

分担研究報告書

若年者違法薬物使用防止の啓蒙活動のためのエビデンス収集

研究分担者： 関野祐子（東京大学大学院薬学系研究科）
研究協力者： 光岡俊成、加藤祐一、筒井泉雄（東京大学大学院薬学系研究科）
間瀬省吾、小金澤紀子、白尾智明（群馬大学大学院医学系研究科）

研究要旨

大麻などの違法薬物の摂取は、未だ心身が発達段階の若年者に対して正常な脳機能を破壊し、記憶・認知・精神運動能力を変容させる可能性が高く、乱用防止は社会的に重要な課題である。大麻や薬物乱用防止の啓蒙活動にとっては、大麻に含まれるカンナビノイドが若年者の心身の発達に与えるリスクを科学的かつ定量的に示すことが極めて重要である。本研究では、ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞の初代培養神経細胞による *in vitro* アッセイ法を使って、カンナビノイド受容体アゴニストが神経細胞同士のネットワークの発達に与える影響を、神経細胞の形態的変化及び細胞死を指標として定量的に解析した。培養7日目にカンナビノイド受容体アゴニスト CP55940 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)を投与して21日目まで培養して、樹状突起長は抗 MAP2 抗体、樹状突起スパイン数は抗ドレブリン抗体を使った免疫細胞化学染色を行い、細胞核は DAPI を使って認識した。画像データはハイスループットイメージングアッセイ法を使って解析した。その結果、3 μ M 以下の CP55940 においては樹状突起スパイン数を示すドレブリンクラスター数は有意に増加し濃度依存性が認められた。10 μ M CP55940 では神経細胞死が観察された。

培養3週間目の神経細胞の NMDA 型受容体を活性化するとドレブリンクラスター数は減少し、反対に NMDA 型受容体を阻害するとドレブリンクラスター数が増加することが知られている。そこで 100 nM CP55940 の2週間投与後に 100 μ M グルタミン酸を投与したところ、ドレブリンクラスター数がコントロールと同程度に減少した。CP55940 は NMDA 型受容体阻害作用を持たないことが示唆された。カンナビノイド受容体アゴニストは神経伝達物質の遊離を減少することが知られている。CP55940 により神経伝達物質の遊離が減少するがその代償作用として AMPA 型受容体が増加し、ドレブリンの局在が変わった可能性がある。これらの結果から、シナプス機能が未成熟な時期に慢性的にカンナビノイド受容体アゴニストを投与すると、シナプス後部構造が異常な形態を示すことが判った。若年期の大麻の乱用でカンナビノイド受容体が持続的に活性化されると、記憶・認知・精神運動能力の発達が変容するリスクがあることの科学的な根拠を示すことができた。

A. 研究目的

大麻などの違法薬物は、特に、未だ心身が発達段階の若年者に対して、長期的に正常な脳機能を破壊する。大脳辺縁系への影響では、記憶、認知、精神運動能力を変える可能性があり、中脳辺縁系経路への影響では、報酬と快楽の反応および痛みの知覚に影響を与える可能性がある⁽¹⁾。一方、若年者における大麻摂取が、大脳皮質の神経活動を長期的に変化させる神経メカニズムについては明らかになっていない。大麻 (*Cannabis sativa*) にはカンナビノイドと呼ばれる480以上の異なる化合物が含まれている。

カンナビノイドの主要な精神活性成分は delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC)であり、大麻樹脂抽出物の約40%を構成するもう1つの重要な成分がカンナビジオール (CBD) である。カンナビノイドは、主に脳の神経細胞や脊髄にあるカンナビノイド受容体 (CB1受容体) と相互作用することによりその効果を発揮する⁽²⁾。本研究では、大麻や覚せい剤などの違法薬物が、発達段階の心身に対して与える影響のメカニズムを、脳の神経細胞同士のネットワーク構築と関係の深い神経シナプス後部構造の形態的な変化や樹状突起長を指標とした *in vitro*

モデル(初代培養神経細胞)を使って明らかにする。本年度は、発達段階の培養ラット海馬神経細胞に Δ 9-THC や CBD と構造が類似し、CB1 受容体アゴニストである CP55940 をモデル化合物として使用した(図1)。カンナビノイド受容体アゴニストである CP55940 を投与し、神経シナプス後部構造の免疫細胞化学染色とハイスループットイメージングアッセイ法を使って、発達段階の神経細胞にどのように作用するかを調査する。

B. 研究方法

脳の発達段階においては、神経細胞の樹状突起が成長しシナプスが形成される。そのため発達過程への影響を *in vitro* において再現するため、初代培養神経細胞の樹状突起上のシナプスが形成される時期⁽³⁾にモデル化合物を投与する試験法とした。ラットの初代培養神経細胞は培養7日目から14日目に樹状突起スパインが形成される。ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞(SKY neuron, Alzmed, Inc, Tokyo)を解凍して96穴プレートに播種し37°C 5%CO₂で培養する。培養7日目又は14日目にモデル化合物を投与して神経細胞が成熟する21日目まで曝露した。

シナプス形成への影響は、ドレブリンクラスタ数の変化を観察することで評価した。ドレブリンはアクチン結合タンパク質として受容体などの樹状突起上にあるシナプス後部の機能タンパクの局在を安定化する役割があり、神経細胞の成熟化の指標になる。さらにグルタミン酸刺激等でグルタミン酸受容体が活性化され細胞内にCa²⁺が流入すると、ドレブリンクラスタは樹状突起のスパインから消失してスパインの形態変化を誘導することが知られている。

また、カンナビノイドはシナプス前部にあるCB1受容体に結合しシナプス後部の興奮性グルタミン酸受容体の活性化を抑制することが知られている。CP55940 投与群(100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 各 n=6), グルタミン酸投与群(10 μ M, 100 μ M, 各 n=6), グルタミン酸と CP55940 併用群(グルタミン酸(10 μ M, 100 μ M) + CP55940 (100 nM), 各 n=6) を比較することで検討した。

免疫細胞化学染色は、ドレブリンを抗ドレブリン抗体(mouse monoclonal, M2F6, 1:1), 樹状突起の軸を成す微小管結合タンパク質である MAP2 を抗 MAP2 抗体(rabbit polyclonal, 1:2000)と4°Cで24時間反応させた後、2次抗体として Alexa Fluor 488 donkey anti-Mouse IgG (1:250) 及び Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG(1:250) に、核を染色するための 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI, 1:1000)を加えて、細胞を

3重に染色した(図2)。画像取得・解析は、CQ-1Yokogawa, Kanazawa, Japan)の自動フォーカス機能(20 \times lens, numerical aperture 0.45)を使って自動的に撮像し、ハイスループットで得られた大量の画像情報を我々が独自に開発した解析プロトコルを使用した(図3)。本評価に使った画像処理アルゴリズムは、日本化学工業協会 LRI 第8期委託研究課題の一環として我々が開発した。また、ラット胎仔由来凍結神経細胞を3週間培養して樹状突起と樹状突起スパイン及び核を免疫細胞化学的に染色し、画像取得・解析を完全自動化で行うことにより、再現性高く、ハイコンテンツアナリシスで評価する方法は、白尾らにより開発された⁽⁴⁾。

C. 研究結果

培養7日~21日に10 μ M CP55940 投与した群で神経細胞死が認められた(図4)。定量的に解析した結果、3 μ M 以下の CP55940 投与群では生細胞数に変化は無いが、10 μ M CP55940 投与群は control 群に比べて64.2%まで減少した(図5)。

ドレブリンクラスタに関しては、3 μ M 以下の CP55940 投与群において、興奮性シナプス後部構造の樹状突起スパイン数を示すドレブリンクラスタ数は、コントロール群に比べていずれの投与群も有意に増加し、濃度依存性が認められた(図6)。また、グルタミン酸による NMDA 型受容体の活性化によるシナプスの減少は、100 nM CP55940 によるシナプス数の増加に影響を与えなかった(data not shown)。そのため、CP55940 によるどれ雨林クラスタ増加作用は、NMDA 型受容体を介さない機序による現象であることが示唆された。

D. 考察

これらの結果は、CP55940 により神経細胞機能の正常な発達過程を逸脱し、シナプスの可塑性を失わせることを示唆している。この現象は、記憶、認知、精神運動能力への影響、報酬と快楽の反応および痛みの知覚に影響を与える原因と成り得る。*in vivo* の実験結果との比較が有用かもしれない。例えば、幼若動物試験での行動観察の結果と比較を行うことも検討したい。また、CB1 又は CB2 受容体に選択的なアゴニスト、アンタゴニストを投与した場合の比較を行うことで、カンナビノイドの作用機序の理解を助ける可能性があり、今後の検討が必要である。

E. 結論

発達段階の培養海馬神経細胞を使ったハイスループットイメージングアッセイ法は、発達段階の神経

細胞への影響を鋭敏に検出できることが示唆された。

F. 参考文献

1. 三島 健一, 入江 圭一, 大麻成分の中樞効果：有用性と危険性, YAKUGAKUZASSHI/140 巻 (2020) 2 号.
2. 船田 正彦, 富山 健一, 大麻成分の依存性と細胞毒性, YAKUGAKU ZASSHI/140 巻 (2020) 2 号.
3. Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S and Shirao T “Drebrin-Dependent Actin Clustering in Dendritic Filopodia Governs Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95 and Dendritic Spine Morphogenesis”, J. Neurosci., 23(16):6586- 6595, 2003
3. Hanamura K, Koganezawa N, Kamiyama K, Tanaka N, Oka T, Yamamura M, Sekino Y and Shirao T.

“High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons.” Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 99:106607, 2019

G. 研究発表

Mitsuoka T, Mase S, Koganezawa N, Katou. Y, Tsutsui I, Shirao T and Sekino Y. Assessment of CB agonist CP55940 in maturity for rat hippocampal neurons using a high-throughput immunocytochemical assay and image digital analysis, 第94回日本薬理学会, 札幌(2021, 3).

H. 知的所有権の取得状況
なし

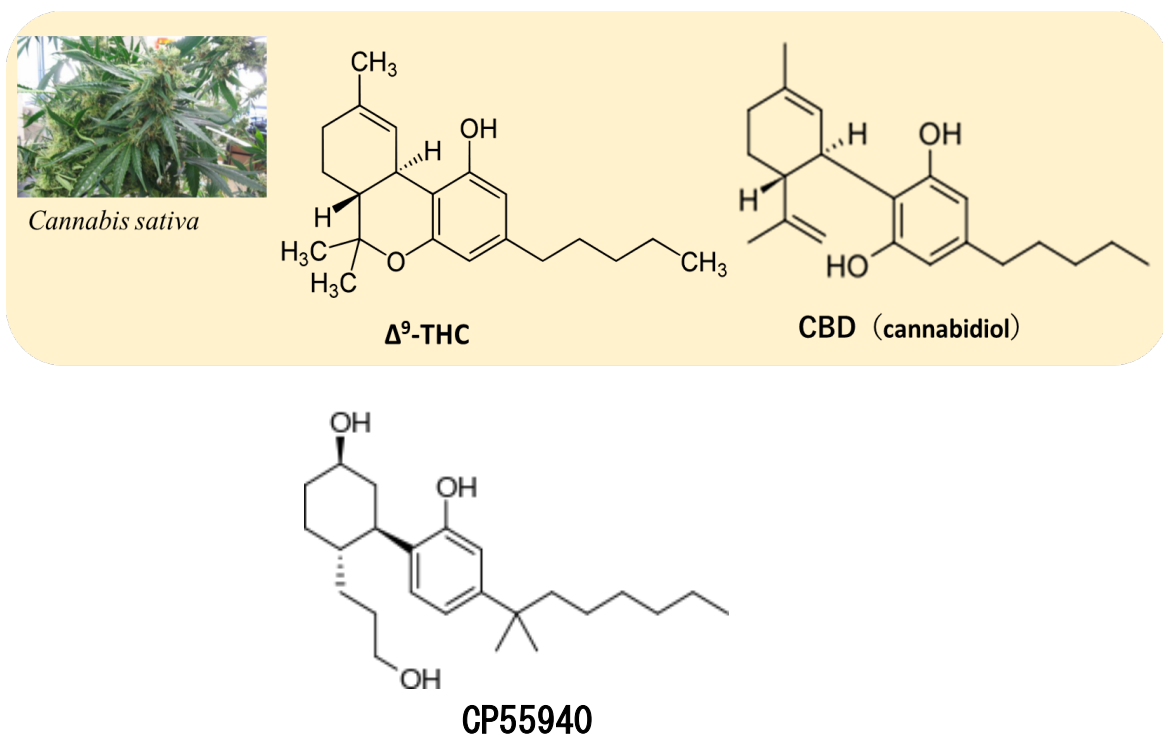


図1. CannabinoidとCP55940の化学構造

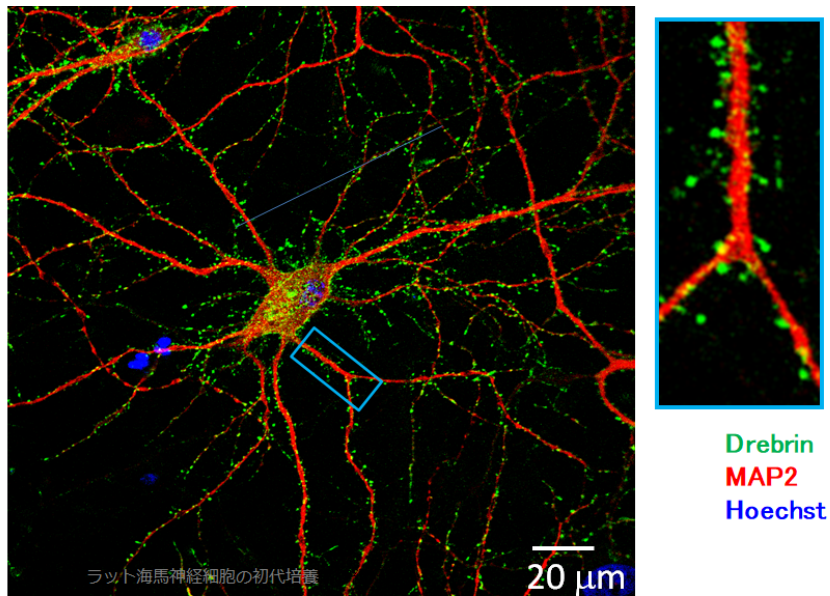


図2. 成熟した培養 21 日目のラット神経細胞の MAP2 とドレブリンの分布：樹状突起は抗 MAP2 抗体（赤）で，樹状突起スパイン（シナプス後部構造）は抗ドレブリン抗体（緑）で可視化した。

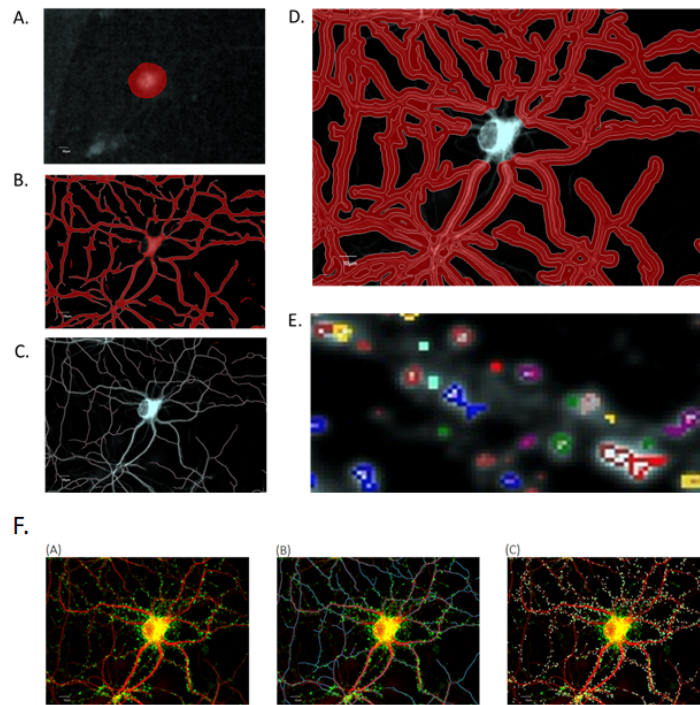


図3. 樹状突起とドレブリン クラスターの解析プロトコル

A.細胞体領域の定 B.樹状突起の同定 C.樹状突起骨格の描出 D.樹状突起骨格の周辺領域範囲の同定 E.樹状突起骨格の周辺領域中のドレブリンクラスターの同定

F.実際の解析の一例：(A) 培養海馬神経細胞の蛍光染色画像：ドレブリン（緑）、MAP2（赤） and DAPI（青）、(B) 樹状突起長計測：蛍光画像上でマッピングした樹状突起骨格（青線）の長さ、(C) ドレブリンクラスター数の計測：蛍光画像上でマッピングしたドレブリンクラスター（白）

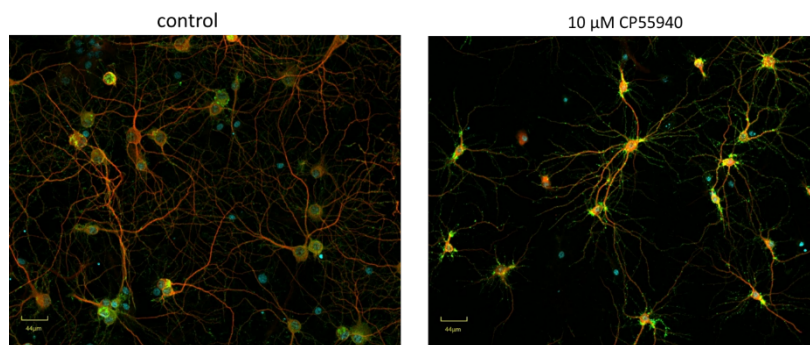


図4. 高濃度カンナビノイド受容体アゴニストの慢性暴露による神経細胞死
10 μ M CP55940 存在下で2週間海馬神経細胞を培養すると神経細胞数が減少し、神経細胞毒性があることが判明した。

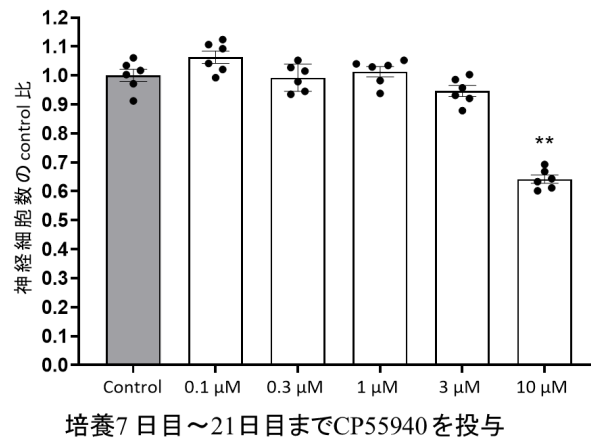


図5. CP55940 の2週間投与による神経細胞数の変化
 培養7日目に各濃度のCP55940を投与して3週間目に固定した。
 10 μM CP55940投与群では平均64%まで神経細胞数が減少した。
 Control群 vs 10 μM群 $p < 0.0001$
 (Dunnett's multiple comparison test)

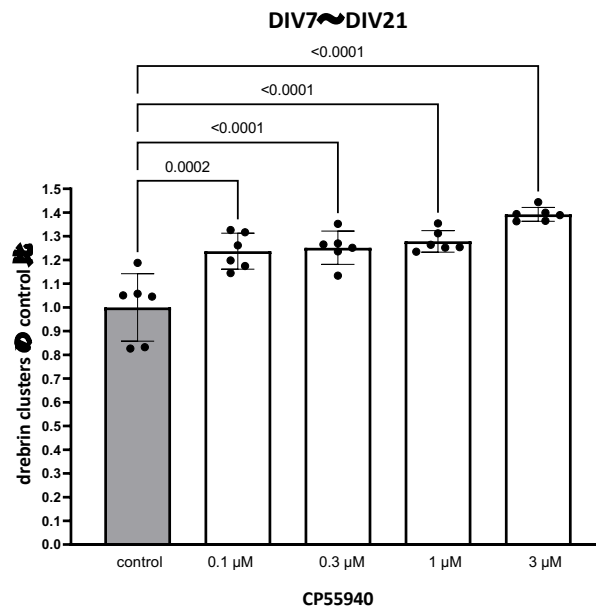


図6. CP55940 の2週間投与によるドレブリンクラスターの変化
 培養7日目に各濃度のCP55940を投与し、3週間目に固定した。
 CP55940投与群ではドレブリンクラスター数の増加が見られた。
 Control群 vs 各群 (Dunnett's multiple comparison test)