

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（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究協力者： 筒井泉雄（東京大学大学院農学生命科学研究科）

間瀬省吾、小金澤紀子（群馬大学大学院医学系研究科）

研究要旨

大麻や合成カンナビノイド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ことが知られており、乱用防止は社会的に取り組むべき課題である。そして違法薬物乱用防止の啓蒙活動において、大麻がなぜ若年者の心身の発達に有害であるかを科学的に示すことは極めて重要である。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* アッセイ法により、合成カンナビノイド（CP55940）が神経ネットワーク形成に与える影響を神経細胞の生存率、樹状突起長、樹状突起スパイン数により定量解析した。神経細胞の樹状突起は抗 MAP2 抗体、樹状突起スパインは抗ドレブリン抗体を使い免疫細胞染色法により可視化して共焦点イメージサイトメータにより撮像し、画像処理を自動化するアルゴリズムを用いて解析した。本年度は、SKY ニューロンの培養 7 日目から 2 週間投与（EXP_D7_2w）、および培養 14 日目から 1 週間投与（EXP_D14_1w）での実験結果を追加して解析した。また化合物の投与期間を変える実験ならびに神経細胞死に関与するカンナビノイド受容体を同定するための実験等も行った。EXP_D7_2w では平均 59.9%（n=10）、EXP_D14_1w では平均 73.1%（n=5）まで神経細胞数が減少した。培養 21 日目から 1 週間の投与（EXP_D21_1w）での神経細胞数は平均 90.8%（n=3）であり細胞死は検出されなかった。CP55940 はシナプス形成期に特有の神経細胞死を誘発することが分かった。次に、EXP_D7_2w において 10 μ M CP55940 に加えて、CB1 受容体阻害剤（AM281）を投与したところ神経細胞死を阻害せず細胞死を増強した。大麻を青年期から長期にわたって使用していると脳の一部分が委縮するとの報告があり、発達期特異的な神経細胞死が示唆されていた。本研究により、萎縮の原因はシナプス形成期特異的な神経細胞死であることが明らかとなった。また本研究課題において、神経細胞死がカンナビノイド受容体以外の経路で誘発された可能性をも示唆しており、今後は合成カンナビノイド使用者の中毒症状を緩和する治療手段の開発が重要な課題となる。

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、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

ラット海馬神経細胞の初代培養

文献5に従って、ラット胎仔由来海馬凍結神経細胞 (SKY ニューロン; AlzMed, Tokyo) を解凍し PLL コートした 96 ウェルプレート (Zeon 社 非売品) に細胞数 1 万個/ウェルになるように播種し, 5% CO₂, 37 °C にて培養を開始する。

化合物投与実験

CP55940 (0.1 ~ 10 mM) を, シナプス形成前期にあたる培養 7 日目から 21 日目まで 2 週間曝露する実験 (EXP_D7_2w), シナプス形成後期にあたる培養 14 日目から 21 日目まで 1 週間曝露する実験 (EXP_D14_1w), 21 日目から 28 日目まで 1 週間曝露する実験 (EXP_D21_1w) を, 昨年度に引き続き行った (図 3)。

シナプス形成期特有の 10 mM CP55940 による細胞死の受容体メカニズムを明らかにするため, 上記の EXP_D7_2w 実験において 10 mM CP55940 と同時に CB1 受容体阻害薬 AM281 (3 mM) を投与した。

3 mM CP55940 は EXP_D7_2w でのみ MAP2 陽性の神経突起長とドレブリン陽性のクラスター数を増加した。本年度は, 検出されたドレブリンクラスターの輝度分布の解析を行った。

本年度はその他に, CB2 受容体阻害薬 (SR144528) の 10 mM CP55940 との同時投与実験, さらに 10 mM CP55940 の投与期間を変える実験として, 14 日目で 3 時間投与, 14 日目から 2 週間投与, 21 日目で 3 時間, 24 時間, 3 日間などを行い, 論文作成準備を開始した。

免疫細胞染色

免疫細胞染色は, ドレブリンの染色に抗ドレブリン抗体 (mouse monoclonal, M2F6, ハイブリドーマ培養上清), 樹状突起の軸を成す微小管結合タンパク質である MAP2 の染色に抗 MAP2 抗体 (rabbit polyclonal, 1:2000) を用いて, 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) で可視化した。核を染色するために, 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, CQ1, Yokogawa, Kanazawa, Japan) の自動フォーカス機能 (20×lens, numerical aperture 0.45) を使っ

て自動的に撮像した後, 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用いて行った。アルゴリズムの開発は日本化学工業協会 LRI 委託研究課題 (第 8~10 期) で開発したものをベースとして一部改良を行った。また本研究でのデータ取得の一部は日本化学工業協会 LRI 委託研究課題の研究費の支援により行われた。

C. 研究結果

昨年度の予備的データに, 10 mM CP55940 の投与実験の解析結果を追加した。EXP_D7_2w では平均 59.9% (n=10), EXP_D14_1w では平均 73.1% (n=5) まで神経細胞数が減少した。培養 21 日目から 1 週間の投与 (EXP_D21_1w) での神経細胞数は平均 90.8% (n=3) であり細胞死は検出されなかった。シナプス形成期の神経細胞は, 慢性的な 10 mM CP55940 曝露に対して脆弱であることが分かった。

10 mM CP55940 の EXP_D7_2w で見られる神経細胞死に対して CB1 受容体阻害薬 AM281 は神経細胞死を抑制せず, 3 例中 2 例ではむしろ神経細胞死が増強した (図 4)。

EXP_D7_2w の 3 mM CP55940 長期曝露では MAP2 陽性の樹状突起長が約 25% 伸びて, ドレブリンクラスター数は約 33% 増加することを昨年報告した。本年度は, 樹状突起スパインへのドレブリン集積の詳細をドレブリンクラスターの輝度分布を解析した。その結果, ドレブリンクラスターの輝度分布が対照と比して明るい方にシフトしていた (data not shown)。今後定量的な解析法を開発して統計学的検定を行う。

EXP_D7_2w の 10 mM CP55940 長期曝露において残存した神経細胞の樹状突起のドレブリンクラスター集積を定性的に観察した典型的な画像例を図 5 に示した。図 5A は培養 21 日目の代表的なニューロンで, 図 5B は EXP_D7_2w で 10 mM CP55940 に曝露されて残存した神経細胞の 1 例である。図 5C と D は A, B に示した例について MAP2 陽性の神経突起の骨格をトレースしたものである。図 5E と F は A, B に示した例についてドレブリン陽性の樹状突起スパインをマークしたものである。細胞体周辺部に矢印で示したような異常なドレブリン集積が観察されていた。また矢頭で示したように樹状突起にも異常なドレブリン集積のある通常よりも大きな樹状突起スパインが認められた。

D. 考 察

EXP_D7_2w において, 3 mM 以下の CP55940 の長期

暴露では樹状突起スパインへのドレブリン集積のみが観察されていたが、10 mM CP55940の暴露で神経細胞死が観察された。3 mM CP55940で樹状突起スパインにドレブリンが集積していたという結果を踏まえると、ドレブリンが集積した樹状突起スパインにはPSD95の過剰な集積⁶⁾が予想されることから、グルタミン酸受容体が集積している可能性がある。そのために興奮性シナプス機能異常を引き起こした結果、神経細胞死が誘発されたと考えられる。

EXP_D7_2wの10 mM CP55940による神経細胞死がCB1受容体阻害薬により抑制されなかったことは、細胞死がCB1受容体を介していないことを示唆している。DheinのReview¹⁾によると、慢性的なカンナビノイド使用で血清中の成長因子のレベルが低下するという報告が複数ある。

BDNFやNGFは神経活動依存的に神経細胞から放出される栄養因子であることから、培養神経細胞においても内因性で作用をしていると考えられる。これらの因子が不足することによる細胞死の可能性もある。

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。培養神経細胞がネットワーク形成を開始するころから合成カンナビノイドに神経細胞が暴露されると、時期特異的な神経細胞死が観察される。このことは若年期から大麻を使用した成人の脳の一部で灰白質の委縮が見られたという報告を説明する実験的根拠を示したことになる。本研究課題は、若年者からの常習的な大麻使用が脳の正常な発達を妨げるメカニズムが発達期特異的にみられる神経細胞死であるということを科学的に示した重要な研究である。

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 2 号 193-204 (2020).
2. Dhein, S “Different Effects of Cannabis Abuse on Adolescent and Adult Brain”, Pharmacology 105; 609-617 (2020)
3. 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 2 号, 205-214 (2020) Symposium Review
4. 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

5. Koganezawa N, Roppongi RT, Sekino Y, Tsutsui I, Higa A, Shirao T. “Easy and Reproducible Low-Density Primary Culture using Frozen Stock of Embryonic Hippocampal Neurons” J Vis Exp. Jan 27 (191), 2023
6. Mizui T, Takahashi H, Sekino Y, Shirao T. “Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions” Mol Cell Neurosci. 30(1):149-57. 2005

G. 研究発表

論文発表

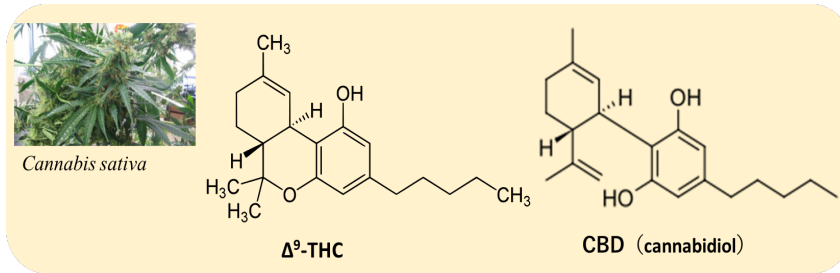
1. Koganezawa N, Roppongi RT, Sekino Y, Tsutsui I, Higa A, Shirao T. “Easy and Reproducible Low-Density Primary Culture using Frozen Stock of Embryonic Hippocampal Neurons” J Vis Exp. Jan 27 (191), 2023

学会発表

1. 関野祐子, 薬物依存の神経化学と薬物乱用防止対策 第 69 回北海道薬学大会, 2022 年 5 月, シンポジウム発表, 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, 川辺浩志, 白尾智明, 関野祐子, ラット海馬培養ニューロンのドレブリン染色画像を用いた発達神経毒性の定量解析, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 札幌コンベンションセンター, 2022 年 6 月, 札幌
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, 川辺浩志, 白尾智明, 関野祐子, ラット海馬培養細胞のドレブリン染色画像を使ったハイコンテンツ分析法, 第 96 回日本薬理学会年会, 2022 年 11 月, 横浜
4. Shogo Mase, “Quantitative analysis for drebrin clusters along dendrites using immunocytochemical images of cultured rat hippocampal neurons” The 12th International Society of Radiation Neurobiology Conference, March 2023, Nigata
5. 関野祐子, カンナビノイドの神経毒性と大麻の規制, 日本生理学会第 100 回記念大会, 2023 年

3月，京都

H. 知的所有権の取得状況
なし



合成カンナビノイド CP55940

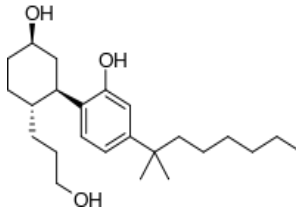


図 1. Cannabinoid と CP55940 の化学構造

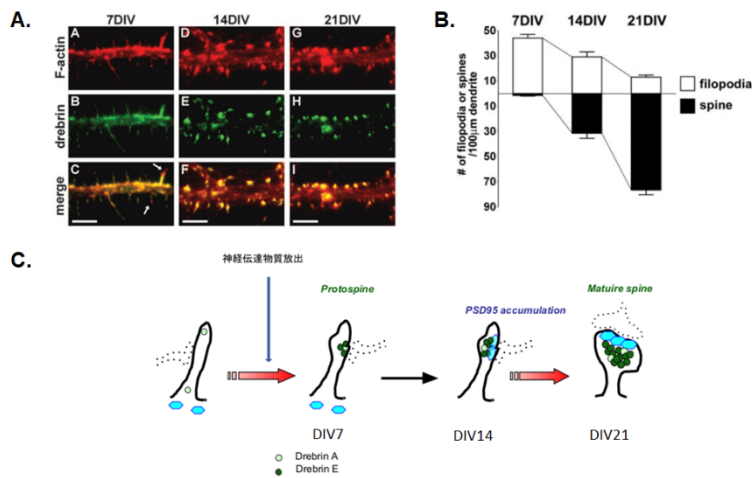


図 2. ラット胎仔由来海馬神経細胞の培養で観察される神経回路形成における樹状突起スパイン形成過程：フィロポディアからスパインへの形態変化

- A. 樹状突起スパイン形成過程におけるアクチンとドレブリンの分布の変化：培養 7 日のフィロポディアの先端はアクチンリッチでありドレブリンとの共存は少ない。
- B. フィロポディアからスパインへの形態変化の培養後の変化：培養 14 日ではフィロポディアとスパインは半々の割合となる。
- C. フィロポディア（左端）からスパイン（右端）への形態変化におけるドレブリン（緑）と PSD95（水色）の分布変化の模式図。培養 7 日はシナプス前部とのコンタクトサイトにドレブリンがアクチンとともに集積し始めて、徐々に成熟型スパインとなる。
- A, B は文献 4 から引用, C は群馬大学白尾研ホームページより引用

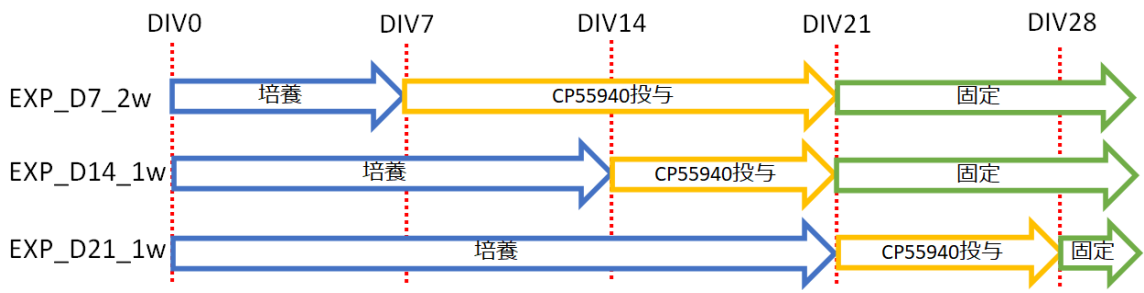
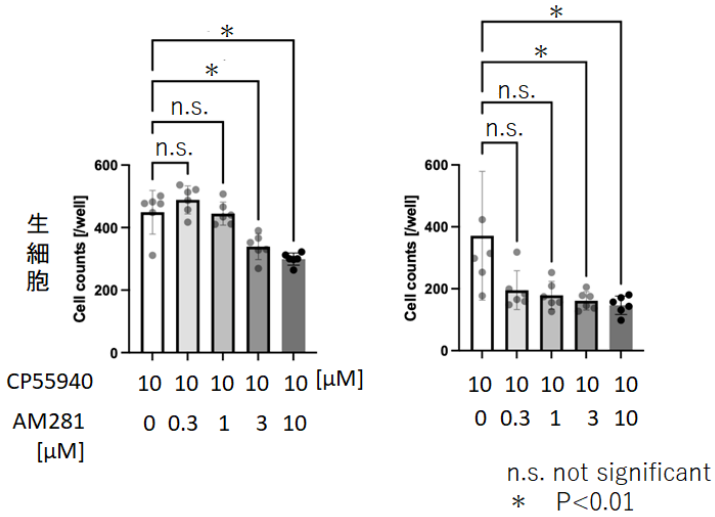


図 3. CP55940 投与のタイミングと培養細胞の固定のタイミング
 EXP_D7_2w : シナプス形成前期 (培養 7~21 日) に曝露する実験のタイムコース
 EXP_D14_1w : シナプス形成後期 (培養 14~21 日) に曝露する実験のタイムコース
 EXP_D21_1w : シナプス成熟期 (培養 21~28 日) に曝露する実験のタイムコース

図 4. CB1 受容体阻害薬 AM281 の 10 mM CP55940 による神経細胞死への影響



EXP_D7_2w の実験結果の 2 例を示した。3 mM と 10 mM の AM281 は、10 mM CP55940 による神経細胞死を阻害せず 増強した。この神経細胞死には CB1 受容体以外のカスケードが関与する可能性がある。

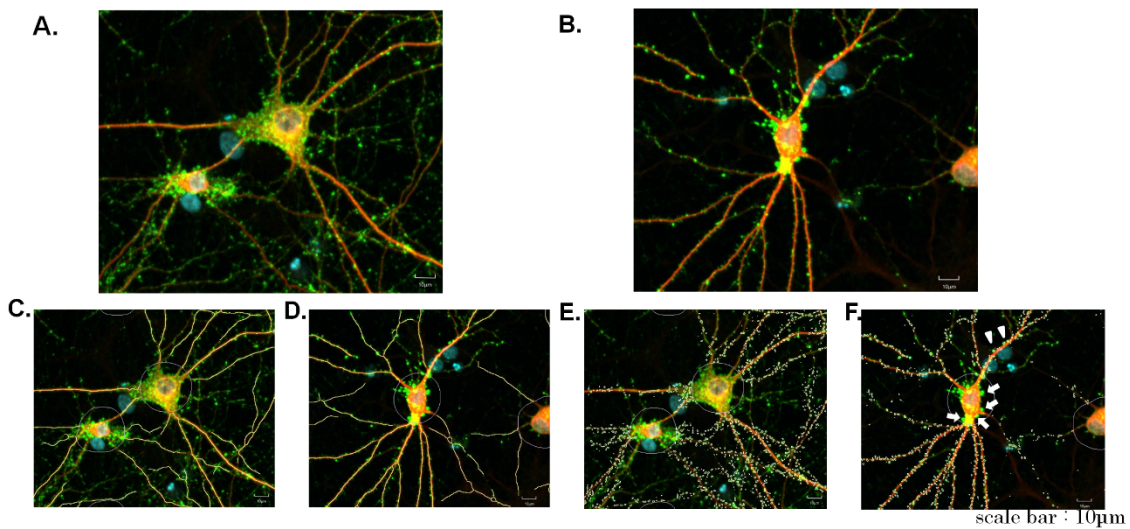


図5. シナプス発達前期（培養7日目から2週間）10 mM CP55940に曝露した場合神経細胞の形態変化

- A. 培養21日目の溶媒対照群の神経細胞
 - B. EXP_D7_2wで10 mM CP55940に曝露されて残存した神経細胞
 - C. Aに示した神経細胞のMAP2陽性神経突起の画像処理による骨格トレース
 - D. Bに示した神経細胞のMAP2陽性神経突起の画像処理による骨格トレース
 - E. Aに示した神経細胞のドレブリン陽性樹状突起スパインの画像処理によるトレース
 - F. Bに示した神経細胞のドレブリン陽性樹状突起スパインの画像処理によるトレース
- EとFを比較すると細胞体周辺部の異常なドレブリン集積（矢印）と、樹状突起上にもドレブリンが異常に集積したスパイン（矢頭）が観察されていることがわかる。