

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10698

研究課題名(和文)覚醒剤の毒性発現に関与する遺伝子の特定と死因究明への応用

研究課題名(英文) Identification of genes that influence methamphetamine toxicity and application to cause of death investigation

研究代表者

松末 綾 (Matsusue, Aya)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70309920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：法医剖検例について、覚醒剤の毒性に関与している可能性のある遺伝子を調べた。男性の覚醒剤検出症例では、Monoamine oxidase A遺伝子のVNTR多型と脳脊髄液中アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン濃度との間に有意な関連は認められなかった。CYP2D6遺伝子多型と体液中メタンフェタミン濃度、アンフェタミン濃度、代謝比との関連を調べた。CYP2D6遺伝子多型から、代謝能を正常型、低下型、欠損型、亢進型に分類した。低下型は正常型よりも全体的に高いメタンフェタミン濃度を示した。特に、尿と骨髄で有意差を認めた。アンフェタミン濃度と代謝比は、いずれの体液でも有意差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CYP2D6の遺伝子多型が、覚醒剤検出症例の体液中メタンフェタミン濃度に影響を与える可能性が示唆された。日本人では、CYP2D6の代謝能低下型の頻度が高い。代謝能低下型の場合、覚醒剤の体内濃度が正常型に比べて高くなり、覚醒剤の毒性も強く発現する可能性がある。

申請者は、以前、覚醒剤摂取時の脳脊髄液中ドパミン濃度が、COMT遺伝子多型によって有意に上昇することを明らかにした。COMTと同様にカテコラミンの代謝に関わるMAOA遺伝子のVNTR多型を調べたが、男性における関連は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Genes that may affect methamphetamine toxicity were examined in forensic autopsy cases. In men where methamphetamine was detected, no significant association was found between the VNTR polymorphism of the monoamine oxidase A gene and the levels of adrenaline, noradrenaline, and dopamine in the cerebrospinal fluid. We investigated the association between CYP2D6 gene polymorphism and body fluid methamphetamine concentration, amphetamine concentration, and metabolic ratio. Ultrarapid metabolizer, extensive metabolizer, intermediate metabolizer, and poor metabolizer phenotypes were predicted from CYP2D6 genotypes. The intermediate metabolizer showed an overall higher methamphetamine concentration than the extensive metabolizer. In particular, significant differences were observed in urine and bone marrow. Amphetamine concentrations and metabolic ratios were not significantly different in any body fluid.

研究分野：法医学

キーワード：覚醒剤 遺伝子多型 剖検例

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

覚醒剤の毒性発現には個人差がある。覚醒剤の血中濃度が致死濃度に達していないにもかかわらず、他に明確な死因がない場合、死因の判定に苦慮する症例は多い。覚醒剤の身体への影響は多岐に渡っており、それに関与する遺伝子も多い。本研究では、特定の遺伝子の変異・発現量の変化が、覚醒剤の毒性に関与していることを明らかにする。

2. 研究の目的

覚醒剤は、体内を循環し排泄され、その一部が血中から脳血液関門を通過し、標的臓器の中樞神経系に作用する。本研究では、この過程に関連する遺伝子の中から、毒性に影響を与える遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 申請者は、これまでに、覚醒剤検出症例の遺伝子解析を行い、覚醒剤摂取時の脳脊髄液中ドパミン濃度が、*COMT* (*Catechol-O-methyltransferase*) 遺伝子多型によって有意に上昇することを明らかにした。本研究では、法医剖検例について、*COMT* と同様にカテコラミンの代謝に重要な役割を果たしている *Monoamine oxidase A* (*MAOA*) 遺伝子の多型を調べた。*MAOA* 遺伝子のエキソン 1 の 1.2 kb 上流のプロモーター領域には variable number tandem repeat (VNTR) 多型が存在し、遺伝子発現に影響を与えることが報告されている。覚醒剤検出症例ならびに薬毒物未検出症例について、*MAOA* 遺伝子の VNTR 多型と脳脊髄液中カテコラミン濃度との関連を検討した。

(2) 法医剖検例の右心房内血液、左心房内血液、外腸骨動脈血液、尿、心膜液、骨髄について、メタンフェタミン並びにアンフェタミン濃度を測定した。メタンフェタミンは、cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) によりアンフェタミンや p-ヒドロキシメタンフェタミンに代謝される。*CYP2D6* には活性に影響を与える遺伝子多型が存在することから、日本人に多く認められる多型を調べ、*CYP2D6* 遺伝子多型と体液中メタンフェタミン濃度、アンフェタミン濃度、代謝比 (メタンフェタミン濃度/アンフェタミン濃度) との関連を検討した。

(3) 法医剖検例について、GC-MS 並びに LC-MS/MS を用いて血液や体液から薬毒物のスクリーニング検査を行った。その中から、死後経過時間が 2 日以内で、血液並びに体液のいずれから薬毒物が未検出の症例 (コントロール群)、血液並びに体液から覚醒剤のみ検出された症例 (覚醒剤のみ検出群)、血液並びに体液から覚醒剤と向精神薬が検出された症例 (覚醒剤及び向精神薬検出群) について、脳から RNA を抽出した。RNA の品質評価を行ったのち、コントロール群 5 症例、覚醒剤検出群 5 症例、覚醒剤及び向精神薬検出群 4 症例についてマイクロアレイ解析を行った。コントロール群と比較して、覚醒剤のみ検出群や覚醒剤及び向精神薬検出群で有意に発現が増減している遺伝子を検索した。マイクロアレイ解析で増減が確認できた遺伝子をさらに調べるために、コントロール群を 21 症例に、覚醒剤のみ検出群を 8 症例に、覚醒剤及び向精神薬検出群を 18 症例に増やし、脳から RNA を抽出し、cDNA を合成した。それぞれの症例について、リアルタイム PCR を用い、マイクロアレイ解析で増減が確認された遺伝子の発現量を再確認した。さらに、コントロール群 21 症例、覚醒剤のみ検出群 8 症例、覚醒剤及び向精神薬検出群 18 症例の脳からタンパク質を抽出し、リアルタイム PCR で増減が確認された遺伝子についてウエスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現量を確認した。

4. 研究成果

(1) *MAOA* 遺伝子の VNTR 多型の反復数は 2、3、4 の 3 種類が認められた。薬毒物未検出の法医剖検例では、男性では、VNTR 多型と脳脊髄液中アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン濃度との間に有意な関連は認められなかった。女性では、VNTR 多型とノルアドレナリン濃度との間に有意な関連は認められなかった。しかし、女性の 3/3 遺伝子型群におけるアドレナリンおよびドパミン濃度は、3/4 ならびに 4/4 遺伝子型群よりも有意に高かった。以上の結果から、*MAOA* 遺伝子プロモーター領域の VNTR 多型は、女性の脳脊髄液中アドレナリンおよびドパミン濃度に影響を与えることが示唆された。覚醒剤検出症例では、男性では VNTR 多型と脳脊髄液中アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン濃度との間に有意な関連は認められなかった。女性の覚醒剤検出症例については、症例数が少なかったため、統計処理ができなかった。今後、症例数を増やし、女性の覚醒剤検出症例における影響を検討したい。

(2) *CYP2D6* 遺伝子多型は、日本人に認められる *CYP2D6**1、*2、*4、*5、*10、*14A、

*14B、*18、*36、multiplication を調べ、代謝能を正常型 (Extensive metabolizer : EM)、低下型 (Intermediate metabolizer : IM)、欠損型 (Poor metabolizer : PM)、亢進型 (Ultrarapid metabolizer : UM) に分類した。その結果、今回調べた症例に PM は認められず、UM も少数であった。覚醒剤検出例と覚醒剤非検出例の間で表現型の頻度に有意差は認められなかった。メタンフェタミン濃度は、全体的に IM のほうが EM よりも高い値を示した (Fig. 1)。特に、尿と骨髄で有意差を認めた。アンフェタミン濃度と代謝比は、いずれの体液でも有意差は認められなかった。今回の結果より、CYP2D6 の遺伝子多型が、覚醒剤摂取時の体液中メタンフェタミン濃度に影響を与える可能性が示唆された。

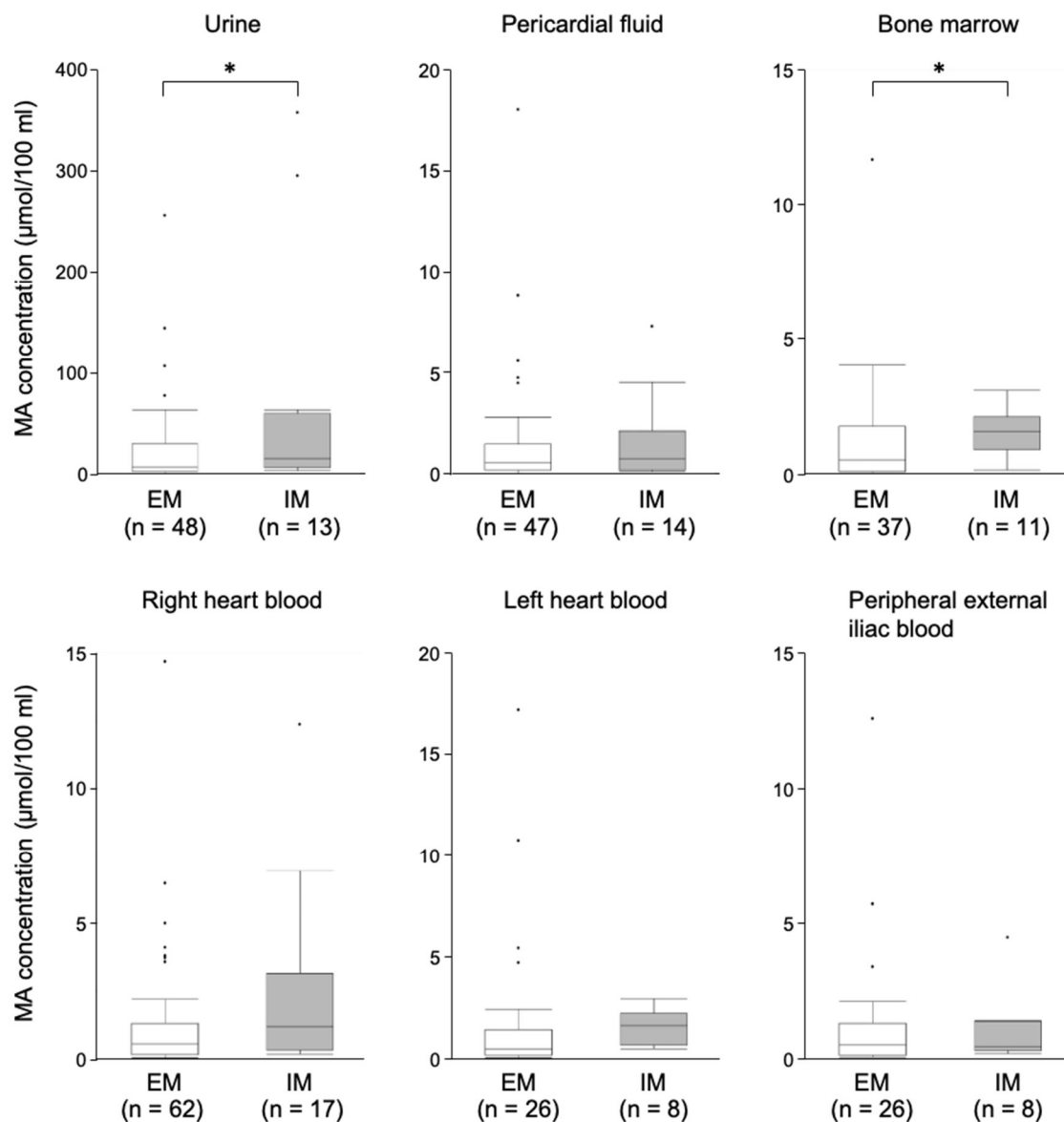


Fig.1 体液中のメタンフェタミン濃度 (μ mol/100ml) と CYP2D6 遺伝子多型との関連

(3) マイクロアレイ解析を行った結果、覚醒剤のみ検出群・覚醒剤及び向精神薬検出群ともに、コントロール群と比べて多くの遺伝子の発現量が増減していることが明らかとなった。リアルタイム PCR においても、覚醒剤検出群 (覚醒剤のみ検出群 + 覚醒剤及び向精神薬検出群) において発現量が増減している遺伝子が複数再確認できた。ウエスタンブロッティングの結果、覚醒剤検出群 (覚醒剤のみ検出群 + 覚醒剤及び向精神薬検出群) において、コントロール群に比べて発現量が増減しているタンパク質が複数確認できた。これらのタンパク質は、覚醒剤による毒性発現に関与している可能性がある。しかし、覚醒剤のみが検出された症例が少なく、覚醒剤と同時に向精神薬も検出されている症例が多いため、これらのタンパク質の増減が覚醒剤由来であるか否かを慎重に検討する必要がある。今後は、発現の増減が確認されたタンパク質について、その機能と覚醒剤の毒性との関連を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsusue A, Kubo SI, Ikeda T, Tani N, Maeda T, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Ikematsu N, Ishikawa T	4. 巻 701
2. 論文標題 VNTR polymorphism in the monoamine oxidase A promoter region and cerebrospinal fluid catecholamine concentrations in forensic autopsy cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 71～76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.02.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsusue A, Ishikawa T, Ikeda T, Tani N, Maeda T, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Kubo SI	4. 巻 58
2. 論文標題 Associations between variable number tandem repeat polymorphism in the monoamine oxidase A with cerebrospinal fluid levels in drug positive cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Albanian Journal of Medical and Health Sciences	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松末 綾, 石川 隆紀, 池田 知哉, 谷 直人, Brian Waters, 原 健二, 高山 みお, 柏木 正之, 久保 真一
2. 発表標題 法医学検例における血中アドレナリン並びにノルアドレナリン濃度とMAOA遺伝子多型の関連
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松末 綾, 石川 隆紀, 池田 知哉, 谷 直人, Brian Waters, 原 健二, 高山 みお, 柏木 正之, 久保 真一
2. 発表標題 法医学検例における薬物検出例の脳脊髄液中カテコラミン濃度とMAOA-uVNTR多型の関連.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松末 綾, 石川 隆紀, 池田 知哉, 谷 直人, Brian Waters, 原 健二, 高山 みお, 柏木 正之, 久保 真一
2. 発表標題 法医剖検例における脳脊髄液中カテコラミン濃度およびMAOA遺伝子プロモーター領域のVNTR多型の関連.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsusue A and Kubo SI	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 17
3. 書名 Forensic Medicine and Human Cell Research	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	久保 真一 (Kubo Shinichi) (10205122)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	石川 隆紀 (Ishikawa Takaki) (50381984)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授 (24405)	
研究分担者	原 健二 (Hara Kenji) (00090738)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

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
研究分担者	柏木 正之 (Kashiwagi Masayuki) (70301687)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	
研究分担者	ウォータース ブライアン (Waters Brian) (00609480)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	
研究分担者	高山 みお (Takayama Mio) (40804802)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

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