

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19483

研究課題名（和文）大麻成分カンナビノイドの毒性発現機構とアルコールの影響に関する研究

研究課題名（英文）The molecular mechanism of direct cardiotoxicity of cannabinoid, and the effect of ethanol

研究代表者

則竹 香菜子（Noritake, Kanako）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：40758067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大麻の主要活性成分である 9-THCの直接的な心毒性発現の分子機構を解明することを目的とした。また、アルコール（エタノール）の 9-THC細胞毒性に対する影響について検討した。9-THCを投与したHL-1マウス心房筋由来細胞では、ERストレスを介したアポトーシス細胞死が誘導されたが、エタノールによる相乗効果は確認されなかった。一方、9-THCは細胞内エネルギーセンサーであるAMPKを活性化し、マクロピノサイトーシスを誘導した。AMPK活性化はマクロピノサイトーシスの誘導だけでなく、9-THCの細胞毒性に対し細胞保護的な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、世界的に大麻乱用者は増加しているが、大麻使用による身体への影響について科学的証明は十分されていないのが現状である。本研究では、9-THCの心毒性の発現機構を分子レベルで明らかにしたことで、大麻使用にリスクが伴う可能性があることを認識する一助となると考える。

研究成果の概要（英文）：9-tetrahydrocannabinol (9-THC), the major psychoactive constituent of marijuana, has been reported to induce adverse effects on the cardiovascular system, including arrhythmias and myocardial infarctions. The aim of this study is to examine the mechanism of direct cardiotoxicity of 9-THC. Alcohol (ethanol) can increase the risk of developing cardiovascular disease caused by 9-THC; therefore, the effect of ethanol on 9-THC cytotoxicity was also examined. 9-THC induced apoptosis caused by ER stress in HL-1 murine cardiomyocyte. We also observed cytoplasmic vacuolization through enhanced macropinocytosis, a process involved in the uptake of extracellular fluids including nutrients. Moreover 9-THC activated AMPK, a sensor of intracellular energy status and an activator of macropinocytosis. AMPK activation involved not only in the induction of macropinocytosis but also in cytoprotection against 9-THC cytotoxicity.

研究分野：法医学

キーワード：9-THC ERストレス マクロピノサイトーシス AMPK 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、嗜好用大麻の使用が合法化されるなど世界的に大麻乱用者が増加している。日本では、大麻取締法により厳しく規制されているが、大麻事犯の検挙者数はここ数年増加しており、20代以下の若年層を中心に乱用が拡大している。以前と比較して、近年流通している大麻では、大麻草に含まれるカンナビノイドのうち主要な精神活性成分である $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール( $\Delta^9$ -THC)の含有量が増加していることが確認されていることから、より強力な作用を有する大麻の乱用により重篤な健康被害をもたらすことが懸念される。

$\Delta^9$ -THCは、不整脈や心筋梗塞など重篤な心血管イベントを誘発し突然死を起こす危険性があると報告されているが、その毒性の分子機構に関する報告はほとんどない。心臓には $\Delta^9$ -THCの選択的受容体として、カンナビノイド受容体1および2(CB-R1およびCB-R2)が発現しているため、 $\Delta^9$ -THCは心臓に直接有害な作用を及ぼす可能性がある。

また、 $\Delta^9$ -THCはほかの中樞神経作用薬と相加的・相乗的影響を及ぼすと推測され、なかでも大麻と同時に摂取される機会の多いアルコール(エタノール)により、心血管疾患の発症リスクが増悪するとの報告があるが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、 $\Delta^9$ -THCの直接的な心毒性発現の分子機構を解明すること、さらにエタノールの影響について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では合成THCではなく大麻草から精製した $\Delta^9$ -THCを使用した。マウス心房筋由来細胞株(HL-1細胞)に $\Delta^9$ -THC/エタノールを投与し、トランスクリプトーム解析(DNAマイクロアレイ)・イムノプロット解析の手法を用いて遺伝子・タンパク質発現変動の解析をおこなった。また、 $\Delta^9$ -THCによる細胞形態変化(細胞質内の空胞形成)について蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

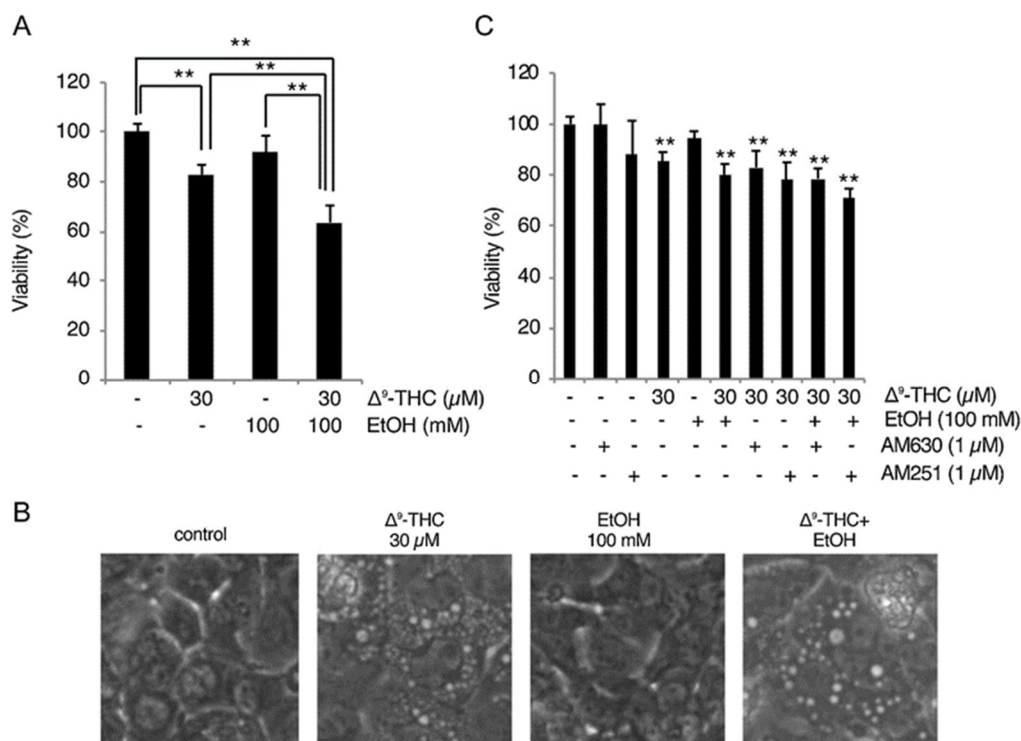
(1) 細胞生存率の評価と細胞形態変化の観察

HL-1細胞に $\Delta^9$ -THCを投与すると細胞生存率が有意に減少した。エタノールの共投与では、

$\Delta^9$ -THC毒性に対する明らかな相乗効果は見られず、相加的なものと思われた(A)。

形態観察の結果、 $\Delta^9$ -THCにより細胞質に多数の液胞が形成された(B)。

$\Delta^9$ -THCによる細胞生存率の低下は、カンナビノイド受容体(CB-R1/2)のアンタゴニストで回復しなかった(C)。



(2) トランスクリプトーム解析

<sup>9</sup>-THC の細胞毒性機構を検討するため DNA マイクロアレイ解析をおこなった結果、ER ストレス関連遺伝子の発現増加、心筋機能関連遺伝子の発現低下をみとめた。

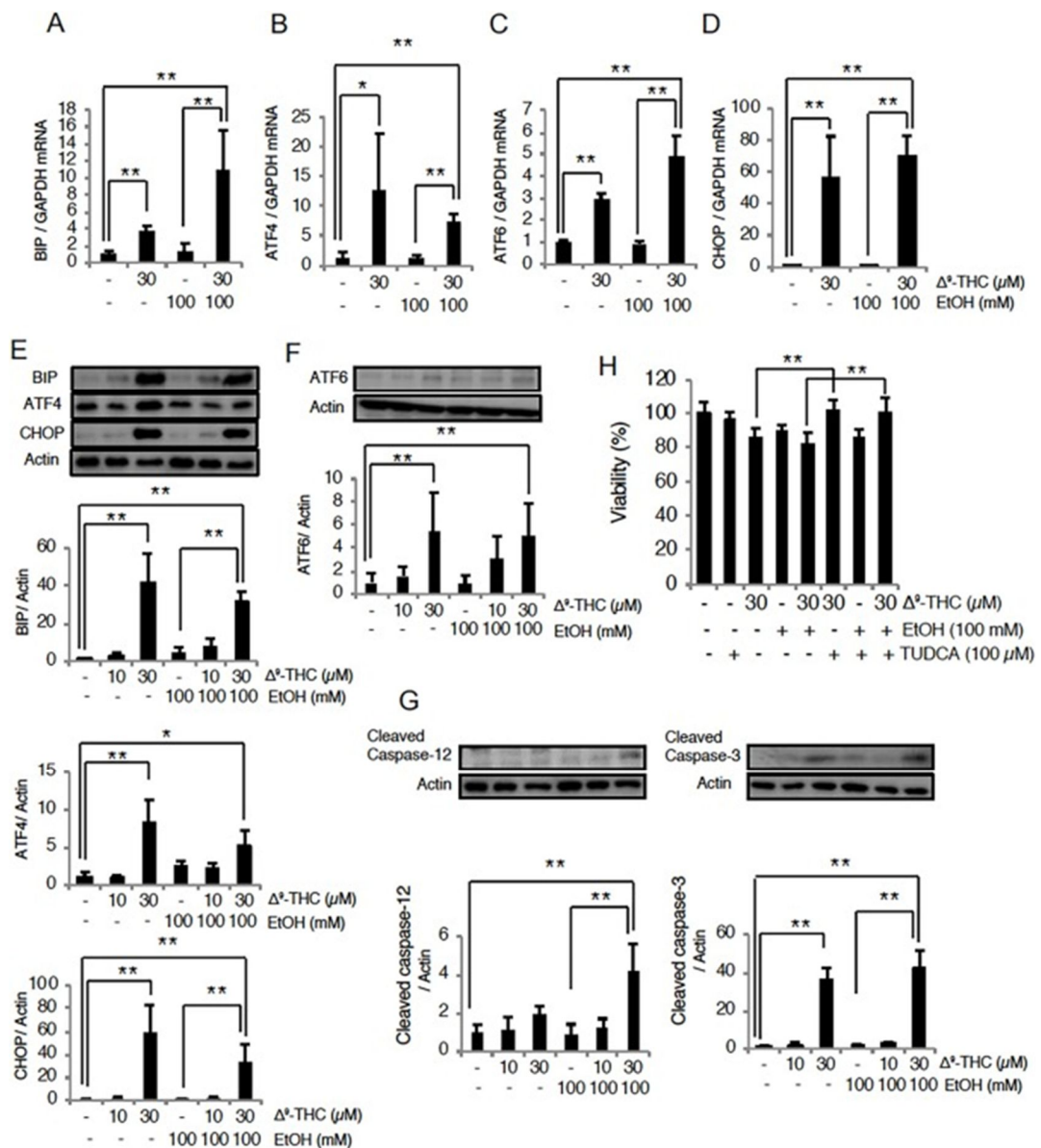
(3) ER ストレス関連遺伝子・タンパク質変動解析

HL-1 細胞に <sup>9</sup>-THC / エタノールを投与し、定量的 RT-PCR・ウェスタンブロット法により ER ストレス応答マーカー (BIP、ATF4、ATF6、CHOP) の遺伝子・タンパク質レベルを解析した。

ER ストレス応答マーカー mRNA・タンパク質レベルは <sup>9</sup>-THC により増加した。エタノールの効果については一定の傾向は見られなかった (A-F)。

ER ストレスを抑制する TUDCA 前処理で、<sup>9</sup>-THC による細胞生存率の低下が有意に回復した (H)。

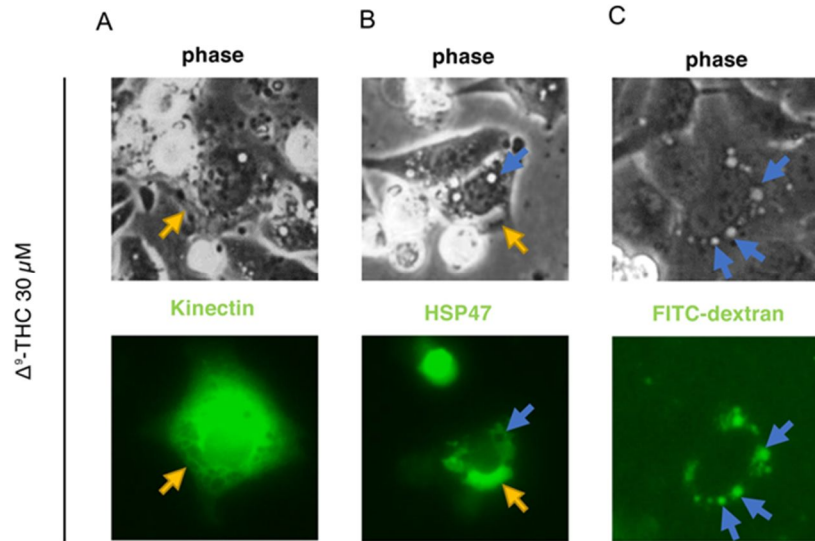
<sup>9</sup>-THC による細胞生存率の低下がアポトーシス細胞死によるものか検討したところ、caspase-3 を介したアポトーシス細胞死が誘導されることが確認された。<sup>9</sup>-THC とエタノール共投与群でのみ caspase-12 の活性化をみとめた (G)。



(4) <sup>9</sup>-THC による細胞内液胞形成

ER の膜および内腔に局在する Kinectin および HSP47 発現ベクターを HL-1 細胞に導入し観察した結果、それぞれ一部の (完全な円形ではない) 液胞と局在が一致した (A,B)

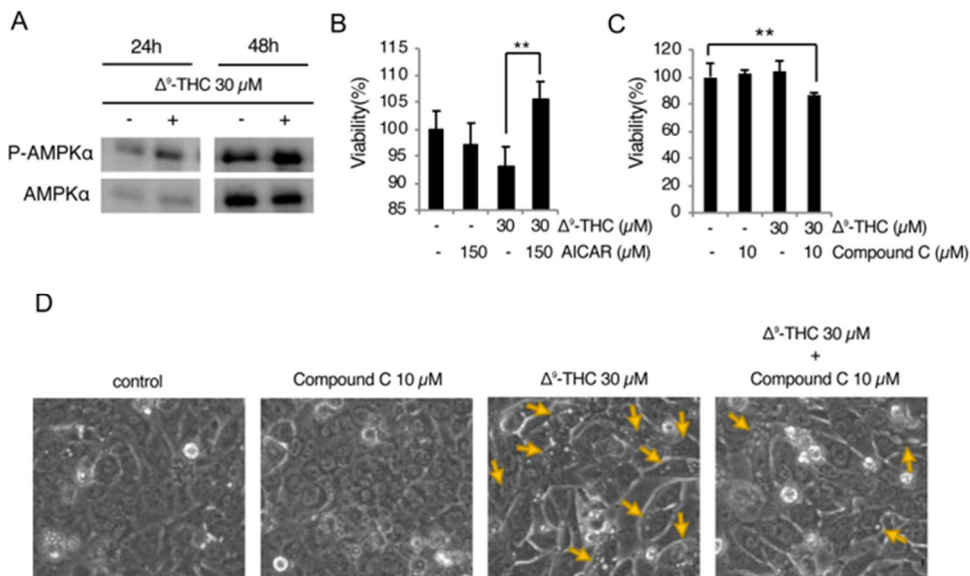
多数形成されている円形の液胞は、マクロピノソームを標識する FITC-dextran の取り込みが観察されたことから、マクロピノサイトーシス (エネルギーを含む細胞外液の取り込みに関与する機構) によるものであることが示唆された (C)。



(5) マクロピノサイトーシス誘導に關する AMPK (細胞のエネルギーセンサー) の役割  
 $\Delta^9$ -THC 処理群では AMPK の活性化が確認された (A)。

$\Delta^9$ -THC による細胞毒性は、AMPK 活性化剤 (AICAR) で抑制され、AMPK 阻害剤 (compound C) で増悪した (B,C)。

AMPK 阻害剤 (compound C) 前処理により、 $\Delta^9$ -THC で形成される細胞内液胞 (マクロピノサイトーシス由来) が抑制された (D)。



(まとめ)

- 本研究では、HL-1 マウス心房由来細胞に対する  $\Delta^9$ -THC / エタノールの直接的な心毒性の分子機構を検討した。
- $\Delta^9$ -THC による細胞毒性は、カンナビノイド受容体 (CB-R1/2) 非依存的なプロセスであることが示唆され、ER ストレスを介したアポトーシス細胞死が誘導されることを確認した。
- $\Delta^9$ -THC の細胞毒性に対するエタノールの相乗効果は確認されなかった。
- $\Delta^9$ -THC による細胞内液胞形成は、マクロピノサイトーシスの亢進によるものであることが示唆された。
- $\Delta^9$ -THC により活性化された AMPK はマクロピノサイトーシスを誘導することで、 $\Delta^9$ -THC の細胞毒性 (ER ストレス誘導性アポトーシス) に対し細胞保護的な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tatsuhiko Murata, Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Koichi Uemura	4. 巻 8
2. 論文標題 Possible roles of AMPK and macropinocytosis in the defense responses against 9-THC toxicity on HL-1 cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 980-987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxrep.2021.04.014.	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 -

1. 著者名 Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Shintaro Isa, Koichi Uemura	4. 巻 6
2. 論文標題 Pyroptotic cell death by exposure to 1-butanol in H9c2 cardiomyoblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05503 ~ e05503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05503	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 1件）

1. 発表者名 村田達彦, 則竹香菜子, 秋利彦, 上村公一
2. 発表標題 大麻成分 9-THCとアルコールの心筋細胞への影響
3. 学会等名 第55回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 則竹香菜子, 秋利彦, 上村公一
2. 発表標題 エタノール以外のアルコールによる細胞毒性研究
3. 学会等名 第55回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanako Noritake, Kanju Saka, Kana Unuma, Takeshi Funakoshi, Ruri Kikura-Hanajiri, Yohsuke Makino, Hirotarō Iwase, Koichi Uemura
2. 発表標題 Fatal Intoxication with a mixture of para-methoxyamphetamine, N-ethylpentylone, and ketamine
3. 学会等名 59th meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) (国際学会)
4. 発表年 2022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