

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860491

研究課題名(和文) アルコールの心筋細胞への影響からみた突然死の解明のための基礎研究

研究課題名(英文) Effects of chronic ethanol consumption on myocardium in mice.

## 研究代表者

小澤 周二 (Shuji, KOZAWA)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・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)：アルコールの長期に渡る多量摂取においては致死的不整脈との関連が示唆されており、そのメカニズムには細胞内シグナル伝達経路の関与が考えられているが明らかにはなっていない。そこで、慢性アルコール投与マウスモデルの心筋細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を行った。その結果、急性期及び離脱期それぞれで異なる遺伝子プロファイルを示し、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。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that fatal arrhythmia is linked to long-term excessive alcohol use, and intracellular signaling pathways are believed to be involved in the mechanism. In the present study, using a microarray technique, a comprehensive analysis of gene expression profiles of cardiomyocytes was performed in a mouse model of chronic alcohol use. The results showed differing gene profiles in the acute and withdrawal phases, which suggested that activation of the JAK/STAT pathway and the cytokine-mediated inflammatory response may be occurring in the acute phase, while persistence of STAT3 and STAT6 activity and cell proliferation, i.e., remodeling, may be occurring in the withdrawal phase.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 マイクロアレイ カスケード解析 アルコール使用障害 アルコール性臓器障害 不整脈 pathway解析 GeneOntology(GO)解析 pat

1. 研究開始当初の背景

アルコールは依存性を生じさせる酩酊薬であり、精神的な依存性のみならず身体的な毒性も有しているため、法医実務に関わりの深い物質である。これまで我々は慢性アルコール投与マウスモデルを用いて、アルコール摂取による心筋細胞の代謝異常や神経伝達異常について一連の研究に取り組んできた。研究では、心筋リモデリングや心不全の際の心筋細胞死の制御などに重要な役割を果たしている、サイトカイン受容体機構の構成要素であるヤヌスキナーゼ(JAK)及びシグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)が、反復的なアルコール摂取の後に活性化されることが示され、アルコール摂取による心筋細胞傷害に対して JAK/STAT 経路の活性化が防御的に働いている可能性が明らかとなった。また一方で、JAK/STAT 経路の活性は血中のアルコールの有無により変化することが示され、アルコールの急性刺激が JAK/STAT 経路の活性に影響を与える可能性が示された。

ところで、アルコール摂取に伴う突然死の多くは、不整脈誘発に因る心停止等が考えられているもののなお、法医学的な診断は非常に困難である。そこで、これまでの研究で培ってきた慢性アルコール投与マウスモデルを用いて、アルコール摂取による心筋細胞内の分子生物学的変化を同定するため網羅的遺伝子発現解析を行い、不整脈発症に至る基礎的遺伝子発現異常を同定し、法医実務におけるアルコール摂取と突然死との因果関係の判断に応用できる基盤作りを行いたいと考えた。

2. 研究の目的

アルコールは主に肝臓でアセトアルデヒドへと代謝を受け酢酸へと代謝されるが、これらの代謝産物は肝臓での代謝が飽和すると血中へと漏出する。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、循環器系への影響では血圧の上昇、不整脈の誘発や突然死を引き起こすと考えられている。この突然死は、月曜日に発生数が多いことや休日飲酒後に頻脈性不整脈を生じる holiday heart など致死的不整脈との関連が示唆されており、そのメカニズムとして交感神経系やサイトカインの果たす役割が注目されている。

そこで本研究では、慢性的にアルコールを摂取することによって、その急性期に心筋に傷害が生じ、また、その離脱期には心筋の保護が行われるという見地からさらに、アルコールの心筋への影響を明らかにするため、慢性アルコール投与マウスモデルの心筋細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を試みた。

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、アルコール投与群には4%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, n=4)、アルコール投与マウスモデルを作成した。アルコール投与群は、アルコール存在下での影響を検討するため、4%アルコール液体食の最終投与の1時間後(慢性アルコール投与群, n=4)あるいは24時間後(アルコール離脱群, n=4)に心臓を摘出した。摘出した心臓は直ちに RNA Later (Ambion) 中で保存した。

摘出した心筋を Tissue Lyser (QIAGEN) を用いてホモジナイズした後、RNeasy Microarray Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した。摘出した心筋から抽出した RNA を試料として、マイクロアレイ1色法により mRNA 発現動態を網羅的に測定した(n=4)。マイクロチップは38,640の遺伝子のプローブが搭載された Agilent 社の SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K を使用した。測定したシグナル値は GeneSpring GX を用いて解析を行った。解析は、まずはじめに実際に発現が変動している遺伝子を探索し(発現変動解析)、次いで、これらの発現変動が生じた遺伝子群に多く含まれる転写因子結合領域の探索を行い(転写因子結合領域解析)、さらに、その結合領域に結合する転写因子群を解析した(結合転写因子解析)。加えて、発現変動が認められた遺伝子群に関して、GeneOntology (GO) 解析を行った。GO Term データとして Biobase Knowledge Library (BKL) manual curation を使用した。

4. 研究成果

(1) 発現変動解析

慢性アルコール投与群  
慢性アルコール投与群とコントロール群のシグナル値を解析したところ、有意に発現差のある遺伝子 (Fold Change (絶対値) > 2.3 および p-value < 0.05) として142 遺伝子が得られた。(Table 1)

Table 1 慢性アルコール投与群における発現変動遺伝子

12000070139Rik	Ap3n	Ctcf	Fign1	Lon2	Nrg1	Sirpb1b	Zfp92
1810022008Rik	Apod	Ctcf5	Foxo6	Lgals3	Nst1	Slc18a5	Zmynd12
2310015K22Rik	Arhgdig	Cyp11a1	Foxo6	Lgals3	Ohr32	Slc44a5	
2310050B05Rik	BC055004	Cyp2b10	Gm10386	Lingo3	Pacsin1	Saaac3	
2810002018Rik	Ccdc150	Cyp4f15	Gm14508	Lmn11	Paaln	Spr14	
2810052E23Rik	Ccl17	D0H4S114	Gm14984	LOC520515	Pfbl	Srsf2	
4831405J19Rik	Cd300b	D43001B11Rik	Gm2763	LOC522269	Plekhh1	Stmn4	
4920512H18Rik	Cd46	D83001E11Rik	Gm1148	LOC74761	Ppp3r	Suvar1	
4930535P18Rik	Cd59b	Derb19	Gm1066	Lox	Ppp1fdg	Taox2	
4933401F05Rik	Ces5	Depdc1b	Gm6970	Lrx2b	Ret	Tfrc	
6030458E02Rik	Chgb	Dmkn	Gag11	Maz2b6	Rv39	Timp1	
A130940M12Rik	Citrb3	Dusp4	Hst1	Maso1	Rv12	Tmem222	
	Chma5	Dynlrb2	Hist1h1b	Mgat1	Rv4r	Tmem56	
	Acc11	Cla1	E130101M22	Hist1h2ab	Mest	Scd4	Tmprss13
	Acc12	Cldn19	Ect2	Hist1h2af	Mmp9	Serpina3n	Tfhrf12a
	Adam8	Cdkn1f	Eklr	Irf	Mao2	Serpina1	Tox2
	AB83975	Comt1	ENSMUSG00000053881	Irf6	Myl7	Serpina3n	Tuba4a
	Ankrd1	Csk3	Fam115a	Irf3	Nel2	Sec2b2	Uhrf1
	Aoxa5	Ctcf1	Fam115a3	Kc5	Nes4	Sh2b2	Utr1
	Aox1	Ctcf8	Fbx22	Krtap11-1	Npbb	Sh3bp1	Wfs1

アルコール離脱群

アルコール離脱群とコントロール群のシグナル値を解析したところ、有意に発現差のあ



コントロール群との比較において、慢性アルコール投与群及びアルコール離脱群ともに遺伝子発現プロファイルに有意な変化が認められ、慢性アルコール摂取により心筋細胞内における遺伝子発現が急性期及び離脱期ともに変動していることが明らかとなった。

慢性アルコール投与群及びアルコール離脱群の各遺伝子の発現量は、慢性アルコール投与群では 142 遺伝子、アルコール離脱群では 82 遺伝子で有意に大きく変動が認められ（発現変動遺伝子群）これらの遺伝子は慢性アルコール摂取によって発現量に変動が生じたものと考えられた。また、これらの発現変動遺伝子群に関する GO 解析により、発現が変動した遺伝子は、急性期では主にサイトカイン・ケモカインや炎症反応に関連する遺伝子、離脱期では主に蛋白分解酵素に関連する遺伝子であることが明らかとなり、慢性アルコール摂取により、急性期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、離脱期には蛋白分解酵素を介した細胞増殖が生じることが示唆された。

一方、これらの発現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に関して、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の比較において、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、慢性アルコール投与群では 12 領域、アルコール離脱群では 44 領域の転写因子結合領域が有意に多く認められた。さらに、これらの領域に結合する転写因子を解析すると、慢性アルコール投与群では多数の STAT Family を含む 12 因子が考えられ、アルコール離脱群では 42 因子が考えられ、その中に STAT Family そのものは含まれておらず、STAT3 や STAT6 と関連するものが優位に含まれていた。STAT6 は心筋細胞において炎症性サイトカインの発現を調節して細胞死を抑制し、また、STAT3 はストレス誘導性の心筋細胞アポトーシスを抑制する。したがって、慢性的なアルコール投与により、急性期には JAK/STAT 経路を介した経路の mRNA の転写が促され、離脱期には STAT Family の中でも STAT3 や STAT6 に関連する経路の活性が持続している可能性が示唆された。

## 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)

小澤周二，那谷雅之，池松和哉，榛葉頼子，

柿崎英二，湯川修弘：アルコール投与マウスにおける心筋内 JAK-STAT signaling pathway の動態解析．アルコールと医学生物学．33．66-71（2015）．査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

小澤周二，池松和哉，村瀬壮彦，池村真弓，中川泰久，那谷雅之：マウス血清における各種サイトカインに及ぼすエタノールの影響．第 100 次日本法医学会学術全国集会．2016 年 6 月 17 日．きゅりあん（東京都品川区）

岡田真名人，東里穂，小澤周二，池村真弓，中川泰久，那谷雅之：マウス心筋細胞への慢性アルコール摂取の影響．第 37 回日本法医学会学術中部地方集会．2015 年 10 月 17 日．山梨県立図書館（山梨県甲府市）

小澤周二，池松和哉，村瀬壮彦，池村真弓，中川泰久，那谷雅之：慢性アルコール摂取によるシグナル伝達物質への影響．平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会．2015 年 10 月 13 日．神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

小澤周二，池松和哉，村瀬壮彦，清藤佑馬，池村真弓，中川泰久，那谷雅之：慢性アルコール投与マウスにおける各種サイトカイン濃度の検討．第 99 次日本法医学会学術全国集会．2015 年 6 月 11 日．高知市文化プラザかるぼーと（高知県高知市）

小澤周二，池松和哉，池村真弓，村瀬壮彦，中川泰久，那谷雅之：マウス心筋細胞への慢性アルコール摂取の影響．第 34 回アルコール医学生物学研究会．2015 年 1 月 23 日．ホテルグリーンパーク津（三重県津市）

小澤周二，那谷雅之，池松和哉，榛葉頼子，柿崎英二，湯川修弘：アルコール投与マウスにおける心筋内 JAK-STAT signaling pathway の動態解析．第 33 回アルコール医学生物学研究会．2014 年 1 月 24 日．高知県立牧野植物園（高知県高知市）

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

池松 和哉 (IKEMATSU KAZUYA)  
長崎大学 医歯(薬)学総合研究科 教授  
研究者番号：80332857

那谷 雅之 (NATA MASAYUKI)  
三重大学 医学系研究科 教授  
研究者番号：70241627

池村 真弓 (IKEMURA MAYUMI)  
三重大学 医学系研究科 助教  
研究者番号：30515490