

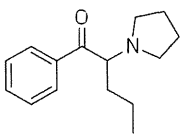
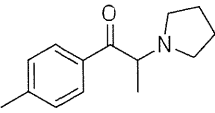
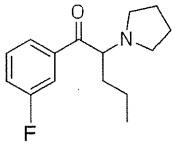
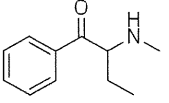
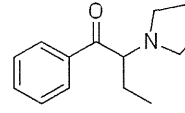
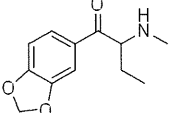
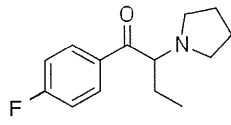
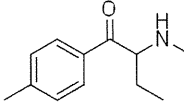
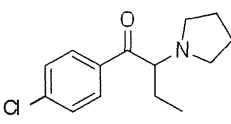
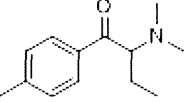
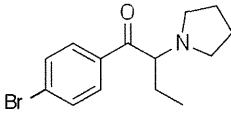
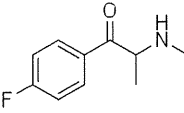
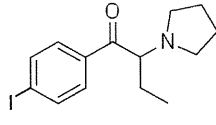
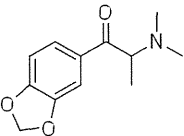
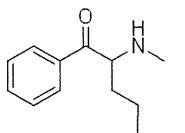
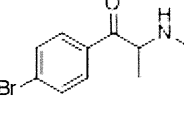
PVP(4)		4Me-PPP(4)	
3F-PVP(4)		Buphedrone(4)	
PBP(4)		Butylone(4)	
4F-PBP(4)		4Me-buphedrone(4)	
4Cl-PBP(4)		4MeMebup(4)	
4Br-PBP(4)		4-FMC(4)	
4I-PBP(4)		bk-MDDMA(4)	
Pentredone(4)		4-BMC(4)	

Fig. 1. Chemical structures of cathinones.

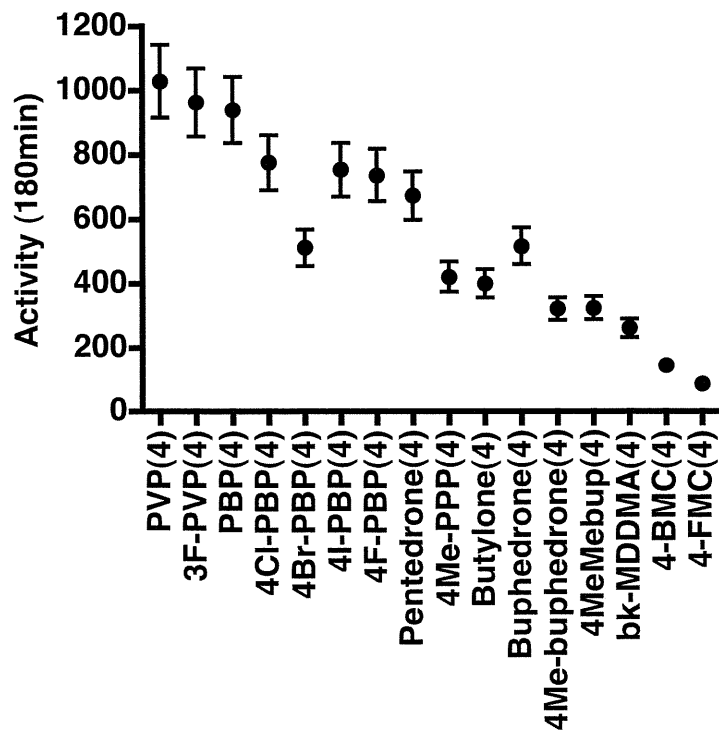


Fig. 2. Effect of acute treatment with cathinone on locomotor activity in mice. Total locomotor activity counts after acute administration of cathinone (4 mg/kg, i.p.) in mice. Each point represents the mean total locomotor activity counts with the S.E.M. of 10 animals at 180 min after drug treatment.

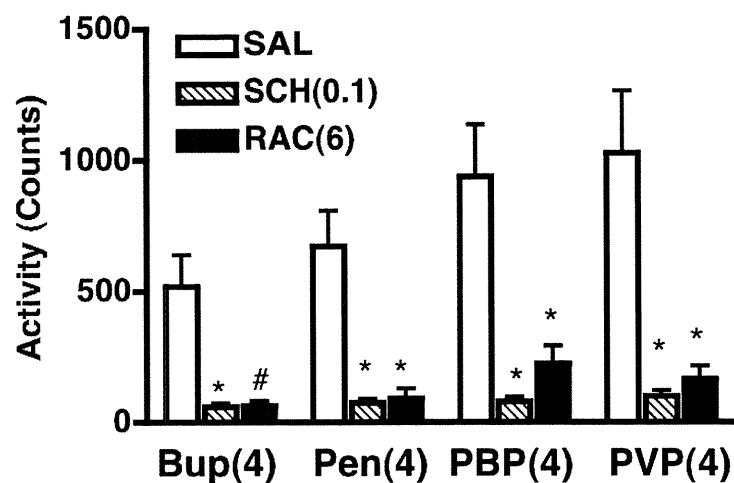


Fig. 3. Effect of pretreatment with dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 or dopamine D2 receptor antagonist raclopride on the cathinone-induced hyperlocomotion in mice. For the antagonist study, SCH23390 (SCH, 0.1 mg/kg, s.c.) or raclopride (RAC, 6 mg/kg, s.c.) was administered 30 min before treatment with cathinone (4 mg/kg). Each column represents the mean total locomotor activity counts with the S.E.M. of 10 animals at 180 min after drug treatment. #  $P < 0.05$ , \* $P < 0.01$  vs. saline (SAL)-pretreated cathinone group.

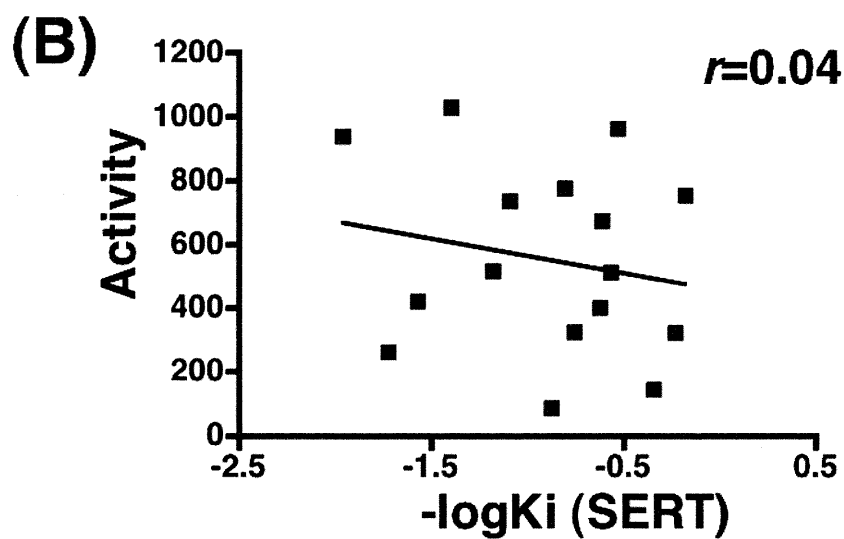
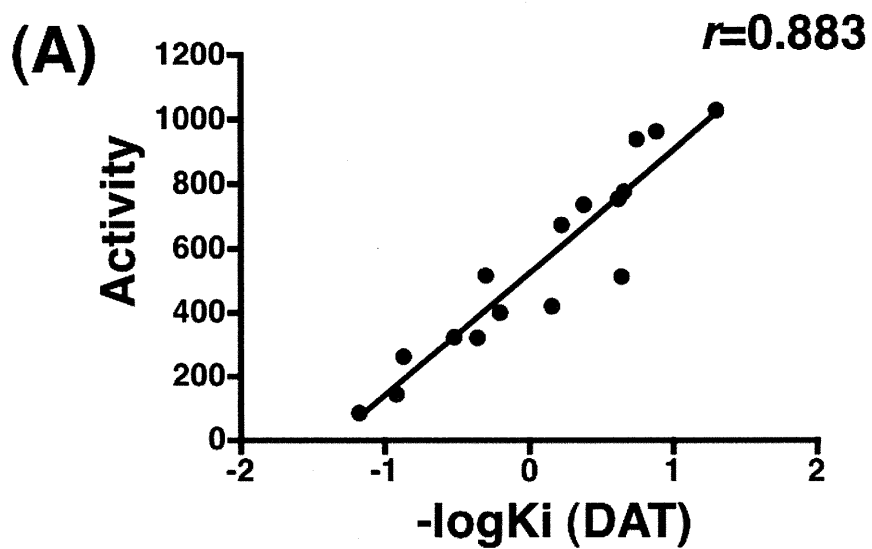


Fig. 4. Scatterplots and regression lines for the relationship between (A) dopamine transporter (DAT) and (B) serotonin transporter (SERT) binding affinities ( $\log K_i$ ) plotted against effect for *in vivo* tests (locomotor activity).

分担研究報告書

コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの有害性予測法に関する研究

分担研究者：栗原正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長）

【研究要旨】

カチノン系化合物の包括指定の範囲としては、実効性の高い範囲を指定するために、文献値及び QSAR（定量的構造活性相関）法による予測値を効果的に用いることでその範囲を検討した。カチノン系化合物において流通化合物を考慮し、活性に重要な 3 つの置換基 ( $R^1, R^2, R^3$ ) について、そのバリエーションにより考えられる 504 化合物について QSAR（定量的構造活性相関）法によって活性予測（ドパミン取り込み作用およびセロトニン取り込み作用の 50%抑制濃度=IC<sub>50</sub> 値の予測）を行った。

A. 研究目的

カチノン系化合物の包括指定範囲の検討を行うことを目的とした。

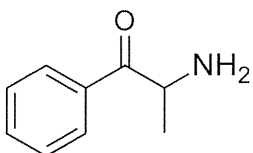


図 1：カチノン (Cathinone)

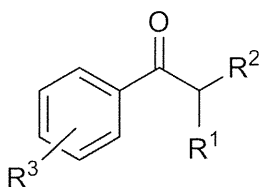


図 2：カチノン系化合物

B. 研究方法

カチノン系化合物（図 1、図 2）において流通化合物等を考慮し、活性に重要な 3 つの置換基 ( $R^1, R^2, R^3$ ) を決め、そのバリエーションにより考えられる 504 化合物(表 1)について QSAR 法によって活性予測を行った。QSAR 式は活性既知化合物より求めた。

表 1

$R^1$	methyl, ethyl, <i>n</i> -propyl	3 種
$R^2$	NH <sub>2</sub> , NHCH <sub>3</sub> , NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , N(CH <sub>3</sub> )(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ), N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> , pyrrolidinyl	7 種
$R^3$	H, 2-methyl, 3-methyl, 4-methyl, 2-ethyl, 3-ethyl, 4-ethyl, 2-OCH <sub>3</sub> , 3-OCH <sub>3</sub> , 4-OCH <sub>3</sub> , 3,4-methylenedioxy, 2,3-methylenedioxy, 2-F, 3-F, 4-F, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I	24 種
3 x 7 x 24 = 504 化合物		

## C. 研究結果

### (1) 既知の活性値

参考文献 1-3 より、ドパミン取り込み作用に対する 50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub> 値) 28 化合物およびセロトニン取り込み作用に対する 50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub> 値) 18 化合物を使用した (表 2, 表 3)。

### (2) QSAR の方法と解析結果

QSAR 解析には、化学計算パッケージ MOE を用いた。用いた記述子は AutoQuaSAR プログラムにより MOE に搭載されている全て 2D 記述子から選択されたものである (図 3、図 4)。この QSAR 式を利用して、指定範囲のカチノン系化合物におけるドパミン取り込み阻害作用 QSAR 値およびセロトニン取り込み阻害作用 QSAR 値を算出した。

## D. 考察

今回、カチノン系化合物の包括指定の範囲としては、実効性の高い範囲を指定するために、カチノン系化合物において流通化合物を考慮し、活性に重要な 3 つの置換基 (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>) に限定し包括範囲を決定した。

## E. 結論

ここで解析したカチノン系化合物 504 個全てを包括指定した。

## F. 参考文献

- 1) Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME; Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro; *Br J Pharmacol.* 2013, 168, 458-470.
- 2) Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR.; Differential effects of psychostimulants and related agents on

dopaminergic and serotonergic transporter function.; *Eur J Pharmacol.* 1999, 382, 45-49.

- 3) Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK.; 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors.; *J Med Chem.* 2006, 49, 1420-32.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 栗原正明：コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの活性予測  
*YAKUGAKU ZASSHI*, 133, 13-16 (2013)
- 2) Y. Demizu, S. Nagoya, M. Shirakawa, M. Kawamura, N. Yamagata, Y. Sato, M. Doi, M. Kurihara: Development of stapled short helical peptides capable of inhibiting vitamin D receptor (VDR)-coactivator interactions  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 4292-4296 (2013)
- 3) N. Sakakibara, T. Hamasaki, M. Baba, Y. Demizu, M. Kurihara, K. Irie, M. Iwai, E. Asada, Y. Kato, T. Maruyama; Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl) uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents  
*Bioorg. Med. Chem.*, 21, 5900-5906 (2013)
- 4) Okuhira, K.; Demizu, Y.; Hattori, T.; Ohoka, N.; Shibata, N.; Nishimaki-Mogami, T.; Okuda, H.; Kurihara, M.; Naito, M.; Development of small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrosis in breast cancer cells  
*Cancer Science*, 104, 1492-1498 (2013)
- 5) T. Shoda, K. Okuhira, M. Kato, Y. Demizu, H. Inoue, M. Naito, M. Kurihara: Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 87-89 (2014)

## 2. 学会発表

- 1) 栗原 正明: コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの活性予測  
日本薬学会第 132 年会 (2012/03/29-31, 札幌)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

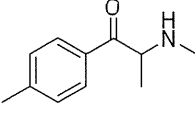
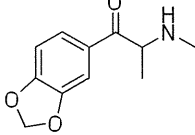
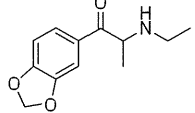
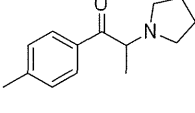
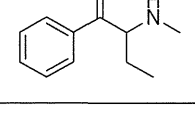
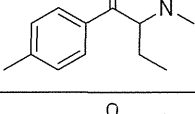
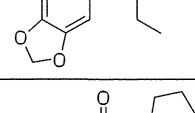
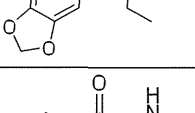
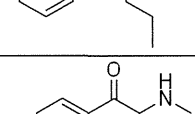
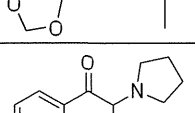
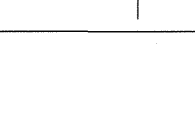
特許取得、実用新案登録、その他  
特になし。

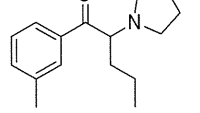
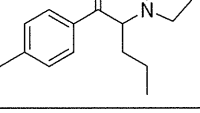
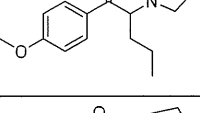
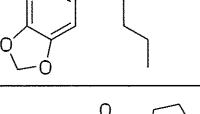
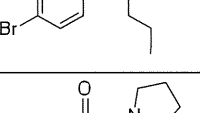
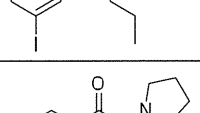
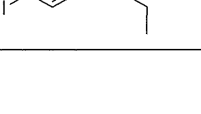
表 2 : ドパミン取り込み阻害活性が既知の化合物とその活性(IC<sub>50</sub> 値,  $\mu$  M)

	カチノン系化合物	DAT ( $\mu$ M)
1		14
2		1.12
3		3.31
4		4.82
5		6.35
6		11.7
7		5.68
8		4.04
9		2.40
10		2.70
11		6.92
12		2.90
13		1.21
14		6.36
15		0.138
16		0.110
17		1.27
18		0.874
19		0.052
20		0.063
21		0.063
22		0.035
23		0.283
24		0.031
25		0.185
26		0.040
27		0.052
28		0.032



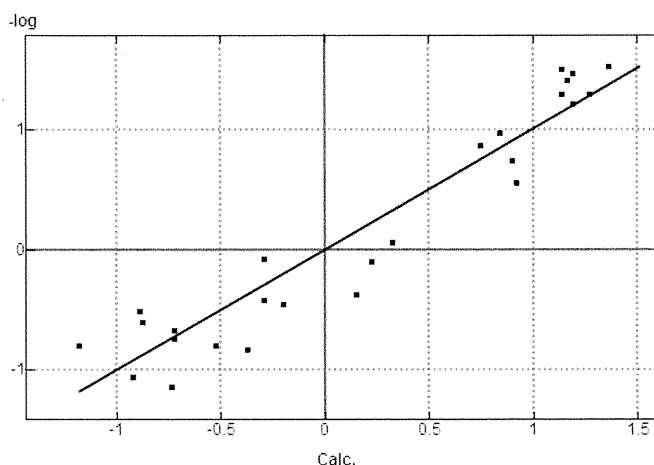
表 3 : セロトニン取り込み阻害活性が既知の化合物とその活性(IC<sub>50</sub> 値, μM)

	カチノン系化合物	SERT (μM)
1		4.64
2		15.5
3		4.36
4		56
5		22
6		1.19
7		6.22
8		20
9		5.01
10		0.923
11		2.02

12		4.4
13		13
14		2.4
15		9.3
16		1
17		1
18		0.2

QSAR 解析には、化学計算パッケージ MOE を用いた。用いた記述子は AutoQuaSAR プログラムにより MOE に搭載されている全て 2D 記述子から選択されたものである。

### ドパミン取り込み阻害活性

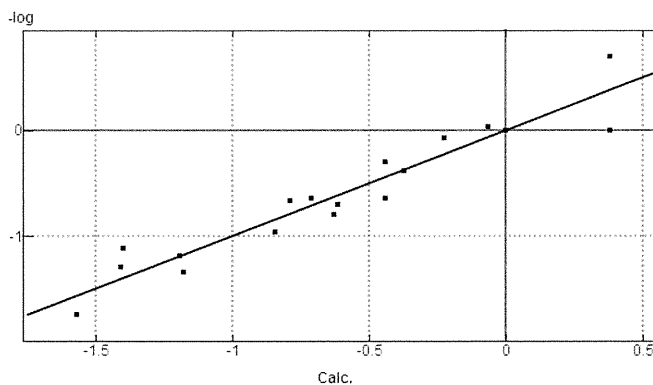


Model :	Const.	*	Desc.	
	- 0.913052			
	+ 0.029053	*	PEOE_VSA+3	Total positive 3 vdw surface area
	- 0.024522	*	SMR_VSA1	Bin 1 SMR (0.110,0.260]
	- 0.002292	*	SMR_VSA7	Bin 7 SMR (0.560,10]
	+ 0.027594	*	SlogP_VSA8	Bin 8 SlogP ( 0.30, 0.40]

$$R^2=0.890778, XR^2=0.832069$$

図 3 : QSAR 式

### セロトニン取り込み阻害活性



Model :	Const.	*	Desc.	
	- 4.648889			
	+ 0.049465	*	PEOE_VSA+1	Total positive 1 vdw surface area
	+ 0.061649	*	PEOE_VSA+2	Total positive 2 vdw surface area
	- 0.037344	*	SMR_VSA6	Bin 6 SMR (0.405,0.560]
	+ 0.029851	*	SlogP_VSA8	Bin 8 SlogP ( 0.30, 0.40]
	+ 0.054979	*	SlogP_VSA9	Bin 9 SlogP ( 0.40,10]

$$R^2=0.912814, XR^2=0.820789$$

図 4 : QSAR 式

分担研究報告書

## 培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築

分担研究者：富山健一（放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター）  
研究協力者：船田正彦（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

### 【研究要旨】

違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として、覚せい剤と類似構造を有するカチノン系誘導体の流通とその乱用が問題となっている。カチノン誘導体は、中枢興奮作用を有しており、その薬理機序は脳内神経伝達物質のドーパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンの遊離促進および再取り込みの阻害であると考えられる。流通の形態としては、ハーブ、リキッドそしてパウダーなど様々な形態で販売されている。現在これらの製品から未規制の薬物を検出には、検出方法等の問題から非常に時間がかかっている。そこで本研究では、流通している製品より簡便に未知の未規制薬物を検出するために、動物を用いた行動薬理学的試験や GS-MS のような高度な技術を必要とする検出系とは異なり、薬物の作用点であるドーパミントランスポーター(DAT)、ノルエピネフリントランスポーター(NET)そしてセロトニントランスポーター(SERT)を安定的に発現する細胞株を作成し、生物学的応答をもとに薬理効果から薬物の種類を推測可能なスクリーニングシステム構築を試みた。マルチクローニングサイトに DAT、NET そして SERT 遺伝子を挿入したベクターCMV6-Entry と Lipofectamine 2000 を用いて HEK-293 細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DAT および SERT タンパク質を発現する安定細胞株を得ることができた。今後は、この細胞を用いて各モノアミントランスポーター機能の確認を進め、ラジオアイソトープを使用しない簡便で正確なスクリーニングシステムの構築を行う。また、これらモノアミントランスポーター発現細胞株を用いることで、今まで初代培養による神経細胞を用いた細胞毒性試験もより短時間で評価可能になると考えられる。

### A. 研究目的

薬物乱用は若年層を中心に浸透しているのが現状であり、麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) の乱用などは、依然大きな社会問題である。一方で、近年の新たな傾向として麻薬等に規制されている薬物と類似の構造を持つ化合物をいわゆる脱法ドラッグとして乱用するケースが急増している。これは、すなわち違法薬物の乱用から法的に処罰を受けない未規制薬物の乱用へと流行がシフトしていることを現

している。また、脱法ドラッグ乱用の増加に伴い、意識障害、嘔吐、けいれん、呼吸困難などの健康被害が報告されている。こうした脱法ドラッグの取り締まりには包括規制を導入するなど様々な対策が行われている。しかしながら、脱法ドラッグは、ハーブ、リキッド、パウダーなど様々な形態で流通しており、これらの製品からの薬物検出には高価な分析機器と熟練のオペレーターが必須であり、また解析結果を得るまでに時間がかかるため、迅速な販売停止および取り締まりに位たるまでに時間を要している。そこで本研究では、

流通している脱法ドラッグより、迅速かつ簡便に薬物を検出可能なシステム構築として、培養細胞を用いたスクリーニングシステムの構築を試みた。カチノン系誘導体の薬理作用は、脳内の神経伝達物質であるドパミン、ノルエピネフリンやセロトニンの遊離促進やこれらを運搬するトランスポーターの働きを阻害するモノアミン再取り込み阻害作用を有している。本研究では、薬物検出スクリーニングシステムで用いる培養細胞として、メタンフェタミン、カチノン系誘導体の作用点であるドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニントランスポーターをそれぞれ安定発現させた細胞株の樹立を行う。

## B. 研究方法

### 1. HEK293 細胞への遺伝子導入

Human dopamine transporter (hDAT, NM\_001044; Gene Symbol: SLC6A3)、human 5-HT transporter (SERT, NM\_001045; Gene Symbol: SLC6A4)および human norepinephrine transporter (NET, NM\_005230; Gene Symbol: ELK3)タンパク質の安定発現細胞樹立を試みた。タンパク質発現のために CMV6-Entry (C-terminal Myc and DDK Tagged; ORIGENE, Rockville, MD)を使用した。本ベクターの特徴は、ORF の C 末端側に Myc タグおよび DDK タグがついており、tagged Protein(タグ融合タンパク質)発現に最適化されている(図 1)。CMV6-Entry の ORF 領域には DAT、SERT および NET の DNA プラスミドが組み込まれており、薬剤選別のためにネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている(図 2)。本プラスミドベクターを用いて HEK-293 細胞に遺伝子導入を行った。HEK-293 細胞は、10 cm ディッシュを用いて 10%FBS-DMEM (P/S は不含)中で  $5.0 \times 10^5$  数となるように調製し 24 時間培養した。遺伝子導入試薬は Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)を使用した。Opti-MEM I (Life Technologies, Inc., Rockville, MD)を 2 本のマイクロチューブに 250 $\mu$ L ずつ用意した。

1 本目のマイクロチューブでは、プラスミドベクター 4 ug : Opti-MEM I 250 uL の割合で混合した。もう一方のマイクロチューブには、Lipofectamine 2000 8 uL : Opti-MEM I 250 uL の割合で混合し 5 分間静置した。その後 2 つの溶液を混ぜて 3 秒ほどボルテックスで混和し、室温で 20 分間静置した。2.5 mL の 10%FBS-DMEM (P/S は不含)で培養している HEK-293 細胞に Lipofectamine 2000 とプラスミドベクターの混合物(500 uL)を加え、ディッシュをゆすって拡散させた。インキュベーター内で 24 時間 37°C・5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2. プラスミドベクター導入細胞の薬剤選択

プラスミドベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。そこで遺伝子導入が成功した細胞のみを失敗した細胞を選別するために薬剤選択培地を調製し、ネオマイシン耐性株のみが生き残るまで薬剤選択を行った。培養を開始する前に HEK-293 細胞のネオマイシンに対するキルカーブの検討を行った。ネオマイシンは、Geneticin® reagent (Life Technologies, Inc.)を用いた。Geneticin 濃度は、0.5 mL/500mL、1 mL/500mL、5 mL/500mL、8 mL/500mL、10 mL/500mL、20 mL/500mL の条件で HEK-293 を 7 日間培養し最適濃度を決定した。プラスミドベクターを導入した HEK-293 細胞は、最適な Geneticin 含有薬剤選択培地にて継続的に培養した。

### 3.モノアミントランスポーター発現のウエスタンブロット解析

薬剤選択培地にて培養 17 日目のトランスフェクション HEK-293 よりタンパク質を抽出し、10%ゲルを用いた SDS-PAGE を実行した。泳動後、ゲルをメンブレン Immobilon P (Millipore, Billerica, MA)に転写し、I-block® (Tropix, Bedford, MA, USA)を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体は、Anti-Dopamine Transporter (1:1000, Millipore, Bedford, MA; MAB369 )、Anti-Serotonin

Transporter (1:1000, Millipore, Bedford, MA; AB1594P)、anti-GAPDH (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)を用いて4°Cのオーバーナイトにて抗体反応を行った。メンブレンはTBS-Tweenで15分の洗浄を3回行った。二次抗体は、anti-rabbit IgG HRP、anti-rat IgG HRP、anti-mouse IgG HRP (GE Healthcare BioSciences, Piscataway, NJ)を1:5000濃度でTBS-Tweenに希釈し室温で60分間反応させた。その後、メンブレンはTBS-Tweenで15分の洗浄を3回行った。抗体検出は、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) および LAS-3000 (FUJIFILM, Japan)を用いて行った。

### C. 研究結果

#### 1. プラスミドベクター導入と薬剤選択

SLC6A3 (DAT)およびSLC6A4 (SERT)を導入したHEK-293は24時間後6割程度の細胞集団を確認した。一方で、ELK3 (NET)導入HEK-293はほとんど細胞が死滅していた。トランスフェクションを行ったHEK-293は、プラスミド含有培地を捨て、Geneticin® reagentを8 mL/500mLで含む10%FBS-DMEM+2mM L-Glutamineに培地を置き換え細胞の維持継代を行った。HEK-293細胞におけるGeneticin® reagentのキルカーブを調べた結果、Geneticin® reagentの濃度は、8-10 mL/500 mL濃度において4-7日の間でHEK-293をほぼ死滅させた。5 mL/500mL以下ではほとんど効果がみられず、逆に20 mL/500mLでは24時間で細胞が死に始めたため本実験では8 mL/500mLを薬剤選択濃度とした。継代は行わず3日おきに薬剤選択培地を交換しながら細胞の維持を行った結果、薬剤選別1週間で通常のHEK-293はほぼ死滅した。残念ながらELK3 (NET)導入HEK-293も細胞維持ができず死滅した。一方で、SLC6A3 (DAT)およびSLC6A4 (SERT)を導入したHEK-293は2週間経過した時点で継代を行えるほどコロニーが

得られた。継代を行い3日目の細胞の状態を図3に示す。

#### 2. DAT、NET および SERT の発現解析

薬剤選択で維持継代されている樹立安定株よりタンパク質を回収し、ウエスタンブロットイン法によってDAT、NETそしてSERTのタンパク質発現の確認を行った。その結果、DAT発現株において70~85 kDaの間でDATの発現が確認された。また、同様にSERT発現株において84~96 kDaの間でタンパク質の発現が確認された。本ウエスタンブロットインの結果から、遺伝子導入を行ったHEK-293は薬剤選択を経て、DATおよびSERTを安定発現する細胞株の樹立に成功したことを示している。

### D. 考察

違法ドラッグとして流通が確認されている覚せい剤(アンフェタミンおよびメタンフェタミン)類似化合物、カチノン系誘導体の作用点であるモノアミントランスポーターを安定発現する培養細胞株の樹立を試みた。本研究では、クローニングサイトにSLC6A3 (DAT)、ELK3 (NET)およびSLC6A4 (SERT)の遺伝子を導入したベクターCMV6-EntryとLipofectamine 2000を用いて、HEK-293細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DATおよびSERTを安定発現するHEK-293細胞株を得ることができた。今後は、各トランスポーターの機能評価を行うために、トリチウムラベルをしたドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンを用いて再取り込み阻害作用を検討し、トランスポーターの働きを確認する。その後機能が正常に働く細胞株の中からより均一な細胞集団を得るためのクローニングを行う予定である。本研究では、NET遺伝子導入で、HKE-293細胞が死滅してしまうため、安定株の樹立が難航している。今後ベクターおよび遺伝子導入方法に工夫を行い早急にNET発現細胞の樹立を目指す。最終的

にこれらの機能的モノアミンとランスポータを発現した細胞株を用いて、アイソトープを使わない簡便で安全かつ正確な薬物スクリーニングシステムを構築し、一般に流通している製品より薬物検出を試みる予定である。

## E. 結論

脱法ドラッグに含まれるカチノン誘導体は、非常に強力な中枢興奮作用および精神依存形成能を有している可能性が高く、その乱用は大変危険である。因果関係は明らかではないが、脱法ドラッグ使用中の死亡例や暴力事件も発生していることから、こうした違法性の高い薬物の迅速な取り締まりが求められる。流通規制のための法的整備は、包括規制による類縁化合物の一斉規制や麻薬指定の迅速化によって体制は整いつつある一方で、現場レベルでの製品からの薬物検出には一定の時間を必要とする現状は問題である。そのため誰もが利用可能で、正確かつ安定した簡便な薬物検出システムの構築は必須である。現在我々は、こうした問題を打開するための薬物スクリーニングシステムの構築および実用化を目指し、本研究でその足がかりとなる培養細胞の作成に成功した。さらにこの樹立安定細胞株は、カチノン誘導体の選択的作用点を有していることから、その細胞毒性の評価も可能であると考えられる。今後は、早期の実用化を目指した研究をすすめていくことになる。

また、我々は培養細胞とは別に動物を用いた行動評価および精神依存性を評価するシステムを構築している。したがって、培養細胞および動物を用いた薬理学的試験を組み合わせた一連の評価システムにより、国内で流通が確認されている違法ドラッグの検出、精神

依存性および神経毒性の検討を行い、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) K. Tomiyama, M. Funada : Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 274:17-23. 2013.

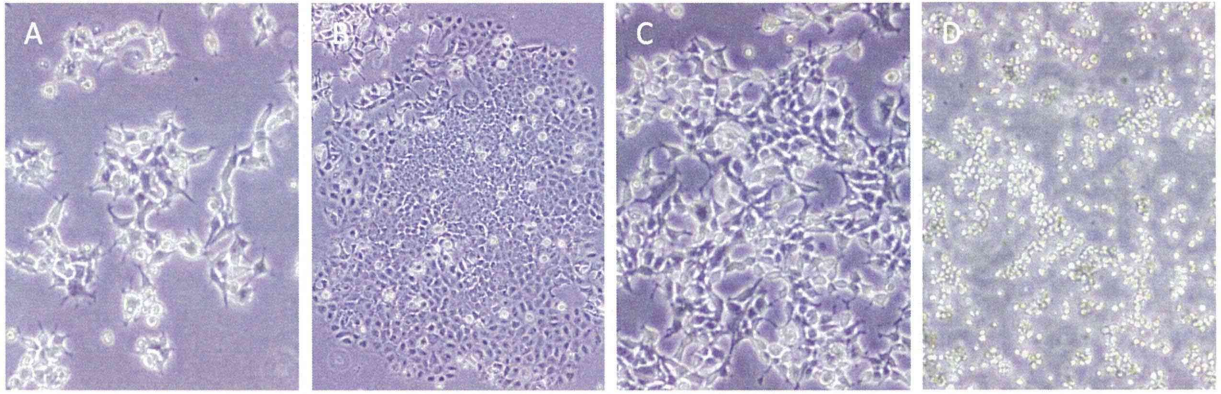
### 2. 学会発表

- 1) 船田正彦、富山健一、和田清、脱法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドの神経細胞毒性、平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、岡山コンベンションセンター、10 月 5 日・2013 年
- 2) M. Funada, K. Tomiyama, K. Wada, Role of dopamine system on the expression of behavioral and cytotoxicological properties of MDPV in mice., 75th Annual Meeting - College on Problems of Drug Dependence. June 15-20, 2013, San Diego, CA, USA.

### I. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他特になし。





培養17日目

図.3. トランスフェクション HEK-293 の薬剤選択

HEK-293 細胞は 10%FBS 含有 DMEM+2mM L-Glutamine で培養維持を行った。薬剤選別を行うために 10%FBS 含有 DMEM+2mM L-Glutamine に 4.5%の GENETECINE を加えた培地で培養を行った。B-C は薬剤選別 17 日目の HEK-293 を示す。A: HEK-293 細胞、B: transfection DAT、C: transfection SERT、D: transfection NET。なお通常の HEK-293 は薬剤選別 4-5 でほぼ死滅する。

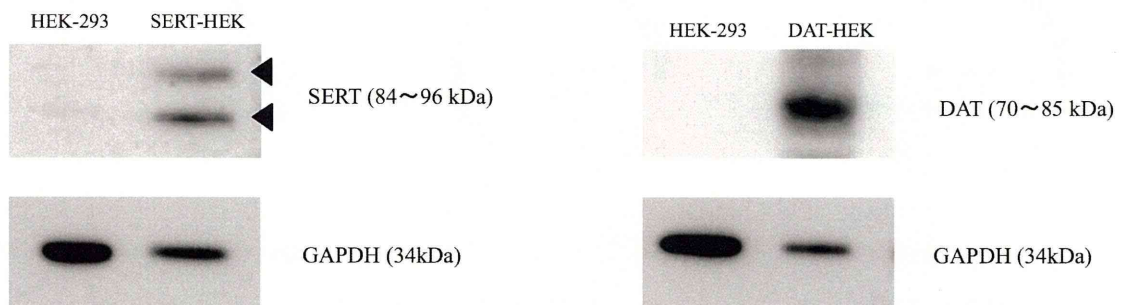


図.4. モノアミントランスポータータンパク質の発現解析

Anti-Dopamine Transporter (1:1000, Millipore, Bedford, MA; MAB369) は 94~80 kDa の間でタンパク質を認識する。Anti-Serotonin Transporter (1:1000, Millipore, Bedford, MA; AB1594P) は 94 kDa、80 kDa そして 76 kDa の間でタンパク質を認識するが、これらの機能的役割については言及されていない。



分担研究報告書

培養細胞を用いたカチノン系違法ドラッグの神経細胞毒性評価

分担研究者：浅沼幹人（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 准教授）  
研究協力者：宮崎育子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教）

【研究要旨】

研究目的：昨年度、カチノン系違法ドラッグの ethcathinone（エトカチノン）、覚醒剤類似体の para-chloroamphetamine (PCA) がセロトニン含有神経細胞にはほとんど毒性を示さないのに対して、ドパミン系神経細胞には中等度の毒性を有することを明らかにしたが、今年度は fluoro 基を有するカチノン系違法ドラッグである 2-fluorocathinone (2-FCAT), 3-fluorocathinone (3-FCAT) および 4-fluorocathinone (4-FCAT) の神経細胞毒性について、ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について蛍光指示薬を用いて検討した。結果：ethcathinone がドパミン系神経細胞に対して中等度の神経細胞毒性を有するのに対して、2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT はドパミン系・セロトニン系両神経細胞に対してもほとんど毒性を示さなかった。2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のいずれも、セロトニン含有神経細胞に曝露した場合に、高濃度(1 mM)の 3 時間後においてのみ軽度のアポトーシス様形態変化が認められ、LDH 放出量に変化がなかったのに対して、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法では形態変化をきたさない濃度(500  $\mu$ M)でのミトコンドリアでの活性酸素生成の亢進という細胞障害性を検出できた。結論：カチノン骨格はあまり強い神経毒性を呈さないが、カチノン類のベンゼン環の fluoro 基による修飾はさらにそのドパミン神経細胞毒性を低下させると考えられる。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の違法ドラッグの曝露早期における神経細胞障害性を明らかにできることから、迅速かつ感度良く、しかも軽微な細胞障害性を評価できる方法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

これまでに、違法ドラッグ(脱法ドラッグ)として乱用が社会問題となった 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT) および植物由来の違法ドラッグ(ハルマラ)の催幻覚成分である harmaline および harmine のモノアミン(ドパミン、セロトニン)神経毒性について検討し、これらの薬剤が比較的低濃度でアポトーシス様細胞死を惹起しうること、さらに合成麻薬 MDMA

および覚醒剤メタンフェタミン(METH)との同時併用により細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることを明らかにした<sup>1), 2)</sup>。さらに、MDMA の構造類似体のメチロン(平成 19 年 2 月麻薬指定)が単独曝露では強い毒性は示さないものの、MDMA もしくは METH との同時乱用では強いセロトニン神経毒性をもたらすことを明らかにした<sup>3)</sup>。

平成 19 年度は、覚醒剤に構造が酷似しているフェネチルアミン系違法ドラッグである 4-fluoroamphetamine (4FMP:平成 19 年 4 月よ

り指定薬物)、 4-methoxymethamphetamine (PMMA:平成19年4月より指定薬物)が、低濃度であっても、低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、ドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を惹起することを明らかにした<sup>4)</sup>。

平成20年度は、覚醒剤と類似の構造を有するピペラジン系違法ドラッグ phenylpiperazine (PP), 1-(2-chlorophenyl)-piperazine (2CPP), 1-(4-chlorophenyl)-piperazine (4CPP), 1-(4-methoxyphenyl)-piperazine (4MPP:平成19年4月より指定薬物)が、ドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種の生成を伴う神経障害および細胞死を惹起することを明らかにした。また、アストロサイトに対しても細胞毒性を引き起こすことを明らかにし、これらのピペラジン系違法ドラッグが、神経細胞にとって極めて毒性の強い薬物であることを示した。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、迅速かつ感度良く、しかも定量的に細胞障害性を評価できる方法として、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを示した<sup>5)</sup>。

また、これらの検討に先立って平成18年度には、フェネチルアミン系違法ドラッグである「2C シリーズ」と称される薬物群のうち、2,5-dimethoxy-4-propylthiophenethylamine (2CT-7:平成18年4月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4:平成19年4月指定薬物、平成20年1月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenethylamine (2CT-2:平成19年4月指定薬物、平成20年1月より麻薬指定)、2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I:平成19年4月指定薬物、平成20年1月より麻薬指定)が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞において、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い神経毒性を示すこと、ま

たセロトニン系神経細胞においては、低濃度の MDMA もしくは METH との同時併用により、2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I のアポトーシス様の細胞死が相乗的に増強されることを明らかにした<sup>6)</sup>。平成23年度は、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, 2CT-2, 2C-I が、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の暴露早期においてセロトニン系神経細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした<sup>7)</sup>。平成21, 22年度には、「2C シリーズ」のなかでも、規制を免れ、広く流通し、乱用されている 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C:平成19年4月より指定薬物)および 2C-C と類似の骨格を有する trichloro-2C-H (T-2C-H)が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い神経細胞毒性を示すこと<sup>8,9)</sup>、さらに非常に低濃度の T-2C-H はセロトニン系神経細胞における 2C-C の神経毒性を増強させること<sup>9)</sup>を明らかにした。また、2C-C, T-2C-H は形態変化が認められない低濃度あるいは早期においても細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした<sup>8,9)</sup>。

これらの結果から、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」の共通骨格が、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示すと考えられた。また、培養神経細胞株と蛍光指示薬を用いての酸化ストレスの検出法は、低濃度のドラッグの暴露早期における細胞障害性を迅速かつ感度良く、しかも定量的に評価できる方法として有用であると考えられた<sup>7)</sup>。

昨年度は、インドールアルカロイド系違法ドラッグの 5MeO-DALT について検討し、5MeO-MIPT, 5MeO-DMT と同様に 5MeO-DIPT よりも神経毒性が軽度であることから、5MeO-DIPT のインドール骨格に加え側鎖の diisopropyl 基が強い神経細胞毒性を惹起する可能性を推測できた<sup>10)</sup>。さらに、カチ

ノン系違法ドラッグの ethcathinone (エトカチノン) の神経細胞毒性について検討し、セロトニン含有神経細胞にはほとんど毒性を示さないのに対して、ドパミン系神経細胞には中等度の毒性を有することを示した。ethcathinone と同様に MDMA 類似のメチロンが、MDMA に比べて両細胞系に対して比較的毒性が弱いことから、カチノン骨格をとることにより、神経毒性が低下すると推測できた<sup>10)</sup>。

違法ドラッグ (脱法ドラッグ) はその構造が規制薬物に類似しており、規制薬物に指定されても次々に別の類似構造をもつ化学物質が乱用されていることから、違法ドラッグおよび規制薬物の神経毒性と構造相関を明らかにし、薬物乱用の危険性および神経毒性を予測することが急務となっている。

今年度はさらに、最近乱用が問題視されている fluoro 基を有するカチノン系違法ドラッグである 2-fluorocathinone (2-FCAT), 3-fluorocathinone (3-FCAT) および 4-fluorocathinone (4-FCAT) のドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討し、昨年度の ethcathinone の検討結果と比較し、神経毒性と構造相関について考察した。

## B. 研究方法

### 1. モノアミン系培養神経細胞への 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT および ethcathinone 暴露

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) およびラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を用いて、それぞれ継代 24、48 時間後に、2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT および ethcathinone (最終濃度 50  $\mu$ M ~ 1 mM) を添加し、3、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性の指標として培地中への LDH

放出量を測定した。また、細胞を 4% paraformaldehyde による固定の後、Hoechst33342 による核染色を行い、アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

### 2. モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞への 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT 暴露早期のミトコンドリアでの活性酸素種生成の評価

モノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を用いて、継代 48 時間後に、2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT (最終濃度 250  $\mu$ M ~ 1 mM) 添加 3 時間後のミトコンドリアにおける活性酸素種生成を、活性酸素種に対する蛍光指示薬である MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XRos を用いて検出した。

## C. 研究結果

### 1. ドパミン系培養神経細胞への 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT および ethcathinone 暴露の効果

ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞に ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT を 24 時間添加したところ、ethcathinone では比較的高濃度の 500  $\mu$ M 以上で細胞障害性の指標となる LDH 放出量の用量依存的な増加 (IC<sub>50</sub>=約 750  $\mu$ M) が認められたのに対して (Fig. 1: 平成 24 年度報告<sup>10)</sup>)、2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT では最大用量の 1 mM まで有意な細胞障害は認められなかった (Figs. 2, 3 and 4)。

### 2. セロトニン含有神経細胞への 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT および ethcathinone 暴露の効果

セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞に ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT を添加し、経時的に LDH 放出量、形態学的変化を観察した。

曝露後早期の 3 時間においては、ethcathinone の比較的高濃度 (500  $\mu$ M 以上)

の曝露により、軽度の細胞死と細胞体の萎縮、空胞化、核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化が認められ(Fig. 5: 平成 24 年度報告<sup>10)</sup>)、ミトコンドリアにおける活性酸素種生成の指標になる MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XRos のシグナル増強がみられた(平成 24 年度報告<sup>10)</sup>)。LDH 放出量に関しては ethcathinone 1 mM においてごく軽度の増加が認められた(Fig. 5: 平成 24 年度報告<sup>10)</sup>)。

B65 細胞に 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT を 3 時間曝露すると、高濃度の 1 mM においてのみ軽度のアポトーシス様形態変化が認められたが、有意な LDH 放出量の増加はみられなかった(Figs. 6, 7 and 8)。ミトコンドリアにおける活性酸素種生成の指標になる MitoTracker CM-H<sub>2</sub>XRos のシグナルについては、2-FCAT 曝露では変化なく、比較的高濃度 500 μM 以上の 3-FCAT および 4-FCAT 曝露においてシグナル強度の増加が認められた(Figs. 9, 10 and 11)。

薬剤曝露 24 時間後においては、ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のいずれの薬剤においても、形態変化および LDH 放出量の増加は認められなかった。(Fig. 12: 平成 24 年度報告<sup>10)</sup>, Figs. 13, 14 and 15)。

#### D. 考察

インドールアルカロイド系違法ドラッグの 5MeO-DALT、カチノン系違法ドラッグの ethcathinone (エトカチノン)、覚醒剤類似体の PCA のドパミン系培養神経細胞とセロトニン含有培養神経細胞における細胞生存率、形態学的変化ならびに曝露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した。

これまでに明らかにしたフェネチルアミン系違法ドラッグ「2C シリーズ」のドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対する強い神経毒性<sup>6,7,8,9)</sup>に比較して、カチノン系違法ドラッグの ethcathinone (エトカチノン)、覚醒剤類似体の PCA の細胞障害性は

軽度であることを昨年度明らかにした<sup>10)</sup>。しかも、ethcathinone (エトカチノン)、PCA のいずれもセロトニン含有神経細胞にはほとんど毒性を示さないのに対して、ドパミン系神経細胞には中等度の毒性を示した。これらの薬剤は広くフェネチルアミン系に包括でき、「2C シリーズ」を含む多くのフェネチルアミン系違法ドラッグがドパミン系・セロトニン系両神経細胞に強い細胞障害性を示すことから、フェネチルアミン系違法ドラッグはその骨格がカテコールアミンに類似していることから少なくともドパミン系神経細胞に強い親和性があると考察した。また、ethcathinone (エトカチノン) と同様にメチロンが、MDMA に比べて両細胞に対して比較的毒性が弱いことから、カチノン骨格は神経毒性を低下させると考えられた。

今回、ethcathinone (エトカチノン) と同じカチノン系違法ドラッグであり、fluoro 基を有する 2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT の神経細胞毒性について、ethcathinone (エトカチノン) と比較して検討した。昨年度 ethcathinone (エトカチノン) がドパミン系神経細胞に対して中等度の神経細胞毒性を発揮した<sup>10)</sup>のに対して、2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT はドパミン系・セロトニン系神経細胞のどちらの細胞に対してもほとんど毒性を示さなかった。昨年度の結果と今回の検討結果より、カチノン類のベンゼン環が fluoro 基で修飾されることにより、そのドパミン神経細胞毒性が低下すると推測される。また、fluoro 基が 2, 3, 4 位のいずれに付加されても、神経毒性に差異はないことがわかった。

2-FCAT, 3-FCAT および 4-FCAT のいずれにおいても、セロトニン含有神経細胞に曝露した場合に、高濃度(1 mM)の 3 時間後においてのみ軽度のアポトーシス様形態変化が認められ、LDH 放出量に変化がなかったのに対して、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法では形態変化をきたさない濃度(500 μM)でのミトコンドリアでの活性酸素生成の亢進という細胞障害性を検出できた。平成 20 年度以降、