

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10123

研究課題名(和文) アルコール性突然死の発症機構の解明～致死性不整脈の法医学的診断法の確立に向けて

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of sudden death in alcohol misuse - the establishment of forensic diagnosis on lethal arrhythmia

研究代表者

小澤 周二 (KOZAWA, Shuji)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20379944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アルコール長期投与マウスモデルを用いて、アルコール性突然死すなわちアルコール誘発性致死性不整脈の発症機構の解明を試みるとともに、その法医学的診断法の確立に取り組んできた。その結果、アルコールの長期投与により、心組織においてMMPとTIMPの不均衡が生じ、ctgfの働きを介して心筋リモデリングが生じ、さらにSERCA2aの低下によって心不全が引き起こされ、アルコール性突然死すなわち致死性不整脈が発症すると考えられた。さらに、これらの心組織の変化をもたらす中心的役割を担っている候補分子を絞り込むことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アルコールの長期投与により心組織において特異的に変動する分子の候補を絞り込むことができています。これらの分子は、アルコール性突然死の発症に大きく寄与している分子と考えられる。この分子がアルコール誘発性致死性不整脈における主たる役割を担っていることを証明することができれば、アルコール性突然死の発症機構の解明ができるのみならず、その予防にも期待でき、さらには、アルコール性突然死、ひいては致死性不整脈の法医診断を可能とする分子となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a long-term alcohol-administered mouse model, we have attempted to elucidate the mechanism of sudden death, or lethal arrhythmia in alcohol misuse, and to establish the method of forensic diagnosis on sudden cardiac death. As a result, long-term administration of alcohol caused an imbalance between MMP and TIMP in the cardiac tissue of the mouse model and the effect of ctgf, resulting in myocardial remodeling, and a decrease in SERCA2a causes heart failure, resulting in sudden death, or lethal arrhythmia. Furthermore, it has been possible to focus on the candidate molecules that play a main role in causing these changes in cardiac tissue.

研究分野：法医病理学

キーワード：アルコール性臓器障害 RT-qPCR ウェスタンブロット 蛍光免疫染色 突然死 致死性不整脈

## 1. 研究開始当初の背景

法医実務においてアルコール多飲者の突然死例にしばしば遭遇するが、形態学的にも病理学的にも変化に乏しいことが多く、慎重な判断と詳細な鑑定が必要となり、法医診断に苦慮することは少なくない。この**アルコール性突然死**には、ケトアシドーシスや低血糖などの代謝異常や膵炎、心筋症等の関与等も考えられているが、これらの病態が否定的な事例が殆どであり、アルコール性突然死は**致死性不整脈**によって生じていることが強く示唆されている。また、アルコール及びその代謝産物は生体に様々な影響をもたらす、特に心機能への影響としては致死性不整脈を惹起することが知られているが、そのメカニズムは十分には明らかになっていない。したがって、アルコールによる致死性不整脈発症の詳細な機構を解明することが、アルコール性突然死の法医診断のためには不可欠であり、アルコール性突然死すなわち**アルコール誘発性致死性不整脈**の法医診断のためには、その発症機構の解明が、困難ではあるが非常に重要で早急に成し遂げなければならない研究課題である。

研究代表者らは、これまでアルコール性突然死の発症機構の解明に取り組み、アルコール長期投与マウスモデルにおいて、血中にアルコールを有する時期(急性期)と血中からアルコールが消失する時期(離脱期)とでは、心臓の遺伝子発現プロフィールに差異が生じていることを明らかにした。また、遺伝子発現の解析により、急性期には JAK/STAT 経路の活性化やサイトカインを介した炎症反応が生じ、離脱期には STAT3 及び STAT6 の活性が持続し、細胞増殖すなわちリモデリングが生じている可能性が示唆された。これらのことから、アルコールの長期投与によりアルコールの影響を繰り返し受けた心筋には、血中のアルコールが消失してアルコールの影響がなくなった時に新たな修復機構が働くようになり、その作用の繰り返しが致死性不整脈を惹起する要因になると考えられた。そこで本研究では、アルコール長期投与時の血中アルコールの有無による変化に注目し、急性期と離脱期を比較検討して、離脱期に認められる変動分子を中心に解析を行い、アルコール性突然死の発症機構の詳細を明らかにする。

## 2. 研究の目的

これまでに得られた知見に、さらなる詳細な分析を加えることにより、キーノードタンパク質(遺伝子発現変化の原因と思われるタンパク質)とそのカスケードを解析し、アルコール性突然死の発症機構について解明を行う。また、そのキーノード分子を同定することで、アルコール性突然死における法医診断法の確立に有効な分子標的を明らかにする。すなわち、アルコール性突然死発症のキーノード分子を同定し、それを標的分子とすることでアルコール性突然死の法医診断を可能とする。

## 3. 研究の方法

7週齢の C57BL/6N マウスを用いて、Lieber らの方法に準じて、アルコール長期投与群には 5% エタノール液体食を、対照群にはコントロール液体食を 6 週間投与し(コントロール群)、アルコール長期投与マウスモデルを作成した。アルコール長期投与群では、アルコール存在下での影響を検討するため、5%アルコール液体食の最終投与の 1 時間後(アルコール長期投与急性期群)あるいは 24 時間後(アルコール長期投与離脱期群)に心臓を摘出した。摘出した心臓は直ちに RNA Later (Ambion) 中、凍結あるいは 4%パラホルムアルデヒド溶液中で保存した。

RNA Later 中で保存した心臓を Micro Smash(TOMY)を用いてホモジナイズした後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて Total RNA を抽出し、抽出した RNA を試料として、RT-qPCR 法あるいはマイクロアレイ法により mRNA 発現動態を測定した。また、凍結保存した心臓を Micro Smash(TOMY)を用いてホモジナイズした後、Western blot 法によりタンパク質発現動態を測定した。さらに、4%パラホルムアルデヒド溶液中で保存した心臓に対し、抗 SERCA2a 抗体を用いて蛍光免疫染色法を行った。

## 4. 研究成果

### (1) アルコールによる心筋リモデリング

一般に、心臓は、圧力や体積負荷などの機械的ストレスに対して、拡張することで適応する。しかしながら、これらのストレスが過剰または長期化して、これらの適応が失敗すると、心筋細胞に傷害が生じて心筋リモデリングが起こり、心肥大や線維化などが生じる。心筋細胞の傷害により生じる心筋リモデリングのメカニズムには、心室の拡張に重要な役割を果たしている細胞

外マトリックス (extracellular matrix; ECM) が大きく関与する。ECM は、ECM を分解する酵素であるマトリックス分解酵素 (matrix metalloprotease; MMP) やそれを阻害する MMP 組織抑制因子 (tissue inhibitor of metalloprotease; TIMP) によって制御されている。これらの MMP や TIMP による ECM の合成と分解の不均衡は、心肥大や線維化の生じる原因の 1 つであり、線維化促進性サイトカインである *ctgf* の働きを介して、心肥大や線維化を生じる。本研究では、アルコール長期投与マウスモデルにおいて、血中にアルコールがある時 (急性期) に心組織の *ctgf* の mRNA の発現量が増加した。また、血中にアルコールがある時 (急性期) には *MMP-3* の mRNA の発現量が増加し、血中からアルコールがなくなる (離脱期) と *MMP-3* の mRNA の発現量が減少した (図 1)。これは、心臓にアルコールが繰り返し曝されることで、血中にアルコールがある時 (急性期) には、*MMP-3* 及び *ctgf* の mRNA の発現量とともに増加して、ECM の分解が亢進するとともに線維化が進み、心筋に急性傷害が生じていることを示している。一方、血中からアルコールがなくなると、*MMP-3* の mRNA 発現量は低下するものの、*ctgf* の mRNA 発現量の増加は持続していることから、心筋の線維化が進行することで心筋リモデリングが生じていることを示している。このように、アルコール多飲者では、アルコール刺激による傷害と修復が繰り返され、心筋リモデリングが進行すると考えられる。

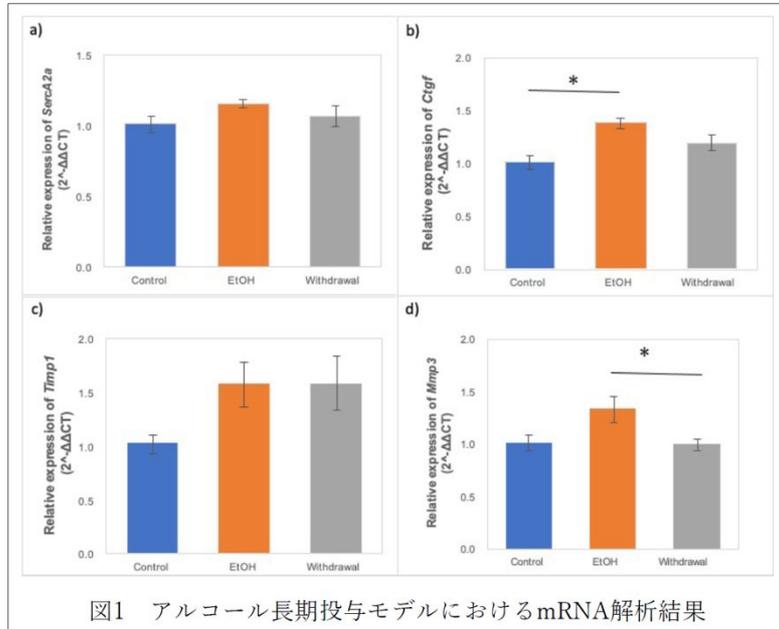


図1 アルコール長期投与モデルにおける mRNA 解析結果

心臓のポンプ作用は、心筋細胞の収縮と弛緩を繰り返すことにより行われ、心筋細胞の収縮や弛緩は、主に細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増減によって制御されている。筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>ポンプ (SERCA) は筋小胞体上に存在し、リアノジン受容体から放出された Ca<sup>2+</sup>を筋小胞体内に能動的に取り込み、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させる。不全心では SERCA の機能が大きく変化するが、例えば、圧負荷により起こる不全心の SERCA2a 発現レベルは低下しており、その他の不全心モデルでも同様に

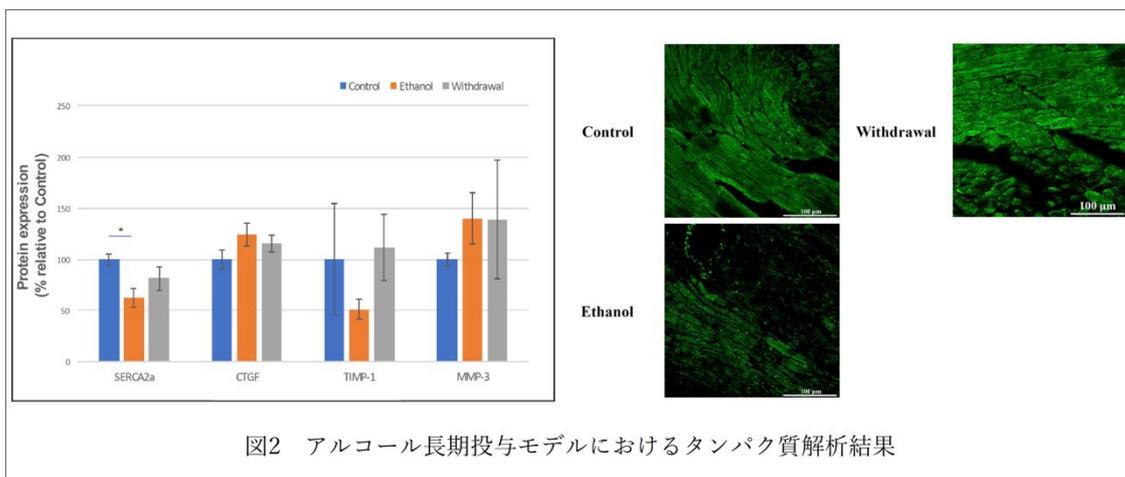


図2 アルコール長期投与モデルにおけるタンパク質解析結果

SERCA2a の発現低下が示されている。本研究では、アルコールの長期投与マウスモデルにおいて、血中にアルコールがある時 (急性期) には SERCA2a のタンパク質の発現量が低下し、血中からアルコールがなくなる (離脱期) と改善した (図 2)。これは、アルコール多飲者では、血中にアルコールがある時 (急性期) に不全心に陥っていることを示している。

以上のことから、アルコール多飲者では、アルコール刺激による傷害と修復が繰り返されて心筋リモデリングが進行することと、アルコールの刺激によりもたらされる不全心とが相まって、アルコール性突然死が引き起こされる主たる原因になっている可能性が示された。

## (2) アルコール性突然死をもたらす主因子の探索

アルコール多飲者において、心筋リモデリングや不全心が生ずるメカニズムを解明するために、これまでに、研究代表者らは、アルコール長期投与マウスモデルを用いて心組織における包括的な遺伝子発現のプロファイルを作成し解析を試みた。その結果、血中にアルコールがある時(急性期)でもない時(離脱期)でも遺伝子発現プロフィールには有意な変化が認められ、アルコール長期投与により心組織において遺伝子発現が変動していることを明らかとした。また、この遺伝子発現の解析の結果、急性期では 142 遺伝子、離脱期では 82 遺伝子で有意に大きな変動が認められ、これらの発現



図3 アルコール長期投与モデルにおけるカスケード解析結果

変動遺伝子群の転写開始点の上流における転写因子結合領域と、発現に変動が認められなかった遺伝子における転写因子結合領域とを比較して、有意に多く存在している転写因子結合領域を探索したところ、急性期で 12 領域、離脱期で 44 領域の転写因子結合領域が有意に多く認められていた。そこで、本研究では、これらの転写因子結合領域に結合する転写因子を同定し、カスケード図の中で高頻度に登場するタンパク質を解析を試みた(カスケード解析)。その結果、急性期で 11 種類、離脱期で 27 種類の分子が同定された(図 3)。これらの分子は、アルコール長期投与による遺伝子発現の変化の原因となる分子と考えられ、アルコール多飲者において、心筋リモデリングや不全心が生じる中心的役割を担っている可能性が示された。

## (3) 結語

アルコール長期投与により、心組織において MMP と TIMP の不均衡が生じ、ctgf の働きを介して心筋リモデリングが生じ、さらに SERCA2a の低下によって心不全が引き起こされ、アルコール性突然死、すなわち致死性不整脈が発症すると考えられた。本研究により同定された分子(図 3)は、これらの心組織の変化をもたらす中心的役割を担っている。すなわち、これらの分子は、アルコール性突然死の発症に大きく寄与している分子と考えられ、アルコールの長期投与により心組織において特異的に変動する分子と考えられる。今後は、この分子がアルコール誘発性致死性不整脈における主たる役割を担っていることを証明することができれば、アルコール性突然死の発症機構の解明ができるのみならず、その予防にも期待でき、さらには、アルコール性突然死、ひいては致死性不整脈の法医診断を可能とする分子となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小澤周二	4. 巻 36(3)
2. 論文標題 アルコール性突然死の発症機構の解明 致死性不整脈の法医学的診断法の確立に向けて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 82-85
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 無
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 小澤周二	4. 巻 35(9)
2. 論文標題 アルコール性突然死の発症機構の解明 致死性不整脈の法医学的診断法の確立に向けて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 66-68
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 無
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 Kozawa S, Bhasima S, Sekijima H, Nata M.	4. 巻 51
2. 論文標題 Changes in myocardial SERCA2a expression in mouse model of chronic alcohol abuse.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Albanian Journal of medical and health science	6. 最初と最後の頁 1-14
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kozawa S, Ikematsu K, Murase T, Nata M.	4. 巻 54(1)
2. 論文標題 Effects of chronic alcohol use on mouse myocardial tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Alcohol Studies and Drug Dependence	6. 最初と最後の頁 25-38
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	池松 和哉  (IKEMATSU Kazuya)  (80332857)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授   (17301)	
研究分担者	関島 秀久  (SEKIJIMA Hidehisa)  (60792447)	三重大学・医学系研究科・助教   (14101)	

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