

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 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590644

研究課題名（和文） 覚醒剤中毒作用におよぼすストレスの影響 - ストレス蛋白の関与 -

研究課題名（英文） Effect of stress on methamphetamine intoxication
- involvement of stress protein -

研究代表者

富田 正文 (TOMITA MASAFUMI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50113197

研究成果の概要（和文）：

覚醒剤 (METH) の中毒作用におよぼすストレスの影響を検討した。組織変化では、短期、長期実験ともに、ストレス下での METH 投与で最も障害が顕著に観察された。短期実験では Heat shock protein (Hsp) が重要な役割を果たすが、長期では種々の遺伝子が障害と防御に関して関与することが分った。Glucocorticoid receptor (GR) 遺伝子多型が、ストレス下での METH の心筋毒性、生体内酸化に影響する可能性が示唆された。下垂体の核濃縮様変化にも影響がみられた。現在、METH の大腿骨骨形態に与える影響、脳細胞の活性化についてさらに検討を続けている。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we assessed the effects of stress on intoxication due to methamphetamine (METH) in mice. Mice were injected with 30 mg/kg i.p. (the acute study) or 10 mg/kg i.p three times per week (the chronic study). The histological findings indicated that METH induced more deleterious effects in the myocardial tissues during acute and chronic administrations when under stress conditions. Heat shock proteins (Hsps) played a critical role in the acute phase, while numerous genes, including anti-oxidant, anti-apoptotic genes played significant roles in the chronic phase. We obtained a significant impact of glucocorticoid receptor (GR) gene polymorphism on cardiac injury and 8-OHdG in urine samples. Pituitary glands were also affected by METH under stress. Now, we are investigating the effect of METH and/or stress on bone mineral density and neuronal cell reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
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：覚醒剤, ストレス, 中毒

1. 研究開始当初の背景

複雑な現代社会ではストレスは避けられず、循環器疾患、中枢神経系疾患など多様な疾患の発症に大きな要因となっていることに疑う余地は無い。またストレス応答は、最も基本的かつ重要な生命現象の1つである。本研究の対象である覚せい剤(METH)中毒でも、強いストレス環境下で使用されることが多く、その中毒作用にストレスが大きな影響を及ぼす可能性が非常に高い。また法医学領域では、METHの作用が直接死因になるという判断のみならず、「ストレスの関与」について医学的に解明されることが望ましい。これまでのMETHに関する国内外の研究では、圧倒的に脳を対象としたものが多い。心筋に関しては、心機能への影響、カテコラミンとの関連、METHによるapoptosisなどである。また、METHとストレスとの関連については、虚血—再還流時でのGap junctionやDNA arrayによる遺伝子発現の比較検討にとどまっている。われわれは先行する研究でマウス心筋でのHeat shock protein (Hsp)70 mRNAおよびそのタンパク質の発現が、METH投与で顕著に促進されるが、水浸拘束ストレス負荷時でのMETH投与では影響が認められなかったことを観察した。すなわち、METHによる心筋でのHsp70の促進がストレス下では抑制され、障害が強まるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋、下垂体および骨に対するMETHの中毒作用について、ストレスの影響を解明することである。心筋については、単回処理でストレス蛋白の関与が示唆されており、また胃粘膜での障害ではグルココルチコイドレセプター(GR)の関与を報告している。ストレス蛋白がGRの高次構造や機能に重要な役割をもち、その発現が個体での毒性発現程度に関与することを考えると、GR遺伝子での多型とストレス下におけるMETHの心筋毒性の関連を検討することも重要である。さらにストレス応答としての視床下部-下垂体-副腎系(HPA axis)を考慮すると、下垂体にとどまらずさらに脳での反応が必要であるかもしれない。

以上から、本研究では(1)ストレス蛋白の発現を中心に、心筋および下垂体へのMETH中毒作用に及ぼすストレスの影響(2)心筋障害および尿中8-OHdGとGR多型の関連(3)1ヶ月処置でのストレスとMETHの相互作用、さらにMETHの影響として未だまったく未知である(4)METHの大腿骨への作用について検討することを目的とした。また

METH自体もストレスであると考えられ、体温が上昇することはよく知られている。中枢性の体温調節機構は一般に脳皮質や辺縁系に連絡する視床下部やその周辺が関係する。そこで、追加実験として、METHによる体温上昇時でのc-fosタンパク質活性(Fos-IR)の脳局在について基礎的検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 心筋および下垂体に対するMETHとストレスの関連:マウスはC57BL/6Jを用いた。水浸拘束ストレス(WRS)下、METH(30mg/kg)を腹腔内投与して検討した。マウスを正常群(C群)、METH投与群(M群)、WRS群(S群)、METH+WRS群(MS群)に分け組織変化(心筋・下垂体)、心筋組織中のRNA、タンパク質のレベル、血中漏出タンパク(Troponin I, H-FABP)を定量した。METH濃度は誘導体化後GC/MSで分析した。下垂体については、グルタルアルデヒド固定し透過型電顕での観察を加えた。

(2) GR多型の関与:マウス(ICR系)を既報のごとく、GR⁸/GR⁸、GR⁸/GR¹⁶、GR¹⁶/GR¹⁶のグループに分けた。(Tomita et al., *Int. J. Mol. Med.*, 25(3), 415-20, 2010)その後、それぞれグループでC群、M群、S群、MS群とし比較検討した。METHは30mg/kgを腹腔内投与し、(1)と同様、心筋漏出タンパク質、RNA発現、尿中8-OHdGなどを調べた。

(3) 1ヶ月処置での影響:マウスはC57BL/6Jを用いた。(1)と同様、C群、M群、S群、MS群で検討した。ストレスは慣れを防ぐため、月曜から金曜まで毎日以下の方法で1ヶ月間処置した。月曜;温度変化/6h(4°Cまたは室温、各1h)、火曜;電気ショック+温度変化/4h、水曜;拘束+温度変化/6h、木曜;温度変化/6h、金曜;水浸拘束/3hとした。METHは3回/週10mg/kgを腹腔内投与した。血液と心筋を採取し、H.E.染色で心筋の組織観察、RT-PCRで遺伝子発現変化を調べた。血中ホルモンはELISAで定量した。

(4) 大腿骨への影響:マウスはC57BL/6Jを用い、2ヶ月間処置した。C群とMETH 5、10mg/kg投与群に分け、隔日に腹腔内投与し、屠殺5日前にテトラサイクリンを、2日前にカルセインを皮下投与した。8週後に麻酔下で採血・失血死させ、両側大腿骨を摘出した。左大腿骨では遠位部の非脱灰 Villanueva Bone stain 標本を作製し、海綿骨形態計測およびtype別骨芽細胞数の計測を行い、右大腿骨は遠位部の骨密度をX線CT装置で測定した。また血中および尿中の骨パラメータの測定を加えた。

(追加)脳細胞の c-fos 活性 : METH (20mg/kg) をマウス腹腔内に投与し、自由運動下及び拘束状態下において経時的に直腸温を測定した。METH 投与 1 時間後に麻酔下で還流固定を行い、16 脳部位での c-fos 陽性細胞を比較検討した。一方、METH 投与後経時的に採血し、血中コルチコステロン、ACTH、CRF 濃度を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 心筋/下垂体に対する METH とストレスの関連 : WRS (+) または (-) の条件下で METH の心筋への影響を検討した。METH の血中濃度は、投与後 3, 6 h で WRS (-) < WRS (+) となり WRS による代謝・排泄への影響が観察された。血中 Troponin I および H-FABP を測定した結果、H-FABP 濃度が MS 群において投与 6 h で有意に高値となるが、M 群、S 群では、その上昇は認められなかった。つぎに、METH 投与 3 h での心筋の Hsp 遺伝子発現を検討した。その結果、M 群では Hsp70, 90, 32 の発現レベルが高値を示すが、S, MS 群での変化は観察されなかつ

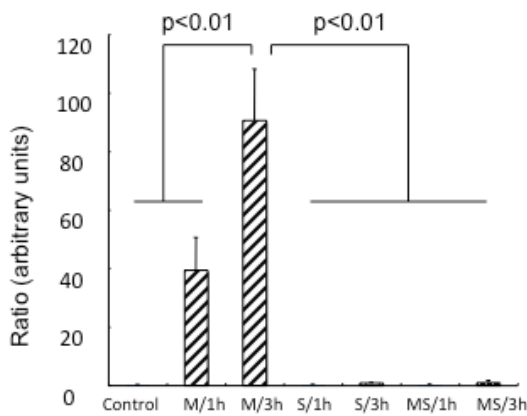


Fig. 1 Hsp70 遺伝子発現

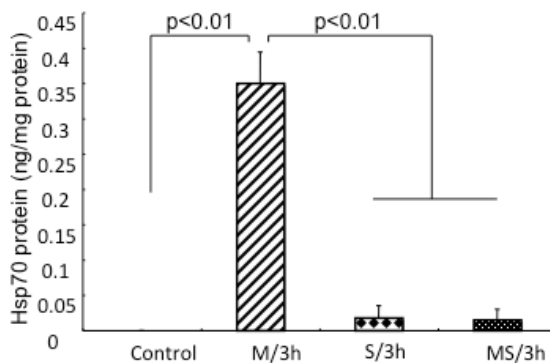


Fig. 2 Hsp70 タンパク質発現

た (Fig. 1)。さらに心筋での Hsp70 タンパク量も M 群において高い値が得られた (Fig. 2)。以上、METH の心筋に対する作用は WRS によって大きな影響を受けることが示唆された。すなわち、M 群の心筋では、防御機構としての Hsps の発現が促進されるが、MS

群では、その発現が低く、障害がより強く惹起される可能性があった。

下垂体細胞の HE 染色においては、下垂体前葉細胞の核濃縮様変化が M 群、S 群で有意に多く観察されたが、MS 群と C 群では差

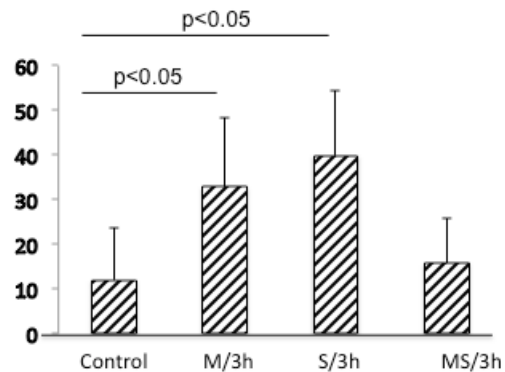


Fig. 3 核濃縮%

は認められなかった (Fig. 3)。これは、強いストレス下では METH による細胞変性がストレスのない場合に比べて少なく、MS 下での METH の取り込みに下垂体細胞の抵抗が小さいことを示唆していると思われる。一方、電顕での観察では、ミトコンドリアの膨潤変性、膜系 (ER, Golgi) の膨潤変性がみられた。

(2) GR 多型の関与 : 心筋障害の指標である血中 H-FABP レベルを GR⁸/GR⁸, GR⁸/GR¹⁶, GR¹⁶/GR¹⁶ で検討した。その結果、いずれのグループも MS/3h で有意に高値を示し、ストレス下で METH による心筋障害が強まることを示した。

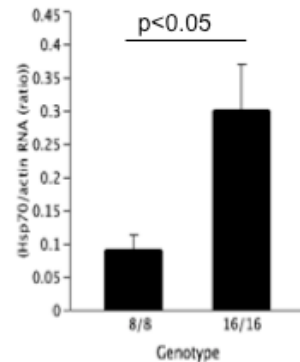


Fig. 4 Hsp70 RNA expression at MS/3h

つぎに各 Genotype で比較すると、正常値、S/6h ではいずれの Genotype もほぼ同じ H-FABP のレベルであったが、GR¹⁶/GR¹⁶ においては M/3h、MS/3h で高値を示した。ホモ型での Hsp70 の遺伝子発現は、GR⁸/GR⁸, GR¹⁶/GR¹⁶ とともに M/3h で高値を示し、さらに M, S, MS 群で GR¹⁶/GR¹⁶ > GR⁸/GR⁸ であり、MS/3h では有意差が認められた (Fig. 4)。また心筋 Hsp70 タンパクレベルは処置群で正常群より増加し、GR⁸/GR⁸ では S/6h で、GR¹⁶/GR¹⁶ では M/3h および S/6h で有意な増加を認めた。一般にタンパクレベルは GR¹⁶/GR¹⁶ > GR⁸/GR⁸ の傾向が得られ、M/3h では GR¹⁶/GR¹⁶

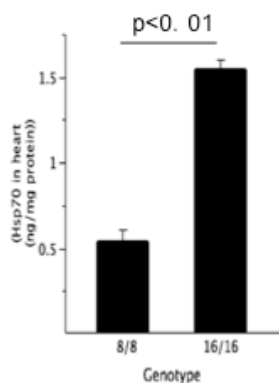


Fig. 5 Hsp70 タンパク質 expression at M/3h

が GR⁸/GR⁸ に対して有意に高い値であった (Fig. 5)。Hsp90 の遺伝子発現についても、M/3h で高い傾向が観察され、特に GR⁸/GR⁸ タイプでは有意にその促進がみ

れたが、多型間に有意差は認められなかった。以上、マウス GR 遺伝子にみられる多型が、ストレス下における METH の心筋毒性に関与することが示唆された。さらに GR⁸/GR⁸、GR⁸/GR¹⁶ は MS/3h で尿中 8-OHdG 量が C 群に比べ高値である傾向がみられたが、GR¹⁶/GR¹⁶ タイプは同じレベルであった。すなわち、ストレス下における覚せい剤投与の生体内酸化に及ぼす影響が GR 遺伝子多型によって異なる可能性が示された。

(3)1ヶ月ストレスと METH の相互作用：血中コルチコステロン値は、S 群で有意に促進したが、MS 群ではその促進が抑えられた。組織では MS 群の心筋では過収縮像と強い凝固壊死像の部位が多数観察され、炎症性

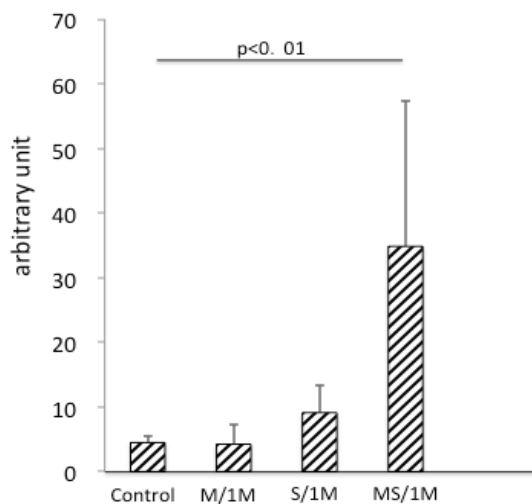


Fig. 6 IL-6 expression in cardiac muscle

サイトカインである IL-6 の血中濃度および心筋での RNA 発現は MS 群で有意に高値を示した (Fig. 6)。遺伝子発現変化を real-time PCR で検討した結果、Hsp70 が単回処理と同様に M 群でのみ有意に上昇した。一方、抗酸化タンパク metallothionein 1 (MT1)、MT2 はストレス負荷で促進がみられ、MS 群で有意に高値を示した。NOS2 は M 群で変化はなく、ストレス負荷群 (S、MS 群)

で有意に低下し、アンジオテンシン変換酵素は MS 群で有意に上昇した。また脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は M 群で有意に促進が見られた。以上、ストレスと METH の1ヶ月における心筋への影響は、遺伝子発現からは障害とその防御に関して観察されたが、組織像ではストレス下での METH 使用により、障害の強まることが明らかにされた。

(4) METH の大腿骨への影響：対照群である C 群と METH 5mg 群の骨形態計測を比較検討した結果、1) 骨形成関連パラメータ、2) 石灰化関連パラメータでの石灰化速度と骨形成速度、3) 骨芽細胞 (type III) 数において、METH による骨形成の有意な亢進が認められた。他方、骨量の増加はみられず、骨密度にも違いは観察できなかった。骨形成が亢進するとカップリング効果により骨吸収も亢進すると言われているが、C 群と METH 5mg 群では吸収関連パラメータに有意な差は認められず、また骨吸収マーカーである尿中 β -C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) 濃度にも影響は認められなかった。METH は中枢神経興奮により行動を亢進するが、過動は骨形成を抑制する。したがって、METH 5mg 群での骨形成の亢進は、薬物による一次的な作用であると思われる。他方、METH 10mg 群では対照群に比べ顕著な骨形成は観察されなかった。これは異常行動による極端な運動量低下など METH の二次的作用であると考えられる。現段階で WRS などのストレスは、作用が非常に強く METH の影響がマスクされてしまい満足な結果が得られていない。さらにストレスの方法を模索し、ストレス下での影響について検討を続けている。

(追加項目) 脳での Fos-IR：MA 投与後 60 分での脳 16 部位での c-Fos 陽性細胞について検討した結果、線条体、視床室傍核、視索前野、外側前視床下部核、背側野、外側野などで対照群に比べ有意に高い陽性細胞数が得られた。一方、血中コルチコステロン濃度は MA 投与後 60 分で有意に高値を示し、120 分で対照群レベルに戻ったが、血中 ACTH は 10 分で高値の傾向を示し、その後低下した。また血中 CRF 濃度には変化が見られなかった。以上、覚醒剤による体温上昇とストレスホルモン、脳特異的領域での神経細胞の活性化に強い関連のあることが分かった。現在、拘束ストレスを中心にストレス条件下での検討を行っている。

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. M. Tomita, T. Okuyama, H. Katsuyama, Y. Watanabe, K. Shinone, M. Nata, T. Ishikawa: Cardiotoxicity of methamphetamine under stress conditions: Comparison of single dose and long-term use. *Mol. Med. Rep.* (査読有) 7: 1786-1790, 2013. doi:10.3892/mmr.2013.1408.
2. M. Tomita, H. Katsuyama, Y. Watanabe, K. Hidaka, K. Yoshitome, S. Miyaishi, T. Ishikawa, K. Shinone, M. Nata: Water-restraint stress enhances methamphetamine-induced cardiotoxicity. *Chemico-Biol. Interactions.* (査読有)190(1): 54-61, 2011. doi: 10.1016/j.cbi.2011.01.025.
3. 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 渡辺洋子ら (8名, 1番目) 拘束ストレス下における覚せい剤の心筋への影響 -マウスのグルココルチコイドレセプター(GR)多型の関与-. *DNA 多型* (査読有) 19: 281-283, 2011.
4. 渡辺洋子, 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 伏見滋子ら (8名, 3番目) マウス尿中 8-OHdG に及ぼす拘束ストレス下における覚せい剤の影響とグルココルチコイドレセプター(GR)多型の関与. *DNA 多型* (査読有) 19: 284- 286, 2011.
5. 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 渡辺洋子, 伏見滋子ら (9名, 1番目) マウスでのストレス感受性とグルココルチコイドレセプター多型の関連 *DNA 多型*(査読有) 18: 42-45, 2010.
6. 渡辺洋子, 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 日高和夫: ELISA 法による尿中 8-OHdG測定 -Ureaseおよびethanol 沈殿処理の検討-. *川崎医学会誌* 36:73-78, 2010.

[学会発表] (計 15 件)

1. 富田正文: 覚せい剤による高体温時での神経細胞 c-Fos 陽性反応. 日本法医学会総会 2013/06/27 札幌
2. 富田正文, 勝山博信, 渡辺洋子, 奥山敏子, 伏見滋子, 伊藤明美: メタンフェタミンの骨代謝への影響. 日本毒性学会 2013/06/18 千葉
3. 富田正文: 覚せい剤によるストレス中枢神経細胞の興奮. 日本法医学会 (地方会) 2012/10/20 高知
4. 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 伏見滋子, 渡辺洋子, 芝池由規, 善成晴彦, 宮本修: 覚せい剤は体温中枢に直接関与するのか? 日本毒性学会 2012/07/19 仙台
5. 富田正文, 石川隆紀, 篠根光太郎, 那谷雅之: 覚せい剤の大腿骨骨密度への影響について. 日本法医学会総会 2012/06/09 浜松

6. 伏見滋子, 富田正文, 奥山敏子, 渡辺洋子, 勝山博信ら: マウス骨密度に及ぼす水浸拘束ストレスの影響. 日本衛生学会 2012/03/25 京都
7. 勝山博信, 石川隆紀, 富田正文: ストレスと覚せい剤 -大腿骨への影響 - 日本法医学会 (地方会) 2011/10/15 倉敷
8. 富田正文, 勝山博信, 渡辺洋子, 奥山敏子, 伏見滋子, 石川隆紀: ストレス下における覚せい剤の生体への影響- 処置 1 ヶ月での検討 - 日本毒性学会 2011/07/12 横浜
9. 富田正文, 那谷雅之, 石津日出雄: ストレスと覚せい剤の長期相互作用 - とくに心筋への影響 - 日本法医学会 2011/06/17 福島
10. 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 伏見滋子, 日高和夫, 渡辺洋子ら: 拘束ストレス下における覚せい剤の心筋への影響 - マウスのグルココルチコイドレセプター (GR) 多型の関与 - 日本 DNA 多型学会 2010/11/18 三島
11. 渡辺洋子, 日高和夫, 富田正文, 奥山敏子, 勝山博信, 伏見滋子ら: マウス尿中 8-OHdG に及ぼす拘束ストレス下における覚せい剤の影響とグルココルチコイドレセプター (GR) 多型の関与. 日本 DNA 多型学会 2010/11/18 三島
12. 富田正文, 石川隆紀, 石津日出雄: 拘束ストレスと覚せい剤の相互作用 - とくに下垂体への影響 - 日本法医学会 (地方会) 2010/10/16 徳島
13. 富田正文: 実験動物を使った基礎的研究から何がみえてくるのか 日本中毒学会 2010/07/24 倉敷
14. 富田正文, 吉留敬, 宮石智, 篠根光太郎, 那谷雅之, 守屋文夫, 石津日出雄: ストレス環境下で覚せい剤の心筋に及ぼす影響 -Heat shock protein の関与- 日本法医学会 2010/06/24 東京
15. 富田正文, 奥山敏子, 渡辺洋子, 日高和夫, 伏見滋子, 勝山博信: 覚せい剤の心筋への作用にストレスは影響するのか? 日本毒性学会 2010/06/18 沖縄

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

勝山 博信 (KATSUYAMA HIRONOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00289175

渡辺 洋子 (WATANABE YOKO)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70135945

(3) 連携研究者

()

研究者番号：