

分担研究報告書

危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発
～酸化ストレスマーカーdHEtを指標にして～

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脳神経機構学 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脳神経機構学 講師）

【研究要旨】

[緒言] 危険ドラッグおよび覚せい剤など乱用薬物による神経障害において活性酸素種生成など酸化ストレスは重要な役割を果たすと考えられる。これまでに、ミトコンドリアでの活性酸素種生成の蛍光指示薬を用いて、2C-C, 2CT-4 を除くいくつかの危険ドラッグについては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活性酸素種生成を検出できることを報告してきた。本研究では、危険ドラッグ暴露早期の細胞内での酸化ストレスをミトコンドリアに限らず広く評価するために、モノアミン系培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ (METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine) 添加による細胞内活性酸素種生成を蛍光物質 dihydroethidine (dHEt) により検出し、その有害性を評価する指標としての可能性について総合的に評価した。

[結果] モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞株 B65 細胞への3時間曝露により、13種いずれの薬剤においても、活性酸素種生成を示す dHEt のシグナルの顕著な増加が認められた。細胞における明らかな dHEt のシグナルの出現濃度は、2CT-4 (50 μ M \sim), 2CT-7 (50 μ M \sim) > 2C-C (50 μ M \sim), harmaline (50 μ M \sim) > harmine (50 μ M \sim) > MDMA (250 μ M) > methylone (500 μ M \sim), PP (500 μ M \sim) > PMMA (500 μ M \sim), 4FMP (500 μ M \sim) > METH (500 μ M \sim), 5MeO-DMT (500 μ M \sim) > 5MeO-MIPT (500 μ M \sim) の順であり、細胞数減少の出現濃度で示される細胞毒性の強度、2C-C (100 μ M \sim), 2CT-4 (100 μ M \sim) > harmaline (100 μ M \sim), harmine (100 μ M \sim) > 2CT-7 (100 μ M \sim) > MDMA (500 μ M \sim) > PP (1 mM \sim), METH (1 mM \sim), PMMA (1 mM \sim), methylone (1 mM \sim), 4FMP (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT (2 mM), 5MeO-DMT (2 mM \sim) ときれいに相関しており、さらに dHEt による細胞内活性酸素種生成は細胞死を惹起しない低濃度においても曝露早期から認められることが明らかとなった。

[考察] 各種乱用薬物、危険ドラッグのモノアミン系培養神経細胞への曝露により、細胞内での活性酸素種生成が曝露3時間後の早期に低濃度から認められ、その酸化ストレス誘導性と形態的な神経細胞障害性との間に強い相関が認められることを明らかにできた。培養神経細胞株での蛍光物質 dHEt を用いた活性酸素種生成の評価は、鋭敏かつ有用な神経毒性発現の蓋然性のスクリーニング方法となりうると考えられた。

A. 研究目的

これまでに、培養神経細胞を用いて、危険

(違法、脱法) ドラッグの神経細胞毒性に関する検討を行い、毒性発現のプロファイルならびに構造毒性相関を明らかにしてきた¹⁾⁴⁾。

これらの知見は、一定の構造を有する薬剤を指定薬物にすることで包括的に規制することの必要性、重要性を示すものである。しかし、次々に別の類似構造をもつ化学物質が製造され、流通・乱用されていることから、危険ドラッグおよび類似化学物質の危険性および精神・神経毒性を予測する技術、すなわち精神・神経毒性発現の蓋然性の指標となる生体分子への作用を簡便に迅速に評価できるスクリーニング法の確立が急務であると考えられた。

平成 20 年度から平成 26 年度の各種危険ドラッグのモノアミン系神経細胞への障害性の検討において、蛍光指示薬によるミトコンドリアでの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危険ドラッグ暴露早期において細胞内での活性酸素種生成を検出できることから、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、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを明らかにした⁷⁻¹⁴⁾。

平成 27 年度から平成 29 年度の一連の検討で、危険ドラッグの精神・神経毒性発現の蓋然性を示す共通の作用点となりうると思われるモノアミン酸化酵素 MAO 阻害活性に着目し、発光性 MAO 基質による MAO 活性の発光検出システムを用いれば、精製された粉末・顆粒状乱用ドラッグの水溶液の MAO 阻害活性を非常に高感度で簡便に評価でき、精神・神経毒性発現の蓋然性をスクリーニングする有用な方策の一つとなりうることを明らかにできた¹⁵⁻¹⁷⁾。

危険ドラッグおよび覚せい剤など乱用薬物による神経障害において神経炎症は重要な役割を果たすと考えられる。High mobility group box-1 (HMGB1)は、核内 DNA 結合タンパク質であるが、組織損傷に応じて細胞外へ放出され、Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)、Toll-like receptor に結合し炎症惹起に働く damage-associated molecular patterns (DAMPs)として知られている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。これまでの研究により、脳卒中(脳梗塞、脳出血)、脳外

傷、てんかん、神経因性疼痛モデルにおいて HMGB1 発現が誘導されており、中和活性を有する抗 HMGB1 抗体を投与することによって神経障害が有意に抑制されることが報告されている²¹⁾。神経細胞毒性発現の共通の作用点となりうる神経炎症関連標的分子と想定される起炎物質 DAMPs の代表である HMGB1 に着目し、一昨年度平成 30 年度は覚せい剤メタンフェタミン(METH)急性投与神経毒性モデルマウスにおける HMGB1 の発現動態ならびにモノアミン神経毒性に対する抗 HMGB1 抗体の効果について検討した。METH 投与により、惹起されるドパミン(DA)系神経障害に関連する高体温、DA トランスポーター(DAT)の減少、DA 神経終末の脱落とともに、起炎物質 HMGB1 の末梢血中での増加ならびに線条体神経細胞での HMGB1 の核から細胞質への移行・放出がみられること、さらに抗 HMGB1 抗体の静脈内投与によりこれら METH 投与による HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落が有意に抑制できることを明らかにし、HMGB1 が乱用薬物により惹起される神経細胞毒性発現の共通分子となりうる可能性を示した²²⁾。昨年度令和元年度は、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ添加による HMGB1 の発現動態の変化について検討し、各種乱用薬物、危険ドラッグのモノアミン系培養神経細胞への曝露早期における HMGB1 の核外移行への作用と神経細胞障害性が、2CT-7 を除いて相関しており、HMGB1 の発現および核外移行は神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうることを明らかにし、神経炎症をあらゆる HMGB1 の核外移行、酸化ストレスをあらゆるミトコンドリアでの活性酸素種生成など複数の早期神経障害指標を用いて評価することが望ましいことを提唱した²³⁾。

今年度は、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ曝露早期の細胞内酸化ストレスを広く評価するために、とくにミトコンドリアに限

らず細胞内でのスーパーオキシドなど活性酸素種生成を検出する蛍光物質 dihydroethidine (dHEt)を用いて検討した。また、炎症反応の起点となる HMGB1 の核外移行と神経細胞死と併せて検討し、その有害性指標としての可能性について総合的に評価した。

B. 研究方法

1. モノアミン系培養神経細胞への危険ドラッグ暴露と活性酸素種生成の評価

ラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞を継代して 96 ウェル培養プレートに播種して (3×10^4 cells/cm²)、48 時間後に、13 種の乱用薬物あるいは危険ドラッグである METH (最終濃度 500 μ M-2 mM), MDMA (250 μ M-1 mM), methylone (500 μ M-2 mM), 4-fluoroamphetamine (4FMP: 500 μ M-2 mM), 4-methoxymethamphetamine (PMMA: 500 μ M-2 mM), 2,5-dimethoxy-4-propylthio-phenethylamine (2CT-7: 50 -250 μ M), 2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4: 50 -250 μ M), 2,5-dimethoxy-4-chloro-phenethylamine (2C-C: 50 -250 μ M), phenylpiperazine (PP: 500 μ M-2 mM), 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT: 500 μ M-2 mM), N-isopropyl-5-methoxy-N-methyltryptamine (5MeO-MIPT: 500 μ M-2 mM), harmaline (50 -250 μ M)および harmine (50 -250 μ M)を添加し、3 時間培養し、細胞質における活性酸素種生成を活性酸素種 (主にスーパーオキシドに対する蛍光指示薬である dihydroethidium (dHEt)を用いて検出した。

2. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による HMGB1 発現変化の評価

乱用薬物あるいは危険ドラッグ METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine (最終濃度 50 μ M-2 mM) を 3 時間曝露し、4% paraformaldehyde による固定を行っ

た。B65 細胞における HMGB1 発現を抗 HMGB1 抗体を用いた蛍光免疫組織化学法で評価した。

細胞膜浸透処理のため 0.1% Triton X-100 加 PBS (PBS-T)を用い、抗体に対しての非特異的反応を防ぐために、1%正常ヤギ血清で 20 分間ブロッキング処理を行った。PBS-T で希釈した 1 次抗体、ウサギ抗 HMGB1 ポリクローナル抗体(Abcam: ab18256, 500 倍希釈)と 4°C で 1 晩反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、500 倍希釈した二次抗体、ヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor488 抗体(Alexa: A-11034)と室温で 1.5 時間 incubate した。PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行い、Hoechst33342 (Thermo Fisher)による核染色を行った。PBS での洗浄後、スライドガラスを DAKO Fluorescence Mounting Medium を用いて封入した。

HMGB1 陽性シグナルの蛍光強度ならびに Hoechst33342 染色による形態学的な生存細胞数を cellSens ソフトウェア(Olympas)によって測定した。

C. 研究結果

1. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による曝露早期における活性酸素種生成

各種乱用薬物あるいは危険ドラッグのモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞への 3 時間曝露により、いずれの薬剤においても、活性酸素種生成を示す dHEt のシグナルの顕著な増加が認められた (Figs. 1~6)。細胞における明らかな dHEt のシグナルの出現濃度は、2CT-4 (50 μ M~), 2CT-7 (50 μ M~) > 2C-C (50 μ M~), harmaline (50 μ M~) > harmine (50 μ M~) > MDMA (250 μ M) > methylone (500 μ M~), PP (500 μ M~) > PMMA (500 μ M~), 4FMP (500 μ M~) > METH (500 μ M~), 5MeO-DMT (500 μ M~) > 5MeO-MIPT (500 μ M~)の順であった。なお、高濃度で著明な細胞死が認められる薬剤 (2CT-7, 2CT-4, 2C-C, harmaline, harmine) の場合、低濃度で著明な dHEt シグナ

ルの増加すなわち活性酸素種生成がみられるが、高濃度では細胞数の著減によりシグナルはむしろ減少していた。

2. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による曝露早期における HMGB1 発現変化

今回の検討で用いた乱用薬物あるいは危険ドラッグの培養 B65 細胞への 3 時間曝露により、4FMP, 2CT-7, 5MeO-DMT を除く薬剤では、核内の HMGB1 シグナル強度の有意な減少が認められた (Figs. 1~6)。HMGB1 の核外移行・細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の有意な減少の出現濃度は、2CT-4 (50 μM ~), 2C-C (50 μM ~) > harmaline (50 μM ~) > harmine (100 μM ~) > PP (500 μM ~) > METH (500 μM ~), PMMA (1 mM~) > MDMA (1 mM), methylone (1 mM~) > 5MeO-MIPT (1 mM) >> 4FMP, 5MeO-DMT (傾向のみ) > 2CT-7 の順であった。

3. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による曝露早期における形態変化と細胞死

乱用薬物あるいは危険ドラッグの培養 B65 細胞への 3 時間曝露により、曝露早期であっても著明な形態変化と細胞数の減少 (細胞死) が観察され、明らかな細胞数減少の出現濃度については、2C-C (100 μM ~), 2CT-4 (100 μM ~) > harmaline (100 μM ~), harmine (100 μM ~) > 2CT-7 (100 μM ~) > MDMA (500 μM ~) > PP (1 mM~), METH (1 mM~), PMMA (1 mM~), methylone (1 mM~), 4FMP (1 mM~) > 5MeO-MIPT (2 mM), 5MeO-DMT (2 mM~) の順であった (Figs. 1~6)。

D. 考察

一昨年度は、マウスへの METH 投与により惹起されるモノアミン系神経障害に関連する高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落とともに、起炎物質 DAMPs のひとつの HMGB1 の

末梢血中での増加ならびに線条体神経細胞での HMGB1 の核から細胞質への移行・放出がみられることを明らかにした²²⁾。さらに、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与により、これら METH 投与による HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落を有意に抑制することができた²²⁾。これらの結果は、HMGB1 が METH 急性神経毒性に関与していることを明らかにしたとともに、HMGB1 が METH 急性神経毒性緩和の標的となりうることを示した。

昨年度は、培養細胞系での HMGB1 の発現動態の評価が危険ドラッグ等の有害性のスクリーニング指標になる可能性を探るべく、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ添加による細胞障害ならびに HMGB1 の発現動態の変化について検討し、曝露 3 時間後の早期から 2CT-7 を除く多くの薬剤で HMGB1 の核外移行・細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の減少が認められ、神経細胞障害性と相関することを明らかにした²³⁾。これは、HMGB1 の発現および核外移行が神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうることを示している。

一方これまでに、危険ドラッグ等のもたらす酸化ストレスの評価については、ミトコンドリアでの活性酸素種生成の蛍光指示薬である MitoTracker CM-H₂XRos による検出法を用いて、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の危険ドラッグ暴露早期において活性酸素種生成を検出できることから、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ことを示してきた^{7,8,10,14)}。しかし、2C-C, 2CT-4 では有意なミトコンドリアでの活性酸素種生成はみられなかった^{7,8,10,14)}。したがって今年度は、危険ドラッグ添加による曝露早期の細胞内での酸化ストレスを広く評価するために、ミトコンドリアに限らず細胞内でのスーパーオキシドなど活性酸素種生成を検出する蛍光物質

dihydroethidine (dHEt)を用いた検討を行った。また、昨年度検討した炎症反応の起点となる HMGB1 の核外移行と神経細胞死も曝露早期に併せて検討し、その有害性を評価する指標としての可能性について総合的に評価した。

13 種いずれの乱用薬物あるいは危険ドラッグにおいても曝露早期 (3 時間) における細胞内での明らかな活性酸素種生成を示す dHEt のシグナル増加が認められ、そのシグナル増加の出現濃度は、2CT-4 (50 μM ~), 2CT-7 (50 μM ~) > 2C-C (50 μM ~), harmaline (50 μM ~) > harmine (50 μM ~) > MDMA (250 μM) > methylone (500 μM ~), PP (500 μM ~) > PMMA (500 μM ~), 4FMP (500 μM ~) > METH (500 μM ~), 5MeO-DMT (500 μM ~) > 5MeO-MIPT (500 μM ~) の順であり、細胞数減少の出現濃度で示される細胞毒性の強度、2C-C (100 μM ~), 2CT-4 (100 μM ~) > harmaline (100 μM ~), harmine (100 μM ~) > 2CT-7 (100 μM ~) > MDMA (500 μM ~) > PP (1 mM~), METH (1 mM~), PMMA (1 mM~), methylone (1 mM~), 4FMP (1 mM~) > 5MeO-MIPT (2 mM), 5MeO-DMT (2 mM~) ときれいに相関しており、さらに dHEt による細胞内活性酸素種生成は細胞死を惹起しない低濃度においても曝露早期から認められることが明らかとなった。また、ミトコンドリアでの活性酸素種生成の蛍光指示薬である MitoTracker CM-H₂XRos による検出法では活性酸素種生成が見られなかった 2C-C, 2CT-4 についても、今回用いた dHEt では細胞内の著明な活性酸素種生成が低濃度から検出できた。細胞内での活性酸素種生成源は、ミトコンドリアの電子伝達系からの漏出のみならず、モノアミン酸化酵素、Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ、フェントン反応、金属触媒ハーバーワイス反応などがあり、広く活性酸素種の発生を評価するためには、dHEt や DCFDA など汎活性酸素種蛍光指示薬により評価することが望ましい。

昨年度検討した起炎物質 HMGB1 の核外移行・細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の減少も低濃度から認められ、曝露早期

の神経炎症の鋭敏な指標となりうると考えられるが、2CT-7 の核内 HMGB1 に関しては有意な変化が見られず神経細胞死との乖離があった。今回の dHEt での細胞内活性酸素種生成は、HMGB1 の核外移行よりもより低濃度から認められ、また形態的な細胞障害性とより強く相関することから、感度の高い早期の酸化ストレス、神経障害の指標となりうると考えられる。

したがって、乱用薬物、危険ドラッグの有害性のスクリーニングでは、培養神経細胞系における細胞内酸化ストレスをあらゆる活性酸素種生成、神経炎症をあらゆる HMGB1 の核外移行など複数の早期の神経障害指標を用いて評価することが望ましいと考えられた。

E. 結論

モノアミン系培養神経細胞系を用いて 13 種の乱用薬物、危険ドラッグ (METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine) 添加による細胞内酸化ストレスの変化についてスーパーオキシドなど活性酸素種生成を検出する蛍光物質 dHEt を用いた検討を行い、細胞内での活性酸素種生成が曝露 3 時間後の早期に低濃度から認められ、その酸化ストレス誘導性と形態的な神経細胞障害性との間に強い相関が認められることを明らかにできた。培養神経細胞株での蛍光物質 dHEt を用いた活性酸素種生成の評価は、鋭敏かつ有用な神経毒性発現の蓋然性のスクリーニング方法となりうると考えられた。

F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」 研究報告書 (主

- 任研究者：船田正彦). P15-24, 2004.
- 2) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成16年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P21-42, 2005.
 - 3) 船田正彦, 竹林美佳, 宮崎育子, 浅沼幹人, 青尾直也, 和田 清: ハルミンの薬物依存性ならびに細胞毒性の評価：植物由来催幻覚成分の有害作用について. 精神保健研究, 61(28): 61-72, 2015.
 - 4) 船田正彦, 竹林美佳, 宮崎育子, 浅沼幹人, 青尾直也, 和田 清: ハルミンの薬物依存性ならびに細胞毒性の評価：植物由来催幻覚成分の有害作用について. 精神保健研究, 61(28): 61-72, 2015.
 - 5) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成18年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P30-65, 2007.
 - 6) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P36-64, 2008.
 - 7) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成20年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P81-108, 2009.
 - 8) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグによる神経・細胞毒性の発現機序に関する多角的検討. 平成21年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P38-55, 2010.
 - 9) 浅沼幹人, 宮崎育子:フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討. 平成22年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P42-57, 2011.
 - 10) 浅沼幹人, 宮崎育子:違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価. 平成23年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P37-49, 2012.
 - 11) 浅沼幹人, 宮崎育子:培養細胞を用いた違法ドラッグの神経細胞毒性評価と構造相関. 平成24年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). P49-68, 2013.
 - 12) 浅沼幹人, 宮崎育子: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. 平成25年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書(主任研究者：船田正彦). 2014.
 - 13) 浅沼幹人, 宮崎育子: 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価. 平成26年

- 度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2015.
- 14) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 38: 394-408, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>
- 15) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2016.
- 16) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～2. 平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2017.
- 17) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～3. 平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2018.
- 18) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., Tracey, K.J.: HMGB1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285 (5425): 248-251, 1999.
- 19) Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C.J., Wang, H., Roth, J., Warren, H.S., Fink, M.P., Fenton, M.J., Andersson, U., Tracey, K.J.: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (1): 296-301, 2004.
- 20) Andersson, U., Tracey, K.J.: HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.*, 29: 139-162, 2011.
- 21) 西堀正洋: DAMP としての HMGB1 と抗 HMGB1 抗体療法. *日本薬理学雑誌*, 151 (1): 4-8, 2018.
- 22) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして～. 平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2019.
- 23) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして2～. 令和元年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書（主任研究者：船田正彦）. 2020.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 38: 394-408, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>
- 2) Isooka, N., Miyazaki, I., Kikuoka, R., Wada, K., Nakayama, E., Shin, K., Yamamoto, D., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Dopaminergic neuroprotective effects of rotigotine via 5-HT1A receptors: possibly involvement of metallothionein expression in astrocytes. *Neurochem. Int.*, 132: 104608, 2020. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104608
- 3) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Takeshima, M., Sonobe, K., Arai, R., Funakoshi, H., Quin, K.E., Smart, J., Zensho, K. and Asanuma, M.: Effects of maternal bisphenol A diglycidyl ether exposure during gestation and lactation on behavior and brain development of the offspring. *Food Chem. Toxicol.*, 138: 111235, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111235>
- 4) Miyazaki, I., Isooka, N., Imafuku, F., Sun, J., Kikuoka, R., Furukawa, C. and Asanuma, M.: Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(9): 3254, 2020. doi:10.3390/ijms21093254
- 5) Kidani, N., Hishikawa, T., Hiramatsu, M., Nishihiro, S., Kin, K., Takahashi, Y., Murai, S., Sugiu, K., Yasuhara, T., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Date, I.: Cerebellar blood flow and gene expression in crossed cerebellar diaschisis after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(11): 4137, 2020. doi: 10.3390/ijms21114137
- 6) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: The rotenone models reproducing central and peripheral features of Parkinson's disease. *NeuroSci*, 1(1): 1-14, 2020. doi: 10.3390/neurosci1010001
- 7) Kikuoka, R., Miyazaki, I., Kubota, N., Maeda, M., Kagawa, D., Moriyama, M., Sato, A., Murakami, S., Kitamura, Y., Sendo, T. and Asanuma, M.: Mirtazapine exerts astrocyte-mediated dopaminergic neuroprotection. *Sci. Rep.*, 10(1): 20698, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77652-4>
- 8) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Neuron-Astrocyte Interactions in Parkinson's Disease. *Cells*, 9(12): 2623, 2020. doi.org/10.3390/cells9122623
- 9) Kitamura, Y., Ushio S., Sumiyoshi, Y., Wada, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Sendo, T.: N-acetylcysteine attenuates the anxiety-like behavior and spatial cognition impairment induced by doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats. *Pharmacology*, 2020, Dec 22: 1-8. doi: 10.1159/000512117 (Online ahead of print)
- 10) Shimaoka, S., Hamaoka, H., Inoue, J., Asanuma, M., Tooyama, I. and Kondo, Y.: Lactoferrin-like immunoreactivity in distinct neuronal populations in the mouse central nervous system. *Acta Med. Okayama*, in press.
- 11) 浅沼幹人, 宮崎育子: パーキンソン病での神経保護標的としてのアストロサイトの抗酸化分子. 日本薬理学雑誌, 2021, 156: 14-20.
- 12) 浅沼幹人, 宮崎育子: パーキンソン病と亜鉛結合蛋白, 城 宜嗣, 津本浩平監修, 古川良明, 神戸大朋編, 生命金属ダイナミクス 生体内における金属の挙動と制御, エヌ・ティー・エス, 東京, 2021, pp304-309.
- 13) 宮崎育子, 浅沼幹人: アストロサイトの亜鉛関連分子を標的としたパーキンソン病治療戦略. 日本薬理学雑誌, in press.

2. 学会発表

- 1) 浅沼幹人: Glutathione in astrocytes as a target of neuroprotection. シンポジウム: 中枢神経における GSH 産生促進を介する神経保護機構, 第 93 回日本薬理学会年会, 横浜, 2020.3.16. (誌上開催)
- 2) 宮崎育子, 浅沼幹人, 村上真樹, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久: 農薬ロテノン曝露によるアストロサイトの部位特異的反応性の差異と神経細胞に及ぼす影響. 第 125 回日本解剖学会総会, 宇部, 2020.3.27. (誌上開催)
- 3) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y., Asanuma, M.: Region-specific glial dysfunction promotes rotenone neurotoxicity. 第 61 回日本神経学会学術大会, 岡山, 2020.8.31-9.2 (誌上発表)
- 4) 浅沼幹人: パーキンソン病と生体金属, 金属結合蛋白. シンポジウム: 生命金属で切り開く神経疾患の解明, 第 61 回日本神経学会学術大会, 岡山, 2020.9.2. (Web 動画配信)
- 5) 宮崎育子, 村上真樹, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: ロテノン誘発ドパミン神経障害におけるアストロサイト-ミクログリア連関. メタルバイオサイエンス研究会 2020, 千葉, 2020.11.6-7 (オンライン発表)
- 6) 今福史智, Jin Sun, 磯岡奈未, 上舞 直, 清水崇司, 豊田俊明, 岡本裕成, 菊岡 亮, 宮崎育子, 浅沼幹人: パーキンソン病モデルマウスにおける杜仲抽出物のメタロチオネイン発現誘導および神経保護効果. メタルバイオサイエンス研究会 2020, 千葉, 2020.11.6-7 (オンライン発表)
- 7) 今福史智, Jin Sun, 磯岡奈未, 上舞 直, 清水崇司, 豊田俊明, 岡本裕成, 菊岡 亮, 宮

崎育子, 浅沼幹人: パーキンソン病モデルマウスにおける杜仲抽出物のメタロチオネイン発現誘導および神経保護効果. 第 34 回創薬・薬理フォーラム, 岡山, 2020.12.26 (オンライン発表)

- 8) 宮崎育子, 磯岡奈未, 菊岡 亮, 北村佳久, 浅沼幹人: 5-HT1A アゴニストによるアストロサイトのメタロチオネイン発現誘導とドパミン神経保護. 第 14 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 福岡, 2021.2.22-24 (Web 動画配信)

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

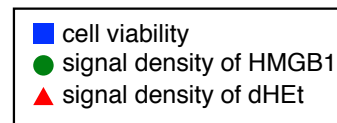
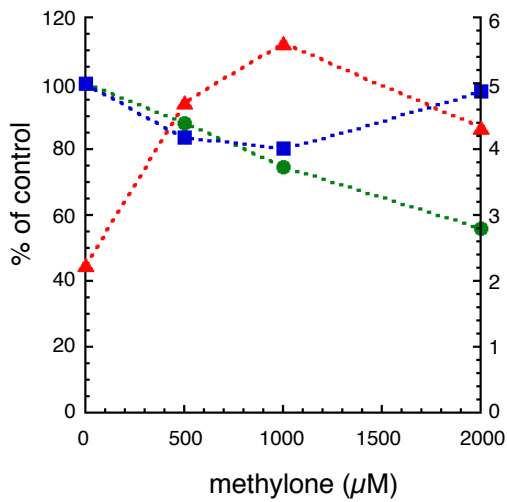
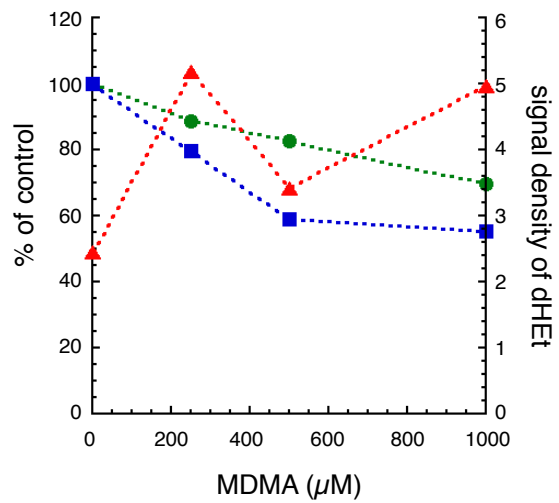
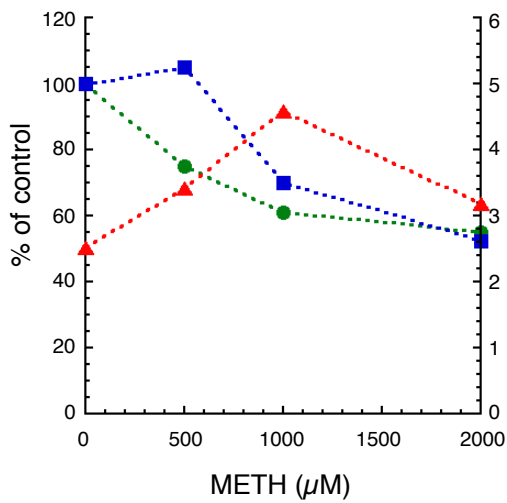
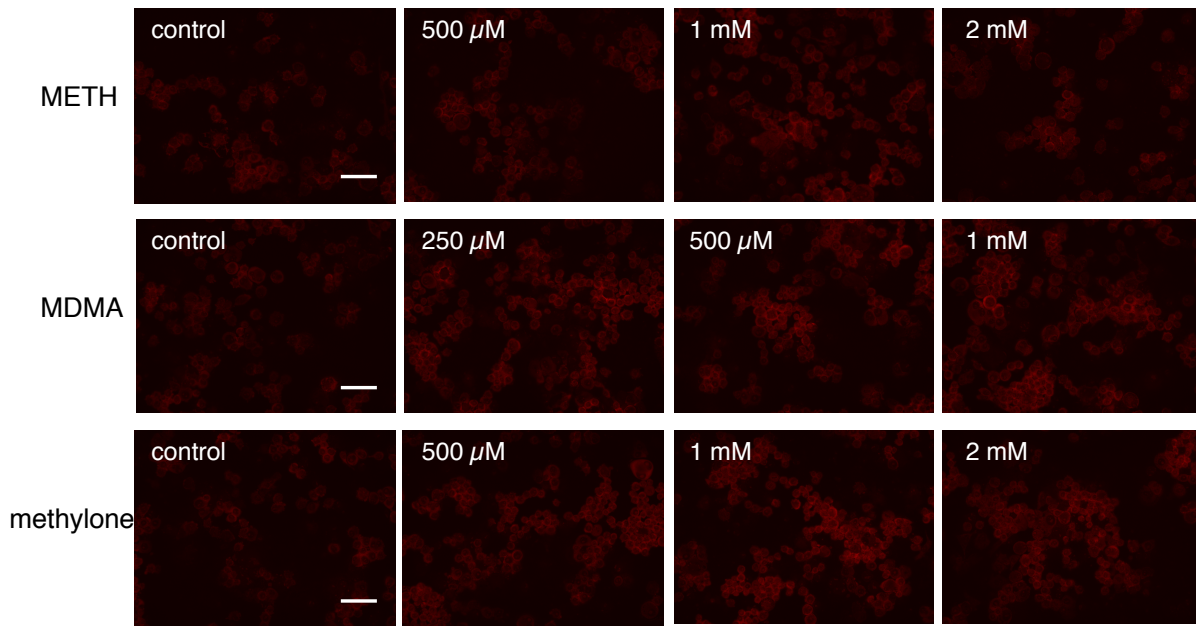


Fig. 1. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to METH, methylone (final concentration: 0, 500 μ M, 1 mM, 2 mM), or MDMA (final concentration: 0, 250 μ M, 500 μ M, 1 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHET) staining (red). Scale bar = 100 μ m. Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHET signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.

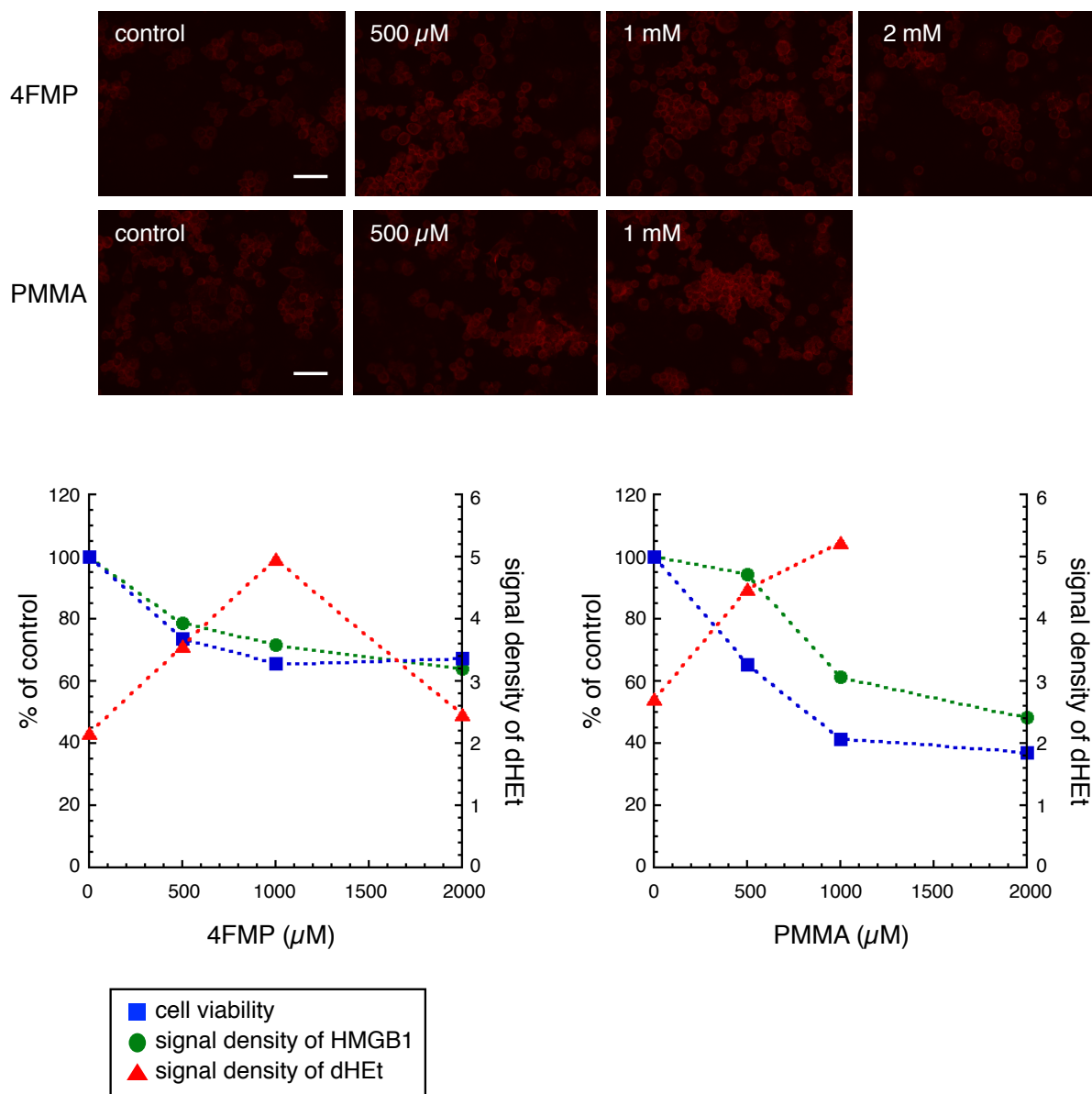


Fig. 2. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to 4FMP or PMMA (final concentration: 0, 500 μM, 1 mM, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHEt) staining (red). Scale bar = 100 μm. Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHEt signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.

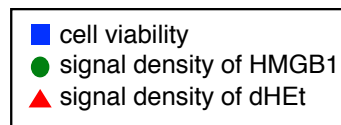
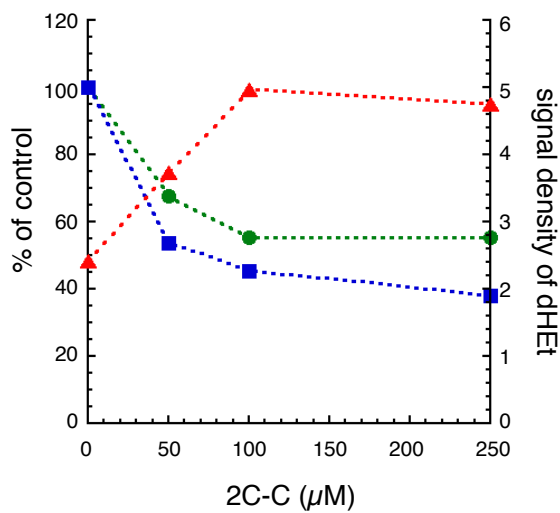
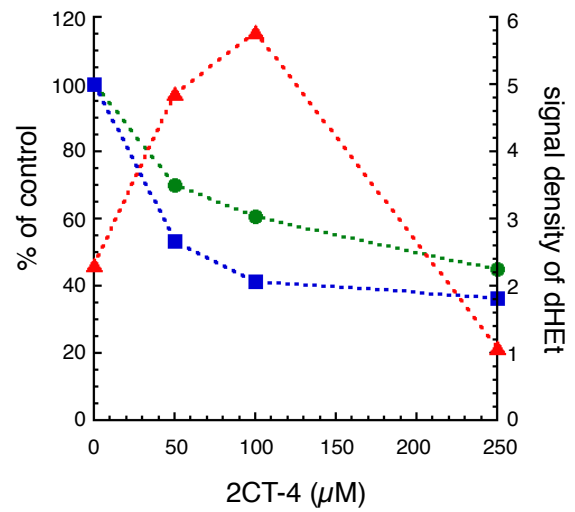
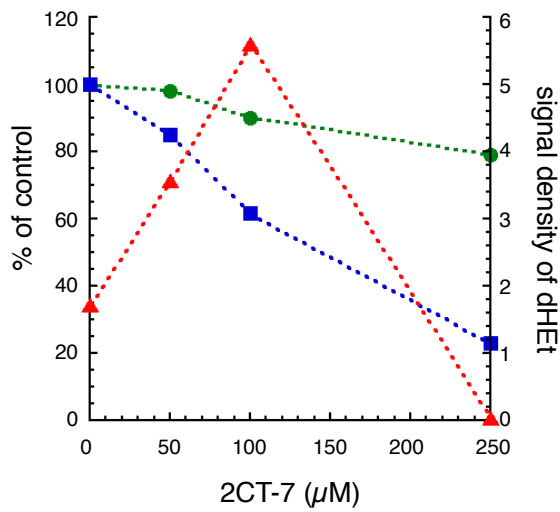
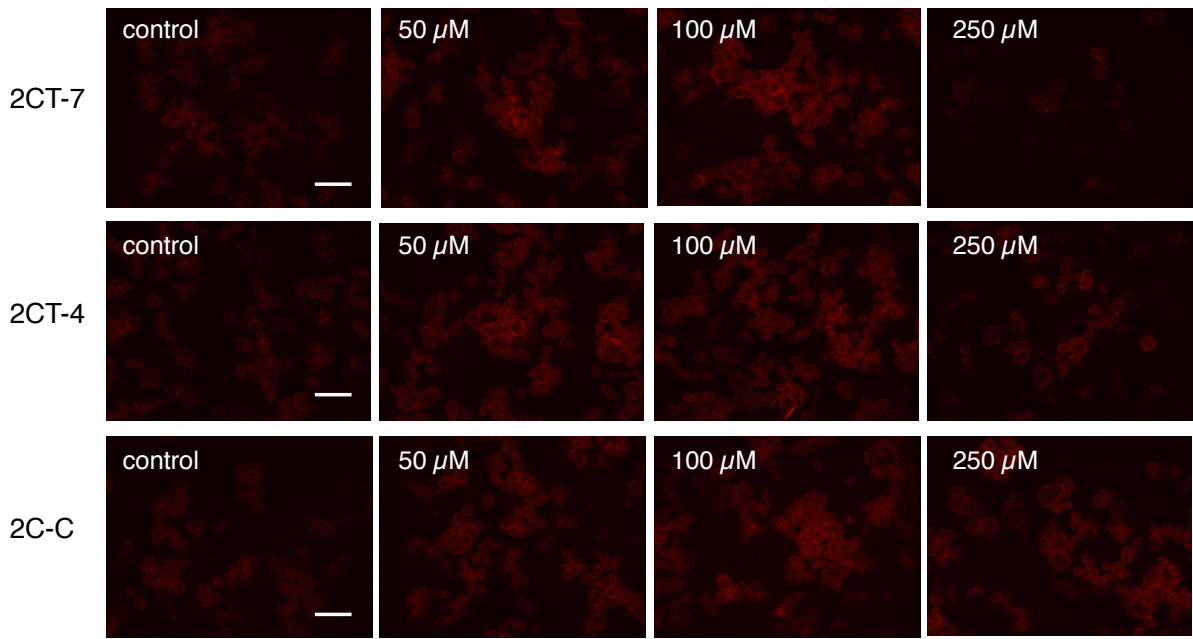


Fig. 3. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to 2CT-7, 2CT-4, or 2C-C (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHEt) staining (red). Scale bar = 100 μm . Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHEt signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.

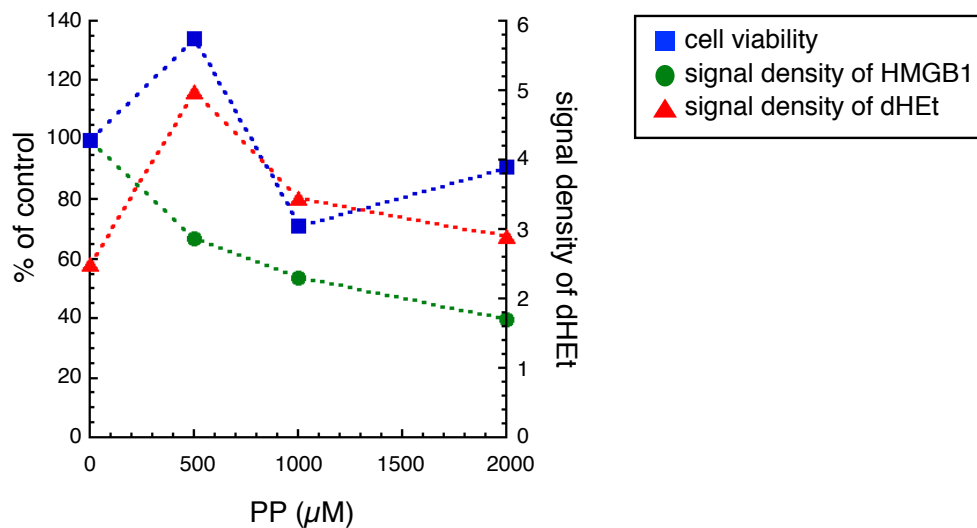
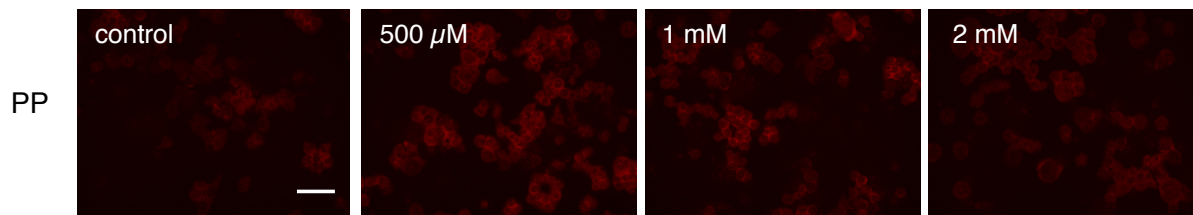


Fig. 4. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to PP (final concentration: 0, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHEt) staining (red). Scale bar = 100 μ m. Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHEt signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.

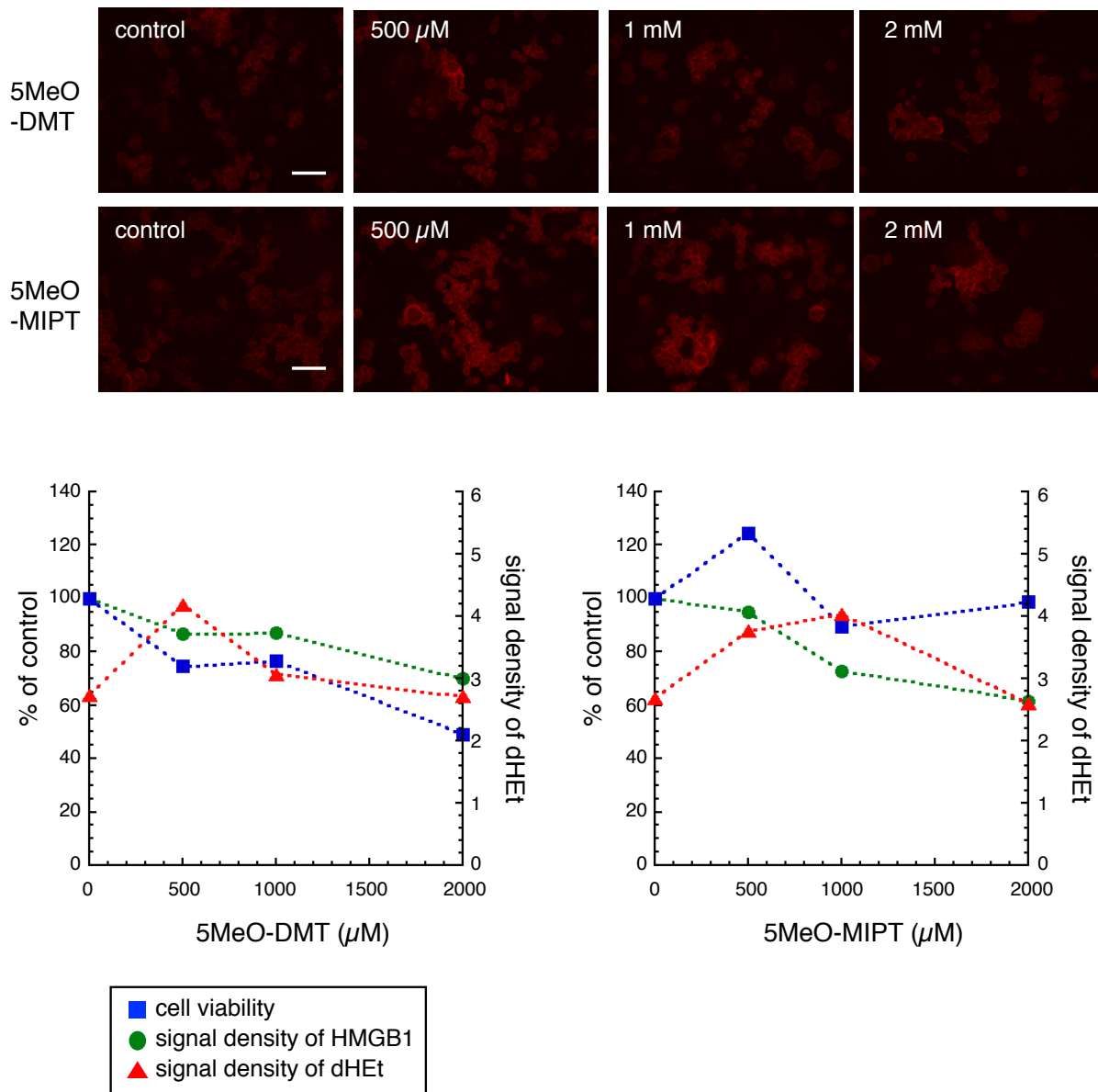


Fig. 5. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to 5MeO-DMT or 5MeO-MIPT (final concentration: 0, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHEt) staining (red). Scale bar = 100 μ m. Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHEt signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.

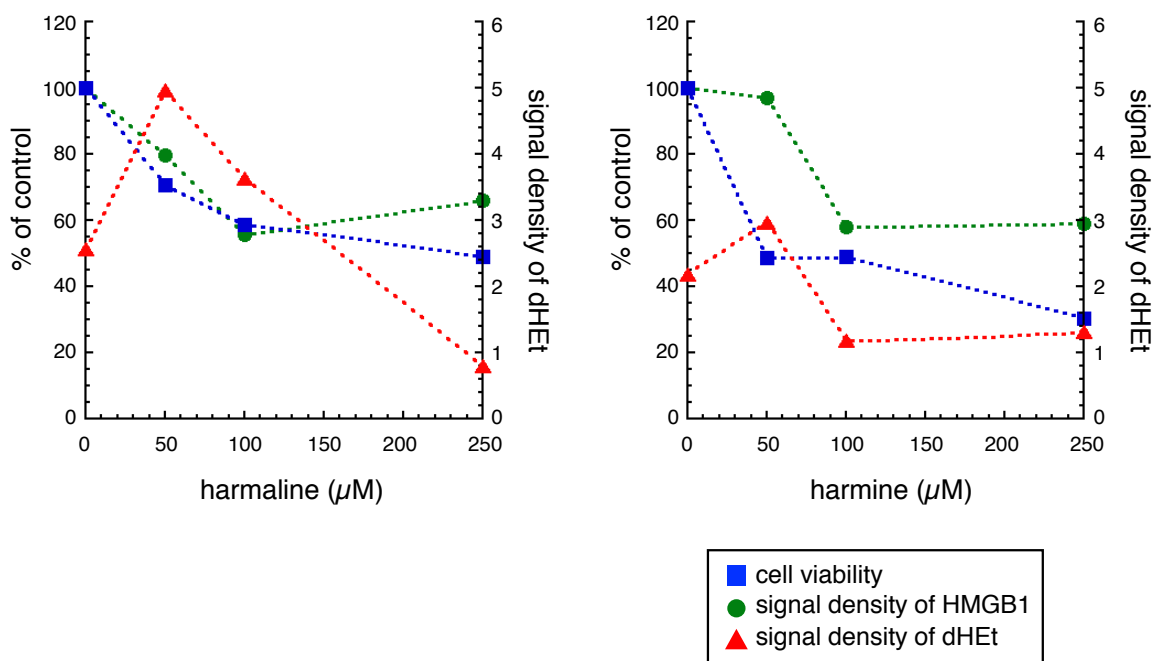
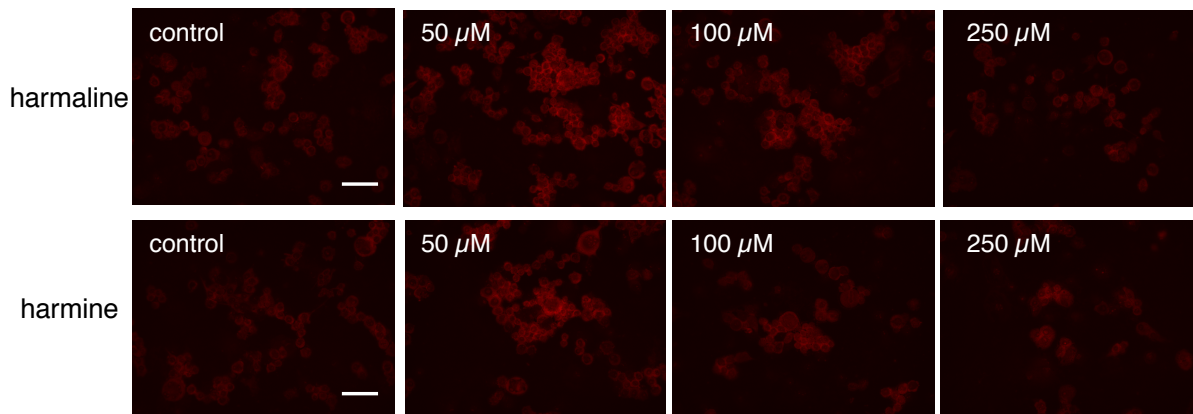


Fig. 6. Changes in superoxide production, HMGB1 release from nuclei, and cell viability in B65 cells exposed to harmaline or harmine (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of dihydroethidium (dHET) staining (red). Scale bar = 100 μm. Bottom: Combination graphs of cell viability, nuclear HMGB1 signals, and dHET signal density. Cell viability and HMGB1 signal density were expressed as percentage of control.