

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12874

研究課題名（和文）神経筋共培養を利用した合成カンナビノイドの有害性予測モデルの開発

研究課題名（英文）Development of an analysis model for harmful side effects of synthetic cannabinoids using neuromuscular co-culture.

研究代表者

富山 健一（Tomiyama, Kenichi）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 薬物依存研究部・室長

研究者番号：20584064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、合成カンナビノイドによる細胞毒性発現と痙攣発症機序を明らかにするために、NG108-15細胞株、C2C12筋芽細胞株、RD細胞株およびそれらを組み合わせた神経筋共培養モデルの作成を試みた。いずれの細胞も合成カンナビノイド濃度依存的に細胞毒性を誘発し、その機序にはCB1受容体を介して発現することが明らかとなった。differentiated NG108-15、differentiated C2C12および differentiated RDを組み合わせた神経筋共培養モデルを作成したが、神経支配による骨格筋活動電位の発現には至らなかった。引き続き、神経筋共培養モデルの構築を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成カンナビノイドは世界的に乱用されている薬物であり、無数の化合物が存在する。それらを動物で個別に評価することは困難であり、培養細胞を用いたスクリーニング法の確立は有害作用の予測を行う上で大変意義がある。特に横紋筋融解症のような、重度の障害発症の予測については、動物愛護の観点からも培養細胞での実施が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the mechanism of synthetic cannabinoid-induced cytotoxicity and seizure, we attempted to generate a NG108-15, C2C12 and RD cell lines or their combinations for a neuromuscular co-culture model. Each cell lines induced cytotoxicity in a synthetic cannabinoid concentration-dependent manner, and the mechanism was found to be mediated by CB1 receptors. Although a neuromuscular co-culture model combining differentiated NG108-15 and differentiated C2C12 or RD cell line was created, the skeletal muscle action potentials under the neuronal control was not achieved.

研究分野：神経薬理

キーワード：合成カンナビノイド NG108-15 RD C2C12 細胞毒性 神経筋共培養モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大麻と類似の作用を持つ合成カンナビノイドの乱用によって意識障害や痙攣または横紋筋融解症のような重篤な健康被害が報告されている。合成カンナビノイドは、無数の類縁体が存在し、多くは正確な薬理作用が不明である。合成カンナビノイドによる中枢神経作用は、中枢神経系に発現する CB1 受容体が関与している。一方で、抹消組織での CB1 の役割についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、運動ニューロンおよび骨格筋のモデル細胞及ぼそれらを組み合わせた神経筋共培養モデルを利用して合成カンナビノイドによる細胞毒性発現と痙攣発症機序を明らかにする。さらに、このモデルを利用し、合成カンナビノイドの細胞毒性および痙攣リスクを迅速に推測可能な、新規の薬物スクリーニング法の開発を行う。

2. 研究の目的

合成カンナビノイドは、中心となる骨格と複数の置換基が組み合わさることで新規の構造類縁体が容易に合成されるため、既存の化合物が規制されても、すぐに新規の化合物が合成され流通し乱用されてしまう。また、このように無数に存在する合成カンナビノイドの多くは、その毒性や薬理作用が明らかになっていない。合成カンナビノイドの使用によって、痙攣のような神経症状から横紋筋融解症のような重篤な健康被害が報告されている。そこで、合成カンナビノイドによる健康被害発症リスクを予測可能とするために、(1)抹消組織に発現する CB1 受容体と毒性発現および(2) 抹消組織における合成カンナビノイドの神経薬理作用という二つの面を検討する。

3. 研究の方法

合成カンナビノイドによる(1)骨格筋細胞および運動ニューロンの毒性発現の解析と(2)神経筋共培養モデルと微小電極アレイ(Multi-electrode array, MEA)法を組み合わせた痙攣発症機序の解析を行う。CB1 受容体アゴニスト・アンタゴニストや分子生物学的手法を利用して、運動ニューロンまたは骨格筋細胞に発現する CB1 受容体が毒性発現に関与するか明らかにする。また、神経筋共培養モデルの利用によって、CB 受容体が運動ニューロンと骨格筋細胞のどちらに作用して筋収縮を制御するか確かめる。運動ニューロンは、NG108-15 細胞(ATCC)を分化させて、骨格筋細胞は C2C12 (ATCC)または RD (Human rhabdomyosarcoma)細胞(ATCC)を分化させてそれぞれのモデルとして検討した。

4. 研究成果

未分化 NG108-15 細胞、未分化 C2C12 および未分化 RD 細胞は CB1 受容体を発現していることを細胞免疫染色(Anti-Cannabinoid Receptor I antibody, ab23703)で確認した。また、NG108-15 細胞、C2C12 および RD 細胞はそれぞれ分化誘導を行なった後も CB1 受容体を発現しており、モデル細胞として活用できることを確認した。いずれの細胞も合成カンナビノイド CP-55,940 によって濃度依存的に細胞毒性が発現した。ヒト横紋筋肉腫細胞株である RD 細胞は、myosin や creatine kinase 陽性細胞であることを細胞免疫染色等で確認し、合成カンナビノイドによる横紋筋融解症モデルとして採用した。合成カンナビノイド CP-55,940 を用いて毒性発現の解析を行ったところ、濃度依存的に creatine kinase 量の増加が認められ、最終的にアポトーシスを誘導した。CB1 受容体拮抗薬 AM251 で細胞毒性は抑制された。また、毒性発現には細胞外からのカルシウム流入の抑制またはカルシウムチャネルの選択的な阻害検討によって、L-type カルシウムチャネルの関与が証明され、合成カンナビノイドによる横紋筋融解症誘発メカニズムの一端が明らかとなった。NG108-15 細胞は、dibutyryl cyclic AMP を用いることで運動ニューロン様形態に、C2C12 および RD 細胞も無血清培地で培養することで、myotube 様形態に分化させた。Differentiated NG108-15 cells では acetylcholine の分泌を ELISA 法で確認した。これらを共培養させることで神経筋共培養モデルの作成を試みた。特に、スクリーニング系を確立する場合、費用・培養維持が容易な細胞株での樹立が望ましいことから、NG108-15 細胞、C2C12 および RD 細胞での確立を試みた。MEA 解析を行った結果、differentiated NG108-15 cells は非常に微量なスパイクのみ検出された。Differentiated C2C12 および differentiated

RD 細胞では、活動電位は検出されなかった。Differentiated NG108-15 cells と differentiated C2C12 および differentiated RD 細胞を組み合わせた共培養系の作成を試みたが、神経支配による活動電位の誘導は確認できなかった。一方で、C2C12 および RD 細胞は、MEA プレート上での筋管を形成する筋芽細胞の融合と神経筋シナプス形成に関連する acetylcholine receptor の発現など培養方法や分化誘導方法など改善すべき点が明らかになり、運動ニューロンも株化細胞ではなく、ヒト iPS 由来 motor neuron (ax0078)を用いた再解析も実施しており、引き続き検討を続け、本評価系の確立を行う。

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 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tomiyama Ken-ichi、Funada Masahiko | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 Synthetic cannabinoid CP-55,940 induces apoptosis in a human skeletal muscle model via regulation of CB1 receptors and l-type Ca ²⁺ channels | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Toxicology | 6. 最初と最後の頁 617 ~ 630 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-020-02944-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 M. Funada |
| 2. 発表標題 Effects of cannabinoids on neuronal activity in mouse cerebellar cultures assessed using microelectrode array techniques |
| 3. 学会等名 College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 81st Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|