

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590858

研究課題名(和文)抗精神病薬の心臓における病態生理の解明 - 薬剤誘発性不整脈の法医学的診断法の確立 -

研究課題名(英文)Diagnosis of Drug Induced arrhythmia

研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80332857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：精神病薬服薬患者の心臓突然死は、法医剖検にて有意な所見が得られないため、突然死の病態解明に苦慮する。マウス心臓を標的臓器として抗精神病薬であるChlorpromazine (Chl)を動物モデルに長期投与することにより、不整脈・心筋症を発症させうる遺伝子発現状態を確認した。本研究では、培養細胞・心筋組織について、Chl処置を行った心筋組織にて核のクロマチン凝集が認められ、Tunel法で陽性であった。ヒトにおいても同様に認められた。従って、Chlは心筋にApoptosisを生じさせることが判明した。このことから、長期Chl投与は心筋症を生じさせるものと推定する。

研究成果の概要(英文)：Long treatment of anti-psycotic drug sometimes induces sudden cardiac death, however, forensic pathologists hardly find any findings. We examined the gene expressional profile with microarray analysis for chronic chlorpromazine treatment of mouse. The results showed that arrhythmia and cardiac myopathy might induce. Chlorpromazine treatment resulted in chromatin aggregation in nuclear on mouse heart tissue and cultural cell, and the treatment showed positive signal Tunel method. This strongly suggested that chronic chlorpromazine treatment might induce apoptosis in heart tissue and cell. Additionally, in human heart, the results were the same. Therefore, chronic chlorpromazine treatment might induce cardiomyopathy and followed sudden cardiac death.

研究分野：法医病理学

キーワード：薬剤 突然死 心筋症 マウス

1. 研究開始当初の背景

法医実務では、年単位の長期間に亘って抗精神病薬を服薬した内因性急死例が経験される。このような症例の中で、血液中の薬物濃度が治療域以下であり、かつ、剖検所見上、諸臓器に死因となるような形態学的変化を見出せず、死因を急性心不全(急性心機能不全)と診断せざるを得ない事例が存在する。長期抗精神病薬の副作用として、高度徐脈、QT 延長症候群、Torsades de pointes (Tdp) や心室頻拍等の多彩な心電図変化や心臓突然死が報告されている。しかし、多くの剖検例では不整脈が生じていたのかどうかを判断しうる有意な肉眼的・組織学的所見からの変化は殆ど見出されない。従って、抗精神病薬服薬による不整脈発症を明らかにする新たな法医病理学的診断法・検査法の開発は必須である。その一方で、長期の抗精神病薬投与は心筋症を発症させることも疑われており、抗精神病薬は心臓に多様な影響を与えていると考えられている。しかし、心臓における抗精神病薬投与時の病態生理は殆ど解明されていない。このために、申請者は代表的な抗精神病薬である CHL or promazine (CHL) を用いて、CHL 投与時のマウス心臓における病態生理を明らかにするために以下の実験を既に企図し遂行した。

A. 培養心筋細胞 HL-1 に対する CHL の影響とその評価

現在、薬物投与による QT 延長は、脱分極に関与する K⁺チャンネルのひとつである I_{Kr} チャンネルに薬物が非特異的に嵌入し、チャンネル機能を阻害することにより生ずると説明されている。そこで、心臓への CHL による影響が I_{Kr} チャンネルのみを介するものかどうかを検討した。具体的には、CHL と I_{Kr} 特異的阻害薬である E-4031 を用いて、マウス心筋培養細胞 HL-1 を対象に電気生理学的検討を行った。QT 延長は両者で認められたが、CHL 投与のみに濃度依存的な心拍数 (HR) の低下が生じた。ついで、両者において C-fos、C-jun 等の超早期遺伝子群 (IEGs) の mRNA 発現を検討したところ、E-4031 では IEGs の発現は全く誘導されず、CHL では濃度依存的に IEGs の発現が増加した。さらに、数時間の CHL 暴露のみが HL-1 に apoptosis 様形態学的変化を生じさせた。このことは、CHL が I_{Kr} チャンネルにだけでなく、その他の心筋細胞膜上のチャンネルやレセプターにも結合し、CHL 特異的な遺伝子発現を生じさせていること、さらには、その遺伝子発現が apoptosis (programmed cell death) を誘導しうることを意味している。つまり、CHL の心筋組織への影響評価については apoptosis を中心とした検討が有用であることを示唆している。

B. CHL 投与動物モデル作成と Telemetry システムを用いた心臓電気生理学的検討
CHL の単回および長期投与したマウスモデルを作成した。この CHL 投与モデルを対象とし、無麻酔・無拘束下 telemetry システムを使用して、心臓電気生理学的検討を行った。ところで、マウスモデルにおける T 波観察は不可能とされているが、申請者等は電極設置法に創意工夫を加え、良好な T 波を検出している。この検討の結果、CHL 単回投与では HR の著明な低下が認められるのみであったが、長期投与ではヒトと同様に Wide QRS、QT 延長症候群等の心電図所見が認められ、さらに、一部のマウスでは Tdp、心室細動等の致死的不整脈を発生し、死亡することを見出した。このことは、我々のモデルが抗精神病薬時の不整脈発症並びに突然死モデルとなりうることを示唆している。

C. CHL 投与動物モデルでの IEGs 発現検討

動物モデルを用いた心筋組織での IEGs の発現が CHL 投与によって誘導されること、さらに、投与期間の差異によって発現量に変化が生じることを報告した (Ikematsu et al. Legal Medicine, 2010)。この結果は、CHL 長期投与により心臓での遺伝子発現状態が変動していることを示唆するものである。

D. 長期 CHL 投与動物モデルを対象とした MicroArray 解析

実験 C. の結果を踏まえ、8 週間投与マウスの心臓を用いて、mRNA や Non-coding RNA (ncRNA) を含む MicroArray 解析 (対象遺伝子数 55,000、n=4) を行ったところ、約 1000 個の有意な発現変動遺伝子が得られた。その約半数以上は ncRNA もしくは機能不明な遺伝子であったが、既知の転写因子、代謝系酵素、K⁺チャンネル等に関連する遺伝子も多数変動していた。転写因子は programmed cell death 誘導に関連するものを含んでいた。また、K⁺輸送を担う K⁺チャンネル関連遺伝子は、Slow type 群および Rapid type 群に大別されるが、興味深いことに、長期 CHL 投与での MicroArray 解析では、Slow type 群の遺伝子発現量が増加し、Rapid type 群は減少していた。この質的变化は、心筋の再分極時間 (QT 間隔) が延長しうること、つまり、長期 CHL 投与が QT 延長を発症させうるような遺伝子発現を生じていることを推定させ、よく知られている CHL の直接的な I_{Kr} 阻害作用による QT 延長とは全く別の機序による QT 延長が存在していることを示唆している。さらに、この結果は、長期に亘って CHL を服用した剖検症例においては、CHL 濃度が低い、もしくは、CHL が欠如した状態でも致死的不整脈が生じ、

その転帰として突然死することを説明可能とするものである。

このように、申請者らは CHL 投与による心臓での病態生理について幾許かの知見を得ているものの、より詳細かつ直接的な病態生理の知見を得るために Apoptosis 解析、蛋白質発現検討 (Proteome 解析や組織学的解析) 等の更なる基礎的研究や、これらの成果を活用するための法医分子病理学的研究が必要であると考え、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

抗精神病薬服薬患者の心臓突然死は、薬物自体に心毒性があるにもかかわらず、法医剖検にて有意な所見が得られることが少ないため、突然死の病態解明に苦慮することが多い。申請者等はマウス心臓を標的臓器として抗精神病薬である CHL を動物モデルに長期投与することによって、不整脈・心筋症を発症させうる遺伝子発現状態を確認した。そこで、本研究では、更なるマウス心臓における抗精神病薬投与時の病態生理学的解明を行うとともに、不整脈・心筋症発症の Key Player となる蛋白質を同定し、その結果を法医剖検例に応用することにより、薬剤誘発性心臓突然死の死因判定の正確性を向上させることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、CHL 投与モデルを対象に分子生物学的検討・Apoptosis 解析・Proteome 解析・組織学的解析を用いて CHL 投与時の不整脈・心筋症発症時の遺伝子・蛋白質動態を検索・解明し、最終的には、Key Player となる蛋白質を同定・指標とする「剖検例における不整脈診断」の確立を目的としており、その方法は動物実験による基礎的研究によるデータの収集と剖検試料を用いた実務的研究から成る。具体的には、種々の実験方法を用いて CHL 投与モデルの心臓における病態を解析することにより、Key player となる蛋白質を見出す。その結果に基づいて、実際の法医剖検例において候補となった蛋白質を検索し、最終的には死因判定つまり「不整脈の診断法」を確立することが最終目的である。

4. 研究成果

心筋においてアポトーシス関連遺伝子の発現動態を調査した。具体的には、CHL を単回又は長期(1日1回を4週)投与したマウスから採取した心筋においてアポトーシス関連遺伝子の発現量を定量的 PCR 法を用いた。CHL 単回投与後の心臓を経時的に採取し、Fas の発現量を測定したところ、CHL 投与後 2 時間から 24 時間にかけて発現量が有意に増加した。特に投与後 4 時間で顕著な差が認められた。

また、単回投与と長期投与の比較も行った。単回モデルでは CHL 投与群とコントロール群で Fas の発現量に有意差が認められたが、長期モデルでは認められなかった。

Bcl2l1 (B cell lymphoma 2 - like 1) はアポトーシスを抑制する遺伝子として知られている。

Bcl2l1 でも、Fas と同様の経過を認められ、特に、投与後 4 時間で顕著な差が認められた。さらに、Bcl2l1 でも、単回モデルで認められた CHL 群とコントロール群の有意差が、長期モデルでは認められなかった。

さらに、Nr4a1 についても検討した。転写因子である Nr4a1(nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) がコードする蛋白質が

核からミトコンドリアへ輸送されると、アポトーシスが誘導されることが知られている。

Fas や Bcl2l1 と同様、投与後 2 時間から 24 時間にかけて発現が増加しており、投与後 4 時間で顕著な差が認められた。Nr4a1 でも、単回モデルで認められた CHL 群とコントロール群の有意差が、長期モデルでは認められなかった。

つまり、Fas、Bcl2l1、Nr4a1 の発現量は、CHL 投与群の心筋で投与後 2 時間から 24 時間にかけて有意に増加し、特に投与後 4 時間でピークを示した。CHL 群とコントロール群の差は、単回モデルでは認められたものの、長期モデルでは認められなかった。

CHL 投与は、心筋において複数のアポトーシス関連遺伝子の発現に影響を与えることが示唆された。

また、心筋において CHL 投与が及ぼすアポトーシス関連遺伝子への影響は、単回投与と長期投与で差異があることと示唆された。

ついで、電子顕微鏡による心筋細胞の観察を行った。

Saline (SA) 単回投与では、正常な核が観察された(図 1-1)。CHL 単回投与でも、正常な核が観察された(図 1-2)。SA 長期投与でも、正常な核が観察された(図 1-3)。しかし、ここまでと対照的に CHL 長期投与では、クロマチンが凝集している核が顕著に認められた。(図 1-4)。

CHL 長期投与で特徴的な核が観察されたことを受けて、CHL による心筋細胞への形態学的影響の検討としてクロマチンが凝集した核の占める割合を調査した。

1 個の核の中で、凝集したクロマチンの占める面積が 50%以上か 50%未満で分類し、個体ごとに核 100 個あたりの個数を計測した。その結果、CHL 長期投与では、50%以上が 67.5%程度を占め、その他の群では 10%以下であった。従って、CHL 長期投与では、クロマチンの凝集が顕著であることが示唆された。

これらのことは、ヒトサンプルにおいても確認した。

これらの結果は、CHL 長期投与が Apoptosis を生じさせることが判明した。このことから、長期 CHL 投与は心筋症を生じさせるものと推定する。

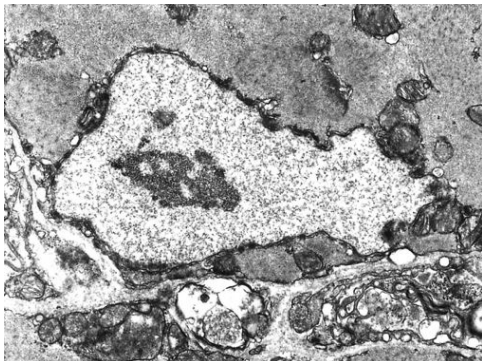


図 1-1 単回 SA 投与

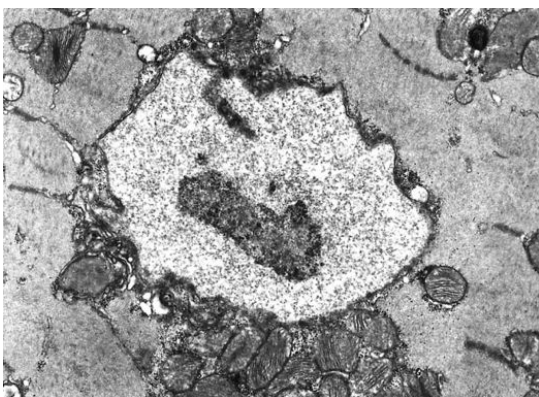


図 1-2 単回 CHL 投与

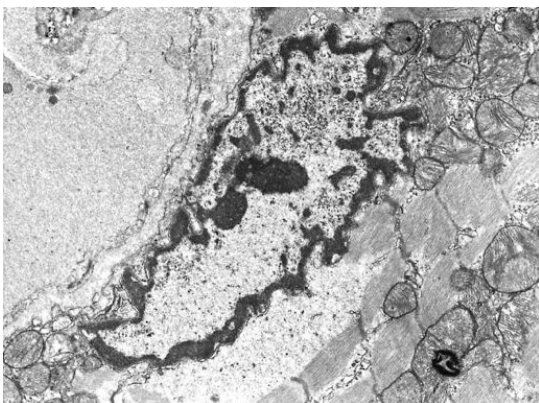


図 1-3 長期 SA 投与



図 1-4 長期 CHL 投与

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 1 件)

1. Expression of Fas, Caspase 8, Caspase 3 and B cell lymphoma 2-like 1 after chlorpromazine administration in mouse heart muscle. T. Kohyama, T. Umehara, T. Mizuno, T. Yamamoto, K. Ikematsu. 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin. 2012.09.22. Freiburg (Germany).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)

・教授

研究者番号：80332857

(2)研究分担者

坪井 貴司 (TUBOI, Takashi)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：8041532