

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17356

研究課題名(和文)新規収縮物質Up4Aを介する炎症時における一過性血管収縮へのアルコールの影響

研究課題名(英文)Effect of the alcohol on transient vasocontraction at inflammation via new contraction substance Up4A

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、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 β 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 β 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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲酒は、心血管病に対し陰陽の両面の影響があることが知られている。しかし、血管の炎症状態に対するアルコールの作用は不明である。そこで、本研究は血管イベントの発症に対してアルコールがどのように作用するか摘出血管を用い検討を行った。敗血症の初期症状であるwarm shockの炎症血管に対する一過性の収縮と急激な弛緩を連続波形として初めて経時的にとらえた。さらに中等度の慢性アルコール摂取モデルにより、アルコールがwarm shockの際、収縮・弛緩を調整することにより、低血圧を抑え循環血液量の減少を緩和し、多臓器不全を予防する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Various pathological conditions of shock exhibit a peripheral circulatory failure. Focus was placed on the action of ethanol regarding the hyperdynamic circulation of superior mesenteric arteries (SMAs) occurring in warm shock, which is the earliest symptom of endotoxin shock. Vascular rings isolated from rat SMAs were showed the transient contraction by interleukin (IL)-1 β was added at the top of peak contraction. Transient contraction in chronic ethanol-fed rats was further increased compared to that in the control group. In both the control and chronic ethanol-fed groups, transient contraction via IL-1 β was suppressed by thromboxane A2 receptor antagonist.

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

研究分野：血液・血管学

キーワード：Inflammation Contraction Transient reaction Relaxation Shock Alcohol Hyperdynamic state Thromboxane A2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

敗血症は臨床医学が進歩した現在でも、致死率が高く、救急科で遭遇する最も重篤な病態である。これらの死亡率は 40%-50% と非常に高く、主要な医療問題である。敗血症の初期において、エンドトキシンに代表される pathogen-associated molecular patterns PAMPs などは様々な経路を経て炎症性サイトカインを感染部位の周囲に放出させるとも重要な生体防御反応である。しかし、全身炎症が進み菌血症状態に陥ると、過剰で有害な反応に変わる。また、炎症性サイトカインは、誘導型一酸化窒素シンターゼ (iNOS) を活性化し一酸化窒素 (NO) を産生しシクロオキシゲナーゼを活性化しプロスタノイドを産生する。これらの因子が末梢血管を弛緩する。その後、四肢の末梢は暖かい状態となり、いわゆる warm shock (hyperdynamic state) が進行する。warm shock は長く続かず、数時間のうちに cold shock や末梢循環不全へ移行することから、敗血症の早期認知は重要であり、生体恒常性を維持している段階で治療することが必要である。しかし、適切な敗血症の早期診断法が定まっていなく、問題視されている。ここで我々が注目したのは血小板凝集作用以外にも強力な血管収縮作用を持つトロンボキサン A2 (TXA2) である。TXA2 は敗血症の初期病態である warm shock への関与についてはほとんど報告されていない。実際に、これまで、敗血症やエンドトキシンショックの初期症状である warm shock の際に起こる弛緩反応についてサイトカインの Interleukin -1 (IL-1) 暴露による炎症血管の反応性について取り組んできた。そこで、収縮中に IL-1 暴露すると予期しない一過性の収縮反応の増加、3 時間後には急激な弛緩を示した。この現象の推測される要因は、収縮物質の一つである TXA2 を介した収縮反応であると予備的検討ながら考えた。また、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、IL-1 などの炎症にかかわるサイトカインを放出し、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、敗血症性ショック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これらの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。そこで、本研究は血管病のリスク増大や敗血症性ショックの初期である warm shock に対してアルコールがどのように作用するのかを摘出血管を用い検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、炎症血管における収縮・弛緩のバランスを経時的にとらえることのできる手法として、等尺性張力測定装置を用い、in vitro の急性実験(摘出した血管にアルコールの添加による影響を検討)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)を行った。

さらに、炎症血管応答におけるアルコールの役割を解明することは、服薬指導と同じく、オーダーメイド的な個々の患者への飲酒指導上に重要である。そこで、本研究は、炎症血管が示す一過性収縮反応の意義と、この収縮に対するアルコールの作用の解明を目的とした。これは、血管の収縮・弛緩の維持に重要な NO・TXA2 と近年報告された新規収縮物質であるウリジンアデノシンテトラフォスフェート(U_p4A)との「クロストーク」の解明につながり、飲酒による高血圧をはじめとする循環器疾患の発症機序の解明に役立つものと考えた。

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(SMA)を用いて、IL-1 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 SMA のリング状標本作製。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-1 暴露時の TXA2 を介した収縮反応(図 1 の 印)におけるエタノールの影響について検討するため、TXA2 受容体拮抗薬である SQ29548 などの様々な阻害剤を添加し、IL-1 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。

慢性エタノール摂取ラットを用いた血管収縮実験(慢性実験)

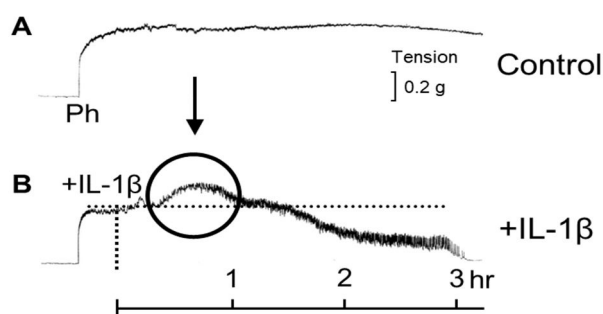


図 1 IL-1 暴露による一過性の収縮反応

(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、慢性エタノ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、SMA を摘出した。

(2) 摘出した SMA を用い、張力測定用に輪状標本を作製し、95% O₂ - 5% CO₂ を通気した 37 の恒温バスに標本を懸垂し、0.2 g 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。

(3) その他、関連遺伝子の変動解析や代謝産物の質量分析、慢性実験における血液生化学検査や病理学的組織検査を行った。

4. 研究成果

急性実験において、IL-1 非暴露下では、Ph 収縮は最大収縮を持続したのに対し、暴露下では、1 時間後に一過性の収縮を示した後に、3 時間後に急激な弛緩反応を示した。そして、内皮細胞剥離血管においては、暴露による一過性の収縮と弛緩反応は見られなかった。また、暴露による一過性の収縮と弛緩反応が SQ29548 により抑制された。暴露下では、1 時間後に TXA₂ の合成酵素である、thromboxane A synthase mRNA の発現が IL-1 で処置した SMA で有意に増加した。TXA₂ の加水分解物である TXB₂ の濃度が 1 時間 IL-1 で処置した SMA で有意に増加したことを示した。以上のことを炎症血管で経時的に初めてとらえ、今回の成果として報告した。(Yuui K. 2022 より改変、図 2)

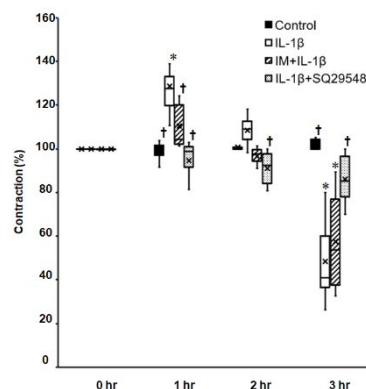


図 2 IL-1 暴露による一過性の経時的変化 (業績一部改変)

また、上記までの同様の方法にて、慢性エタノール摂取ラットとの比較検討を行った。

ラットの血液生化学・病理学的組織検査の結果では慢性エタノールによる大きな影響は見られなかった。エタノール群において IL-1 暴露による一過性収縮が対照群と比べ増大した。そして、慢性エタノール摂取ラットにおいて急性実験と比べ、さらなる一過性の収縮の増加傾向を示した。

この収縮は TXA₂ 受容体のアンタゴニスト SQ29548 より抑制された。また、エタノール群における TXA₂ の遺伝子発現も上昇し、TXA₂ の経路の関与が示唆された。しかし、SQ29548 では一過性の収縮を完全には抑制しなかった。次に TXA₂ 受容体と相補的な関与が示唆される Up4A の受容体のアンタゴニストと併用すると、一過性収縮は抑えられた。この結果より、TXA₂ と相補的な Up4A の関与も示唆された。さらにエタノール群において IL-1 暴露による弛緩はみられなかった。本研究から、慢性アルコールの適量摂取は、IL-1 暴露による一過性の血管収縮を強化することにより、後に続く弛緩反応を抑制することが明らかとなった。また、アルコールと TXA₂/Up4A の関与についてはさらなる検討が必要であり、今後の検討課題となった。これらの経路に対するエタノール作用に関する報告例はなかったが、本研究で初めてアルコールが TXA₂ などを介した一過性の収縮の増大作用が急激な弛緩抑制に作用する可能性を見出した。

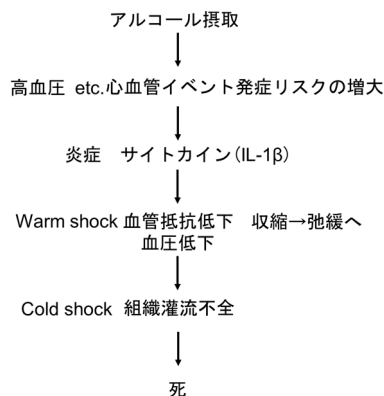


図 3 炎症血管応答に及ぼすアルコールの影響

当初、図 3 のように増悪傾向に傾くと予期してい

たが、得られた新たな知見として、適量なアルコー

ルが敗血症性ショックにおける warm shock に対する血管保護作用を持つ可能性が示唆された。

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

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuui Katsuya, Kudo Risa, Kasuda Shogo	4. 巻 20
2. 論文標題 Arterial thromboxane A2-induced transient contraction after IL-1 exposure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1721727X2210779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1721727X221077946	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 Kudo Risa, Yuui Katsuya, Kasuda Shogo	4. 巻 14
2. 論文標題 Endothelium-Independent Relaxation of Vascular Smooth Muscle Induced by Persimmon-Derived Polyphenol Phytocomplex in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 89 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14010089	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 工藤利彩、勇井克也、粕田承吾	4. 巻 36
2. 論文標題 心血管イベントにおける誘導型内皮由来過分極因子の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 97-99
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 Yuui Katsuya, Kudo Risa, Kasuda Shogo, Ueshima S	4. 巻 54
2. 論文標題 Mozuku (Cladosiphon okamuranus) a Brown Seaweed, Inhibits the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Co-cultured with Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Albanian Journal of Medical and Health Sciences	6. 最初と最後の頁 14-33
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 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 2. 工藤利彩、勇井克也、粕田承吾	4. 巻 46
2. 論文標題 新規メディエーター誘導型内皮由来過分極因子を介する血管機能調節機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 34-35
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 Yuui Katsuya, Kudo Risa, Kasuda Shogo, Hatake Katsuhiko	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 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172759 - 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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 勇井克也, 工藤利彩, 粕田承吾
2. 発表標題 末梢血管における炎症反応へのプロスタノイド類の関与について
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勇井克也, 工藤利彩, 粕田承吾
2. 発表標題 Thromboxane A2による血管張力制御機構の検討
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 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
2. 発表標題 インスリンによる血管弛緩反応に及ぼすエタノールの影響
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 Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K.
2. 発表標題 Experimental investigating of vascular function on the pathogenesis of endotoxin shock.
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 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 Kasuda S, Kudo R, Yuui K, 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 Yuui K, Kudo R, 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 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 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 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Risa Kudo, Katsuya Yuui, and Katsuhiko Hatake	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 20
3. 書名 Forensic Medicine and Human Cell Research	

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学 法医学教室 HP https://www.naramed-u.ac.jp/~legalmed/
--

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

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