

総括研究報告書

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
(課題番号：1-1)

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

【研究要旨】

本研究は、「危険ドラッグによる有害作用の予測に関する効率的な評価技術の開発」を目的とした。危険ドラッグとしては、最大の流通量が確認された合成カンナビノイドとカチノン系化合物を中心に研究を進めた。

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、情動に関する影響を検討した。合成カンナビノイド処置により薬物依存形成、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した。標準物質として、大麻成分 THC を使用した。THC を連続投与すると、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、脳内 CB1 受容体が重要であることを明らかにした。また、扁桃体領域の CB1 受容体を介して条件性恐怖記憶が制御されることを明らかにした。毒性評価法として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モデルを確立し、カンナビノイド CB1 受容体を介して毒性が発現することを明らかにした。

カチノン系化合物：カチノン系化合物については、薬物依存形成と標的タンパク質機能調節との関連性を中心に解析を行った。その結果、カチノン系化合物による精神依存形成強度とドパミントランスポーター(DAT)阻害作用に相関性があることを確認した。DAT 発現細胞による評価から、細胞実験による DAT 阻害強度を指標として、精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。

コンピューター解析：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。その結果、水素結合エネルギーを指標に、リガンドの結合部位を固定することで、良好な活性予測が可能になることを見出した。コンピューター解析による予測データは、合成カンナビノイドによる精神依存、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。

本研究を通じて、細胞実験(in vitro)による評価データから、動物実験(in vivo)データを予測することが可能であり、細胞実験を主軸とした有害作用予測システムの導入は、データ収集の効率化が期待される。

1. 研究目的

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」を目的とした。

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、カチノン系化合物をメインターゲットとして、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した。

有害作用の評価法:動物の行動解析、細胞による評価に加え、コンピュータ解析を含めた包括的な解析を行った。一方、危険ドラッグ慢性使用による脳内神経回路の変化については、脳内神経の可視化モデル動物を作成し、危険性予測のマーカー検索システムの構築を試みた。こうした総合的な評価法を構築することで、危険ドラッグの危険性を迅速に検出、予測することが可能になる。また、脳内神経回路可視化モデル動物を駆使することで、薬物慢性使用による依存症、精神疾患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

分担研究者:

栗原正明 湘南医療大学 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

3. 研究成果

カチノン系化合物:船田らは、カチノン系化合物の作用点であるモノアミントランスポーターに着目して培養細胞系による機能調節評価と動物実験より得られるデータとの相関性を検討した。着目した作用点としては、細胞膜トランスポーターとして **dopamine transporter (DAT)**、**serotonin transporter (SERT)**、**norepinephrine transporter (NET)**について検討した。動物実験としては、マウスを使用して条件付け場所嗜好性試験 **conditioned place preference (CPP)** 法による精神依存性評価を行った。モノアミントランスポーター阻害作用: 8種類のカチノン系化合物について、取り込み阻害作用は **DAT > NET > SERT** であり、**DAT** 取り込み阻害作用が強い傾向が確認された。報酬効果の評価: 8種類のカチノン系化合物 (**4mg/kg, i.p.**) の条件付けにより報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが明らかになった。相関性解析: 8種類のカチノン系化合物による報酬効果とモノアミントランスポーター阻害作用強度の相関性について検討したところ、**DAT** 阻害作用において有意な相関性 $R^2=0.934$ が認められた。本研究の解析から、カチノン系化合物による報酬効果の発現強度は、**DAT** 阻害作用強度と相関することが明らかになった。したがって、**HEK-DAT** 細胞による機能解析から、カチノン系化合物の精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。

栗原らは、カンナビノイド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規制薬物のインシリコ活性予測法の開発のための基礎検討を行った。ターゲットとするカンナビノイド受容体構造は、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, 5XR8 (CB1受容体)** とした。関連タンパク質構造をプロテインデータバンクからダウンロードし使用

した。カンナビノイドリガンドの選択は、CB1 受容体親和性(Ki 値)が高い化合物 11 種をドッキング対象とした。使用する合成カンナビノイドのデータは部分構造にアミノ酸を持つ基本骨格を有し、R 体及び S 体の活性値が得られている 8 組 (16 化合物) を用いた。ドッキングスタディは統合計算化学ソフト MOE を用いて行った。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。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。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。さらに予測精度を向上させるため、スコアリング関数を変更したり、配座探索回数を増やしたりするなどの条件検討を行う必要があると考えられる。

橋本らは、合成カンナビノイドと腸内細菌叢の関連について解析した。マウスの思春期 (P35-P45) に合成カンナビノイド系化合物 WIN55,2121-2 (2mg/kg/day)あるいは生理食塩水を投与した。その後、何も処置せず、成人期 (P70) に炎症を惹起させるリポポリサッカライド (LPS: 0.5 mg/kg) を投与した。LPS 投与前に新鮮な糞を採取し、腸内細菌叢を解析した。投与 24 時間後に血液と脳部位 (前頭皮質、海馬、側坐核) を採取した。血液は炎症性サイトカインとメタボローム解析で代謝物を測定した。前頭皮質および側坐核におけるミクログリアの活性化は、WIN55,2121-2 群の方が生理食塩水投与群より有意に高かった。一方、血液中の炎症性サイトカイン濃度は両群で差が無かった。腸内細菌叢解析では、 α および β 多様性には有意な差は無かったが、両群で有意に差が認められた腸内細菌が見つかった。興味深いことに、腸内細菌の相対的分布と脳におけるミクログリア活性化の間に相関が認められた。さらに、腸内細菌の相対的分布と血液中の代謝物の間に相関が認めら

れた。これらの結果は、思春期におけるカンナビノイド受容体の刺激は、成人期におけるストレス (炎症) に対して脆弱性を示すことが示唆され、長期にわたる腸内細菌の異常が関与している可能性が示唆された。腸内細菌-脳ミクログリアのクロストークが、思春期の大麻使用と成人期における精神病リスクに関わっている可能性が示された。

三島らは、大麻主要成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) 処置後の動物の行動変化ならびに脳内遺伝子発現変化を検討した。遺伝子発現変化はマイクロアレイを使用して解析した。マウスを個別飼育しておき、THC を投与すると THC はカンナビノイド受容体を介した攻撃行動を誘発することを明らかにした。また、THC を慢性処置 (3 日間) しておくと、THC による直腸温降下作用は減弱していた。THC を連日投与する際に SR141716A を併用すると THC による薬理作用の減弱は見られなかった。よって、THC を連日投与することで、カンナビノイド CB1 受容体が刺激されると THC による直腸温降下作用に耐性が形成されることを明らかにした。また、THC を連日投与した後、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。本研究により、大麻の作用について、ストレス負荷や大麻使用経験などの生体がおかれた状況によって、カンナビノイド受容体を介した薬理作用が変化することが示唆された。今後、生体がおかれた状況がカンナビノイド受容体を介して起こる薬理作用に与える影響について、その制御機構を解析することは、大麻が示す作用の不安定さを表すエビデンスとなることが期待される。

関口らは、合成カンナビノイドの AB-FUBINACA が脳シナプス伝達 (特に情動中枢扁桃核) や文脈性恐怖記憶の獲得などに対する影響を検討した。マウス脳スライス中の扁桃核錐体細胞におけるシナプス伝達に対する AB-FUBINACA の作用をパッチクランプ法にて検討したところ、AB-FUBINACA 投

与により扁桃体シナプス伝達が抑制される例が観察された。一方、マウスに AB-FUBINACA を腹腔内投与して恐怖条件づけ行動試験を行ったところ、濃度依存的かつ有意にマウスのすくみ反応時間が減少した。この減少は AM251 (CB1 受容体阻害薬) 前投与下での AB-FUBINACA 投与では見られなかった。AB-FUBINACA の腹腔内投与はマウスの作業記憶も CB1 受容体依存的に抑制した。さらに、AB-FUBINACA の腹腔内投与は、高濃度ではマウス心拍数を減少させた。本研究では、合成カンナビノイド AB-FUBINACA が扁桃体関連記憶である文脈性恐怖記憶の獲得を抑制することを明らかにした。

三輪らは、フェンサイクリジン (PCP) やケタミンなど NMDA 受容体拮抗薬が示す幻覚作用に関する研究の一環として、GluN2C, GluN2D サブユニットを含む NMDA 受容体の発現脳部位に着目し、脳機能解析を行った。メマンチンを用いて、さまざまな脳部位、細胞種に対するメマンチンの応答性を *in vitro* 電気生理学により検証した。その結果、細胞種毎に差異があり、特に GABA 作動性ニューロンでの応答性が高いことが示唆された。幻覚・幻聴を主訴とする統合失調症でも GABA システムの減弱が観察されているので、今後は共通の神経回路異常として関連性が注目される。また、新たな薬物依存症モデルの開発に取り組むため、ドパミン神経特異的に組み替え酵素 Cre を発現する、*dopamine transporter-Cre* (DAT-Cre) マウスを用いて、化学遺伝学 (DREADD) により、有用性の検証を行った。また、薬物依存症治療標的分子の候補として、オキシトシンシステムに着目しており、新たに開発されたオキシトシン受容体可視化マウスの評価を行った。DAT-Cre マウスの腹側被蓋野を化学遺伝学的手法 (AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherry をインジェクション) により神経活動を制御したところ、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ものであり、実験系として確立することができた。さらに、オキシトシン受容体発現可視化遺伝子改変マウス (*Oxtr-T2A-tdTomato* マウスおよび *Oxtr-T2A-iCre* マウス) を用いてオキシトシン受容体発現細胞の脳内分布を調べた。オキシトシン受容体発現細胞の脳内分布について、いままでの報告と合致している点 (扁桃体中心核や中隔に発現が多い) や相違している点 (大脳皮質 2 層に陽性細胞が局在する) が観察された。さらに、急性スライス標本を作成し、パッチクランプ法により *tdTomato* 陽性細胞から電気応答を記録し、オキシトシンへの応答を調べた。その結果、これらの蛍光タンパク質陽性細胞がオキシトシンアゴニストで電気応答に変化が生じることを電気生理学的解析により確認できた。DAT-Cre マウスとオキシトシン受容体発現可視化遺伝子改変マウスを交配させることで、薬物依存症の原因とされるドパミン神経と薬物依存症の治療標的候補であるオキシトシンシステムとの相互作用する可能性の脳部位を検証し、薬物依存症の病態基盤を明らかにするモデル動物となることが期待される。

本研究を通じて、細胞実験 (*in vitro*) による評価データから、動物実験 (*in vivo*) データを予測することが可能であり、細胞実験を主軸とした有害作用予測システムの導入は、データ収集の効率化が期待される。また、本研究の危険ドラッグに関する機能評価から、その作用強度を解析する評価システムは、危険ドラッグの中枢作用および有害作用発現の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

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 CB1 receptors and L-type Ca²⁺ channels. *Arch Toxicol.* 2020.
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* 68, 773-778, 2020.
doi: 10.1248/cpb.c20-00249.

Moriya S, Shibasaki H, Kohara M, Kuwata K, Imamura, Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue. *Bioorg Med Chem Lett.* 39, 127850, 2021.
doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127850.

Kuniishi H, Yamada D, Wada K, Yamada M, Sekiguchi M, Stress-induced insertion of calcium-permeable AMPA receptors in the OFC-BLA synapse modulates emotional behavior in mice. *Transl Psychiat* 10, 154-159, 2020.
doi.org/10.1038/s41398-020-0837-3.

Witkin, J.M., Kranzler, J., Kaniecki, K., Popik, P., Smith, J.L., Hashimoto, K., Sporn, J., R-(-)-ketamine modulates behavioral effects of morphine predicting efficacy as a novel therapy for opioid use disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 194, 172927, 2020.
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. *Neuropsychopharmacology Report* 40(4), 412-416, 2020.
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* 140(2), 193-204, 2020. doi: 10.1248/yakushi.19-00195-3.

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* 15(3), e0230647, 2020.
doi: 10.1371/journal.pone.0230647.

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, Behavior and Immunity* 90, 319-331, 2020.
doi.org/10.1016/j.bbi.2020.09.013.

令和元年度～令和3年度
国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費
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
(課題番号：1-1)

分担研究報告書

危険ドラッグの作用点に着目した有害作用評価方法の確立 (1-1-01)

分担研究者：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）

研究協力者：富山健一（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）

【研究要旨】

新しく合成された精神活性物質が危険ドラッグとして流通しており、その乱用拡大が社会問題となっている。代表的な危険ドラッグとしては、覚醒剤と類似作用を示すカチノン系化合物とオピオイド系化合物であるフェンタニル類縁化合物の広がり深刻であり、次々に新規の化合物が登場している。迅速な流通規制を目指し、薬物の精神依存性を迅速に検出するシステム構築が急務である。本研究では、カチノン系化合物の作用点であるモノアミントランスポーターに着目して培養細胞系による機能調節評価と動物実験より得られるデータとの相関性を検討した。着目した作用点としては、細胞膜トランスポーターとして dopamine transporter (DAT)、serotonin transporter (SERT)、norepinephrine transporter (NET)について検討した。動物実験としては、マウスを使用して条件付け場所嗜好性試験 conditioned place preference (CPP) 法による精神依存性評価を行った。

モノアミントランスポーター阻害作用：8種類のカチノン系化合物について、DAT阻害作用(IC50値： $5.2 \times 10^{-8} \sim 7.1 \times 10^{-6} \text{M}$)、SERT阻害作用(IC50値： $2.0 \times 10^{-6} \sim 5.6 \times 10^{-4} \text{M}$)、NET阻害作用(IC50値： $1.8 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-6} \text{M}$)を有することが明らかになった。今回検討したカチノン系化合物について、取り込み阻害作用はDAT>NET>SERTであり、DAT取り込み阻害作用が強い傾向が確認された。

報酬効果の評価：8種類のカチノン系化合物 (4mg/kg, i.p.) の条件付けにより報酬効果が発現し、精神依存形成能を有することが明らかになった。

相関性解析：8種類のカチノン系化合物による報酬効果とモノアミントランスポーター阻害作用強度の相関性について検討したところ、DAT阻害作用において有意な相関性 $R^2=0.934$ が認められた。

本研究の解析から、カチノン系化合物による報酬効果の発現強度は、DAT阻害作用強度と相関することが明らかになった。したがって、HEK-DAT細胞による機能解析から、カチノン系化合物の精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。

A. 目的

新しく合成された精神活性物質が危険ドラッグとして流通しており、その乱用拡大が社会問題となっている。代表的な危険ドラッグとしては、覚醒剤やコカインと類似作用を示すカチノン系化合物の広がり深刻であり、次々に新規の化合物が登場している^{1,2,3)}。

カチノン系化合物は、モノアミントランス

ポーター [ドパミントランスポーター (dopamine transporter; DAT)、セロトニントランスポーター (serotonin transporter; SERT)、ノルエピネフリントランスポーター (norepinephrine transporter; NET)] 阻害作用により、モノアミン神経伝達物質 (ドパミン、セロトニン、ノルエピネフリン) の細胞内取り込みを抑制することで、細胞間隙のモノアミン量を増加させることが、薬理作用発現に

関与することが明らかになっている^{4,5)}。

本研究では、カチノン系化合物の行動薬理学的特性と作用点であるモノアミントランスポーターDAT、SERT、NET に対する作用について検討し、行動薬理学的特性の発現とモノアミントランスポーター機能調節との関連性について検討した。また、本研究から得られる動物実験と細胞による実験からのデータの関係性を解析することで、有害作用予測の迅速化の可能性について考察した。

B. 方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25 - 30g、日本クレア) を使用した。

使用薬物：カチノン系化合物として、麻薬に指定されている 3-fluorophenmetrazine (3-FPM)、4-chloromethcathinone (4-CMC)、4-fluoro-amphetamine (4-FA)、 β -keto-1,3-benzodioxolyl-N-ethylbutanamine (Eutylone)、3,4-methyl-enedioxypyrovalerone (MDPV)、N-ethylhexedrone (NEH)、 α -pyrrolidinohexiphenone (PV-7)、 α -pyrrolidinopentiphenone (α -PVP)の 8 種類を対象とした (Fig. 1)。

1. モノアミントランスポーター阻害作用

Human Embryonic Kidney 293 (HEK-293) ヒト胎児腎細胞 293 細胞にヒト-DAT cDNA、ヒト-SERT cDNA、ヒト-NET cDNA をトランスフェクションし、モノアミントランスポーター発現安定細胞：HEK-DAT 細胞、HEK-SERT 細胞、HEK-NET 細胞を樹立した。各細胞を poly-D-Lysin コートした 96 well black plate (Greiner) に 5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C・5.0% CO₂ 条件下で培養した。カチノン系化合物を細胞に添加し 10 分間 37°C でインキュベーションした。その後 Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit (Molecular Devices)* のプロトコルに従って DAT、SERT、NET に対する取込み阻害作用

を解析した。機能の選択性に関しては、選択的 DAT 阻害薬: GBR-12909、選択的 SERT 阻害薬: Fluoxetine、選択的 NET 阻害薬: Nisoxetine および選択的 VMAT2 阻害薬: Tetrabenazine を使用して確認した。

(*本 assay kit では、モノアミン類に類似した蛍光物質を使用する。本蛍光物質がモノアミントランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、細胞内における蛍光量の増加を測定することで取り込み能力の評価が可能となっている。)

2. カチノン系化合物の精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒 2 区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、カチノン系化合物を 1 日おきに投与し、30 分間装置内に閉じ込め、6 日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である 0.1% DMSO 含有生理食塩液を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした (Table 1)。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎：薬物、○：溶媒、T：テスト（薬物、溶媒ともに処置せず）

テストセッションは、7 日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

3. 相関性解析

8 種類のカチノン系化合物について、報酬効果スコアと細胞実験で得られたモノアミントランスポーター阻害作用強度 (1/IC₅₀ 値) の相関性について検討した。

4. 統計解析

全てのデータは、Prism 7 for Mac OS X に

より解析した。8種類のカチノン系化合物について、行動薬理学的データは一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、ポストホックテストとして Dunnett's multiple comparison test により比較した。報酬効果スコアと細胞実験で得られたモノアミントランスポーター阻害作用強度の相関性については、Prism 7 for Mac OS X: Linear Regression を使用して解析した。

C. 結果

1. モノアミントランスポーター阻害作用

樹立した HEK-DAT 細胞、HEK-SERT 細胞、HEK-NET 細胞について、選択的 DAT 阻害薬である GBR-12909、選択的 SERT 阻害薬である Fluoxetine、選択的 NET 阻害薬である Nisoxetine および選択的 VMAT2 阻害薬である Tetrabenazine による取り込み阻害作用の選択性を検討した。HEK-DAT 細胞について、取り込み作用の選択性を確認したところ、選択的 DAT 阻害薬である GBR-12909 ($IC_{50}=2.52 \times 10^{-8}$ M)の作用がもっとも強力であったことから、樹立した HEK-DAT 細胞は DAT を介する伝達物質の取り込みを選択的に評価できることを確認した。同様に、HEK-SERT 細胞および HEK-NET 細胞についても機能選択性を確認した。機能確認後、HEK-DAT 細胞、HEK-SERT 細胞、HEK-NET 細胞を使用して解析を行った。

8種類のカチノン系化合物について、DAT 阻害作用(IC_{50} 値: $5.2 \times 10^{-8} \sim 7.1 \times 10^{-6}$ M)、SERT 阻害作用(IC_{50} 値: $2.0 \times 10^{-6} \sim 5.6 \times 10^{-4}$ M)、NET 阻害作用(IC_{50} 値: $1.8 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-6}$ M)であった。8種類のカチノン系化合物について、取り込み阻害作用は DAT > NET > SERT であり、DAT 取り込み阻害作用が強い傾向が確認された (Table 1)。

2. カチノン系化合物の精神依存性評価

マウスを使用して conditioned place

preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った。カチノン系化合物の条件付けによって CPP の発現、すなわち報酬効果の発現が認められた (Table 1)。

3. 相関性解析

8種類のカチノン系化合物による報酬効果とモノアミントランスポーター阻害作用強度 ($1/IC_{50}$ 値)の相関性について検討したところ、DAT 阻害作用において有意な相関性 ($R^2=0.94$ (Slope: $F(1,6)=85.1$, $P<0.0001$) が認められた (Fig. 2)。一方、SERT 阻害作用 (SERT: $R^2=0.042$) および NET 阻害作用 (NET: $R^2=0.001$) においては、有意な相関性は確認されなかった。

D. 考察

本研究では、麻薬に指定されているカチノン系化合物 8種類について、行動薬理学的解析を行った。すべてのカチノン系化合物により報酬効果が発現し、精神依存性を示すことが確認された。

次に、モノアミントランスポーター機能調節に関する研究として、DAT、SERT、NET 発現細胞を用いてカチノン系化合物のモノアミン取り込み阻害作用について検討した。すべてのカチノン系化合物は、DAT、SERT、NET 取り込み阻害作用を示した。取り込み阻害作用の強度は、DAT > NET > SERT であり、DAT 取り込み阻害作用が強い傾向が確認された。カチノン系化合物に関する先行研究でも、DAT 阻害作用が強い傾向が確認されており、本研究での評価方法は妥当であると考えられる^{5,6,7}。

本研究では、カチノン系化合物の行動薬理学的特性と作用点であるモノアミントランスポーター (DAT、SERT、NET) に対する作用について検討し、行動薬理学的特性の発現とモノアミントランスポーター機能調節との関連性について解析した。8種類のカチノン系化合物による報酬効果とモノアミントランスポーター阻害作用強度の相関性について検討

したところ、DAT 阻害作用において有意かつ良好な相関性 ($R^2=0.934$, $P<0.0001$) が認められた。一方、SERT 阻害作用および NET 阻害作用については有意な相関性は確認されなかった。

本研究の解析から、カチノン系化合物による報酬効果の発現強度は、DAT 阻害作用強度と相関することが明らかになった。したがって、HEK-DAT 細胞による機能解析から、カチノン系化合物の精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。現在のカチノン系化合物に関する包括指定対象薬物は、運動促進作用、報酬効果と DAT 阻害作用の関連性が示唆されている。本研究で解析対象としたカチノン系化合物群は、現在のカチノン系化合物包括指定範囲に含まれないものである。本研究の行動解析および細胞解析データを利用して、カチノン系化合物の包括指定範囲を拡大することが可能であると考えられる。

本研究で確認された動物実験と DAT 細胞による機能解析法は、総合的な有害作用評価システムとして、評価の迅速化のために有用な手法であると考えられる。さらに、カチノン系化合物包括指定範囲の拡大のために貢献できる解析手法であると期待される。

E. 結 論

本研究では、カチノン系化合物の行動薬理学的特性と作用点であるモノアミントランスポーター (DAT, SERT, NET) に対する作用について検討し、行動薬理学的特性の発現とモノアミントランスポーター機能調節との関連性について検討した。本研究の解析から、カチノン系化合物による精神依存性の発現強度は、DAT 阻害作用強度と相関することが明らかになった。したがって、HEK-DAT 細胞による機能解析から、カチノン系化合物の精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。本研究で確認された動物実験と細胞による総合的な有害作用評価システムは、カチノン系化合物包括指定範囲の拡大のため

に貢献できる解析手法であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Kelly JP. Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal.* 3(7-8): 439-453, 2011.
- 2) Ford LT, Berg JD. Analysis of legal high materials by ultra-performance liquid chromatography with time of flight mass spectrometry as part of a toxicology vigilance system: what are the most popular novel psychoactive substances in the UK? *Ann Clin Biochem.* 54: 219-229, 2017.
- 3) Fornal E. Identification of substituted cathinones: 3,4-Methylenedioxy derivatives by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 81-82, 13-19, 2013.
- 4) Baumann MH, Ayestas MA Jr, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho AE, Cozzi NV. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuro-psychopharmacology.* 37(5): 1192-1203, 2012.
- 5) Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechi ME. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol.* 168(2): 458-470, 2013.
- 6) Eshleman AJ, Wolfrum KM, Reed JF, Kim SO, Swanson T, Johnson RA, Janowsky A. Structure-Activity Relationships of Substituted Cathinones, with Transporter Binding, Uptake, and Release. *J Pharmacol Exp Ther.* 360(1): 33-47, 2017.

- 7) Eshleman AJ, Nagarajan S, Wolfrum KM, Reed JF, Swanson TL, Nilsen A, Janowsky A. Structure-activity relationships of bath salt components: substituted cathinones and benzofurans at biogenic amine transporters. *Psychopharmacology (Berl)*. 236(3): 939-952, 2019.

健康危険情報

本事業成果は、危険ドラッグおよび指定薬物の精神依存性および細胞毒性に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦, 富山健一: 大麻規制の現状と課題. *都薬雑誌*, 43: 4-7, 2021.
- 2) Tomiyama K, Funada M.: Synthetic cannabinoid CP-55,940 induces apoptosis in a human skeletal muscle model via regulation of CB₁ receptors and L-type Ca²⁺ channels. *Arch Toxicol*. 95(2): 617-630, 2021.

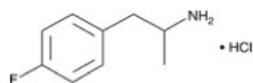
2. 学会発表

- 1) Funada M, Tomiyama K: Effects of cannabinoids on ethanol-induced motor impairment using the rotarod performance test in mice. CPDD 83th Annual Scientific Meeting, U.S.A. June 22, 2021: Web Zoom.
- 2) 富山健一, 船田正彦: 北米における嗜好用大麻の使用実態について, 令和3年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 三重, 2021年12月17-19日.

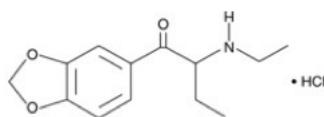
H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし

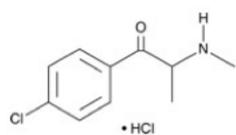
B



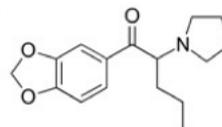
4-fluoroamphetamine (4-FA)



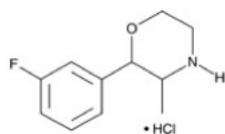
β -keto-1,3-benzodioxolyl-N-ethylbutanamine (Eutylone)



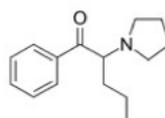
4-chloromethcathinone (4-CMC)



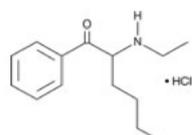
3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV)



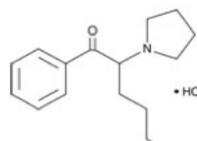
3-fluorophenmetrazine (3-FPM)



α -pyrrolidinopentiophenone (α -PVP)



N-ethylhexedrone (NEH)



α -pyrrolidohexiophenone (PV-7)

Fig. 1. Chemical structures of amphetamine-like drug and cathinones.

Table 1. Inhibition of monoamine transporter uptake by synthetic cathinones.

	Drug	CPP(score)	DAT	SERT	NET
1	4-FA	75	7.05×10^{-6}	1.56×10^{-4}	1.96×10^{-6}
2	4-CMC	70	5.73×10^{-6}	2.18×10^{-4}	3.16×10^{-6}
3	3-FPM	85	5.28×10^{-6}	2.93×10^{-4}	7.59×10^{-6}
4	NEH	90	1.26×10^{-6}	3.89×10^{-4}	3.38×10^{-6}
5	Eutylone	100	8.24×10^{-7}	9.54×10^{-6}	7.18×10^{-6}
6	MDPV	220	5.21×10^{-8}	2.01×10^{-6}	5.52×10^{-7}
7	α -PVP	198	8.70×10^{-8}	5.72×10^{-5}	1.79×10^{-7}
8	PV-7	190	1.22×10^{-7}	5.60×10^{-4}	7.48×10^{-7}

Effect of synthetic cathinones on neurotransmitter transporter uptake at DAT, SERT or NET. For transporter bioassay. The 50% inhibitory concentration (IC_{50} , M) values calculated using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

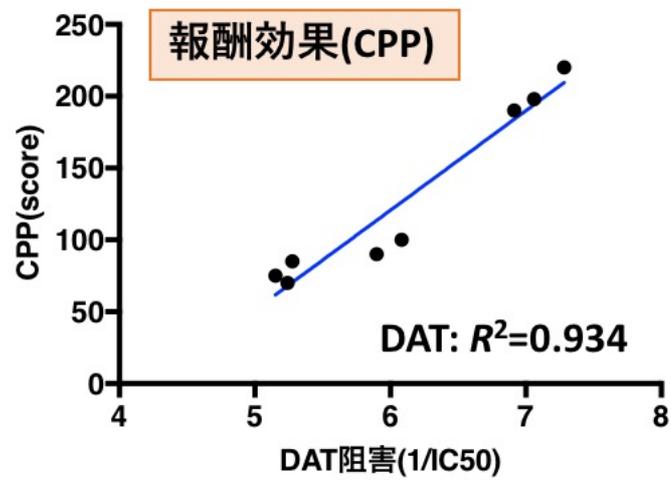


Fig. 2.

Correlation between potencies at inhibition of uptake at DAT and rewarding effects (CPP). The linear regression line is shown using GraphPad Prism 7 (Linear Regression). Correlation (R^2) is as follows: DAT: $R^2=0.934$, SERT: $R^2=0.042$, NET: $R^2=0.001$.

令和元年度～令和3年度
国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費
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
(課題番号：1-1)

分担研究報告書

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（湘南医療大学 薬学部）

研究協力者：湯山円晴（国際医療福祉大学 薬学部）

【研究要旨】

危険ドラッグの迅速な規制にはインシリコ活性予測法の開発が必要不可欠である。従来、危険ドラッグ等の規制薬物のインシリコ活性予測には定量的構造活性相関（QSAR）法が用いられてきた。

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規制薬物のインシリコ活性予測法の開発を行うことを目的とする。

1) **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 5XR8, 5XR8 (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。

2) **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 種をドッキング対象とした。次に使用する合成カンナビノイドのデータは部分構造にアミノ酸を持つ基本骨格を有し、R 体及び S 体の活性値が得られている 8 組 (16 化合物) を用いた。

3) **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しうる場所を 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。

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。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。さらに予測精度を向上させるため、スコアリング関数を変更したり、配座探索回数を増やしたりするなどの条件検討を行う必要がある。

A. 目的

危険ドラッグの迅速な規制にはインシリコ活性予測法の開発が必要不可欠である。従来危険ドラッグ等の規制薬物のインシリコ活性予測には定量的構造活性相関 (QSAR) 法が用いられてきた。

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規制薬物のインシリコ活性予測法の開発を行うことを目的とする。

B. 方法

①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、5XRA¹⁾ 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。

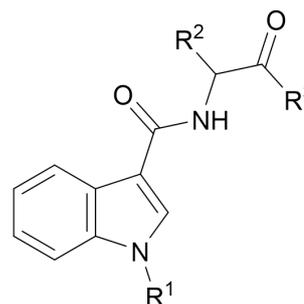


図 1. 基本骨格

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 5XRA¹⁾ (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²⁾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。立体構造データの预处理として 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しうる場所を 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。

②近年の構造活性相関研究より、図 1 のような構造を持つ合成カンナビノイドは既存カンナビノイドに比べ強力なカンナビノイド受容体アゴニストとして作用することが示唆されている。³⁾そこで今回、下記の基本骨格を有する化合物を対象にドッキングスタディの手法を用いた活性予測を試みた。

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 5XR8¹⁾ (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図 1 の基本骨格を有し、R 体及び S 体の活性値が得られている 8 組 (16 化合物) を用いた。

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。立体構造データの预处理として 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しうる場所を Dummy-site として登録した。ドッキングの結果得られた S 値を補正し、-S 値とした。

C. 結果

①S 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)

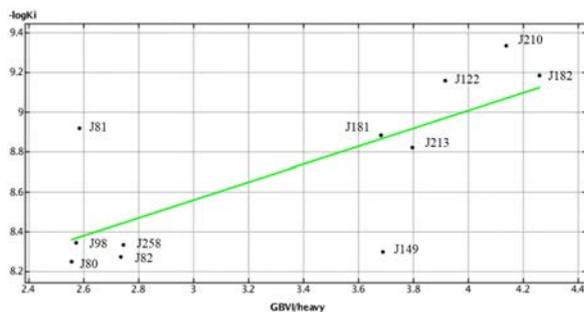


図 1

②ドッキングスコア-S値と実測活性値 pEC_{50} の相関について検討したところ、実測値と同様に S 体の方が予測値も高くなる結果が得られた化合物は 8 組中 4 組に留まった。(図 2) 活性値と予測値の関連が良好な化合物は図 3 のような構造を有していた。

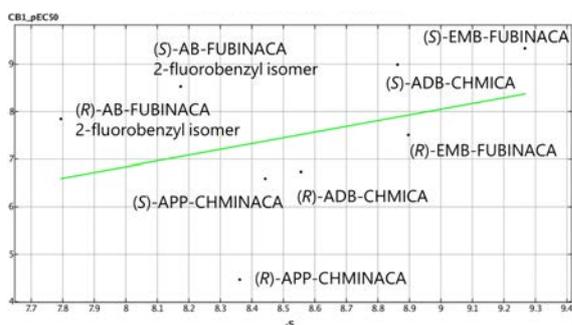


図 2. ドッキングスタディの結果

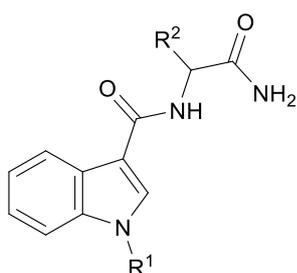


図 3 活性値と予測値の関連が良好な構造

D. 考察

①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 K_i 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。

②ドッキングについては 8 組中 4 組で立体異性体の違いによる活性差を反映するスコアが得られているが、さらに予測精度を向上させるため、スコアリング関数を変更したり、配座探索回数を増やしたりするなどの条件検討を行う必要がある。

E. 結論

本研究により危険ドラッグのインシリコ活性予測に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規制薬物のインシリコ活性予測法の開発を検討した。その結果、ドラッグスタディによる活性予測の可能性を示した。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。さらに予測精度を向上させるため、スコアリング関数を変更したり、配座探索回数を増やしたりするなどの条件検討を行う必要がある。条件検討をまとめると以下のようになる。

- ①スコアリング関数の変更→系にあった計算法が見つかる
- ②スコアの規格化→原子数が多い場合の影響を補正できる
- ③ファーマコフォアの設定→ポーズを拘束できるので妥当な配座が見つかる
- ④Induced Fit での構造最適化→リガンドが元のリガンドサイズより大きい時に有効

F. 参考文献

- 1) Hua, T., Vemuri, K., Nikas, S.P., Laprairie, R.B., Wu, Y., Qu, L., Pu, M., Korde, A., Jiang, S., Ho, J.H., Han, G.W., Ding, K., Li, X., Liu, H., Hanson, M.A., Zhao, S., Bohn, L.M., Makriyannis, A., Stevens, R.C., Liu, Z.J., Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1, *Nature*, 2017, 547: 468-471.

- 2) J. L. Wiley, V. J. Smith, J. Chen, B. R. Martin, J. W. Huffman, Synthesis and pharmacology of 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles: steric and electronic effects of 4- and 8-halogenated naphthoyl substituents, *Bioorg Med Chem*, 2012, 20:2067-81.
- 3) J. L. Wiley, J. A. Marusich, T. W. Lefever, K. R. Antonazzo, M. T. Wallgren, R. A. Cortes, P. R. Patel, M. Grabenauer, K. N. Moore, B. F. Thomas, AB-CHMINACA, AB-PINACA, and FUBIMINA: Affinity and potency of novel synthetic cannabinoids in Producing Δ^9 - tetrahydrocannabinol-like effects in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 354, 328–339.
- 4) 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*, 2020, 68(8), 773-778

健康危険情報

本事業成果は、危険ドラッグおよび指定薬物の精神依存性および細胞毒性に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

令和元年度～令和3年度
国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費
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
(課題番号：1-1)

分担研究報告書

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（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）
研究協力者：万夏雲（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）
研究協力者：江口哲史（千葉大学・予防医学センター 環境健康学）
研究協力者：森千里（千葉大学・予防医学センターおよび大学院医学研究院 環境生命科学）

【研究要旨】

多くの疫学研究から、思春期の大麻の使用は、成人期以降の精神病の発症リスクを高めることが知られている。しかしながら、思春期の大麻使用が成人期の精神疾患発症にどのように関わっているか不明であった。一方、様々な精神疾患の病因に腸内細菌叢の異常が報告され、脳-腸相関の重要性が提唱されている。今回、マウスの思春期(P35-P45)に合成カンナビノイド系化合物 WIN55,2121-2 (2mg/kg/day)あるいは生理食塩水を投与した。その後、何も処置せず、成人期 (P70) に炎症を惹起させるリポポリサッカライド (LPS: 0.5 mg/kg) を投与した。LPS 投与前に新鮮な糞を採取し、腸内細菌叢を解析した。投与 24 時間後に血液と脳部位（前頭皮質、海馬、側坐核）を採取した。血液は炎症性サイトカインとメタボローム解析で代謝物を測定した。

前頭皮質および側坐核におけるミクログリアの活性化は、WIN55,2121-2 群の方が生理食塩水投与群より有意に高かった。一方、血液中の炎症性サイトカイン濃度は両群で差が無かった。腸内細菌叢解析では、 α および β 多様性には有意な差は無かったが、両群で有意に差が認められた腸内細菌が見つかった。興味深いことに、腸内細菌の相対的分布と脳におけるミクログリア活性化の間に相関が認められた。さらに、腸内細菌の相対的分布と血液中の代謝物の間に相関が認められた。

これらの結果は、思春期におけるカンナビノイド受容体の刺激は、成人期におけるストレス（炎症）に対して脆弱性を示すことが示唆され、長期にわたる腸内細菌の異常が関与している可能性が示唆された。腸内細菌-脳ミクログリアのクロストークが、思春期の大麻使用と成人期における精神病リスクに関わっている可能性がある。

A. 目的

大麻の安全性が確認されていないにも関わらず、欧米では、娯楽用大麻の合法化が加速している。これまでの多くの疫学研究から、若年層における大麻の使用は、成人期における精神疾患の発症リスクを高くすることが知られている (1,2)。しかしながら、生物学的機序は不明である。

近年、脳-腸相関の異常が多くの精神疾患の病態に関わっている知見が蓄積されている (3,4)。しかしながら、思春期における大麻の使用が、成人期の腸内細菌にどのような影響を与えるかは不明である。これまでマウスを用いた実験において、思春期 (P35-P45) にカンナビノイド受容体作動薬 WIN55,2121-2 を投与すると、成人期 (P70-P74) における覚せい剤投与による運動量亢進が生じること、また側坐核の脳由来神経栄養因子の亢進が関与していることを報告し

た (5)。

本研究の目的は、思春期 (P35-P45) に WIN55,212-2 を投与し、成人期 (P70-P74) における腸内細菌叢に影響を与えるかを調べることである。さらに、成人期に炎症を引き起こす化合物リポポリサッカライド (LPS) を投与し、血液中の炎症性サイトカイン濃度や腸内細菌が生成する代謝物、脳におけるミクログリアの活性化を測定した。

B. 方法

動物試験

実験には C57/B6 マウス (雄性、4 週齢、日本 SLC 社) を使用した。P35 から P45 の間に生理食塩水 (10 ml/kg) あるいは WIN55,212-2 (2 mg/kg/day) を合計 11 日間、腹腔内投与した。その後、通常の飼育を行い、成人期 (P70) に新鮮な糞を採取した。その後、LPS (0.5 mg/kg) を腹腔内投与し、翌日に血液および脳部位 (前頭皮質、海馬、側坐核) を採取した。脳におけるミクログリア Iba1 の発現をウエスタンブロット法にて測定した。血液中の炎症性サイトカイン (IL-6 and TNF-alpha) 濃度は ELISA で測定した。腸内細菌叢解析は 16s rRNA 解析で実施した。短鎖脂肪酸は、ガスクロマトグラフィーで測定した。血液中の代謝物は、メタボローム解析で測定した。

C. 結果

成人期に LPS を投与し、炎症を引き起こすと、両群の血液中の炎症性サイトカイン濃度には影響を与えないが、前頭皮質および側坐核における Iba1 の発現が増加し、ミクログリアの活性化が有意に増加した (図 1)。一方、海馬では差がなかった。

思春期における WIN55,212-2 の投与は、成人期における腸内細菌叢の多様性 (α および β) には影響を与えなかった。しかしながら、LEfSe 解析では WIN55,212-2 群に特有な腸内細菌が同定された (図 2)。

さらに、両群で有意に異なる個別の腸内細菌を認めた。腸内細菌により生成される短鎖脂肪酸は両群で差がなかった。メタボローム解析により、両群で異なる代謝物を同定し、また代謝物と腸内細菌の間に相関が認められ

た (図 3)。

興味深いことに、ある種の腸内細菌の分布と脳内ミクログリアの発現の間に有意な相関関係が認められ、腸内細菌が脳ミクログリアに影響を与える可能性が示唆された (図 4)。

D. 考察

本研究の結果より、思春期におけるカンナビノイド系薬剤の使用は、長期にわたり腸内細菌叢の異常を来し、腸内細菌が脳ミクログリアの発現に影響を与える可能性が示唆された (6)。最近の研究では、腸内細菌が脳内のミクログリア活性化に影響を与える可能性が示唆されている (7)。さらに、ストレス、炎症などに対する脆弱性が増加する可能性も示唆され、脳炎症の亢進が精神疾患の発症リスクを高める可能性がある。

E. 結論

近年わが国において、若年層の大麻使用者が増加していることが新聞等で社会問題になっている。これまでの海外の多くの疫学研究から、大麻の使用は、精神病の発症リスクを高めることが知られており、その機序として、腸内細菌叢の異常が関わっている可能性がある。早期に腸内細菌叢の改善を目的とした治療を行うことにより、精神病の発症を予防できる可能性もある。

F. 参考文献

- 1) Andréasson S, Allebeck P, Engström A, Rydberg U: Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet*, 1987; 2:1483-1486.
- 2) Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G: Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 2007; 370: 319-328
- 3) Chang L, Wei Y, Hashimoto K: Brain-gut-microbiota axis in depression: A historical overview and future directions. *Brain Res. Bull.* 2022; 182: 44-56.

- 4) Wei Y, Wang T, Liao L, Fan X, Chang L, Hashimoto K: Brain-spleen axis in health and diseases: A review and future perspective. *Brain Res. Bull.* 2022; 182: 130-140.
- 5) Dong C, Tian Z, Zhang K, Chang L, Qu Y, Pu Y, Ren Q, Fujita Y, Ohgi Y, Futamura T, Hashimoto K: Increased BDNF-TrkB signaling in the nucleus accumbens plays a role in the risk for psychosis after cannabis exposure during adolescence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2019; 177: 61-68.
- 6) Wan X, Eguchi A, Qu Y, Yang Y, Chang L, Shan J, Mori C, Hashimoto K: Gut-microbiota-brain axis in the vulnerability to psychosis in adulthood after repeated cannabis exposure during adolescence. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* In press.
- 7) Yang Y, Ishima T, Wan X, Wei Y, Chang L, Zhang J, Qu Y, Hashimoto K: Abnormalities in gut microbiota composition and short-chain fatty acids in mice after repeated administration of colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX5622. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2022; 272: 483-495.

健康危険情報

本事業成果は、カンナビノイド系化合物の長期にわたる副作用（腸内細菌叢の異常）に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

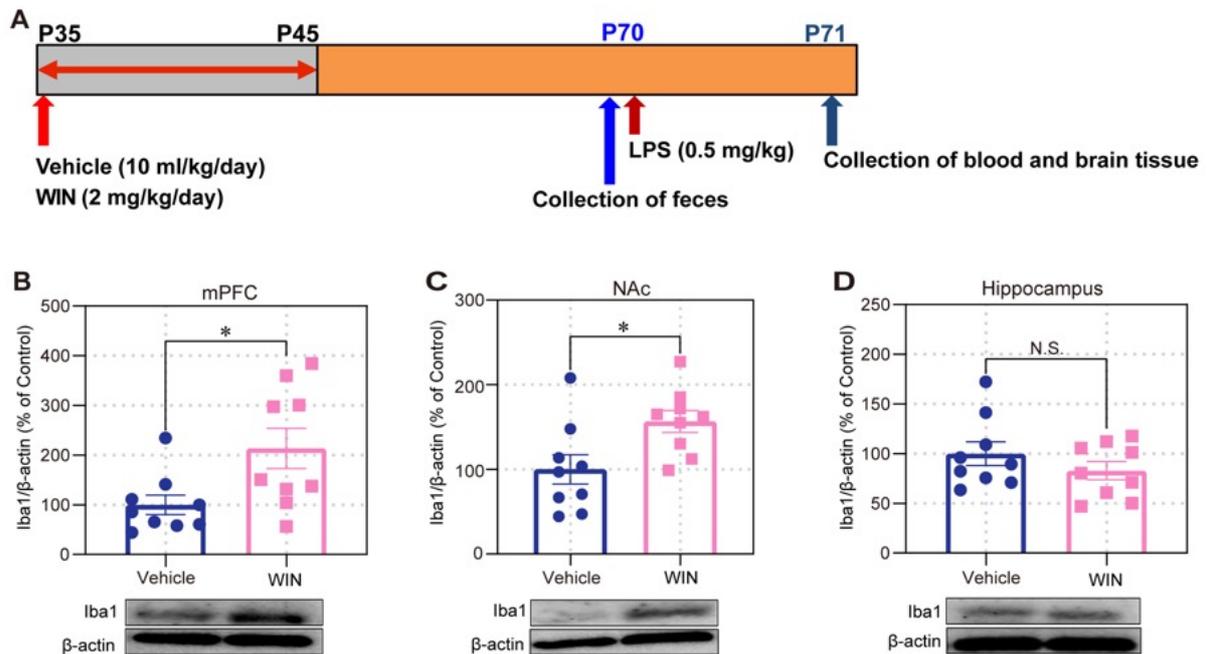


Figure 1. Experimental schedule and the expression of microglial marker in the brain

A: Experimental schedule. Vehicle (10 ml/kg/day) or WIN55,212-2 (2 mg/kg/day) was administered i.p. into mice from P35 to P45. On P70, fresh fecal samples were collected before LPS (0.5 mg/kg) administration. B, C, D: Western blot analysis of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) and β -actin in the medial prefrontal cortex (mPFC), nucleus accumbens (NAc) and hippocampus. The values represent the mean \pm S.E.M. Unpaired Student's t-test (n = 9). *P < 0.05, N.S.: not significant.

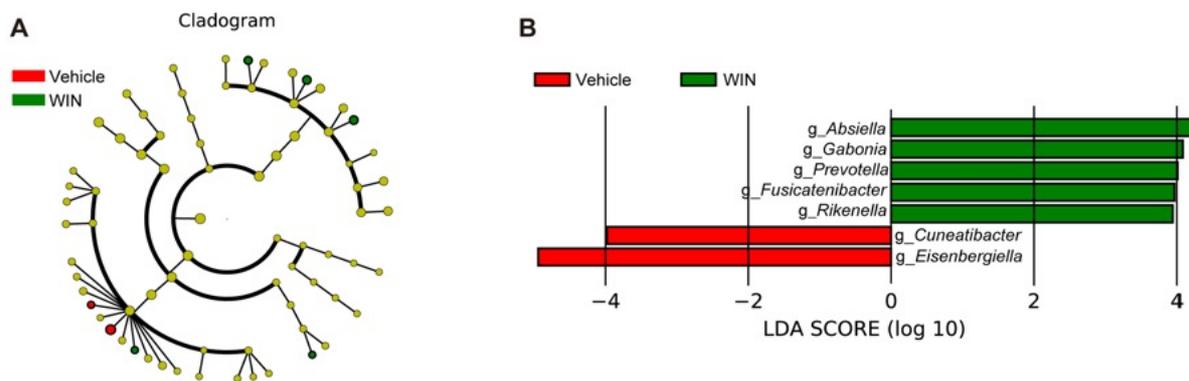


Figure 2. LefSe analysis of gut microbiota

A: Evolutionary branching diagram obtained from LefSe analysis. B: The histogram shows the overrepresented taxa with LDA score of 3.0 or higher. Wilcoxon rank-sum test (n=9). LDA: linear discriminant analysis. LefSe: linear discriminant analysis effect size. N.S.: not significant. WIN: WIN55,212-2.

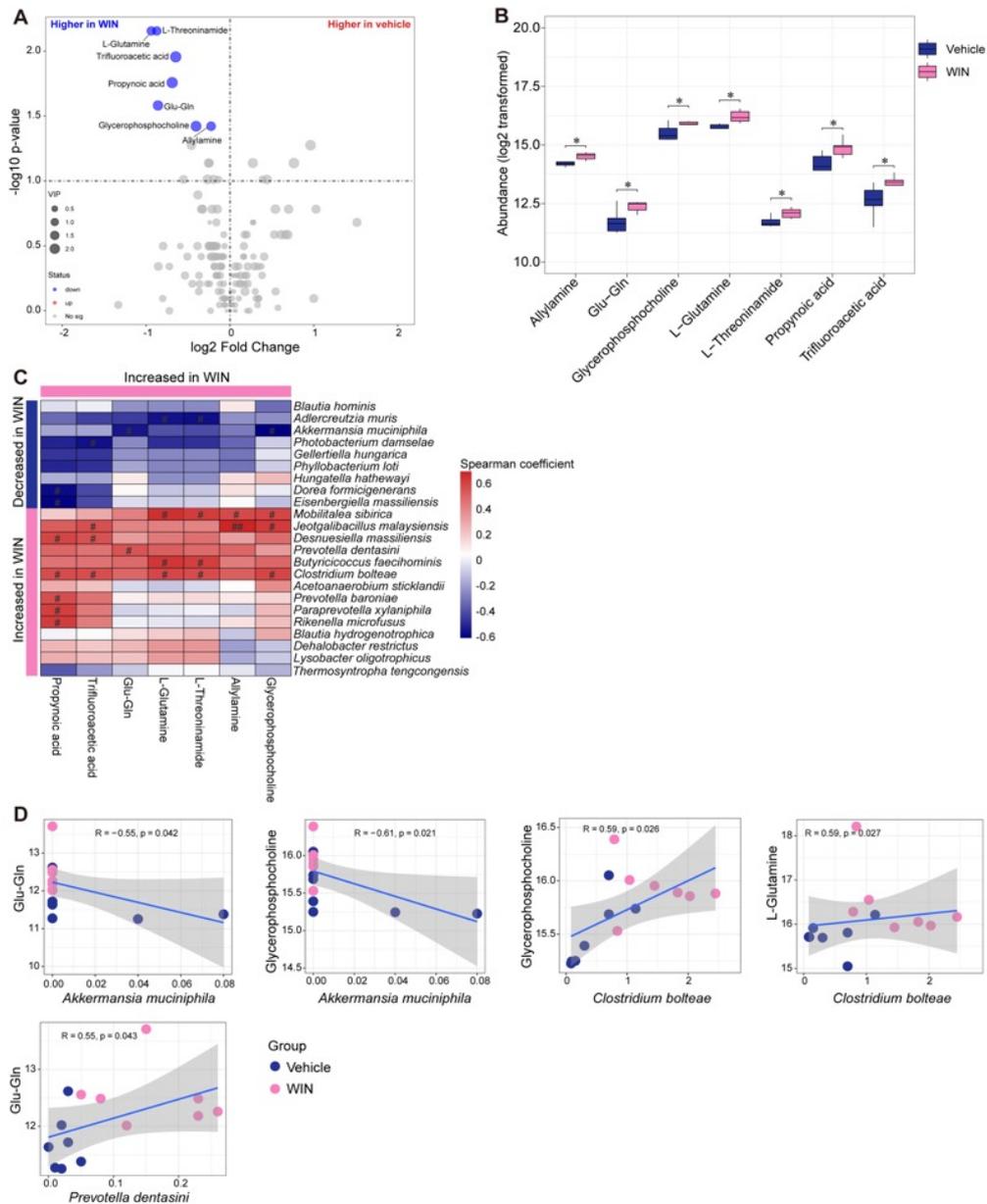


Figure 3. Effects of adolescent WIN 55,212-2 exposure on plasma metabolites in the adult mice

A: Volcano plot shows the differential metabolites between the two groups. The X-axis indicates the log₂-transformed plasma metabolite abundance of fold change, and the y-axis indicates the -log₁₀-transformed P value using the Wilcoxon rank sum test. Horizontal lines indicate P < 0.05. Metabolites with increased or decreased metabolites are marked in red and blue, respectively. The size of the dot represents the size of the VIP value. Metabolites with P < 0.05 and VIP > 1.0 are marked in text. B: Changes in metabolic characteristics associated with WIN 55,212-2 group (the relative abundance data of metabolites were transformed with log₂, Wilcoxon Rank sum test). C: Spearman correlation between WIN55,212-2-associated bacteria and WIN55,212-2-associated plasma metabolites. D: Representative taxon - metabolite correlation diagram. *P_{FDR} < 0.05, #P < 0.05, ###P < 0.01. VIP: variable importance in projection.

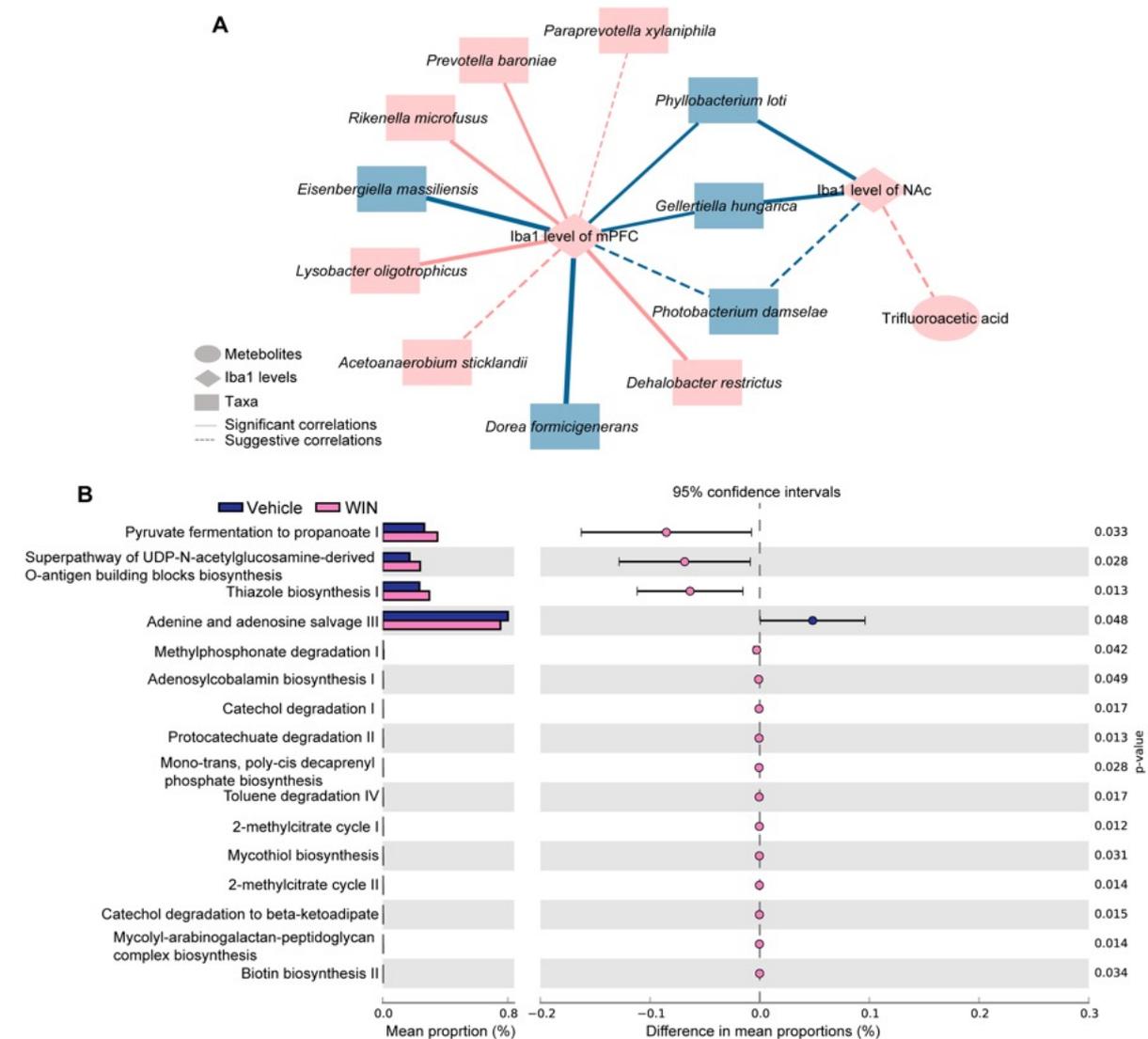


Figure 4. An integrated association network representing host-microbe interactions, gut microbiome, metabolic profiles and Iba1 levels in the brain regions

A: Network revealing the association between differentially abundant taxa or metabolites in the WIN 55,212-2 group and vehicle group and Iba1 expression in the mPFC and NAc, Spearman correlation analysis (absolute correlation coefficient > 0.4), nodes represent enriched (red) or depleted (blue) features in the WIN 55,212-2 group compared to vehicle group. The red line connecting the nodes indicates positive correlation and the blue line indicates negative correlation. Solid lines represent significant correlations ($P_{FDR} < 0.05$), and dashed lines indicate suggestive correlations ($P < 0.05$). B: PICRUSt2 predicted differential pathways between the WIN 55,212-2 group and vehicle group.

令和元年度～令和3年度
国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費
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
(課題番号：1-1)

分担研究報告書

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（福岡大学薬学部 生体機能制御学研究室）

【研究要旨】

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。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。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。本研究は、マウスを用いて、THC の連日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目的で実施した。

THC の連日投与が CB 受容体を介した薬理作用に与える影響を検討するために、マウスに THC を3日間毎日、腹腔内投与して、直腸温を測定した。また、CB₁ 受容体拮抗薬 SR141716A を使用した。その結果、THC は、マウスの直腸温を有意に低下させた。CB₁ 受容体拮抗薬 SR141716A は THC による直腸温低下作用を有意に抑制した。THC 投与3日目について、THC による直腸温低下作用は減弱していた。THC を連日投与する際に SR141716A を併用すると THC による薬理作用の減弱は見られなかった。よって、THC を連日投与することで、CB₁ 受容体が刺激されると THC による直腸温低下作用に耐性が形成されることを明らかにした。また、THC を連日投与した後、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。

本研究により、大麻は使用経験などの生体がおかれた状況によって、CB 受容体を介した薬理作用が変化することが示唆された。今後、生体がおかれた状況が CB 受容体を介して起こる薬理作用に与える影響について、その制御機構を解析することは、大麻が示す作用の不安定さを表すエビデンスとなることが期待される。

A. 目的

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 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) などの生体内リガンドが存在する(1,2)。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 (3)。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。本研究は、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、マウスを用いて、THC の連日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目的で実施した。

B. 方法

実験動物

実験には ICR 系マウス (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。

薬物投与

CB₁ 受容体拮抗薬 SR141716 を腹腔内投与した後、THC を腹腔内投与した。各薬物は 3 日間連続で併用した。薬物を投与している期間、THC を投与した後、直腸温を測定した。また、各薬物を 3 日間連続投与した後、4 日間休薬して (投与開始から 7 日目)、THC を単独で投与した。単独で THC を投与した後、直腸温を測定した。

直腸温の測定

マウスの直腸温は、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、THC を投与したマウスの直腸温を 30 秒間記録した。

遺伝子発現量解析

THC を連日投与した後、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。

C. 結果

1. THC 連日投与による耐性形成

THC の投与開始 1 日目について、THC を投与してから 2 時間目まで、マウスの直腸温を経時的に測定した結果、THC は投与 1 時間後のマウスの直腸温を有意に低下させた (Fig. 1)。THC は、投与 1 時間後、マウスの直腸温度を有意に低下させ、2 時間後には正常体温にまで回復した。また、THC 投与開始から 3 日目について、THC による直腸温降下作用は減弱しており、THC による有意な直腸温降下作用は認められなかった (Fig.1)。

2. THCの連日投与による耐性形成にCB₁受容体拮抗薬が与える影響

各薬物の投与開始1日目、THCは、マウスの直腸温を有意に降下させ、CB₁受容体拮抗薬SR141716AはTHCによる直腸温の降下を有意に抑制した(Fig. 2)。また、THCを3日間投与することで、THCによる直腸温降下作用は減弱した。各薬物の連日投与3日目、CB₁受容体拮抗薬SR141716AとTHCを併用したマウスの直腸温は降下しなかった。各薬物を3日間連続して投与した後、4日間投与を辞めた後(7日目)、THCを投与して、直腸温を測定した。その結果、THCのみ連日投与したマウスは3日目と同様にTHCによる直腸温降下作用が減弱していた。一方、THCを連日投与する際にSR141716Aを併用するとTHC投与時に直腸温が降下しており、THC連日投与による直腸温降下作用の減弱は見られなかった(Fig. 2)。

3. THC耐性形成時の遺伝子発現量の変化

THCを連続投与した後、THCによる直腸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(Fig. 3)。

D. 考 察

本課題により、THCを連日投与することで、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。また、薬理学的手法を用いて、THCの体温降下作用はCB₁受容体を介して起こることを確認した。更に、CB₁受容体拮抗薬を用いて、THCの薬理作用に耐性が形成される際、CB₁受容体を介して起こることを確認した。このとき、THCを連日投与したマウスの脳では多数の遺伝子発現量が増減することを明らかにした。THCの連日投与時に脳内環境が変化していることを示唆した。今後、薬理学的、分子生物学的手法を用いて、THCの薬理作用が減弱

する機構について、詳細が明らかになることが期待された。

E. 結 論

本課題の成果によって、大麻は使用経験などの生体がおかれた状況によって、CB受容体を介した薬理作用が変化することが示唆された。このことから、大麻を使用した際にCB受容体が刺激されることで、CB受容体を介した薬理作用の強弱が変化することを予想され、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。また、THCを連日投与したマウスの脳内環境が変化していたことは合成カンナビノイドなどの中枢作用および有害作用を考える上で有用な情報となると考えられた。

F. 参考文献

- 4) Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K.: 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.: *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97, 1995
- 5) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. : Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949, 1992
- 6) Martin B. R., Role of lipids and lipid signaling in the development of cannabinoid tolerance, *Life Sciences* 77,1543-1558, 2005

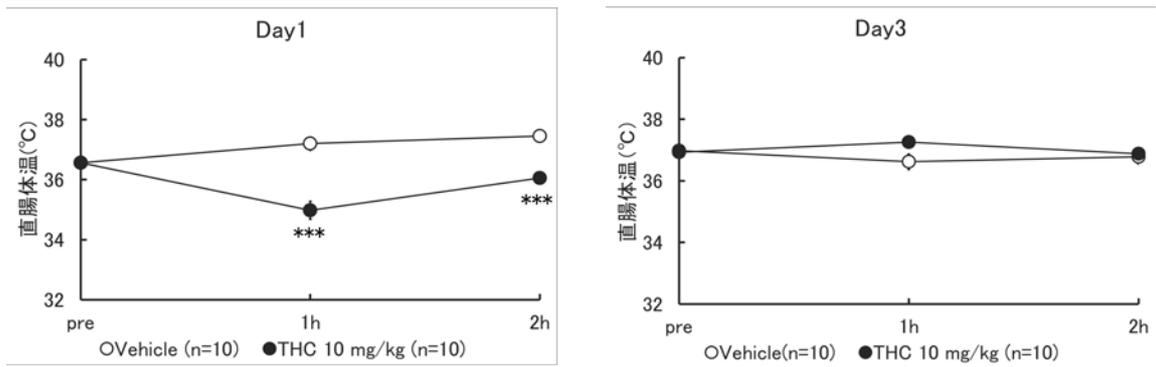


Fig. 1. Effect of daily treatment of THC on rectal temperature in mice.

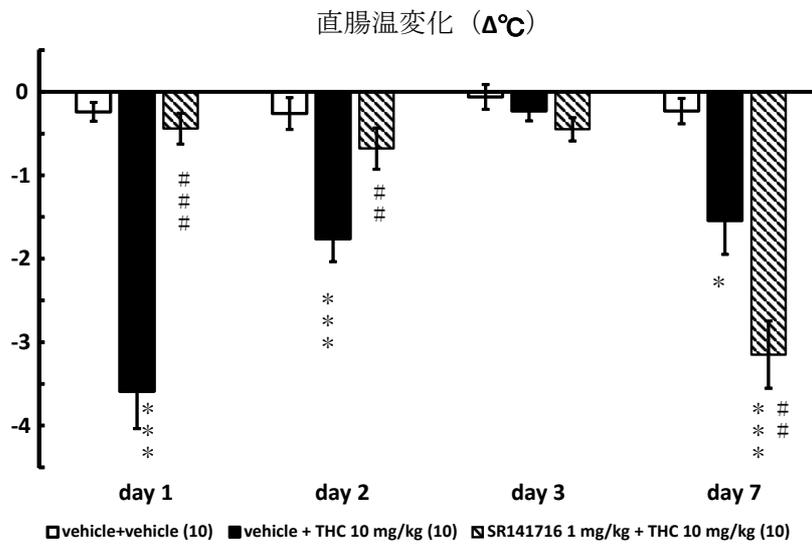


Fig. 2. Effect of SR141716A on tolerance to hypothermic effect of THC after daily treatment in mice.

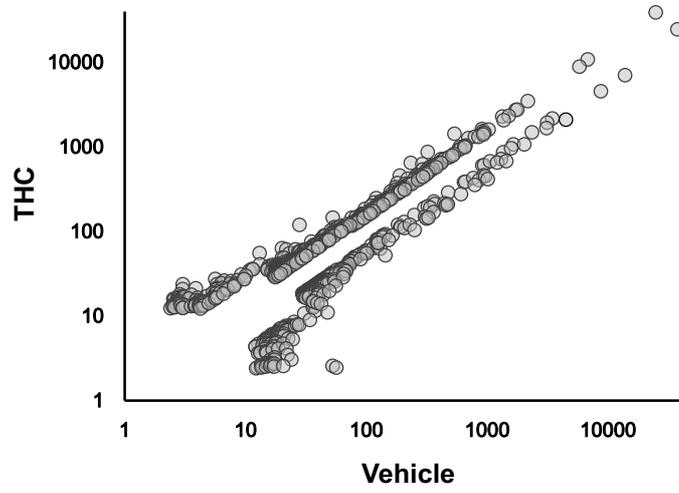


Fig. 3. Regulation of gene expression by daily treatment of THC in mice

令和元年度～令和3年度
国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費
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
(課題番号：1-1)

分担研究報告書

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 (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)
研究協力者 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)
山田大輔 (東京理科大学薬学部薬学科薬理学教室)
高橋秀依 (東京理科大学薬学部薬学科薬化学教室)
牧野宏章 (東京理科大学薬学部薬学科薬化学教室)
荒木拓嗣 (東京理科大学薬学部薬学科薬化学教室)
斎藤顕宜 (東京理科大学薬学部薬学科薬理学教室)

【研究要旨】

危険ドラッグの成分のひとつである合成カンナビノイド AB-FUBINACA は大麻成分の Δ^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。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。本研究は、これら先行研究を基盤として、AB-FUBINACA が脳シナプス伝達（特に情動中枢扁桃体）や文脈性恐怖記憶の獲得など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。実験には C57BL/6J マウス（雄性, 8 週齢）を使用した。マウス脳スライス中の扁桃体錐体細胞におけるシナプス伝達に対する AB-FUBINACA の作用をパッチクランプ法にて検討したところ、AB-FUBINACA 投与により扁桃体シナプス伝達が抑制される例が観察された。一方、マウスに AB-FUBINACA を腹腔内投与して恐怖条件づけ行動試験を行ったところ、濃度依存的かつ有意にマウスのすくみ反応時間が減少した。この減少は AM251 (CB1 受容体阻害薬) 前投与下での AB-FUBINACA 投与では見られなかった。AB-FUBINACA の腹腔内投与はマウスの作業記憶も CB1 受容体依存的に抑制した。さらに、AB-FUBINACA の腹腔内投与は、高濃度ではマウス心拍数を減少させた。本研究では、合成カンナビノイド AB-FUBINACA が扁桃体関連記憶である文脈性恐怖記憶の獲得を抑制すること等が示された。

A. 目的

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。危険ドラッグのひとつである合成カンナビノイド

AB-FUBINACA は大麻成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol 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。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 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²⁾。

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 が脳シナプス伝達（特に情動中枢扁桃体）や文脈性恐怖記憶の獲得など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。

B. 方法

1. マウス及び薬物

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（研究グループにて合成）を、カンナビノイド CB1 受容体阻害薬として AM251 を使用した。

2. 脳シナプス伝達

マウス脳スライス中の扁桃体錐体細胞におけるシナプス伝達に対する AB-FUBINACA の作用をパッチクランプ法にて電気生理学的に検討した³⁾。

3. 文脈性恐怖条件づけ試験

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。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。行動実験における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¹⁾。対象としては、それぞれの薬物に関して溶媒投与群を用いた。

その他の行動実験や生理学的実験は既知の方法を用いて行った³⁾。

C. 結果

1. 合成カンナビノイド AB-FUBINACA 投与により扁桃体シナプス伝達が抑制される例が観察された。
2. AB-FUBINACA を腹腔内投与し恐怖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有意に減少した(Fig. 1)。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消失した。
3. AB-FUBINACA の腹腔内投与はマウスの作業記憶を抑制した。この抑制作用は AM251 前投与で消失した。
4. AB-FUBINACA の腹腔内投与は、高濃度 (5 mg/kg) ではマウス心拍数を減少させた。

D. 考察

本研究では、合成カンナビノイド AB-FUBINACA が扁桃体シナプス伝達に影響を及ぼす可能性や扁桃体関連記憶である文脈性恐怖記憶の獲得に抑制的に作用することが示された。この結果は、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²⁾。今後、AB-FUBINACA の情動関連脳部位におけるシナプス伝達や情動行動に関してさらに詳細な理解を得ることにより、合成カンナビノイドについての新たな理解の進展が期待される。

ただし本研究においては、情動系ではない記憶である作業記憶についても AB-FUBINACA により抑制がみられた点は注意が必要であり、今後情動関連脳部位以外の脳部位での検討も必要になる。

一方、本研究では高用量の AB-FUBINACA によりマウス心拍数の減少が観察された。このことは、AB-FUBINACA の全身作用の複雑性を示唆すると思われ、これについても今後更に検討が必要である。

E. 結論

合成カンナビノイド AB-FUBINACA が扁桃体関連記憶である文脈性恐怖記憶の獲得を抑制すること等が示された。

F. 参考文献

- 1) 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.
- 2) Pamplona FA, Takahashi RN (2006) WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett*, **397**, 88-92.
- 3) 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.

Fear conditioning

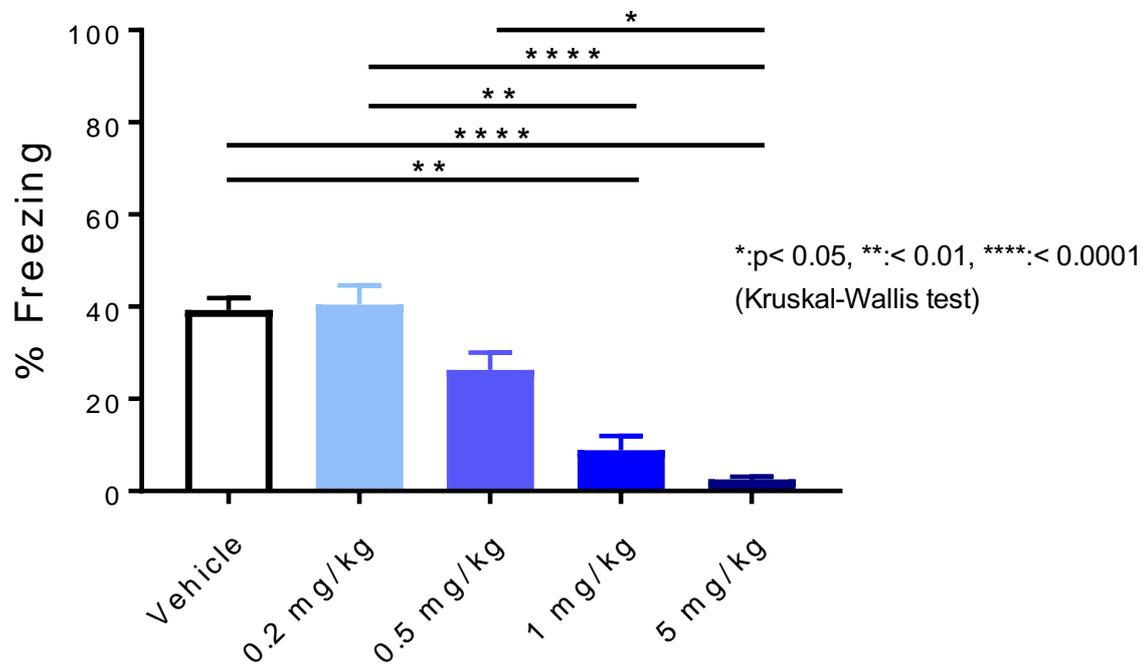


Fig. 1

Dose-dependent reduction of freezing rate (%) in mice by administration (i.p.) of AB-FUBINACA.

分担研究報告書

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（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）

【研究要旨】

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も GluN2C, GluN2D サブユニットが他の GluN2A, GluN2B より高いことが報告されている (Khlestova et al., 2016)。これらを背景に、本研究では GluN2C, GluN2D 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た。具体的には、PCP 系薬物の標的分子を探索する上で、その準備段階として、PCP と類似の作用点をもつメマンチンを用いて、さまざまな脳部位、細胞種に対するメマンチンの応答性を *in vitro* 電気生理学により検証した。その結果、細胞種毎に差異があり、特に GABA 作動性ニューロンでの応答性が高いことを示唆する知見を得ることができた。幻覚・幻聴を主訴とする統合失調症でも GABA システムの減弱が観察されているので、今後は共通の神経回路異常として関連性を明らかにしていく。

また、行動レベルでの新たな薬物依存症モデルの開発に取り組むため、ドパミン神経特異的に組み替え酵素 Cre を発現する、dopamine transporter-Cre (DAT-Cre) マウスを用いて、化学遺伝学 (DREADD) により、有用性の検証を行った。また、薬物依存症治療標的分子の候補として、オキシトシンシステムに着目しており、新たに開発されたオキシトシン受容体可視化マウスの評価を行った。実験方法は、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ものであり、実験系として確立することができた。さらに、オキシトシン受容体発現可視化遺伝子改変マウス (*Oxtr-T2A-tdTomato* マウスおよび *Oxtr-T2A-iCre* マウス) を用いてオキシトシン受容体発現細胞の脳内分布を調べた。*Oxtr-T2A-tdTomato* マウスについては、免疫組織化学的解析により、全脳における tdTomato 陽性細胞の分布を調べた。さらに、急性スライス標本を作成し、パッチクランプ法により tdTomato 陽性細胞から電気応答を記録し、オキシトシンへの応答を調べた。*Oxtr-T2A-iCre* マウスに関しては、アデノ随伴ウイルス PHPeB-DIO-EGFP を眼窩静脈叢経由で投与した後、免疫組織化学的解析により、全脳における EGFP 陽性細胞の分布を調べることでオキシトシン受容体発現細胞分布を調べた。今後は、上記の DAT-Cre マウスとオキシトシン受容体発現可視化遺伝子改変マウスを交配させることで、薬物依存症の原因とされるドパミン神経と薬物依存症の治療標的候補であるオキシトシンシステムとの相互作用する可能性の脳部位を検証し、薬物依存症の病態基盤を明らかにするとともに、治療標的分子の更なる探索を行う。

A. 目的

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も GluN2C, GluN2D サブユニットが他の GluN2A, GluN2B より高いことが報告されている (Khlestova et al., 2016)。これらを背景に、本研究では GluN2C, GluN2D 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た。

また、行動レベルでの新たな薬物依存症モデルの開発に取り組むため、ドパミン神経特異的に組み替え酵素 Cre を発現する、dopamine transporter-Cre (DAT-Cre)マウスを用いて、化学遺伝学 (DREADD)により、有用性の検証を行った。また、薬物依存症治療標的分子の候補として、オキシトシンシステムに着目しており、新たに開発されたオキシトシン受容体可視化マウスの評価を行った。

B. 方法

使用動物：急性スライス標本を用いた *in vitro* 電気生理学実験においては、C57BL/6J 系雄性マウス (8-12 週齢、日本クレア) を使用した。

DAT-Cre マウスは東京都医学総合研究所・学習記憶プロジェクトリーダー・齊藤実博士との共同研究により分与していただいた。オキシトシン受容体可視化マウス

(Oxtr-T2A-tdTomato マウスおよび

Oxtr-T2A-iCre マウス)は神経研究所・疾病研究第六部・井上由紀子博士との共同研究により分与していただいた。

使用薬物：急性スライス実験において、NMDA 受容体拮抗薬としてメマンチン (Tocris)を使用した。化学遺伝学実験において、Clozapine N-oxide (CNO, Tocris)を使用した。

。

1. メマンチンへの NMDA 受容体応答性の脳部位・細胞種での違い

脳スライス標本 (海馬、扁桃核、前頭前野、視床) を用いて、パッチクランプ法により、電気応答を測定することで、各脳部位の NMDA 受容体特性を解析することで GluN2C, GluN2D サ

ブユニットを含む特性かを推測した。また、メマンチンなど NMDA 受容体拮抗薬による NMDA 受容体電流応答の抑制率を解析した。

2. ドパミン神経回路の可視化とドパミン神経の化学遺伝学による人工操作の評価

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 マウスの組織学的解析を行い、ドパミン神経の脳局在を解析した。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化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やプレパルス抑制試験など実施した。

3. オキシトシン受容体発現細胞の可視化: キシトシン受容体発現可視化遺伝子改変マウス

(Oxtr-T2A-tdTomato マウスおよび Oxtr-T2A-iCre マウス) を用いて以下のことを行った。Oxtr-T2A-tdTomato マウスについては、免疫組織化学的解析により、全脳における tdTomato 陽性細胞の分布を調べることでオキシトシン受容体発現細胞分布を調べた。さらに、急性スライス標本を作成し、パッチクランプ法により tdTomato 陽性細胞から電気応答を記録し、オキシトシンへの応答を調べた。Oxtr-T2A-iCre マウスに関しては、アデノ随伴ウイルス PHPeB-DIO-EGFP を眼窩静脈叢経路で投与した後、免疫組織化学的解析により、全脳における EGFP 陽性細胞の分布を調べることでオキシトシン受容体発現細胞分布を調べた。

C. 結果

1. メマンチンへの NMDA 受容体応答性の脳部位・細胞種での違い

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、前頭前野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。さらに、メマンチン応答性について解析を行った。

2. ドパミン神経回路の可視化とドパミン神経の化学遺伝学による人工操作の評価

DAT-tdTomato マウスの組織学的解析により、**tdTomato** 陽性シグナルの脳内分布を観察した。その結果、これまでの報告と一致し、腹側被蓋野はもちろん、前頭前野、扁桃体中心核、視床にも **tdTomato** 陽性シグナルの神経終末を観察することができた (Fig.1)。

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ものであった (Fig.2)。

3. オキシトシン受容体発現細胞の可視化

オキシトシン受容体発現細胞の脳内分布について、いままでの報告と合致している点 (扁桃体中心核や中隔に発現が多い) や相違している点 (大脳皮質2層に陽性細胞が局在する) が観察された。また、これらの蛍光タンパク質陽性細胞がオキシトシンアゴニストで電気応答に変化が生じることを電気生理学的解析により確認できた (Fig.3)。

D. 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薬物依存症の治療標的としてオキシトシン神経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、これらの基本的な薬理学的特性をもとに幻覚の生物学的神経基盤の理解を今後深めていく予定である。

E. 結 論

今後の薬物依存症研究を展開する上で、基本的な知見を得ることができた。また、PCP系薬物の標的分子を探索する上で、その準備段階として、PCPと類似の作用点をもつメマンチンを用いて、さまざまな脳部位、細胞種に対するメマンチンの応答性を *in vitro* 電気生理学により検証した。その結果、細胞種毎に差異があり、特にGABA作動性ニューロンでの応答性が高いことを示唆する知見を得ることができた。幻覚・幻聴を主訴とする統合失調症でもGABAシステムの減弱が観察されているので、今後は共通の神経回路異常として関連性を明らかにしていく。また、薬物依存性の新規治療薬の標的分子として、オキシトシンシステムに着目して知見を得た。今後は薬物依存症モデルでのオキシトシンシステムの異常などについて明らかにしていく。

F. 参考文献

- 7) Elizaveta Khlestova, Jon W Johnson, John H Krystal, John Lisman. (2016). The Role of GluN2C-Containing NMDA Receptors in Ketamine's Psychotogenic Action and in Schizophrenia Models. *J Neurosci.* 36(44), 11151-11157
- 8) Shawn E Kotermanski, Jon W Johnson. (2009). Mg^{2+} imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci.* 29(9), 2774-2779.
- 9) Yukiko U. Inoue, Hideki Miwa, Kei Hori, Ryosuke Kaneko, Yuki Morimoto, Eriko Koike, Junko Asami, Satoshi Kamijo, Mitsuhiro Yamada, Mikio Hoshino, Takayoshi Inoue. Targeting Neurons with Functional Oxytocin Receptors: A Novel Set of Simple Knock-In Mouse Lines for

Oxytocin Receptor Visualization and
Manipulation. eNeuro.
2022;9(1):ENEURO.0423-21.2022. doi:
10.1523/ENEURO.0423-21.2022.

健康危険情報

特になし

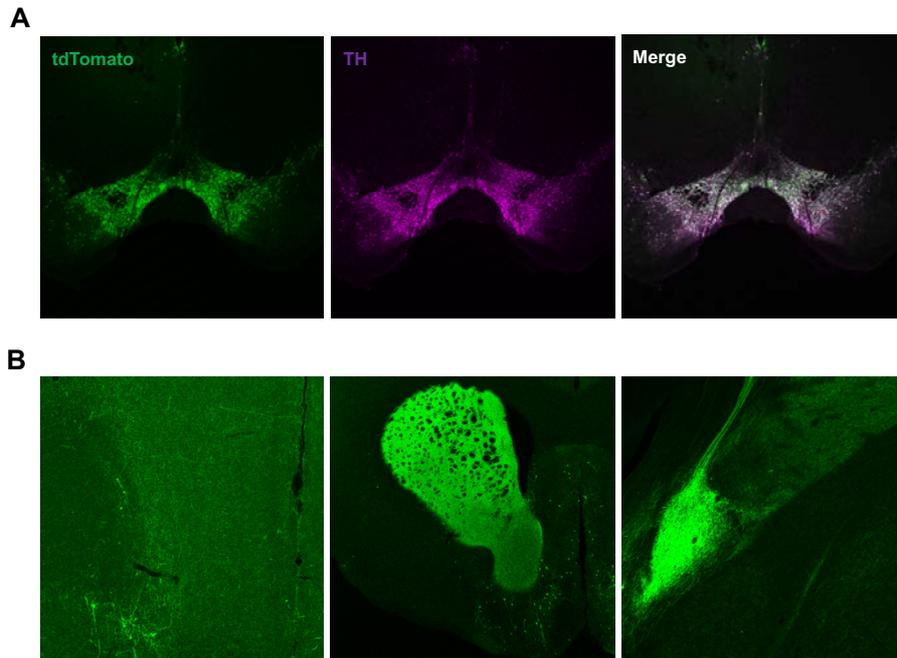


Fig. 1. Evaluation of dopamine transporter (DAT)-Cre mice. To confirm the expression pattern of Cre in the DAT-Cre mice, DAT-Cre mice were crossed with Ai9 (Gt(ROSA^{Ai9/+})) mice. **A**, a representative image of the ventral tegmental area (VTA) DAT-Cre::Gt(ROSA^{Ai9/+}) mice. tdTomato signals (green, left) were almost merged with tyrosine hydroxylase (TH) immune-positive cells (magenta, middle). **B**, tdTomato signals were observed in the medial prefrontal cortex (left), the nucleus accumbens (middle), and the central amygdala (right).

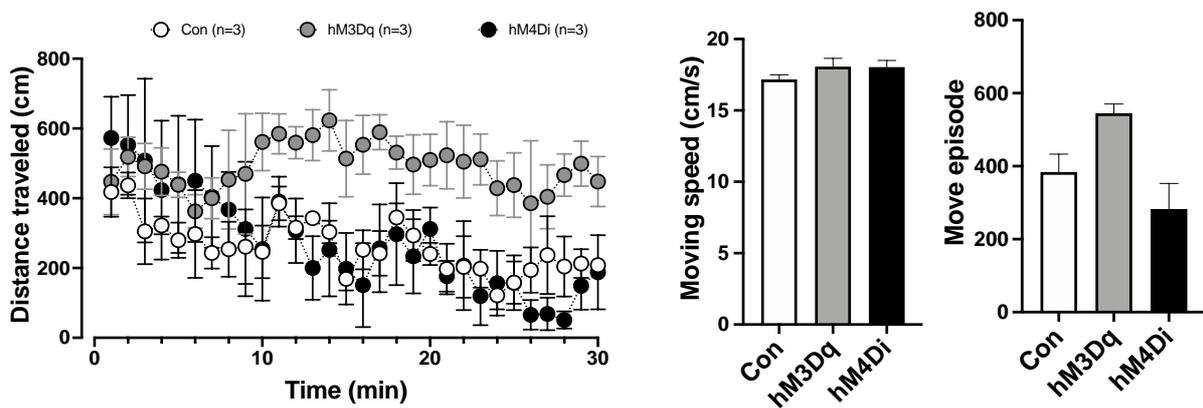


Fig. 2. Motor activity in an open field upon hM3Dq- and hM4Di-DREADD-mediated activation of ventral tegmental area (VTA) of DAT-Cre mice. Data were acquired were from DAT-Cre mice transduced with mCherry (control), hM3Dq, and hM4Di vector. CNO were injected 30 min before the beginning of the test. hM3Dq-mediated activation of VTAs of DAT-Cre mice by CNO injection tends to increase locomotor activity in the open field, compared with control mice and hM4Di-mediated inactivation of VTA of DAT-Cre mice (Left). Moving speeds were comparable among three groups but move episodes of hM3Dq-mediated activation of VTAs of DAT-Cre mice tends to be higher than the other two groups.

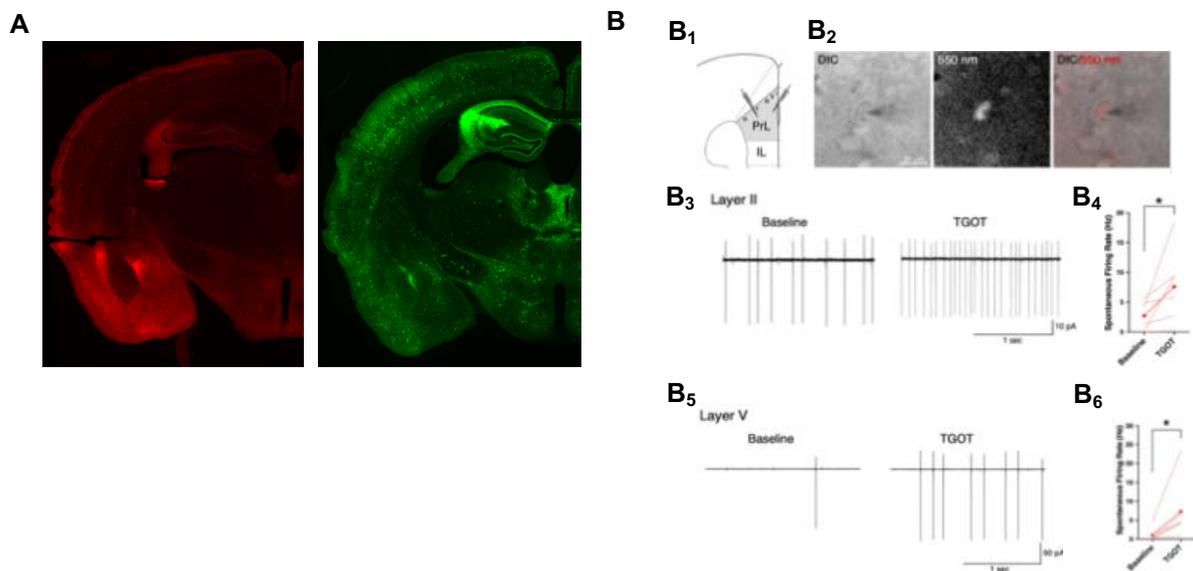


Fig. 3. Evaluation of Oxt-T2A-tdTomato mice and Oxt-T2A-iCre mice. **A**, a representative image of Oxt-T2A-tdTomato mice. tdTomato-positive (red) are the cells expressing oxytocin receptors (left). A representative image of Oxt-T2A-iCre mice. GFP-positive (green) are the cells expressing oxytocin receptors (right). AAV-PHPeB vector harboring CBh_FLEX-GFP. GFP expression can be induced by Cre-dependent inversion. **B**, functional verification of tdTomato-positive neurons in Oxt-T2A-tdTomato mice by *in vitro* electrophysiological analyses. **B₁**, Schematic diagram of a mouse brain coronal section which shows placement of recording electrodes in Layer II and Layer V of the PrL. IL, infralimbic cortex. **B₂**, Representative differential interference contrast (DIC; left), fluorescent (red; middle), and merged (right) images of a Layer V neuron in the PrL from four-week-old Oxt-T2A-tdTomato homozygous male are arranged. **B₃**, Representative cell-attached recording traces from a Layer II tdTomato-positive cell in the PrL. Left panel shows the baseline firing rate. Upon treatment of Oxt agonist, TGOT, the firing rates are significantly increased as shown in right panel. Scale bar: 10 pA, 1 s. **B₄**, Quantification of spontaneous firing activities from Layer II tdTomato-positive cells in the PrL ($n = 6$ cells from 6 mice). Light red lines represent individual neurons' responses. Red circles with line represent average response. Presence of 1 μ M TGOT significantly increases the firing rate; $*p < 0.05$ by Wilcoxon's test. **B₅**, Representative cell-attached recording traces from a Layer V tdTomato-positive cell in the PrL. Left panel indicates the baseline firing rate. On treatment of TGOT, the firing rates are considerably increased as shown in right panel. Scale bar: 50 pA, 1 s. **B₆**, Quantification of firing activities from Layer V tdTomato-positive cells in the PrL ($n = 6$ cells from 6 mice). Administration of 1 μ M TGOT considerably increases the spontaneous firing rate; $*p < 0.05$ by Wilcoxon's test.

Research Subject No.: 1-1

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

Principal Investigator: Masahiko FUNADA, Ph.D.

Section Chief, Section of Addictive Drugs Research, Department of Drug Dependence Research,
National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry

In recent years, the abuse of new psychoactive substances, mainly synthetic cannabinoids and cathinones, has been expanding, primarily among the youth, and has now become a major social problem. The abuse of new psychoactive substances is associated with psychic dependence, mental disorders, and cytotoxicity, but no methods currently exist to evaluate their comprehensive harm, including outbreaks associated with their unpredictable toxicity. This study aimed to investigate the mechanisms underlying the adverse effects of new psychoactive substances and to develop an efficient evaluation technique for predicting their adverse effects.

Mechanisms underlying adverse effects: We will examine the mechanisms underlying adverse effects such as psychic dependence and cytotoxicity using animal behavior analysis, biological signals, and cultured cells, with a focus on synthetic cannabinoids, cathinone compounds, and opioid drugs as new psychoactive substances.

Evaluation methods for adverse effects: In addition to animal behavior analysis and cell-based evaluation, comprehensive analysis including computer analysis will be conducted. In order to examine changes in neural circuits in the brain caused by the chronic use of new psychoactive substances, we will create animal models to visualize neural circuits in the brain and construct a marker search system to predict risk. By constructing such a comprehensive evaluation method, it will be possible to detect and predict the danger of new psychoactive substances rapidly. In addition, by making full use of animal models with visualized neural circuits in the brain, we expect to provide a seed for the development of therapeutic drugs for addiction and psychiatric disorders caused by chronic drug use.

Through this research, we aim to establish a system to evaluate the abuse risk and other harmful effects of new psychoactive substances based on the molecular basis of the expression of their effects. We will also attempt to search for drug candidates for the treatment of drug-related psychiatric disorders based on the molecular mechanisms underlying their adverse effects.

Funada et al. established a myotoxicity evaluation model for synthetic cannabinoids using a human skeletal muscle cell model, and found that toxicity is mediated by cannabinoid receptor type 1 (CB₁). Mishima et al. continuously administered delta-9-tetrahydrocannabinol, the main psychoactive component of cannabis, to mice and reported the development of tolerance to the hypothermic effect and a catalepsy-like immobility state, indicating the importance of CB₁ receptors in the brain. In addition, Sekiguchi et al. conducted a fear conditioning test and found that the synthetic cannabinoid AB-FUBINACA regulates inhibitory conditioned fear memory via CB₁ receptors in the amygdala region. Miwa focused on dopaminergic neurons to identify the neural circuitry responsible for the hallucinogenic effects of new psychoactive substances, generated dopamine transporter (DAT) -Cre/tdTomato and oxytocin receptor

fluorescent tag mice, and activated the ventral tegmental gyrus by chemical genetic techniques. The mice showed increased locomotor activity and became important animal models for analyzing the role of the dopamine nervous system and oxytocin receptors in the development of adverse effects caused by new psychoactive substances.

Using a mouse-conditioned place preference test, Funada and Hashimoto et al. confirmed that cathinones exhibit central excitatory and psychic-dependent effects. They identified a positive correlation between the intensities of DAT inhibition and central excitatory and psychic-dependent effects, as assessed by DAT-expressing cells. The adverse effects of cathinones can be predicted from the functional evaluation of DAT-expressing cells. Funada et al. showed that CB₁ receptors are involved in the development of psychic dependence on synthetic cannabinoids, and that a positive correlation exists between CB₁ receptor activity intensity and CB₁ receptor-expressing cells. The toxic effects of synthetic cannabinoids can be predicted from the functional evaluation of CB₁ receptor-expressing cells. Using computer analysis, Kurihara et al. also examined the validity of activity prediction through docking studies of CB₁ receptors and ligands, which are the action points of synthetic cannabinoids. They found that good activity prediction could be achieved by fixing the binding site of the ligand using hydrogen bonding energy as an indicator. Prediction data by computer analysis also correlated well with the intensity of psychic dependence and myotoxicity induced by synthetic cannabinoids, suggesting that it is possible to predict toxicity based on their chemical structure.

These findings indicate that experimental (in vivo) animal data can be predicted from evaluation data based on cell experiments (in vitro). Therefore, the introduction of an adverse effect prediction system based mainly on cell experiments could be expected to improve the efficiency of data collection.