

平成30年 5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19269

研究課題名(和文) 危険ドラッグ誘導性の不整脈に特異的な蛋白及び遺伝子を用いた突然死診断法の開発

研究課題名(英文) Development of sudden death diagnosis method using proteins and genes specific to illegal drug-induced arrhythmia

研究代表者

永澤 明佳 (Nagasawa, Sayaka)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30536735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、危険ドラッグ使用中の突然死10事例及びメタンフェタミン使用中の突然死10事例、コントロールとして心筋症状及びLQTS歴のない100事例の心臓血及び心筋組織を用いて、KCNQ1及びKCNH2の2つの遺伝子の増幅及びシーケンス解析を行った。その結果、危険ドラッグ使用中の突然死事例において、メタンフェタミン使用中の突然死及びコントロール群と比べ優位にG643S多型が検出された。また、G643S保有者では、特に -PVPを含む合成カチノンが検出される事例が多いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, We analysed variations in the LQTS-associated genes KCNQ1 (LQT1) and KCNH2 (LQT2) using cardiac blood and myocardial tissue from subjects having died suddenly during MP or NPS use to investigate the relationship between congenital genetic abnormalities and sudden death during illegal drug use. We amplified and sequenced all exons of these genes using samples from 20 subjects, half of whom had died taking MP and half after using NPSs. G643S, a KCNQ1 missense polymorphism, was significantly more common among sudden deaths involving NPSs (6 subjects) than those involving MP (1 subject) and healthy Japanese subjects. Notably, synthetic cathinones were detected in 2 of 3 cases involving G643S carriers. Our data suggest that use of NPSs, particularly synthetic cathinones, is associated with elevated risk of serious cardiac arrhythmia and sudden death for subjects carrying KCNQ1 G643S.

研究分野：法遺伝学

キーワード：危険ドラッグ 先天性QT延長症候群 遺伝子多型 突然死

1. 研究開始当初の背景

危険ドラッグは麻薬や覚醒剤と同様の効果を得る目的で使用される化学物質や植物などである。これらの多くは、麻薬や覚醒剤と異なり、法律で所持や使用等が禁止されていないため、簡単に入手・使用ができることから、近年使用者の増加傾向が問題となっている。しかし、実際は覚醒剤や麻薬より毒性が強いものが多くあるとされ、どのような危険性があるかは未だ明らかになっておらず、危険ドラッグ使用者の死亡事例は使用者の増加に比例して年々増加傾向になってきている。また、このような死亡事例では、解剖検査を行ったとしても急死初見以外の器質的異常が同定されない事がほとんどであり、死因を急性心不全や死因不詳と診断せざるを得ない事例は少なくはない。

メタンフェタミン (MA) はフェネチルアミン骨格を持つ覚醒剤であり、使用者ではカテコールアミン過剰から生じる心毒性が観察されている。MA のカテコールアミン上昇作用は大麻やコカインなど、他の薬物と比べ大きいとされ、心臓への影響がより著名であるとされる。MA 使用中の心筋梗塞及び頻脈性不整脈による死亡事例の症例報告では、心臓疾患の既往歴を持たない健康な若年性成人の間で、あらゆる摂取レベル、及び経路における死亡事例が報告されている(引用文献)。よって、MA と同じフェネチルアミンの骨格を持つ危険ドラッグ使用者においても MA 同様に心毒性により心筋梗塞や頻脈性不整脈等などが起こり、それらが死因に関与している可能性が考えられた。しかし、多くの法医剖検例では、不整脈が生じていたのかどうかを判断しうる優れた肉眼的、組織学的初見からの形態学変化はほとんど観察されない。したがって、危険ドラッグ摂取時の不整脈発生の有無を明らかにする新たな法医病理学的診断・検査法の開発は今後必須であると考えられた。

2. 研究の目的

危険ドラッグ乱用者の突然死亡事例において、解剖を行っても有意な肉眼的・組織学的所見を得られることが少なく、死因究明に苦慮することがほとんどである。申請者は、危険ドラッグ使用中の突然死事例において心房細動の原因遺伝子である心筋イオンチャンネル KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 の 1 塩基多型 (SNP) 発現率が正常人に比べ優位に高いことから、これらの SNP が危険ドラッグ使用中の突然死のリスクファクターである可能性を見出した。本研究では、心筋組織及び刺激伝導系組織両者に着目し、危険ドラッグ投与による心筋組織と刺激伝達系における特異的な蛋白発現を動物モデルを用いて解析・同定し、法医解剖における応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 予備実験により、先天性 QT 延長症候群の

原因遺伝子とされる 13 遺伝子のうち、特にカリウムチャンネルへ影響を与える KCNQ1 及び KCNH2 において、KCNQ1 領域の G1927A (G643S) 及び KCNH2 領域の A2690C (K897T) の SNP がフェネチルアミン類の危険ドラッグ使用中の突然死事例において正常人及び覚醒剤使用中の突然死事例と比較して検出率が高い傾向が見られた。よって、検体数を増やし、より正確な検出率を明らかにすることで、フェネチルアミン類の危険ドラッグ各薬剤使用中の突然死と QT 延長症候群原因遺伝子との関連性などの基礎データを収集していく。

(2) 上記の実験にて関連性がみられた遺伝子のノックダウンマウスモデルにて、種々のフェネチルアミン類の危険ドラッグを用いて、投与期間：シングル、1 週間から 6 週間；低濃度、高濃度投与モデルを作成し、投与した後心臓を摘出する。採取した各組織より、蛋白質を細胞質、細胞膜、核内、細胞骨格の 4 分画より抽出して、それぞれの分画について酸性領域及びアルカリ性領域について二次元電気泳動・変動スポット (蛋白質) 検索を行う。

Tof/MS を用いて、スポット蛋白質 (標的蛋白質) を同定する。合わせてモデル動物各組織より RNA を抽出して、標的蛋白質の mRNA 発現量について real-timePCR を用いて比較検討を行い、標的蛋白質の in vivo での有効性を確認する。

(3) マウス心筋で発現が変化する薬物誘導性遺伝子の発現変化について網羅的に解析するために、セミアレイ法を用いて検討する。また、不整脈関連遺伝子を検索するために、薬剤性 QT 延長症候群を誘発するとされているクロルプロマジンの投与により発現の変化が認められているマウス心臓におけるカリウムチャンネル関連遺伝子として、内向き整流 K チャンネルである Kcnj15, LCNj4、Na/K/Ca 交換体である Slc24a2 及び遅延整流 K チャンネル遺伝子である Kcna6 の 4 遺伝子について検討する。

(4) (1) から (3) の実験で特定した蛋白質及び RNA 発現量を解析統計し、フェネチルアミン類危険ドラッグ誘導性の不整脈による突然死に特異的なマーカーを検索し、検出されたマーカーを実際の解剖検体に応用することで、先天的 QT 延長症候群の原因遺伝子 SNP がある人における危険ドラッグ使用時の突然死事例の死因診断法の開発を行う。

4. 研究成果

(1) 我々は、MP 使用中の突然死事例 10 事例 (男性 10 人: 女性 0 人、平均年齢 51.60 歳) 危険ドラッグ使用中の突然死事例 10 事例 (男性 9 人: 女性 1 人、平均年齢 32.90 歳) の心臓血及び心筋組織より、Qiagen EZ1[®] DNA Investigator kit EZ1[®] を用いて Qiagen

EZ1 advanced XL systemにて抽出した。KCNQ1及びKCNH2の全エクソン領域のPCR増幅及びシーケンス解析を行った。LQTSと診断されていないコントロールとしては、以前にKameiらが報告した日本人100人より得た同遺伝子の検出率を用いた(引用文献)。

その結果、KCNQ1遺伝子で8個の一塩基多型(SNP)、KCNH2遺伝子で5個のSNPが検出された。このうち2個(KCNQ1で1個【G643S】、KCNH2で1個【K897T】)はミスセンス突然変異であり、6個(KCNQ1で2個、KCNH2で4個)はサイレンス突然変異であった。MP使用中の突然死グループではG643S及びK897Tがそれぞれ10%(1/10)で検出された。一方、危険ドラッグ使用中の突然死グループではG643S及びK897Tがそれぞれ60%(6/10)及び10%で検出された。コントロール群におけるこれら遺伝子の検出率はそれぞれ11%及び6%であった。G643Sは危険ドラッグ使用中の突然死グループにて、MP使用中の突然死及びコントロール群と比べ、優位に多く検出された($P < 0.001$)。K897Tの検出率は3グループ間で優位な差は見られなかった($P > 0.05$)。また、G643Sを保有する危険ドラッグ使用中の突然死事例のうち3事例より違法薬物が検出され、そのうち2事例では合成カチノンが検出された。

今回危険ドラッグ使用中の突然死グループで検出率が高かったG643S変異は、これまでに、機能解析の結果、30%程度の軽度のIKsチャネル機能不全を引き起こすことが報告されており、G643S多型は、低カリウム血症または徐脈性不性脈のような増悪因子の存在下で、遺伝子保有者の生命を脅かす不整脈にかかりやすくするとされている(引用文献)。本研究では、MP使用中の突然死グループで10%なのに対し、危険ドラッグ使用中の突然死グループでは60%で検出された。これまでに報告されている、健康な日本人におけるG643S変異の検出率は日本人381人を用いたKameiらの報告で11%、アジア110人を用いたAckermanらの報告で9%と比較し、危険ドラッグ使用中の突然死事例で優位に多く検出されている(引用文献)。今回用いたMP使用者のMP血中の濃度は様々であり、どの濃度においても、優位に検出される遺伝子変異はなかった。これらのことからMPはQT延長作用を有するが、G643S変異はMPの使用濃度も関わらず、死因には関与していないことが示唆された。一方、危険ドラッグは未だに致死濃度が明らかでないものが多く、薬物濃度と死因の関連性については不明なものが未だ多い。また薬物の検出自体が難しく、使用していても検出されないものもある。今回危険ドラッグ使用者はから検出された薬物はPVP、PHP、PHPP、XLR-11、UR-144、EAM2201、5-fluoro-AB-PINCAである。PVP、PHP、PHPPは合成カチノン類に分類され、作用はMPに類似している。これまでに、臨床における合成カチノン類の中毒患者の主

な症状として、発作及び心臓不整脈が報告されている(引用文献)。本研究ではG643S変異と各種薬物の関連性は明らかにできなかったが、危険ドラッグ同様にQT延長作用を持つMP使用中突然死事例と比較し、危険ドラッグ使用中の突然死グループ、特に-PVPを含む合成カチノン使用中の突然死事例にて優位にG643S変異が検出されたことから、G643S変異保有者が合成カチノン系薬物を使用することで、重篤な不整脈が誘発され、それが死因に関与する可能性が示唆された。

LQT2のK897T変異はMP使用中の突然死事例グループ及び危険ドラッグ使用中の突然死グループからそれぞれ10%で検出された。これまでにKameiらが381人の日本人を用いた検出率は9.2%であり、一般的な日本人の保有率と優位な差は見られなかった。よって、今回薬物使用中の突然死にK897Tが関与しているか否かの検討は難しかった。

研究方法2、3、4の実験はノックダウンモデルを作成することが難しく、細胞を用いた実験に変更したが、それらの結果もうまういかなかった。今後細胞の種類やノックダウン遺伝子の配列を再検討し、検討を継続していく予定である。

<引用文献>

Inoue, H et al. Methamphetamine-related sudden death with a concentration which was of a 'toxic level'. *Leg Med (Tokyo)*. 8, 150-155 (2006)

Kamei S et al. Molecular analysis of potassium ion channel genes in sudden death cases among patients administered psychotropic drug therapy: are polymersisms in LQT genes a potential risk factor? *J Hum Genet*. 59, 95-99 (2014)

Kubota T et al. Evidence for a single nucleotide polymerism in the KCNQ1 potassium channel that underlies susceptibility to life-threatening arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 12, 1223-1229 (2001).

Ackerman M et al. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 78 1479-1487 (2003).

Potocka-Banas et al. Fatal intoxication with -PVP, a synthetic cathinone derivative. *J Forensic Sci*. 62, 553-556 (2017).

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)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永澤 明佳 (NAGASAWA, Sayaka)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：30536735