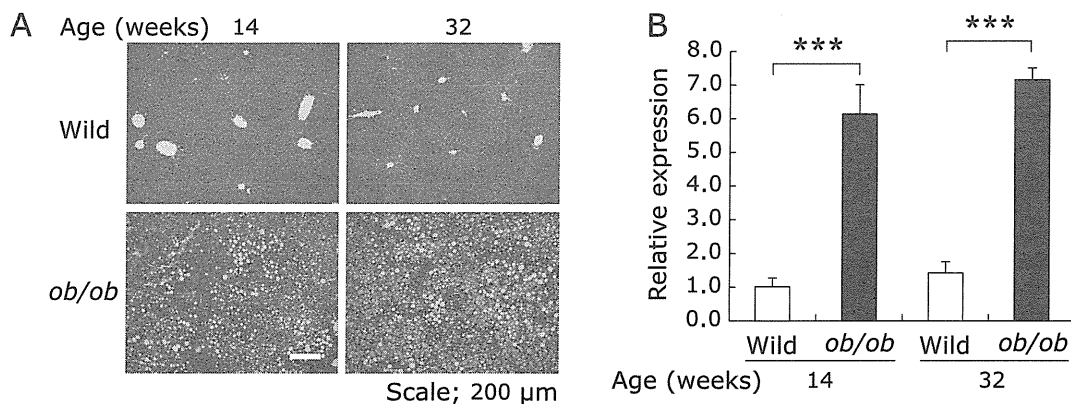


**Fig. 1.** Vanin-1 mRNA expression in mouse liver with steatosis induced by the high-fat diet. (A) Relative expression of vanin-1 in normal chow-fed and high-fat diet-fed mice. The values shown are the mean (SEM) ( $n = 5$ );  $***p < 0.001$  by analysis of variance compared with the normal diet. (B) Relative expression of mouse vanin-1 induced by the high-fat diet during the first week (Day 1–Day 7). “Day 3 + 4” indicates a normal diet was fed for 4 days after feeding a high-fat diet for 3 days. The data were normalized to the value of 18S rRNA. The values shown are the mean (SEM) ( $n = 5$ );  $***p < 0.001$  by analysis of variance compared with Day 0 (prior to induction by high-fat diet).

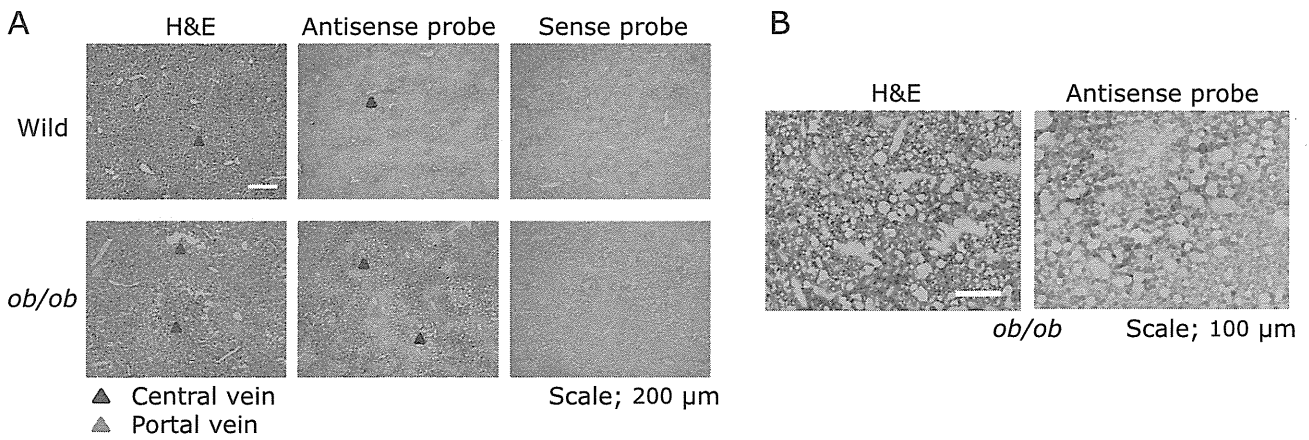
**Table 1.** Effects of the high-fat diet condition on physiological and biochemical parameters

Parameter	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 3 + 4
Body weight (g)	22.6 ± 0.5	23.6 ± 0.8	25.5 ± 0.5*	25.3 ± 0.5*	23.6 ± 0.7
Liver weight (g)	1.26 ± 0.05	1.34 ± 0.06	1.52 ± 0.05*	1.44 ± 0.05	1.24 ± 0.07
WAT weight (g)	0.24 ± 0.04	0.34 ± 0.05	0.46 ± 0.04*	0.44 ± 0.06*	0.28 ± 0.02
Blood sugar (mg/dL)	175 ± 5	155 ± 6	195 ± 6	180 ± 13	179 ± 7
Total Protein (g/dL)	5.1 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.6 ± 0.0
Albumin (g/dL)	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0
T-Cho (mg/dL)	79 ± 3	120 ± 3***	197 ± 4***	178 ± 8***	77 ± 2
HDL-C (mg/dL)	44 ± 2	71 ± 3***	103 ± 2***	91 ± 6***	42 ± 1
LDL-C (mg/dL)	6 ± 0	11 ± 0**	16 ± 1***	17 ± 1***	6 ± 0
Triglyceride (mg/dL)	46 ± 7	107 ± 12	51 ± 16	94 ± 25	71 ± 9
FFA (mEq/l)	0.88 ± 0.11	2.06 ± 0.14***	1.51 ± 0.15	1.50 ± 0.22	0.92 ± 0.05
GPT (U/l)	12 ± 2	9 ± 1	9 ± 0	12 ± 2	4 ± 1**

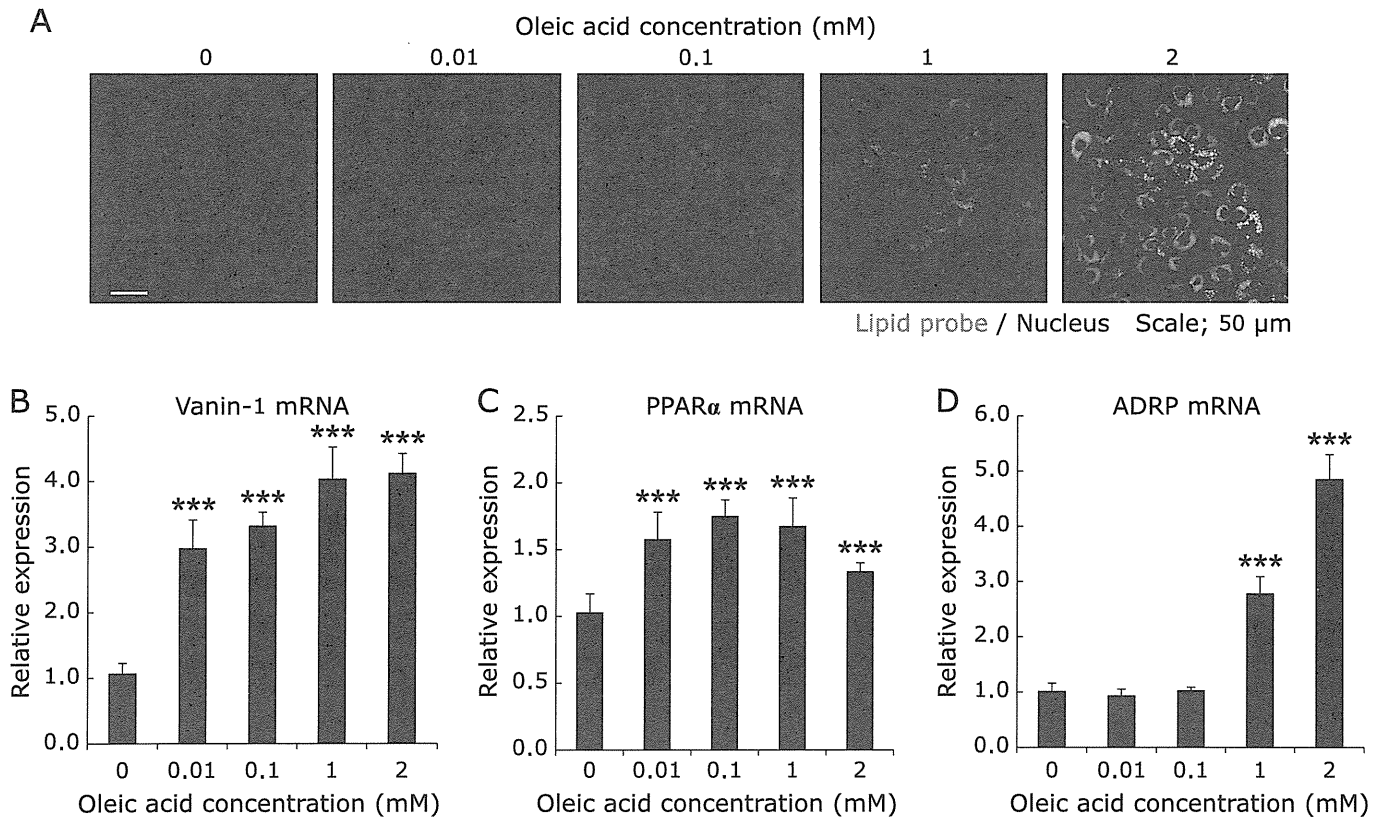
The data are expressed as mean ± SEM ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  vs the controls. “Day 3 + 4” indicates a normal diet was fed for 4 days after feeding a high-fat diet for 3 days. WAT indicates white adipose tissue; T-Cho, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; FFA, free fatty acid; GPT, glutamic-pyruvic transaminase.



**Fig. 2.** Vanin-1 mRNA expression in *ob/ob* mouse liver. (A) Results of the H&E staining of tissues from 14- and 32-week-old wild-type and *ob/ob* mice. (B) Relative expression of vanin-1 in the wild-type and *ob/ob* mice. The data were normalized to the value of 18S rRNA used as an endogenous control. The values shown are the mean (SEM) ( $n = 5$ );  $***p < 0.001$  by analysis of variance.



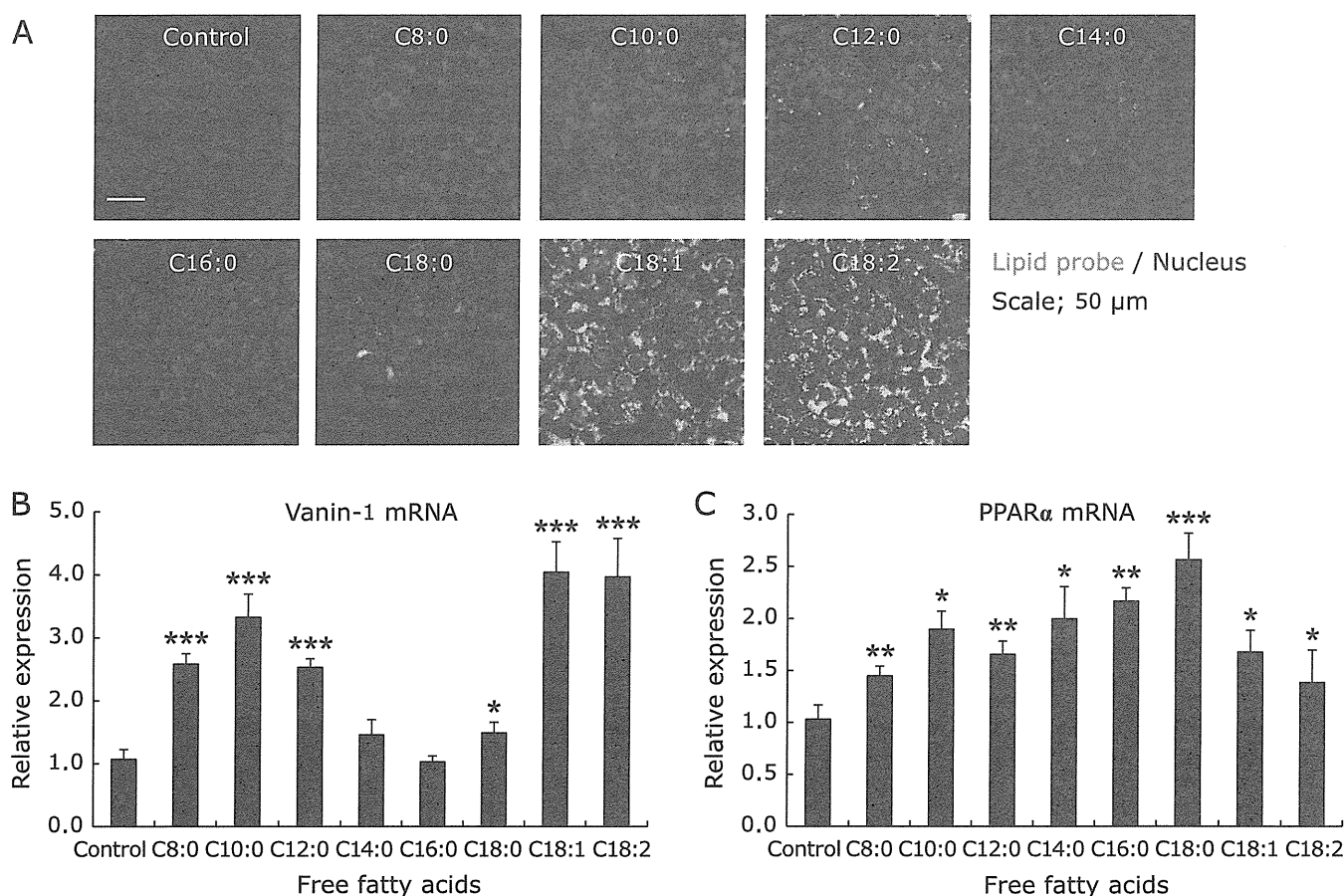
**Fig. 3.** Distribution of vanin-1 mRNA in steatotic liver tissues of *ob/ob* mouse. (A) *In situ* hybridization of tissues from wild-type and 32-week-old *ob/ob* mice. An antisense probe was used to detect vanin-1 mRNA and a sense probe was used as the negative control. (B) Right panels are high-magnification images of liver sections of *ob/ob* mice.



**Fig. 4.** Oleic acid (C18:1)-induced vanin-1 mRNA expression during the course of lipid accumulation in HuH-7 cells. (A) Immunofluorescence to show lipid accumulation (green) and nuclei (blue) in human hepatoma cell line HuH-7. After 24-h induction with 0 (control), 0.01, 0.1, 1, and 2 mM oleic acid, HuH-7 cells were fixed and observed by confocal laser-scanning microscopy. Note the absence of green fluorescence at oleic acid concentrations of 0.01 and 0.1 mM. (B)–(D) Relative expressions of vanin-1 (B), PPARα (C), and ADRP (D) in HuH-7 cells with the same doses of oleic acid. The values shown are the mean (SEM) ( $n = 6$ ); \*\*\* $p < 0.001$  by analysis of variance compared with the controls.

in inducing the same (Fig. 4A). Vanin-1 mRNA expression was significantly upregulated with concentrations of oleic acid  $\geq 0.01$  mM when compared with the controls (Fig. 4B); however, lipid droplets were not observed at oleic acid concentrations of 0.01 and 0.1 mM. Oleic acid upregulated PPARα mRNA expres-

sion when compared with the expression in control cultures (Fig. 4C), indicating that oleic acid act as a mediator to increase PPARα mRNA expression in HuH-7 cells. The mRNA expression of ADRP increased at oleic acid concentrations of 1 mM and above (Fig. 4D), which is consistent with the results shown in



**Fig. 5.** Induction of vanin-1 mRNA expression by different FFAs in HuH-7 cells. "Control" indicates control cells without FFAs. (A) Immunofluorescence to show lipid accumulation (green) and nuclei (blue) in HuH-7 cells. After 24-h induction by FFAs, HuH-7 cells were fixed and observed by confocal laser-scanning microscopy. Note the abundance of green fluorescence for oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2). (B) and (C) Relative expressions of vanin-1 (B) and PPAR $\alpha$  (C) in HuH-7 cells with different FFAs. The values shown are the mean (SEM) ( $n = 6$ ); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  by analysis of variance compared with the controls.

Fig. 4A. Additionally, lipid droplet formation was induced by oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2), but not by octanoic acid (C8:0), decanoic acid (C10:0), lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), and stearic acid (C18:0) (Fig. 5A). Further, when compared with the control cultures, the upregulation of vanin-1 mRNA was extremely significant with octanoic acid (C8:0), decanoic acid (C10:0), lauric acid (C12:0), and linoleic acid (C18:2), and moderately significant with stearic acid (C18:0), but insignificant with myristic acid (C14:0) and palmitic acid (C16:0) (Fig. 5B). Meanwhile, all FFAs used in this study upregulated PPAR $\alpha$  mRNA expression when compared with the expression in control cultures (Fig. 5C). These results suggested that the regulation of vanin-1 mRNA expression depended on chain length and nature of bonds in the FFAs.

## Discussion

In the present study, we demonstrated that levels of vanin-1 mRNA in mice on a high-fat diet increase within a day and that vanin-1 mRNA expression is more prominent around lipid droplet formations in the liver. Although vanin-1 expression did not change with the age of the mice with liver steatosis or grade of liver steatosis, the appearance of vanin-1 upregulation before the onset of liver steatosis suggests a definite role of vanin-1 in the progression of fatty liver disease.

Our findings indicate that serum FFAs derived from a high-fat diet may act as regulators of vanin-1 mRNA expression. Normally, high plasma FFA levels may either increase hepatic FFA uptake or at least maintain a normal rate of hepatic FFA uptake, despite increased hepatic FFA levels.<sup>(23)</sup> Therefore, in our study model, the vanin-1 mRNA expression in hepatocytes may have been upregulated by the increased rate of hepatic FFA uptake caused by elevated plasma FFA levels.

In general, FFAs are continuously metabolized and oxidized in hepatocytes. Oxidative products generated during these processes give rise to oxidative stress.<sup>(24,25)</sup> Vanin-1 gene expression is reportedly upregulated by oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation through 2 antioxidant response-like elements in thymic-sorted cells.<sup>(12)</sup> Interestingly, we observed that following the administration of high-fat diet, the increase in vanin-1 mRNA levels (seen as early as Day 1 after high-fat diet) preceded the onset of lipid accumulation, the hallmark of NAFLD (seen at 2 weeks after high-fat diet). Oleic acid, in particular, at concentrations of  $\geq 0.01$  mM was able to significantly upregulate vanin-1 mRNA expression *in vitro* when compared with control cultures (Fig. 4B); however, lipid droplets were not observed at oleic acid concentrations of 0.01 and 0.1 mM. Hence, it is possible that oxidative stress produced through beta oxidation of FFAs in the hepatocytes contributes to the induction of vanin-1 gene, and marks an early stage of NAFLD. The pantetheinase activity of

vanin-1 hydrolyzes pantetheine, an intermediate metabolite of coenzyme A, into pantothenic acid (vitamin B5) and cysteamine, a potent antioxidant.<sup>(26)</sup> Pantothenic acid, pantothenol, and other derivatives are known to protect cells and whole organs against peroxidative damage by increasing the content of cellular glutathione.<sup>(27)</sup> Therefore, the upregulation of vanin-1, leading to increased levels of cysteamine, may be an adaptive mechanism against hepatic oxidative stress induced by high-fat diet.

Previously, it has been reported that hepatic vanin-1 mRNA was upregulated in hepatic steatosis.<sup>(7–9)</sup> Further, PPAR $\alpha$  is a major coordinator of fatty acid oxidation in the liver.<sup>(28)</sup> FFAs increase PPAR $\alpha$  mRNA expression, and its activation regulates several key genes involved in fatty acid uptake and  $\beta$ -oxidation.<sup>(29,30)</sup> We have previously shown that a high-fat diet induces the mRNA expression of ADRP,<sup>(31)</sup> which is a reliable lipid droplet marker in fatty liver condition.<sup>(32)</sup> Furthermore, it has been reported that vanin-1 mRNA is upregulated by PPAR $\alpha$  activation.<sup>(33–36)</sup> In the present study, we observed that PPAR $\alpha$ , but not vanin-1, is upregulated by all types of fatty acids. Hence, it is appealing to speculate that in addition to PPAR $\alpha$ , vanin-1 is regulated by another upstream factor, whose expression/activity is controlled by the uptake of FFAs, and which may play a role in lipid metabolism in the liver.

NAFLD is characterized by fatty infiltration of the liver in the absence of alcoholic consumption, and currently affects approximately 30% of the adults and 10% of the children in the United States. It ranges from simple steatosis to NASH, which can progress to end-stage liver disease.<sup>(24,25)</sup> The development of NAFLD is closely associated with obesity and type 2 diabetes.<sup>(6)</sup>

Previous reports have suggested hyperinsulinemia and inappropriately high amounts of free fatty acids as a cause of hepatic steatosis.<sup>(37)</sup> However, a greater understanding of the pathophysiological changes is needed to develop more effective therapies for NAFLD.<sup>(6)</sup> We therefore believe that our mouse model for high-fat diet-induced hepatic steatosis would be useful to study the pathophysiology and regulatory factors involved in the progression of steatosis to NASH. Because NASH is thought to be a mitochondrial-dysfunction disease, which is caused by the overproduction of reactive oxygen species that in turn triggers lipid peroxidation,<sup>(38)</sup> it is quite likely that upregulation of vanin-1 plays a role in disease progression.

Our findings reveal that the upregulation of vanin-1 precedes lipid accumulation and is differentially mediated by various types of FFAs in the fatty liver model, presenting vanin-1 as a novel player in the pathogenesis of NAFLD. Further experiments using vanin-1 knockout mice would be necessary to establish the function of vanin-1 in the progression of NAFLD.

## Acknowledgments

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (23790799, 21790640) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan and the Takeda Science Foundation.

## Conflict of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## References

- Vega GL. Obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol* 2004; **29**: 47–54.
- Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, *et al*. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**: 2174–2180.
- Argo C, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009; **51**: 371–379.
- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci* 2010; **55**: 560–578.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; **114**: 842–845.
- Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; **16**: 733–747.
- Yu S, Viswakarma N, Batra SK, Samabasi Rao M, Reddy JK. Identification of promethin and PGLP as two novel up-regulated genes in PPAR $\gamma$ 1-induced adipogenic mouse liver. *Biochimie* 2004; **86**: 743–761.
- Sato W, Horie Y, Kataoka E, *et al*. Hepatic gene expression in hepatocyte-specific Pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatol Res* 2006; **34**: 256–265.
- Guillén N, Navarro MA, Arnal C, *et al*. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiological Genomics* 2009; **37**: 187–198.
- Aurrand-Lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity* 1996; **5**: 391–405.
- Pitari G, Malergue F, Martin F, *et al*. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett* 2000; **483**: 149–154.
- Berruyer C, Martin FM, Castellano R, *et al*. Vanin-1<sup>-/-</sup> mice exhibit a glutathione-mediated tissue resistance to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 7214–7224.
- Berruyer C, Pouyet L, Millet V, *et al*. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *J Exp Med* 2006; **203**: 2817–2827.
- Martin F, Penet MF, Malergue F, *et al*. Vanin-1<sup>-/-</sup> mice show decreased NSAID- and Schistosoma-induced intestinal inflammation associated with higher glutathione stores. *J Clin Invest* 2004; **113**: 591–597.
- Pouyet L, Roisin-Bouffay C, Clement A, *et al*. Epithelial vanin-1 controls inflammation-driven carcinogenesis in the colitis-associated colon cancer model. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 96–104.
- Roisin-Bouffay C, Castellano R, Valéro R, Chasson L, Galland F, Naquet P. Mouse vanin-1 is cytoprotective for islet beta cells and regulates the development of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008; **51**: 1192–1201.
- Terayama R, Bando Y, Murakami K, Kato K, Kishibe M, Yoshida S. Neuropilin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury. *Neuroscience* 2007; **148**: 175–187.
- Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, Kumei S, Yoshizaki Y, Okumura T. Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and induce cell growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; **29**: 22.
- Kumei S, Motomura W, Yoshizaki T, Takakusaki K, Okumura T. Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **380**: 614–619.
- Inoue M, Ohtake T, Motomura W, *et al*. Increased expression of PPAR $\gamma$  in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **336**: 215–222.
- Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 2005; **33**: 138–144.
- Ockerman HW. *Source book for food scientists*. Connecticut: AVI Publishing Company, 1978; 151–152.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; **114**: 147–152.
- Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006; **130**: 207–210.
- Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubscher SG, Adams DH. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2007; **27**: 173–193.
- Nitto T, Inoue T, Node K. Alternative spliced variants in the pantetheinase family of genes expressed in human neutrophils. *Gene* 2008; **426**: 57–64.
- Slyshenkov VS, Dymkowska D, Wojtczak L. Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett* 2004; **569**: 169–172.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPAR $\alpha$ : energy combustion,

- hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal* 2010; **8**: e002.
- 29 Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; **205**: 1–8.
- 30 Yoon M. The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. *Pharmacol Res* 2009; **60**: 151–159.
- 31 Motomura W, Inoue M, Ohtake T, *et al.* Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **340**: 1111–1118.
- 32 Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Cao Q, Lieber CS. Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; **32**: 683–689.
- 33 Yamazaki K, Kuromitsu J, Tanaka I. Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 1114–1122.
- 34 Wong JS, Gill SS. Gene expression changes induced in mouse liver by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; **185**: 180–196.
- 35 Moffit JS, Koza-Taylor PH, Holland RD, *et al.* Differential gene expression in mouse liver associated with the hepatoprotective effect of clofibrate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **222**: 169–179.
- 36 Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research* 2010.
- 37 Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk-factors. *Hepatology* 1990; **12**: 1106–1110.
- 38 Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; **29**: 22–35.

## 特集II 肝硬変患者の栄養マネジメント

## 飲酒の鉄代謝に及ぼす影響\*

大竹 孝明\*\*\*  
高後 裕\*\*

**Key Words** : alcoholic liver disease, iron overload, hydroxyl radical, transferrin receptor, hepcidin

## 生体と鉄

核酸, 脂肪, 糖を構成している元素は炭素, 水素, 酸素, 窒素, リン, イオウで, これにカルシウム, カリウム, ナトリウム, マグネシウム, アルミニウムを加えた11元素でもって生体の99%以上が構成されている。しかし, 生体活動にはさらに鉄, 亜鉛, 銅, マンガンなどの必須微量元素が必要である。なかでも鉄は最も多量な必須微量元素である(3~4 g)。生体鉄はヘモグロビン, ミオグロビン, またはヘム鉄として多数の酵素の補因子として使用され, エネルギー代謝に重要な働きをしている。

健常状態において鉄は腸管粘膜・皮膚上皮の脱落によってわずかに喪失するだけで, 能動的に体外へ排泄する機構はない。食餌鉄の吸収は, わずか1 mg/日が上部小腸から吸収され, イン・アウトのバランスがとれている。鉄需要のほとんどが網内皮系細胞による老廃赤血からのヘモグロビン鉄のリサイクルによって供給されている。鉄の体内運搬はトランスフェリン(Tf)結合鉄

の状態で行われる。鉄は主に骨髄での赤血球造血で利用され, 残りは肝臓や網内皮系細胞に蓄積されている。貯蔵鉄は必要に応じて血清中の再利用プールに汲み出される。このように生体内鉄代謝はリサイクル機構が発達した半閉鎖的システムとなっており, 鉄の過剰や欠乏が起きないように厳密に調節されている。

## 鉄過剰症

鉄は能動的な排泄機構がないことから鉄過剰症とそれに伴う酸化ストレスが発生しやすく, 慢性飲酒者においてもしばしばみられる。鉄過剰症となり血清Tf飽和度が60%以上になるとアルブミン, クエン酸とだけ弱く結合した非トランスフェリン結合鉄(non-transferrin bound iron; NTBI)が出現する。このNTBIは不安定血清鉄であり, 細胞毒性が強い<sup>1)</sup>。細胞内では非ヘム鉄はフェリチンやヘモジデリンによって隔離貯蔵されているが, 鉄過剰になると不安定鉄プール(labile iron pool; LIP)という自由鉄分画が増加してくる<sup>2)</sup>。肝臓は鉄の貯蔵臓器であるので, 鉄過剰症では肝細胞内のLIPが増加し, 鉄毒性が増強する。炎症, 放射線, 紫外線と同様に鉄過剰状態は活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)産生を介して細胞障害, 発癌リス

\* Influence of iron metabolism by alcohol drinking.

\*\* Takaaki OHTAKE, M.D., Ph.D. & Yutaka KOHGO, M.D., Ph.D.: 旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野(〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1-1-1); Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology, Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, JAPAN

\*\*\* 旭川医科大学臨床消化器・肝臓学診療連携講座

ク因子として働く。これはDNA損傷、細胞内シグナル伝達系および遺伝子発現異常、細胞増殖およびアポトーシスなど多くのステップで関与している。

### 肝疾患と鉄過剰症

欧米で多い遺伝性ヘモクロマトーシスは、種々の鉄関連分子の遺伝子変異を背景に全身実質臓器に鉄の過剰蓄積が起り、肝硬変などの臓器不全が起きる。肝発癌は健常人の200倍になる。貯蔵鉄が多いほど発癌リスクが増大する。二次性鉄過剰症としてサラセミアなどの無効造血疾患、再生不良性貧血などの輸血依存性血液疾患、漫然とした鉄剤投与による鉄過剰症がある。C型肝炎の肝組織にも鉄の過剰蓄積があり、ラジカル産生を介して、肝細胞障害や肝発癌に関与しており、これに対し瀉血療法は酸化ストレスを軽減し、発癌抑制効果がある<sup>3)</sup>。さらに、この鉄による酸化ストレス状態はアルコール性肝障害(ALD)や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)でも起きている<sup>4)5)</sup>。

### 鉄過剰の酸化ストレス

肝臓は代謝の中心臓器であり、多数の酵素によってさまざまな代謝反応が起きている。ミトコンドリア、マイクロゾームの電子伝達系では多量のROSが産生される。産生された活性酸素 $\cdot O_2^-$ の反応性は弱い。細胞内において鉄はフェリチンに隔離収納されており、通常はラジカル産生に寄与しない。しかし、鉄が過剰になりLIPが増加していくと、遊離の3価鉄の一部が2価鉄となり、 $\cdot O_2^-$ からFenton反応、Haber-Weiss反応によって強力なヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )を産生し、蛋白質、脂質、核酸と反応し、細胞障害、線維化、発癌を促進する。

### アルコール性肝障害

アルコールはほぼ全世界で消費されている嗜好品で、その巨大な消費人口においてアルコール依存症合併の有無にかかわらず、ALDを主とした臓器障害の発症が問題となっている。ウイルス性肝炎の制御が可能になりつつある現在、わが国においても慢性肝疾患に占めるALDと肥

満を背景としたNASHの比率が増大していくことが予想される。本邦におけるALDの定義は、エタノール(EtOH)換算60g/日以上(通常は5年以上)にわたる過剰の飲酒が肝障害の主な原因となるものとなっている。

ALD発症メカニズムは、アルコール代謝とそれに伴う生化学反応から、過度の飲酒が代謝異常と免疫反応を介して起きている。また、疾患発症リスクは積算飲酒量だけでなく、代謝酵素の遺伝子多型の影響も明らかとなっている。ALDの主となる病態メカニズムは肝脂肪化、酸化ストレス、脂質過酸化、アセトアルデヒド(AcH)産生が重要である。合併する鉄過剰は酸化ストレスを増強し、肝臓中の脂質過酸化反応のアルデヒドエンドプロダクト濃度を増加させ、肝細胞障害を悪化させる。

### ALDの酸化ストレス

EtOH代謝はアルコール脱水素酵素(ADH)、シトクロムP450 2E1(CYP2E1)を主としたマイクロゾームエタノール酸化系(MEOS)、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)の3つの経路によってEtOHからAcHを介して酢酸に代謝される。酢酸はさらにクエン酸サイクルにおいて水と二酸化炭素に分解される。長期間の過剰飲酒によって、代謝過程で産生されるROS、中間代謝物のAcHが臓器障害の原因となる。

酸化ストレス状態とは細胞内外のROS産生が内因性抗酸化機能を凌駕した状況である。慢性飲酒者におけるROS供給源は肝細胞のMEOS、ミトコンドリア電子伝達系、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、クッパー細胞などである。ALDの病因に重要であると考えられる酸化物は $\cdot O_2^-$ 、過酸化水素( $H_2O_2$ )、 $\cdot OH$ 、ヒドロキシエチルラジカルである。実際に、鉄の存在下でMEOSは脂質過酸化反応を起こすのに十分なROSを産生する。CYP2E1はEtOH代謝を触媒するときヒドロキシエチルラジカルを産生する。このような酸化ストレスによって細胞膜のリポ蛋白質脂質の多価不飽和脂肪酸(PUFA)成分の脂質過酸化が起き、炎症、線維化および免疫反応につながる。ALDでは酸化ストレスおよび脂質過酸化の程度と肝障害の程度は相関する。 $\cdot OH$ の供給源であ

る $\cdot O_2^-$ の敏速な消去が抗酸化ストレスに重要であるが、 $\cdot O_2^-$ スカベンジャーであるsuperoxide dismutase (SOD)やcatalase, glutathione peroxidaseがROS消去に重要な役割を担っている。アルコール症では栄養状態が悪く、微量金属欠乏症を合併していることが多く、これら酵素の活性が低下し、活性酸素の消去が不十分となることが多い。また、肝炎がある場合、浸潤炎症細胞内にも多量の活性酸素が産生されており、このような環境下において鉄過剰状態になるとラジカル産生が促進され、肝炎がさらに悪化するものと考えられる。

### ALD病態における鉄過剰の役割

ALDにおいて過剰飲酒の機序だけでなく、発症してきた肝脂肪化そのものも病態を悪化させている。大酒家ALDの肝生検組織の肝脂肪化の程度とパターンが線維化と肝硬変進展リスクの予測因子になっている。つまり、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)と同様にALDの肝脂肪化は“first hit”であり、さまざまな“second hit”に対する肝の感受性を増している状態といえる。“second hit”には腸内細菌由来エンドトキシンのほかに、過剰鉄が関与していると考えられている。

ALDでは肝内鉄濃度の上昇があり、鉄酸化ストレスによる肝障害の増強が示唆されていた<sup>6)</sup>。この病態を、アルコールと鉄の胃内投与をする動物モデル (Tsukamoto model) を用いて検討すると、肝内鉄量の増加、脂質過酸化、肝細胞障害、肝線維化の促進が示され、鉄とアルコールの相乗効果による酸化ストレスの増強が証明された<sup>7)</sup>。さらに細胞分画レベルの検討ではアルコールがKupffer細胞の鉄含量を上昇させ、NF- $\kappa$ Bを活性化し、TNF $\alpha$ 産生を促進させ、さらに鉄はこのNF- $\kappa$ Bシグナルを促進するように働くことによって肝細胞障害と肝線維化を促進することが示された<sup>8)</sup>。また、アルコールは肝の抗酸化システムであるグルタチオンレベルを低下させるが、鉄過剰はこのアルコールによる肝内グルタチオン濃度の減少をさらに促進することが報告されている<sup>9)</sup>。

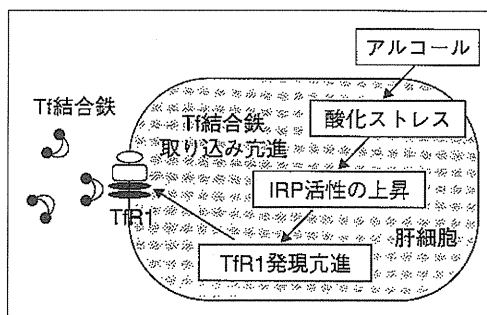


図1 アルコールとトランスフェリン受容体発現異常  
アルコールの中間代謝産物アセトアルデヒドの酸化ストレスによってIRP活性が増し、TfR1発現が誘導され、肝細胞へのTf結合鉄の取り込みが亢進する。

### アルコールによる鉄関連分子発現異常を介した鉄代謝障害

#### 1. アルコールとトランスフェリン鉄の取り込み亢進

ALDの肝組織において、肝実質細胞への鉄の沈着が認められる。肝細胞内への鉄取り込みのほとんどがTfとトランスフェリン受容体 (TfR) を介して起こる。TfRにはさまざまな細胞に存在するTfR1と肝特異的に発現していて鉄感知センサーとしての役割をするTfR2の2種類がある。通常の状態の肝細胞にはTfR1はほとんど発現していないが、ALDの肝組織ではTfR1の発現が増加しており、TfR1を介したTf結合鉄の取り込み亢進が誘導されている<sup>10)</sup>。アルコールによるTfR1発現亢進の機序に関してはiron responsive element (IRE)/ iron regulatory protein (IRP) binding assayによってアルコール代謝産物AcHによる酸化ストレスがIRP活性を上げTfR1の発現を増加させていることが見出されている<sup>11)</sup> (図1)。

#### 2. アルコールと鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現異常

遺伝性ヘモクロマトーシスにおいて、その鉄関連遺伝子の変異を背景とした鉄代謝異常は鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現異常を介している。アルコールによる鉄過剰症の病態においても、このヘプシジンの発現異常が存在することが示され、アルコールと鉄代謝不全との関連が明らかにされつつある。

元来、鉄代謝における鉄供給源はマクロファ-



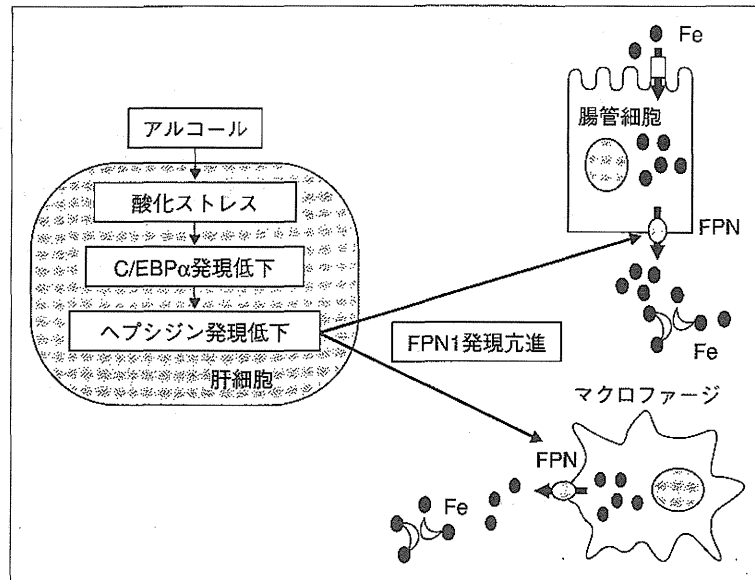


図2 アルコールとヘプシジン発現異常

アルコールのROS産生による転写因子C/EBPαの発現低下を介したヘプシジンの発現低下がFPNの発現亢進を誘導することによって腸管細胞からの鉄吸収とマクロファージからの鉄放出が促進し肝内鉄過剰となる。

ジによるヘモグロビン鉄のリサイクル系であり、それにわずかな十二指腸からの鉄吸収が加わり半閉鎖的な鉄代謝システムが形成されている。よって、鉄の過剰や欠乏が起きないように、骨髄、肝臓、脾臓、網内系細胞、腸管などの離れた諸臓器が協調して鉄代謝を行い、厳密に調節されている。その液性の調節因子が肝細胞で産生されるヘプシジンである<sup>12)</sup>。ヘプシジンは腸管細胞とマクロファージに発現する鉄トランスポーターferroportin1 (FPN)の発現を制御することによって、十二指腸からの食餌鉄吸収とマクロファージからの鉄放出を抑制し、生体の鉄代謝を負の方向に調節する。ヘプシジン産生は、鉄負荷、細菌の曝露、炎症、低酸素などの状況で変化する。炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6)、bone morphogenetic protein (BMP)を介したシグナルで発現が誘導され、その結果、小腸からの鉄吸収とマクロファージからの鉄の放出を抑制する<sup>13)</sup>。逆に鉄欠乏状態ではヘプシジンの発現は低下し、それとともに小腸のFPNの発現が亢進し、鉄吸収が増加する。

アルコール摂取により、消化管からの鉄吸収が亢進することが古くから報告されていたが、

その機序は不明であった。ALDにおける肝内鉄過剰蓄積の別の機序として、われわれはヘプシジンの発現が低下していることを見出している。ALD患者の血清中プロヘプシジン濃度についてELISA法で検討したところ、ALD患者の血清プロヘプシジン濃度は健常人に比べて低下傾向であった<sup>14)</sup>。さらに、マウス、ラットを用いたアルコール負荷動物モデルや肝癌細胞株へのエタノール添加モデルにおいても、ヘプシジンの発現抑制が確認された。アルコールによるヘプシジン発現抑制の機序はアルコールによるROS産生が転写因子CCAAT-enhance-binding protein α (C/EBPα)の発現低下を介して起きていると報告されている<sup>15)16)</sup>。また、急性アルコール性肝障害モデルでは肝内の低酸素状態がhypoxia inducible factor (HIF)-1α、HIF-2αがC/EBPαの産生低下を介してヘプシジン発現を抑制していると報告されている<sup>17)</sup>(図2)。しかし、一方で、ALD患者のヘプシジンが常に低下しているわけでもない。ROSのひとつであるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は低濃度ではシグナルの上流のIL-6またはBMPの刺激と独立して、ヘプシジンの発現を誘導するようであり、アルコール代謝におけるヘプシジンを介した鉄代謝異常

は思った以上に複雑のようである。

### おわりに

アルコール代謝に伴う肝脂肪化、酸化ストレスはALDの病態の主因であるが、飲酒による鉄代謝異常はその増悪因子となる。鉄過剰によって酸化ストレスが増強し、肝線維化、肝発癌への進展を促進させる。この飲酒による鉄代謝異常のメカニズムは鉄関連分子レベルで解明されてきているが、まだブラックボックスの部分が多い。今後の研究に期待される。

### 文 献

- 1) Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005 ; 18 : 277.
- 2) Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool : characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* 2002 ; 33 : 1037.
- 3) Kato J, Miyanishi K, Kobune M, et al. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2007 ; 42 : 830.
- 4) Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, et al. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 2005 ; 29 Suppl : 189S.
- 5) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003 ; 38 : 32.
- 6) Chapman RW, Morgan MY, Bell R, Sherlock S. Hepatic iron uptake in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1983 ; 84 : 143.
- 7) Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 620.
- 8) Xiong S, She H, Takeuchi H, et al. Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 17646.
- 9) Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, et al. Effects of ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997 ; 25 : 351.
- 10) Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, et al. Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2002 ; 26 Suppl : 26S.
- 11) Suzuki M, Fujimoto Y, Suzuki Y, et al. Induction of transferrin receptor by ethanol in rat primary hepatocyte culture. *Alcohol Clin Exp Res* 2004 ; 28 Suppl : 98S.
- 12) Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2(USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 8780.
- 13) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1271.
- 14) Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, et al. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res* 2007 ; 31 (1 Suppl) : S2.
- 15) Bridle K, Cheung TK, Murphy T, et al. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury : implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2006 ; 30 : 106.
- 16) Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 22974.
- 17) Anderson ER, Taylor M, Xue X, et al. The Hypoxia-Inducible Factor-C/EBP $\alpha$  Axis Controls Ethanol-Mediated Hepcidin Repression. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 : 4068.

\* \* \*

## メタボリック症候群と飲酒

大竹 孝明 高後 裕<sup>1)</sup>

**要旨:** アルコール性肝障害の病態はエタノール代謝による肝細胞の生化学的変化から代謝異常を呈し、肝脂肪化、酸化ストレス、脂質過酸化がおきて発症、進行する。本稿では慢性飲酒にともなう脂質代謝を中心とした代謝異常、酸化ストレスの発現メカニズムを概説し、さらに酸化ストレスを促進する環境因子である食餌内容と病態との関連、肝障害に対する飲酒とメタボリック症候群との相加・相乗効果に関して述べる。

**索引用語:** シトクロム P450 2E1 (CYP2E1), 遊離脂肪酸 (free fatty acid; FFA), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), 酸化ストレス

### はじめに

アルコールはほぼ全世界で消費されている嗜好品で、ストレス軽減、人間関係の円滑化にも一役をこなしている。その巨大な消費人口においてアルコール依存症合併の有無にかかわらず、アルコール性肝障害を主とした内科疾患の発症が問題となっている。ウイルス性肝炎の制御が可能になりつつある現在、わが国においても慢性肝疾患に占めるアルコール性肝障害と肥満を背景とした非アルコール性脂肪性肝疾患の比率が増大していくことが予想される。しかも両疾患とも代謝異常を高頻度に合併し、心血管系疾患合併に寄与するため、これら患者群は全身状態が不良な症例が多い。

アルコール性肝障害発症メカニズムは、アルコール代謝とそれにとまなう生化学反応の研究から、過度の飲酒が代謝異常と免疫反応を介しておきている。また、疾患発症リスクは積算飲酒量の環境因子だけでなく、代謝酵素の遺伝子多型の影

響も重要であることが明らかとなっている。一方で合併するメタボリック症候群の病態に与える影響に関しては不明な点が多い。本稿ではメタボリック症候群と飲酒の関連性に関してアルコール性肝障害の病態から記述していく。

### 1 エタノール代謝とアルコール性肝障害の病態メカニズム

アルコール性肝障害 (ALD) の病態メカニズムはエタノール (EtOH) 代謝による肝細胞の生化学的・組織学的変化から始まる。肝脂肪化、酸化ストレス、脂質過酸化、アセトアルデヒド (AcH) 産生が重要な要素となっている。

#### 1. アルコール性脂肪肝の病態

飲酒は肝細胞にグリセロール三リン酸 (G3P) のエステル化反応で産生されたトリグリセリド (TG) を蓄積させる。脂肪酸合成関連遺伝子の転写因子 sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) 誘導によって脂肪酸合成を増加、同じく転写因子の peroxisome proliferator-

1) 旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野  
Metabolic syndrome and chronic alcohol consumption  
Takaaki OHTAKE and Yutaka KOHGO<sup>1)</sup>

1) Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology, Department of Medicine, Asahikawa Medical University  
Corresponding author: 大竹 孝明 (totake@asahikawa-med.ac.jp)

activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 抑制によって $\beta$ 酸化を減少し、遊離脂肪酸(free fatty acid; FFA)を増加させる。それらのエステル化反応によってTGが増加、加えて、超低比重リポ蛋白(very low density lipoprotein; VLDL)放出が減少する。これら肝細胞の生化学的変化によってアルコール性脂肪肝が発症する。

## 2. レドックス状態変化の代謝への影響

EtOHからAcHを介して酢酸に代謝されるEtOH代謝は、アルコール脱水素酵素(alcohol dehydrogenase; ADH)、シトクロムP450 2E1(CYP2E1)を主としたミクロゾームエタノール酸化系(microsomal ethanol oxidizing system; MEOS)、アルデヒド脱水素酵素(aldehyde dehydrogenase; ALDH)の3つの経路からなる。ADHとALDHはその酸化反応においてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を補酵素として使用するため、肝細胞内では酸化型NAD<sup>+</sup>が減少し、還元型NADHが増加するという肝細胞内のレドックス状態の変化がおきる。NADH/NAD比の増加は炭水化物・脂質代謝に深く影響する。糖新生が障害され、クエン酸サイクルの基質のフローが抑制され、アセチルCoAがケトン生成・脂肪酸合成へ転用され、脂肪酸合成が増加する。加えて、レドックス状態の変化は脂肪酸の $\beta$ 酸化を抑制する。NADH/NAD比の増加はG3P産生も増加する。飲酒はこれらのメカニズムを通じてTG基質供給を増加し、肝細胞においてTG合成を促進させる。

## 3. PPAR $\alpha$ 抑制作用

EtOHはPPAR $\alpha$ を介して脂肪酸酸化にも影響をしている。PPAR $\alpha$ は肝におけるミトコンドリア、ミクロゾーム、ペルオキシソームの脂肪酸酸化系の調節因子である。実際に飲酒がPPAR $\alpha$ のDNA結合能を減少し、脂肪酸酸化酵素の発現および酵素活性を抑制し、細胞内のFFA濃度を上昇させている。EtOH代謝の中間代謝産物であるAcHがPPAR $\alpha$ 抑制作用を有するとされている<sup>1)</sup>。

## 4. TG放出量変化

アルコール性脂肪肝において基質供給の増加、

エステル化反応の増加に加えて、TG放出量の減少も肝細胞内TG量増加に関与している。通常、脂肪はVLDLの形で循環血流中に放出される。慢性アルコール摂取ではこの輸出機構が抑制される。そのメカニズムは明らかではないが、ゴルジ複合体が関与している。AcHが微小管の $\alpha$ チューブリンに結合し、その動態を障害するためとされている。またEtOHはTGとアポリポ蛋白B(apoB)からVLDL粒子形成に関与する酵素ミクロゾームトリグリセリド転移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein; MTP)の発現も抑制しており、このこともTG放出抑制に影響している<sup>2)</sup>。

## 5. アルコール性脂肪肝におけるTNF $\alpha$

ALDでは腸管粘膜バリアの透過性亢進によって流入したエンドトキシンによってクッパー細胞が刺激されTNF $\alpha$ を誘導し、肝臓の炎症・線維化の病態に関与する。TNF $\alpha$ は病初期の脂肪肝の進展にも関与している。TNF $\alpha$ による肝脂肪化のメカニズムはMTPの発現抑制、SREBP-1cの発現誘導、アディポネクチンの発現抑制による。アディポネクチン抑制はPPAR $\alpha$ 活性の抑制もおこしている。

## 6. 飲酒によるメチオニン代謝抑制と小胞体ストレス

飲酒によってホモシステインをメチオニンに変換するmethionine synthaseは抑制される。ホモシステイン血症は小胞体ストレスを介して動脈硬化、アルツハイマー病発症に関与する。小胞体はmRNAからの翻訳による蛋白合成、その輸送、翻訳後修飾に関与している。小胞体における蛋白合成機能が障害され、unfolded proteinが増加する。肝細胞はunfolded proteinの負荷を軽減するため他の蛋白合成を抑制し、肝細胞をアポトーシス誘導の方向に向ける。加えてホモシステインによる小胞体ストレスはSREBP-1cの発現を誘導して脂肪酸遺伝子の発現を増加させる。このように飲酒によるホモシステイン血症は小胞体ストレスを介してALD促進に寄与する<sup>3)</sup>。

## II ALD進展における肝脂肪化の役割

ALDにおいて過剰飲酒による機序だけでな

く、発症してきた肝脂肪化そのものも病態を悪化させている。大酒家の前向き研究においてALDの肝生検組織の肝脂肪化の程度とパターンが線維化と肝硬変進展リスクの予測因子になることが報告されている。つまり、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と同様にALDの肝脂肪化は“first hit”であり、さまざまな“second hit”に対する肝の感受性を増している状態といえる。“second hit”には腸内細菌由来エンドトキシン、過剰鉄、その他の酸化ストレス、免疫機序などが考えられる。たとえば肥満・脂肪肝では肝内のリンパ球分画が変化している。正常肝では循環血中のリンパ球分画と異なり、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞とナチュラルキラー T (NKT) 細胞を多く含む。肥満マウスの脂肪肝ではNKTが選択的に減少している。アルコール性脂肪肝のモデルでは不明であるが、脂肪が肝臓の免疫環境を変えている可能性が伺える。

### III ALDの酸化ストレス

酸化ストレス状態は細胞内外の活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 産生が内因性抗酸化機能を凌駕した状況である。慢性飲酒者におけるROS供給源は肝細胞のミクロゾームのCYP2E1、ミトコンドリア電子伝達系、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS)、クッパー細胞などである。ALDの病因に重要であると考えられる酸化物はROS、スーパーオキシド陰イオン ( $\cdot O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) とヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ )、ヒドロキシエチルラジカルである。酸化ストレスによって細胞膜のリポ蛋白脂質の多価不飽和脂肪酸成分の脂質過酸化がおき、炎症、線維化および免疫反応につながる。ALD発症において酸化ストレスおよび脂質過酸化の程度と肝障害の程度は相関する。

鉄の存在下でミクロゾームは脂質過酸化反応をおこすのに十分なROSを産生する。そのほとんどはMEOSのCYP2E1で産生される。本酵素はEtOHをAcHに、その後、酢酸に酸化する。CYP2E1はEtOH代謝を触媒する時にヒドロキシエチルラジカルが産生される。飲酒によって

CYP2E1の発現が誘導され、ROS産生が増加し、脂質過酸化・炎症が悪化することがALD病態の特徴である。また、脂肪酸、ケトン体もCYP2E1の基質であり、肥満・高脂肪食によって肝へのFFA流入が増加すると、ROS産生が増す<sup>45)</sup>。ミトコンドリア電子伝達系ではEtOH代謝で生じるNADHの再酸化のため活性酸素ラジカルが産生される。TNF $\alpha$ はミトコンドリア電子伝達系のROS産生増加に働く。また、ALDではミトコンドリアの微細構造変化がおき、ミトコンドリアの酸化ストレスに関与している。一酸化窒素(NO)はミトコンドリア機能の調節因子で、シトクロムc酸化酵素に結合し、ROS産生を増加させる。またTNF $\alpha$ はNF- $\kappa$ B依存性のiNOS発現誘導を介して酸化ストレスを増強する。クッパー細胞はエンドトキシンに対する反応としてTNF $\alpha$ を産生する他に、フリーラジカル供与源としてALDの病態に関与する。

### IV ALDの抗酸化機能障害

飲酒は内因性抗酸化機能を障害する。酸化ストレス時のグルタチオン (GSH) 消費とその前駆体のS-アデノシルメチオニン (SAMe) 産生に関与するメチオニン合成酵素とmethionine adenosyltransferase (MAT)の抑制によって肝内のSAMeとGSHの減少がおきる。まずミトコンドリアのGSHが枯渇し、肝細胞のTNF $\alpha$ に対する感受性を増してALDが進行する。最近の研究ではGSHレベルの減少より、S-adenosylhomocysteine (SAH) /SAMe比の上昇が肝細胞のTNF $\alpha$ 感受性に重要とされている。この時アポトーシス誘導のcaspase-8活性が上昇していると考えられる。大酒家は抗酸化酵素GSH peroxidase活性に必要な抗酸化微量元素セレン、抗酸化ビタミンA, C, E, コエンザイムQが欠乏している。コエンザイムQは細胞膜、ミトコンドリア内膜に存在する重要なフリーラジカル捕捉分子で、食事から摂取されるのに加えて肝臓で合成もされている。

### V アセトアルデヒド

AcHは最初のEtOH代謝産物でALD病態の中心的な役割をもつ。AcHはアルブミン、ヘモ

グロビン、血漿蛋白質、コラーゲン、ミクログロム酵素、チューブリンと共有結合し、付加体を形成し、その蛋白機能に影響する。微小管の集合、酵素活性の欠損はAcHに起因する。AcHはSREBP-1cのコレステロール合成酵素の転写誘導を経て、unfolded proteinと小胞体ストレスを介してコレステロールを増加させる。また、GSHを減少し、SAME合成を減少させ、エンドトキシン刺激時のクッパー細胞からのTNF $\alpha$ 誘導細胞障害に対する感受性亢進にも寄与している。

#### VI ALDの酸化ストレスに対する食事の影響

脂肪摂取量は肝臓への脂肪供給量を規定し、肝脂肪化に寄与するが、慢性飲酒では脂肪組織の脂肪分解を促し、血中FFA濃度を上昇させる。このFFAは肝臓に取り込まれてTG合成のための基質となる。さらに高濃度FFAはTG合成の律速酵素であり、ホスファチジン酸を脱リン酸化シリアシルグリセロール産生を触媒するphosphatidate phosphohydrolase (PAP)の酵素活性を上げることによってTG合成を促進する。酸化ストレスを促進する環境因子である食餌はALDの進展に関与することがわかっている。ラットのEtOH負荷モデルでは牛脂肪で肝障害が少なく、コーン油で強く、食餌中のリノール酸量との相関が想定された。魚油もROSからの攻撃に脆弱で肝障害を悪化させる。多価不飽和脂肪が肝障害を促進すると考えられるが、ALDにおける多価不飽和脂肪の障害促進メカニズムは完全には解明されていない。CYP2E1発現誘導と過酸化脂質の増加が関与していると考えられている<sup>9)</sup>。また、多価不飽和脂肪は強力な炎症メディエーターであるエイコサノイドの前駆体である。エイコサノイド産生に関与する主要酵素シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2)はエンドトキシン、TNF $\alpha$ によって誘導されることからALDの病態にも関与している可能性が考えられる。このように酸化ストレスを高める高脂肪食が肝脂肪化の進展に寄与していることは明らかであるが、その種類の違いによって炎症・線維化をともなったより進展したALDへの病態にも寄与する可能性が示唆されている。ま

た、食餌中の鉄も肝臓中の脂質過酸化反応のアルデヒドエンドプロダクト濃度を増加させたり、グルタチオン前駆体およびメチルドナーSAMEの補充によって酸化ストレスが減少すると肝細胞障害も改善するなどの報告もある。一般に大酒家はグルタチオン、セレン、コエンザイムQなど内因性抗酸化機能を消費・枯渇している。

#### VII 肝障害に対する飲酒と肥満の相加・相乗効果

日本を含めた最近の先進諸国では過栄養による肥満・糖尿病が問題となっており、飲酒との関連性も指摘されている。高脂肪食・体重オーバーがアルコール性肝硬変のリスク因子になっている<sup>7)</sup>。また、飲酒と高脂肪食・肥満の相加・相乗効果が指摘されている<sup>9)</sup>。疾患の診断基準においてNAFLDは1日当たりの純EtOH摂取量が20g以下であり、ALDは70g以上となっている。この中間にあたる軽度～中程度の飲酒歴の患者は、従来の基準では原因不明群に含まれ、その実態は不明であった。そこで肥満と少量から中程度の飲酒を背景に発症してきていると考えられる非B非C肝硬変がどの程度存在するか調査するために、2011年に開催された日本消化器関連学会週間(JDDW 2011)の特別企画「主題ポスター討論：我が国における非B非C肝硬変の実態調査」においては、画像診断あるいは組織診断上、脂肪性肝障害を基盤にした肝硬変で、飲酒量が純EtOH摂取1日20gから70gまでの例で、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)でもなければALDにもならない範疇の患者を「脂肪性肝硬変」として調査した。

本調査で、6999症例の非B非C肝硬変症例が集計され、アルコール性55.1%、NASH関連14.5%、そしてアルコール性とNASHの境界の範疇である脂肪性はわずか2.5%しか存在しなかった(Figure 1)。各成因別の男女比は、アルコール性7.12、NASH 0.77、脂肪性6.86であり、アルコール性と脂肪性は男性の比率が高い。平均年齢はNASH 66.9歳、アルコール性60.3歳、脂肪性64.2歳で、アルコール性<脂肪性<NASHの順で年齢が高くなった。body mass index(BMI)

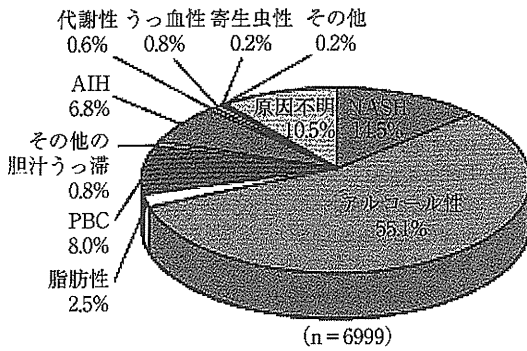


Figure 1. 非B非C肝硬変の成因別頻度：JDDW 2011 第15回日本肝臓学会大会特別企画「主題ポスター討論：我が国における非B非C肝硬変の実態調査」6999例の検討（文献10より引用）。

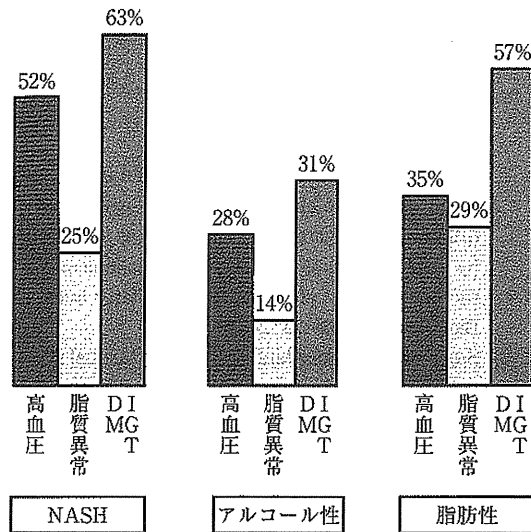


Figure 2. NASH・アルコール性・脂肪性肝硬変のメタボリック因子合併率（文献10より引用）。

Table 1. NASH・アルコール性・脂肪性肝硬変のBMI（文献10より引用）

	全体	男性	女性
NASH	27.0 ± 4.3	26.9 ± 4.2	27.0 ± 4.4
アルコール性	23.4 ± 6.4 *	23.0 ± 6.7 *	22.3 ± 3.9 *
脂肪性	25.0 ± 3.7	25.3 ± 3.7	22.9 ± 2.5

\*p<0.001.

と高血圧・脂質異常症・糖尿病（DM・IGT）の合併に関しては、BMIはNASH 27kg/m<sup>2</sup>、アルコール性 23.4kg/m<sup>2</sup>、脂肪性 25kg/m<sup>2</sup>と、アルコール性<脂肪性<NASHの順に高かった（Table 1）。高血圧の合併頻度はNASH 52%がアルコール性 28%と脂肪性 35%より高かった。脂質異常症の合併頻度はNASH 25%と脂肪性 29%がアルコール性 14%より高く、DM・IGTの合併頻度もNASH 63%と脂肪性 57%がアルコール性 31%より高かった。以上より、脂肪性の臨床像はNASHとアルコール性の中間の臨床像を呈しているといえる。しかし、その頻度はさほど多くないという結果であった<sup>10)</sup>（Figure 2）。

VIII 肥満・糖尿病・脂質異常症の影響

肝硬変死亡率とアルコール消費量との相関が指摘されているが、近年、肝硬変死亡率が漸増している別の理由として肥満率の増加の影響が示唆さ

れている。肥満がALDの重要なリスク因子と指摘されており、特に女性より男性患者において肥満、メタボリック症候群（MetS）の影響が示唆されている<sup>11)</sup>。また、肥満のタイプでは飲酒は皮下脂肪とは負の相関であるが、内臓脂肪と正の相関があることを指摘されており、心血管疾患リスクを下げるとされている少量～中程度の飲酒に脂肪蓄積に対する保護効果はないという報告もある<sup>12)</sup>。一方で、検診受診者においては、逆に少量から中程度の飲酒者は非飲酒者より高血圧症以外のMetS因子との関連性が低下するとされており<sup>13)</sup>、今後、少量飲酒と肥満・MetSとの関連性がさらに明らかにされることが必要と考えられる。

おわりに

ALDの病態における代謝異常と肥満・MetSとの関連性に関して概説した。本邦においてはALDH2酵素活性の欠損している人口比率が高いことからより少量の飲酒で肝細胞障害に対して感受性となっていると考えられる。その時に合併する肥満、MetSの影響は重要なリスク因子となりえる。今後さらにこの領域の研究の進展が必要と考えられる。

本論文内容に関連する著者の利益相反

: なし

文 献

- 1) Galli A, Pinaire J, Fischer M, et al: The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 276: 68-75: 2001
- 2) Sugimoto T, Yamashita S, Ishigami M, et al: Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats. *J Hepatol* 36: 157-162: 2002
- 3) Ji C, Deng Q, Kaplowitz N: Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 40: 442-451: 2004
- 4) Mezey E: Dietary fat and alcoholic liver disease. *Hepatology* 28: 901-905: 1998
- 5) Robertson G, Leclercq I, Farrell GC: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1135-G1139: 2001
- 6) Ronis MJ, Korourian S, Zipperman M, et al: Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr* 134: 904-912: 2004
- 7) Rotily M, Durbec JP, Berthézène P, et al: Diet and alcohol in liver cirrhosis: a case-control study. *Eur J Clin Nutr* 44: 595-603: 1990
- 8) Naveau S, Giraud V, Borotto E, et al: Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 25: 108-111: 1997
- 9) Hellerbrand C: Pathophysiological similarities and synergisms in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 28: 783-791: 2010
- 10) 鈴木康秋, 大竹孝明, 青柳 豊, 他: 集計報告 我が国における非B非C肝硬変の実態—第15回日本肝臓学会大会特別企画「主題ポスター討論: 我が国における非B非C肝硬変の実態調査」の集計報告—. 我が国における非B非C肝硬変の実態調査2011, 高後 裕監修, 響文社, 札幌, 2012 (<http://www.jsh.or.jp/medical/info.html>)
- 11) Taniai M, Hashimoto E, Tokushige K, et al: Roles of gender, obesity, and lifestyle-related diseases in alcoholic liver disease: Obesity does not influence the severity of alcoholic liver disease. *Hepatol Res* 42: 359-367: 2012
- 12) Kim K, Oh SW, Kwon H, et al: Alcohol consumption and its relation to visceral and subcutaneous adipose tissues in healthy male Koreans. *Ann Nutr Metab* 60: 52-61: 2012
- 13) Wakabayashi I: Influence of age on the relationship between alcohol consumption and metabolic syndrome. *Gerontology* 58: 24-31: 2012

( 論文受領, 2012年7月10日 )  
( 受理, 2012年7月11日 )



特

集

喫煙, アルコールと消化器疾患

Gastrointestinal  
Research

## アルコールの代謝とその異常

大竹孝明\* 高後 裕\*

## Summary

アルコールの生体内代謝はアルコール脱水素酵素 (ADH), シトクロム P450 2E1 (CYP2E1), カタラーゼ, アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の反応によって, アセトアルデヒド (AcH) を経て酢酸に代謝される. アルコール代謝の過程で産生される活性酸素種 (ROS), 中間代謝物が臓器障害の原因となる. これら代謝酵素には遺伝子多型があり, 酵素活性に影響し, 飲酒時の酩酊症状の出方や臓器障害発症の人種差, 個人差となっている.

## Key words

アルコール脱水素酵素 (ADH) ミクロソームエタノール酸化系  
シトクロム P450 2E1 (CYP2E1) アルデヒド脱水素酵素 (ALDH)  
遺伝子多型

## はじめに

飲酒などで摂取されたエタノール (EtOH) は, 種々の酵素の触媒反応によって分解される. ヒトでは胃・小腸粘膜から吸収された EtOH は全身に拡散し, おもに肝臓においてアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH), シトクロム P450 2E1 (CYP2E1) を主としたミクロソームエタノール酸化系 (microsomal ethanol oxidizing system: MEOS), カタラーゼ, アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) の反応によって, アセトアルデヒド (AcH) を経て酢酸に代謝される. 酢酸はさらにトリカルボン酸回路 (tricarboxylic acid cycle: TCA 回路) において, 水と二酸化炭素に分解される<sup>1)</sup> (図 1). また EtOH をエステル転換する系も存在する. 吸収さ

れた EtOH はすみやかに肝臓で代謝されるが, その EtOH 代謝の許容を超える場合は血中 EtOH 濃度が上昇し, 酩酊状態となる. EtOH は濃度依存性に中枢神経抑制作用があり, 多量摂取によって呼吸・循環器系の抑制の急性中毒が起きる. ほろ酔い状態の血中 EtOH 濃度が 0.05~0.1% であり, 致死量は 0.4% 以上である. 作用濃度と致死濃度が非常に近接していることから, EtOH は嗜好品であるにもかかわらず急性中毒の危険性があることを念頭に入れておく必要がある. また, 長期間にわたる過度の飲酒は, 精神神経疾患のみならずアルコール性肝障害をはじめとした全身の臓器障害の原因となり, これらすべてを含めてアルコール関連疾患ととらえられる.

\*OHTAKE Takaaki, KOHGO Yutaka/旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野

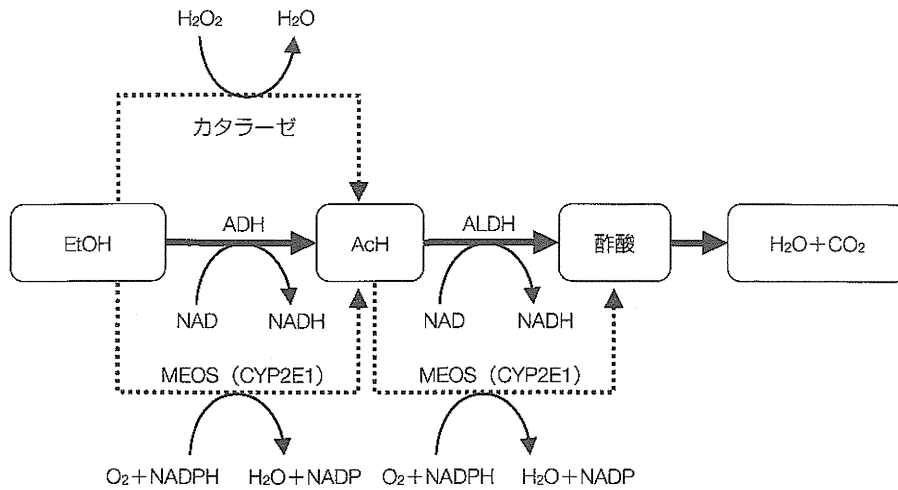


図 1. アルコール代謝

ADH、MEOS、カタラーゼ、ALDHの酵素群が触媒する。

## 1 | アルコール脱水素酵素 (ADH)

ADHは種々のアルコールを酸化してアルデヒドにする反応を触媒する。ヒトには5クラスのADHがある。クラスIは肝細胞に多く発現しEtOH代謝の中心的役割を担っている。クラスIIは高濃度のEtOH代謝に関与し、クラスIIIは長鎖アルコールや $\omega$ 脂肪酸の代謝に関与、クラスIVは上部消化管に多く発現し、クラスVは詳細がわかっていない。

ADHはEtOHを酸化する際に電子を2分子奪い、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide: NAD) に受け渡し、還元型 (reduced NAD: NADH) に変換する。したがって、EtOHがADHによって分解代謝されると、NAD/NADH比が減少する。慢性飲酒では細胞内NAD/NADH比が恒常的に変化し、NADを補酵素とする酵素群の動態に影響することが臓器障害の原因となっている<sup>1)</sup>。

## 2 | アルデヒド脱水素酵素 (ALDH)

ALDHは、EtOHの中間代謝産物であるAcHを酢酸に分解する反応を触媒する酵素群である。

ADHと同様にNADを補酵素としている。ALDHは1~10に分類されていて、細胞質に発現しているALDH1は高濃度のAcH代謝に寄与し、ミトコンドリアに発現しているALDH2は低濃度のAcHの代謝に関与している。AcHは酢酸に酸化された後、アセチルCoAとしてTCA回路で代謝される<sup>1)</sup>。

## 3 | EtOH代謝酵素系の遺伝子多型の意義

クラスI ADHのADH1Bに一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) が2カ所あり、3種類の遺伝子をADH1B1、1B2、1B3という。アジア人では1B2が多く、白人では1B1が多い。1B2は1B1に比較してEtOH代謝が遅く、飲酒量が抑制され依存症になりにくいとされている。一方、1B1は飲酒後のAcH濃度の上昇が早いため、AcH中毒症状に注意する必要がある。また、ADH7のSNPが上部消化管癌の発症と関連があるという知見も報告されている<sup>2)</sup>。

ALDH2の487番目のアミノ酸のグルタミン酸/リジン変化を規定するSNPがあり、ALDH2\*1とALDH2\*2と命名されている。Complemen-

tary DNA (cDNA) の 1,510 番目の核酸の G/A 変化が原因で、メジャーホモ (ALDH2\*1) の GG 型とマイナーヘテロの AG 型およびマイナーホモ (ALDH2\*2) の AA 型からなる。マイナーヘテロでも AcH 代謝活性はメジャーホモの 1/16 程度の能力しかなく、マイナーホモでは代謝活性が失われている。AcH は毒性が強く、濃度が上昇すると、顔面紅潮、頭痛、悪心、嘔吐、頻脈の中毒症状が起き、悪酔い、二日酔いの原因となる。よって ALDH2\*2 型の人に急速大量飲酒を強要すると、生命を脅かす事態となる。さらに、AcH は細胞内の蛋白、脂質、DNA に結合し変性させ、細胞内オルガネラの機能障害、肝星細胞の刺激などを介して臓器障害の主因となる。マイナーホモの人はまったく酒が飲めない体質であるが、マイナーヘテロの人は飲酒が可能である。マイナーヘテロはアルコール依存症になることは少ないが、毒性の強い AcH が分解され難く体内にとどまるため、アルコール性臓器障害のハイリスク群になる可能性がある。実際に各種疫学調査において、同じ量の飲酒を継続した場合でも、頭頸部癌、大腸癌のアルコール関連発癌の頻度が高くなる。人種差では白人、黒人のほとんどが ALDH2\*1 であるのに対し、アジア人では ALDH2\*2 のホモ型またはヘテロ型の比率が高く、このことがわが国におけるアルコール関連臓器障害の重要な遺伝的背景となっているといえる<sup>3)</sup>。一方、ALDH2\*1 型ではアルコール依存症のリスクが問題となることが多くなる。

#### 4 ■ シトクロム P450 2E1 (CYP2E1)

シトクロム P450 (CYP) は水酸化酵素ファミリーで、さまざまな基質を水酸化する。肝臓においては解毒をおこなう酵素である。このサブファミリーの CYP2E1 は EtOH に対し高い親和性を持ち、ADH と同様に EtOH を AcH に代謝し、また、AcH を酢酸に酸化する反応も触媒する。肝臓における CYP による EtOH 酸化はミクロソーム

ムにあることから MEOS といわれており、その 50% が CYP2E1、残り 25% ずつを CYP1A2 と CYP3A4 が担っている。これら CYP はほかにアセトアミノフェンをはじめとした種々の薬物も基質とすることから、飲酒と薬物動態の相互作用は重要である。CYP2E1 はこの酸化反応のとき、補酵素で電子供与体であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NAD phosphate : NADPH) を用いて基質の水酸化反応を触媒する。このとき、NADPH (還元型) が NADP<sup>+</sup> (酸化型) に変換される。

EtOH の代謝における律速酵素は ALDH であり、その活性により酒に強い、弱いといった差が生じる。一方、酒を飲むことによって酒に強くなるという現象もあり、これは EtOH 曝露によって CYP2E1 の遺伝子発現が誘導されることによる。CYP2E1 の EtOH 酸化効率 は ADH より劣るが、慢性飲酒下では酵素の発現誘導が起り、活性が 10 倍以上になる。

#### 5 ■ その他の EtOH 代謝系

カタラーゼはペルオキシゾームの酵素で、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を用いて EtOH を AcH に酸化する。脳において重要な EtOH 代謝系である。脂肪酸エチルエステルシンターゼは EtOH を脂肪酸エチルエステルに転換する酵素で、心臓において重要な代謝系とされている。

#### 6 ■ アルコール代謝と肝脂肪化・酸化ストレス・自然免疫反応

アルコール性肝障害の特徴は、肝脂肪化である。脂質摂取の増加だけでなく、EtOH による sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) 発現誘導を介した脂肪酸合成<sup>4)</sup>、Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\alpha$  抑制を介した  $\beta$  酸化の抑制<sup>5)</sup>、脂肪細胞からの放出による遊離脂肪酸が増加し、また、NAD/NADH 比低下に伴うグリセロール三リン酸の増加による中性

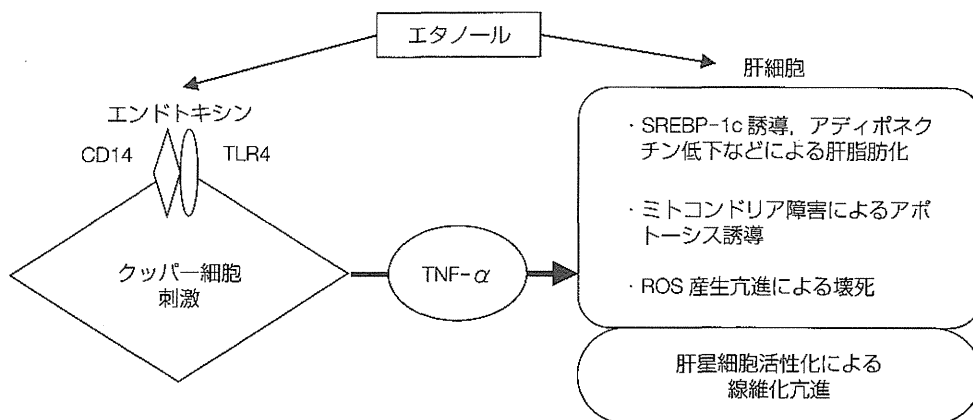


図 2. アルコール性肝障害における炎症性サイトカイン  $TNF-\alpha$

おもにクッパー細胞で産生される  $TNF-\alpha$  は SREBP-1c を誘導、アディポネクチンを抑制して肝脂肪化を促進させる。また ROS 産生を増加し、肝細胞の壊死・アポトーシスを誘導する。さらに肝星細胞を活性化し、肝線維化を促進させる。

脂肪合成の亢進、そして肝細胞からの超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein : VLDL) 放出の低下によって肝脂肪化が進行する。

さらにアルコール性肝障害が肝硬変、肝細胞癌に進展するうえで慢性飲酒による酸化ストレス増強、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 産生、炎症性サイトカイン誘導、ミトコンドリア機能障害、粗面小胞体ストレス誘導が重要である。アルコール代謝の複数のステップで ROS は産生される。CYP2E1 は最も酸化ストレス、ROS 産生に関与する酵素であり<sup>6)</sup>、毒性の強い中間代謝物 AcH は強力な酸化ストレスとなり ROS 産生に寄与する。慢性飲酒によって酸化ストレスに傾いたとき、生体内では抗酸化因子を誘導する転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1) が抗酸化遺伝子群の NADPH quinone oxidoreductase-1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione S-transferase (GST) の転写活性を高めて、発現を誘導する。しかし、これら肝細胞の抗酸化作用の能力を超えた飲酒が継続されると ROS は脂質過酸化反応を起こし、蛋白・脂質付加体 (アダクト) を形成し、細胞膜およびオルガネ

ラ膜を障害する。また、ROS はレドックス感受性炎症性シグナルを活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導し、線維化促進も起こす。

慢性の飲酒は腸管粘膜バリアを傷害し透過性を増し、菌体構成成分を門脈血流中への侵入を招く。侵入したエンドトキシンは、とくにクッパー細胞と肝細胞のその受容体 CD14 と Toll-like receptor 4 (TLR4) を刺激する<sup>7)</sup>。活性化したこれらの細胞では、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor :  $TNF-\alpha$ ), インターロイキン (IL)- $1\beta$ , IL-6 の炎症性サイトカイン、IL-8, IL-17 などのケモカインが産生され、肝臓の好中球浸潤に関与する。 $TNF-\alpha$  を主とした炎症性サイトカインは、肝脂肪化を促進し、ROS 産生を増強、肝細胞は機能障害、壊死、アポトーシスを誘導、肝星細胞は刺激され線維化は促進し、肝線維症、肝硬変への進展に寄与する<sup>8)</sup>。アディポネクチンは脂肪細胞が産生する抗炎症性メディエーターであるが、慢性飲酒ではアディポネクチン産生が障害される (図 2)。

## おわりに

アルコール代謝の生体への影響を ROS, AcH による酸化ストレスを中心に概説した。アルコー