

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790731

研究課題名(和文)覚醒剤少量反復投与ラットの神経細胞障害の解析～小胞体ストレスからのアプローチ～

研究課題名(英文) Analysis of the low-dose methamphetamine pre-treatment in the rat midbrain. ; An approach from endoplasmic reticulum stress.

研究代表者

武市 敏明 (TAKEICHI, Toshiaki)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90460360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：少量のMethamphetamine(METH)を反復投与し、中脳に小胞体ストレス蛋白の増加を認めるモデル動物に対して多量のMETHを投与した。この動物の中脳の解析により、小胞体ストレス蛋白のGrp78および活性化ATF6の有意な増加を認めた。さらに、酸化ストレスのマーカーである4-HNEの増加の抑制や抗酸化ストレス蛋白であるSOD1の早期の増加を認めた。また、アポトーシスの指標が抑制され、少量のMETH反復前投与は、多量のMETH投与における中脳の神経細胞に対する感受性に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that low-dose methamphetamine (METH) pre-treatment increases endoplasmic reticulum stress protein levels in the rat midbrain. In this study, we assessed the effects of high-dose METH on rat midbrain. High-dose METH administration led to a significant increase in expression of the endoplasmic reticulum stress protein Grp78 and activated ATF6. Furthermore, we observed an early increase of the antioxidant stress protein SOD1 and increased inhibition of the oxidative stress marker 4-HNE. High-dose METH inhibited the apoptotic index in midbrain. Collectively, these results suggest that low-dose METH pre-treatment influenced the susceptibility of midbrain neurons to high-dose METH administration.

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：Methamphetamine ER stress Grp78 ATF6 ASK1 Rat

1. 研究開始当初の背景

覚醒剤の濫用は世界的な社会問題であり、さらに近年、日本でも覚醒剤に対する社会的関心は特に高まっている。しかしながら、覚醒剤濫用に対する法医病理学的診断法はいまだ確立されているとはいえない状況である。ヒトでの覚醒剤の使用では、少量の摂取を繰り返すことで依存を強めていき覚醒剤の使用量が漸増する。そして、ついには覚醒剤精神病の発症や死亡となる。覚醒剤の Methamphetamine (METH) による中枢神経障害のメカニズムについては、動物へ METH を多量単回投与したモデルを用いて多くの検討がなされており、主に酸化ストレスによるアポトーシスが、ドーパミン作動性神経に引き起こされることが知られている。しかし、この動物モデルは、ヒトにおける覚醒剤濫用とは異なった条件といえる。そこで、METH を少量反復投与することにより、中脳の黒質において、酸化ストレスの指標の上昇を認めないにもかかわらず、小胞体ストレス蛋白が増加しているドーパミン作動性神経の神経障害の前段階、すなわちヒトの覚醒剤濫用の初期像と考えられるモデル動物を作成した。

2. 研究の目的

少量の METH 反復投与モデル動物における脳神経の解析を行うことにより、ヒトの覚醒剤濫用における初回使用、濫用、依存、覚醒剤精神病という状態に移行する過程における神経障害のメカニズムの解明につながる法医病理学的診断のための基本的情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料作成

実験動物への薬物投与

実験動物は、9週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、環境に十分に慣らした後より実験に供した。METH の少量反復投与 (METH 群) は、1.0 mg/kg/day を5日間の反復投与を行い、6日目に多量の METH (40 mg/kg/day) を投与した。対照として、薬剤を溶解した溶媒のみを反復投与 (対照群) した後に、多量の METH を投与した動物を作成した。試料採取は、炭酸ガス吸入による安楽の死直後に行った。

タンパク質解析用試料作成

最終投与の8時間、1日、3日目に脳を取り出し、中脳の黒質を含む領域を分画分取した後に液体窒素にて凍結した。試料は -80 °C にて保存した。

分取した脳は、凍結粉碎を行い RIPA Buffer を用いて抽出した。

遺伝子発現解析用試料作成

上記と同様に分取した脳を凍結粉碎し、RNAzol RT を用いて Total RNA の抽出を行った。

免疫組織化学的染色用試料作成

最終投与8時間後に、4% Paraformaldehyde による還流固定を行い脳を取り出し、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作成した。

(2) 解析

Western blotting によるタンパク質の定量的解析

タンパク質を抽出した試料は、アクリルアミド電気泳動により分子量で分離し、PVDF メンブレンに転写した。その後、抗体を反応させ、化学発光により検出する Western blotting を行った。

1次抗体には、小胞体ストレスに関連する指標として、Glucose-regulated proteins 78 (Grp78) を認識する抗 KDEL 抗体、抗 Activating transcription factor 6 (ATF6) 抗体を用いた。細胞死関連マーカーとして、ドーパミン神経のマーカーである抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体、アストロサイトのマーカーである抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体をもちいた。アポトーシスに関連する指標として、小胞体ストレスからのアポトーシスに関与する抗 C/EBP homology protein (CHOP) 抗体、抗アポトーシス因子である抗 B-cell lymphoma protein-2 (Bcl-2) 抗体、アポトーシスの促進因子である抗 Bcl-2 associated X protein (Bax) 抗体、抗リン酸化 Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) 抗体を用いた。さらに、アポトーシスの制御関連因子として、抗リン酸化 Mammalian target of rapamycin (Ser2481) (mTOR C2) 抗体、抗リン酸化 Serine-threonine kinase Akt (AKT) 抗体を用いた。

遺伝子発現解析

試料より抽出した mRNA より High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて cDNA の合成を行い、ドーパミン D2 レセプターおよび、小胞体ストレス時にスプライシングされることにより活性化する X-box binding protein 1 (XBP1) を活性化型の XBP1 のみを認識するプライマーを用いて、Real Time PCR 法による定量的発現解析を行った。

免疫組織化学的染色

作成したパラフィンブロックは、厚 5 μm にて薄切し、パラフィン薄切切片を作成した。切片は、親水処理後1次抗体として抗 KDEL 抗体、抗 ATF6 抗体、抗リン酸化 ASK1 抗体、抗 mTOR C2 抗体、抗リン酸化 AKT 抗体および抗 TH 抗体、を用い、蛍光色素を結合させた2次抗体を用いて染色した。その後、DAPI による核染色を行い、水溶性封入剤にて封入し蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) Western blotting の結果

細胞死関連マーカー

3日において、対照群では、THの有意な低下、CHOP、GFAPの有意な増加、Bcl2/Bax比の有意な低下を認めた。一方、METH群は、これら細胞障害の指標のTH、CHOP、GFAP、Bcl2/Bax比において、有意な変化を認めなかった。

小胞体ストレス関連因子

MEHT群において前投与後に増加していたGrp78は、多量のMETH投与後にさらに有意な増加を示した。8時間においては、ATF6の活性化体の有意な増加を示した。

対照群においては、Grp78の有意な変化を認めず、8時間におけるATF6の活性化体の有意な変化を認めなかった。

一方、リン酸化ASK1は、対照群において8時間で有意に増加を示し、METH群では有意な変化を認めなかった。

アポトーシス制御関連因子

mTOR C2は8時間において、METH群では有意に増加を示すが、対照群においては有意な変化を認めなかった。

8時間におけるAKT1のリン酸化は、METH群において有意に増加を認めた。対照群では有意な変化を認めなかった。

(2) 遺伝子発現解析

スプライシングされた活性化型のXBP1の発現は、METH群、対照群に有意な変化を認めなかった。

ドーパミンD2レセプターの発現についてもMETH群、対照群において、有意な変化を認めなかった。

(3) 免疫組織化学的染色

Grp78は、TH陽性細胞と良く一致していた。しかしながら、GFAPと一致した陽性像をほとんど認めなかった。

ATF6は、TH陽性細胞と一致した染色像を認めた。

リン酸化ASK1は、METH群のTH陽性細胞と一致する染色像をほとんど認めなかった、しかしながら、対象群のTH陽性細胞とは一致した染色像を認めた。

一方、リン酸化AKTは、METH群のTH陽性細胞に認めた。しかしながら、対照群のTH陽性細胞にはほとんど認めなかった。

mTOR C2は、METH群のTH陽性細胞に一致した染色像を認めた。対象群のTH陽性細胞と一致した染色像は、ほとんど認めなかった。

(4) まとめ

中脳より抽出したタンパク質のWestern blottingによる解析では、METH群において、小胞体ストレス状態を示唆するGrp78の増加

を認めた。このとき、ATF6の活性化体の増加はMETH群のみに認めた。小胞体ストレス時に活性化される主なカスケードの1つであるATF6経路の活性化が、本研究において行った薬物投与方法の特徴であると考えられる。

さらに、METH群におけるTHの低下やGFAPの増加といった細胞障害の指標の有意な変化を認めず、さらにアポトーシスの指標となるBcl2/Bax比、CHOPの変化も抑制されていた。このことは、METHにより引き起こされることが知られているアポトーシスが、METH群では抑制されているものと考えられる。これは、中脳黒質の神経細胞障害の抑制を示唆している。

アポトーシスカスケードの1つであるASK1-JNK Pathwayの指標となるASK1のリン酸化をWestern blottingにより解析したところ、METH群においてその発現レベルは抑制されていた。さらに、ASK1のリン酸化を抑制するAKTのリン酸化体の有意な増加を認めた。また、AKTのリン酸化に参与するmTOR C2の有意な増加を認めたことから、mTOR C2-AKT-ASKのpathwayの可能性が考えられた。このmTOR C2は、小胞体に局在しているとの報告があり、本研究の結果と合わせて考えると、上記pathwayにATF6が関与している可能性が考えられた。

免疫組織化学的染色による解析では、ASK1、AKT、mTORが中脳黒質のTH陽性細胞に認められ、前期mTOR C2-AKT-ASK pathwayが黒質のドーパミン作動性神経において関与していることが考えられた。

以上のことより、少量のMETHを反復投与することにより引き起こされる中脳の小胞体ストレスの増加は、多量のMETH投与に対する中脳黒質の神経細胞における小胞体ストレス反応やアポトーシス経路に影響することを示唆するものと考えられる。

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1件)

Takeichi T, Wang EL, Kitamura O, The effects of low-dose methamphetamine pretreatment on endoplasmic reticulum stress and methamphetamine neurotoxicity in the rat midbrain, *Legal Medicine*, 査読有, Vol. 14, No.2, 2012, pp. 69-77 <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2011.12.004>

[学会発表](計4件)

武市 敏明, methamphetamine 投与によるラット黒質神経細胞への影響、第35回日本法医学会学術中部地方集会、2013年10月12日、石川(金沢医科大学病院)

武市 敏明、少量のメタンフェタミン前投与によりラット中脳ではATF6を介した小胞体ストレス応答が活性化される、第97次日本法医学会学術全国集会、2013年6月27日、札幌（ロイトン札幌）

Takeichi T、The neuroprotective effect of low-dose methamphetamine pretreatment against high-dose methamphetamine neurotoxicity in the rat midbrain is mediated by an unfolded protein response involving ATF6.、Neuro2013、2013年6月20日、京都（国立京都国際会館）

武市 敏明、少量のメタンフェタミン反復投与による小胞体ストレス蛋白の誘導がメタンフェタミン多量投与における神経細胞障害へ与える影響、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡（マリンメッセ福岡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武市 敏明 (TAKEICHI, Toshiaki)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90460360