

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（SKYニューロン）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ネットワークの発達に与える影響を、神経細胞の形態的变化及び細胞死を指標として定量的に解析した。カンナビノイド受容体アゴニスト CP55940（0.1, 0.3, 1, 3, 10 μM ）を培養7日目から21日目まで投与する実験、14日目から21日目まで投与する実験、21日目から28日目まで投与する実験を行った。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、SKYニューロンの培養7日目から2週間投与実験（EXP_D7）、および培養14日目から1週間投与実験（EXP_D14）の10 μM CP55940存在下では、神経細胞数はcontrol群に比べてそれぞれ平均55%と平均67%まで減少した。しかし、培養21日目から1週間投与実験（EXP_D21）では平均91%で有意差はなかった。低濃度のCP55940（0.1, 0.3, 1, 3 μM ）存在下では生細胞数に変化は無かった。一方、樹状突起長および興奮性シナプスである樹状突起スパイン数を示すドレブリンクラスター数は、EXP_D7の3 μM CP55940存在下で、樹状突起長は平均値125%、ドレブリンクラスター数で平均値133%であり、増加が見られた。しかし、EXP_D14およびEXP_D21では樹状突起長に変化はなかった。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高濃度のカンナビノイド受容体アゴニストにさらされると神経細胞死が起こるリスクがあることが判った。低濃度のアゴニストにさらされた場合には、樹状突起長およびドレブリンクラスター数への影響には違いがあるが、樹状突起スパインへのドレブリン集積は興奮性シナプス機能への影響を示している。これらの実験結果は、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を変容するリスクを示す科学的な根拠である。

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、大麻や覚醒剤などの違法

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) を解冻して 96 穴プレートに播種し 37°C 5%CO₂ で培養する。CP55940 を投与し、シナプス形成前期にあたる培養 7 日目から 21 日目まで曝露する実験 (EXP_D7), シナプス形成後期にあたる培養 14 日目から 21 日目まで曝露する実験 (EXP_D14), シナプス形成成熟期にあたる 21 日から 28 日目まで曝露する実験 (EXP_D21) を行った (図 2)。

シナプス形成への影響は、ドレブリンクラスタ一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 (図 3)。

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 (0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 各 n=18) をコントロール群と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。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 4)。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

EXP_D7 および EXP_D14 において、10 μ M CP55940 投与した群で神経細胞死が認められた (図 5)。定量的に解析した結果、3 μ M 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 EXP_D7 において平均値 55%, EXP_D14 において平均値 67% まで神経細胞数が減少した。一方、EXP_D21 は平均値 91% と有意な差はなかった (図 6)。

神経細胞の樹状突起長および興奮性シナプスである樹状突起スパイン数を示すドレブリンクラスタ一数は、特に 3 μ M CP55940 存在下で EXP_D7 の樹状突起長は平均値 125%, ドレブリンクラスタ一数で平均値 133% と増加が見られた。しかし、EXP_D14 および EXP_D21 ではそれぞれ樹状突起長に変化はなかった (図 7)。

ドレブリンクラスタ一に関しては、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一数は、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た (図 8)。

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が高濃度のアゴニストにさらされると神経細胞死を引き起こすリスクがあることが判った。シナプス形成前期の低濃度長期曝露の影響は樹状突起スパインへのドレブリン集積であるが、形態異常か興奮性シナプス機能異常であると考えられる。また、低濃度のアゴニストをさらされると樹状突起長およびドレブリンクラスタ一数

への影響には違いがあることが判った。未成熟な時期でもシナプス形成前期と後期で異なる発達神経毒性のメカニズムが存在する可能性が示唆された。

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*で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

CB1受容体アゴニストであるCP55940により神経細胞機能が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が示された。また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によって、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

1. 間瀬省吾, 筒井泉雄, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 川辺浩志, 白尾智明, 關野祐子, 学習記憶障害をもたらすグルタミン酸受容体結合化合物の発達神経毒性の評価: ラット海馬培養ニューロンにおけるドレブリン染色解析, 第48回日本毒性学会学術年会, 2021年7月, ポスター (オンライン)
2. 間瀬省吾, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 筒井泉雄, 白尾智明, 川辺浩志, 關野祐子, 合成カンナビノイドCP55940により誘発される樹状突起スパインへのドレブリンの過剰集積と神経細胞死, 第44回日本神経科学大会, 2021年7月, ポスター (オンライン)
3. 間瀬省吾, 光岡俊成, 小金澤紀子, 山崎博幸, 加藤祐一, 筒井泉雄, 白尾智明, 川辺浩志, 關野祐子, 合成カンナビノイドCP55940がシナプス形成にもたらす発達神経毒性: ドレブリン局在変化の解析, 第64回日本神経化学学会大会 2021年9月ポスター (web)

H. 知的所有権の取得状況 なし

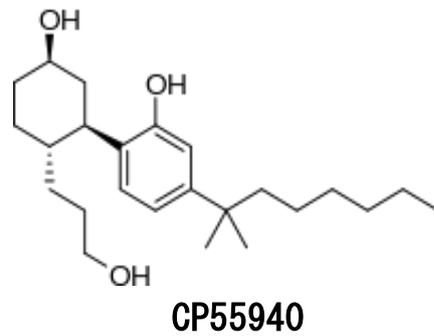
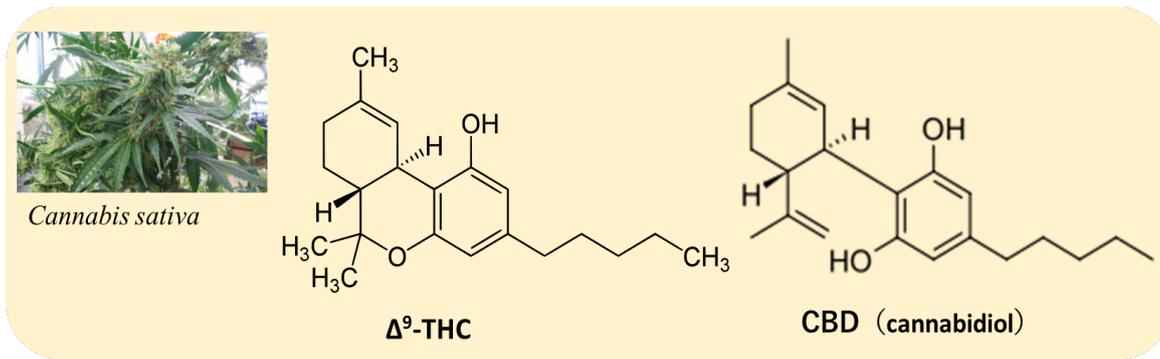


図 1. Cannabinoid と CP55940 の化学構造

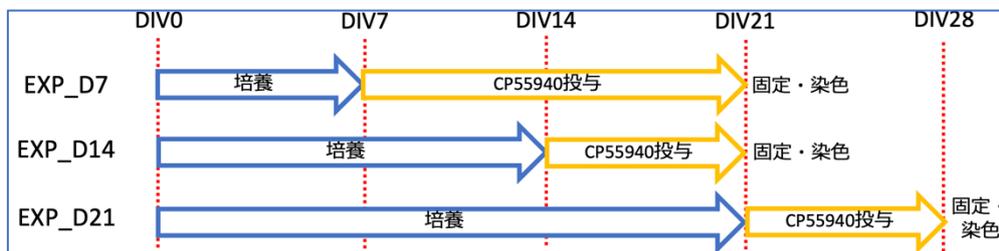


図 2. CP55940 投与と固定のタイムライン

- シナプス形成前期(培養 7~21 日)で投与する実験 (EXP_D7)
- シナプス形成後期(培養 14~21 日)で投与する実験 (EXP_D14)
- シナプス成熟期(培養 21 日以降)で投与する実験 (EXP_D21)

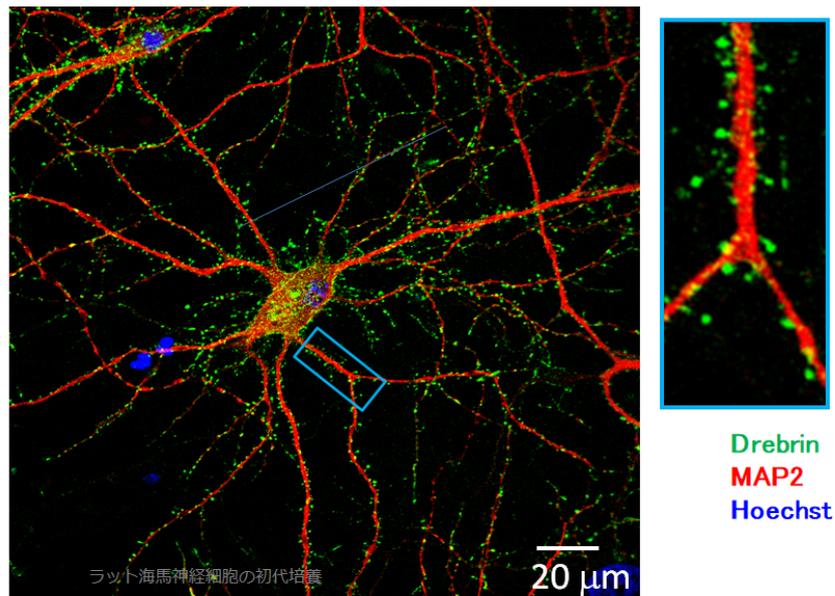


図3. 成熟した培養 21 日目のラット神経細胞の MAP2 とドレブリンの分布 : 樹状突起は抗 MAP2 抗体 (赤) で, 樹状突起スパイン (シナプス後部構造) は抗ドレブリン抗体 (緑) で可視化した。(参考: 2020 年度報告書)

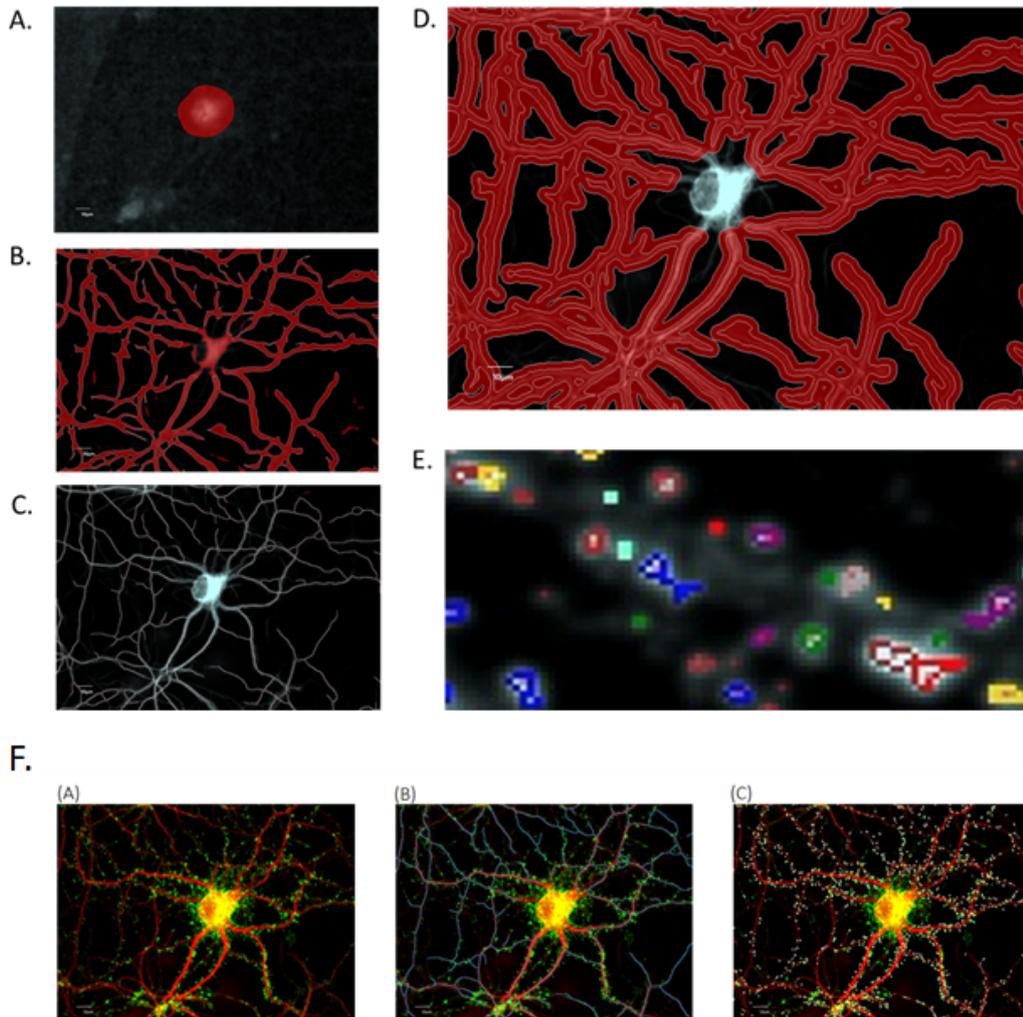


図4. 樹状突起とドレブリン クラスターの解析プロトコル

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）

（参考：2020 年度報告書）

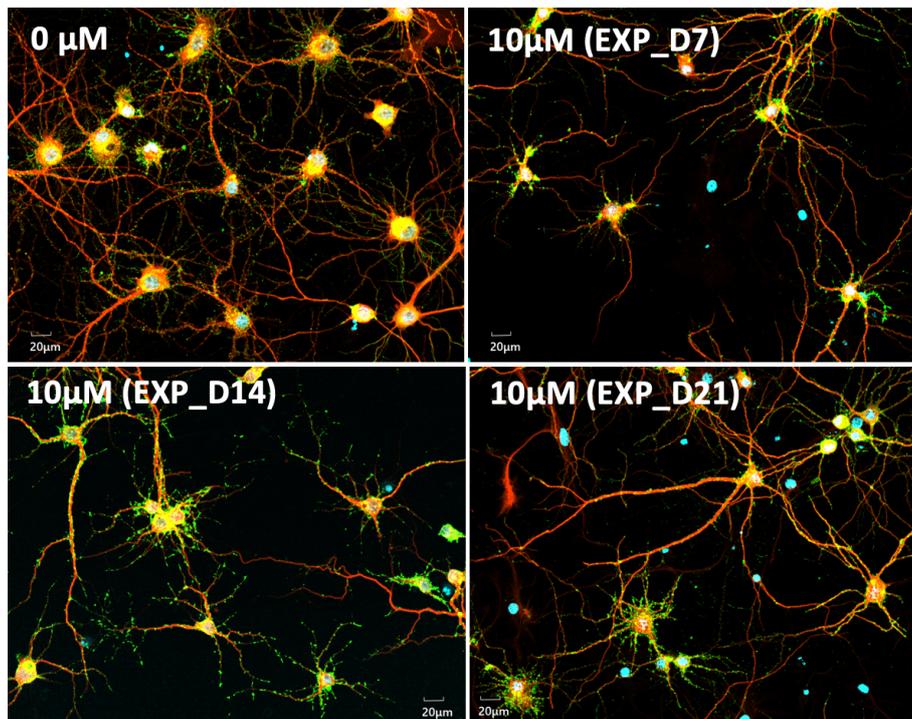


図5. シナプス発達前期(EXP_D7), シナプス発達後期(EXP_D14), シナプス成熟期(EXP_D21)における高濃度カンナビノイド受容体アゴニストの慢性暴露
 10 μ M CP55940 存在下で EXP_D7, EXP_D14 において神経細胞数が減少し, シナプス発達期に顕著に神経細胞毒性を及ぼすことが判明した。

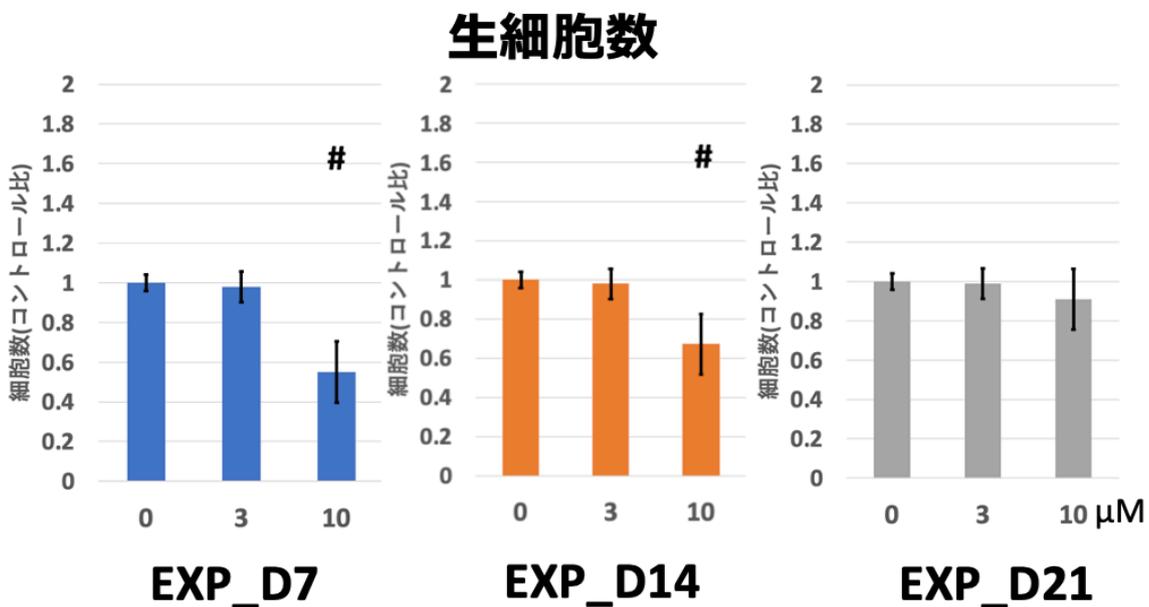
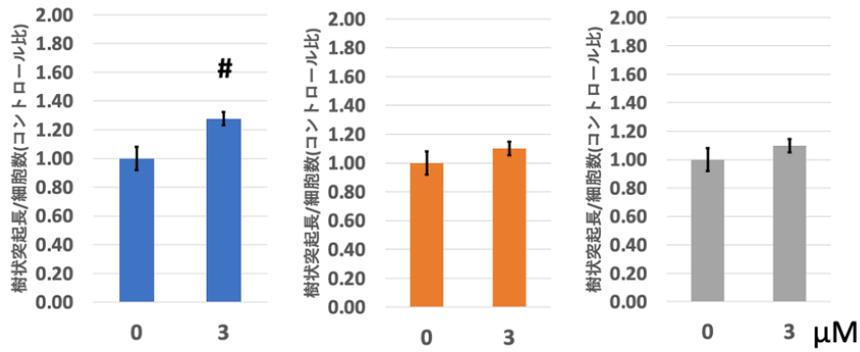


図6. CP55940 を0, 3, 10 μ M 投与した場合の生細胞数の変化
 10 μ M CP55940 投与群では EXP_D7 において平均値 55%, EXP_D14 において平均値 67%まで神経細胞数が減少した。一方, EXP_D21 は平均値 91%と有意な差はなかった。
 Control 群 vs 10 μ M 群 #: $p < 0.05$
 (Dunnett' s multiple comparison test)

樹状突起長



ドレブリンクラスタ数

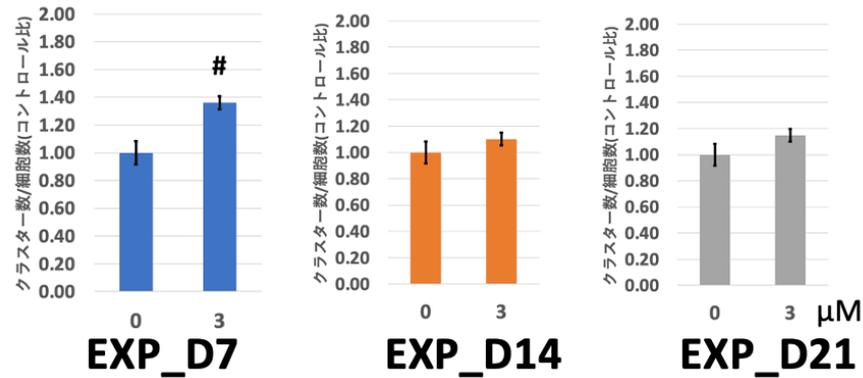
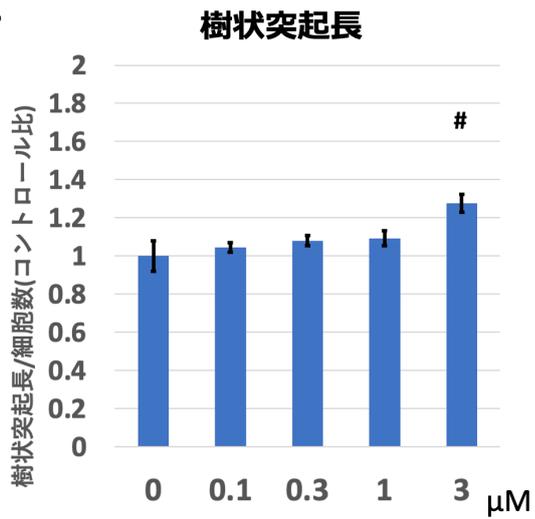


図7. CP55940 を 3 μM 投与した場合の 1 細胞当たりの樹状突起長 (上段)とドレブリンクラスタ数 (下段)

EXP_D7 の場合、樹状突起長は平均値 125%、ドレブリンクラスタ数は平均値 133%と増加が見られた。一方、EXP_D14 および EXP_D21 では、有意な差が見られなかった。

Control 群 vs 3 μM 群 #: $p < 0.05$
(Dunnett' s multiple comparison test)

A.



B.

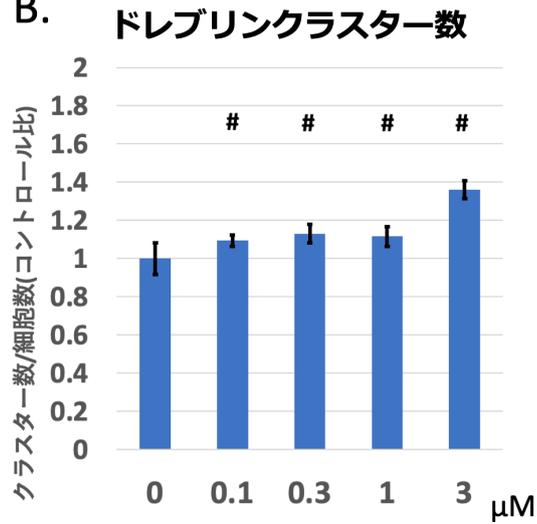


図 8. シナプス発達前期 (EXP_D7) における濃度依存的変化

A: 樹状突起長は、3 μM 投与の時に有意に増加した。

B: ドレブリンクラスタ数は、3 μM 以下の全ての濃度で増加していることが判明した。

Control 群 vs 各投与群 #: $p < 0.05$

(Dunnett' s multiple comparison test)