

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460879

研究課題名(和文) 高KmADH3の慢性Alc摂取下でのAlc代謝とAlc性障害発症における役割

研究課題名(英文) The roles of high Km ADH3 on alcohol metabolism and alcoholic disorders under chronic alcohol consumption

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wild、ADH1欠損、ADH3欠損の3種類のADH遺伝子型マウスに10%エタノール水を慢性摂取させ、各ADHのアルコール(Alc)代謝及びAlcoholism発症における役割を検討した。ADH1は慢性Alc摂取の継続に不可欠であり、Alc性肝障害及び依存症発症防御に寄与すること、一方、ADH3は慢性Alc摂取時の飲酒量を抑制するもAlc性肝障害の進展に関係することが分かった。両ADHは共に慢性Alc摂取によるAlc代謝亢進へ寄与し、特に一方のADHが欠損している場合それぞれ寄与を増大させるが、慢性摂取が長期化するとADH1の寄与はADH3とは異なり低下することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Three kinds of mice with different ADH genotypes(Wild, Adh1<sup>-/-</sup>, Adh3<sup>-/-</sup>) were subjected under chronic alcohol consumption (CAC) with 10% ethanol. ADH1 was found to be indispensable to continue CAC, and to have protective roles in alcoholic liver disease and dependence. On the other hand, ADH3 was demonstrated to accelerate alcoholic liver disease and alcoholism, although it represses daily alcohol intake under CAC. It is also suggested that both ADHs contribute to an increase in alcohol metabolism by CAC, especially in the absence of the other one, however, the contribution of ADH1 decrease in the prolonged CAC, differing from that of ADH3.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール代謝 ADH1 ADH3 アルコール嗜好性 アルコール肝障害 アルコール依存 ノックアウト  
マウス 慢性アルコール摂取

## 1. 研究開始当初の背景

従来、急性アルコール (Alc) 中毒時および慢性 Alc 摂取時の Alc 代謝には MEOS (Microsomal ethanol oxidizing system) が主要な役割を果たすと言われてきた<sup>1</sup>。しかし、その仮説はノックアウト (KO) マウスを用いた近年の報告で否定的である<sup>2</sup>。我々は近年、エタノール (EtOH) に対し極めて高い Km を持つ ADH3 が血中 Alc 消失に投与量依存的に寄与することを ADH3 KO マウス (*Adh3*<sup>-/-</sup>) を用いて明らかにした<sup>3</sup>。

また、我々は、Alc 代謝の鍵酵素として知られている ADH1 の Alc 代謝への寄与は、従来言われていたように約 70~80%であることを KO マウス (*Adh1*<sup>-/-</sup>) によって確認したが、その寄与は投与量の増加と共に低下することを示した<sup>3</sup>。

Alc 代謝は慢性 Alc 摂取によって亢進することが知られている。この代謝亢進に ADH が寄与するとの報告があるが<sup>4</sup>、これら ADH isozyme の検討はなく、慢性 Alc 摂取による Alc 代謝亢進の酵素的実体は不明である。

さらに、Alc 依存形成および Alc 性肝障害発症に関して、これら ADH がどのように関係しているかは明らかではなく、また、これら KO マウスを用いた慢性 Alc 投与と実験もまだ行われていない。

## 2. 研究の目的

*Wild* (W)、*Adh1*<sup>-/-</sup> (A1)、*Adh3*<sup>-/-</sup> (A3) の各 ADH 遺伝型マウスを用いて、以下のことを明らかにする。

(1) 慢性 Alc 摂取によって亢進する Alc 代謝に ADH1 および ADH3 がどのように寄与するか

(2) Alc 性肝障害および alcoholism の進展に ADH1 および ADH3 がどのように関与するか。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物

*Wild* (C57BL/6N) は三共ラボから購入した。*Adh1*<sup>-/-</sup>、*Adh3*<sup>-/-</sup>の各 ADH KO マウス<sup>3</sup>は C57BL と 13 世代の戻し交配を行い congenic strain として確立し、日本医科大学動物実験 SPF 室で継代飼育しているものを用いた。

### (2) 慢性アルコール投与

ケージに 5~10 匹の雄マウスを入れ、8 週令から 10% (w/v) EtOH 水を 1 ヶ月 (1M)、4 ヶ月 (4M) または 1 年 (1Y) 間摂取させたものを慢性 Alc 摂取群とした (WE、A1E、A3E)。また、EtOH 水の代わりに水を摂取させたものをコントロール群とした (WW、A1W、A3W)。EtOH 水および固形飼料はいずれも自由摂取とした。

### (3) 血中 Alc 濃度測定

尾静脈から 10 μℓ の血液を経時的に採取し、血中 Alc 濃度 (BAC) をパーキンエルマー社製 HS-ガスクロマトグラフィーで測定した<sup>3</sup>。

### (4) 血液生化学的検査

マウスの下大静脈から全採血し、その遠心上清をオリエンタル酵母 (株) に検査委託した。

### (5) 病理組織化学的検査

臓器を 4% パラホルムアルデヒド (1 日)、10% ホルムアルデヒド (数ヶ月) に浸漬した後、新日本組織化学 (株) に検査委託した。

## 4. 研究成果

(1) 各 ADH 遺伝子型マウスの慢性 Alc 摂取時の生存率

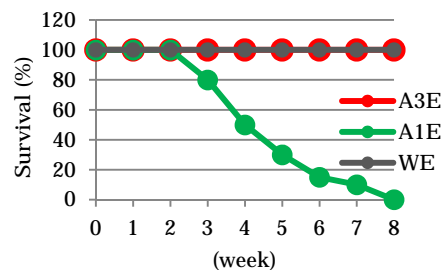


Fig.1 Survival of mice during drinking period of 10% ethanol (n=20)

A1E は EtOH 摂取 3 週目頃から死亡し始め、8 週目までには全匹死亡した (Fig.1)。

一方、WE および A3E は 4 ヶ月までは死亡は見られなかったが、EtOH 摂取 1 年間の死亡率は WE で 40%、A3E では 0% であった

### (3) 慢性 Alc 摂取時の体重変化

EtOH 摂取開始 (8 week-old) から 6 週までのマウスの体重は、WE は WW および A1W と同様な増加を示したが、A1E は増加が見られず他の群に比べて有意に低体重であった。

A3W はもともと WW に比べて若干低体重であるが、A3E は WE に比べて 1 年間に亘り有意に低体重であった。

### (2) Alc 摂取量

EtOH 摂取開始から 5 週目までの Alc 摂取量は、A1E で WE および A3E に比べて少なかった。また、WE は 10 週以降から 60 週 (1 年 5 ヶ月) まで Alc 摂取量の漸減傾向を示したが、A3E はほぼ一定の摂取量 (10g EtOH/kg 体重/day) を保持し、WE より多い摂取量を示した (Fig.2)。

### (3) 慢性 Alc 摂取期間中の BAC

A1EはEtOH摂取3週目まで80mM以上の高いBACを保持し、Alc禁断後15時間目頃から激しい退薬症状を呈した。一方、WEおよびA3EのBACは20mM以下で、禁断症状は見られなかった (Fig.3、n=5)。

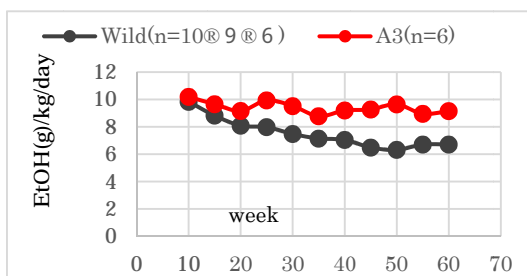


Fig. 2 Alcohol intake of mice

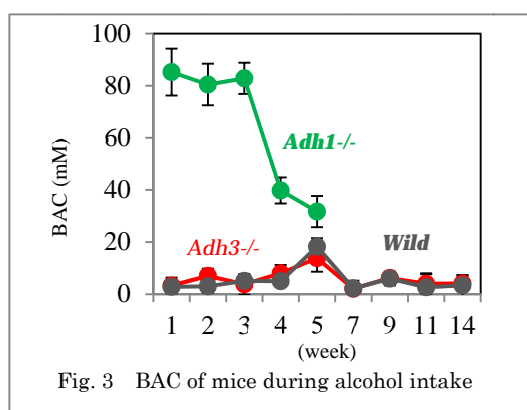


Fig. 3 BAC of mice during alcohol intake

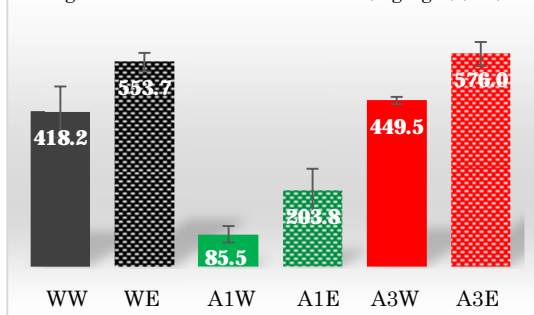
WEとA3EのAlc摂取1年目のBACはWE:27.6 ± 5.0 (昼) 2.6 ± 0.7 (夜)、A3E:35.0 ± 4.1 (昼) 5.6 ± 2.0 (夜)であり、A3Eが高い濃度を保持していた(n=5)。なお、両マウス種とも目立った退薬症状は見られなかった。

#### (4) Alc代謝速度(ER)

##### 慢性Alc摂取1ヶ月

コントロールマウス(3ヶ月令)の4g/kg EtOH投与下でのAlc代謝速度(ER:mg/kg/h)はWW:418.2 ± 69.5、A3W:449.5 ± 9.7、A1W:85.5 ± 22.4であり、A1WはWWの20.4%の代謝速度であった。一方、Alc摂取1ヶ月のマウス(同3ヶ月令)のERはWE:553.7 ± 25.1、A3E:576.0 ± 32.7、A1E:203.8 ± 59.9となり、いずれも有意な代謝亢進がみられた。そして、その増加率はそれぞれ32.4%、28.1%、138.4%で、特にA1Eにおける増大は約2.4倍であった(Fig.4)。

Fig.4 Alcohol elimination rate (mg/kg/h)(1M)



##### 慢性Alc摂取4ヶ月

各マウス(6ヶ月令)の4g/kg EtOH投与下でのERはWW:399.5 ± 51.0、A3W:387.2 ± 53.6、WE:480.4 ± 53.3、A3E:488.9 ± 86.1となり、4ヶ月間のAlc摂取によってそれぞれ21.3%、26.3%の有意な増加を示した。

##### 慢性Alc摂取1年

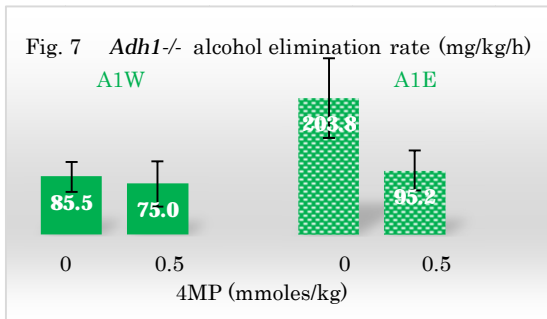
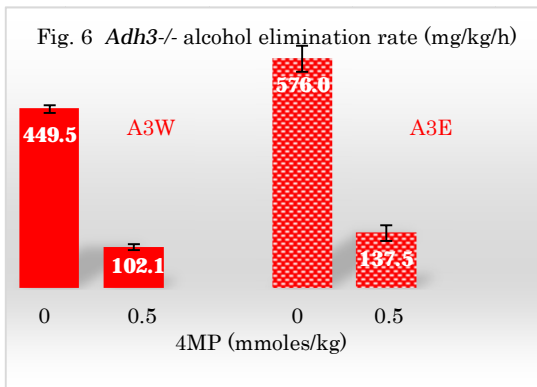
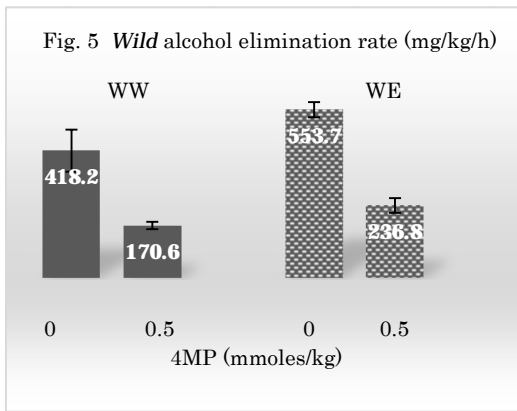
各マウス(1年2ヶ月令)の4g/kg EtOH投与下でのERはWW:330.2 ± 35.7、A3W:338.6 ± 65.3、WE:442.6 ± 31.6、A3E:415.1 ± 70.6となり、1年間の慢性Alc摂取によってそれぞれ34.0%、22.6%の増加を示したが、有意な増加はWEのみであった。ところで、Wild、Adh3-/-共に1M、4M、1YでageingによるERの低下傾向がみられ、WE、A3W、A3Eで有意であった。

##### 4-methylpyrazole(4MP)感受性Alc代謝

慢性Alc摂取1ヶ月の各マウス(WW、WE、A1W、A1E、A3W、A3E)の4g/kg EtOH投与下でのAlc代謝を4MP投与(EtOH投与3時間後に0.5mmoles/kgを腹腔内投与)の有無で比較検討した。

WW(4MP)のERはWWの40.8%、WE(4MP)はWEの42.8%であり、Wildの4MP感受性Alc代謝は慢性Alc摂取の有無に拘わらず全体の約60%を占めた(Fig.5)。一方、A3W(4MP)はA3Wの30.2%、A3E(4MP)はA3Eの23.0%であり、Adh3-/-の4MP感受性Alc代謝の全体に占める割合(69.8%)はWildより大きく、慢性Alc摂取によりさらに大きくなった(77.0%)(Fig.6)。このことはAdh3-/-のAlc代謝ではADH1依存代謝系の占める割合がWildに比べて大きく、慢性Alc摂取でその割合はさらに増大することを示す。

Wildの約20%程度のAdh1-/-のAlc代謝は、A1W(4MP)がA1Wの87.7%と大部分が4MP耐性Alc代謝系であるが、慢性Alc摂取ではA1E(4MP)はA1Eの46.7%と低下し、4MP感受性Alc代謝系が過半を占めた(Fig.7)。このことから、慢性Alc摂取により2倍以上に増大したAdh1-/-のAlc代謝はADH1以外のADH代謝系の亢進によるものであることが示された。



### (5) 慢性 Alc 摂取による臓器障害

#### 慢性 Alc 摂取 1 ヶ月

血液生化学検査で A1E は A1W に比べて AST、ALT、CK の有意な増加が見られた。一方、WE と WW および A3E と A3W との間には差は見られなかった。

#### 慢性 Alc 摂取 4 ヶ月

HE 染色の結果、WE は肝に Alc 性の大型脂肪変性が観察されたが、A3E は WE に比べて軽度であった。

#### 慢性 Alc 摂取 1 年

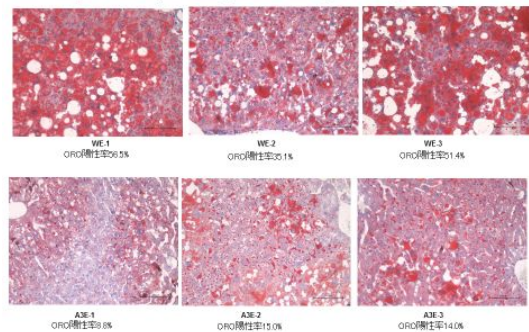
慢性 Alc 摂取 1 年の各マウスの肝：体重比を検討した結果、WE は WW に比較して有意な

肝肥大が認められたが、A3E と A3W の間では認められなかった。

血液生化学検査の結果、WE は WW に比べて ALT および AST が高値であったが、A3E は A3W に比べて有意な変化は認められなかった。

肝の肉眼的観察では、WE は A3E に比べて脂肪変性が強く、腫瘍様または結節様の変性も見られた。病理組織化学検査でも WE は A3E に比べて、Macrovesicular fatty degeneration が顕著で、中心性肝細胞肥大が強く、軽度の fibrosis も見られた。さらに、オイルレッド O (ORO) 染色陽性率は WE が平均 47.6% で A3E の 12.6% に比べて有意に高かった (Fig. 8)。これらのことから、WE は A3E に比べてよりも強いアルコール性肝障害を発症したことが明らかとなった。

Fig. 8 Steatohepatic changes of liver after 1 year drinking of 10% ethanol



### (6) まとめと考察

#### ADH1

*Adh1*<sup>-/-</sup>の慢性 Alc 摂取期間中の Alc 摂取量は *Wild* および *Adh3*<sup>-/-</sup> に比べて低いこと、また、*Adh1*<sup>-/-</sup> は慢性 Alc 摂取 3 週目頃から死亡しはじめ、8 週目頃には全死したことから、ADH1 は Alc 摂取量を高め、慢性 Alc 摂取を継続するための必須酵素であることが示された。さらに、*Adh1*<sup>-/-</sup> は、慢性 Alc 摂取期間中他のマウス種に比べて著しく高い BAC を呈し、Alc 摂取の禁断により激しい退薬症状を示したこと、ならびに血清酵素上昇により Alc 性臓器障害が示唆されたことから、

ADH1 は Alc 摂取中の BAC を低下させることによって、Alc 依存症ならびに臓器障害の発症を防御していることが示された。

ADH1 の Alc 代謝への寄与は *Adh1*<sup>-/-</sup> および 4 MP 投与の *Wild* の Alc 代謝速度から 60 ~ 80 % と考えられるが、*Adh3*<sup>-/-</sup> の 4 MP 感受性 Alc 代謝が *Wild* のそれに比べて大きいことから、ADH3 が欠損している場合はその寄与を増大させることが示された。さらに、*Adh3*<sup>-/-</sup> の 4 MP 感受性 Alc 代謝は 1 ヶ月の慢性 Alc 摂取により増大することから、ADH1 は慢性 Alc 摂取による Alc 代謝亢進に寄与することが示された。

### ADH3

*Adh3*<sup>-/-</sup> は *Wild* に比べて慢性 Alc 摂取期間中 2 週目 (10 週令) 頃から体重上昇が小さくなったが、Alc 摂取量はむしろ多くなり、飲酒量 EtOH(g)/kg/day は 60 週まで高く保持された。その結果、慢性 Alc 摂取期間中の BAC は *Adh3*<sup>-/-</sup> が *Wild* に比べて高く保持された。しかしながら、それにも関わらず摂取 4 ヶ月と 1 年目の血液生化学検査ならびに病理学検査から *Adh3*<sup>-/-</sup> の肝病態は *Wild* に比べて軽度であることが示された。このことは、ADH3 は飲酒量を抑制する役割を持つが、Alc 代謝に参加して Alc 性肝障害を進展させる生体因子であることを示唆する。さらに、Alc 摂取 1 年で死亡が見られたのは *Wild* のみで (死亡率 40 %) であったことから、ADH3 は長期 Alc 摂取による Alcoholism の進展ならびに死亡にも関与することが示唆された。

最近、我々は、ADH3 が四塩化炭素による肝線維化の増悪因子であることを報告した<sup>5</sup>。

ところで、我々は以前、ノックアウトマウス作成当時の *Adh3*<sup>-/-</sup> を用いて、ADH3 は投与量依存的に Alc 代謝に寄与することを報告した<sup>3</sup>。今回は C57/BL との 13 回以上の戻し交配を経た congenic strain を用いたためか、*Adh3*<sup>-/-</sup> と *Wild* との間に代謝速度の差は見られなかった。その原因は、*Adh3*<sup>-/-</sup> の Alc 代

謝では 4 MP 投与実験によって ADH1 の寄与の増大が認められたことから (4MP 感受性代謝の占める割合 WW: 59.2%、WE: 57.2%、A3W: 69.8%、A3E: 77.0%)、*Adh3*<sup>-/-</sup> においては ADH3 の欠損による ADH1 の代償的増大が適応的に生じたことによるものと考えられる。

なお、慢性 Alc 摂取の Alc 代謝速度亢進は 1 ヶ月目で *Wild* は 32.4%、*Adh3*<sup>-/-</sup> は 28.1% の増大であり、1 年目では *Wild* のみ 34.0% の有意な増大が見られたことから、ADH1 のみならず ADH3 の慢性 Alc 代謝亢進への寄与が示唆された。さらに、*Adh1*<sup>-/-</sup> の代謝は 1 ヶ月の慢性 Alc 摂取によって 2 倍以上亢進し、*Wild* の約 50% に達することが明らかになり、この亢進した代謝系は 4 MP 投与で抑制されることから ADH 依存代謝系であることが明らかとなった。*Adh1*<sup>-/-</sup> には ADH1 は欠損していることから、その 4 MP 感受性アルコール代謝は全身に分布する ADH3 によるものであることが示唆された。このように、ADH3 も ADH1 が欠損している場合は慢性 Alc 摂取による Alc 代謝亢進への寄与をさらに高めることが考えられた。

### < 引用文献 >

Liber C.S. and DeCarli L.M.: The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 181, 279-287, 1972.

Kono H., Bradford B.U., Yin M., Sulik K.K., Koop D.R., Peters J.M., Gonzalez F.J., McDonald T., Dikalova A., Kadiiska M.B., Mason R.P., Thurman R.G.: CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol*. 277, G1259-1269, 1999.

Haseba T., Duester G., Shimizu A., Yamamoto I., Kameyama K., Ohno Y.: In vivo contribution of Class III alcohol

dehydrogenase (ADH3) to alcohol metabolism through activation by cytoplasmic solution hydrophobicity. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 276 - 283, 2006 .

Hawkins R.D., Kalant H.: The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol Rev*, 24, 67-157, 1972.

Yi H-S., Lee Y-S., Byun J-S., Seo W., Jeong J-M., Park O., Duester G., Haseba T., Kin S.C., Park K-G., Gao B., Jeong W-I., Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and supporting natural killer cells in mice. *Hepatology*, 60, 2014, 1044-1053

#### 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5件)

Ohoshima S., Haseba T., Nemoto A., Siiya S., Kanda T., Ohno Y., Effects of ALDH2 genrtic polymorphism on the adaptive change in alcohol metabolism due to continuous moderate alcohol consumption in humans. *Food & Nutri. Sci.* 6, 2015, 195-204, 査読有

Goto M., Kitamura H., Alam M-M., Ota N., Haseba T., Akimoto T., Shimizu A., T-Yamamoto T., Yamamoto M., Motohashi H., Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from nonalcoholic steatohepatitis. *Genes to Cells*, 20, 2015, 464 - 480, 査読有

大島俊二、福田和郎、阿部裕子、長谷場健、大野陽吉、飲酒後のアルコール代謝動態と生理的変動に関するデータベース(第2報) - ALDH2\*1/\*1型の男性がビールあるいは焼酎を食事の有無で適量飲酒した場合、アルコールと医学生物学、33, 2014, 1 - 11, 査読有

Yi H-S., Lee Y-S., Byun J-S., Seo W., Jeong J-M., Park O., Duester G., Haseba T., Kin S.C., Park K-G., Gao B., Jeong W-I., Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and supporting natural killer cells in mice. *Hepatology*, 60, 2014, 1044-1053, 査読有

長谷場 健、アルコール代謝における Non-ADH pathway の正体と Class III alcohol dehydrogenase(ADH3) (総説)、*日本アルコール・薬物医学雑誌*、49 巻、2014、159 - 168、査読有

[学会発表](計4件)

長谷場健、丸山基世、秋元敏雄、慢性アルコール摂取によるアルコール代謝亢進に寄与する Non-ADH1 pathway の正体、アルコール医学生物学会、2016、1月、東京

Haseba T., Maruyama M., Akimoto T., Ohno Y., Class I alcohol dehydrogenase (ADH1) is indispensable for continuous alcohol drinking (CAD) to develop alcoholism. 15<sup>th</sup> European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Valencia, Spain, Sept. 2015 .  
佐久間隆弘、長谷場健、丸山基世、秋元敏雄、大野陽吉、急性アルコール中毒下での臓器障害とアルコール脱水素酵素の役割、日本法医学会学術関東地方集会、2014年、11月、東京

長谷場 健、アルコール代謝における Non-ADH pathway の正体と Class III alcohol dehydrogenase(ADH3)、アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会シンポジウム、2014年、10月、岡山

#### 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

秋元敏雄 (AKIMOTO Toshio)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30184112

##### (3)研究分担者

丸山基世 (MARUYAMA Motoyo)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60709757