ChR2) を発現させ、この動物の扁桃体外側核錐体ニューロンから膜電流を記録しながら、波長 465nm の青色光を照射することにより、大脳皮質聴覚野から当該ニューロンへのシナプス伝達を誘発した。このシナプス伝達のうちグルタミン酸作動性シナプスの活動によるシナプス電流に対するカンナビノイド CB1 受容体アゴニストである合成カンナビノイド WIN55,212-2 (WIN) の作用を検討した。聴覚野から扁桃体外側核錐体ニューロンへのグルタミン酸作動性シナプス電流は WIN により弱く抑制された。この抑制効果は用量依存的であった。このシナプス応答は合成カンナビノイドの恐怖神経回路に対する作用を検討する指標となることが期待される。

大麻成分：三島らは、大麻主要成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(THC)の連続投与が CB 受容体を介した薬理作用に与える影響を検討した。マウスに THC を 7 日間(1 日 1 回)腹腔内投与し、直腸温度を測定した。THC の単回投与は、THC 投与 1 時間後のマウスの直腸温度を有意に降下させ、用量依存的であった。次に、THC 連続投与の影響を検討した結果、3 日目において、THC による投与 1 時間後の直腸温度降下作用は減弱していた。さらに、7 日目まで THC を連続投与し続けた結果、THC による直腸温度降下作用は減弱したままであった。これらの結果より、THC の連続投与によって、THC による体温降下作用に耐性が形成されることを明らかにした。

評価技術に関する研究

栗原らは、カンナビノイド CB1 受容体の X 線構造 (5U09, 5TGZ, 5XRA) を用いて、合成カンナビノイドと CB1 受容体モデルとのドッキングスタディを行い、その評価関数(S)と実際の生物活性の相関を調べた。ドッキングスタディは統合計算化学システム MOE を用いて行った。合成カンナビノイド 37 種を用いてドッキングスタディを行い、評価関数(S)を求めた。解析の結果、合成カンナビノイドの活性予測の検討を行う際には 5XRA が適していることが分かった。

船田らは、カンナビノイド CB1 および CB2 受容体発現細胞を作成し、54 種類の合成カンナビノイド benzoylindole 類の CB1 および CB2 受容体作用強度を解析した。その結果、benzoylindole 類は CB1 受容体を介して、有害

作用を示す可能性が示唆された。予備検討として、CB1 受容体解析データに基づいて QSAR 解析による活性予測を行なったところ、CB1 受容体作用強度において相関性の高い計算式を得ることができた。CB1 受容体発現細胞による解析データを利用することで、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害性の予測が可能であると考えられる。

三輪は、ドパミン作動性ニューロンの異常に着目した幻覚作用に関連する神経回路の解析を目指し、dopamine transporter (DAT)-Cre マウス(DAT 陽性細胞に組換え酵素 Cre が発現)と Rosa26-tdTomato レポーターマウスを交配させ、DAT 陽性細胞 (基本的にはドパミン陽性細胞) を蛍光タンパク質 tdTomato で可視化し、脳内でのドパミン細胞の局在およびその神経終末の可視化を試みた。その結果、これまでの組織学的知見と一致し、腹側被蓋野 VTA や黒質において、tdTomato 陽性細胞の細胞体が確認でき、さらに線条体、視床背内側核 MD、前頭前野、島皮質において tdTomato 陽性の神経終末様構造が確認できた。本モデル動物は、ドパミン作動性ニューロンの異常の基づく幻覚作用発現機序の解明に有用であると考えられる。

4. 今後の研究の進め方について

有害作用発現機序：オピオイド系化合物の依存形成と多価不飽和脂肪酸の代謝過程に存在する可溶性エポキシド加水分解酵素の関連性を解析し、治療薬としての可能性を調べる。大麻成分および合成カンナビノイドについては、慢性投与による生理機能や恐怖神経回路への影響について、行動解析並びに電気生理学的手法による解析を進め、CB 受容体を起点とした細胞内情報伝達系の役割について検討していく予定である。

評価技術：カンナビノイド受容体の X 線構造を用いて、薬物の結合様式の解析、ドッキングモデルの構築を行う。コンピュータシミュレーションと、CB1 および CB2 受容体発現細胞による解析データを蓄積し、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害作用の予測精度を高める。また、「幻覚」の神経基盤の候補として、ドパミン作動性神経ニューロンに着目し、これらの神経回路を光遺伝学や化学遺伝学により活性あるいは抑制することで、異常行動の発現について検討する。さらに、マウスなどの齧歯類における「幻覚」作用を評価する行動測定系として、「ラバーテイル試験」の確立および改良を進める予定である。細胞による有害作用の評価

に加え、動物の生体シグナル(行動変化や電気生理学的神経活動変化)を利用した危険ドラッグによる情動変化などの中樞神経作用の行動薬理学的な評価システムを構築する予定である。

5. 倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

各研究テーマについては、「実験動物等の実施に関する基本指針」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および所属施設の小型動物実験倫理指針、組み換え DNA 実験内部規則等に準拠し、各施設の倫理委員会等の承認に基づいて実施されている。

合成カンナビノイドの有害作用および有用性評価

分担研究者 ○船田正彦¹⁾、
研究協力者 阿久根陽子¹⁾、富山健一¹⁾
高橋秀依²⁾

- 1) 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 薬物依存研究部
- 2) 東京理科大学 薬学部

【はじめに】

危険ドラッグの乱用が蔓延し、大きな社会問題となっている。最も多くの流通が確認されている危険ドラッグは、大麻の精神活性物質である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) と類似の作用を示す合成カンナビノイドである。合成カンナビノイドについては、JWH-018 をはじめとする naphthoylindole 類が多く検出されたため、3-(1-naphthoyl)indole 構造に着目した包括指定が導入され、850 種類を超える化合物が規制に至った。一方、naphthoylindole 類以外では、RCS-4 をはじめとする benzoylindole 類が流通しており、各国でその規制が進んでいる。実際、RCS-4 については、2010 年以降、欧米で流通が確認され、わが国でも流通が拡大したため、2011 年（平成 23 年 9 月）より指定薬物として規制に至った。薬物の合成過程を考えた場合、benzoylindole 類については、容易にシリーズ合成が可能であるため、今後類縁化合物の登場が懸念される。

本研究では、合成カンナビノイドの作用評価及び薬物検出を目的とするカンナビノイド受容体強制発現細胞の樹立を試みた。本細胞を利用して、合成カンナビノイドの benzoylindole 類について、カンナビノイド受容体への作用強度、細胞毒性強度を解析し、有害作用の予測システムの構築を試みた。

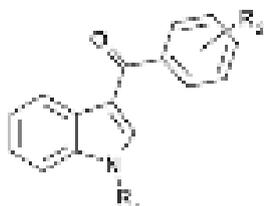


図 1 Benzoylindoles 構造式

【方法】

カンナビノイドCB受容体作用の解析

CHO細胞にヒトCB1受容体もしくはヒトCB2受容体をトランスフェクションし、受容体発現

安定細胞株として CHO-CB1 細胞および CHO-CB2 細胞を樹立した。この細胞を使用して、細胞内カルシウム濃度を測定した。96 穴ブラックプレート (BD Falcon) に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、合成カンナビノイド添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。合成カンナビノイドの AB-CHMINACA、JWH-018 および JWH-133 を標準薬として、54 種類の benzoylindole 類 (R_1 および R_2 置換体シリーズ) について解析を実施した。それぞれの薬物 ($30 \mu\text{M}$) 添加による蛍光強度 (RFU) を検討した。

合成カンナビノイドの細胞毒性

薬物添加後の死細胞由来プロテアーゼ遊離を細胞毒性のマーカーとして解析した。細胞毒性の評価は CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit (Promega) を使用した。

【結果】

CHO-CB1 細胞を利用して、CB1 受容体に対する作用を検討した。 R_1 にアルキル鎖を有する構造において、炭素鎖の長さに依存して、CB1 受容体作用強度並びに細胞毒性作用が増加した。さらに、アルキル基の末端に F 置換を導入するとその強度はさらに増強された。一方、 R_2 のハロゲン置換 (I, Br, Cl) では影響がほとんど認められないものの、 $-\text{OCH}_3$ 基 (特にメタ位かパラ位) の導入により、作用強度は増加した。また、CHO-CB2 細胞を利用して、CB2 受容体に対する作用を検討した結果、benzoylindole 類については、CB2 受容体への選択性が高い JWH-133 より強力な作用を有する化合物は存在しなかった。

【考察】

本研究では、CB1 および CB2 受容体発現細胞を作成し、54 種類の合成カンナビノイド benzoylindole 類の CB1 および CB2 受容体作用強度を解析した。その結果、benzoylindole 類は、CB1 受容体を介して、有害作用を示す可能性が示唆された。予備検討として、CB1 受容体解析データに基づいて QSAR 解析による活性予測を行なったところ、CB1 受容体作用強度において相関性の高い計算式を得ることができた。CB1 受容体発現細胞による解析データを利用することで、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害性の予測が可能であると考えられる。

受容体とのドッキングスタディによる危険ドラッグのインシリコ活性予測

分担研究者 ○栗原正明
研究協力者 湯山円晴
国際医療福祉大学 薬学部

【はじめに】

これまで危険ドラッグのインシリコ活性予測には定量的構造活性相関 (QSAR) が使われてきた。我々も QSAR 法により危険ドラッグの包括規制を行ってきた。

本研究では、カンナビノイド受容体を初めとする危険ドラッグのターゲット受容体とリガンドのドッキングスタディにより危険ドラッグ等の違法薬物のインシリコ活性予測法の開発を行う。

近年、カンナビノイド受容体 (CB1) の X 線構造解析が行われた。これを用いて、合成カンナビノイドと CB1 とのドッキングスタディを行い、その評価関数と実際の生物活性の相関を調べる。また、フェンタニル類縁体とオピオイド μ 受容体のドッキングスタディによる活性予測を行う。さらに QSAR による活性予測との比較を行うことも考えている。

【方 法】

カンナビノイド受容体の構造

CB1 受容体は結晶構造が解析されている 5U09¹⁾、5TGZ²⁾、5XRA³⁾ のタンパク質構造をプロテインデータベース (以下: PDB) からダウンロードし使用した。

リガンドの選択

使用する合成カンナビノイドのデータは構造に類似性がある J. W. Huffman 教授のチームが合成した JWH から始まる合成カンナビノイド 154 種⁴⁾ を候補とし、154 種のうち、Ki 値が > 10000nM となっている正確な値が不明なものを除いた。また、より顕著な傾向を調べるため、 $\Delta 9$ -THC を比較対象とし各受容体への Ki 値が $\Delta 9$ -THC の Ki 値の 10 倍超または 1/10 未満のものを取り上げた。その結果 CB1 受容体では 37 種、CB2 受容体では 41 種がドッキングの対象となった。

($\Delta 9$ -THC CB1 : Ki = 42 nM CB2 : Ki = 36 nM)

ドッキングスタディ

ドッキングスタディは統合計算化学システム MOE を用いて行った。立体構造データの前処理として Structure Preparation で構造安定化、Energy Minimization で水素エネルギー最小化を行った。Site finder で構造からリガンドが結合しうる場所を、Dummy-site として登録した。

【結 果】

5TGZ を用いた場合、S 値 (横軸) と予測 Ki 値 (縦軸) との間に相関性は見られなかった。5XRA、5U09 では $\Delta 9$ -THC を中心にグラフを 4 分割した時、右上部と左下部に分かれる傾向があった。(図 1)

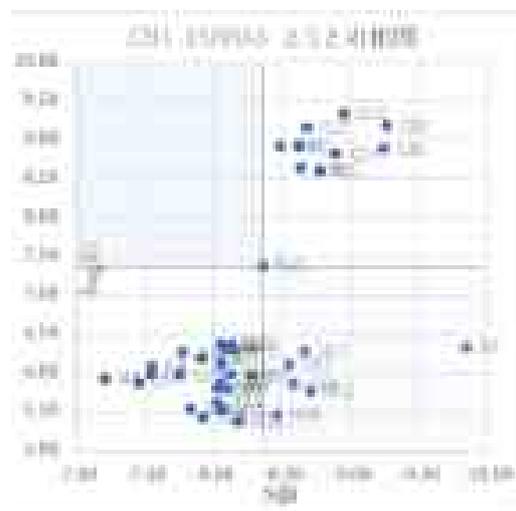


図 1

【考 察】

今回使用した設定ではドッキングを用いて MOE の S 値から Ki 値の定量的な予測を行うことは難しいことが分かった。今後、設定等を検討していくことが必要である。しかし今後ドッキングを用いて活性予測の検討を行う際には 5XRA が適していることが分かった。

1. *Nature*, 2016, 540, 602-606.
2. *Cell*, 2016, 167, 750-762.
3. *Nature*, 2017, 547, 468-471
4. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2012, 20, 2067-2081

オピオイド系薬物による精神障害の治療法の開発

分担研究者 ○橋本謙二
研究協力者 藤田有子

国立大学法人 千葉大学
社会精神保健教育研究センター

【はじめに】

米国では鎮痛薬で使用されているオピオイド系薬剤の大量服薬で多くの方が死亡しており、大きな社会問題になっている(1,2)。しかしながら、オピオイド系薬剤の依存に対する有効な治療薬は現在のところ無い。

最近我々は、麻酔薬ケタミンの光学異性体であるR-ケタミンが、新規抗うつ薬になる事を報告した(3,4)。本研究は、オピオイド系薬剤の依存などの有害作用に対する治療法を開発することを目的で、モルヒネの報酬効果に対するR-ケタミンの効果を検討した。

【方法】

実験には9~12週齢のddY雄性マウス(日本エスエルシー株式会社)を使用した。場所嗜好性試験(CPP)の測定は、Suzukiらの方法(5)に準じて行った。生理食塩水(10 ml/kg)あるいはR-ケタミン(10 and 20 mg/kg)を投与し30分後にモルヒネ塩酸塩(5 mg/kg)あるいは生理食塩水(10 ml/kg)を投与し、その後白または黒のボックスに60分間閉じ込め、条件付けを行った。薬物処置側ボックスの滞在時間から溶媒処置側ボックスの滞在時間を差し引いた値をCPPスコアとした。

【結果】

場所嗜好性試験(CPP)より、モルヒネ投与による場所嗜好性の増加が観察され、R-ケタミンの前投与は、モルヒネ投与による場所嗜好性の増加を有意に抑制した。一方、R-ケタミン単独投与は、生理食塩水投与群と同等で場所嗜好性を増加しなかった。

【考察】

本研究において、R-ケタミンは、モルヒネの報酬効果を予防することが判り、オピオイド系の薬物依存症の治療薬として可能性がある。また既報(6,7)と同様、R-ケタミンは、報酬効果

を示さないことから、R-ケタミンの薬物依存の可能性は低いと考えられる。

文献

1. Volkow ND, Collins FS. The role of science in the opioid crisis. *N. Eng. J. Med.* 2017; 377(18): 1798.
2. Volkow ND, Blanco C. The changing opioid crisis: development, challenges and opportunities. *Nol. Psychiatry*2020. Feb. 4. doi: 10.1038/s41380-020-0661-4.
3. Hashimoto K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2019; 73(10): 613-627.
4. Hashimoto K. Molecular mechanisms of the rapid-acting and long-lasting antidepressant actions of (R)-ketamine. *Biochem. Pharmacol.* 2020; 177: 113935.
5. Suzuki T, et al. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ketamine on morphine-induced place preference in mice. *Life Sci.* 2000;67(4): 383-389.
6. Yang C, et al. R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Transl. Psychiatry* 2015;5:e632.
7. Chang L, et al. Comparison of antidepressant and side effects in mice after intranasal administration of (R,S)-ketamine, (R)-ketamine, and (S)-ketamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2019;181:53-59.

大麻受容体を介した薬理作用の解析

分担研究者 ○三島健一
研究協力者 入江圭一、佐野和憲、
山下郁太
福岡大学 薬学部
生体機能制御学教室

【はじめに】

大麻主要成分 (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC) は、生体内の大麻受容体 (カンナビノイド受容体, CB 受容体) を介し、様々な薬理作用を示す。また、CB 受容体には生体内リガンドが存在しており、1992 年に Devane らによりブタの脳から N-Arachidonoyl ethanolamide (Anandamide, AEA) が同定され (Devane et al., *Science* 258:1946-1949, 1992)、1995 年に Sugiura らによりラットの脳、Mechoulam らによりイヌの小腸から 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) が同定された (Sugiura et al., *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97, 1995)。分担研究者らは大麻関連化合物が示す薬理作用に焦点をあてて研究してきた。ラットやマウスの CB 受容体を刺激することで、摂食亢進、直腸温度低下、不安 (高架式十字迷路)、抑うつ状態 (強制水泳)、被刺激性 (驚愕反応)、感覚運動情報制御機構などを観察してきた。また、CB 受容体の内因性リガンドの 1 つである 2-AG に着目し、マウスが脂質を多く含む食 (高脂肪食) を摂食し続けた時に、脳内の 2-AG が増加することを明らかにした。加えて、個別に飼育 (単独隔離飼育) した後、THC を投与すると単独隔離飼育した動物について、THC は CB 受容体を介した攻撃行動を誘発した。そのため、CB 受容体を介して発現する薬理作用は、生体がおかれた状況によって影響を受けやすいことが予想された。

大麻は、同一人が同一量を服用しても作用が大きく異なることが知られている。その作用が一定でない原因は、服用者の期待感、性格、生活歴、摂取時の環境や気分、用量、代謝酵素の量などが関与していると考えられているが、科学的根拠は少ない。本課題は、分担研究者らが現在まで CB 受容体と生体内リガンドについて明らかにしている知見に基づき、摂食や飼育環境の変化、THC の連続投与が大麻関連化合物の薬理作用に与える影響を検証した後、その制御機構を明らかにする予定である。本年度はマウスを用いて、THC の連続投与が CB 受容体を介した薬理作用に与える影響を検討した。

【方法】

実験動物

実験動物には 30~45 g の ICR 系雄性マウス (九動; 佐賀) を用いた。マウスは、プラスチックケージの中に、室温 23 ± 2 °C、湿度 60 ± 2 %, および 12 時間の明暗サイクル (7:00AM 点灯) の動物室で飼育した。なお、餌には、CE-2 (日本クレア 株式会社 東京) を用い、水と共に自由に摂取させた。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。

マウスの体温の測定

マウスの体温は、動物体温記録計 (マウス用体温記録計: KN-91-AD1687-M、マウス用プローブ: AX-KO4746-100、A&D, Inc.) を用いて測定した。室温条件下で、マウス専用のプローブを肛門から約 1 cm 挿入し、直腸温度を 30 秒間記録した。また、マウスにプローブを挿入する際、潤滑油としてグリセリンを用いた。THC は、マウスに 7 日間毎日、腹腔内投与した。THC を投与してから 2 時間目まで、マウスの直腸温度を経時的に測定し、7 日目まで実施した。

【結果】

THC の単回投与は、投与 1 時間後をピークにマウスの直腸温度を約 2°C ほど有意に低下させ、2 時間後には正常体温にまで回復した。その THC による直腸温度降下作用は、用量依存的であった。一方、THC の連続投与は、THC 投与 3 日目において、直腸温度降下作用を減弱させた。その後、7 日目まで THC を連続投与した結果、直腸温度降下作用は減弱したままであった。

【考察】

本課題により、THC を連続投与することで、THC 投与開始 3 日目以降、体温降下作用に耐性が形成されることを明らかにした。今後、薬理的、分子生物学的手法を用いて、THC の体温効果作用が減弱する機構を明らかにする予定である。本課題の成果によって、大麻を使用した経験、摂食、環境によって CB 受容体を介した薬理作用が変化する事実は、大麻が示す作用の不安定さを表すエビデンスとなりうるため、有害作用の評価基準の策定に向けて有用な情報であると考えられる。

合成カンナビノイドの有害作用および有用性評価

分担研究者 ○三輪秀樹

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 精神薬理研究部

【はじめに】中枢神経系において、合成カンナビノイドの作用点は主に CB1 受容体を介して行われ、その薬物作用として、幻覚などが生じていると考えられている。しかしながら、「幻覚」の神経基盤は明らかにされていない。視床は感覚ゲーティング機能を担っており、幻覚・妄想などの陽性症状を主訴とする統合失調症患者において、視床の機能異常が報告されている (Koshiyama, *Sci Rep*, 2018)。したがって、合成カンナビノイドによる幻覚作用も視床神経回路を介して生じている可能性がある。さらに、アンフェタミンなどの中枢神経系興奮薬の作用機序として、ドパミン神経系が知られている。ドパミン作動性神経系は広範囲投射系として、視床や大脳皮質など広範囲の脳部位に投射し、神経機能を修飾していると考えられている。以上を背景とし、視床-皮質神経回路に着目しながら、「幻覚」の神経基盤を目指すことが本研究の目標である。具体的には、脳波による周波数解析（特に統合失調症でも着目されているデルタ波とスピンドル波）や多点電極を用いた個々の神経活動動態の解析およびマウスなどの実験動物を用いた「幻覚」を評価する行動測定系の確立を目指し、合成カンナビノイドの危険性の評価に資する研究を行う。

【方法】(1)「幻覚」作用の神経基盤を明らかにするために、その候補としてドパミン作動神経系に着目した。古くから免疫組織学的にドパミン神経回路を明らかにされてはいるが、その神経終末を網羅的かつ正確に解析するのは困難であった。そこで、米国 Jackson laboratory 社 から DAT-IRES-Cre(DAT; dopamine transporter ; DAT 陽性細胞に組換え酵素 Cre が発現)マウスおよび Ai9 マウス (Rosa-CAG-LSL-tdTomato マウス) を購入・交配し、DAT 陽性細胞（基本的にはドパミン陽性細胞）を蛍光タンパク質 tdTomato で可視化し、脳内でのドパミン細胞の局在およびその神経終末の可視化を試みた。その結果、これまでの組織学的知見と一致し、腹側被蓋野 VTA や黒質において、tdTomato 陽性細胞の細胞体が確認でき、さらに線条体、視床背内側核 MD、前頭前野、島皮質において tdTomato 陽性の神

経終末様構造が確認できた（当初の計画では、視床網様核も tdTomato 陽性神経終末が観察されることを期待していたが、残念ながら明確なシグナルは検出できなかった）。ドパミン作動性ニューロンの異常は統合失調症に関連することが古くから指摘され、幻覚作用を持つアンフェタミンなどはドパミンの放出および再取り込み機構に作用すると考えられているため、これらを元に幻覚作用に関連すると考えられる神経回路の候補として、今後の解析対象と考えている。(2)「幻覚」作用をマウスなどの実験動物で評価する新たな行動測定系として、「ラバーテイル試験」(Wada et al., 2016) の確立・改良を試みた。(3)「幻覚」作用の神経基盤の実体を将来的に明らかにすることを目標としており、そのためには、in vivo において個々の神経活動を記録・解析することが必要であると考えており、その測定系の習得に取り組んだ。

【結果】(1)tdTomato 陽性シグナルが観察される細胞体が主に観察されたのは、側坐核や腹側被蓋核であり、今までのドパミン神経細胞の局在と一致しており、この評価システムが機能していることが示唆された。さらに、tdTomato 陽性シグナルが観察された神経終末は前頭前野や視床の一部や島皮質であった。分担研究者の予想に反して、視床網様核（感覚運動ゲーティングに関与すると考えられている）には tdTomato 陽性シグナルがあまり観察されなかった。(2)ラバーテイル幻覚試験に関する既報 (Wada et al., 2016) を参考に装置を作成した。この先行研究の行動実験装置には改善余地が多く見受けられ、その点に関して、マイクロコンピュータ Arduino を用いて、自動化によるタスク制御を試み、良好な結果を得ている。(3)多点電極記録に関して、米国 MIT の Michael Halassa 博士との共同研究により、解析方法の導入を行った。

【考察】本研究は、実験動物を用いた新規危険ドラッグの「幻覚」作用評価系を確立することを目指した研究計画である。研究計画初年度として、次年度以降の研究の土台となる研究ツールを確立でき、順調に研究が遂行できていると考えている。「幻覚」作用に関するマウスなどの実験動物を用いた評価系の確立は、「幻覚」は統合失調症などを含む複数の精神疾患・神経疾患で見られる症状であり、この症状を寛解・治療する治療薬は開発されていないため、本研究成果は、薬物依存症の治療薬だけでなく、統合失調症などの治療薬の開発にも貢献できることが期待できる。

合成カンナビノイドのシナプス伝達と行動に対する作用

分担研究者 ○関口正幸

研究協力者 國石 洋、竹内絵理
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第4部

【はじめに】

危険ドラッグの主要成分として合成カンナビノイドが同定されている。一方、内因性カンナビノイドは人にも存在し、脳内では神経終末からの神経伝達物質放出を制御する生理的役割を担っていることが知られている。合成カンナビノイドは本来内因性カンナビノイドが用いている受容体やキャリアなどを利用してその生物活性を発揮している可能性がある。

本研究ではまず、合成カンナビノイドが脳における主要な興奮性シナプスであるグルタミン酸作動性シナプス伝達に作用するか否かを電気生理学的に明らかにすることを目的とする。

この目的のために情動中枢扁桃体の錐体ニューロンにおいてグルタミン酸作動性シナプス伝達を記録し、このシナプス伝達に対するカンナビノイド CB1 受容体のアゴニストである合成カンナビノイド（研究用試薬）の作用を検討する。

一方、行動の変化はその行動に重要な神経回路内のシナプス伝達の変容を伴う場合があることが知られている。上述の扁桃体シナプスの場合、恐怖条件付け行動パラダイムにより形成される「恐怖記憶」への関与が示唆されていることを考慮し、合成カンナビノイドの恐怖記憶に関する作用を検討する。

【方法】

恐怖条件付け行動試験の脳内神経回路はここ半世紀ほどの研究によりほぼ明らかになりつつある。そこで、シナプス伝達に対する合成カンナビノイドの作用を検討する場合、恐怖記憶と関係のあるシナプスを選択的に調べることで行動との相関をより考えやすくなる。このためには入力（プレ）—出力（ポスト）関係が明白なシナプス伝達を単離して記録する必要があり、このためには最近開発され頻用されている「光遺伝学」の使用が有効である。

我々は、音依存性恐怖記憶の条件刺激を仲介するシナプスの一つと考えられている大脳皮質聴覚野から扁桃体外側核へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を光遺伝学的に抽出し、こ

のシナプス伝達に対する合成カンナビノイドの作用を検討した。

具体的には、マウス大脳皮質聴覚野ニューロンに光により活性化する陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2（ChR2）を発現させ（AAV ベクターの脳局所注入法）、このマウスの扁桃体外側核錐体ニューロンから膜電流を記録しながら、波長 465nm の青色光を照射することにより、大脳皮質聴覚野から当該ニューロンへのシナプス伝達を誘発した。このシナプス伝達のうちグルタミン酸作動性シナプスの活動によるシナプス電流に対するカンナビノイド CB1 受容体アゴニストである合成カンナビノイド WIN55,212-2（以下 WIN）の作用を検討した。

【結果】

光遺伝学的に単離された聴覚野から扁桃体外側核錐体ニューロンへのグルタミン酸作動性シナプス電流は、テトロドトキシンにより完全に抑制され、この抑制中に 4-アミノピリジンを投与することにより回復するというこれまでに他のシナプスで報告されている投射部位でのプレシナプス ChR2 活性化によるシナプス伝達の性質を有していた。

このシナプス伝達は WIN により弱くではあるが抑制され、この抑制効果は容量依存的であった（0.3 μM で平均約 2% の抑制、3 μM で約 10% の抑制、10 μM で約 15% の抑制）。

音依存性恐怖条件付け行動試験における WIN の作用は現在検討中である。

【考察】

CB1 受容体はグルタミン酸シナプスのプレ側に存在し、伝達物質グルタミン酸の放出をマイナスに制御することが知られている。扁桃体にも CB1 受容体は高発現しており、WIN は CB1 受容体のアゴニストであるので、今回得られた WIN によるグルタミン酸作動性シナプス電流の抑制はこのマイナス制御を反映していると思われた。

ただし、WIN は合成カンナビノイドではあるものの研究用試薬であり、これまでこれを主成分とする危険ドラッグは見出されていないと思われる。したがって、今後は既に危険ドラッグの成分であることが同定されている合成カンナビノイドを用いて同様の電気生理学的、行動学的検討を行うことが必要と思われる。

Title: Study on development of a new method for detecting adverse reactions to new psychoactive substances

Masahiko Funada, Ph.D.

Department of Drug Dependence Research, National Institute of Mental Health
National Center of Neurology and Psychiatry

Opioids: Hashimoto et al. reported that pretreatment with the antidepressant ketamine abolished morphine-induced rewarding effects in mice, suggesting that ketamine may be effective as a therapeutic agent for morphine dependence.

Synthetic cannabinoids: Sekiguchi et al. labeled one of the inputs that transfers the “condition stimulation” of condition-related fear memory by locally administering an adeno-associated virus vector incorporating Channelrhodopsin-2 to the auditory region of the mouse. Next, they isolated the synapse reply from the auditory region to the lateral amygdaloid nucleus by preparing brain slices including the amygdaloid body and irradiating 465-nm light onto them during patch-clamp recording from neurons in the lateral amygdaloid nucleus. They found that this synapse reply could be used as an index for examining the action of synthetic cannabinoids on the neural fear circuit.

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC): Mishima et al. investigated the effect of continuous administration of a major component of cannabis THC on cannabinoid (CB) receptor-mediated pharmacological action. They found that the hypothermic effect of THC was attenuated by chronic THC administration. From these results, it was clarified that the continuous administration of THC leads to the development of tolerance to the hypothermic effect of THC.

Evaluation techniques: Kurihara et al. conducted a docking study of synthetic cannabinoids using the X-ray structure (5U09, 5TGZ, 5XRA) of cannabinoid receptor type 1 (CB₁), and examined the correlation of the evaluation function with the actual biological activity. The docking study, which used 37 kinds of synthetic cannabinoids, obtained the evaluation function, and reported that 5XRA was suitable for the study of activity prediction. Funada et al. prepared cells expressing CB₁ and CB₂ and analyzed their potency for 54 synthetic cannabinoid benzoylindoles by quantitative structure–activity relationship analysis. They found that benzoylindoles may exert an adverse effect via CB₁. It is considered possible to predict toxicity based on the chemical structure of synthetic cannabinoids by using the analysis data obtained from cells expressing CB₁. Miwa created an animal model for analyzing neural circuits related to hallucination with a focus on the abnormality of dopaminergic neurons. In the animal model, dopamine transporter-positive cells were visualized using the fluorescent protein tdTomato, which enabled localization of dopamine cells in the brain and visualization of their nerve endings. This animal model is considered to be useful for elucidating the mechanism of hallucinogenic action based on the abnormality of dopaminergic neurons.

How to proceed with our study in the future

Mechanism of adverse effects: We plan to investigate the relationship between the formation of opioid dependence and the presence of soluble epoxide hydrolase in the metabolic processes of polyunsaturated fatty acids, as well as its possibility as a therapeutic drug. Furthermore, the effects of chronic administration of synthetic cannabinoids or THC on physiological functions and neural fear circuits, and the role of the intracellular signal transduction system originating from CB receptors will be analyzed using behavioral and electrophysiological methods.

Evaluation techniques and technology: Using the X-ray structure of CB₁, we will analyze the binding mode of drugs and construct a docking model. We also aim to predict adverse effects based on the chemical structure of synthetic cannabinoids by accumulating computer simulations and data from cells expressing CB₁ and CB₂. In addition, we plan to construct a system that uses biological signals (behavioral and electrophysiological nerve activity changes) for evaluating emotional changes caused by new psychoactive substances.