

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08539

研究課題名(和文)カンナビノイドの睡眠調節に及ぼす作用に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of cannabinoids on sleep modulation

研究代表者

内山 奈穂子(Uchiyama, Nahoko)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・室長

研究者番号：60392297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たな睡眠調節物質として注目したカンナビノイド：9-THC及びJWH-018により誘発される痙攣がCB1受容体拮抗薬で抑制されたことから、本作用はCB1受容体を介して起こることが示された。CB1受容体KOマウスにおいてJWH-018投与後に痙攣脳波又は痙攣行動を示さなかったことから本作用が確認された。JWH-018及びcannabicyclohexanol投与マウスの脳波の多変量解析を行った。判別分析の結果、Score plot上で両薬物とも、薬物投与群と溶媒投与群に分かれた。また、薬物投与群に寄与する脳波の周波数は両薬物とも、2.5-5.5 Hz(デルタ波)であることが明確に示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、カンナビノイドの睡眠調節に関する作用の解明に加えて、カンナビノイドの既知の中樞作用にも何らかの関与が見いだされる可能性もある。多変量解析を用いた脳波解析は、睡眠・覚醒を含めた様々な脳波パターンを識別するための判断ツールとして有用であると考えられる。従って、不眠などの睡眠障害の原因解明や、ひいては睡眠に関する新たな治療薬の開発にも繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：An intraperitoneal administration of 9-THC or JWH-018 triggered electrographic seizures in mice, recorded by EEG and videography. Administration of JWH-018 increased seizure spikes dose-dependently. Pretreatment of mice with AM-251, a cannabinoid receptor 1 (CB1R)-selective antagonist, completely prevented cannabinoid-induced seizures. The results clearly show that the epileptogenic properties of cannabinoids are mediated via CB1R. Additionally, CB1RKO mice show no electrographic or behavior seizures after JWH-018 administration confirming again the mediation of seizure phenomenon by CB1R. Multivariate analysis of EEG in mice treated with JWH-018 and cannabicyclohexanol was performed. As a result of discriminant analysis, both drugs were divided into a drug administration group and a solvent administration group on the Score plot. Moreover, it was clearly shown that the EEG frequency contributing to the drug administration group was 2.5 to 5.5 Hz (delta wave) for both drugs.

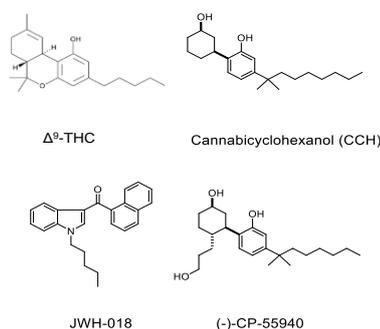
研究分野：生薬・天然物化学，法中毒学

キーワード：カンナビノイド 脳波 多変量解析 睡眠 痙攣

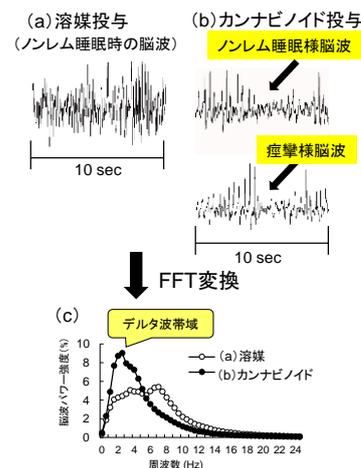
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) カンナビノイドは、脳内のカンナビノイド受容体 (CB-R) のうち、CB1-R を介して記憶、学習能力の低下、食欲増進などの中枢作用を示す。また、 $\Delta^9$ -THC (大麻の主活性カンナビノイド) や内因性カンナビノイドが睡眠を促進することが報告されている (Murillo-Rodriguez E, et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2011)。しかし、カンナビノイドがどのように睡眠調節に関与するかについては不明点が多い。これまでに我々は、新たな睡眠調節物質としてカンナビノイドに注目し検討を行ってきた。そしてカンナビノイド受容体作動薬 (cannabicyclohexanol (CCH), JWH-018, CP-55940) (図 1) が、いずれも野生型マウスの自発運動量を有意に抑制するとともに、脳波の特定周波数帯域 (2-5Hz, デルタ波: ノンレム睡眠時に増強する帯域) を有意に増強させることを明らかにした (図 2c)。さらに、カンナビノイド投与によって誘発されるこの脳波を詳しく解析したところ、生理的なノンレム睡眠脳波とは明らかに異なるノンレム睡眠様波形を示すこと、痙攣様の脳波が断続的に出現することが判明した (図 2a, 2b) (Uchiyama N. et al., 2014, 2015)。従って、カンナビノイド投与によって誘発されたノンレム睡眠様の現象 (デルタ波領域の増強) は、従来の分類法で定義された生理的な睡眠とは明らかに異なると考えられた。しかし、この睡眠様脳波がどのようにして起こるのかは不明である。



(図 1) 天然及び合成カンナビノイドの構造



(図 2) 溶媒 (a) あるいはカンナビノイド (CCH) 投与後 (b) のマウス脳波、及び投与 1 時間の各脳波の周波数分布

(2) 一方、これまでに、我々のグループは睡眠物質—プロスタグランジン  $D_2$  (PGD<sub>2</sub>) 及びアデノシン—による睡眠調節に関する研究を行ってきた (Urade Y, Hayaishi O, *Future Neurol.*, (2010) 5, 363-376)。内因性睡眠物質である PGD<sub>2</sub> は、前脳基底部クモ膜細胞に存在するプロスタグランジン D 受容体 (DP<sub>1</sub>) に結合してアデノシンを遊離させる。遊離アデノシンは、前脳基底部に局在するアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体 (A<sub>2A</sub>-R) を発現している神経を刺激し、その結果、睡眠調節中枢と考えられている腹側外側視索前野 (VLPO) の活動を亢進させ、睡眠を誘発する。そこで、睡眠覚醒障害モデル動物として、リポカリン型 PGD 合成酵素 (L-PGDS) 及びアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、前述の合成カンナビノイド CCH, JWH-018, (-)-CP-55940 をそれぞれ投与した。その結果、これら薬物を投与後、野生型マウスの場合と比較していずれの KO マウスにおいても自発運動量の抑制作用がより増強された。続いて、これら 3 種の合成カンナビノイドの L-PGDS KO マウスの脳波に及ぼす作用を検討した。その結果、全ての化合物投与後の脳波に共通して、野生型マウスと同様の特定周波数帯域 (2-5Hz, デルタ波: ノンレム睡眠様脳波) のスペクトル強度が有意に増加した。さらに、野生型マウスの場合と比較して L-PGDS KO マウスにおいて、上記帯域のスペクトル強度がより増強された。また、これらカンナビノイド投与後におけるマウスの自発運動量抑制作用とノンレム睡眠様脳波発現の持続時間には相関がみられた。以上の結果から、カンナビノイドの自発運動量抑制及びノンレム睡眠様作用の増強作用の調節には、L-PGDS-PGD<sub>2</sub>-(DP<sub>1</sub>)-アデノシン-A<sub>2A</sub>-R という睡眠情報伝達経路が関与している可能性が示唆された。カンナビノイドは、一般的に中枢において抑制作用をもたらすと考えられるが、なぜ睡眠誘発に働く伝達系 (L-PGDS 及びアデノシン-A<sub>2A</sub>-R) を遮断したマウスで行動抑制作用が増強されるのか、またノンレム睡眠様脳波の強度が増強されるのか不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、睡眠・覚醒に関わる新たな調節機構として、カンナビノイドの睡眠調節に及ぼす作用を解明することを目的とする。我々はこれまでに、カンナビノイド投与により生じる自発運動量抑制作用が、睡眠調節因子 (L-PGDS 遺伝子やアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体) の遺伝子欠損マウスにおいて、より増強されることを発見した。さらに、これらカンナビノイド投与により、従来の生理的な脳波と異なる異常脳波が出現すること、さらにこの異常脳波出現時に観察される特定周波数帯域 (デルタ波) の脳波スペクトル強度が、野生型と比較して L-PGDS 遺伝子欠損マウスにおいてより増強することを見出した (Uchiyama et al., 2014, 2015)。そこで本研究では、(1) カンナビノイドがカンナビノイド受容体 (CB-R), L-PGDS 等を介した睡眠調節にどのように作用するのかを明らかにする。さらに、(2) 多変量解析を用いて様々な脳波パターンの細分類化を行

い、カンナビノイドに特徴的な脳波パターンについて、従来の生理的な脳波との相違点、類似点を明確化する。

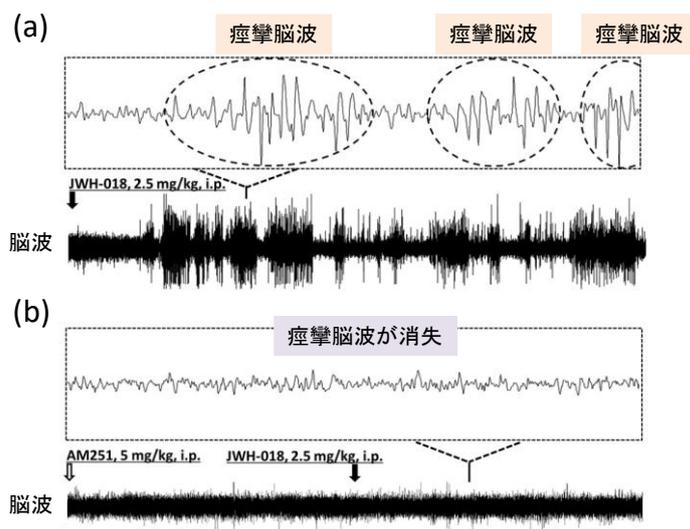
### 3. 研究の方法

(1) 睡眠調節因子（リポカリン型 PGD 合成酵素（L-PGDS）等）やカンナビノイド受容体（CB-R）の選択的阻害薬、作動薬、さらに、CB-R の KO マウス及び睡眠覚醒障害モデル動物（L-PGDS の KO マウス等）を用いて、各行動量及び脳波を測定し、カンナビノイドが CB-R や睡眠調節因子（L-PGDS 等）にどのように関与するかを検討した。

(2) 通常の脳波解析と共に、多変量解析を行い、様々な脳波パターンの細分類化を検討した。これらの結果から、カンナビノイドに特徴的な脳波パターンについて、生理的な睡眠や覚醒の脳波との相違点、類似点の明確化を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 大麻由来カンナビノイド  $\Delta^9$ -THC 或いは合成カンナビノイド（JWH-018）を投与したマウスの脳波と自発運動量の変化を調べた。マウスに  $\Delta^9$ -THC を腹腔内投与すると、有意な行動量の低下が観察され、痙攣行動と痙攣脳波が誘発され、痙攣脳波は断続的に 4 時間以上持続して起こることが判明した。一方、JWH-018 を腹腔内投与すると、 $\Delta^9$ -THC と比較して、行動量の抑制と痙攣がより投与から短時間に誘発されることが判明した。さらに、JWH-018 によるマウスへの痙攣誘発作用が容量依存的に起こることが明らかとなった。また、CB1 受容体選択的拮抗薬 AM251 を  $\Delta^9$ -THC 或いは JWH-018 投与の 30 分前に腹腔内投与しておくこと、行動量の抑制と痙攣の誘発が完全に消失することが判明した（図 3）。従って、 $\Delta^9$ -THC や JWH-018 は、CB1 受容体を介してマウスに痙攣を誘発することが示された [1]。



（図 3）JWH-018 投与後のマウス脳波（a）、CB1 受容体選択的拮抗薬 AM251 を前投与した後に JWH-018 を投与後のマウス脳波（b）

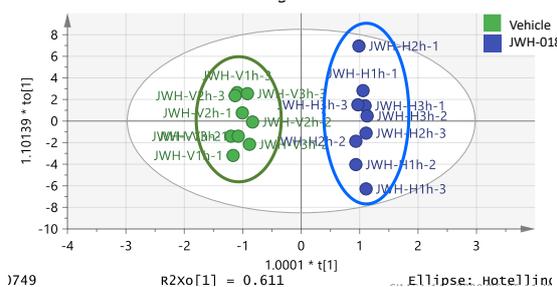
(2) 次に、痙攣を誘発する  $\Delta^9$ -THC 用量の閾値を検討した結果、投与量 2.5 mg/kg が痙攣を誘発する最低用量であった。さらに、脳波スペクトルの特性を視覚的に区別することができる脳波解析：スペクトログラムとエンベロープ変動係数解析を行った。さらに、 $\Delta^9$ -THC の反復投与により、投与 3-4 日後に痙攣の発生数が減少したことから、 $\Delta^9$ -THC 連続投与により身体的な耐性が生じることが示された。また、CB1 受容体拮抗薬をマウスに前投与することにより、 $\Delta^9$ -THC および JWH-018 によって誘発される痙攣が抑制されたことから、これらの痙攣作用は、CB1 受容体を介して起こることが示された。さらに CB1 受容体 KO マウスに JWH-018 を腹腔投与した結果、CB1 受容体 KO マウスは JWH-018 投与後に痙攣の脳波または痙攣行動を示さなかったことから、JWH-018 の痙攣作用は、CB1 受容体を介して起こることが改めて確認された。

(3) 合成カンナビノイドを種々の条件（野生型（WT）マウス、KO マウス、薬物投与群、溶媒投与群）で測定した脳波について、多変量解析を用いて、脳波パターンの分類化を試みた。

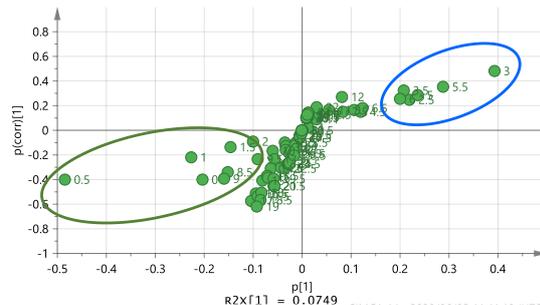
2 種類の合成カンナビノイド（JWH-018, cannabicyclohexanol (CCH)）を、野生型（WT）及び睡眠覚醒障害モデル動物（リポカリン型 PGD 合成酵素（L-PGDS）の KO マウス：LKO）にそれぞれ投与し、得られた各測定脳波について、脳波解析（FFT 変換）後、さらに多変量解析を行った。得られた脳波について、薬物投与群と溶媒投与群で判別分析（OPLS-DA, Scaling: pareto）を行った。その結果、WT マウスにおいては、Score plot 上で、JWH-018, CCH いずれも、薬物

投与群と溶媒投与群の2グループに分かれることが確認できた(図4)。また、S-plotにより、薬物投与群に寄与する脳波の周波数はJWH-018, CCHいずれも、2.5~5.5 Hz付近であった(図5)。次に、LKO マウスにおいてもWTと同様に、Score plot上で、JWH-018, CCHいずれも、薬物投与群と溶媒投与群の2グループに分かれた(図6)。また、S-plotにより、薬物投与群に寄与する脳波の周波数についてもWTと同様に、JWH-018, CCHいずれも2.5~5.5 Hz付近であった(図7)。

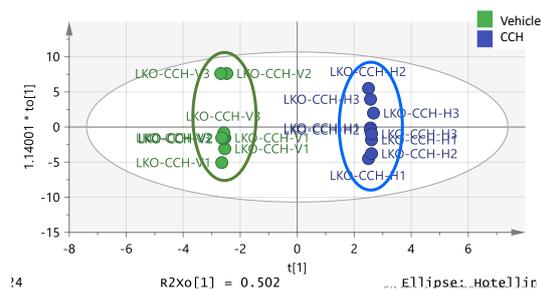
この2.5~5.5 Hz付近の周波数はデルタ波(ノンレム睡眠様脳波)の帯域である。これは、WT, LKO いずれにおいても通常の各脳波のFFT比較による脳波解析と同様の結果を示した(図2c)。従って、従来の脳波解析によるFFT比較では差異が明瞭に示しにくい脳波パターンについて、多変量解析を用いることで、薬物投与の有無による脳波の差異をより明確に示すことが可能となった。



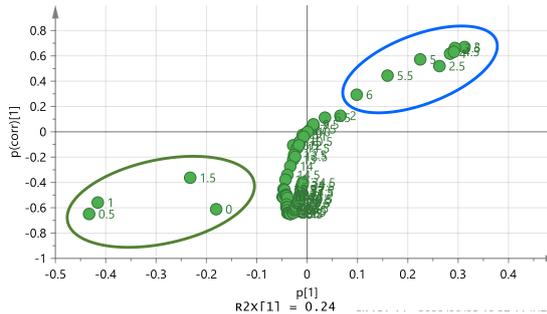
(図4) JWH-018 投与群及び溶媒投与群の脳波データからのOPLS-DAプロット(WTマウス)



(図5) JWH-018 投与群及び溶媒投与群の脳波データからのS-plotプロット(WTマウス)



(図6) CCH 投与群及び溶媒投与群の脳波データからのOPLS-DAプロット(LKOマウス)



(図7) CCH 投与群及び溶媒投与群の脳波データからのS-plotプロット(LKOマウス)

#### <引用文献>

[1] Malyshevskaya O., Aritake K., Kaushik M.K., Uchiyama N., Cherasse Y., Kikura-Hanajiri R., Urade Y.: Natural ( $\Delta^9$ -THC) and synthetic (JWH-018) cannabinoids induce seizures by acting through the cannabinoid CB1 receptor. Scientific Reports 7: 10516. doi:10.1038/s41598-017-10447-2 (2017). Published online: 05 September 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 O. Malyshevskaya, K. Aritake, M. K. Kaushik, N. Uchiyama, Y. Cherasse, R. Kikura-Hanajiri, Y. Urade	4. 巻 7
2. 論文標題 Natural ( 9-THC) and synthetic (JWH-018) cannabinoids induce seizures by acting through the cannabinoid CB1 receptor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10447-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Olga Malyshevskaya
2. 発表標題 Natural ( 9-THC) and synthetic (JWH-018) cannabinoids induce seizures through the cannabinoid CB1 receptor
3. 学会等名 Japanese-Russian Symposium, Krasnoyarsk, Russia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Olga Malyshevskaya
2. 発表標題 Natural ( 9-THC) and synthetic (JWH-018) cannabinoids induce seizures through the cannabinoid CB1 receptor
3. 学会等名 9th Global Experts Meeting on Neuropharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Olga Malyshevskaya, 有竹浩介, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 裏出良博
2. 発表標題 カンナビノイドは痙攣を誘発する
3. 学会等名 日本法中毒学会第36年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	有竹 浩介  (Aritake Kosuke)  (70390804)	第一薬科大学・薬学部・教授   (37107)	
研究 分担者	マリシェフサカヤ オリガ  (Malyshevskaya Olga)  (20739429)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員   (12102)	