

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は、動物を用いた行動薬理学的手法により解析されてきた。一方で、ヒトを想定した危険ドラッグの有害作用を評価する方法は、いまだ十分には確立されていない。特に、多数の薬物を一斉に評価する必要がある場合には、神経機能を模倣した安定発現細胞株を用いることで、薬理作用や毒性の強度比較を同一条件下で迅速に実施できる効率的なスクリーニング系となり得る。しかしながら、その結果がヒト由来神経細胞で得られる結果と一致するかについては十分に明らかになっていない。そこで本研究では、ドパミンおよびセロトニン神経を標的とした培養系を確立し、危険ドラッグの薬理作用評価法について検討した。

[方法] ドパミン神経系の評価には、ヒト由来ドパミン神経細胞 (iCell® DopaNeurons) を使用した。セロトニン神経系については、*in vitro* における評価系に関する情報が限られていることから、セロトニン神経を含有することが報告されているラット由来 raphe 領域初代培養を用い、セロトニン機能の評価が可能か検討した。覚醒剤 methamphetamine (METH) および危険ドラッグである合成カチノン α -PVP、MDPV を用い、神経細胞毒性、DAT 取込み阻害作用およびドパミン遊離作用を評価した。また、セロトニン機能として SERT 取込み阻害作用およびセロトニン遊離作用について検討した。

[結果] ヒトドパミン神経細胞に METH、 α -PVP および MDPV を添加したところ、24 時間後にはいずれの化合物においても濃度依存的な神経細胞数の減少が認められた。ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経において、METH、 α -PVP および MDPV の処理により、いずれも有意な DAT 取込み阻害作用が認められた。ドパミン遊離作用については、1 μ M の METH 処理により有意な増加が確認されたが、合成カチノンでは有意な増加は認められなかった。セロトニン神経系の評価として、セロトニン神経を含有するラット由来 raphe 領域培養を用いた基礎評価を行った。細胞免疫染色の結果、TPH2 陽性細胞が確認され、本培養系がセロトニン神経を含有する共培養系であることが示された。METH および fluoxetine 処理による SERT 取込み阻害作用については抑制傾向が認められた。また、セロトニン遊離については、fluoxetine 処理 24 時間後に有意な増加が認められた。

[考察] ヒト由来ドパミン神経細胞を用いた神経細胞毒性評価では、既報のマウス forebrain 由来神経培養系と同様に、ドパミン神経系を標的とする薬物の毒性評価が可能であることが確認された。また、METH や合成カチノンの標的である DAT に対する取込み阻害作用が認められ、さらに METH によるドパミン遊離促進作用も確認されたことから、本細胞系はヒトを想定した薬理作用評価に適用可能であると考えられる。一方、DAT 取込み阻害作用の評価については、強制発現系の安定発現細胞株の方が感度に優れる可能性がある。したがって今後は、ヒト由来ドパミン神経細胞の培養条

件の最適化や、適切な細胞評価系を組み合わせることで、神経毒性評価だけでなく薬理作用に基づく機能評価への応用が期待される。セロトニン神経系については、ラット由来 raphe 領域培養を用いた機能評価を実施した。TPH2 陽性細胞が確認されたことからセロトニン神経を含有する培養系であることは示されたが、SERT 取込み阻害作用およびセロトニン遊離については薬物間で顕著な差は認められなかった。今後は培養条件の最適化を進めるとともに、SERT やセロトニン受容体を標的とする薬物評価系としての有用性について、さらに検証を進める必要がある。

A. 研究目的

近年、危険ドラッグ（未規制物質）として流通する麻薬類似物質や覚醒剤類似物質が世界的に増加しており、特に合成カチノン類をはじめとする危険ドラッグは次々と出現している^{1,2)}。これらの物質はドパミンやセロトニンなどのモノアミン神経系に作用し、中枢神経興奮作用や依存性を示すことが知られている。

これまで、危険ドラッグの中枢神経作用や報酬効果の評価には主として動物を用いた行動薬理学的手法が用いられてきた。しかしながら、新規物質が短期間に多数出現する現状においては、動物実験のみで迅速に薬理作用や有害性を評価することは困難である。

一方、神経機能を模倣した培養細胞を用いる *in vitro* 評価系は、薬理作用や毒性の強度を同一条件下で比較できるため、多数の薬物を迅速に評価するスクリーニング手法として有用であると考えられる。しかしながら、これらの評価系がヒト神経系の反応をどの程度反映するかについては十分に検証されていない。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞およびラット由 raphe 領域培養を用いたセロトニン神経培養系を構築し、危険ドラッグおよび覚醒剤を対象として、神経細胞毒性ならびにモノアミントランスポーター機能 (DAT、SERT) およびモノアミン遊離作用を指標とした *in vitro* 評価系の有用性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. iCell® ドパミン神経細胞の培養

ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞 iCell® DopaNeurons (FUJIFILM Cellular Dynamics) を使用した。培養はメーカーのプロトコルに従い、poly-L-lysine コートした 96 well black plate (greiner) に 5.0×10^4 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 21 日間培養した。培地は 2 日ごとに半量交換した。

2. ラット由来 raphe 領域初代培養

ラット由来 raphe 領域神経細胞 Rat Neurons-raphé (Catalog No.R1510, ScienCell Research Laboratories, Inc.) を使用した。細胞懸濁液を poly-L-lysine コートした 96 well black plate (greiner) に 1.0×10^5 cells/well で播種し、37°C・5% CO₂ 条件下で培養した。培養には MACS Neuro Medium (NeuroBrew-21, GlutaMAX) を使用し、21 日間培養した。培地は 2 日ごとに半量交換した。

3. 細胞免疫染色による神経細胞の評価

各培養細胞は培養培地を除去後、PBS で洗浄し 4% paraformaldehyde (PFA) で固定した。固定後、PBS 中 0.1% Triton X-100 を用いて透過処理を行い、室温で 10 分間静置した。一次抗体として anti-TH (sc-7847, 1:100)、anti-MAP2 (MAB3418, 1:100)、Alexa Fluor® 488 Anti-Synapsin I 抗体 (EPR23531, 1:100)、Anti-TPH2 (AMAB91108, 1:100) を 4°C・24 時間処理した。PBS で 3 回洗浄後に、蛍光標識された 2 次抗体を室温 30 分間反応させた。抗体の検出は BioZERO (Keyence) を用いて実施した。

4. iCell® DopaNeurons 細胞の毒性発現解析

培養 21 日目の iCell® DopaNeurons を用いて、覚醒剤 methamphetamine (METH) および合成カチノン α -PVP、MDPV の神経毒性を比較した。各薬物を指定濃度で添加し 24 時間処理した。細胞毒性は CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて評価し、薬物添加 24 時間後の細胞生存率を指標として解析した。

5. DAT および SERT 取込み阻害作用

96 well plate に 5.0×10^4 cells/well で培養した iCell® DopaNeurons (培養 21 日目) およびラット由来 raphe 領域培養細胞に DAT 選択的阻害薬 GBR-12909 (Sigma-Aldrich)、SERT 選択的阻害薬 Fluoxetine (Sigma-Aldrich)、METH ならびに合成カチノン α -PVP、MDPV を添加し 10 分間または 120 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) のプロトコルに従い、DAT または SERT に対する取込み阻害作用を測定した。データは蛍光強度 (Relative Fluorescence Units, RFU) として解析した。

6. モノアミンリリースの測定

培養 21 日目の iCell® ドパミン神経細胞に METH (0.1–100 μ M) を添加し、37°C で 30 分インキュベーションした。培養上清を回収し Dopamine ELISA Kit (Abcam, ab285238) を用いてドパミン濃度を測定した。96 well plate に 5.0×10^4 で培養したラット由来 raphe 領域初代培養にセロトニン遊離作用を有する METH (0.1–100 μ M) または Fluoxetine (0.01–10 μ M) を添加し 24 時間 37°C でインキュベーションした。また、ラット由来 raphe 領域初代培養に METH (0.1–100 μ M) または fluoxetine (0.01–10 μ M) を添加し、37°C で 24 時間インキュベーションした。培養上清中のセロトニン濃度を Serotonin ELISA Kit (Abcam, ab133053) を用いて測定した。

C. 研究結果

1. 細胞免疫染色による神経細胞の評価

培養 21 日目の iCell® DopaNeurons において、ドパミン神経マーカー tyrosine hydroxylase (TH) に加え、神経細胞マーカー microtubule-associated protein 2 (MAP-2) および Synapsin I の発現を認めた (Fig. 1)。また、ラット由来 raphe 領域神経細胞 (Rat Neurons-raphé) の培養 21 日目において、セロトニン神経マーカー tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) と MAP-2 および Synapsin I の発現を確認した (Fig. 2)。

2. 神経細胞の毒性発現解析

iCell® DopaNeurons を用いて、METH、 α -PVP、MDPV の神経毒性を評価した。その結果、METH は 4 mM の濃度範囲において、 α -PVP と MDPV はそれぞれ 250 μ M 以上において、24 時間処理後に細胞生存率の低下が認められた (Fig. 3A-C)。

3. DAT および SERT 取込み阻害作用

iCell® DopaNeurons に GBR-12909、METH、 α -PVP、MDPV を処理し、DAT 取込み阻害作用を評価した。その結果、GBR-12909 (1 μ M) および METH、 α -PVP、MDPV (100 μ M) において有意な取込み阻害作用が認められた (Fig. 4A-C)。一方、ラット由来 raphe 領域神経細胞 Rat Neurons-raphé を用いた SERT 取込み阻害評価では、陽性対象 fluoxetine (1 μ M) および METH (100 μ M) のいずれにおいても有意な阻害作用が認められた (Fig. 4D)。

4. モノアミンリリースの解析

iCell® DopaNeurons に METH および合成カチノン α -PVP、MDPV を処理し、細胞からのドパミン遊離量を ELISA により測定した。その結果、METH は 1 μ M の濃度で iCell® DopaNeurons から有意なドパミン遊離を誘導した (Fig. 5A)。一方、 α -PVP、MDPV では 100 μ M までの濃度範囲において有意なドパミン遊離は認められなかった (Fig. 5BC)。こ

これらの結果は、本評価系がモノアミントランスポーターに対する薬物作用様式（トランスポーター基質型および阻害型）の違いを識別可能であることを示唆する。また、ラット由来 raphe 領域初代培養に fluoxetine および METH を処理し、24 時間後の培養上清中セロトニン濃度を測定した。その結果、fluoxetine は 0.1–10 μM の濃度範囲で有意なセロトニン量の増加を示したのに対し、METH では 100 μM までの濃度範囲において有意な変化は認められなかった (Fig. 6AB)。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経細胞 (iCell® DopaNeurons) およびラット由来 raphe 領域神経細胞 (Rat Neurons-raphe) を用いて、危険ドラッグおよび覚醒剤のモノアミン神経系に対する作用を *in vitro* で評価した。細胞免疫染色の結果、iCell® DopaNeurons においてドパミン神経マーカーである TH に加え、神経細胞マーカー MAP-2 およびシナプス前終末マーカー Synapsin I の発現が認められた。これらの所見から、本培養系にはドパミン神経を含む神経細胞が存在し、神経ネットワークが形成されていることが示唆された。また Rat Neurons-raphe においてはセロトニン神経マーカー TPH2 と Synapsin I の発現が確認され、セロトニン神経を含む神経培養系であることが示された。以上の結果から、本培養系ではドパミン神経およびセロトニン神経を含む神経細胞が成熟し、神経突起形成およびシナプス関連タンパクの発現を伴う神経ネットワークが形成されている可能性が示唆された。神経毒性評価では、METH は mM オーダー、 α -PVP および MDPV は 250 μM 以上の濃度で細胞生存率の低下を引き起こした。これらの結果は、METH や合成カチノンが高濃度条件下で神経毒性を示すことを報告した既存研究と概ね一致する結果であり、本培養系が薬物による神経毒性の評価系として利用可能であることが示唆された^{3,4)}。DAT 取込み阻

害試験では、陽性対照である GBR-12909 に加え、METH、 α -PVP、MDPV において有意な DAT 取込み阻害作用が確認された。これらの薬物はいずれもドパミントランスポーターに作用することが知られており、本評価系が DAT 機能を反映した評価系として機能していることが示された。さらにモノアミン遊離試験では、METH により濃度依存的なドパミン遊離が認められた一方、 α -PVP および MDPV では有意なドパミン遊離は認められなかった。METH は DAT を介した逆転輸送を誘導するトランスポーター基質型薬物であるのに対し、 α -PVP や MDPV は主として DAT 阻害作用を示すトランスポーター阻害型薬物であることが知られている^{5,6)}。本研究結果はこれらの薬理作用様式の違いと一致しており、iCell® DopaNeurons を用いた評価系がモノアミントランスポーターに対する薬物作用様式の違いを識別可能であることが示唆された。一方、セロトニン神経系では Rat Neurons-raphe を用いた評価において fluoxetine により有意なセロトニン濃度の増加が認められたことから、本培養系が少なくとも SERT 阻害作用を反映する評価系として機能する可能性が示された。一方で METH では有意なセロトニン増加は認められなかったことから、本評価条件ではセロトニン遊離を十分に検出できていない可能性も考えられる。今後は培養条件や評価時間の最適化を行うことで、セロトニン神経系に対する薬物作用評価系としての有用性をさらに検討する必要がある^{7,8)}。

以上の結果から、本研究で用いたヒト由来ドパミン神経細胞およびラット由来 raphe 神経培養系は、危険ドラッグを含むモノアミン神経系作用薬の薬理作用および神経毒性を評価する *in vitro* スクリーニング系として有用である可能性が示された。

F. 参考文献

2) 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.
- 3) 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.
 - 4) Kita T, Wagner GC, Nakashima T. Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. J Pharmacol Sci. 92: 178-195, 2003.
 - 5) Leong HS, Philp M, Simone M, Witting PK, Fu S. Synthetic Cathinones Induce Cell Death in Dopaminergic SH-SY5Y Cells via Stimulating Mitochondrial Dysfunction. Int J Mol Sci. 2020 Feb 18;21(4):1370. doi: 10.3390/ijms21041370. PMID: 32085614; PMCID: PMC7073199.
 - 6) 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. 168: 458-470, 2013.
 - 7) Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, Rothman RB, Goldberg SR, Lupica CR, Sitte HH, Brandt SD, Tella SR, Cozzi NV, Schindler CW. Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. Neuropsychopharmacology. 38: 552-562, 2013.
 - 8) Yasufuku-Takano J, Nakajima S, Nakajima Y. Morphological and physiological properties of serotonergic neurons in dissociated cultures from the postnatal rat dorsal raphe nucleus. J Neurosci Methods. 167: 258-267, 2008.
 - 9) Lautenschlager M, Höltje M, von Jagow B, Veh RW, Harms C, Bergk A, Dirnagl U, Ahnert-Hilger G, Hörtnagl H. Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. Neuroscience. 99: 519-527, 2000.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiyama KI, Funada M. The synthetic opioid isotonitazene induces locomotor activity and reward effects through modulation of the central dopaminergic system in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2025 Jul;500:117361

2. 学会発表

- 1) 富山健一, 船田正彦:新規合成オピオイド nitazene 系化合物の薬理学的特性の解析. 2025 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (2025.10.24).

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

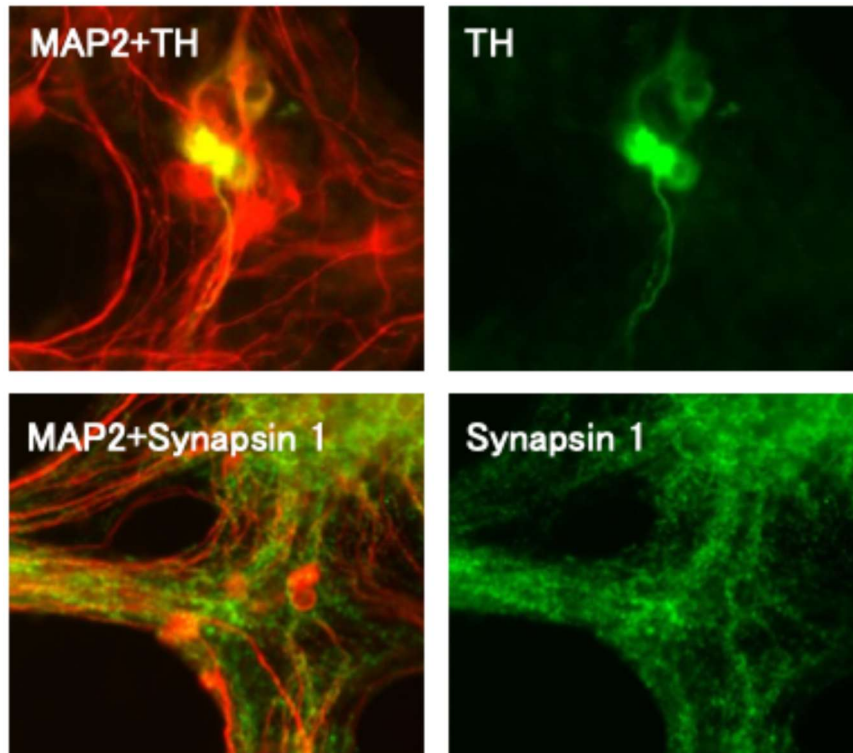


Fig. 1 Immunocytochemical characterization of iCell® DopaNeurons at 21 days in vitro.

Representative immunofluorescence images of iCell® DopaNeurons cultured for 21 days in vitro (DIV21). (Upper panels) Co-immunostaining for microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (red), a neuronal marker localized mainly in dendrites, and tyrosine hydroxylase (TH) (green), a key enzyme in dopamine synthesis and a marker of dopaminergic neurons. The merged image demonstrates TH-positive dopaminergic neurons integrated within the MAP-2-positive neuronal network. (Lower panels) Co-immunostaining for MAP-2 (red) and the presynaptic marker Synapsin-1 (green). The merged image shows punctate Synapsin-1 signals distributed along MAP-2-positive neurites, indicating synaptic vesicle-associated structures and neuronal network maturation.

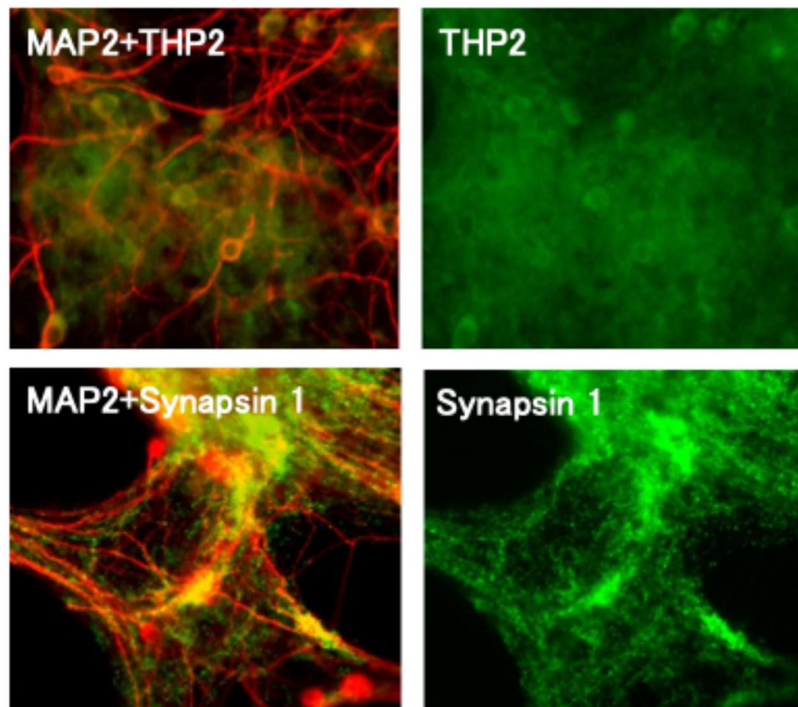


Fig. 2. Immunocytochemical characterization of cultured serotonergic neurons.

Representative immunofluorescence images of cultured neurons showing the expression of serotonergic and synaptic markers. (Upper panels) Co-immunostaining for microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (red), a neuronal marker localized mainly in dendrites, and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) (green), the rate-limiting enzyme for serotonin synthesis and a marker of serotonergic neurons. The merged image (MAP2+TPH2) demonstrates TPH2-positive serotonergic neurons within the MAP-2-positive neuronal network. (Lower panels) Co-immunostaining for MAP-2 (red) and the presynaptic marker Synapsin-1 (green). The merged image (MAP2+Synapsin-1) shows punctate Synapsin-1 signals distributed along MAP-2-positive neurites, indicating the formation of synaptic structures in the cultured neuronal network.

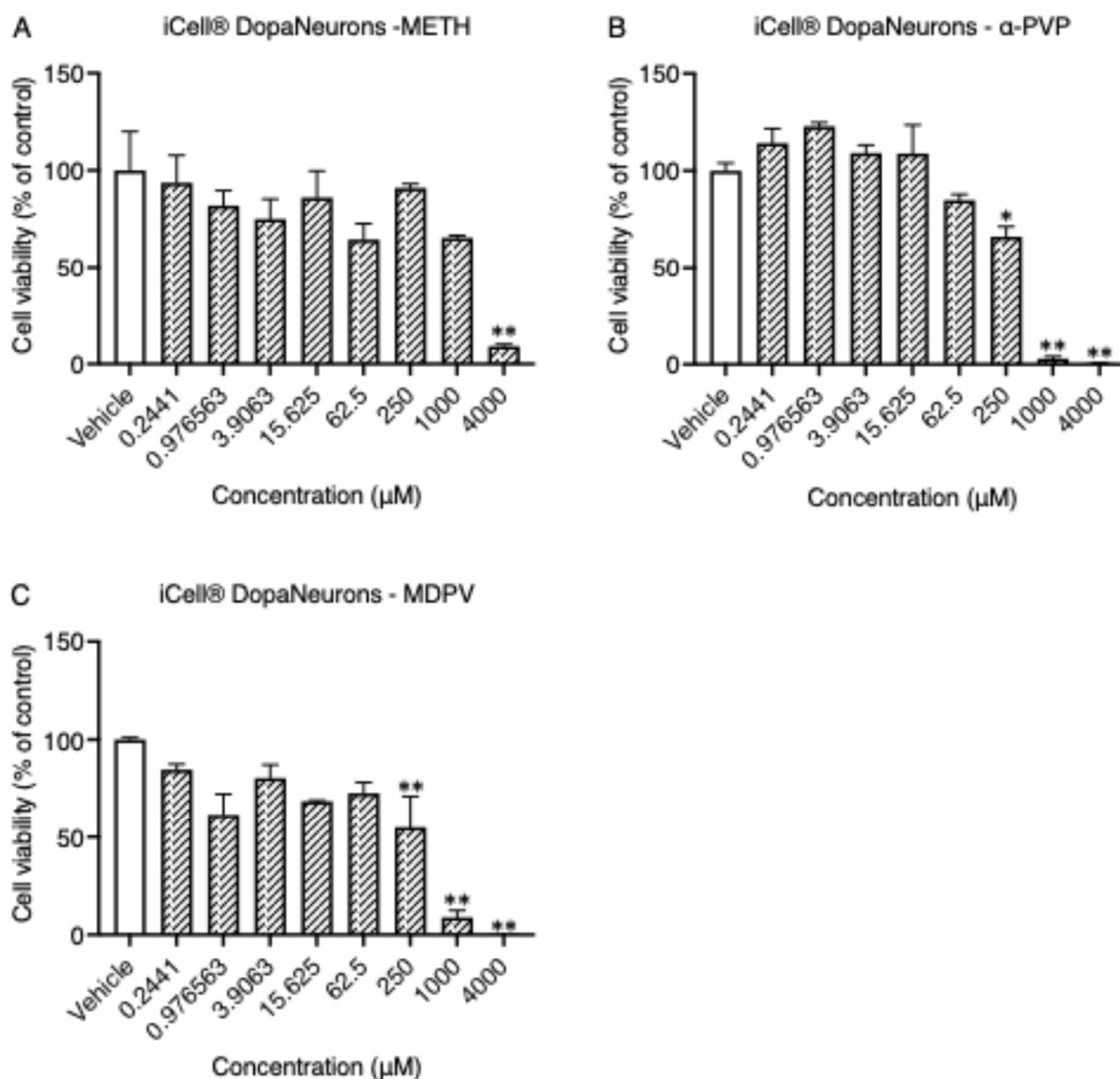


Fig. 3. Effects of synthetic cathinones on neuronal cell viability.

Cell viability of cultured neurons following exposure to methamphetamine (METH), α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP), and methylenedioxypropylvalerone (MDPV) was evaluated using a cell viability assay. Cells were exposed to increasing concentrations of each compound for 24 h, and viability was expressed as a percentage relative to untreated control cells. METH produced a concentration-dependent reduction in cell viability, with marked cytotoxicity observed at higher concentrations. In contrast, α -PVP and MDPV showed weaker cytotoxic effects under the same conditions, with only modest decreases in viability across the tested concentration range. Data are presented as mean \pm SEM of independent experiments. Statistical significance compared with the control group was determined using one-way ANOVA followed by a post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.

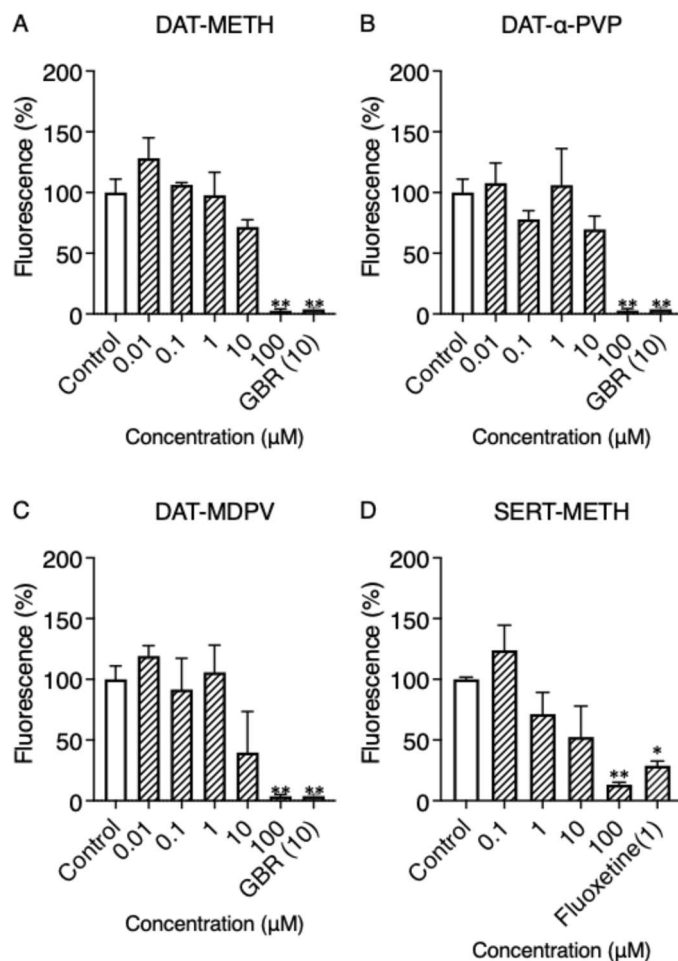


Fig. 4. Inhibition of monoamine transporter uptake in cultured neurons.

The effects of test compounds on monoamine transporter activity were evaluated by measuring dopamine transporter (DAT) and serotonin transporter (SERT) uptake in cultured neurons. DAT-mediated dopamine uptake was measured in iCell® DopaNeurons, whereas SERT-mediated serotonin uptake was measured in rat raphe neurons. Cells were exposed to increasing concentrations of the indicated compounds, and transporter activity was expressed as a percentage relative to the untreated control. In iCell® DopaNeurons, several compounds inhibited DAT-mediated dopamine uptake in a concentration-dependent manner. In raphe neurons, SERT-mediated serotonin uptake was also reduced following exposure to the test compounds, indicating inhibitory effects on serotonin transporter function. Data are presented as mean ± SEM of independent experiments. Statistical significance compared with control was determined using one-way ANOVA followed by a post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.

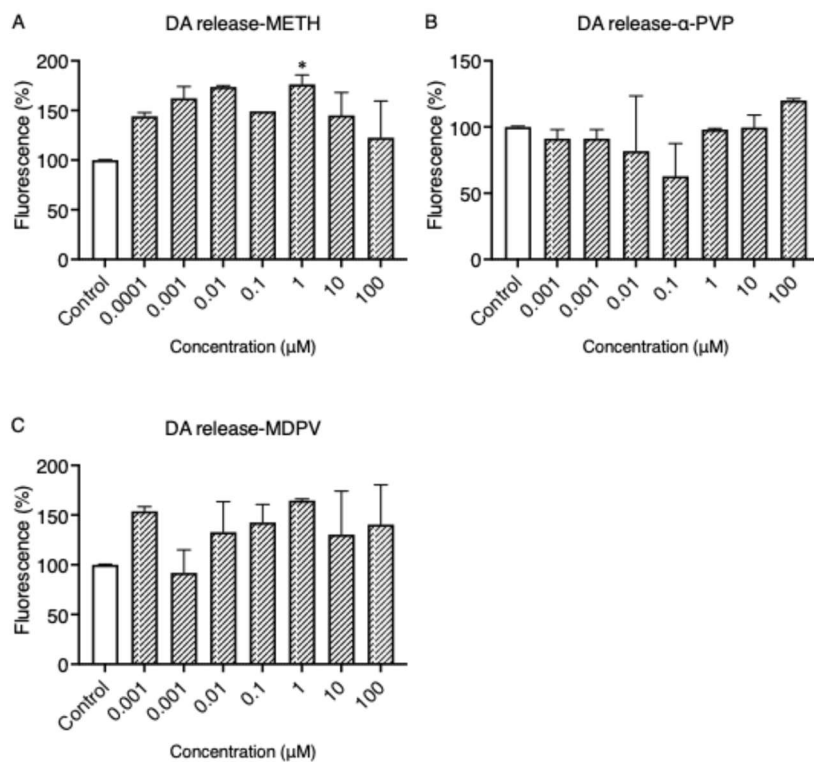


Fig. 5. Effects of test compounds on dopamine release in iCell® DopaNeurons.

Dopamine (DA) release from iCell® DopaNeurons was measured following exposure to the indicated compounds. Cells were treated with increasing concentrations of each compound, and extracellular dopamine levels in the culture medium were quantified using a dopamine ELISA assay. Dopamine release was expressed as a percentage relative to untreated control cells. Several compounds increased extracellular dopamine levels compared with control, indicating stimulation of dopaminergic neurotransmitter release in iCell® DopaNeurons. The magnitude of dopamine release varied depending on the compound and concentration tested. Data are presented as mean \pm SEM of independent experiments. Statistical significance compared with the control group was determined using one-way ANOVA followed by an appropriate post hoc test. * $p < 0.05$ vs control.

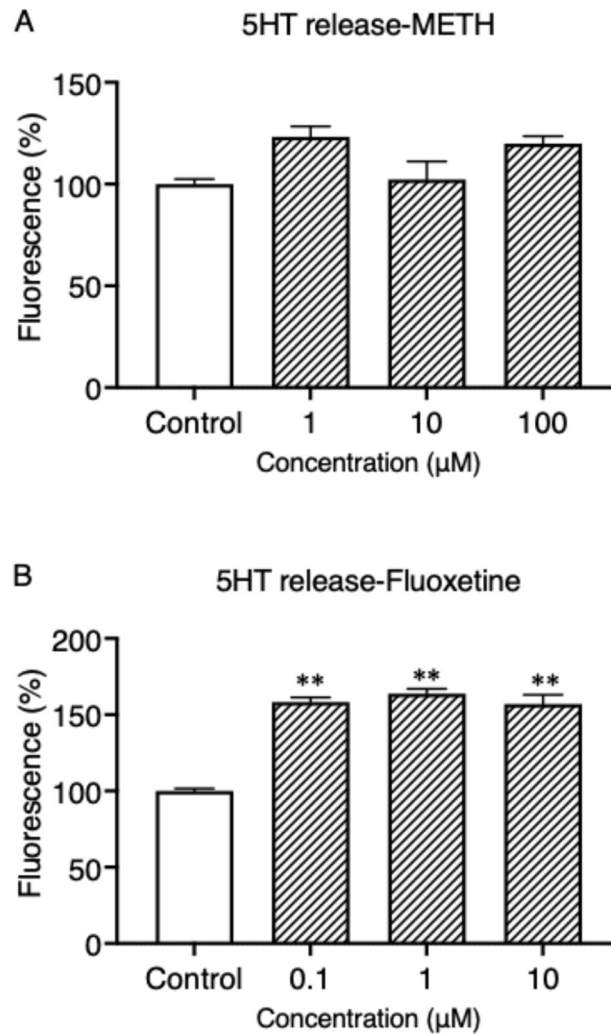


Fig. 6. Effects of test compounds on serotonin release in raphe neurons. Serotonin (5-HT) release from rat raphe neurons was measured following exposure to the indicated compounds. Cells were treated with increasing concentrations of each compound, and extracellular serotonin levels in the culture medium were quantified using a serotonin ELISA assay. Serotonin release was expressed as a percentage relative to untreated control cells. Several compounds increased extracellular serotonin levels compared with control, indicating stimulation of serotonergic neurotransmitter release in raphe neurons. The magnitude of serotonin release differed among the tested compounds. Data are presented as mean \pm SEM of independent experiments. Statistical significance compared with the control group was determined using one-way ANOVA followed by an appropriate post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.