

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞より作成した機能的神経細胞を用いた危険ドラッグ の有害作用の評価

分担研究者：富山 健一（国立精神・神経医療研究センター）

協力研究者：船田正彦（湘南医療大学 薬学部 薬理学研究室）

【研究要旨】

[緒言] 危険ドラッグとして流通する麻薬類似物質の中樞神経作用や報酬効果などは、動物を用いた行動薬理学的な解析方法によって評価が可能となっている。一方で、ヒトに対する危険ドラッグの薬理(有害)作用の評価方法についてはまだ確立していない。特に、多数の薬物を一斉に評価する必要がある場合、ヒト由来の機能的培養細胞を用いた薬物スクリーニング法は、薬理作用や毒性の強度比較を同一条件下で迅速に実施することが可能である。そこで、本課題1年目では、ヒト由来ドパミン神経を用いて、細胞の機能的応答または毒性発現を指標とする危険ドラッグの新しい有害作用評価方法の確立を行う。

[結果] ヒト iPS 由来ドパミン神経および市販のヒトドパミン神経細胞を用いて、覚醒剤である methamphetamine および危険ドラッグである合成カチノンの神経細胞毒性について検討した。Methamphetamine および危険ドラッグである合成カチノンの添加によりヒト iPS 由来ドパミン神経および市販のヒトドパミン神経細胞は、いずれも濃度依存的に細胞毒性を発現した。

[考察] ヒト由来ドパミン神経を用いた神経細胞毒性評価は、感度が良くドパミン神経系を標的とする薬物の毒性評価に適していることが確認された。引き続き、危険ドラッグの薬理(有害)作用の評価に適したヒト由来ドパミン神経細胞の培養方法を検証していくことで、神経毒性だけでなく薬物の薬理作用に基づく機能評価にも応用可能であると考えられる。

A. 研究目的

危険ドラッグ（未規制物質）として、中樞興奮作用を有する合成カチノン系化合物等の新規化合物の流通が確認されている^{1,2)}。麻薬や覚醒剤と類似の作用を示すと考えられる未規制物質の中樞神経作用や報酬効果などは、動物を用いた行動薬理学的な解析方法によって評価が可能となっている。一方で、ヒトに対する危険ドラッグの薬理(有害)作用の評価方法についてはまだ十分に確立していない。特に、危険ドラッグの毒性発現については、

生物個体よりも培養細胞を用いる方が、動物愛護の観点と迅速なスクリーニング法の観点から望ましい。そこで、本課題では、新たにヒト iPS 細胞より麻薬類似物質の主要な標的細胞であるドパミン神経を作成し、細胞の機能的応答または毒性発現を指標とする危険ドラッグの新しい有害作用評価方法の確立を行う。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト iPS 細胞株 (HPS2478) は、理化学研究所バイオリソース研究センターより購入し、Easy iMatrix-511 (1.6 μ g/mL, Takara)を用いてコーティングした dish 上にて StemFit AK02N (Takara) で培養した。iCell ドパミン神経細胞 (FUJIFILM Cellular Dynamics) はプロトコルに従って培養した。

2. ヒト iPS 由来 dopaminergic neuron の誘導

StemXVivo Neural Progenitor Differentiation Kit (R&D Systems) のプロトコルに従い、ヒト iPS 細胞株 (HPS2478) より神経前駆細胞を作成した。Poly-L-ornithine と fibronectin でコーティングした 96 well plate を作成し、ヒト iPS 由来神経前駆細胞は、 5.0×10^4 で培養した。ドパミン神経の誘導は、StemXVivo Human/Mouse Dopaminergic Neuron Differentiation Kit (R&D Systems, 販売中止) のプロトコルを再現し、BrainPhys™ Neuronal Medium (STEMCELL Technologies) を基礎として、NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement (STEMCELL Technologies)、hFGF (100 ng/mL, Miltenyi Biotec)、hFGF8 (100 ng/mL, Miltenyi Biotec)、hBDNF (10 ng/mL, Miltenyi Biotec)、hSHH (200 ng/mL, FUJIFILM Wako Pure Chemical) および ascorbic acid (200 μ M/mL, Sigma-Aldrich) を添加した。2 日間ごとに培地を交換し、15 日間培養した。ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞は、4%PFA にて固定し、anti-TH (sc-7847, 1:100) および anti-MAP2 (MAB3418, 1:100) にて蛍光免疫染色を行った。

3. ヒト由来ドパミン神経細胞の毒性発現解析

ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞を用いて覚醒剤 (methamphetamine, METH) および合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone の神経毒性発現を比較した。それぞれの細胞は、培養 15 日目に BrainPhys™ Neuronal Medium+ SM1 に置き換え、培養条件を揃え 24 時間培養した。

翌日 methamphetamine を指定の濃度で添加して 24 時間培養した。細胞毒性の評価は、CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay kit (Promega)を使用した。薬物添加 24 時間後の細胞生存率を細胞毒性のマーカーとして解析した。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 由来 dopaminergic neuron の誘導

StemXVivo Neural Progenitor Differentiation Kit およびヒト iPS 細胞株 (HPS2478) を用いて神経前駆細胞の分化を行なった。培養 7 日目に SOX-1 陽性細胞を確認した (図 1)。本 NPC を用いてドパミン神経細胞の誘導を行い、培養 15 日目にドパミン神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) および神経マーカーである microtubule associated proteins 2 (MAP-2) の発現を確認した(図 2)。

2. ヒト由来ドパミン神経細胞毒性発現

METH、3-CMC 並びに dipentylone 処理 24 時間後にヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞の細胞生存率を評価した。METH、3-CMC 並びに dipentylone は、それぞれの細胞に対して濃度依存的に細胞生存率の低下を示した (図 3)。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞よりドパミン神経細胞の誘導を試み、市販のヒトドパミン神経細胞と機能を比較しながら、危険ドラッグの新しい評価系の基礎検討を行なった。ヒト iPS 細胞から神経前駆細胞を分化したところ、神経前駆細胞の主要なマーカーである SOX-1 陽性の細胞を得ることができた。この神経前駆細胞を用いてドパミン神経細胞の分化誘導を行ったところ、培養 15 日目でのヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞の自立発火を多点電極アレイ (MEA) 法で確認した (data not shown)。本細胞を用

いて、ドパミン神経細胞に対して細胞毒性を引き起こす依存性薬物の覚醒剤 (methamphetamine) および評価薬物として合成カチノンとして 3-CMC 並びに dipentylone の細胞毒性評価を行った。その結果、methamphetamine および 3-CM 並びに dipentylone は添加 24 時間後に、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞の細胞生存率を濃度依存的に低下させた。本結果から、ヒト細胞株からのドパミン神経に対する依存性薬物の毒性評価が可能となり、引き続き毒性発現メカニズムを解析していくことで、マウスの胎児より採取する初代培養神経細胞の代替法として活用できる可能性がある。依存性薬物の中でも methamphetamine や合成カチノン系化合物は、ドパミントランスポーター (DAT) の働きを阻害する³⁾。そこで iPS 由来ドパミン神経細胞の DAT 機能について、予備的に選択的阻害剤 GBR-12909 による DAT 取込み阻害作用を検討した。その結果、GBR-12909 による DAT 取込み阻害作用を確認した (data not shown)。引き続き、DAT 機能の評価方法を検討するとともに、今後は、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell ドパミン神経細胞からのドパミン分泌や vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) の発現も解析し、動物実験でモノアミンを測定するマイクロダイアリス法⁴⁾の補助または代替となり得るか検討する。また、危険ドラッグにおいては、セロトニン神経に作用して薬理作用を発現する薬物も存在する。最近、ヒト iPS 細胞から選択的なセロトニン神経の誘導方法が報告されてきた⁴⁾。引き続き、危険ドラッグ (未規制薬物) 評価のためのヒト由来ドパミン神経の最適な培養方法を探索するとともに、セロトニン神経においても培養を検討してく。

薬物の薬理作用を評価する上で、生体(個体)の行動薬理学評価は必須である。しかし、ヒトを対象とした未規制薬物の評価は現実的でなく、動物実験による評価が重要な役割を果たす。しかし、動物とヒトとの種間の差が

あることから、麻薬類似物質の主要な標的細胞であるドパミン神経を用いた評価系を確立することで、ヒトを反映した薬物特性の一端を収集可能になることが期待できる。

F. 参考文献

- 2) Kuroepka P, Zawadzki M, Szpot P. A review of synthetic cathinones emerging in recent years (2019-2022). *Forensic Toxicol.* 41: 25-46, 2023.
- 3) Barenholtz E, Krotulski AJ, Morris P, Fitzgerald ND, Le A, Papsun DM, Logan BK, Hahn WE, Goldberger BA, Cottler LB, Palamar JJ. Online surveillance of novel psychoactive substances (NPS): Monitoring Reddit discussions as a predictor of increased NPS-related exposures. *Int J Drug Policy.* 2021 Dec;98:103393. doi: 10.1016/j.drugpo.2021.103393. Epub 2021 Aug 5. PMID: 34365124; PMCID: PMC8671170.
- 4) Banks ML, Worst TJ, Rusyniak DE, Sprague JE. Synthetic cathinones ("bath salts"). *J Emerg Med.* 46: 632-42, 2014.
- 5) Lu J, Zhong X, Liu H, Hao L, Huang CT, Sherafat MA, Jones J, Ayala M, Li L, Zhang SC. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 34: 89-94, 2016.
- 6) Nakatsuka N, Heard KJ, Faillétaz A, Momotenko D, Vörös J, Gage FH, Vadodaria KC. Sensing serotonin secreted from human serotonergic neurons using aptamer-modified nanopipettes. *Mol Psychiatry.* 26: 2753-2763, 2021.
- 7) Holmes J, Lau T, Saylor R, Fernández-Novel N, Hersey M, Keen D, Hampel L, Horschitz S, Ladewig J, Parke B, Reed MC, Nijhout HF, Best J, Koch P, Hashemi P. Voltammetric Approach for Characterizing the Biophysical and

Chemical Functionality of Human Induced
Pluripotent Stem Cell-Derived Serotonin
Neurons. Anal Chem. 94: 8847-8856, 2022.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 22) 富山健一, 船田正彦：新規合成オピオイド isotonitazene の薬理学的特性の解析,
2023 年度アルコール・薬物依存関連学
会合同学術総会, 岡山, 2023 年 10 月
13-15 日.

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

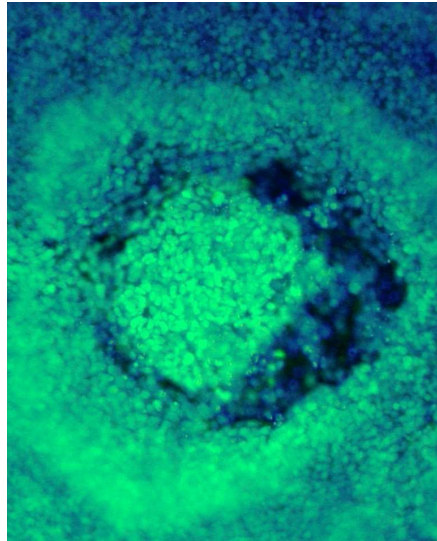


Fig. 1. Differentiation of induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. After 7 days of differentiation, cells were imaged using a microscope Biozero (Keyence). The human induced pluripotent stem cells were differentiated into neural progenitor cells using the media supplements included in this kit. After 7 days of differentiation, cells were imaged using brightfield microscopy. Cells demonstrate rosette formation characteristic of neural progenitor cells in culture. To evaluate lineage commitment, the cells were stained with the anti-Human SOX1 antibody (green).

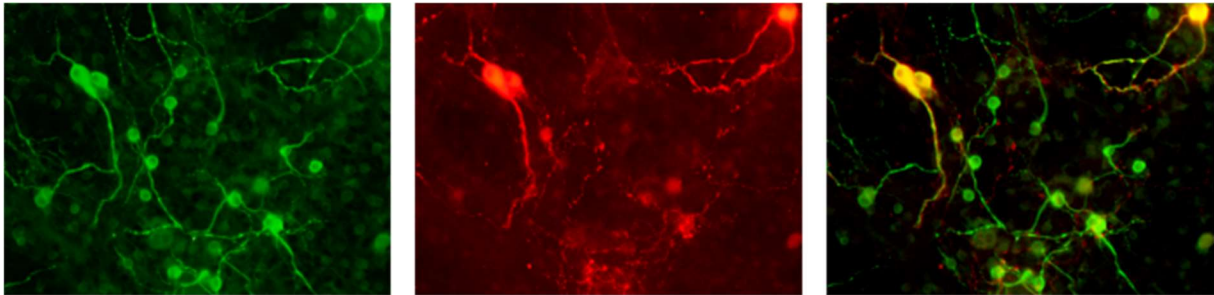


Fig. 2. Characterization of Dopaminergic Neurons Generated from Human Pluripotent Stem Cells. Dopaminergic neurons were generated from human pluripotent stem cells as described methods. MAP-2 was detected using Anti-MAP2 Monoclonal Antibody (Merck, Catalog # MAB3418, 1:100; green). Tyrosine Hydroxylase was detected using Mouse Anti-Human Tyrosine Hydroxylase Monoclonal Antibody (Santa Cruz, Catalog # sc-7847, 1:100; red).

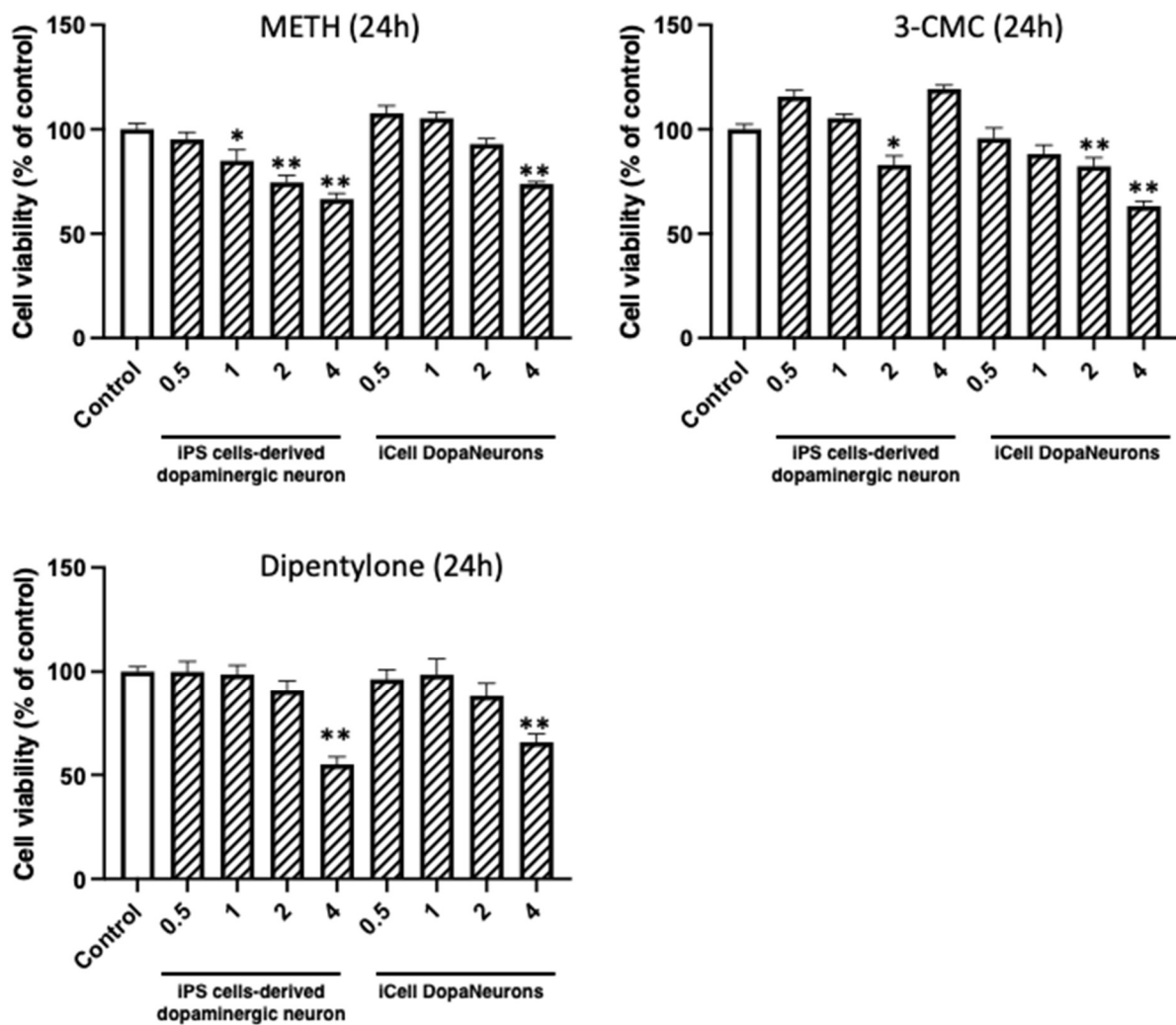


Fig.3. Cell viability in iPS cells-derived dopaminergic neurons and iCell DopaNeurons after treatment with methamphetamine, 3-CMC and dipentylone.

The relative value of cell viability compared to the baseline value for control and iPS cells-derived dopaminergic neurons/iCell DopaNeurons treated with methamphetamine (METH, 0.5-4 mM), 3-CMC (0.5-4 mM) and dipentylone (0.5-4 mM) for 24 h. Mean percent changes \pm S.E.M. are shown. Statistical significance was evaluated with one-way analysis of variance. The Dunnett's multiple comparison test was used to determine significant differences in the percentage of cells showing cell viability from that observed in controls at the 24 h time point. * p <0.05, ** p <0.01 vs. control.