

令和元年5月8日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09223

研究課題名(和文)慢性過剰飲酒における肝ADH1および3の活性動態とアルコール性肝障害進展への影響

研究課題名(英文) Enzymatic and metabolic adaptation to chronic alcohol consumption mediated by alcohol dehydrogenase 1 and 3 in mice.

研究代表者

大野 曜吉 (Ohno, Youkichi)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：70152220

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)：Wild Type(WT)/Adh1およびAdh3遺伝子欠損マウスを10%エタノール水で1ヶ月飼育した。その後、4.0g/kgエタノールを腹腔内に急速投与し経時的にアルコール血中濃度を測定し、肝ADH1およびADH3の酵素量・酵素活性・mRNA解析を行った。その結果、エタノール水飼育群が水飼育群よりもアルコール濃度時間曲線下面積(AUC)は有意に低く、マウスのAdh遺伝型に関わらず代謝耐性があった。さらに、酵素活性・mRNA発現は慢性飲酒によって変化しないものの、酵素量はADH1およびADH3ともに代謝速度の亢進に相関して増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝アルコール脱水素酵素では、ADH1・ADH3ともに代謝適応があり、慢性飲酒の初期には酵素量を増加させてアルコール代謝の亢進に寄与していることが示唆された。ADHを介したアルコール代謝では、ADH1のみならずADH3も慢性飲酒においても代謝耐性を獲得し、全身諸臓器でアルコール代謝に強く関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of ADH1 and ADH3 on alcoholic liver disease during chronic alcohol consumption (CAC) to clarify their involvement in ADH pathogenesis.

Nine-week-old male mice of different ADH genotypes (WT, Adh1<sup>-/-</sup>, and Adh3<sup>-/-</sup>) were administered 10% ethanol solution for 1 month, followed by acute ethanol administration (4.0 g/kg). Blood alcohol concentration (BAC) was measured, and the alcohol elimination rate (AER) was calculated. The liver content was evaluated by ELISA. CAC increased AER in all ADH genotypes, indicating that the mice acquired metabolic tolerance to ethanol in the early period of CAC. The increased ADH1 content was correlated with AER in WT mice. Similarly, the increased ADH3 content was also correlated with AER in both WT and Adh1<sup>-/-</sup> mice. We conclude that ADH1 contributes to metabolic pharmacokinetics of CAC with increased AER by increasing the enzyme content<sup>3</sup>. ADH3 also contributes to increased AER by an adaptive increase in the enzyme content.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール脱水素酵素 アルコール代謝

## 1. 研究開始当初の背景

アルコール脱水素酵素 (Alcohol dehydrogenase: ADH) は生体内におけるアルコール代謝経路のうち、エタノールを酸化しアセトアルデヒドに変換する役割を担っている。ADH は複数のアイソザイムを持つが、そのうち ADH1 はエタノール酸化の大部分を担う鍵酵素である。一方で、急性アルコール中毒時または慢性飲酒における慢性アルコール性肝障害では、血中アルコール濃度が高まるとともに ADH1 のアルコール代謝への寄与が低下し、より  $K_m$  の高い別のアルコール代謝酵素の寄与が高まるとされている。この肝 ADH1 以外のアルコール代謝経路の正体は薬物代謝系的一种であるミクロソームエタノール酸化系 (MEOS) であると考えられてきた。しかし、MEOS の主要成分であるチトクローム P450 2E1 (CYP2E1) 遺伝子欠損マウスにおいても慢性アルコール投与下で Wild Type (WT) と同程度のアルコール代謝亢進が認められたことなどにより、慢性飲酒時のアルコール代謝亢進に対する MEOS の役割には賛否両論の意見がある。

われわれは、従来から、慢性飲酒時の ADH1 以外の代謝経路の最有力候補として ADH アイソザイムのひとつである ADH3 に注目してきた。この ADH3 の  $K_m$  は血中でみられるエタノール濃度と比較して非常に高いため *in vivo* でのアルコール代謝への寄与は否定的であったが、ADH3 が疎水反応条件では EtOH に対し  $K_m$  を大きく低下させ、活性を著しく増大させる活性調節能を持つことを明らかにした [Haseba, Ohno et al. BBA., 2006]。また、*Adh3<sup>-/-</sup>* を用いた実験で ADH3 が急性 Alc 投与下での血中 Alc 消失速度に投与量依存的に寄与すること [Haseba, Ohno et al. BBA., 2006] や、マウスに EtOH を投与すると肝の ADH1 と ADH3 はダイナミックな活性変動を示し Alc 代謝で相補的な役割を担うこと [Haseba, Ohno et al. Int J Hepatol., 2012] などを明らかにした。また徳田らは、大量飲酒時には脳に局在する ADH3 によってアルコールが局所的に代謝され、生成したアセトアルデヒドが海馬での長期増強 (LTP) の阻害に関与し記憶を障害していることを報告した [Tokuda et al. Neurosci Lett. 2013]。これらはいずれも血中アルコール濃度が高い状況において ADH3 がアルコール代謝の一躍を担っていることを強く示唆しており、ADH3 のアルコール代謝における役割を詳細に検討することはアルコール関連臓器障害 (肝障害・依存症) やアルコール関連死 (急性アルコール中毒死・大酒家突然死症候群) の病態を解明するうえで極めて重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

慢性飲酒において一般的に ADH には代謝耐性がほとんどないと考えられている。そこで本研究ではマウスを用いて、慢性飲酒の初期における ADH1 および ADH3 の代謝適応について、分子生物学的・酵素学的解析を行い、ADH の代謝耐性の獲得についての検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

WT/*Adh1* および *Adh3* 遺伝子欠損マウスを 10% エタノール水で 1 ヶ月飼育した。その後、4.0g/kg エタノールを腹腔内に急速投与し経時的にアルコール血中濃度を測定するとともに、肝 ADH1 および ADH3 の酵素量・酵素活性・mRNA 解析を行った。コントロール群として水で 1 ヶ月飼育したものについても急速投与を行い同様の解析を行った。両群の各マウス種を Student-Newman-Keuls (SNK) method (ystat2013, Igaku-shoin, Tokyo, Japan) で比較し、 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

#### 4 . 研究成果

全てのマウス種においてエタノール水飼育群が水飼育群よりもアルコール濃度時間曲線下面積 (AUC) は有意に低く、一方で代謝速度 (AER) は有意に亢進し、マウスの *Adh* 遺伝型に関わらず代謝耐性があった。さらに、酵素活性・mRNA 発現は慢性飲酒によって変化しないものの、酵素量は ADH1 および ADH3 とともに代謝速度の亢進に相関して増加した。以上よりマウス肝 ADH1 のみならず ADH3 も耐性を獲得し、慢性飲酒の初期には酵素量を増加させながらアルコール代謝の亢進に寄与していることが示唆された。ADH を介したアルコール代謝では、諸臓器の ADH3 がアルコール代謝を行い、さまざまなアルコール関連臓器障害の発症に関与していると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Okuda T. The effect of alcohol dehydrogenase isozymes on alcohol liver disease and alcoholic osteoporosis. J Nippon Med Sch. 2019;86(1) 58-9. DOI: 10.1272/jnms.JNMS.2019\_86-11
2. Okuda T, Haseba T, Katsuyama M, Maruyama M, Akimoto T, Igarashi T, Ohno Y. Metabolic pharmacokinetics of early chronic alcohol consumption mediated by liver alcohol dehydrogenases 1 and 3 in mice. J Gastroenterol Hepatol. 2018;33(11):1912-19. DOI: 10.1111/jgh.14260

〔学会発表〕(計2件)

1. Okuda T, Katsuyama M, Maruyama M, Akimoto T, Haseba T, Ohno Y. Enzymatic and metabolic adaptation to ethanol by alcohol dehydrogenase 1 and 3 in mice. 24th Congress of International Academy of Legal Medicine (Fukuoka). Jun. 2018.
2. Okuda T, Maruyama M, Akimoto T, Haseba T, Ohno Y. The role of Class III Alcohol Dehydrogenase (ADH3) in alcohol-related disorder on liver and bone.16th Congress of European Society for Biomedical Research on Alcoholism (Crete). Oct 2017.

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：五十嵐 勉

ローマ字氏名：((IGARASHI, tsutomu)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10421190

研究分担者氏名：奥田 貴久

ローマ字氏名：(OKUDA, takahisa)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20620305

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 長谷場 健

ローマ字氏名: (HASEBA, takeshi)

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、研究者個人に帰属されます。