

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）

【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や覚醒剤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手法によって解析が可能となっている。一方で、ヒトを想定した危険ドラッグの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 2 年目では、ヒト由来ドパミン神経を用いて、細胞の毒性発現および機能的変化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検討を行った。

[結果] ヒト iPS 細胞より誘導したドパミン神経および市販のヒトドパミン神経細胞 (iCell® DopaNeurons) を用いて、覚醒剤 (methamphetamine) および危険ドラッグ合成カチノン N-ethylheptedrone の神経細胞毒性、DAT 取込み阻害作用およびドパミンの遊離作用について検討した。Methamphetamine 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神経細胞の減少を引き起こした。市販のヒトドパミン神経細胞において、methamphetamine (10 μ M) および N-ethylheptedrone (10 μ M) の処理によって有意な DAT 取込み阻害作用が認められた。ドパミンの遊離作用については、methamphetamine (10 μ M) の処理によって市販のヒトドパミン神経細胞より有意なドパミン濃度の増加を確認した。

[考察] ヒト iPS 細胞より誘導したドパミン神経および市販のヒトドパミン神経細胞 (iCell® DopaNeurons) を用いた神経細胞毒性評価は、マウス forebrain 由来の神経細胞と同様に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。ヒトドパミン神経細胞 (iCell® DopaNeurons) においては、覚醒剤や合成カチノンの標的となる DAT の取込み阻害作用と methamphetamine によるドパミンの分泌促進作用も認められたことから、評価に適した細胞であると考えられる。引き続き、危険ドラッグの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条件等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有害作用の評価方法に

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適している。ヒトへの影響を想定し、本課題では、ヒト iPS 細胞より覚醒剤類似物質や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、細胞の毒性発現または機能的応答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. ヒト iPS 由来 dopaminergic neuron の誘導

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 $\mu\text{g/mL}$, Takara)を用いてコーティングした 6 well plate (IWAKI AGC Techno glass co., Ltd.)にて StemFit AK02N (Takara) で培養した。一度継代を行い、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 (Sigma-Aldrich) と Corning® フィブロネクチン (Corning)でコーティングした 96 well plate (greiner, REF655090) に 1.0×10^5 cells/well または 24 well plate (IWAKI, AGC TECHNO GLASS Co., Ltd.) に 5.0×10^5 cells/well となるようヒト iPS 由来神経前駆細胞を培養した。ドパミン神経の誘導は、StemXVivo Human/Mouse Dopaminergic Neuron Differentiation Kit (R&D Systems) のプロトコルを参考に、BrainPhys™ Neuronal Medium (STEMCELL Technologies) を基礎として、NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplementb (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 $\mu\text{M/mL}$, Sigma-Aldrich) を添加した。2 日間ごとに培地を交換し、21 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。

2. iCell®ドパミン神経細胞の培養

iCell®ドパミン神経細胞 (FUJIFILM Cellular Dynamics) はプロトコルに従って、96 well plate (greiner) に 1.0×10^5 cells/well または 24 well plate (IWAKI, AGC TECHNO GLASS Co., Ltd.) に 5.0×10^5 cells/well で調製し 21 日間培養した。

3. マウス初代培養の評価

胎生 15 日目の新生胎児より forebrain を切り出し氷冷した Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies)に入れ、組織の洗浄を行った。その後、脳組織は Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) および gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec)に移し、プロトコルに従って脳組織のホモジネーションを行った。組織懸濁液は、MACS Neuro Medium (with NeuroBrew-21, 2 mM L-glutamine; Miltenyi Biotec)で懸濁した。細胞懸濁液を BD Falcon™ セルストレーナー (BD Falcon Biosciences)で濾過し、未消化の組織や細胞塊を除去した。得られた細胞懸濁液は、poly-L-lysine コートした 96 well black plate (Greiner)に 1.0×10^5 cells/well で撒き、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{ CO}_2$ 条件下で 2 日間培養した。MACS Neuro Medium (with 10 μM cytosine arabinoside, NeuroBrew-21, 2 mM L-glutamine)に置換して 24 時間培養した。Cytosine arabinoside 含有 MACS Neuro Medium を除去し、MACS Neuro Medium にて細胞を維持し、14 日目に神経細胞毒性試験を行った。

4. ヒトおよびマウス由来神経細胞の毒性発現解析

ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞 (培養 21 日目)、iCell®ドパミン神経細胞 (培養 21 日目) およびマウス由来神経細胞 (培養 14 日目) を

用いて覚醒剤 (methamphetamine, METH) ならびに合成カチノン N-ethylheptedrone の神経毒性発現を比較した。それぞれの細胞は、METH および N-ethylheptedrone 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。

5. DAT 取込み阻害作用

96 well plate に 1.0×10^5 で培養したヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞 (培養 21 日目)、iCell® ドーパミン神経細胞 (培養 21 日目) およびマウス由来神経細胞 (培養 14 日目) に DAT 選択的阻害薬 GBR-12909 (Sigma-Aldrich)、METH および N-ethylheptedrone を添加し 10 分間 37°C でインキュベーションした。その後 Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit (Molecular Devices) のプロトコルに従って DAT に対する取込み阻害作用を解析した。データは蛍光強度 (Relative Fluorescence Units, RFU) として解析した。

本 kit はアミン系の神経伝達物質に類似した蛍光物質を使用しており、モノアミントランスポーターにより細胞内に取り込まれるため、細胞内における蛍光量の増加を測定することで DAT の取込み能力が評価可能となっている。

6. ドーパミンリリースの測定

24 well plate に 5.0×10^5 で培養したヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞 (培養 21 日目) および iCell® ドーパミン神経細胞 (培養 21 日目) にドーパミン遊離作用を有する METH (10 μ M) を添加し 30 分間 37°C でインキュベーションした。その後、培養上澄液を回収し、Dopamine Elisa Kit (Abcam, ab285238) のプロトコルに従ってドーパミン濃度を測定した。

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 A)。本神経前駆細胞を用いてドーパミン神経細胞の誘導を行い、培養 21 日目にドー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 1C-D)。

2. 神経細胞の毒性発現解析

METH (1-4 mM) および N-ethylheptedrone (0.25-1 mM) 処理 24 時間後にヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞、iCell® ドーパミン神経細胞およびマウス由来神経細胞の細胞生存率を評価した。METH および N-ethylheptedrone 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 2)。

3. DAT の阻害作用評価

ヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞、iCell® ドーパミン神経細胞およびマウス由来神経細胞に GBR-12909、METH および N-ethylheptedrone を処理し、取込み阻害作用を確認した。ヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞において、取込み阻害作用を示す GBR-12909 を処理したところ、1 μ M 濃度で有意な阻害作用を示した (図 3A)。METH と N-ethylheptedrone による取込み阻害作用は認められなかった (図 3A)。iCell® ドーパミン神経細胞では、1 μ M 濃度の GBR-12909 と 10 μ M 濃度の N-ethylheptedrone において有意な阻害作用を示した (図 3B)。一方、マウス由来神経細胞では、いずれの化合物においても取込み阻害作用は認められなかった (図 3C)。ヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞、iCell® ドーパミン神経細胞およびマウス由来神経細胞で神経伝達物質に類似した蛍光物質の取込み量を比較したところ、iCell® ドーパミン神経細胞が最も DAT 取込み作用を示した (図 3D)。

4. ドパミンリリースの解析

ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell®ドパミン神経細胞に METH (10 μ M) を処理し、細胞からのドパミンの遊離量を ELISA で測定した。METH は、iCell®ドパミン神経細胞から有意なドパミンの遊離を引き起こした (図 4)。

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 iCell®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。ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞は最大で 21 日間培養し、ドパミン神経マーカーである TH 陽性細胞が認められた。市販の iCell®ドパミン神経細胞は付属のプロトコルに従って培養を行った。陽性対象として、神経毒生を誘発することが確認できているマウス胎児由来神経細胞の初代培養を行った³⁾。これらの細胞を用いて、覚醒剤 (methamphetamine) と合成カチノン N-ethylheptedrone の毒性評価を行った。その結果、methamphetamine と N-ethylheptedrone は添加 24 時間後に、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞、iCell®ドパミン神経細胞およびマウス初代培養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、ヒト由来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⁴⁾。そこで、DAT 選択的阻害剤

GBR-12909、methamphetamine および N-ethylheptedrone による DAT 取込み阻害作用を検討した。その結果、iCell®ドパミン神経細胞において GBR-12909 および N-ethylheptedrone による DAT 取込み阻害作用を確認した。ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞では GBR-12909 の阻害作用が認められた。一方で、マウス初代培養神経細胞では、いずれの化合物も取込み阻害作用を示さなかった。今後は、ヒト iPS 由来ドパミン神経細胞および iCell®ドパミン神経細胞の培養条件を調整することで、危険ドラッグによるヒト神経細胞を想定した DAT 取込み阻害作用の評価が可能になると考えられる。ドパミンの分泌作用については、iCell®ドパミン神経細胞において METH 刺激による応答が確認できた。引き続き、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シス法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⁵⁻⁷⁾。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いく。

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) Pieprzyca E, Skowronek R, Czekaj P. Toxicological Analysis of Cases of Mixed Poisonings with Synthetic Cathinones and Other Drugs of Abuse. *J Anal Toxicol.* 46: 1008-1015, 2023.
 - 4) Tomiyama K, Funada M. 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, 2014.
 - 5) Banks ML, Worst TJ, Rusyniak DE, Sprague JE. Synthetic cathinones ("bath salts"). *J Emerg Med.* 46: 632-42, 2014.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Holmes J, Lau T, Saylor R, Fernández-Novet 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

- 1) 富山健一，船田正彦：新規合成オピオイド系化合物の薬理作用の評価について，2024 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，砂防会館 シェーンバッハ・サボー，2024 年 9 月 21 日.
- 2) 二井信行，長谷川翔大，辻野南，高野温，富山健一，船田正彦：危険ドラッグの迅速包括検出のためのモバイル細胞培養デバイス，2024 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，砂防会館 シェーンバッハ・サボー，2024 年 9 月 20 日.
- 3) 富山健一，船田正彦：危険ドラッグに含まれる大麻成分 THC 類似物質の薬理学的特性の解析，2024 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，砂防会館 シェーンバッハ・サボー，2024 年 9 月 19 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

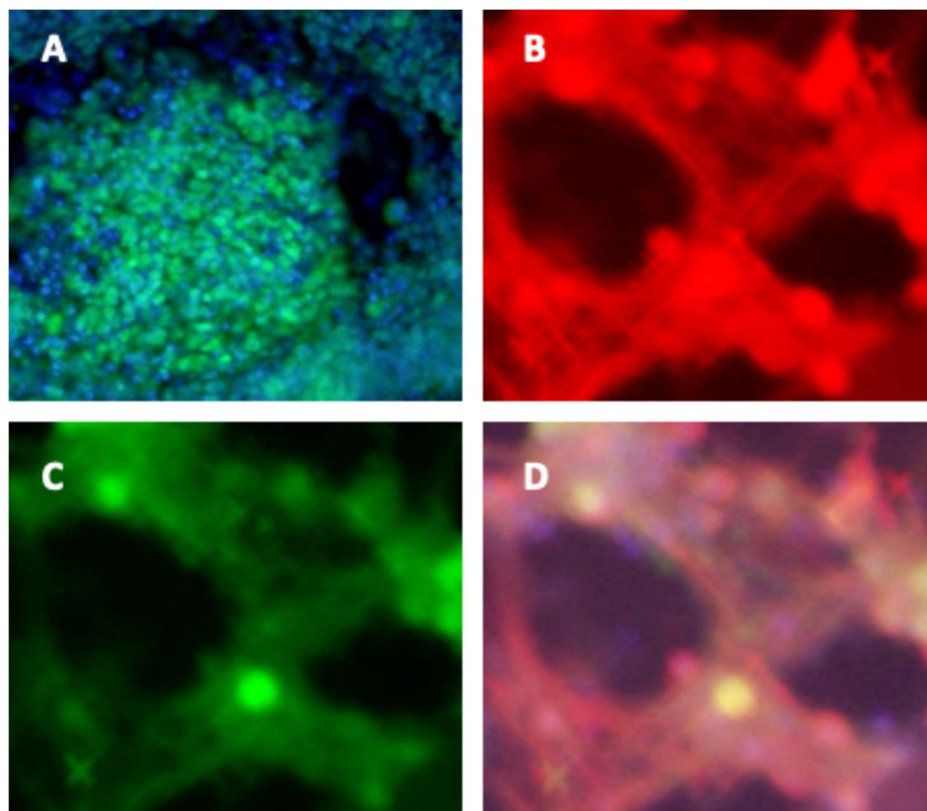


Fig. 1. Differentiation of induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. (A) To evaluate lineage commitment, the cells were stained with the anti-Human SOX1 antibody (green). Characterization of Dopaminergic Neurons Generated from Human Pluripotent Stem Cells. Dopaminergic neurons were generated from human pluripotent stem cells as described methods. (B) MAP-2 was detected using Anti-MAP2 Monoclonal Antibody (Merck, Catalog # MAB3418, 1:100; red). (C) Tyrosine Hydroxylase was detected using Mouse Anti-Human Tyrosine Hydroxylase Monoclonal Antibody (Santa Cruz, Catalog # sc-7847, 1:100; green). (D) dual staining cells with DAPI.

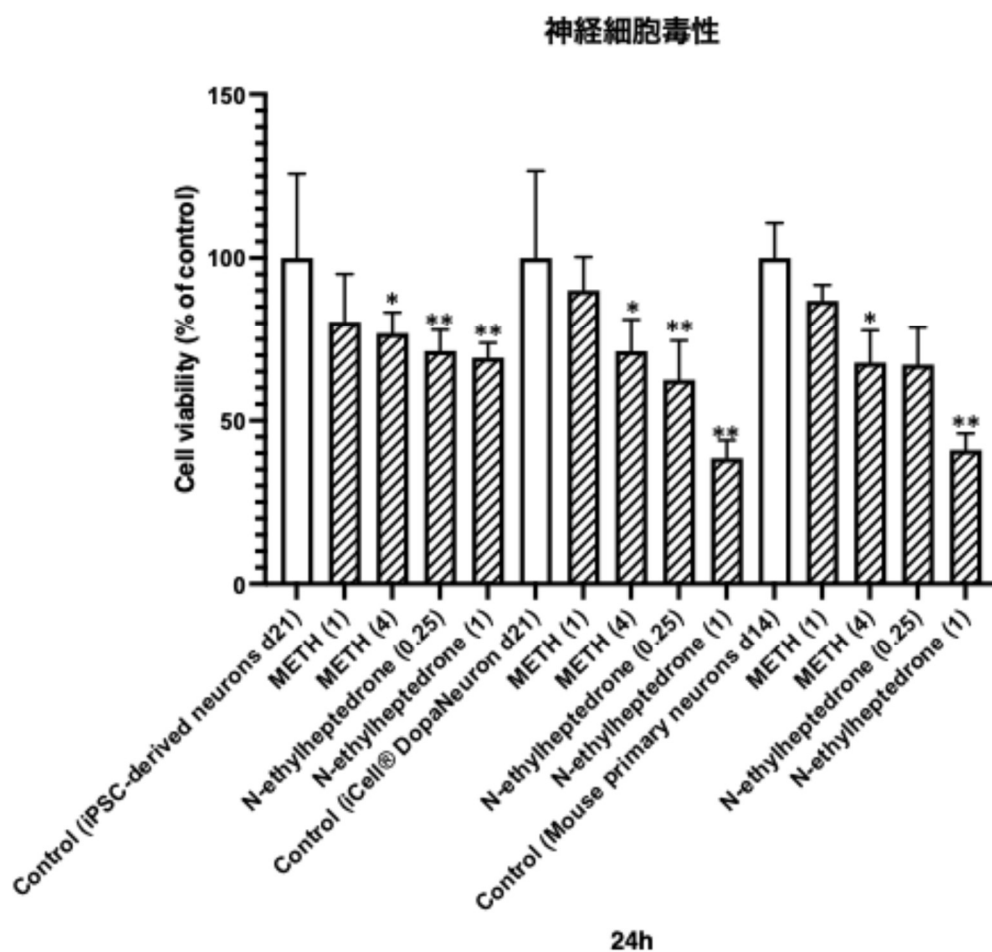


Fig.2 Cell viability in iPS cells-derived dopaminergic neurons, iCell® DopaNeurons and mouse forebrain cultures after treatment with methamphetamine and N-ethylheptedrone.

The relative value of cell viability compared to the baseline value for control and iPS cells-derived dopaminergic neurons, iCell® DopaNeurons and mouse forebrain cultures treated with methamphetamine (METH, 1-4 mM) and N-ethylheptedrone (0.25-1 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.

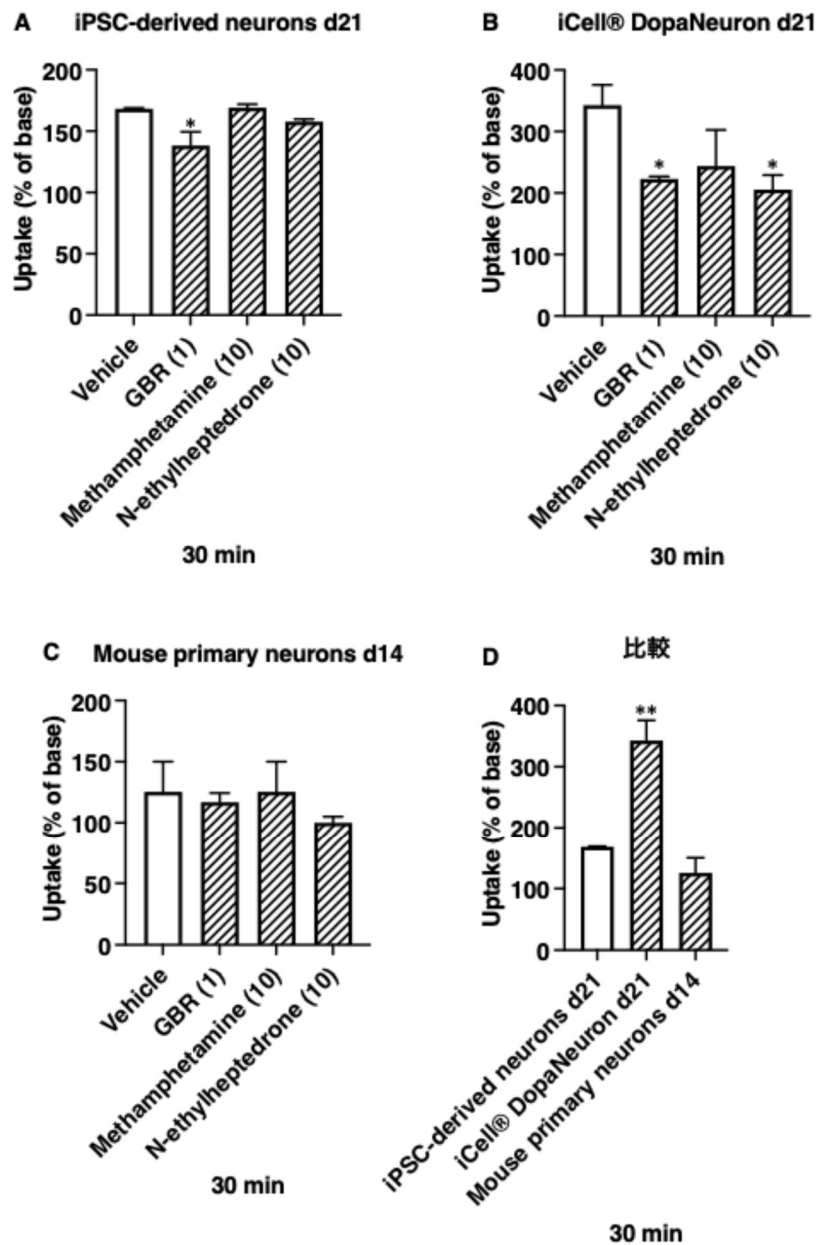


Fig. 3. Inhibitory effect of GBR, methamphetamine and N-ethylheptedrone on neurotransmitter transporter uptake at DAT in iPS cells-derived dopaminergic neurons, iCell® DopaNeurons and mouse forebrain cultures. DA uptake assay was used DAT selective inhibitor GBR12909 (1 μ M), methamphetamine (10 μ M) or N-ethylheptedrone (10 μ M). (A) iPS cells-derived dopaminergic neurons, (B) iCell® DopaNeurons, (C) mouse forebrain cultures or (D) Comparison of the inhibitory effects of DAT on 3 different types of cells. Data point depicted represents the mean of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 vs. control.

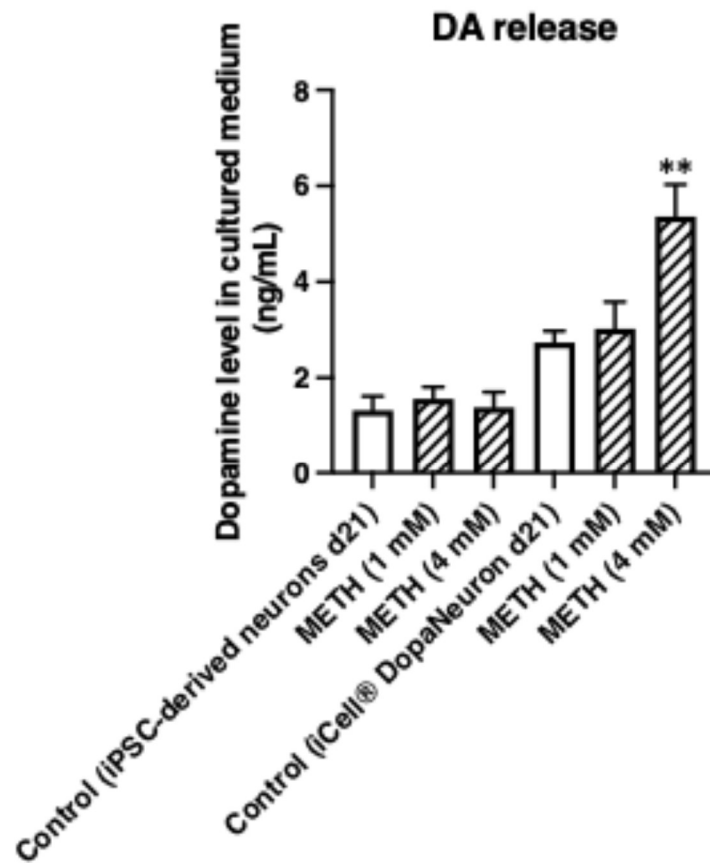


Fig. 3. Effect of methamphetamine on dopamine release from iPS cells-derived dopaminergic neurons and iCell® DopaNeurons.

Dopamine release was detected in response to 1-4 mM methamphetamine stimulation. Data point depicted represents the mean of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.