

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860103

研究課題名(和文)覚せい剤類似化合物の構造と精神依存性・神経毒性の関連評価

研究課題名(英文)Relationship between neurotoxicity and the chemical structures of amphetamines

研究代表者

山下 琢矢(Yamashita, Takuya)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10645203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は危険ドラッグの中でも乱用が問題視されている覚せい剤類似化合物の構造活性相関の解明に繋がる毒性情報の収集を目的としている。本研究では覚せい剤に含まれる芳香環の2-、3-、4-位にフッ素、メトキシ基が置換した化合物を使用した。各化合物の細胞毒性、神経分化毒性、脳内モノアミン量への影響、そして脳内プロテオームに及ぼす影響を明らかにした。結果として、覚せい剤類似化合物はそのすべてが覚せい剤と同等もしくはそれ以上の毒性・生理作用を示した。

研究成果の概要(英文)：Little information is available on the basic toxicological properties of designer amphetamines. We evaluated relationship between the toxicity and their chemical structures of amphetamines substituted with fluor and methoxy groups. In this study, we suggested that amphetamines have similar or larger cytotoxicity, inhibitory effect of neurite outgrowth, change the amount of monoamines in mouse brain and change the proteome in mouse brain compare to AP and MA treatment. In order to avoid abuse from amphetamines, it is necessary to development of laws for these analogs rapidly.

研究分野：毒性学

キーワード：覚せい剤類似化合物 神経毒性 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

平成 19 年 4 月から違法ドラッグ(現在は危険ドラッグに改称)の規制に迅速に対応するため、本邦において危険ドラッグ対策強化を盛り込んだ薬事法が施行された。とりわけ、化学構造が類似していれば一括して規制することができる「包括指定」が検討されている。しかし、「包括指定」は医療応用が期待される化合物も取り締まり対象となり得ることから医療、研究分野への影響が懸念され、制定に向けて足踏みしている。これは、危険ドラッグの構造活性相関(置換基の種類・位置の違いによって、どのような精神依存性・神経毒性を示すのか)に関連する科学的検証が圧倒的に乏しいことに起因している。従って、将来的に危険ドラッグの「包括指定」を円滑に施行するための科学的基礎情報の収集が喫緊の課題とされている。

## 2. 研究の目的

本申請研究は危険ドラッグの中でも乱用が特に問題視されている「覚せい剤類似化合物」の構造活性相関の解明に繋がる毒性情報の収集を目的とする。危険ドラッグ関連の基礎研究は流通が認められる薬物が主に対象となっており、化学構造、特に置換基の種類・位置を系統付けた構造活性相関解析に関する研究は皆無である。さらに本研究では特色として、得られた相関情報の裏付け(作用メカニズムの解析)に、プロテオミクスによる網羅的解析を導入する。本申請研究では覚せい剤類似化合物を対象としているが、今後、麻薬類似化合物なども含めて構造活性相関を明らかにできれば、円滑な「包括指定」のための指針策定に繋がると期待される。従って、本申請研究は危険ドラッグの根絶に向けて重要な基礎研究であり、社会的意義は極めて高い。

## 3. 研究の方法

### 使用した覚せい剤類似化合物

覚せい剤(アンフェタミン:AP、メタンフェタミン:MA)に含まれる芳香環の 2-、3-、4-位にフッ素(F)、メトキシ基(MeO)が置換した化合物を使用した。(例: AP に含まれる芳香環の 2 位の位置に F が置換したものを 2-F-AP と表記。その他の化合物も同様に略記した。)

### 細胞傷害試験

ラット褐色細胞腫(PC12)、ヒト神経芽腫(SH-SY5Y)の分化誘導モデルへ各薬物を曝露させ、その生存性を WST-8 法で評価した。

### 神経突起形成への影響評価

PC12、SH-SY5Y 細胞の分化誘導時に各化合物を同時曝露させ、形成される神経突起の長さを測定した。また、同時に突起伸長に関わる分子である Rho-associated protein kinase への影響をウエスタンブロッティング法で比較した。

### モノアミン産生への影響評価

各薬物を投与した雄性 ddy マウス脳組織ならびに各細胞の培養上清中の遊離モノアミン(ドパミン、セロトニン、ノルエピネフリン)を高速液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-ESI-MS/MS)で検出し比較検討した。また、同時に各薬物のモノアミン酸化酵素(MAO)活性への影響を Amplex-Red 試薬を用いて評価した。

### プロテオーム解析

薬物依存性が明らかとなっている AP、4-MeO-AP および 4-MeO-MA を 10 mg/kg の投与量で 1 日おきに 1 週間腹腔内投与した雄性 ddy マウスの脳組織を回収し、TCA-アセトン沈殿法により蛋白質を精製した。さらに精製した蛋白質の発現変動を二次元電気泳動法により分離した。変動蛋白質スポットは、オートゲルピッカーにより切り出し、トリプシン処理することでペプチド断片化させた。抽出したペプチド断片を抽出し、MALDI-TOF-MS/MS により各スポットの蛋白質を同定した。

## 経時的な同定蛋白質の脳内発現量変動解析

薬物投与後、継時的(6時間、1日、7日後)にマウス脳組織を採取し、各時間における同定蛋白質の発現をウエスタンブロッティング法で比較した。解析対象とした分子は同定蛋白質の中でも変動の大きい4種(図2のスポットNo.1,3,7,9)とした。

## 4. 研究成果

### 細胞毒性試験

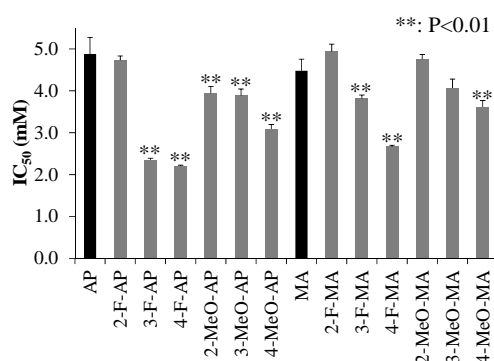


図1 覚せい剤および覚せい剤類似化合物のPC12に対する細胞毒性

PC12およびSH-SY5Yに覚せい剤類似化合物は覚せい剤と同等、もしくはそれ以上の細胞毒性を示した(図1)。置換基の違いによる細胞毒性を比較すると、メトキシ基よりもフッ素が置換した化合物はより強い毒性を示した。またその置換基の位置が2- 3- 4-の順に細胞毒性は強くなることが示唆された。

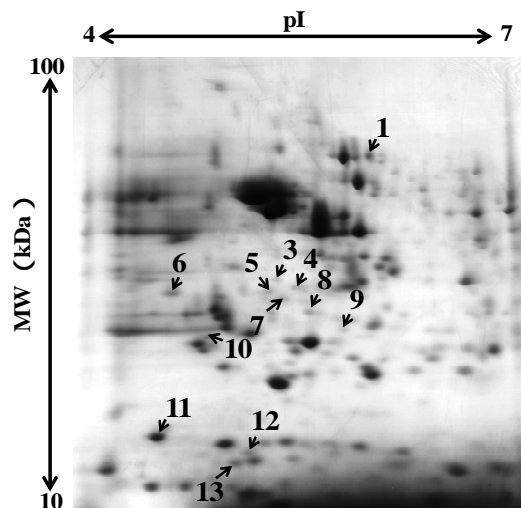
### 神経突起形成への影響評価

PC12およびSH-SY5Yに覚せい剤類似化合物は覚せい剤と同等、もしくはそれ以上の突起形成障害作用を示した。特に3-MeO-APおよび4-MeO-APは顕著な突起形成障害を引き起こし、Rho-associated protein kinaseのリン酸化を強力に阻害することが判明した。

### モノアミン産生への影響評価

雄性 ddy マウスに対してすべての化合物で覚せい剤と同様に脳内ドパミン量の減少が認められた。一方でメトキシ基置換体は脳内セロトニン、ノルエピネフリンの増加も観察された。さらにすべての化合物で覚せい剤と同等のMAO活性阻害作用が認められた。

## プロテオーム解析



No.	Protein name
1	Stress-70 protein, mitochondrial
2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
3	Thioredoxin-like protein 1
4	Phosphoglycolate phosphatase
5	EF-hand domain-containing protein D2
6	Clathrin light chain B
7	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial
8	Glyoxalase domain-containing protein 4
9	Latexin
10	Proteasome subunit alpha type-5
11	Beta-synuclein
12	Olfactory marker protein
13	Cytochrome b5

図2 覚せい剤および覚せい剤類似化合物を投与したマウス脳内で発現減少した蛋白質

AP、4-MeO-AP および 4-MeO-MA を経時曝露したマウス脳組織で共通して発現減少する蛋白質を13種類同定した(図2)。各蛋白質は依存性薬物乱用者にみられる臨床症状である、多幸感、高熱、神経脱落などを反映していた。

## 経時的な同定蛋白質の脳内発現量変動解析

投与後の各時間におけるマウス脳内の各対象蛋白質の発現を解析した結果、それぞれ概ね投与後1日で発現減少することが明らかとなった。

### 総括

研究期間中に本研究では覚せい剤類似化合物の細胞毒性、神経分化毒性、脳内モノアミンへの影響、そして脳内プロテオームに及ぼす影響を明らかにした。覚せい剤類似化合物はそのすべてが覚せい剤と同等もしくはそれ以上の毒性・生理作用を示す上に、脳内で変動する蛋白質も極めて類似してい

た。従って、危険ドラッグを規制する上で基礎骨格を基準にした現行の包括指定はある程度、妥当と考えられる。覚せい剤類似化合物にも包括指定が適用されることを期待したい。また、今回プロテオーム解析で見出した蛋白質は薬物依存性バイオマーカーとして有用である可能性がある。今後、これらを活用した迅速な薬物依存性評価法の確立を目指す。

## 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)

[学会発表](計 11 件)

山下琢矢、宮本和奈、桑山健次、辻川健治、井上博之、糟谷史代:「フルオロアンフェタミン類とメトキシアンフェタミン類のPC12を用いた神経毒性評価」, 横浜, 日本薬学会第133年会, 2013.3.30、【国内会議】

宮本和奈、山下琢矢、中園裕紀子、桑山健次、辻川健治、三木康義、井上博之、糟谷史代:「17種類のフェネチルアミン系薬物におけるヒト肝ミクロソームを用いた代謝解析」, 横浜, 日本薬学会第133年会, 2013.3.30、【国内会議】

宮本和奈、山下琢矢、柴原知美、伊達舞、中園裕紀子、桑山健次、辻川健治、井上博之、糟谷史代:「ヒト及びマウス肝ミクロソームを用いたトリプタミン系デザイナードラッグの *in vitro*代謝」, 神戸, 第38回日本医用マスペクトル学会, 2013.9.26、【国内会議】

山下琢矢、藤本大圭、井上惇彬、柳本龍也、荒川奈美、宮本和奈、桑山健次、辻川健治、井上博之、糟谷史代:「ドーパミン作動性神経細胞を用いたフェネチルアミン系危険ドラッ

グの神経毒性評価」, 神戸, 第38回日本医用マスペクトル学会, 2013.9.26、【国内会議】

宮本和奈、山下琢矢、柴原知美、伊達舞、中園裕紀子、桑山健次、辻川健治、井上博之、糟谷史代:「トリプタミン系乱用薬物の代謝におけるヒトCYP分子種の同定」, 熊本, 日本薬学会第134年会, 2014.3.28、【国内会議】

山下琢矢、藤本大圭、井上惇彬、柳本龍也、荒川奈美、宮本和奈、桑山健次、辻川健治、井上博之、糟谷史代:「ドーパミン作動性神経細胞を用いた覚せい剤類似化合物の毒性評価」, 熊本, 日本薬学会第134年会, 2014.3.28、【国内会議】

山下琢矢、宮本和奈、柳本龍也、荒川奈美、辻川健治、岩田祐子、井上博之、糟谷史代:「覚せい剤類似化合物の神経毒性評価 ~ ROCK pathwayを介した神経突起形成障害 ~」, 名古屋, 日本法中毒学会第33年会, 2014.7.4、【国内会議】

宮本和奈、山下琢矢、高馬里奈、福田麻裕、桑山健次、金森達之、井上博之、糟谷史代:「MDA系薬物によるシトクロム P450 分子種の mechanism-based inhibition評価」, 名古屋, 日本法中毒学会第33年会, 2014.7.5、【国内会議】

宮本和奈、山下琢矢、高馬里奈、福田麻裕、辻川健治、岩田祐子、井上博之、糟谷史代:「MDA系薬物によるシトクロム P450 分子種の mechanism-based inhibition 評価 - MDA系薬物と覚せい剤との相互作用 -」, 千葉, 第39回日本医用マスペクトル学会年会, 2014.10.17、【国内会議】

山下琢矢、宮本和奈、辻川健治、岩田祐子、井上博之、糟谷史代：「覚せい剤構造類似体の神経毒性評価」，神戸，日本薬学会第135年会，2015.3.28、【国内会議】

山下琢矢、宮本和奈、柳本 龍耶、荒川 奈美、辻川健治、岩田祐子、井上博之、糟谷史代：「ハロゲン基を有するフェネチルアミン類の神経毒性評価」，福岡，日本法中毒学会第34年会，2015.6.26、【国内会議】

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 琢矢 (Yamashita, Takuya)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10645203