

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790612

研究課題名（和文）覚醒剤・向精神薬乱用者の中枢神経系および内分泌系における変性蛋白の解析

研究課題名（英文）Analysis of denaturated protein in the central nervous system and endocrine system of drug abusers

研究代表者

石川 隆紀（ISHIKAWA TAKAKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50381984

研究成果の概要（和文）：本研究では、覚醒剤・向精神薬乱用者の中枢神経系および内分泌系組織について、アルツハイマー病やクロイツフェルトヤコブ病などの神経変性疾患で増加することが知られているアポリポプロテイン E4, アポリポプロテイン B およびアポリポプロテイン J の発現動態を免疫組織化学的手法および分子生物学的手法（mRNA 発現）を用いて解析した。その結果、部位による発現の相違はあるものの、火災、熱中症および凍死などの異常温度環境下においてアポリポプロテインの発現に加え、薬物乱用者におけるアポリポプロテインの発現が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the expression dynamics of apolipoprotein (Apo) E4, ApoB, and ApoJ, which are known to be increased in cases with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease, in the central nervous system and endocrine system of metamphetamine and psychotropic drug abusers using immunohistochemical and molecular biological (mRNA expression) techniques. Although Apo expression showed site-to-site differences, characteristic expression patterns were detected not only in cases exposed to extreme temperature conditions in traumatic events, such as fire fatality, hyperthermia, or hypothermia, but also in drug abusers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：社会医学・細胞・組織・ストレス・蛋白質・薬物乱用

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医解剖・鑑定においては、死因や受傷時の状況などについて医学的判断が求められる。特に死亡時における薬物の影響に関する評価は法医学のみならず、精神医学や賠償

医学の観点からみても重要である。乱用薬物に関する研究の多くは動物実験によって行われているが、ヒトに対する薬物の影響を客観的に分析できる方法は未だ確立されていない。

(2) これまで申請者らは、異常環境、加齢、アルコール性肝疾患、低栄養や覚醒剤乱用の影響あるいは下垂体ホルモンの死後変化等について、本研究の基盤となる様々な病態における視床下部-下垂体-副腎系の動態を形態学的・生化学的に検討してきた。最近では急性期のストレス反応として血液や脳脊髄液中におけるホルモン（副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、成長ホルモン（GH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH））濃度の変化を明らかにし、極早期のストレス反応について、細胞の呼吸量を指標として種々の向精神薬の中樞神経系および内分泌系培養細胞への影響を溶存酸素測定装置を用いて検討した。

(3) 特に本研究課題発案の原点となった下垂体前葉内の混合細胞性濾胞の加齢的变化に関する研究において、薬物依存者に特徴的な所見を見出した。すなわち、同濾胞は、20歳台では下垂体硬膜側に数個認められるのに対し、70歳台では前葉内に散在し、濾胞構成細胞はGH細胞が主体であった。一方、覚せい剤や向精神薬などの薬物乱用者の濾胞構成細胞はプロラクチン細胞が主体で、GH細胞はむしろ減少していた。下垂体内の濾胞はPAS染色陽性の糖蛋白質で、この濾胞をレーザーマイクロディセクションにて採取し、ウエスタンブロッティングにて濾胞内容を分析すると、アポリポプロテインの1種であるクラスτεリンであることが判明した。薬物乱用者において、脳と内分泌系のインターフェースとして働く下垂体内においてアポリポプロテインを含有する濾胞が増加し、またホルモン含有細胞の割合も変化していることが明らかとなり、薬物とアポリポプロテイン、薬物とホルモン分泌の関係やアポリポプロテインとホルモンの関係を明らかにすることができれば、薬物依存研究の基盤となる可能性がある。アポリポプロテインはリポタンパク質と結合し、リポタンパク質の認識や脂質代謝に関与する酵素群の活性化因子あるいは補酵素として働く一群のタンパク質である。構造や働きによりいくつかのサブタイプが知られており、クラスτεリンなどのアポリポプロテイン J は中樞神経系の可溶性アミロイドβ蛋白を調整する重要なレギュレーターで、神経突起斑のタウリン酸化を亢進し、また細胞死をプログラムする機能を持つ細胞外シャペロンとしての役割が知られている。アポリポプロテイン E には、アポリポプロテイン E2、アポリポプロテイン E3 およびアポリポプロテイン E4 があり、このうちアポリポプロテイン E4 は、疫学調査によってアルツハイマー病の危険因子として

知られている。その他、クロイツフェルトヤコブ病などのプリオン病は、異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）が、主に脳や脊髄等に蓄積し、海綿状脳症を引き起こす変性疾患であるが、この PrP^{Sc} がアポリポプロテイン B と結合することが既に知られている。このようにアポリポプロテインは神経変性疾患に強く関与しており、これらの変化が向精神薬を中心とした薬剤で誘発される可能性があり、薬物依存者におけるその病態についての調査は、法医学実務上、特に重要であるのみならず、法医学から臨床医学に向けて発信する応用研究となりうると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は覚せい剤・向精神薬乱用者の視床下部-下垂体-副腎系組織において、神経変性疾患罹患時に増加する変性蛋白、特に今回はクロイツフェルトヤコブ病やアルツハイマー病などで発現することが知られているアポリポプロテインの動態について解析し、ヒト特異的な行動ともいえる薬物依存における精神障害の病態を解明することにある。乱用薬物の影響を、他分野では得難いヒト試料を用いて、病理学のみならず生化学的見地から分析し、覚せい剤・向精神薬が中樞神経系および内分泌系に及ぼす影響について調査することは、法医学実務上のみならず、臨床精神医学的観点からみても重要な意義があると思われ、薬物依存治療のための基礎的資料となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究においては、大脳を含む中樞神経系器官および視床下部・下垂体・副腎などの内分泌系器官を指標とし覚醒剤・向精神薬乱用が中樞神経系および内分泌系組織に与える影響とその反応様式等、特に今回はアポリポプロテインおよび各種脳内分泌系ホルモンの発現に関するデータを剖検例の組織および血液や脳脊髄液等の体液を用いて、免疫組織化学的手法や酵素結合免疫吸着法などによって解析した。病理学的変化は少なくとも数時間から数年にわたる慢性的な薬物投与の結果であると推測され、急性の薬物投与による変化に対しては通常の病理組織学的変化のみから分析するには限界があるように思われる。そこで本研究期間内に病理形態学的手法に加えて、覚醒剤・向精神薬を投与したマウスの脳実質内および血清・脳脊髄液中のホルモンの変化について検討した。また大脳神経細胞、下垂体細胞、副腎髄質細胞などの中樞神経系および内分泌系の培養細胞を

用い、覚醒剤・各種向精神薬投与後の細胞活性の変化を酸素消費量、産生ホルモン量(mRNA)およびアポリポプロテインを指標として検討し、覚醒剤・向精神薬の中樞神経系および内分泌系に及ぼす影響について分析した。

4. 研究成果

(1) 研究上半期は、視床下部・頭頂葉・海馬・中脳・下垂体・副腎について、抗ヒトアポリポプロテイン B, アポリポプロテイン E₄ およびアポリポプロテイン J 抗体を用いて免疫染色し、死因別陽性細胞率の変化について検討した結果、視床下部や海馬におけるアポリポプロテイン B およびアポリポプロテイン E₄ は、熱中症において高値を示したが、薬物中毒死では他群間に比較して差は認められなかった。中脳では、アポリポプロテイン B のみが熱中症で高値を示し、中毒死に特徴的な変化はみられず、アポリポプロテイン E₄ では死因間の差は認められなかった。各部位におけるアポリポプロテイン J の免疫染色陽性率に統計学的差は認められず、凍死で低下する傾向がみられた。

(2) 研究下半期は、大脳頭頂部・海馬・中脳黒質および下垂体について、アポリポプロテイン B, アポリポプロテイン E₄ およびアポリポプロテイン J の mRNA の発現について死因別に比較検討した。アポリポプロテイン E₄ の mRNA の発現量は、中脳において他の部位より多く、頭頂葉および海馬では火災、熱中症および凍死で高値、中脳では熱中症において高値を示した。下垂体では一酸化炭素中毒で高値を示した。アポリポプロテイン B の mRNA の発現は、部位による発現量の差は認められず、頭頂部では凍死で高値、溺死で低値を示し、中脳および海馬では死因間の差は認められなかった。下垂体では火災および中毒で高値を示した。アポリポプロテイン J の mRNA の発現量は、下垂体において他の部位に比較して低下が認められた。死因別にみると、頭頂部および中脳では火災、中毒および頭部外傷で他群に比較して高値、下垂体では火災で高値を示した。海馬における死因間の差は認められなかった。以上の研究結果から、部位による発現の相違はあるものの、火災、熱中症および凍死などの異常温度環境下並びに薬物乱用者におけるアポリポプロテインの発現動態が明らかとなった。

(3) これらの薬物や異常環境因子が中樞神経系および内分泌系組織に及ぼす影響に関する病態生理学的分析の成果を、国際学会を中心に公表した。

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 6 件)

① Ishikawa T, Michiue T, Maeda H, Evaluation of postmortem serum and cerebrospinal fluid growth hormone levels in relation to the cause of death in forensic autopsy, *Hum Cell*, 査読有, 24, 2011, 74-77, DOI: 10.1007/s13577-011-0012-5

② Yoshida C, Ishikawa T, Michiue T, Quan L, Maeda H, Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of chromogranin A as a stress marker with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia, *Int J Legal Med*, 査読有, 125, 2011, 11-20, DOI: 10.1007/s00414-009-0374-3

③ Quan L, Ishikawa T, Hara J, Michiue T, Chen JH, Wang Q, Zhu BL, Maeda H, Postmortem serotonin levels in cerebrospinal and pericardial fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy, *Leg Med*, 査読有, 13, 2011, 75-78, DOI: 10.1016/j.legalmed.2010.11.003

④ Tomita M, Katsuyama H, Watanabe Y, Hidaka K, Yoshitome K, Miyaiishi S, Ishikawa T, Shinone K, Water-restraint stress enhances methamphetamine-induced cardiotoxicity, *Chemico-Biol Interact*, 査読有, 190, 2011, 54-61, DOI: 10.1016/j.cbi.2011.01.025

⑤ Maeda H, Ishikawa T, Michiue T, Forensic biochemistry for functional investigation of death: Concept and practical application, *Leg Med*, 依頼原稿・査読無, 13, 2011, 55-67, DOI: 10.1016/j.legalmed.2010.12.005

⑥ Ishikawa T, Yoshida C, Michiue T, Perdekamp MG, Pollak S, Maeda H, Immunohistochemistry of catecholamines in the hypothalamic-pituitary-adrenal system with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia, *Leg Med*, 査読有, 12, 2010, 121-127, DOI:10.1016/j.legalmed.2010.01.004

[学会発表] (計 9 件)

① Ishikawa T, Michiue T, Maeda H, Molecular pathology of apolipoprotein E4 in human brain with regard to traumatic stress, 8th International Symposium on Advances in Legal Medicine. 26-30 Sep. 2011, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany.

② Ishikawa T, Molecular pathological approaches to pathophysiology of death in routine forensic casework: present observations and outlook, 8th International Symposium on

Advances in Legal Medicine, 26-30 Sep. 2011, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany

③ Hara J, Ishikawa T, Michiue T, Maeda H, Post-mortem urinary catecholamine levels with regard to the cause of death, 8th International Symposium on Advances in Legal Medicine. 26-30 Sep. 2011, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany

④ Ishikawa T, Miyazato T, Michiue T, Maeda H, Molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines in the lung with special regard to fatal intoxication, hypothermia and hyperthermia, 8th International Symposium on Advanced in Legal Medicine, 26-30 Sep. 2011, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany

⑤ Ishikawa T, Miyazato T, Michiue T, Maeda H, Different death processes of fire fatality as demonstrated by molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines with special regard to contribution of burns and carbon monoxide intoxication, 8th International Symposium on Advanced in Legal Medicine, 26-30 Sep. 2011, Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt, Germany

⑥ Miyazato T, Ishikawa T, Michiue T, Maeda H, Molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines in drowning, 第95次日本法医学会学術全国集会, 2011年6月15日-17日, 福島, コラッセ福島

⑦ 宮里公子, 石川隆紀, 道上知美, 織谷茂樹, 王起, 小川雅史, 前田均, 剖検例における急性薬物中毒死の生化学指標, 第31回日本中毒学会西日本部会, 2011年2月26日, 大阪, りんくう総合医療センター, 市立泉佐野病院

⑧ Ishikawa T, Michiue T, Wang Q, Chen JH, Yoshida C, Miyazato T, Maeda H, Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of β -endorphin with regard to the cause of death in forensic autopsy, The 10th Indo-Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Science, 25 Oct. 2010, Noida, India

⑨ Ishikawa T, Michiue T, Miyazato T, Perdekamp MG, Pollak S, Maeda H, Immunohistochemistry of apolipoproteins in the hypothalamic-pituitary-adrenal system with special regard to fatal poisoning in forensic autopsy, 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 24 Sep. 2010, Berlin, Germany

〔図書〕(計2件)

① Ishikawa T, Maeda H, Hyperthermia and hypothermia. Encyclopedia of Forensic Science (in press).

② Ishikawa T, Maeda H, Systemic response to

trauma. Encyclopedia of Forensic Science (in press).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 隆紀 (TAKAKI ISHIKAWA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 50381984

(2) 研究協力者

前田 均 (HITOSHI MAEDA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20135049

道上 知美 (TOMOMI MICHIEU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 00529240

富田 正文 (MASAFUMI TOMITA)
川崎医科大学・准教授
研究者番号: 50113197

(3) 連携研究者

該当なし