

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460869

研究課題名(和文) アルコール・心理ストレスによる動脈硬化性プラーク不安定化の機転に関する研究

研究課題名(英文) Chronic Ethanol Consumption and Chronic Mental Stress Promoted the Development of Atherosclerosis and Increased the Risk of Cardiovascular Events

研究代表者

劉金耀(LIU, Jinyao)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60379956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルコールと動脈硬化誘発飼料併用マウスでは、血管内皮細胞層修復遺伝子発現量の低下・単球走化性蛋白質1と蛋白質分解酵素MMP9遺伝子の過剰発現を引き起こし、動脈硬化の進行(血管エコー上に内中膜複合体厚(動脈硬化の程度)と低輝度(易破綻)プラーク形成率の増大)が促進される。慢性心理的ストレス、特に高脂血症下で、これを受けたマウスは内皮細胞機能と関連する血管内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子発現量の低下とレクチン様酸化LDL受容体遺伝子の過剰発現がみられ、動脈硬化進行の促進と心血管イベントフリー生存率の低下を認めた。本研究は法医学に無論のこと、動脈硬化の治療法と予防法の開発にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：C57BL/6j and apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor double knockout male mice were randomly divided into alcoholic or chronic mental stress (CMS) study, and then reared for 16 weeks. Ethanol promoted the development of atherosclerosis and induced the down-regulation of endothelial cell layer repair gene (CD34) and up-regulations of the monocyte chemotactic protein-1 and matrix metalloproteinase 9 (an enzyme involved in the extracellular matrix degradation) gene expressions in abdominal aortas. CMS, especially in mice with hyperlipidemia, showed the high risk of cardiovascular events via the developed atherosclerosis accompanied the down-regulation of nitric oxide synthase 3 and up-regulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene expressions (the genes that related to the endothelial dysfunction).

The chronic heavy drink and CMS could be the risk factors for cardiovascular disease, especially in subject with hyperlipidemia.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール 慢性心理的ストレス 動脈硬化 心血管イベント 遺伝子 血管エコー 先天的動脈硬化マウス

1. 研究開始当初の背景

法医解剖が年々増加するに伴って内因性急死の症例も増えてきた。死因究明のためには法医解剖率と死因の診断精度を上げることが最善の方法であり、社会医学としての法医学が担う重要な責務となる。

我々は、アルコール突然死モデルラットを開発し、アルコール依存症ラットにおける致死的不整脈性急死発症機転に関わるメカニズムの研究を行った(基盤C・18590635)。アルコール持続消費よりも、むしろ突然の断酒により心機能の低下¹⁾、致死的な不整脈発症リスクの増大²⁾がみられた。交感神経活性化を介する心筋ギャップ結合リモデリング³⁾・心室再分極の均質性障害⁴⁾は、アルコール性心機能障害および致死的な不整脈性突然死の発症機転に重要な役割を果たすことが解明された(基盤C・22590635)。

日本において高脂血症の罹患率が増大し、動脈硬化を基盤とするアテローム血栓症性心・血管障害の発症頻度が増えてきている。飲酒は脂質代謝障害を引き起こし、動脈硬化の危険因子である高脂血症の発症と関連する。我々の最新の研究報告では、アルコールによる脂肪肝の進展と高脂血症の発症が交感神経活性化と関連し交感神経遮断薬投与により抑制されることが示された⁵⁾。

近年の研究報告により、軽度な心理的ストレスでも総死亡率が高まり、心理的ストレスの症状が軽度から重度になると共に、総死亡と心血管病死亡のリスクは、次第に高くなる⁶⁾。

アルコールが動脈硬化の進展にもたらす影響を調べる研究は少なく、アルコール・心理ストレスによる動脈硬化の進展・アテロームプラーク不安定化を基盤とする心・血管障害急死の発症機転に関する報告も希である。

2. 研究の目的

野生型マウス(C57BL/6j, WT)とアポリポタンパク E および低密度リポタンパク質受容体の両者が欠損している先天性動脈硬化マウス(ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-})を用いてアルコール消費と慢性心理的ストレス(CMS)が動脈硬化進展にもたらす影響を検討し、アテロームプラーク不安定化を基盤とする心・血管イベント発症機転を解明する。レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)・単球走化性蛋白質-1(MCP-1)・マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-9)・血管内皮型一酸化窒素合成酵素(NO₃)とCD34の遺伝子発現量の変動を分析し、単球の内皮細胞へ接着、動脈壁への侵入・内皮細胞層修復能と内皮機能障害・動脈硬化脆弱化の制御機構を解明する。プラーク不安定化を基盤とする心・血管イベントの発症機転を反映できるバイオマーカーを開発する。

3. 研究の方法

(1) アルコールと動脈硬化進展の促進

13週令雄マウス(C57BL/6j)を、標準飼料(Control diet, CD)、動脈硬化誘発飼料(低炭水化物・高タンパク質・高脂質)(atherogenic diet, AD)、標準飼料+アルコール(EtOH)、動脈硬化誘発飼料+アルコール(AD+EtOH)の4群(図-1)に分けて16週間飼育した。

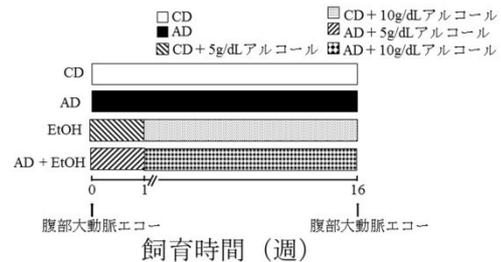


図-1 慢性アルコール投与動物モデルの作製(野生型マウス)

動脈硬化危険因子である血中総コレステロールと動脈硬化の程度を反映する内中膜複合体を測定した。腹部大動脈組織を用いて、tRNAの抽出・cDNAの合成を経て、MCP-1とCD34の遺伝子発現量を調べた。

(2) アルコールとプラークの脆弱化

WTとApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}マウス(図-2)を用いて、ADとアルコール併用投与によるプラーク脆弱化の促進について検討した。

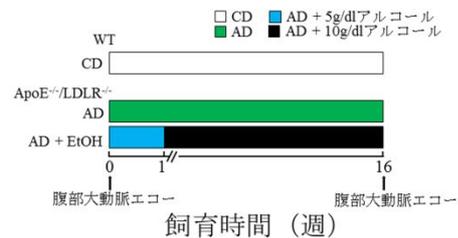


図-2 慢性アルコール投与動物モデルの作製(先天性動脈硬化マウス)

血管エコーでは、外膜に比べ内部と表面にて低輝度の部分が多いプラークを脆弱化プラークとした。

腹部大動脈組織を用いて、プラークの脆弱化と関連するMMP-9遺伝子発現量を調べた。

(3) CMSによる動脈硬化進行の促進

CMSが動脈硬化進行にもたらす影響を確認するために、13週令雄マウス(C57BL/6j)をCDとAD食で16週間飼育し、CMSなし・あり、それぞれ計4種類の動物モデルを作成した(図-3)。

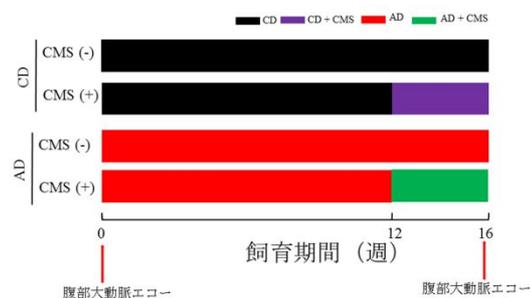


図-3 野生型マウスCMSモデルの作製

動脈硬化誘発飼料飼育直前と実験終了時に腹部大動脈エコーを実施した。

慢性心理的ストレスは、拘束・水回避・汚物・社会性・傾斜ストレスの、計5種類があり、飼育の終了前1ヶ月間に行った。

腹部大動脈組織を用いて、内皮細胞機能を反映する血管内皮型一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS3)とNOの放出量と関連するレクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の遺伝子発現量を調べた。

(4) CMSによる心・血管イベント発症リスク

先天的動脈硬化マウス36匹と野生型マウス34匹を28週間と1年間にわたって追跡、CMSによる動脈硬化進展の促進と心・血管イベント発症との関連について検討した。心・血管イベントのエンドポイントは突然死と動脈血栓症による四肢運動障害とし、Kaplan-Meier法により心・血管イベントフリー生存率を計算した。

CMSによる動脈硬化の進展では、13週令の雄C57BL/6j(WT)とApoE^{-/-}/LDLR^{-/-}を動脈硬化誘発飼料で飼育し、CMSなし・あり、それぞれ計4群に分けて16週間飼育した(図-4)。

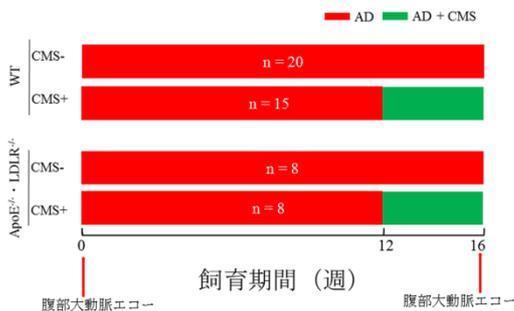


図-4 ApoE^{-/-}/LDLR^{-/-} CMSモデルの作製

4. 研究成果

(1) アルコールと動脈硬化進展の促進

動脈硬化誘発食を消費したマウスにおいて、高脂血症が引き起こされた。なお、動脈硬化誘発食とアルコールの同時投与マウスでは高脂血症が顕著であったが、動脈硬化誘発食単独投与群との有意な差はみられなかった(図-5)。

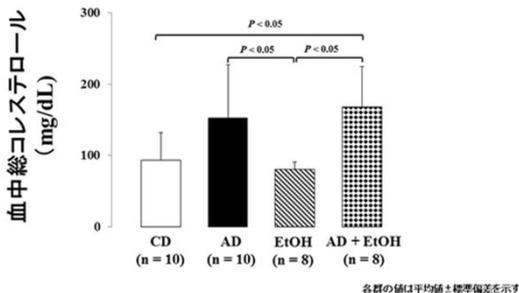


図-5 動脈硬化誘発飼料単独や、アルコールとの同時投与による高脂血症

動脈硬化誘発食を消費したマウスにおいて、IMTの増大が引き起こされた。なお、動

脈硬化誘発食とアルコールの同時投与マウスではIMTの増大が顕著であった(図-6)。

アルコール単独投与マウスにおいて、CD34遺伝子発現量の増加がみられた。ADの単独投与により腹部大動脈壁中MCP-1遺伝子の過剰発現が引き起こされたと同時に、血管内皮細胞層修復を反映する指標であるCD34遺伝子発現量の増加はみられなかった。MCP-1遺伝子の過剰発現はアルコールとADの同時投与マウスにて顕著であった(図-7)。

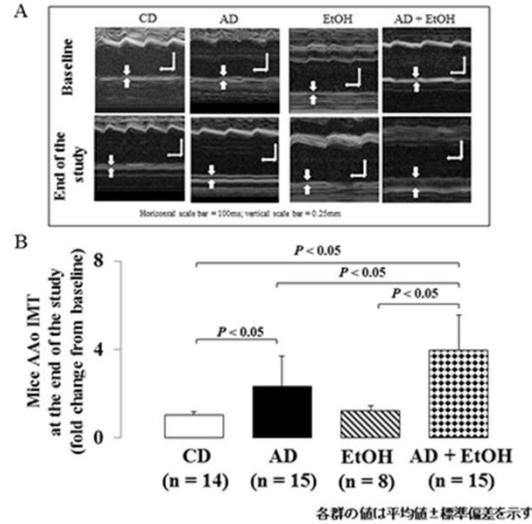


図-6 動脈硬化食とアルコール単独、または併用によるIMTの変化

A: 腹部大動脈エコー(Mモード)の典型例、B: IMTの統計結果(分散分析・Bonferroni/Dunn法)

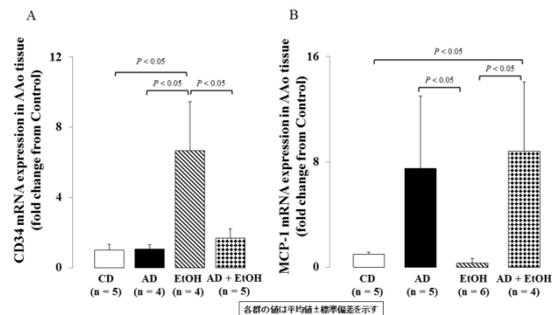


図-7 動脈硬化食とアルコール単独、または併用による腹部大動脈CD34(A)とMCP-1(B)遺伝子発現量の変化

以上の結果により、アルコールと動脈硬化誘発食の相乗効果が血管内皮細胞層修復の減弱とMCP-1過剰発現を介し、動脈硬化の進行を促進する可能性が示唆された。

(2) アルコールとプラークの脆弱化

アルコールと動脈硬化誘発飼料を併用した先天的動脈硬化マウスでは、腹部大動脈内中膜複合体厚の増加および高脂血症を認め、腹部大動脈組織中のMMP-9遺伝子発現量の増加(図-8)が引き起こされた。

高輝度プラークの形成は先天的動脈硬化マウスにてみられたが、同じ28週令野生型

マウスでは見られなかった。プラークおよびプラークの被膜の脆弱化を反映する低輝度プラークは、動脈硬化誘発飼料とアルコール併用投与マウスのみで見られた(図-9)。

以上の結果により、動脈硬化誘発飼料とアルコールの併用投与は、蛋白質分解酵素MMP-9 遺伝子発現量を増加し、プラークに沈着する細胞外マトリックス分解が亢進され、プラークおよびプラーク被膜の脆弱化を促進する可能性が示唆された。

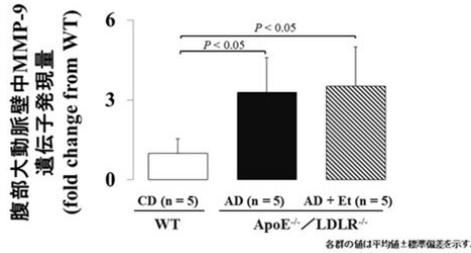


図-8 動脈硬化誘発食とアルコール併用がMMP-9 遺伝子発現量へもたらす影響

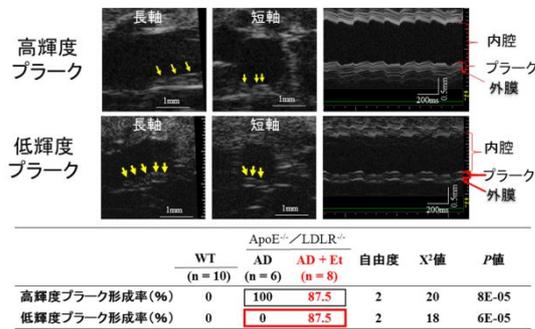


図-9 低輝度プラークは、動脈硬化誘発飼料とアルコール併用投与マウスのみで見られた

(3) CMS による動脈硬化進行の促進

動脈硬化誘発飼料投与により、高脂血症は引き起こされたが、CMS による、この高脂血症の増悪はみられなかった(図-10)。

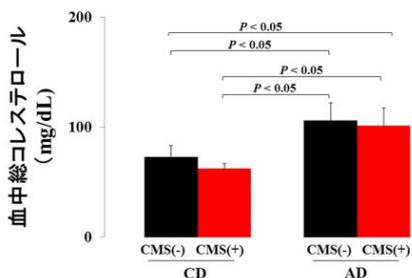


図-10 CMS が高脂血症にもたらす影響

16 週間の飼育後、CD 群マウスと比較して、AD 群マウスは、IMT の増大が顕著であった。一方、CMS によるタンパク質、脂質摂取量、カロリー消費量、および体重の低下にかかわらず、CMS は、IMT 増大の進行を引き起こした(図-11)。

動脈硬化誘発飼料投与と CMS は腹部大動

脈の NOs3 遺伝子発現量の低下を引き起こした(図 12A)。また、CMS により、腹部大動脈中における LOX-1 遺伝子発現量の増加が引き起こされた。特に動脈硬化誘発食を用いて飼育したマウスにおいて顕著であった(図 12B)。

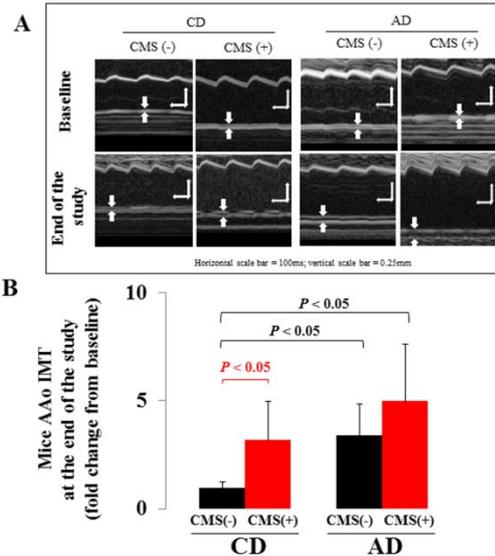


図-11 動脈硬化誘発食と慢性心理的ストレスがIMT へもたらす影響

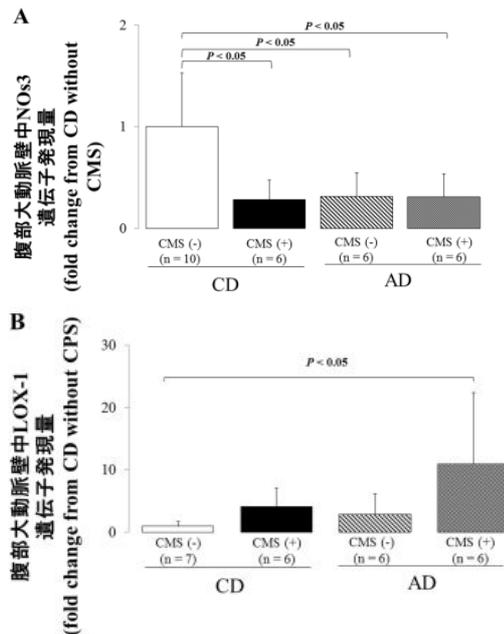


図-12 動脈硬化誘発食と CMS が Nos3 (A) と LOX-1 (B) 遺伝子発現量へもたらす影響(各群の値は平均値 ± 標準偏差を示す)

以上の結果により、マウスの腹部大動脈では、動脈硬化誘発食と CMS の単独および同時負荷によって NOs3 遺伝子発現の低下、LOX-1 遺伝子の過剰発現を引き起こしたことから、CMS、特に高脂血症下での CMS が LOX-1 を介して NO による血管弛緩反応障害を引き起こし、動脈硬化の進行を促進することが示唆された。

(4) CMS による心・血管イベント発症リスク

先天的動脈硬化マウスの1年間心・血管イベントフリー生存率は著明に低下した(図-13A)が、28週間追跡した方においてはC57BLとの差がみられなかった(図-13B)。

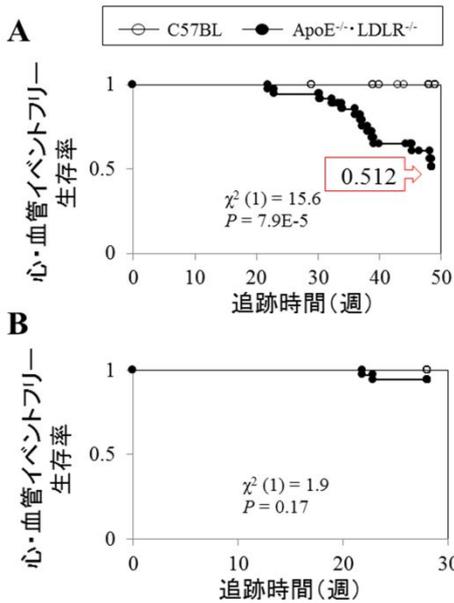


図-13 心・血管イベントフリー生存率
A: 1年間自然経過。B: 28週間自然経過

慢性心理的ストレスを受けた先天的動脈硬化マウスの28週間心・血管イベントフリー生存率は顕著に低下し、自然経過の1年間心・血管イベントフリー生存率に近いレベルとなった(図-14)。

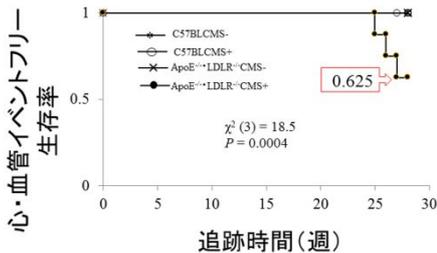


図-14 慢性心理的ストレスによる心・血管イベントフリー生存率の低下

12週令の雄野生型と先天的動脈硬化マウスを動脈硬化誘発飼料で飼育し、CMSなし・あり、それぞれ計4群ともにIMTの増大とプラークの形成は認められなかった。しかし、16週間飼育後の28週令において、CMSによる腹部大動脈IMT(図-15)とプラーク形成率(図-16)の増大がみられ、特に先天的動脈硬化マウスにおいて顕著であった。

以上の結果により、慢性心理的ストレスは動脈硬化進行の促進を介し、心・血管イベントに対する強い関連因子であると考えられる。

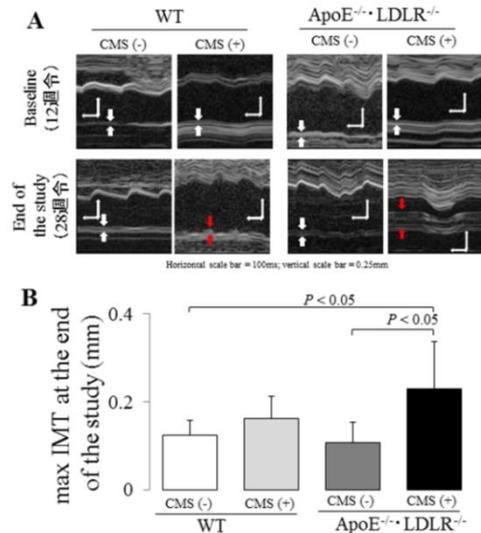


図-15 CMSがIMTにもたらす影響

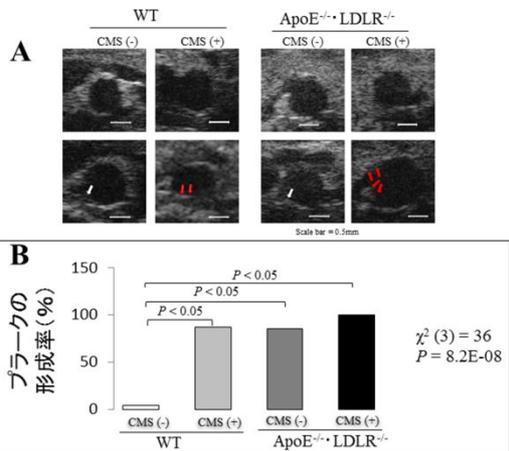


図-16 CMSはプラーク形成にもたらす影響

引用文献

Liu J, Shirafuji S, Fujimiya T. Rats in acute withdrawal from ethanol exhibit left ventricular systolic dysfunction and cardiac sympathovagal balance shift. Alcohol. 2009; 43:207-216

Liu J, Fujimiya T. Abrupt termination of an ethanol regimen provokes ventricular arrhythmia and enhances susceptibility to the arrhythmogenic effects of epinephrine in rats. Alcohol Clin Exp Res. 2010; 34 Suppl 1:S45-53

Liu J, Takase I, Hakucho A, Liu X, Fujimiya T. Carvedilol prevents the ethanol-induced ventricular arrhythmias by modifying the gap junction remodeling in rats. Heart. 2012; 98 Suppl 2:E109-E110

Shirafuji S, Liu J, Okamura N, Hamada K, Fujimiya T. QT interval dispersion and cardiac sympathovagal balance shift in rats with acute ethanol withdrawal. Alcohol Clin Exp Res. 2010; 34:223-230

Liu J, Takase I, Hakucho A, Okamura N, Fujimiya T. Carvedilol attenuates the progression of alcohol fatty liver disease in rats. Alcohol Clin Exp Res. 2012; 36:1587-1599

Russ TC, Stamatakis E, Hamer M, Starr JM, Kivimäki M, Batty GD. Association between psychological distress and mortality: individual participant pooled analysis of 10 prospective cohort studies. BMJ. 2012;345:e4933

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

劉 金耀、高瀬 泉、白鳥 彩子、劉 旭、藤宮 龍也、マウスにおけるアルコールと動脈硬化誘発食が腹部大動脈中の単球走化性蛋白質-1 と内皮細胞修復遺伝子発現へもたらす影響、アルコール医学生物学、査読有、34 巻、2015、21-22

劉 金耀、高瀬 泉、白鳥 彩子、劉 旭、藤宮 龍也、マウスにおける低炭水化物・高蛋白質とアルコールの動脈硬化進展への影響、アルコール医学生物学、査読有、33 巻、2014、102-104

〔学会発表〕(計7件)

劉 金耀、アルコール慢性投与による動脈硬化巢の脆弱化の促進：先天性動脈硬化マウスを用いた検討、第35回アルコール医学生物学研究会学術集会、2016年1月22日、東京都 新宿区リーガロイヤルホテル東京

劉 金耀、慢性心理的ストレスによる動脈硬化の進行と心・血管イベントリスクの増大：先天性動脈硬化マウスを用いた検討、第32回日本法医学会学術中四国地方集会、2015年10月30日、岡山県岡山市 岡山大学 Jホール

劉 金耀、マウスにおける動脈硬化誘発食・心理的ストレスとレクチン様酸化LDL受容体遺伝子発現の誘導との関連、第99回日本法医学会学術全国集会、2015年6月10日、高知県 高知市 文化プラザかるぼーと

劉 金耀、マウスにおけるアルコールと動脈硬化誘発食が腹部大動脈中の単球走化性蛋白質-1 と内皮細胞修復遺伝子発現へもたらす影響、第34回アルコール医学生物学研究会学術集会、2015年1月23日、三重県 津市 ホテルグリーンパーク津

劉 金耀、マウスにおける慢性の心理的ストレスが動脈硬化進展にもたらす影響：腹部大動脈の内膜中膜複合体厚の比較検討、第31回日本法医学会学術中四国地方集会、2014年11月1日、香川県

高松市 アルファあなぶきホール
Liu J, Ethanol promoted the development of atherogenic-diet-induced atherosclerosis in mouse abdominal aorta, 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2014年6月20日、福岡県 福岡市 福岡国際会議場
劉 金耀、マウスにおける低炭水化物・高蛋白質とアルコールの動脈硬化進展への影響、第33回アルコール医学生物学研究会学術集会、2014年1月24日、高知県 高知市 県立牧野植物園

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

劉 金耀 (LIU, Jinyao)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60379956

(2)研究分担者

藤宮 龍也 (FUJIMIYA, Tatsuya)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50219044