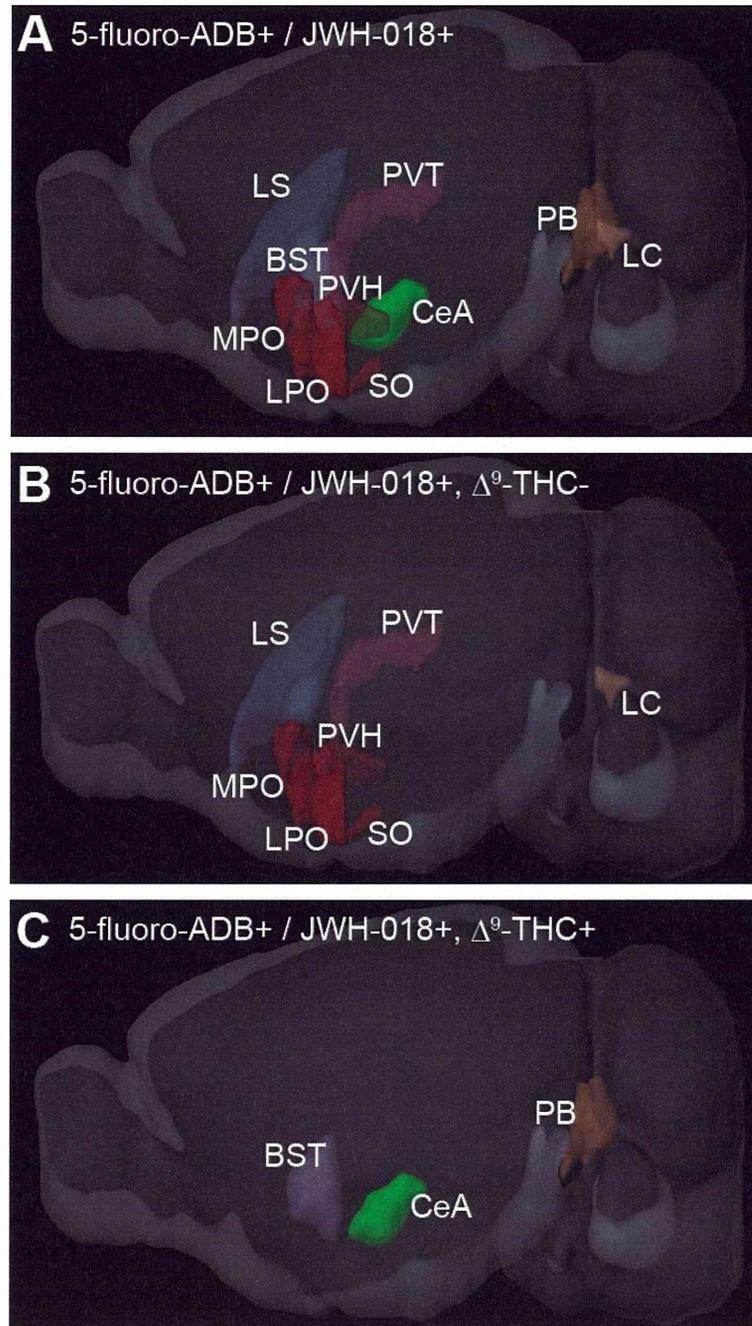


Table 1

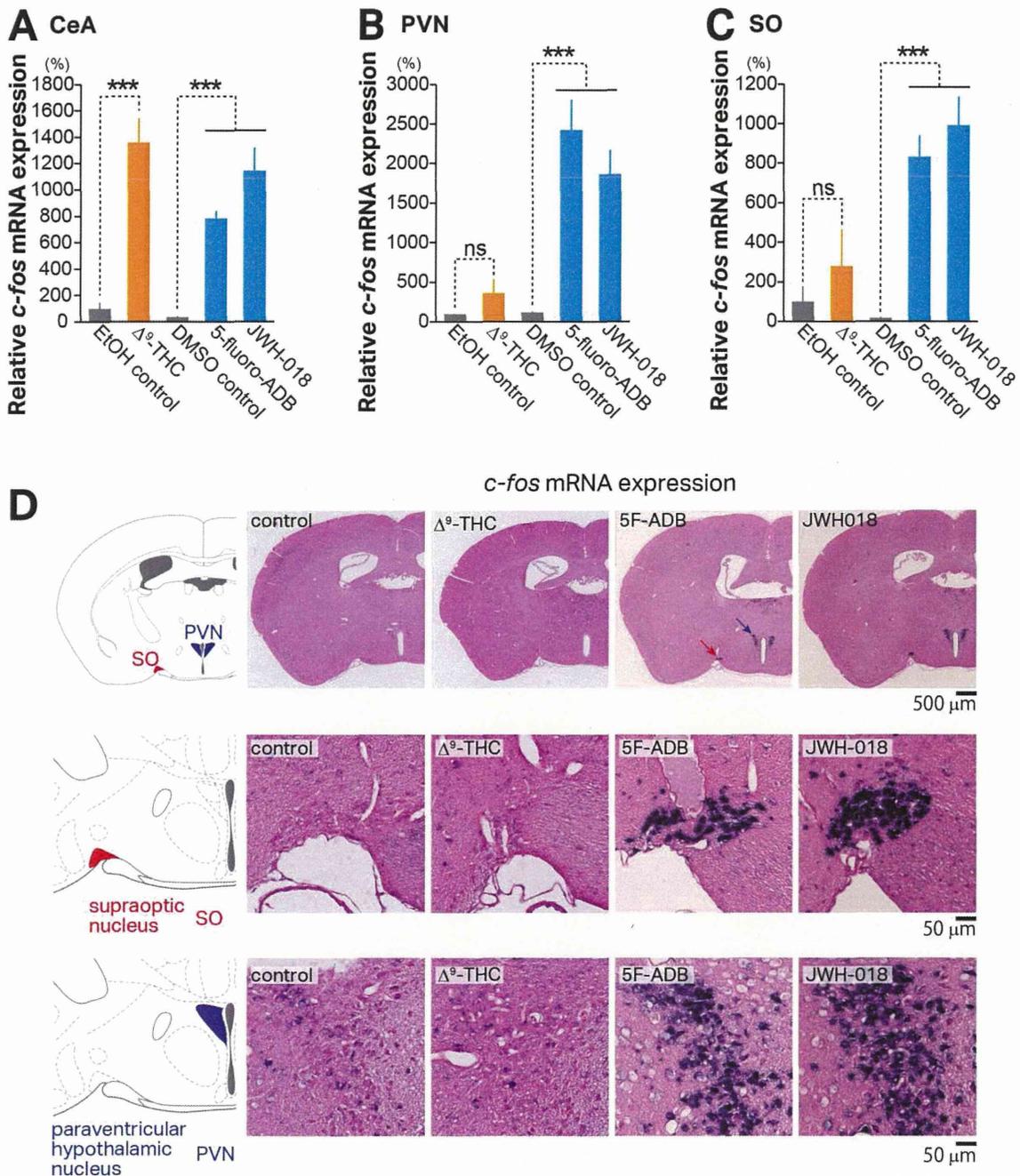
	JWH-018	5-fluoro-ADB	Δ^9 -THC	機能
olfactory bulb (嗅球)	+	+	—	嗅覚
olfactory cortex (嗅皮質)	+	+	—	嗅覚
lateral septum (外側中隔核)	++	++	—	不安やストレス
cingulate cortex (帯状皮質)	+	+	—	
bed nucleus of stria terminalis (分界条床核)	++	++	++	恐怖やストレス
lateral preoptic area (外側視索前野)	++	++	—	体温中枢
medial preoptic area (内側視索前野)	++	++	—	体温中枢
paraventricular nucleus of hypothalamus (視床下部室傍核)	++	++	—	神経内分泌
paraventricular nucleus of thalamus (視床室傍核)	++	++	—	身体的・心理的ストレス
central amygdala (扁桃体中心核)	++	++	++	恐怖中枢
supraoptic nucleus (視索上核)	++	++	—	神経内分泌
dorsomedial hypothalamus (視床下部背内側核)	+	+	—	体温制御
ventromedial hypothalamus (視床下部内腹側核)	+	+	—	体温制御
auditory cortex (聴覚野)	+	+	—	聴覚
posterior hypothalamus (後部視床下部)	+	+	—	体温調節
parabrachial nucleus (傍小脳脚核)	++	++	+	自律神経と情動の制御
locus coeruleus (青斑核)	++	++	—	覚醒、注意、パニック

Figure 1



全脳活性化マッピングによって明らかになった、5-fluoro-ADB と JWH-018 で共通して活性化される領域 (A)、5-fluoro-ADB と JWH-018 によって活性化されるが Δ^9 -THC では活性化されない領域(B)、5-fluoro-ADB, JWH-018, Δ^9 -THC で共通して活性化される領域(C)を脳の 3D モデル上に示した。

Figure 2



A-C, Δ^9 -THC, ADB, JWH-018 及びコントロール (Ethanol/emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18) 又は DMSO/ emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18)) を投与したマウスの扁桃体中心核(A), 室傍核(B), 視索上核 (C)のそれぞれの領域で検出された *c-fos* mRNA シグナルの平均値を計測した. グラフは平均値 +SEM を示している. また, グラフ中にコントロールと化合物投与群との間で Student's t-test (unpaired) を行った結果を示した (*, $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$).

D, Δ^9 -THC, ADB, JWH-018 のそれぞれの化合物を投与したマウス及び溶媒を投与したコントロールマウスの室傍核(PVN)及び視索上核(SO)における *c-fos* mRNA の発現を示した(最上段). 真中および下の段にそれぞれ視索上核(SO) 及び室傍核(PVN)の拡大図を示した.

分担研究課題：合成カンナビノイドの中枢メタボロームへの影響に関する研究

研究分担者：山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 教授

－合成カンナビノイドの生体影響と既存乱用薬物との相違：メタボロミクスによる解析－

研究要旨：本研究では、ヘロイン、大麻由来成分の Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC)、および合成カンナビノイド JWH-018 を調査対象とした。これら乱用薬物摂取により引き起こされる生体応答のメカニズム理解のために、マウス脳のメタボロームに及ぼす影響を解析することを目的とした。ヘロインおよび Δ^9 -THC については、慢性摂取の影響を、また、JWH-018 については急性摂取の影響を検討した。それぞれの薬物がメタボロームに及ぼす影響には、類似点と相違点があった。既報で血液および尿のメタボロームでも増加が認められているクエン酸が、脳においてもヘロイン慢性投与により増加していることが分かった。一方、本研究では、 Δ^9 -THC および JWH-018 により内因性カンナビノイドレベルが増加することが初めて示唆された。内因性カンナビノイド、ピローダミン (*O*-アラキドノイルエタノールアミン; *O*-AEA) の増加は Δ^9 -THC と JWH-018 に共通したバイオマーカーになる可能性がある。また、脳の *N*-アセチルアスパラギン酸はヘロインでは低下したが、 Δ^9 -THC と JWH-018 では何れも増加したことから、これらに共通したバイオマーカーになる可能性が示唆された。脳メタボローム解析は、危険ドラッグ等により引き起こされる症状理解の一助となり、新たなバイオマーカー設定につながる期待される。

研究協力者

石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 准教授

武田 知起 九州大学大学院薬学研究院 助教

森元 聡 九州大学大学院薬学研究院 教授

A. 研究目的

合成カンナビノイドは、2004 年以降、インターネットや店舗から、Spice, Gold Spice, Spice Silver, Spice Diamond, Tropical Spice, Chillx, Yucatan Fire, やその他多くの名称でハーブとの混合物として流通されてきた。近年、合成カンナビノイドの使用が引き起した事故が社会問題化し、これら薬物への法規制が進んだ。Huffman らは、最初の JWH 化合物を内因性カンナビノイド (CB_1 および CB_2) 受容体 に対する影響を研究する過程で合成した (1)。

JWH-018 (1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole) は、2008 年に‘Spice’製品の中から同定された (2)。JWH-018 は CB_1 受容体 (CB_1R) と CB_2 受容体 (CB_2R) に低 nM 域で結合し活性化させる (3)。JWH-018 は、大麻の主成分である Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) と骨格が大きく異なるにも関わらず、カンナビノイド受容体との親和性が高く、 Δ^9 -THC に比較して CB_1R に約 4 倍、 CB_2R に約 10 倍強く結合する (3)。JWH-018 は、大麻様作用を有することなどから、現在、麻薬に指定されており、精神および身体への影響が多数報告されている (4)。しかし、JWH-018 等の合成カンナビノイドが、 CB_1R 、 CB_2R に結合することが事実であるにせよ、 Δ^9 -THC による生体影響との異同等、生体に及ぼす影響の詳細な機構は、まだ十分に理解されているとは言い難い。そのた

め、体系的な診断や治療の方法が未だ確立されておらず、毒性発現機構の解明は喫緊の課題である。メタボローム解析では、体液、細胞および組織など、生体システムに存在する低分子をトータルに抽出、分離、分析、定量し、合成カンナビノイドに特異的な生理的状态を解析することが出来ると期待される。本研究では、まず、代表的な合成カンナビノイド JWH-018 と既存の乱用薬物、ヘロインおよび Δ^9 -THC に対して、脳および血液のメタボローム解析を行い、これら薬物による毒性発現機構の相違について検討し、JWH-018 の乱用の指標となるバイオマーカーを同定することを目指した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物処理

C57BL/6J 雄性マウス (7 週令)(各群 10 匹)を用いた。塩酸ヘロインは、15 $\mu\text{mol}/\text{kg}/10 \text{ mL}$ (i.p.)を一日 2 回、12 日間投与し、最終投与 16 時間後、麻酔し、脳を摘出した。対照動物には、同量の生理食塩液を投与した。また、 Δ^9 -THC はエタノールに溶解後、生理食塩液でエタノールの終濃度 2% となるように希釈し、5.6 $\text{mg}/\text{kg}/10 \text{ mL}$ (i.p.)を一日 1 回、12 日間投与し、最終投与 24 時間後に、麻酔、採血し、脳を摘出した。対照群には、同様に希釈した薬物を含まない溶液を同量投与した。JWH-018 は、エタノールと Tween 80 の 1:1 混合液に溶解し、生理食塩液でそれぞれの終濃度が 2% となるように希釈し投与液とした。これを低用量群 (1 $\text{mg}/\text{kg}/10 \text{ mL}$, i.p.)と高用量群 (6 $\text{mg}/\text{kg}/10 \text{ mL}$, i.p.)として投与し、投与 2 時間後に、麻酔、採血し、脳を摘出した。対照群には、同様に希釈した薬物を含まない溶液を同量投与した。

2. メタボローム解析

既報 (5) に準じて、採取した組織を $\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:2:1, v/v)で抽出して、下記の構成からなる Waters 社製 UPLC-TOF/MS を用いてメタボローム解析を行った。ACQUITY UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

-electrospray ionization (ESI) 検出器を装着した Waters LCT Premier™ Mass Spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK)(positive および negative モード)を使用し、カラムには ACQUITY UPLC BEH-C18 column (50 mm 4.6 mm i.d., 1.7 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)を用いた。

3. データ解析

統計解析には One-way ANOVA と post hoc Tukey test を用いた。バイオマーカー候補物質の同定には、HMDB データベース、PubChem 化合物データベースおよび KEGG を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号:A26-250-2.

C. 結果

ヘロインがメタボロームに及ぼす影響:

主成分解析の結果、ヘロイン処理群と対照群の間には明確なメタボロームの変動があることが示唆された (Fig. 1A)。次に、S-plot を用いて、ヘロインにより増減するバイオマーカー候補物質を選別した (Fig. 1B)。その際、対照群と比較して 0.8 以上および 0.8 以下のものを対象とした。既報で血液および尿のメタボロームでも増加が認められているクエン酸 (6)が、大脳においてもヘロイン慢性投与により増加していることが分かった (Table 1)。また、L-チロシンが低下する一方で、その代謝経路にあるノルアドレナリン、メタネフリンは増加した。ヌクレオチドモノリン酸もヘロイン慢性投与により増加した。また、脂質代謝に関連するカルニチンは増加した。

Δ^9 -THC がメタボロームに及ぼす影響:

主成分解析の結果、 Δ^9 -THC 慢性投与群と対照群の間には、脳および血液、いずれにおいても明確なメタボロームの変動があることが示唆された (Fig. 2A)。次に、S-plot を用いて、 Δ^9 -THC によ

り増減するバイオマーカー候補物質を選別した (Fig. 2B). 変動が大きかった物質を Table 2 に示す. 血液では、脂質代謝に関与するカルニチンが低下した. 一方、アミノ酸である L-グルタミン、L-フェニルアラニンおよび L-メチオニンが増加した. また、N-ステアロイルチロシンおよび、内因性カンナビノイドであるピローダミン (O-アラキドノイルエタノールアミン; O-AEA) およびアナンダミド (18:3, n-6) が増加した. このうち、最も変動が大きかったのはピローダミンであった. 脳では、血液と同様に L-グルタミンが増加した. また、神経伝達物質のセロトニンも増加した. 一方、N-アセチルアスパラギン酸は低下した.

JWH-018 がメタボロームに及ぼす影響:

JWH-018 高用量 6 mg/kg 単回投与によりカタレプシーが著しく惹起されたことから、JWH-018 については、単回投与での検討を行った. 低用量 1 mg/kg 単回投与での検討も行ったが、メタボロームへの顕著な影響は認められなかったため (未掲載)、高用量単回投与での解析結果のみを掲載する. 主成分析の結果、JWH-018 投与群と対照群の間には、脳および血液、いずれにおいても明確なメタボロームの変動があることが示唆された (Fig. 3A). 次に、S-plot を行った (Fig. 3B). JWH-018 では、得られたイオン数が多くなかったため、XCMS™ online (The Scripps Research Institute) による Cloud plot での解析も行った (Fig. 4). このプロットでは、横軸は保持時間であり、上半分に増加したイオン (緑)、下半分に減少したイオン (赤) を示している. 円の大きさはピーク面積を示し、有意水準が高いほど濃い色で示される. 変動が大きかったものを Table 3 に示す. 血液では、脂質代謝に関与するカルニチンが増加した. また、アミノ酸である L-グルタミン、L-フェニルアラニンおよび L-チロシンが増加した. また、N-ステアロイルチロシンは低下した. 一方、内因性カンナビノイドである O-AEA および 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) が著しく増加した. 特に O-AEA の増加が顕著だった. また、3-ケトスフィン

ゴシン、ミオイノシトールおよび D-グルコースも増加した. 脳では、N-アセチルアスパラギン酸の低下が最も顕著であった. 一方、脂質代謝に関与するアセチルカルニチン、リノレイルカルニチンが増加した. アミノ酸ではグルタミン酸、TCA サイクルの中間代謝物コハク酸も増加した. また、内因性カンナビノイドであるアナンダミド (18:3, n-6) およびアナンダミド (20:5, n-3) が増加した. 酸化型グルタチオン、AMP も増加した.

D. 考察

本研究では、合成カンナビノイド JWH-018、既存の乱用薬物ヘロインおよび Δ^9 -THC がメタボロームに及ぼす影響を検討した. ヘロインおよび Δ^9 -THC は慢性投与、JWH-018 は急性投与であるため、単純な比較を行って結論を出すのは早計であると思われるが、それぞれの薬物がメタボロームに及ぼす影響には、類似点と相違点があった. まず、ヘロイン慢性投与では脳で L-チロシンの低下が認められた. しかし、JWH-018 では、L-チロシンレベルの増加が血液で認められ、脳では変動が認められていない. Δ^9 -THC では血液中フェニルアラニンレベルの増加が認められたものの、L-チロシンレベルには脳でも血液でも大きな変動はなかった. ヘロインでは、L-チロシンレベル低下とともに、脳のノルアドレナリン、メタネフリンが増加していたが、このような変動は Δ^9 -THC および JWH-018 には認められなかった. 今回検討した範囲では、ノルアドレナリンレベルの増加は、ヘロインに特徴的な変動成分と思われたが、ノルアドレナリンレベルの変動は、多くの乱用薬物に広く適用できると期待されていることから (7)、更なる検討が必要と考えられた. 一方、クエン酸は、食事でも変動し得る成分であることに留意する必要があるものの、血液、尿でも増加が報告され (6)、本研究で脳においても増加が確認されたことから、ヘロイン摂取のバイオマーカー候補になると思われた.

次に、 Δ^9 -THC および JWH-018 を比較する. い

ずれにおいても、血液中の L-グルタミンおよび L-フェニルアラニンレベルが増加しており、これらは共通の指標となり得ると考えられた。一方、血液中のカルニチンは前者では低下、後者では増加した。JWH-018 では、脳でアセチルカルニチン、リノイルカルニチンが増加しており、脂質代謝への影響が伺える。脂肪酸はミトコンドリアで β 酸化を受ける際、アシルカルニチンを経由する。これが JWH-018 による脳内での脂質代謝亢進を反映しているのか、逆に β 酸化の抑制を反映しているのかは、さらなる生化学的検討を行って検証する必要がある。JWH-018 では、TCA サイクルの中間代謝物であるコハク酸が、興奮性アミノ酸のグルタミン酸とともに脳で増加している。コハク酸は、 α -ケトグルタル酸の酸化的脱炭酸で生成するスクシニル CoA に由来すると推定される。またグルタミン酸は、 α -ケトグルタル酸とアラニン/アスパラギン酸とのトランスアミネーション反応で生成する。TCA サイクルではスクシニル CoA は脱水素反応によりフマル酸へと変換される。この反応には FAD が補酵素として必要である。これは、JWH-018 処理で FAD が不足しスクシニル CoA が蓄積したとすれば説明がつく。FAD 量の変動の有無は更なる検討が必要であるが、もし FAD 低下が起こっているならば、スクシニル CoA の蓄積とともに、 α -ケトグルタル酸も余剰になると思われ、トランスアミネーションによってグルタミン酸が増えることにつながったと考えることができる。FAD はミトコンドリアの β 酸化においても必要である。FAD の低下により、脂質代謝に関連するアシルカルニチンレベルが上昇するか否かは明らかではないものの、TCA サイクルや β 酸化の停滞を引き起こすと考えられるので、ミトコンドリアでの ATP 産生が減ることにもつながると推定される。これらの仮説については、次年度以降、生化学的検証を行う必要がある。

また、脳の *N*-アセチルアスパラギン酸レベルは Δ^9 -THC と JWH-018 いずれにおいても低下した。*N*-アセチルアスパラギン酸は、精神医学的、神経

学的障害のバイオマーカーとされていることから注目される (8)。*N*-アセチルアスパラギン酸と L-グルタミンの比 (*N*-アセチルアスパラギン酸/L-グルタミン)は、筋萎縮性側索硬化症の症状期間と負の相関があり、症状期間が長くなるほど下がることが報告されている (9)。本研究観察された、血液中の L-グルタミン増加と、脳での *N*-アセチルアスパラギン酸の低下は、 Δ^9 -THC と JWH-018 に共通のバイオマーカーになる可能性がある。

さらに、内因性カンナビノイドレベルの変動が Δ^9 -THC と JWH-018 いずれにおいても観察された。 Δ^9 -THC では、血液中の *O*-AEA およびアナンダミド (18:3, n-6)が増加した。JWH-018 では *O*-AEA および 2-AG が著しく増加し、特に *O*-AEA の増加が顕著だった。 Δ^9 -THC や合成カンナビノイドによって、内因性カンナビノイドレベルが変動することを示唆したのは、我々の知る限り本研究が初めてである。合成系の亢進や分解系の抑制など、そのメカニズムの検証は今後の課題である。アナンダミド (18:3, n-6)と 2-AG の増加は、 Δ^9 -THC と JWH-018 それぞれに特徴的なバイオマーカーになる可能性がある。また、血液中の内因性カンナビノイド、*O*-AEA の増加は Δ^9 -THC と JWH-018 に共通の、あるいは他の合成カンナビノイドにも共通のバイオマーカーになる可能性がある。

E. 結論

血液中の内因性カンナビノイド、*O*-AEA の増加は Δ^9 -THC と JWH-018 に共通したバイオマーカーになる可能性がある。また、血液中の L-グルタミン増加と、脳での *N*-アセチルアスパラギン酸の減少も、 Δ^9 -THC と JWH-018 に共通したバイオマーカーになる可能性が示唆された。今後、JWH-018 の低用量、慢性摂取での影響を検討する必要がある。

F. 参考文献

1. Huffman, J.W., Dai, D., Martin, B.R., and Compton, D.R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**: 563-566 (1994).
2. Logan BK, Reinhold LE, Xu A, and Diamond, F.X., *J. Forensic Sci.* **57**: 1168-1180 (2012)
3. Wiley, J.L., Compton, D.R., Dai, D., Lainton, J.A., Phillips, M., Huffman, J.W., Martin, B.R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 995-1004 (1998).
4. Atwood, B., Morgan, D., Huffman, J., Straiker, A., Mackie, K., *Br. J. Pharmacol.* 160, 585-593 (2010).
5. Ivanisevic, J., Zhu, Z. J., Plate, L., Tautenhahn, R., Chen, S., O'Brien, P.J., Johnson, C.H., Marletta, M. A., Patti, G. J., Siuzdak, G., *Anal. Chem.* 85, 6876-6884 (2013).
6. Zheng, T., Liu, L., Aa, J., Wang, G., Cao, B., Li, M., Shi, J., Wang, X., Zhao, C., Gu, R., Zhou, J., Xiao, W., Yu, X., Sun, R., Zhou, Y., Zuo, Y., Zhu, X., *Drug Alcohol Depend.* 127, 177-186 (2013).
7. Fitzgerald, P. J. *Subst. Abuse* 7, 171-183 (2013).
8. Moffett, J. R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C. N., Namboodiri, A. M. A., *Prog. Neurobiol.* **81**,

89-131 (2007).

9. Sako, W., Abe, T., Izumi, Y., Harada, M., Kaji, R., *J. Clin. Neurosci.*, in press, pii: S0967-5868(15)00629-3. doi:10.1016/j.jocn.2015.08.044.

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

学会発表

1. 李 任時, 石井祐次, 武田知起, 山田英之: ヘロイン慢性投与がマウス脳メタボロームに及ぼす影響, 日本薬学会第 136 年会, 横浜 (2016. 3)
2. 李 任時, 石井祐次, 武田知起, 森元 聡, 山田英之: 合成カンナビノイドの生体影響と既存乱用薬物との相違: メタボロミクスによる解析, 日本法中毒学会第 35 年会, 大阪 (2016. 7, 発表予定)

I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Table 1. Representative components, which were altered by chronic heroin-treatment, in the brain of male C57BL/6J mice. (Top metabolite predictions)

Representative components altered by heroin			
Increased		Reduced	
Amino acids		Amino acids	
D-proline	L-glutamate	L-tyrosine	
L-methionine	homoserine		
N-acetylaspartate			
TCA intermediates		Fatty acid metabolism	
citrate		carnitine	arachidonic acid
Neurotransmitter		Neurotransmitter	
noradrenaline	metanephrine	tryptamine	
dopamine			
Nucleotide		Nucleotide	
AMP	CMP	IMP	
GMP	XMP		
Others		Others	
Inosine		glucose-6-phosphate	

Abbreviations: CMP, Cytidine monophosphate; AMP, Adenosine monophosphate; GMP, Guanosine monophosphate; XMP, Xanthosine monophosphate; IMP, Inosine monophosphate

Table 2. Representative components, which were altered by Δ^9 -THC -treatment, in the brain and serum of male C57BL/6J mice.

Representative components altered by Δ^9 -THC			
sample	Increased		Reduced
brain	Amino acids		Amino acids
	L-glutamine		N-acetylaspartate
	Neurotransmitter		
	serotonin		
serum	Amino acids		Amino acids
	L-glutamine	L-methionine	N-stearoyl tyrosine
	L-phenylalanine		
	Endocannabinoids		Fatty acid metabolism
	virodhamine		carnitine
	anandamide (18:3, n-6)		

Table 3. Representative components, which were altered by JWH-018-treatment, in the brain and serum of male C57BL/6J mice.

sample	Representative components altered by JWH-018	
	Increased	Reduced
brain	Amino acids	
	glutamic acid	N-acetyl-aspartate
	Endocannabinoids	
	anandamide (20:5, n-3)	
	anandamide (18:3, n-6)	
	TCA intermediates	
	succinic acid	
	Fatty acid metabolism	
	acetylcarnitine	linoleyl carnitine
	Nucleotide	
AMP		
Others		
glutathione disulfide	tyramine-O-sulfate	
serum	Amino acids	
	L-glutamine	L-phenylalanine
	L-tyrosine	N-stearoyl tyrosine
	Endocannabinoids	
	2-arachidonoylglycerol	virodhamine
	Fatty acid metabolism	
	carnitine	
	Others	
	D-glucose	3-ketosphingosine
	myoinositol	

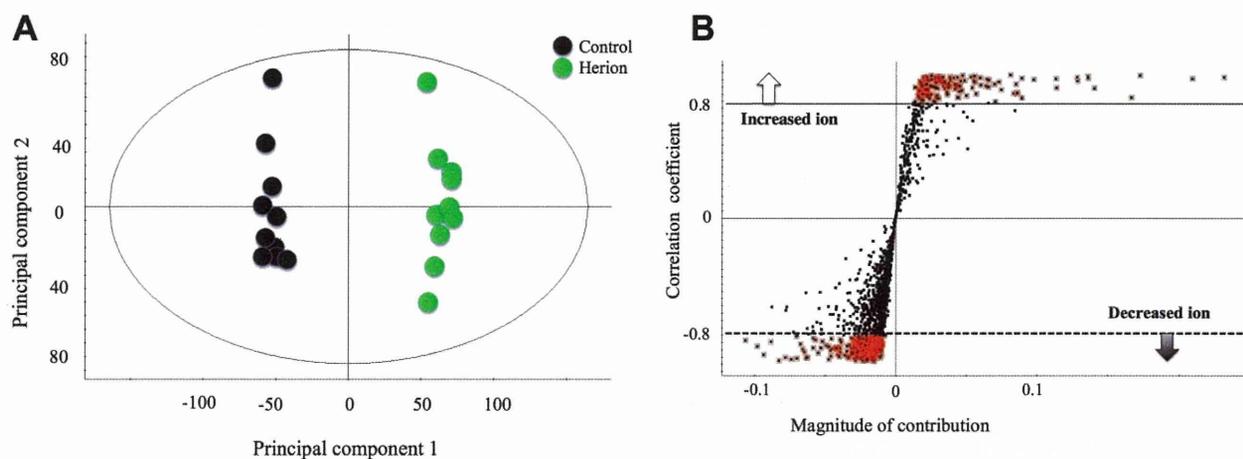


Fig. 1. Principle component analysis of a change in the profile of brain metabolome by heroin in positive ion mode

Male mice were exposed either to heroin (15 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., twice in a day, 12 days) or vehicle alone (each N=10), and their metabolomic profile in the cerebrum was analyzed. Panel A represents the score plot of the control and heroin group. B is the S-plot analyzed by positive ion mode between the control and heroin group.

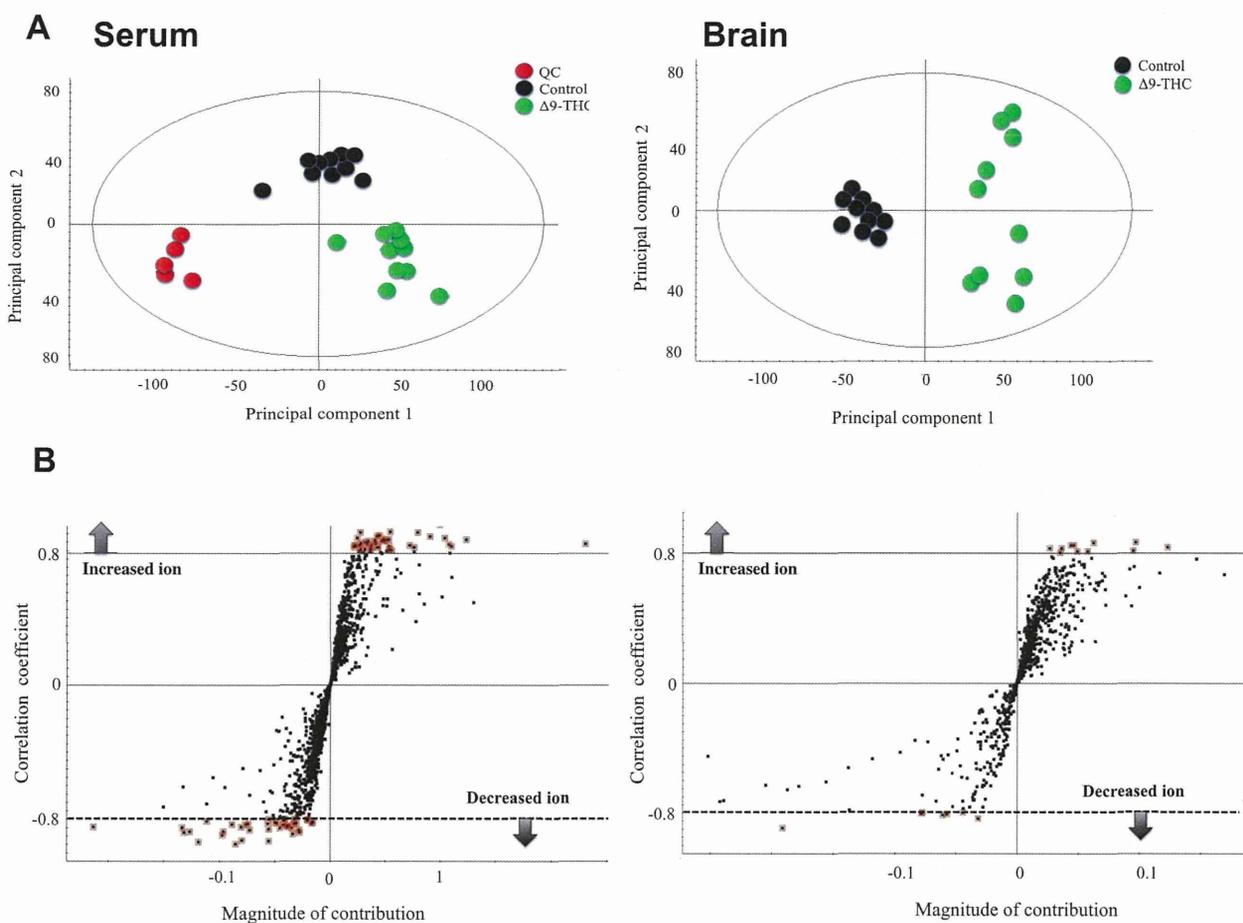


Fig. 2. Principle component analysis of a change in the profile of brain and serum metabolomes by Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in positive ion mode

Male mice were exposed either to heroin (5.6 mg/kg/day, i.p., 12 days) or vehicle alone (each N=10), and their metabolomic profiles in the cerebrum and serum were analyzed. Panel A represents the score plot of the control and Δ^9 -THC group. B is the S-plot analyzed by positive ion mode between the control and Δ^9 -THC group. Left panels, serum; right panels, cerebrum. In the experiments for serum, quality control (QC) was also performed using the sample obtained by mixing the same volume of all samples in both groups.

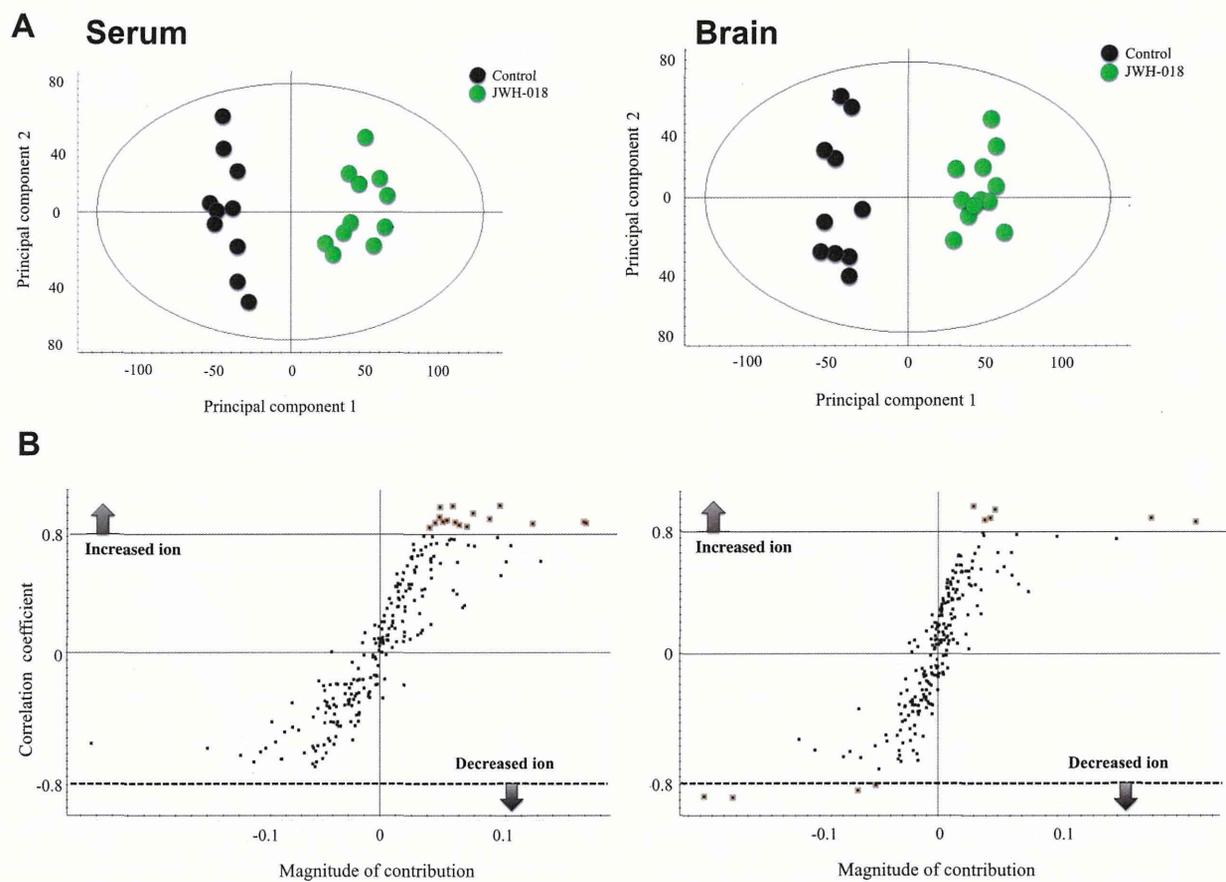


Fig. 3. Principle component analysis of a change in the profile of brain and serum metabolomes by JWH-018 in positive ion mode

Male mice were exposed either to JWH-018 (6 mg/kg, i.p.) or vehicle alone (each N=10), and their metabolomic profiles in the cerebrum and serum were analyzed. Panel A represents the score plot of the control and JWH-018 group. B is the S-plot analyzed by positive ion mode between the control and JWH-018 group. Left panels, serum; right panels, cerebrum.

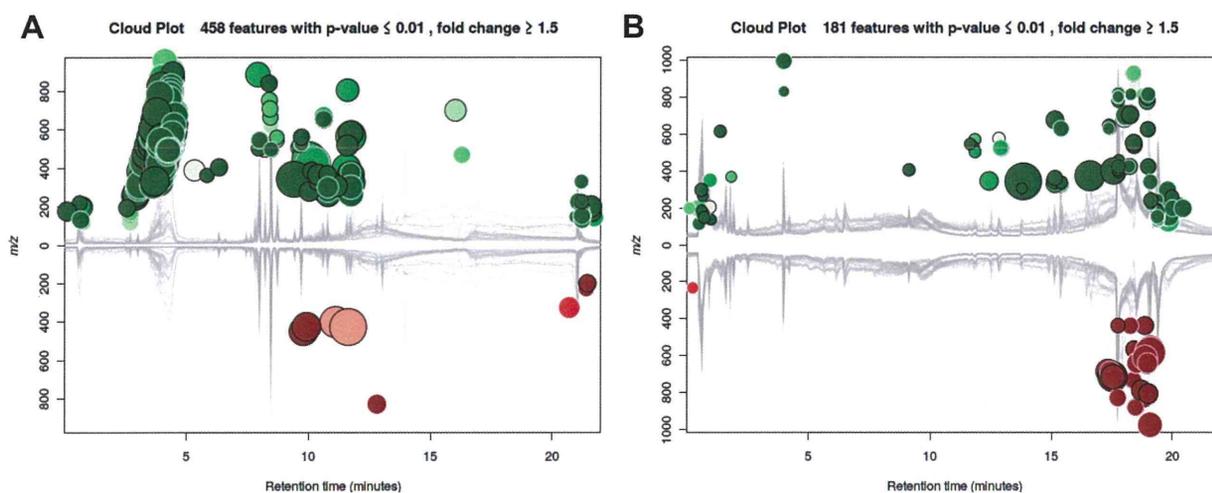


Fig. 4. Cloud plot showing discriminatory ion features (positive ion data) in serum (A) and brain (B) of mice treated with JWH-018

Data set from Fig. 3 were analyzed in XCMS online and the interactive cloud plot was integrated. Panels A and B represent the cloud plots of serum and cerebrum, respectively. Ions significantly increased and decreased were shown in green and red respectively. The size of each circle corresponds to the log fold change of the feature: the larger the bubble, the larger the fold changes. The statistical significance of the fold change, as calculated by a Welch t-test with unequal variances, is represented by the intensity of the feature's color where features with low p-values are brighter compared to features with high p-values.

分担研究課題:危険ドラッグの合成と危害影響予測手法に関する研究
研究分担者:栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長

—危険ドラッグ成分の活性評価法の開発—

研究要旨: 危険ドラッグを迅速に規制するためにはインシリコ活性予測法が有効である. 本研究ではコンピュータを用いた化学計算による活性予測法を開発する. 本年度は, 危険ドラッグとして流通しているカチノン系化合物について運動活性を用いて QSAR (定量的構造活性相関) 法を適用し, 長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物の活性予測を検討した.

A. 研究目的

危険ドラッグが大きな社会問題となっている. そこで, 危険ドラッグを速やかに規制するためには, 危険ドラッグの迅速な評価法が必要である. 本研究では, それら危険ドラッグ等のコンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発することを目的とする. 昨年度は長鎖アルキル基(C4~C7)を有するカチノン系化合物についてドパミン取り込み阻害活性を用いて QSAR 解析を行ったが, 本年度は運動活性を用いて長鎖アルキル基(C4~C7)を有するカチノン系化合物の活性予測を行った.

B. 研究方法

運動活性の測定は国立精神・神経医療研究センター、薬物依存研究部で測定したものである(表1). 実験には ICR 系雄性マウス(Jcl, 20 - 25g, 日本クレア)を使用した. マウスの運動量は, 自発運動量測定装置 (ACTIMO-100, バイオリサーチセンター社) を用いて測定した. 3時間の環境適応後、薬物投与から60分間にわたって運動量を測定した.

QSAR 式の構築には化学計算パッケージ MOE を使った. QSAR (定量的活性相関) 法

は AutoQuaSAR 法を使って妥当な QSAR モデル式を構築した. QSAR モデル式で用いた記述子は, MOE 上で動作する AutoQuaSAR プログラムによって, MOE に搭載されている 184 のすべての 2D 記述子から選択されたものである. QSAR 式は交差検定の R^2 (相関係数の 2 乗) が最も良いものを用いた.

C. 研究結果

表 1 の 12 化合物から構築した QSAR 式を図 2 に示した. QSAR 式は 3 つの記述子を使い, その交差検定の値は 0.8208 であった. QSAR 式から求めた予測値を表 1 に併記した.

D. 考察

運動活性を用いて妥当と思われる QSAR 式を構築することができた. QSAR を用いた予測法に置いては, 既知である類似化合物の活性データの有無がデータの信頼性に大きく係わって来ることが最大の問題点である.

E. 結論

ドパミン取り込み阻害活性同様運動活性を用いても妥当と思われる QSAR 式を構築することができた。ここで構築した QSAR 式を使い他の化合物への適用を検討する必要がある。また、異なる方法による活性値を統合する方法論の開発も必要である。

F. 研究発表等

1. 論文発表

- 1) 栗原正明, 危険ドラッグ規制の戦略, *日本薬理学会雑誌*, 146, 315-320(2015)

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

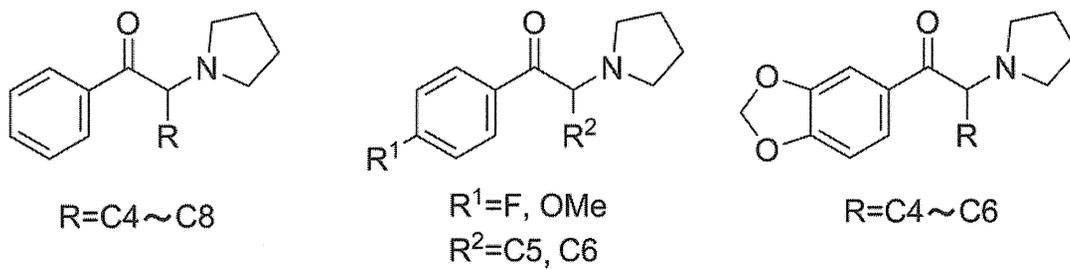
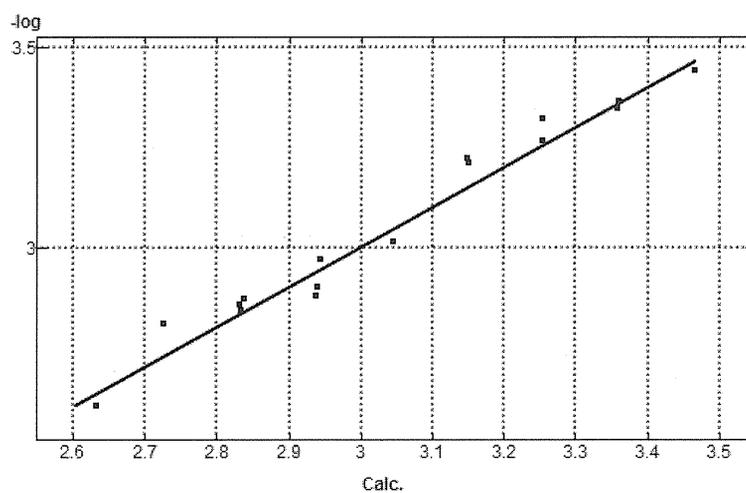


図 1

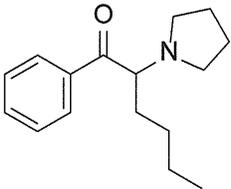
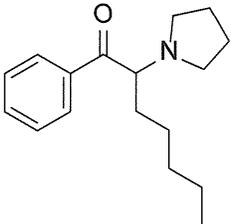
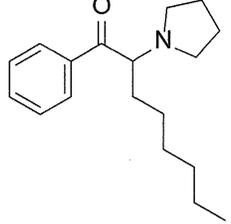
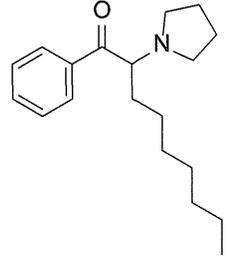
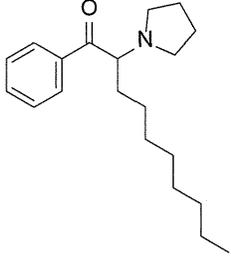
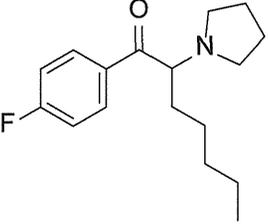


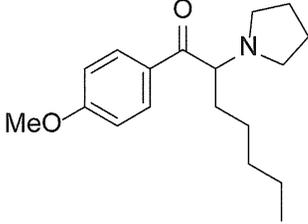
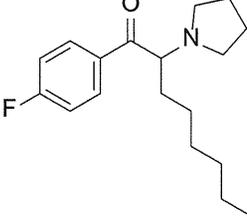
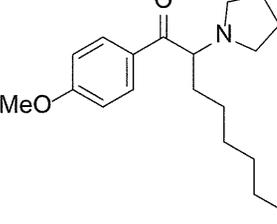
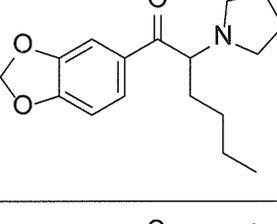
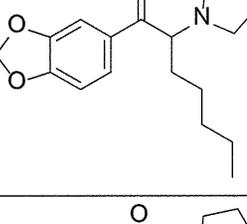
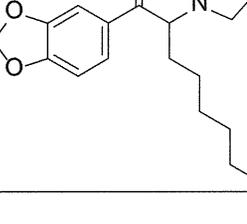
Const.	*	Desc.
+ 3.445340		
+ 0.010145	*	PEOE_VSA-1 Total negative 1 vdw surface area
+ 0.018616	*	SlogP_VSA0 Bin 0 SlogP (-10 , -0.40]
- 0.010260	*	SlogP_VSA8 Bin 8 SlogP (0.30, 0.40]

$$R^2=0.9262, \quad XR^2=0.8208$$

図 2 構築した QSAR 式

表 1 カチン系化合物の運動活性

	カチン系化合物	運動活性 (予測値)
1		3.44 (3.47)
2		3.37 (3.36)
3		3.27 (3.26)
4		3.21 (3.16)
5		3.02 (3.04)
6		3.23 (2.74)

7		2.97 (2.94)
8		2.60 (2.63)
9		2.87 (2.84)
10		3.32
11		3.22
12		2.84

分担研究課題:危険ドラッグの簡易活性評価手法の検討

研究分担者:熊谷 英敏 東京大学医学部附属病院 22 世紀医療センター

—危険ドラッグ成分のセロトニン受容体下流の各種シグナル伝達経路の
活性評価法の検討—

研究要旨: 危険ドラッグの主成分の一つであるフェネチルアミン系化合物は, G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるセロトニン受容体 (5-HT_{2A} 受容体) を活性化して幻覚作用を誘発すると考えられている. 近年の研究により, GPCR はアゴニスト刺激後に, 従来の G タンパク質を介するシグナル伝達経路に加えて, β -アレスチンを介する独立したシグナル伝達経路を活性化することが見出された. また, それら二つの経路を選択的に活性化するリガンドの発見から, 両シグナル伝達経路は独自の生理機能を発揮することが明らかとなった. そこで, 5-HT_{2A} 受容体下流の二つのシグナル伝達経路のそれぞれに対するフェネチルアミン系化合物の活性を評価するために, G タンパク質を介するシグナル伝達経路の活性化をモニターするアッセイ系に加えて, 今回, 新たに β -アレスチン経路の活性化をモニターできるアッセイ系を確立した. 両アッセイ系を用いて, 内因性リガンドであるセロトニンに加えてフェネチルアミン系化合物を含む 6 種類の危険ドラッグ成分を検討した. アッセイの結果, セロトニンは, G タンパク質シグナル伝達経路に偏向的なリガンドであることが示唆された. また, 6 種類の被検化合物は, ヒト 5-HT_{2A} 受容体下流の両シグナル伝達経路を用量依存的に活性化し, G タンパク質シグナル伝達経路に対する活性の強度は 25D-NBOMe > DOI >> 4-OH MET > 3C-E > Allylescaline >> bk-2C-B であり, β -アレスチンシグナル伝達経路に対する活性の強度は 25D-NBOMe >> DOI >> 4-OH MET > bk-2C-B > 3C-E > Allylescaline であった. bk-2C-B 以外の 5 種類の被検化合物は, セロトニンと同様に G タンパク質シグナル伝達経路に偏向的なリガンドであったが, bk-2C-B は, 両シグナル伝達経路を同等の強さで活性化するユニークな性状を有することが明らかとなった.

A. 研究目的

危険ドラッグ成分などのセロトニン神経作動薬は, ヒトで幻覚作用を示し, その分子メカニズムの一つとして 5-HT_{2A} 受容体に対するアゴニスト活性が考えられている. しかしながら, 内因性リガンドであるセロトニンのように全ての 5-HT_{2A} 受容体アゴニストが幻覚作用を示す訳ではないことから, 5-HT_{2A} 受容体アゴニストには, 様々な受容体活性化機構があることが示唆されている. 5-HT_{2A}

受容体は, G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 群に属し, 受容体下流で二つの独立した細胞内シグナル伝達経路 (G タンパク質経路と β -アレスチン経路) を活性化することが知られている. そこで, 5-HT_{2A} 受容体下流の G タンパク質経路を評価するアッセイ系に加えて, 新たに β -アレスチン経路を評価するアッセイ系を構築し, 種々の危険ドラッグ成分がこれら二つのシグナル伝達経路に対してどのように作用するかを調べた.