

様式 C-19

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 24 日現在

機関番号：37111
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22659138
研究課題名（和文）覚醒剤投与マウス心臓における蛋白質発現の探索：覚醒剤乱用者の突然死診断への挑戦
研究課題名（英文）Search for protein expression in amphetamines treated mouse heart: Challenge to the diagnosis for the sudden death of amphetamines abusers
研究代表者
久保 真一（KUBO SHIN-ICHI）
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：10205122

研究成果の概要（和文）：覚醒剤（以下 MA）乱用者の突然死の病態解明を目的として、MA 長期投与による心筋組織における特異的な蛋白質発現と遺伝子発現を、動物モデルを用いて解析・同定し、法医実務応用への可能性を検討した。MA 継続投与によって、プログラム細胞死（PCD）を生じうる mTOR 経路が活性化していることが明らかとなった。また、心肥大関連遺伝子が増加していた。カリウムチャンネル関連遺伝子は、発現が減少していた。MA の長期投与はマウス心筋細胞の肥大、活動電位に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： In this study, the pathological changes of cardiac region, especially impulse conducting system in amphetamines (MA)-abusers was investigated. In long term MA-treated mouse-model, cardiac tissue was examined by 2-dementional electrophoresis to observe the changes of protein expressions. After long-term MA treatment, mTOR passway, related to program cell death (PCD) was activated. Gene expressions of potassium-channel associated genes were down regulated in MA-treated mouse. MA might change the action potential of cardiac cells to induce the cardiac sudden death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

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：法医学、覚醒剤、心臓突然死、心肥大、致死性不整脈

1. 研究開始当初の背景

法医剖検例では、年単位の長期間にわたって MA 乱用者の急死例がしばしば経験される。このような症例の中で、血液中の MA、つま

り、Methamphetamine (MA) 濃度が致死量よりもはるかに低濃度で、かつ、剖検所見上、諸臓器に死因となるような形態学的変化を見出せず、死因を急性心不全（急性心機能不全）と診断せざるを得ない事例は決して少な

くない。長期 MA 乱用は、QT 延長症候群等の不整脈や心臓突然死が報告されている。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有意な肉眼的・組織学的所見からの形態学的変化はほとんど観察されない。従って、MA 摂取時の不整脈発症の有無を明らかにする新たな法医病理学的診断法・検査法の開発は必須である。近年、Molecular Forensic Pathology という新たな学問分野が注目され、我々も皮膚における損傷受傷時期の推定 (Kagawa et al. Legal Med. 2008)、窒息時の脳 (Ikematsu et al. Forensic Sci Int. 2007) や頸部皮膚 (Ikematsu et al. Legal Med. 2006) で特異的な遺伝子・蛋白質の発現が存在し、法医病理学的に応用可能であることを報告しており、今後の法医実務には遺伝子・蛋白質発現という見地からの診断法が新たに活用されることが考えられる。

そこで、本研究では心臓刺激伝導系組織・心筋細胞の両者に着目し、多数の蛋白質を同時かつ詳細に分離同定できる 2 次元電気泳動法を活用することによって、MA 長期投与による刺激伝導系組織および心筋細胞組織における特異的な蛋白質発現を動物モデルにて捉え、その結果を法医実務に応用することを着想した。

2. 研究の目的

MA 乱用者の突然死例において、法医剖検にも有意な所見が得られることが少ないために死因診断に苦慮することが多い。本研究では、刺激伝導系組織および心筋組織の両者に着目し、MA 長期投与による刺激伝導系組織と心筋組織における特異的な蛋白質発現、心臓細胞の肥大、活動電位に関連する遺伝子発現を動物モデル用いて解析・同定し、法医実務応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) MA 投与マウスモデル

MA 投与マウスモデル (投与期間は Single、1

～6 Week ; 低濃度、高濃度投与) より心臓を摘出する。刺激伝導系組織の採取は極めて困難であるが、Laser Micro Dissection (LMD) を用いて採取する。また、心筋組織は左心室を採取する。

(2) 2 次元電気泳動・変動スポット (蛋白質) 検索

各組織より蛋白質を細胞質、膜、核内、細胞骨格の 4 分画より抽出し、それぞれの分画について酸性領域 (pH4-7)、アルカリ性領域 (pH7-10) について 2 次元電気泳動・変

動スポット (蛋白質) 検索を行う。

MALDI-TOF-MS を用いてスポット蛋白質 (標的蛋白質) を同定する。

併せて、モデル動物の各組織より 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) 心肥大関連遺伝子の変動

Pik3r1 と *Cntfr*、*Tsc2* 遺伝子発現を観察した。

(4) 不整脈関連遺伝子の変動

Kcnj15 と *Kcnj4*、*Slc24a2*、*Kcna6* を観察した。

4. 研究成果

(1) 2 次元電気泳動・変動スポット (蛋白質) の検索

マウスに 10 mg/kg の MA を 4 週間連日投与し、最終投与 30 分後に心臓を採取した。心筋より蛋白質を抽出し、2 次元電気泳動 (pH 4-7、12%PAGE) を行った。生理食塩水投与群を対照とし、両者の泳動像比較にて MA 群のみに認められるスポットを採取し、MALDI-TOF-MS にてスポット蛋白質の同定を行った (図 1)。

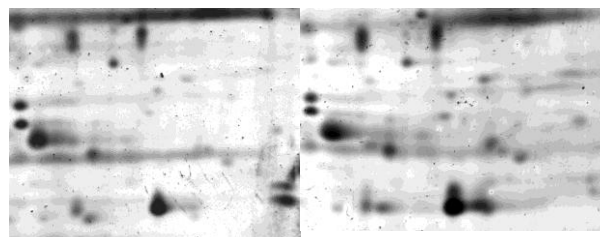


図 1 : 2 次元電気泳動・変動スポット (可溶性分画、左 : コントロール 右 : MA4 週間投与。pH レンジ、分子量ともに同様の部位を供覧している。両者のスポットの出現パターンには、著しい差異が認められる。)

同定した蛋白質について、mRNA 発現量は q-PCR 法にて検討し、また、蛋白質量はウェスタンブロット法を用いて定量した。MA 群に特異的に発現する蛋白質として、Interferon Regulatory Factor 4、Programmed Cell Death Protein 4、Cyclin A2、Death Associated Protein Kinase 2 を同定した。これらの mRNA 量を検討したところ、両群に差は認められなかったが、蛋白質量では MA 群にいずれも有意な増加が認められた。このように遺伝子発現量と蛋白質量に乖離が認められたが、その意義については明らかにできなかった。

これら 4 種類の蛋白質の増加は直接的もし

くは間接的にプログラム細胞死(PCD)を誘導することが知られている。また、MA 継続投与によって PCD を生じうる mTOR 経路が活性化することを明らかにした。本結果より、MA 継続投与がマウス心筋では mTOR 経路だけでなく、多種多様なカスケードを活性化し、PCD が誘導されることが推定された。

(2) 心肥大関連遺伝子の検索

MA 継続投与によりマウス心筋で発現が変化する遺伝子について網羅的に見るため、セミアレイ法で検討した。その結果、*Pik3r1* (図 2) と *Cntfr* (図 3) の遺伝子発現がコントロール群に比べ MA 投与群で増加していた。

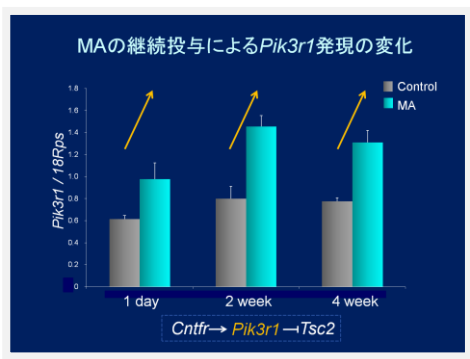


図 2 : MA の継続投与による *Pik3r1* 発現の変化

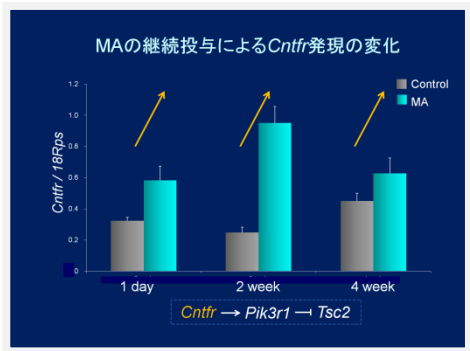


図 3 : MA の継続投与による *Cntfr* 発現の変化

一方、PI3K 経路の活性化によってその活性が阻害される *Tsc2* の発現について検討した結果、1 日、2 週間の MA 継続投与においては *Tsc2* 発現の阻害効果は認められなかったが、4 週間の継続投与においてコントロール群に比べ、有意に発現が減少していた (図 4)。MA 継続投与によって、PI3K 経路が活性化されていることが示唆された。

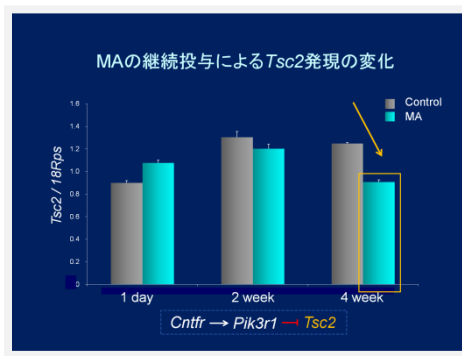


図 4 : MA の継続投与による *Tsc2* 発現の変化

このように MA を継続投与したマウスの心臓において、*Cntfr* 及び *Pik3r1* 発現の増加、また *Tsc2* 発現の減少が認められ、MA の継続投与により心臓において PI3K 経路が活性化されていることが示唆された。

PI3K 経路は心肥大の発症に関与しているとの報告もあることから、MA の連用による心肥大の発症には PI3K 経路が関与していることが示唆された。

今後は、組織形態として、心臓の肥大化を検討する他、実際の MA 中毒死症例においても心臓の遺伝子発現について検討を行い、MA 乱用者の心筋病変の検索につなげていけるものと考えます。

(3) 不整脈関連遺伝子の検索

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投与により発現の変化が認められているカリウムチャンネルの遺伝子について検討した。

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* と *Kcnj4*、Na/K/Ca 交換体である *Slc24a2* および遅延整流 K チャンネルである *Kcna6* の 4 遺伝子を検討した。内向き整流 K チャンネルに属する *Kcnj15* の発現は減少していた (図 5)。

Kcnj4 は 4 週間の MA 投与においてのみ有意にその発現は減少していた (図 6)。

Na/K/Ca 交換体である *Slc24a2* は、4 週間の MA 投与において、有意に発現が減少していた (図 7)。

Kcna6 は 4 週間の高用量 MA の投与において有意に発現が減少していた (図 8)。

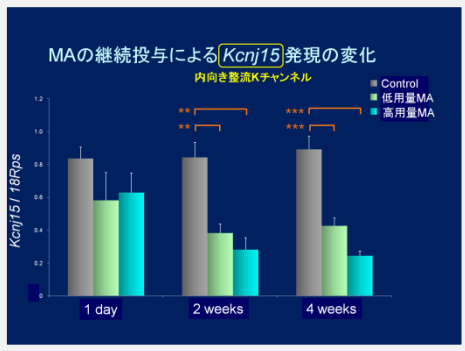


図 5: MA の継続投与による *Kcnj15* 発現の変化

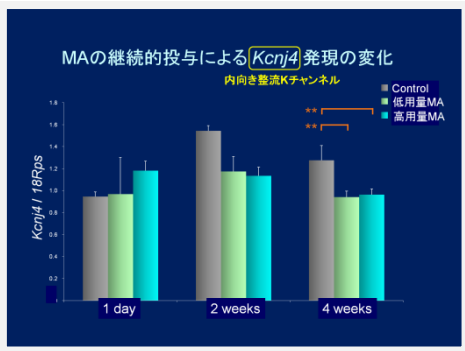


図 6: MA の継続投与による *Kcnj4* 発現の変化

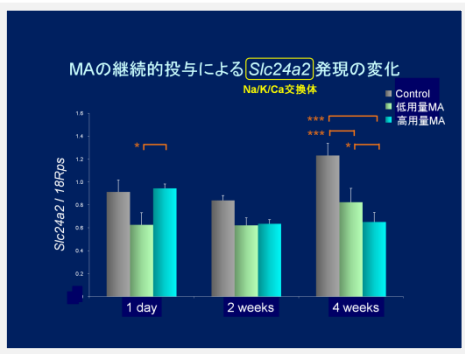


図 7: MA の継続投与による *Slc24a2* 発現の変化

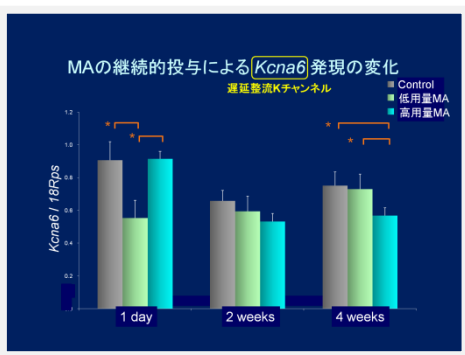


図 8: MA の継続投与による *Kcna6* 発現の変化

MA を投与したマウス心臓において、K チャンネルに関連する 4 遺伝子の発現は、いずれも長期投与において発現が有意に減少していることが明らかとなった。このことから、MA の長期投与は QT 延長を引き起こしているのではないかと推測された。QT 延長は致死性の不整脈を惹起し得ることから、MA の連用によって突然死を引き起こす一因ともなり得ることが示唆された。

本研究の結果より、MA は、心肥大や致死性不整脈の発生に繋がる可能性が示唆された。今回明らかとなった心肥大関連遺伝子、カリウムチャンネル関連遺伝子とそのタンパク質を検索することで、MA 乱用者の突然死の診断の一助となるかもしれない。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 松尾 綾、池松 和哉、中園 一郎. メタンフェタミン投与マウスの心臓におけるカリウムチャンネル関連遺伝子の発現. 日本法中毒学会第 30 年会, 2011 年 6 月 10 日, 長崎市
- ② 松尾 綾、池松 和哉、久保 真一、中園 一郎. メタンフェタミン投与マウスの心臓における Phosphoinositide 3-kinase 経路関連遺伝子の発現動態. 第 94 次日本法医学会学術全国集会, 2010 年 6 月 25 日, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 真一 (KUBO SHIN-ICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 10205122

(2)研究分担者

池松 和哉 (IKEMATSU KAZUYA)
長崎大学・歯歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 80332857

阿部 俊太郎 (ABE SYUNTAROU)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80335116

(3)連携研究者: なし