

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07131

研究課題名(和文)炎症血管におけるアルコールの機序～トロンボキサンA2による収縮反応の観点から～

研究課題名(英文)Effect of alcohol in the inflammatory blood vessel

研究代表者

勇井 克也 (Yuui, Katsuya)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50783875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショックに関連する様々な病態は、末梢循環不全を来す。我々は、エンドトキシンショックの初期症状であるwarm shock時に起こる循環亢進に及ぼすエタノールの作用について検討を行った。ラット上腸間膜動脈を摘出し、収縮のピーク時にIL-1 暴露したところ、一過性の収縮反応を示した。慢性エタノール摂取群の一過性収縮は、対照群より増大した。慢性エタノール摂取群と対照群において、一過性収縮はトロンボキサンA2受容体の阻害剤により抑制された。エタノールは、IL-1 暴露により、一過性の血管収縮を強化して、以降の緩和を抑制した。エタノールは、エンドトキシンショックにおいて血管への保護作用を持つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Various pathological conditions associated with shock exhibit peripheral circulatory failure. The effect of ethanol on hyperdynamic circulation in the superior mesenteric artery (SMA) was examined in warm shock, which occurs in the earliest phase of endotoxin shock. Vascular rings isolated from rat SMAs showed transient contraction in response to exposure to interleukin (IL)-1 during peak contraction. Transient contraction in chronic ethanol-fed rats was further increased compared to that in a control group. In both control and chronic ethanol-fed groups, transient contraction induced by IL-1 was suppressed by a thromboxane A2 receptor antagonist.

Ethanol enhanced transient contraction in response to IL-1 exposure and suppressed subsequent relaxation. Ethanol might have a protective effect on vessels in endotoxin shock.

研究分野：アルコール医学

キーワード：contraction relaxation endothelial cell alcohol transient

1. 研究開始当初の背景

重篤な感染症では、エンドトキシンにより炎症細胞が刺激され、Interleukin-1 β (IL-1 β)などの炎症にかかわるサイトカインを放出し、Inducible nitric oxide synthase (iNOS) が血管や心筋に発現し、動脈の炎症や内皮細胞の障害を引き起こすことが報告されている。NOが産生されることにより、エンドトキシンショック、敗血症などが引き起こされる。一方、Ajisakaらによると、低濃度エタノールはエンドトキシンショックに対し保護的作用を持つと考え、Greenbergらは、エタノールが、エンドトキシン症の初期症状である体液性変化や低血圧をマスクすることにより、罹患率や死亡率を増加させる恐れがあるとしている(引用文献 1,2)。

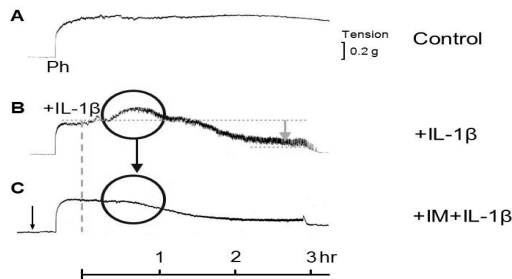


図1 IL-1 β 暴露による弛緩反応に対する阻害剤の影響

我々もこれまでに、IL-1 β 暴露した血管に対するエタノールの作用を示してきた。図 1-B の IL-1 β 暴露すると、1hr で収縮を強め、3hr 後に弛緩反応を示した。この弛緩反応は、各種阻害剤を用い、iNOS 発現による反応と示し、エタノールが iNOS 発現を抑え、弛緩反応を抑制することも示した。

一方、図 1-A のようにフェニレフリン (Ph) による収縮反応は一定を維持し、IL-1 β 暴露 1hr 後に見られた Ph 収縮の増大 (図 1-B の○印) は、トロンボキサン A₂ (TXA₂) 阻害剤である Indomethacin (IM) の共存により消失したので (図 1-C の○印) 図 1-B の○印の収縮は、TXA₂ を介した反応と考えられた。しかし、TXA₂ を介した収縮反応に関する詳細な検討は行っていない。そこで今回、TXA₂ を介した収縮反応に着目し予備的に検討した結果、エタノールが、収縮物質の一つでありシクロオキシゲナーゼ (COX) から産生される TXA₂ を介した収縮反応をさらに増大させることを確認した。これは、IL-1 β 暴露血管の弛緩反応の結果と合わせると、エタノールが弛緩反応に対し、前段階で TXA₂ を介した収縮を増大させることにより血管機能の恒常性の維持、もしくは生体防御的な反応を

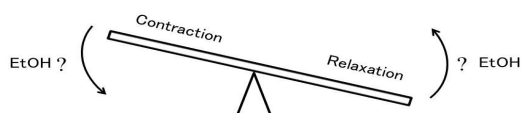


図2 収縮・弛緩のバランス に対するエタノールの影響

引き起こす可能性がある と推察される(図2)。

2. 研究の目的

本研究は、in vitro においてラットから摘出した血管にアルコールを暴露した急性実験と、in vivo においてラットに一定期間アルコールを摂取させることによって血管の炎症を引き起こす慢性実験のそれぞれについて血管反応性がどのように変化しているのかを検討することを目的とする。これらを解明することは、多量飲酒者の循環病態を探る上で重要である。

血管機能には収縮と弛緩があり、血管内皮細胞などから産生される生理活性物質により、血圧・血流や生体の恒常性を保持している。収縮には平滑筋細胞に直接影響して起こる収縮と、内皮細胞由来血管収縮因子 (EDCF) を介した収縮がある。EDCF には、エンドセリン-1 (ET-1) や TXA₂ などがあり、正常な状態では弛緩因子が優位だが、炎症や低酸素など病態では、これらの収縮因子が放出され動脈硬化の発生・進展に関与する。そして、血管平滑筋の収縮反応には、細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度依存性収縮反応と、Ca²⁺感受性亢進による細胞内 Ca²⁺濃度非依存性収縮反応 (異常収縮) がある。通常の収縮は、細胞内 Ca²⁺濃度依存性であり、Ca²⁺濃度の上昇に伴い、カルモジュリン (CaM) との共同で、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 活性化を介する収縮が起こる。また、異常収縮は Rho-kinase を介して引き起こされるが、Rho-kinase の活性化に関与する因子としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) や TXA₂ が注目を浴びている。

しかし、TXA₂ 受容体 (TP) は内皮細胞と平滑筋のいずれにも局在することから、TXA₂ を介した収縮反応の機序については、未だ明確な知見が得られていない。さらに、エタノールと TXA₂ の関連性についての報告はない。これまでに、アルコールと血管の反応性の検討には主に、正常 Wistar 系雄性ラットの摘出血管を用い、等尺性張力の測定により、大量飲酒を想定した in vitro での実験を行ってきた。血管機能に及ぼすエタノールの作用についての急性実験 (摘出した血管を用いてアルコールの影響を検討) と慢性実験 (一定の期間アルコールを投与し、in vivo でアルコールに暴露後、摘出した血管を用いて検討) を行ってきた。これらにより、心血管病イベントの発症機序について、収縮反応における TXA₂ 機構を明らかにすることと、炎症血管応答におけるエタノールの影響を明らかにすることは、服薬指導と同じく、テーラーメイド医療として個々の患者への飲酒指導上に重要である。

3. 研究の方法

正常ラットを用いた血管収縮実験 (急性実験) ラットから摘出した上腸間膜動脈を用いて、IL-1 β 暴露による TXA₂ の収縮反応に対する、エタノールの影響を等尺性張力測定する。

(1) Wistar 系雄性ラット(体重約 300 g)から摘出した上腸間膜動脈のリング状標本を作製。また内皮細胞の影響を除外する必要がある場合は、ステンレスワイヤーにて内皮細胞を剥離した標本を作製した。

(2) 恒温バス内(37℃、95%O₂-5%CO₂ gas を通気した栄養液で満たし pH7.4 に調整したもの)に血管標本を懸垂し、一定の張力を負荷し安定させた後、IL-1β 暴露時の TXA₂ を介した収縮反応(図 3 の○印)におけるエタノールの影響について検討するため、受容体

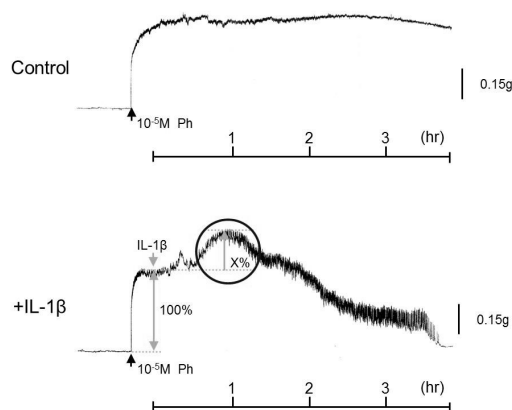


図 3 IL-1β 暴露による収縮率の算出方法

TP 阻害剤である SQ29548 などの様々な阻害剤を添加し、サイトカイン(IL-1β)暴露による TXA₂ を介した収縮反応に対する影響を検討した。さらに内皮細胞の有無やエタノール共存下における TXA₂ を介した収縮反応に対する影響を検討した。

慢性アルコール摂取ラットを用いた血管収縮実験(慢性実験)

(1) Wistar 系雄性ラット(9 週齢)に 10%エタノールを含む液体飼料(Lieber 食)を 10 週間投与し、慢性アルコール摂取ラットを作製し、エタノール群とした。また、エタノールを含まない同カロリーの液体飼料(エタノールを等カロリーの炭水化物で置き換えた試料)を 10 週間投与し、総摂取カロリーを合わせたラットを対照群とした。両群の各ラットの体重を毎週測定し、10 週間飼育した後、上腸間膜動脈を摘出した。

(2) 摘出した上腸間膜動脈を用い、張力測定用に輪状標本作製し、95%O₂-5%CO₂ を通気した 37℃ の恒温バスに標本を懸垂し、0.2g の張力を負荷し安定後、等尺性張力変化を測定した。懸垂した標本に収縮惹起剤であるフェニレフリンを投与し、急性実験の方法と同様に、収縮反応に対する影響について検討を行った。

4. 研究成果

正常 Wistar 系雄性ラットの上腸間膜動脈を用い、血管機能に及ぼすエタノールの作用を等尺性張力の測定により収縮反応の変化について検討した。これまでに、IL-1β を暴露した血管に対するエタノールの作用を示してきた。フェニレフリンによる収縮が一定し

ているところに IL-1β 暴露すると、1h で収縮は増大し、一過性の収縮を示した。さらに、3h 後には収縮は暴露前より減退し、弛緩反応へ転じた。3h 後の弛緩反応は、各種阻害剤を用いて iNOS 発現による弛緩反応であることを明らかにした。また、エタノールを前処置すると iNOS 発現を抑え、弛緩反応を抑制することも示した。一方、IL-1β 暴露 1h 後に見られたフェニレフリン収縮の増大は、TXA₂ 阻害剤であるインドメタシンの共存により消失した。このことより収縮の増大は、TXA₂ を介した反応と示唆された。さらに、TXA₂ を産生させるシクロオキシゲナーゼ(COX-1、COX-2)の阻害剤である SC-560、NS-398、および内皮細胞の剥離処理により収縮の増大が抑えられた。急性実験において、アルコールによる TXA₂-TP を介した収縮の増強が考えられた。

また、Wistar 系雄性ラット(10 週齢)に 10%エタノールを含んだ液体飼料(Lieber 食)を 10 週間投与し、慢性アルコール摂取ラットを作製し、上腸間膜動脈を摘出し、張力を測定した。慢性エタノール群とコントロール群の各群の収縮反応下に IL-1β を追加し、両群比較により TXA₂ を介した収縮反応へ及ぼす慢性エタノール摂取の影響について検討を行った。慢性エタノール群がより一過性の収縮反応を強く示した。また慢性エタノール群は急性実験におけるエタノールの弛緩反応の抑制と同様に弛緩反応を示さなかった。この一過性の収縮と IL-1β 暴露血管の弛緩反応の結果をふまえると、慢性実験において、内皮細胞を介した iNOS による弛緩反応の増大が考えられ、これに伴う代償機構として TXA₂ が誘導され、血管内皮細胞もしくは平滑筋細胞に分布する TP の活性化を介する収縮が引き起こされると考えられた。そして、エタノール前処置により、内皮細胞の COX から産生される TXA₂ を介した収縮反応をさらに増大させる傾向にあった。つまり、エタノールが IL-1β 暴露 3h 後の弛緩反応に対し、前段階で TXA₂ を介した収縮を増大させることにより血管機能の恒常性の維持、もしくは生体防衛的な反応を引き起こすことを示唆した。本研究で得られた結果は、血管の収縮・弛緩の維持・恒常に重要な NO と TXA₂ との「クロストーク」の解明する手がかりとなり、飲酒による循環器関連の突然死や高血圧の発症の機序などの病態の解明に役立つものと考えられる。

引用文献

Ajisaka et al. Effects of acute low-dose ethanol on inflammatory reactions to endotoxin-induced shock in rats *J Toxicol Sci* 2012; 37(3): 649-654.

Greenberg et al. Ethanol suppresses endotoxin but not platelet activating factor-induced hypotension and nitric oxide. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20(7): 1260-1268.

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 3 件)

Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Nakata M, Imai H, Nakanishi M, Hatake K. Effect of ethanol on capsaicin-induced nerve-mediated vasorelaxation in rat arteries. Rom J Leg Med, 25, 1-7, 2017. Doi. 10.4323/rjlm.2017.1 査読有

Nakata M, Kasuda S, Yuui K, Kudo R, Hatake K. Relevance of hemolysis-induced tissue factor expression on monocytes in soft clot formation in alcohol-containing blood. Leg Med (Tokyo), 25, 83-88, 2017. Doi. org/10.1016/j.legalmed.2017.01.011 査読有

Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K. Ethanol attenuates vasorelaxation via inhibition of inducible nitric oxide synthase in rat artery exposed to interleukin-1 β . Human and Experimental Toxicology, 35(9), 938-945, 2016. Doi. 10.1177/0960327115611944. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Hatake K. The role of inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelium-dependent relaxation in the superior mesenteric arteries of ethanol-fed rats. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine and 96th Annual Conference German Society of Legal Medicine, Dusseldorf, Germany, p353, 2017 査読無

Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K. Inhibition of IL-1 β -mediated gradual vasorelaxation in the superior mesenteric arteries of ethanol-fed rats. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine and 96th Annual Conference German Society of Legal Medicine, Dusseldorf, Germany, p388, 2017 査読無

勇井克也, 工藤利彩, 粕田承吾, 今井裕子, 中田匡俊, 中西真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. Phenylephrine 収縮下における iNOS 発現および Ethanol の影響. 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 岐阜, 2017 査読無

工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦. カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)による神経性弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響. 第 51 回アルコール・アディクション, 東京, 2016 査読無

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 査読無

勇井克也, 工藤利彩, 羽竹勝彦. 血管内皮細胞依存性弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響. 第 51 回アルコール・アディクション, 東京, 2016 査読無

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~legalmed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勇井克也 (YUUI, Katsuya)

奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50783875

(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

()