

機関番号	3 2 6 6 6
研究種目	基盤研究 (C)
研究期間	2008~2010
課題番号	20590689
研究課題名 (和文)	新たなアルコール代謝酵素クラス 3 ADH のアルコール生体反応感受性における役割
研究課題名 (英文)	Roles of Class III ADH (ADH3), a new alcohol metabolizing enzyme, on biosensitivities for alcohol
研究代表者	長谷場 健 (HASEBA TAKESHI) 日本医科大学・医学部・准教授 研究者番号: 50156329

研究成果の概要 (和文):

近年、我々はアルコール脱水素酵素 ADH3 の体内アルコール (Alc) 代謝への寄与を明らかにした。そこで、本 ADH の血中 Alc 動態の性差、主要臓器における Alc およびアセトアルデヒド (AcH) 動態、Alc 感受性、さらに Alc 嗜好性における役割について、ノックアウトマウス (*Adh1*^{-/-}、*Adh3*^{-/-}) を用いて Alc 代謝の鍵酵素である ADH1 と比較検討した。その結果、ADH3 の Alc 代謝への寄与には性差が見られ、雄では EtOH の投与量に依存して寄与の増大が見られるが、雌では中等量 (2-3g/kg) での寄与が大きかった。一方、*Wild*、*Adh3*^{-/-} の両マウス種で見られた血中 Alc 動態の性差は肝 ADH1 活性の性差と Alc 体内分布率 (γ) の性差によってほぼ説明が可能であった。さらに、主要臓器での AcH 産生に関しては、ADH1 は肝および腎での寄与が見られたが、ADH3 は肝でのみ見られた。また、ADH3 は ADH1 と共に急性 Alc 中毒防御因子ならびに Alc 嗜好因子の役割を果たすことがわかった。

研究成果の概要 (英文):

We have recently demonstrated that alcohol dehydrogenase 3 (ADH3) participates in systemic alcohol metabolism. In this study, we used ADH knockout mice (*Adh1*^{-/-}, *Adh3*^{-/-}) to investigate the role of ADH3 in sex-difference of alcohol metabolism, in the production of acetaldehyde in major organs, in alcohol sensitivity and in alcohol preference, comparing with ADH1, a key enzyme of alcohol metabolism. ADH3 showed a sex-different contribution to systemic alcohol metabolism, contributing dose-dependently in male, but at middle doses (2-3g/kg) in female. On the other hand, the sex-differences of pharmacokinetics of blood alcohol found in both *Wild* and *Adh3*^{-/-} could be explained by the sex-differences of ADH1 activity in the liver and of alcohol distribution rate (γ). ADH1 contributes to acetaldehyde production in the liver and kidney, whereas ADH3 only in the liver. In addition, ADH3 was found to play as a protective factor for acute alcohol poisoning, and as an alcohol-preferential factor, together with ADH1.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 社会医学・法医学

キーワード: アルコール代謝動態、ADH 1、ADH 3、組織酵素量、ノックアウトマウス、性差、アルコール嗜好性、急性アルコール中毒

1. 研究開始当初の背景

ヒトのアルコール (Alc) に対する生体反応として、酪酐、アセトアルデヒド (AcH) 反応、Alc 中毒などの急性反応および臓器組織障害、依存症などの慢性反応があり、さらには、Alc 嗜好性も Alc 生体反応の一つと言える。これらの Alc 生体反応の強弱 (Alc 感受性) は、性差および民族差を含む大きな個人差があり、基本的にはエタノール (EtOH) とその代謝産物 AcH の血中ならびに組織中における濃度と暴露時間に依存する [1]。それ故、EtOH および AcH の代謝速度ならびに組織濃度分布は Alc 感受性を制御する最も重要な生体側の条件であり、それらを明らかにすることは Alc の生体反応の機序を解明するために必須と言える。

体内での Alc 代謝は主に EtOH 酸化の Class I ADH (ADH1) と AcH 酸化の ALDH2 で担われている。ヒトにおいては、ADH1B ならびに ALDH2 のいずれにも活性を異にする遺伝子多型が存在し、これらの多型が Alc 嗜好性、急性症状、依存症ならびに臓器障害発症などに関与することが知られている [1]。しかし、これら遺伝的多型はその出現が民族特異的であり、Alc 感受性個人差の一般的な原因とはいえない。一方、女性は男性より少ない飲酒量および短い飲酒期間で Alc 依存症や Alc 性肝障害などを発症する。Alc 感受性の性差の原因として、血中 EtOH 濃度や EtOH 代謝速度などの性差が研究されているが、まだ一定の見解は得られておらず、その血中動態性差の酵素学的メカニズムも明らかではない。この Alc 感受性性差の機序の解明は Alc 感受性個人差のより普遍的な機序の解明につながる事が予想される [2]。

ところで、体内の EtOH 代謝には ADH1 以外の酵素系も寄与しており、その候補として MEOS と catalase が長年議論されてきたが、その酵素的実態は明らかではなかった。我々は最近、哺乳類の臓器組織に普遍的に存在する ADH3 が体内 EtOH 代謝に投与量依存的に寄与を増大させること、そして、ADH1 は逆に投与量依存的にその寄与を低下させることを、それぞれのノックアウトマウス (Adh3^{-/-}、

Adh1^{-/-}) を用いて明らかにした [3]。さらに、Wild type マウスの Alc 代謝速度は ADH1 と ADH3 の両活性を反映する Total 肝 ADH 活性と相関すること [4]、そして、その代謝速度と Total 活性はいずれも雌が雄より高く、マウスの血中 EtOH 濃度の性差と関係していることを見出した。

2. 研究の目的

Alc 生体反応には大きな個人差があり、基本的には EtOH とその代謝産物 AcH の血中ならびに組織中における濃度と暴露時間に依存すると考えられる [1]。従って、Alc 投与後の血中ならびに各臓器組織における EtOH および AcH の動態を知ること、さらに、それらの濃度が ADH でどのように制御されているかを知ることが重要と考えられる。そこで、既に我々が Alc 代謝に寄与することを明らかにした ADH1 または ADH3 のノックアウトマウス (Adh1^{-/-}、Adh3^{-/-}) およびイタリックに Alc を投与して、これら ADH の血液 Alc 動態の性差、急性 Alc 中毒ならびに Alc 嗜好性への寄与を比較検討する。さらに、これら酵素の主要臓器における EtOH および AcH 動態への寄与をこれら臓器における酵素量を測定し比較検討する。

[1] Bosron W.F. et al. (1993) *Seminars in liver disease*, 13: 126-135.

[2] Sato N. et al. (2001) *Alcohol Clin Exp Med*, 25: 40s-45s.

[3] Haseba T. et al (2006) *BBA*, 1762: 276-283.

[4] Haseba T. et al (2003) *Legal Med* 5: 202-211.

3. 研究の方法

(1) 使用動物種

ノックアウトマウス (Adh1^{-/-}、Adh3^{-/-}) は Burnham 研究所 (CA, USA) の Dr. Duester から譲渡されたものを日本医科大学実験動物管理室で飼育繁殖したものをを用いた。Wild 型は C57BL/6 (♀) と 129Svj (♂) のハイブリッドを作成して系代飼育したものをを用いた。

(2) マウスの ADH 遺伝子型診断法

ADH1 遺伝子に対する forward primer (TAAGTCTGAACAGCGGTGAG) と reverse primer (GGGTAATTAAACGGGTCCAAC)、また、ADH3 遺伝子に対する forward primer (TGGACTCTAACCTGAAGAAC) と reverse primer (TAAGATTCAAGTCTCAAAG)、さらに、各 ADH 遺伝子をノックアウトするために挿入された PKG-neo 遺伝子に対する forward primer (CAAGACCGACCTGTCCGGTG) と reverse primer (ACTTCGCCCAATAGCAGCCAG) をそれぞれ合成して、PCR 反応条件を検討した。その結果、94°C30 秒、55°C30 秒、72°C30 秒の 40 サイクルで PCR を行い、PCR 反応液を電気泳動し、Neo primer 増幅産物 (144bp)、ADH3 primer 増幅産物 (390bp 付近) または ADH1 primer 増幅産物 (400bp 付近) の有無を用いて、各 ADH 遺伝子型を診断する方法を確立した。

(3) 肝 ADH 活性測定法

肝を 6 倍量の 5mM Tris buffer (pH8.5) を用い氷冷下でホモジナイズし、その遠心上清を ADH 活性測定用肝抽出液とした。肝 ADH 活性は、基質 EtOH 濃度を 0.1 から 1000mM まで変化させながら従来の方法で行った。

(4) 臓器組織中の各 ADH 酵素量の測定法

Wild 雄から各臓器組織を摘出し、6 倍量の 5mM Tris buffer (pH8.5) を用い氷上でホモジナイズし、その遠心上清を試料とした

(n=3)。マウスの ADH1 または ADH3 に特異的な抗体(長谷場健、No. 11470120 科研費成果報告書、p99-143、平成 14 年)をウサギに免疫し、得られた抗血清を硫酸分画さらには nProtein A sepharose 4 Fast flow (GE Healthcare) で精製したものをを用いた。なお、各抗体の特異性の検定は肝抽出液に対するウエスタンブロット法によって行った。これら各 ADH 特異抗体を用いて、各臓器組織中の両 ADH タンパク量を ELISA 法で測定した。

(5) 急性 Alc 投与実験

各 ADH 遺伝子型マウス (8~12 週齢の雄または雌) にそれぞれ 1、2、3、4、4.5、5g/kg 量の EtOH を腹腔内に投与し、尾静脈血中 Alc 濃度 (BAC_T)、正向反射回復時間 (LOR

R) および死亡を経時的に測定した (n=3~5、5g/kg は n=10)。BAC の測定はヘッドスペースガスクロマトグラフ (PerkinElmer 社製 9000) を用いた

(6) 心臓血ならびに臓器組織中の EtOH および AcH 濃度測定法

マウスに 4.5g/kg の EtOH を腹腔内投与し、投与後 0.5、2、4h のそれぞれの時間に心臓血、肝、腎、脳、筋を採取した (各 ADH 遺伝子型マウスは各時間で n=4~7)。心臓血は 0.3ml をシリンジで採取し、10mM tiourea、0.5mM EDTA、8μM iso-butanol (AcH の内部標準)、1mM n-propanol (EtOH の内部標準) をそれぞれ含む 1.5 ml の冷過塩素酸溶液

(0.6N) に添加し、素早く 5 秒攪拌後、0°C、5000rpm、5 分で遠心し、その上清 1ml をバイアル (15ml 容) に封入した。各臓器組織は心臓血採取後直ちに摘出し、液体窒素で凍結後、クライオプレス (MicroTeck Niton、千葉) で 10 秒間 2 回ホモジナイズし、其の粉末 0.3g を 1.5ml の冷過塩素酸溶液に添加し素早く 5~10 秒攪拌後、心臓血と同様に処理した。

(7) Alc 嗜好性テスト

各 ADH 遺伝子型マウスを用いて、水と EtOH 水 (5 または 10% v/v) の 2 瓶選択法によって Alc 嗜好性を一週間テストした。Wild、Adh3^{-/-}、Adh1^{-/-} は 16.6±3.8 カ月齢のものをそれぞれ雄 34、20、12 匹、雌で 10、22、32 匹を用いた。一つのケージには 5 から 9 匹のマウスを入れ一週間当たりの水と EtOH 水の減少量をそれぞれ計測し、1 匹当たりの摂取量を算出し、EtOH 水の摂取量を水、EtOH 水の総摂取量で除した値を Alc 嗜好性の評価値とした。

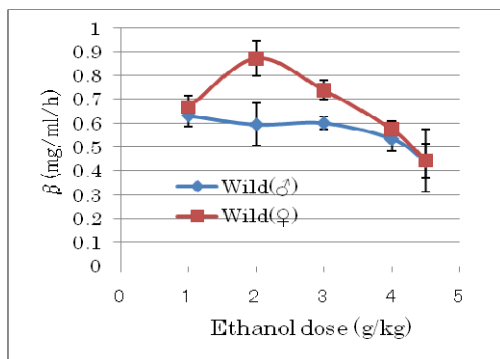
4. 研究成果

(1) 各 ADH 遺伝子型マウスの肝 ADH 活性とその性差

Wild ならびに Adh3^{-/-} の肝 ADH 活性は雄雌とも基質 EtOH が 3.8mM から 38mM の間でピークを示したが、両マウス種とも雌は雄の約 1.7 倍高かった。Adh1^{-/-} 型では、基質濃度が 75mM までは明らかな活性は雌雄とも見られなかったが、それ以上で雌雄差を認めない濃度依存的な活性上昇がみられた。

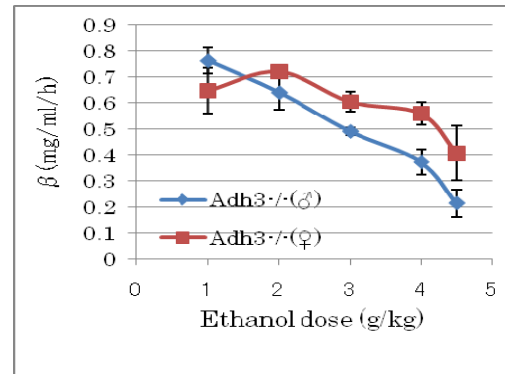
(2) 各 ADH 遺伝子型マウスの Alc 代謝動態の性差

Wild では、血中 Alc 濃度 (BAC_T) は 4g/kg を除く 1~4.5g/kg のすべての Alc 投与量で雄が雌より有意に高かった (1, 2g/kg: $p < 0.0001$, 3g/kg: $p < 0.05$, 4.5g/kg: $p < 0.001$, ANOVA)。その原因として、肝 ADH 活性の性差 (♀ > ♂) による血中 Alc 消失速度 (β 値) (図) および体内 Alc 消失速度 (EDR) の性差 (♀ > ♂: $p < 0.05$, ANOVA, 2 と 3g/kg で $p < 0.01$) が考えられた。



ADH3 を欠損する $Adh3^{-/-}$ の BAC_T は 2, 3, 4g/kg で雄が雌より有意に高かった (2g/kg: $p < 0.05$, 3, 4g/kg: $p < 0.0001$, ANOVA)。その原因は、Wild 同様雌の肝 ADH 活性が雄より高く、 β 値 (図) および EDR も雌が雄より高い ($p < 0.0001$, ANOVA, 3, 4, 4.5g/kg で有意) ことが考えられた。なお、4.5g/kg では BAC は逆に雄が雌より低かった ($p < 0.0001$, ANOVA) が、その原因としては後述の 4.5g/kg における Alc の体内分布率 (γ 値) の性差が示唆された。

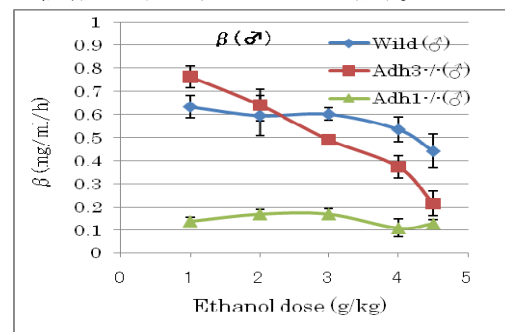
ADH1 を欠損する $Adh1^{-/-}$ の BAC_T は、Wild および $Adh3^{-/-}$ と異なり、1, 2, 3g/kg で雌が雄より高かった ($p < 0.0001$, 0.005, 0.0001, ANOVA)。 $Adh1^{-/-}$ では、肝 ADH 活性、 β 値および EDR のいずれにも性差を認めなかったため、このマウス種における BAC の性差は、 γ 値の性差が反映したものと考えられた (雌 < 雄, $p < 0.01$, ANOVA)。なお、4g/kg では BAC の性差がなくなったが、その原因として、 $Adh1^{-/-}$ におけるこの投与量での γ 値の性差の消失によることが示唆された。

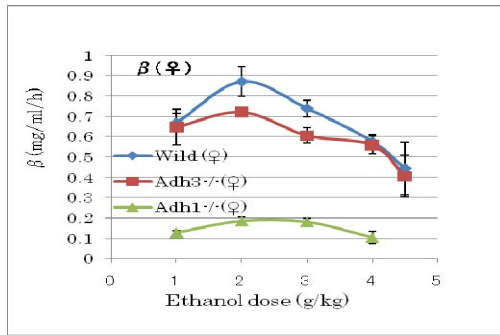


(3) 各 ADH 遺伝子型マウスの Alc 代謝動態 $Adh1^{-/-}$ は、ADH1 を欠損するため、Wild ならびに $Adh3^{-/-}$ に比べてすべての投与量において雌雄ともに有意に高い BAC を示した ($p < 0.0001$)。ADH3 $^{-/-}$ の BAC_T は Wild に比べて、1, 2g/kg の EtOH 投与では雌は高かったが、雄は低かった ($p < 0.0005$, ANOVA)。また、3g/kg では、雌雄ともに Wild より低かった ($p < 0.005$, ANOVA) が、4g/kg では、雌雄ともに Wild より高かった ($p < 0.005$, ANOVA)。4.5g/kg では、雌は 4g/kg と同様に Wild より高かったが、雄は逆に有意に低かった ($p < 0.005$, ANOVA)。このように $Adh3^{-/-}$ の BAC は Wild との比較で、投与量ならびに雌雄の複雑な関係が見られ、後述のごとく $Adh3^{-/-}$ 雄の投与量依存的な γ 値の変化が示唆された。

$Adh1^{-/-}$ の β 値は全投与量の範囲で雌雄とも Wild と比べて 1/3 から 1/4 の低値であった。EDR 値も β 値とほぼ同様な結果であった。

$Adh3^{-/-}$ の β 値は Wild と比べて雌雄とも有意な差が見られ ($p < 0.005$, ANOVA)、雄では 3g/kg 以上での低下が顕著であり (交互作用 $p < 0.005$)、雌では 2, 3g/kg で有意な低値が見られ、ADH3 の Alc 代謝への寄与の仕方に投与量依存の性差が認められた (図)。

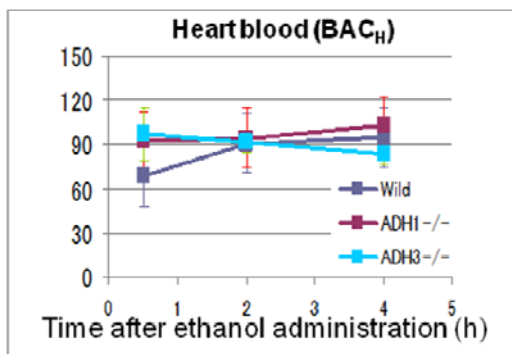




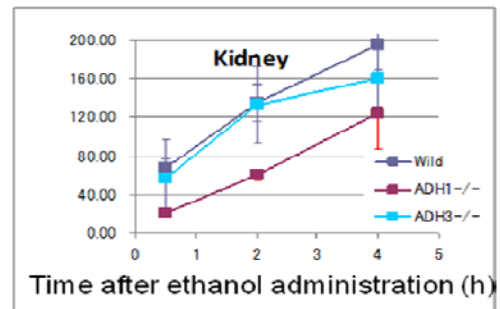
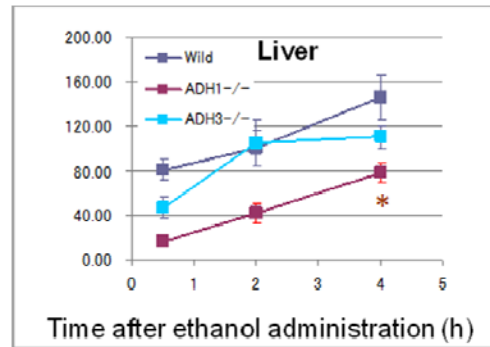
γ 値は Adh3^{-/-}の雄および Adh1^{-/-}の雌雄で投与量依存的な上昇がみられた。特に、Adh3^{-/-}の雄では 4.5g/kg における特徴的な増大が見られ ($p < 0.05$, ANOVA)、大量投与下での Alc 体内分布に ADH3 が何らかの関与をすることが示唆された (Adh3^{-/-}雄: $p < 0.0001$, Adh1^{-/-}雄: $p < 0.005$)。なお、4.5g/kg での Adh3^{-/-}雄の BAC が Wild に比べて有意な低下を示したが、その原因には Adh3^{-/-}雄における γ 値の特異的な増大が関係することが示唆された。

(4) 急性 Alc 中毒下における心臓血ならびに臓器組織中の EtOH および AcH 濃度

4.5g/kg の EtOH をマウスに投与し、4 時間後まで血中を初め各主要臓器中の EtOH および AcH の濃度を測定した。心臓血 (BAC_H) は Adh1^{-/-}、Adh3^{-/-}ともに 0.5h で Wild より高く ($p < 0.01$, Students-t)、EtOH 酸化の停滞が示唆された (図)。



AcH 濃度に関しては、Adh1^{-/-}は肝と腎で 4 時間までイタリックより低く ($p < 0.0001$)、ADH1 がこれらの臓器での AcH 産生に寄与していることが示された。一方、Adh3^{-/-}は肝でのみイタリックより低く、ADH3 の肝における EtOH 酸化が示された (図)。



(5) 各 ADH 遺伝子型マウスの Alc 嗜好性

Adh3^{-/-} および Adh1^{-/-} の 5% または 10% EtOH 水に対する Alc 嗜好性は、いずれも Wild に比べて雄雌共に有意に低かった。この結果は、ADH1 のみならず ADH3 も Alc 嗜好性因子の役割を持つことを示す。

(6) 各 ADH 遺伝子型マウスの急性 Alc 感受性と急性中毒および中毒死

EtOH 投与 4 ならびに 4.5g/kg 下での急性 Alc 中毒症状を対向反射消失時間 (LORR) で見たところ、Adh1^{-/-} はいずれの投与量でも雌雄ともに著しい延長を示した。また、Adh3^{-/-} も雌雄ともに両投与量下の LORR は有意に延長した。5g/kg において、Adh3^{-/-} および Adh1^{-/-} はいずれも雌雄ともにイタリックに比べて高い死亡率を示した。この結果は、ADH1 のみならず ADH3 も急性 Alc 中毒に対する防御的因子となることを示す。

(7) 臓器組織中の ADH1 と ADH3 の酵素量

ADH1 は肝 1 g で 2.15 ± 0.75 mg、小腸で肝の約 1/2.4、腎で 1/4.3、肺で 1/5.8 であった。その他の臓器では肝の 1/10 以下で、脳と心では検出されなかった。臓器組織当たり換算すると肝は 3.08 ± 1.35 mg となり、小腸は肝の 1/3、腎 1/11 で、肝 ADH1 量は測定した全臓器組織の量の約 64.3% に相当した。一方、ADH3 は肝 1 g あたり 2.23 ± 0.35 mg で ADH1 とほぼ同量認められ、肝に比べて、腎は

1/4.5、心 1/6、胃 1/6.6、精巣・小腸 1/8.3、大腸 1/8.6、膵 1/9.7 で、その他検査した全ての臓器組織（肺、眼球、脾、筋、皮膚）で肝の 1/16 以下の量が検出された。臓器組織当たりに換算すると ADH3 は肝では 3.12 ± 0.48mg となり、小腸では肝の 1/10、腎 1/12、大腸 1/26 で、肝 ADH3 量は全臓器組織の量の 77.8% に相当した。小腸と肺では ADH1 が ADH3 に比べて有意に多かったが、心、大腸、精巣、脳では ADH3 が ADH1 に比べて有意に多かった。以上の結果から、Alc 代謝への寄与が *in vivo* で証明されている ADH1 ならびに ADH3 はいずれも肝に局在し、肝が Alc 代謝の中心的臓器であることが確認された。肝以外の臓器に存在する ADH1 または ADH3 はそれぞれその臓器組織の生理的代謝を担うと同時にその場における局所的な Alc 代謝を担っていると考えられる。これら両 ADH の各臓器組織における分布の偏りとこれら臓器組織の Alc 感受性・障害のされやすさとの関係は今後の研究課題である。特に ADH1 の局在の認められない脳および心の Alc 性障害の臓器特異性と ADH3 との関係は興味深い。さらに、現在、飲酒後の Alc 初回通過効果 (First pass metabolism; FPM) は、胃の役割が大きいと言われているが、胃の ADH 含量は肝に比べて、ADH1 で 1/62、ADH3 で 1/39 と小さく、一方、小腸は ADH1 で 1/3、ADH3 で 1/10 であった。従って、今回の結果から、肝のみならず小腸の FPM への寄与の可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Haseba T., Kameyama K., Mashimo K., Ohno Y.: Dose-dependent change in elimination kinetics of ethanol due to shift of dominant metabolizing enzyme from ADH 1 (Class I) to ADH 3 (Class III) in mouse. *Int. J. Hepatology* (特集 "Advances in alcoholic liver disease"), 2011, in press. (査読あり)
2. Haseba T., Ohno Y.: A new view of alcohol metabolism and alcoholism—role of the high-Km Class III alcohol dehydrogenase (ADH 3)—. *Int. J. Environ. Res. Public*

Health, 1076–1092, 2010. (査読あり)

3. 長谷場 健: アルコール代謝の新しい視点—High Km ADH 3 (Class III) のアルコール代謝およびその生体作用における意義— *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, 44(2)、78–93、2009. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. Haseba T., Ohkusa M., Tanabe T., Yagi Y., Nakao S., Ye Y., Dyester G., Ohno Y.: Roles of ADH 3 in ethanol metabolism in major organs and in ethanol distribution—A comparison with ADH 1. 2010 ISBRA World Congress, Sept. 2010, Paris.
2. Haseba T.: (Invited lecture) Alcohol dehydrogenases—their biological and medical roles—. In Vietnam Academy Science and Technology, Institute of Tropical Biology, Sept. 2009, Ho Chi Minh City, Vietnam,.
3. Haseba T., Dyester G., Ohno Y.: (Workshop) Roles two major alcohol dehydrogenase isozymes, ADH 1 and ADH 3, in pharmacokinetics of blood ethanol. The 2nd USA–Japan Joint Workshop on Alcohol-related Problems, Sept. 2008, Yokohama, JPN.

[図書] (計 1 件)

1. 長谷場 健: (分担) 生活指導辞典 (総頁数 329)、日本生活指導学会編、エイデル研究所出版 (第 6 章 児童福祉・家族福祉と生活指導・対人援助・6–10 アルコール依存症者とその家族への支援「アルコール感受性と依存」)、pp. 240、2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷場 健 (HASEBA TAKESHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50156329

(2) 研究分担者 なし