

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10527

研究課題名（和文）ヒトの概日リズムに着目した薬物中毒死例における薬物代謝能の評価に関する研究

研究課題名（英文）Evaluation of drug metabolism capacity in drug poisoning cases focusing on human circadian rhythms

研究代表者

谷 直人（Tani, Naoto）

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00802612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：薬物中毒症例において時計遺伝子がどのように薬物代謝を制御し、薬物による致死的な副作用を生じさせているかを調べた。メタンフェタミン（MA）検出例における肝臓組織の遺伝子発現解析およびHepG2細胞へのMA暴露実験の結果は、時計遺伝子がCYP3A4、CYP2D6の発現制御に関与していることが示唆された。一方、ベンゾジアゼピン系薬物（BZD）検出例における肝臓組織の遺伝子発現解析およびHepG2細胞へのBZD暴露実験の結果は、時計遺伝子がCYP3A4、CYP2C19の発現制御に関与していることが示唆された。MAおよびBZD代謝において時計遺伝子が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物中毒関連死では、治療濃度域でも致死的な副作用が生じることがあり、死因診断およびその病態生理を理解することに苦慮することがある。そのことから、薬物中毒死症例では薬物摂取による致死的な副作用が生じやすい時間帯があるものと予想される。本研究では、メタンフェタミンおよびベンゾジアゼピン系薬物検出例における薬物代謝酵素の発現に時計遺伝子が関与していることが示された。時計遺伝子の発現状態により薬物代謝酵素の発現が影響され、薬物による致死的副作用の個人差に関与する可能性が示唆された。法医学的には、中毒死症例における薬感受性の個人差の評価に貢献できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study investigated how clock genes affect drug metabolism and contribute to fatal drug-induced side effects in cases of drug poisoning. Gene expression analysis of liver tissues in cases where methamphetamine (MA) has been detected, and the results of MA exposure experiments on HepG2 cells, suggest that clock genes are involved in regulating the expression of CYP3A4 and CYP2D6. Furthermore, the results of gene expression analysis in liver tissues in cases where benzodiazepine (BZD) has been detected, and the results of BZD exposure experiments using HepG2 cells, suggest that clock genes are involved in regulating the expression of CYP3A4 and CYP2C19. It has thus become clear that clock genes play an important role in the metabolism of both MA and BZD. The expression status of clock genes may influence the expression of drug-metabolizing enzymes, suggesting that they may account for the individual differences observed in fatal drug-induced side effects.

研究分野：法医学

キーワード：時計遺伝子 薬物代謝酵素 薬物中毒 覚醒剤 ベンゾジアゼピン 肝臓 培養細胞 バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物中毒関連死では、治療濃度域でも致死的な副作用が生じることがあり、死因診断およびその病態生理を理解することに苦慮することがある。一方で、臨床医学や薬理学の分野では、投薬する時間により、体内での薬の動き方や効き方が大きく異なるということが、一般的な考え方となっている。そのことから、薬物中毒死症例においても薬物摂取による致死的な副作用が生じやすい時間帯があるものと予想される。一方、薬物中毒症例において、時計遺伝子発現がどのように薬物代謝を制御し、薬物の致死的な副作用を生じさせているかは明らかではない。

### 2. 研究の目的

ヒトにおける血圧や体温、ホルモンの分泌などの生理機構は、約 24 時間周期による概日時計により制御されている。概日時計とは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群によって構成されており、時計遺伝子の欠損は概日リズムの特徴に変化を生むことが知られている。時計遺伝子はシトクロム P450 や薬物などの物質輸送を行うトランスポーターの発現にも影響を及ぼし、薬物の吸収や代謝に時間依存的な変化を引き起こしていることが明らかとなっている。そこで本研究では、薬物中毒症例において時計遺伝子がどのように薬物代謝を制御し、薬物による致死的な副作用を生じさせているかを明らかにする。本研究で得られた結果から、薬物中毒死における時計遺伝子発現状態による薬物代謝能の変化を評価し、法医学的に応用することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 死後経過 48 時間以内に解剖が行われた MA 検出 40 剖検例の肝臓組織を用いた。肝臓組織から RNA を抽出し、cDNA 合成後、時計遺伝子 BMAL1, PER2 および MA の代謝に関与する薬物代謝酵素 CYP2D6, CYP3A4 の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析し、死亡時刻、血中 MA 濃度と比較した。血中 MA 濃度は GC/MS により測定され、症例は 4 つのサブグループに分類された：血中 MA 濃度 < 0.2  $\mu\text{mol/dL}$  (低濃度群:  $n = 9$ ), 0.2 ~ 1.0  $\mu\text{mol/dL}$  (中濃度群:  $n = 20$ ), 1.0 ~ 3.0  $\mu\text{mol/dL}$  (高濃度群:  $n = 7$ ), および > 3.0  $\mu\text{mol/dL}$  (致死濃度群:  $n = 4$ )。

(2) 肝臓細胞への MA 曝露の影響を調査するために、肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を使用した。HepG2 細胞に MA を終濃度 0.2, 2, 5, および 10  $\mu\text{mol/dL}$  になるよう添加した (各  $n = 6$ )。MA 添加, 1 時間および 3 時間後に細胞を回収し、RT-PCR により BMAL1, PER2, CYP2D6, CYP3A4 の遺伝子発現を解析した。

(3) BMAL1 および PER2 発現抑制下での MA の影響を確認するために、Silencer<sup>®</sup> Select pre-designed siRNAs (Thermo Fisher Scientific) を使用して、遺伝子発現抑制実験を行った。Silencer<sup>®</sup> Select Negative Control #1 siRNA をネガティブコントロール (NC) として使用した。siRNA は、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用し、リポフェクション法により細胞に導入した。MA 添加実験は、siRNA 導入の 48 時間後に実施した。MA を終濃度 5  $\mu\text{mol/dL}$  となるよう添加し、1, 3, 6 時間後に細胞を収集した ( $n = 6$ )。回収した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を用いて CYP2D6, CYP3A4 の遺伝子発現を解析した。

(4) 死後経過 48 時間以内に解剖が行われた BZD 検出 56 剖検例および薬物非検出 51 剖検例の肝臓組織を用いた。肝臓組織から RNA を抽出し、cDNA 合成後、時計遺伝子 BMAL1, PER2, DBP および BZD の代謝に関与する薬物代謝酵素 CYP2C19, CYP3A4 の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析し、死亡時刻、薬物種類別に比較した。血中 BZD 濃度は GC/MS により測定され、症例は 5 つのサブグループに分類された：ジアゼパム検出群 ( $n = 12$ ), ミダゾラム検出群 ( $n = 21$ ), エスタゾラム検出群 ( $n = 7$ ), その他の BZD 単独検出群 ( $n = 9$ ) および BZD 複数検出群 ( $n = 7$ )。

(5) 肝臓細胞への BZD 曝露の影響を調査するために、肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を使用した。BZD は終濃度がそれぞれ、ジアゼパム 20  $\mu\text{g/mL}$ , ミダゾラム 2  $\mu\text{g/mL}$ , アルプラゾラム 0.6  $\mu\text{g/mL}$ , エスタゾラム 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , トリアゾラム 0.04  $\mu\text{g/mL}$  になるよう細胞に添加した ( $n = 4$ )。これらの BZD はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、ネガティブコントロールとして DMSO のみを細胞に添加した。BZD 曝露の 1, 3, 6 時間後に細胞を回収し、BMAL1, PER2, CYP2C19, CYP3A4 の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

### 4. 研究成果

(1) MA 検出例の肝臓における遺伝子発現解析の結果、死亡時間と BMAL1, PER2, CYP3A4, および CYP2D6 の発現との間に統計的有意差はなかった。また、BMAL1 の発現は、血中 MA が中濃度および高濃度の群で上昇する傾向があったが、致死濃度群では低下する傾向があった。一方、PER2 の発現は血中 MA 濃度の増加とともに上昇し、致死濃度群で最も高かった。CYP3A4 の発現は PER2

の発現と同様に、血中 MA 濃度の増加とともに上昇する傾向があった。CYP2D6 の発現は BMAL1 の発現と同様に、血中 MA 高濃度群で最も高かったが、致死濃度群で低下した（図 1）。

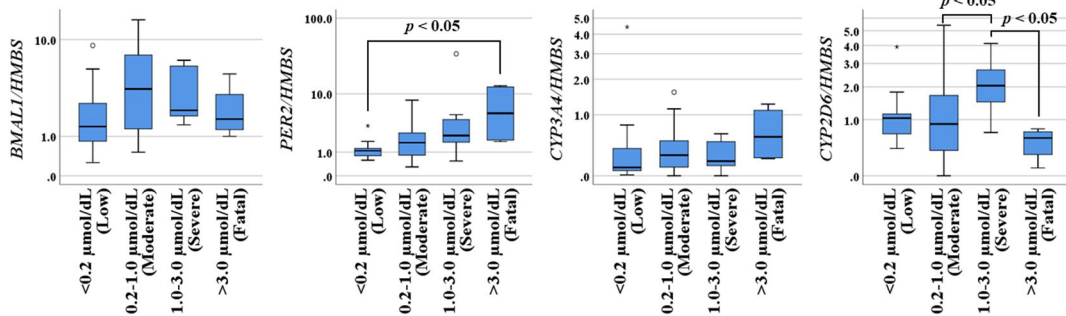


図 1. 血中 MA 濃度分類ごとの BMAL1, PER2, CYP3A4, CYP2D6 の遺伝子発現

(2) HepG2 細胞における BMAL1 および CYP2D6 の発現は、MA 添加後 3 時間では添加後 1 時間と比較して低下していた。MA 添加後、PER2 および CYP3A4 の発現は MA 濃度の増加とともにわずかに上昇する傾向がみられた（図 2）。

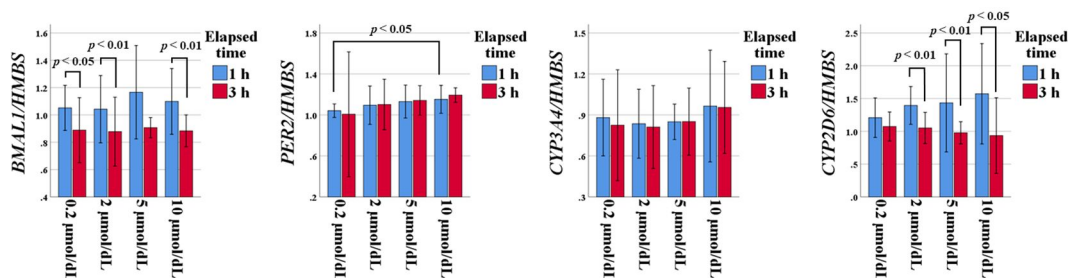


図 2. HepG2 細胞への MA 暴露後の BMAL1, PER2, CYP3A4, CYP2D6 の遺伝子発現

(3) siRNA の導入により BMAL1 の発現が抑制された。BMAL1 の抑制後、CYP3A4 および CYP2D6 の発現は NC と比較して増加した。さらに、BMAL1 抑制下では MA 暴露後の経過時間に依存し、CYP3A4 の発現は増加、CYP2D6 の発現は減少した。PER2 の発現についても、siRNA の導入後に抑制された PER2 抑制下では NC と比較して CYP3A4 発現が増加し、MA 暴露後は経過時間に依存して CYP3A4 の発現は増加した。一方、NC における CYP2D6 の発現は MA 暴露後の経過時間に依存し低下したが、PER2 抑制下の CYP2D6 の発現は MA 暴露後の経過時間で変化しなかった（図 3）。

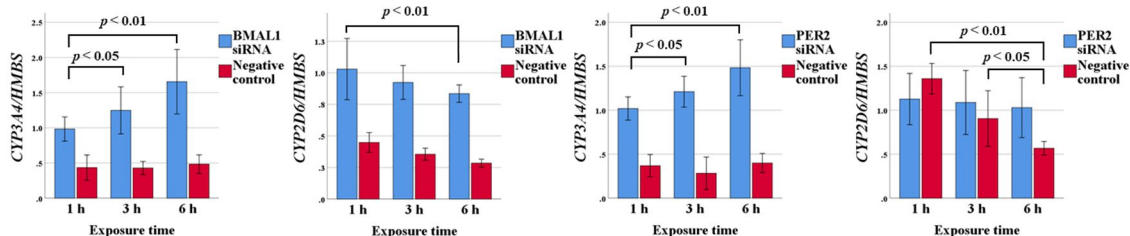


図 3. BMAL1 および PER2 抑制下での MA 暴露後の CYP3A4, CYP2D6 の遺伝子発現

(4) BZD 検出群では、死亡時刻と BMAL1 発現との間に有意差は見られなかった。BZD 検出群における PER2 発現は 0~4 時に死亡した症例よりも 16~20 時に死亡した症例の方が高かった。BZD 検出群における DBP 発現は、0~4 時および 12~16 時に死亡した症例よりも 8~12 時に死亡した症例の方が高かった。BZD 検出群における CYP3A4 および CYP2C19 の発現は、DBP 発現と同様に 8 時~12 時に死亡した症例で高くなる傾向があった。薬物非検出群では、20~24 時に死亡した症例の BMAL1 発現が、8~12 時に死亡した症例よりも高かった。しかし、PER2, DBP, CYP3A4, および CYP2C19 の発現と死亡時間には有意差は認められなかった。BMAL1 および PER2 の発現は、BZD 薬物種類別で有意差はみられなかった。BZD 検

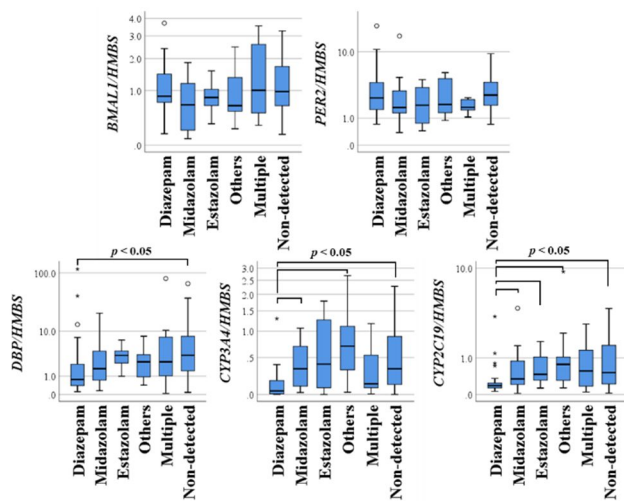


図 4. 検出 BZD 種類ごとの BMAL1, PER2, DBP, CYP3A4, CYP2C19 の遺伝子発現

出例の肝臓における遺伝子発現解析の結果，ジアゼパム検出群の *DBP*，*CYP3A4*，および *CYP2C19* の発現が薬物非検出群よりも低下していた．BZD 検出例の肝臓組織の遺伝子発現解析の結果として，特に時計遺伝子 *DBP* が，薬物代謝酵素の発現に関与している可能性が示された（図 4）．

（5）*BMAL1* の発現は，ジアゼパムまたはミダゾラム曝露 6 時間後でネガティブコントロールよりも高かった．さらに，*PER2* の発現は，ジアゼパム曝露後 1 時間およびジアゼパム曝露後 6 時間ではネガティブコントロールよりも低かった．*DBP* の発現は，ジアゼパムまたはミダゾラム曝露後 1 時間および 3 時間後でネガティブコントロールよりも低かった．*CYP3A4* の発現は，ジアゼパムまたはミダゾラム曝露後 3 時間および 6 時間でネガティブコントロールよりも低かった．*CYP2C19* の発現は，ジアゼパムまたはミダゾラム曝露の 3 時間後でネガティブコントロールよりも高かった．さらに，*CYP2C19* の発現は，ジアゼパム曝露 6 時間後においてもネガティブコントロールよりも高かった．結果として，ジアゼパムまたはミダゾラム曝露後の *DBP* および *CYP3A4* の発現が，剖検組織における遺伝子発現解析と同様の結果を示した（図 5）．

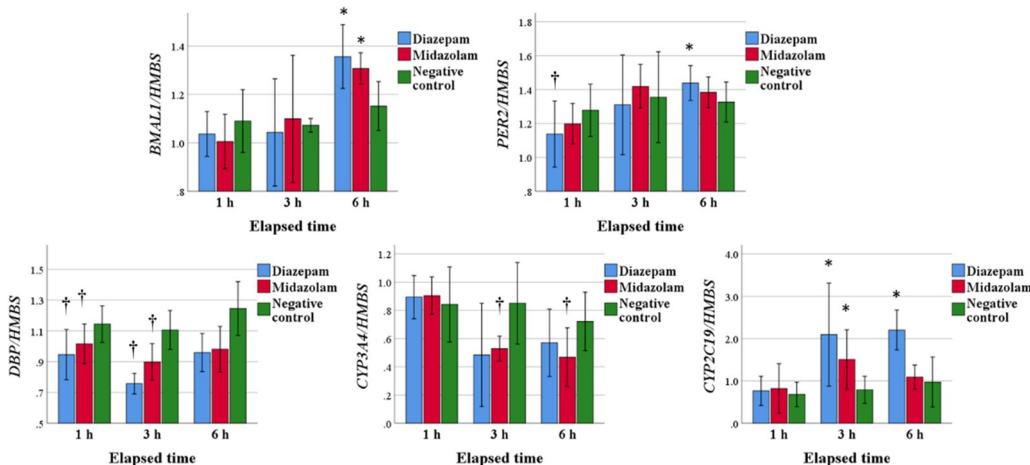


図 5. HepG2 細胞への各種 BZD 曝露後の *BMAL1*，*PER2*，*DBP*，*CYP3A4*，*CYP2C19* の遺伝子発現

（6）本研究結果より，MA および BZD 摂取例における薬物代謝酵素の発現に時計遺伝子が関与していることが示唆された．また，時計遺伝子の発現状態により薬物代謝酵素の発現が影響され，薬物による致死的副作用の個人差に関与する可能性が示唆された．一方で，時計遺伝子および薬物代謝酵素の発現を解析するのみでは，死亡時刻ごとの死亡者の薬感受性の個人差を評価することは困難であった．今後の展望として，トランスポーターなどの薬物輸送や酸化ストレスなどの薬物による毒性発現メカニズムに関して調査することにより，薬感受性の個人差を評価する方法を解明することができるかもしれない．

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 2件）

1. 著者名 Tani Naoto, Ikeda Tomoya, Ishikawa Takaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Effect of methamphetamine on clock genes and drug-metabolizing enzyme expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human & Experimental Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09603271221124092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tani Naoto, Ikeda Tomoya, Ishikawa Takaki	4. 巻 42
2. 論文標題 Relationship between clock gene expression and <i>CYP2C19</i> and <i>CYP3A4</i> with benzodiazepines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human & Experimental Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09603271231171643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 1件）

1. 発表者名 Naoto Tani, Tomoya Ikeda, Tatsuya Hirokawa, Shigeki Oritani, Takaki Ishikawa
2. 発表標題 Association between stimulant-controlled clock gene regulation and the expression of drug-metabolizing enzymes
3. 学会等名 25th Congress of the International Academy of Legal Medicine（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷 直人, 池田知哉, 廣川達也, 織谷茂樹, 石川隆紀
2. 発表標題 覚醒剤による時計遺伝子への影響と薬物代謝酵素との関係性について
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 谷 直人, 池田知哉, 石川隆紀
2. 発表標題 時計遺伝子および薬物代謝酵素の発現に対するメタンフェタミンの影響
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	池田 知哉  (Ikeda Tomoya)  (10620883)	佐賀大学・医学部・教授   (17201)	
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)	

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
---------	---------