

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09265

研究課題名(和文) 飲酒と主要栄養素変更の併存が動脈硬化症の進展と心臓性突然死発症に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of coexistence of drinking and major nutrient change on the development of arteriosclerosis and sudden cardiac death

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性高脂血症(AL)マウスをエタノールと低炭水化物・高蛋白質(LCHP)食単独または併用にて16週間飼育，形態，組織/細胞および遺伝子レベルにて，動脈硬化症の進行および心臓性突然死の発症へもたらす影響，またその制御機構に関わる関連因子を調べた．ALマウスにおいて，飲酒とLCHP食の同時摂取が大動脈壁の高酸化ストレス状態と内皮前駆細胞減少を介し，内皮細胞機能と平滑筋細胞増殖関連遺伝子の変動がみられ，動脈硬化を促進，また飲酒は心臓交感神経活性化を介し，心機能と心筋ギャップ結合蛋白質に影響，LCHP関連心機能障害の増悪と致死的不整脈感受性の増加と関与する可能性が示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲酒と低炭水化物・高蛋白質食の慢性併用が，先天性高脂血症マウスの動脈硬化症の進展，心機能の増悪および心臓性突然死発症リスクの増加へもたらす影響を確認し，動脈硬化進展と心臓性突然死へ関与する内皮細胞の傷害と修復および平滑筋細胞の増殖の関連因子，心臓自律神経機能・心筋ギャップ結合蛋白質の変化，またその変化の制御機構についての基礎研究である．

研究成果の概要(英文)：Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor double-knockout (AL) mice fed for 16 weeks with ethanol and a low-carbohydrate, high-protein (LCHP) diet alone or in combination, the effects of simultaneous intake of alcohol and LCHP food on the progression of arteriosclerosis and onset of cardiac sudden death, and related factors involved in its control mechanism were investigated at the morphological, histiocyte and genetic levels.

In AL mice, simultaneous intake of alcohol and LCHP diet causes changes in endothelial cell function and smooth muscle cell proliferation-related genes through hyperoxidative stress state and decrease of endothelial progenitor cells of the aortic wall, and promotes arteriosclerosis. Drinking affected cardiac function and myocardial gap junction channel protein through cardiac sympathetic nerve activation, and may be involved in exacerbation of LCHP-related cardiac dysfunction and increased fatal arrhythmia sensitivity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルコール 自律神経機能 低炭水化物・高蛋白質食 心筋ギャップ結合 動脈硬化 心臓性突然死 血管内皮前駆細胞 心臓

1. 研究開始当初の背景

法医学解剖が年々増加するに伴って心血管疾患による内因性急死の症例も増えてきた¹⁾。一方、日本人の死因の上位を占める心血管疾患²⁾の主たる原因は動脈硬化症である。動脈硬化進行の促進およびそれと関連する心臓性突然死の発症を制御する機序をいっそう明確に解き明かすことが重要である。

動脈内皮細胞の形態と機能は動脈硬化の進展とともに障害され、障害された動脈内皮細胞がさらに動脈硬化を進展させるといった悪循環を形成しながら動脈硬化症の進展に深く関与すると考えられる。先行研究にて、過剰な飲酒かつ低炭水化物・高蛋白質 (low-carbohydrate/high-protein diet: LCHP) 食が動脈硬化の進行を促進することを認めた³⁾。動脈内皮機能障害に対する内皮細胞脱落の補助は、動脈硬化の進展を抑制できる可能性がある。血管内皮前駆細胞は血管障害部位の内皮を補助できると考えられる⁴⁾。先行研究にて、過剰な飲酒かつ LCHP 食が腹部大動脈の内皮前駆細胞遺伝子発現量の減少を引き起こすことを認めた⁵⁾。

一方、突然死の中で最も多いのは心臓の栄養血管である冠状動脈の動脈硬化性変化による狭窄や閉塞で起こる急性心臓死である。先行研究にて、過剰な飲酒がラットの致死的不整脈の発症リスクを増加させることを検証した⁶⁾。なお、過剰な飲酒は肝臓のアルコール代謝が亢進し、酸化されない脂肪酸を増加させる。その一部は肝臓に蓄積し、脂肪肝の原因となる。一部は肝臓外へ分泌され、動脈硬化の危険因子である高脂血症を引き起こす⁷⁾。

飲酒習慣は動脈硬化性疾患の発症に対して功罪両面の作用を示すことが知られている。しかし、基礎研究に基づく報告は少なく、その制御機序についての研究も少ない。飲酒と主要栄養素変更の併存がどのような機序で動脈内皮機能の障害・内皮細胞修復能の低下ならびにそれと関連する心臓性突然死を来しているのか、その詳細はいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、野生型 (C57BL/6j) と apolipoprotein E と low-density lipoprotein receptor の両者が欠損している先天性高脂血症 (AL) マウスを用いて、飲酒と LCHP 食の併存が動脈硬化症の進行およびそれと関連する心臓性突然死の発症へもたらす影響、またその制御機構に関わる動脈内皮機能障害、動脈内皮細胞修復能、心筋障害、心筋ギャップ結合リモデリングの解明を目的とする。

3. 研究の方法

野生型と AL マウスをエタノール (ethanol, Et)・LCHP 飼料単独または併用にて 16 週間飼育する。血管エコー、急性拘束とエピネフリン不整脈誘発試験、フローサイトメトリー、蛍光免疫組織化学多重染色 / 共焦点レーザー顕微鏡、電気泳動および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 技術を利用し、形態、組織 / 細胞、タンパク質および遺伝子レベルにて飲酒と主要栄養素変更の併存が動脈硬化の進展およびそれと関連する心臓性突然死の発症を制御する機構にもたらす影響を総合的に解明する。

4. 研究成果

先天性高脂血症 (AL) マウスにおいては、下記の研究成果を得た。

(1) アルコールと LCHP 食併用は、大動脈壁にて酸化ストレス指標メタロチオンイン (metallothionein: MT) 低下性高酸化ストレス状態を起こした (図 1)。

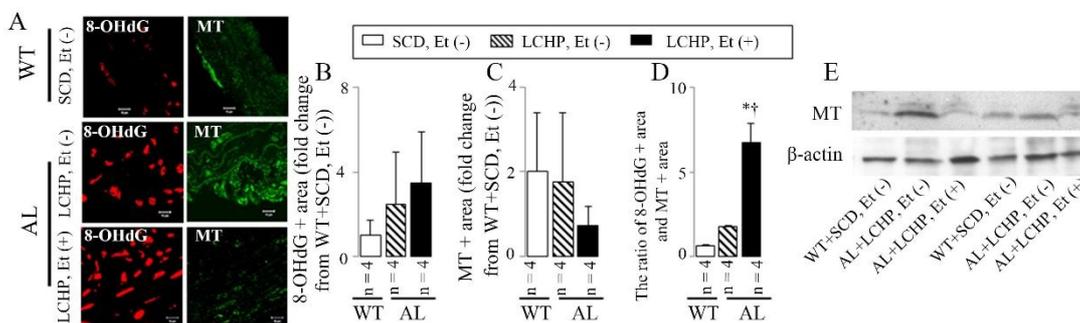


図 1 アルコールと LCHP 食併用は大動脈壁にて高い酸化ストレスを起こした。

WT: 野生型マウス, AL: 先天性高脂血症マウス, SCD: 標準飼料, LCHP: 低炭水化物・高蛋白質, Et (アルコール). A: 大動脈免疫染色典型画像, 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine): 酸化ストレスマーカー (赤色), MT: 酸化ストレスマーカー (緑色). B-D: 大動脈免疫染色陽性面積定量評価の結果. E: 大動脈壁 MT 電気泳動典型画像. 各群の値は平均値 ± 標準偏差を表す. * p < 0.05 vs. WT + SCD, Et (-), † p < 0.05 vs. AL, LCHP+ Et (-).

血管内皮細胞と平滑筋細胞がこの高酸化ストレス病態を受け、血管内皮細胞機能および平滑筋細胞増殖関連遺伝子の変動がみられ(図2, 図3), 動脈硬化の進行(図4)を促進する可能性が示唆された⁸⁾。

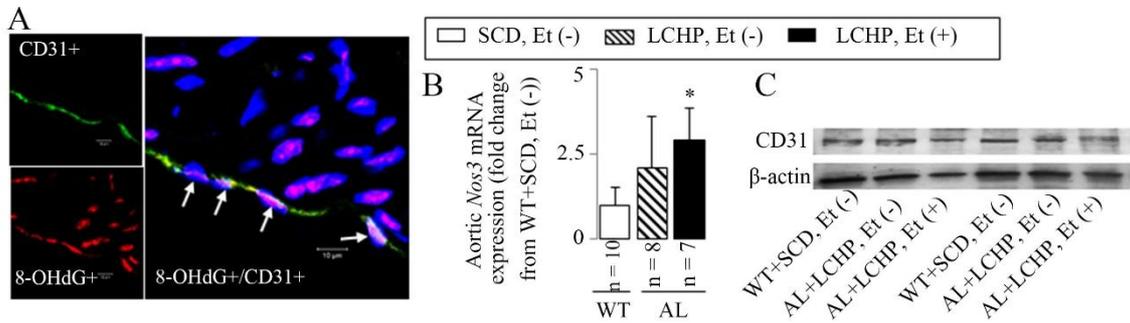


図2 大動脈血管内皮細胞がアルコールとLCHP食併用による大動脈の高酸化ストレス病態を受け、血管内皮細胞機能関連遺伝子の変動を起こした。

WT:野生型マウス, AL:先天性高脂血症マウス, SCD:標準飼料, LCHP:低炭水化物・高蛋白質, Et(アルコール). A:大動脈免疫染色典型画像, CD31:内皮細胞のマーカー(緑色), 8-OHdG:酸化ストレスマーカー(赤色). B:PCRを利用し、大動脈内皮機能と関連する遺伝子 *Nos3* の変化. C:大動脈壁 CD31 電気泳動典型画像. 各群の値は平均値±標準偏差を表す. * p < 0.05 vs. WT + SCD, Et (-).

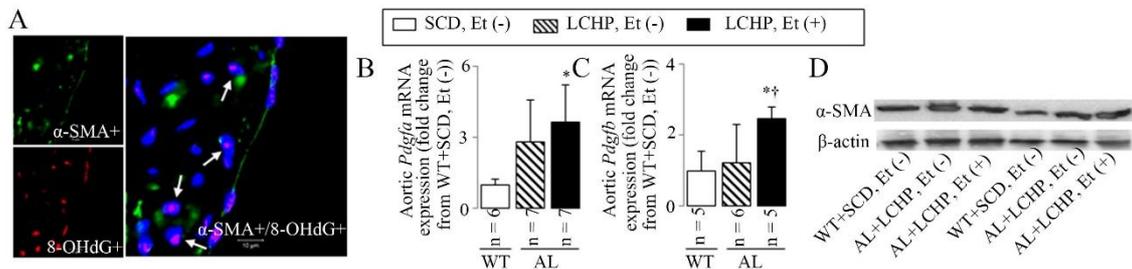


図3 大動脈平滑筋細胞がアルコールとLCHP食併用による大動脈の高酸化ストレス病態を受け、平滑筋細胞増殖関連遺伝子の変動を起こした。

WT:野生型マウス, AL:先天性高脂血症マウス, SCD:標準飼料, LCHP:低炭水化物・高蛋白質, Et(アルコール). A:大動脈免疫染色典型画像, α -SMA:平滑筋細胞のマーカー(緑色), 8-OHdG:酸化ストレスマーカー(赤色). B:PCRを利用し、大動脈平滑筋細胞増殖と関連する遺伝子 *Pdgfra* と *Pdgfb* の変化. C:大動脈壁 α -SMA 電気泳動典型画像. 各群の値は平均値±標準偏差を表す. * p < 0.05 vs. WT + SCD, Et (-), † p < 0.05 vs. AL, LCHP+ Et (-).

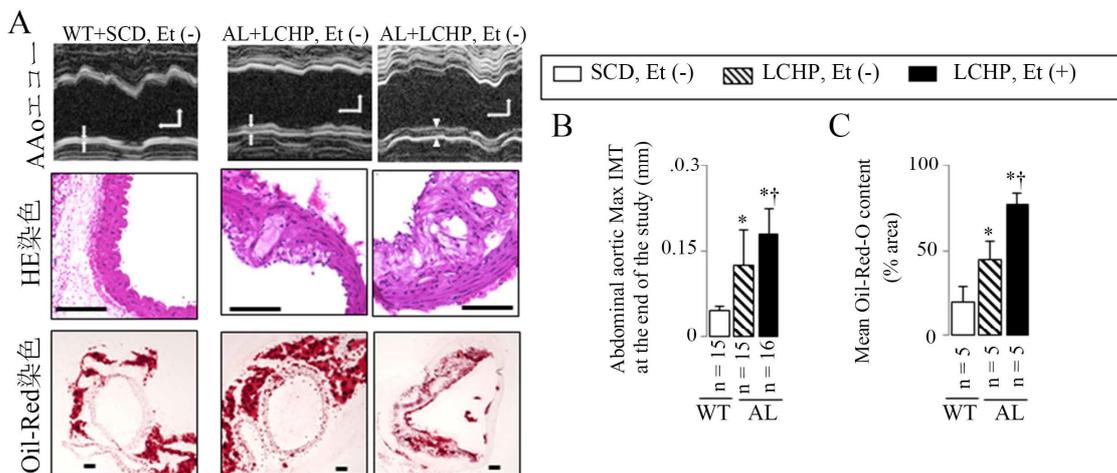


図4 アルコールとLCHP食併用による動脈硬化症の進行。

WT:野生型マウス, AL:先天性高脂血症マウス, SCD:標準飼料, LCHP:低炭水化物・高蛋白質, Et(アルコール). A:腹部大動脈(AAo)エコー. 矢印間の部分は大動脈硬化程度を反映する内膜中膜複合体厚(maximum intima media thickness: Max IMT)の増大・大動脈HEおよびOil-Red(脂肪)染色での動脈硬化性プラーク典型画像. B:腹部大動脈Max IMTの結果. C:Oil-Red(脂)染色にて大動脈壁脂肪沈着定量評価の結果. 各群の値は平均値±標準偏差を表す. * p < 0.05 vs. WT + SCD, Et (-), † p < 0.05 vs. AL, LCHP+ Et (-).

一方、アルコールとLCHP食併用は、EPCを制御する関連遺伝子の発現量を抑制し、大動脈壁中のEPCの動員・血管内皮細胞への分化を障害し、内皮細胞修復障害と関与することが示唆された⁹⁾。

(2) 飲酒は心臓交感神経活性化(図5)を介し、心筋β受容体およびギャップ結合蛋白質(図6)に影響、LCHP関連左心機能障害の増悪(図7)と致死的不整脈感受性の増加(図8)と関与する¹⁰⁾。

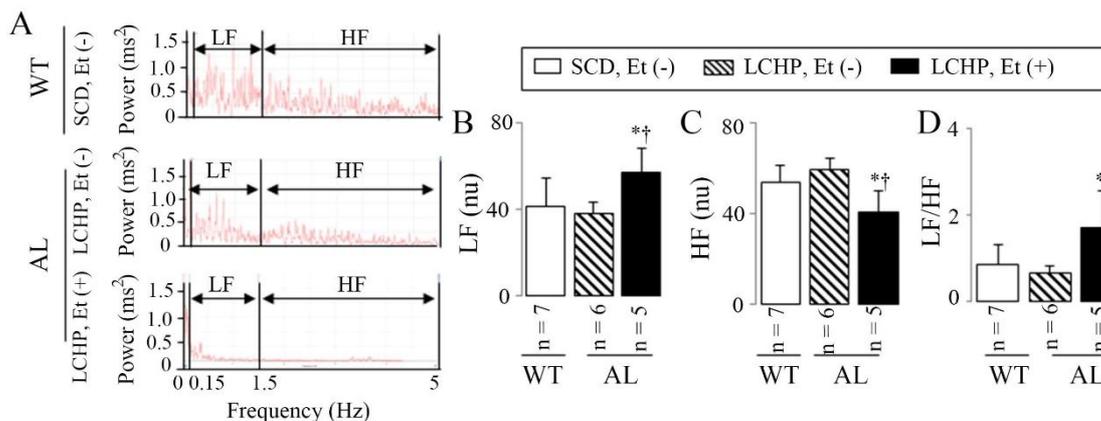


図5 アルコールとLCHP食併用による心臓交感神経の活性化。

WT:野生型マウス,AL:先天性高脂血症マウス,SCD:標準飼料,LCHP:低炭水化物・高蛋白質,Et(アルコール).A:心臓交感神経活性化を反映する心拍変動の典型写真.LF(低周波数パワー):交感神経活性化のマーカ, HF(高周波数パワー):迷走神経活性化のマーカ, LF/HF:心臓自律神経バランスのマーカ.B-D:心拍変動解析定量評価の結果.各群の値は平均値±標準偏差を表す.* $p < 0.05$ vs. WT + SCD, Et(-), † $p < 0.05$ vs. AL, LCHP+ Et(-).

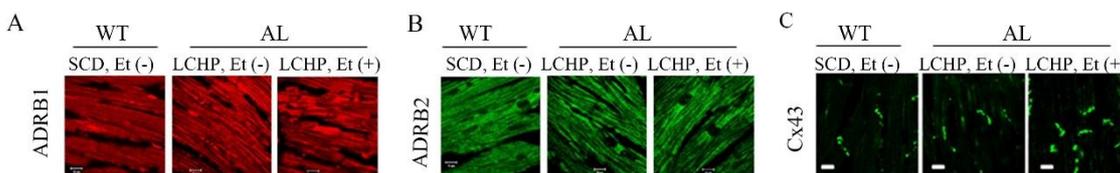


図6 アルコールとLCHP食併用による心筋β受容体およびギャップ結合蛋白質産生の増加.WT:野生型マウス,AL:先天性高脂血症マウス,SCD:標準飼料,LCHP:低炭水化物・高蛋白質,Et(アルコール).A:心筋β受容体1(ADRB1)の典型写真.B:心筋β受容体2(ADRB2)の典型写真.C:ギャップ結合蛋白質であるCx43の典型写真.

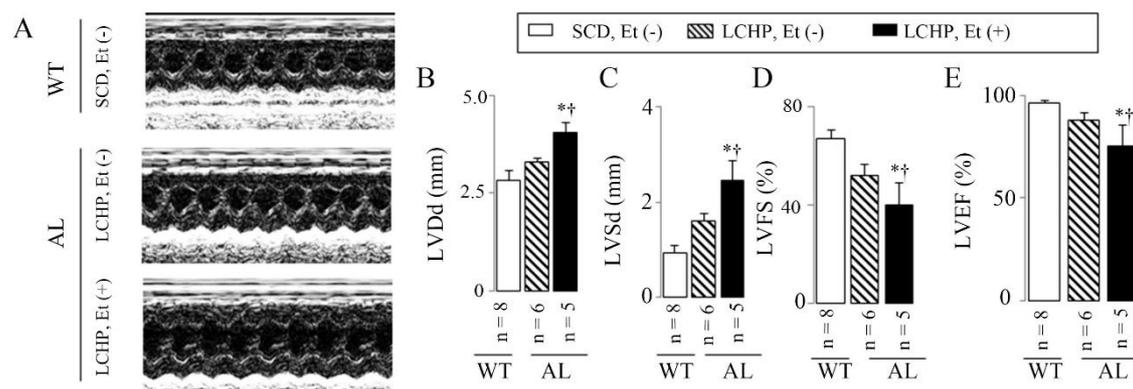


図7 アルコールとLCHP食併用による左心機能の低下。

WT:野生型マウス,AL:先天性高脂血症マウス,SCD:標準飼料,LCHP:低炭水化物・高蛋白質,Et(アルコール).A:心機能を反映する心エコーの典型写真.B:左心室拡大を反映するLVDd(左心室拡張末期内径)定量評価の結果.C:左心室拡大を反映するLVSD(左心室収縮末期内径)定量評価の結果.D:左心機能を反映するLVFS(左室内径短縮率)定量評価の結果.E:左心機能を反映するLVEF(左室駆出率)定量評価の結果.各群の値は平均値±標準偏差を表す.* $p < 0.05$ vs. WT + SCD, Et(-), † $p < 0.05$ vs. AL, LCHP+ Et(-).

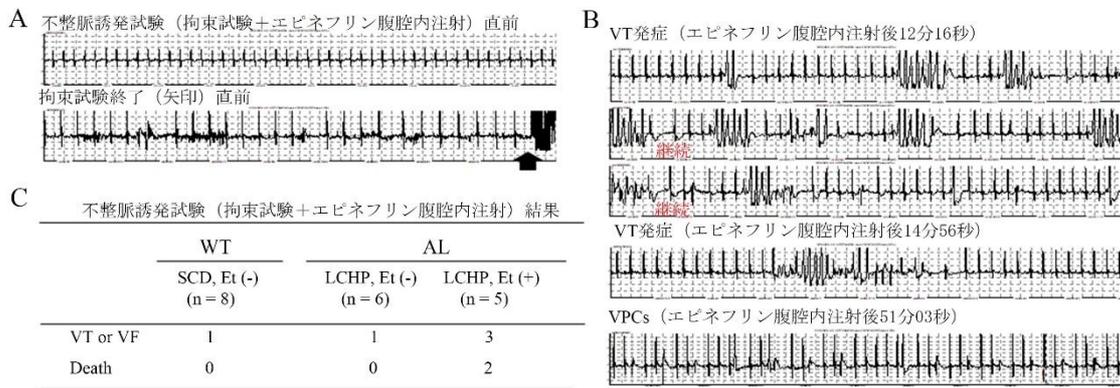


図8 アルコールとLCHP食併用による致死的不整脈感受性の増加。

WT:野生型マウス,AL:先天性高脂血症マウス,SCD:標準飼料,LCHP:低炭水化物・高蛋白質,Et(アルコール).AとB不整脈誘発試験(拘束試験+エピネフリン腹腔内注射)典型心電図,VT:心室頻拍.VF:心室細動.VPCs:心室期外収縮.C:不整脈誘発試験結果.

<引用文献>

1. 東京都監察医務院平成26年版統計データベース.
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/kansatsu/>.
2. 厚生労働省2015年報告.
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei15/index.html>
3. 劉金耀,他.マウスにおける低炭水化物・高タンパク質とアルコールの動脈硬化進展への影響.アルコールと医学生物学 2014;33:102-104.
4. 室原豊明.血管内皮前駆細胞と病態診断.心臓.2010;42:1569-1574.
5. 劉金耀,他.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単球走化性タンパク質-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,三重
6. Liu J and 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.
7. Liu J et al. Carvedilol attenuates the progression of alcohol fatty liver disease in rats. Alcohol Clin Exp Res. 2012;36:1587-99.
8. Yuzo Furuta, et al. Alcohol consumption in combination with an atherogenic diet increased indices of atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double-knockout mice. Alcohol Clin Exp Res. 2019;43:227-242.
9. 劉金耀,他.動脈硬化進行におけるアルコールおよび動脈硬化誘発食の相乗効果が血管内皮前駆細胞とその調節因子にもたらす影響.アルコールと医学生物学 2018;37:10-14.
10. Liu J. Alcohol consumption combined with dietary low-carbohydrate/high-protein intake increased the left ventricular systolic dysfunction risk and lethal ventricular arrhythmia susceptibility in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double-knockout mice. Alcohol. 2020;89:63-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Jinyao Liu ¹ Ayako Himemiya-Hakucho, Xu Liu, Koichi Yoshimura and Tatsuya Fujimiya	4. 巻 5
2. 論文標題 The chronic complex stress combined atherogenic diet accelerates the process of atherosclerosis in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Integrative Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15761/IMM.1000338	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 Yuzo Furuta, Jinyao Liu, Ayako Himemiya-Hakucho, Koichi Yoshimura, and Tatsuya Fujimiya	4. 巻 43
2. 論文標題 Alcohol Consumption in Combination with an Atherogenic Diet Increased Indices of Atherosclerosis in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor Double-Knockout Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH	6. 最初と最後の頁 227-242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/acer.13925	査読の有無 有
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 劉 金耀 富田 周作 姫宮彩子 藤宮 龍也	4. 巻 37
2. 論文標題 動脈硬化進行におけるアルコールおよび動脈硬化誘発食の相乗効果が血管内皮 前駆細胞とその調節因子にもたらす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アルコールと医学生物学	6. 最初と最後の頁 10-14
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 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 Liu Jinyao	4. 巻 89
2. 論文標題 Alcohol consumption combined with dietary low-carbohydrate/high-protein intake increased the left ventricular systolic dysfunction risk and lethal ventricular arrhythmia susceptibility in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alcohol	6. 最初と最後の頁 63~74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alcohol.2020.07.003	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 アルコールと低炭水化物高蛋白質食の慢性併用がマウス大動脈壁中の血管内皮前駆細胞にもたらす影響
3. 学会等名 第55回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 飲酒がアンバランスな栄養素摂取による左心機能障害と致死的不整脈感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 アルコールと低炭水化物高蛋白質飼料同時投与がマウス左心機能障害と致死的不整脈発症のリスクに及ぼす影響
3. 学会等名 第54回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 慢性ストレスによる心臓自律神経機能失調と 致死性不整脈発症リスクの増加に関する基礎研究
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liu J, Himemiya-Hakucho A, Fujimiya T
2. 発表標題 The chronic complex stress combined with atherogenic diet accelerates the process of atherosclerosis in mice.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu J, Furuta Y, Himemiya-Hakucho A
2. 発表標題 Synergy of ethanol and atherogenic diet consumption accelerates the process of atherosclerosis via the shift of aortic oxidative stress and anti-oxidative stress balance in hyperlipidemia mice.
3. 学会等名 19th World Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 金耀, 富田周作, 姫宮彩子, 藤宮龍也
2. 発表標題 動脈硬化進行におけるアルコールおよび動脈硬化誘発食の相乗効果が血管内皮前駆細胞とその調節因子にもたらす影響
3. 学会等名 第37回アルコール医学生物学研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 金耀, 姫宮彩子
2. 発表標題 アルコールおよび動脈硬化誘発食の相乗効果が血管壁再構築と関連する内皮細胞及び平滑筋細胞にもたらす影響
3. 学会等名 平成30年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 低炭水化物・高蛋白質飼料とアルコール併用による動脈硬化の進展：高酸化ストレス病態を介する内皮機能障害
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 肝星細胞交感神経活性化を標的としたアルコール性肝機能障害の解明
3. 学会等名 第52回日本アルコール・アディクション医学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 Hyperactivity of adrenal gland and the excessive aortic inflammatory response accelerate the process of atherosclerosis in mice with chronic complex stress
3. 学会等名 GW-ICC2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 動脈硬化進行におけるアルコールと低炭水化物高蛋白質食の相乗効果と血管壁内酸化ストレス病態の関与
3. 学会等名 第34回日本法医学会学術中四国地方集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 劉 金耀
2. 発表標題 動脈硬化進行におけるアルコールおよび低炭水化物高蛋白質食の相乗効果が血管内皮前駆細胞とその調節因子にもたらす影響
3. 学会等名 第37回アルコール医学生物学研究会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>飲酒・栄養アンバランス食事および慢性心理的ストレスが動脈硬化症の進行に及ぼす影響の解明 http://kenkyu.yamaguchi-u.ac.jp/src/index.php?id=18</p>

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	藤宮 龍也 (FUJIMIYA TATSUYA) (50219044)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	姫宮 彩子(白鳥彩子) (HIMEMIYA-HAKUCHO AYAKO) (90593301)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

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