

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18982

研究課題名（和文）薬剤性呼吸中枢抑制を診断する新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Searching for novel biomarkers to diagnose drug-induced respiratory depression

研究代表者

堤 博志（Tsutsumi, Hiroshi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：50849114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：過量服薬による中毒の有無や程度の推定は、事件や事故の解明に非常に重要である。催眠鎮静薬であるGABAA作動薬は、多くの事例で検出されており、薬物濃度以外の客観的な指標が存在すれば、中毒推定において非常に有用である。新たな中毒指標を探索した結果、解糖系代謝物である2,3-Bisphosphoglycerate、Dihydroxyacetone-phosphate、Glycerol-3-phosphate、Sedoheptulose-7-phosphateが、GABAA作動薬であるジアゼパムの投与により減少する可能性および解糖系の酵素であるGAPDHの発現量が増加することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボロミクスおよび生化学的な実験により、GABAA作動薬をアストロサイト細胞株に投与すると解糖系に変化が生じることが見出された。この研究成果は、過量服薬による中毒の推定において新たな手がかりを提供し、法医学の発展に寄与することが期待される。解糖系とGABA作動薬との関連性を明らかにすることで、中毒推定の客観的指標を構築する新たな道が開かれるであろう。

研究成果の概要（英文）：The determination of the presence and degree of intoxication from drug overdose is crucial for the elucidation of incidents or accidents. Frequently detected in such cases are GABA<sub>A</sub> receptor agonists, a class of sedative-hypnotic drugs, suggesting that objective measures beyond drug concentration could be highly useful in intoxication assessment. In the quest for novel intoxication markers, we identified glycolytic metabolites, namely 2, 3-Bisphosphoglycerate, Dihydroxyacetone-phosphate, Glycerol-3-phosphate, and Sedoheptulose-7-phosphate, as potential indicators. It was found that their levels could decrease upon administration of the GABA<sub>A</sub> receptor agonist, diazepam. Furthermore, an increase in the expression of GAPDH, an enzyme in the glycolytic pathway, was also observed.

研究分野：法中毒

キーワード：法医学 法中毒 GABAA作動薬 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

世界的に薬物中毒死は増加傾向にあり、法医・救急・精神科などの広い医療分野で問題視されている。とくに医療用麻薬であるオピオイドと、睡眠薬であるベンゾジアゼピン類による中毒死は米国における薬物中毒死の半数以上を占めている。本邦は諸外国と比較してオピオイド処方の規制が厳格であるため、現状ではオピオイドによる中毒死は比較的少なく、ベンゾジアゼピン類による中毒死が多い。

オピオイド中毒死、ベンゾジアゼピン類中毒死の機序は、中枢神経系の呼吸中枢を過剰に抑制することによる窒息死だと考えられている。法医診断をするうえで薬物中毒死を客観的に診断する中毒の指標は、原因薬物の濃度を既知の致死濃度と比較することのみである。しかしオピオイドによる呼吸中枢抑制は、ベンゾジアゼピン類を併用することにより、単剤で摂取するときよりも少ない量で生じることが知られている。そのためオピオイドとベンゾジアゼピン類が同時に遺体より検出された場合、それぞれの薬物について単剤の時の致死濃度を当てはめることはできず、オピオイドやベンゾジアゼピン類がどの程度死因に寄与したのかの推定は困難となる。したがって薬物濃度以外に、オピオイド中毒、ベンゾジアゼピン類中毒による呼吸中枢抑制を推定できる客観的な指標があれば有用である。

## 2. 研究の目的

### (1) メタボロミクスによるベンゾジアゼピン類中毒マーカーの探索

まずベンゾジアゼピン類に焦点をあて実験を施行した。アストロサイトは中枢神経系において最も数が多いグリア細胞であり、中枢神経系にて薬物脳内移行にかかわる血液脳関門を形成する。多くの  $GABA_A$  作動薬も神経細胞に作用する際に、アストロサイトが形成する血液脳関門を経由する。過量服薬による中毒時には、アストロサイトは血液中の多量の  $GABA_A$  作動薬に暴露され影響を受ける可能性がある。

近年、様々な診断指標を探索する方法として、細胞や組織の代謝物を網羅的に探索するメタボロミクスが行われている。本研究はアストロサイトから  $GABA_A$  作動薬中毒指標を探索することを目的として、ラットアストロサイト細胞株に  $GABA_A$  作動薬である **Diazepam** を投与しメタボロミクスをおこなった。

### (2) **Diazepam** 投与によるアストロサイト細胞株 **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase** の発現量変化

メタボロミクスにて解糖系の関与が明らかとなったため、解糖系に關与する代表的な酵素である **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)** について、 $GABA_A$  作動薬である **Phenobarbital** 投与による発現量変化を経時的に検出した。その際、細胞内へのカルシウムシグナル阻害薬である **BTP2** を投与し、**GAPDH** の発現量増加とカルシウムシグナルとの関連を調べた。

### (3) $GABA_A$ 受容体 $\alpha 1$ サブユニットのリン酸化検出

$GABA_A$  受容体はその機能をリン酸化の有無によって変化させることが知られている。**Diazepam** 投与により発現上昇が認められた **GAPDH** の役割を明らかにするため、 $GABA_A$  受容体のリン酸化について検出した。

## 3. 研究の方法

### (1) メタボロミクスによるベンゾジアゼピン類中毒マーカーの探索

ラットアストロサイト細胞株である **RNB** 細胞に **DMSO** に溶解した **Diazepam** (終濃度 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を投与した ( $n=8$ )。Vehicle 群には **DMSO** を投与した。24 時間反応後、**PBS** にて洗浄し、**-80** にて急速に凍結した。凍結サンプルに対し内部標準として **2-Isopropylmalic acid** を添加し、**Bligh & Dyer** の方法に従い、代謝物を抽出した。抽出した代謝物は凍結乾燥し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (**GCMS**) 分析時に用事溶解した。凍結乾燥代謝物にメトキシアミン、**MSTFA** を添加し、誘導体化(メトキシム化、トリメチルシリル化)をおこない、**GCMS** を用い、**475** 代謝物について分析した (**Shimadzu GCMS-TQ8050**、**Smart Metabolites Database**)。GCMS 分析にて得られたクロマトグラムの曲線化面積をピーク強度とし、ピークが観察された **220** 代謝物よりピーク強度を得た (**Shimadzu Labsolution Insight**)。得られたピーク強度は、内部標準である **2-Isopropylmalic acid** のピーク強度で除しピーク強度比とした。ピーク強度比を用いて主成分分析、ボルケーノプロットを行った (**Metaboanalyst5.0**)。またボルケーノプロットにて、ピーク強度比の変化が大きく、有意に変化した代謝物について、**t** 検定を用いて比較した (**GraphPad prism 9**)。

### (2) **Phenobarbital** 投与によるアストロサイト細胞株の **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase** の発現量変化

**RNB** 細胞株に致死濃度の **Phenobarbital** (終濃度 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびカルシウムシグナル阻害薬 (**BTP2**: 終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) を投与し、**0,4,8,24** 時間後に細胞溶解液を採取した ( $n=6$ )。全自動ウェスタンブロットであるシンプルウェスタンシステム (**ProteinSimple, San Jose, CA, USA**) (**Fig.1**) を用いて **GAPDH** 発現量 (**Cat# 60004-1-Ig, 1:250**)、総蛋白量を測定した。**GAPDH** 発現量を総蛋白量で除して標準化し、二元配置分散分析および **Dunnett** 検定で群間を比較した。

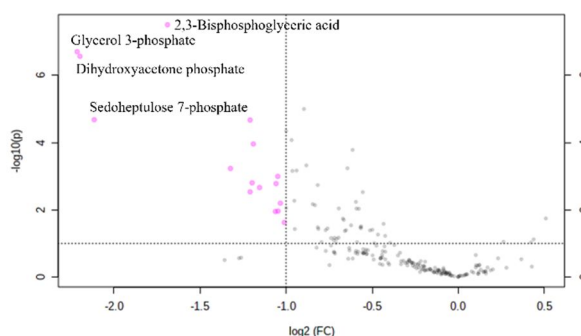
### (3) **GABA<sub>A</sub>** 受容体 $\alpha 1$ サブユニットのリン酸化検出

**RNB** 細胞にブランク(**PBS**、メタノール)、致死濃度となる **GABA<sub>A</sub>** 作動薬 (ジアゼパム: 終濃度 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェノバルビタール: 終濃度 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ゾルピデム: 終濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびカルシウムシグナル阻害薬 (**BTP2**: 終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) を投与し、し、**8** 時間後に細胞溶解液を採取した。リン酸化タンパク質をリン酸化レベルに応じて分離し、複数のバンドとして検出可能なゲルであるスーパーセップ™ Phos-tag®を用いて、**GABA<sub>A</sub>** 受容体  $\alpha 1$  サブユニット (**Cat# 12410-1-AP, 1:2500**) についてウェスタンブロットングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) メタボロミクスによるベンゾジアゼピン類中毒マーカーの探索

**RNB** 細胞に対し **Diazepam** を投与し、メタボロミクスをおこなったところ、**2,3-Bisphosphoglyceric acid**、**Glycerol 3-phosphate**、**Dihydroxyacetone phosphate**、**Sedoheptulose 7-phosphate** の4代謝物が **Diazepam** 投与によるピーク強度比の変化が大きく、有意に減少しており、**GABA<sub>A</sub>** 作動薬中毒指標の候補と考えられた (**Fig.1**)。 **GABA<sub>A</sub>** 作動薬中毒指標の候補と考えられた4代謝物について、**t** 検定を用いてピーク強度比を比較したところ、いずれの代謝物について有意にピーク強度比が減少した (**Fig.2**)。



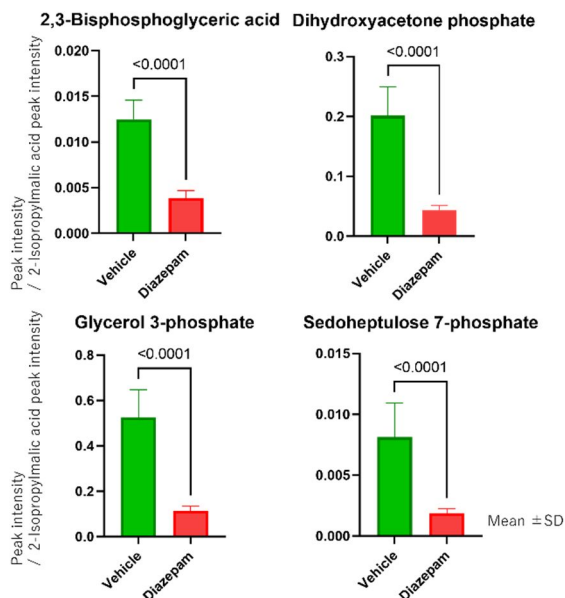
**Fig. 1** メタボロミクス結果のボルケーノプロット

### (2) **GAPDH** 発現量の測定

**RNB** 細胞の **GAPDH** の発現量は **Phenobarbital** 投与 (終濃度 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) により、投与後4時間で有意に上昇し、**24** 時間まで持続した。また、**Phenobarbital** 投与による **GAPDH** 発現量上昇はカルシウムシグナル阻害剤である **BTP2** の投与により抑制された (**Fig.3**)。

### (3) **GABA<sub>A</sub>** 受容体 $\alpha 1$ サブユニットのリン酸化検出 (**Fig.4**)

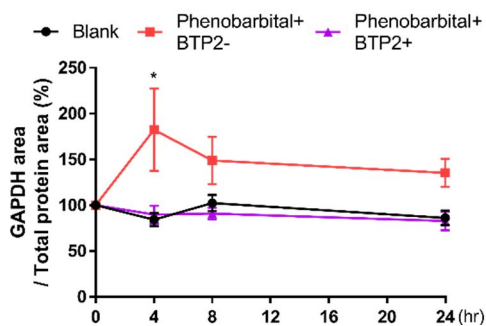
リン酸化されていないタンパク質と比較して、リン酸化されたタンパク質は **Phos-tag** ゲルにおいて泳動速度が遅くなる。したがって **GABA<sub>A</sub>** 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの一部がリン酸化されていれば、**GABA<sub>A</sub>** 受容体  $\alpha 1$  サブユニットのバンドは分離する。しかし **Phos-tag** ゲルにおいても **GABA<sub>A</sub>** 受容体  $\alpha 1$  サブユニットのバンドは分離せず、リン酸化した **GABA<sub>A</sub>** 受容体  $\alpha 1$  サブユニットは検出されなかった。



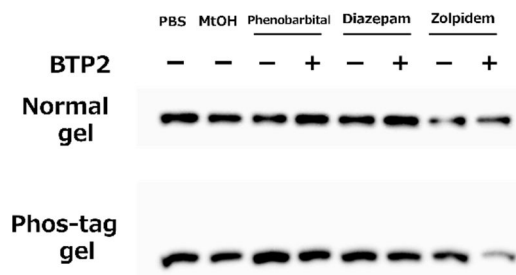
**Fig. 2** ピーク強度比変化の比較

## まとめ

アストロサイト細胞株に対する  $\text{GABA}_A$  作動薬の投与により、**2,3-Bisphosphoglyceric acid**、**Glycerol 3-phosphate**、**Dihydroxyacetone phosphate**、**Sedoheptulose 7-phosphate** の4代謝物のピーク強度比が **Vehicle** 群と比較して有意に低下した。さらに **GAPDH** 発現量を調べたところ、 $\text{GABA}_A$  作動薬の投与により有意に増加し、カルシウムシグナルを抑制する **BTP2** により抑制された。これらから、解糖系代謝物のピーク強度比変化はカルシウムシグナルを介した **GAPDH** の発現量変化によるものであることが示唆された。しかし **GAPDH** の発現量上昇により、 $\text{GABA}_A$  受容体  $\alpha 1$  のリン酸化は認められなかった。今後、 $\text{GABA}_A$  作動薬過剰服薬時の **GAPDH** 発現上昇の役割を明らかにしていく予定である。



**Fig. 3** **GAPDH** の発現量変化



**Fig. 4** **Phos-tag**ゲルによる  $\text{GABA}_A$  受容体 **1** サブユニットのリン酸化検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>堤 博志, 笹尾 亜子, 大津 由紀, 古川 翔太, 西谷 陽子     | 4. 巻<br>74       |
| 2. 論文標題<br>ラット過量服薬モデルを用いた薬剤性運動機能障害マーカーの探索(第2報) | 5. 発行年<br>2020年  |
| 3. 雑誌名<br>日本法医学雑誌                              | 6. 最初と最後の頁<br>75 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                  | 査読の有無<br>無       |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難         | 国際共著<br>-        |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堤 博志, 笹尾 亜子, 大津 由紀, 古川 翔太, 西谷 陽子 |
| 2. 発表標題<br>アストロサイト細胞株を用いた催眠鎮静薬中毒指標の探索       |
| 3. 学会等名<br>第105次日本法医学会学術全国集会                |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堤 博志, 笹尾 亜子, 大津 由紀, 古川 翔太, 西谷 陽子    |
| 2. 発表標題<br>ラット過量服薬モデルを用いた薬剤性運動機能障害マーカーの探索(第2報) |
| 3. 学会等名<br>第104次日本法医学会学術全国集会                   |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|