

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03066

研究課題名(和文) 危険ドラッグの新規化学構造と毒性・動態相関の解明およびヒトへの影響予測

研究課題名(英文) Toxicities and pharmacokinetics of new chemical structures of designer drugs, and their prediction in humans

研究代表者

太田 茂(OHTA, Shigeru)

広島大学・医系科学研究科(薬)・名誉教授

研究者番号：60160503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで危険ドラッグの毒性について、中枢組織と末梢組織において幅広く評価した研究は少ない。本研究では、危険ドラッグになりうるフェネチルアミン誘導体やカチノン誘導体の神経毒性や心毒性発現におけるメカニズム解明、および化学構造と毒性発現との関連性について調べた。またその中で、これらメカニズムを指標とした毒性スクリーニング系の構築は、簡便にかつ早期に毒性発現を予測する有用なアプローチとなる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

危険ドラッグの使用による事件・事故は大きな社会問題となっている。最近、規制強化によりその頻度は減少したものの、継続的にいくつかの危険ドラッグが指定薬物に指定されている。また海外での流通状況も考えると、これまでの包括規制の枠を超えた新規危険ドラッグが今後も出回る可能性がある。本研究から明らかとなった化学構造と毒性の関連性に関する知見や簡便な毒性スクリーニングは、今後の迅速な法規制の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：There are few studies that have extensively evaluated the toxicity of designer drugs in both central and peripheral tissues. In this study, we have investigated the mechanism of neurotoxicity and cardiotoxicity of phenethylamine and cathinone derivatives, and evaluated the relationship between their chemical structures and toxicities. As the results, we suggested that the construction of screening system based on these mechanism may be a useful approach to conveniently predict these toxicities.

研究分野：神経化学、裁判化学

キーワード：危険ドラッグ 構造活性相関 毒性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグ(規制薬物または指定薬物に化学構造が似せられて作られ、これらと同様の薬理作用を有する化合物)による事件・事故は大きな社会問題となっている。最近はその規制強化により、事件・事故の頻度は低下したが、海外での流通状況も踏まえると、今後も法の網をすり抜けるため化学構造を変化させた危険ドラッグが次々と出現する可能性がある。この中で、未規制薬物の危険ドラッグの発見から生体影響試験を介して指定薬物に指定するまでの流れに時間がかかり、法規制が後手に回ることも想定される。したがって、危険ドラッグの被害を拡大させないよう、先手を打って法規制するためにも、すでに出回った危険ドラッグについて、ひとつずつ毒性評価を行うのではなく、これまで規制した危険ドラッグの化学構造の変遷からその化学構造を推定し、毒性や体内動態などの特性を予測しておくことが重要となる。また、危険ドラッグの毒性評価は主に興奮活性などの中枢毒性について調べた研究が多いが、不整脈、心筋症など心臓に与える毒性影響なども知られており、中枢、末梢組織における幅広い毒性評価が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、カチノン、フェネチルアミン骨格をベースに様々な化合物を合成し(図1)、中枢、末梢組織(心臓)における毒性発現メカニズムの解明を行う。その中で、化学構造と毒性の関係を調べ、構造活性相関を明らかにし、そのカギとなるトキシコフォアを同定する。この知見からヒトへの影響を予測し、先手を打った法規制への一助にする。

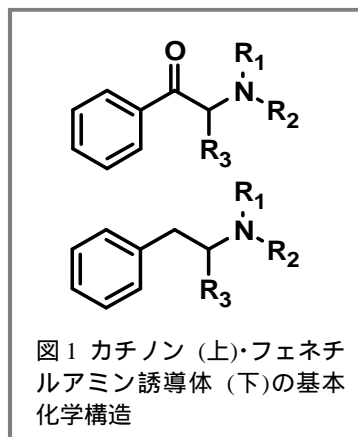


図1 カチノン(上)・フェネチルアミン誘導体(下)の基本化学構造

3. 研究の方法

(1) カチノン、フェネチルアミン誘導体の合成

カチノン誘導体の合成は、Perera *et al.*, *J. Med. Chem.* (2003)およびWei *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* (2016)を、フェネチルアミン誘導体の合成は、Le Gall *et al.*, *J. Org. Chem.* (2009)を参考にした。

(2) ドパミン再取り込み阻害活性評価

ヒト神経線維芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に評価化合物を曝露後、 ^3H 標識ドパミンを取り込ませ、インキュベーションした。上清を除去し、細胞内に取り込まれた ^3H 標識ドパミンを液体シンチレーションカウンターにより測定した。

(3) ドパミントランスポーター(DAT)におけるドッキングスタディー

Drosophila melanogaster DAT と、ドパミンとの結晶構造(PDB ID:4XP1)から(Wang *et al.*, *Nature*, 2015)、ホモロジーモデリングによって予測されたヒトDATの立体構造をもとに(Rojas *et al.*, *J. Chem. Inf. Model*, 2020)、評価化合物とのドッキングスタディーをAutoDock[®]4.2.6を用いて行った。

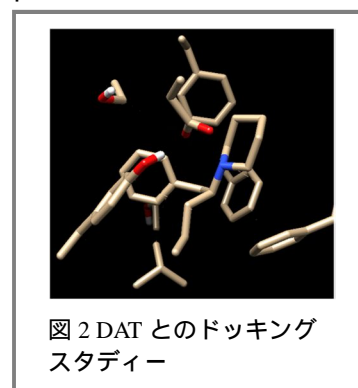


図2 DATとのドッキングスタディー

ドパミン結合部位を中心に、Grid BoxはX:42、Y:40、Z:50と設定した。また、flexible residuesは、ドパミン結合部位の近傍に存在し、化合物との結合に重要だと考えられた⁷⁶Phe、⁷⁹Asp、¹⁴⁹Ser、¹⁵²Val、¹⁵⁶Tyr、³²⁰Phe、³²⁶Phe、⁴²²Serを指定した。Genetic Algorithmで300回計算し、最も低いドッキングスコア(deltaG)を求めた。Ki = exp(deltaG*1000)/(Rcal*TK)より阻害定数を推定した。

(4) 評価化合物をマウスに投与後の自発運動量の測定

雄性ICRマウスに対し、10~100 mg/kgとなるよう評価化合物を腹腔内投与したのち、40センチメートル四方のオープンフィールド上での投与後40分間の行動を録画し、行動解析装置SMART3.0を用いることによって移動量を測定した。本動物実験は、承認された広島大学動物実験計画に遵守して行った。

(5) 出芽酵母遺伝子過剰発現株ライブラリーを用いた新規メカニズム探索

評価化合物を曝露した寒天培地に出芽酵母を播種し、出芽酵母における最小発育阻止濃度を求めた。その濃度の化合物を含み、ロイシンを欠乏させた寒天培地に出芽酵母遺伝子過剰発現株ライブラリー(gTOW6000)を播種することにより、耐性株の取得を試みた。

(6) 新生仔ラット初代心筋細胞の単離および培養

生後1~4日の新生仔ラットから単離した心室筋細胞を播種後4日間培養した。安定した自発的な拍動を確認した後、評価化合物を2時間曝露後の拍動数変化を計測した。本動物実験は、承認された広島大学動物実験計画に遵守して行った。

(7) CYP2J2 阻害活性評価

ヒトリコンピナント CYP2J2 を用い、その典型基質である astemizole の脱アルキル化活性を指標に質量分析装置 LC-MS/MS (Nexera HPLC system, LCMS-8050 system, 株式会社島津製作所) を用いて解析し、CYP2J2 阻害活性を評価した。

4. 研究成果

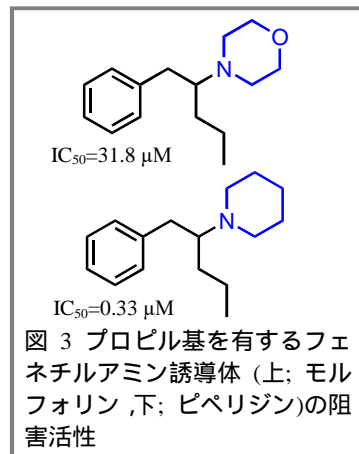
(1) ドパミン再取り込み阻害活性評価

メタンフェタミンに代表されるフェネチルアミン誘導体の構造活性相関研究において、ベンゼン環置換化合物の報告が多く、アルキル部分や、アミン部分を修飾した化合物群については、ほとんど評価されていないことから、図1中、R₁、R₂のアミン部分をヘテロ環に置換した化合物や、R₃部分のアルキル鎖を伸長させた化合物を中心に合成した。

フェネチルアミンは、シナプス間隙中のドパミン濃度を上昇させることが知られる。その中でも、細胞内へのドパミンの再取り込みを担う DAT の阻害作用がメタンフェタミンのメカニズムで重要と考えられていることから、メタンフェタミンを陽性対象とし、DAT の阻害活性を評価した。

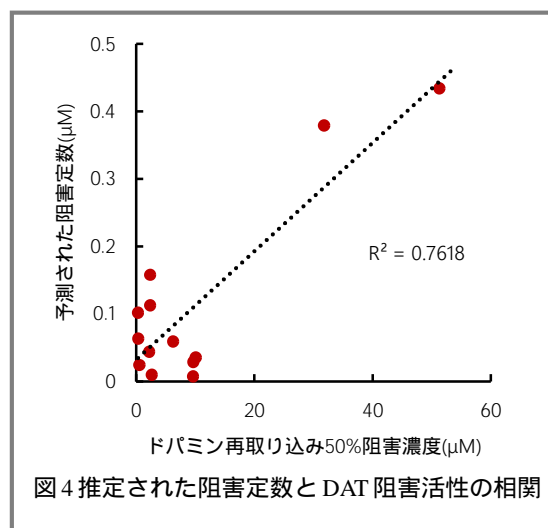
アミン部分をピペリジンに固定し、アルキル鎖伸長の影響について評価したところ、その50%阻害濃度 (IC₅₀) から、プロピル基が挿入された化合物が最も強い阻害活性を示し、アルキル鎖伸長が DAT の阻害活性に及ぼす影響は小さいことが示唆された。

次に、アルキル鎖をプロピル基に固定し、アミン部分を変化させ、アミン部分にモルフォリンが導入された化合物とピペリジンが導入された化合物を比較すると、ピペリジンを有する化合物において100倍強い阻害活性が認められた(図3)。このことから、アミン置換がドパミン再取り込み阻害活性において非常に重要であると考えられた。



(2) DAT におけるドッキングスタディー

DAT の阻害活性が、DAT への結合親和性で予測できるのではないかと考え、AutoDock[®]4.2.6 を用いて、(1)で評価した化合物と DAT とのドッキングスタディーを行った。そのドッキングスコアから阻害定数を推定し、(1)の実験で得られた阻害活性値と比較したところ、r² 値は約 0.7618 となり、概ね相関することが示された(図4)。以上から、DAT への阻害は DAT 結合親和性によって説明できることが示唆された。



(3) フェネチルアミン誘導体をマウスに投与後の自発運動量の測定

(1)の阻害活性が *in vivo* におけるマウス自発運動量に反映するかどうか比較検討を行った。アミン部分(図1, R₁, R₂)をピペリジンに固定し、アルキル鎖伸長(図1, R₃部分)の影響を評価すると、メチル基が挿入された化合物よりプロピル基を導入した化合物において、顕著な自発運動量の亢進が観察されたが、この結果は DAT 阻害活性の大小関係を反映していた。一方、アルキル部分をプロピル基に固定し、アミン部分がモルフォリンとピペリジンである化合物間で比較すると、ピペリジンを有する化合物で強力な興奮活性が認められ、こちらも DAT 阻害活性を反映していた。

(4) 出芽酵母遺伝子過剰発現株ライブラリーを用いた新規メカニズム探索

フェネチルアミン誘導体がシナプス間隙中のドパミン濃度を上昇させるメカニズムに DAT 阻害以外の関与も考えた。出芽酵母遺伝子過剰発現株ライブラリーを用いて新規ターゲットを探索した。ピペリジンを有するフェネチルアミン化合物を曝露したところ、CIN5 遺伝子が過剰発現している株を耐性株として同定することができた。しかしながら、ドパミン濃度上昇との関連性は明らかにできず、今後のさらなる検討が必要である。

(5) カチノン誘導体をマウスに投与後の自発運動量の測定

アミン部分 (図 1, R₁, R₂) がモルフォリン、ピペリジンを導入した化合物 (図 1, R₃ はメチル基) を用い、DAT 阻害能と自発運動量への影響との関連性を調べた。その結果、ピペリジンを有する化合物の方が約 3 倍強い DAT 阻害活性を示した。これらをマウスに投与したところ、ピペリジン化合物において、自発運動量の亢進が観察された。この結果は、フェネチルアミン誘導体の結果を反映しており、アミン部分の活性に与える影響の寄与が大きいことが示唆された。

(6) CYP2J2 阻害と拍動に与える影響

心毒性の副作用を示す医薬品にはシトクローム P450 (CYP2J2) の基質もしくは阻害するものが複数存在することが報告されている。その中で、カチノンに分類されアミン部分にピペリジンが導入された筋弛緩薬エベリゾンは CYP2J2 の基質であり QT 延長のような心毒性の副作用が知られている (Solanki *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* 2018)。この背景から、カチノン誘導体の心毒性には、CYP2J2 との関連性が考えられた。しかしながら、心毒性と CYP2J2 の関連性は十分に解明されていないことから、まず、その関連性について精査することとした。CYP2J2 を阻害する terfenadine、astemizole、ketoconazole および弱い CYP2J2 阻害活性を確認した diphenhydramine を心筋細胞に曝露したところ、濃度依存的な拍動の低下が観察され、この 4 つの評価化合物において、CYP2J2 阻害と拍動の低下に相関性が認められた (図 5)。そのメカニズムとして、心保護効果が知られ、CYP2J2 によって生成されるアラキドン酸代謝物 epoxyeicosatrienoic acids (EETs) が CYP2J2 の阻害によって、その生成が抑制され、拍動低下につながっているのではないかと考えた。EETs のひとつ 14, 15-EET 共曝露で terfenadine により低下した拍動の回復傾向が見られたが、他の CYP2J2 の内在性基質・代謝物が関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

本研究において、CYP2J2 阻害と心拍低下の関連性が示唆されたため、カチノン誘導体についてもその関連性について精査した。アミン部分 (図 1, R₁, R₂) にモルフォリン、ピペリジンが導入された化合物 (図 1, R₃ はメチル基) では、細胞死が起こらない濃度でも、拍動の低下が観察された (図 6)。また、これらには弱い CYP2J2 阻害活性が見られた。心拍数低下と CYP2J2 阻害は、上述のテルフェナジンより高い濃度で観察されたことから、その関連性は明確ではないが、大量摂取において、CYP2J2 阻害により心拍数に影響を与える可能性もある。

(7) まとめ

フェネチルアミン誘導体やカチノン誘導体の *in vitro*、*in vivo* 評価において、中枢毒性にはアミン部分の修飾が大きく関与することが示唆された。DAT 阻害に反映する *in silico* ドッキングスタディーを適用することで、簡便にそのリスクを予測できる可能性が示唆された。さらには、カチノン誘導体の心毒性についても留意する必要がある、特に CYP2J2 阻害が強いものがそのリスクが高まる可能性がある。今後さらに化合物を増やした検証が必要となる。

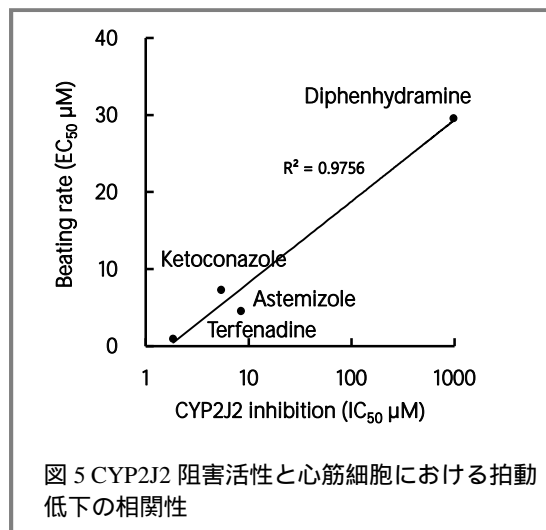


図 5 CYP2J2 阻害活性と心筋細胞における拍動低下の相関性

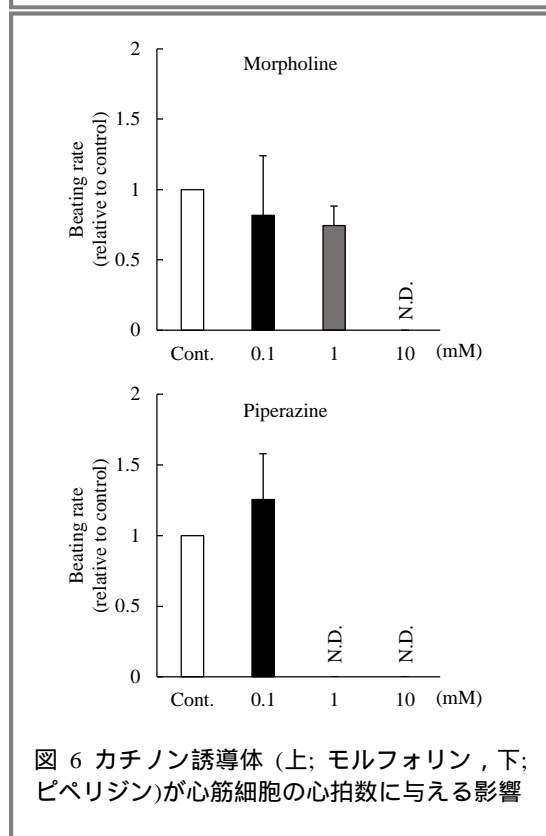


図 6 カチノン誘導体 (上; モルフォリン, 下; ピペリジン) が心筋細胞の心拍数に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石谷 聡基, 須山 翔太, 梅原 祥太, 奥田 勝博, 佐能 正剛, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 危険ドラッグの危険性予測を指向したフェネチルアミン誘導体の構造毒性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 恵利加, 佐能 正剛, 今子 千鶴, 藤野 智恵里, 大月 佑也, 宮良 政嗣, 奥田 勝博, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 心筋細胞を用いたジフェンヒドラミン中毒の発現メカニズム検討
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今子 千鶴, 佐能 正剛, 藤野 智恵里, 宮良 政嗣, 奥田 勝博, 河合 秀彦, 江尻 洋子, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 ジフェンヒドラミンおよび代謝物の心筋細胞毒性
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 恵利加, 佐能 正剛, 須山 翔太, 渡部 祥子, 奥田 勝博, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 カチノン誘導体とフェネチルアミン誘導体のマウスにおける興奮毒性の比較
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今子 千鶴, 佐能 正剛, 藤野 智恵里, 大月 佑也, 采 洋太郎, 高木 優志, 山頭 征岳, 宮良 政嗣, 江尻 洋子, 奥田 勝博, 藤本 成明, 河合 秀彦, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 神経・肝・心筋細胞の3次元培養系の構築とジフェンヒドラミンの毒性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須山翔太, 佐能正剛, 梅原祥太, 奥田勝博, 太田茂、古武弥一郎
2. 発表標題 化学合成した危険ドラッグの薬理評価と毒性化学構造同定
3. 学会等名 「広島神経医科学研究会」第2回学生・若手研究者ポスター発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須山翔太, 佐能正剛, 梅原祥太, 奥田勝博, 太田茂、古武弥一郎
2. 発表標題 合成したフェネチルアミン誘導体の薬理評価および構造毒性相関に関する研究
3. 学会等名 日本法中毒学会第37年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学薬学部・広島大学大学院医系科学研究科生体機能分子動態学研究室ホームページ
<https://kotake-1.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古武 弥一郎 (KOTAKE Yaichiro) (20335649)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授 (15401)	
研究分担者	佐能 正剛 (SANOH Seigo) (00552267)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	
研究分担者	奥田 勝博 (OKUDA Katsuhiro) (00389115)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究分担者	清水 恵子 (SHIMIZU Keiko) (90312462)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	須山 翔太 (SUYAMA Shota)		
研究協力者	今子 千鶴 (IMAKO Chizuru)		
研究協力者	森田 恵利加 (MORITA Erika)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石谷 聡基 (ISHITANI Soki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関