

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590861

研究課題名(和文) 覚醒剤濫用によるアルファシヌクレイン障害とエピジェネティックス的变化の解析

研究課題名(英文) Investigation on synucleinopathy and epigenetic mechanisms in the brains of methamphetamine abusers

研究代表者

王路(OH, RO)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60555051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、覚醒剤濫用者の脳において、酸化ストレスによるドーパミン作動性マーカーの障害やグリア細部の反応に加えて、 α -シヌクレインの病理学的変化が、覚醒剤濫用者の病態に關与する可能性が示唆された。また、酸化ストレスによる神経毒性に加えて、エピジェネティックなメカニズムによる薬物依存という病態についても明らかにした。以上の病態を解析することにより、覚醒剤濫用の法医病理学的診断に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：This study suggests that, in addition to dopaminergic terminal marker deficits and glial reactions, synucleinopathy is induced by methamphetamine neurotoxicity including oxidative stress in the brains of methamphetamine abusers. Furthermore, we have demonstrated that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and methyl CpG binding protein 2 (MeCP2), a transcription factor of BDNF, that is involved in epigenetics, are found in methamphetamine abusers. In the point of view of forensic pathology, detection of synucleinopathy and epigenetic mechanisms involving MeCP2 and BDNF expression could be useful to investigate the mechanisms involved in neurotoxicity and drug dependence of human methamphetamine abusers.

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 神経細胞障害 酸化ストレス 薬物依存 エピジェネティックス グリオーシス

1. 研究開始当初の背景

覚醒剤濫用は、中枢神経系障害を引き起こし、様々な精神神経症状、さらには高体温症や循環器障害等により死に至ることが知られている。

北村(共同研究者)らとの研究により、覚醒剤濫用の法医病理学的診断の観点から、剖検脳を免疫組織化学的に解析した結果、(1)線状体におけるドーパミン作動性(DA)マーカーの障害(酸化ストレスによる神経毒性)、(2)同部のグリア細胞の増加、(3)海馬における熱ショックタンパク質の発現(高体温症の影響)等を明らかにした(Kitamura O, et al, 2007; Kitamura O, 2009; Kitamura O, Takeichi T, Wang EL et al. 2010.)。

近年、覚醒剤(メタンフェタミン)を投与された動物のDA神経において、前シナプス蛋白質であるアルファシヌクレイン(α -synuclein)の発現が上昇すると共に凝集し、ユビキチン-プロテアソーム系の関与による細胞内の異常な構造物への変化が認められた(Fornari F et al, Brain Res. Bull. 65, 405-13, 2005)。 α -synucleinの異常蓄積・細胞障害(synucleinopathy)は、DA神経の消失を特徴とするパーキンソン病のLewy小体に認められ、 α -synucleinの関与も示唆されている。一方、 α -synucleinはこのような機序に対して防御的な役割を果たすと報告されている。

また、エピジェネティックなメカニズムが薬物依存の形成過程に関与していることが注目されている。例えば、methyl CpG binding protein 2 (MeCP2)は、メチル化されたDNAに結合する転写因子であるが、MeCP2は神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)発現を促進することにより、薬物依存の形成に関与することが明らかになった(Im HI et al, Nature Neurosci. 13, 1120-7, 2010)。

一方BDNFは、メタンフェタミンによる神経毒性に対して、防御的な役割を果たすという報告がある(Matsuzaki H et al, Biol. Psychiatry 55, 52-60, 2004)。したがって、BDNFは「神経毒性」と「薬物依存」との両方において、一定の役割を果たしていると

考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 神経毒性による α -synucleinの病理学的変化(synucleinopathy)の解析
- (2) 薬物依存の形成におけるエピジェネティックなメカニズムの解析
- (3) 上記の「神経毒性」と「薬物依存」の相互関係について、免疫組織学的染色(IHC)を用いて法医病理学的に解析を行うことにより、覚醒剤濫用者における法医病理学的診断に応用することを目的とする。

(1) 神経毒性による前シナプス蛋白質の病理学的変化については、 α -synucleinの発現・凝集及びユビキチン-プロテアソーム系の作用後のリン酸化(異常構造への変化; synucleinopathy)、さらに α -synuclein及び β -synucleinの発現について解析する。

(2) 薬物依存の形成におけるエピジェネティックなメカニズムについては、MeCP2、BDNF、BDNFのレセプターであるTrkBの発現について解析する。

(3) 「神経毒性」と「薬物依存」の相互については、「神経毒性」と「薬物依存」に関与するBDNFの発現の他に、これまでの研究で得られたDAマーカーの障害及びグリア細胞の変化に関するデータを加えて、総合的に解析する

以上の研究により、ドーパミン作動性神経における前シナプス蛋白質障害、さらに薬物依存に関与するエピジェネティックな変化を免疫組織化学的に観察することにより、これまでの研究で焦点を当ててきた覚醒剤濫用による「神経毒性」と「薬物依存」という病態の法医病理学的診断を向上させることを目的とする。また、メタンフェタミンにおける研究において、独立して解析されてきた「神経毒性」と「薬物依存」のメカニズムの関連性を検討することにより、覚醒剤濫用による中枢神経障害の詳細な評価を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 脳の組織切片作製

覚醒剤濫用者の症例（14例）及び対照者から採取した中脳（黒質）、線状体（側坐核、被殻及び尾状核）、海馬、前頭葉等の部位のパラフィン包埋ブロックより、厚さ6 μmの組織切片を作製した。

(2) -synuclein、ユビキチン、-synuclein、-synuclein、MeCP2、BDNF及びTrKBのIHC

・ -synucleinの発現、凝集及びリン酸化の検出、-synuclein及び -synucleinの発現

脱パラした切片は、-synuclein、-synuclein及び -synuclein抗体と反応させる。その際、-synucleinの凝集を検出するために、正常な -synucleinを分解するプロテナーゼKによる前処理を行い、発現の解析にはこの処理は施行しなかった。また、抗リン酸化-synuclein抗体との反応により、ユビキチン-プロテアソーム系作用後の -synucleinを検出した。1次抗体反応後、2次抗体との反応及び発色（酵素抗体法、または蛍光抗体法）を行った。

・ -synucleinへのユビキチン-プロテアソーム系の作用

-synucleinとユビキチンとの相互作用を検出するため、Proximity Ligation Assay (PLA)法を用いた。これは、2種類の蛋白質へ、それぞれの1次抗体反応及びオリゴヌクレオチドを連結させた2次抗体を反応させる。それぞれの2次抗体同士が近接すると、核酸のライゲーション、ポリメラーゼによる伸長及び蛍光標識されたプローブの結合により、発色するものである。

・ MeCP2、BDNF及びTrKB のIHC

MeCP2、pro-BDNF（BDNFの前駆体）、BDNF及びTrKBに対する抗体と反応させる。1次抗体反応後、酵素抗体法、または蛍光標識された2次抗体との反応及び発色を行う。

(3) 画像解析

IHCによる染色像は、NanoZoomer Digital Pathology（浜松フォトニクス）によりデジタル画像として取り込む。取り込んだ画像

は、染色の強度、陽性細胞数、-synucleinとユビキチンとの相互作用等を画像解析ソフト（Image-Pro Plus）により解析を行った。

(4) 神経毒性と薬物依存の相互関係の解析

本研究に使用される症例は、DAマーカーの障害及びグリア細胞の変化について解析されている。

以上のデータに加えて、神経毒性と薬物依存に關与するBDNFのデータを軸として全体のデータを総合的に検討し、神経毒性と薬物依存との相互関係を解析する。

4. 研究成果

覚醒剤濫用者の症例（14例）及び対照群の脳より、中脳（黒質）、線状体（側坐核、被殻及び尾状核）、海馬、前頭葉等の部位を切り出し、組織切片を作成した。

中脳及び線状体について、-synuclein抗体を一次抗体として、さらにプロテナーゼKによる前処理群と未処理群にわけて免疫組織化学的染色を行ったところ、覚醒剤濫用者群においては、いずれの処理群において陽性像を認めた。したがって、覚醒剤濫用者の脳において、-synucleinが凝集していることが確認された。

また、-synucleinとユビキチンとの相互関係を示す陽性像に加えて、リン酸化-synuclein抗体についても神経細胞に染色像が観察された。

以上のことから、覚醒剤長期濫用による神経障害のメカニズムには、ユビキチン-プロテアソーム系による-synucleinの異常（synucleinopathy）が關与している可能性が示唆された。

さらに、NSE（神経細胞のマーカー）、GFAP（アストロサイトのマーカー）及びhGLUT5（ミクログリアのマーカー）等のマーカーとの二重染色により、神経細胞における染色像を認めたが、グリア細胞には陽性像を認めなかった。したがって、-synucleinの局在が、神経細胞にあることが明らかとなった。

これまでに、覚醒剤の長期濫用は神経毒性により、酸化ストレスによるドーパミン

作動性マーカーの障害を引き起こすことが明らかになっている。その中で、 α -synucleinの病理学的変化を観察したことは、この変化が酸化ストレスによるドーパミン作動性マーカーの障害と同様に、覚醒剤のneurotoxicityを反映すると考えられる。

α -synuclein、 β -synucleinについては、対照群と同様に、覚醒剤濫用者群において、明らかな陽性像を認めなかった。

一方、MeCP2については、覚醒剤濫用者群の線状体において、陽性像を認めた。神経細胞及びグリア細胞のマーカーとの二重染色により、MeCP2の局在が、神経細胞にあるが、グリア細胞ではほとんど認めないことが明らかとなった。さらに、

以上の結果から、覚醒剤濫用者においては、酸化ストレスによるドーパミン作動性マーカーの障害やグリア細胞の反応に加えて、エピジェネティックなメカニズムが関与していることが明らかとなった。以上の結果は、薬物依存という状態を示唆していると考えられ、覚醒剤濫用者の病態を反映していることが考えられる。

さらに、BDNFの陽性像が観察され、BDNFのレセプターであるTrkBについても、発現が認められた。しかし、以前の研究における、グリオーシスの欠如しているというデータを考え合わせると、神経毒性に対する防御的な作用が働いていると考える。

また、MeCP2は、BDNFの転写因子であることから、この遺伝子発現は、薬物依存と神経細胞の防御機構との相関関係に関与している可能性が示唆された。

以上のように、覚醒剤濫用による神経細胞障害、薬物依存メカニズム等を観察することにより、この病態の法医病理学的診断に寄与するものと考えられる。

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 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

王 璐 (OH, Ro)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60555051

(2)研究分担者

北村 修 (KITAMURA, Osamu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266609