

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K09273
研究課題名(和文) 新規メディエーター誘導型内皮依存性過分極因子を介するエタノールの血管機能調節機構

研究課題名(英文) Cardiovascular regulation of ethanol by the new mediator, inducible endothelium-dependent hyperpolarizing factor

研究代表者
工藤 利彩 (KUDO, RISA)
奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20347545
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性エタノール摂取ラットの上腸間膜動脈におけるアセチルコリン(Ach)による血管内皮依存性弛緩に対する誘導型内皮依存性過分極因子(iEDHF)の経路の関与について検討した。この弛緩は、対照群に比べEtOH群で有意に増大し、その差はiEDHF阻害剤によって打ち消された。また、15-L0とsEHタンパク質の発現量は、対照群よりもEtOH群で高値を示したことから、慢性エタノール摂取によるAch誘発性弛緩の増大には、iEDHFの経路が関与していることが明らかとなった。この研究結果は、適切な飲酒中にiEDHFの経路が活性化され、心血管疾患の発症を防ぐのに役立つ可能性があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、適切な飲酒中に血管内皮細胞から誘導型内皮依存性過分極因子(iEDHF)の経路が活性化され、血管弛緩を増大させ、エタノールによる血圧上昇を補償することにより、血液循環の恒常性を維持し、心血管病の発症を防ぐ可能性が示唆された。これは、飲酒量と虚血性心疾患の罹患率がJカーブの関係にあることの裏付けとなっており、心血管病に関しては禁酒に比べ、適量飲酒の方が予防効果を期待できることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The inducible endothelium-dependent hyperpolarizing factor (iEDHF) pathway causes vasorelaxation and maintains circulatory homeostasis in the organs. Although small to moderate amount of ethanol cause vasorelaxation, the involvement of the iEDHF pathway in this process is unknown. Therefore, we studied the effect of iEDHF in acetylcholine (Ach)-induced relaxation in the superior mesenteric artery of rats chronically fed ethanol. Ach-induced relaxation was significantly greater in the EtOH than the control groups. However, it was prevented by iEDHF inhibitors. 15-L0 and sEH protein expression levels were higher in the EtOH than the L-Control group. The increase in Ach-induced relaxation by chronic ethanol consumption was mediated by the iEDHF pathway. This mechanism may compensate for the blood pressure elevation induced by ethanol. This study suggests that iEDHF is induced during proper drinking and may help prevent the onset of cardiovascular conditions.

研究分野：アルコール医学

キーワード：エタノール iEDHF 血管弛緩

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大量飲酒は不整脈、心筋症、高血圧、冠攣縮などの心血管病を誘発することから、アルコールは心血管イベント誘発因子の1つとして知られている。法医学分野においても心疾患や脳血管疾患による突然死に対するアルコールの関与が指摘されている。一方、適量飲酒は血圧の低下、線溶系亢進、HDL-コレステロール上昇等により、心血管病を予防することが知られており、飲酒には良い面と悪い面の二面性がある。また、平成26年6月1日に内閣府により「アルコール健康障害対策基本法」が施行されるなど、これまで以上に適量飲酒に対する社会の意識が高まっている。

我々はこれまで、適量飲酒による心血管病の予防効果に焦点を当て研究を行ってきた結果、慢性的な適量飲酒は、血管内皮細胞依存性過分極因子(EDHF)を介する血管弛緩を増大させることにより、血圧の上昇を抑え、心血管病を予防することが示唆された。血管の機能は、収縮と弛緩のバランスによって調節されているが、適量飲酒では、弛緩が優位となり、血圧上昇を抑え、心血管病の発症および進展を予防するものと推察される。

2. 研究の目的

近年、Campbell WBらにより、EDHFsには、恒常的EDHF(cEDHF)と誘導型EDHF(iEDHF)が存在し、これらが相乗的に作用することにより強力な過分極による弛緩反応を引き起こすことが示された。我々は、既に示した適量飲酒モデルラットにおけるEDHFを介する弛緩反応の増大にもcEDHFのみならずiEDHFの経路が関与するのではないかと仮説を立て、本研究では、適量飲酒モデルラットを用い、これらiEDHFの一連の経路に対するエタノールの詳細な作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 適量飲酒モデルラットの作製

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、慢性エタノール摂取ラット(EtOH群)とした。エタノールを含まない等カロリーの液体飼料(エタノールと等カロリーの炭水化物に置き換えた試料)を10週間投与し、総摂取カロリーを合わせたラットをL-Control群とした。さらに、通常固形食を10週間与えたラットをS-Control群とした。

(2) 血管リング標本の作製と等尺性張力測定

ラットをペントバルビタール麻酔下に頸動脈から失血死させ、上腸間膜動脈(SMA)を摘出し、リング標本作製した。得られた輪状標本を95%O₂-5%CO₂を通気した37°Cの等尺性張力測定装置の恒温バスに懸垂し、0.2gの張力を負荷し安定後、以下の実験に用いた。なお、すべての標本はPGI₂経路の影響を除外するため、indomethacin存在下で検討した。標本に収縮惹起剤としてフェニレフリン(ph)を投与し、収縮が最大に達したところでアセチルコリン(Ach)を段階的に投与し、等尺性張力変化を測定し、dose-response curveを作成した。Achの弛緩反応に対するiEDHF経路の各種阻害剤の影響を3群間で比較検討した。

iEDHF経路の阻害剤として、PLA₂阻害剤; quinacrine、15-lipoxygenase(15-LO)阻害剤; nordihydroguaiaretic acid(NDGA)、PD146176、hydroperoxide isomerase阻害剤; miconazole、soluble epoxide hydrolase(sEH)阻害剤; AUDAを用い、慢性エタノール摂取による弛緩反応の増大が減弱するか検討した。

(3) 血管平滑筋細胞膜の電位測定

血管平滑筋細胞膜の電位変化は、電位感受性色素bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol(DiBAC4(3))を用いて評価した。SMAリング標本を、50nM DiBAC4(3)を含む37°C

の栄養液中で 30 分間保温した後、張力-蛍光同時測定装置内の恒温バスに懸垂し 0.2g の張力を負荷した。標本が安定した後、 $10\ \mu\text{M}$ ph を投与し、収縮が最大に達したところで、 10nM Ach を投与した。DiBAC4(3)の蛍光強度は、Ach 投与の前後に 516nm で測定した。なお、過分極状態では、色素分子（励起波長 490nm ）が細胞膜に集中し、蛍光強度（発光波長 516nm ）が減少するため、蛍光強度の減少は、Ach の投与に応じた過分極レベルを反映する。

(4) iEDHF 関連物質の mRNA 発現解析

RNeasy Mini キット (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用して、各群の SMA サンプルから総 RNA を抽出した。SuperScript RT キット (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) でトータル RNA (5ng) を cDNA に逆転写した。eNOS、15-LO、および iNOS の mRNA 発現量は、TaqMan プローブと各プライマーを用い、qRT-PCR により測定した。Hypoxanthine phosphoribosyl transferase を内因性コントロールとし、mRNA 発現の定量化には $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法を使用した。

(5) iEDHF 関連物質のタンパク発現解析

各群の SMA サンプルを均質化し、遠心分離 ($17,900\text{g}$ 、20 分、 4°C) し、上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。サンプルを PVDF 膜に転写し、ブロッキングした後、iNOS、eNOS、15-LO および sEH に対する一次抗体と反応させた。メンブレンを洗浄し、二次抗体ウサギ IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼと反応させた。膜を洗浄し、免疫反応性タンパク質を ECL Plus を用いた化学発光で検出した。シグナルは、FUSION-SOLO 2 で可視化した。得られたバンドの強度は Image J ソフトウェア 1.47v で決定した。

(6) データ解析

すべてのデータは、平均±標準誤差 (S.E.M.) として表した。有意差検定は、一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey's test を用いて行った。 $P < 0.05$ を統計的有意差とした。

4. 研究成果

(1) Ach による弛緩反応に対する慢性エタノール摂取の影響

各群のラットから摘出した上腸間膜動脈において Ach 投与による弛緩反応を比較したところ、いずれの群においても Ach 濃度依存性弛緩反応を示した。Ach 投与による弛緩率は S-Control 群と L-Control 群の間で類似していたが、EtOH 群で、2 つの対照群よりも有意に弛緩率が増大した。

(2) 慢性エタノール摂取による Ach 弛緩の増大に対する NO および EDHF 経路の関与

EtOH 群における Ach 投与による弛緩率の増大に、どの経路が関与しているのかを明らかにするため、各経路の阻害剤存在下における Ach 投与による弛緩率を 3 群間で比較した (図 1)。まず、indomethacin、apamin、および charybdotoxin 存在下、すなわち Ach 投与による NO の経路を介する弛緩をグループ間で比較したところ、S-Control、L-Control、および EtOH 群の E_{max} (最大弛緩率) は、それぞれ $96.49 \pm 2.05\%$ 、 $97.94 \pm 1.01\%$ 、および $99.19 \pm 0.68\%$ であり、群間の差は見られなかった。次に、indomethacin、nitro-L-arginine (L-NA)、および Carboxy-PTIO 存在下、すなわち Ach 投与による EDHF の経路を介する弛緩をグループ間で比較したところ、2 つの対照群と比較して EtOH 群で大幅に弛緩率が増大した。S-Control、L-Control、および EtOH 群の E_{max} は、それぞれ $84.78 \pm 3.33\%$ 、 $87.74 \pm 3.15\%$ 、および $95.17 \pm 1.44\%$ ($P = 0.021$ vs S-Control 群) を示した。これらの結果から、EtOH 群における Ach 投与による弛緩の増大には、NO 経路ではなく、EDHF の経路が関与することが示唆された。

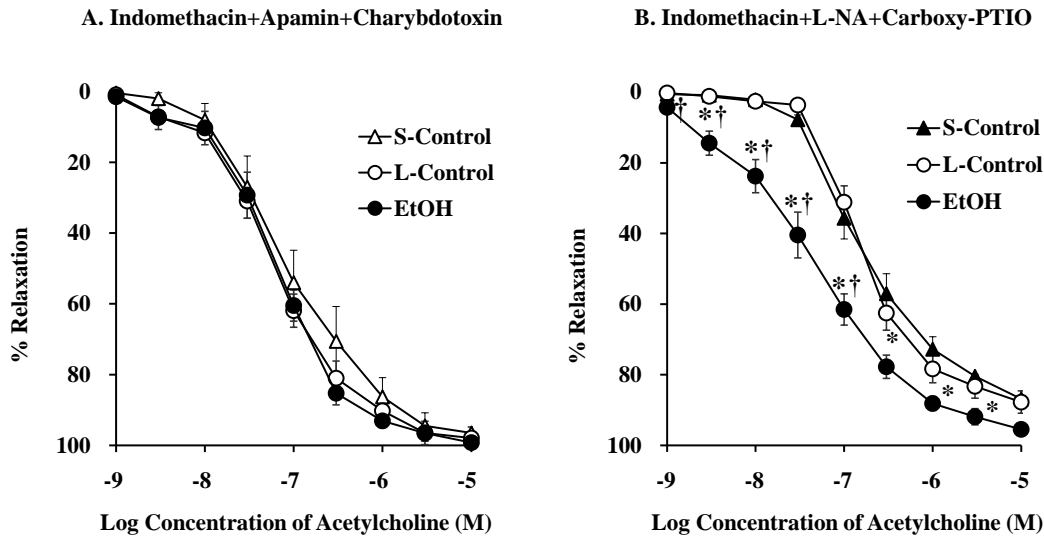


図1. SMAにおける慢性エタノール摂取によるAch弛緩の増大に対するNOおよびEDHF経路の関与。S-Control, L-Control, およびEtOH群のAch投与による弛緩率を表す。(A) 10 μ M indomethacin, 0.1 μ M apamin, 0.1 μ M charybdotoxin存在下におけるAch弛緩を示す(S-control, n=9; L-control, n=7; EtOH, n=7)。(B) indomethacin, 100 μ M L-NA, 300 μ M carboxyPTIO存在下におけるAch弛緩を示す(S-control, n=7; L-control, n=6; EtOH, n=10)。弛緩率は平均値 \pm 標準誤差を示す。†P < 0.05 vs. S-control群, *P < 0.05 vs. L-control群) L-NA, nitro-L-arginine。

(3) 慢性エタノール摂取によるAch弛緩の増大に対するiEDHF経路の関与

次に、EtOH群におけるAch投与による弛緩の増大には、cEDHFとiEDHFのいずれの経路が関与しているのかを明らかにするため、indomethacin、nitro-L-arginine (L-NA)、Carboxy-PTIOの阻害剤にさらにiEDHFの経路の阻害剤を添加し、3群間の弛緩率を比較した(図2)。iEDHFの経路の阻害剤であるquinacrine, NDGA, PD146176, miconazole, AUDAの添加により、群間の差は見られなくなった。これらの結果から、EtOH群におけるAch投与による弛緩の増大には、iEDHFの経路の活性化が関与することが示唆された。

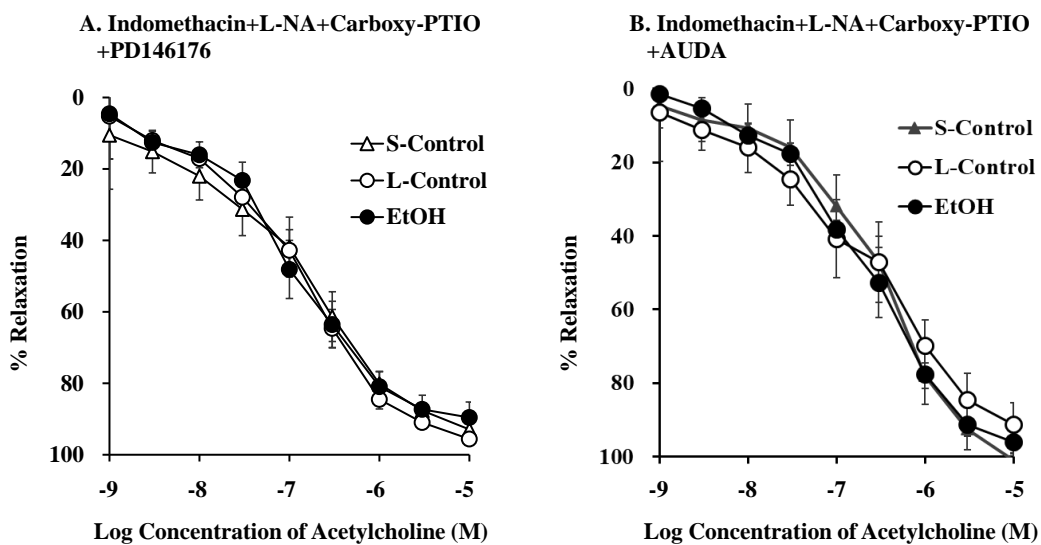


図2. SMAにおける慢性エタノール摂取によるAch弛緩の増大に対するiEDHF経路の関与。S-Control, L-Control, およびEtOH群のAch投与による弛緩率を表す。(A) 10 μ M indomethacin, 100 μ M L-NA, 300 μ M carboxy-PTIO, 10 μ M PD146176存在下におけるAch弛緩を示す(S-control, n=9; L-control, n=12; EtOH, n=10)。(B) 10 μ M indomethacin, 100 μ M L-NA, 300 μ M carboxy-PTIO, 1 μ M AUDA存在下におけるAch弛緩を示す(S-control, n=6; L-control, n=5; EtOH; n=5)。弛緩率は平均値 \pm 標準誤差を示す。L-NA, nitro-L-arginine。

(4) Ach による膜電位の変化に対する慢性エタノール摂取の影響

L-Control 群における 10nM Ach 投与後の DiBAC4(3)の平均蛍光強度を 100%とすると、EtOH 群は有意に低下していた ($93.5 \pm 1.5\%$, $P = 0.018$)。この結果から、EtOH 群における Ach 投与による弛緩の増大には、血管平滑筋の過分極が関与していることが示唆された。

(5) iNOS, eNOS, 15-LO mRNA 発現量に対する慢性エタノール摂取の影響

SMA における iNOS mRNA の発現は見られなかった。EtOH 群の eNOS mRNA 発現量は L-Control 群との間に差はなく、15-LO mRNA 発現量は、L-Control 群よりも EtOH 群で有意に増加した ($P = 0.006$)。

(6) iNOS, eNOS, 15-LO および sEH タンパク質発現に対する慢性エタノール摂取の影響

SMA における iNOS タンパク質の発現は見られなかった。EtOH 群の eNOS タンパク質発現量は L-Control 群との間に差はなく、15-LO ($P = 0.008$) と sEH タンパク質発現量 ($P = 0.305$) は、L-Control 群よりも EtOH 群で増加した (図 3)。これらの結果から、EtOH 群の SMA における Ach 投与による弛緩の増大には、15-LO と sEH の活性化が関与することが示唆された。

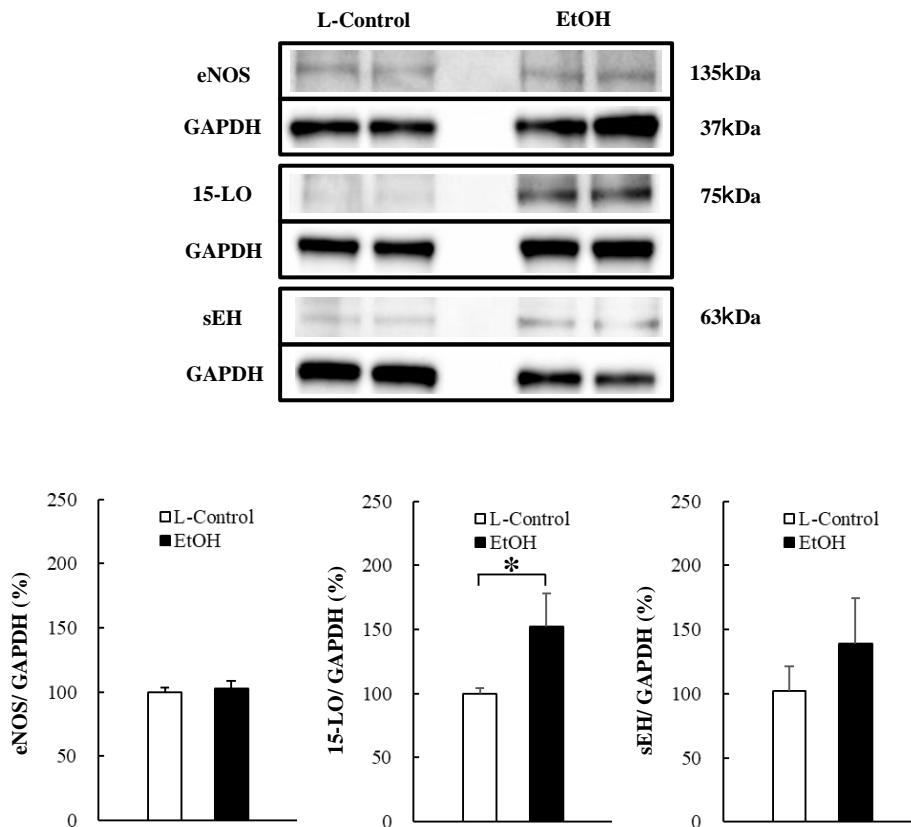


図 3. SMA における eNOS, 15-LO および sEH タンパク質発現に対する慢性エタノール摂取の影響.

各群の SMA における eNOS, 15-LO, and sEH タンパク質発現量を示す (40 μ g/lane). 棒グラフの縦軸は GAPDH で補正した各タンパク質発現量の平均値 \pm 標準誤差を示す ($n = 5-6$). * $P < 0.05$ vs. L-Control group.

(7) まとめ

本研究の結果から、適量飲酒により iEDHF の経路の 15-LO と sEH が活性化され、血管平滑筋の過分極による弛緩を引き起こすことが示唆された。このメカニズムは、飲酒によって引き起こされる血圧上昇を補償するのではないかと考えられる。これは、適切な飲酒中に iEDHF の経路が活性化され、心血管疾患の発症を防ぐのに役立つ可能性があることを示唆している。

<引用文献>

Campbell, W.B., Gauthier, K.M., 2013. Inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor: role of the 15-lipoxygenase-EDHF pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61, 176–18.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K.	4. 巻 865
2. 論文標題 Chronic ethanol consumption enhances inducible endothelium-dependent hyperpolarizing factor-mediated relaxation in the rat artery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 172759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172759	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 Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Nakata M, Imai H, Nakanishi M, Hatake K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Effect of ethanol on capsaisin-induced nerve-mediated vasorelaxation in rat arteries.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rom J Leg Med	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4323/rjlm.2017.1	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 Kasuda S, Kudo R, Yuui K, Sakurai Y, Hatake K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Acute ethanol intoxication suppresses pentraxin 3 expression in a mouse sepsis model involving cecal ligation and puncture.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Alcohol	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alcohol.2017.04.003	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 勇井克也、工藤利彩、粕田承吾
2. 発表標題 エタノール摂取ラットにおけるIL-1 を介した血管反応性について
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 工藤利彩、勇井克也、粕田承吾、羽竹勝彦
2. 発表標題 インスリンによる血管弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響
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 Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Mechanism of enhancement of vascular endothelium-dependent relaxation of superior mesenteric arteries in chronic ethanol-fed rats.
3. 学会等名 The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Acute ethanol intoxication intensifies the release of neutrophil extracellular traps.
3. 学会等名 The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Chronic ethanol consumption enhances endothelium-dependent relaxation in the rat superior mesenteric arteries.
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 Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Influence of chronic ethanol consumption on the pathogenesis of endotoxin shock.
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 工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦.
2. 発表標題 血管系に及ぼす慢性アルコール摂取の影響
3. 学会等名 第53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 2018年

1. 発表者名 Kudo R, Yuui K, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 The role of inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelium-dependent relaxation in the superior mesenteric arteries of ethanol-fed rats.
3. 学会等名 10th International Symposium Advances in Legal Medicine and 96th Annual Conference German Society of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Inhibition of IL-1 β -mediated gradual vasorelaxation in the superior mesenteric arteries of ethanol-fed rats.
3. 学会等名 10th International Symposium Advances in Legal Medicine and 96th Annual Conference German Society of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kudo R, Yuui K, Hatake K.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 20
3. 書名 Forensic Medicine and Human Cell Research. Alcohol and Pathophysiology.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	羽竹 勝彦 (HATAKE KATSUHIKO) (40164842)	奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師 (24601)	
研究 分担者	勇井 克也 (YUUI KATSUYA) (50783875)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	