

博士論文

Adh3 と Keap1-Nrf2 システムの機能的
相互作用による酸化ストレス防御機構

後藤 まき

平成 26 年度提出

東北大学

目次

第 1 章 要約

第 2 章 研究背景

第 3 章 研究目的

第 4 章 研究方法

- (1) 実験動物
- (2) 変異マウス
- (3) 遺伝子型の決定
- (4) 不死化したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) の作成
- (5) グルタチオン定量
- (6) 総グルタチオン (GSx) の半減期測定
- (7) グルコースオキシデースおよびカタラーゼ添加実験

- (8) グルコースオキシデースおよび CDDO-lm 添加実験
- (9) メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与実験
- (1 0) 血液生化学的解析および組織学的解析
- (1 1) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析
- (1 2) ウェスタンブロット法による Adh3 および Nrf2 タンパクの検出
- (1 3) 統計

第 5 章 研究結果

- (1) *Adh3* 欠損により酸化ストレスに対する抵抗性が減弱する
- (2) MCD 食投与実験において、*Adh3* 欠損マウスは野生型マウスより重篤な肝傷害を発症しやすい
- (3) MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスでは、Nrf2 が代償的に細胞保護作用を発揮している
- (4) *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは肝臓のグルタチオンの量が低下しやすい
- (5) Nrf2 の活性化は、*Adh3* 欠損による酸化ストレスに対する防御能低下を代償できる

(6) $Adh3^{-/-};Keap1^{F/-}$ マウスでは肝臓のグルタチオンの量は $Adh3$ 欠損マウス

とほぼ同じレベルである

第 6 章 考察

第 7 章 結論

第 8 章 引用文献

第 9 章 謝辞

図表

第 1 章 要約

Adh3（アルコール脱水素酵素タイプ 3）は大腸菌からヒトに至るまで、最も高度に保存されているアルコール脱水素酵素である。Adh3 はホルムアルデヒドと一酸化窒素をグルタチオン依存的に解毒することが知られている。Adh3 がホルムアルデヒドと一酸化窒素を解毒した結果、グルタチオン（還元型グルタチオンと酸化型グルタチオン）を再生することから、Adh3 がグルタチオンの細胞内濃度維持に貢献することで生体防御の一端を担う、ということが予想されるが、詳細は明らかではない。そこで本研究では、Adh3 の生体防御における貢献をグルタチオン代謝の側面から明らかにすることを目的とした。まず、不死化した MEF（マウス胎児線維芽細胞）を使って細胞内総グルタチオン（還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン）を測定した。すると、野生型 MEF と *Adh3* 欠損 MEF でグルタチオン合成に関連する遺伝子の発現に差はみられないにも関わらず、*Adh3* 欠損 MEF は野生型 MEF に比べて細胞内総グルタチオン濃度が低値であった。細胞内総グルタチオンの半減期を求めたところ、野生型 MEF に比べて *Adh3* 欠損 MEF の細胞内総グルタチオンの半減期は短縮していた。これらの結果から、Adh3 は細胞内グルタチオンの維持に貢献していることがわか

った。そこで、酸化ストレスを負荷したところ、*Adh3* 欠損 MEF は野生型 MEF に比べて酸化ストレスに脆弱であるということがわかった。次に、*Adh3* 欠損 MEF でみられた酸化ストレスへの抵抗性の低下が、マウス個体でも観察されるかどうかを検証するために、酸化ストレスの蓄積とグルタチオンの減少による肝障害をもたらすとされるメチオニン・コリン欠乏（MCD）食を 5 日間、野生型マウスと *Adh3* 欠損マウスに投与した。すると、野生型マウスでは肝障害が認められなかったのに対し、MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで肝障害の発症が認められ、MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスでは、Nrf2 の標的遺伝子の発現上昇が認められた。Nrf2 は生体防御に関連する遺伝子の発現を誘導する強力な転写活性化因子である。その中でも、生体防御因子であるグルタチオンの合成や還元に関連する遺伝子の発現を制御することは、Nrf2 が担う生体防御システムの中でも重要な位置を占めている。MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで、Nrf2 の標的遺伝子の発現が上昇していたことから、MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで Nrf2 が保護的に作用しているのではないかと予想し、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスを作成し同様に MCD 食を 5 日間投与した。すると、MCD 食を投与した *Nrf2* 欠損マウスでは肝障害が認められなかったのに対し、MCD 食を投

与した *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは *Adh3* 欠損マウスと比べて、重篤な肝障害が認められた。さらに、*Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}*マウスを作成し、*Adh3* 欠損状態で *Nrf2* を安定化させ、MCD 食を 5 日間投与したところ MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで認められた肝障害が緩和した。以上の結果から、*Adh3* は *Nrf2* と協調的に酸化ストレスに対する生体防御に貢献することがわかった。*Nrf2* はグルタチオンの産生と還元を促進し、*Adh3* がそのリサイクルを通して効率的な使用を可能にしているものと考えられる。

第2章 研究背景

生体防御は大きく二つに分けられる。一つは下等な生物から保存されてきた恒常的な生体防御システムであり、もう一つは生物が進化の過程で比較的新たに獲得した非恒常的な刺激誘導性の生体防御システムである。

恒常的防御システムのひとつであるアルコール脱水素酵素ファミリーは 1~7 まで存在しているが、Adh3（アルコール脱水素酵素タイプ 3）はその中でも、生命の長い歴史の中で、古くは大腸菌からヒトにいたるまでもっともよく保存されている。Adh3 はグルタチオン依存性にホルムアルデヒドと一酸化窒素を解毒する (Fig. 1A)。グルタチオンとホルムアルデヒドもしくは一酸化窒素は非酵素的に結合し、それぞれヒドロキシメチルグルタチオン (HMGS) もしくは S-ニトロソグルタチオン (GSNO) になる。その後 Adh3 によってヒドロキシメチルグルタチオンは最終的にギ酸と還元型グルタチオン (GS) に、S-ニトロソグルタチオンはヒドロキシアミン (NH_2OH) と酸化型グルタチオン (GSOG) に代謝される。

Adh3 は、コードする遺伝子名が *Adh5* であることから、Adh5 と呼ばれることもあり、また、その酵素活性に着目して GSNO (S-nitrosoglutathione

reductase) や、FDH (Formaldehyde dehydrogenase) とも呼ばれている。

これまで *Adh3* は GSNOR として多く報告されてきた。*Adh3* 欠損マウスでは一酸化窒素の供給源である S-ニトロソグルタチオンが体内に蓄積していることから、S-ニトロソチオール産生が上昇する。LPS 投与によるニトロ化ストレスの負荷では、*Adh3* 欠損マウスは産生されたニトロソチオールを代謝できないため、感受性が高くなる (Liu et al., 2004)。また、*Adh3* 欠損マウスでは S-ニトロソグルタチオンの蓄積により DNA 修復タンパク質である AGT の S-ニトロシル化が促進され、プロテアソーム系での分解が促進されることにより、DNA 修復能が低下することが考えられ、実際ニトロ化ストレスであるジエチルニトロサミンによる DNA 損傷に対して感受性が高い (Wei et al., 2010)。一方、S-ニトロソチオールが減少することで病態が悪化する気管支喘息においては、*Adh3* 欠損によって S-ニトロソチオールが補われるため、*Adh3* 欠損マウスは野生型と比較して症状が軽くなる (Que et al., 2005)。また、S-ニトロソグルタチオンは、転写因子 Hif-1 α を S-ニトロシル化し、Hif1- α による VEGF の遺伝子の結合を促進して、血管新生と心筋保護をもたらすことから、*Adh3* の欠損は、心筋梗塞にとって有利に作用する (Lima et al., 2009)。

また、Adh3 はホルムアルデヒドを解毒する酵素でもあるため、*Adh3* 欠損マウスはホルムアルデヒドに対して高感受性である (Deltour et al., 1999)。ホルムアルデヒドの作用により、DNA にクロスリンク障害が発生するが、近年ニワトリの DT40 細胞での解析により、*Adh3* の欠損と DNA のクロスリンク障害の修復因子の欠損とが合成致死の関係にあることが示された (Rosado et al., 2011)。これは *Adh3* が欠損した状態では DNA クロスリンク障害の修復機構が極めて重要であることを意味しており、Adh3 は内因性に生じるホルムアルデヒドを解毒し、遺伝毒性からの防御に貢献しているということを示唆している。

Keap1-Nrf2 システムはショウジョウバエ以降の生物が獲得した誘導的な生態防御システムである。Nrf2 (NF-E2 related factor 2) は酸化ストレスや親電子性物質に対して応答し、生体防御に必要な遺伝子の発現発現を誘導する強力な転写因子である (Fig. 1B)。通常の状態では、Nrf2 は分子内の保存された Neh2 ドメインを介して、細胞質内に局在する Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) に捕捉され、ユビキチン-プロテアソーム系によりすみやかに分解される。しかし酸化ストレスを受けると Keap1 による Nrf2 の機能阻害は解除され、分解を免れて安定した Nrf2 は核へ移行、蓄積する。Nrf2 は塩基性領域ロイシンジッ

パー（b-ZIP）構造をもち、同じ b-ZIP 型転写因子である小 Maf 群因子（MafK、MafF、MafG）のいずれかとヘテロ二量体を形成して ARE/EqRE 領域に結合し、転写レベルにおける解毒酵素群や抗酸化酵素群遺伝子の発現を誘導する。その中でも、グルタチオンの合成と還元に関連する遺伝子の発現を誘導することは、Nrf2 が制御する生体防御システムでも重要な位置を占めている。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸からなるトリペプチドであり、生体内の酸化還元バランスの調整やグルタチオン抱合による化学物質の解毒などを行う生体防御に必須の因子である。

酸化ストレスの蓄積は様々な疾患の原因や増悪因子となる。体内に酸化ストレスの蓄積が原因で発症、進行する疾患として、動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病などがあり（Harada et al., 2012、Urano et al., 2013）、口腔領域においては飲酒や喫煙がリスクファクターとなる口腔がんや歯周病に関わっていることが考えられる（Blot et al., 1998）。また、歯周病の危険因子である糖尿病は、酸化ストレスによって悪化することから、酸化ストレスは口腔内疾患に直接的かつ間接的に関わっていることが考えられるため、酸化ストレスの制御はこれらの疾患の予防および治療を行う上で重要な位置を占めている。そこで、本研究では、

Adh3 と Keap1-Nrf2 システムに着目して酸化ストレスからの生体防御機構の一端を解明することを目指した。

Adh3 の欠損による一酸化窒素の保護作用の報告が多くされているため、*Adh3* は阻害した方が生体にとって有利であるとも考えられている。しかし、先にも述べたように生物種を超えて太古から保存されてきたことや、生体の組織中でも幅広く発現していることから、*Adh3* はホルムアルデヒドや一酸化窒素の解毒にとどまらない、生体にとって重要な機能を持った酵素なのではないかと考えた。また、恒常的防御システムと考えられる *Adh3* と、刺激誘導性防御システムである Keap1-Nrf2 システムの機能的相互関係を明らかにしたいと考えた。*Adh3* はホルムアルデヒドもしくは一酸化窒素を代謝し、その結果グルタチオンの再生をもたらすことで生体防御に貢献していることが予想されるが、これまでに明らかにされていない。そこで、*Adh3* がグルタチオンの再生をもたらすことで、グルタチオン合成と還元を担う Nrf2 と協力的に酸化ストレスに対する生体防御に関わっている、という仮説を立て、研究を進めた。

第3章 研究目的

本研究では、Adh3 の生体内グルタチオン維持における貢献と、酸化ストレス防御において果たす役割を、Keap1-Nrf2 制御系との機能的な相互作用の視点から明らかにすることを目的とした。

第4章 研究方法

(1) 実験動物

実験用マウスは12時間の明暗周期で飼育されている。全てのマウスは特定病原体除去下で飼育を行い、東北大学遺伝子組み換え実験安全専門委員会および動物実験専門委員会の承認を得て、さらに文部科学省および環境省が定める、実験動物の指針および動物愛護と管理に関する法律に則り、実験を行った。

(2) 変異マウス

Adh3 欠損マウスは、Deltour らが作成したマウスを、日本医科大学長谷場健先生より分与いただいた。同マウスでは *Adh3* の遺伝子座のエクソン 1~4 が削除され、代わりに PGK-neo が挿入されている (Deltour et al., 1999)。

Nrf2 欠損マウスでは、*Nrf2* の遺伝子座のエクソン 5 を含む 1.2kb の領域が削除され、代わりに lac-Z が挿入されている (Itoh et al., 1997)。

Keap1 欠損マウス (*Keap1*^{-/-})では、*Keap1* の 8~204 のアミノ酸残基をコードする領域に NSL タグ付き lac-Z が挿入されている (Wakabayashi et al., 2003)。

条件付き *Keap1* 欠損マウス (*Keap1*^{F/F})では、*Keap1* の遺伝子座のイントロン

3 に LoxP が挿入されており、ターミナルエクソンの下流に Neo cassette が挿入されている (Okawa et al., 2006)。なお、*Keap1*^{Flox} はノックダウン Allele であることが後に報告された (Taguchi et al., 2010)。本実験では、*Keap1*^{F/-} マウスは *Keap1* の発現が通常の 5% 程度であるため、*Keap1* のノックダウンマウスとして使用した。

(3) 遺伝子型の決定

実験用マウスの遺伝子型は、PCR 法により DNA の特定の領域を増幅し、電気泳動により遺伝子型を決定した。以下にプライマーの配列を示す。

Adh3 欠損マウス

Adh3 wild type

intron4 F2: TGG ACT CTA ACC TGA AGA AC

intron4 R2: TAA GAG ATT CAG TCT CAA AG

Adh3 allele

neoF2: TAT CAG GAC ATA GCG TTG GCT A

Adh5-intron4R5: AGG TAC AGG GAA CCA TGG AG

Nrf2 欠損マウス

Nrf2KO-F: TGG ACG GGA CTA TTG AAG GCT G

Nrf2KO-LacZ-R: GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT AGG

Nrf2KO-WT-R: GCC GCC TTT TCA GTA GAT GGA GG

条件付き *Keap1* 欠損マウス

720s: CAG CAG TTA AGG GCA CCA ATG C

925as: CCT GCC TCA GCT TCC CAT CA

CKOg1: CAA CGA GAA GCG CGA TCA CA

Keap1 欠損マウス

Keap1: CGG GAT CCC CAT GGA AAG GCT TAT TGA GTT C

Keap2: GAA GTG CAT GTA GAT ATA CTC CC

Keap3: TCA GAG CAG CCG ATT GTC TGT TGT GCC CAG TCA

（４）不死化したマウス胎児線維芽細胞（MEF）の作成

野生型および *Adh3* 欠損 MEF は、C57/BL6 の *Adh3* ヘテロマウス同士をかけ合わせ、リッターメイトとして得られた胎生 13.5 日目の胎児より作製した。胎児の頭部および肝臓は取り除き、頭部は遺伝子型を決定するために用いた。胴体は 0.125%トリプシン液に浸し一晩 4℃保存した後に、上清を取り除き PBS で懸濁し 37℃で 15 分インキュベートした。その後細胞塊をほぐして 10 分ほど静置した後に得られた上清を採取して 1000rpm、5 分遠心分離し、得られた沈殿を 37℃にあらかじめ暖めておいた 10%FBS と 1%抗生物質含有の DMEM High glucose で培養した。その後レンチウイルスにより SV40 large T-antigen を導入して不死化させた。

（５）グルタチオン定量

MEF における総グルタチオン定量では、野生型 MEF、*Adh3* 欠損 MEF のいずれも 1.0×10^6 個の細胞を 10cm ディッシュに播種し、12 時間後に細胞全体を採取した。この時同時に細胞数を数え、細胞数あたりの総グルタチオン（還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン）量を Total GSH Quantification Kit

(DOJINDO, Kumamoto, Japan) にて測定した(n=3)。

マウス個体の肝臓における還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは CE/MS (アジレント・テクノロジー株式会社) にて測定した。凍結保存していたマウスの肝臓約 50mg に 4°C に保存したメタボライト抽出用メタノール 500μl を加え、5000rpm、4°C で 45 秒ビーズホモジナイズし、そこにクロロホルム 500μl および Milli-Q 水 200μl を加え、30 秒ボルテックスにかけてよく混合した。2300g、4°C、5 分遠心分離した上層をメタボライトが含む水層とし、このうち 200μl をフィルターカップに入れ、9100g、4°C で 4~6 時間かけて遠心分離した。約 2 時間減圧遠心乾燥後、25μl のメタボライト溶解用 Milli-Q 水加えた後に 15 秒ボルテックスしたものをサンプルとした。

(6) 総グルタチオン (GSx) の半減期測定

野生型 MEF、*Adh3* 欠損 MEF のいずれも 1.0×10^6 個の細胞を 10cm ディッシュに播種し、12 時間後にグルタチオン合成阻害剤である 2mM の BSO を添加した。添加後それぞれ 0, 1, 3, 6, 12 時間後に細胞全体を採取し、ディッシュあたりの総グルタチオン (還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン) 量を Total GSH

Quantification Kit (DOJINDO、Kumamoto、Japan) にて測定した(n=3)。

(7) グルコースオキシデースおよびカタラーゼ添加実験

野生型および *Adh3* 欠損 MEF を 1.0×10^5 個ずつ 12 well dish に播種し、12 時間後に 0, 2, 5, 10, 20mU/ml のグルコースオキシデースおよび 0 または 100mU/ml のカタラーゼを添加し、1 時間後に細胞数をカウントし、細胞の生存を確認した。その際に、トリパンブルーで細胞を染色し、死細胞は除いた。

(8) グルコースオキシデースおよび CDDO-lm 添加実験

野生型および *Adh3* 欠損 MEF を 1.0×10^5 個ずつ 12 well dish に播種し、12 時間後に 1nM の CDDO-lm を添加した。さらに 3 時間後に 0, 2, 5, 10, 20mU/ml のグルコースオキシデース添加し、1 時間後に細胞数をカウントし、細胞の生存を確認した。その際に、トリパンブルーで細胞を染色し、死細胞は除いた。

(9) メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与実験

8 週齢の野生型、*Adh3* 欠損マウス、*Nrf2* 欠損マウス、*Adh3::Nrf2* 二重欠損

マウス、*Keap1*^{F/-}マウス、*Adh3*^{-/-}:: *Keap1*^{F/-}マウスに5日間コントロール食もしくはメチオニン・コリン欠乏（MCD）食（Oriental Yeast, Tokyo, Japan）を投与した。投与開始および終了の時刻を午後6時から午後8時の間とし、摂餌時間による差を少なくした。投与終了後に血清および肝臓組織を採取し、解析に用いた。

（10）血液生化学的解析および組織学的解析

血液生化学的解析はマウスから採取した血液に、抗血液凝固剤として EDTA を 2μl 加え（ALP 測定用サンプルのみ加えない）、1000g、常温で 5 分遠心分離した上清を血清とし解析した。血清における alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)、alkaline phosphatase (ALP)、triglyceride (TG) および total bilirubin (T-Bill) はドライケム(DRI-CHEM7000)により測定した。肝組織は 4℃下で 10%パラホルムアルデヒドにより固定後、ヘマトキシリン染色およびマッソントリクローム染色を行った。Oil Red O 染色では、4℃下で 10%パラホルムアルデヒドにより固定後、スクロース溶液を通した後に -80℃で凍結させ、染色を行った。タンパクおよび RNA の解析に用いる組織は

液体窒素で凍結し、解析まで-80℃で保存した。

(11) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

各組織約 50mg を ISOGEN 1ml でビーズホモジェナイズし、得られた RNA 2μg を逆転写して得られた cDNA を用いた。以下に本稿中に用いたプライマーの配列を示す。

rRNA

Forward: 5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

Reverse: 5'- GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

Probe: 5' -TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-3'

Adh3

Forward: 5'-CTGGGAGGCGGGAAAGCCTCT-3'

Reverse: 5'-CGGTGTGGCAAACAGCAGTGG-3'

Nqo1

Forward: 5'-AGCTGGAAGCTGCAGACCTG-3'

Reverse: 5'-CCTTTCAGAATGGCTGGCA-3'

Probe: 5'-ATTTTCAGTTCCCATTGCAGTGGTTTGGG-3'

Ho-1

Forward: 5'-GTGATGGAGCGTCCACAGC-3'

Reverse: 5'-TTGGTGGCCTCCTTCAAGG-3'

Probe: 5'-CGACAGCATGCCCCAGGATTTGTC-3'

Gclm

Forward: 5'-TGGAGCAGCTGTATCAGTGG-3'

Reverse: 5'-AAATCTGGTGGCATCACACA-3'

Gclc

Forward: 5'-ATCTGCAAAGGCGGCAAC-3'

Reverse: 5'-ACTCCTCTGCAGCTGGCTC-3'

Probe: 5'-ACGGGTGCAGCAAGGCCCA-3'

xCT

Forward: 5'-TGGGTGGAAGTCTCGTAAT-3'

Reverse: 5'-AGGATGTAGCGTCCAAATGC-3'

Probe: 5'-AGCTACTGCTGTGATATCCC-3'

iNos

Forward: 5'- ACCGGGCTGTCACGGAGATC-3'

Reverse: 5'- CCATGATGGTCACATTCTGC-3'

Probe: 5'- CTGTGCTCCATAGTTTCCAG-3'

Tnfa

Forward: 5'-CACGCTCTTCTGTCTACTGAA-3'

Reverse: 5'-GGCTACAGGCTTGTCACTCGA-3'

Tgfβ

Forward: 5'-TGGAGCAACATGTGGAACTC -3'

Reverse: 5'-CAGCAGCCGGTTACCAAG -3'

αSma

Forward: 5'-CCCACCCAGAGTGGAGAA -3'

Reverse: 5'- ACATAGCTGGAGCAGCGTCT -3'

Col1a1

Forward: 5'-ATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'

Reverse: 5'-TCCCTCGACTCCTACATCTTC-3'

(12) ウェスタンブロット法による Adh3 および Nrf2 タンパクの検出

Adh3 の検出は、各臓器の 9 倍量の 0.25M のスクロース溶液 (0.25M スクロース、1mM PMSF、1×complete、1mM DTT) でホモジェナイズしたものを細胞の全抽出とし、2xSDS バッファー (0.1M Tris HCl pH 6.8、1.7M Glycerol、3.3% SDS、0.2M DTT、 6.0×10^{-5} M BPB) を等量加え 100°C、10 分加熱したものをサンプルとした。抗 Adh3 抗体は日本医科大学長谷場健先生より分与いただいたものを用いた。抗 Adh3 抗体は 1/1000 希釈で用い、二次抗体として抗ウサギ抗体を 1/2500 希釈で用いた。コントロールとして β -actin を検出した。抗 β -actin 抗体 (Actin (I-19)、sc-1616、Santa Cruz Biotechnology) は 1/200 希釈で用い、二次抗体として抗ヤギ抗体を 1/5000 希釈で用いた。

Nrf2 の検出は、各臓器の 9 倍量の 0.25M のスクロース溶液 (0.25M スクロース、1mM PMSF、1×complete、1mM DTT、10 μ M MG132) でホモジェナイズしたものを 1000g、4°C、5 分間遠心分離した沈殿を細胞の核分画とし、2xSDS バッファーを等量加え 100°C、10 分加熱したものをサンプルとした。抗 Nrf2 抗体 (Nrf2 #103、山本研究室より分与) は 1/100 希釈で用い、二次抗体として抗ラット抗体を 1/1000 で用いた。コントロールとして LaminB を検出した。

抗 Lamin B 抗体（Lamin B（M-20）、sc-6217、Santa Cruz Biotechnology）は 1/5000 希釈で用い、二次抗体として抗ヤギ抗体を 1/5000 希釈で用いた。

（１３）統計

統計処理は Student's t-test を用い、マウス肝臓における GSH、GSSG の定量および比の検定（Fig. 7）のみ Mann-whitney U test を用いた。どちらも P 値を算出し、 $P < 0.05$ を統計的に差があるものとした。

第5章 研究結果

(1) *Adh3* 欠損により酸化ストレスに対する抵抗性が減弱する

細胞内グルタチオン代謝における *Adh3* の貢献を *in vitro* で明らかにするため、野生型および *Adh3* 欠損 MEF（マウス胎児線維芽細胞）を樹立し、不死化した。まず、野生型および *Adh3* 欠損 MEF の細胞内総グルタチオン（酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオン）の定量を行った（Fig. 2A）。*Adh3* 欠損 MEF では野生型 MEF に比べて総グルタチオン量が低下していた。しかし、グルタチオン合成に関連する遺伝子である *Gclc*、*Gclm*、*xCT* の発現には、野生型 MEF と *Adh3* 欠損 MEF とで差はなかった（Fig. 2B）。このことから、*Adh3* 欠損 MEF におけるグルタチオン量の低下はグルタチオン合成の減少によるものではないと予想された。そこで *Adh3* がグルタチオンの細胞内維持に与える影響を調べるために、野生型および *Adh3* 欠損 MEF にグルタチオン合成阻害剤である BSO を添加し、その後グルタチオンの減少を測定することで、総グルタチオンの半減期を求めた。すると、*Adh3* 欠損 MEF で総グルタチオンの半減期が有意に短縮していることがわかった（Fig. 2C）。このことから、*Adh3* 欠損 MEF ではグルタチオンの消費が増加していることがわかった。*Adh3* は、ホルムアルデ

ヒドおよび一酸化窒素の解毒課程で使用するグルタチオンを再生することから、*Adh3* 欠損 MEF ではグルタチオンの再生が行われず、その結果消費の増加がもたらされたと考えられる。

次に *Adh3* 欠損 MEF は細胞内グルタチオン量の低下を示すことから、酸化ストレスに対して抵抗性が低いことが予想された。そこで、グルコースオキシデースを添加して、細胞障害を調べた。するといずれの細胞でもグルコースオキシデースの濃度依存的に死細胞の増加が認められたが、野生型に比べて *Adh3* 欠損 MEF はより死にやすいことがわかった (Fig. 2D)。グルコースオキシデースは培地中のグルコースを使用して、過酸化水素を発生させる。グルコースオキシデースによる細胞死がグルコースの減少によるものではなく、過酸化水素による酸化ストレスが原因であることを確認するために、野生型および *Adh3* 欠損 MEF にグルコースオキシデースと共にカタラーゼを添加した。すると、野生型および *Adh3* 欠損 MEF は細胞死を起こさず (Fig. 2D)、グルコースオキシデースに対して *Adh3* 欠損 MEF が細胞死をおこしやすいのは、酸化ストレスによるものであることがわかった。

これらのことから、*Adh3* は細胞内グルタチオン濃度の維持に関わっており、

Adh3 を欠損すると細胞内のグルタチオン濃度が低下し、酸化ストレスに対する抵抗性が低下することがわかった。

(2) MCD 食投与実験において、*Adh3* 欠損マウスは野生型マウスより重篤な肝傷害を発症しやすい

Adh3 欠損により酸化ストレスに対する抵抗性が弱くなることの、生体内における意義を明らかにするために、マウス個体を用いて、*Adh3* の酸化ストレス防御における貢献を検証した。野生型のマウスの主要な臓器における *Adh3* の遺伝子発現を調べた (n=3) (Fig. 3A、B)。すると、*Adh3* は肝臓と腎臓で遺伝子の発現およびタンパク量が高いことがわかった。そこで、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食を投与することで肝臓に酸化ストレスの負荷を加えて、*Adh3* の有無による障害の違いを調べることにした。MCD 食は、グルタチオンの減少および酸化ストレスの蓄積による肝障害をもたらすことが知られている (Fig. 1C)。メチオニン・コリンは生体にとってメチル基供給源であるため、MCD 食を投与すると食餌性にメチル基が失われることによって、肝臓における脂質代謝障害、ROS (Reactive oxygen species) の発生、還元型グルタチオンが減少し酸化ス

ストレスが発生する。酸化ストレスの発生により、脂肪滴の蓄積や炎症が惹起し、さらに障害が続くと線維化に至る (Pogribny et al., 2012)。この時にストレス応答性転写因子 Nrf2 は発生した酸化ストレスによって活性化し、抗酸化酵素群遺伝子 (GSH、SOD など) や解毒酵素群遺伝子 (Nqo1、Gsts など) の発現を誘導することによって、肝障害に対して保護的に働くことが知られている (Okada et al., 2012)。本研究では、コントロール食、もしくは MCD 食を 5 日間、野生型および *Adh3* 欠損マウスに与え、肝障害の程度を解析した。

まず、血液生化学的な解析を行った (Fig. 3C)。*Adh3* 欠損マウスに MCD 食を投与したものでは、AST、ALT で高値を示す個体がいることがわかった。そこで AST の値が 200 以上かつ ALT の値が 50 以上である個体を肝障害を発症したマウスと定義する (この値は、Jackson Laboratory におけるマウスの標準値と、コントロール食を投与した野生型マウスの値を参考に定めた) と、野生型マウスは食餌に関わらず肝障害を示さなかったが、*Adh3* 欠損マウスの MCD 投与したもののみのみ、11 匹中 5 匹に肝障害がみられた (Table 1)。次に組織学的な解析を行った。*Adh3* 欠損マウスの MCD 投与したもののみのみ 10 匹中 4 匹に脂肪滴の蓄積や中心静脈を中心とした炎症性細胞浸潤、線維化の増加がみられ、

これらはいずれも血液生化学的な所見で AST、ALT が高値を示した個体であった (Fig. 4)。また、肝臓における炎症マーカーの遺伝子の発現を解析したところ、いずれの遺伝子も *Adh3* 欠損マウスに MCD 投与したもので、肝障害を示した個体において野生型よりも有意に発現が上昇していることがわかった (Fig. 5)。このことから、*Adh3* 欠損マウスは野生型のマウスに比べて、MCD 食による肝障害が発症しやすいことがわかった。

(3) MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスでは、Nrf2 が代償的に細胞保護作用を発揮している

MCD 投与実験においては、発生する酸化ストレスによって Nrf2 が誘導され、肝臓に対して保護的に働くことが知られている (Okada et al., 2012)。そのことをふまえて、MCD 投与後における Nrf2 標的遺伝子の発現を調べた (Fig. 6A)。すると、MCD 食を投与した野生型マウスにおいては xCT 以外の Nrf2 標的遺伝子の軽度上昇が認められたのに対して、*Adh3* 欠損マウスでは、肝障害を呈した MCD 食投与マウスにおいて、調べたすべての Nrf2 標的遺伝子が顕著に誘導されており、Nrf2 が核内に蓄積していた (Fig. 6B)。この結果から、MCD 食を投

与した *Adh3* 欠損マウスの肝臓では、Nrf2 が保護的に働いていると予想した。

そこで、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスを作り、同様にコントロール食もしくは MCD 食を 5 日間投与し、肝障害の程度を解析した。まず *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスにおける Nrf2 標的遺伝子の発現を確認したところ、同マウスでは MCD 食の投与を行っても、*Ho-1* 以外の Nrf2 標的遺伝子の遺伝子発現上昇がみられなかった (Fig. 6A)。このことから *Adh3* 欠損マウスに MCD 食投与した際に見られた Nrf2 標的遺伝子発現の上昇は、Nrf2 依存性であることが確認された。

次に血液生化学的解析を行った (Fig. 3C)。*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは肝障害マーカーである AST、ALT および T-Bill の顕著な上昇がみられたことから重篤な肝障害が起こっていることが示唆された。ALP では、*Adh3* 欠損マウスは野生型や *Nrf2* 欠損マウスと変わりなかったが、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスに MCD 食投与したもののみ、著しい上昇がみられた。さらに組織学的な解析を行った (Fig. 4)。この際組織学的所見から重症度の分類を行った (Table 2)。すると、MCD 食を投与した *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは、MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスに比べて、より高い確率で重篤な肝障害を発症したことがわかった (Table 3)。炎症関連遺伝子 (*Nos2*、*Tnfa*、 *α Sma* および *Tgf β*) の発現は、

Adh3::Nrf2 二重欠損マウスと *Adh3* 欠損マウスで違いがなかったが、*Collagen 1a1* の発現は、前者において著しい上昇が認められた (Fig. 5)。これは、MCD 食を投与した *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスの肝組織像における線維化の増加とも一致している。

Adh3 欠損マウスに比べて、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスで MCD 食の投与による肝障害が重篤化したことから、*Adh3* 欠損マウスでは酸化ストレス負荷時に *Nrf2* が保護的に働いていることがわかった。

(4) *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは肝臓のグルタチオンの量が低下しやすい

MCD 食投与実験における肝臓のグルタチオン（還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン）の量を CE/MS で測定した (n=6) (Fig. 7)。酸化型グルタチオンに大きな差はないが、還元型グルタチオンでは *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスで有意な減少が認められた。これは、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスの肝障害が重篤であることによく一致する結果である。

(5) *Nrf2* の活性化は、*Adh3* 欠損による酸化ストレスに対する防御能低下を代

償できる

Adh3::Nrf2 二重欠損マウスによる MCD 食投与実験から、*Adh3* 欠損マウスにおいてさらに *Nrf2* を欠損させることにより肝臓内グルタチオン量が大きく低下し、重篤な肝障害を示すことがわかった。そこで、*Nrf2* の抑制因子である *Keap1* の発現量が通常の 5%程度にまで低下している *Keap1* ノックダウンマウス (*Keap1^{F/-}*) を利用して *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}* マウスを作成し、逆に *Adh3* 欠損状態において *Nrf2* を活性化させることにした。*Nrf2* を安定化させることによって *Adh3* 欠損マウスに MCD 食を投与した際の肝障害がレスキューされるかどうかを調べた。まず、血液生化学的解析を行った (Fig. 8)。すると、*Keap1^{F/-}* マウスおよび *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}* マウスのいずれにおいても、MCD 食投与後の AST や ALT などの肝障害マーカーの上昇はみられなかった。次に組織学的解析を行った (Fig. 9)。*Keap1^{F/-}* マウスおよび *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}* マウスは軽度の油滴の蓄積がみられるものもいたが、Table 2 の基準による肝障害にはあてはまらないほど軽度のものであった。炎症関連の遺伝子の発現は、*Keap1^{F/-}* マウスおよび *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}* マウスに MCD 食を投与しても上昇は認められず、野生型の肝障害を生じないマウスと同じレベルであった (Fig. 10A)。*Nrf2* 標的遺伝子の発現を調べたところ、

Nqo1 では *Keap1*^{F/-}マウスおよび *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスともに野生型および *Adh3* 欠損マウスの発現より顕著に上昇していた (Fig. 10B)。しかし、*Gclc* では、MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスと *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスでは発現量に差がみられず、*Ho-1*、*Gclm*、*xCT* ではむしろ減少傾向であった。

これらのことから、Nrf2 を安定化することによって MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスにみられた肝障害はレスキューされることがわかった。また、この結果は MEF において Nrf2 の誘導剤である CDDO-lm を事前に投与し、Nrf2 を活性化させることで、*Adh3* 欠損 MEF におけるグルコースオキシデースへの脆弱性が改善されることとも一致している (Fig. 2E)。

(6) *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスでは肝臓のグルタチオンの量は *Adh3* 欠損マウスとほぼ同じレベルである

Keap1^{F/-}マウスおよび *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスの MCD 食投与実験における肝臓のグルタチオン (還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン) の量を CE/MS で測定した (n=3) (Fig. 7)。いずれの肝臓の還元型グルタチオンも *Adh3* 欠損マウスとほぼ同じレベルであることがわかった。しかし還元型グルタチオ

ンと酸化型グルタチオンの比（GSH/GSSG）を比べると、*Keap1^{F/-}*マウスおよび *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}*マウスで高い傾向にあり、グルタチオンの還元が促進されていると考えられた。

第6章 考察

Adh3 は FDH (Formaldehyde dehydrogenase) もしくは GSNOR (S-nitrosoglutathione reductase) としての機能を持つことから、ホルムアルデヒドと一酸化窒素の解毒を介して生体防御に貢献するとされてきた。本研究では、Adh3 がグルタチオンの維持を通して生体の酸化ストレス防御に、より幅広く貢献しているということを見いだした。

Adh3 欠損の影響をなるべく単純なシステムで検討するため、まず、細胞レベルの実験を構築するべく、野生型および Adh3 欠損 MEF を樹立した。MEF のグルタチオン測定の結果から、通常培養下においてグルタチオン合成に差はないと考えられるにも関わらず、野生型と比較して Adh3 欠損 MEF はグルタチオン濃度が低下していた。また、MEF におけるグルタチオンの半減期測定では Adh3 欠損 MEF は野生型と比較してグルタチオンの半減期が短かった。Adh3 欠損 MEF でグルタチオンの分解が亢進しているということも考えられるが、グルタチオン分解酵素である γ -GTP (γ -グルタミルトランスペプチダーゼ) は細胞外に存在する膜結合性のたんぱく質であるため、細胞内のグルタチオンを分解しているとは考えにくい。このことから、通常の培養下においても内因性のホル

ムアルデヒドや一酸化窒素が発生しており、野生型の MEF では Adh3 が絶えずそれらをグルタチオン依存的に解毒していること、そしてその結果 Adh3 が効率的なグルタチオンの濃度維持を実現していることが推察される。

誘導的にタンパク質が安定化して機能する Nrf2 に対して、Adh3 は、転写レベルでもタンパク質レベルでも発現が誘導されているという報告はこれまでに認められない。Adh3 のプロモーター領域に存在する Sp1 結合エレメントがその遺伝子発現に重要であることが示されているが (Thompson et al., 2009)、このエレメントが何らかの刺激に対する誘導的な発現に関与するという報告もない。したがって、Adh3 は定常状態においてすでに十分量が発現し内因性に発生するホルムアルデヒドや一酸化窒素の代謝に貢献していると考えられる。

また、Adh3 と類似した反応を触媒するグルタチオン依存性酵素にメチルグリオキサールを代謝するグリオキシレースがある。メチルグリオキサールは、解糖系の副産物として作られ、血管内に蓄積すると酸化ストレスを産生し、血管の細胞を破壊し、細胞内毒性や糖尿病進行に作用するとも言われている。グリオキシレースはメチルグリオキサールにグルタチオンが非酵素的に結合したヘミメルカプタルを代謝し、最終的に乳酸とグルタチオンを再生することから、

Adh3 と同様にグリオキシレースもメチルグリオキサールの存在下ではグルタチオンの維持に貢献しているものと考えられる。

グルタチオンの減少と酸化ストレスの蓄積により肝障害を発症することで知られている MCD 食の 5 日間投与では、野生型マウスは肝障害を発症しないが、*Adh3* 欠損マウスは 10 匹中 4 匹で脂肪肝や線維化などの肝障害を示した。また、*Nrf2* 欠損マウスは肝障害を発症しなかったが、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスでは MCD 食 5 日間投与により *Adh3* 欠損マウスより高い確率（12 匹中 8 匹）でかつ重篤な肝障害を示した。このことから、*Nrf2* 欠損状態において *Adh3* は酸化ストレスからの防御に特に大きく貢献していることがわかった。

Adh3::Nrf2 二重欠損マウスは、コントロール食を投与したマウスの中で 8 匹中 5 匹に線維化には至らないが、軽度の脂肪滴や、炎症性細胞の浸潤を認めた。グルタチオン合成系遺伝子である *Gclc* の条件付き欠損マウスは、自然に脂肪肝を発症することが知られており（Chen et al., 2007）、通常状態において *Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスで認められる肝臓の変化は、グルタチオンの低下を反映していると予想される。

グルタチオン濃度が低下している *Adh3* 欠損マウスに、*Nrf2* を安定化させて

グルタチオン量を増やすことで *Adh3* 欠損マウスの肝障害をレスキューできるのではないかと考え、*Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスに同様の実験をおこなったところ肝障害を発症しなかった。このことから、*Keap1* ノックダウンによって Nrf2 が活性化し、肝臓内でグルタチオンが増加することによって、肝障害が緩和したことが考えられたが、Nrf2 の標的遺伝子の発現を調べたところ、グルタチオン合成系である *Gclc*、*Gclm* および xCT の発現は *Adh3* 欠損マウスの発現より上昇してはいなかった (Fig. 10B)。また実際に還元型グルタチオンを測定したところ、MCD 食を投与した *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスのグルタチオンの量は、*Adh3* 欠損マウスのものと変わらなかった。このことから、Nrf2 を安定化させた際の肝障害の緩和は、Nrf2 がグルタチオン合成系以外のシステム、すなわちチオレドキシンやペルオキシレドキシン等の酸化ストレスの除去に関わる遺伝子の発現誘導や、グルタチオンの還元に関わる酵素の発現を促進したためであると考えられた。本実験では、その一つとして *Nqo1* の発現上昇が観察されている (Fig. 10B)。その他 Nrf2 の標的遺伝子としてチオキシレドキシンの還元に関わるチオキシレドキシンレダクターゼ、ペルオキシレドキシン 1 やグルタチオンの還元に関わるグルタチオンレダクターゼなどの発現が誘導されている可能性が考え

られる。

本研究から、*Adh3* 欠損マウスが MCD 食投与に対して脆弱である、ということが示されたが、一方、MCD 食投与と同様に還元型グルタチオンが減少することにより肝障害を発症することで知られている四塩化炭素やアセトアミノフェンの投与では、野生型に比べて *Adh3* 欠損マウスの肝障害が軽いことが報告されている。これらの報告では *Adh3* の欠損により一酸化窒素が蓄積し、これが防御的に作用するためと解釈されている (Cox et al., 2014, Yi et al., 2014)。 *Adh3* の生体防御における役割として本研究とは異なる結論が得られている理由として、以下のような理由が考えられる。

まず、一酸化窒素は、低濃度では生体に対して保護的に働くことが知られており、生体内での濃度が上昇していくにつれて毒性を示すことが知られている。生体内でグルタチオンが減少してしまうと一酸化窒素が毒性を発揮するということもすでに報告されている (Aquilano et al., 2010, Aquilano et al., 2011)。したがって *Adh3* 欠損状態ではグルタチオンの低下と一酸化窒素の上昇のバランスにより、一酸化窒素の防御的作用が強くなるか、細胞毒性が強くなるかが決まるものと考えられる。

アセトアミノフェンの実験系の場合 (Cox et al., 2014) は、アセトアミノフェン投与後 24 時間以内の反応を観察しており、発生する一酸化窒素の量が少なく、生体内で有利な濃度の一酸化窒素が生体に対して防御的に働くことにより、*Adh3* 欠損マウスの肝障害を緩和していることが考えられる。

一方、四塩化炭素の実験系 (Yi et al., 2014) では 2 週間という長期的な影響を解析している。本研究では MCD 食を 5 日間という短期における影響を解析したため、二次的影響が表れる以前の段階で *Adh3* の機能をとらえることができたと考えられる。すなわち 5 日間の MCD 食投与では、*Nos2* の発現上昇もあまり顕著ではなく (Fig. 5)、一酸化窒素による保護作用が効き始める前の状態を解析している。おそらく MCD 食をより長期間投与することにより、一酸化窒素による生体防御作用や他の防御系が働き始めると、MCD 食投与実験においても同様に野生型と *Adh3* 欠損マウスの表現型に差がなくなる、もしくは、*Adh3* 欠損マウスで障害が軽くなることも考えられる。また、本研究において、肝臓における *Adh3* の重要性が明らかになったが、ここには 2 つの要因があると考えられる。1 つは、肝臓での *Adh3* の発現量が多いということであり、同様に *Adh3* が高発現している腎臓でもその酸化ストレス防御への貢献が認められると予想さ

れる。もう一つは、肝臓においては、コリン、クレアチニンやカテコラミンの代謝が盛んであり、内因性のホルムアルデヒドの発生量が多いことが予想されることである。そのため、肝臓では特に、Adh3 がグルタチオンのホルムアルデヒド付加体であるヒドロキシメチルグルタチオンを代謝してグルタチオンを再生することが、組織の抗酸化機能の維持に重要であると思われる。

今回新たに Adh3 が酸化ストレス防御へ貢献していることが明らかになった。特に *Nrf2* 欠損状態において Adh3 の貢献がより大きいということは興味深い。ヒトの *NRF2* 遺伝子のプロモーター領域には、転写開始点から上流 617bp 付近に SNP の存在が認められている (-617C/A)。この SNP で A をホモに持つヒトでは *NRF2* の発現が低いため、酸化ストレスへの感受性が高く、急性肺傷害などの酸化ストレスが原因となる疾患の発症 (Marzec et al., 2007) および、喫煙に伴う肺がんの発症率も有意に高いことが報告されている (Suzuki et al., 2013)。このような *NRF2* 遺伝子の発現が低くなる SNP を持つヒトでは、喫煙や飲酒がリスクファクターであり酸化ストレスの密接な関係が示唆されている口腔がん (Blot et al., 1988) や、酸化ストレスが蓄積するとされる病態下 (肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙) において、ADH3 が生体のレドックス恒常性

維持により大きな貢献を果たしていると考えられる。また、NCBI のデータベースに *ADH3* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う SNP が複数報告されており、*ADH3* の機能に個人差がある可能性がある。*NRF2* 遺伝子の発現が低くなる SNP と、*ADH3* の SNP の組み合わせ次第では、酸化ストレスに対する感受性が高くなり、先に述べたような疾患に罹患するおそれが大きくなる場合があると予想される。これらのことから、*ADH3* は酸化ストレス関連疾患の予防および診断などにおける有用な分子標的となるものと期待される。

第7章 結論

本研究から、Nrf2 と Adh3 が細胞内グルタチオン量を協調的に制御することがわかった。Nrf2 はこれまでの報告からもわかっていたように、グルタチオンの合成に関わる遺伝子（Gclm、Gclc や xCT）発現や GSH の還元に関わる遺伝子発現（Gr）の制御に関わっている。Adh3 はこれまで一酸化窒素やホルムアルデヒドの解毒に関わることによって生体防御に貢献しているということが知られていたが、今回 Adh3 がグルタチオンの細胞内の濃度維持を通して、酸化ストレスに対する生体防御に貢献していることがわかった。恒常的な防御系として Adh3 が誘導的な防御系である Nrf2 と協調的に働くことにより、生体内でグルタチオン量を維持し、生体防御に貢献しているものと結論される。

第 8 章 引用文献

Aquilano, K., Baldelli, S., Cardaci, S., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. (2011)

Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells.

Journal of Cell Science 124, 1043-1054

Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M. R. (2011)

Glutathione is a crucial guardian of protein integrity in the brain upon nitric oxide imbalance.

Communicative & integrative Biology 4, 477-479

Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., Fraumeni, J. F. Jr.(1998)

Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer.

CANCER RESERCH 48, 3282-3287

Chen, Y., Yang, Y., Miller, M. L., Shen, D., Shertzer, H. G., Stringer, K. F., Wang, B., Schneider, S. N., Nebert, D. W., Dalton, T. P. (2007)

Hepatocyte-specific Gc/c Deletion Leads to Rapid Onset of Steatosis with Mitochondrial Injury and Liver Failure.

HEPATOLOGY 45, 1118-1128

Cox, A. G., Saunders, D. C., Kelsey, P. B. Jr, Conway, A. A, Tesmenitsky, Y., Marchini, J. F., Brown, K. K., Stamler, J. S., Colagiovanni, D. B., Rosenthal, G. J., Croce, K. J., North, T. E., Goessling, W. (2014)

S-Nitrosothiol Signaling Regulates Liver Development and Improves Outcome following Toxic Liver Injury.

Cell Reports 6,56-69

Deltour, L., Foglio, M. H., Duester, G. (1999)

Metabolic Deficiencies in Alcohol Dehydrogenase *Adh1*, *Adh3*, and *Adh4* Null Mutant Mice: OVERLAPPING ROLES OF *Adh1* AND *Adh4* IN ETHANOL CLEARANCE AND METABOLISM OF RETINOL TO RETINOIC ACID.

The Journal of Biological Chemistry 274, 16796-16801

Harada, N., Ito, K., Hosoya, T., Mimura, J., Maruyama, A., Noguchi, N., Yagami, K., Morito, N., Takahashi, S., Maher, J. M., Yamamoto, M., Ito, K. (2012)

Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation.

Free Radic Biol Med. 53, 2256-2262

Itoh, K., Chida, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997)

An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements.

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 236, 313-322

Lima, B., Lam, G. K. W., Xie, L., Diesen, D. L., Villamizar, N., Nienaber, J., Messina, E., Bowles, D., Kontos, C. D., Hare, J. M., Stamler, J. S., Rockman, H. A. (2009)

Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury.

Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 106, 6297-6302

Liu, L., Yan, Y., Zeng, M., Zhang, J., Hanes, M. A., Ahearn, G., McMahon, T. J., Dickfeld, T., Marshall, H. E., Que, L. G., Stamler, J. S. (2004)

Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock.

Cell 116, 617-628

Marzec, J. M., Christie, J. D., Reddy, S. P., Jedlicka, A. E., Vuong, H.,

Lanken, P. N., Aplenc, R., Yamamoto, T., Yamamoto, M., Cho, H., Kleeberger, S. R. (2007)

Functional polymorphisms in the transcription factor *NRF2* in human increase the risk of acute lung injury.

The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 21, 2237-2246

Okada, K., Warabi, E., Sugimoto, H., Horie, M., Tokushige, K., Ueda, T., Harada, N., Taguchi, K., Hashimoto, E., Itoh, K., Ishii, T., Utsunomiya, H., Yamamoto, M., Shoda, J. (2012)

Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatihepatitis.

J Gastroenterol 47, 924-935

Okawa, H., Motohasi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T. W., Yamamoto, M. (2006)

Hepatocyte-specific deletion of the *Keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity.

Biochemical and Biophysical Research Communications 399, 79-88

Pogribny, I. P., James, S. J., Beland, F. A. (2012)

Molecular alternations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl

deficiency.

Molecular Nutrition & Food Research 56, 116-125

**Que, L. G., Liu, L., Yan, Y., Whitehead, G. S., Gavett, S. H., Schwartz, D. A.,
Stamler, J. S. (2005)**

Protection from Experimental Asthma by an Endogenous Bronchodilator.

SCIENCE 308, 1618-1621

Rosado, I. V, Langevin, F., Crossan, G. P, Takata, M., Patel, K. J (2011)

Formaldehyde metabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia
DNA-repair pathway.

Nature Structural & molecular biology 18, 1432-1434

**Suzuki, T., Shibata, T., Takaya, K., Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H.,
Tsuta, K., Furuta, K., Goto, K., Hosoda, F., Sakamoto, H., Motohashi, H.,
Yamamoto, M. (2013)**

Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2
Expression Levels.

Molecular and Cellular Biology 33, 2402-2412

**Taguchi, K., Maher, J. M., Suzuki, T., Kawatani, Y., Motohashi, H.,
Yamamoto, M. (2010)**

Genetic Analysis of Cytoprotective Functions Supported by Graded Expression of Keap1.

Molecular and Cellular Biology 30, 3016-3026

Thompson, C. M., Sonawane, B., Grafstrom, R. C. ()

The Ontogeny, Distribution, and Regulation of Alcohol Dehydrogenase 3: Implications for Pulmonary Physiology.

DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 37, 1565-1571

Uruno, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., Sugawara, A., Kensler, T. W., Yamamoto, M. (2013)

The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus.

Molecular and Cellular Biology 15, 2996-3010

Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., Harada, T., Douglas, J., Yamamoto, M. (2003)

Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation.

Nature genetics 35, 238-245

Wei, W., Li, B., Hanes, M. A., Kakar, S., Chen, X., Liu, L. (2010)

S-Nitrosylation from GSNOR Deficiency Impairs DNA Repair and Promotes Hepatocarcinogenesis.

Science Translational Medicine 2, 1-9

Yi, H., Lee, Y., Byun, J., Seo, W., Jeong, J., Park, O., Duester, G., Haseba, T., Kim, S. C., Park, K., Gao, B., Jeong, W. (2014)

Alcohol Dehydrogenase III Exacerbates Liver Fibrosis by Enhancing Stellate Cell Activation and Suppressing Natural Killer Cells in Mice.

HEPATOLOGY 60, 1044-1053

第9章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験の初歩から論文の執筆に至るまで研究に関するあらゆる面に対してご指導、ご教示していただきました東北大学加齢医学研究所・遺伝子発現制御分野 本橋ほづみ教授に心から深く感謝を申し上げます。常に温かく見守り、研究に関する心構えや方針などをご指導、ご教示してくださいました同大学医学系研究科・医化学分野 山本雅之教授、同大学同研究科・分子血液学分野 清水律子教授に深く感謝を申し上げます。研究に際して貴重な意見をくださり、常に励まし続けてくださいました本橋研究室、山本研究室、清水研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。研究に際しまして、特にご助力をいただきました山本研究室 長沼絵里子さん、本橋研究室 太田奈緒さんに厚く感謝の意を表します。

本研究で用いた *Adh3* 欠損マウスおよび抗 *Adh3* 抗体をいただきました日本医科大学法医学 長谷場健准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、本橋研究室にて研究を行う機会を与えて下さった東北大学歯学系研究科顎口腔矯正学分野 山本照子教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、自身の勉学に対して理解を示し、惜しみない援助と励ましをくれた

家族および友人達に深く感謝の意を表します。

Fig. 1

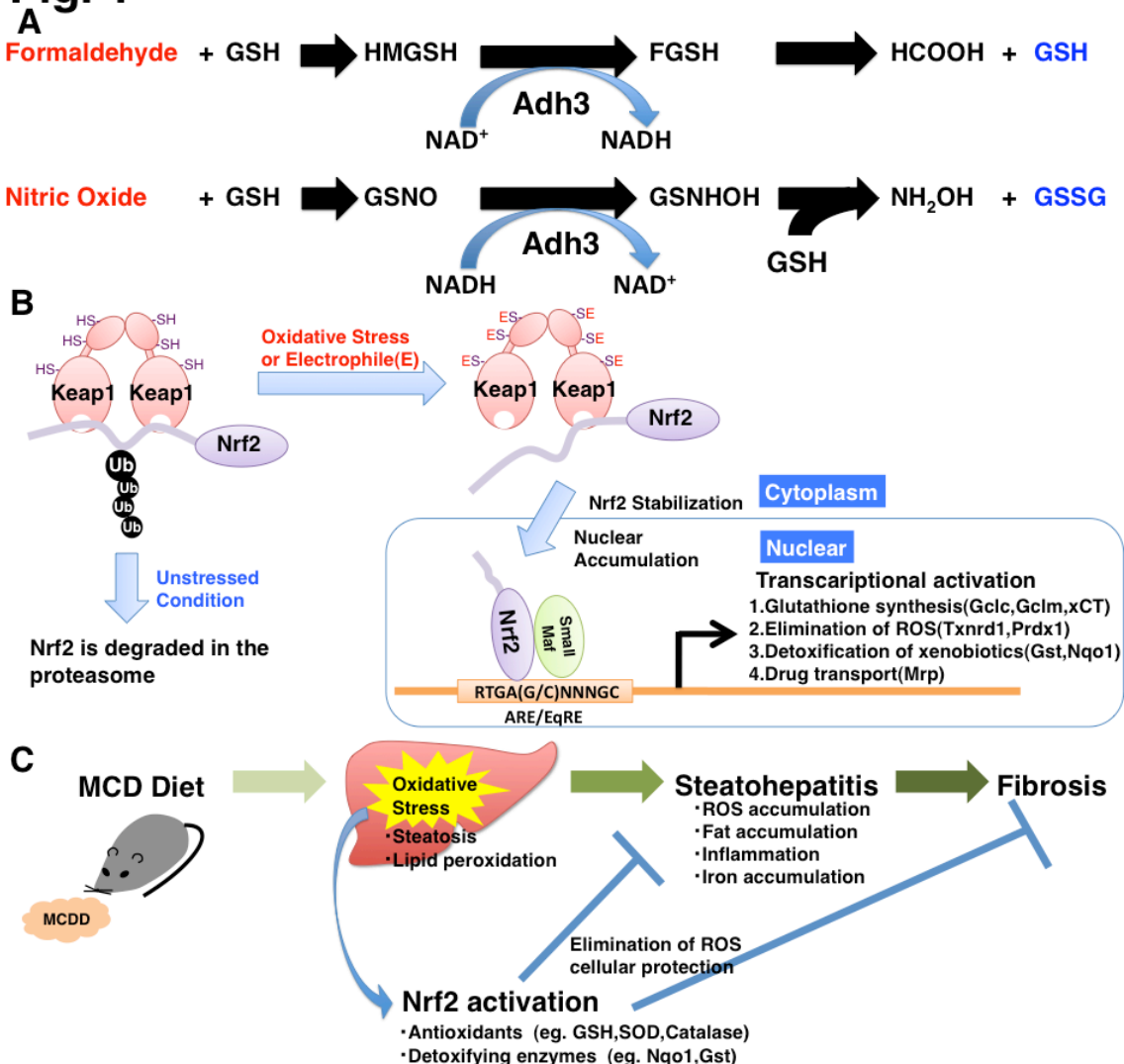


Fig. 1 本実験における模式図

A Adh3によるホルムアルデヒドと一酸化窒素の代謝。Adh3はグルタチオン依存性にホルムアルデヒドと一酸化窒素を解毒し、結果として還元型グルタチオン（GSH）と酸化型グルタチオン（GSSG）を再生する。

B Nrf2による生体防御システム。転写因子 Nrf2は通常の下では Keap1に捕捉されユビキチン化されているが、酸化ストレスや親電性物質により Keap1は Nrf2のユビキチン化を起さなくなり、Nrf2は安定化し、核内に移行して生体防御に関連する遺伝子の発現を誘導する。

C MCD（メチオニン・コリン欠乏）食の投与による肝障害発症。MCD食はグルタチオンの減少および酸化ストレスの蓄積による肝障害を発症する。

Fig. 2

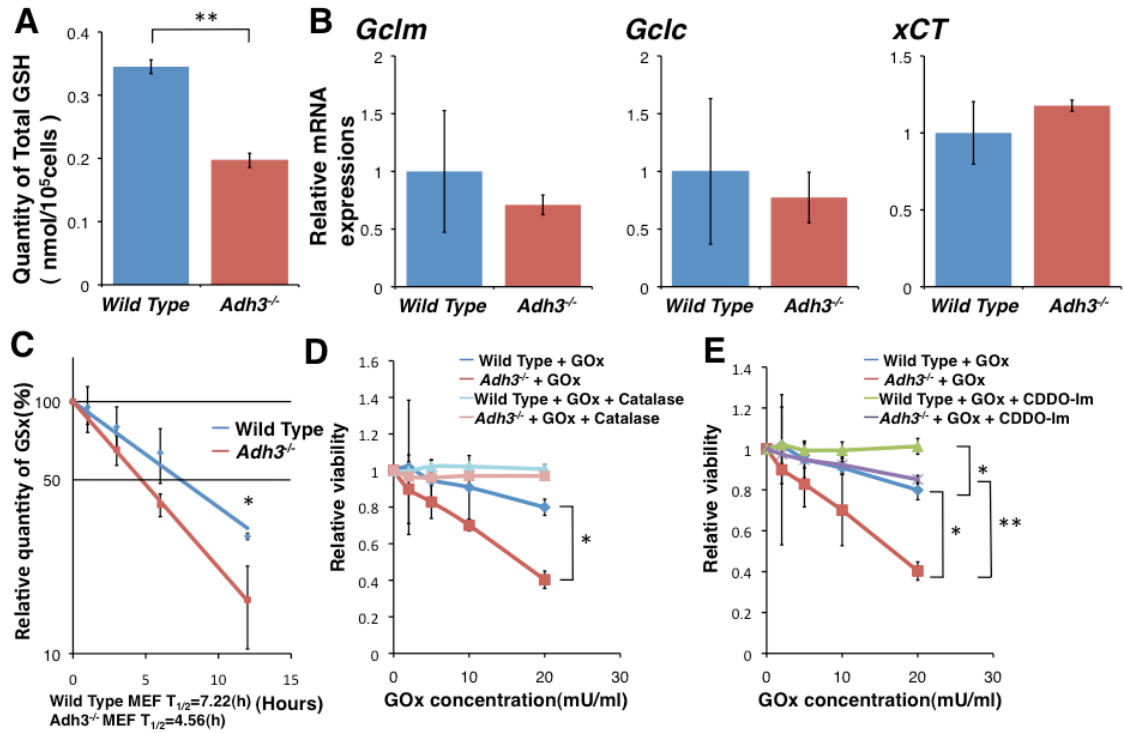


Fig. 2 野生型および *Adh3* 欠損 MEF を用いた解析

A 野生型および *Adh3* 欠損 MEF の 1.0×10^5 個あたりの細胞内総グルタチオン量 (n=3 ** P<0.005)。

B 野生型および *Adh3* 欠損 MEF におけるグルタチオン合成系遺伝子 (*Gclm*、*Gclc*、*xCT*) の発現 (n=3)。野生型 MEF の発現を 1 とした。

C 野生型および *Adh3* 欠損 MEF におけるグルタチオン半減期測定 (n=3 *P<0.05)。

D 野生型および *Adh3* 欠損 MEF へのグルコースオキシデース (GOx) およびカタラーゼ添加実験 (n=3 *P<0.05)。GOx 無添加の細胞数を 1 とした。

E 野生型および *Adh3* 欠損 MEF へのグルコースオキシデース (GOx) および CDDO-lm 添加実験 (n=3 *P<0.05 **P<0.005)。1nM CDDO-lm 添加の 3 時間後に GOx を添加した。GOx 無添加の細胞数を 1 とした。野生型および *Adh3* 欠損 MEF に CDDO-lm を添加していない時の細胞数は、D のカタラーゼを添加していない時の細胞数と同じものを使用している。

Fig. 3

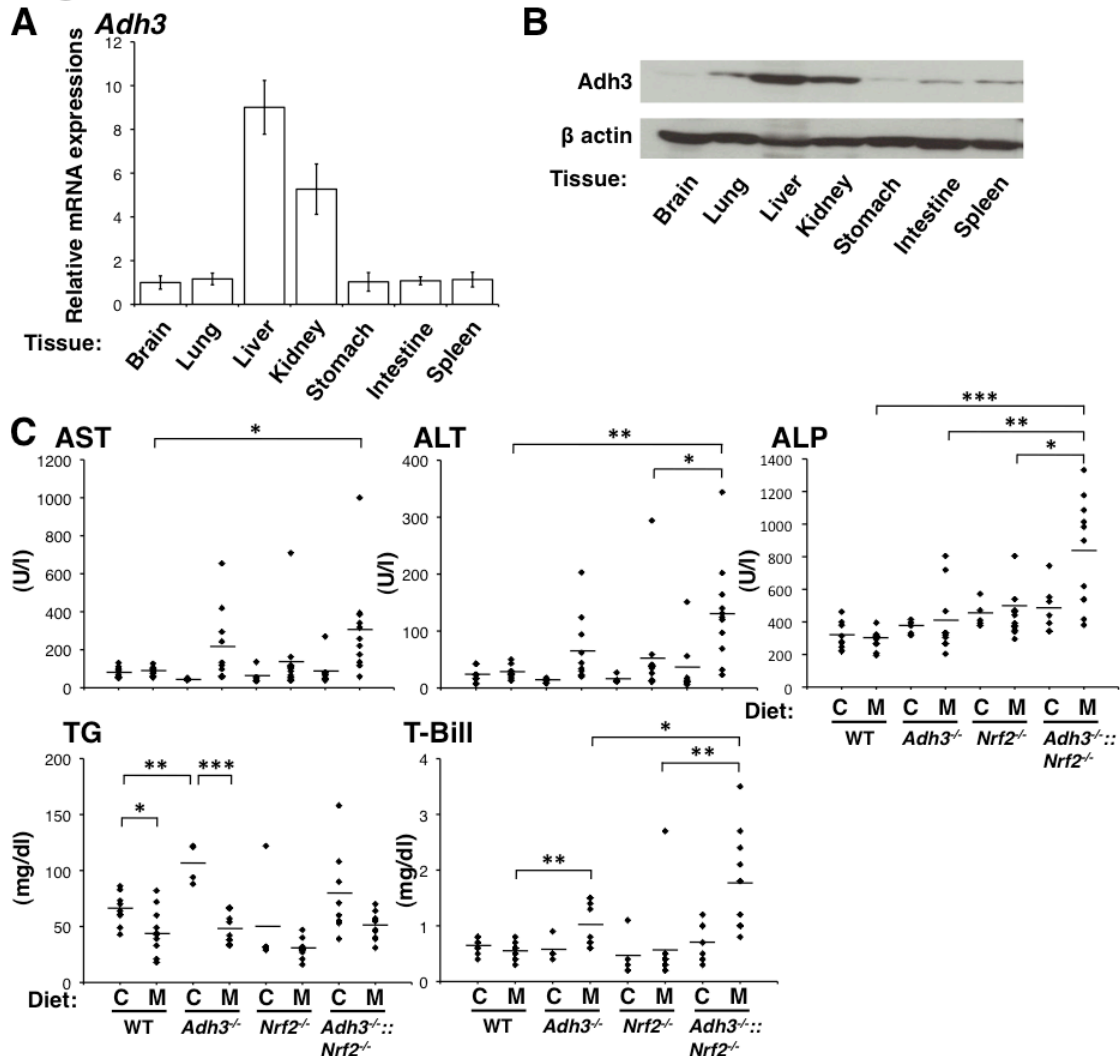


Fig. 3 MCD 食投与実験における血液生化学的解析

A 野生型マウスの様々な臓器（脳、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、脾臓）における *Adh3* の発現（ $n=3$ ）。脳の遺伝子発現を 1 とした。

B ウェスタンブロットによる野生型マウスの様々な臓器（脳、肺、肝臓、腎臓、胃、小腸、脾臓）における *Adh3* のタンパク量の定量。全抽出で検出しており、コントロールとして β アクチンを用いている。

C コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損、*Adh3*;*Nrf2* 二重欠損マウスにおける血液生化学的な解析。食餌は C:コントロール食、M:MCD 食を示している。グラフ中の線はそれぞれの平均値を示している。いずれの遺伝子型も、コントロール食を投与したマウスは $n \geq 5$ 、MCD 食を投与したマウスは $n \geq 10$ である（* $P < 0.05$ ** $P < 0.005$ *** $P < 0.0005$ ）

Fig. 4

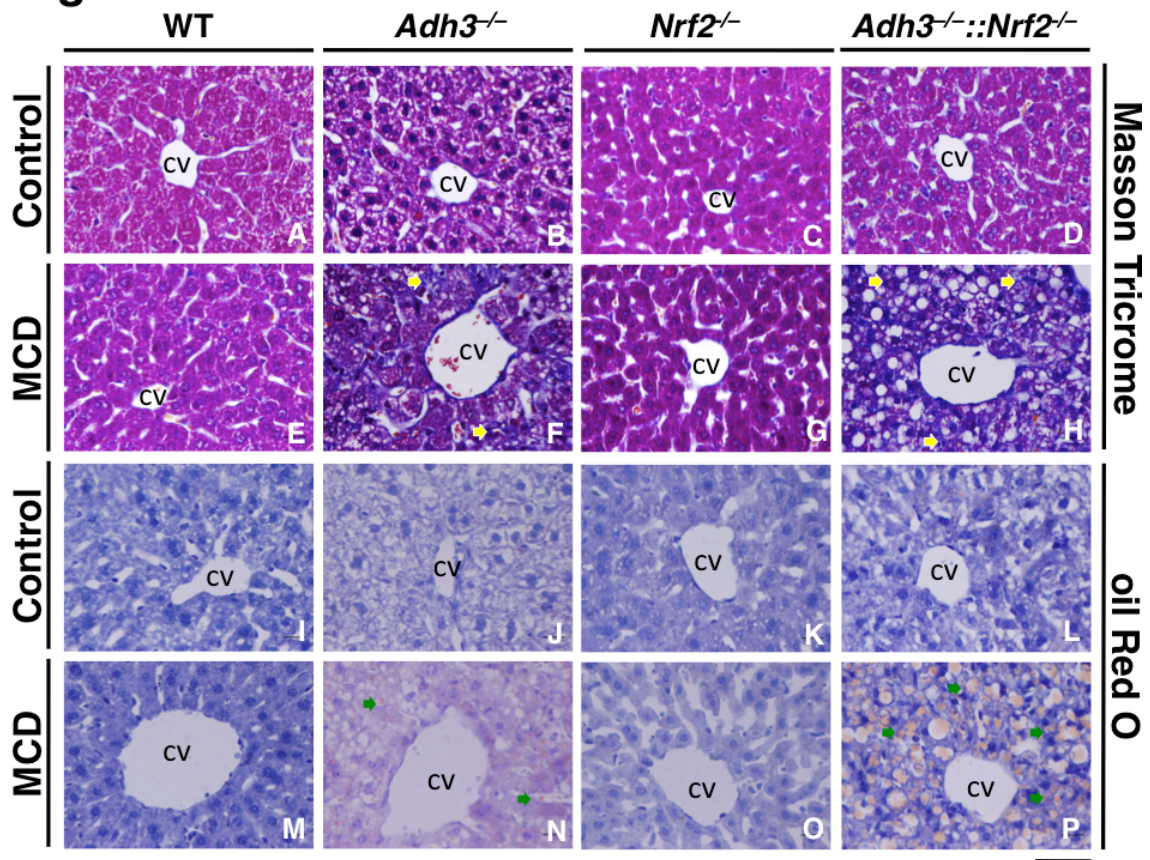


Fig. 4 MCD 食投与実験における肝臓の組織学的解析

コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損、*Adh3::Nrf2* 二重欠損マウスにおける肝臓の組織学的解析。すべて 400 倍に拡大されており、スケールバーは 50μm である。cv は中心静脈、黄色の矢印は炎症性細胞の浸潤（パネル F、H）、緑色の矢印は脂肪滴（パネル N、P）を示している。

Fig. 5

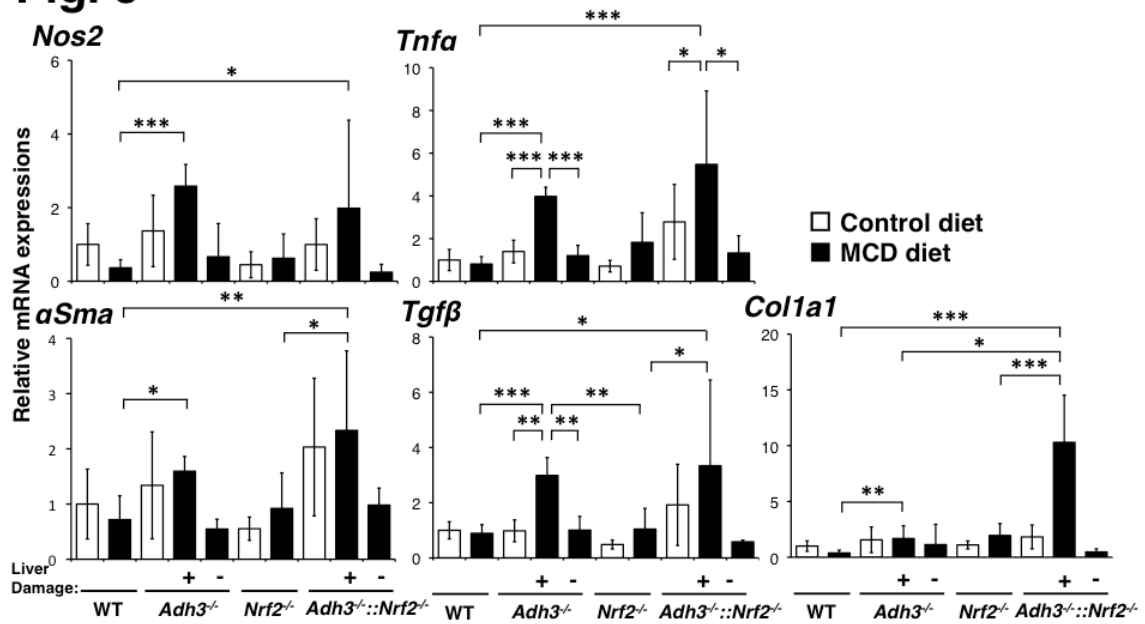


Fig. 5 コントロールもしくはMCD食投与実験における肝臓の炎症関連遺伝子発現

コントロールもしくはMCD食を投与した野生型、*Adh3*欠損、*Nrf2*欠損、*Adh3*::*Nrf2*二重欠損マウスにおける肝臓の炎症関連遺伝子の発現。すべての遺伝子で、コントロール食を投与した野生型マウスの遺伝子発現を1とした。MCD食を投与した*Adh3*欠損および*Adh3*::*Nrf2*二重欠損マウスにおいては、AST>200、ALT>50を示した個体を肝障害を発症したマウスとし、肝障害の有無でそれぞれ+と-に分けて解析した。いずれの遺伝子型も、コントロール食を投与したマウスはn≥5、MCD食を投与したマウスはn≥10 (*P<0.05 **P<0.005 ***P<0.0005)

Fig. 6

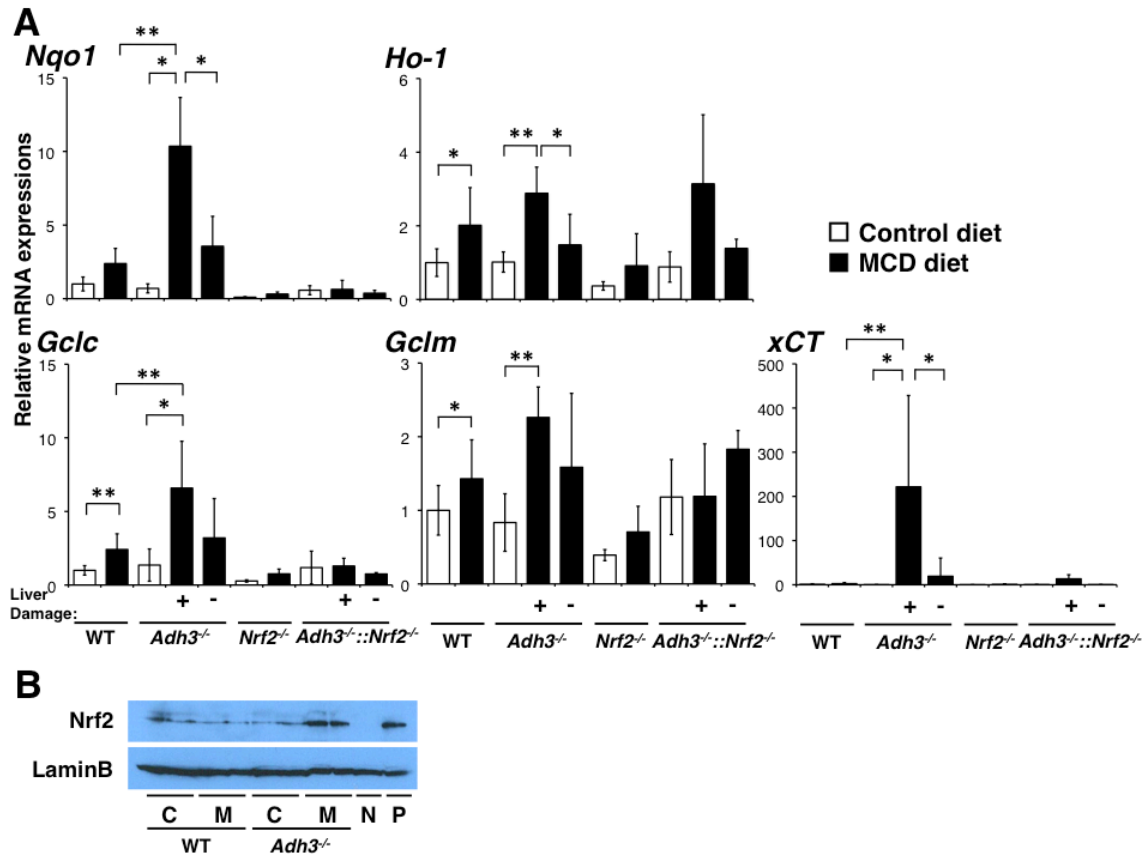


Fig. 6 コントロールもしくはMCD食投与実験における肝臓のNrf2標的遺伝子の発現

A コントロールもしくはMCD食を投与した野生型、*Adh3*欠損、*Nrf2*欠損、*Adh3*;*Nrf2*二重欠損マウスにおける肝臓のNrf2標的遺伝子の発現。すべての遺伝子で、コントロール食を投与した野生型マウスの遺伝子発現を1とした。MCD食を投与した*Adh3*欠損および*Adh3*;*Nrf2*二重欠損マウスにおいては、AST>200、ALT>50を示した個体を肝障害を発症したマウスとし、肝障害の有無でそれぞれ+と-に分けて解析した。いずれの遺伝子型も、コントロール食を投与したマウスはn≥5、MCD食を投与したマウスはn≥10 (*P<0.05 **P<0.005)

B コントロールもしくはMCD食を投与した野生型および*Adh3*欠損マウスの肝臓核分画におけるNrf2タンパクの発現。核抽出の泳動のコントロールとしてLaminBを使用した。C: コントロール食投与、M: MCD食投与、N: Negative control (*Nrf2*欠損マウス) P: Positive control (*Keap1*^{F/-}マウス)

Fig. 7

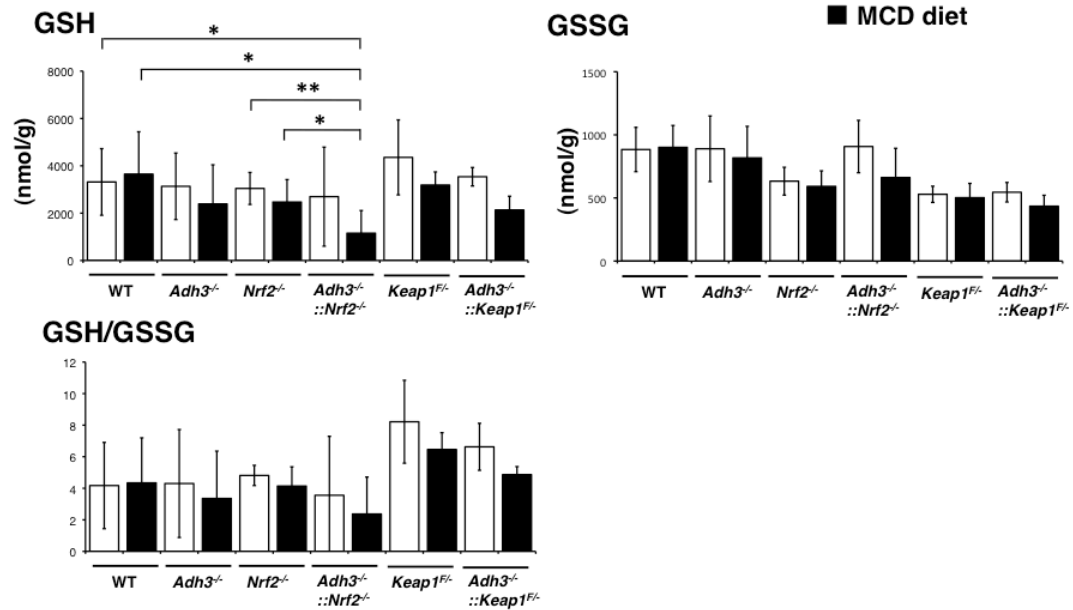


Fig. 7 コントロールもしくは MCD 食投与実験における肝臓のグルタチオン量の定量

コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損、*Adh3*::*Nrf2* 二重欠損、*Keap1*^{F/-}、*Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスにおける肝臓のグルタチオン（還元型グルタチオン、酸化型グルタチオン）量の定量。コントロールもしくは MCD 食を投与したマウスは野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損および *Adh3*::*Nrf2* 二重欠損マウスで n=6、*Keap1*^{F/-}および *Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/-}マウスで n=3 (*P<0.05 **P<0.005)

Fig. 8

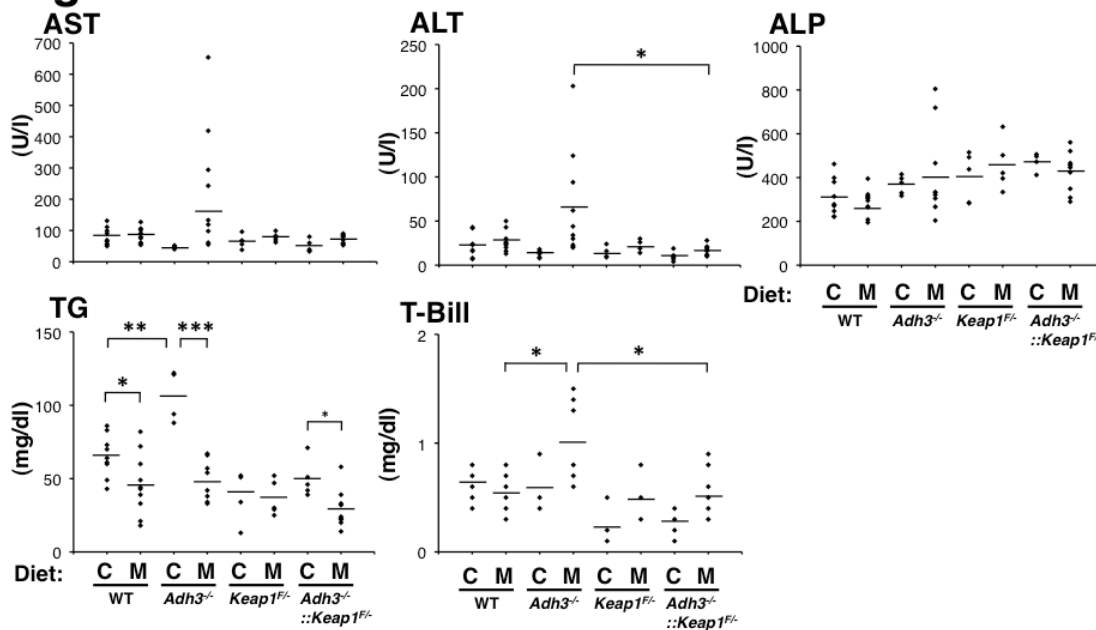


Fig. 8 MCD 食投与実験における血液生化学的解析

コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Keap1*^{F/F}、*Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/F} マウスにおける血液生化学的な解析。野生型および *Adh3* 欠損マウスは Fig. 3 と同じデータを使用している。食餌は C:コントロール食、M:MCD 食を示している。グラフ中の線は平均値を示している。いずれの遺伝子型も、コントロール食を投与したマウスは $n \geq 5$ 、MCD 食を投与したマウスは $n \geq 10$ (MCD 食を投与した *Keap1*^{F/F} マウスのみ $n=5$) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.005$ *** $P < 0.0005$)

Fig. 9

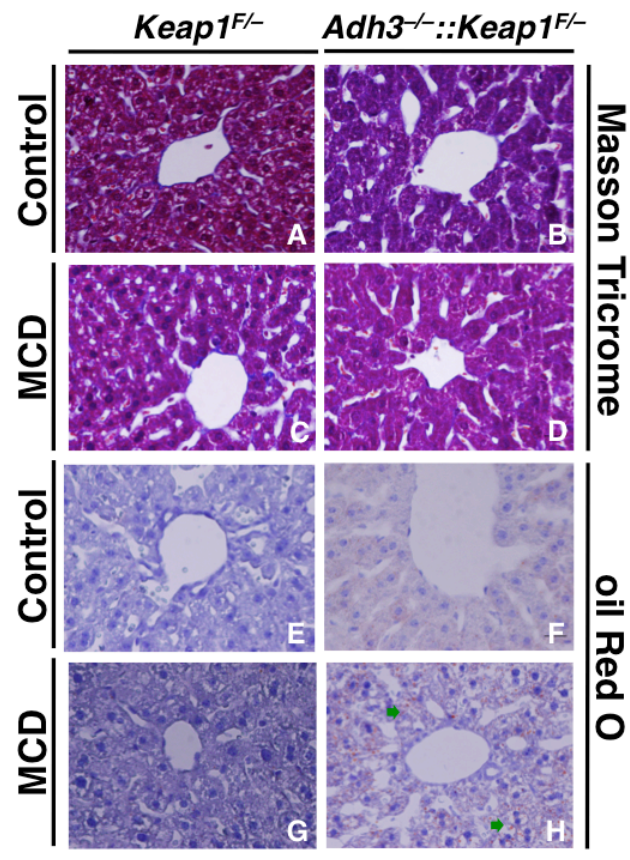


Fig. 9 MCD 食投与実験における肝臓の組織学的解析

コントロールもしくは MCD 食を投与した *Keap1^{F/-}* および *Adh3^{-/-}::Keap1^{F/-}* マウスにおける肝臓の組織学的解析。すべて 400 倍に拡大されており、スケールバーは 50 μ m である。cv は中心静脈、緑色の矢印は脂肪滴（パネル H）を示している。

Fig. 10

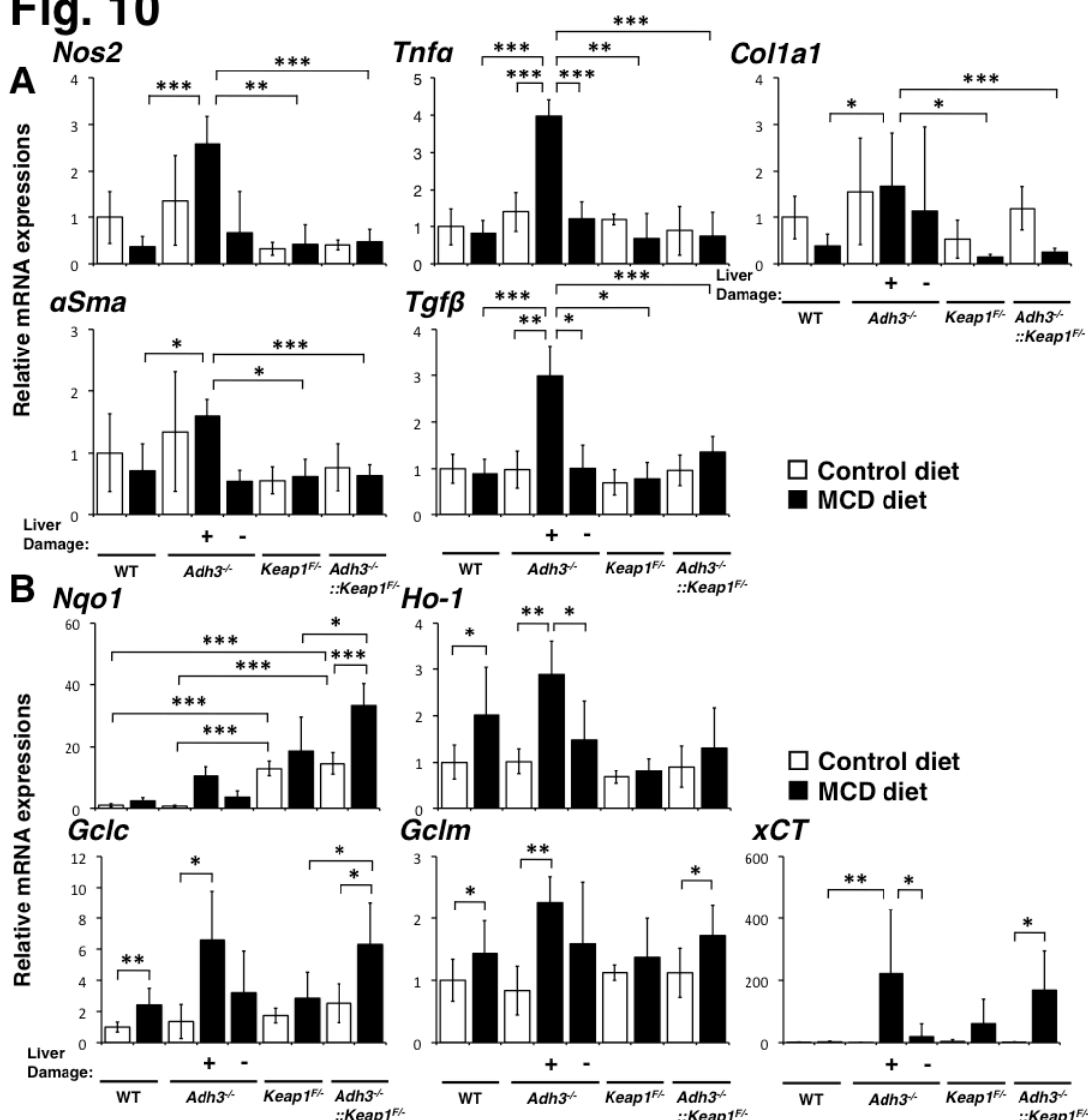


Fig. 10 MCD 食投与実験における Nrf2 標的遺伝子の発現

A コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Keap1*^{F/F-}、*Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/F-} マウスにおける肝臓の炎症関連遺伝子の発現。

B コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Keap1*^{F/F-}、*Adh3*^{-/-}::*Keap1*^{F/F-} マウスにおける Nrf2 標的遺伝子の発現。

A、B ともにすべての遺伝子で、コントロール食を投与した野生型マウスの遺伝子発現を 1 とした。野生型および *Adh3* 欠損マウスは Fig. 5 および 6 と同じデータを使用している。MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスにおいては、AST>200、ALT>50 を示した個体を肝障害を発症したマウスとし、肝障害の有無でそれぞれ+と-に分けて解析した。いずれの遺伝子型も、コントロール食を投与したマウスは n≥5、MCD 食を投与したマウスは n≥10 (MCD 食を投与した *Keap1*^{F/F-} マウスのみ n=5) (*P<0.05 **P<0.005 ***P<0.0005)

Table 1 血液生化学による肝障害を発症したマウスの割合

	WT	<i>Adh3</i> ^{-/-}	<i>Nrf2</i> ^{-/-}	<i>Adh3</i> ^{-/-} :: <i>Nrf2</i> ^{-/-}
Control Diet	0/10 0%	0/5 0%	0/5 0%	1/8 12.5%
MCD Diet	0/12 0%	5/11 45.4%	1/12 8.3%	7/11 63.6%

コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損、*Adh3*::*Nrf2* 二重欠損マウスにおける血液生化学的解析によって、ALT>50 U/l かつ AST> 200 U/l のマウスを、肝障害を示したマウスとして実際の匹数と割合を示した。いずれの遺伝子型もコントロール食 n≥5、MCD 食 n≥10 である。

Table 2 組織学的所見による肝障害重症度の指標

	Lipid droplet		Inflammatory cell infiltration		Fibrosis
-	None		None		None
±	Small droplet >100 per field	or	0~3 per field		None
+	Small droplet >100per field	and	3~5 per field	and	Limited fibrosis around central vein
++	Large droplet >40 per field	and	>5 per field	and	Extensive fibrosis

肝臓の組織学的所見による肝障害重症度の指標。顕微鏡における 400 倍で、一視野あたりの計測とする。

Table 3 組織学的所見における重症度評価（％）

	WT	<i>Adh3</i> ^{-/-}	<i>Nrf2</i> ^{-/-}	<i>Adh3</i> ^{-/-} :: <i>Nrf2</i> ^{-/-}
Control Diet	- 100%	- 100%	- 100%	- 37.5%
	± 0%	± 0%	± 0%	± 62.5%
	+ 0%	+ 0%	+ 0%	+ 0%
	++ 0%	++ 0%	++ 0%	++ 0%
MCD Diet	- 100%	- 60%	- 92.3	- 33.3%
	± 0%	± 0%	± 0%	± 0%
	+ 0%	+ 40%	+ 7.7%	+ 0%
	++ 0%	++ 0%	++ 0%	++ 66.7%

コントロールもしくは MCD 食を投与した野生型、*Adh3* 欠損、*Nrf2* 欠損、*Adh3*::*Nrf2* 二重欠損マウスにおける組織学的解析を、Table 2 の指標を基準として肝障害の重症度別の割合を表した。いずれの遺伝子型もコントロール食 n≥5、MCD 食 n≥10 である。