

メタボロミクスを基盤とした乱用薬物の生体影響及びその機構に関する研究

李, 任時

<https://hdl.handle.net/2324/1931847>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

メタボロミクスを基盤とした乱用薬物の生体影響及びその機構に関する研究

分子衛生薬学分野

3PS15009M

李任時

【序論】

世界的乱用薬物であるヘロイン等は、日本では麻薬として厳しく規制されている。更に、大麻やその主要成分である Δ^9 -THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) は大麻取締法で規制される一方、合成カンナビノイドの多くが麻薬として規制されている^[1]。これらの薬物は生体に対し多岐に渡る毒性、例えば、依存性や記憶障害などを惹起することが知られている^[2,3]。乱用の歴史の古いものは、詳細に作用機構が解析されているものもあるが、合成カンナビノイドの毒性発現機構には、未解明な点が多い。

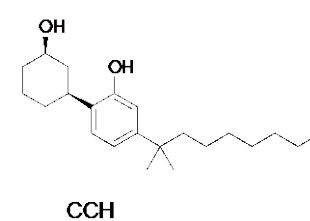
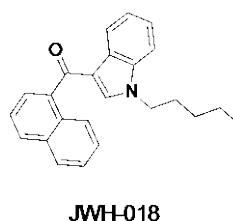
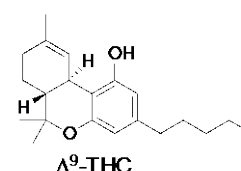
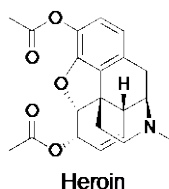


Fig. 1. Structures of abused drugs used in this study.

合成カンナビノイドは、 Δ^9 -THC の化学構造や作用を模して合成された化合物である^[4]。合成カンナビノイドを混在させたいわゆる“脱法ハーブ”の乱用が大きな社会問題になっている。乱用薬物として、ヘロインや Δ^9 -THC や合成カンナビノイドなどでは、各々の受容体の活性化を通しての作用が示唆されている。薬物によって遺伝子発現変動のパターンは大きく異なり、これらが複合的に毒性に寄与すると考えられる^[5]。しかし、多くの変動遺伝子の中から全ての毒性を規定する因子を同定し、最終的に毒性を惹起するメカニズムを明らかにすることは困難を極めているのが現状である。生体機能維持に必須の低分子化合物の合成や代謝および排泄等に影響を与えた結果から、乱用薬物の毒性発現機構を想定できる。このような背景のもと、薬物作用の統合的理解のために低分子化合物変動の網羅的解析であるメタボローム解析が行われるようになってきている^[6]。

そこで、本研究では、危険薬物の乱用指標となるバイオマーカーの同定と、その毒性発現機構の解明を目指して研究を行った。まず、UPLC-TOF/MS を用いてヘロインがマウス脳メタボロームに及ぼす影響を網羅的に解析した。また、メタボローム解析を用いて、カンナビノイド Δ^9 -THC および合成カンナビノイド CCH (cannabicyclohexanol) と JWH-018 (1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole) の生体影響を比較し、ヘロインとの相違を考察した。そこで示唆された合成カンナビノイドによる脳の内因性カンナビノイドの増加に着目し、その機構および学習・記憶を含む障害性との関連を検証した。

【方法】

動物実験は、九州大学動物実験委員会の承認を得て行った。C57BL/6J 雄性マウス (7 週齢) を用い、

採取した組織は CH₃OH/CH₃CN/H₂O (2:2:1, v/v) で抽出して^[7]、Waters 社製 UPLC-TOF/MS (ACQUITY UPLC system- ESI 検出器を装着した LCT Premier™ Mass Spectrometer, カラム: ACQUITY UPLC BEH-C18 column) を用いてメタボローム解析を行った。得られた結果は、主成分分析および直交型部分最小二乗法を用いて変動成分を解析した。変動した成分をデータベース解析に付して推定し、機構を考察した。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。

JWH-018 による内因性カンナビノイド AEA (anandamide) および 2-AG (2-arachidonoylglycerol) の増加について、それぞれ AEA-d₄ および 2-AG-d₈ を標品として定量を行った。また、AEA および 2-AG の合成および分解に関与する酵素の遺伝子発現変動を RT-PCR 解析した。次に、内因性カンナビノイドの増加がマウスの学習記憶能力などの行動および神経系に及ぼす影響を検討した。

【結果】

ヘロイン、大麻由来成分の Δ⁹-THC および合成カンナビノイド JWH-018、CCH 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、ヘロイン慢性投与マウス脳のメタボローム解析の結果

を OPLS-DA plot と、それに基づく直交型部分最小二乗法によって得られた両群間の S-plot として示す (Fig. 2A, B)。明確なメタボロームの変動があることが示唆され、さらに有意な変動因子を抽出し、データベース解析によって変動化合物の推定を行った。その結果、アミノ酸、TCA サイクルの成分、神経伝達物質、ヌクレオチドなど生理活性物質の変動が見出された。その一例として、チロシンが低下

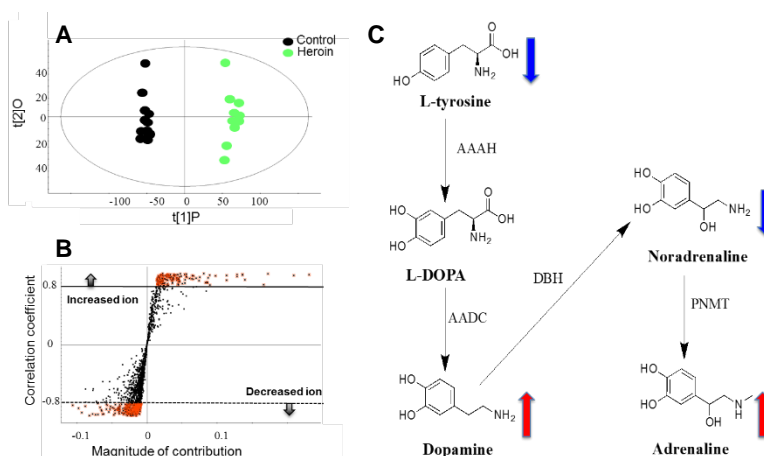


Fig. 2. Metabolomic profiling of the heroin-treated group using the UPLC-TOF/MS system. A and B represent the OPLS and S-plot mode of the control vs heroin group. C, the effect of heroin on the biosynthesis pathway of catecholamine.

する一方で、その代謝経路にある神経伝達物質、ドーパミン、アドレナリンは増加し、ノルアドレナリンは低下したことがわかった (Fig. 2C)。ま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^[8]、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。また、脳の N-アセチルアスパラギン酸はヘロインでは増加したが、Δ⁹-THC と JWH-018、CCH では何れも低下したことから、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。

一方、本研究では、Δ⁹-THC、CCH 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の脳機能における役割の一つとして、学習・記憶能力の低下作用が報告されている^[9]。本研究では、内因性カンナビノイドの増加に着目し、JWH-018 により引

き起される生体応答のメカニズム理解のために、内因性カンナビノイド AEA および 2-AG レベルを、各々の重水素標識化合物を用いて、定量を行った。AEA および 2-AG の増加が確認され、メタボローム解析を支持する結果が得られた (Fig. 3)。続いて、CB1 アンタゴニスト AM251 の併用効果を調べた。AM251 の併用により AEA および 2-AG のレベルは正常レベルに近づいた。これらの結果から、JWH-018 がマウス脳の海馬において cannabinoid 1 受容体 (CB1) 依存的に内因性カンナビノイドレベルを上昇させることが示唆された。次に、JWH-018 による内因性カンナビノイドの増加機構を解明するため、内因性カンナビノイドの合成・代謝酵素の発現変動を解析した。その結果、JWH-018 により、CB1 依存的に内因性カンナビノイド、AEA および 2-AG それぞれに対する加水分解酵素 FAAH (fatty acid amide hydrolase) および MAGL (monoacylglycerol lipase) の mRNA 発現レベルが低下することが明らかになった。

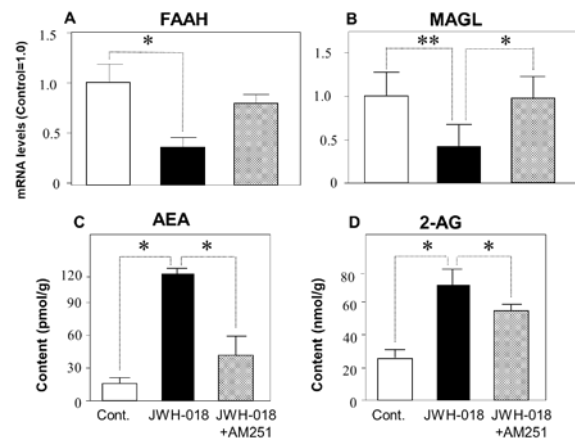


Fig. 3. Effect of JWH-018 and AM251 on the mRNA expression of degradation enzymes (FAAH, MAGL) for AEA and 2-AG (A, B), and the accumulation AEA and 2-AG in the hippocampus of male mice (C, D), respectively. (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)

また、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) は、神経細胞のシナプス機能亢進などの神経細胞の成長を調節する脳細胞の増加に働き、さらに、学習や記憶、情動、糖代謝などにおいても不可欠な神経系の特性タンパク質であるため [10]、本研究では、JWH-018 が BDNF レベルに及ぼす影響を調べた。mRNA レベル、タンパク質レベルいずれにおいても JWH-018 依存的に抑制され、AM251 により正常レベルに戻った (Fig. 4)。このように JWH-018 により BDNF が抑制されること、またこの抑制が CB1 依存的であることが明らかになった。このことから、BDNF の減少は、合成カンナビノイドによる記憶障害に関連すると考えられた。

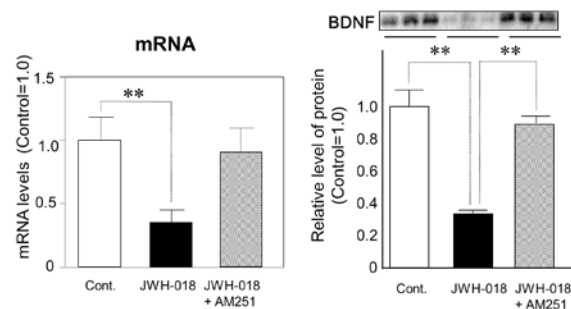


Fig. 4. Effect of administration of JWH-018 on the levels of BDNF mRNA and BDNF protein in hippocampus of male mice, respectively. (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)

【考察】

本研究では、メタボローム解析を基盤として、既存の乱用薬物ヘロインと近年乱用が問題になっている合成カンナビノイドのバイオマーカーの同定を試みた。ヘロインがマウス脳のメタボロームに及ぼす影響から、エネルギー代謝だけでなく、マウス脳内の神経伝達としてのカテコールアミン代謝にも影響を及ぼすことが示された。これらは、ヘロイン乱用者に引き起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と期待される。

また、合成カンナビノイドについては、本研究でバイオマーカー候補として浮上した内因性カンナビノイドの増加機構の解析を行った。メタボローム解析に基づくアプローチにより、合成カンナビノイド JWH-018 による学習記憶障害の発現機構が新たに示唆された。JWH-018 が CB1 依存的に内因性カンナビノイド (AEA, 2-AG) の加水分解酵素 (FAAH, MAGL) の減少を介して、内因性カンナビノイド (AEA, 2-AG) を蓄積させることが初めて示唆された。内因性カンナビノイドは、シナプス前部の CB1 を介して、神経伝達物質 (GABA, Glu) の分泌を抑制し、これによりシナプス伝達が低下し、シナプスの長期増強 (LTP, long-term potentiation) を抑制することが報告されていることから^[11]、JWH-018 による短期記憶障害への関与が推定される。また、JWH-018 により、MAPK の活性化が抑制されることも合わせて見出しており、これと BDNF 発現の低下を通じて、学習記憶障害に影響すると推定された。行動薬理的解析によって、短期記憶の障害が確認され、JWH-018 による内因性カンナビノイドの増加とその脳機能における役割について、新規知見を得ることが出来た。これらの結果から、JWH-018 が CB1 を介して内因性カンナビノイド 2-AG を増加させることが示された。また、この増加した 2-AG は、再び CB1 を介して学習・記憶能力の低下の惹起に関与する可能性が示唆された。

本研究で新たに明らかになったバイオマーカーが、乱用薬物の有害性を評価するシステムとして有効に活用されることが望まれる。また、JWH-018 による内因性カンナビノイドの増加と学習記憶障害の関連は、あくまでマウスにおける解析ではあるが、今後モデル動物やヒトでの研究がより進み、メカニズムの詳細が明らかになることが期待される。また、合成カンナビノイドの医薬品としての可能性と制約が明らかになり、多種存在する合成カンナビノイドの中から、より有用性が高いものが選択され、創薬ターゲットとして、新しく有害性がない合成カンナビノイドの発見に導かれることが期待される。

【発表論文および引用文献】

Ren-Shi Li, Tomoki Takeda, Takashi Ohshima, the late Hideyuki Yamada, Yuji Ishii. Metabolomic profiling of brain tissues of mice chronically exposed to heroin. *Drug Metab Pharmacokinet* **32**: 108-111 (2017).

[1] World Health Organization *Lexicon of alcohol and drug term* **47**: 25-26 (1994).

[2] Carlini *et al.*, *Br J Pharmacol* **50**: 299-309 (1974).

[3] Mangione *et al.*, *J Gen Intern Med* **23**: 1336-1338 (2008).

[4] Auwärter *et al.*, *J Mass Spectrom* **44**: 832-837 (2009).

[5] Snyder *et al.*, *Mutat Res* **488**: 151-169 (2001).

[6] Goodacre *et al.*, *Trends Biotechnol* **22**: 245-252 (2004).

[7] Ivanisevic *et al.*, *Chem Biol* **21**: 1575-1584 (2014).

[8] Zheng *et al.*, *Drug Alcohol Depend* **127**: 177-186 (2013).

[9] Sugaya *et al.*, *J Neurosci* **33**: 3588-3601 (2013).

[10] Thoenen, *Science* **270**: 593-598 (1995).

[11] Marsicano *et al.*, *Curr Top Behav Neurosci* **1**: 201-230 (2009).