

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670356

研究課題名(和文) ヒト型肝臓動物モデルを利用したデザイナードラッグのメタボローム解析と体内動態予測

研究課題名(英文) Prediction of metabolism and metabolome analysis of designer drugs using humanized liver mice

研究代表者

太田 茂(Ohta, Shigeru)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：60160503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、危険ドラッグの健康被害が多く報告されている。フェネチルアミン誘導体のうちマウス自発運動量を変化させるものがみられた。これは、ドパミン取り込み阻害活性や高い脳内移行性が起因している可能性がある。また、フェネチルアミン誘導体の酸化代謝物とカチノン誘導体の還元代謝物は共通代謝物となりうる。ヒトの体内動態予測動物「ヒト肝細胞移植キメラマウス」に投与後の尿中からカチノン誘導体の還元代謝物が検出され、ヒトでの体内動態の情報が少ないことからも有用な知見となるだろう。

研究成果の概要(英文)：Recently, various dangerous drug-induced health injuries have reported in humans. In this study, we have focused on phenethylamine and cathinone types in dangerous drugs. Phenethylamine derivatives changed locomotor activity in mice, which could be caused by inhibitory effects on dopamine uptake and high permeability at the blood-brain barrier. Oxidative metabolite of phenethylamine could become common metabolite of cathinone reduction, which was detected in chimeric mice with humanized liver after administration of cathinone derivative. These results contribute to criminal identification because there are a little information regarding drug metabolism of dangerous drugs in humans.

研究分野：毒性学

キーワード：危険ドラッグ デザイナードラッグ フェネチルアミン カチノン ドパミン 体内動態 ヒト肝細胞移植キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤や麻薬をはじめとする薬物乱用は大きな社会問題となっている。また、覚せい剤や麻薬と類似した化学物質を含み、摂取することによって、規制薬物と同等またはそれ以上の有害性が疑われる「危険ドラッグ」の乱用の根絶も図る必要がある。日本では、医薬品医療機器法に基づき、中枢神経の興奮や抑制、幻覚を引き起こす作用を有し、保健衛生上の危害が発生するおそれがある物質を指定薬物として規制している。しかしながら、規制薬物である麻薬や覚せい剤の化学構造の一部を改変させて人工的に作られた「デザイナードラッグ」が含まれる危険ドラッグがハーブ、粉末、液体、錠剤が広まっている。

デザイナードラッグには、合成カンナビノイド系、トリプタミン系、フェネチルアミン系、カチノン系などが知られている。合成カンナビノイドは大麻の有効成分をもとに合成されたものであり、トリプタミン系はセロトニンと構造が類似していることから幻覚作用があるとされる。フェネチルアミン系やカチノン系は、覚せい剤の化学構造と類似しており主に興奮性の作用を示すと言われている。一方、これらの化合物を規制すると、別の化学構造を持つ類縁化合物が登場するという悪循環も生じる。現行の法律では、新しいデザイナードラッグを成分とする危険ドラッグが登場してから「指定薬物」に指定するまでに時間がかかる。規制強化を図る目的で、危険ドラッグとなる可能性がある化学物質を包括規制することもあるが、医薬品をはじめとする有用な化学物質の製造が困難になることが懸念される。

2. 研究の目的

習慣性薬物の乱用においては、次々と新しいデザイナードラッグが創出されるため、尿中排泄などのヒト体内動態プロファイルのデータ蓄積が少なく、その同定に時間がかかることが想定される。普及していく新たな構造を有する化合物へ対応するべく、デザイナードラッグの化学構造のうち母骨格に着目してカテゴリー分けを行う。また、マウスの肝臓がヒトの肝細胞で置換された「ヒト肝細胞移植キメラマウス」はヒトの薬物代謝酵素やトランスポーターが発現しているため、本マウスを用いることで、「ヒトにおけるデザイナードラッグの体内動態予測」が可能となり、デザイナードラッグの分析体制の確立に貢献できると考えた。

新しく創出されるデザイナードラッグの化学構造を予測できれば、ターゲットを絞った分析方法が可能となるが、その予測は難しいのが現状である。そこで、申請者らは、デザイナードラッグの化学構造を広くとらえ、分類された基本母核(カチノン系、フェネチルアミン系)に着目して評価を進める。

また、デザイナードラッグのヒト体内動態に関する臨床データは少なく、また定期的な臨床サンプルの入手も困難であることから、ヒト体内動態予測研究の実績がある「ヒト肝細胞移

植キメラマウス」をヒト代替動物として使用することが本研究の大きなアイデアとなっている。これは、ヒトの肝臓から単離された肝細胞やホモジネート画分を用いた *in vitro* 試験に比べても有用なデータが得られる。ヒト肝細胞移植キメラマウスの尿中において、基本母核ごとの尿中メタボローム解析を行い、カテゴリーごとの尿中バイオマーカーを決定できれば、実際の現場においても乱用使用の判断指標として利用できる可能性を有する。

また、体内動態の予測のみならず、投与時のマウスの行動変化や化合物の脳内移行性なども評価することで、乱用使用の同定だけでなく、薬効や毒性も外挿できる可能性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)フェネチルアミン誘導体の合成

フェネチルアミン誘導体(図1)の合成は、Hartung et al., *Tetrahedron*(2000)の方法もしくは、Le et al., *J. Org. Chem* (2009)の方法に従って以下の4つの化合物(1, 2, 3, 4)を合成した。これらを合成後、¹H-NMR、LC-MS/MSにて確認を行った。またこれらは塩酸塩化した。

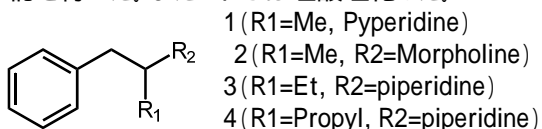


図1, フェネチルアミン誘導体の基本母核

(2)カチノン誘導体の合成

各種カチノン誘導体(図2)の合成は Ryan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2013を参考に行った。合成後、還元代謝物の標品として -ケト基の部分を sodium borohydride にて -ヒドロキシ基に変換した化合物を合成し、酸化代謝物の標品としてベンゼン環のパラ位にヒドロキシ基をもつ、4-hydroxypropiofenone を用いて Ryan らの合成法をもとに合成した。これらを合成後、¹H-NMR、LC-MS/MSにて確認を行った。またこれらは塩酸塩化した。

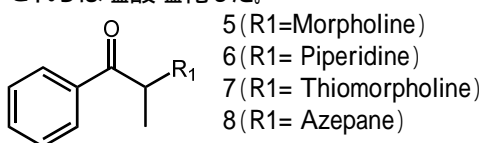


図2, カチノン誘導体の基本母核

(3)*In vivo* 薬理評価

マウスにおける自発的運動量測定法であるオープンフィールドテストを用い、そのパラメータとなる移所行動について運動量を測定した(図3)。各フェネチルアミン系薬物 1, 2, 3, 4 を腹腔内投与(10, 30mg/kg, 生理食塩水に溶解)したマウスをテストフィールドの中心におき、2 分間の探索行動における移動量を測定した。

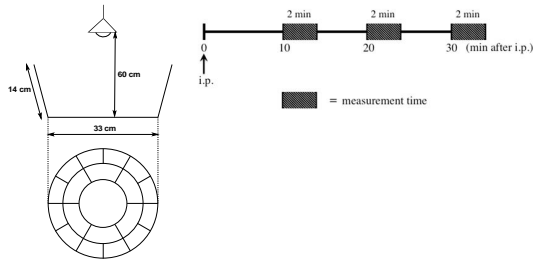


図 3, 自発運動量測定法であるオープンフィールドテスト

(4) マウスにおける脳内移行性

マウスにフェネチルアミン系薬物 1, 2, 3, 4 を腹腔内投与 (10, 30mg/kg, 生理食塩水に溶解) 後 30 分後の線条体、側坐核の組織中濃度および血漿中濃度を LC/MS/MS を用いて測定した。

(5) 脳内ドパミン濃度の測定

フェネチルアミン系薬物 1 (30mg/kg)、2 (30mg/100mg/kg)、4,5,6 (10, 30mg/kg) を腹腔内投与後 30 分後の線条体、側坐核におけるドパミン濃度を電気化学検出器が付随した高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて測定した。

(6) 細胞毒性評価

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y にフェネチルアミン系薬物 1,2,3,4 (10-1000 μM) を 24 時間曝露させ、ミトコンドリア機能低下をみる WST-1 assay を行った。

(7) ドパミン取り込み阻害効果の検討

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y にフェネチルアミン誘導体 1,2,3,4 を曝露させ、溶液を除去して [ring-2,5,6-³H]3,4-dihydroxyphenylethylamine を添加し、インキュベーション後、氷冷 HEPES buffer で洗浄した。細胞を RIPA buffer で可溶化し、液体シンチレーションカウンターでサンプル中の放射活性を測定し、³H]DA の取り込み量を算出した。なお、10 μM GBR12909 曝露時の放射活性を³H]DA の非特異的取り込み阻害の放射活性とした。

(8) ラット肝細胞を用いた代謝実験

ラット肝臓よりコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離し、カチノン誘導体 (5,6,7,8) を 2 時間インキュベーションした。代謝物の生成量を LC/MS/MS を用いて測定した。

(9) マウスおよびヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた肝ミクロソーム、サイトソール画分を用いた代謝実験

肝臓を摘出後 1.15% KCl 水溶液を用いてホモジナイズした後に、9000g 上清画分、ミクロソーム画分、サイトソール画分を調製し、フェネチルアミン系、カチノン系薬物をインキュベーションさせ、代謝物の生成量を LC/MS/MS を用いて測定した。

(10) ヒト肝細胞移植キメラマウスにおける体内動態評価

ヒト肝細胞移植キメラマウスにカチノン誘導体 (化合物 8) を 10mg/kg の割合で静脈内投与し、血漿、尿中における未変化体、代謝物濃度を LC/MS/MS を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) フェネチルアミン誘導体のマウスにおける自発的運動量の比較

フェネチルアミン誘導体 (1,2,3,4) のマウスにおける自発的運動量に及ぼす影響について評価した。その結果、コントロール群 (生理食塩水投与群) に対して、化合物 3 では投与後 10 分で運動量の顕著な増加が見られた。その増加は投与量依存적であり、他の化合物に比べて持続的に高い自発運動活性が観察された。化合物 4 では 20 分以降で有意な運動量増加が見られたが、化合物 3 ほどの顕著な運動量増加は見られなかった。化合物 2 では、投与後 10 分の 30mg/kg 投与群において有意な運動量の低下がみられた (図 4)。

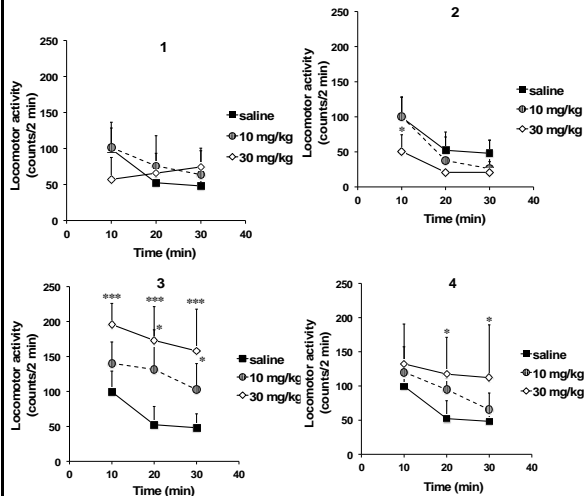


図 4, フェネチルアミン誘導体 1, 2, 3, 4, のマウスの自発運動量活性変化

(2) フェネチルアミン誘導体のマウスにおける脳内移行性

フェネチルアミン誘導体 (化合物 1,2,3,4) をマウスに投与後の脳内 (線条体、側坐核) および血漿中濃度を測定した。いずれの化合物の良好な脳内移行性を示すことが分かった。脳内濃度は、1>2>3>4 の順となり、前述の自発運動量に対する影響の強さとは関連性が認められなかった (表 1)。

表 1, フェネチルアミン誘導体のマウス脳内移行性

	1	2	3	4
線条体	17.6	11.9	9.96	4.01
側坐核	15.9	11.1	8.04	3.48
血漿	3.90	3.41	2.04	0.62

線条体、側坐核 (μg/g tissue)、血漿 (μg/mL)

(3) フェネチルアミン誘導体の細胞毒性

フェネチルアミン誘導体(1,2,3,4)をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に曝露させたところ、いずれの化合物も 100 μM 以下では細胞毒性が見られなかった。

(4) フェネチルアミン誘導体のドパミン取り込み阻害活性評価

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y における化合物 1,2,3,4 のドパミン取り込み阻害活性(IC50)は、2.45 μM, 49.9 μM, 0.33 μM, 0.39 μM となり、化合物 3, 4 で強い阻害活性を示した。

本研究におけるフェネチルアミン誘導体は、いずれも高い脳内移行性を示すことが明らかとなった。顕著な自発運動量増加作用を有した化合物 3 は、SH-SY5Y 細胞を用いたドパミン取り込み阻害作用も強い活性を示した。化合物 2 は、自発運動量抑制作用を示したが、ドパミン取り込み阻害作用も弱い活性であった。このことから、フェネチルアミン誘導体の自発運動量に対する影響は、ドパミン取り込み阻害が大きく関与している可能性がある(図 5)。一方、マウスにフェネチルアミン誘導体を投与後の脳内におけるドパミン濃度を測定したが、コントロール群にくらべ顕著な差異は認められなかった。今後、細胞内、細胞外ドパミン濃度を分けて測定していく必要があると考えている。

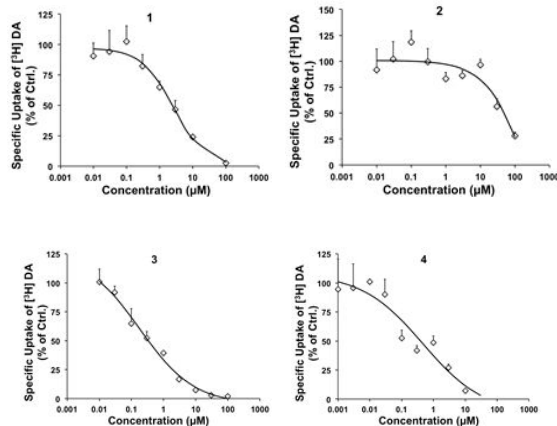


図 5, SH-SY5Y 細胞におけるフェネチルアミン誘導体のドパミン取り込み阻害活性

(5) マウスミクロゾームにおけるフェネチルアミン誘導体代謝物

フェネチルアミン誘導体(化合物 2)を NADPH 添加マウス肝ミクロゾーム画分でインキュベーションさせたところ、ベンジルが水酸化された代謝物が生成することが分かった。これは、カチノン誘導体(化合物 5)のカルボニルの還元代謝物でもある。このことから、カチノン誘導体の還元代謝についての検討を行った。

(6) カチノン誘導体化合物の肝細胞における代謝活性

カチノン誘導体化合物(5,6,7,8)を嫌気条件下(酸素濃度 0.1%以下)でラット肝細胞と反応させたところ、カルボニルの還元代謝物の生成が確認できた。またフェノール性水酸基を有する

酸化代謝物も生成量は少ないものの確認できた。

カチノン誘導体(化合物 8)について取り上げ、その薬物代謝酵素の寄与を調べる目的で、各種還元代謝酵素の活性阻害剤(11種類)を共添加し(1, 10 μM)、活性影響を評価した。その結果、グリチルリチン酸などの 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase(11-HSD)の活性阻害剤で、活性が大きく減少した(図 6)。

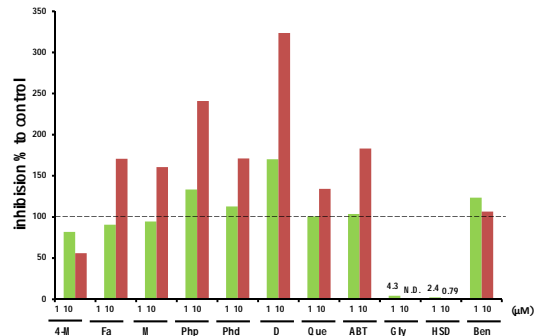


図 6, ラット肝細胞におけるカチノン誘導体 8 における還元代謝活性と各種阻害剤による影響
4-Methylpyrazole (4-M, ADH inhibitor), Flufenamic acid (Fa, AKR inhibitor), Menadione (M, SDR inhibitor), Phenolphthalein (Php, AKR inhibitor), Phenindon (Phd, NQO1 inhibitor), Dicmarol (D, NQO1 inhibitor), Quercetine (Que, SDR/NQO2 inhibitor), 1-Aminobenzotriazole (ABT, P450 inhibitor), Glycyrrhetic acid (Gly, 11-HSD inhibitor), 11-HSD inhibitor (HSD, 11-HSD inhibitor), Benzopyrene (Ben, NQO2 inhibitor)

(7) ヒト肝細胞移植キメラマウスから単離した肝臓 9000g 上清画分、ミクロソーム画分、サイトソール画分での代謝活性

カチノン誘導体(化合物 8)を肝 9000g 上清、ミクロソーム、サイトソールでインキュベーションさせたところ、NADPH 添加の 9000g 上清画分およびミクロソーム画分で還元代謝活性が認められた。これは、還元代謝に寄与すると考えられる 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase がミクロソーム画分に局在することに起因している可能性がある。また、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓組織での代謝活性が確認できたことから、*in vivo* での代謝物生成を評価した。

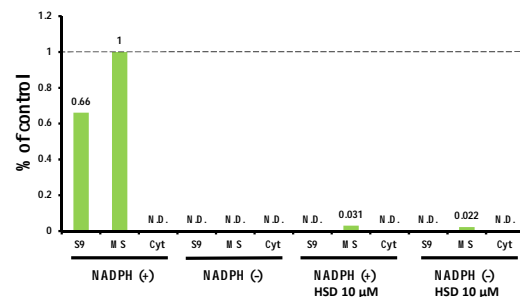


図 7, ヒト肝細胞移植キメラマウス肝臓ホモジネートにおけるカチノン誘導体 8 の還元代謝活性

(8)カチノン誘導体のヒト肝細胞移植キメラマウスにおける体内動態

カチノン誘導体(化合物 8)をヒト肝細胞移植キメラマウスに静脈内投与し、血漿中濃度推移と尿中未変化体、代謝物の濃度を測定した。PKパラメータのうち総クリアランスは 122mL/min/kg となりVdssは、2.93L/kg、半減期は0.7hrであった。また、未変化体尿中排泄率は0.7%(対投与量)、還元代謝物は0.2%(対投与量)、酸化代謝物はごくわずかであった。このことから、実際のヒトにおいても還元代謝物が検出される可能性がある。

ヒト肝細胞移植キメラマウスのPKからヒトのPKを予測できることをすでに提唱しているが(Sano et al., *Xenobiotica* 2015)、今回用いたキメラマウスに移植している肝細胞のロットはこれまでの知見のロットは異なるため、本ロットでのPK予測性が確立できた後にヒトのPKのデータを外挿していく予定である。一般に危険ドラッグのヒトの体内動態のデータは少ないことからも有用な知見となりうる。

またカチノン誘導体の還元代謝物は、フェネチルアミン誘導体の酸化代謝物と共通して検出される可能性がある、このことから、この代謝物の質量分析スペクトルは、幅広い危険ドラッグの同定に有用なマーカー代謝物となりうる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

梅原 翔太, 古武 弥一郎, 渡部 祥子, 奥田 勝博, 佐能 正剛, 太田 茂, フェネチルアミン誘導体のマウス脳内モノアミンに対する影響, 日本法中毒学会第34回年会, 2015年6月26日~27日, 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 茂(OHTA SHIGERU)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号: 60160503

(2)研究分担者

奥田 勝博(OKUDA KATSUHIRO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00389115

(3)研究分担者

佐能 正剛(SANO SEIGO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号: 00552267

(4)研究分担者

清水 恵子(SHIMIZU KEIKO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90312462