

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19485

研究課題名(和文)危険ドラッグとして乱用されるCB1受容体アゴニストのミトコンドリア障害機序の解明

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、培養細胞を用いて、危険ドラッグとして乱用されているCB1受容体アゴニストが、CB1受容体発現や代謝に与える影響を調べた。そのために、マウス由来neuroblastomaであるNeuro2Aを用いて、培養環境の変化がCB1受容体発現に与える影響やCB1受容体アゴニストがメタボロームに与える影響を調べた。その結果、培地中の血清減少によりCB1受容体のmRNA発現が変動した。また、HU-210とAM2210により糖・脂質・アミノ酸やその代謝物40成分の発現が有意に変動した。このような代謝の変動は細胞死を含む細胞や組織の機能異常を引き起こす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、危険ドラッグの乱用が中毒死を含めた健康被害や異常行動などを引き起こし、社会的な問題となっている。このような危険ドラッグのなかでも、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類は、THCや内在性リガン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、その活性を現す。また、CB1受容体のアンタゴニストは肥満治療薬として海外で認可されたが、その副作用によって認可が取り消された例もある。合成カンナビノイドが特に中枢に与える影響を詳細に解明することにより、急性中毒のメカニズムを解明するとともに、治療・予防薬としてカンナビノイドの利用に寄与することができる。

研究成果の概要(英文): In this study, we investigated the effects of CB1 receptor agonists, which are abused, on CB1 receptor expression and metabolism using cultured cells. For the aim of this study, we used Neuro2A, a mouse-derived neuroblastoma, to investigate the effects of changes in the culture environment on CB1 receptor expression and the effects of CB1 receptor agonists on the metabolome. As a result, the mRNA expression of the CB1 receptor fluctuated due to the decrease in serum in the medium. In addition, HU-210 and AM2210 significantly changed 40 components including sugars, lipids, amino acids and their metabolites. It is considered that such fluctuations in metabolism may cause dysfunction of cells and tissues including cell death.

研究分野：細胞生化学

キーワード：法医学 分子生物学 生化学

1. 研究開始当初の背景

近年、危険ドラッグの乱用が中毒死を含めた健康被害や異常行動などを引き起こし、社会的な問題となっている。このような危険ドラッグのなかでも、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類は、THC や内在性リガン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、その活性を現す。CB₁ 受容体は、中枢神経系において発現が高く、細胞膜とミトコンドリア外膜に存在するとされている。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関与する。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。

一方、エネルギー代謝の主要な場であるミトコンドリアは、その細胞が置かれている状況に応じて融合と分裂を繰り返しており、エネルギー代謝やアポトーシスなど細胞がその正常な機能を維持するために重要な働きをしている。ミトコンドリアの融合は、外膜の Mfn1/2 および内膜の Opa1 によって促進されている。分裂は Drp1 によって制御されており、小胞体が非常に大きな役割を果たしている。このミトコンドリア・ダイナミクスの異常は、中枢神経細胞死を伴う疾患との関連が報告されている。ミトコンドリアはエネルギー代謝に大きく関与する細胞小器官であるため、細胞を取り巻く環境によって強く影響を受けることが考えられる。

以上のことから、CB₁ 受容体アゴニストがメタボロームに与える影響の詳細な解析は、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体を介し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。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、ミトコンドリア・ダイナミクスの制御および、その疾患への関与や CB₁ 受容体の機能について個別の研究は多いが、細胞を取り巻く環境が 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のメタボロームに与える影響を詳細に報告した例はない。さらに、法中毒学分野においてメタボローム解析を用いた研究は少ない。

そこで本研究では、神経系細胞を取り巻く環境による CB₁ 受容体発現変動とメタボローム解析を用いることによって CB₁ 受容体アゴニストの毒性機序を詳細に解明することを目的とした。細胞内において、ミトコンドリアは代謝に深く関与し、メタボローム解析を行い変動した代謝物に関与するパスウェイを解析することで、合成カンナビノイドがミトコンドリアの機能に与える影響を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウス由来の Neuroblastoma である Neuro2A 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℃ 環境下で培養した。細胞を取り巻く環境を変動させるために、細胞を 10% FBS-DMEM を用いて一定の濃度で播種した後、翌日に培地を DMEM 中の FBS 濃度を 10%、1%、0.1%、0%として 6 時間および 24 時間培養してから回収した。回収した細胞は ISOGEN2 を用いて

Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA を逆転写して cDNA を合成した後、Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を用いて mouse CB₁ 受容体の mRNA 発現を調べた。

メタボローム解析には、CB₁ 受容体発現解析にもちいたのと同様に Neuro2A を用いた。合成カンナビノイドとして市販の HU-210 と麻薬指定されている AM-2210 を用いた。また、CB₁ 受容体アンタゴニストとして SR141716 を用いた。Neuro2A を 0.1% FBS-DMEM を用いて一晩培養した後、上記のアゴニスト・アンタゴニストを用いて 6 時間培養して、氷冷下メタノールを用いて細胞を回収した。その後、4 で 15 分間振とうした後、インターナルコントロールを加えた後にメタノール：クロロホルム (1:1)の溶液を添加し、さらに 4 で 5 分間振とうした。遠心後上清を回収し、蒸留水を加えてさらに 4 で 5 分間振とうした。得られた上清を新しいチューブに移し、上清を液体窒素で凍結させた後、-85 で一晩凍結乾燥を行った。翌日、メトキシアミン塩酸塩・ピリジン溶液を添加して溶解した後、30 で 90 分間振とうした。さらに、*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)を添加して 37 で 30 分間振とうして誘導体化を行った。こうして得た試料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。

4 . 研究成果

Neuro2A の培地に含まれる FBS を段階的に減少させたところ、CB₁ 受容体の mRNA 発現が変動した。次に、合成カンナビノイドである HU-210 や AM-2210 を用いて Neuro2A を刺激し、そのメタボロームに与える影響を調べた結果、およそ 100 成分の糖質・脂質・アミノ酸やそれらの代謝物が検出された。そのうち、約 40 成分が合成カンナビノイドの刺激により有意に変動した。一方で、HU-210 と AM-2210 との間では増減はあるものの、同一成分においては変動の傾向は変わらなかった。

FBS 中には脂質や神経伝達物質、成長因子等様々な成分が含まれており、本実験結果からは、そのうちどのような成分が CB₁ 受容体 mRNA 発現変動に影響を与えたかについては不明である。しかし、前述のとおり CB₁ 受容体は中枢におけるエネルギー代謝のみならず、記憶の維持などに関与していることから、どのような成分がこの現象に寄与しているのかについては今後研究を進める予定である。今回の研究結果から、合成カンナビノイド刺激により、多くの成分が変動することが明らかとなった。メタボロームの変動は細胞の機能に影響を与えることが考えられ、変動が過剰にあることで細胞死や様々な障害を及ぼすことが考えられる。さらなる研究により詳細なパスウェイの同定や関連遺伝子やたんぱく質の発現変動を調べる予定である。

また、CB₁ 受容体は細胞膜の他にミトコンドリア膜にも発現しているが、今回の現象がそのうちどちらによるものであるのかについては不明である。ミトコンドリアはエネルギー代謝を司り、その異常は様々な疾患に関与することが知られていることから、細胞透過性の異なる CB₁ 受容体アンタゴニストを用いることで、どちらに発現する CB₁ 受容体がこれらの現象に寄与しているのかについて明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石井 晃、吉本 高士、名取 雄人、山本 敏充、財津 桂
2. 発表標題 労働現場で発生したトルエン中毒の二死亡例
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名取 雄人、井本 英志、Levi Mikael、土橋 均、石井 晃、小倉 泰郎、財津 桂
2. 発表標題 LC/Q-TOFMSとMicro Volume QuEChERSを用いた全血中薬物のノンターゲットスクリーニングメソッドの構築
3. 学会等名 日本法中毒学会第38年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eishi Imoto, Yujin Natori, Jun Watanabe, Hitoshi Tsuchihashi, Kei Zaitzu, Ichiro Hirano
2. 発表標題 Evaluation of micro volume sample preparation technology newly designed for forensic toxicology with High Resolution Accurate Mass Spectrometry
3. 学会等名 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yujin Natori, Eishi Imoto, Kengo Matsumoto, Mikael Levi, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii, Tairo Ogura, Kei Zaitzu
2. 発表標題 Non-target screening methods for drugs in blood by combinational use of LC/Q-TOFMS and Micro Volume QuEChERS kit
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Ishii, Kei Zaitso, Yujin Natori, Hitoshi Tsuchihashi
2. 発表標題 Comparison of internal standards for determining glyphosate, glufosinate and their metabolites in human plasma by LC-MS/MS
3. 学会等名 .The 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) (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
---------	---------