

## アルデヒドに起因した生体高分子への影響に関する研究

研究分担者 中村 純 大阪府立大学

### 研究要旨

加熱式および電子タバコのエアロゾルに含まれるカルボニル化合物の健康におよぼす影響についての懸念が広がっている。エアロゾル中のカルボニル化合物やラジカルは呼吸器組織の酸化ストレスを高めることにより内因性カルボニルをさらに増加させる。カルボニル化合物はお互いに結合し新たな化合物ができる場合がある。しかし、その健康への影響はほとんど知られていない。エアロゾルに含まれるカルボニル化合物の中に既知ヒト発癌物質であるホルムアルデヒド (FA) およびアセトアルデヒド (AA) が相当量含まれていることが明らかになっている。FA あるいは AA は脂質過酸化に由来する内因性カルボニルであるマロンジアルデヒド (MDA) と結合することにより 1,4-dihydropyridine (DHP) 型のハイブリッド型付加体を蛋白のリジン側鎖に作ることをこれまでに報告してきた。DHP 型付加体は炎症性反応を引き起こすことが報告されている。過去3年間の本研究により、DHP 型付加体が蛋白質、脂質、および DNA 上のアミノ基に産生されることを明らかにした。さらに DHP 型付加体に対する抗体が生体内に産生されることを明らかにした。また、アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) が組織内の FA の解毒に関与している可能性を示唆する結果をマウスを用いて報告した。日本人の約 50% が ALDH2 の低機能変異体である ALDH2\*2 対立遺伝子を持っており、野生型と比較して ALDH2\*1\*2 (ヘテロ型) から作られる酵素の FA を解毒する機能は著しく低い。低活性型 ALDH2\*2 アレルを持つ人が加熱式および電子タバコのエアロゾルに含まれる高濃度の FA および AA に暴露した場合、野生型アレル (ALDH2\*1\*1) のみを持つ人に比べ FA および AA に起因した呼吸器毒性が強く出る可能性について今後の調査が必要と思われる。

### A. 目的

燃焼タバコ煙あるいは環境中の微粒子の慢性的な暴露が動脈硬化などの生活習慣病の発症に深く関与していることが疫学および実験的に証明されている [1-4]。さらに、機序は未だ不明だが、慢性的な肺の炎症が心血管系疾患を引き起こすことも明らかになってきている [5]。一方、電子タバコと加熱式タバコ製品から産生されるエアロゾル中には従来のタバコ煙よりも変異原性物質を含む毒性物質の生成が少ないと考えられている。しかし、その電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾルから種々のカルボニル化合物が

高濃度に検出されることが報告されている [6]。そのカルボニル化合物には既知ヒト発癌物質であるホルムアルデヒド (FA) およびアセトアルデヒド (AA) が含まれる。これらのカルボニル化合物はプロピレングリコール (PG) およびグリセロール (VG) が加熱されることによって産生される。カルボニル化合物は生体内高分子 (DNA、およびタンパク質など) に直接反応し付加体を形成したり [7]、間接的に酸化ストレスを引き起こしたりすることで毒性を示す。酸化ストレスはさらに脂質過酸化を引き起こし、マロンジアルデヒド (MDA) を含む内因性の反応性アル

デヒドの形成をもたらす。すなわち、電子タバコと加熱式タバコ製品から発生するエアロゾルを吸い込んだ肺にはこのような種々のカルボニル化合物が混在する条件下で炎症などの健康障害が発生すると考えられる。

これまでに、MDA と FA あるいは AA が複雑に反応することによってリジン側鎖にあるアミノ基に抗原性の高い炎症性 1,4-ジヒドロピリジン (DHP) 型の付加体の M2FA あるいは M2AA を作ることを明らかにしてきた [8,9] (図 1)。この DHP 型付加物は、1 分子の FA あるいは AA と 2 分子の MDA がアミノ基と反応することで作られる。そこで我々は、電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾル中に存在する種々のアルデヒドが MDA の存在下でタンパク質、DNA および脂質と反応することで DHP 型付加体を作るか否かを検討した (図 2)。さらに、DHP 型付加体に対する抗体価を測定する方法を確立した。

また、FA の生体内における毒性学的影響に及ぼすアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) の重要性に関してノースカロライナ大学 (米国) と共同研究を実施した。ALDH2 の主たる基質はアルコール飲料に含まれるエタノールが代謝される時に大量に産生される AA である。ALDH2 はその AA を酢酸塩に代謝、無害化する。ALDH2 には、一塩基多型 (ALDH2\*2) が存在し、特に日本を含めた東アジア諸国の人口の約 50% で不活性型の ALDH2\*2 のアレルを持つ人がいる。ALDH2 は試験管内で FA の代謝にも関与していることが報告されていることから、我々は FA の主たる代謝酵素であるアルコール脱水素酵素 5 (Adh5) に加え Aldh2 を共に欠損したマウスを作製し、ALDH2 の FA 代謝の重要性を生体レベルで検討を行った。

FA あるいは AA などのアルデヒド化合物は直接生体高分子と反応する [10]。一方、メタノールあるいはエタノールなどの水酸基を持つ化合物は生体内でアルコール脱水素酵素 (ADH) により FA あるいは AA などのアルデヒド化合物に変わる。電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾル中に存在するグリシドールはエポキシ

基と水酸基を合わせ持つ化合物である。グリシドールの水酸基も ADH によりアルデヒド基に変換される可能性があり、このタイプの化合物はエポキシ基が存在することより、アルデヒド基が代謝により新たに作られることで 2 官能基性の代謝体が産生され、遺伝毒性が強まる可能性がある。そこで、エポキシ基と水酸基を合わせ持つ化合物の遺伝毒性の新たなメカニズムを理解する目的で、細胞を用いた研究を行った。我々は、モデル化合物として、燃焼タバコ煙および電子タバコと加熱式タバコ製品のエアロゾル中に含まれるブタジエンのエポキシ化代謝体の 1 つである 1,2-dihydroxy-3,4-epoxybutane (EBD) を用いて遺伝毒性の検討を行った。

## B. 方法

ハイブリッド型リジン付加体の精製 : MDA の存在下でリジンアナログであるアミノカプロン酸 (6ACA) とカルボニル化合物 (FA、AA、メチルグリオキサール (MGO)、グリオキサール (GO)、ジアセチルおよびシナムアルデヒド) を生理食塩水中で 37°C、7 日間反応させた。その後、反応物からリジン付加体の精製物および部分精製物を HPLC-ダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いて分離した。DHP 型付加体と思われるピークが検出された場合は最終的にノースカロライナ大学の質量解析研究室にて LC-MS 法を用い質量を解析した。

FA/AA に由来する DHP-DNA 塩基付加体の形成 : FA および AA を 37°C、弱酸性リン酸緩衝液 (pH 5.8) 中で MDA の存在下で、グアニンあるいはアデニンと反応させた。反応液から HPLC-DAD 法を用いいくつかのピークを分離し、UV 吸収スペクトルと蛍光特性の両方から DHP 型付加体および他のハイブリッド型付加体と思われるピークを精製した。さらに上述のようにノースカロライナ大学の質量解析研究室にて質量を解析した。

FA/AA による DHP 型リン脂質付加体の形成 : FA あるいは AA、MDA とエタノールアミン (EA) とを 37°C で PBS 中に反応させた。反応後、DHP-EA を含む

反応液は HPLC-DAD 法を用い、いくつかのピークを分離し、さらに UV 吸収スペクトルと蛍光特性の両方をもとに DHP-EA 付加体と思われるピークを精製した。同様に、FA あるいは AA、MDA とジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とを 37°C でクロロフォルム/水 (1/1) 中にて反応させた。修飾された DPPE は 1 あるいは 10N の塩酸または 1N の水酸化カリウムを用いて加水分解し、EA 付加体を解離させた。また、ホスホリパーゼ D (PL-D) を用いて同様に DPPE から EA 付加体を加水分解させた。その後、上述と同様に HPLC-DAD 法にて DHP-EA を検出した。

付加体を用いた抗原の作製 : AA および FA 由来の DHP 型リジン付加体 (M2AA-6ACA および M2FA-6ACA) を精製後、キャリアー蛋白である牛血清アルブミン (BSA) ないしはキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合させ、さらに透析を行い、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) に用いる抗原を作製した。

リジン付加体抗原を用いた ELISA : DHP 型付加体抗原は一定量 96 穴プレートに固相化し、スキンミルクを用いてブロッキングした後、血清と一晚反応させた。その後、パーオキシダーゼをラベルした二次抗体に反応させ、最後にパーオキシダーゼの基質と反応させ、プレートリーダーで定量を行った。

血清サンプル : 粥状動脈硬化感受性マウスの ApoE 欠損マウスと野生型マウスの血清は米国ノースキャロライナ大学の Xianwen Yi 博士から入手した。マウス実験は、ノースキャロライナ大学動物実験施設の施設内動物管理使用委員会の審査委員会によって承認され実施された。

#### FA に対する感受性と ALDH2 機能 :

我々はマウスを用いて FA 代謝の主要経路と代償経路の両方の遺伝子を欠損させた。すべてのマウス実験は、ノースキャロライナ大学動物実験施設の施設内動物管理使用委員会の審査委員会によって承認され実施された。マウスは、病原体のない、温度および光が制御された動物施設に、12 時間の明/暗サイクルで飼育さ

れ、標準的な餌と水が自由に与えられた。C57BL/6J バックグラウンドの *Aldh2 ko* マウス[11]および *Adh5 ko* マウス[12]を入手した。*Aldh2<sup>-/-</sup>/Adh5<sup>-/-</sup>* マウスを交配することにより、*Aldh2/Adh5* 両遺伝子欠損 (*dko*) マウスの樹立を試みた。

ブタジエンの代謝体の遺伝毒性検出法 : EBD の新たな遺伝毒性のメカニズムを明らかにするため、遺伝子修復酵素を欠損した細胞 (DT40 細胞の変異株) を用いた遺伝毒性検出アッセイを行った [13,14]。浮遊細胞 (ウェルあたり 75 $\mu$ l あたり約 1200 細胞) を 96 穴プレートに播種し、ブタジエン (BD) のエポキシ化代謝物に曝露した。使用した被験物質を滅菌 1XPBS で段階希釈し、細胞に暴露した。被験物質への曝露後、細胞は約 7~8 細胞周期の間培養した。次に、細胞生存率を XTT アッセイで測定した。プレートリーダーを使用した吸光度による LC<sub>50</sub> の定量を行った。GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) を使用して、野生型と DNA 修復欠損変異細胞の LC<sub>50</sub> を比較し、解析を行った。遺伝毒性プロファイルは相対 LC<sub>50</sub> として表した。

#### C. 結果および D. 考察

ハイブリッド型リジン付加体の精製 : カルボニル化合物 (FA, AA, MGO, GO, ジアセチルおよびシナナムアルデヒド) を MDA の存在下で 6ACA と生理食塩水中で 37°C、7 日間反応させ、安定な DHP 型リジン付加体ができるか否かを HPLC-DAD 法で検討した。その結果、AA、FA、MGO 由来の DHP 型リジン付加体 (それぞれ、M2AA、M2FA、M2MGO) が検出および精製された (図 3)。MGO は PG および VG のエアロゾル化に伴って産生される  $\alpha$ -ジカルボニル化合物である [6]。 $\alpha$ -ジカルボニル化合物の中にはバター風味を示すジアセチルが含まれ、ジアセチルは吸入曝露によって有毒な影響を呼吸器にもたらすことが知られている。これまでに、バター風味の蒸気にさらされた電子レンジ用ポップコーン工場の労働者に重症の閉塞性細気管支炎が発症している [15]。最近の研究では、ジアセチルのエアロゾルの吸入がラットに閉塞性細気管支

炎様病変を引き起こすことも実証されている[16]。さらに、ラットにジアセチルを暴露することにより生じる気道上皮壊死は、MGOでも認められ、炭素鎖が短いMGOの方がジアセチルより肺毒性が強いことが報告された[16]。MGOが炎症性のあるDHP型リジン付加体M2MGOを作ることが明らかになったことより、MGOにより作られるM2MGOに起因する呼吸器への影響を理解することが必要と思われる。

FA/AAに由来するDHP-DNA塩基付加体の形成：DHP型付加体はDNAの環外アミノ基にも産生される可能性がある。DHP型の付加体の構成要素であるMDAは単独でグアニン塩基と反応して3環型の付加体(M<sub>1</sub>G)を作ること我々を含むいくつかの研究グループが報告している[17-20]。FAおよびAAもまたDNA塩基の環外アミノ基と反応し、不安定なDNA付加体やDNA-蛋白クロスリンクを作ると報告してきた[7,21,22]。そこで、グアニンあるいはアデニンをMDAの存在下でFAあるいはAAと反応させた後にHPLC-DADで精製し、LC-MSで質量解析を行った。実験はDHP型付加体が産生されやすい弱酸性環境で反応を行った。その結果、M2FA-アデニン(図4および図5)およびM2AA-グアニン付加体(図6)が産生されることが明らかになった。しかし、今回の質量解析において検出されたM2AA-グアニン付加体はDHP型付加体M2AA-グアニンIIなのか3環型付加体M2AA-グアニンI(図6)なのかを区別することはできなかった。また、DHP型付加体以外にもハイブリッド型の付加体としてM1FA-グアニン(図7)およびM1AA-グアニン付加体(図8)が検出された。これらDHP型塩基付加体および3環型の塩基付加体は生理的条件下でかなり安定と考えられる。今後、中性環境下でこれらの塩基付加体が産生されるかを検討する必要がある。

FA/AAによるDHP型リン脂質付加体の形成：反応性が高いアルデヒドの4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)がホスファチジルエタノールアミン(PE)などのアミノリン脂質(図2)の求核部位に共有結合

する結果生ずる付加体について最近報告されている[23]。しかし、その病態生理学的影響はほとんど理解されていない。本研究では、PE分子のアミノ基にもDHP型付加体が産生されるのではないかと考え、まずPEの1つであるDPPEをMDAの存在下でFAあるいはAAと37°Cにて反応させた(図9)。反応液は黄色となり、DHP-リジンの励起波長に近い365nmの波長で蛍光性の物質が検出された。このことから、DHP型の付加体(DHP-DPPE)が産生されている可能性が考えられた。DHP-DPPEからDHPが付加したEAを切り出す方法には、PL-D、強酸あるいは強塩基による加水分解がある(図9)。そこで、EAをMDAの存在下でFAあるいはAAと反応させ、DHP-EAが検出されるかを検討した。生理食塩水を用いてEAをMDAの存在下でFAないしはAAを37°Cにて反応させ、その反応液中にDHP-EAが存在するか否かをHPLC-DAD法を用いて検討した。その結果、UV吸光度スペクトラムをもとにM2FA-EAおよびM2AA-EAと考えられるピークが検出された。さらに、365nmの波長で蛍光性が検出されたことから、M2FA-EAおよびM2AA-EAがそれぞれ分離されたものと考えられた。

DHP-EAは強酸にはある程度の安定性を示したが、強塩基によって不安定な性状が確認できた。そこで、DHP-DPPEからのDHP-EAの解離反応にはPL-Dによる酵素反応あるいは強酸による加水分解を用いることとした。次に、M2FA-DPPEおよびM2AA-DPPEをPL-D処理あるいは強酸処理した後、その反応液をHPLCによる分析にかけた。その結果、精製されたM2FA-EAおよびM2AA-EAのピークと同じ保持時間にピークを検出できた。これらの結果より、加水分解処理により、DHP-PEからDHP-EAが切断されることが明らかになった(図10)。今後さらに検討を加え、定量的な解析ができるよう研究を行う。

ハイブリッド型リジン付加体に対する抗体価の上昇と動脈硬化：タバコ煙あるいは環境中の微粒子をApoE欠損マウスに吸入暴露させることで粥状動脈硬化が悪化することが報告されている[24,25]。ApoE

欠損マウスを用いてタバコ煙と加熱式タバコのエアロゾルの粥状動脈硬化への影響を比較した結果も報告されている[26]。この様に ApoE 欠損マウスは環境中の大気汚染物質の動脈硬化への影響を明らかにするために頻繁に使われている疾患モデル動物である。我々はこれまでに、ApoE 欠損マウスの3か月齢の血液中に M2AA および M2FA に対する IgG および IgM 抗体が動脈硬化発症時に上昇することを明らかにした[8,9]。本研究では、3から5か月齢の野生型マウスおよび ApoE 欠損マウスの血液中の抗 M2AA 抗体 (IgG、IgM、IgG1、IgG2a) を調べた。その結果、IgG、IgM、IgG1、IgG2a の抗体価は特に3から4か月齢において ApoE 欠損マウスの血清中において上昇していることが明らかになった (図 11)。抗 M2AA 抗体および抗 M2FA 抗体の測定は、マウスのみならず、ラットおよびヒトの検体についても確立に成功しており、今後臨床サンプルを使ったヒトにおける影響について検討する予定である。

**FA に対する感受性と ALDH2 機能 :** FA の生体内における毒性学的影響に及ぼす ALDH2 の重要性に関してノースカロライナ大学 (米国) とマウスを用いて共同研究を実施し、その結果を報告した[27]。FA の主たる代謝酵素である Adh5 に加えバックアップ酵素と考えられる Aldh2 を共に欠損したマウスを作製し、ALDH2 の FA 代謝の重要性を生体レベルで検討を行った。その結果、Adh5 および Aldh2 をともに欠損したマウスは離乳前にほぼ前例死に至ることが明らかになり、動物体内に存在する FA の解毒に Aldh2 が関与していることが強く示唆された[27]。最近の研究によって、ヒトでもこの2遺伝子が機能的に変異した場合、骨髄障害、白血病、精神疾患を伴う重篤な遺伝子疾患が生じることが明らかになった[28-30]。これらの新たな情報から、ヒトが高濃度の FA に暴露された場合、ALDH2 の不活性型遺伝子多型 (ALDH2\*2) を持つヒトは活性型遺伝子 (ALDH2\*1) のみを持つヒトに比べて FA に対する感受性が高くなる可能性があることが考えられた (図 12)。今後、ALDH2\*2 アレルを持つ人が電子タバコな

いは加熱式タバコのエアロゾルに暴露された場合の健康への影響を注意して解析する必要があると考える。

**エポキシ基と水酸基の両方持つ化合物の遺伝毒性のメカニズムの解明 :** ブタジエン (BD) は加熱式タバコのエアロゾルなどにも含まれるヒトの既知発癌性物質である。BD は二つの炭素-炭素二重結合をもつ化合物である (図 13)。ヒトでは、主として CYP2E1 などによって1つの炭素-炭素二重結合がエポキシ化されて、さらにミクロゾームエポキシドヒドロラーゼ (mEH) によって加水分解される。さらに、CYP2E1 などによって、もう一つ炭素-炭素二重結合がエポキシ化されることでエポキシ基と水酸基の両方持つ 3,4-epoxybutan-1,2-diol (EBD) を生成する。我々は、この1官能基 (エポキシ基) 化合物である EBD が2官能基様のクロスリンク型の遺伝毒性を引き起こすことを最近報告した[31]。EBD はヒトの体内で他の BD 由来のエポキシ化代謝体と比べて最も弱い遺伝毒性をもつと報告されている。その一方で、EBD は最も多量に作られるエポキシ化代謝体と考えられている。本研究では、EBD を DNA 修復機能を欠落した細胞 (DT40 細胞ミュータント) に暴露したところ、特に DNA 鎖間架橋を修復するファンコニー貧血 (FANC) 関連遺伝子を欠損した細胞に高感受性を示した。このことは EBD が代謝過程において鎖間架橋を作る代謝物に変換される可能性を示唆するものである。EBD に類似した構造のグリシドールはエポキシ基と水酸基の両方持つ化合物である。グリシドールは加熱式タバコや電子タバコの保湿剤の VG が過熱されることによりエアロゾル内に産生される化合物である[6]。このグリシドールはこれまで1官能基化合物と考えられてきているが、EBD と同じように ADH により水酸基がアルデヒドとなることで2官能基化合物になり、遺伝毒性が強い鎖間架橋を引き起こす可能性が考えられる。

## E. 結論

加熱式および電子タバコのエアロゾルには種々のカルボニル化合物が含まれる。そのカルボニル化合物は DNA などの生体内高分子に直接反応し付加体を形成したり、酸化ストレスを引き起こしたりすることで毒性を示す。酸化ストレスはさらに脂質過酸化を引き起こし、MDA を含む内因性の反応性アルデヒドの形成をもたらす。加えて、加熱式および電子タバコのエアロゾル中にはグリシドールなどのエポキシ基と水酸基を持つ化合物があり、体内の代謝によって生体内でアルデヒド基を持つ代謝体に変化する可能性がある。すなわち、電子タバコと加熱式タバコ製品から発生するエアロゾルを吸い込んだ肺にはこのような種々のカルボニル化合物が混在する条件で炎症などの健康障害が発生すると考えられる。本研究において、カルボニル化合物の中でもヒトにおける発癌性が証明されている FA が酸化ストレス下で MDA と反応し DNA、蛋白、および脂質に炎症性のある DHP 型 M2FA 付加体を産生することを明らかにした。さらに、ヒトが高濃度の FA に暴露した場合、ALDH2 の不活性型遺伝子多型 (ALDH2\*2) を持つヒトは活性型遺伝子 (ALDH2\*1) のみを持つヒトに比べて FA に対する感受性が高くなる可能性を示唆する研究結果がマウスを用いた実験で得られた。日本人の約 50% で不活性型の ALDH2\*2 のアレルを持つ人がいることから、今後、電子タバコと加熱式タバコ製品から産生されるペーパー中の FA ないしは AA に対する感受性を ALDH2 の遺伝子多型を踏まえて調査する必要があると考えられる。

#### 引用文献

1. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Smoking in relation to atherosclerosis of the coronary arteries. *N Engl J Med* [Internet]. 1965;273:775–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5829021>
2. Sackett DL, Gibson RW, Bross ID, Pickren JW. Relation between aortic atherosclerosis and the use of cigarettes and alcohol. An autopsy study. *N Engl J Med* [Internet]. 1968;279:1413–20.

Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5722916>

3. Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, et al. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2005;113:201–6. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687058>

4. Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA* [Internet]. 2005;294:3003–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414948>

5. Van Eeden S, Leipsic J, Paul Man SF, Sin DD. The relationship between lung inflammation and cardiovascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012;186:11–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22538803>

6. Uchiyama S, Noguchi M, Sato A, Ishitsuka M, Inaba Y, Kunugita N. Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2020;33:576–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31950825>

7. Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Mar 12];88:102806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32070903>

8. Shimomoto T, Collins LB, Yi X, Holley DW, Zhang Z, Tian X, et al. A purified MAA-based ELISA is a useful tool for determining anti-MAA antibody titer with high sensitivity. *PLoS One*. 2017;
9. Nakamura J, Shimomoto T, Collins LB, Holley DW, Zhang Z, Barbee JM, et al. Evidence that endogenous formaldehyde produces immunogenic and atherogenic adduct epitopes. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2019 Nov 17];7:10787. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2888>

3613

10. Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2020;88:102806.

Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786419303805>

11. Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett* [Internet]. 2000 [cited 2020 Mar 12];476:306–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913633>

12. Yang Z, Wang Z-E, Doulias P-T, Wei W, Ischiropoulos H, Locksley RM, et al. Lymphocyte development requires S-nitrosoglutathione reductase. *J Immunol* [Internet]. The American Association of Immunologists; 2010 [cited 2020 Mar 12];185:6664–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980633>

13. Ridpath JR, Takeda S, Swenberg JA, Nakamura J. Convenient, multi-well plate-based DNA damage response analysis using DT40 mutants is applicable to a high-throughput genotoxicity assay with characterization of modes of action. *Environ Mol Mutagen. Environ Mol Mutagen*; 2011;52:153–60.

14. Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, Sonoda E, Arakawa H, et al. Cells deficient in the FANCD/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res.* 2007;67:11117–22.

15. Kreiss K, Gomaa A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 [cited 2020 Apr 17];347:330–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151470>

16. Hubbs AF, Kreiss K, Cummings KJ, Fluharty KL, O'Connell R, Cole A, et al. Flavorings-Related Lung Disease: A Brief Review and New Mechanistic Data. *Toxicol Pathol* [Internet]. SAGE

Publications Inc.; 2019 [cited 2020 Apr 17];47:1012–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31645208>

17. Basu AK, O'Hara SM, Valladier P, Stone K, Mols O, Marnett LJ. Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 1988 [cited 2020 Apr 17];1:53–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2979712>

18. Jeong Y-C, Sangaiah R, Nakamura J, Pachkowski BF, Ranasinghe A, Gold A, et al. Analysis of M1G-dR in DNA by aldehyde reactive probe labeling and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2005 [cited 2019 Nov 17];18:51–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15651849>

19. Mao H, Schnetz-Boutaud NC, Weisenseel JP, Marnett LJ, Stone MP. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 [cited 2019 Nov 19];96:6615–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359760>

20. Jeong Y-C, Nakamura J, Upton PB, Swenberg JA. Pyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 [cited 2020 Apr 17];33:6426–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282591>

21. Lu K, Craft S, Nakamura J, Moeller BC, Swenberg JA. Use of LC-MS/MS and stable isotopes to differentiate hydroxymethyl and methyl DNA adducts from formaldehyde and nitrosodimethylamine. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Nov 17];25:664–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22148432>

22. Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, et al. Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment.

- Toxicol Sci [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 19];120 Suppl 1:S130-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163908>
23. Jovanović O, Škulj S, Pohl EE, Vazdar M. Covalent modification of phosphatidylethanolamine by 4-hydroxy-2-nonenal increases sodium permeability across phospholipid bilayer membranes. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2019;143:433-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31461663>
24. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The ApoE(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med* [Internet]. 2016;14:146. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207171>
25. Fetterman JL, Pompilius M, Westbrook DG, Uyeminami D, Brown J, Pinkerton KE, et al. Developmental exposure to second-hand smoke increases adult atherogenesis and alters mitochondrial DNA copy number and deletions in apoE(-/-) mice. *PLoS One* [Internet]. 2013;8:e66835. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825571>
26. Phillips B, Szostak J, Titz B, Schlage WK, Guedj E, Leroy P, et al. A six-month systems toxicology inhalation/cessation study in ApoE-/- mice to investigate cardiovascular and respiratory exposure effects of modified risk tobacco products, CHTP 1.2 and THS 2.2, compared with conventional cigarettes. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;126:113-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30763686>
27. Nakamura J, Holley DW, Kawamoto T, Bultman SJ. The failure of two major formaldehyde catabolism enzymes (ADH5 and ALDH2) leads to partial synthetic lethality in C57BL/6 mice. *Genes Environ* [Internet]. *Genes Environ*; 2020 [cited 2020 Jun 16];42:21. Available from: <https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-020-00160-4>
28. Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, Higasa K, et al. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Sci Adv* [Internet]. 2020;6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33355142>
29. Dingler FA, Wang M, Mu A, Millington CL, Oberbeck N, Watcham S, et al. Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell* [Internet]. 2020;80:996-1012.e9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33147438>
30. Mu A, Hira A, Niwa A, Osawa M, Yoshida K, Mori M, et al. Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency. *Blood* [Internet]. 2021; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33512438>
31. Nakamura J, Carro S, Gold A, Zhang Z. An unexpected butadiene diolepoxide-mediated genotoxicity implies alternative mechanism for 1,3-butadiene carcinogenicity. *Chemosphere* [Internet]. 2021;266:129149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33310515>

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (7 件)

(1) Tian X, Chen Y, Nakamura J. Development of a novel PIG-A gene mutation assay based on a GPI-anchored fluorescent protein sensor. *Genes Environ*. 2019 Dec 10;41:21. PMID: 31867084.

(2) Ridpath JR, Nakamura J. Acid-specific formaldehyde donor is a potential, dual targeting cancer chemotherapeutic/chemo preventive drug for FANC/BRCA-mutant cancer. *Genes Environ*. 2019 Dec 27;41:23. PMID: 31890056.

(3) Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)*. 2020 Apr;88:102806. PMID: 32070903.



(4) Nakamura J, Holley DW, Kawamoto T, Bultman SJ. The failure of two major formaldehyde catabolism enzymes (ADH5 and ALDH2) leads to partial synthetic lethality in C57BL/6 mice. *Genes Environ.* 2020 Jun 3;42:21. PMID: 32514323.

(5) Tian S, Nakamura J, Hiller S, Simington S, Holley DW, Mota R, Willis MS, Bultman SJ, Luft JC, DeSimone JM, Jia Z, Maeda N, Yi X. New insights into immunomodulation via overexpressing lipoic acid synthase as a therapeutic potential to reduce atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2020 Oct-Nov;133-134:106777. PMID: 32750408.

(6) Nakamura J. Potential Doxorubicin-Mediated Dual-Targeting Chemotherapy in FANC/BRCA-Deficient Tumors via Modulation of Cellular Formaldehyde Concentration. *Chem Res Toxicol.* 2020 Oct 19;33(10):2659-2667. PMID: 32876438.

(7) Nakamura J, Carro S, Gold A, Zhang Z. An unexpected butadiene diolepoxide-mediated genotoxicity implies alternative mechanism for 1,3-butadiene carcinogenicity. *Chemosphere.* 2021 Mar;266:129149. PMID: 33310515.

## 2. 学会発表 (5件)

(1) 米国毒性学会 (SOT) 年次総会、J. Nakamura J, Kawanishi M, Okada T, Yagi T, and Kunugita N. Blood Titers of Antibody against Complex Malondialdehyde-Acetaldehyde-Lysine Adducts as a Biomarker for the Very Early Stage of Metabolic Syndromes, Such as Atherosclerosis. March, 2019.

(2) 米国毒性学会 (SOT) 年次総会 (COVID-19 により開催中止) J. Nakamura J, Kawanishi M, Yagi T, Okada T, and Kunugita N. Antigenic, Inflammatory DHP-Lysine Adducts Are Induced by Aldehydes in the Vapor of Both Flavored and Unflavored E-cigarettes and Heated Tobacco Products. March, 2020.

(3) 米国環境変異原学会 (Environmental Mutagenesis & Genomics Society Virtual Annual Meeting) Jun Nakamura, Sujey Carro, Avram, Zhenfa Zhang. Unexpected 3-Butene-1,2-Diol-Mediated Genotoxicity Implies Alternative

Mechanism of 1,3-Butadiene Carcinogenesis. September, 2020.

(4) 日本環境変異原学会年次大会. 中村純, Sujey Carro, Avram Gold, Zhenfa Zhan. エポキシブタンジオールの遺伝毒性の解析により明らかになったブタジエンの新たな発癌メカニズム. 2020年11月.

(5) 日本分子生物学会年会フォーラム (環境因子と生体防御機構をイメージする!). 中村純, ホルムアルデヒド/アセトアルデヒドにより産生される蛍光性付加体と免疫反応. 2020年12月.

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1 電子タバコおよび加熱タバコ由来のエアロゾル中のカルボニル化合物が作る可能性がある DHP-リジン付加体の産生メカニズム

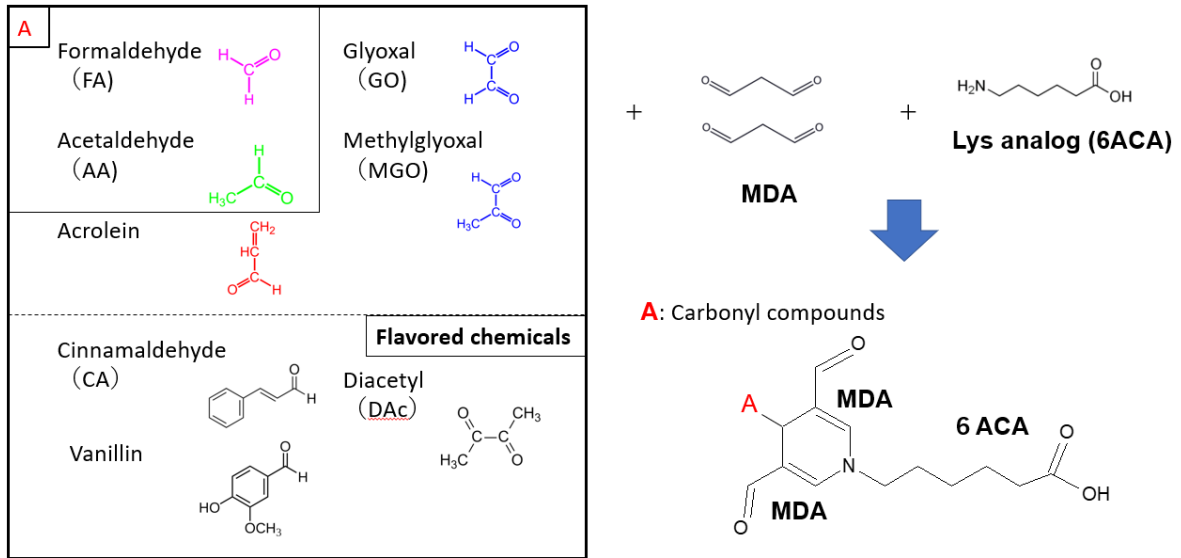
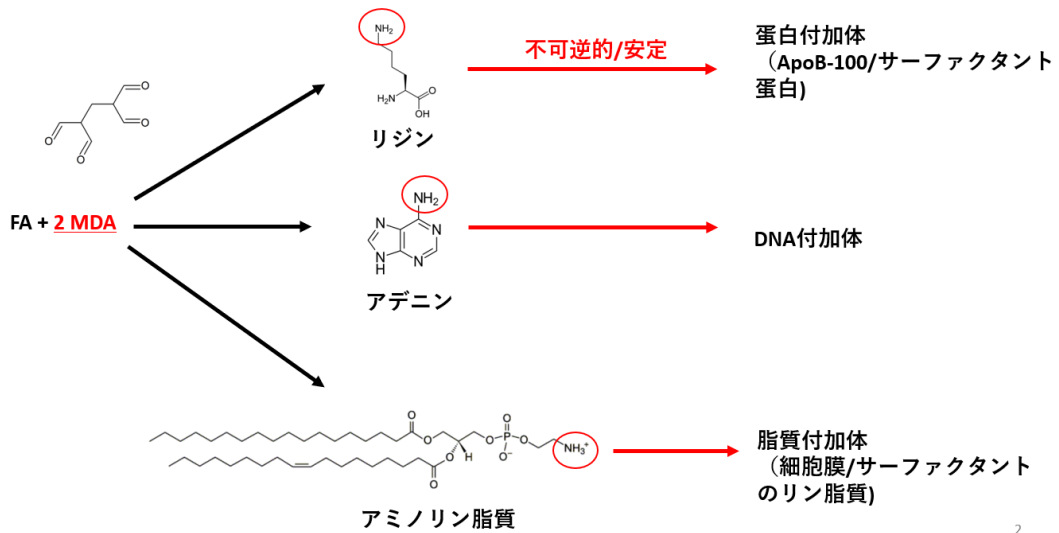


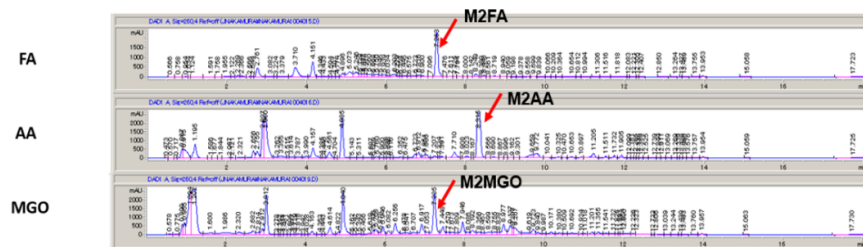
図2 FA と脂質過酸化由来の MDA と生体内高分子との想定される不可逆的反応



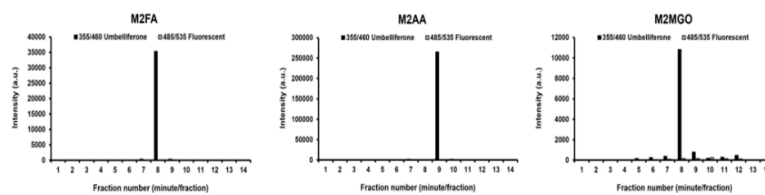
2

図3 M2FA、M2AA、および M2MGO の構造、特徴および HPLC を用いた精製

A. HPLC Purification



B. Fluorescence detection



C. Adduct structure

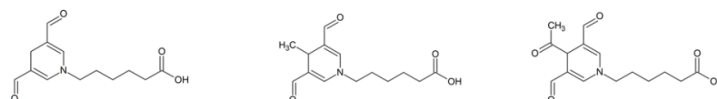


図4 M2FA-アデニン (A) 付加体の産生メカニズム

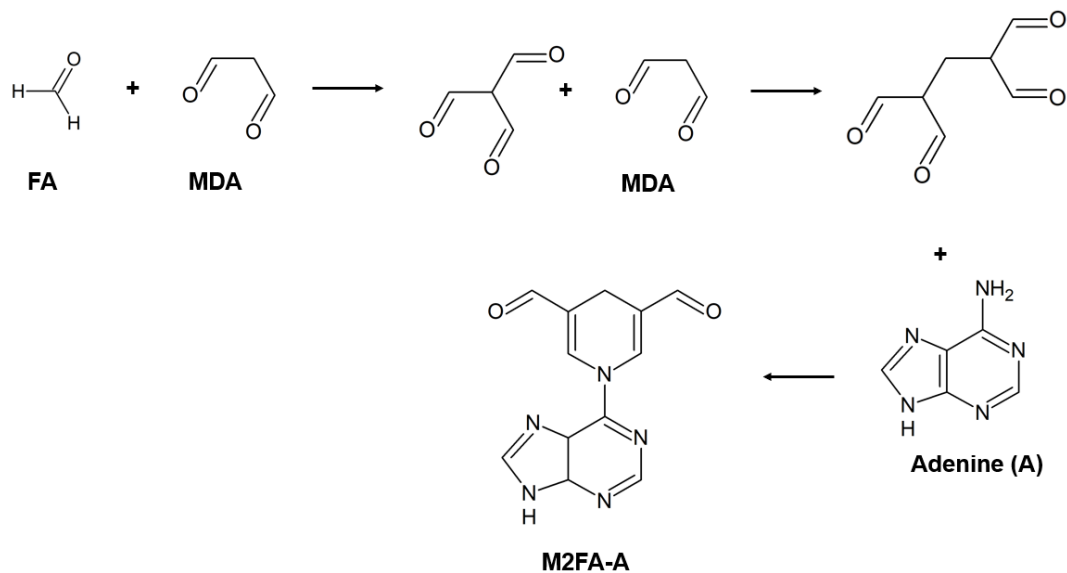


図5 M2FA-Aの質量解析

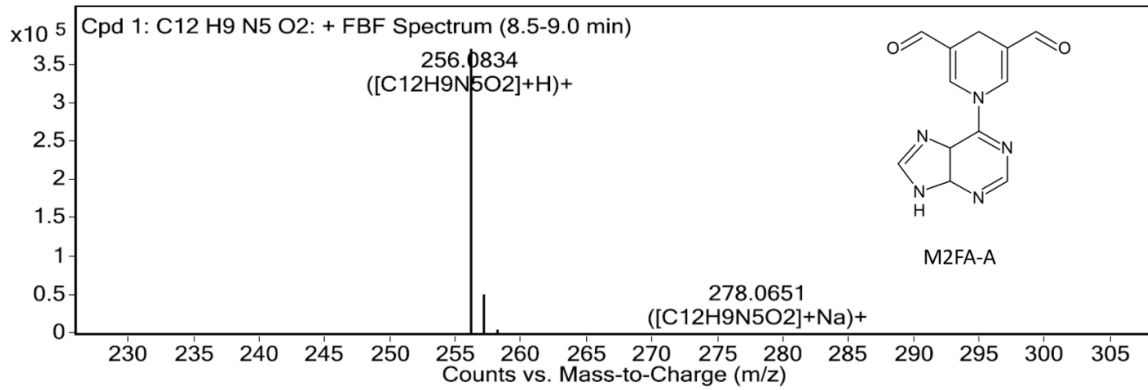


図6 M2AA-GI および M2AA-GII の質量解析

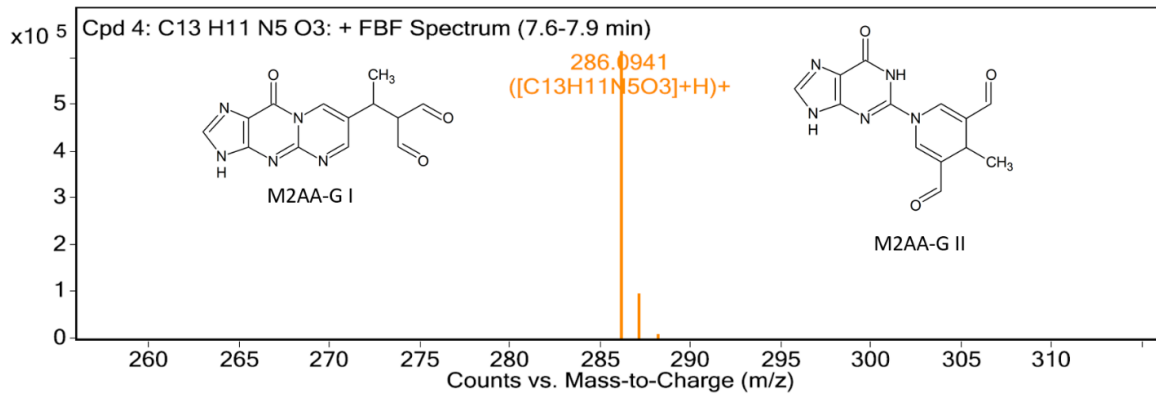


図7 M1FA-Gの質量解析

MS Zoomed Spectrum

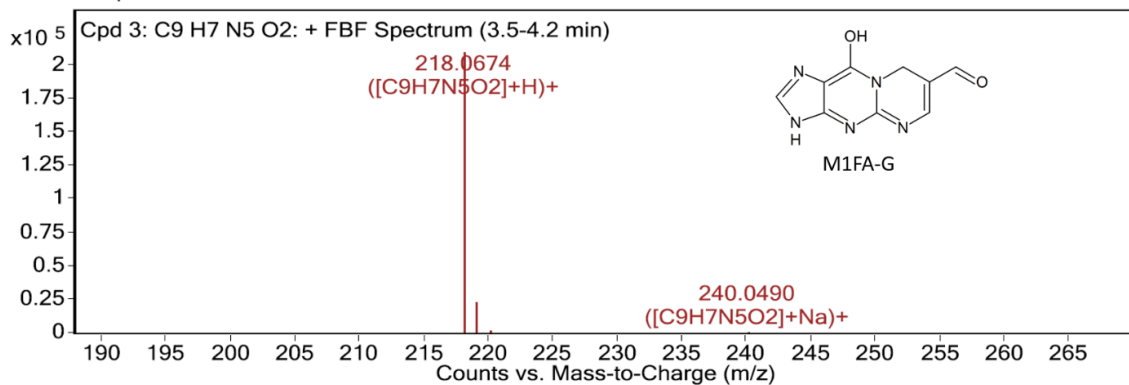


図8 M1AA-Gの質量解析

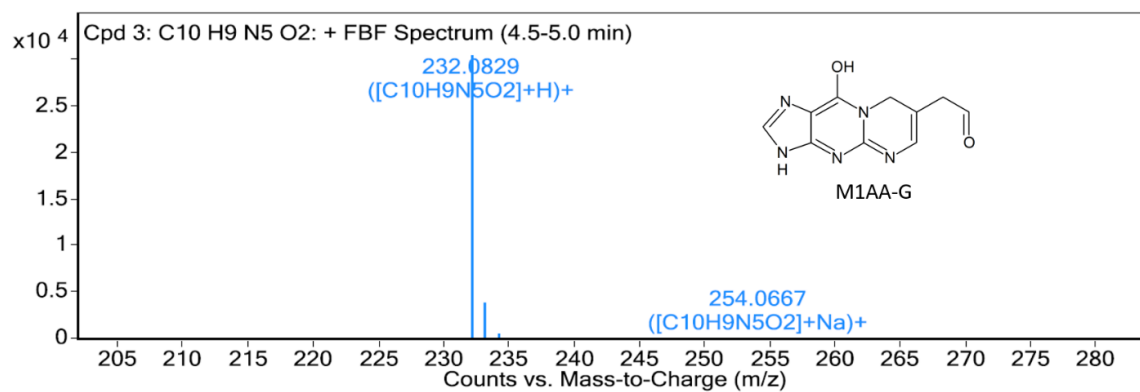


図9 アミノリン脂質に作られる DHP 型付加体

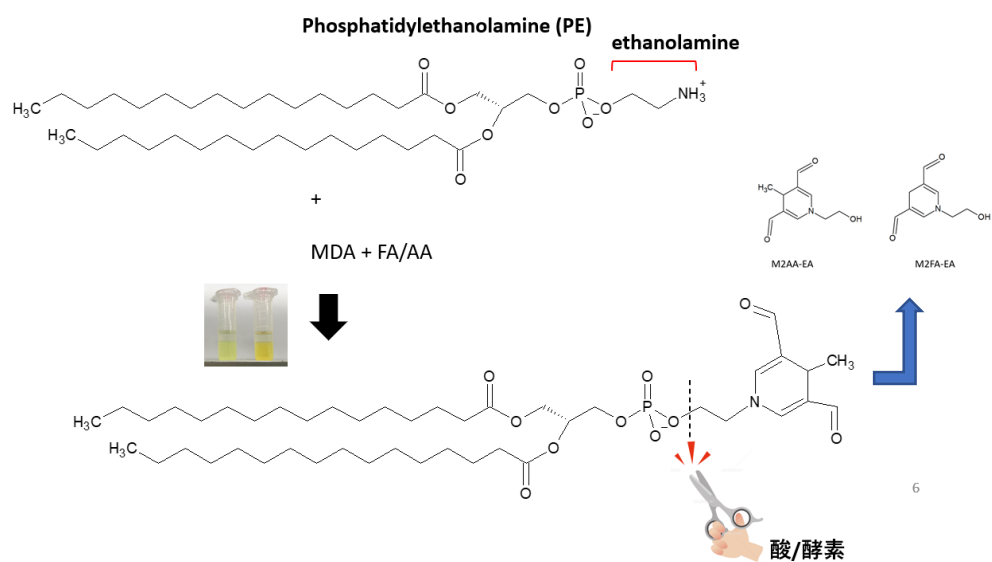


図 1 0 精製された M2FA-EA と M2FA-DPPE から加水分解された M2FA-EA

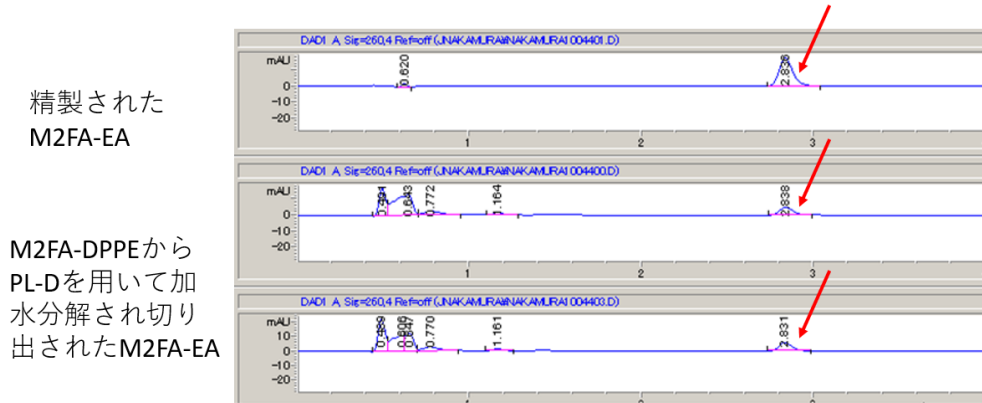
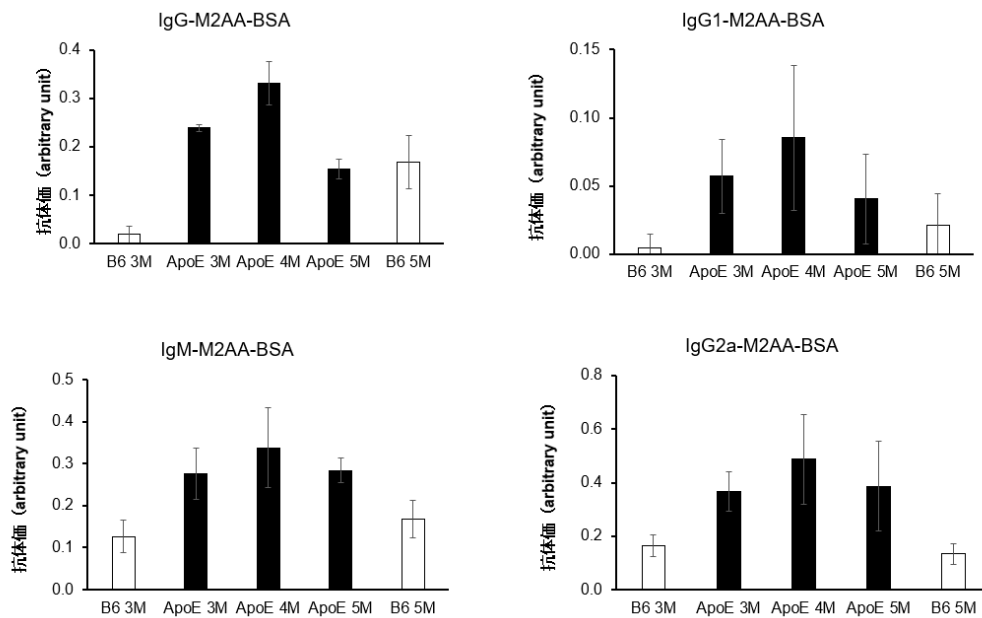
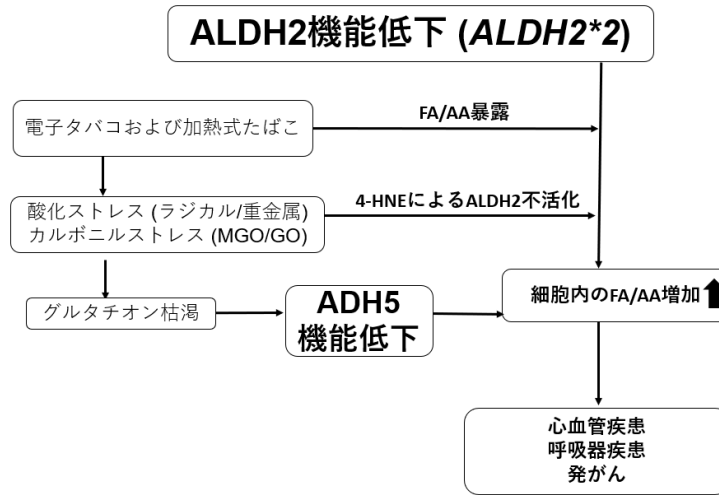


図 1 1 ApoE 欠損マウス (ApoE) と野生型マウス (C57/B6) の抗 M2AA 抗体価 (IgG、IgM、IgG1、および IgG2)



注) 3 M : 3 か月齢 ; 4 M : 4 か月齢 ; 5 M : 5 か月齢

図 1 2 ALDH2 \* 2 対立遺伝子を持つヒトの加熱式たばこに対する感受性 (仮説)



加熱式たばこのエアロゾルに含まれる化合物は ALDH2\*2 アレルを持つ日本人の FA/AA の解毒に大きな負荷をかける。さらに、グルタチオンの枯渇を介した ADH5 の FA 解毒機能低下を引き起こし、細胞内の FA 濃度を増加する可能性がある。

図 1 3 1,3-ブタジエン (BD) の代謝活性化経路および EBD の代謝活性化による鎖間架橋形成の仮説スキーム。

