

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590845

研究課題名(和文) 合成麻薬MDMAによる毒性機構の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for biological toxicity with synthetic narcotic MDMA

研究代表者

高安 達典 (Takayasu, Tatsunori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80154912

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)：合成麻薬MDMAについて、覚醒剤メタンフェタミン(MA)と構造がよく似ていることから、生体の反応は覚醒剤の反応とどこが同じで、何が異なるのかを明らかにする目的で、合成麻薬MDMAとMAとをマウスに長期投与し、脳や心臓における各種因子について包括的に解析した。その結果、マウスの体重はいずれも生食水を投与したブランクと比較し10-20日減少傾向を示した。その後はブランクとほぼ同じ比率で増加した。脳および心臓試料から包括的mRNA解析を行った結果、脂肪や脂肪酸代謝因子、サイトカイン、転写因子、翻訳因子など多岐にわたる因子の変動が見られた。これらの結果は今後の解析の基礎となる。

研究成果の概要(英文)：MDMA is a synthetic narcotic, which is resembled to methamphetamine (MA) structure. The aim of this study is clear the differences of biological functions from MDMA and MA. MDMA and MA were separately injected to mice once two days during 51 days as well as saline for a blank experiment. Mice weights for MDMA or MA were decreased to those of a blank group for 10-20 days. Then mice weights for MDMA and MA were increased same rate as the blank group. Comprehensive mRNA analyses with the brain and heart showed changes of metabolic factors for lipids and fatty acids, cytokines, transcription factors, translation factors, and others. These results are fundamental to the next experiment.

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：合成麻薬 MDMA 毒性 遺伝子 多因子解析 覚せい剤

1. 研究開始当初の背景

合成麻薬 MDMA の乱用は大きな社会問題の一つである。しかし、MDMA の分子毒性解析はあまり多く行われていない。最近の MDMA に関する研究は、1) MDMA はドパミントランスポーターやノルエピネフェリントランスポーターよりはセロトニントランスポーターに主に作用する (Rundnick et al, PNAS, 89, 1817, 1992), 2) セロトニンはセロトニントランスポーターによって取り込まれた後、MDMA がセロトニン作動性ニューロンからセロトニンを遊離させる。しかし、MDMA は、セロトニン作動性活性とは間接的なそしてドパミントランスポーター機能とは直接的なドパミン作動性システムとはあまり大きく相互作用しない、とされている (Nakagawa & Kaneko, J Pharmacol Sci 106, 2, 2008)。さらに、MDMA の慢性投与はメタンフェタミン (MA) と同様、それらのセロトニン放出効果、即ちセロトニン作動性感作を増加させることが報告されている (同前)。このような機構で精神神経毒性が発揮されることが推定されるが、実際にはまだ不明な点が多く、包括的分子毒性解析は行われていない。

2. 研究の目的

合成麻薬 MDMA の乱用は大きな社会問題の一つである。しかし、MDMA の分子毒性解析はあまり多く行われていない。そこで、覚醒剤 MA と構造がよく似ている MDMA を投与した場合の生体の反応は覚醒剤の反応とどこが同じで、何が異なるのかを明らかにする目的で、マウスを用いた動物実験を行い、脳や心臓における、これまで研究されてきたドパミンリセプター、セロトニンリセプター、ドパミントランスポーター、セロトニントランスポーターなどを含む多くの因子について包括的分子動態解析を行い、その動態を詳細に解析する。この解析により、MDMA と覚醒剤 MA との相違を mRNA 発現レベルや蛋白質レベルで解析し、MDMA の危険性を詳細に明らかにすることを目的とした。

3. 研究方法

マウスを用いた動物実験を行い、脳および心臓に焦点をあて実験を行った。

1) 合成麻薬 MDMA 投与

合成麻薬 MDMA のマウス (BALB/C、雄、25g 前後) 3 匹への投与、対照として同マウス 2 匹への生食水の投与、以上の 2 群について、MDMA 5 mg/kg 体重の割合で 1 日おきに計 23 回投与。最終 3 回は毎日同量を投与した。即ち計 26 回投与した。27 回目の最終投与は MDMA 15 mg/kg を投与し、1 時間後に大脳、心臓を採取した。一部を急速冷凍し速やかに Rneasy Plus Universal Mini Kit を用いて total RNA を抽出・精製した。これら total RNA を用い、包括的 mRNA 解析はアジレント社製マイクロアレイを用いて DNA チップ研究所に依頼し行った。その解析を元に種々の因子についてそ

れらの役割について検討した。

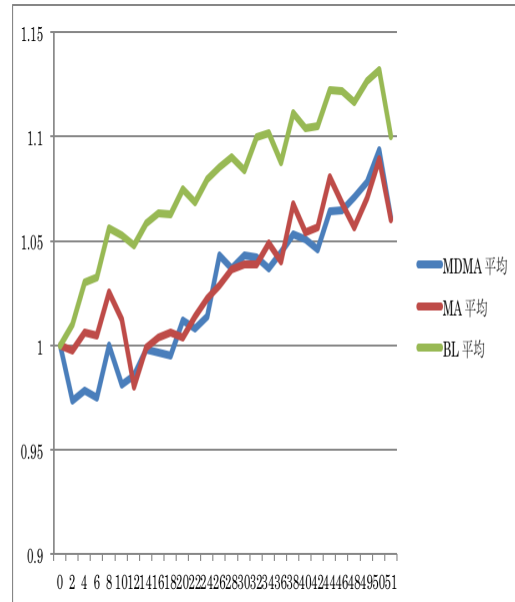
2) 覚せい剤メタンフェタミン (MA) のマウスへの投与

MA のマウスへの投与は MDMA の場合と同様行った。投与量は 3 mg/kg 体重の割合で、最終投与量は 10 mg/kg 体重の割合で行った。大脳、心臓からの抽出・mRNA 解析も同様行った。

4. 研究成果・考察

1) マウス 体重の変化

マウス体重の変化を下記の図 1 に示した。縦軸には投与直前の体重を 1 とした比率を、横軸には時間 (日) を用いた。



これまで報告されているように、MDMA (青色) や MA (赤色) を投与した個体では生食水を投与したブランク (BL, 緑色) 個体よりも明らかに体重の増加は少なかった。しかし図から明らかなように、前記の投与量では 20 日前後から体重が増加傾向を示し、その増加率もブランク群とその割合は類似していた。即ち、前記の実験条件では体重の増加を抑える効果が認められたのは 15-20 日間位であって、それ以降の影響は体重に関しては認められない結果であった。また MDMA と MA では初めの 10 日位では MDMA の方がやや減少傾向を示したが有意な差ではなかった。

2) MDMA を投与した場合の mRNA の発現

MDMA 長期投与マウス脳試料でブランクと比較し発現の上昇が見られたのはサイトカイン MCP1, 神経ペプチド AGPR, 細胞間シグナルタンパク質 CYR61, インターロイキンリセプター IL-4R, 細胞間シグナル G タンパク質、転写因子 ATF3 などで、また発現の減少がみられたのは翻訳開始因子 EIF2S3, 眼や小脳発達関連因子 MAB21L1, 神経成長因子 GMFG, S100 タンパク質ファミリー-S100A5, 内耳形成因子 OPT2, 翻訳因子 Guf1 などであった。

サイトカイン MCP1 (CCL2) は様々な臓器で発現する因子であるが、脳や神経系で CCL2

は神経変性によって特徴づけられる中枢神経系の様々な病気で行われる神経炎症過程で作用する。グリア細胞での CCL2 の発現はてんかん、脳虚血および外傷性脳損傷において上昇することが明らかになっている。神経ペプチド AGPR は視床下部においてみられるメラノコチンレセプター（G タンパク質共役受容体）および食欲促進活性能力を抑制する MC3R and MC4R の内在性アンタゴニストである。AGRP は食欲促進ペプチドである。細胞間シグナルタンパク質 CYR61 は細胞接着、移動、増殖、分化、アポトーシスなどを調節する因子で、肺臓で高頻度に発現しているが、脳でも低く発現している。インターロイキンリセプター IL-4R はタイプ I サイトカインリセプターで、膜貫通タンパク質である。B 細胞での IgE 抗体産生を調節するため、IL-4 や IL-13 と結合する。また PIK3C3, SH2-containing phosphatases, PTPN6/SHIP1, PTPN11/SHIP2 や INPP5D/SHIP などとも相互作用することが知られている。B 細胞での発現は強いが、脳をはじめ多くの組織細胞で発現が確認されている。細胞間シグナル G タンパク質は GTP 結合タンパク質の RAD/GEM ファミリーに属し、細胞で最も重要なシグナル伝達分子の一つで、カルシウム依存性カルモデリンと相互作用し、ROCK1 と結合する。さらに糖尿病やアルコール依存症などにも関与する。G タンパク質は子宮にやや多く発現しているが、脳など多くの組織細胞で発現している。転写因子 ATF3 は cAMP 依存性転写因子で、IL-6 や IL-12 などのサイトカインを抑制する役割をはたす。また ATF3 はストレス応答の調節因子であるとも考えられている。ATF3 は脳など多くの組織細胞で発現が認められている。以上の種々の多様な因子の発現が上昇していることが明らかになったが、これら因子も含めさらに多くの記載できなかった因子も含めそれらの間の関連についても検討を続ける。

翻訳開始因子 EIF2S3 はメチオニル-tRNA をリクルートする GTP-結合タンパク質複合体の最も大きいサブユニットである。EIF2S3 は脳など多くの組織細胞で発現が認められている。眼や小脳発達関連因子 MAB21L1 は様々な精神疾患に重要な役割を演じるかもしれない 5' UTR における 3 塩基繰り返し領域の伸張が推定されている。MAB21L1 は脳など多くの組織細胞で発現が認められている。神経成長因子 GMFG は赤芽球系の発達に関与し、また T リンパ細胞の移動や接着を調整している因子で、神経系発達、血管形成、および免疫機能を持つ。S100 タンパク質ファミリー S100A5 は S100-A5 は他の S100 タンパク質よりも 20-100 倍の Ca^{2+} アフィニティを持ち、また Ca^{2+} を害する Zn^{2+} や Cu^{2+} と強く結合し、脳をはじめほとんどの臓器組織細胞で発現している。内耳形成因子 Otopetrin2 は細胞間応答でのカルシウム流入とカルシウム恒常性に介在する因子で、内耳の耳石形成

に関与している。翻訳因子 Guf1 は脳をはじめほとんどの組織細胞で通常ほぼ同じレベルで発現している。MDMA 長期投与マウス脳試料で発現の減少がみられた因子の上位には恒常性維持に必要な翻訳因子などが見られた。

MDMA 長期投与マウス心臓試料でblankと比較し発現の上昇が見られたのは ATF3, CASP (CYTIP), USP31, FAIM3, KRT8, CCR7, L-セレクトイン(Selectin), HSPA1A, ペリフェリン(Peripherin), 足場タンパク質 LRRC16A などであった。また発現の減少が見られたのは炭酸脱水酵素(Carbonic anhydrase), 補体因子 D(CFD), チトクローム P450 2E1(P4502E1), アディポカイン・レジスチン(Resistin), アポリポタンパク質 C1(Apolipoprotein C1), ハプトグロビン(Haptoglobin), ステアロイル CoA 不飽和酵素(SCD1), メタロプロテアーゼ ADAMTS13, 老化促進因子 ECRG4, calsyntenin 3 などであった。

転写因子 ATF3 は前記した。CASP (CYTIP) は(主にリンパ球系で強く発現している)細胞メディエータ因子で、心臓など多くの細胞でも発現している。USP31 はユビキチンのグリシンの C 末端を加水分解する酵素で、心臓をはじめほとんどの組織細胞で発現している。FAIM3 は CFLAR 増強調節を通して CASP8 活性を抑制することによって FAS 誘導アポトーシスを抑制し細胞を守る。脳組織細胞では比較的多く発現し、また心臓など多くの組織細胞でも発現している。KRT8 はケラチン 18 とヘテロ二量体を形成し中間フィラメントを作り、そして細胞骨格を形成する。ケラチン 8 は心臓をはじめ小腸、大腸、膵臓などで比較的多く発現し、その他多くの組織細胞でも発現している。CCR7 は G タンパク質共役受容体の一員であり、CCL19 および CCL21 と結合し、様々なリンパ球や活性型 B および T 細胞で発現している。その他心臓などほとんどの組織細胞でも発現がみられる。L-セレクトイン(Selectin)は接着因子で、白血球が血管内皮細胞と接着し血管外に浸潤する際に関与する。全血・白血球系細胞に多く発現しているが、ほとんどの組織で発現がみられる。HSPA1A は熱ショックタンパク質 70KD ファミリーの一員で、他の熱ショックタンパク質と連結して、集合に対してタンパク質自信を安定化する。そして、細胞質やオルガネラにおいて新しく翻訳されたタンパク質のホールディングにも介在する。HSPA1A は肝臓や腎臓でやや発現が強くみられるが、心臓などほとんどの組織でも発現が見られる。Peripherin はタイプ III 中間径フィラメントで、末梢神経系のニューロンで主に発現しているが、また脊柱運動ニューロンのような末梢へ向かう中枢神経のニューロンでもみられる。Peripherin はビメンチン、デスミン、GFAP のような他のタイプ III 中間径フィラメントと同様の構造を持つ。Peripherin は心臓などほとんどの組織で発現がみられる。足場

タンパク質 LRRC16A は心臓などほとんどの組織で発現がみとめられる。以上, MDMA 長期投与マウス心臓試料でブランクと比較し発現の上昇が見られた因子は構造タンパク質やメディエータなどで比較的強い発現が確認されたが, その他多くの因子の上昇がみられたことからこれらの相互作用などさらに検索する予定である。

ブランクと比較し発現の減少が見られた, 炭酸脱水酵素 (CA3) は二酸化炭素と水を炭酸水素イオンと水素イオンとに迅速に変換する酵素で, 亜鉛イオンを含有し, その発現は骨格筋で発現が高く, 心筋や平滑筋では低い。補体因子 D (CFD) は補体第二経路の一コンポーネントで, トリプシン様の活性を持ち, B 因子を切断する。Factor D は心臓, 肺臓, 脂肪細胞で比較的強く発現している。チトクローム P450 2E1 (P4502E1) は様々な基質を水酸化する水酸化酵素ファミリー・シトクローム P450 の一員。肝臓で強く発現しているが, 心臓などほとんどの組織で発現している。アディポカイン・レジスチン (Resistin) は霊長類, 豚, 犬では免疫細胞や上皮細胞で分泌されているが, 齧歯類では脂肪細胞で分泌されている。分子量約 12.5KDA のタンパク質で, 肥満と関連している。アポリポタンパク質 C1 (Apolipoprotein C1) の主な機能はおそらく HDL 分子の荷電を変えることでコレステロールエステル転移タンパク質を抑制する。Apolipoprotein C1 の発現は肝臓で高いが, 心臓などの他の組織でも広く発現している。ハプトグロビン (Haptoglobin) は血漿タンパク質の一つで, 赤血球から遊離したヘモグロビンと結合し, その複合体は細網内皮系で除去される。ハプトグロビンは肝臓, 骨髄で強く発現しているが, 心臓などでも広く発現している。ステアロイル CoA 不飽和酵素 (SCD1) は脂肪酸の代謝の鍵になる酵素。脂肪細胞で強く発現しているが, 心臓などその他の組織でも広く発現している。ADAMTS13 は亜鉛を含むメタロプロテアーゼで, 血液凝固因子 vWF 多量体を分解し, vWF 活性を減少させる。ADAMTS13 は心臓などでほとんどの組織で広く発現している。老化促進因子 ECRG4 は神経系細胞の老化を促進している遺伝子と推定されているが, 詳細は不明である。ECRG4 は甲状腺で強く発現し, 気管, 下垂体, 網膜や肺臓などで比較的多く発現し, その他心臓などでも広く発現している。大脳の特定位で発現している calyntenin-3 は 106 kDA のタンパク質で, カルシウム結合構造を持つ。それはアミロイド 周囲のニューロンの突起に蓄積し変性突起を形成すると考えられている。calyntenin-3 は脳に比較的多く発現しているが, 心臓などにも広く発現している

3) MA を投与した場合の mRNA の発現
MA を長期投与マウスの脳組織から同様 mRNA の発現の上昇が見られたのは: 転写因子 ATF3, 細胞間シグナル G タンパク質,

転写因子 FOSB, 転写因子 EGR2, 転写抑制因子 BTG2, 転写因子 JUNB, 後期応答因子 IEG2 などであった。この様に比較的多く転写因子などがみられた。ATF3 因子のように MDMA と共通の因子もみられた。また発現の減少がみられたのはドパミントランスポーター DAT1, チュープリン・チロシン・リガーゼ TTL3, 乳酸脱水酵素 LDHAL6B, G タンパク質共役受容体 GPR179 などであった。ドパミントランスポーター DAT1 因子が減少していたことは覚せい剤の長期投与での影響の一つとして注目すべきことで, 今後さらに詳細に検討する予定である。

MA 長期投与マウス心臓試料でブランクと比較し発現の上昇が見られたのはサイトカイン IL1b, ホメオボックスタンパク質 6 (Lhx6), Xaf1, 転写因子 Nfx1, Lonrf3, Aldh3A1 などであった。様々な因子が上昇していたが今後さらに詳細に分析する予定である。

心臓試料で発現の減少が見られたのはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1 (Pck1), 炭酸脱水酵素 3, アディポネクチン, レジスチン, 補体因子 D, 脂肪滴局在タンパク質ペリリピンなどであった。脂肪酸の代謝に関わる因子などがみられ, 今後詳細に解析する予定である。

以上 MDMA および MA を長期連続投与した場合の各種因子の動態を解析した。その結果多くの因子が変動していたが, 脂肪酸の代謝因子の変動や各種サイトカインの変動, 転写因子や翻訳因子の変動など多岐にわたり, 今後の詳細な解析の基礎が形成された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

主な発表論文等は全て準備中のものである。

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 高安達典 (金沢大), マウスにおける MDMA 投与時の各種因子の動態, 第 97 次日本法医学会総会, 2013 年 6 月 26 日-28 日, 札幌市。

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高安 達典 (TAKAYASU TATSUNORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 80154912

(2) 研究分担者

なし
(3)連携研究者
なし