

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10520

研究課題名（和文）長期的なアルコール摂取により誘発される突然死の法医学的診断法の確立

研究課題名（英文）The Establishment of Forensic Diagnostic Methods for Sudden Death Induced by Long-term Alcohol Consumption

研究代表者

小澤 周二（KOZAWA, Shuji）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：20379944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、長期的なアルコール摂取がマウスの心機能に及ぼす影響を解析した。16週間にわたる20%エタノール水の摂取により、心エコー法を用いた評価でEF、SV、GLSの低下が観察され、LVdDおよびLVEDVの低下も確認された。これにより、アルコールの長期摂取が心臓の収縮能力に悪影響を及ぼし、心機能の低下を引き起こすことが示唆された。また、RNA-seq法により心組織の網羅的な遺伝子発現解析を行い、アルコール摂取による心機能障害に関与する主要分子としてHSP70が同定された。これにより、アルコール性突然死の法医学的診断法の確立に向けた新たな分子標的の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、長期的なアルコール摂取が心機能に与える具体的な影響とそのメカニズムを詳細に解明した点にある。心エコー法による非侵襲的評価とRNA-seq法による遺伝子発現解析を組み合わせることで、アルコールによる心筋障害の具体的な指標と主要分子HSP70を同定したことが重要である。社会的意義としては、アルコール性突然死のリスク評価と予防策の構築に寄与し、アルコール多飲による心機能障害の理解を深め、法医学的診断法の改善や新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of long-term alcohol consumption on cardiac function in mice. Mice were administered 20% ethanol water for 16 weeks, and echocardiographic evaluations revealed decreases in EF, SV, and GLS, along with reductions in LVdD and LVEDV. These findings suggest that prolonged alcohol intake impairs cardiac contractility and leads to decreased heart function. Additionally, comprehensive gene expression analysis of cardiac tissue using RNA-seq identified HSP70 as a key molecule involved in alcohol-induced cardiac dysfunction. This discovery highlights a potential new molecular target for forensic diagnosis of alcohol-related sudden death.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール性突然死 心エコー RNA-seq マウス 致死性不整脈 法医学的診断

### 1. 研究開始当初の背景

アルコール摂取が健康に与える影響は単純ではなく、適度なアルコール摂取 (5~25 g/日) は循環器疾患および死亡率の低下と関連することが知られていた。しかし、最近の研究では、少量のアルコール摂取でさえも死亡率の増加と関連があることが報告されている。法医学の実務では、アルコール多飲者の突然死例がしばしば見受けられる。これらの事例は薬物動態学および形態学的な変化が少ないため、慎重な判断と詳細な鑑定が必要となり、法医学的診断が難しいことが多い。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、肺炎、心筋症が関与すると考えられているが、多くの事例ではこれらの病態が否定されており、アルコール性突然死は致死性不整脈によるものであることが示唆されている。また、月曜日に発生数が多いことや、休日の飲酒後に頻脈性不整脈が発生する「holiday heart」現象からも、アルコール性突然死と致死性不整脈の関連が示唆されている。

生体ではアルコールを摂取すると、主に肝臓でアセトアルデヒドに代謝され、さらに酢酸に変換される。しかし、肝臓での代謝が飽和すると、これらの代謝産物は血中に漏れ出す。血中のアルコールやその代謝産物は生体にさまざまな影響を及ぼし、特に循環器系への影響では致死性不整脈の誘発が考えられるが、そのメカニズムは十分には明らかになっていない。そのため、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学的診断には不可欠である。この課題は非常に重要かつ緊急性の高い研究テーマである。

研究代表者らはこれまでに、アルコール性突然死の発症機構の解明に取り組んできた。アルコール長期投与マウスを用いた研究では、血中にアルコールが存在する時、心筋細胞内  $Ca^{2+}$  の取り扱いに中心的な役割を果たす筋小胞体  $Ca^{2+}$  ポンプである SERCA2a (心筋筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase) のタンパク質発現量が低下し、血中からアルコールが消失すると回復することが示されている。この SERCA2a の減少は、アルコール多飲者の不全心の主な原因である可能性が示唆されている。この不全心という状態は、形態学的な変化は認めない中で、心臓の収縮機能や拡張機能の障害を示唆するものであり、致死的な心室性不整脈発症の要因である可能性が示唆される (図1)。また、血中にアルコールがある場合とない場合のいずれにおいても、心組織のマトリックス分解酵素 (matrix metalloprotease; MMP) を阻害する MMP 組織抑制因子 (tissue inhibitor of metalloprotease; TIMP) の TIMP-1 の mRNA 発現量が増加する一方で、血中にアルコールが存在する時には MMP-3 の mRNA 発現量が増加し、アルコールが消失すると減少することが示されている。この結果は、アルコール多飲者においてアルコール刺激による心筋リモデリングと細胞外マトリックスの合成・分解の不均衡が不全心を引き起こすことを示唆している。

さらに、研究代表者らは、アルコール多飲者における心筋リモデリングや不全心のメカニズムを解明するために、アルコール長期投与マウスを用いた心組織の包括的な遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により作成し、解析を行った。その結果、Gene Ontology (GO) 解析により、血中にアルコールが存在する時にはサイトカインやケモカインを介した炎症反応が生じ、アルコールが消失すると蛋白分解酵素を介した細胞増殖が生じることが明らかになった。そこで本研究では、研究代表者らが作成した独自の長期アルコール負荷による心筋障害モデルを用いて、アルコール性突然死の発症機構の詳細を明らかにすることを目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、以前より当講座で行ってきたアルコール長期投与モデルマウスを用いた研究を基に、アルコール性突然死発症に関わる機構を明らかにし、さらにそのキーノード分子を同定し、アルコール性突然死における法医学的診断法の確立に有効な分子標的を明らかにすることを目的とする。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診断を可能にし、さらにアルコール性突然死および致死性不整脈を引き起こす機構の解明を試みることで、すべての致死性不整脈による突然死の法医学的診断法の確立に応用する。

現在、アルコールの長期摂取が心臓へ及ぼす影響については一定の知見が得られている。そこで、さらに詳細な知見を得るために、これまでに得られた知見にさらなる解析を加えて、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) の候補分子とそのカスケードを

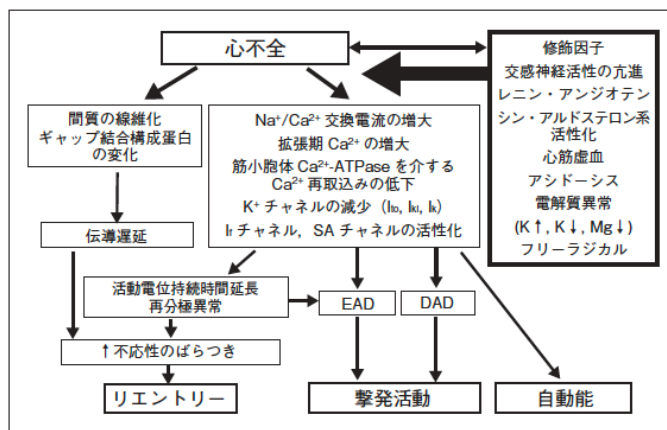


図1 心不全における不整脈発症機序 (志賀剛ら, JPN. J. ELECTROCARDIOLOGY 31(4), 365-375 (2011))

解析し、キーノード分子を同定して法医学的診断に応用することを目指す。

### 3. 研究の方法

6週齢のC57BL/6J系雄マウスに、16週間にわたり20%エタノール水を摂取させ、アルコール長期投与モデルマウスを作成した。

#### (1) 経胸壁4D心エコー法による心機能評価

心エコー検査実施の1時間前に20%エタノール生食水を0.1mL静脈内に投与し、経胸壁心エコー法により心機能評価を行った。経胸壁心エコー検査はVevo®3100イメージングシステム(FUJIFILM VisualSonics)を使用した。心エコー検査では、リアルタイム3D心エコー(4D心エコー)、ドップラー法、Bモード法およびMモード法を用いて、等容性収縮時間(IVCT)、等容性弛緩時間(IVRT)、MV E/A、MV E/E'、Tei index、左室収縮末期容積(LVESV)、左室拡張末期容積(LVEDV)、一回拍出量(SV)、左室駆出率(EF)、global longitudinal strain(GLS)、左室収縮末期径(LVDs)および左室拡張末期径(LVDd)を計測した。

#### (2) RNA-seq法によるキーノード分子の同定

Sacrifice実施の1時間前に20%エタノール生食水を0.1mL静脈内に投与し、心臓を摘出した。摘出した心臓は直ちにRNA Later(Ambion)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、RNA-seq法により網羅的にmRNA発現動態を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 長期アルコール摂取のマウス心機能に対する影響の解析

長期的なアルコール摂取がマウスの心機能に与える影響を心エコー法で評価し、具体的な心機能障害の指標を明らかにした。結果として、EF、SV、GLSの低下が観察され、さらにLVDdおよびLVEDVの低下も確認された(図2)。これにより、長期的なアルコール摂取が心臓の収縮能に悪影響を及ぼし、心機能の低下を引き起こす可能性が示唆された。

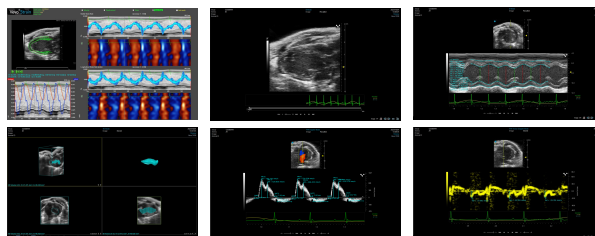


図2-1 各種心エコーの典型像(慢性アルコール摂取群)

本解析の意義は、マウスモデルにおける詳細な心機能評価の新たなアプローチを提供した点にある。心エコー法により非侵襲的で詳細な心機能の評価が可能であることが確認され、特に3D心エコーの利用により、心機能のより正確な評価が可能であることが示された。これにより、アルコールが心臓に与える具体的な影響をより正確に捉えることができた。

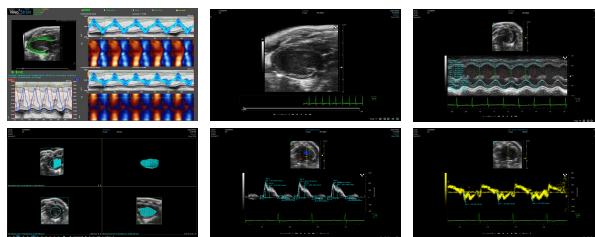


図2-2 各種心エコーの典型像(コントロール群)

また、4D心エコー法により、長期アルコール摂取がマウスの心機能に悪影響を及ぼすことが明らかになった。アルコールの長期的かつ多量の摂取は、心筋傷害を誘発し、結果として心機能障害を引き起こす可能性が高いことが示された。本解析は、動物モデルを用いて長期アルコール摂取が心機能に及ぼす影響を明確に示す点で重要である。今後はさらなる研究を通じて、アルコールが心機能に与える影響とそのメカニズムを詳細に解明することが求められる。

#### (2) アルコール性突然死をもたらすキーノード分子の同定

アルコール長期投与モデルマウスにおいて、心機能障害が生ずるメカニズムを解明するために、RNA-seq法により心組織の網羅的な遺伝子発現を測定し、心組織の網羅的な遺伝子発現のプロファイルからカスケード解析を行い、アルコールの長期摂取が引き起こす遺伝子発現変動の主要分子候補を明らかにした。

現在、研究代表者らは、この主要分子候補の中で熱ショックタンパク質HSP70(Heat Shock Protein 70)に注目している。HSP70は、分子シャペロンとしての役割を持ち、ストレスによりその発現が促される。このHSP70は、多様な疾患での発現増加や関与が確認され、特にストレス応答の観点からの関与が注目されてい

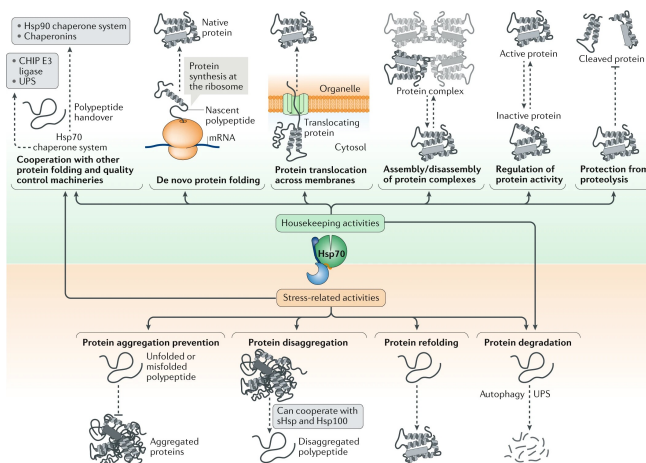


図3 HSP70の多様な役割(Rina Rosenzweig et al, Nature Reviews Molecular Cell Biology 20, 665-680 (2019))

る(図3)。Hirota Yら(Biochem Biophys Res Commun, 372(3): 469-474, 2008)およびMuralidharan Sらの研究(J Immunol, 200: 2291-2303, 2018)により、HSP70の心機能への影響やアルコール摂取による変動が明らかにされている。これらの研究から、HSP70とアルコール、さらに心機能の関係性を詳細に探求することで、アルコールが引き起こす心機能障害の発症メカニズムをより深く理解する方向へ進むことができると考えられる。したがって、HSP70がアルコール摂取による心機能障害の発症にどのように関与しているのかを詳細に明らかにすることは、アルコール摂取が心機能に及ぼす影響の本質的な理解につながり、新しい診断法や治療法の開発に貢献する可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 小澤周二、越智拓、磯部一郎	4. 巻 23(13)
2. 論文標題 アルコール性突然死におけるキーノード検索-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 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 81-84
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 53(5)
2. 論文標題 【今,改めて考える,流産,死産,新生児死亡】新生児の死亡診断書の書き方	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 829-833
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 Shuji Kozawa, Hidehisa Sekijima, Hiroshi Ochi, Ichiro Isobe	4. 巻 3
2. 論文標題 Glioblastoma multiforme masquerading as an intracerebral hemorrhage on postmortem computed tomography: Investigating a case of maternal death during pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Reports	6. 最初と最後の頁 100202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsir.2021.100202	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 Hiroshi Ochi, Yukari Hirata, Makoto Hamajima, Shuji Kozawa, Kazuo Igarashi, Ichiro Isobe	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Endocannabinoid 2-AG inhibits the release of dopamine from PC12 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24508/mms.2022.06.001	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, Sekijima H, Nata M	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 Integrated transcriptomic and proteomic analysis of heat exposure on heart tissue in rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5281/zenodo.7993066	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7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小澤 周二, 越智 拓, 関島 秀久, 濱島 誠, 平田 ゆかり, 磯部 一郎
2. 発表標題 法医学から発信するアルコール・薬物研究～これまでと今後の展望 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
3. 学会等名 2021年度アルコール・薬物依存関連学会 合同学術総会 / 第56回日本アルコール・アディクション医学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤周二, 磯部一郎, 濱島誠, 平田ゆかり, 越智拓
2. 発表標題 死後CT所見の解剖での確認に苦慮した2事例.
3. 学会等名 第43回日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智 拓, 平田ゆかり, 濱島 誠, 小澤周二, 磯部一郎
2. 発表標題 植物性カンナビノイドおよび内因性カンナビノイドの培養グリオーマ細胞に対する細胞毒性の評価
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱島 誠, 越智 拓, 鈴木里奈, 小澤周二, 磯部一郎
2. 発表標題 消火用二酸化炭素ガス放出による中毒死と考えられた1例
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会 / 第69回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤周二, 越智拓, 鈴木里奈, 濱島誠, 磯部一郎
2. 発表標題 ラット心臓由来H9c2細胞株におけるエタノールによる心毒性関連因子の発現動態
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智拓, 鈴木里奈, 濱島誠, 小澤周二, 磯部一郎
2. 発表標題 ヒト中枢神経系由来培養細胞における低酸素関連因子の発現動態
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤周二, 鈴木孝典, 越智拓, 鈴木里奈, 吉川哲史, 磯部一郎
2. 発表標題 突然死をきたした乳児：サイトメガロウイルス感染との関係性
3. 学会等名 第45回日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2023年

〔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	越智 拓  (OCHI Hiroshi)  (70527704)	藤田医科大学・医学部・講師   (33916)	
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
---------	---------