

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) Total RNA was prepared from cultured cells using standard methods and was reverse transcribed using a One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan) with avian myeloblastosis virus-derived reverse transcriptase XL according to the manufacturer's instructions. PCR was run for 19 cycles of 95°C for 0.5 min/65°C for 0.5 min/72°C for 1.5 min. Primer sequences were as follows: For mouse TNF- α (GenBank accession number NM_013693) (Fransen et al. 1985), forward: 5'-TCT CAG CCT CTT CTC ATT CC-3'; reverse: 5'-GTC CCA GCA TCT TGT GTT TC-3'; for mouse β -actin (BC063166), forward: 5'-GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG-3'; reverse: 5'-AGC ATT TGC GGT GCA CGA GG-3'.

Luciferase activity assay The PathDetect pNF κ B-Luc Cis-Reporter Plasmid, a luciferase reporter construct for the NF κ B gene promoter, was obtained from Stratagene (Tokyo, Japan). The vector was introduced into cells by using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h of transfection, cells were treated with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of WSPW or C-Man-WSPW (10 μ M), or left untreated for the periods indicated in the text. Then luciferase activity was assayed with cellular extracts by using a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), as described before (Yasuoka et al. 2004).

Statistical analysis Statistical analysis was performed using Student's *t*-test or ANOVA (StatView software). Significance was set at *P* < 0.05.

Funding

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the President's Discretionary Fund of Nagasaki University, Japan, the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology of Japan, and fellowship from the Tsukushi Foundation (E.M.).

Acknowledgements

We are grateful to Akiko Emura for technical assistance.

Conflict of interest statement

None declared.

Abbreviations

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium;; DMF, dimethylformamide; DSP, dithiobis[succinimidyl]propionate]; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione S-transferase; I κ B α , inhibitor of κ B α ; *i*-Pr₂NEt, diisopropylethylamine; IRAK1, interleukin-1 receptor-associated kinase 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LMP1, latent membrane protein 1; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen activating protein kinase; MTT,

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TAK1, TGF- β -activated kinase 1; TBS, Tris-buffered saline; TGF- β , transforming growth factor β ; TLR, Toll-like receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TRAF6, TNF- α receptor-associated factor 6; TSP, thrombospondin; TSR, thrombospondin type 1 repeat.

References

- Akira S. 2001. Toll-like receptor and innate immunity. *Adv Immunol.* 78:1–56.
- Bannerman DD, Goldblum SE. 2003. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284:L899–L914.
- Beau JM, Gallagher T. 1997. Nucleophilic C-glycosyl donors for C-glycoside synthesis. *Top Curr Chem.* 187:1–54.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.* 197:1119–1124.
- Buskas T, Ingale S, Boons G-J. 2006. Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiology.* 16:113R–136R.
- Chen W, White MA, Cobb MH. 2002. Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem.* 277:49105–49110.
- Cheung NS, Beart PM, Pascoe CJ, John CA, Bernard O. 2000. Human Bcl-2 protects against AMPA receptor-mediated apoptosis. *J Neurochem.* 74:1613–1620.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. 1999. Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays.* 21:412–421.
- De Peredo AG, Klein D, Macek B, Hess D, Peter-Katalinic J, Hofsteenge J. 2002. C-mannosylation and O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Mol Cell Proteomics.* 1:11–18.
- Doucey M-A, Hess D, Blommers MJ, Hofsteenge J. 1999. Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. *Glycobiology.* 9:435–441.
- Doucey M-A, Hess D, Cacan R, Hofsteenge J. 1998. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell.* 9:291–300.
- East L, Isacke CM. 2002. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta.* 1572:364–386.
- Fransen L, Muller R, Marmenout A, Tavernier J, Van Der Heyden J, Kawashima E, Chollet A, Tizard R, Van Heuverswyn H, Van Vliet A, Ruyschaert M-R, Fiers W. 1985. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res.* 13:4417–4429.
- Furmanek A, Hess D, Rogniaux H, Hofsteenge J. 2003. The WSAWS motif is C-hexosylated in a soluble form of the erythropoietin receptor. *Biochemistry.* 42:8452–8458.
- Furmanek A, Hofsteenge J. 2000. Protein C-mannosylation: Facts and questions. *Acta Biochim Polonica.* 47:781–789.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 197:1107–1117.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signaling.* 13:85–94.
- Haltiwanger RS, Lowe JB. 2004. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem.* 73:491–537.
- Hartmann S, Hofsteenge J. 2000. Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *J Biol Chem.* 275:28569–28574.
- Hofsteenge J, Blommers M, Hess D, Furmanek A, Miroshnichenko O. 1999. The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. *J Biol Chem.* 274:32786–32794.
- Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, Peter-Katalinic J. 2001. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem.* 276:6485–6498.
- Hofsteenge J, Muller DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ, Vliegthart JF. 1994. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry.* 33:13524–13530.
- Ihara Y, Manabe S, Kanda M, Kawano H, Nakayama T, Sekine I, Kondo T, Ito Y. 2005. Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic Zucker rats. *Glycobiology.* 15:383–392.

- Ihara Y, Urata Y, Goto S, Kondo T. 2006. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C208–C221.
- Irie T, Muta T, Takeshige K. 2000. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor- κ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* 467:160–164.
- Janssens S, Beyaert R. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell.* 11:293–302.
- Jimenez B, Volpert OV, Reiher F, Chang L, Munoz A, Karin M, Bouck N. 2001. c-Jun N-terminal kinase activation is required for the inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Oncogene.* 20:3443–3448.
- Kishimoto K, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. 2000. TAK1 mitogen-activated protein kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem.* 275:7359–7364.
- Kollewe C, Mackensen AC, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, Wesche H, Martin MU. 2004. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem.* 279:5227–5236.
- Lawler J, Hynes RO. 1986. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol.* 103:1635–1648.
- Lee NV, Sato M, Annis DS, Loo JA, Wu L, Mosher DF, Iruela-Arispe ML. 2006. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J.* 25:5270–5283.
- Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE. 2000. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem.* 275:23340–23345.
- Manabe S, Ito Y. 1999. Total synthesis of novel subclass of glyco-amino acid structure motif: C2- α -C-Mannosylpyranosyl-L-tryptophan. *J Am Chem Soc.* 121:9754–9755.
- Manabe S, Marui Y, Ito Y. 2003. Total synthesis of mannosyl tryptophan and its derivatives. *Chem Eur J.* 9:1435–1447.
- McGreal EP, Miller JL, Gordon S. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol.* 17:18–24.
- Miller JS, Dudkin VY, Lyon GJ, Muir TW, Danishefsky SJ. 2003. Toward fully synthetic N-linked glycoproteins. *Angew Chem Int Ed.* 42:431–434.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051–3064.
- Nishikawa T, Ishikawa M, Wada K, Isobe M. 2001. Total synthesis of α -C-mannosyltryptophan, a naturally occurring C-glycosyl amino acid. *Synlett.* 945–947.
- Nishikawa T, Kajii S, Sato C, Yasukawa Z, Kitajima K, Isobe M. 2004. α -C-mannosyltryptophan is not recognized by conventional mannose-binding lectins. *Bioorg Med Chem.* 12:2343–2348.
- Perez-Vilar J, Randell SH, Boucher RC. 2004. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology.* 14:325–337.
- Shahov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. 1990. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med.* 171:35–47.
- Silverman N, Zhou R, Erlich RL, Hunter M, Bernstein E, Schneider D, Tom Maniatis T. 2003. Immune activation of NF- κ B and JNK requires drosophila TAK1. *J Biol Chem.* 278:48928–48934.
- Singhrunnusom P, Suzuki S, Kawasaki N, Saiki I, Sakurai H. 2005. Critical roles of threonine 187 phosphorylation in cellular stress-induced rapid and transient activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) in a signaling complex containing TAK1-binding protein TAB1 and TAB2. *J Biol Chem.* 280:7359–7368.
- Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: Glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol.* 17:6274–6282.
- Takahira R, Yonemura K, Yonekawa O, Iwahara K, Kanno T, Fujise Y, Hashida A. 2001. Tryptophan glycoconjugate as a novel marker of renal function. *Am J Med.* 110:192–197.
- Tucker RP. 2004. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:969–974.
- Uemura N, Kajino T, Sanjo H, Sato S, Akira S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. 2006. TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF- κ B. *J Biol Chem.* 281:7863–7872.
- Van Der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. 1999. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun.* 67:3824–3829.
- Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology.* 3:97–130.
- Wan J, Sun L, Mendoza JW, Chui YL, Huang DP, Chen ZJ, Suzuki N, Suzuki S, Yeh W-C, Akira S, Matsumoto K, Liu Z-G, Wu Z. 2004. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol.* 24:192–199.
- Wilson KE, Li Z, Kara M, Gardner KL, Roberts DD. 1999. B1 integrin- and proteoglycan-mediated stimulation of T lymphoma cell adhesion and mitogen-activated protein kinase signaling by thrombospondin-1 and thrombospondin-1 peptides. *J Immunol.* 163:3621–3628.
- Yasuoka C, Ihara Y, Ikeda S, Miyahara Y, Kondo T, Kohno S. 2004. Antiapoptotic activity of Akt is down-regulated by Ca^{2+} in myocardial H9c2 cells. Evidence of Ca^{2+} -dependent regulation of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 279:51182–51192.



解説

脂質過酸化*

後藤 信治** 近藤 宇史**

Key Words : reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, lipid peroxide

酸化ストレス

生体内で主要な活性酸素種(ROS)は、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル(OH)である。これらは、酸素による障害性を示す因子であることからオキシダントとも呼ばれる。

ミトコンドリア呼吸鎖すなわち電子伝達系から、呼吸鎖反応で使われる酸素の約0.1%が O_2^- になるとされている。

ペルオキシゾームは脂肪酸の β -酸化を行う。この酸化反応の過程で H_2O_2 が産生される。

ミクロソームに局在するチトクロムP-450は酸化還元反応で植物由来などの毒物(親電位物質)を解毒する酵素である。この反応ではNADPHを補酵素として、直接酸素から O_2^- を生じる。

異物貪食能を有する炎症細胞は、標的物質を処理する際にROSのmixtureを放出する。

ROSは酸化ストレスとして蛋白質、脂質、核酸を酸化修飾する。酸化修飾された生体構成成分が蓄積することが老化あるいは癌化の促進につながると考えられている(図1)¹⁾。蛋白質、脂質やDNAはROSによって直接酸化修飾されるばかりでなく、糖のglycationによる代謝産物や脂質の過酸化物は蛋白やDNAを酸化修飾する。

ミトコンドリアDNAの異常は、糖尿病、肥満、がん、神経変性疾患、心筋障害や老化に強く結

びついていると考えられている。ミトコンドリアDNAの突然変異が加齢とともに増加すること、ミトコンドリア代謝が低下することから、ミトコンドリアにおける酸化ストレス障害が糖尿病などの疾病と関連することはすでに報告がある。

酸化ストレスによる脂質過酸化

生体構成成分の脂質の中で、二重結合を2個以上もつ高度不飽和脂肪酸はもっとも酸化を受けやすい(図2)。そのため脂質過酸化物は酸化ストレスのマーカーとして考えられている。ROSによる酸化ストレスを受けると、高度不飽和脂肪酸はまずラジカル連鎖開始反応を受けてラジカル種(LOO^-)が生成される。次に連鎖過酸化反応が進行して脂質ヒドロペルオキシド($LOOH$)になる。この反応の開始点は、不飽和脂肪酸の二重結合に囲まれた水素(二重アリル水素)である。

生体内で脂質過酸化を受けやすいのは、もっとも量の多いリノール酸(18:2)とそれより濃度は低い反応性が高いアラキドン酸(20:4)の過酸化物である。脂質の酸化反応の進行は酸化ストレスの種類によって異なる。リノール酸では、ラジカルによってラジカル連鎖反応による酸化が非特異的に起こる。LOOHの生成は、一重項酸素による非ラジカル非酵素学的な反応でも起こる。ラジカル連鎖反応が起こらずに、二重結合へ親電子付加反応が直接起こって二重結合を形

* Lipid peroxide.

** Shinji GOTO, Ph.D. & Takahito KONDO, M.D., Ph.D.: 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設放射線障害解析部門分子情報制御研究分野[☎852-8523 長崎市坂本1-12-4]; Department of Biochemistry and Molecular Biology in Disease, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, JAPAN

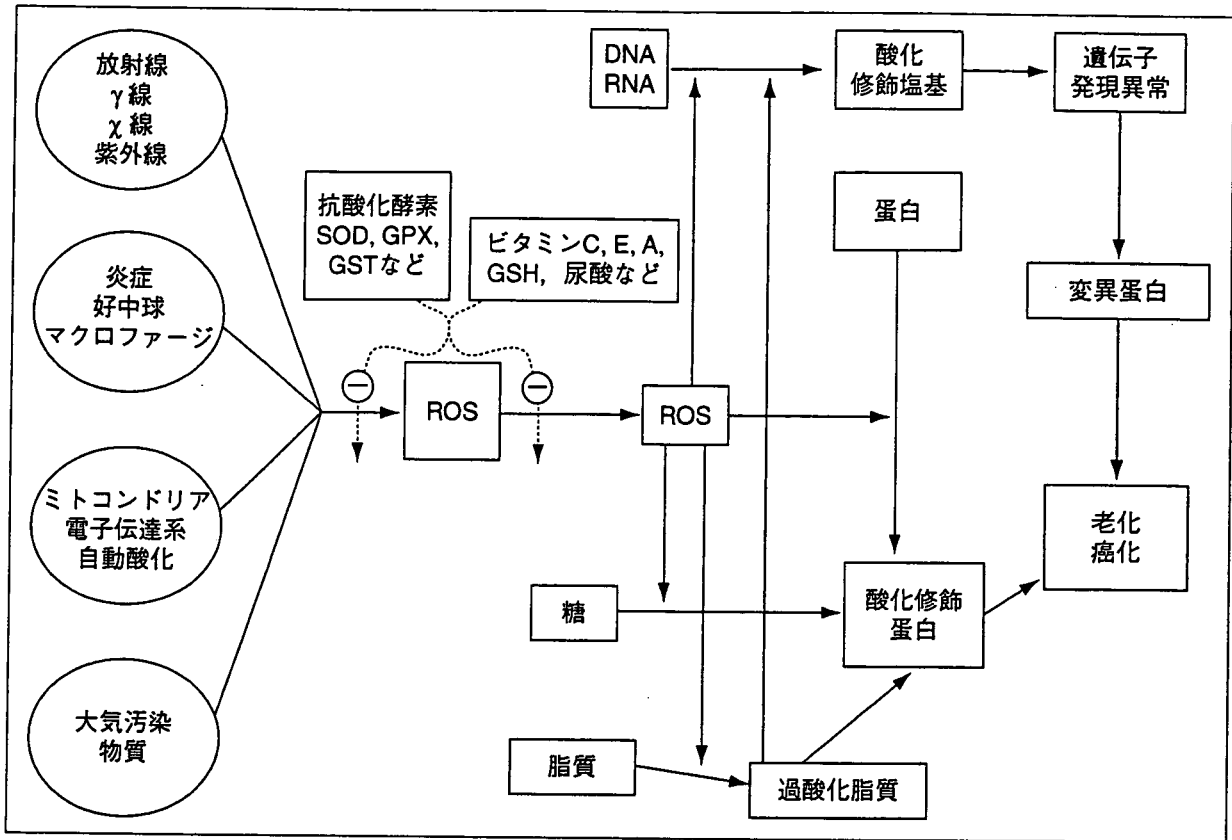


図1 酸化ストレスによる細胞障害

細胞内外からのストレスはROSを産生し、細胞構成成分の蛋白質、脂質、核酸を酸化修飾して細胞障害をひき起こす。

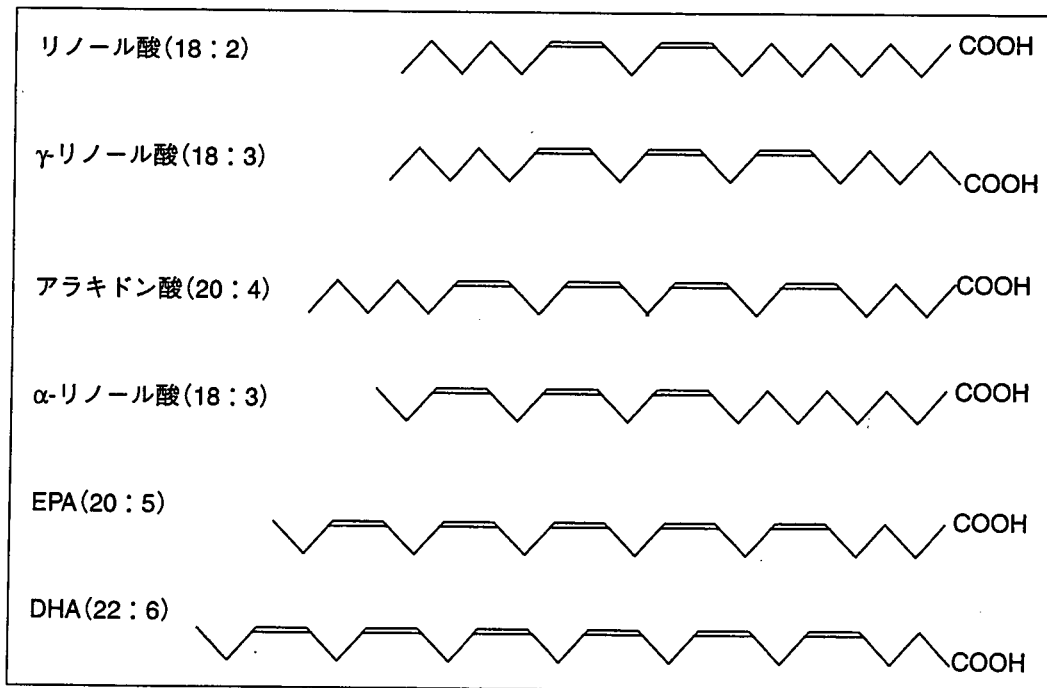


図2 不飽和脂肪酸

生体構成成分の脂質の中で、多く存在する不飽和脂肪酸。二重結合を2個以上もつ高度不飽和脂肪酸はもっとも酸化を受けやすい。

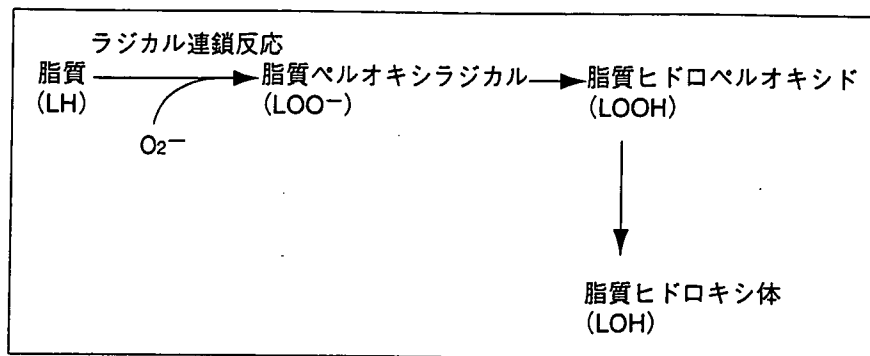


図3 脂質過酸化物の生成反応

不飽和脂肪酸はまずラジカル連鎖開始反応を受けてラジカル種(LOO $^-$)が生成される。次に連鎖過酸化反応が進行して脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)になる。この反応の開始点は、不飽和脂肪酸の二重結合に囲まれた水素(二重アリル水素)である。LOOHは安定した脂質ヒドロキシ体となる。

成する炭素部位がヒドロペルオキシド化される。さらに、15-リポキシゲナーゼなどの酵素による酵素学的LOOH生成反応もある。15-リポキシゲナーゼが関与する反応は基質として二重アリル水素を有する多価不飽和脂肪酸が必要である。これら脂質過酸化の共通した第一次生成物はLOOHであるが、反応の種類によって位置、立体、光学的特異性が異なるためにその鑑別は可能である。この生成物はすみやかにGPXなどの還元酵素の働きでアルコールなどの安定したヒドロキシ体になる。ラジカル連鎖反応を抑制して脂質過酸化を防ぐ働きをするものに血液中に存在する水溶性のビタミンCや尿酸、脂溶性のビタミンEやユビキノールやカロテノイドがある。ビタミンEはLOO $^-$ からの酸素分子の離脱を抑えてLOOH生成を抑制する。続いてアルデヒド、低級脂肪酸、炭化水素などを生成する(図3)²⁾。

代表的な脂質過酸化物

脂質過酸化物はリン脂質のほか、コレステロールエステル、コレステロール、遊離脂肪酸など多くの脂質から生成される。主として、不飽和脂肪酸の二重結合部位の酸化によってLOOHが作られ、さらにケトンやアルデヒドなどの2次生成物になる。アルデヒドは脂質過酸化以外の代謝でも生成されることから解析が難しかったが、近年は脂質過酸化に特異的なアルデヒドが解明されてきている。脂質過酸化由来のアルデヒドは、①2-アルケナール、②4ヒドロキシ-2-アルケナール、③ケトアルデヒドの3種類に大別さ

れる。①2-アルケナールには、アクロレイン、クロトナルデヒド、2-ヘキサナール、2-ノネナールが含まれる。②4ヒドロキシ-2-アルケナールには、ヒドロキシ-2-ノネナール(4HNE)、4ヒドロキシ-2-ヘキサナールが、③ケトアルデヒドには、グリオキサール、メチルグリオキサール、マロンジアルデヒドや、アラキドン酸由来のレプランジン化合物が含まれる(図4)。

脂質過酸化物は蛋白質や核酸成分と容易に反応して脂質過酸化物付加体が生成される。たとえば、4HNEは蛋白質のシステイン、ヒスチジン、リシン残基と反応して付加化合物を生成する³⁾。

以前より脂質過酸化物の測定には、チオバルビツール酸を脂質過酸化物と反応させるチオバルビツール酸反応陽性物質を測定するTBARS法が用いられてきた。これは、LOOHばかりでなく、アルデヒド誘導体なども反応物に含み、広い脂質過酸化のマーカーとして用いられている。より特異性の高いLOOH測定はHPLCやLC-MSなどを用いて行われる。

脂質過酸化の消去

1. GPXによるLOOHの還元反応

GPXにはcellular GPX, gastrointestinal GPX, extracellular GPX, phospholipid hydroperoxide GPX, selenoprotein Pなどがある。このうちのいずれのGPXもLOOHの還元反応を触媒する。PCOOHはphospholipid hydroperoxide GPXとselenoprotein Pで還元される。



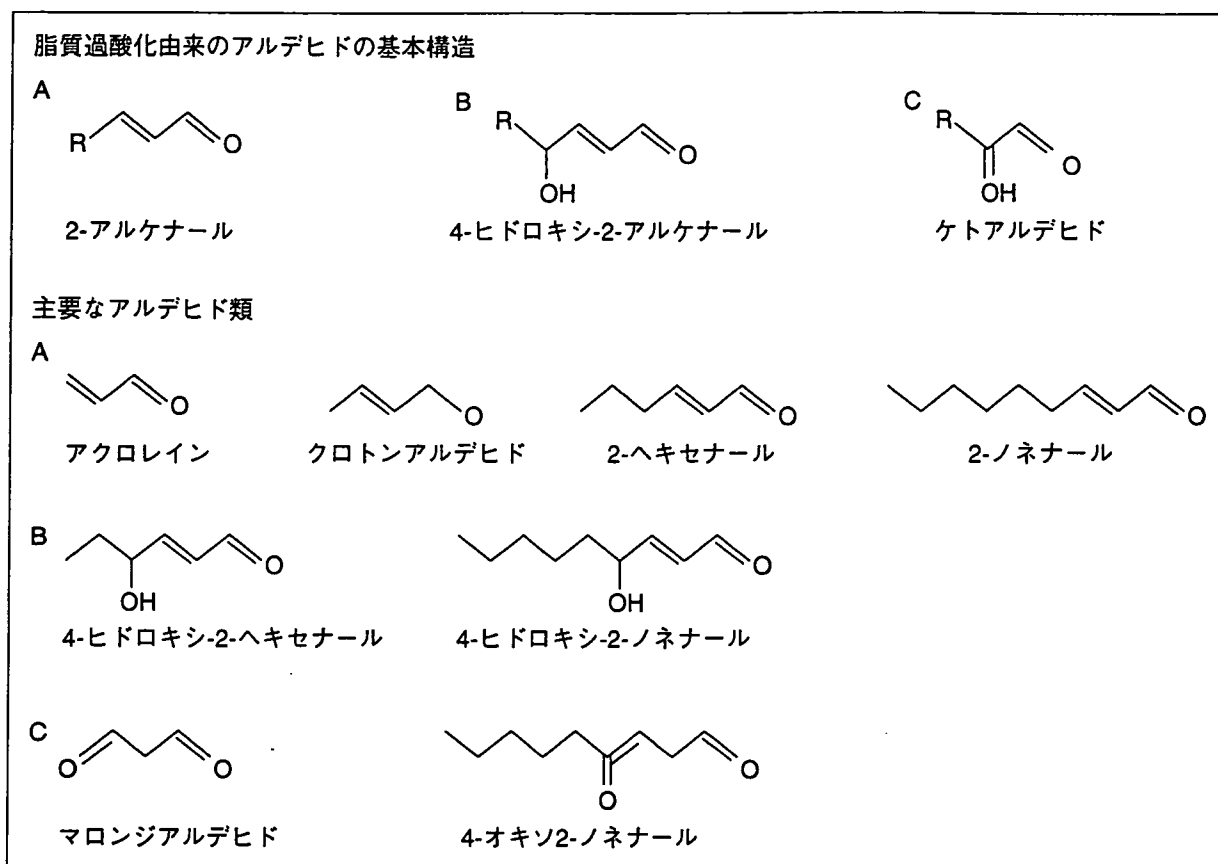


図4 脂質過酸化由来のアルデヒド

基本構造は3種類に分けられる。2-アルケナールの主なアルデヒドにはアクロレインなどがある(A)。4-ヒドロキシ-2-アルケナールには4-HNE(B)、ケトアルデヒドには4-オキソ-2-ノネナールがある(C)。

なかでも、ミトコンドリアのphospholipid hydroperoxide GPXは脂質過酸化を防御する特異的なシステムである⁴⁾。

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)は、薬剤に対するGSH抱合活性のほかに、脂質や核酸の過酸化物に対するGSHペルオキシダーゼ活性などを示す多機能酵素である。原発性肝硬変患者の胆管では、GST π 発現の減少と脂質過酸化物(4-HNE)の上昇が認められ、GSTによる脂質過酸化の消去作用が胆管の障害を防ぐ意味で重要であると考えられている⁵⁾。STZ-DMラットを用いた研究では、いくつかの組織のミトコンドリアに局在するGST遺伝子の発現量が亢進していた⁶⁾。最近のヨーロッパにおける多数の糖尿病患者を対象とした研究では、血液細胞中のGST valiantの存在が炎症マーカーの上昇と脂質過酸化物の増加と相関していたとする報告がなされている⁷⁾。

核酸の脂質過酸化

DNAは脂質過酸化物によっても修飾を受けており、グアニンの環外アミノ基と脂質アルデヒドが付加体を生じることによってDNA損傷を引き起こすことが明らかとなってきた。グアニン以外にもアデニンとシトシンも過酸化修飾を受けるが、環外アミノ基のないチミンは修飾を受けない。これらの脂質過酸化物で修飾されたDNAの存在が組織や尿中で証明されている。この反応はMDA, HNEやアクロレイン類とDNAとの付加体であるが、脂質過酸化物以外にも、糖代謝やアセトン、アルコール、さらには環境汚染の化学物質とも反応する特異性のない修飾である点であるために、脂質過酸化物とDNA付加体の特異的な測定法を確立することが重要である。

河合らはリノール酸酸化物と核酸塩基の*in vitro*での反応を解析した結果、脂質アルデヒドのひとつである4-oxo-2-nonenal(4-ONE)が塩基に付加

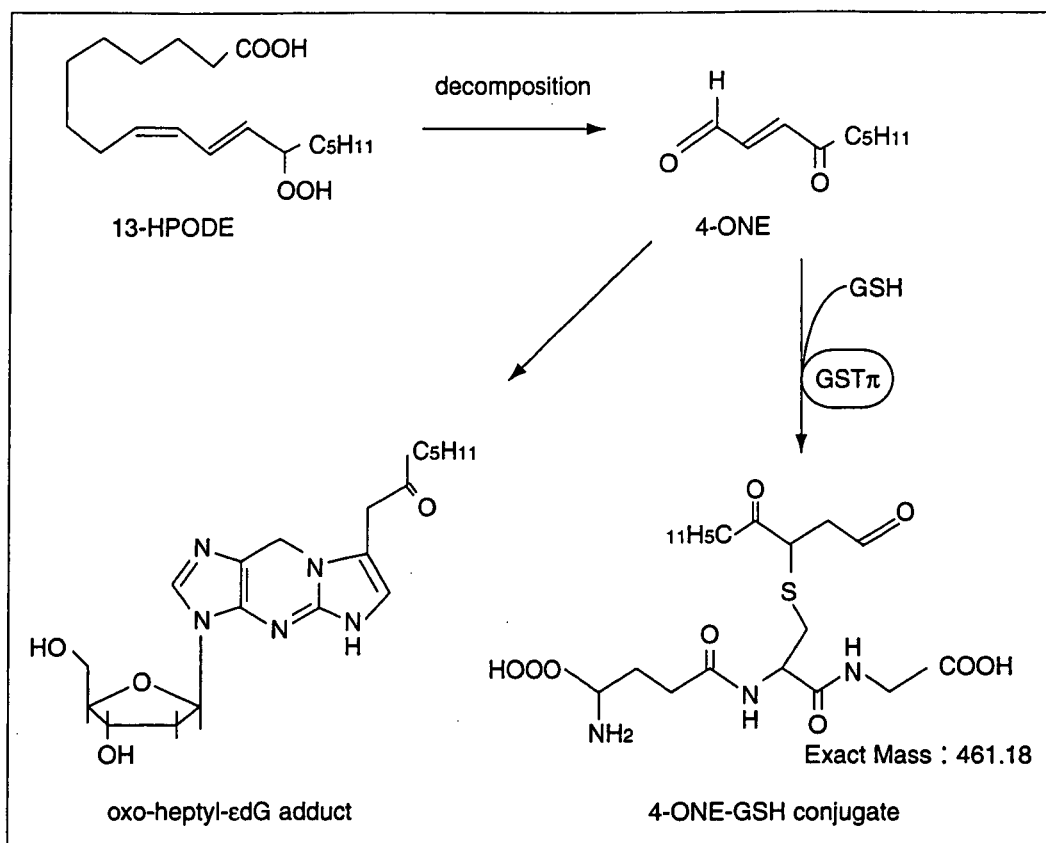


図5 核DNAと脂質過酸化物の付加体

13-HPODEの分解産物の脂質アルデヒドである4-ONEとDNAのグアニンとの反応産物であるONE-グアニン付加体(oxo-heptyl-edG)は、発癌や老化に結びつくと考えられる。GSTπは4-ONEのグルタチオン抱合を起こしてDNA障害の防御に働く。

した反応物が特異的に生成されることを見出した⁸⁾。この4-ONEは、リノール酸過酸化物のひとつである13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE)が分解して生じる脂質アルデヒドである。この4-ONEとグアニンとの反応の結果生成されるONE-グアニン付加体(oxo-heptyl-edG)を認識するモノクローナル抗体を作製し、発癌モデルであるコリン欠乏食投与ラット肝臓の細胞で、oxo-heptyl-edGが核内に検出されることを見出した⁹⁾(図5)。

われわれはヒト癌細胞で、主に細胞質に存在するGSTπが、酸化ストレスによって核に移行することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、過酸化水素を添加すると、核の凝集や核DNAの断片化とともにoxo-heptyl-edGが検出されるが、GSTπが4-ONEのGSH抱合を行ってこの4-ONEの核酸塩基付加体形成を軽減することを報告している¹¹⁾。

脂質過酸化の病態的意義

LDLはその酸化変性の過程でアポB100蛋白がfragmentationを受けるほかに、脂質過酸化物も増加する。なかでもリン脂質のPCが分解されlyso-PCが増加する¹²⁾。LysoPCはアポB100のリジン残基やアルギニン残基を酸化修飾して、分解を亢進する。LDLの脂質過酸化には血管内皮細胞や血管マクロファージの15-LOが働くとされている¹³⁾。脂質過酸化物を含んだ変性LDLはマクロファージのみならず、血管内皮細胞に発現する酸化LDLリセプター、LOX-1を介して取り込まれる。LOX-1細胞外ドメインが炎症時に血清中に遊離することが、急性の冠動脈疾患で認められることから、新規の血管病変の予知因子として注目されている¹⁴⁾。

過酸化脂質と糖尿病

脂質過酸化の中で、疾病や老化と関連する上

で膜構造主成分であるリン脂質の過酸化が重要と考えられる。健康人の血漿でも、微量の過酸化リン脂質(PCヒドロペルオキシド)が存在する。その他さらに少量のエタノールアミンヒドロペルオキシドも存在している。PCヒドロペルオキシドの主分子種はリノール酸ヒドロペルオキシドである。糖尿病患者血漿PCヒドロペルオキシドがHbA_{1c}値に相関して増加しているという報告がある¹⁵⁾。この原因は、エタノールアミンが糖化を受けてアマドリ型糖化脂質が生じ、そこから重金属の存在下で生じるスーパーオキシドがヒドロキシラジカルとなり脂質過酸化を誘発するとされる¹⁶⁾。

最近中山らは、2型糖尿病ラットを用いて検討し、ラ氏島に4HNEの蓄積が認められることと、AT₁R阻害剤が軽減作用を有することを報告している¹⁷⁾。高血糖による酸化ストレスの増大は4HNEの増加をもたらすという報告もある¹⁸⁾。4HNEを3T3-L1脂肪細胞株に投与したところ、adiponectinのmRNA発現が低下した。糖尿病に認められる4HNEの増加は、N-acetylcysteineやtaurineなどの抗酸化物質の投与で軽減し、インスリン抵抗性も改善したことは、脂質過酸化物が、遺伝子発現や細胞内情報伝達機構の異常を伴って糖尿病悪化の一因になっていることを示唆する¹⁹⁾。

糖尿病においては、脂質過酸化物の蓄積は、細胞膜の変性、代謝反応の異常、酸化ストレスの増加などと、脂質過酸化物の除去に働く酵素の発現低下からインスリン作用の低下をもたらすと考えられる。すなわち、糖尿病ラットで認められるFALDH遺伝子発現低下は、酸化ストレスの増大を伴い、インスリンシグナルの下流にあるPI3K依存性の遺伝子発現調節の異常をもたらす²⁰⁾。

文 献

- 1) Earl RS. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2002 ; 33 : 597.
- 2) 二木鋭夫, 野口範子, 内田浩二. 酸化ストレスマーカー. 初版. 東京:学会出版センター; 2005. p. 1.
- 3) 倉林正彦, 山岸昌一. 酸化ストレスナビゲーター. 初版. 東京:メディカルレビュー社; 2005. p. 34.
- 4) Nomura K, Imai H, Koumura T, et al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 29294.
- 5) Tsuneyama K, Harada K, Kono N, et al. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 2002 ; 37 : 176.
- 6) Raza H, Prabu SK, Robin MA, et al. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats : tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* 2004 ; 53 : 185.
- 7) Hayek T, Stephens JW, Hubbart CS, et al. A common variant in the glutathione S-transferase gene is associated with elevated markers of inflammation and lipid peroxidation in subjects with diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2005 Jul 4 [Epub ahead of print].
- 8) Kawai Y, Uchida K, Osawa T, et al. 2'-deoxycytidine in free nucleosides and double-stranded DNA as the major target of lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 2004 ; 36 : 529.
- 9) Kawai Y, Kato Y, Nakae D, et al. Immunohistochemical detection of a substituted 1, N(2)-etheno-deoxyguanosine adduct by omega-6 polyunsaturated fatty acid hydroperoxides in the liver of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Carcinogenesis* 2002 ; 23 : 485.
- 10) Goto S, Ihara Y, Urata Y, et al. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by the nuclear glutathione S-transferase π . *FASEB J* 2001 ; 15 : 2702.
- 11) Kamada K, Goto S, Okunaga T, et al. Nuclear glutathione S-transferase p prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA products. *Free Radic Biol Med* 2004 ; 37 : 1875.
- 12) Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces

シンポジウム 「次の百年へ」 老化と抗加齢の科学

活性酸素と老化*

近藤 宇 史†

はじめに

活性酸素とその代謝産物によってもたらされる酸化ストレスは、生体構成成分のタンパク質、脂質や核酸を酸化修飾してそれらの構造と機能を変化させる。これらの酸化修飾物が蓄積すると細胞の機能にも影響を及ぼし、老化が進む。生体はつねに活性酸素に曝露されているほかに、意図的に活性酸素を産生し殺菌や細胞内情報伝達に使用している。一方、体液や各組織細胞はそれぞれ活性酸素を消去する防御機構を有している。活性酸素が過剰に加わったとき、酸化ストレスとして細胞障害が生まれ、そのストレスが長期に亘るときに病的老化のもととなる慢性疾患を進展させる。たとえば、慢性喫煙は肺癌、慢性肺気腫、心血管病変の増悪因子であるが、その機序に酸化ストレスがあると考えられる。肥満、耐糖能異常、高脂血症、高血圧のいずれにも酸化ストレスによる組織障害が存在する。

活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) によるタンパク質のチオール基の酸化修飾と、それを還元する因子による酸化還元 (レドックス) のバランスは、細胞内情報伝達や遺伝子の発現などの重要な細胞機能を制御している。ROS が細胞障害ばかりでなく、細胞内情報伝達を含めた細胞機能の制御に関連するレドックス制御因子の研究が疾病の予知や予防の面から注目されている。

Key words: Reactive oxygen species, Oxidative stress, Aging, Akt, Redox

*Reactive Oxygen Species and Aging

†長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設放射線障害解析部門分子病態生化学. Takahito Kondo: Department of Biochemistry and Molecular Biology in Disease, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

1. 活性酸素の生成

生体内で主要な ROS は、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル (OH) である。ROS の産生は、(1)ミトコンドリア呼吸鎖での電子伝達系、(2)ペルオキシソームでの脂肪酸代謝、(3)チロクローム P-450 による反応、(4)貪食細胞による “respiratory burst” の際などで行われる。ミトコンドリアでの ROS 産生は電子伝達系を流れる電子の約 0.1-2% 程度とされる。ミトコンドリアの Mn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が H_2O_2 に変える。

炎症細胞は、異物貪食をする際に ROS の mixture を放出する。それには、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、hypochloride が含まれる。その ROS は慢性炎症で病的意義があると考えられる。細胞膜に局在する NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced) oxidase は炎症細胞では炎症と関連するほかに、ホルモン、増殖因子やサイトカインなどの受容体を介したシグナルがこの酵素を活性化して微量の ROS を産生し、シグナル伝達に関連する。

2. 細胞の抗酸化機構

細胞内小器官は、酸化ストレスに対して独自のアンチオキシダント機能を有している。核ばかりでなく、小胞体も本来のタンパク質の合成と品質管理に対するストレスに独自の反応を示す。ミトコンドリアはアポトーシスを制御するシグナルの担い手であり、高いアンチオキシダントを有してストレスに反応している。たとえば O_2^- を消去する Mn-SOD が局在している。SOD が生成する H_2O_2 を消去するグルタチオン過酸化酵素やグルタチオン (GSH)、レドックスに関わるチオレドキシシンやグルタレドキシシン (GRX) 2 も存在する。これら小器官のストレス応答の破綻が酸化ストレスによる老化進展をもたらすとするデータも多い。

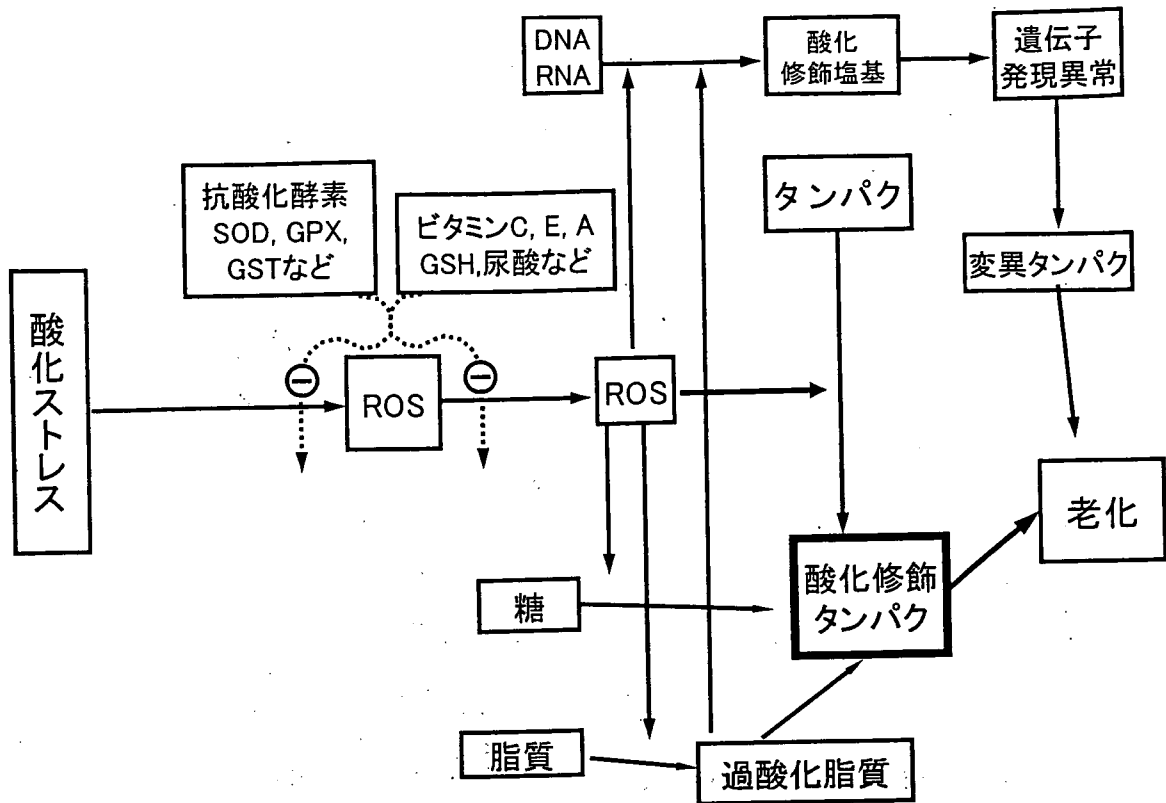


図1 活性酸素種による老化の進展. 種々のストレスで細胞内外で生じる ROS は, 細胞構成成分のタンパク質, 脂質, 糖質, 核酸に酸化修飾を引き起こす. 酸化修飾タンパクや遺伝子の異常による変異タンパク質の増加が老化へと結びつく. [文献7より引用, 一部改変]

3. 活性酸素の標的因子と測定法

タンパク質, 脂質と核酸が酸化修飾されることが, オキシダントが過剰に発生していることの証拠として測定されている.

(1) 脂質過酸化

脂質過酸化物の測定は, 脂質過酸化物とタンパク質の付加体に対する特異抗体を作製して免疫学的に測定する方法が開発され, 組織細胞や血漿タンパク質での検討が進められている. 2-アルケナール, 4-ヒドロキシノネナール, 4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール, イソレブグランジンなどのケトアルデヒドなどの測定方法が確立している.

(2) 核酸の酸化修飾

現在多くの酸化修飾核酸の測定法が開発されている. 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) などの核酸酸化物を測定する.

(3) タンパクの酸化修飾

カルボニル化タンパク質の免疫学的定量法が一般的に用いられている. カルボニル化タンパクは血漿や組織細胞で多く認められている.

4. 酸化ストレスと細胞の老化

ROSによって修飾されたタンパク質, 脂質, 核酸が増加して蓄積すると種々の機能障害を生じる(図1). 固体では1日当たりDNAは 10^5 個の酸化傷害を受けていると言われており, 加齢によって核やミトコンドリアでのDNA過酸化物の蓄積が増加する. ROSは直接DNAのstrand breakやcross-linkを形成してmRNA(messenger ribonucleic acid)の転写停止, 翻訳のエラーや遺伝子の不安定化を来す. 酸化修飾されたタンパク質はクロスリンクしやすいために, プロテアソームでのタンパク分解を受けづらい. 酸化LDL(low-density lipoprotein), 過酸化脂質, 糖化タンパクや高血圧におけるシアストレスのシグナルも細胞に過剰な酸化ストレスとして働く. 脂肪細胞由来のTNF- α (tumor necrosis factor- α)もROS産生に働く. さ

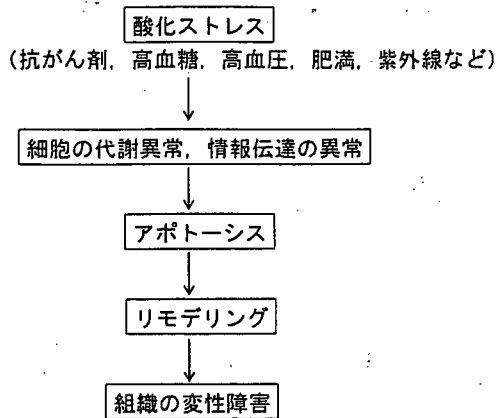


図2 酸化ストレスによる組織細胞のアポトーシスとリモデリング。細胞内外にはアンチオキシダントがあつて ROS を消去するが、過剰な ROS は脂質、タンパク質、DNA を酸化修飾する。その結果心筋のアポトーシスからリモデリングが引き起こされ、組織障害と機能不全の原因となる。高血糖、高血圧、肥満、紫外線、炎症、抗癌剤などが酸化ストレスを生じる。【文献1より引用、一部改変】

らに血管内のマクロファージや好中球からの ROS も酸化ストレスとなる。動脈硬化病変で酸化修飾タンパクや脂質過酸化物が検出されることから、慢性酸化ストレスが血管の老化を進展させていると考えられる。

心筋障害による心不全、肺気腫による呼吸不全、2型糖尿病などによる組織障害でも、組織細胞に酸化ストレスが負荷されることで細胞のアポトーシスが生じ、組織のリモデリングへ進み、変性と機能不全へと進む(図2)¹⁾。

呼吸器疾患に関連して、長井らは最近喫煙による酸化ストレスの意味を報告している²⁾。すなわち、気管支肺泡洗浄液中の酸化修飾タンパク質を測定してみると、若年者では喫煙の有無による差異は見られなかったが、老年者では慢性喫煙によって非喫煙者とは異なる酸化修飾タンパクの著明な増加を認めた。さらに洗浄液中のグルタチオン(GSH)/酸化型グルタチオン(GSSG)比が低下しており、喫煙によってレドックスにも変化を及ぼすことが示された。

5. レドックス制御と老化

レドックスは細胞機能全般の制御に関連する重要な仕組みである。GSH が ROS によって GSSG になるとタンパク質のシステイン残基は、GSSG で修飾され可逆性の -S-S- か -SSG(グルタチオン化)、さらに不可逆性の -SO_xH となる。可逆的なシステインの酸化還元状態はその組織細胞や体液でのレドックスバランスを反

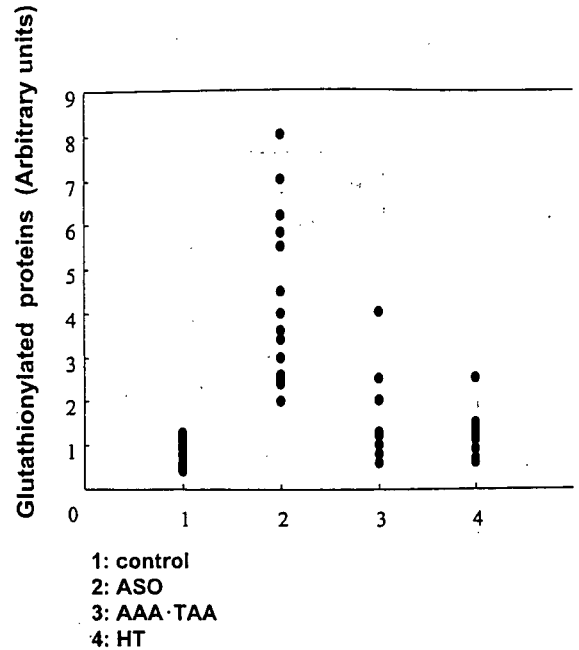


図3 閉塞性動脈硬化症におけるグルタチオン化血清タンパク。患者血清中のレドックス異常で引き起こされるグルタチオン化タンパクを測定。ASO; 閉塞性動脈硬化症, AAA-TAA; 大動脈瘤, HT; 高血圧症。

映することから、特にグルタチオン化されたタンパクの測定は、新しい血管障害危険因子となると考えられる。最近われわれは、血管老化疾患である閉塞性動脈硬化症(ASO)でのグルタチオン化血清タンパクの測定を試みた³⁾。ASO では、グルタチオン化タンパクが上昇しており、他の心血管障害では変化が著明でなかったことから、この測定の意義があると考えられる(図3)。

転写因子による遺伝子発現も、転写因子タンパクの DNA 結合を制御するレドックスによって調節されている。情報伝達に働く多くのキナーゼは mRNA の発現、タンパクの発現と、翻訳後の酵素活性の修飾で制御されるが、システインの-SH-基が酸化型か還元型かによって活性が調節されている。

細胞が除去できなかった ROS は直接アポトーシスへと向かう ASK-1, JNK, p38MAPK などのシグナルを活性化する(図4)。一方、ROS はレドックスを働かせる起点となり、細胞内情報伝達の活性化を引き起こすことで抗アポトーシス作用を示す。最近われわれが報告したレドックス調節因子 GRX によるシグナル伝達の制御機構の1つを紹介する⁴⁾。ROS を添加した心筋細胞では、アポトーシスを防ぐ PI3-kinase/Akt の抗アポトーシスシグナルが働く(図5)。Akt はミトコンドリアにアポトーシスを引き起こすシグナルを伝える Bax を

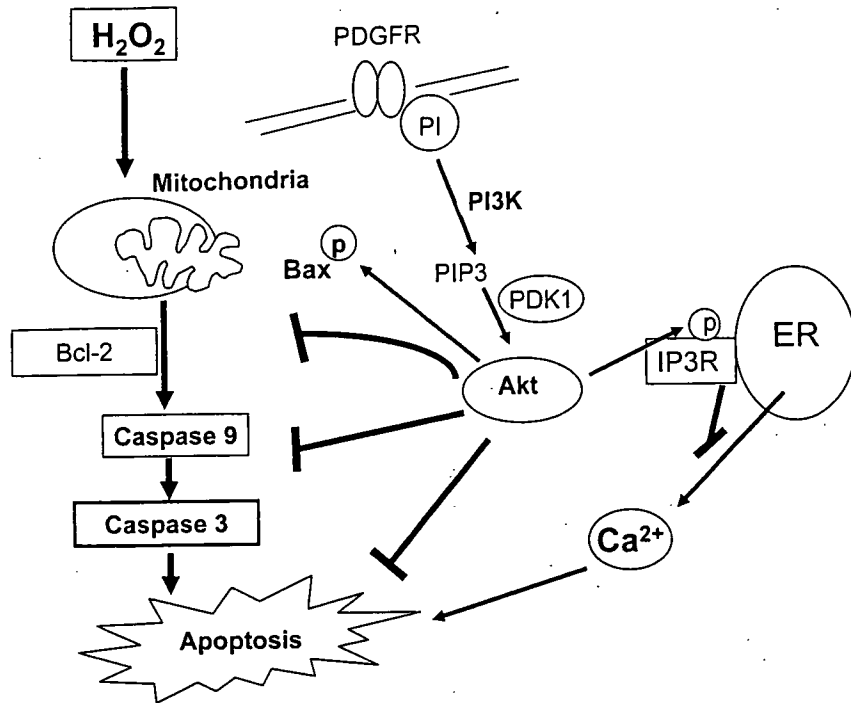


図4 酸化ストレスによるミトコンドリア障害と抗アポトーシスシグナル。増殖因子受容体を介したシグナルは PI3-kinase/Akt の抗アポトーシスシグナルを活性化する。Akt はミトコンドリアからのアポトーシスシグナルを抑制する。また、小胞体(ER)からのアポトーシスに働くカルシウムを、そのポンプである IP3 受容体(IP3R)をリン酸化することで抑制し、抗アポトーシスに働く。

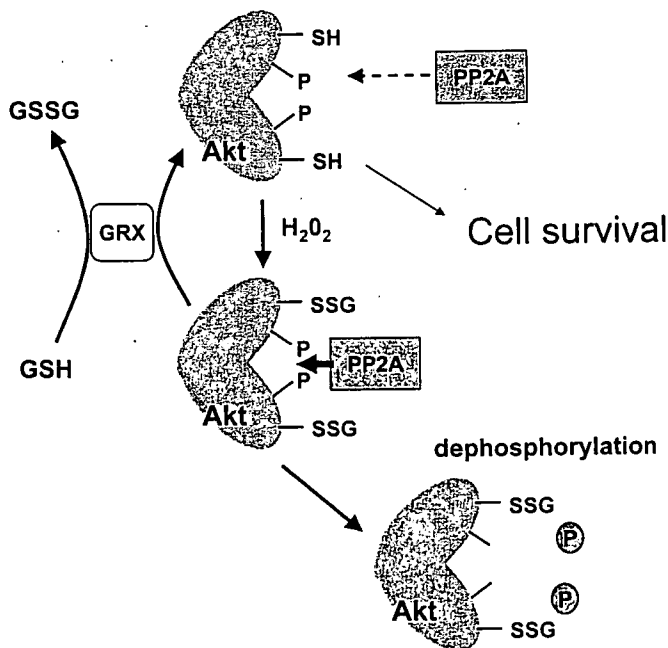


図5 GRX によるレドックス制御。タンパク質のシステイン基(Protein-SH)が、ROSでグルタチオン化(Protein-SSG)されると、GRX は GSH を基質として還元型に戻すように働く。Akt の活性は GSH/GRX システムで還元型に維持されることで抗アポトーシスシグナルを伝えることが可能となる。

リン酸化することで、ミトコンドリア内への移行を抑制する。さらに Akt はミトコンドリアからのアポトーシスシグナル系を抑制して抗アポトーシスに働く。一方、GRX は Akt の活性を調節するシステインが還元型であるように働き、その結果リン酸化活性が高く維持される。それは還元型ときにはプロテインフォスファターゼ PP2A が結合しにくいからである。

さらに、性ホルモンによるレドックス制御について女性ホルモン(エストラジオール, E₂)の抗酸化能の討を行った⁶⁾。E₂ は基本的には E₂ 受容体(ER)に結合して転写因子として遺伝子発現を調節する。この ER に ER α と ER β が存在し、性組織細胞ばかりでなく広組織細胞に発現していることから、E₂ の生理的意義広いことが推測される。ER β を発現している心筋細胞に ROS のストレスを与えると、ROS によってアポトーシスシグナルが活性化される。E₂ をあらかじめ投じておいた心筋細胞では、Akt の活性が上昇し、アポトーシスが起こらなくなった。このことは、Akt の性維持に働く GRX と GSH 合成の遺伝子発現が E₂ によって誘導された結果である。

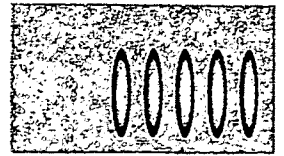
インスリンが受容体を介して細胞にシグナルを伝

する際に、NADPH oxidaseが活性化されて産生されたROSが、インスリンシグナルを活性化させる。ROSの働きの1つに、インスリンシグナルであるチロシンキナーゼのリン酸化を不活化するプロテインフォスファターゼPTP1Bを不活性化状態にすることが知られている。PTP1BはGRXのレドックス制御によって活性化される。ホルモンや増殖因子の受容体やキナーゼと調節酵素フォスファターゼが、それぞれの活性部位近傍に存在するシステインのレドックスがGRXなどの酵素によって調節されていることで細胞の機能に重要な働きを及ぼしている。

肥満での脂肪細胞から産生されるTNF α がインスリン抵抗性に働くことが知られているが、最近、TNF α によってもたらされるインスリン抵抗性とTNF α によって産生されるROSとに深い関連があることが明らかとなってきた⁶⁾。同じようにしてdexamethasone投与によるインスリン抵抗性出現にも機序は異なるものの、ROSが関与する。抗酸化物質の投与によってインスリン抵抗性が改善される可能性も示唆している。すなわち、生理的な状態で産生されるROSが関連するシグナル伝達を慢性の酸化ストレスを生じる状態では、過剰なROSがその機構を阻害すると考えられる。慢性疾患でのレドックス制御の意義はこれからの検討課題である。

文 献

- 1) Dhalla NS, Dent MR, Tappia PS, et al. Subcellular remodeling as a viable target for the treatment of congestive heart failure. *Cardiovasc Pharmacol Therapeut* 2006; 11: 31-45.
- 2) Nagai K, Betsuyaku T, Kondo T, et al. Long term smoking with age builds up excessive oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 2006; 61: 496-502.
- 3) Nonaka K, Kume N, Urata Y, et al. Serum levels of S-glutathinylated proteins as a risk marker for arteriosclerosis obliterans. *Circulation J* 2007. (in press)
- 4) Murata H, Ihara Y, Nakamura H, et al. Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem* 2003; 278: 50226-33.
- 5) Urata Y, Ihara Y, Murata H, et al. 17 β -Estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2 cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 13092-102.
- 6) Houstis N, Rosen ED, Lande ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944-8.
- 7) Earl RS. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biol Med* 2002; 33: 597-604.



酸化ストレスと老化

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設
放射線障害解析部門分子病態生化学教授

近藤 宇史 (こんどう たかひと)

◆キーワード

酸化ストレス
老化
抗酸化機構
レドックス制御

活性酸素の生成

生体内で主要な活性酸素種 (ROS) は、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) である。ROS の産生については以下に挙げる通りである。

① ミトコンドリア呼吸鎖から生じるもので、電子伝達系を流れる電子の約 0.1~2% 程度とされる。ミトコンドリアには Mn-SOD が局在して O_2 を消去して H_2O_2 に変えるため、細胞内で生じる H_2O_2 の多くはミトコンドリア由来である。

② ペルオキシソームでの脂肪酸代謝の過程で H_2O_2 が産生される。

③ ミクロソームに局在するチトクローム P-450 による反応で直接酸素から O_2 を生じる。

④ 異物食能を有する炎症細胞は、標的物質を処理する際に ROS の mixture を放出する。

⑤ 細胞膜に局在する NADPH oxidase はインスリンなどのホルモン、増殖因子やサイトカインなどの受容体を介したシグナルが活性化されて ROS を産生する。

はじめに

生体は常に活性酸素に曝露されているほかに、意図的に活性酸素を産生し殺菌や細胞内情報伝達に使用している。体液や各組織細胞は、それぞれ活性酸素を消去する防御機構を有している。活性酸素が優位となった時、酸化ストレスとして細胞障害が生まれ、そのストレスが長期にわたる時に病的老化のもととなる慢性疾患を進展させる。

具体的には、酸化ストレスはタンパク質、脂質、核酸を酸化修飾して、それらの構造と機能を変化

させる。これらの酸化修飾された細胞の構成成分が蓄積すると、細胞の機能にも影響を及ぼし、老化が進む。例えば、慢性喫煙は肺癌、慢性肺気腫、心血管病変の増悪因子であるが、その機序に喫煙による酸化ストレスがあると考えられる。メタボリックシンドロームでは肥満、耐糖能異常、高脂血症、高血圧のいずれにも酸化ストレスによる組織障害が存在する。

酸化ストレスの消去機構の特徴は、細胞内の小器官ごとに独自のシステムが存在することである。酸化ストレスと消去機構とで繰り返される酸化還元 (レドックス)

の変化は、細胞内情報伝達や遺伝子の発現などの重要な細胞機能を制御している。このように酸化ストレスが示す変動は多彩であり、細胞死や分化増殖にも関わる、きわめて重要な制御因子と考えられている。

活性酸素産生とその消去機構の研究が進展し、活性酸素が細胞障害ばかりでなく、細胞内情報伝達を含めた細胞機能の制御に関連することが明らかにされるとともに、これら酸化ストレスと関連因子について、老化の予防や疾病の予知因子としての意義の研究も進められている。

⑥生体外からは、喫煙、放射線、抗がん剤、環境ホルモンなどがROSをもたらし、

活性酸素の標的因子と測定法

ROSの標的は主に脂質とタンパク質と核酸である。これらの標的因子が酸化ストレスで修飾されていることが、ROSが過剰に発生していることの証拠であり、修飾された因子の蓄積が老化につながる

と考えられる。
(1)脂質過酸化
最近、脂質過酸化物とタンパク質の付加体に対する特異抗体を作製して免疫学的に測定する方法が開発され、組織細胞や血漿タンパク質での検討が進められている¹⁾。過酸化脂質として、喫煙などで生成されるアクロレインなどの揮発性の2-アルケナール、多価不飽和脂肪酸から生成される4-ヒドロキシ-2-ノネナールや4-ヒド

ロキシ-2-アルケナール、アラキドン酸由来のレプグラジン化合物などのケトアルデヒドが存在する。脂質過酸化物はタンパク質やDNAの障害を引き起こす。
(2)核酸の酸化修飾
8-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン(8-OHdG)などの核酸酸化物を測定するもので、加齢によって核やミトコンドリアでのDNA過酸化物の蓄積が増加する指標とされている。

(3)タンパクの酸化修飾

カルボニル化タンパク質の免疫学的定量法が一般的に用いられている。カルボニル化タンパクは血漿や組織細胞で多く認められている。

細胞の抗酸化機構

細胞内小器官が独自のアンチオキシダントを発現しているが、ROSによる小器官の障害の蓄積が病的老化を引き起こすという報告がある。例えば、核は独自の抗酸化機構を有するが、ROS過剰ではアポトーシスを生じる。小胞体もROSによって本来のタンパク質の合成と品質管理ができなくな

り、変性疾患を起こす。ミトコンドリアもROSに応答する機能を高く有しているが、その機能障害が病的老化の原因とされている。酸化LDL、過酸化脂質、糖化タンパクや高血圧におけるシアステレスのシグナルも細胞に酸化ストレスとして働く。脂肪細胞由来のTNF α もROS産生に働く。さらに、血管内のマクロファージや好中球からのROSも酸化ストレスとなる。動脈硬化病変には酸化修飾タンパクや脂質過酸化物が検出されることから、慢性酸化ストレスが血管の老化を進展させていると考えられる。

心筋障害による心不全、慢性気管支喘息や肺気腫など慢性閉塞性肺疾患による呼吸不全、2型糖尿病などは、種々の刺激によって引き起こされる。その結果、組織細胞の構築と機能の変化(リモデリング)が生じる²⁾。心疾患では、心筋にストレスが負荷されるとROSが産生されて心筋細胞のアポトーシスが生じ、心筋のリモデリングへ進む(図1)。

ROSを産生するストレスとなるのは虚血・再還流、炎症、抗が

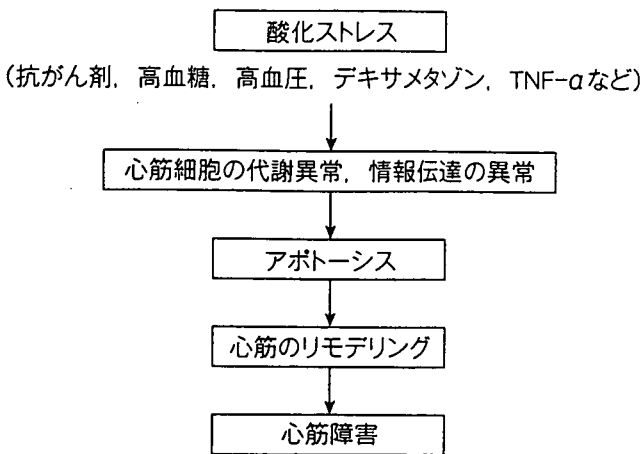
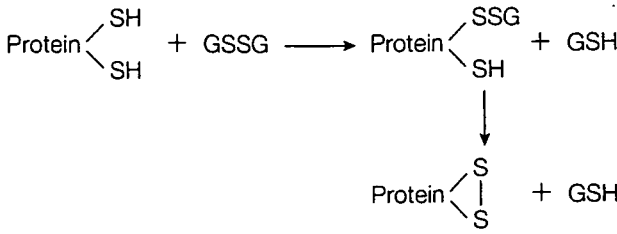


図1 酸化ストレスと心筋の老化

細胞内外からのストレスはROSを発生し、細胞障害を引き起こす。細胞内外にはアンチオキシダントがあってROSを消去するが、過剰なROSは脂質、タンパク質、DNAを酸化修飾する。その結果、心筋のアポトーシスからリモデリングが引き起こされ、心筋障害の原因となる。

1. 酸化ストレスによるタンパク性 SH 基の修飾



2. GRX による還元

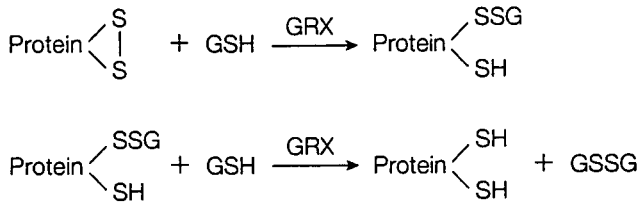


図 2 GRX によるレドックス制御

タンパク質の SH 基 (Protein-SH) は、ROS で酸化型となる (Protein-SSG あるいは Protein-S-S-) が、GRX は GSH を基質として還元型に戻すように働く。

GSSG: 酸化型グルタチオン, GSH: 還元型グルタチオン

ん剤、シアストレスなどである。虚血では ATP 分解でできたヒポキサンチンと酸素が反応して O₂ が生じる。シアストレスによるシグナルも ROS 産生を引き起こす。炎症時には炎症細胞から直接 ROS が産生されるほかに、分泌された TNF-α が血管内皮細胞や心筋細胞に働いて ROS を産生する。

レドックス制御と老化

レドックスは細胞機能全般の制

御に関連する重要な仕組みである。転写因子や情報伝達に働く多くのキナーゼ活性は、システインの SH 基が酸化型か還元型かによって活性が調節されている (図 2)。細胞にとって代表的な酸化ストレスは、上述したミトコンドリア由来の内因性 ROS のほかに、放射線、炎症細胞、大気汚染物質などの外因性 ROS とがある。ROS が発生した細胞では、消去できなかった ROS が、ASK1、

JNK、p38MAPK などのシグナルを活性化して直接アポトーシスへと向かう。一方、ROS はレドックスを働かせる起点となり、細胞内情報伝達の活性化を引き起こすことで抗アポトーシス作用を示す。

最近われわれが報告した thioredoxin family の一つである glutaredoxin (GRX) によるシグナル伝達の制御機構の一つ³⁾を紹介する。PI3-kinase/Akt の抗アポトーシスシグナルに着目してみると、GRX は Akt の Cys が還元型であるように働き、活性が高く維持される。

肥満での脂肪細胞から産生される TNF-α がインスリン抵抗性に働くことが知られているが、最近、TNF-α によってもたらされるインスリン抵抗性と、TNF-α によって産生される ROS とに深い関連があることが明らかとなってきた⁴⁾。

同じようにデキサメタゾン投与によるインスリン抵抗性出現にも、機序は異なるものの、ROS が関与する。抗酸化物質の投与によってインスリン抵抗性が改善さ

れる可能性も示唆している。すなわち、生理的な状態で産生される ROS が関連するシグナル伝達を、慢性的な酸化ストレスを生じる状態では、過剰な ROS がその機構を阻害すると考えられる。その結果、多くの病的老化が進展するのであろう。

性ホルモンの酸化機構

最近われわれ⁵⁾は、女性ホルモン (エストラジオール、E₂) の酸化能に興味を持って検討を行った。E₂ は基本的には E₂ 受容体に結合して転写因子として遺伝子発現を調節する。微量の E₂ を予め投与しておいた心筋細胞では、ROS に反応して抗アポトーシス因子である Akt の活性が上昇し、E₂ の細胞保護効果が認められた。

□□□文 献□□□

1) 山形昌一 編: 酸化ストレスとナニゲーター、メテノカルピビユー社、東京、2005. 2) Dhalla NS, et al.: J Cardiovasc Pharmacol Ther 11: 31, 2006. 3) Murata H, et al.: J Biol Chem 278: 50226, 2003. 4) Houtis N, et al.: Nature 440: 944, 2006. 5) Umeta Y, et al.: J Biol Chem 281: 13092, 2006.

1. COPD Pathogenesis from the Viewpoint of Risk Factors

Shinji Teramoto

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by irreversible airflow limitation in the lungs. Smoking is one of the amongst major risk factors for the development of COPD. Environmental pollution, age, and airway hyperreactivity are also the risk factors. The protease-antiprotease imbalance and the oxidant-antioxidant imbalance cause airway inflammation and destruction. The genes related to these balances may contribute to development of COPD pathology. Candidate gene-association studies and linkage analyses have been reported for COPD patients. The alpha-1 antitrypsin, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase, and matrix metalloproteinase, are candidate genes. In acquired factors for COPD pathology, the adenoviral latent infection may enhance airway inflammation, leading to airflow obstruction. The current progress and future visions of genetic predisposition of COPD are discussed.

Key words: Smoking, protease-antiprotease imbalance, oxidant-antioxidant imbalance, Gene-Association Studies, adenoviral latent infection may

(DOI: 10.2169/internalmedicine.46.1775)

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by irreversible airflow limitation in the lungs. Although COPD was the 12th largest disease burden in the world in 1990, it is estimated that it will rise to be the fifth largest disease burden by 2020 (1-4). The most important risk factor for the development of COPD is smoking (Fig. 1). However, only 10-20% of chronic heavy smokers develop symptomatic COPD, which indicates that a difference in susceptibility to tobacco smoke injury must exist and may be related to genetic factors (Fig. 2). Candidate gene-association studies and linkage analyses have been reported for COPD patients. We summarized the evidence for the role of the candidate genes in the pathological processes associated with COPD. This review describes the genetic predisposition of COPD. The current progress and future visions of genetic predisposition of COPD are further addressed.

1) Background and Risk Factors of Development of COOD

Chronic tobacco smoking is the major risk factor for the development of COPD, but only a relatively small propor-

tion of smokers actually develop airway obstruction. Although there is a dose-response relationship between FEV1 and the extent of cigarette smoking, smoking history accounts for only approximately 15% of the variation in lung function. That is why the genetic predisposition of COPD may exist in smokers. Although cigarette smoking is the most important risk factor for the development of COPD, allergic airway inflammation, long-standing asthma, air pollutants, and diesel exhaust particles may also cause irreversible airflow limitation such as COPD. Environmental pollution, age, and airway hyperreactivity are also the risk factors. Destruction of the lung parenchyma leads to the loss of alveolar attachments to the small airways and decreases lung elastic recoil (Fig. 1).

2) Candidate Gene-Association Studies for the Development of COPD

a) The genes related to the protease-antiprotease imbalances

There are two major hypotheses on the cause of COPD and emphysema, such as the protease-antiprotease hypothesis and the oxidant-antioxidant hypothesis (5, 6). It is well known that the Z alpha (1)—antitrypsin homozygote is predisposed to developing early onset basal, panacinar emphy-

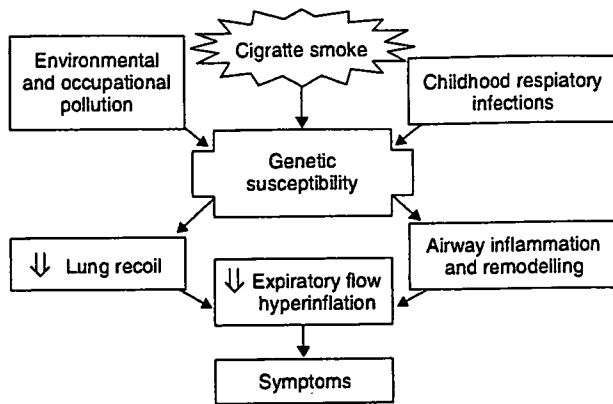


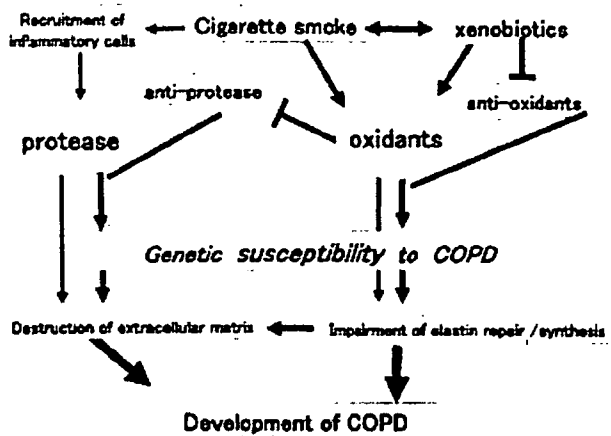
Figure 1. The risk factors for the development of COPD.

sema (7). In patients with the secretory defect of alpha (1)—antitrypsin, the lung tissue is under uncontrolled proteolytic attack from neutrophil elastase, culminating in alveolar destruction (8-12). The mouse metalloelastase knock-out studies implicate this enzyme as a key mediator in the pathology associated with cigarette smoke-induced emphysema (13, 14). There is also associative evidence from human genetic and animal studies suggesting a pathological link with other MMPs. The polymorphism of alpha-1-antichymotrypsin (AACT) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) gene polymorphisms may be associated with individual susceptibility to the development of COPD. The AACT/Ala-15 genotype may be less protective against smoking injury.

b) The genes related to the oxidant-antioxidant imbalance

Oxidative stress is believed to play an important role in the pathogenesis of smoking-induced COPD. The second hypothesis is the oxidant-antioxidant theory, which proposes that oxidant stress and reactive oxygen species (ROS), resulting from an oxidant/antioxidant imbalance, have important consequences for the pathogenesis of COPD. These include oxidative inactivation of antiproteases, alveolar epithelial injury, increased sequestration of neutrophils in the pulmonary microvasculature, and gene expression of proinflammatory mediators. Several studies have provided supportive evidence of a role for reactive oxygen species (ROS) released from circulating neutrophils and the development of airflow limitation. Thus, the presence of oxidative stress may have important consequences for the pathogenesis of COPD. Number of studies have been done on the identification of genes that predispose to the development of COPD.

Heme oxygenase-1 (HO-1) plays a protective role as an antioxidant in the lung. The length of the (GT)_n repeat in the 5'-flanking region of human HO-1 gene polymorphism is associated with susceptibility to COPD (15). The polymorphisms of antioxidant genes glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and GSTP1 are reported to be associated with susceptibility to an accelerated decline of lung function in smokers (16, 17).



Teramoto S et al. Xenobiotic enzymes and genetics of COPD. Chest 2005 ; 127 : 408-409

Figure 2. Hypothesis of genetic susceptibility to COPD (6).

c) Xenobiotic enzymes and genetics of COPD

Each puff of a cigarette contains 10^{17} free radicals and about 4000 substrates including carcinogenic agents and other possible causative agents of COPD such as volatile aldehydes and hydrogen cyanide. Thus, defects in the detoxification of these reactive species may predispose smokers to airflow obstruction and emphysema. It has been suggested that genetic polymorphisms of cytochrome P450, microsomal epoxide hydrolase (mEPHX) are associated with emphysema or COPD (18-20). The genetic polymorphism of exon 5 of smokers with glutathione S-transferase P1 (GSTP1) is associated with the development of COPD in smokers (3). There is growing evidence for the role of xenobiotics and antioxidant imbalance in the pathogenesis of airflow obstruction, which is supported by association studies between COPD and variants in epoxide hydrolase and GSTs that detoxify free radicals and other tobacco products (10-14).

d) Other genes associated with the genetic predisposition to COPD

Because airway obstruction is due to both loss of lung elastic recoil and inflammatory narrowing of peripheral airways, genetic polymorphisms that affect either process could be involved. It has been suggested that genetic polymorphisms of tumour necrosis factor- α , interleukin-13 (IL-13) gene promoter, and Vitamin D binding protein gene are associated with emphysema or COPD (21-23).

3) The Pathologic Relationship between Respiratory Illness in Childhood and Chronic Air-Flow Obstruction in Adulthood. —Adenoviral Latent Infection Thyptohesis—

It has been suggested that respiratory illness in childhood might cause chronic air-flow obstruction in adulthood. Hogg

JC and colleagues have suggested an association between latent adenoviral infection with expression of the adenoviral E1A gene and COPD (24, 25). The present study focuses on how the adenoviral E1A gene could alter expression of growth factors by human bronchial epithelial (HBE) cells. The data show that connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor (TGF)-beta 1 mRNA and protein expression were upregulated in E1A-positive HBE cells. The latent infection of epithelial cells by adenovirus E1A could contribute to airway remodeling in COPD by the viral E1A gene, inducing TGF-beta 1 and CTGF expression and shifting cells to a more mesenchymal phenotype.

Conclusion and Implication

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the collective term describing two separate chronic lung disease diseases: emphysema and chronic bronchitis. Results of many studies have suggested that the genetic susceptibility to COPD is dependent on the action of several gene polymorphisms operating in concert. Polymorphisms in an individual gene may impart only a small relative risk of COPD, and it is likely that the cumulative effect of many polymorphisms will be important in its pathogenesis. Before these associations are generally accepted, they must be subjected to scrutiny with further association studies in terms of ethnicity and COPD phenotypes.

Acknowledgements: This work was supported by a grant from Mitsui Life Social Welfare Foundation.

References

- Murray CJL, Lopez AD. Evidence-Based Health Policy-Lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274: 740-743, 1996.
- Teramoto S, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Matsuse T, Ouchi Y. Global burden of COPD in Japan and Asia. *Lancet* 362: 1764-1765, 2003.
- Sandford AJ, Weir TD, Pare PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 10: 1380-1391, 1997.
- Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 364: 613-620, 2004.
- Molfini NA. Genetics of COPD. *Chest* 125: 1929-1940, 2004.
- Teramoto S, Ishii T, Yamamoto H, et al. Xenobiotic enzymes and genetics of COPD. *Chest* 127: 408-409, 2005.
- Falk GA, Briscoe WA. Alpha-1-antitrypsin deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 72: 427-429, 1970.
- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, et al. Association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 30: 543-548, 2000.
- Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 11: 569-576, 2002.
- Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, et al. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 469-473, 2001.
- Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 18: 748-752, 2001.
- Minematsu N, Nakamura H, Tateno H. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 116-119, 2001.
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277: 2002-2004, 1997.
- Foronjy RF, Okada Y, Cole R, D'Armiento J. Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung. *Am J Physiol* 284: L727-L737, 2003.
- Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66: 187-195, 2000.
- He JQ, Ruan J, Connett JE, et al. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 323-328, 2002.
- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 54: 693-696, 1999.
- Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350: 630-633, 1997.
- Koyama H, Geddes DM. Genes, oxidative stress, and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 53 (Suppl): S10-S14, 1998.
- Minematsu N, Nakamura H, Iwata M, et al. Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 58: 623-628, 2003.
- Sakao S, Tatsumi K, Igari H, et al. Association of tumor necrosis factor (alpha) gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 420-422, 2001.
- van der Pouw Kraan TC, Kucukaycan M, Bakker AM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun* 3: 436-439, 2003.
- Schellenberg D, Pare P, Weir T, et al. Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 957-961, 1998.
- Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: S71-S75, 2001.
- Teramoto S, Kume H. The role of nuclear factor-kappa B activation in airway inflammation following adenovirus infection and COPD. *Chest* 119: 1294-1295, 2001.

EFFECTS OF AGE AND SEX ON PLASMA ADRENOMEDULLIN LEVELS IN PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME

To the Editor: It has been recognized that obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is one of the risk factors of cardiovascular disorders, including hypertension, ischemic heart disease, and cerebrovascular diseases.¹⁻³ Although the incidence of sleep apnea increases with age, the pathological roles of OSAS have not been fully established. OSAS-induced hypoxic stress and oxidative stress increase circulating inflammatory mediators, including adhesion molecules, inflammatory cytokines, and high-sensitivity C-reactive protein, leading to hypertension and cardiovascular events.^{4,5} The stress and its related inflammatory molecules are implicated in the production of adrenomedullin (AM), which is a potent endothelial-derived vasodilator.⁶ Circulating AM levels are higher in adults with untreated OSAS than in adults without OSAS.⁷ Because plasma AM is closely correlated with pulse wave velocity and atherosclerosis progression in middle-aged and elderly patients, higher levels of AM may be a surrogate marker for hypertension and the progression of atherosclerosis.⁸ Furthermore, treatment with nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) mostly reversed the higher AM levels in subjects with OSAS. Thus, OSAS treatment may prevent atherosclerosis and cardiovascular events, although circulating AM levels and therapeutic response to OSAS have not been examined in elderly people. Furthermore, female sex hormones increase AM-induced vasodilation by increasing the expression of AM2 receptor components in rats.⁹ Sex may affect circulating AM levels in humans.

Age and sex differences in AM levels in patients with OSAS were examined. Eighty middle-aged (aged 40-60)

and 80 elderly (aged 60) patients were compared with OSAS and 80 middle-aged and 80 elderly age- and body mass index (BMI)-matched subjects without OSAS. The patients had to fulfill the following criteria: absence of renal and renovascular hypertension, systolic blood pressure (BP) greater than 160 mmHg or diastolic BP greater than 95 mmHg, chronic renal and hepatic diseases, and diabetes mellitus. Patients who smoked or had systemic infections at the time of the study or within 4 weeks before the study were excluded. No patients were being treated with antihypertensive agents. These subjects were examined using polysomnography; subjects with an apnea-hypopnea index (AHI) less than five were controls, and those with an AHI of five or greater were determined to have OSAS. To assess OSAS-induced hypoxia quantitatively, the oxyhemoglobin desaturation index (ODI) was used in this study as previously described.⁴ ODI was defined as $ODI = \Sigma(90 - \text{oxygen saturation})/t$, where t is time of desaturation (hours).⁴

Circulating AM levels and sleep study variables were compared. Then 3 months of nCPAP treatment was performed in the patients. Peripheral blood was obtained from the subjects at 7:30 a.m. to 8:00 a.m. before and after the 3 months treatment with nCPAP. The AM was measured using a specific radioimmunoassay.

There were no significant differences in BMI between the patients and controls in each age group, whereas AHI in subjects OSAS was markedly greater than in controls (Table 1). There were no significant differences in BP or metabolic indices. The AHI values in elderly (50.1 ± 3.2 events/h) and middle-aged (51.6 ± 3.0) subjects with OSAS were considerably greater than in age-matched controls (3.8 ± 0.3 and 3.6 ± 0.4 , respectively). There were significant differences in baseline ODI between patients with OSAS and controls, suggesting that the patients with OSAS were exposed to a

Table 1. Circulating Adrenomedullin (AM) Levels and Other Variables in Elderly and Middle-Aged Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS) and Controls

Characteristic	Middle-Aged Subjects with OSAS (n = 80)	Elderly Subjects with OSAS (n = 80)	Middle-Aged Controls (n = 80)	Elderly Controls (n = 80)
	Mean \pm Standard Error			
Age	46.8 \pm 2.2	65.8 \pm 2.2	45.1 \pm 2.2	64.8 \pm 2.1
Body mass index	33.4 \pm 0.9	32.1 \pm 0.9	32.8 \pm 1.1	31.5 \pm 1.1
Systolic blood pressure, mmHg	138.1 \pm 3.7	139.1 \pm 4.7	135.6 \pm 4.1	137.1 \pm 3.7
Diastolic blood pressure, mmHg	82.1 \pm 3.2	80.1 \pm 3.2	78.9 \pm 3.8	78.1 \pm 2.8
Total cholesterol, mg/dL	202.9 \pm 7.9	199.1 \pm 6.9	202.9 \pm 7.9	198.3 \pm 10.8
High-density lipoprotein cholesterol, mg/dL	43.0 \pm 2.2	41.0 \pm 2.1	43.6 \pm 2.3	42.2 \pm 2.1
Triglyceride, mg/dL	144.1 \pm 10.7	137.1 \pm 12.7	140.1 \pm 10.7	132.0 \pm 10.9
Fasting plasma glucose, mg/dL	98.4 \pm 1.3	94.6 \pm 1.3	97.6 \pm 1.4	90.3 \pm 1.1
Hemoglobin A1c, %	5.7 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	5.6 \pm 0.1	5.27 \pm 0.1
Total sleep time, min	368.1 \pm 20.3*	348.1 \pm 20.3*	440.3 \pm 20.9	414.3 \pm 20.9
Apnea-hypopnea index, events/h	51.6 \pm 3.0*	50.1 \pm 3.2*	3.8 \pm 0.3	3.6 \pm 0.4
Lowest oxygen saturation, %	67.2 \pm 2.1*	68.9 \pm 3.0*	95.8 \pm 0.5	94.1 \pm 0.5
Oxyhemoglobin desaturation index	2.45 \pm 0.32*	2.41 \pm 0.36*	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Arousal index/h	42.4 \pm 3.1*	40.2 \pm 2.2*	8.3 \pm 3.1	8.3 \pm 3.1
AM level, pg/mL	49.1 \pm 3.7	51.1 \pm 4.1	24.8 \pm 1.9	25.7 \pm 2.1

Note: There were 40 men and 40 women in each group.

* $P < .001$ versus control group.