

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21693

研究課題名（和文）向精神薬長期服用者の突然死に対し、死亡病態解明への多角的アプローチ

研究課題名（英文）A multifaceted approach to elucidate the pathophysiology of sudden death in patients taking psychotropic drugs for a long time.

研究代表者

舟山 真人（Funayama, Masato）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40190128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：18例の突然死例において、心疾患関連遺伝子解析では、標準ヒトゲノム配列hg19と比較したところ、500-1011個（平均719.2個）のSNPが観察された。次にヒトゲノム関連疾患についての情報データベースClinVarを用いてフィルタリングした。その結果、5-13個のSNPが検出された。この中で多くの試料にTNNI3遺伝子の変異が見られた。一方、薬剤代謝関連遺伝子の解析では137SNPsのタイピング結果が得られた。中でもCYP1A、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4遺伝子は薬物代謝に重要な役割を担っているが、これらの遺伝子が働かなるような変異は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の突然死例の中には、ある一定の割合で原因究明が困難な一群がある。この誘因として長期に亘る向精神薬投与が影響していると考えられているが、一つの機関での症例数の少なさに加え解剖自体の未執行が加わり、分子生物学的探索はほぼ手つかずの状態にあるといってもよい。しかし当分野ではある程度の症例数の蓄積がある。そこで本研究では心疾患関連遺伝子および薬剤代謝関連遺伝子の変異解析、さらにミトコンドリアDNA解析という、多角的アプローチによる精神科領域における突然死の原因解明を試みようというものである。

研究成果の概要（英文）：In the cardiac disease-related gene analysis, 500-1011 SNPs (average 719.2) were observed when compared to the standard human genome sequence, hg19. Next, we filtered the data using ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), a database that collects information on diseases associated with the human genome. As a result, 5-13 SNPs were detected. Among these, many samples showed mutations in the TNNI3 gene. On the other hand, analysis of drug metabolism-related genes yielded typing results for 137 SNPs. Among them, CYP1A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 genes play important roles in drug metabolism, but no mutations that prevented these genes from working were observed.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 向精神薬 心疾患関連遺伝子 薬剤代謝関連遺伝子 変異解析 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する東北大法医学分野では年間 250～300 体の法医解剖を施行している。法医解剖の目的には大きく 2 つあり、一つは犯罪性の有無に関し、医学の目からのアプローチ、もう一つが死因究明である。後者に関連し 2012 年に「死因究明等の推進に関する法律」、2019 年 6 月に「死因究明等推進基本法」が公布された。これら法律は、高齢化ならびに孤独死の増加と共に、死因究明を行うことによって得られた知識が公衆衛生の向上及び増進に資する情報として広く活用されることを目的にしたものである。例えば予期せぬ死という状況で発見されたヒトに対して、犯罪性が低くとも、捜査機関や行政が大学法医学教室との連携のもと、積極的に解剖を施行するよう努力しなさい、というものである。このような動きの中で、従来ほとんど解剖に付されなかった、犯罪とは関係の低い死亡例が、積極的に解剖されるようになった。そのような解剖例に精神科領域における突然死症例があり、これらは剖検においても原因究明が困難な一群である。この誘因に、長期に亘る向精神薬投与が影響していると考えられているが、一つの機関での症例数の少なさ、に解剖自体の未執行が加わり、分子生物学的探索は手つかずの状態にあるといってもよい。しかし当分野ではある程度の症例数の蓄積がある。そこで本研究で、心疾患関連遺伝子および薬剤代謝関連遺伝子の変異解析、さらにミトコンドリア DNA 解析という、多角的アプローチによる精神科領域における突然死の原因解明を試みようというものである。

2. 研究の目的

ここ数年、増加している死因究明関連事例の中で目に付くのが精神疾患患者の突然死である。長期に亘り向精神薬を投与されていた患者が自宅や入院先で予期せぬ死を迎え、しかし解剖で心筋梗塞のような死因となる明らかな異変がみられない症例(以下突然死群と称する)があることは、一部の法医医師や精神科医の中で知られてはいた。関連薬剤としてフェノチアジン系薬の関与が言われているが、そのメカニズムは不明のままであり、実際にはこれ以外の薬剤でも突然死が発生している。そしてそのような症例が当分野において年間 3～5 例程度、数えるようになった。そこで本研究では、このような突然死群に対し、最新の診断技術であるそこで本研究で、心疾患関連遺伝子および薬剤代謝関連遺伝子の変異解析、さらにミトコンドリア DNA 解析という、多角的アプローチによる精神科領域における突然死の原因解明を試みようというものである。

3. 研究の方法

倫理委員会での研究承認後、まず、症例の抽出を行った。2007 年以降、当分野での解剖例中、統合失調症あるいはうつ病の既往があるもので、向精神薬の投与情報が得られ、かつ精密機器分析が行われた成人症例の中から、可能性を含めた死因を挙げ得なかったものを抽出した。なお、冠状動脈硬化症など器質的疾患の罹患率が高い 60 代以上は除いた。その結果、統合失調症 11 例、うつ病 5 例で、うちテンカンが 2 例、アルコール依存が 2 例重なりがある。男性が 13 例と多く、20 代 2 名、30 代 5 名、40 代 6 名、50 代 3 名であった。得られた情報からの病歴期間は統合失調症が 3 年以上、うつ病が 1.5 年以上である。両疾患とも向精神薬は 3 種類以上の処方記録があるが、解剖後の検体を精密機器で薬毒物分析を行ったが、多くの症例で処方薬全てが検出されてはいない一方、処方リストにはない薬剤が検出された例もみられた。薬剤の種類が多く、傾向を把握するには症例数が少ないものの、バルプロ酸ナトリウムが 9 例と目立っていた。最近の研究では抗テンカン薬とブルガダ型心電図波形との関連を示唆する報告があり、興味深い。また 2 種類以上のベンゾジアゼパム系薬剤併用例は 10 例にみられた。

次に、解剖時に採取した心筋から抽出したゲノム DNA を用いて、次世代シーケンサー、Ion GeneStudio S5(Thermo Fisher Scientific)により心疾患関連遺伝子および薬剤代謝関連遺伝子の変異解析を行った。試料は向精神薬を長期服用していた患者の中で司法解剖に回ってきた事例のうち、死因が心不全等心臓突然死例 10 例、薬物中毒死例 8 例、それらとの比較対照として窒息 1 例、肺水腫 1 例の計 20 例である。年齢は 6 ヶ月の乳幼児 1 例を除くと 26-69 歳(平均 42.6 歳)であり、男性 18 例、女性 2 例であった。心疾患関連遺伝子は Thermo Fisher Scientific 社のホームページ上でターゲット遺伝子を選んでプライマーセットを設計する、IonAmpliseq Designer ツールを用いて 282 遺伝子、計 5404 SNP を一度に増幅するプライマーセットを設計・作成した。また、薬剤代謝関連遺伝子の解析には IonAmpliseq Pharmacogenomics Panel による 119 遺伝子、137 SNP を解析するプライマーセットを用いた。いずれもそれぞれのプライマーセットで増幅した後、ライブラリを作成し Ion Chef System にてエマルジョン PCR 後テ

ンプレートを調整した。シーケンスは 540 チップと Ion GeneStudio S5 を用いて行い、付属の Plug-in

ソフトウェアおよびクラウドの Ion Reporter を用いて多型解析を行なった。その結果、それぞれ複数の関連遺伝子ならびにその疑いがあるものを持つ SNP が検出された。詳細については、下段の「研究成果」を参照されたい。

最終年度は次世代シーケンサーを用いたミトコンドリア DNA(mtDNA)解析を行った。ミトコンドリアは、真核生物の細胞中に存在する細胞小器官の一つであり、生命活動に必要なエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)の生産を担っている。ミトコンドリアは核 DNA と異なり、独自のゲノム DNA(mtDNA)を持っており、これに変異が存在するとミトコンドリア病を発症することが知られている。脳の神経細胞であれば、見たり、聞いたり、物事を理解することに障害が起き、筋肉であれば運動障害が生じる。mtDNA の変異が先天性であれば乳幼児から症状が見られるが、年齢を重ねた後に発症することもある。これは時間が経過するとともに変異を持つ mtDNA の数が増加するためであり、特に心臓でこれが起きると心筋症の症状が現れ、突然死の一因になるとも考えられている。このように、加齢と共に変異を持つ mtDNA の数が増加し、ある閾値を超えると臨床症状が出ることを閾値効果と呼ぶが、長期に及向精神薬服用者の突然死には、これが当てはまる可能性が考えられる。そこで今回、向精神薬長期服用者の突然死例においても同様な事例が見られるか、mtDNA 変異の検索を行った。18 例の突然死例の心筋および血液から DNA を抽出し、Precision ID mtDNA Whole Genome Panel を用いて mtDNA 全領域の増幅を行い、Ion Chef System で前処理後、次世代シーケンサーである Ion Gene Studio S5 System でデータを取得した。得られたシーケンスデータは、Converge ソフトウェアで mtDNA 参照配列(rCRS)との変異解析を行った。

4 . 研究成果

心疾患関連遺伝子ならびに薬剤代謝関連遺伝子いずれも興味深い解析結果が得られた。心疾患関連遺伝子解析では、標準のヒトゲノム配列である hg19 と比較したところ、1 人あたり SNP が 500-1011 個 (平均 719.2 個) 観察された。次にそれらの SNP の中で病原性を持つものがあるか、否かを、ヒトゲノムの多様性と関連する疾患についての情報を収集しているデータベース ClinVar(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)を用いてフィルタリングした。その結果、5-13 個の病原性またはその疑いがあるものを持つ SNP が検出された。1 例を除きほぼ全ての試料にて TNNI3 遺伝子の変異が見られており、この SNP と突然死との関係を判断するのは更なる情報収集が必要である。また、試料によっては RYR2 や SCN5A などこれまで突然死との関連が強く示唆される SNP も検出されており、心疾患関連遺伝子の解析は突然死の死因究明に有効であったと考えられる。しかし、これらのゲノム変異はあくまでもリスクファクターでしかない。なぜなら、死亡する年齢まで生きており、ゲノム変異が死因であればとっくに亡くなっているからである。したがって、これらゲノム変異と環境・加齢による影響、もしくは他の要因がトリガーとなり突然死を引き起こすのかもしれない。薬剤代謝関連遺伝子の解析では 137SNP タイピング結果が得られているが、中でも CYP1A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 遺伝子は薬物代謝に重要な役割を担っており、これらの遺伝子が全く働かなるような変異は観察されなかった。薬物の代謝ではゲノム変異よりも、発現状態を観察するために mRNA を測定することが重要となる。さらには薬物代謝酵素の測定が最も重要となるが、剖検試料においては mRNA や酵素を測定することは死後変化により困難であり、ゲノム変異の確認しか行うことができないのが現状である。したがって、薬物代謝系遺伝子の SNP に関しては、それぞれの症例で処方された薬物と照らし合わせて判断することが必要であると考えられた。

ミトコンドリア DNA の解析結果については、それぞれの心筋と血液の mtDNA 配列を比較したところ、18 例中 14 例において変異が見られた。これは、4 例は血液と心筋の mtDNA 配列は同一であったが、残りの 14 例においては、血液からのタイプと心筋でのタイプが違う、いわゆるヘテロプラスミーの状態にあることを意味している。さらに、心筋や血液内でもモザイク状態であることが確認されており、mtDNA は 1 人の体の中でかなりばらつきのあるタイプを有していることが判明した。これら変異が蓄積され、閾値効果を発揮することで、ミトコンドリア病を発症することが容易に想像できた。心筋にのみ見られた mtDNA 変異の中で、3 例においては ClinVar データベースから病原性があると判断された。2 例は 30 代男性における 8473C、及び 40 代女性の 10398R の変異であり、死因は虚血性心疾患および心肥大であった。残りの 1 例は 60 代女性の 9484.1T であり、死因自体は薬物中毒であった。先の 2 例は mtDNA の変異と死因の関連性が疑われるところであるが、病歴などの情報も加味して判断する必要がある。向精神薬の長期服用と死因の関連に関しては、服用していた薬物の種類、薬物代謝系遺伝子変異、心筋の mtDNA 変異等の多方面からのアプローチを行うことで、突然死の死因究明の道筋に新たな指針を提示することができると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Guan X, Ohuchi T, Usui K, Hashiyada M, Funayama M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Analysis of autopsy cases of unknown cause of death in psychotropic drug users.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Res Pract Forens Med	6. 最初と最後の頁 159-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Guan X., Ohuchi T., Hashiyada M., Funayama M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Age-related DNA methylation analysis for forensic age estimation using post-mortem blood samples from Japanese individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101917 ~ 101917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.101917	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ohuchi T, Guan X, Funayama M.	4. 巻 255
2. 論文標題 Evaluation of the Utility of Mitochondrial DNA Testing in Personal Identification Work in the Great East Japan Earthquake of 2011.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 257-281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 Guan X, 舟山真人, 臼井聖尊, 大内司
2. 発表標題 校正紙薬服用者の死因不明剖検例の検討.
3. 学会等名 第105次日本法医学学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 雪てい;、舟山真人他
2. 発表標題 向精神薬服用者の死因不明剖検例の検討
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋谷田 真樹 (Hashiyada Masaki) (40374938)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	

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
---------	---------