

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20351

研究課題名(和文)急性アルコール中毒時の敗血症増悪機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a exacerbation mechanism of sepsis in acute ethanol intoxication

研究代表者

粕田 承吾 (Kasuda, Shogo)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70434941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：急性アルコール中毒時の敗血症増悪機構について、急性期タンパクpentraxin 3 (PTX3)に着目し、解明した。PTX3は、炎症時にTNF- α に刺激により、JNKのリン酸化シグナルを介して速やかに産生される。PTX3は血管内皮細胞保護作用を有し、敗血症時の急性肺障害を軽減する役割を果たす。アルコールは、TNF- α の産生ならびにJNKのリン酸化を抑制することにより、PTX3産生を阻害することをin vivo およびin vitroの実験系を用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We elucidated a mechanism of exacerbation mechanism of sepsis during acute ethanol intoxication in view of pentraxin 3 (PTX3) production. PTX3 is an acute phase protein, whose levels increase rapidly in response to inflammation. PTX3 production is triggered by TNF- α and is mediated by JNK phosphorylation. As PTX3 exerts protective effects on endothelial barrier integrity, it mitigates acute lung injury during sepsis. We demonstrated that ethanol suppresses de novo PTX3 synthesis via two mechanisms; suppression of TNF- α production and inhibition of JNK phosphorylation.

研究分野：血液凝固－炎症反応連関からみた敗血症増悪機構

キーワード：敗血症 急性アルコール中毒

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性アルコール中毒患者の外傷による死亡率の高さは、救急医療現場において重大な問題である。これら外傷患者では敗血症が容易に進展し、死亡率の上昇に寄与している。しかし、エタノールによる敗血症増悪機構は明らかとなっておらず、その解明は社会医学の観点からも望まれていた。

(2) 急性期タンパクの1種である pentraxin 3 (PTX3) は、pentraxin superfamily に属する long pentraxin である。Short pentraxin に分類される C reactive protein (CRP) は炎症反応のマーカーとして臨床現場で頻用されている。PTX3 は炎症早期に血管内皮細胞を含む全身の細胞から産生され、異物侵襲に対する免疫システムを作動させる。PTX3 は、主に炎症性サイトカイン TNF- α の刺激により、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) のリン酸化シグナルを介して産生される。

(3) PTX3 は他にも血管内皮細胞を保護することにより、敗血症や急性肺障害の増悪を防ぐ作用があることが示唆されている。

(4) 我々は、急性アルコール中毒時には、PTX3 の産生能力が何らかの変容を受け、敗血症を増悪させているのではないかとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

エタノールが、PTX3 の産生に及ぼす影響を検討し、そのメカニズムを解明することにより、今後の敗血症治療に役立つ知見を得る。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* の実験では、C57BL/6 マウス (オス、10~12 週齢) を用いた。6 g/kg の 32% エタノールを経口投与することにより、急性アルコール中毒を実験的に作製した。対照群として、生理食塩水を投与したマウスを用いた。

(2) マウス敗血症モデルを作製するために、cecal ligation and puncture (CLP) 法を用いた。エタノールもしくは生理食塩水投与後 30 分で、イソフルラン麻酔科において CLP 法を施行した。

(3) 一定時間後、心臓穿刺により採血し、クエン酸ナトリウムで抗凝固したのち、遠心操作で血漿サンプルを得、各種アッセイに用いた。また、肺を摘出し、これも各種アッセイに用いた (後述)。

(4) 肺血管透過性アッセイは、CLP 後 4 時間で頸静脈より Evans blue を注入し、30 分循環させたのち、肺を摘出した。摘出肺をホルムアミドに浸け、60 \times で一晩ホルムアミドを抽出し、吸光度を測定した。

(5) *in vitro* の実験には、human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) を用いた。

(6) HUVECs を LPS \pm エタノールで刺激し、Transwell による透過性アッセイを行った。

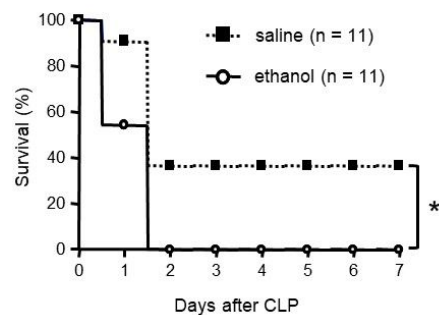
(7) 得られた肺組織や HUVEC のサンプルを用いて、PTX3 の mRNA についてリアルタイム PCR を行った。

(8) マウス血中あるいは、HUVECs の培養上清を用いて、TNF- α および PTX3 の濃度を ELISA 法を用いて測定した。

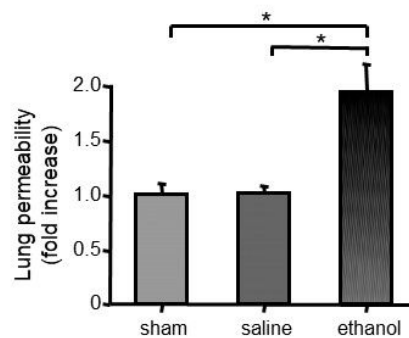
(9) 得られた肺組織や HUVECs のサンプルを用いて、JNK のリン酸化を western blot 法を用いて評価した。

4. 研究成果

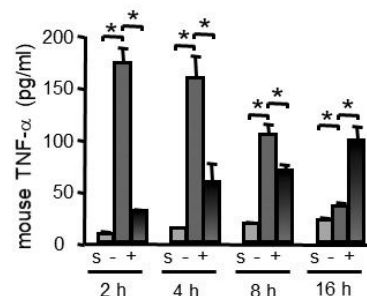
(1) 急性アルコール中毒は、敗血症による死亡率を上昇させることを確認した。



(2) エタノールは敗血症時の肺の透過性を亢進させた。

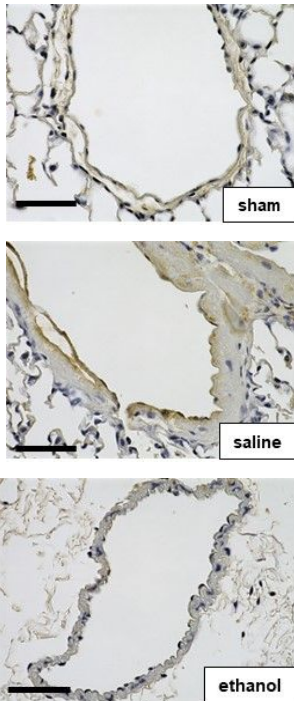


(3) エタノールは敗血症マウスの TNF- α の発現を一過性に抑制する。s: sham, (-): saline, (+): ethanol

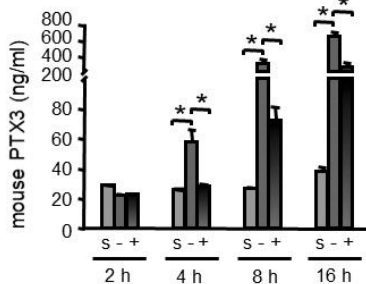


エタノールによる PTX3 産生抑制作用は、TNF- の産生を抑制するものである。

(4) エタノール投与により、敗血症マウス肺における PTX3 の発現は抑制された。

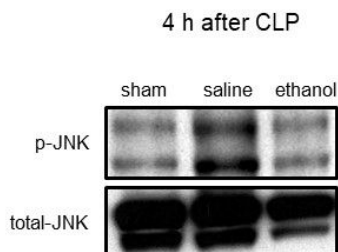


(5) エタノールは、敗血症時の PTX3 の血中濃度を低下させる。この抑制は、TNF- 産生の一過性抑制が消失した後でも持続する。

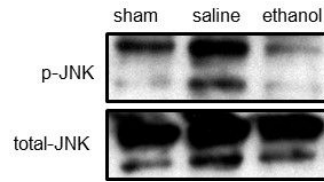


このことから、エタノールによる PTX3 産生抑制作用は、TNF- の産生を抑制することのみでは説明できない。ほかの機序が介在する可能性が示唆される。

(6) エタノールは、CLP 施行の 4 時間および 16 時間後においても、肺における JNK のリン酸化を阻害した。

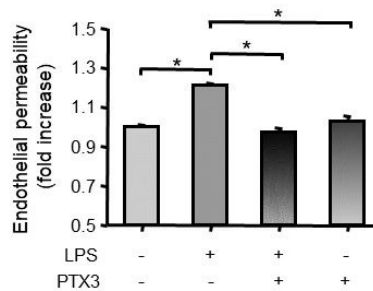


16 h after CLP



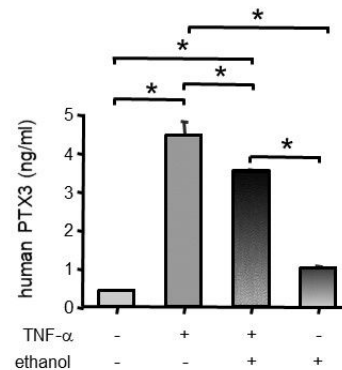
エタノールは、長時間にわたって JNK のリン酸化を阻害する。

(7) エタノールは LPS による HUVECs の透過性亢進を増大させる。

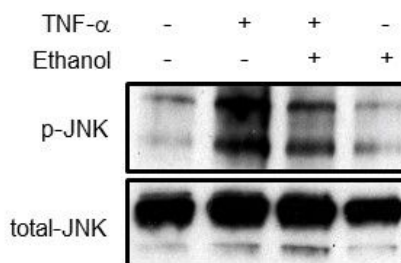


エタノール (20 mM) は、*vitro* の実験系でも血管内皮障害を増悪させることを確認した。

(8) エタノール (20 mM) は、外来性の TNF- 存在下でも、HUVECs における PTX3 産生を抑制する。



(9) エタノール (20 mM) は外来性 TNF- 存在下でも HUVECs における JNK のリン酸化を阻害した。



(10) 以上のことから、エタノールは 2 つの機序で PTX3 産生を阻害していることが明らかとなった。第一は、TNF- α の産生を抑制すること、第二は、JNK のリン酸化を阻害することである。

エタノールが免疫系を攪乱し、炎症性サイトカインの産生を抑制することは古くから知られていた。我々の実験でも、実際に TNF- α の産生は抑制されたが、その効果は一過性であった。TNF- α の産生が復活してきているにもかかわらず、PTX3 の産生が引き続き抑制されている点が、本実験において特に注目すべき点であり、ここから新たな知見を引き出すことができた。

我々の実験結果は、エタノールはかなりの低濃度 (20 mM) でも JNK のリン酸化をすることを確認した。すなわち、アルコールを多量に摂取して、相当時間が経っていたとしても、PTX3 の産生は抑制されるということである。

近年の研究で、PTX3 は自然免疫を活性化させるだけではなく、ヒストンと結合する作用があることが指摘されている[1]。ヒストンは、細胞死の際に核から放出され、いわゆる死のメディエーターとして、重篤な血管内皮傷害を惹起し、敗血症の死亡率上昇に大きくかかわっている。PTX3 はヒストンと結合することにより血管内皮細胞傷害を軽減し、むしろこちらの役割のほうが敗血症病態を軽減するのに重要であると言われている。PTX3 は炎症早期に速やかに産生され、血管内皮を保護しているものと思われる。我々の実験でも、敗血症モデル作製後、わずか 4 時間で、血中に PTX3 が検出されている。エタノールは、この炎症早期の PTX3 の産生を阻害することによって、血管内皮細胞傷害を増悪し、炎症の増幅をしているものと思われた。

エタノールによる JNK のリン酸化における影響については、細胞種や、使用するアゴニストなどによってまちまちである。今回、我々は、血管内皮細胞におけるエタノールの JNK のリン酸化阻害作用を報告した。我々の知る限りでは、初めての報告である。

本研究は、エタノールの生体に対する多彩な悪影響を明らかにしたものである。社会医学的にも臨床医学的にも、アルコールの過量摂取に対する健康被害を訴えるうえで重要であると考えられる。

<引用文献>

[1] Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, et al.

Protective effect of long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cytotoxicity in sepsis. *Science Signaling*. 2014; 7: ra88.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kasuda S, Kudo R, Yuui K, Sakurai Y, Hatake K. Acute ethanol intoxication suppresses pentraxin 3 expression in a mouse sepsis model involving cecal ligation and puncture. *Alcohol*. 2017; 64: 1-9.

〔学会発表〕(計 1 件)

粕田承吾, 工藤利彩, 勇井克也, 今井裕子, 中田匡俊, 中西真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. 急性アルコール中毒による敗血症増悪機構の検討. 第 100 次 日本法医学会学術全国集会, 東京, 2016

6 . 研究組織

(1)研究代表者

粕田 承吾 (KASUDA, Shogo)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70434941

(2)研究協力者

工藤 利彩 (KUDO, Risa)

勇井 克也 (YUUI, Katsuya)

櫻井 嘉彦 (SAKURAI, Yoshihiko)

羽竹 勝彦 (HATAKE, Katsuhiko)