

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10567

研究課題名(和文) 依存形成抑制メカニズムとしての内因性カンナビノイドシステムの可能性の検討

研究課題名(英文) Investigation of the possibility of the endocannabinoid system as a mechanism for suppressing the formation of addiction

研究代表者

越智 拓 (OCHI, Hiroshi)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：70527704

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)：本研究では、中枢神経系由来培養細胞モデルを用いて、内因性カンナビノイドシステムと脳内報酬系との関連性を明らかにすることを目的とした研究であった。しかし、カンナビノイドの培養細胞に対する影響を検討するための基礎的知見を得る段階において、カンナビノイドを用いて細胞を処理することで、顕著な細胞毒性が認められた。そこで、これらカンナビノイドによって誘発される細胞毒性の機序について検証した。内因性カンナビノイドであるAEAによって誘導される細胞毒性は、ネクローシス様であるのに対し、植物性カンナビノイドであるCBDによって誘導される細胞毒性は、アポトーシス様であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大麻は紀元前から医薬品として使用されるとともに、これまでに様々な疾患に対する植物性カンナビノイドの有効性が明らかとされている。また、内因性カンナビノイドは正常細胞に対して、増殖性および生存促進性作用が認められるとともに、いくつかの腫瘍化細胞に対して細胞死を誘導することが報告されている。本研究においても、カンナビノイドの腫瘍化細胞に対する有効性を確認した。また本研究で用いたC6細胞とU87細胞は、それぞれラットおよびヒトのグリオーマに由来する細胞であることから、これらの細胞に対するカンナビノイドの細胞毒性をさらに検証することで、難治性のグリオーマに対する効果的な治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The original aim of this study was to elucidate the relationship between the endocannabinoid system and brain reward system as the center of dependence formation by using a cultured cell model derived from the central nervous system. However, at the stage of obtaining basic knowledge for examining the effects of cannabinoids on cultured cells, significant cytotoxicity was observed by treating cells with cannabinoids. Therefore, we investigated the mechanism of cytotoxicity induced by these cannabinoids. We found that the cytotoxicity induced by the endocannabinoid arachidonylethanolamide was necrotic, whereas that induced by the phytocannabinoid cannabidiol was apoptotic.

研究分野：法医学

キーワード：植物性カンナビノイド カンナビジオール CBD 内因性カンナビノイド グリオーマ アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

内因性カンナビノイドシステムは、生体内に広く存在し、様々な生理機能に関与していることが明らかとなってきている。中枢神経系において内因性カンナビノイドシステムは、シナプス逆行性に作用することにより、プレシナプスからのシグナル伝達を抑制的に制御している（逆行性シグナル伝達抑圧）。

一方、違法薬物をはじめとした依存形成物質は、まず、それぞれの特異的な標的分子に作用したのち、さらに次の標的分子に対して作用を広げていくことで報酬効果を発揮する。このような報酬効果に共通するメカニズムとして深く関与しているのが、脳内報酬系と呼ばれるドーパミンシグナリング伝達系である。また、依存形成には脳内報酬系機能の亢進が深く関与していると考えられている。

そこで本研究では、培養細胞モデルを用いて、中枢神経系を構成する神経細胞やグリア細胞に存在する内因性カンナビノイドシステムにおける逆行性シグナル伝達抑制機構が、脳内報酬系機能の亢進に対し、抑制的な効果を発揮する可能性について検討することとした。

## 2. 研究の目的

これまでに報告されている内因性カンナビノイドの中枢神経系における逆行性シナプス伝達抑圧機構については、グルタミン酸神経系やγ-アミノ酪酸神経系に対するものがほとんどであり、ドーパミン神経系におけるシグナル伝達への内因性カンナビノイドの影響について検討したものは少ない。

また、これまでの薬物依存についての研究は、動物実験が主体であり、その研究結果の解釈においては、個体レベルにおける薬物に対する応答の複雑性のため、薬物依存形成の根底にある詳細な分子機構は、未だ解明されていない。

そこで本研究では、中枢神経系由来の培養細胞を用い、これらの細胞における内因性カンナビノイドシステムとドーパミンシグナリングに研究対象を限定することでシンプルな実験系とし、依存形成メカニズムの分子基盤を明らかにするとともに、内因性カンナビノイドシステムの逆行性シナプス伝達抑圧作用に基づいた依存形成抑制機構について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞の調整、形態観察

中枢神経系由来培養細胞として、ラット由来グリオーマ細胞株 (C6 細胞)、ヒト由来グリオーマ細胞株 (U87 細胞) を用い、これらの細胞に対し、植物性カンナビノイド (cannabidiol (CBD)) および内因性カンナビノイド (2-arachidonoyl glycerol (2AG)、arachidonoyl ethanolamide (AEA)) で処理した。各カンナビノイドで処理後位相差顕微鏡にて細胞の形態変化を観察し、記録した。

### (2) 細胞毒性の評価

植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイドを作用させた培養細胞における細胞生存率と細胞傷害率を、それぞれ CCK8 アッセイならびに LDH アッセイにて評価した。

### (3) Caspase3/7 活性の測定

植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイドを作用させた培養細胞におけるカスパーゼ 3/7 活性を、Caspase-Glo 3/7 アッセイにて評価した。

## 4. 研究成果

本研究は当初、中枢神経系由来培養細胞モデルを用いて、内因性カンナビノイドシステムと脳内報酬系との関連性を明らかにすることを目的としていたが、植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイドの培養細胞への影響について検討するにあたり、基礎的知見を得る段階において、一部のカンナビノイド処理により、著しい細胞毒性が確認された。このカンナビノイド誘発性の細胞毒性発現メカニズムを明らかにしなければ、当初の研究目的を達成することができないと考え、植物性カンナビノイドならびに内因性カンナビノイドによる細胞毒性発現メカニズムの詳細を明らかにすることとした。

### (1) 植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイド処理による培養細胞の形態変化

図 1 に示すように、cont では、顕著な細胞形態の変化を認めず、時間経過に伴う良好な細胞増殖を認める。2AG 処理では、1 時間で突起の退縮を認めるも、その後は時間経過とともに良好な細胞増殖を認める。AEA 処理では、1 時間で細胞の膨化および球状化を認め、その後は明瞭な細胞形態が認められず、大小不同の残滓物となる。CBD 処理では、1 時間で突起の退縮を認め、その後細胞は収縮および球状化する。

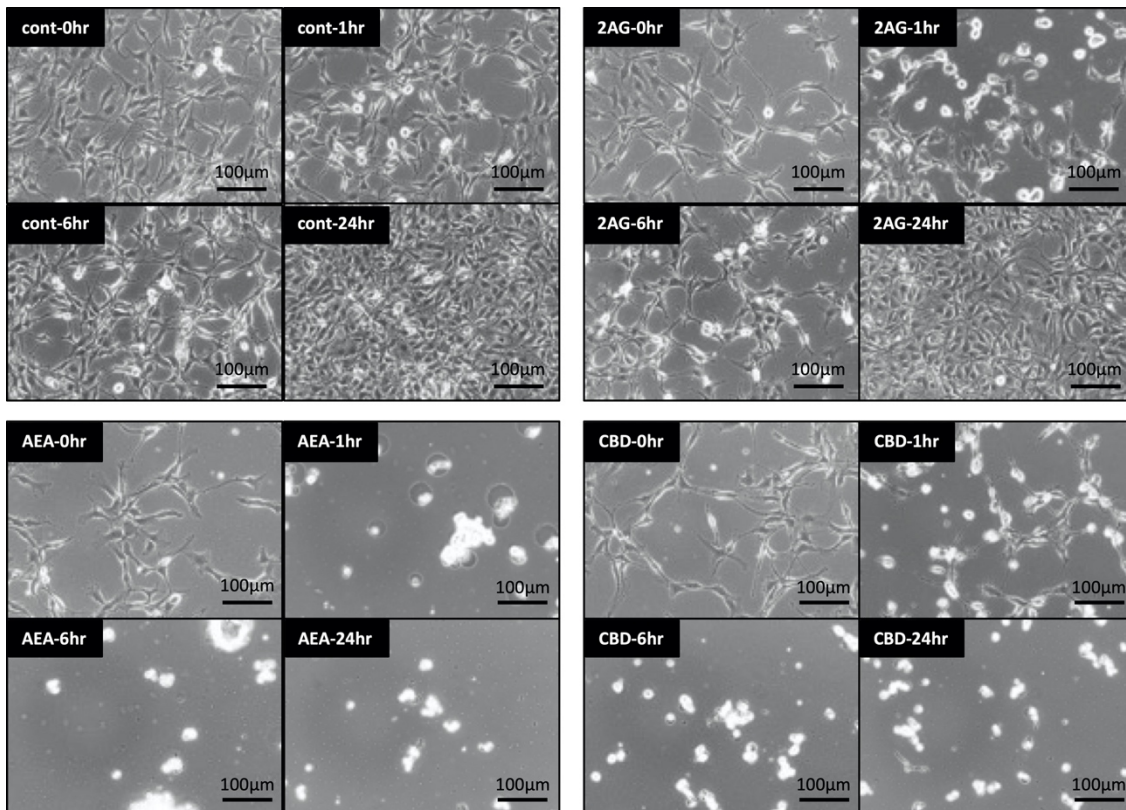


図1 カンナビノイド処理による C6 細胞の経時的形態変化  
C6 細胞をコントロール (cont)、10 $\mu$ M 2AG (2AG)、10 $\mu$ M AEA (AEA)、10 $\mu$ M CBD (CBD) にて、0、1、6、24 時間処理した。

(2) 植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイド処理による細胞毒性

各種カンナビノイドによる C6 細胞に対する細胞毒性の詳細を明らかにするために、CCK8 アッセイにて細胞生存率を評価し、LDH アッセイにて細胞傷害率を評価した。2AG 処理では、10 $\mu$ M にて一過性の生存率の低下を認めるが、その後回復した (図2)。AEA 処理では、10 $\mu$ M にて細胞生存率の急激な低下と、細胞傷害率の急激な上昇を認めた (図2)。CBD 処理では、5 $\mu$ M 以上にて細胞生存率の急激な低下を認めるが、細胞傷害率は時間経過に伴い漸増した (図2)。

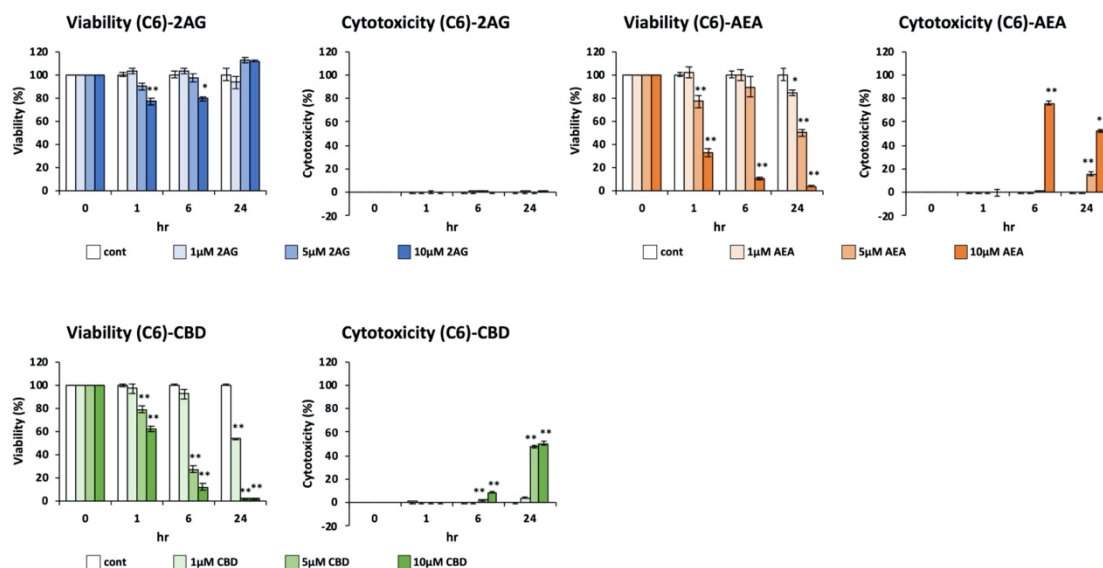


図2 カンナビノイド処理による C6 細胞に対する細胞毒性  
C6 細胞をコントロール (cont)、1~10 $\mu$ M 2AG、1~10 $\mu$ M AEA、1~10 $\mu$ M CBD にて 0~24 時間処理した場合における Viability (細胞生存率: 各時間における cont での細胞生存率を 100%とした場合における相対的細胞生存率) と Cytotoxicity (細胞傷害率: 各時間における cont での細胞傷害率を 0%とした場合における相対的細胞生存率) を示す。mean $\pm$ SE, n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (v. s. cont)。

また、異なる動物種のグリオーマに由来する株化細胞 (U87 細胞) に対し、カンナビノイドによる同様の細胞毒性が認められるかを検証した。2AG 処理では顕著な細胞毒性を認めず、AEA 処理では細胞生存率の急低下と細胞傷害率の急上昇を認め、CBD 処理では細胞生存率の急低下と細胞傷害率の漸増を認めた (図 3)。これらの結果は、C6 細胞で認められた結果と同様であった。

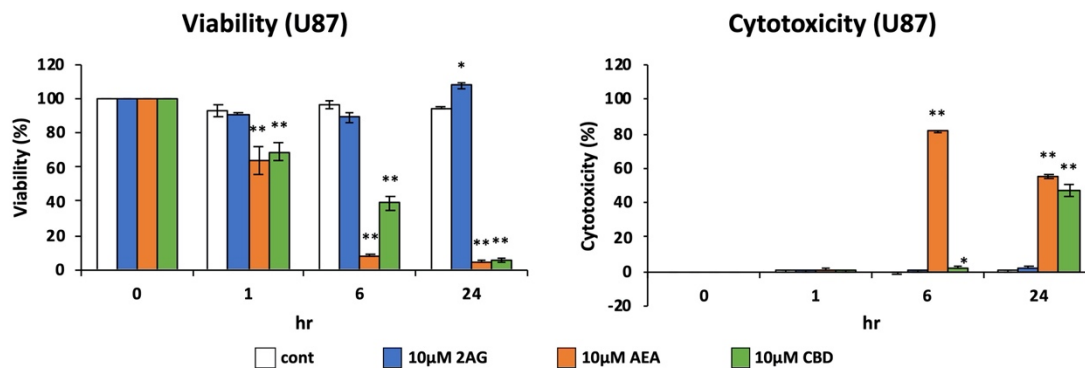


図 3 カンナビノイド処理による U87 細胞に対する細胞毒性

U87 細胞をコントロール (cont)、10µM 2AG、10µM AEA、10µM CBD にて 0~24 時間処理した場合における Viability (細胞生存率: 各時間における cont での細胞生存率を 100%とした場合における相対的細胞生存率) と Cytotoxicity (細胞傷害率: 各時間における cont での細胞傷害率を 0%とした場合における相対的細胞生存率) を示す。mean±SE, n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (v. s. cont)。

### (3) 植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイド処理によるカスパーゼ 3/7 活性

カンナビノイドによって誘導される C6 細胞における細胞毒性に対し、アポトーシス機構が関与しているかを確認するため、カンナビノイド処理に伴うカスパーゼ 3/7 活性の変化を確認した。アポトーシス誘導剤である staurosporine (STS) で処理した場合、カスパーゼ 3/7 活性は 6 時間で有意に上昇した (図 4)。2AG および AEA 処理では、カスパーゼ 3/7 活性に顕著な変化を認めなかった (図 4)。一方、CBD 処理では、カスパーゼ 3/7 活性は 1 時間で有意に上昇し、6 時間でより顕著となった。

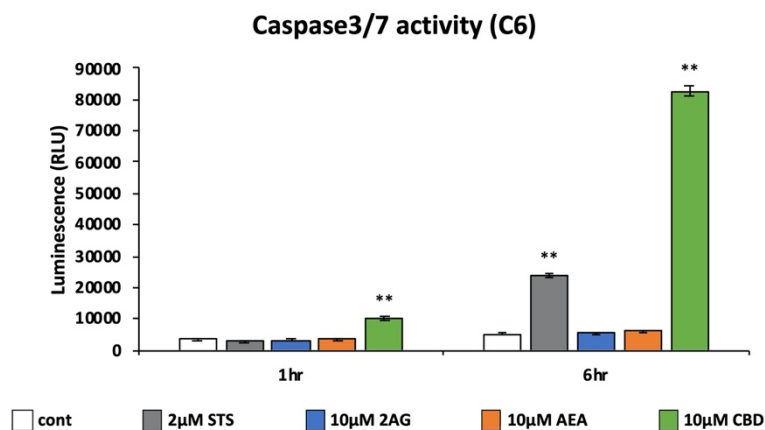


図 4 C6 細胞のカスパーゼ 3/7 活性に対するカンナビノイドの影響

C6 細胞をコントロール (cont)、2µM staurosporine (STS)、10µM 2AG、10µM AEA、2µM CBD にて 1 あるいは 6 時間処理した場合におけるカスパーゼ 3/7 活性を示す。mean±SE, n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (v. s. cont)。

### (4) まとめ

本研究において、カンナビノイドにより誘導される細胞変化が異なることが明らかとなった。2AG では顕著な細胞毒性を認めなかった。一方、AEA によって誘導される細胞変化 (細胞形態の膨化、細胞外 LDH 活性の急激な上昇) は、ネクロシス様であるのに対し、CBD によって誘導される細胞変化 (細胞形態の収縮、カスパーゼ 3/7 活性の上昇) は、アポトーシス様であった。

一般に、内因性カンナビノイドである 2AG や AEA、また植物性カンナビノイドのうち中枢神経作用を持つカンナビノイドである THC は、カンナビノイド受容体のアゴニストとして作用することが知られている。一方、中枢神経作用を持たない CBD は、カンナビノイド受容体に対する結合能が低く、主にその他の受容体やイオンチャネルなどを介して作用すると考えられている。また、CBD は THC の作用に拮抗することも知られている。この様な各カンナビノイドの作用機序の

違いが、本研究で認められたカンナビノイドによって誘導される細胞毒性の違いに起因する可能性が示唆される。

また、2AG および AEA はともに内因性カンナビノイドであるが、中枢神経系において 2AG は AEA の 100 倍以上の高濃度で存在するとされている。この様な元々の生体での存在量の差が、本研究で認められた 2AG と AEA 処理に対するグリオーマ細胞の応答性の違いに寄与している可能性が示唆される。

大麻は、紀元前から医薬品として使用されるとともに、これまでに様々な疾患に対する有効性が明らかとされている。また内因性カンナビノイドは、正常細胞に対して増殖性および生存促進性作用が認められるとともに、いくつかの腫瘍化細胞に対して細胞死を誘導することが報告されている。本研究で用いた培養細胞モデルは、ラットならびにヒトのグリオーマ由来の細胞株である。グリオーマは最も多い脳腫瘍の一つで難治性の腫瘍であるとされている。カンナビノイドによる細胞毒性をグリオーマ細胞に対し特異的に誘導することが可能となれば、難治性の疾患に対する効果的な治療法の開発につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Shuji Kozawa, Kazuo Igarashi, Ichiro Isobe	4. 巻 6
2. 論文標題 Endocannabinoid 2-AG inhibits the release of dopamine from PC12 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24508/mms.2022.06.001	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 Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Ichiro Isobe, Kazuo Igarashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Dopamine enhances the glial endocannabinoid signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 2-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24508/mms.2021.06.001	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 Shuji Kozawa, Hidehisa Sekijima, Hiroshi Ochi, Ichiro Isobe	4. 巻 3
2. 論文標題 Glioblastoma multiforme masquerading as an intracerebral hemorrhage on postmortem computed tomography: Investigating a case of maternal death during pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsir.2021.100202	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 越智拓、平田ゆかり、濱島誠、鈴木里奈、小澤周二、磯部一郎
2. 発表標題 植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイドの培養グリオーマ細胞に対する細胞毒性の評価
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱島誠、越智拓、鈴木里奈、小澤周二、磯部一郎
2. 発表標題 消火用二酸化炭素ガス放出による中毒死と考えられた1例
3. 学会等名 第44次日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯部一郎、濱島 誠、平田ゆかり、越智 拓
2. 発表標題 病理解剖において腹腔内出血と肝挫傷を認め外傷性出血性 ショックが疑われた事例
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤周二、磯部一郎、濱島誠、平田ゆかり、越智拓
2. 発表標題 死後CT所見の解剖での確認に苦慮した2事例
3. 学会等名 第43次日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智拓、平田ゆかり、濱島誠、磯部一郎
2. 発表標題 内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現調節に關与する細胞内シグナル伝達経路の探索
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯部一郎、濱島誠、平田ゆかり、越智拓
2. 発表標題 事前通告のあった心中死体で内因死と考えられた事例
3. 学会等名 第42次日本法医学会学術中部地方会
4. 発表年 2020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
---------	---------