

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17323

研究課題名（和文）危険ドラッグとしてのCB1 受容体アゴニスト乱用による急性中毒死メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of acute poisoning mechanism due to abuse of CB1 receptor agonist.

研究代表者

名取 雄人（NATORI, Yujin）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80610104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：危険ドラッグの乱用は社会的な問題となっており、次々に新たな化合物が合成されている。危険ドラッグは合成カンナビノイドが多くを占め、CB1・CB2受容体を介してその機能を発揮する。本研究では、様々なオミクス解析を用いて、CB1受容体アゴニストの神経細胞に及ぼす毒性機序を多層的に解明することを目的とした。その結果、CB1受容体アゴニスト・CB2受容体アゴニスト処理群では代謝物・タンパク質・遺伝子発現において主成分分析の結果十分に分離していることが示された。また、受容体親和性の違いによって関与する代謝経路や変動する遺伝子発現が異なることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の分析機器の高性能化に伴い代謝物などの発現を網羅的に解析することが可能になったことから、これらの解析によってデータ駆動型の研究が可能となった。本研究の結果、親和性の異なる合成カンナビノイドが培養神経細胞に多層的に異なる影響を与えることがわかった。さらに解析を進めることで、新たな毒性機序の理解につながる事が考えられる。また、CB1受容体アゴニストは欧米において用いられており、日本においても同様な受容体を介して作用する大麻の医療利用が予定されていることから、その毒性機序の解明はこれらの治療薬の開発や使用において、より有効な使用方法の確立や有害作用の回避に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The abuse of synthetic cannabinoids has become a social problem, and new compounds are being synthesized one after another. These compounds exert their functions via CB1 and CB2 receptors. In this study, we aimed to elucidate the toxic mechanisms of CB1 and CB2 receptor agonists on neuronal culture cells in a multilayered manner using various omics analyses. As a result, principal component analysis showed that the CB1 receptor agonist and CB2 receptor agonist treatment groups were well separated in terms of metabolite, protein, and gene expression. It was also suggested that the metabolic pathways involved, and the fluctuating gene expression differ depending on the receptor affinity.

研究分野：生化学

キーワード：カンナビノイド 神経細胞 メタボロミクス オミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグの乱用は健康被害・異常行動やそれに伴う事故などを引き起こし、社会的な問題となっている。このような危険ドラッグは従来テトラヒドロカンナビノール(THC)と同様の作用を持つ合成カンナビノイドが多くを占め、次々に新たな化合物が合成されている。合成カンナビノイドは THC および内在性カンナビノイドと同様にカンナビノイド受容体 CB₁ および CB₂ と結合してその活性を発現して様々な生理作用を現す。CB₁ 受容体は、特に中枢神経系において高発現し、特に海馬ではシナプス前終末の CB₁ 受容体の活性化がグルタミン酸の放出抑制を介して逆行性シナプス伝達抑制に参与する。また、CB₁ 受容体アゴニストは記憶障害を誘引することが報告されている。

生物学においては、従来ある生命現象に対して仮説を立てそれを実証することを目的とした実験を行うことで研究がおこなわれてきたが、近年の分析機器の発展・高性能化に伴い代謝物等の発現を網羅的に解析することが可能になった。これらオミクス解析によって仮説を立てることなく、新たな生命現象に関する知見を見出すデータ駆動型の研究が可能となった。データ駆動型研究では、従来の仮説駆動型に比べてデータ収集時には予想していなかった知見を得る可能性がある。このような多層的なオミクス解析によって合成カンナビノイドが神経細胞に及ぼす影響を詳細に調べることで、これまでに予想もされていなかった毒性機序の理解につながり、さらには中毒死因の解明に寄与する可能性が考えられる。また、CB₁ 受容体アゴニストは欧米において疼痛治療薬として用いられているため、その毒性機序の解明はこれらの治療薬の開発や使用において、有害作用の回避に役立つ可能性がある。

2. 研究の目的

これまでに、ある仮説を立て、これを実証するために CB₁ 受容体の機能やその下流タンパク質発現・修飾について個別の研究は多い。一方で、CB₁ 受容体発現に与える影響や CB₁ 受容体発現と合成カンナビノイドが細胞機能に及ぼす影響をメタボローム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析等網羅的な分析を用いたデータ駆動型研究は少ない。さらに、法中毒学分野において上記階層性の異なるオミクス分析を駆使したデータ駆動型研究は少ない。そこで本研究では、神経系細胞にメタボローム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析を用いて、CB₁ 受容体アゴニストの毒性機序を多層的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウス Neuroblastoma である Neuro2A 細胞を用いた。Neuro2A は 10% Fetal Bovine Serum (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用い、5% CO₂、37°C 環境下で培養した。合成カンナビノイドには CB₁ 受容体・CB₂ 受容体への親和性が異なる 3 種類を用いた。

初めにこれら 3 種類の合成カンナビノイドの細胞毒性を調べるために LDH アッセイおよび CCK8 アッセイを行った。各合成カンナビノイドを用いて、3 時間および 24 時間インキュベート後に上記アッセイを行った結果、いずれも濃度依存的に細胞死を惹起していた。これらの結果から、合成カンナビノイド類の濃度を決めて Neuro2A 細胞を 3 時間培養して試料とした。

メタボローム解析には、Neuro2A 細胞を各合成カンナビノイド類で 3 時間培養して冷メ

タノールを用いて回収して試料とした。メタボロームの抽出効率を補正するためにアミノ酸の安定同位体を用いた。メタボロームを回収するために、この試料を液体窒素と 37°C のサーマルシェイカーを用いて凍結融解を 3 サイクル行った。その後 4°C で 5 分間振とうした後、氷上で 10 分間静置した。遠心後上清を回収し、クロロホルムと超純水を加えてさらに 4°C で 5 分間振とうした。遠心後に得られた上清にさらに超純水を加えて 4°C で 5 分間振とうした後遠心して、その上清を回収した。濃縮遠心機で 1 時間濃縮して残留有機溶媒を除去した。その後、液体窒素を用いて試料を凍結した後に、一晚凍結乾燥した。翌日、乾燥した試料にメトキシアミン塩酸塩・ピリジン溶液を添加してソニケーションを用いて溶解した後、30°C で 90 分間振とうした。さらに、*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) を加えて 37°C で 30 分間振とうして誘導體化を行った。以上のように誘導體化を行ったメタボロームをガスクロマトグラフィ-タンデム質量分析計(GC-MS/MS)を用いて分析を行った。解析には metaboanalysis5.0 および 6.0 を用いた。

トランスクリプトーム解析には、メタボローム解析において特に変動が大きかった 2 種類の合成カンナビノイドを上記と同様に Neuro2A 細胞に 3 時間インキュベートして回収した細胞ペレットを用いた。この細胞ペレットから total RNA を回収した。この total RNA について affymetrix 社の mouse clarion S array を用いて網羅的な遺伝子発現を調べた。解析には Transcriptome Analysis Console をもちいた。

プロテオーム解析にはトランスクリプトーム解析に用いた試料と同様な 2 種類の合成カンナビノイドを細胞に 3 時間作用させて試料を回収した。この細胞ペレットからタンパク質を抽出した後、還元・アルキル化・Trypsin/Lys-C 処理をして試料とした。分析には Thermo scientific 社の Orbitrap Fusion を用いた。分析には metaboanalyst6.0 を用い、解析には Uniprot データベースを用いた。

4. 研究成果

GCMSMS を用いて分析した結果、得た代謝物データの内、コントロールにおいて RSD% が 25% 以下の 85 成分について、metaboanalyst5.0 および 6.0 を用いて解析した結果、61 成分が有意な変動を示していた。主成分分析を行った結果、スコアプロットにおいて各カンナビノイド類はコントロールと分離していた。CB₁ 受容体に親和性が高い合成カンナビノイドと、CB₂ 受容体に親和性が高いものの間ではより分離度が高かった。一方でより CB₁ 受容体に親和性が高い 2 種の合成カンナビノイド同士では分離度が低いことが分かった。そこで分離度が高かった CB₁ 受容体アゴニストと CB₂ 受容体アゴニストのそれぞれについてパスウェイ分析を行ったところ、CB₁ 受容体アゴニストと CB₂ 受容体アゴニストによって共通して解糖系や TCA サイクルのような基本的なエネルギー代謝が変動している一方、芳香族アミノ酸の代謝も変動していることが示唆された。一方で、両アゴニスト間が異なるアミノ酸代謝に寄与していることも分かった。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析ではコントロールと CB₁ 受容体アゴニストと CB₂ 受容体アゴニストを用いた試料を分析した。分析の結果 22206 の既知の遺伝子が検出された。主成分分析において各成分は十分に分離していた。変動を調べた結果、CB₁ 受容体アゴニストによって 60 遺伝子が有意に変動し、CB₂ 受容体アゴニストによって 181 遺伝子が変動した。CB₁ 受容体アゴニスト・CB₂ 受容体アゴニスト間では 54 遺伝子が変動していた。

プロテオーム解析にはトランスクリプトーム解析と同様な試料を供した。コントロール

と CB₁ 受容体アゴニスト・CB₂ 受容体アゴニスト処理群で共通して定量された成分の内、コントロールにおいて RSD が 25%以下の成分を metaboanalyst6.0 で解析した結果、主成分分析において十分に分離していた。

上記のように、CB₁ 受容体アゴニスト・CB₂ 受容体アゴニスト処理群ではメタボローム、トランスクリプトーム、プロテオームにおいて主成分分析において十分に分離していることが示された。また、受容体親和性の違いによって関与する代謝経路や変動する遺伝子発現が異なることも示唆された。今後は、変動した遺伝子やタンパク質発現をリアルタイム PCR やウエスタンブロットなどによって調べるとともに、動物実験においても CB₁ 受容体アゴニスト・CB₂ 受容体アゴニスト処理群の変動が生じることを確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 名取雄人、石井晃
2. 発表標題 培養神経細胞の代謝プロファイルに対するカンナビノイド類の影響解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 名取雄人、水野大、川原正博、石井晃
2. 発表標題 カンナビノイドがマウス視床下部由来GT1-7 の代謝物変動に及ぼす影響解析
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 道志 勝, 名取 雄人, 石井 晃, 渡辺 志朗, 細山田 真, 赤江 豊
2. 発表標題 脳虚血マウスの海馬および血清のメタボローム解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 道志 勝, 名取 雄人, 石井 晃, 三枝 大輔, 渡辺 志朗, 細山田 真, 赤江 豊
2. 発表標題 低体温が脳虚血によるマウス海馬の代謝物の変動に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 道志 勝, 渡辺 志朗, 名取 雄人, 細山田 真, 赤江 豊
2. 発表標題 甲状腺ホルモン投与がマウス脳虚血再灌流後の海馬TGF- β 1遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道志 勝, 渡辺 志朗, 名取 雄人, 細山田 真, 赤江 豊
2. 発表標題 マウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に対するトリヨードチロニンの悪化作用
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021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