

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590735

研究課題名（和文）ストレスは覚醒剤の心臓への影響を強めるか？—遺伝子発現を指標とした病態生理解明

研究課題名（英文）Molecular-biological analysis of the effect of methamphetamine on the heart in stressed mice.

研究代表者

那谷 雅之（NATA MASAYUKI）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70241627

研究成果の概要（和文）：

ストレスは覚醒剤の心臓への影響を強めるかについて、マウスを用いて種々の検討を行った。ストレス（単回）は拘束及び水浸拘束を用いた。覚醒剤投与に拘束が加わると循環動態の変化が相乗的に起こると考えられた。また、覚醒剤とストレスの長期相互作用でも種々の遺伝子の発現に影響を与えていることが確認された。

研究成果の概要（英文）：Interaction in the heart between the administration of methamphetamine (MAP) and stress was investigated. The result suggests induction of an inflammatory condition such as damage to the myocardium, and indicated that these insults affected the circulatory system additively or synergistically. Long term interaction of Map and stress was also investigated, some interesting findings were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：覚醒剤、ストレス、遺伝子発現、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

覚醒剤メタンフェタミン(MAP)は、神経終末からのノルアドレナリン・ドパミン放出増加、monoamine oxydase 抑制、ノルアドレナリン・ドパミンの再取り込み阻害、交感神経レセプターへの直接作用から交感神経・中枢神経の過剰興奮を起こすことが知られている。覚醒剤に身体拘束（ストレス）が作用した場合に生体内でどのような変化が生じているかを解明するためにマウスを用いたマ

イクロアレイ実験及び real time PCR 実験を始めていた。マイクロアレイ実験ではマウスを、①対照群、②拘束群、③覚醒剤を腹腔内投与した MA 群、④覚醒剤投与後に拘束した MA+拘束群（SM 群）の 4 群に分けた。処置後 1 時間で安楽死させ、直ちに心臓を取り出し常法に従ってマイクロアレイ解析（OpArray TM Mousev4.0: Filgen）を行った。

マイクロアレイ解析の結果について、pathway 解析を行った。Pathway 解析では炎

症反応、核レセプター、平滑筋収縮 pathway が亢進し、電子伝達系 pathway が抑制されていることが明らかとなった。個々の遺伝子では、コントロール群に対し、MA 投与および身体拘束群において3倍以上発現変動したものが22遺伝子、1/3以下の発現変動を示したものが14遺伝子あった。

2. 研究の目的

覚醒剤乱用者が暴れ、それを押さえようと身体拘束を行うと急死することが稀にある。この際に生体内でどのような変化が生じているかを解明するためにマウスを用いた遺伝子発現実験を心臓での変化に焦点をあてて行うことを計画した。

3. 研究の方法

(1) モデルマウス

雄 C57BL/6J マウス (9-week-old) に対し、生理食塩水を腹腔内投与した対照群 (C 群; n=6)、生食投与後に拘束した群 (S 群; n=7)、methamphetamine (MA; 30mg/kg) を腹腔内投与した群 (M 群; n=6)、MA 投与後に拘束した群 (SM 群; n=7) の4群に分類した。

(2) Quantitative RT-PCR analysis

total RNA を抽出し、cDNA を作製した。microarray analysis から得られた遺伝子に対し primer を設計し、量的 RT-PCR 法を行った。

(3) cytokine 測定

血清における TNF- α 、IL-6 濃度を ELISA kit (invitrogen) で測定した。

(4) 分析

統計処理は、Tukey-Krammers 法を用いて有意水準 5%未満を有意とした。

(5) Gap Junction について検討

細胞間の電気的および情報連絡経路となる Gap Junction について検討を行った。Cx (Connexin) 遺伝子のうち、心臓において発現が報告されている Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 の4遺伝子について Real time PCR を用いて遺伝子発現定量を行い、二元配置分散分析により検定した。

(6) heat shock protein の関与

メタンフェタミン (MAP) が、ストレス下で心筋に及ぼす影響について heat shock protein (Hsp) を指標として検討した。また、1ヵ月間の MAP 投与・ストレス負荷の影響についても検討した。

ストレスは水浸拘束 (WRS) を用いた。WRS 直前に MAP 30mg/kg を1回腹腔内投与した。心筋の一部を Hsp70 測定試料とした。また、心筋から RNA を抽出し、Hsp60, 70, 90, 32 の遺伝子発現を real-time PCR で検討した。Hsp70、H-FABP は ELISA で定量し、血中 MAP 濃度は誘導体化後 GC/MS で定量した。

(7) 覚醒剤とストレスの長期相互作用

1ヵ月間のストレス (S 群) として温度変化、電気ショック、拘束、WRS を用いた。MAP は 3 回/週 10mg/kg を1回腹腔内投与した (M 群)。心筋から RNA を抽出し、各種遺伝子発現を real-time PCR で検討した。ストレスの指標である血中コルチコステロン (CORT) を ELISA で定量した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子の変動パターン

遺伝子発現の変動パターンは①C 群および S 群は変動せず、M 群と SM 群で変動を示したグループ (Nfkbiz, Nr4a1, Iigs1; Fig 1.)、②C 群に対し、他の群全てで発現が増加し、特に C と SM 群間で有意な変動を示したグループ (Rgs2, Rasd1, MafF; Fig 2.) に分類できた。

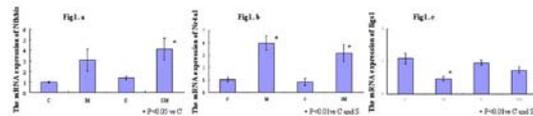


Fig 1. The expression of Nfkbiz(a), Nr4a1(b) and Iigs1(c) in each group. Values are means \pm SE. The mRNA expression of Nfkbiz and Nr4a1 tended to up-regulated in the Group M and Group SM. On the other hand, the expression of mRNA of Iigs1 was lessened in the Group M and Group SM.

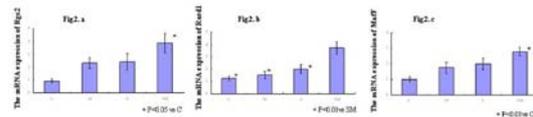


Fig 2. The expression of Rgs2(a), Rasd1(b) and MafF(c) in each group. Values are means \pm SE. The mRNA expression of Rgs2, Rasd1 and MafF tended to up-regulated in each group. Rgs2, Rasd1 and MafF showed significant increase in the Group SM compared with the Group C.

Table 1. The 22 genes selected from the results of microarray analysis

name	description of function
1 Am2a2	regulator of cytosolic calcium in the heart
2 Birc1e	anti-apoptotic activity
3 Cd14	mediate LPS-induced cell activation
4 Cfc1	intercellular signaling pathway during vertebrate embryogenesis
5 Cvet	electron transporter activity
6 Dbp	P/AR-hizp transcription factor family
7 Dp1	cell cycle and apoptosis
8 Dusp1	MAP kinase phosphatase
9 Efcfbp2	N-terminal EF-hand calcium binding protein
10 Gak	cyclinG associated kinase
11 Iigs1	IFN-inducible GTPase
12 MafF	small maf basic leucine zipper transcription factor
13 Nfkbiz	regulator of NfKB
14 Nr4a1	transcription factor
15 Olfr492	olfactory receptor
16 Pold3	DNA polymerase
17 Rasd1	activator of G-protein signaling
18 Rgs2	regulator of G-protein signaling
19 Rnf125	mediator of ubiquitin ligase activity
20 Sart2	tumor-rejection antigen
21 Sema6b	axon guidance
22 Zdhc23	zinc-finger, DHHC-type family

Table 2

Serum concentrations (ng/ml) of TNF- α and IL-6 in each group

	C	S	M	SM
TNF-α	1.76\pm0.14	1.71\pm0.11	2.15\pm0.28	3.64\pm0.24*
IL-6	6.95\pm0.47	67.2\pm12.2	89.9\pm36.2	244.2\pm38.4*

Values are means \pm SE.

* Significantly different from the Group C, S and M (P < 0.0001).

C 群および S 群は変動せず、M 群と SM 群で変動を示したグループ①の Nfkbiz, Nr4a1 では、

- Nf κ B signaling による発現誘導
- proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) は Nf κ B を活性化
- MA 投与による proinflammatory cytokine 産生 (table 2.)

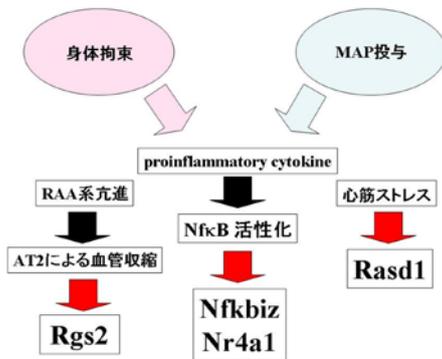
から MA 投与による心筋傷害を惹起すること

が示唆された。

C 群に対し、他の群全てで発現が増加し、特に C と SM 群間で有意な変動を示したグループ②では、

- Rgs2 はアンジオテンシン II (ATII) による血管収縮を調節
- ATII は Rgs2 発現を増加、Rgs2 は negative-feedback effect で ATII 調節から血管収縮・レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進が起こっている可能性が考えられた。また、
- Rasd1 がコードするタンパクは cellular and tissue stress と関連
- amphetamine 投与により Rasd1 発現増加から心筋へのストレスが生じている可能性が考えられた。

以上を図で示すと以下のようなになる。



以上をまとめると、MA 投与により心筋虚血等による心筋傷害が惹起された可能性が考えられ、MA 投与または身体拘束の各々が血管収縮やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化といった循環動態の変化を来し、MA 投与に身体拘束が加わると相乗的に作用すると考えられた。

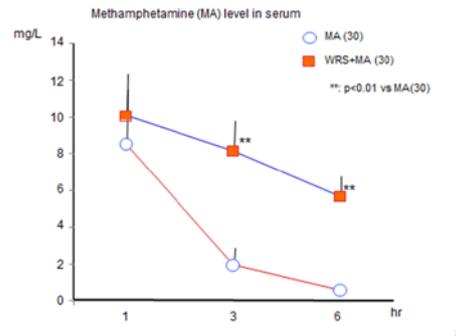
(2) Gap Junction に関する遺伝子

Cx37 は覚醒剤投与により、Cx45 は身体拘束により有意に低下した。また、Cx40 は身体拘束により低下傾向を、Cx43 は覚醒剤投与に身体拘束が加わると増加傾向を示した。覚醒剤投与により発現低下を示した Cx37 は血管内皮に分布し、高血圧、動脈硬化、糖尿病などの血管内皮障害時に発現を低下することが報告されている。さらに、覚醒剤投与により血清中の IL-1, IL-6, TNF- α 等の炎症性サイトカインが増加するという報告もある。これらの報告から、覚醒剤投与により炎症性サイトカインが生成され、心筋傷害が生じている可能性が考えられた。また、元来 turnover の速い Gap Junction において、身体拘束ストレスによって洞房結節、房室結節に分布する Cx45 の発現低下が、房室伝導障害を惹起し、致死性不整脈の発生要因となっている可能性が考えられた。本結果から、覚醒剤投与に身体拘束が加わると相加・相乗的に心臓に影響する可

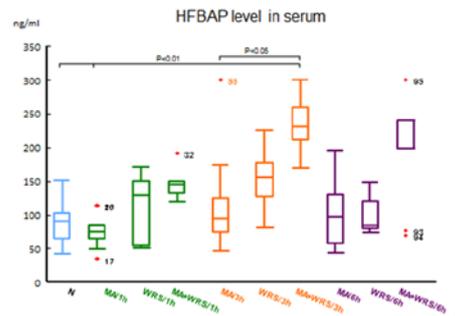
能性が示された。つまり、覚醒剤投与が心筋障害を惹起し、さらに身体拘束が刺激伝導系に作用し循環動態に影響を与えることが考えられた。

(3) heat shock protein の関与

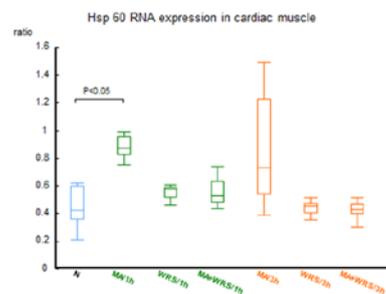
WRS(+)または(-)の条件下で MAP の心筋への影響を検討した。MAP 投与後 3.6h での血中濃度は WRS(-)に比べ、(+)で有意に高値となり、WRS 下ではその代謝・排泄が遅れることを示した。

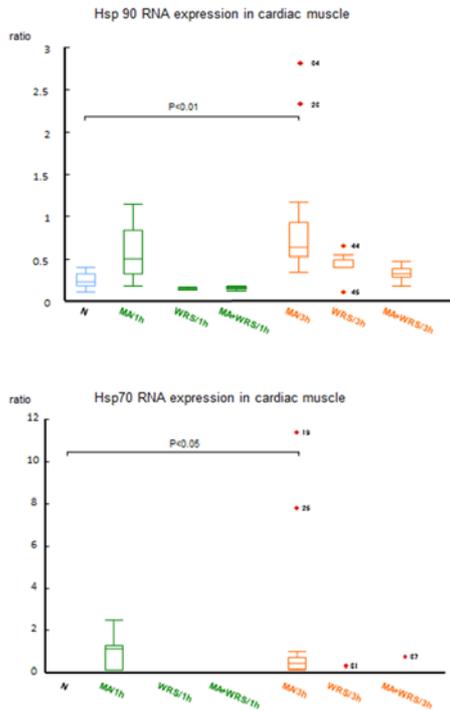


H-FABP 濃度が WRS(+)MAP 群において投与 6h で有意に高値となるが、WRS(-)MAP 群、WRS のみの群ではその上昇は認められなかった。

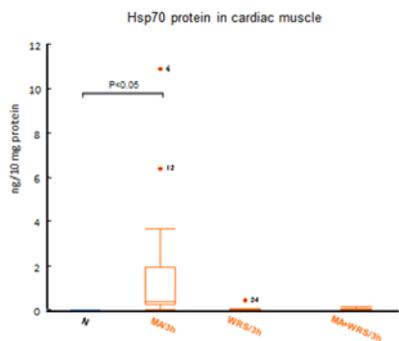


MAP 投与 3h での心筋の Hsp 遺伝子発現では、WRS(-)MAP 投与において Hsp70, 90, 32 の発現レベルが高値を示すが、WRS(+)MAP 群では大きな変化は観察されなかった。





心筋における Hsp70 タンパク量も WRS(-)MAP 投与群において一般に高い値が得られた。



WRSS(-)MAP 群の心筋では、防御機構としての Hsp の発現が促進されるが、WRS(+)MAP 群では、その発現が低く、障害が惹起される可能性があり、MA 単独よりも、water-immersion restraint stress (WRS) 下の方が、MA の心筋に対する影響 (障害) は強かった。その原因の 1 つには、MA の血中からの排泄が遅れることが考えられ、一般的には、stress と MA は同じように、相加的あるいは相乗的に作用していると考えられた。

(4) 覚醒剤とストレスの長期相互作用

血中 CORT 値は M 群では変化が見られず、S 群で優位に促進し、MS 群ではその促進が抑えられた。

心筋の遺伝子発現では以下の①~⑥が考えられた。

①Hsp70 を始め Hsps は M 群で高値を示す傾向にあり、メタロチオネイン(MT)はストレス負荷で促進がみられ、MS 群で有意に高値を示した。MMP および TiMP は処置群の心筋で促進する傾向を示した。すなわち、心筋での障害とその防御に関する影響が観察された。

②MS 群でアンジオテンシン変換酵素(ACE)の発現が促進し、NOS2 は低下を示した。これは、心筋における血管収縮を強め、血圧上昇、心不全の因子になりうる。IL-6 や Osteopontin (OPN) の発現促進は、MS 群で心筋の炎症が強まっていることを示唆した。

③心筋障害の指標の 1 つであるプロスタサイクリン合成酵素は、処理群でいずれも有意な促進を認めたが、その受容体 IP の発現は M 群だけ上昇しており、M 群にのみ心筋保護作用を示すことが示唆された。

④心臓の収縮・弛緩の異常は Ca 動態の異常である。電位依存性 Ca チャネル(Cacnalc)の MS 群での低下は心筋障害を示唆した。

⑤組織の低酸素状態に対する適応応答である解糖系酵素ホスホグリセリン酸キナーゼ (Pgk1) は、M 群で発現促進が認められた。また、アンジオテンシンの作用と機能的に拮抗し、心保護作用が期待される BNP は M 群でのみ有意な促進を示した。これらは、心筋での防御作用が M 群で強いことを示唆した。

⑥Connexin 43 発現は MS 群で有意に増加し、これは心筋障害の一因になると思われる。

		M	S	MS
Hsp	<i>HSF1</i>	+++		
	<i>Hsp70</i>	+++		
	<i>Hsp90</i>	+		
	<i>Hsp60</i>	++		
	<i>Hsp27</i>	++	+	++
	<i>Hsp47</i>	+++		
	<i>Hsp32 (HO1)</i>			
MT	<i>MT1</i>	+	+	++
	<i>MT2</i>		++	+++
Oxidant stress	<i>Nrf2</i>		---	---
	<i>GSH red</i>			
	<i>Gpx1</i>			+++
	<i>GST</i>	+++	+++	+++
	<i>Sod1</i>		-	
	<i>Sod2</i>	+++	+	+++

	<i>catalase</i>	+++		
	<i>Prdx1</i>		-	
	<i>GCS</i>			
	<i>Nqo1</i>		-	
	<i>TF</i>	+++	++	+
Cytokine	<i>IL6</i>		+	+++
	<i>OPN</i>		+	+
MMP & TIMP	<i>Mmp14</i>			
	<i>MMP2</i>	++	+	++
	<i>MMP3</i>	+	+	+++
	<i>TiMP2</i>		++	+++
	<i>TiMP3</i>	+++	+++	+++

ACE	<i>ACEvar1</i>	+	+	+
	<i>ACEvar2</i>			+++
NOS	<i>NOS1</i>	+		
	<i>NOS2</i>		---	---
	<i>NOS3</i>			
Prosta-cycline	<i>Prostacy Syn</i>	++	+++	+++
	<i>IP</i>	+++		
Ca ion	<i>Cacna1c</i>			-
	<i>Cacna1c ver1</i>	+		-
	<i>Ryr2</i>	++	++	
	<i>ATP2a2</i>	++		
p53	<i>p53</i>		--	--
	<i>TIGAR</i>	++		
CAM	<i>Cldn1</i>	+	+	+
	<i>Cdn5</i>		-	
	<i>ZO1</i>		-	
	<i>ZO2</i>		-	-
	<i>b-catenine</i>	+++		
	<i>connexine43</i>	+		+++
	<i>ICAM1</i>			+
<i>VCAM1</i>	++	+	+++	
	<i>BCI2</i>	++		-
	<i>pgk1</i>	+++		
	<i>NRSF</i>		-	-

	<i>BNP</i>	++		
	<i>plasma Pltp</i>			+++

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 3 件)

1. Water-restraint stress enhances methamphetamine induced cardiotoxicity. Tomita M, Katsuyama H, Watanabe Y, Hidaka K, Yoshitome K, Miyaishi S, Ishikawa T, Shinone K, Nata M. *Chem Biol Interact*. 2011 15; 190: 54-61.(査読有)
2. Molecular biological analysis of cardiac effect of high temperature in rats. Nakagawa Y, Inoue H, Shinone K, Ikemura M, Nata M. *leg Med*. 2010;14:63-68.(査読有)
3. Molecular-biological analysis of the effect of methamphetamine on the heart in restrained mice. Shinone K, Tomita M, Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Nata M. *Legal Med* 2010;12:79-83.(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. ストレスと覚醒剤の長期相互作用 - とくに心筋への影響 - . 富田正文, 石川隆紀, 篠根光太郎, 那谷雅之. 第 95 次日本法医学会学術全国集会 (福島). 2011 年 6 月 17 日.
2. ストレス環境下で覚醒剤の心筋に及ぼす影響 - Heat shock protein の関与 - . 富田正文, 吉留 敬, 宮石 智, 篠根光太郎, 那谷雅之. 第 94 次日本法医学会学術全国集会 (東京). 2010 年 6 月 24 日.
3. 覚醒剤及び身体拘束の心臓における遺伝子発現への影響 (第 2 報). 篠根光太郎, 富田正文, 那谷雅之, 井上裕匡. 伊藤真弓. 第 93 次日本法医学会学術全国集会 (大阪). 2009 年 5 月 15 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那谷 雅之 (NATA MASAYUKI)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70241627

(2) 研究分担者

富田 正文 (TOMITA MASAHUMI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50113197