

課題番号 : 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  
船田正彦

### 総括研究報告

#### 1. 研究目的

危険ドラッグ乱用の蔓延により、救急搬送や交通事故が発生し、社会不安が増大したことは記憶に新しい。こうした危険ドラッグの有害作用については、事件や事故との関連性で有害作用が推定されているが、その発現機序に関する詳細な検討はなされていない。また、流通製品中の危険ドラッグの検出技術については、簡易検出手法が存在せず、新規技術開発が喫緊の課題となっている。

本研究では、「危険ドラッグによる有害作用の発現機序を検討するとともに、有害作用の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。

**有害作用発現機序** : 危険ドラッグとしては、合成カンナビノイド、カチノン系化合物、オピオイド系薬物を中心として、動物の行動解析、生体シグナルおよび培養細胞を利用した精神依存形成、細胞毒性等の有害作用の発現機序に関する検討を実施する。

**有害作用の評価法** : コンピュータ解析を含めたハイスループット包括解析を行う。一方、危険ドラッグ慢性使用による精神病様症状については、動物実験による幻覚作用の適切な評価系が存在しないため、解析が進んでいない。そこで、行動実験と電気生理学的手法により、幻覚作用評価手法を構築する。異常行動と脳波の関連性を検討し、幻覚様行動特異的な脳活動の検出を試みる。新規評価方法により、脳内機序を解析することで、薬物慢性使用による精神病に対する治療薬開発のシードが得られると考えられる。

本研究を通じて、危険ドラッグの作用発現の分子基盤に基づいた乱用危険性等の有害性を評価するシステム確立を目指す。また、有害作用発現の分子メカニズムに基づいた薬物関連精神疾患に対する治療薬候補の探索を試みる。

#### 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  
精神保健研究所 薬物依存研究部)

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  
センター病態解析研究部門)  
三島健一 (福岡大学 薬学部)  
関口正幸 (国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第四部)  
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)

#### 3. 研究成果

##### 有害作用発現機序

船田らは、ヒト骨格筋細胞モデルを使用して合成カンナビノイドの筋毒性評価法について検討した。骨格筋細胞モデルとして、カンナビノイド CB1 と CB2 受容体を発現するヒト胎児横紋筋肉腫 (RD)細胞を用いて、合成カンナビノイド CP-55,940 の細胞毒性の誘導について検討した。その結果、CP-55,940 は CB1 受容体を介して細胞毒性を誘導し、この機序には L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからのカルシウム流入およびミトコンドリアの機能障害が重要であることが示唆された。本研究結果から、合成カンナビノイドは、骨格筋細胞において CB1 受容体を介して細胞毒性を誘導する可能性が明らかとなった。本評価方法は、合成カンナビノイドの筋毒性評価法として妥当であると考えられる。合成カンナビノイドを含む製品の乱用は、精神活動のみならず、身体的な障害を誘発する恐れがある。一方で、本研究成果は、カンナビノイド受容体アンタゴニストやカルシウムチャネルブロッカーが合成カンナビノイドの急性毒性作用から骨格筋細胞の保護または治療に繋がる可能性を示唆してい

る。本研究をさらに発展させていくことで、将来的に合成カンナビノイド誘発性中毒症状を発症する患者に対してCB1受容体アンタゴニストやカルシウムチャネルブロッカーが有効な治療薬になる可能性がある。

三島らは、マウスに大麻成分 $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC)を連続投与して、体温降下作用、カタレプシー様不動状態の発現に耐性が生じることを見出した。CB1受容体拮抗薬SR141716はこれらの効果を有意に抑制した。一方、CB2受容体拮抗薬のAM630は影響を与えなかった。したがって、THCの体温降下作用、カタレプシー様不動状態の耐性発現にCB1受容体が関与すると考えられる。また、THCを連続投与した後、THCの薬理作用に耐性が形成されたマウスの脳をサンプルとして遺伝子発現量を解析した結果、多くの遺伝子発現量が増減していることが明らかとなった。今後は、本THC慢性投与モデルマウスを利用して、カンナビノイド受容体を介した行動や遺伝子の変化を解析する予定である。

三輪は、危険ドラッグの幻覚発現の責任神経回路を同定するため、ドパミン神経に着目し遺伝子改変マウスの作出を実施した。DAT-tdTomatoマウスを作出し、逆行性神経トレーサーであるコレラ毒素Bサブユニット(CTB)[CTB-488およびCTB633]を前頭前野(Infralimbic cortex)および側坐核にそれぞれインジェクションし、腹側被蓋野におけるそれぞれのドパミン神経の起始部の分布を解析した。DAT-tdTomatoマウスに対する逆行性神経トレーサー解析では、前頭前野からの逆行性シグナルと側坐核からの逆行性シグナルは腹側被蓋野において重複する個体は得られなかった。DAT-Creマウスの腹側被蓋野を化学遺伝学的手法により神経活動を人工操作した実験では、AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherryをインジェクションしたマウスはオープンフィールド試験に置いてコントロールマウスと比較して過活動を示した。これはドパミン細胞の活動上昇がオープンフィールド試験での過活動と関連するという知見と一致した。危険ドラッグの有害作用発現におけるドパミン神経系の役割を解析するための重要なモデル動物を得ることができた。

### 有害作用の評価法

橋本らは、マウス場所嗜好試験を用いて、モルヒネの精神依存形成に対する各種薬物の効果を検討した。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を見出した。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可能性が示唆された。同様に、新規鎮痛薬の可溶性エポキンド加水分解酵素阻害薬TPPUについても検討を実施した。場所嗜好性試験において、TPPUは精神依存性を示さないことを明らかにした。また、モルヒネとTPPUを併用したところ、モルヒネの報酬効果には影響を及ぼさなかった。したがって、モルヒネの精神依存形成に可溶性エポキンド加水分解酵素は関与していない可能性を見出した。本結果より、可溶性エポキンド加水分解酵素阻害薬は、オピオイド系鎮痛薬に替わる新規鎮痛薬として期待される。

関口らは、恐怖条件づけ試験により、合成カンナビノイドAB-FUBINACAの文脈性恐怖記憶獲得への影響について検討した。その結果、AB-FUBINACA投与により、すくみ反応時間の減少が確認され、AB-FUBINACAの処置により恐怖記憶が減弱することが示唆された。この抑制効果は、CB1受容体拮抗薬AM251をAB-FUBINACA投与前に処置すると遮断された。合成カンナビノイドAB-FUBINACAはCB1受容体を介して条件性恐怖記憶を抑制的に制御していることが明らかになった。本研究結果は、カンナビノイドCB1受容体の活動増強により、恐怖記憶の獲得が減弱するという先行研究と良く一致するものであった。今後、AB-FUBINACAの扁桃体シナプス伝達への作用について電気生理学的に解析していく予定である。

栗原らは、コンピュータ解析を利用して、合成カンナビノイドの作用点であるCB1受容体とリガンドのドッキングスタディによる活性予測の妥当性を検討した。公開されているCB1受容体のX線構造解析データを利用して、合成カンナビノイドのCB1受容体に対するドッキング条件について検討した。今回使用したリガンドに関しては、ドッキング解析の結果得られた計算活性値を、リガンドの重原子数で除した補正活性値を用いることで実測の受容体親和性(K<sub>i</sub>)値との相関性が向上することが分かった。評価化合物の物性に着目して、水素結合エネルギー、リガンドの結合部位の固定などのドッキングの条件設定を変えることで、良好な活性予測が可能になることを見出した。合成カンナビノイドによる筋毒性の発現強度との相関性も良好であり、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。

#### 4. 研究成果刊行一覧

Tomiyama KI, Funada M. Synthetic cannabinoid CP-55,940 induces apoptosis in a human skeletal muscle model via regulation of CB<sub>1</sub> receptors and L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Arch Toxicol*. 2021 Feb;95(2):617-630. doi: 10.1007/s00204-020-02944-7.

Yuyama M, Ito T, Arai Y, Kadowaki Y, Iiyama N, Keino A, Hiraoka Y, Kanaya T, Momose Y, Kurihara M. Risk Prediction Method for Anticholinergic Action Using Auto-quantitative Structure-Activity Relationship and Docking Study with Molecular Operating Environment. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2020;68(8):773-778. doi: 10.1248/cpb.c20-00249.

Shoda T, Ohoka N, Tsuji G, Fujisato T, Inoue H, Demizu Y, Naito M, Kurihara M. Targeted Protein Degradation by Chimeric Compounds using Hydrophobic E3 Ligands and Adamantane Moiety. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Feb 25;13(3):34. doi: 10.3390/ph13030034.

Witkin JM, Kranzler J, Kaniecki K, Popik P, Smith JL, Hashimoto K, Sporn J. R(-)-ketamine modifies behavioral effects of morphine predicting efficacy as a novel therapy for opioid use disorder<sup>1</sup>. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020 Jul;194:172927. doi: 10.1016/j.pbb.2020.172927.

Wan X, Fujita Y, Chang L, Wei Y, Ma L, Wuyun G, Pu Y, Hammock BD, Hashimoto K. Lack of rewarding effects of a soluble epoxide hydrolase inhibitor TPPU in mice: Comparison with morphine. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2020 Dec;40(4):412-416. doi: 10.1002/npr2.12136.

三島健一,入江圭一.大麻成分の中樞効果:有用性と危険性. *薬学雑誌* 2020; 140(2): 193- 204.

Takeuchi E, Yamada D, Suzuki S, Saitoh A, Itoh M, Hayashi T, Yamada M, Wada K, Sekiguchi M. Participation of the nucleus accumbens dopaminergic system in the antidepressant-like actions of a diet rich in

omega-3 polyunsaturated fatty acids. *PLoS One*. 2020 Mar 25;15(3):e0230647. doi: 10.1371/journal.pone.0230647.

Kuniishi H, Yamada D, Wada K, Yamada M, Sekiguchi M. Stress induces insertion of calcium-permeable AMPA receptors in the OFC-BLA synapse and modulates emotional behaviours in mice. *Transl Psychiatry*. 2020 May 18;10(1):154. doi: 10.1038/s41398-020-0837-3.

Hashimoto O, Kuniishi H, Nakatake Y, Yamada M, Wada K, Sekiguchi M. Early life stress from allergic dermatitis causes depressive-like behaviors in adolescent male mice through neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*. 2020 Nov;90:319-331. doi: 10.1016/j.bbi.2020.09.013.

Hori K, Yamashiro K, Nagai T, Shan W, Egusa SF, Shimaoka K, Kuniishi H, Sekiguchi M, Go Y, Tatsumoto S, Yamada M, Shiraishi R, Kanno K, Miyashita S, Sakamoto A, Abe M, Sakimura K, Sone M, Sohya K, Kunugi H, Wada K, Yamada M, Yamada K, Hoshino M. AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication. *iScience*. 2020 Jun 26;23(6):101183. doi: 10.1016/j.isci.2020.101183.

Matsuzaka Y, Tanihata J, Ooshima Y, Yamada D, Sekiguchi M, Miyatake S, Aoki Y, Terumitsu M, Yashiro R, Komaki H, Ishiyama A, Oya Y, Inoue YU, Inoue T, Takeda S, Hashido K. The nSMase2/Smpd3 gene modulates the severity of muscular dystrophy and the emotional stress response in mdx mice. *BMC Med*. 2020 Nov 19;18(1):343. doi: 10.1186/s12916-020-01805-5.

## 5. 分担研究報告

### 合成カンナビノイド有害性および有用性の評価 (1-1-01)

分担研究者 ○船田正彦<sup>1)</sup>

研究協力者 富山健一<sup>1)</sup>

- 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

#### 【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。近年、危険ドラッグである合成カンナビノイドの乱用によって、横紋筋融解症を発症するケースが報告されている。しかし、合成カンナビノイドが直接骨格筋細胞に対して細胞毒性を示すか不明であった。本研究では、合成カンナビノイドが骨格筋細胞に細胞毒性を誘導するか、CB<sub>1</sub>とCB<sub>2</sub>の二つの受容体に作用するアゴニストCP-55,940と骨格筋細胞モデルとしてヒト胎児横紋筋肉腫(RD)細胞を用いて検討した。

#### 【方法】

##### 合成カンナビノイドの細胞毒性

ヒト胎児横紋筋 (RD)細胞は ATCC より購入した。細胞は、10% FBS 含有 DMEM (ATCC)にて 37°C・CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培養培地を無血清 DMEM に置換し CP-55,940 (10-30μM)添加後の細胞生存率を 1-3 時間の間で解析した。細胞生存率の評価は Celltiter-Glo™ Assay (Promega)を用いて解析した。CB<sub>1</sub>受容体アンタゴニスト AM251 (30 μM)、CB<sub>2</sub>受容体アンタゴニスト AM630 (30 μM)、L型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカー Verapamil (5.0 μM)、diltiazem (5.0 μM)、Ca<sup>2+</sup>キレーター EGTA (2.5 mM) または BAPTA-AM (20 μM)は CP-55,940 処理の 30 分前にあらかじめ培地に添加した。筋障害マーカーの一つであるクレアチンキナーゼ(CK)は、Creatine Kinase Activity Assay Kit (Abcam)を使用して解析した。

##### アポトーシス解析

アポトーシスの評価は、形態的特徴としてフローサイトメトリー (Beckman Coulter) による Annexin-V/PI (Beckman Coulter) およびミトコンドリア膜電位測定蛍光試薬 JC1 (MarkerGene™ Technology)による解析を実施し、生化学的マーカーである caspase-9 および caspase-3 の活性測定は Caspase-9, -3-Glo® Assay kit (Promega)と Infinite

F200 プレートリーダー (Tecan, Männedorf) を使用した。

#### 【結果】

CP-55,940 は、時間・濃度依存的に RD 細胞の細胞生存率を減少させた。同時に、筋障害マーカーである CK の遊離も認められた。一方で、CB<sub>1</sub> 受容体アンタゴニスト AM251 の前処置によって CP-55,940 による細胞生存率の低下および CK 遊離は抑制された。CB<sub>2</sub> 受容体アンタゴニスト AM630 の前処置では細胞生存率の低下を抑制することはできなかった。CP-55,940 による細胞死は、Annexin-V 陽性、caspase-9, -3 の活性化およびミトコンドリアの膜電位低下を示したことから、アポトーシスの誘導であることが明らかとなった。一方で、CP-55,940 は RD 細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を有意に増加させ、L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーであるジルチアゼムやベラパミルまたは Ca<sup>2+</sup>キレーター EGTA や BAPTA-AM によって細胞死は抑制された。以上の結果から、CP-55,940 による細胞死(アポトーシス)の誘導には、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増加が必要な役割を果たしていると考えられる。さらに細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増加はミトコンドリアの機能障害を誘発し、caspase の活性化を伴うアポトーシスを誘導すると考えられた。

#### 【考察】

本研究では、CB<sub>1</sub>とCB<sub>2</sub>受容体を発現する RD 細胞を用いて、ヒト骨格筋細胞モデルにおける合成カンナビノイドの細胞毒性の誘導を検討した。

その結果、CP-55,940 は CB<sub>1</sub> 受容体を介して細胞毒性を誘導し、この機序には L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルからのカルシウム流入およびミトコンドリアの機能障害が重要であることが示唆された。本研究結果から、合成カンナビノイドは、骨格筋細胞において CB<sub>1</sub> 受容体を介して細胞毒性を誘導する可能性が明らかとなった。合成カンナビノイドを含む製品の乱用は、精神活動のみならず、身体的な障害を誘発する恐れがある。一方で、本研究結果は、カンナビノイド受容体アンタゴニストやカルシウムチャンネルブロッカーが合成カンナビノイドの急性毒性作用から骨格筋細胞の保護または治療に繋がる可能性を示唆している。本研究をさらに発展させていくことで、将来的に合成カンナビノイド誘発性中毒症状を発症する患者に対して CB<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストやカルシウムチャンネルブロッカーが有効な治療薬になる可能性がある。

## 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 (1-1-02)

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】

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) が用いられてきた。

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。また、これまでに我々が行った研究により、5XRA<sup>1)</sup> がドッキングを用いた活性予測に適していることが分かった。しかし、合成カンナビノイドと CB1 のドッキングにより得られる評価関数 (S) と実際の生物活性の間に高い相関は見られなかった。そこで今回、相関性を高めるため、ドッキングの条件設定を検討する。

### 【方法】

#### カンナビノイド受容体の構造

これまでの研究でドッキングを用いた活性予測に適していることが明らかになった 5XRA<sup>1)</sup> (CB1 受容体) のタンパク質構造をプロテインデータバンク (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 のチームが合成した JWH から始まる合成カンナビノイドで、Ki 値が高い化合物 11 種<sup>2)</sup>をドッキング対象とした。

#### 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ソフト MOE を使って行った。立体構造データの前処理として Structure Preparation で構造安定化、Energy

Minimization で水素結合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する場所を Dummy-site として登録した。ドッキングの結果得られた S 値をリガンドの重原子数で除し、重原子による S 値への影響を補正した。

### 【結果】

S 値/重原子数を算出し、重原子による影響を補正することにより、決定係数  $R^2=0.5461$  という結果が得られた。この結果より、ドッキング結果 (横軸) と実測 Ki 値 (縦軸) の間にある程度高い相関性が見られた。(図 1)

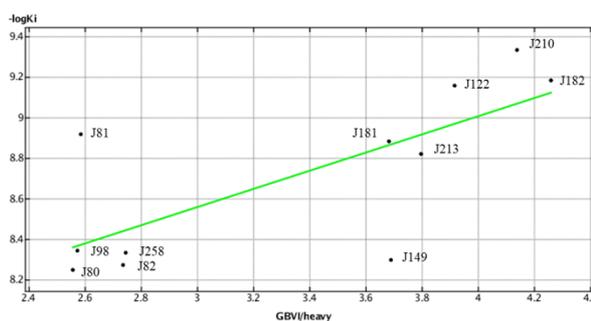


図 1

### 【考察】

今回使用したリガンドに関しては、S 値をリガンドの重原子数で除した補正 S 値を用いることで実測 Ki 値との相関が見られやすくなることが分かった。しかし、今回の対象化合物数は多くないため、今後はさらにドッキング対象化合物を増やし、活性予測を行うことが必要である。

### 【文献】

1. *Nature*, 2017, 547, 468-471
2. *Bioorganic & Medicinal 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 (1-1-03)

分担研究者 橋本 謙二<sup>1)</sup>、  
研究協力者 万 夏雲<sup>1)</sup>、藤田 有子<sup>1)</sup>

1) 千葉大学社会精神保健教育研究センター  
病態解析研究部門

### 【はじめに】

米国では鎮痛薬として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。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。これまで、新規抗うつ薬(R)-ケタミンがモルヒネ誘発の報酬効果を抑制することを見出し、オピオイド系薬物依存の治療薬になる可能性を報告した (Witkin et al, 2020)。

一方、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は、脳を含む様々な部位において重要な役割を果たしている。これまで我々は、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がうつ病、自閉症スペクトラム障害、統合失調症、パーキンソン病などの病因に関わっていることを報告した (Ma et al, 2019; Pu et al, 2020)。また、可溶性エポキシド加水分解酵素阻害薬は、オピオイド系の鎮痛薬に替わる可能性が指摘され、臨床試験が実施されている。

本研究の目的は、非オピオイド系鎮痛薬として期待されている可溶性エポキシド加水分解酵素阻害薬 TPPU が、報酬効果を示すか、場所嗜好性試験を用いて調べることである。

### 【方法】

#### 場所嗜好性試験

実験には C57/B6 マウス (雄性、8 週齢、日本 SLC 社) を使用した。3 日間の馴化期間の後、モルヒネ (10 mg/kg) あるいは生理食塩水 (10 ml/kg) を 1 日ごとに腹腔内投与し、60 分間箱に入れた (6 日間)。翌日に場所嗜好性試験を行い、場所嗜好性スコアを計算した。

同様に、3 日間の馴化期間の後、TPPU (3, 10, 30 mg/kg) あるいは溶媒 (PEG400, 10 ml/kg) を 1 日ごとに経口投与し、60 分間箱に入れた (6 日間)。翌日に場所嗜好性試験を行い、場所嗜好性スコアを計算した。

次に、モルヒネ投与による場所嗜好性に可溶性エポキシド加水分解酵素が関与しているかを調べるために、モルヒネ投与 30 分前に TPPU (30 mg/kg)

を経口投与して同様に調べた。

### 【結果】

場所嗜好性試験において、モルヒネは場所嗜好性を有意に増加させ、報酬効果を示すことを確認した。一方、TPPU は全ての投与量において、場所嗜好性を変化させず、報酬効果を示さなかった。さらに、TPPU の前投与は、モルヒネの報酬効果を抑制しなかった。

### 【考察】

本研究では、非オピオイド系鎮痛薬として期待されている可溶性エポキシド加水分解酵素阻害薬 TPPU は報酬効果を示さない事、またモルヒネの報酬効果には可溶性エポキシド加水分解酵素は関与していない事を報告した (Wan et al, in press)。

以上の結果より、可溶性エポキシド加水分解酵素阻害薬は、オピオイド系鎮痛薬に替わる新規鎮痛薬として期待される。

### 【文献】

- Ma, M., Ren, Q., Yang, J., Zhang, K., Xiong, Z., Ishima, T., Pu, Y., Hwang, S.H., Toyoshima, M., Iwayama, Y., Hirano, Y., Yoshikawa, T., Hammock, B.D., Hashimoto, K. (2019). Key role of soluble epoxide hydrolase in the neurodevelopmental disorders of offspring after maternal immune activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 7083-7088.
- Pu, Y., Yang, J., Chang, L., Qu, Y., Wang, S., Zhang, K., Xiong, Z., Zhang, J., Tan, Y., Wang, X., Fujita, Y., Ishima, T., Wan, D., Hwang, S.H., Hammock, B.D., Hashimoto, K. (2020). Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 11752-11759.
- Wan, X., Fujita, Y., Chang, L., Wei, Y., Ma, Li., Wuyun, G., Pu, Y., Hammock, B.D., Hashimoto, K. (in press). Lack of rewarding effects of a soluble epoxide hydrolase inhibitor TPPU in mice: comparison with morphine. *Neuropsychopharmacol. Rep.* 2020 Sep. 7. doi: 10.1002/npr2.12136.
- Witkin, J.M., Kranzler, J., Kaniecki, K., Popik, P., Smith, J.L., Hashimoto, K., Sporn, J. (2020). R(-)-ketamine modulates behavioral effects of morphine predicting efficacy as a novel therapy for opioid use disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 194, 172927.

## 大麻受容体を介した薬理作用の解析 (1-1-04)

分担研究者 三島健一<sup>1)</sup>,  
研究協力者 入江圭一<sup>1)</sup>, 山下郁太<sup>1)</sup>,  
江口幸臣<sup>1)</sup>

1) 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 ( $\Delta^9$ -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 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) などの生体内リガンドが存在する。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。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。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、個別に飼育した後、THC を投与すると THC は CB 受容体を介した攻撃行動を誘発した。また、THC を連続投与した際に THC の薬理作用には耐性が形成される (Martin B. R., 2005)。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 (摂食や飼育環境、THC の使用経験など) によって影響を受けやすいことが予想された。

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、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。

#### マウスの直腸温の測定

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。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た。また、マウスに CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 SR141716、CB<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 AM630 を腹腔内投与した 1 時間後、THC を投与して 1 時間後、2 時間後に直腸体温を測定した。

#### 遺伝子発現量解析

THC を連続投与した後、THC による体温降下作用に耐性が形成されたマウスの脳を摘出した。摘出した脳から、TRIzol 試薬を用いて、total RNA を抽出した後、マイクロアレイキット (SurePrint G3 Mouse GE) を用いて解析した。

### 【結 果】

THC 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。また、CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 SR141716 は THC による直腸温度降下作用を有意に抑制した。一方で、CB<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の AM630 は THC の直腸温度降下作用に影響を与えなかった。また、THC を連続投与した後、THC による体温降下作用に耐性が形成されたマウスの脳の遺伝子発現量を解析した結果、多くの遺伝子発現量が増減していることが明らかとなった。

### 【考 察】

昨年度、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。本年度は、薬理学的手法を用いて、THC の体温降下作用は CB<sub>1</sub> 受容体を介して起こることを確認した。また、THC を連続投与したマウスの脳内環境が変化していることを明らかにした。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。

### 【文 献】

Martin B. R. (2005). Role of lipids and lipid signaling in the development of cannabinoid tolerance, *Life Sciences* 77,1543-1558.

## 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 (1-1-05)

分担研究者 関口正幸<sup>1)</sup>

研究協力者 竹内絵理<sup>1)</sup>, 高橋秀依<sup>2)</sup>, 牧野宏章<sup>2)</sup>, 荒木拓嗣<sup>2)</sup>, 山田大輔<sup>3)</sup>, 斎藤顕宜<sup>3)</sup>

- 1) 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
- 2) 東京理科大学薬学部薬学科薬化学教室
- 3) 東京理科大学薬学部薬学科薬理学教室

### 【はじめに】

本邦においては、2012-2014年の間に200件を超える危険ドラッグ摂取によると思われる自動車事故が発生し社会問題となった。合成カンナビノイド AB-FUBINACA は大麻成分の  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) よりも高いカンナビノイド CB1 受容体親和性を示し、動物実験の結果から少量で様々な身体症状を引き起こすことが報告されている (Gatch, Forster, 2015; Canazza et al., 2017)。しかしながら、AB-FUBINACA の情動行動、特に情動性記憶・学習行動に対する作用については不明であった。これまでに、学術的研究のための試薬として市販されているカンナビノイド CB1 受容体作動薬 WIN55, 212-2 (WIN) は、げっ歯類への腹腔内投与により、情動性記憶の一種である「文脈性恐怖記憶」の獲得を減弱することが知られていた (Pamplona, Takahashi, 2006)。

本研究は、これら先行研究を基盤として、危険ドラッグの成分である合成カンナビノイド AB-FUBINACA が文脈性恐怖記憶の獲得に影響を及ぼすかどうか評価することを目的として行われた。

### 【方法】

実験には C57BL/6J マウス (雄性, 8 週齢, 日本クレア) を使用した。合成カンナビノイドとして AB-FUBINACA を、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬として AM251 を使用した。投与量は先行研究を参考に、AB-FUBINACA (0.2, 0.5, 1.0, 5 mg/kg)、AM251 (5 mg/kg) とした (Canazza et al., 2017)。文脈性恐怖条件づけ試験を用いて AB-FUBINACA の恐怖記憶獲得への影響について調べた。すなわち、マウスに AB-FUBINACA を腹腔内投与した 15 分後に未知実験箱 (条件刺激) と電気ショック (無条件刺激) による恐怖条件づけを行い、その 24 時間後に条件刺激のみによって引き起こされるすくみ反応を解析した。また同様の実験において、AM251 を AB-FUBINACA を投与する 20 分前に腹

腔内投与し CB1 受容体の関与について検討を加えた。対照としては、それぞれの薬物に関して溶媒投与群を用いた。

### 【結果】

合成カンナビノイド AB-FUBINACA を腹腔内投与し条件づけ試験を行ったところ、濃度依存的にマウスのすくみ反応時間が減少した。さらに、AM251 を AB-FUBINACA 投与前に腹腔内投与すると、すくみ反応時間の減少がキャンセルされることが示された。

### 【考察】

本研究では、合成カンナビノイド AB-FUBINACA の文脈性恐怖記憶獲得への作用について調べた。その結果、AB-FUBINACA を腹腔内投与することで恐怖記憶が減弱することが示唆された。今回の結果は、カンナビノイド CB1 受容体の活動増強により、恐怖記憶の獲得が減弱するという先行研究と良く一致するものであった (Pamplona, Takahashi 2006; Yamada, 2014)。今後、AB-FUBINACA の扁桃体シナプス伝達への作用について電気生理学的に解析していく予定である。

### 【文献】

Canazza I, Ossato A, Vincenzi F, Gregori A, Di Rosa F, Nigro F, Rimessi A, Pinton P, Varani K, Borea PA, Marti M (2017) Pharmacotoxicological effects of the novel third-generation fluorinated synthetic cannabinoids, 5F-ADBINA, AB-FUBINACA, and STS-135 in mice. In vitro and in vivo studies. *Hum Psychopharmacol*, **32**, e2601.

Gatch MB, Forster MJ (2015)  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-like effects of novel synthetic cannabinoids found on the gray market. *Behav Pharmacol*, **26**, 460-468.

Pamplona FA, Takahashi RN (2006) WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett*, **397**, 88-92.

Yamada D, Takeo J, Koppensteiner P, Wada K, Sekiguchi M (2014) Modulation of fear memory by dietary polyunsaturated fatty acids via cannabinoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, **39**, 1852-1860.

## 合成カナビノイドおよび PCP 系薬物の中樞神経系への影響に関する脳波による評価 (1-1-06)

分担研究者 三輪秀樹<sup>1)</sup>

1) 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】

フェンサイクリジン(PCP)やケタミンなど NMDA 受容体拮抗薬は幻覚作用を持つことが知られているが、その作用機序は不明な点が多い。Khlestova らの研究によると、ケタミンへの NMDA 受容体感受性は NMDA 受容体のサブユニットの中で GluN2C/2D サブユニットが他のサブユニットより高いことが報告されており、本研究では、GluN2C/2D サブユニットを含む NMDA 受容体の発現脳部位に着目し、脳機能解析を進めることは幻覚など精神病症状の理解を深めることを目指している。

幻覚作用の神経基盤として、ドパミン神経系が古くから想定されており、腹側被蓋野や中脳黒質が中樞神経系におけるドパミン神経の起始部として知られている。統合失調症の陽性症状は中脳(腹側被蓋野)-辺縁経路の過活動であり、陰性症状は中脳(腹側被蓋野)-皮質路の機能低下であるという仮説が提唱されているが、これらの神経回路の機能特性の差異は不明な点が多い。本研究では、それぞれのドパミン神経経路の機能特徴と幻覚などの精神症状との関連を明らかにすることを目標とする。

### 【方法】

#### NMDA受容体解析

脳スライス標本を用いて、パッチクランプ法により各脳部位の NMDA 受容体特性を解析することで NR2C サブユニットを含む特性かを推測した。

#### ドパミン神経回路解析

ドパミントランスポーター-特異的 Cre 発現マウス(DAT-Cre)にレポーターマウス Ai9(Creによる組換えで蛍光タンパク質 tdTomato を発現するマウス)を交配させて得られた DAT-tdTomato マウスに対して、逆行性神経トレーサーであるコレラ毒素 B サブユニット(CTB) [CTB-488 および CTB633] を前頭前野および側坐核にそれぞれインジェクションし、腹側被蓋野におけるそれぞれのドパミン神経の起始部の分布を解析した。また、化学遺伝学的手法により DAT-Cre マウスの腹側被蓋野にア

デノ随伴ウイルス AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherry あるいは AAV-DIO-hM4D(Gi)-mCherry をインジェクションし、腹側被蓋野の神経活動を活性あるいは抑制することによる、行動変化をオープンフィールド試験、プレパルス抑制試験など統合失調症との関連性を念頭に解析した。

### 【結果】

#### NMDA受容体解析

海馬 CA1 錐体細胞およびパルブアルブミン陽性 GABA 作動性ニューロン、扁桃体主要細胞、視床ニューロンからパッチクランプ法により電流-電圧曲線を作成した。その結果、電位依存性による反応の違いが観察された。

#### ドパミン神経回路解析

DAT-tdTomato マウスに対する逆行性神経トレーサー解析では、前頭前野からの逆行性シグナルと側坐核からの逆行性シグナルは腹側被蓋野において重複する個体は得られなかった。DAT-Cre マウスの腹側被蓋野を化学遺伝学的手法により神経活動を人工操作した実験では、AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherry をインジェクションをしたマウスはオープンフィールド試験に置いてコントロールマウスと比較して過活動を示した。これはドパミン細胞の活動上昇がオープンフィールド試験での過活動と関連するという知見と一致した。

### 【考察】

本研究では、PCP 系薬物の薬理効果として NMDA 受容体特性に関する解析および幻覚作用の細胞基盤としてドパミン神経回路に着目して実施した。PCP やケタミンなど NMDA 受容体拮抗薬に関する細胞レベルでの解析は、培養細胞での解析は行われているが、実際の脳スライス標本や動物個体での解析は不明の点が多い。ケタミンや MK801 の細胞レベルでの作用機序に関して、パルブアルブミン陽性細胞の NMDA 受容体に特に作用するという報告もあるが、実際には再現性に問題があるのではないかという個人的な疑問もあり、それらを解決する上でも本研究を今後発展させていく。

### 【文献】

- Khlestova E. et al., (2016) J Neurosci. 36(44), 11151-11157.  
Kotermanski SE, Johnson JW. (2009) J Neurosci. 29(9), 2774-2779.  
Bjorklund A, Dunnett SB. (2007) Trends Neurosci. 30(5), 194-202.

Title: Research on the development of new methods to evaluate adverse effects of new psychoactive substances

Masahiko Funada, Ph.D.

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

The purpose of this study was to investigate the mechanism of adverse effects caused by new psychoactive substances (NPSs) and develop an efficient technique to predict adverse effects.

**Mechanism of adverse effects:** Funada et al. established a human skeletal muscle cell model for evaluating the myotoxicity of synthetic cannabinoids and found that toxicity is mediated by the cannabinoid CB1 receptor. Mishima et al. found that continuous administration of the cannabis component THC to mice induced resistance to body temperature-lowering effects and the development of catalepsy-like immobility. Miwa et al. focused on the dopaminergic nerve and created genetically modified mice, which they used to identify the neural circuit responsible for hallucinations associated with NPSs. DAT-Cre-tdTomato mice exhibited increased momentum in movements and the ventral tegmental nucleus could be activated using chemo-genetic techniques. We thus developed an important animal model for analyzing the role of the dopamine nervous system in the development of adverse effects of NPSs.

**Method to evaluate adverse effects:** Using a mouse location preference test, Hashimoto et al. revealed that the novel analgesic soluble epoxide hydrolyase inhibitor TPPU does not induce psychological dependence. In addition, Sekiguchi et al. reported that the synthetic cannabinoid AB-FUBINACA suppresses conditioned fear memories via the CB1 receptor in a fear conditioning test. Kurihara et al. used computer analyses to examine the validity of docking study predictions of the activity of CB1 receptors and ligands, which function as the sites of action of synthetic cannabinoids. These analyses revealed that good activity prediction can be achieved by fixing the binding site of the ligand using the hydrogen bond energy as an index. The correlation with the severity of myotoxicity caused by synthetic cannabinoids was also good, suggesting that it is possible to predict harmful effects of cannabis and NPSs based on the chemical structures of synthetic cannabinoids.

How to proceed with our study in the future:

**Mechanism of adverse effects:** To establish a model for chronic NPS and cannabis component exposure, changes in brain functional proteins and expression of mRNAs related to the mechanism of dependence will be examined. In particular, the cannabis model will analyze changes in cannabinoid receptors. To examine the effects of synthetic cannabinoids on emotional behavior, synaptic transmission will be optogenetically isolated, and the responsible brain neural circuit will be identified electrophysiologically. DAT-Cre-tdTomato mice will be subjected to repeat behavioral experiments with hallucinogenic drugs such as PCP and ketamine, and development of an in vitro measurement system will follow.

**Method to evaluate adverse effects:** A greater number of drugs will be evaluated using muscle cell models and CB1 receptor-expressing cells to improve the accuracy of harmful effect predictions based on the chemical structures of synthetic cannabinoids. The analytical conditions of in silico activity predictions based on docking study data will be re-examined to improve the accuracy of predicted values. We aim to build a high-throughput comprehensive method for hazard prediction using cell-based experiments and computer analyses.