

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年12月02日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390196

研究課題名（和文）アルコール性急死における自然免疫系破綻のトランスクリプトミクス

研究課題名（英文）Disturbance of innate immune system in alcoholic sudden death and organ damage

研究代表者

松本 博志（MATSUMOTO HIROSHI）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60263092

研究成果の概要（和文）：アルコール性急死および大腿骨頭壊死において自然免疫機構のシグナリングが関与していることを明らかにし、特に IRF7 および IFN α の活性が影響を及ぼしている可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study found that the transcription factor IRF7 and its-induced IFN α plays a crucial role in the alcohol-related death, traumatic brain injury under alcohol consumption, and osteonecrosis of the femoral head

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |
| 2009年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2010年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール、Myd88、TLR、自然免疫、急死、壊死

1. 研究開始当初の背景

飲酒と死因との因果関係については、血中の高濃度アルコールの存在で急性アルコール中毒、慢性飲酒の既往歴があり、心筋症や肝硬変があった場合にアルコール性心筋症あるいはアルコール性肝硬変と診断されてきた。しかしながら、血中アルコール濃度が2 mg/ml 以下であった場合や血中アルコールが検出されない場合は死因とアルコールの関係と言及することは難しく、ましてや死因への因果関係は明らかではない。

私どもは以前よりアルコールの生体防御破綻の分子機序について様々な臓器について研究を行ってきた。肝臓においては、アルコールそのものが生体防御系の転写制御因子 NF- κ B を活性化させ、細胞死系

の重要なプロテインキナーゼ JNK の活性を抑制することや Akt を活性化させ JIP を抑制することを見出した。肝障害が強くなるとこれらの系がむしろ抑制していることも見出している。また、アルコール性肝障害が強くなるとこれらの系がむしろ抑制していることも見出している。また、アルコール性肝障害の進展機序には腸管から流入したエンドトキシンが関与している仮説に対して、後肢懸垂ラットを作成し上昇したエンドトキシンにより肝障害をきたさないものの肝臓内の toll-like receptor (TLR) を介する自然免疫系のバランスが崩れていることを見出し、特にアルコール投与後の生体防御系シグナリングが抑制されていることを見出した。このことは先の仮説に対して、エンドトキシ

ンがプライマーではないものの影響をもたらす因子であることを明らかにしたものである。一方、非アルコール性肝障害の病態機序を MCD 食摂取モデルで解析したところ、先に挙げた生体防御系の転写制御因子 NF-kappaB が重要な働きをしており、PPAR アゴニストと NF-kappaB 阻害剤により肝障害が抑制することを見出した。さらに TLR4 ミュータントマウスと TLR の細胞内シグナリングの重要なタンパクである Myd88 ノックアウトマウスを用いた実験から TLR4 が脂肪肝形成機構に重要な役割を担っていること、それには Myd88 が重要な働きをしていることを発見した。これは TLR が自然免疫機構以外の役割を担っていることを示唆している。また、最近、コレステロール代謝系に TLR が関与しているという報告もなされており、これらは私たちの知見を支持していた。

以上の知見から、私たちは、TLR を介すると突然死をきたすのではないかとという仮説を立てて、ラットに対して比較的少量の LPS を投与したところ、生存曲線が有意に低下することを見出した。したがって、TLR を介するすぐなるが死因に影響を及ぼしていることが考えられる。

2. 研究の目的

アルコール性突然死モデル、アルコール性大腿骨頭壊死モデル、アルコール性脳挫傷死モデルを確立し、さらにそれらにおいて、TLR を中心として自然免疫系の役割とその病態機構の一端の解明を試みることである。

3. 研究の方法

(1) アルコール性突然死モデルの確立については、C57BL/6J 雄マウス (5 週齢) を用いて、LPS を 2 mg/kg を 24 時間毎に 2 回投与した後、エタノールを 2, 4, 6 g/kg で投与した。生存曲線の検討実験と以後経時的に採血、肝・腎・心臓を採取する実験に分けた。採取した肝・腎・心臓については、組織学的評価を行うとともに、血中サイトカインを multiplex で Luminex を用いて測定した。さらに、組織分画を行い、核画分については自然免疫系に関与する転写制御因子 NF-kappaB, Ap-1, IRF1, IRF3, IRF7, IRF9, HIF-1, PPARs, CREB の活性を EMSA で、可溶画分については、caspase-1, caspase-3, cytochrome c を western blotting で検出した。

(2) アルコール性脳挫傷死モデルについては、Wistar 雄ラットを使用し、アルコールを 3g/kg 投与した 1 時間後に、脳挫傷を作成し、以後経時的に 7T-MRI を用いて脳浮腫の程度を評価するとともに生存曲線を作成した。一方、経時的に 3, 6, 12, 24 時間後に採血と脳を採取した。採取した脳につい

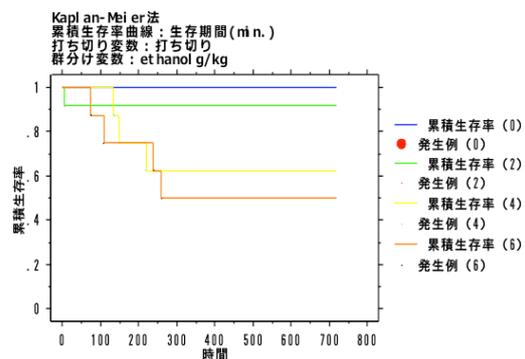
ては組織学的な検討を行うとともに、脳浮腫に関与するタンパクである AQP4 の免疫染色を行った。また、組織画分を行い、転写制御因子の NF-kappaB, AP-1, HIF-1 の活性を検出するとともに、mRNA の発現を quantitative realtime PCR を用いて定量した。また、死亡率を低減する物質として抗酸化剤の n-acetyl cystine と AQP4 の阻害剤である acetazolamide を投与した後、同様に評価した。

(3) アルコール性大腿骨頭壊死モデルについては、Wistar 系雄ラットを用いて、Liber-DeCarli 食を 1 週から 2 4 週摂取させた。経時的に採血、大腿骨、肝臓、脾臓を採取し、組織学的評価を行うとともに、血液中のサイトカインについては multiplex で Luminex を用いて測定した。また、肝臓、脾臓について転写制御因子 NF-kappaB, IRF1, IRF3, IRF7 の活性を EMSA にて検出した。

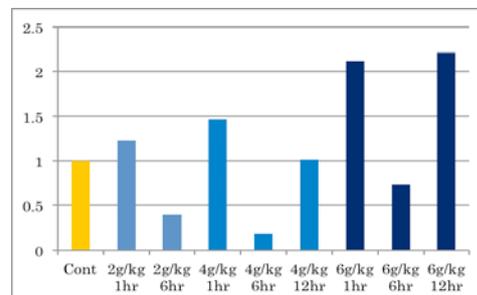
4. 研究成果

(1) アルコール性突然死モデル

生存曲線を下記に示す。濃度依存性に死亡率が上昇し、このモデルはアルコール性に急死が誘発されていることが確認された。



また、転写制御因子の活性については、IRF3 の活性を下記に示すが、6 時間後に一度活性が落ちることが判明し、この時期と死亡率との関係があることが明らかとなった。



(2) アルコール脳挫傷モデル

アルコール投与後脳挫傷受傷では脳浮腫が有意に上昇し、それが死亡率に影響している

ことが明らかとなった。その脳浮腫については細胞性の脳浮腫であり、脳挫傷3時間後に抗酸化剤投与で軽減し、死亡率も改善することが明らかとなり、臨床への応用が期待される結果となった。

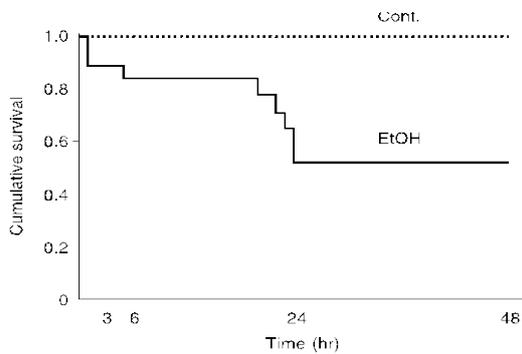


FIG. 1. Kaplan-Meier survival curve. Only the EtOH group showed animal deaths. Survival probability for the EtOH animals decreased markedly between 6 and 24 h after TBI. Time 0 indicates when TBI was inflicted. Log-rank test, $p = 1.09 \times 10^{-3}$. Cont., control, $n = 23$; EtOH, ethanol, $n = 29$.

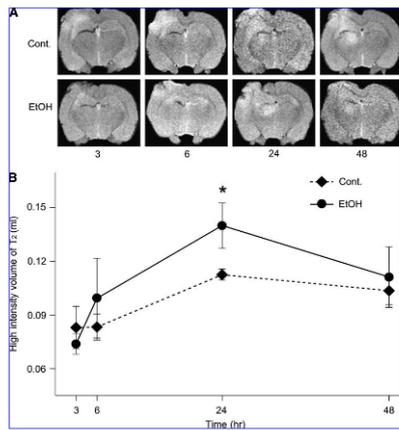


FIG. 4. (A) Representative MRI T2WI. The left side of each image covers the right hemisphere of the rat brain. (B) Changes of high intensity volume of T2WI after time. The high intensity volume in T2WI peaked at 24 h after TBI (pretreatment), significantly increased the high intensity volume at this time point. The data represent the mean \pm SE ($n = 5$). There was a significant interaction between EtOH treatment and high intensity volume (two-way ANOVA, p for interaction = 0.001, $^*p < 0.05$).

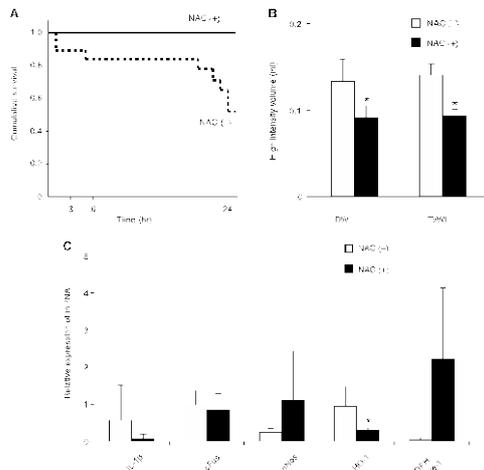


FIG. 7. (A) Survival over 24 h of ethanol pretreated animals treated with or without NAC 2h after TBI. NAC treatment reversed the survival of ethanol pretreated rats. Log-rank test, $p = 0.04$. (B) High intensity volume of T2WI and T2WI in either pretreated animals, animals with or without NAC. The MRI scans taken 24 h after TBI. (C) Significant increase in Bcl-2, Bcl-2, c-MYC, Bcl-1, and NAD71 (c-MYC) mRNA 24 h after TBI in ethanol-pretreated animals treated with or without NAC. The mRNA levels are expressed as described in Figure 5. (D) The data represent the mean \pm SE ($n = 4$). $^*p < 0.05$.

さらに、AQP4がこのアルコール前処置脳挫傷後脳浮腫に関係していることを証明した。ると、

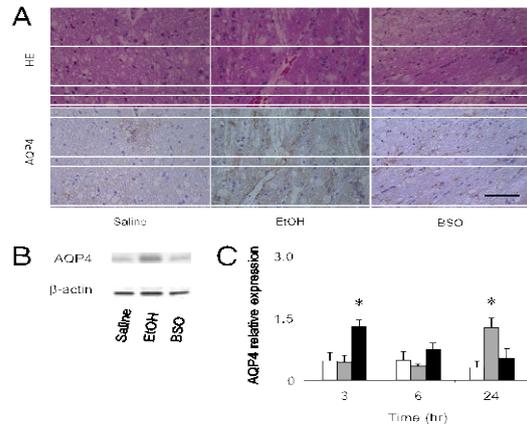


Figure 2. Pericontusional AQP4 expression after TBI. **A:** Histopathological findings in the pericontusional cortex at 24 hours after TBI. **Top panels:** Representative H&E staining of rat pericontusional cortex. **Bottom panels:** Representative AQP4 protein expression determined by IHC with rabbit anti-AQP4 antibody (diluted 1:200) in the pericontusional cortex. AQP4 expression was recognized in the perivascular layer and glia. Scale bar = 50 μ m. **B:** Representative AQP4 immunoblots. Rat pericontusional brain was processed for immunoblotting with rabbit polyclonal anti-AQP4 antibody (diluted 1:1000). **C:** AQP4 relative protein expression at 24 hours after TBI under EtOH consumption was normalized to β -actin. Data represent the mean \pm SE ($n = 4$). White, gray, and black bars represent the saline, ethanol, and BSO groups, respectively. $^*p < 0.05$ versus the saline group.

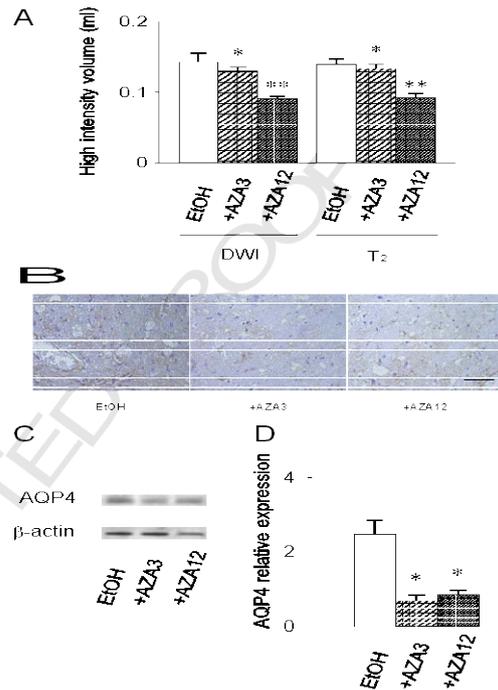


Figure 3. Effects of inhibition of AQP4 on brain edema. **A:** High-intensity volume in DWIs and T2WIs at 24 hours after TBI. An AQP4 inhibitor, AZA, was administered to rats i.p. at 3 hours (AZA3) or 12 hours (AZA12) after TBI under ethanol consumption. The high-intensity volumes in both DWIs and T2WIs were decreased in the AZA12 group after TBI under ethanol consumption. Data represent the mean \pm SE ($n = 4$). $^*p < 0.01$ versus the saline group; $^{**}p < 0.01$ versus the AZA3 group. **B:** AQP4 histopathological findings in the pericontusional area of cortex at 24 hours after TBI under EtOH consumption with AZA administration at 3 or 12 hours after TBI. AQP4 protein expression was determined by rabbit polyclonal anti-AQP4 antibody immunoreactivity (diluted 1:200) in the pericontusional area of the cortex. AQP4 expression was recognized in the perivascular layer and glia. Scale bar = 50 μ m. Representative images of AQP4 and β -actin immunoreactivity within brain contusion areas are shown. **C:** AQP4 relative expression at 24 hours after TBI under EtOH, AZA3, and AZA12 groups. Rat pericontusional brain was processed for immunoblotting with rabbit polyclonal anti-AQP4 antibody (diluted 1:1000). **D:** AQP4 relative protein expression at 24 hours after TBI under EtOH consumption was normalized to β -actin. Data represent the mean \pm SE ($n = 4$). $^*p < 0.01$ versus the saline group.

さらに、AQP4阻害剤を脳浮腫後3時間、12時間に投与すると、脳浮腫を軽減でき全て生

存することが明らかとなった。このことは、AQP4 阻害剤が飲酒者の頭部外傷後の治療に応用可能なことを示した。

(3) アルコール性大腿骨頭壊死モデル
特発性大腿骨頭壊死症の主要な要因にはアルコール慢性摂取とステロイド療法がある。私たちは、この両方の動物モデルを世界ではじめて確立した。アルコール性大腿骨頭壊死については、臨床的な知見から大腿骨頭壊死症と肝障害が関係していることを見出し、そこから、アルコール性肝障害動物モデルに使用されている Lieber-DeCalri 食を使用することで大腿骨頭壊死が発生するのではと考えて行ったところ、大腿骨頭壊死を作成することができた。これは世界で初めてである。

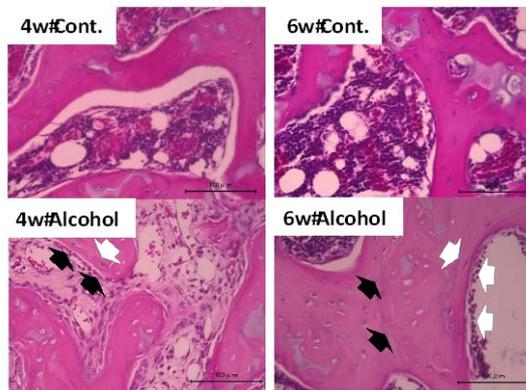


Fig. 2 Histological appearance (high magnification) of femoral head osteonecrosis by hematoxylin and eosin staining. The alcohol group shows formation of appositional bone around necrotic bone trabeculae represented the repair process at 4 and 6 weeks in the alcohol group (black arrow). Scale bar presents 100 μ m.

この時点で、組織学的に脂肪性肝障害を認めるとともに、血中では IFN α の上昇と adiponectin の減少を認め、これらの何らか

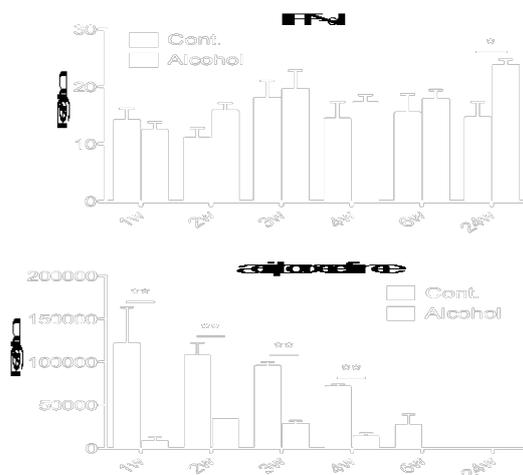


Fig.5 Changes of blood IFN α and adiponectin levels in the control and alcohol

groups. IFN α did not significant change in the alcohol group at 1 to 6 weeks, while adiponectin showed significant decreased in the alcohol group at 1 to 4 weeks.

の関与が示唆された。さらに転写制御因子の NF-kappaB, IRF3, IRF7 の活性化を調べたところ、IRF7 の上昇を認め、この関与が示唆された。IRF7 および IFN α は TLR シグナリング系によって活性化し、特に TLR7 および TLR9 の下流域に存在する。したがってこれらの分子の関与も考えられた。

一方、ステロイド性大腿骨頭壊死については、TLR4 のリガンドである LPS と methyl prednisolone を投与することで、世界で初めて大腿骨頭壊死のラットモデルを確立することができた。

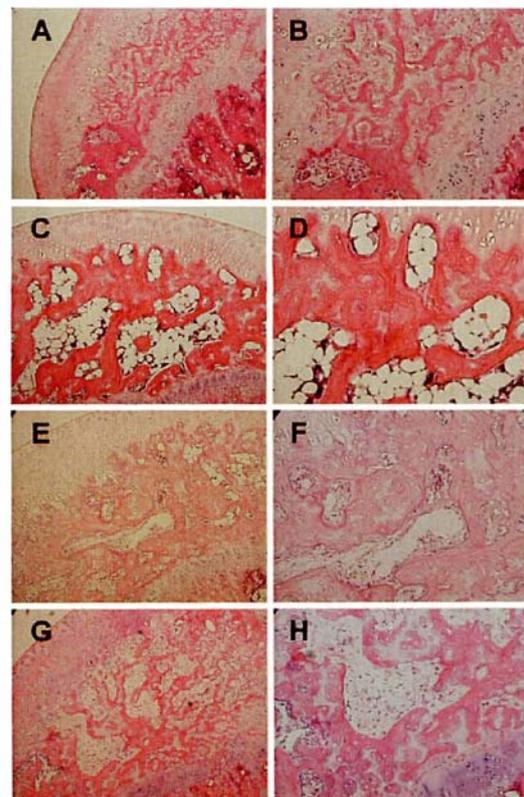


Fig. 5. Histological appearance of the femoral head osteonecrosis. Haematoxylin and eosin staining of the femur at week 1 (A and B); at week 2 (C and D); at week 3 (E and F); and at week 4 (G and H) after medication. Original magnification $\times 100$ (A, C, E, G); $\times 200$ (B, D, F, H). Osteonecrosis of the femoral head was not observed in the control group (data not shown).

さらに、他の TLR リガンドである imiquimod と CpG-C を投与した後、methylprednisolone を投与すると、同様に大腿骨頭壊死ができることを証明した。Imiquimod は TLR7 のリガンド、CpG-C は TLR9 のリガンドである。このことは、大腿骨頭壊死に自然免疫シグナリングが関与していることを世界で初めて明らかにしたことになる。

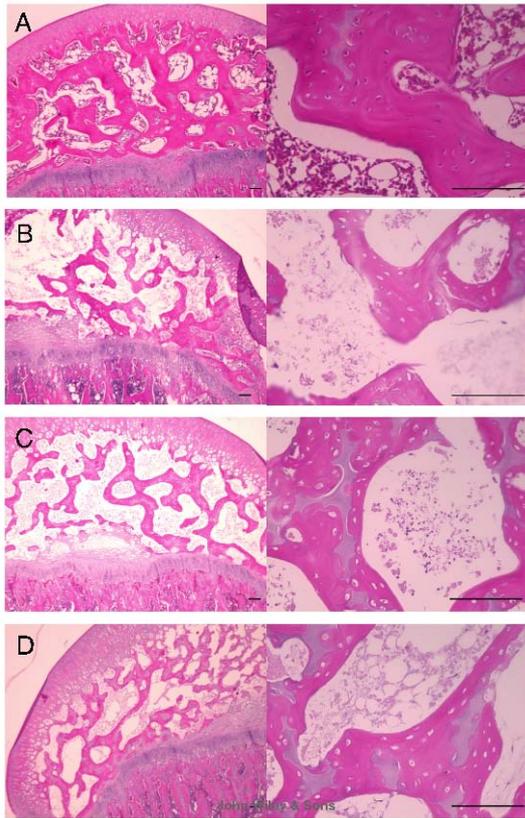
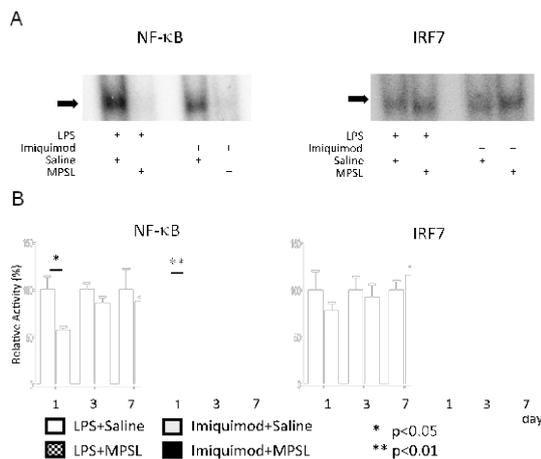
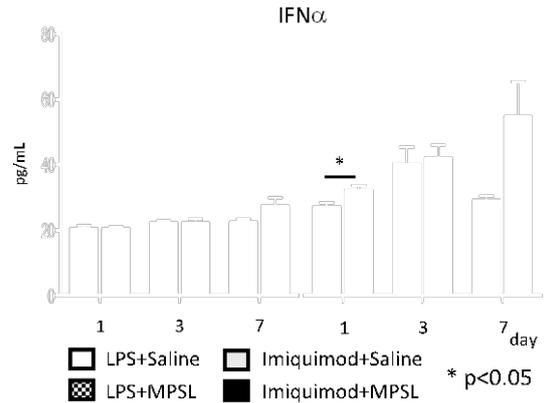


Figure 1. Histological appearance of the femoral head affected by osteonecrosis. Panels show hematoxylin and eosin stained femurs. Typical images for Group Saline+MPSL (A); Group LPS+MPSL (B); Group Imiquimod+MPSL (C); Group CpG-C+MPSL (D) are shown. The diffuse presence of empty lacunae and pyknotic osteocytic nuclei in the bone trabeculae accompanied by bone marrow cell necrosis was observed in the femoral head of all groups, except Group Saline+MPSL (A). Scale bar: 100 μ m.



さらに、これらの TLR リガンドと methyl prednisolone 投与後については、IRF7 および $INF\alpha$ の上昇を認めたことからこれらがその大腿骨頭壊死形成機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。



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 2 2 件)

- ① Katada R, Nishitani Y, Honmou O, Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H. Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure. *Am J Pathol* (in press)
- ② Okazaki S, Nagoya S, Yamamoto M, Tateda K, Takahashi H, Yamashita T, Matsumoto H. High risk of osteonecrosis of the femoral head in autoimmune disease patients showing no immediate increase in hepatic enzyme under steroid therapy. *Rheumatol Int* (in press).
- ③ 松本博志. アルコールの基礎知識. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 46: 135-140, 2011
- ④ 松本博志. 交通被害者と飲酒. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 46: 141-146, 2011
- ⑤ Katada R, Nishitani Y, Honmou O, Okazaki S, Houkin K, Matsumoto H. Prior ethanol injection promotes brain edema after traumatic brain injury: evidence for poor prognosis for intoxicated patients. *J Neurotrauma*. 2009, 26: 2015-2025.
- ⑥ Okazaki S, Nishitani Y, Nagoya S, Kaya M, Yamashita T, Matsumoto H. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway. *Rheumatology*. 2009; 48: 227-232.

[学会発表] (計 8 5 件)

- ① Matsumoto H, Tanaka M, Tateda K, Ishizaka A, Nishitani Y, Okazaki S, Katada R, Mizuo K, Watanab S. Alcohol consumption promotes insulin resistance via accumulation of proinflammatory responses in the NIDDM murine model. Experimental Biology 2010, Anaheim, U.S.A. April 27-28,2010.
- ② Matsumoto H, Tanaka M, Fujii K, Nishitani Y, Katada R, Ishizaka A, Shimizu J, Igarashi A, Hagiwara T, Tateda K, Mizuo K, Watanabe S. Role of innate immune system of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease in forensic autopsy. XXI Congress of the International Academy of Legal Medicine, Lisbon, Portugal, May 28-30, 2009.
- ③ Matsumoto H, Fujii K, Nishitani Y, Okazaki S, Imabayashi K. TLR4-signaling pathway contributes to formation of steatosis in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: A new therapy for fatty liver disease. ISBRA2008. Alcohol Clin Exp Res. 2008; 32: 40A, Washington DC. June 29-30, 2008.

[図書] (計1件)

- ① 松本博志, アルコールの法医学、NEW法医学・医事法、2008、95

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/legalm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 博志 (MATSUMOTO HIROSHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60263092

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：