

B. 研究方法

GPCR である 5-HT2A 受容体は、アゴニスト刺激を受けると三量体 G タンパク質を活性化し、引き続き活性化されるホスホリパーゼ C β がホスファチジルイノシトールを加水分解してジアシルグリセロールとイノシトール-3 リン酸(IP₃)を産生する。これらは、細胞質へのカルシウム動員を惹起し、様々な生理作用を引き起す。一方で、アゴニスト刺激された 5-HT2A 受容体は、細胞内ドメインが GPCR キナーゼ(GRK)によりリン酸化を受け、そのリン酸化部位に β -アレステチンがリクルートされる。その結果、受容体- β -アレステチン複合体に、 β -アレステチンをスキヤフォールドとして様々な分子が集積し、活性化された受容体は細胞内へとインターナリゼーションされる(図 1)。

このように β -アレステチンは、古典的には、活性化された受容体のインターナリゼーションを惹起することを通じてリガンド刺激から細胞を脱感作するために働くネガティブフィードバック分子の一つとして捉えられていた(図 1)。しかしながら、近年、GPCR に属するケモカイン受容体の中に β -アレステチン経路だけを活性化する受容体が見出されたことや、ある種の GPCR の人工リガンドの中に β -アレステチン経路のみを選択的に活性化するものが見出されたことから、 β -アレステチン経路は G タンパク質とは独立した細胞内シグナル伝達経路であることが明らかとなった。また、それらの偏向的な活性化を惹起する人工的な化合物はバイアスドリガンドと呼ばれ、その薬理作用も注目されている(図 2)。

最近の危険ドラッグ化合物群には、摘発のがれを目的とした急速な化学構造の多様化により、従来の危険ドラッグとは異なる薬理作用を示すものが出現してきている。従って、セロトニン神経に作用する危険ドラッグは、5-HT2A 受容体下流の二つの独立した細胞内シグナル伝達経路(G タンパク質を介するカルシウム動員および β -アレステチンを介するシグナル伝達経路)に対して様々な活性化機構を示す可能性があると思われた。そこで、

5-HT2A 受容体下流のそれぞれのシグナル伝達経路に対して危険ドラッグが及ぼす影響を評価するために、G タンパク質を介するカルシウム動員を指標としたアッセイ系に加えて、新たに β -アレステチンシグナル伝達経路を評価するアッセイ系を構築した(図 3)。

G タンパク質経路の評価は、カルシウム動員により惹起される NFAT (Nuclear factor of activated T cells) の活性化を利用し、NFAT-luciferase リポーターアッセイ系を用いて行った(図 3)。

β -アレステチン経路の評価は、アゴニスト刺激依存的に惹起される 5-HT2A 受容体と β -アレステチンの会合を酵素断片コンプリメンテーション法によって特異的に定量するアッセイ系を用いて行った。酵素 β -ガラクトシダーゼは、N 末端側の 6kDa の α 断片と残りの C 末端側の ω 断片の 2 つに分離すると酵素活性を失うが、両者が会合することで酵素活性が復活する。そこで、2 つの融合分子、すなわち 5-HT2A 受容体に β -ガラクトシダーゼ α 断片を結合させた分子及び β -アレステチンに β -ガラクトシダーゼ ω 断片を結合させた分子を、同時に細胞内に発現させると、アゴニスト刺激依存的に 5-HT2A 受容体と β -アレステチンの会合が促進され、それに伴い 5-HT2A 受容体と β -アレステチンに融合している β -ガラクトシダーゼの α 断片と ω 断片が再会合し、酵素活性が発揮される。この現象を利用し β -アレステチン経路に対するアッセイ系を構築した(図 3)。

1) 測定対象化合物

測定対象化合物として Caymen chemical 社製もしくは国立医薬品食品衛生研究所において調製されたものを用いた。

2) G タンパク質経路の評価

実験初日に、通常培地(5%ウシ胎児血清, 1%非必須アミノ酸溶液, 1%ペニシリンストレプトマイシン溶液, 10 μ g/ml Blasticidin S, 10 μ g/ml Puromycin, 0.25mg/ml Geneticin 含有 DMEM)中に、ヒト 5-HT2A 受容体及び NFAT-luciferase リポ

ーターを恒常的に発現したインディケーター細胞 (CHO 細胞由来) を分散し、96 ウェルホワイトプレートに播種 (30,000 細胞/ウェル) し、一晚培養した。翌日、培養液を吸引除去し、100 μ l のアッセイ培地 (0.1% BSA 含有 Opti-MEM I) に交換し、更に一晚培養した。実験 3 日目にアッセイ培地 (50 μ l) に希釈した被験物質を各ウェルに添加し、更に 6 時間培養した。培養終了後、培養液を吸引除去し、Steady-Glo ルシフェラーゼ試薬 (50 μ l, プロメガ社) を添加した。ルシフェリン発光は、ARVO マルチラベルリーダー (パーキンエルマー社) で測定した。

3) β -アレスチン経路の評価

【融合遺伝子発現ベクターの作製】

5-HT2A 受容体- α 断片融合遺伝子発現ベクターは、次のように調製した。5-HT2A 受容体遺伝子の終止コドンを除いたオープンリーディングフレームを PCR 法により増幅し、上流にクローニング部位が設けられた β -ガラクトシダーゼの α 断片が組み込まれているレトロウイルスベクターのクローニング部位にインフレームになるように挿入した。 β -アレスチン- ω 断片融合遺伝子発現ベクターは、ヒト β -アレスチン 2 遺伝子の終止コドンを除いたオープンリーディングフレームを PCR 法により増幅し、 β -ガラクトシダーゼの ω 断片が挿入されたレトロウイルスベクター (ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を有する) の上流に ω 断片とインフレームになるように挿入し、構築した。

【インディケーター細胞株の樹立】

β -アレスチン- ω 断片融合遺伝子発現レトロウイルスベクターをレトロウイルスパッケージング細胞にトランスフェクションし、数日間の培養の後、レトロウイルスを含む培養上清を回収した。予め、作製したレトロウイルス受容体発現 CHO 細胞に回収した培養上清を用いて、 β -アレスチン- ω 断片融合遺伝子を感染導入した。感染細胞をハイグロマイシン B 含有培地で培養し、 β -アレスチン- ω 断片融合遺伝子を安定的に発現する細胞を選別し、インディケーター細胞株を樹立した。細胞株は、

通常培地 (5% 牛胎児血清, 1% 非必須アミノ酸溶液, 0.5mg/ml ハイグロマイシン B, 1% ペニシリン ストレプトマイシン溶液含有 DMEM 培地) で培養し、3~4 日に一度継代培養することで維持した。

【検定細胞株を用いた化合物の評価】

実験初日に、 β -アレスチン- ω 断片融合遺伝子を安定的に発現するインディケーター細胞を 6 cm ディッシュに播種 (1×10^6 細胞/ディッシュ) した。翌日に 5-HT2A 受容体- α 断片融合遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、さらに一晚培養した。三日目に遺伝子導入された細胞を 96 ウェルホワイトマイクロプレートに播種 (30,000 個/ウェル) し、通常培地中 37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌日、培養液を吸引除去し、100 μ l のアッセイ培地 (0.1% BSA 含有 Opti-MEM I, サーモフィッシャーサイエンティフィック社) に交換し、更に一晚培養した。実験 4 日目に、培養液を吸引除去し、希釈した化合物を添加したアッセイ培地 (0.1% BSA 含有 Opti-MEM I) を 40 μ l 添加し、1.5 時間培養した。その後、Gal-Screen β -ガラクトシダーゼ試薬 (20 μ l, サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を添加し、室温で 1.5 時間酵素反応を行った。反応終了後、化学発光を ARVO マルチラベルリーダー (パーキンエルマー社) で測定した。

C. 研究結果

本アッセイ系を用いて 6 種類の化合物 (3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 25D-NBOMe, DOI, 4-OH-MET) を評価した。その際、セロトニンを陽性コントロールとして用いた。

今回、酵素断片コンプリメンテーション法を用いて確立した β -アレスチンシグナル伝達経路に対するアッセイ系でのセロトニンの EC₅₀ は凡そ 160nM (図 5 及び表 1) であり、G タンパク質シグナル伝達経路に対する EC₅₀ (セロトニンに対する EC₅₀, 2.9nM) の 55 分の 1 の感度であった (図 4 及び表 1)。

6 種類の被検化合物は、ヒト 5HT2A 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(図 4, 図 5 及び表 1).

D. 考察

陽性コントロールであるセロトニンの両シグナル伝達経路に対する活性の強度比(β -アレスチン経路/G タンパク質経路)は 55 であり, 内因性アゴニストであるセロトニンは, G タンパク質経路偏向性を示すリガンドであることが示唆された. 6 種類の被検化合物の中では, 3C-E, Allylescaline, DOI, 25D-NBOMe 及び 4-OH MET はセロトニンと類似した G タンパク質経路偏向性のリガンドであることが示されたが, bk-2C-B はそれらとは異なり, 両シグナル伝達経路に対して活性は弱いものの同程度の活性強度を有する特性が見出だされた. β -アレスチン経路の下流では MAP キナーゼなどの活性化がおこることが知られているので, bk-2C-B により活性化されたセロトニン作動神経は新たな遺伝子発現を介して生理的性状が変化する可能性が示唆される.

E. 結論

ヒト 5-HT_{2A} 受容体下流の β -アレスチン経路を評価するアッセイ系を確立したことで, 種々の危険ドラッグ成分の二つのシグナル伝達経路(G タンパク質経路及び β -アレスチン経路)に対する影響を比較検討することが可能となった. 今回, 内因性リガンドであるセロトニンを評価したところ, G タンパク質経路偏向性を示すことが明らかとなった. また, 6 種類の被検化合物では, bk-2C-B 以外の 5 種類は, セロトニンと同様の G タンパク質経路偏向性を示したが, bk-2C-B の両シグナル伝達経路に対する活性は均等であった. 今後, 多くの危険ドラッグ成分の活性強度を 5-HT_{2A} 受容体下流の両シグナル伝達経路に対して評価することで, 危険ドラッグ成分が有する幻覚等の薬理的性状と両シグナル伝達経路の関係が見出だされる可能性が考えられる.

F. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学発表
無し

G. 知的所有権の取得状況

特になし

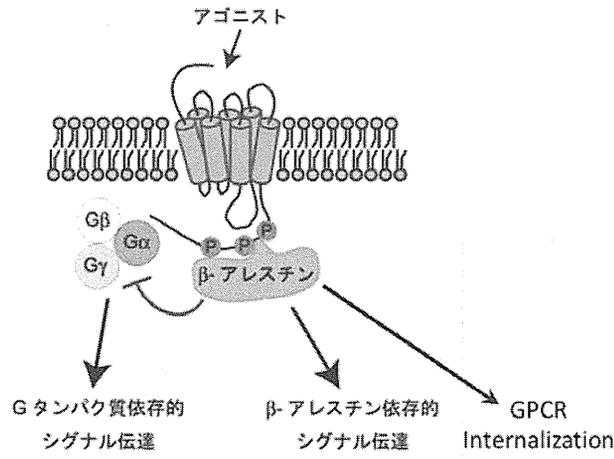


図 1. アゴニスト刺激後を受けた GPCR の細胞内シグナル伝達経路の模式図

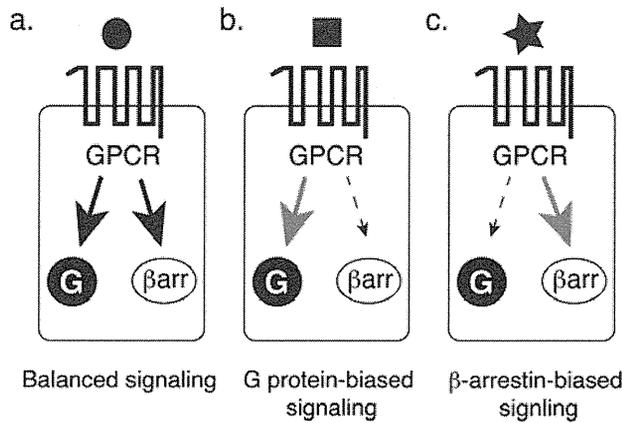


図 2. GPCR のバイアスドリガンドによる細胞内シグナル伝達系の模式

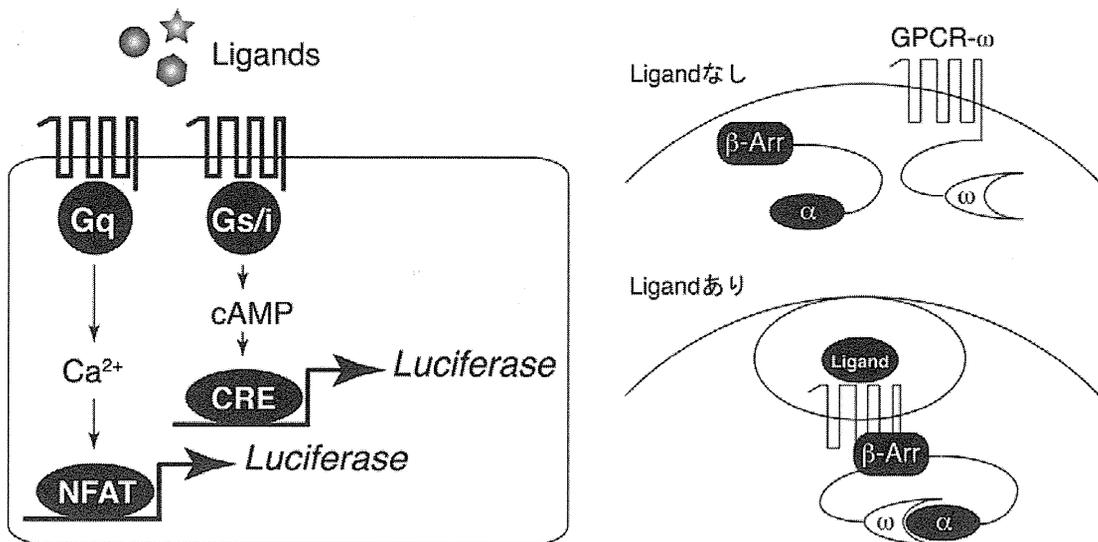


図 3. GPCR の二つの細胞内シグナル伝達経路におけるアッセイ原理

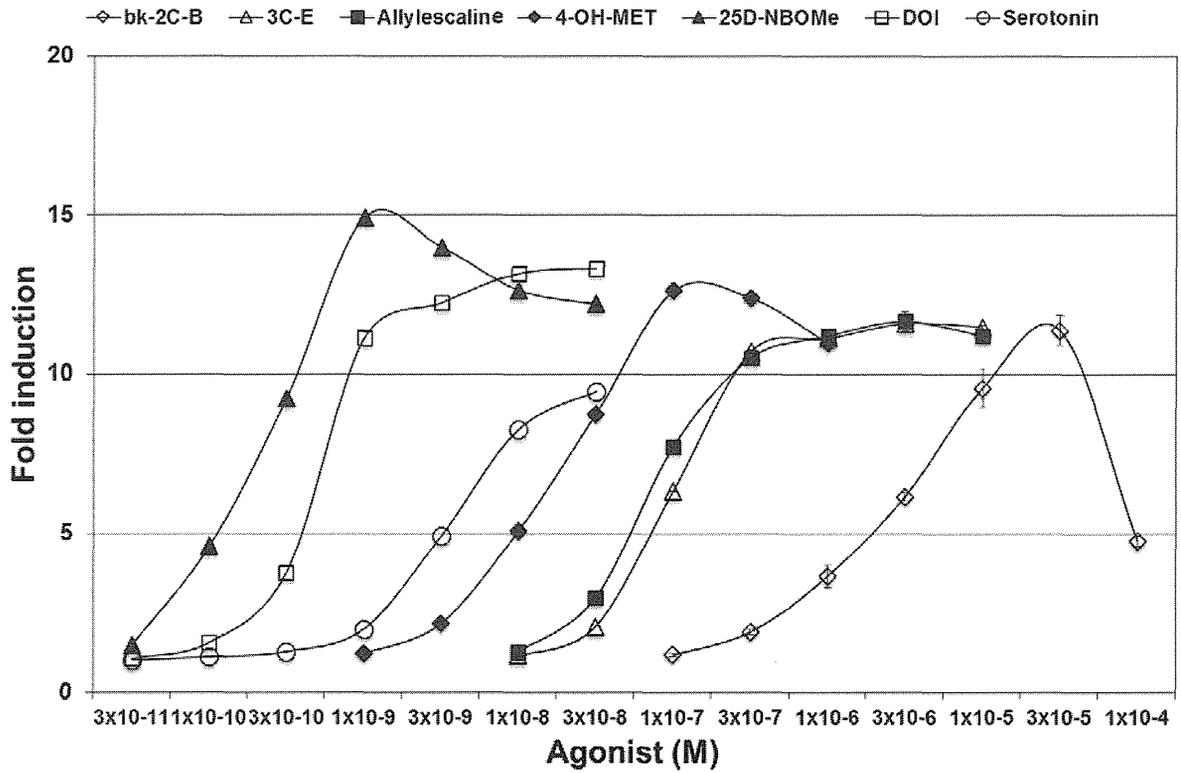


図 4. Gタンパク質経路に対する影響

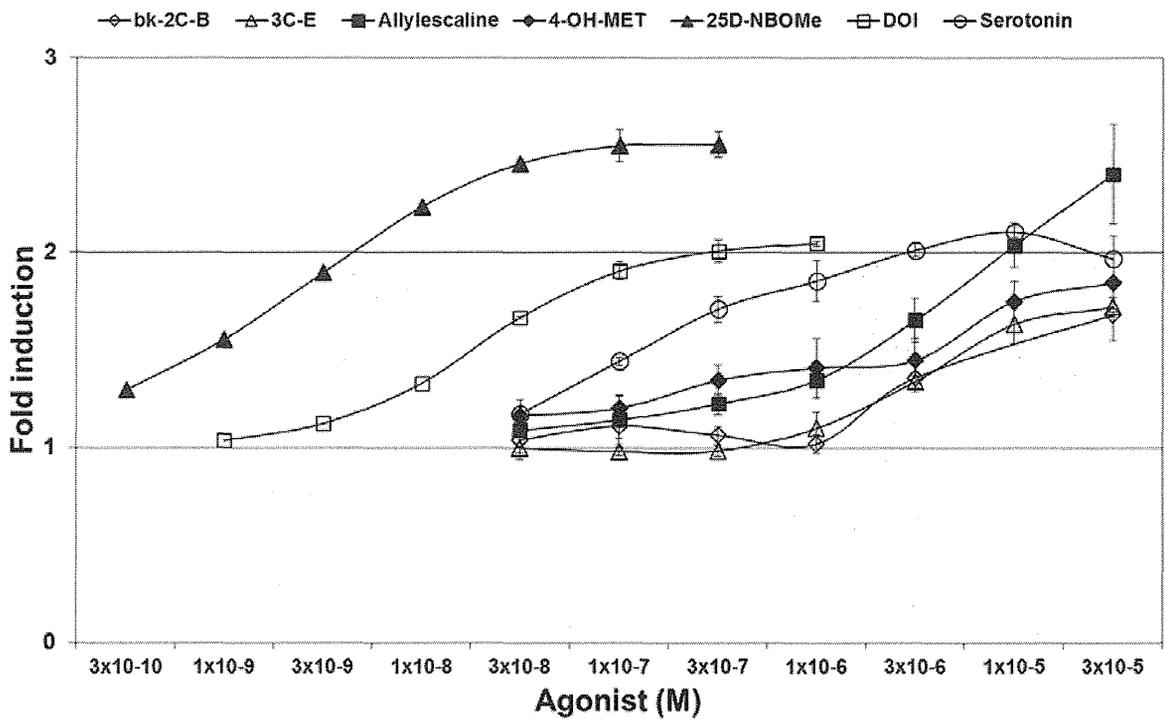


図 5. β -アレスチン経路に対する影響

表 1 各種危険ドラッグ成分の G タンパク質経路と β -アレスチン経路に対する EC₅₀

Substances	EC ₅₀ (nM)		
	G-protein pathway	β -arrestin pathway	β /G
3C-E	91	3300	36
Allylescaline	72	3500	49
bk-2C-B	2600	2800	1.1
25D-NBOMe	0.22	2	9.1
DOI	0.58	20	35
4-OH-MET	17	1400	82
Serotonin	2.9	160	55

分担研究課題:危険ドラッグのヒト中枢神経系作用を予測する培養神経細胞による
評価系の開発

研究分担者:関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長

—危険ドラッグに含まれる中枢作用性化合物の薬理評価系開発—

研究協力者:最上 由香里 国立医薬品食品衛生研究所薬理部

研究協力者:佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 室長

研究要旨: 危険ドラッグを法的に規制する科学的根拠を示すため、危険ドラッグの中枢作用を *in vitro* で迅速かつ定量的に評価する試験系を構築している。平成27年度は、カンナビノイド(CB)系合成化合物の CB2 受容体を介した中枢神経系への影響を評価する試験の開発を行った。CB 受容体には、CB1 受容体と CB2 受容体の2種類が存在し、神経細胞に CB1 受容体、ミクログリアに CB1 受容体と CB2 受容体の両方が発現している。今回、ミクログリアを用いて CB 系合成化合物の CB2 受容体を介した中枢神経系への作用を評価する試験系の構築を試みた。まず、CB2 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化を Western Blotting 法で定量し、さらに ELISA 法を用いた評価系の開発に取り組んだ。その結果、本系が合成 CB 系化合物の中枢神経系への作用を迅速かつ定量的に評価可能な試験系となる可能性が示された。しかしながら、現段階では、化合物非処置下の応答が安定しない、感度が低いという課題が残っている。被験化合物の評価を行うためには、さらなる試験系の向上が必要である。

A. 研究目的

危険ドラッグの人体への摂取は、健康被害を引き起こすばかりではなく自動車事故の原因になるなど深刻な社会問題となっている。危険ドラッグには、麻薬や覚醒剤の化学構造をわずかに変えた物質が含まれていることが多く、人体に及ぼす影響は麻薬や覚醒剤と同程度、ときにはそれ以上になることもあり、一刻も早く取り締まる必要がある。厚生労働省では薬機法に基づいて、危険ドラッグに含まれる成分のうち、幻覚等の作用を有し、使用した場合に健康被害が発生するおそれのある物質を「指定薬物」として規制を行っている(1)。言い換えると、作用未知の化合物の有害性を評価し、

人体に有害である科学的根拠を示すことではじめて、「指定薬物」として規制することが可能となる。したがって、危険ドラッグに含まれる成分の持つ中枢神経系への作用を定量的に評価し、法規制の科学的根拠を迅速に示すことが求められている。昨年度に引き続き、今年度は CB 系合成化合物の中枢神経系への影響を評価する試験系の開発を行った。

危険ドラッグに含まれる CB 系合成化合物が作用すると考えられる CB 受容体には、CB1 受容体と CB2 受容体の2種類が存在する。中枢神経系においては、神経細胞に CB1 受容体のみ、ミクログリアに CB1 受容体と CB2 受容体の両方が発現

している(2,3). すなわち, 中枢神経系において, CB系合成化合物は, CB1受容体を介した神経細胞の神経伝達に及ぼす作用および, CB1受容体とCB2受容体を介したミクログリアの機能に及ぼす作用を有する.

中枢の免疫担当細胞であるミクログリアは, 脳の恒常性を維持するだけでなく, 神経活動にも関与しており(4-6), ミクログリアの機能が損なわれると, うつ病や自閉症などの精神疾患を発症しうることが報告されている(7,8). 一方, ミクログリアは, 過剰に活性化すると脳組織にダメージを与える. 活性化したミクログリアではCB2受容体の発現が増大すること, CB系合成化合物はミクログリアのCB2受容体を介して炎症を抑制することが報告されている(9-11). したがって, 危険ドラッグに含まれるCB系合成化合物がミクログリアの機能に長期間影響を及ぼすことで, 様々な有害な作用を引き起こしている可能性がある(12,13). そこで本研究では, CB系合成化合物がミクログリアのCB2受容体に及ぼす作用を定量的に評価することを試みた. CB2受容体はGi共役型の受容体で, 免疫細胞やミクログリア細胞株では, CB2受容体を介してERK1, 2のリン酸化が生じる(14-17). ミクログリアをLipopolysaccharide (LPS)で刺激してもERK1, 2のリン酸化が生じるが, このLPSによるERK1, 2のリン酸化に対してはCB2受容体アゴニストが抑制作用を示す(17,18). そこで, 初代培養ミクログリアにおいても, CB2受容体を介したERK1, 2のリン酸化が生じるかを検討し, CB2受容体アゴニストのミクログリアに対する作用をWestern Blotting法を用いて定量的に評価する試験系の構築を試みた. H26年度の検討結果から, ラットの初代培養ミクログリアにも機能的なCB2受容体が発現していること, 初代培養ミクログリアをCB2受容体の選択的アゴニストで刺激すると濃度依存的なERK1, 2のリン酸化が生じること, LPS刺激で生じる初代培養ミクログリアのERK1, 2のリン酸化はCB2受容体アゴニストによって抑制されることを示した. 一方で, Western Blotting法では評価に多

くの細胞を必要とすること, 実験に時間がかかること, 一度に解析可能なサンプル数が限られること, などの課題があった. そこで今年度は, スループットの高い評価系の構築を目指して, ELISA法でERK1, 2のリン酸化を定量する試験系の構築に着手した.

B. 研究方法

ラットミクログリアの初代培養

生後1日齢のWistarラットの脳皮質領域から, ミクログリアを含む混合グリア細胞を調製して7-10日間培養した後, 増殖した弱付着性のミクログリア細胞を回収して実験に用いた. なお, 実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程, 及び国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則に従って行った.

オプティカルプレートの選別(MTTアッセイ)

初代培養ミクログリアを 5×10^4 cells/wellの濃度で7種類の96 well オプティカルボトムプレートに播種し, 血清除去を3時間行った後, MTT試薬を4時間処置し, 接着細胞数を比色定量により評価した.

ERK1, 2リン酸化測定(ELISA法)

初代培養ミクログリアを 5×10^4 cells/wellの濃度でグライナーアドバンスド96 well オプティカルボトムプレートに播種し, 血清除去を3時間行った後, 様々な濃度のCB受容体アゴニスト, アンタゴニストを処置した後, 4% formaldehydeを添加して反応を停止した. ERK1, 2のリン酸化の定量はBioAssay Systems社のEnzyFluo ERK Phosphorylation Assay Kitを用いて, マニュアルに基づき行った(Fig. 1A). リン酸化ERK1, 2の特異的抗体, 2次抗体と反応させた後, 蛋白染色を行った. リン酸化ERKの値は, 蛍光値(Ex 530 nm, Em 585 nm), 総蛋白量は蛍光値(Ex 360 nm, Em 450 nm)を蛍光プレートリーダー(Spectra Max Molecular Devices CA, USA)で定量した.

C. 研究結果

まず、ラットの初代培養マイクログリアが良好に接着するプレートを選抜した。市販されている 7 種類の 96 well オプティカルボトムプレートにマイクログリアを接着させ、ERK1, 2 のリン酸化を測定する条件下で培養し、プレートに残っているマイクログリアの細胞数を MTT アッセイで評価した。その結果、最も安定してマイクログリアが接着したグライナー社のアドバンスドプレートを選択した (Fig. 1B)。

次に ERK1, 2 のリン酸化の評価について、ELISA 法で Western Blotting 法と同様の結果が再現できるか検討した。まず、CB2 受容体アゴニストまたは LPS で初代培養マイクログリアを刺激した際の ERK1, 2 のリン酸化におけるタイムコースを検討した (Fig. 2B)。ラットの初代培養マイクログリアを CB2 受容体アゴニストである JWH015 (10 nM, 10 μ M)、または LPS (10 ng/ml) で、10, 30, 60, 120 分間刺激した。反応を停止させた後、抗リン酸化 ERK 選択的抗体を用いて、リン酸化 ERK1, 2 を定量した。JWH015 は、10 μ M の高濃度で、刺激 10, 30 分後に有意な ERK1, 2 のリン酸化を誘導した。一方、LPS は、刺激 60 分後に強く ERK1, 2 のリン酸化を誘導した (Fig. 2B)。この結果は Western Blotting 法の解析結果 (Fig. 2A) と一致した。以上の結果からマイクログリアの CB2 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化を ELISA 法で定量的に解析可能であることが示された。

次に、JWH015 の ERK1, 2 のリン酸化に対する濃度依存性と CB2 受容体アンタゴニストによる影響を検討した。その結果、JWH015 は 0.1-1 μ M で濃度依存的なラットの初代培養マイクログリアの ERK リン酸化を誘導し、その EC₅₀ 値は 0.0258 μ M であった (Fig. 3A)。この ERK1, 2 のリン酸化は、CB2 受容体アンタゴニストである SR144528 を処置することで、有意に抑制された (Fig. 3B)。一方、マイクログリアを LPS で活性化させた際の ERK1, 2 のリン酸化に及ぼす JWH015 の作用を検討した (Fig. 3B)。その結果、JWH015 は、0.01-10 μ M において LPS 刺激による ERK1, 2 のリン酸化を有意に抑

制したが、その抑制率は 30%程度であった (Fig. 3B)。この LPS 刺激による ERK1, 2 のリン酸化に対する JWH015 の抑制作用も SR144528 処置下において減少したが、JWH015 10 μ M による抑制は SR144528 処置でリカバーされなかった。この結果、ELISA 法においても、マイクログリアの CB2 受容体を介した応答を定量的に解析出来ることが明らかになった。

D. 考察

危険ドラッグに含まれる CB 系合成化合物は、CB1 受容体と CB2 受容体に作用する。今回、CB2 受容体を介して中枢神経系に及ぼす作用を定量化する評価系を構築した。マイクログリアには CB1 受容体と CB2 受容体の両方が発現しているが、CB1 受容体を介した細胞機能についての報告は、ほとんどない。一方で CB2 受容体は、脳の疾患時に活性化したマイクログリアで発現増加が認められ、CB2 受容体アゴニストは炎症を抑制することが報告されている (10,11)。したがって、マイクログリアは、中枢の環境変化に応じて CB2 受容体を介した応答性を変化させることで中枢の恒常性を維持していると考えられる。本実験においても CB2 受容体選択的アゴニストが、定常状態のマイクログリアにおいては ERK1, 2 のリン酸化を誘導し、LPS で活性化したマイクログリアに対しては ERK1, 2 のリン酸化を抑制するという反対の作用を示しており、マイクログリアの活性状態によって CB2 受容体が異なる役割を演じていることが明らかになった。CB 系合成化合物を繰り返し摂取した場合、マイクログリアの CB2 受容体が活性化されることによって、脳が本来の生理的役割を果たすことが出来なくなる可能性がある。

今年度は、CB2 受容体アゴニスト JWH015 は濃度依存的なラットの初代培養マイクログリアの ERK リン酸化を誘導すること、LPS 刺激で生じる初代培養マイクログリアの ERK1, 2 のリン酸化が JWH015 によって濃度依存的に抑制されることを多検体の評価が可能な ELISA 法を用いて示した。本評価

系で, JWH 015 0.1-3.3 μM による ERK1, 2 のリン酸化は CB2 受容体アンタゴニスト SR144528 により有意に抑制された. LPS 刺激による ERK1, 2 のリン酸化は JWH015 0.01-1 μM で有意に抑制され, その抑制は SR14428 で回復した. 今回, ミクログリアに対する CB2 受容体アゴニストの作用を 2 つの方法で評価し, その検出感度は同程度であった. しかしながら, LPS 刺激による ERK1, 2 のリン酸化に対する CB2 受容体アゴニストの抑制作用については, その作用機序が不明であることに加えて, LPS 刺激下では正常時における CB2 受容体の中枢における機能を評価しているとは言えない. 無刺激時のミクログリアを用いた方が望ましいと考えられた. 一方, ERK1, 2 のリン酸化を測定する際, Western Blotting 法, ELISA 法のいずれにおいても, ラットの初代培養ミクログリアの定常状態での ERK1, 2 のリン酸化の状態が安定しないという課題が認められた. ラット初代培養のミクログリアを JWH015 で刺激した際の ERK1, 2 のリン酸化は, 定常状態であるコントロールと比較して, 1.6~3 倍とばらつきが認められた. また, 定常状態ですでに ERK1, 2 のリン酸化が生じている場合, JWH015 による ERK1, 2 リン酸化の増大は確認出来ず, さらに安定した試験系の開発が必要である. 初代培養ミクログリアを用いていることがデータのバラツキの原因となっている可能性がある. 初代培養細胞ではロット間の差や培養条件によって, 定常状態のミクログリアの活性程度が異なる可能性があること, また, 取得できる細胞数も限られるため, 細胞数を増加させて感度を上げることが困難である. そこで, マウスのミクログリア細胞株である MG-5 を用いた検討も開始している. また, 感度を増幅する等の工夫も必要である. 危険ドラッグに含まれている CB 系合成化合物の定量評価を行うため, 感度を改善し, より安定した実験系の開発を目指す.

E. 結論

CB 系合成化合物の中枢影響評価系開発とし

て, スループットの高い ELISA 法を用い, ラット初代培養ミクログリアの CB2 受容体を介した応答の定量解析を可能にした. 無刺激時および LPS 活性化時のミクログリアで CB2 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化応答を定量的に評価し, いずれの条件においても評価可能であることを示した. CB2 受容体を介した正常時のミクログリアに対する作用を評価するには, 無刺激時のミクログリアを用いた実験が望ましいと考えられた. 感度や安定性を改善すれば, 危険ドラッグに含まれる CB 系合成化合物の中枢機能変調を同定する評価系として有用である.

参考文献

1. Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, N. U., and Goda, Y., *Drug Test Anal.*, **6**, 832-839 (2014).
2. Atwood, B. K., and Mackie, K., *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 467-479 (2010).
3. Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., and Ross, R. A., *Pharmacol. Rev.*, **62**, 588-631 (2010).
4. Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., and Verkhratsky, A., *Physiol. Rev.*, **91**, 461-553 (2011).
5. Kreutzberg, G. W., *Trends Neurosci.*, **19**, 312-318 (1996).
6. Tremblay, M. E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A., *J. Neurosci.*, **31**, 16064-16069 (2011).
7. Blank, T., and Prinz, M., *Glia*, **61**, 62-70 (2013).
8. Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., and Gross, C. T., *Nat. Neurosci.*, **17**, 400-406 (2014).
9. Arevalo-Martin, A., Vela, J. M.,

- Molina-Holgado, E., Borrell, J., and Guaza, C., *J. Neurosci.*, **23**, 2511-2516 (2003).
10. Cabral, G. A., and Marciano-Cabral, F., *J. Leukoc. Biol.*, **78**, 1192-1197 (2005).
11. Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J., and Marciano-Cabral, F., *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 240-251 (2008).
12. Martin-Moreno, A. M., Reigada, D., Ramirez, B. G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., and de Ceballos, M. L., *Mol. Pharmacol.*, **79**, 964-973 (2011).
13. Cutando, L., Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Gomis-Gonzalez, M., Delgado-Garcia, J. M., Gruart, A., Maldonado, R., and Ozaita, A., *J. Clin. Invest.*, **123**, 2816-2831 (2013).
14. Lopez-Rodriguez, A. B., Llorente-Berzal, A., Garcia-Segura, L. M., and Viveros, M. P., *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 1435-1447 (2014).
15. Bouaboula, M., Dussosoy, D., and Casellas, P., *J. Biol. Chem.*, **274**, 20397-20405 (1999).
16. Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., and Casellas, P., *Eur. J. Biochem.*, **237**, 704-711 (1996).
17. Romero-Sandoval, E. A., Horvath, R., Landry, R. P., and DeLeo, J. A., *Mol. Pain.*, **5**, 25 (2009).
18. Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Simioni, C., Fazzi, D., Mirandola, P., and Borea, P.A., *Br J Pharmacol*, **165**(6), 1773-1788 (2012).
- cannabinoid receptor activity in the CNS using the ERK1/2 phosphorylation pathway of microglial cells, CBI 学会 2015, 東京 (2015.10)

G. 知的所有権の取得状況
特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

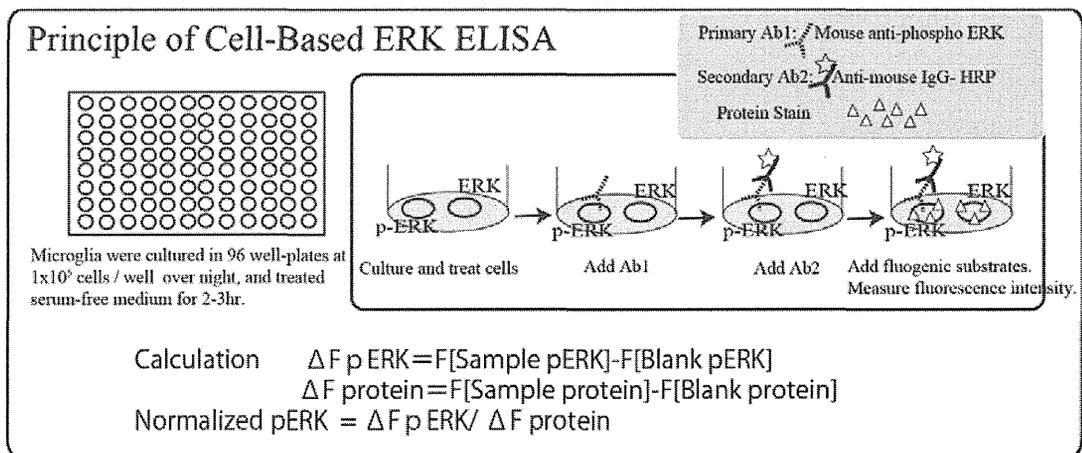
特になし

2. 学会発表

- 1) Shigemoto-Mogami, Y., Sato, K., Hoshikawa, K., Kikura-Hanajiri, R., Hakamatsuka, T., Sekino, Y., Evaluation of drug-induced CB2

Fig. 1

A



B

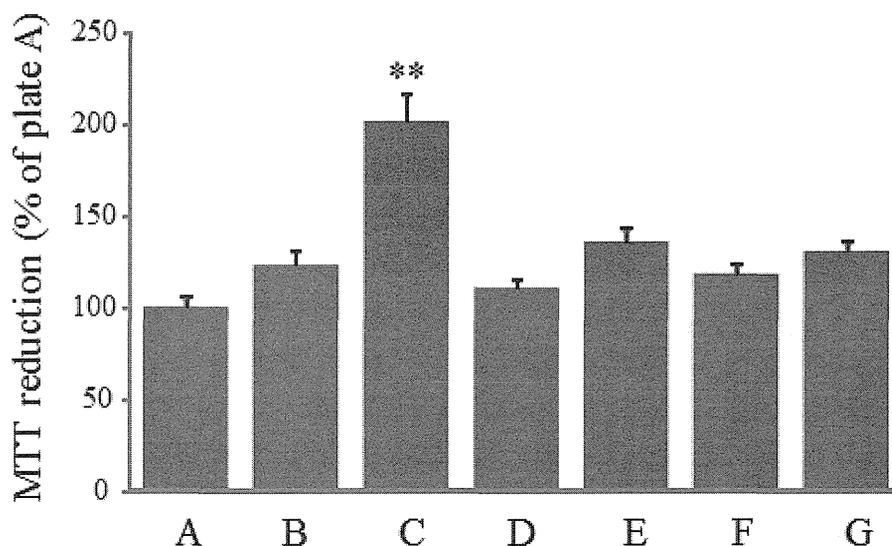


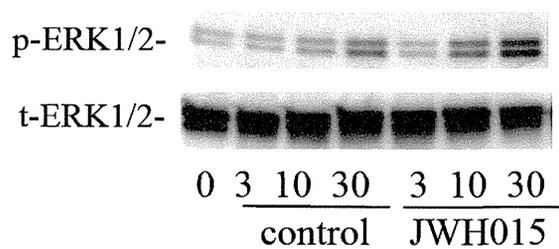
Fig. 1 ラットの初代培養ミクログリアの ELISA 法による ERK リン酸化解析

(A)ELISA 法による ERK1, 2 リン酸化解析の原理. (B)ラットの初代培養ミクログリアが良好に接着するプレートの選抜. ラット初代培養ミクログリアをメーカーや細胞接着面のコートが異なる 7 種の 96 ウェルグリアボトムプレートに播種し, Overnight で培養後, 3 時間血清除去メディウムに切り替えた後, MTT アッセイにて残存細胞数を評価した. プレートは, A; Corning coastar 3603, B;Greiner 655090, C; Greiner 655986, D; Thermo NUNC 165305, E;Corning 3904, F; Corning 3340, G; Corning 3842 の 7 種類を評価した. プレート C のみ有意に接着生細胞数が多いことが明らかになった.

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$ vs. each time of control, by Tukey's test following ANOVA.

Fig. 2

A



B

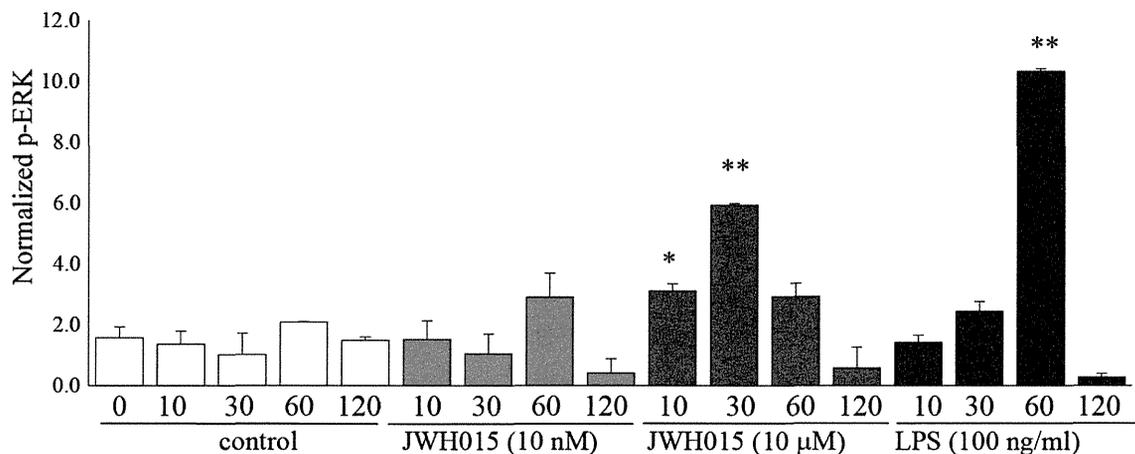
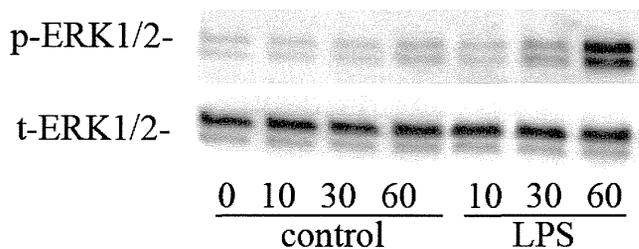


Fig. 2 ミクログリアの ERK リン酸化反応は CB2 受容体を介して制御されている

CB2 アゴニストによる ERK1, 2 のリン酸化反応のタイムコース. Western Blotting 法(A)ELISA 法(B)による解析. ミクログリアを JWH015 10 μM および, LPS100 ng/ml 存在下で, 10, 30, 60 分間反応させ, セルライセートを SDS-PAGE で分離後, リン酸化 ERK 特異的抗体と反応させ ERK1, 2 のリン酸化を定量した. CB2 アゴニスト JWH015(10 nM, 10 μM)および LPS(100 ng/ml)で, 10, 20, 60, 120 分間刺激した.

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$ vs. each of control, by Tukey's test following ANOVA.

Fig. 3

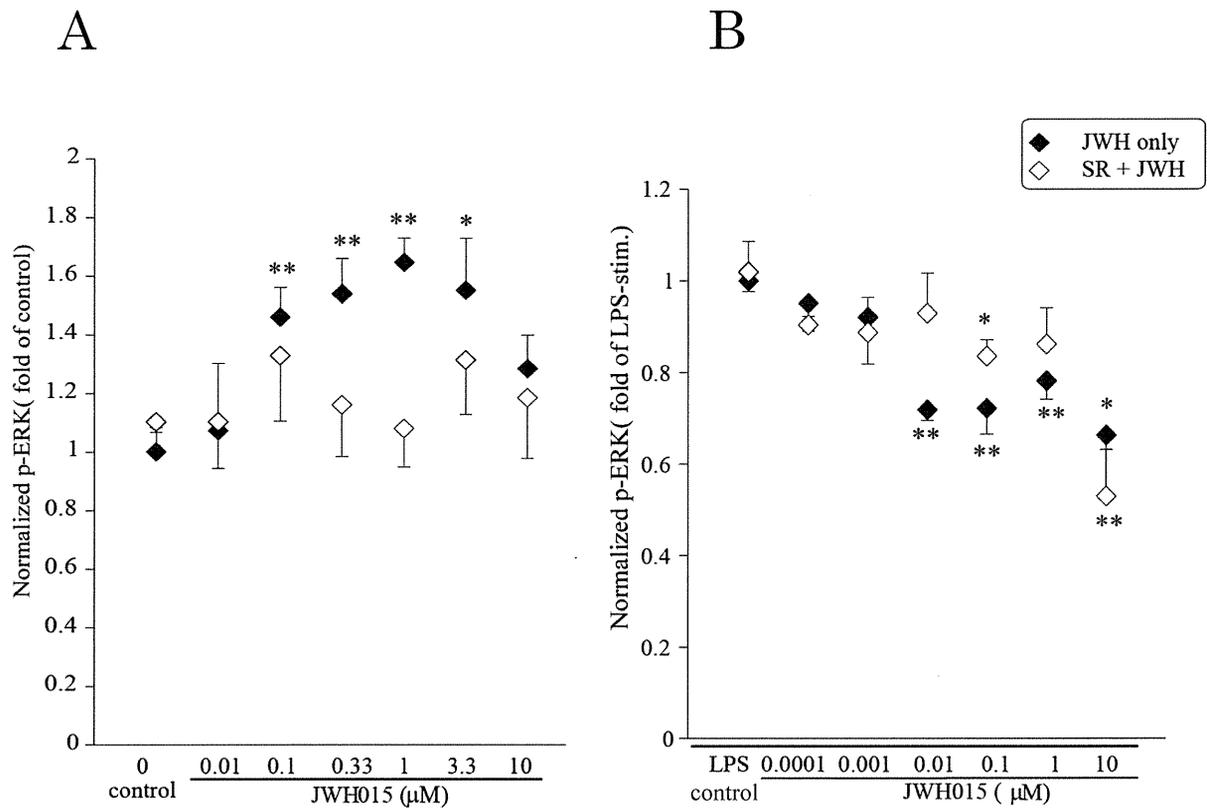


Fig. 3 ミクログリアの ERK リン酸化反応は CB2 受容体を介して制御されている

(A)ラット初代培養ミクログリアを SR144528(SR) 存在下, 非存在下において, 様々な濃度の JWH015 (JWH)で30分間刺激した. その後 ERK1, 2のリン酸化反応をELISAにより解析した. JWH015は ERK1, 2のリン酸化を誘導し, その反応は SR144528 で抑制された.

(B)ラット初代培養ミクログリアを, 様々な濃度の JWH015 共存下において LPS で 60 分刺激した.

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$ vs. each of control, by Tukey's test following ANOVA.

分担研究課題:危険ドラッグの脳波による作用評価に関する研究

研究分担者:裏出 良博 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構 (IIS) 教授

—新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究—

研究協力者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:最近の危険ドラッグ市場において、多くの製品中から合成カンナビノイドが検出されており、これら合成カンナビノイドが原因と考えられる健康被害が多数報告されている。しかし、これら合成カンナビノイドの薬理作用、特に行動に関する詳細についてはほとんど報告されていない。そこで本研究では、平成 25, 26 年度に引き続き、主に平成 27 年度に国内(外)で流通した危険ドラッグ製品から新たに検出された合成カンナビノイド及びその類似化合物(指定薬物 5 化合物, 未規制 6 化合物: 計 11 化合物)についてマウスの自発運動量に及ぼす作用を検討した。陽性対照として JWH-018(麻薬)を用いた。さらに、これら化合物を含め、平成 25~27 年度に検討した計 57 化合物(指定薬物 48 化合物, 未規制 9 化合物)について各作用を比較した。その結果、57 化合物中 36 化合物はいずれもマウスの自発運動量を有意に減少させ、特に、アミドエステル類(5Fluoro-ADB 等)は、陽性対照である JWH-018 と同程度またはそれ以上に強力な行動量抑制作用を示した。また、今回検討した合成カンナビノイドの行動を観察したところ、アミドエステル類(5Fluoro-ADB 等)やエステル類(NM2201 等)の一部の化合物で投与後に痙攣、歩行失調、挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察された。以上の結果から、これら新規流通合成カンナビノイドの摂取により重篤な健康被害が生じる可能性が危惧された。なお、本結果の一部は、平成 27 年度新規指定薬物として規制される際の参考データとして活用された。

研究協力者

有竹浩介 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究
機構 (IIS)・准教授

A. 研究目的

最近の危険ドラッグ市場において、多くの製品中から合成カンナビノイドが検出されており、これら合成カンナビノイドが原因と考えられる健康被害も多数報告されている。これまで我々は、危険ドラッグ成分の中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物(ラット)の脳波の

変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討してきた [1-5]。しかし、次々と新たな合成カンナビノイドが検出される現状において、行動量解析のような、より簡便な薬理作用の評価法が必要である。ところが、これら化合物の薬理作用、特に行動に関する詳細については非常に報告が少ない。そこで本研究では、平成 25, 26 年度に引き続き [6-8]、主に平成 27 年度に国内(外)で流通した危険ドラッグ製品から新たに検出された合成カンナビノイドについて、マウスの自発運動量に及ぼす作用を調べた。化合物の内訳としては、指定薬物 5 化合物, 未規制化合物 6 化合物の計 11

化合物を用い、陽性対照として麻薬(JWH-018)を用いた(化合物 1, Fig. 1). さらに、これらを含め、平成 25-27 年度に検討した計 57 化合物(化合物 1-57)について各作用を比較した(Fig. 1).

B. 研究方法

【使用動物】C57BL/6 系雄性マウス(9 週齢, 体重 21-24 g)を日本エスエルシー株式会社より購入した.

【飼育方法】マウスは 12 時間ごとの明暗周期下で、飼料と水を自由に摂取させた.

【薬物投与】今回使用した 11 化合物は、Cayman chemical 社製もしくは国立衛研において調製したものをを用いた. 各化合物は、DMSO/emurphor® EL-620(GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水(1/1/18)の溶媒に溶解あるいは懸濁させ、マウスに各 5 mg/kg の用量で腹腔内投与(intraperitoneal administration: i.p.)した. 投与は暗期開始時刻(19:00)直前に行い、1 日目は溶媒単独のコントロールとして、vehicle(溶媒)のみを投与し、2 日目に薬物を投与した(n=3~4).

【自発運動量測定】マウスは動物行動量測定用チャンバー内の個別のケージに入れ、行動量測定を行った. 行動量は、動物から放出される赤外線を検出するセンサー(Biotex Japan 社)とソフトウェア Biotex 16CH Act Monitor BAI2216(Biotex Japan 社)を用いて 1 分毎の行動量を 48 時間記録した. 自発運動量は、投与後 1 時間毎の累積量と、投与 0-6 時間後の累積量を 1 日目のコントロールを 100%として算出し、化合物投与後のそれぞれの累積値と比較した.

(倫理面の配慮)

動物実験は、筑波大学の動物実験委員会「動物実験に関する指針」、文部科学省のガイドラインおよび動物の愛護および管理に関する法律(第 105 号)を厳守し、動物福祉の観点に基づいて、適切な実験計画、実験手技のもとで実施した.

C. 研究結果および考察

検討を行った 57 化合物を、その構造から以下の 9 グループに分類した(Fig. 1).

- (A) カルボニル類(化合物 1-4)
- (B) エステル類(化合物 5-17)
- (C) アミド類(化合物 18-28)
- (D) ジアミド類(化合物 29-42)
- (E) アミドエステル類(化合物 43-51)
- (F) シクロプロピル類(化合物 52-54)
- (G) カルバゾール類(化合物 55)
- (H) ピペラジン類(化合物 56)
- (I) ピラゾール類(化合物 57)

【自発運動量の経時的変化】

各薬物[指定薬物: 26, 28, 42, 44, 51, 未規制化合物: 10, 12, 14, 24, 25, 57 の計 11 化合物]をそれぞれ 5 mg/kg ずつマウスに投与した場合の、投与後 1 時間毎の自発運動累積量の経時変化を、Fig. 2a-2k に示した.

エステル類(グループ B)(化合物 10, 12, 14)を投与した場合、インドール骨格を持つ化合物 10(CBL-018)は、投与 13 時間後まで有意にマウスの自発運動量を減少させた(Fig. 2a). 一方、その他のインダゾール骨格を持つ化合物 14(FUB-NPB-22)は、投与 2 時間後まで有意にマウスの自発運動量を減少させた(Fig. 2c). 化合物 12(NPB-22)では有意な自発運動量の抑制作用はみられなかった(Fig. 2b).

アミド類(グループ C)(化合物 24, 25, 26, 28)を投与した場合、キノリン骨格をもつ化合物 24(THJ)では有意な自発運動量の抑制作用はみられなかった(Fig. 2d). また、同じくキノリン骨格をもつ化合物 25(5F-THJ)及びベンジル骨格をもつ化合物 26(SDB-006)は、いずれも投与 2 時間後まで有意にマウスの自発運動量を減少させた(Fig. 2e, 2f). 一方、フェニルプロパン骨格をもつ化合物 28(5-Fluoro-CUMYL-PINACA)は、投与 16 時間後までの長時間にわたり有意にマウスの自発運動量を減少させた(Fig. 2g). 従って、化合物 28

(5-Fluoro-CUMYL-PINACA)は、陽性対照のJWH-018(投与16時間後まで有意に減少,[6-8])と同程度の長時間にわたり作用が持続することが示された。

次に、ジアミド類(グループD)である化合物42(Fu-PX-2)を投与した場合、投与1時間後まで有意に自発運動量を増加させた(Fig. 2h)。

アミドエステル類(グループE)の化合物44(MDMB-CHMICA)、化合物51(MDMB-FUBINACA)を投与した場合、両化合物とも投与の12時間後まで長時間にわたり有意に自発運動量を減少させた(Fig. 2i, 2j)。また、有意差はないものの、両化合物ともに、投与24時間後まで運動量抑制作用がみられた(Fig. 2i, 2j)。

ピラゾール類(グループI)の化合物57(AB-CHFUPYCA)を投与した場合、有意な自発運動量の抑制作用はみられなかった(Fig. 2k)。

【累積自発運動量】

次に、平成25~27年度に検討した計57化合物(化合物1~57, Fig. 1)の投与0-6時間後におけるマウスの累積自発運動累積量を、コントロールを100%として算出し、Fig. 3(グループA-I)に示した。結果として、57化合物中36化合物はいずれもマウスの自発運動量を有意に減少させた(Fig. 3)。また、投与0-6時間後の%コントロールを0~10%未満、10~25%未満、25~50%未満、50~100%未満、100%以上(いずれも有意差有り)及び有意差なしに分類し、下記に各化合物の結果を示した。

<投与0-6時間後の累積自発運動累積量の%コントロール>

- 0~10%未満:化合物10, 11, 28, 44-51
- 10~25%未満:化合物1-3, 5, 6, 8, 21-23, 31
- 25~50%未満:化合物9, 29, 30, 32, 35, 38, 39, 43, 52
- 50~100%未満:化合物7, 19, 20, 25, 37, 56
- 100%以上:化合物36
- 有意差なし:化合物4, 12-18, 24, 26, 27, 33, 34, 40-42, 54-57

上記及びFig. 3の結果から、投与0-6時間後までの行動累積量を比較すると、下記に示す結果が得られた。

①カルボニル類(A)(化合物1-4):インドール骨格(化合物1, 2)及びインダゾール骨格(化合物3)は、有意な行動抑制作用を示したが、ベンズイミダゾール骨格(化合物4)は抑制作用がみられなかった。

②エステル類(B):行動抑制作用は、インドール骨格(化合物5-11)>>インダゾール骨格(化合物12-17, 有意差なし)であった。

③アミド類(C):行動抑制作用は、インダゾール骨格(化合物21, 22)>インドール骨格(化合物18, 19)であった。また、ベンジル基を有する化合物(26, 27)では抑制作用はみられなかったが、フェニルプロパノイド基を有する化合物28(5-Fluoro-CUMYL-PINACA)は、有意な行動抑制作用を示した。

④ジアミド類(D):概ね有意な行動抑制作用を示した(化合物29-32, 35, 37-39)。しかし、ベンジル基を有する化合物(40-42)では抑制作用は見られなかった。また、1*H*-インダゾール(AB-CHMINACA, 35)は行動抑制作用を示したが、2*H*-インダゾール(AB-CHMINACA 2*H*-indazole analog, 36)では抑制作用を示さなかった。

⑤アミドエステル類(E)(化合物43-51):最も顕著な行動抑制作用を示し、陽性対照JWH-018(1)と同程度またはそれ以上に強力な作用を有することが示された。

⑥シクロプロピル類(F):化合物52-53は中程度の行動抑制作用がみられた。

⑦カルバゾール類(G)のEG-018(55)、ピペラジン類(H)のMEPIRAPIM(56)、ピラゾール類(I)のAB-CHFUPYCA(57)では抑制作用は見られなかった。

D. 結論

本研究では、平成 25, 26 年度に引き続き、主に平成 27 年度に国内(外)で危険ドラッグ成分として流通した合成カンナビノイド 11 化合物について、マウスの自発運動量に及ぼす作用を検討した。さらに、これら化合物を含む、平成 25~27 年度に検討した計 57 化合物の投与 0-6 時間後におけるマウスの合計自発運動量を比較した結果、57 化合物中 36 化合物がマウスの自発運動量を有意に減少させた。特にアミドエステル類(化合物 43-51)は、陽性対照 JWH-018(1)と同程度またはそれ以上に強力な作用を有することが示された。なお、検討した合成カンナビノイドの行動を観察したところ、アミドエステル類(化合物 43-51)やエステル類(NM2201(11)等)の一部の化合物で投与後に痙攣、歩行失調、挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察された。従って、これら合成カンナビノイドの摂取により重篤な健康被害が生じる可能性が危惧された。

以上本結果は、薬理作用がほとんど不明である新規流通合成カンナビノイドについての有用なデータである。なお、本結果の一部は、未規制であった危険ドラッグ成分が、平成 27 年度新規指定薬物として規制される際の参考データとして活用された。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度及び 20 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」及び「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 2) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度, 22 年度及び 23 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究(2)」及び「麻薬成分ケタミン誘導体:メキセタミンのラット脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 3) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Matsumoto N., Huang Z.L., Urade Y., Goda Y. Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci. Int.* (2012) 215:179-183.
- 4) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」平成 24 年度, 25 年度研究分担報告「カチノン系化合物 α -PVP 及び合成カンナビノイド MAM-2201 のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」及び「新規流通合成カンナビノイド QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 5) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Aritake K., Goda Y., Urade Y. Effects of MAM-2201 and α -PVP on electroencephalogram power spectra and locomotor activity in rats. *SOFT2013* (2013.10)
- 6) 内山奈穂子, 有竹浩介, 花尻(木倉)瑠理, 裏出良博, 合田幸広, 袴塚高志:新規流通違法ドラッグ成分である合成カンナビノイドのマウス自発運動量に及ぼす作用 日本薬学会第 134 年会 (2014.3)
- 7) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」平成 25 年度研究分担報告「新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究」(裏

出良博, 内山奈穂子)

- 8) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び
危害影響予測に関する研究」平成 26 年度研
究分担報告「新規流通合成カンナビノイドの
自発運動量に及ぼす作用に関する研究」(裏
出良博, 内山奈穂子)

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

学会発表

- 1) Uchiyama N., Aritake K., Kikura-Hanajiri R.,
Hakamatsuka T., Urade Y.: Effects of
recently-emerged synthetic cannabinoids on
locomotor activity in mice. TIAFT2015
(2015.8.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

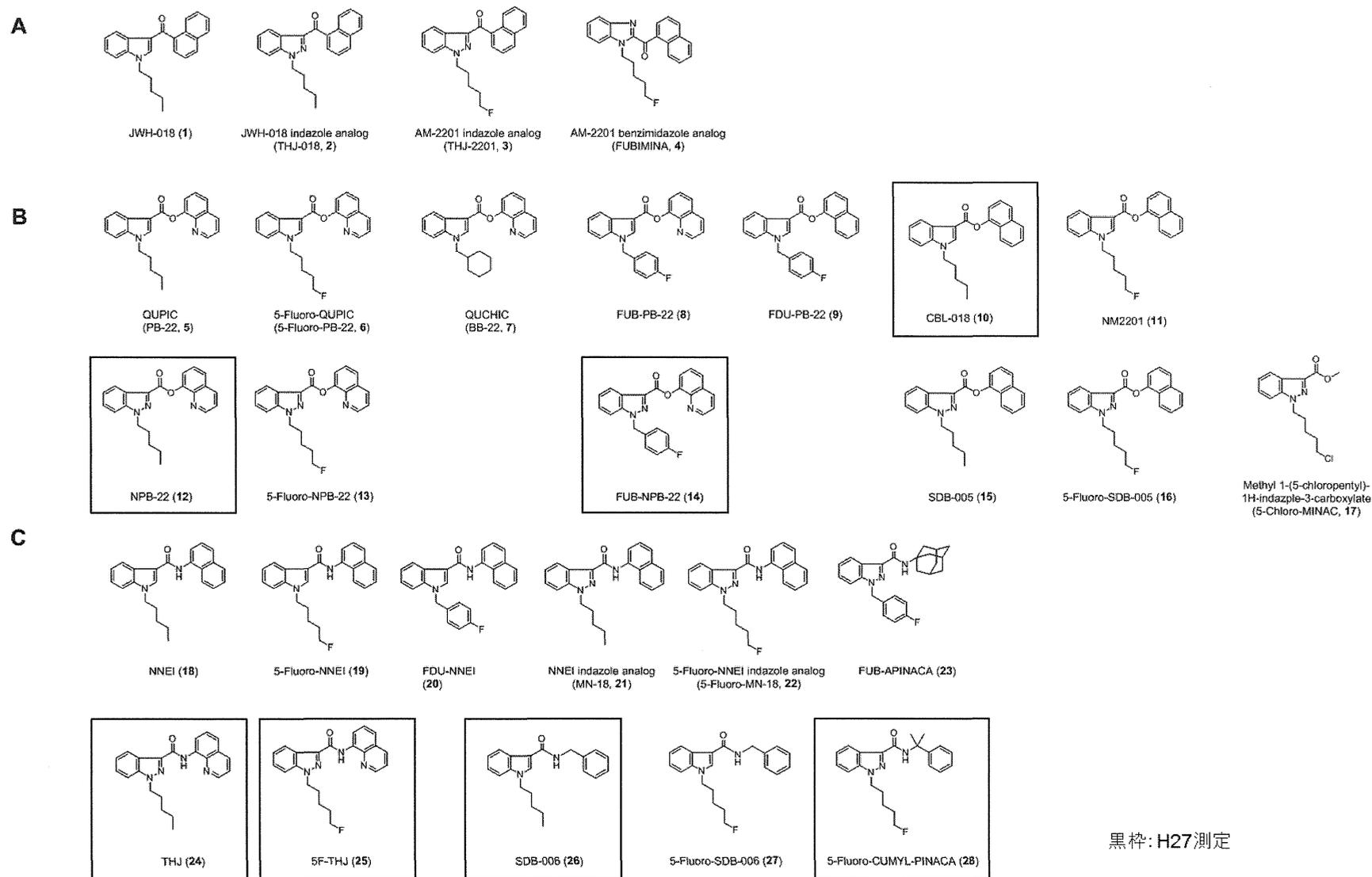


Fig. 1. Structures of tested synthetic cannabinoids (1-28)