

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590637
 研究課題名（和文）アルコールの脳神経伝達物質に及ぼす影響-ApoE と ALDH2 欠損マウスによる研究
 研究課題名（英文）Cholinergic function in apolipoproteinE (apoE^{-/-}) and ALDH2 (^{-/-}) mice after alcohol consumption, and the relation of alcohol in producing dementia in these animal models.
 研究代表者 JAMAL MOSTOFA (JAMAL MOSTOFA)
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：50418802

研究成果の概要：

アルコール (EtOH) 投与後の ALDH2 KO マウスは血液および脳内に EtOH とともに高濃度のアセトアルデヒドを検出した。EtOH 投与により ALDH2 KO マウスの前頭皮質のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) と アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 発現の抑制を、野生型マウスでは多量の EtOH 投与にのみ ChAT 発現の抑制を認めた。8アームラジアル迷路実験では、ALDH2 KO マウスは EtOH 投与量依存的に、ApoE KO、野生型マウスでは多量投与でのみ有意なエラー増加を認めた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 2,800,000 | 0 | 2,800,000 |
| 2007年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2008年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 300,000 | 4,100,000 |

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；アセトアルデヒド；コリン作動性神経系；前頭皮質；ALDH2 ノックアウトマウス；ApoE ノックアウトマウス；記憶の固定；8アームラジアル迷路

1. 研究開始当初の背景:

アセトアルデヒドはアルコール代謝で生じ、毒性はアルコールよりも強く、その代謝

は ALDH2 で行われる。約半数のアジア人が Low Km 値の ALDH2 活性が欠損しており、飲酒後に高濃度のアセトアルデヒドの産生がある。このような ALDH2 欠損型では、飲酒に伴う種々の生体への影響がアルコールそのものによるものに加え、代謝産物アセトアルデヒドによる関与の有無、程度については必ずしも明らかにされていない。

前頭皮質のコリン作動性神経系は睡眠、注意、学習、記憶に関与している。アルコールはコリン作動性神経系に関与する学習や記憶に影響し、アセトアルデヒドもアルコールによるコリン作動性中枢神経への影響に一部関与していると考えられている。

ALDH2 KO マウスは、アルコール投与後に高濃度のアセトアルデヒドが血中に検出されるため、アセトアルデヒドによるコリン作動性中枢神経への影響を研究する有用な実験モデルといえ、ApoE KO マウスは ApoE 蛋白の発現が欠損し、コリン作動性神経系の機能が低く、記憶や学習に関係するとされており、記憶や学習への影響を知る上で有用な実験モデルといえる。

2. 研究の目的

本実験では、ヒトの ALDH2 欠損型モデルとして ALDH2 KO マウスを、記憶障害モデルとしての ApoE KO マウスをそれぞれ用い、アルコールおよびアセトアルデヒドのコリン作動性神経系への影響、行動学的影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物： C57BL6/J 系の ALDH2 (産業医大衛生学講座から供与)、ApoE (CLEA Japan から購入) KO、野生型マウス (CLEA Japan から購入) を用いた。

(2) 脳内アルコールとアセトアルデヒドの測定： ALDH2 KO および野生型マウスに脳微小透析チューブを前頭皮質に留置 3 日後に 2g/kg のアルコールを腹腔内投与し、リンゲル液を 8 μ L/分 で環流し、氷中の密閉した容器に透析液を 10 分間採取した。アルコールとアセトアルデヒドの測定は head-space GC 法で行った。

(3) 前頭皮質の ChAT および AChE の発現： ALDH2 KO および野生型マウスについて 1) 対照群、2) アルコール (2g/kg) 投与群、3) アルコール (4g/kg) 投与群にて行った。

脳組織の採取： アルコール投与 40 分と 120 分後に、エーテル麻酔したマウスを断頭し、氷上で前頭皮質 (約 50mg) を採取し、直ちに -70 °C で実験開始まで保存した。

RNA 抽出と RT-PCR 分析： RNA 抽出は Isogen (ニッポンジーン社) で行い、抽出試料は分析するまで -70 °C で保存した。

Western blot 法： 前頭皮質の 20 倍容 (wt/vol) の冷 Tris-HCl (20 mM、pH 7.4) -蔗糖含有 (0.32 mM) 緩衝液でホモジナイズし、遠心後の上清成分を試料とし、10% SDS PAGE で電気泳動後 PVDF メンブレンに転写した。検出は Goat anti-ChAT antiserum (AB144p, polyclonal; diluted 1:500, Chemicon International Inc) と horseradish peroxidase-linked anti-goat IgG antibody で行った。

AChE 活性の測定: AChE 活性の測定は Western blot 用試料と同じものを呈色反応で発色させ分光光度法 (UV-1700, Shimadzu, 420 nm) にて測定した。

(4) 8 ラジアル迷路 (RAM) 実験: ALDH2 KO、ApoE KO および野生型マウスについて、1) 対照群、2) アルコール (0.5g/kg) 投与群、3) アルコール (1.0g/kg) 投与群、4) アルコール (2.0g/kg) 投与群にて行った。

RAM はアクリル樹脂性で中心のプラットフォームと 8 本のアームからなり、各アームの端に餌をおく。RAM 実験は習慣付け、訓練、テストの 3 段階からなる。習慣付け: マウスをアームに飼料のない状態で 10 分間、1 日習慣付けをする。訓練期: マウスは各アームに餌を置いた状態で、すべての飼料を食するまで行い、その間に既に餌を食したアームに入った場合、あるいは飼料のあるアームに入ったが食しなかった場合をエラーとして記録する。この訓練を 3 日間行う。テスト期: 5 日目にアルコールを投与し、投与後 5 分から RAM 測定を行った。パフォーマンス比はコントロールと比較して求めた。

4. 研究成果:

(1) ALDH2 KO マウスと野生型マウスにアルコールを投与し、血液と脳内のアセトアルデヒドとアルコールを測定したところ、ALDH2 KO マウスでは血液、脳内ともにアルコールと高濃度のアセトアルデヒドを検出した。脳内のアルコールは血液濃度と同程度であったが、脳内のアセトアルデヒド濃度は血液濃度の約 1/5 程度であった。

一方、野生型では血液や脳内にアルコールは検出されたが、アセトアルデヒドはほとんど検出されなかった。ALDH2 KO マウスでは ALDH2 活性がなく、アルコール代謝で産生したアセトアルデヒドがさらに代謝されないことになり、血中、脳内中に高濃度のアセトアルデヒドが検出されたものといえる。しかし、アセトアルデヒドの脳内濃度は血液濃度よりもかなり低い。これは、血液脳関門でのアセトアルデヒドの蛋白吸着、ALDH2 以外の ALDH やその他の何らかの酵素活性による代謝が考えられる。

(2) ALDH2 KO マウスの前頭皮質の ChAT と AChE 発現はアルコール 2g/kg、4g/kg 投与で抑制を認めたが、野生型マウスでは 4g/kg 投与でのみ ChAT 発現の低下はあったが、AChE 発現への影響をみられなかった。多量のアルコール、および高濃度のアセトアルデヒドがコリン作動性神経系の前あるいは後シナプス間隙の蛋白質あるいは m-RNA の発現を変化させた。このことは、中枢神経系のコリン作動性神経系がアセトアルデヒドに対して感受性が高いことを示している。また、多量のアルコールにも感受性のあることを示している。ALDH2 KO マウスでは、アセトアルデヒド単独による影響に加え、アルコールとの協同効果による影響も考えられる。

(3) RAM 実験では、ALDH2 KO マウスは 0.5g/kg、1 g/kg、2 g/kg アルコール投与量に依存的にエラー増加を認めたが、Apo E KO と野生型マウスは 2 g/kg アルコール投与でのみエラーの増加を認めた。ALDH2 KO マウスでみられた RAM テストのエラー増強は、アセトアル

デヒドによるものと考えられる。アセトアルデヒドは、記憶、学習などの抑制していることが示唆され、また、コリン作動性神経系の酵素や mRNA 発現の低下もこのことを支持していると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Uekita Ikuo, Weihuan Wang, Mitsuru Kumihashi, Shiakh Badiuzzaman and Iwao Ijiri. Acetaldehyde-induce changes in cholinergic function in the frontal cortex of ALDH2 transgenic mice (3rd). Jpn J Legal Medicine, 2008, 62 (suppl), 62 (S6-9). (Reviewed)
- ② Mostofa Jamal, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi, Iwao Ijiri, and Kiyoshi Ameno. Cholinergic changes following exposure to nicotine, ethanol, or both combined in the frontal cortex and hippocampus of rat. Jpn J Alcohol & Drug Dependence, 2008, 43, 384-385. (Reviewed)
- ③ Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi, Weihuan Wang and Iwao Ijiri (2007) Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats. Neurotoxicology, 28, 1245-1248. (Reviewed)
- ④ Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Setsuko Ameno, Jun Morishita, Weihuan Wang, Mitsuru Kumihashi, Uekita Ikuo, Takanori Miki and Iwao Ijiri (2007) Changes in cholinergic function in the frontal cortex and

hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. Neuroscience, 144, 232-23. (Reviewed)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 11th Conference of the Japanese Forum on Nicotine and Drug Dependence Studies, September 15-19, 2008, Yokohama. Cholinergic changes following exposure to nicotine, ethanol, or both combined in the frontal cortex and hippocampus of rat. Mostofa Jamal, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi, Iwao Ijiri, and Kiyoshi Ameno. (Oral)
 - ② 5th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), September 1-5, 2008, Osaka: Acetaldehyde-induce changes in cholinergic function in the frontal cortex of ALDH2 transgenic mice (3rd). Mostofa Jamal^a, Kiyoshi Ameno^a, Uekita Ikuo^a, Weihuan Wang^a, Mitsuru Kumihashi^a, Shiakh Badiuzzaman^b and Iwao Ijiri^a. (Oral)
 - ③ 92th Congress of Japanese Society of Legal Medicine, April 23-25, 2008, Nagasaki: Role of catalase in mediating acetaldehyde production in the striatum of free-moving rats. Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi, Weihuan Wang, and Iwao Ijiri. (Poster)(Reviewed)
- Acetaldehyde-induce changes in cholinergic function in the frontal cortex of ALDH2 transgenic mice. Mostofa Jamal, Kiyoshi

Ameno, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi,
Weihuan Wang, and Iwao Ijiri. (Oral)
(Reviewed)

④9th Aldh2 Knockout Mice Conference, October
26-27, 2007, Fukuoka: Acetaldehyde-*induce*
changes in cholinergic function in the frontal
cortex of ALDH2 Transgenic Mice. Mostofa
Jamal¹, Kiyoshi Ameno¹, Weihuan Wang¹, Ikuo
Uekita¹, Mitsuru Kumihashi¹, Masashi Higuchi²,
and Iwao Ijiri (Oral) (Reviewed)

⑤18th Annual Spring Brain Conference (SBC),
March 14-17, 2007, Sedona, Arizona, USA:
Acetaldehyde-*induce* changes in cholinergic
function in the frontal cortex of ALDH2
transgenic mice. Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno,
Weihuan Wang, Ikuo Uekita, Mitsuru Kumihashi
and Iwao Ijiri. (Poster)

[図書] (計1件)

① Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Mitsuru
Kumihashi, Weihuan Wang, Uekita Ikuo and
Iwao Ijiri (2007), Ethanol and acetaldehyde:
In vivo quantitation and effects on
cholinergic function in rat brain. In:
Acetaldehyde-Related Pathology: Bridging
the Trans-Disciplinary Divide, Novartis
Foundation 285, pp 137-144. John Wiley &
Sons Ltd, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

JAMAL MOSTOFA (JAMAL MOSTOFA)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50418802

(2) 研究分担者

飴野 清 (AMENO KIYOSHI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：50019626