

グリコールアルデヒドによる小胞体ストレス誘導性  
アポトーシスに関する研究

本論文は 2014 年北海道薬科大学における博士（薬学）の  
学位取得のために提出し受理されたものである。

平成 25 年度

北海道薬科大学大学院薬学研究科  
生物薬学専攻 博士後期課程

佐 藤 恵 亮

## 目次

略語・略号表.....	1
緒言.....	3
<b>第1章 グリコールアルデヒド (GA) によるアポトーシスの誘導</b>	
第1節 序論.....	8
第2節 実験方法.....	9
第3節 実験結果.....	12
1. シュワン細胞の細胞生存率に対する GA の影響.....	12
2. シュワン細胞の細胞生存率に対するジカルボニル化合物の影響.....	14
3. GA による細胞傷害とアポトーシスとの関連性.....	15
第4節 考察.....	19
<b>第2章 グリコールアルデヒド (GA) による小胞体ストレスの誘導</b>	
第1節 序論.....	23
第2節 実験方法.....	25
第3節 実験結果.....	31
1. ミトコンドリアに対する GA の影響.....	31
2. ROS 産生量に対する GA の影響.....	32
3. 小胞体ストレスセンサーに対する GA の影響.....	34
4. オートファジーに対する GA の影響.....	35

5. 小胞体ストレス誘導性アポトーシス促進因子に対する GA の影響 ..	36
6. 膜受容体に対する GA の影響 .....	37
第 4 節 考察 .....	38
<b>第 3 章 グリコールアルデヒド (GA) によるストレス応答機構の誘導</b>	
第 1 節 序論 .....	43
第 2 節 実験方法 .....	45
第 3 節 実験結果 .....	49
1. GA による細胞傷害に対する NAC の影響 .....	49
2. 細胞内 GSH 量に対する GA の影響 .....	51
3. MRP1 発現量に対する GA の影響 .....	52
4. Keap1/Nrf2 システムに対する GA の影響 .....	54
5. Nrf2 ノックダウン細胞における GA の影響 .....	57
6. GA による細胞傷害に対する Keap1/Nrf2 システム活性化の影響 .....	58
第 4 節 考察 .....	59
総括 .....	64
謝辞 .....	67
参考文献 .....	68

## 略語・略号表

本論文においては以下の略語および略号を用いた（アルファベット順）

AGEs	糖化最終産物	advanced glycation end products
ATF6	活性化転写因子 6	activating transcription factor 6
CDF	カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン ジアセテート（5-, 6-混合物）	5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate
CHOP	C/EBP 類似タンパク質	C/EBP-homologous protein
3-DG	3-デオキシグルコソン	3-deoxyglucosone
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPBS	ダルベッコリン酸緩衝食塩水	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTNB	5,5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTPA	ジエチレントリアミン五酢酸	diethylenetriaminepentaacetic acid
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	エパルレスタット	epalrestat
FBS	ウシ胎児血清	fetal bovine serum
GA	グリコールアルデヒド	glycolaldehyde
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸 脱水素酵素	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素	$\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase
GO	グリオキサール	glyoxal
GSH	還元型グルタチオン	reduced glutathione
GSSG	酸化型グルタチオン	oxidized glutathione
HE	ヒドロエチジン	hydroethidine
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ-1	heme oxygenase-1
IRE1	イノシトール要求性酵素 1	inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1
Keap1	Kelch 様 ECH 結合タンパク質 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	乳酸脱水素酵素	lactate dehydrogenase
MG	メチルグリオキサール	methylglyoxal
MRP1	多剤耐性関連タンパク質 1	multidrug resistance-associated protein 1

MTS	3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)- 5-(3-カルボキシメトキシフェニル)- 2-(4-スルフォフェニル)- 二水素テトラゾリウム塩	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfohenyl)-2H-tetrazolium salt
NAC	<i>N</i> -アセチル-L-システイン	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
NADH	還元型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチド	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	還元型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリリン酸	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Nrf2	NF-E2 関連転写因子 2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	リン酸緩衝食塩水	phosphate-buffered saline
PERK	RNA 依存性プロテインキナーゼ様 ER キナーゼ	RNA-dependent protein kinase-like ER kinase
PI	ヨウ化プロピジウム	propidium iodide
ROS	活性酸素種	reactive oxygen species
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ	superoxide dismutase
TBS	トリス緩衝食塩水	Tris-buffered saline
TNF	腫瘍壊死因子	tumor necrosis factor

## 緒言

2012年の世界における糖尿病人口は3億7,100万人とみられており、2030年には5億5,200万人に急増すると予測されている（Fig. 1）<sup>1)</sup>。2012年の我が国における糖尿病人口は710万人とみられ、2030年には1,000万人を超えると予測されている。糖尿病自体は死因の上位ではないが、死因の上位を占める脳梗塞や心筋梗塞のリスクファクターであり、神経障害、腎症、網膜症といった糖尿病三大合併症を引き起こす。合併症の中でも糖尿病性神経障害は、比較的早期かつ高頻度に認められるが、自覚症状に乏しく軽視されやすい。しかし、痛みや異常感覚などの症状が出現すると治療が難しくQOLを著しく損なう疾患であり、発症早期からの進展阻止は大きな課題となっている。

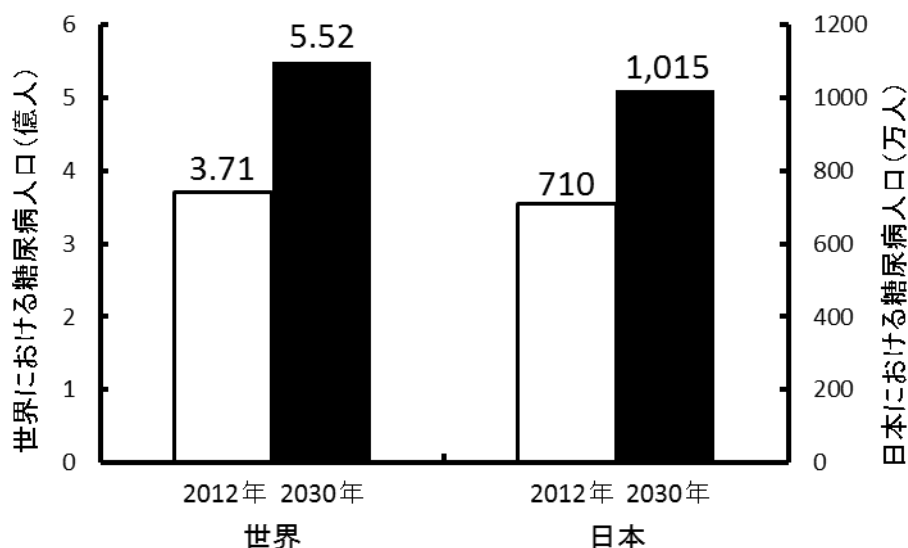


Fig. 1 世界および日本における糖尿病人口<sup>1)</sup>

糖尿病合併症が発症するメカニズムには、ポリオール代謝経路の活性化、プロテインキナーゼCの活性化、酸化ストレス、糖化反応の亢進などの関与が示唆されている<sup>2)</sup>。なかでも糖化反応の亢進は、糖尿病性神経障害の主要因であり、シュワン細胞の細胞死を引き起こすことが報告されている<sup>3)</sup>。シュワン細胞は、神経細胞の跳躍伝導に必須な神経組織構成細胞であり、神経損傷時の再生に重要な役割を担っている。シュワン細胞では、糖化反応が引

き金となって生成する糖化最終産物 advanced glycation end products (AGEs) の蓄積が確認されている<sup>4)</sup>。そのため、AGEs によるシュワン細胞の傷害が糖尿病性神経障害に関与していると考えられている<sup>5)</sup>。

糖化反応はグルコースなどの還元糖とタンパク質の非酵素的な結合に基づく反応（メイラード反応）である（Fig. 2）。還元糖のカルボニル基とタンパク質のアミノ基が反応してシッフ塩基を作り、アマドリ変換を経て比較的安定なアマドリ化合物を作る初期反応、高反応性の中間体が生じる中期反応、AGEs が生成する後期反応に区別される<sup>6)</sup>。糖化反応は、血中グルコース濃度に依存して起こり、タンパク質の翻訳後修飾として酵素タンパク質や構造タンパク質に様々な影響を及ぼし糖尿病の病態に関わっていると考えられている<sup>6)</sup>。アマドリ化合物であるヘモグロビン A1c は、糖尿病の診断基準や血糖コントロールの指標、評価に利用されている。



Fig. 2 糖化反応の概要

$\alpha$ -ヒドロキシアルデヒドであるグリコールアルデヒド (GA) は、糖化反応から AGEs が生成する過程で形成される (Fig. 3)。この過程では、幾つかの反応性に富む中間体が形成される<sup>7-9)</sup>。AGEs は生成経路の異なる AGE-1~6 に分類される<sup>10-12)</sup>。AGEs の前駆体としてメチルグリオキサール (MG)、グリオキサール (GO)、3-デオキシグルコソン (3-DG) などのジカルボニル化合物が広く知られているが<sup>7-9)</sup>、GA 由来の AGE-3 はジカルボニル化合物由来の AGEs よりも細胞傷害能が強いことが報告されている<sup>3)</sup>。さらに、炎症性組織ではアミノ酸の酸化促進によって GA の生成能が上昇することが知られている<sup>13)</sup>。しかし、GA が生体にどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。

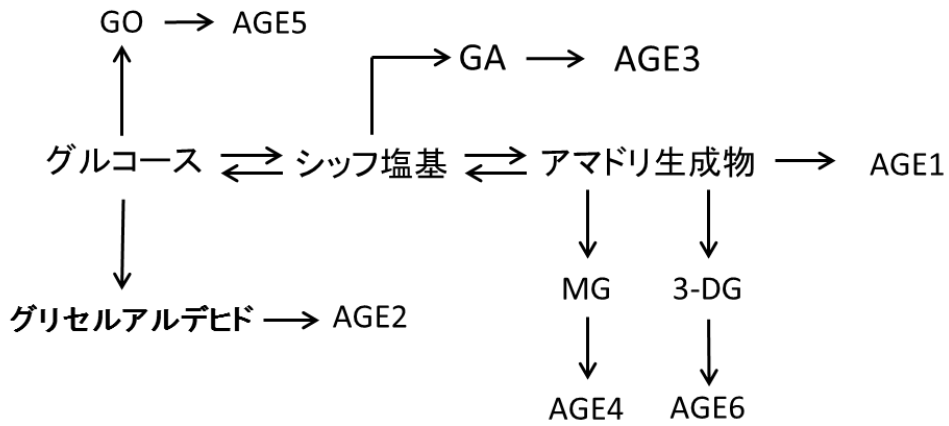


Fig. 3 糖化反応経路

糖尿病の根底には、酸化ストレスが関与していると考えられている。1980年代後半にグルコースの自動酸化や糖化反応に伴う活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) の産生が明らかにされて以来、糖尿病と酸化ストレスの関連性を示す多数の知見が報告されている。ジカルボニル化合物である MG は、シュワン細胞において酸化ストレスを誘導し、アポトーシスを惹起する<sup>14)</sup>。MG や AGEs が、ROS の産生や抗酸化酵素群の失活によりアポトーシスを誘導することが種々の培養細胞系で立証されている<sup>15-17)</sup>。アポトーシスにはミトコンドリア、小胞体、膜受容体を介する経路などが存在することが知られているが、MG や AGEs によるアポトーシスにはミトコンドリアを介する経路の関与が提唱されている<sup>18, 19)</sup>。即ちミトコンドリア傷害により、酸化ストレスが生じてアポトーシスに至ると考えられている。一方、近年になって小胞体ストレス応答経路の分子機構が次々と明らかになり、糖尿病の病態形成に小胞体ストレスによるアポトーシスが関与していることが報告されている<sup>20, 21)</sup>。しかし、MG のようなジカルボニル化合物や AGEs 等によるアポトーシス誘導への小胞体ストレスの関与については、現在までほとんど報告がなされていない。

小胞体ストレスは、糖化反応や SH 基の酸化などを受け、異常立体構造をもつ折り畳み不全タンパク質 (unfolded proteins) が小胞体内腔に蓄積する状態である<sup>22)</sup>。小胞体ストレスによるアポトーシス誘導機構を Fig. 4 に示す。小胞体ストレスが生じると、異常タンパク質を小胞体ストレスセンサーが感



知する<sup>23-25)</sup>。主な小胞体ストレスセンサーとして RNA-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK)、inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6) が知られている<sup>23-25)</sup>。小胞体ストレスセンサーは、オートファジーや転写因子である C/EBP-homologous protein (CHOP) を介したアポトーシスを誘導する<sup>26)</sup>。一方で、細胞はストレスに対抗するための防御機構を構築しており、小胞体ストレスなどの多種多様なストレスを緩和するために、ストレス応答機構を活性化する<sup>27-30)</sup>。ストレス応答機構として、Fig. 5 に示すような抗酸化酵素群や第 II 相解毒酵素群の発現誘導が起こる。なかでも、heme oxygenase-1 (HO-1) は、代表的なストレス応答タンパク質である。また、還元型グルタチオン (GSH) 生合成の律速酵素である  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) の発現も誘導される。さらに、薬物代謝酵素である GSH S-トランスフェラーゼ、薬物トランスポーターである multidrug resistance associated protein-1 (MRP1) など多くのストレス応答タンパク質の発現誘導が起こる。近年、これらストレス応答タンパク質の発現制御に Kelch-like ECH-associating protein 1/ nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1/Nrf2) システムが関与していることが示されている<sup>27-30)</sup>。

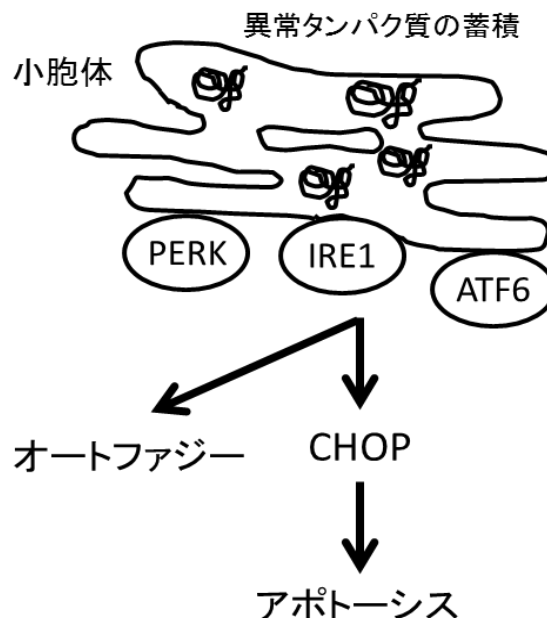


Fig. 4 小胞体ストレス誘導性アポトーシス

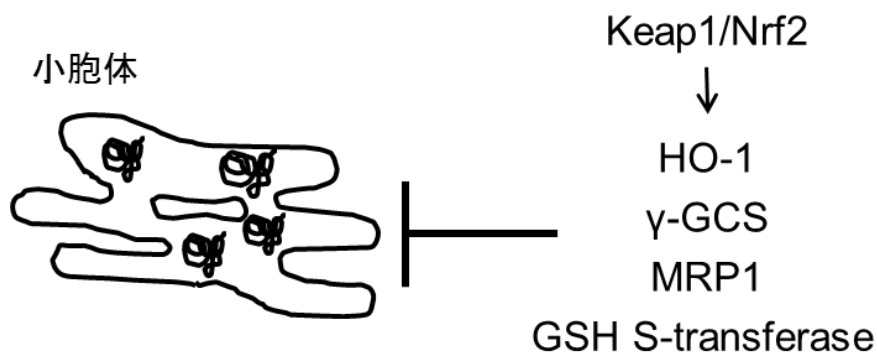


Fig. 5 ストレス応答機構

前述したように、GA が生体にどのような影響を及ぼしているのかは明らかではない。GA に関する研究報告はジカルボニル化合物に比べて圧倒的に少なく、健常人や糖尿病患者における血中濃度などについては報告されていない。ヒトの生体濃度 (physiological concentration) が 0.1~1 mM と推測している報告があり<sup>31-33)</sup>、これによると、ジカルボニル化合物の血中濃度 (数  $\mu\text{M}$ ~数十  $\mu\text{M}$ )<sup>34)</sup>と比較して高濃度に存在すると考えられる。一方、GA の細胞傷害能やジカルボニル化合物との比較を示した報告はなされていない。ヒト乳がん細胞において GA によるアポトーシス誘導を示す唯一の報告があるものの<sup>35)</sup>、シュワン細胞をはじめとする他の細胞系に対する GA の影響は不明である。

本研究では、末梢神経構成細胞であるシュワン細胞に及ぼす GA の各種影響について検討した。第 1 章では、GA による細胞傷害能、ジカルボニル化合物との比較、アポトーシスとの関連性について検討した。第 2 章では、GA によるアポトーシス誘導メカニズムを探る目的で、小胞体ストレス関連因子に対する影響を中心として検討を行った。第 3 章では、ストレス応答タンパク質に対する影響、並びにその発現を制御する Keap1/Nrf2 システムに着目して検討した。これらの結果、シュワン細胞において GA が小胞体ストレス誘導性アポトーシスを引き起こすという新規の知見が得られたので、以下に詳述する。

## 第 1 章 グリコールアルデヒド (GA) によるアポトーシスの誘導

### 第 1 節 序論

糖尿病性神経障害は、糖尿病三大合併症の 1 つであり、最も早期かつ高頻度で発症が認められる。シュワン細胞は、末梢神経の機能維持に重要な役割を果たしているが、糖尿病性神経障害ではシュワン細胞が傷害を受けることが知られている<sup>36)</sup>。血中グルコース濃度に依存して糖化反応が起こり、糖化反応の亢進がシュワン細胞の傷害を誘発し、糖尿病性神経障害の病態形成や進展に結びつくと考えられている<sup>37, 38)</sup>。

糖化反応から AGEs が生成する過程では、幾つかの反応性に富む中間体が形成される<sup>7-9)</sup>。中間体として MG、GO、3-DG などのジカルボニル化合物が広く知られている<sup>7-9)</sup>。また、GA やグリセルアルデヒドなどの  $\alpha$ -ヒドロキシアルデヒドも挙げられる<sup>7-9)</sup>。ジカルボニル化合物については、糖尿病合併症との関連性を示す報告がなされている。例えば、細胞傷害能はグルコースや AGEs よりもジカルボニル化合物の方が強いことや<sup>6)</sup>、ジカルボニル化合物の中でも MG の作用が最も強いこと<sup>39)</sup> が報告されている。また、健常人に比べ糖尿病患者では、血中 MG 濃度が上昇している<sup>34)</sup>。一方、 $\alpha$ -ヒドロキシアルデヒドである GA は、ヒトの生体濃度が 0.1~1 mM と報告されており<sup>31-33)</sup>、ジカルボニル化合物の血中濃度 (数  $\mu$ M~数十  $\mu$ M)<sup>34)</sup> と比較して高濃度に存在する。GA は糖化反応のみではなく、活性化されたリンパ球系細胞においてミエロペルオキシダーゼを介してセリンから生成され、炎症時 GA 生成能は上昇する<sup>14)</sup>。しかしながら、GA が生体にどのような影響を及ぼしているのかは明らかではない。

糖尿病性神経障害にはシュワン細胞の傷害が重要であることは既に述べたが、ラットシュワン細胞において MG がアポトーシスを誘導することが実証されている<sup>15)</sup>。さらに、MG によるアポトーシス誘導は、シュワン細胞だけではなく、他の培養細胞系においても認められる。例えば、ヒト網膜周皮細胞<sup>40)</sup>、ヒト単球性白血病細胞<sup>41)</sup>、褐色細胞<sup>42)</sup>、ヒト大動脈内皮細胞<sup>38)</sup> やウシ大動脈内皮細胞<sup>43)</sup> などがある。また、AGEs によるアポトーシス誘導は、

ラットシュワン細胞をはじめヒト線維芽細胞<sup>44)</sup>、ウシ網膜周皮細胞<sup>45)</sup>、ヒト尿細管細胞<sup>46)</sup>、ヒトメサングウム細胞<sup>47)</sup>、ラット骨芽細胞<sup>48)</sup>で起こる。これらの報告から、長期間の高血糖状態により増加した MG や AGEs によって、アポトーシスが進行し、糖尿病性神経障害をはじめとする糖尿病合併症の進展に結びつくと考えられる。一方、GA については、ヒト乳がん細胞においてアポトーシス誘導を示す報告が唯一あるものの<sup>35)</sup>、シュワン細胞を含め、ヒト乳がん細胞以外の細胞に対する GA の影響は明らかにされていない。

本研究では、シュワン細胞を用い、GA の影響について検討した。第 1 章では、ラットシュワン細胞を GA で処理し、その細胞傷害能を評価し、MG などのジカルボニル化合物との比較検討を行った。続いて、GA がシュワン細胞のアポトーシスを誘導する可能性について、アポトーシスの形態学的特徴である細胞膜構造の変化、DNA の断片化、また生化学的特徴であるカスパーゼの活性化を指標として検討した。

## 第 2 節 実験方法

### 1. 試薬

GA (二量体) は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。GO (40% 水溶液) は、関東化学株式会社 (東京) より、3-DG、Hoechst 33258 は株式会社同仁化学研究所 (熊本) より、MG (40% 水溶液) は、ナカライテクス株式会社 (京都) より購入した。CellTiter96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Proliferation Assay は、プロメガ株式会社 (東京) より購入した。パラホルムアルデヒド (4%) リン酸バッファーは、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Annexin-V-FLUOS staining kit は、Roche (Indianapolis, IN, USA) より、ウサギ由来抗 cleaved caspase-3 抗体、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 標識抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、L-グルタミン溶液、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) / トリプシン溶液は Life Technologies

Corporation (Carlsbad, CA, USA) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Cambrex Co. (East Rutherford, NJ, USA) より、blocking agent は GE Healthcare UK Ltd. (Little Chalfont, UK) より購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を使用した。

## 2. 細胞培養と GA 処理

細胞は、大日本住友製薬株式会社 (大阪) から購入したラットシュワン細胞を使用した。培地として DMEM に 10% FBS、2 mM L-グルタミン、ペニシリン (200 U/mL)、ストレプトマイシン (200 µg/mL) を添加したのを用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air) 内で培養した。本研究では、3~20 継代のシュワン細胞を用いた。

GA 処理は、以下のように行った。シャーレ (直径 6 cm) あるいはマルチウェルプレートにシュワン細胞を播種し、コンフルエント状態まで培養した。培地を 2% FBS を含む DMEM に交換後、GA (100~500 µM) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーション (0~24 時間) 後、GA を含む溶液を除き、細胞を DPBS で洗浄して測定に用いた。

## 3. 細胞傷害

GA による細胞傷害能の評価は、生細胞数と相関性を示すテトラゾリウム塩 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) -2 H-tetrazolium salt (MTS) の還元能および死細胞数と相関する乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出を指標として行った。

MTS 還元能：生細胞の NAD(P)H デヒドロゲナーゼや NAD(P)H によって MTS が還元されて生成するホルマザンを指標にした<sup>49)</sup>。96 well plate にて培養したシュワン細胞に GA を添加し CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーション (0~24 時間) 後、GA を含む溶液を除き、37°C に加温しておいた DMEM (FBS free) 250 µL/well で細胞を洗浄した。次いで、DMEM (FBS free) 100 µL を加え、CellTiter96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Proliferation Assay 溶液を 10 µL/well 添加し、37 °C で 1 時間インキュベーションした。その後、490 nm の吸光度を microplate reader (Labsystems Multiskan Bichromatic、大阪) によ

り測定した。

LDH 漏出：12 well plate にて培養したシュワン細胞に GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーション後、培地中へ漏出した LDH の活性（細胞外 LDH 活性）と細胞内に残存する LDH の活性（細胞内 LDH 活性）を測定した。培地の一部を細胞外 LDH 活性の測定用試料とした。細胞を 0.1% TritonX-100 含有 PBS（1 mL）を加えて十分に攪拌して可溶化した。遠心後の上清を細胞内 LDH 活性の測定用試料とした。LDH 活性は、試料を 0.62 mM ピルビン酸ナトリウム含有 50 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.5）に添加後、0.2 mM NADH を加えて反応を開始し、340 nm における吸光度の変化から求めた。LDH の漏出は次の式から求めた。LDH 漏出（%）＝細胞外 LDH 活性 / （細胞外 LDH 活性＋細胞内 LDH 活性）×100

#### 4. アポトーシスの生化学的変化

アポトーシスの生化学的特徴であるカスパーゼ 3 の活性化は、抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、氷冷メタノールを用いて細胞透過処理を行った。その後、0.5% blocking agent でブロッキング処理を行い、同溶液で希釈した抗 cleaved caspase-3 抗体（1:200）と室温で 1 時間インキュベーションし、次いで、Alexa Fluor 488 で標識した抗ウサギ IgG 抗体（1:1,000）を 2 次抗体として、室温で 30 分インキュベーションした。EDTA/トリプシン溶液を添加して細胞を剥離し、遠心分離して上清を除去した。細胞沈渣を DPBS で懸濁し、セルストレーナーチューブでろ過した。Alexa Fluor 488 の蛍光は、フローサイトメーター Gallios（Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA）（FL-1 チャネル：530 nm）を用いて測定した。

#### 5. アポトーシスの形態学的変化

アポトーシスの形態学的特徴を細胞膜構造の変化および DNA の断片化を指標に解析した。

細胞膜構造の変化：細胞膜構造の変化を示すホスファチジルセリンの細胞膜表面への露出について解析するために Annexin-V-FLUOS staining kit を使用した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に GA (250, 500  $\mu$ M) を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーション (0~24 時間) した。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、Annexin-V-FLUOS 溶液を加え、室温で 30 分インキュベーションし、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, BRD) (励起波長：488 nm, 555 nm) およびフローサイトメーター (FL-1 チャンネル：530 nm、FL-2 チャンネル：585 nm) で測定した。

DNA の断片化：ヘキスト染色により評価した。12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。その後、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、氷冷メタノールを用いて細胞透過処理した。Hochest33258 の DPBS 溶液を加え、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長：405 nm) で測定した。

## 6. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。F 検定による等分散の検定後、t 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 第 3 節 実験結果

### 1. シュワン細胞の細胞生存率に対する GA の影響

ラットシュワン細胞を GA (100, 250, 500  $\mu$ M) で処理し、経時的に細胞生存率を測定した (Fig. 6)。細胞生存率は MTS 還元能を指標にした。MTS はテトラゾリウム塩であり、生細胞によりホルマザンへ還元される<sup>49)</sup>。GA 100  $\mu$ M では、細胞生存率に影響は見られなかった。GA 250  $\mu$ M では、16 時間および 24 時間において有意な低下が認められた。GA 500  $\mu$ M では、16 時間以降細胞生存率は著しく低下した。これらの結果から、GA は濃度および時間依存的にシュワン細胞の生存率を減少させることが明らかになった。Fig. 7

に、死細胞の指標である LDH 漏出を測定した結果を示す。GA 500  $\mu\text{M}$  処理 24 時間において、顕著な LDH 漏出が認められた。これらの結果から、シュワン細胞は GA により細胞傷害を起こすことが明らかとなった。

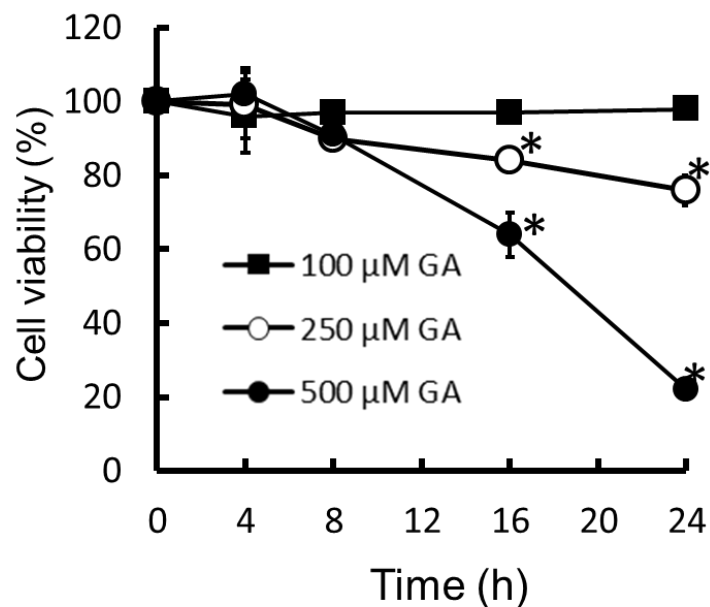


Fig. 6 細胞生存率に対する GA の影響

シュワン細胞を 100、250、500  $\mu\text{M}$  の GA で 0~24 時間処理した。細胞生存率は、MTS 還元能を指標とした。各測定時間におけるコントロール (GA 未処理細胞) の値を 100%として細胞生存率を表した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=6) で示している。\* $p < 0.05$  : コントロールと比較。



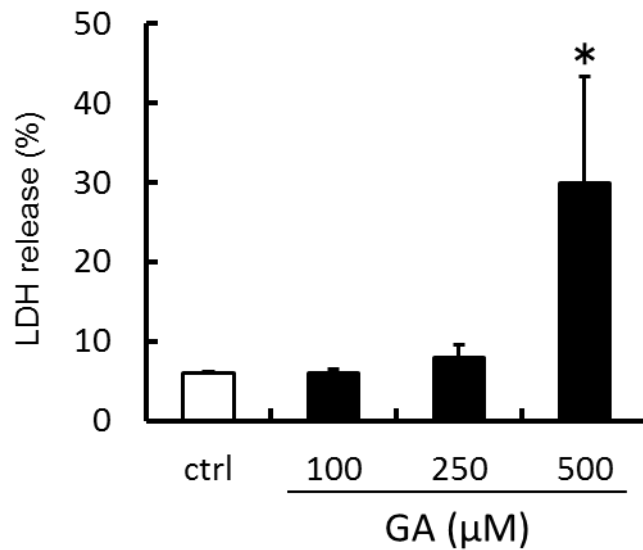
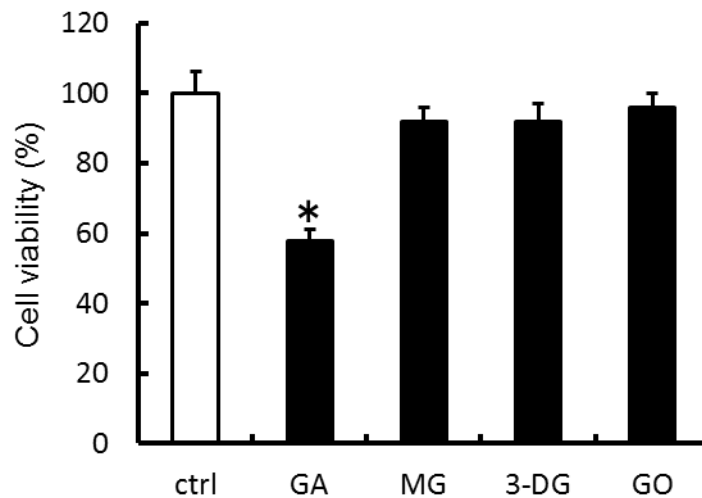


Fig. 7 LDH の漏出に対する GA の影響

シュワン細胞を 100、250、500 μM の GA で 24 時間処理した。LDH 漏出 (%) = 細胞外 LDH 活性 / (細胞外 LDH 活性 + 細胞内 LDH 活性) × 100 として評価した。データは、平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p < 0.05$  : コントロールと比較。

## 2. シュワン細胞の細胞生存率に対するジカルボニル化合物の影響

シュワン細胞に対する GA およびジカルボニル化合物 (MG, GO, 3-DG) の細胞傷害能について比較検討した。シュワン細胞を 500 μM の GA およびジカルボニル化合物で 24 時間処理後、細胞生存率を測定した (Fig. 8)。細胞生存率は、GA 処理では有意に低下するのに対し、MG、GO、3-DG 処理では有意な低下は認められなかった。シュワン細胞において、GA はジカルボニル化合物よりも細胞傷害能が強いと考えられる。



**Fig. 8** 細胞生存率に対するジカルボニル化合物の影響

シュワン細胞を 500  $\mu\text{M}$  の GA またはジカルボニル化合物で 24 時間処理した。細胞生存率は、MTS 還元能を指標とした。各測定時間におけるコントロール(未処理細胞)の値を 100%として細胞生存率を表した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=6) で示している。\* $p < 0.05$  : コントロールと比較。

### 3. GA による細胞傷害とアポトーシスとの関連性

GA によるシュワン細胞の細胞傷害にアポトーシスが関与する可能性について検討した。アポトーシスの形態学的特徴である細胞膜構造の変化、DNA の断片化、また生化学的特徴であるカスパーゼの活性化を指標として解析した。

初めに、アネキシン V およびヨウ化プロピジウム (PI) の二重染色を行い、細胞膜構造の変化について、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて解析した。アネキシン V および PI の二重染色法は、細胞膜構造の変化に基づいて細胞死様式を判定する方法である。細胞がアポトーシスに向かう早期の過程では、ホスファチジルセリンが細胞膜表面へ移行し、これにアネキシン V が結合して蛍光強度の上昇を示す。一方、アポトーシスが進行すると、細胞膜構造は崩壊するため、PI が細胞内へ侵入して核と結合し、PI の蛍光強度も増強する。即ち、生細胞ではアネキシン V、PI の蛍光は共に陰性であるが、アポトーシスの初期段階 (早期アポトーシス) ではアネキシ

ン V の蛍光は陽性、PI の蛍光は陰性を示し、アポトーシスが進んだ段階（後期アポトーシス）ではアネキシン V、PI の蛍光は共に陽性になる。シュワン細胞を GA（100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ）で 24 時間処理し、アネキシン V および PI の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した（Fig. 9）。コントロール細胞、GA 100  $\mu\text{M}$  処理細胞、GA 250  $\mu\text{M}$  処理細胞では、アネキシン V、PI 共に蛍光を示さなかった。一方、細胞傷害が顕著であった GA 500  $\mu\text{M}$  処理細胞では、アネキシン V のみ蛍光を示す細胞、アネキシン V および PI の両蛍光を示す細胞が観察された。この結果は、シュワン細胞を GA 500  $\mu\text{M}$  で 24 時間処理すると、早期アポトーシス細胞と後期アポトーシス細胞が混在していることを示唆している。

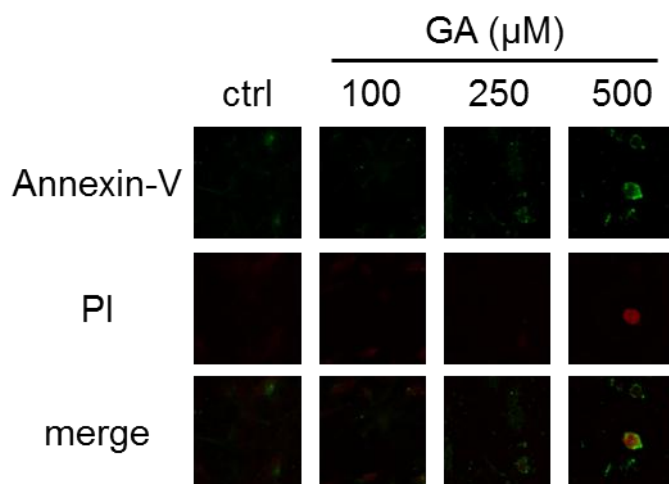


Fig. 9 細胞膜構造の変化に対する GA の影響

シュワン細胞を 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  の GA で 24 時間処理した。アネキシン V および PI の二重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡により評価した。緑の蛍光はアネキシン V、赤の蛍光は PI の蛍光を示す。

次に、GA 処理により、生細胞から早期アポトーシス細胞、後期アポトーシス細胞へ至る経時的変化を追跡する目的で、シュワン細胞を GA 500  $\mu\text{M}$  で 4~24 時間処理し、フローサイトメーターを用いて検討した。フローサイトメトリー解析は細胞集団の蛍光強度の分布を評価するものであり、Fig. 10 は各パネルを分割して表した。生細胞は領域 A（アネキシン V 陰性、PI 陰性）に、早期アポトーシス細胞は領域 B（アネキシン V 陽性、PI 陰性）に、後期

アポトーシス細胞は領域 C (アネキシン V 陽性、PI 陽性) に分布すると考えられる。GA 未処理のコントロールでは 93% の細胞が領域 A に分布した。GA (500  $\mu$ M) 処理では 4~16 時間において時間依存的に早期アポトーシス細胞の増加が認められた。また、16~24 時間では生細胞および早期アポトーシス細胞が減少し、後期アポトーシス細胞の増加が確認された。

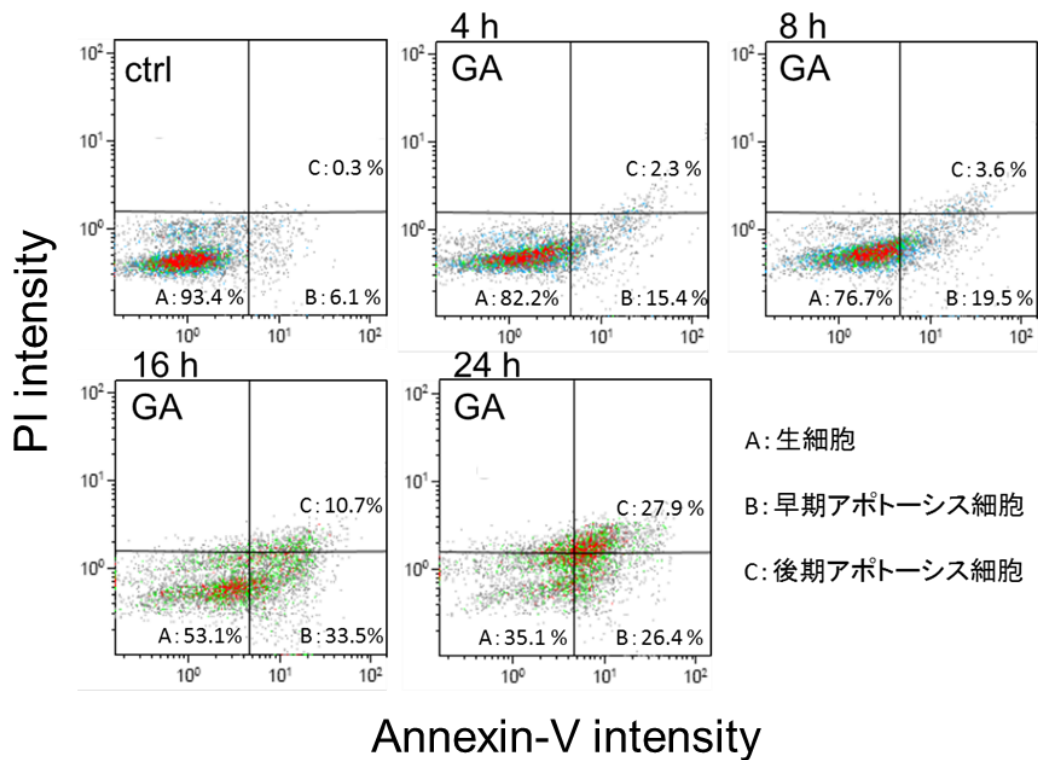


Fig. 10 細胞膜構造の変化に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu$ M の GA で 24 時間処理した。アネキシン V および PI の二重染色を行いフローサイトメーターにより分析した。A 領域は生細胞、B 領域は早期アポトーシス、C 領域は後期アポトーシス細胞として評価した。

DNA の断片化について、ヘキスト染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により測定した (Fig. 11)。GA (500  $\mu$ M, 24 時間) 処理細胞では、DNA の断片化を示す青色蛍光が顕著に観察された。

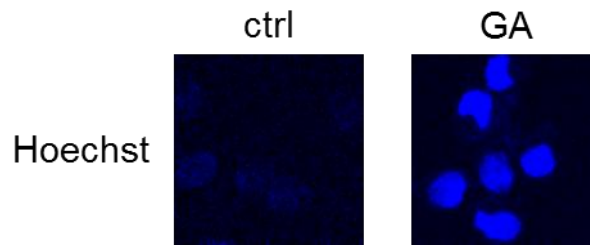


Fig. 11 DNA の断片化に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu\text{M}$  の GA で 24 時間処理した。DNA の断片化は、Hoechst 33258 を用い、共焦点レーザー顕微鏡により評価した。

次に、カスパーゼカスケードの下流に位置するアポトーシス実行酵素であるカスパーゼ-3 の活性をフローサイトメーターにより測定した (Fig. 12)。コントロール細胞と比較して GA (500  $\mu\text{M}$ , 24 時間) 処理細胞では、カスパーゼ-3 の活性化を示す領域 A から領域 B へのシフトが認められ、平均蛍光強度はコントロールの約 3 倍であった。

以上の結果より、GA によるシュワン細胞の細胞傷害にアポトーシスが関与していることが示唆された。

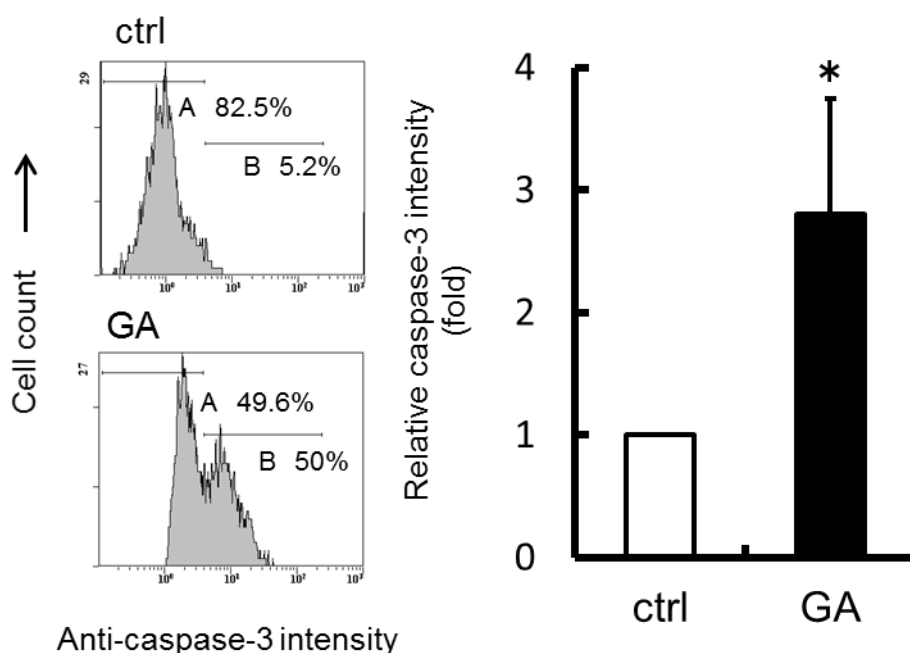


Fig. 12 カスパーゼ-3 に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。カスパーゼ-3 活性は、抗カスパーゼ-3 抗体を用いフローサイトメーターにより測定した。グラフは、コントロールの平均蛍光強度を 1 としたときの相対値で表した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p$ <0.05 : コントロールと比較。

#### 第 4 節 考察

第 1 章では、GA がラットシュワン細胞の細胞死を惹起し、この細胞死にアポトーシスが関与していることを示した。ラットシュワン細胞の細胞死誘導には 250  $\mu$ M および 500  $\mu$ M の GA 処理濃度を要した (Fig. 6)。本研究では、ラットシュワン細胞を 10% FBS 含有 DMEM で培養後、GA 添加時に培地を 2% FBS 含有 DMEM に交換し実験を行った。この場合、GA 添加直後、GA が培地中の血清タンパク質と相互作用し、何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられ、実験に先立ち、無血清 DMEM を用いて検討を行った。その結果、GA による細胞傷害能には 2% FBS 含有 DMEM および無血清 DMEM の条件下で違いは認められなかった (data not shown)。従って、GA と血清タ

ンパク質の相互作用は殆どないと考えられる。一方、添加した GA がどの程度細胞内に取り込まれるのかは明らかではないが、MG を培養細胞に添加した場合、細胞内に取り込まれる MG は僅か数%である<sup>50)</sup>。現在、GA のシュワン細胞内への取り込みについては検討中であるが、培地中に残存する GA を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いて測定したところ、取り込みの程度は 10%前後であるという結果が得られている。このことから、本実験では主に 500  $\mu\text{M}$  の GA を用いたが、細胞内に取り込まれる GA はかなり低濃度であると予想される。また、GA の生体濃度は 0.1~1 mM と推測されている<sup>31-33)</sup>。GA が細胞内外で生成することを考慮すると、本研究で用いた GA の濃度は生体内において存在しうる濃度と考えられる。

GA は濃度および時間依存的にシュワン細胞の細胞生存率を減少させた (Fig. 6)。糖化反応から AGEs が生成する過程では、 $\alpha$ -ヒドロキシアルデヒド化合物として GA だけでなくグリセルアルデヒドも形成される<sup>7-9)</sup>。グリセルアルデヒドの影響について検討した結果、シュワン細胞の生存率に対する影響は認められなかった (data not shown)。さらに、GA の細胞傷害能は、MG、GO、3-DG などのジカルボニル化合物に比べて強いことが明らかになった (Fig. 8)。これらの結果から、シュワン細胞は、糖化反応の中間体のなかでも GA に対する感受性が高いと示唆される。AGEs は生成経路により AGE-1~AGE-6 の 6 種類に分類される<sup>9)</sup>。その中で GA 由来の AGE は AGE-3 と示される。 $\alpha$ -ヒドロキシアルデヒド由来の AGEs は、ジカルボニル化合物由来の AGEs よりも細胞傷害能が強いことが報告されている<sup>3)</sup>。よって、GA 由来の AGE-3 の細胞傷害能は強いと考えられる。本研究において、GA によるシュワン細胞の傷害が GA により直接起こるのか、あるいは AGE-3 の生成を経て起こるのかについては明らかではない。GA (500  $\mu\text{M}$ ) によるシュワン細胞の細胞傷害は 16 時間および 24 時間で顕著に認められたが (Fig. 6, 7)、ヒト軟骨細胞において GA (500  $\mu\text{M}$ ) から AGE-3 が生成するまでに 24~48 時間のインキュベーション時間を要することが示されている<sup>51)</sup>。おそらく GA による細胞傷害には、AGE-3 ではなく、GA が直接関与していると推測される。

第 1 章では、シュワン細胞の細胞死が顕著であった 500  $\mu\text{M}$  GA で 24 時間

処理した条件を主に用いて、アポトーシスの関与の可能性について検討した。GA 処理 24 時間において、細胞膜構造の変化を示すホスファチジルセリンの細胞表面への露出 (Fig. 9) および DNA の断片化 (Fig. 11) が認められた。併せて、アポトーシス実行酵素とされるカスパーゼ-3 が活性化されることが明らかになった (Fig. 12)。アネキシン V および PI 二重染色法によるフローサイトメトリー解析では、GA 処理 24 時間までに、生細胞から早期アポトーシス、後期アポトーシス細胞へ至る経時的変化が認められた (Fig. 10)。この経時的変化は MTS 還元能により評価した細胞生存率の結果 (Fig. 6) に一致する。さらに、GA 処理 24 時間では細胞膜の損傷に伴う LDH 漏出が認められ、GA による細胞死が確認された (Fig. 7)。以上の結果は、GA がシュワン細胞においてアポトーシスを引き起こすことを示唆している。本章で得られた結果を Fig. 13 に示す。

ヒト乳がん細胞を用いた研究報告では GA が ROS 産生を増大し、このことがアポトーシス誘導に関係している可能性を示している。そのメカニズムは次の通りである；GA は細胞内で GSH を基質として glyoxalase により代謝され、ジカルボニル化合物である GO と superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) に変換される。さらに生じた GO は直接または hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) の増加を介して酸化ストレスによるアポトーシスを誘導する。シュワン細胞において、GO による生存率の低下は認められず (Fig. 8)、シュワン細胞とヒト乳がん細胞では GA により誘導されるアポトーシスのメカニズムが異なることが考えられる。

アポトーシスにはミトコンドリア、小胞体、膜受容体を介する経路などが知られている。MG および AGEs の場合、多種多様な培養細胞でアポトーシスが認められているが、多くの報告はミトコンドリアの傷害が引き金となり、ROS 生成が増大し、アポトーシスに至るメカニズムを示している。当研究室においても、ヒトおよびウシ血管内皮細胞において MG がアポトーシスを誘導する過程では、ミトコンドリア膜電位の低下に続き、ROS 量が上昇することを確認している<sup>42, 43</sup>)。一方、GA がアポトーシスを誘導する過程における、ミトコンドリア、小胞体や膜受容体に対する影響については、ヒト乳がん細胞を含めて全く報告されていない。



そこで次章では、シュワン細胞における GA のアポトーシス誘導機構について、GA がミトコンドリア、小胞体、膜受容体に及ぼす影響、ROS 産生に対する影響について検討した。

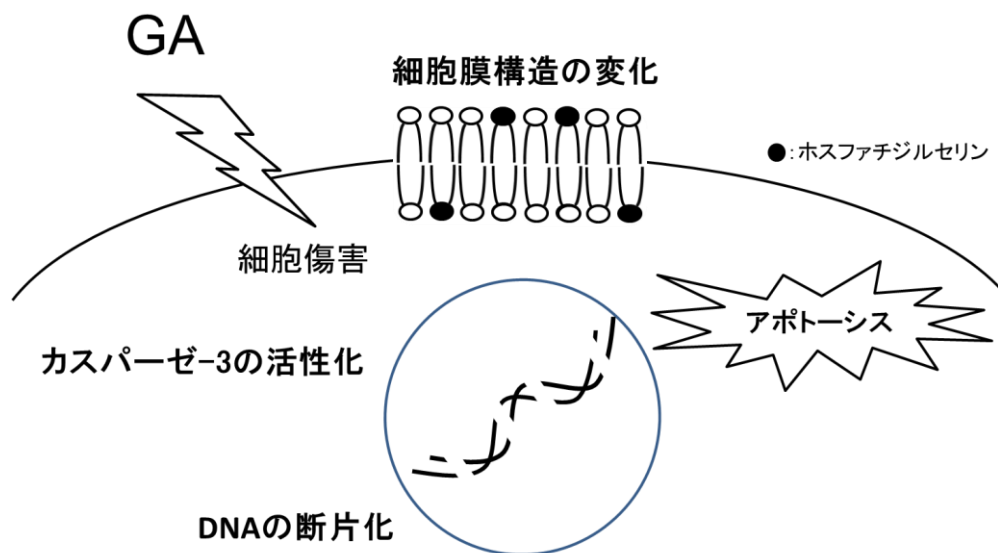


Fig. 13 GA によるアポトーシスの誘導

## 第2章 グリコールアルデヒド (GA) による小胞体ストレスの誘導

### 第1節 序論

アポトーシスは、ミトコンドリアの傷害により引き起こされるミトコンドリア依存性の経路、小胞体や膜受容体を介するミトコンドリア非依存性の経路に大別される。糖化反応により生成する MG などのジカルボニル化合物や AGEs により誘導されるアポトーシスには、ミトコンドリア依存性経路の関与が報告されている。ROS の産生や抗酸化酵素の失活によりミトコンドリアが傷害を受け、傷害を受けたミトコンドリアから ROS が派生し、酸化ストレスに起因したアポトーシスを生じると考えられている。MG は、タンパク質との非酵素的反応により MG ラジカルとなり、このラジカルの自動酸化によって  $O_2^{\cdot-}$  を生成する<sup>52)</sup>。また、Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) や GSH peroxidase などの抗酸化酵素の活性低下を引き起こす<sup>53)</sup>。シュワン細胞を用いた研究報告では、MG による細胞内 ROS の増大<sup>14)</sup>、AGEs によるミトコンドリアの傷害が示されている<sup>19)</sup>。他の培養細胞系においても ROS の増大やミトコンドリアの傷害を示す報告がなされており、これらの報告は、いずれも MG や AGEs が酸化ストレスを介してアポトーシスを誘導するメカニズムを提唱している<sup>15-18)</sup>。

第1章では、GA がシュワン細胞のアポトーシスを誘導することを示した。ヒト乳がん細胞の場合、GA によるアポトーシスに ROS の関与が示唆されている<sup>35)</sup>。しかし、GA がミトコンドリアの傷害を起こしているのか、あるいはミトコンドリア非依存性経路である小胞体や膜受容体を介してアポトーシスを生じているのかは不明である。

近年、小胞体ストレス応答経路の分子機構が次々と明らかになり、糖尿病をはじめ、がん、炎症性疾患、パーキンソン病などの神経変性疾患など多様な疾患の病態形成への関与が示唆されている<sup>54,55)</sup>。最近では、2型糖尿病患者において、膵β細胞の生細胞数が減少していることが明らかになってきており<sup>56)</sup>、膵β細胞の生細胞数低下の一因として、小胞体ストレスによるアポ

トーシスが注目されている。

小胞体は、タンパク質合成の場であり、合成されたタンパク質はゴルジ体へ輸送される。しかし、小胞体は細胞内外からのストレスを受けやすく、合成過程のタンパク質が糖化反応や SH 基の酸化などを受けると、異常立体構造を持つタンパク質である **unfolded proteins** が蓄積する結果を招く。そのため小胞体の機能は一時的に低下するが、一方で小胞体の機能を改善、維持するために **unfolded proteins** を分解するオートファジー機構や小胞体ストレス応答機構が働く。しかし、過度のストレスが起こり小胞体ストレス応答機構を上回ると、アポトーシス経路が活性化されて細胞死に至る。このような小胞体ストレス誘導性アポトーシスが広範囲に及んだ場合、種々の病態形成を引き起こすことが近年明らかになってきている。

小胞体内腔に **unfolded proteins** が蓄積した状態を小胞体ストレスと呼びであるこれを小胞体ストレスセンサーが感知する (Fig. 14)。小胞体ストレスセンサーとして **PERK**、**IRE1**、**ATF6** が知られており、これら 3 つのセンサーのいずれかが活性化される。**PERK** および **IRE1** はリン酸化されることで、**ATF6** は断片化されることで活性化される。これらのセンサーが活性化されると、**unfolded proteins** を分解するオートファジー機構が働く。オートファゴソーム(オートファジー小胞)が形成され、自食作用により **unfolded proteins** が分解排除される。一方、過度の小胞体ストレスが生じると、ストレスセンサーによりアポトーシス誘導因子である **CHOP** が活性化され、アポトーシスが実行される<sup>26)</sup>。現在までに、**AGEs** が小胞体ストレスを起こすことを示すいくつかの報告がある<sup>51,57)</sup>。しかし、**MG** などのジカルボニル化合物、あるいは **GA** については、小胞体ストレスとの関連性は報告されていない。

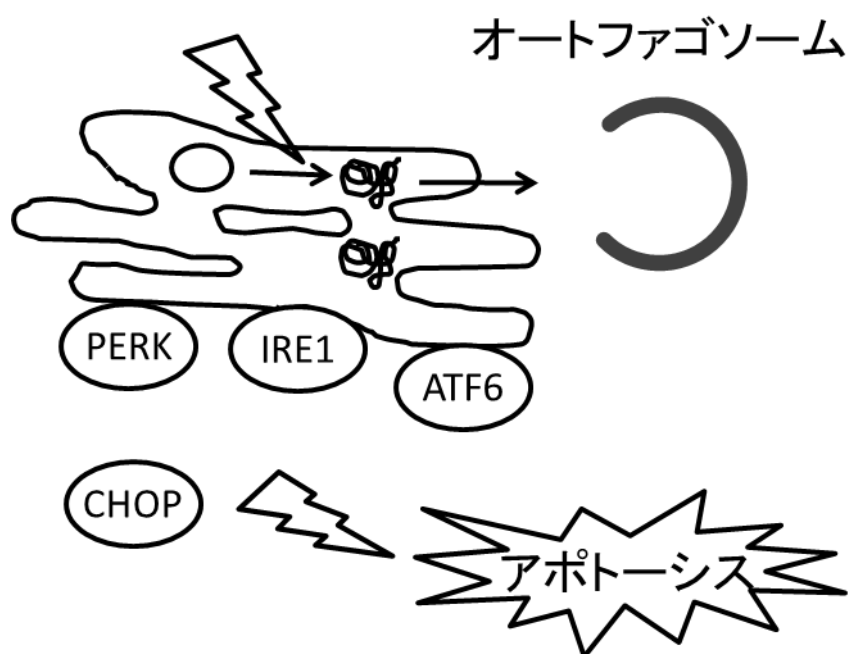


Fig. 14 小胞体ストレス誘導性アポトーシスの概要

第2章では、シュワン細胞におけるGAのアポトーシス誘導機構について検討した。初めに、ROS生成およびミトコンドリアに対するGAの影響について検討した。次いで、GA誘導アポトーシスと小胞体ストレスの関連性について、小胞体ストレスセンサー、オートファジーおよびCHOPに対する影響について検討した。また、アポトーシス誘導に関わる膜受容体への影響についても検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

ヒドロエチジン (HE)、CellRox<sup>®</sup> Green、RNA spin mini、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit は Life Technologies Corporation より、MitoLight apoptosis detection kit は、Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA) より購入した。カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン (CDF)、オルトバナジン酸ナトリウムは Sigma Aldrich より、アガロース S、Loading Buffer は

和光純薬工業株式会社より、Triton X-100 は、ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA) より購入した。ウサギ由来抗リン酸化 PERK 抗体、ウサギ由来抗 PERK 抗体、ウサギ由来抗リン酸化 IRE1 抗体、ウサギ由来抗 IRE1 抗体、マウス由来抗 CHOP 抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) より、Laemmli sample buffer、2-メルカプトエタノール、ニトロセルロース膜、グリシン、Tween-20 は Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA) より、Cyto-ID<sup>®</sup> Autophagy detection kit は、ENZO Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) より購入した。TaKaRa EX Taq は、タカラバイオ株式会社 (大阪) より、ウサギ由来抗 cleaved caspase-8 抗体は、Cell Signaling Technology より購入した。その他の試薬は、第 1 章で使用したもの、あるいは市販特級品を用いた。

## 2. 細胞培養と GA 処理

細胞培養と GA 処理は、第 1 章と同様の方法で行った。

## 3. ミトコンドリア膜電位

ミトコンドリア膜電位の低下は、特異的プローブ MitoLight を用いて検討した。直径 6 cm のシャーレにて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。その後、GA を含む培地を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、MitoLight を含むバッファーを添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。EDTA/トリプシン溶液を添加して細胞を剥離し、遠心分離して上清を除去した。細胞沈渣に DPBS を加え、得られた細胞懸濁液をセルストレーナーチューブでろ過した。MitoLight 蛍光は、フローサイトメーター (FL-1 チャンネル : 530 nm) により測定した。

## 4. ROS 産生

ROS の産生は、特異的プローブを利用した蛍光法およびアコニターゼ活性を指標に評価した。

蛍光法 : 6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。次いで、GA を

含む反応液を除去し、1.5 mL/well の DMEM (FBS free) を加え、蛍光プローブ (HE、CDF、CellRox<sup>®</sup> Green) を添加し CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 20 分間インキュベーションした。各プローブの蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長 : 488 nm, 555 nm) で測定した。

アコニターゼ活性 : 直径 6 cm のシャーレにて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む反応液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、細胞を回収し、遠心分離して上清を除去した。得られた細胞沈渣を可溶化剤 (100 mM DTPA、0.2% TritonX-100、5 mM クエン酸) で可溶化した。10 分間氷上に保持後、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を測定試料とした。37 °C の条件下、100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に測定試料、基質として 200 mM イソクエン酸を加えて、生成するシスアコニチン酸の 240 nm の吸光度を測定した。

## 5. 小胞体ストレスセンサー

PERK、IRE1、ATF6 の 3 つの小胞体ストレスセンサーの mRNA 発現量およびタンパク質発現量を測定した。

mRNA 発現量 : mRNA 発現量は、real time- RT- PCR 法により測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む反応液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、RNA spin Mini を用いて、製品マニュアルに従って RNA の抽出を行った。次いで、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用して逆転写を行い、cDNA を作成した。mRNA 発現量は、7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation) を使用して、標準物質として GAPDH を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。プライマーには、Life Technologies Corporation より購入した Rn00581002\_m1 (PERK)、Rn01471008\_m1 (IRE1)、Rn01490844\_m1 (ATF6)、Rn01775763\_g1 (GAPDH) を使用した。

タンパク質発現量 : PERK タンパク質発現量は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法により評価した。12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベシ

オンした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、4% パラホルムアルデヒドを用い細胞を固定した。DPBS で洗浄後、氷冷メタノールを用い、細胞透過処理した。0.5% blocking agent でブロッキングし、ブロッキング溶液で希釈した PERK 抗体、またはリン酸化 PERK 抗体 (1:200) により室温で 1 時間インキュベーションし、Alexa Fluor 488 で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (1:1,000) を 2 次抗体として、室温で 30 分インキュベーションした。Alexa Fluor 488 の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長: 488 nm) を用い測定した。

IRE1 タンパク質発現量の測定は、以下のように行った。直径 6 cm のシャーレにて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、RIPA バッファー (含 1 mM オルトバナジン酸、プロテアーゼ阻害剤) を加えてシュワン細胞を可溶化した。タンパク質定量後、同量の Laemmli sample buffer (含 0.5 mM 2-メルカプトエタノール) と混合し、煮沸したものを試料とした。試料をゲルにローディングして、SDS-PAGE (12%, 20  $\mu$ g protein/lane) を行った。なお、タンパク定量には Bradford 法を用いた。ウエスタンブロットは、Towbin らの方法に準じて行った<sup>59)</sup>。先ず、転写バッファーとして 25 mM トリス、192 mM グリシン溶液を用い、ニトロセルロース膜に 0.8 mA/cm<sup>2</sup> の条件で通電して転写した。転写終了後、ニトロセルロース膜を TBST (TBS に 0.1% Tween-20 を添加した溶液、TBS: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) で洗浄し、ブロッキング溶液 (5% non-fat dry milk を含む TBST 溶液) で室温にて 2 時間振とうした。次いで、ニトロセルロース膜をブロッキング溶液で希釈した抗 IRE1 抗体、または抗リン酸化 IRE1 抗体 (1:1,000) により室温で 1 時間振とうした。TBST で 5 分間の洗浄を 3 回行い、続いて horseradish peroxidase 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:1,000) を 2 次抗体として、室温で 1 時間振とうした。TBST で 5 分間 3 回洗浄した後、バンドの検出は ECL Plus を用い落射式ゲル撮影装置 (アトー株式会社、東京) で行った。

## 6. オートファジー

オートファジーの評価は、Cyto-ID<sup>®</sup> Autophagy detection kit を用い、オートファジーの過程で形成されるオートファゴソームを指標にした。12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、Cyto-ID と Hoechst33258 を含むバッファーを加えて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分インキュベーションした。Hoechst33258 と Cyto-ID の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡（励起波長：405 nm, 488 nm）を用い測定した。

## 7. CHOP 発現量

mRNA 発現量：CHOP mRNA 発現量は、RT-PCR 法を用いて測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。RNA spin Mini を用いて、製品マニュアルに従って RNA の抽出を行った。次いで、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用し逆転写を行い、cDNA を作成した。CHOP のプライマー（Fw, 5'-ACCAC ACCTGAAAGCAGAAAC-3'; Rv, 5'-TCAGTCAGCCAAGCTAGG GA-3'）は、グライナー・ジャパン（東京）に依頼し合成した。RT-PCR は、TaKaRa Ex Taq の製品マニュアルに従った。得られた PCR 産物を Loading buffer で希釈し（2:1）、2% アガロースゲルを用い電気泳動を行った。その後、落射式ゲル撮影装置を用い mRNA 発現量を測定した。標準物質として、GAPDH のプライマー（Fw, 5'-CCTGCTTCACCACCTTCT-3'; Rv, 5'-AGTCCATGCCATCAC TGC-3'）を使用した。

タンパク質発現量：CHOP のタンパク質発現量は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法により評価した。12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。DPBS で洗浄後、氷冷メタノールを用い、細胞透過処理した。その後、0.5% blocking agent でブロッキング



グし、同溶液で希釈した抗 CHOP 抗体 (1:200) と室温で 1 時間インキュベーションした。次いで、Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG 抗体 (1:1,000) と Hoechst33258 (1:1,000) とともに、室温で 30 分インキュベーションした。Hoechst33258 と Alexa Fluor 488 の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長: 405 nm, 488 nm) を用い測定した。

## 8. Fas 受容体発現量

Fas 受容体 mRNA の発現量は、RT-PCR 法を用いて評価した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、RNA spin Mini を使用して、製品マニュアルに従い RNA を抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用し逆転写を行い、cDNA を作成した。Fas のプライマー (Fw, 5'-TCAGCCTGGT GAACGAA AAGT-3'; Rv, 5'-GTT CGTGTGTGCAAGGCTCAAG-3') は、グライナー・ジャパン (東京) に依頼し合成した。RT-PCR は、TaKaRa Ex Taq の製品マニュアルに従い行った。得られた PCR 産物を Loading buffer で希釈し (2:1)、2% アガロースゲルを用い電気泳動を行った。その後、落射式ゲル撮影装置を用い mRNA 発現量を評価した。標準物質として、GAPDH のプライマー (Fw, 5'-CCTGCTTCACCAC CTTCT-3'; Rv, 5'-AGTCCATGCCATCACTGC-3') を使用した。

## 9. カスパーゼ-8 活性

カスパーゼ-8 活性は、フローサイトメーターを用いた免疫染色法により評価した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定後、氷冷メタノールを用いて細胞透過処理を行った。その後、0.5% blocking agent でブロッキング処理を行い、同溶液で希釈した抗 cleaved caspase-8 抗体 (1:200) と室温で 1 時間インキュベーションし、次いで、Alexa Fluor 488 で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (1:1,000) を 2 次抗体として、室温で 30 分イ

ンキュベーションした。Alexa Fluor 488 の蛍光は、フローサイトメーター (FL-1 チャンネル : 530 nm) を用いて測定した。

#### 10. タンパク質定量

タンパク質定量は Bradford 法で行なった。マイクロチューブ内で、超純水 495  $\mu\text{L}$  と試料 5  $\mu\text{L}$  を混合し、その後、Bradford 試薬 (Sigma Aldrich) 500  $\mu\text{L}$  を加え、595 nm の吸光度を測定した。検量線は、ウシ血清アルブミンを用いて作成した。

#### 11. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。F 検定による等分散の検定後、t 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 第 3 節 実験結果

#### 1. ミトコンドリアに対する GA の影響

初めに、ミトコンドリアに対する GA の影響について、ミトコンドリア膜電位の変化を指標として検討した。蛍光プローブ MitoLight は、正常な細胞では二量体としてミトコンドリアに集積するが、ミトコンドリア膜電位が低下した細胞では単量体として細胞質に局在し、緑色蛍光を発する。シュワン細胞を GA (500  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間処理し、MitoLight の蛍光をフローサイトメーターで測定した (Fig. 15)。コントロール細胞では、正常なミトコンドリア膜電位を示す領域 A に 92.7% の細胞が分布した。GA 処理細胞では、領域 A に 90.7% の細胞が分布し、コントロール細胞と同様であった。この結果から、GA はミトコンドリアに傷害を与えずに、アポトーシスを誘導していると考えられる。

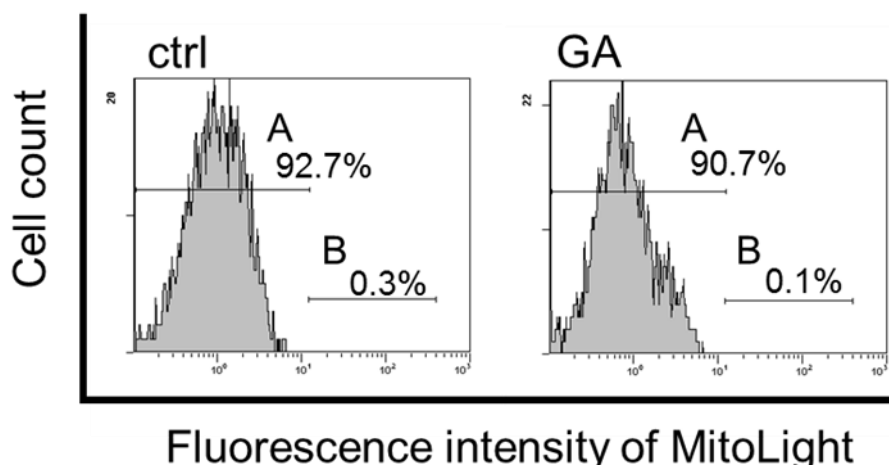


Fig. 15 ミトコンドリア膜電位に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu\text{M}$  の GA で 24 時間処理した。ミトコンドリア膜電位の変化を特異的プローブである MitoLight を用いてフローサイトメーターにより測定した。

## 2. ROS 産生量に対する GA の影響

ヒト乳がん細胞において、GA は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生を増加させることが示されている<sup>35)</sup>。シュワン細胞を GA (500  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間処理し、細胞内 ROS 産生について 3 種の蛍光プローブを用い測定した (Fig. 16)。蛍光プローブは HE、CDF、CellRox<sup>®</sup> Green を用い、共焦点レーザー顕微鏡で評価した。HE は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対して特異性が高いプローブである<sup>59)</sup>。しかし、いずれの蛍光プローブを用いた場合も、コントロール細胞と GA 処理細胞に違いは認められなかった。ROS は不安定であり、ROS が産生されると速やかに細胞成分と反応するため、細胞内に長時間蓄積しない。そのため、Fig. 16 の蛍光プローブを用いた実験では、GA 処理 24 時間時における ROS 量を断片的に捉えている可能性が考えられた。そこで、細胞内 ROS 量を累積して評価するために、アコニターゼ活性に対する GA の影響について検討した。アコニターゼは、鉄硫黄クラスター  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  を有する酵素であり、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  によって容易に酸化され  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  となり失活する<sup>60, 61)</sup>。アコニターゼの活性低下の程度は、細胞内  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生の累積量と相関性を示すため、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  の生成を感度良く反映する<sup>60, 61)</sup>。シュワン細胞を 1 mM の GA で 4 時間処理し、アコニターゼ活性を測定した (Fig. 17)。しかし、アコニターゼ活性に対する GA の影響は確認できなかつ

た。なお、ポジティブコントロールとして細胞内 ROS 誘導剤であるメナジオンを用いた。

以上の結果より、GA はシュワン細胞においては ROS 産生を増加しないと推定される。従って、GA によるシュワン細胞のアポトーシス誘導機構は、ヒト乳がん細胞<sup>35)</sup>とは異なると考えられる。また、MG および AGEs によるアポトーシスには、ミトコンドリア傷害に起因した ROS 産生の関与が報告されているが<sup>15-19)</sup>、GA によるシュワン細胞のアポトーシスには両者とは異なる別のメカニズムが関与していると推察される。

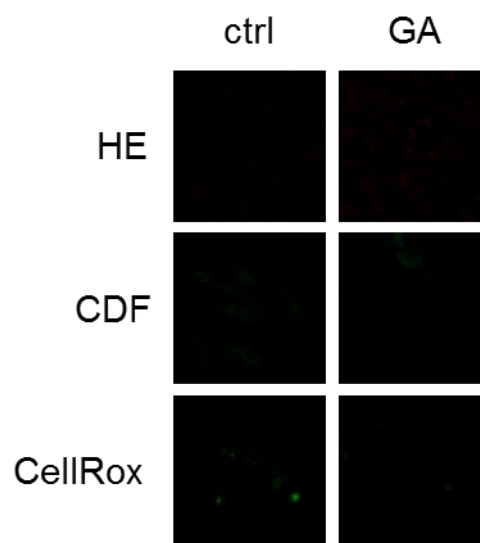


Fig. 16 ROS 産生量に対する GA の影響 (蛍光法)

シュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。ROS 産生量を蛍光プローブである HE、CDF、CellRox<sup>®</sup>Green を用い共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。

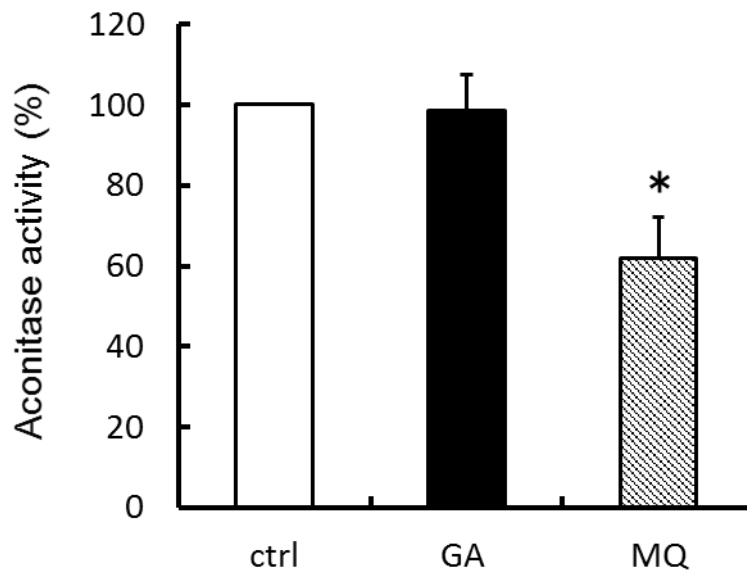


Fig. 17 ROS 産生量に対する GA の影響 (アコニターゼ活性)

シュワン細胞を 1 mM の GA で 4 時間処理した。アコニターゼ活性はイソクエン酸を基質として分光学的手法で測定した。データは、平均値±標準偏差 (n=3) で示している。ポジティブコントロールとして 10  $\mu$ M メナジオン (MQ) を用いた。\* $p$ <0.05 : コントロールと比較。

### 3. 小胞体ストレスセンサーに対する GA の影響

次に小胞体ストレスに着目して検討した。初めに小胞体ストレスセンサーである PERK、IRE1、ATF6 に対する GA の影響について検討した (Fig. 18)。シュワン細胞を GA (500  $\mu$ M) で 24 時間処理し、3 つの小胞体ストレスセンサーの mRNA 量を測定した。PERK および ATF6 の mRNA に対する GA の影響は認められなかったが、IRE1 mRNA 量は 3 倍に増加した。また、PERK および IRE1 については、活性化を示すリン酸化タンパク質が増大し、特に IRE1 のリン酸化が顕著に認められた。なお、ATF6 については、活性化を示す ATF6 断片化の検討は行わなかった。これらの結果から、GA は少なくとも 2 つの小胞体ストレスセンサー PERK および IRE1 を活性化することが明らかになった。

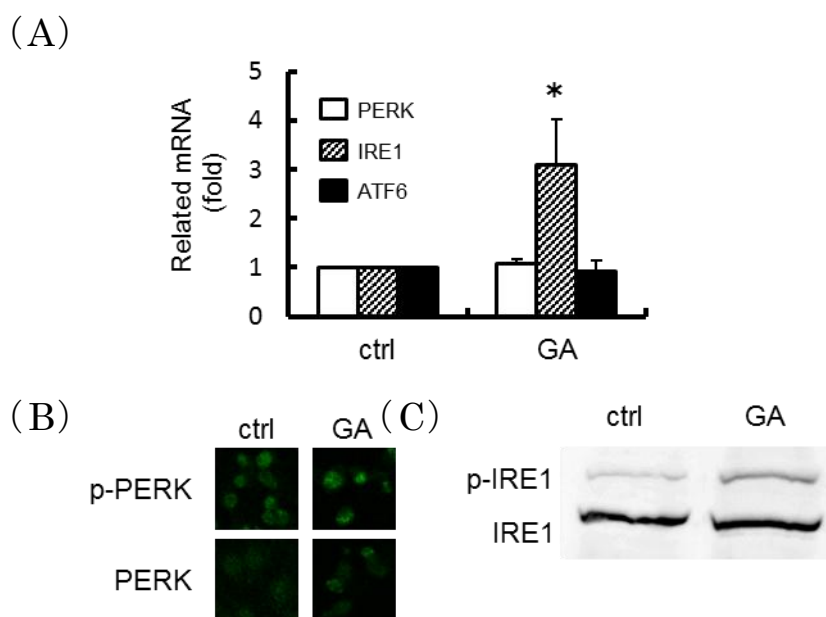


Fig. 18 小胞体ストレスセンサーに対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu$ M の GA で 24 時間処理した。(A) PERK、IRE1、ATF6 mRNA は real time RT-PCR により評価した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p$ <0.05: コントロールと比較。(B) p-PERK、PERK タンパク質発現量は、共焦点レーザー顕微鏡を用い免疫染色により評価した。(C) p-IRE1、IRE1 タンパク質発現量は、免疫染色 (ウエスタンブロット法) により評価した。

#### 4. オートファジーに対する GA の影響

小胞体ストレスを生じ、小胞体ストレスセンサーが活性化されると、unfolded proteins を分解するオートファジー機構が働く。オートファジーに対する GA の影響について、オートファジー誘導時に増大するオートファゴソームを指標として解析した。測定にはオートファゴソームを緑色蛍光に染色する Cyto-ID™ Autophagy detection kit を用いた。GA (500  $\mu$ M) 24 時間処理細胞において、Cyto-ID の蛍光が増大し、オートファゴソームの形成が認められた (Fig. 19)。オートファゴソーム形成細胞はヘキスト染色により DNA の断片化が確認された細胞 (アポトーシス細胞) と一致し、アポトーシス細胞においてオートファジーが起きていることが明らかになった。

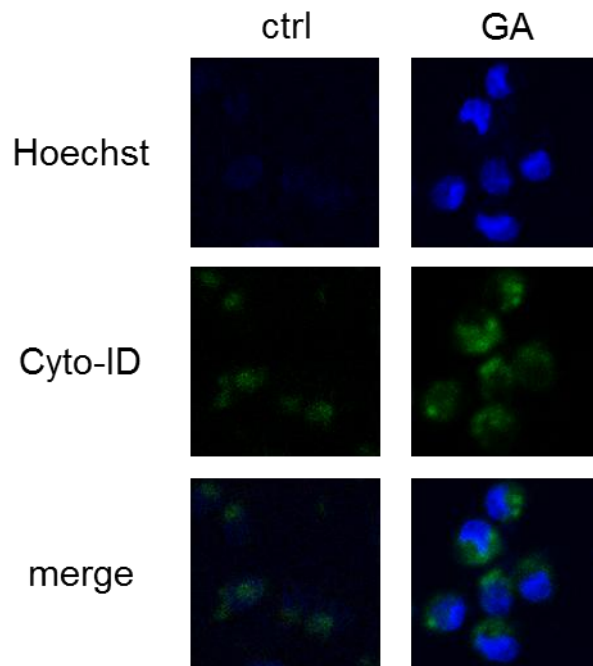


Fig. 19 オートファゴソームに対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu\text{M}$  GA で 24 時間処理した。オートファゴソームは、共焦点レーザー顕微鏡により評価した。緑の蛍光はオートファゴソーム、青の蛍光は核を示している。

##### 5. 小胞体ストレス誘導性アポトーシス促進因子に対する GA の影響

CHOP は小胞体ストレス誘導性アポトーシス促進因子であり、核へ移行することで活性化される。シュワン細胞を GA (500  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間処理し、CHOP に対する影響を検討した (Fig. 20)。GA 処理により CHOP mRNA 量は約 4 倍に増加し、併せて CHOP タンパク質発現量の増加も認められた。ヘキスト染色を行い、アポトーシス細胞とその DNA 断片化による核の局在位置を確認した。CHOP タンパク質発現量の増加が認められた細胞はアポトーシス細胞と一致し、また CHOP が核に局在していることが明らかとなった。これらの結果は、GA は CHOP の発現を誘導すると共に、CHOP を活性化することを示している。

以上の結果より、シュワン細胞において GA は小胞体ストレスによるアポトーシスを誘導していると示唆される。

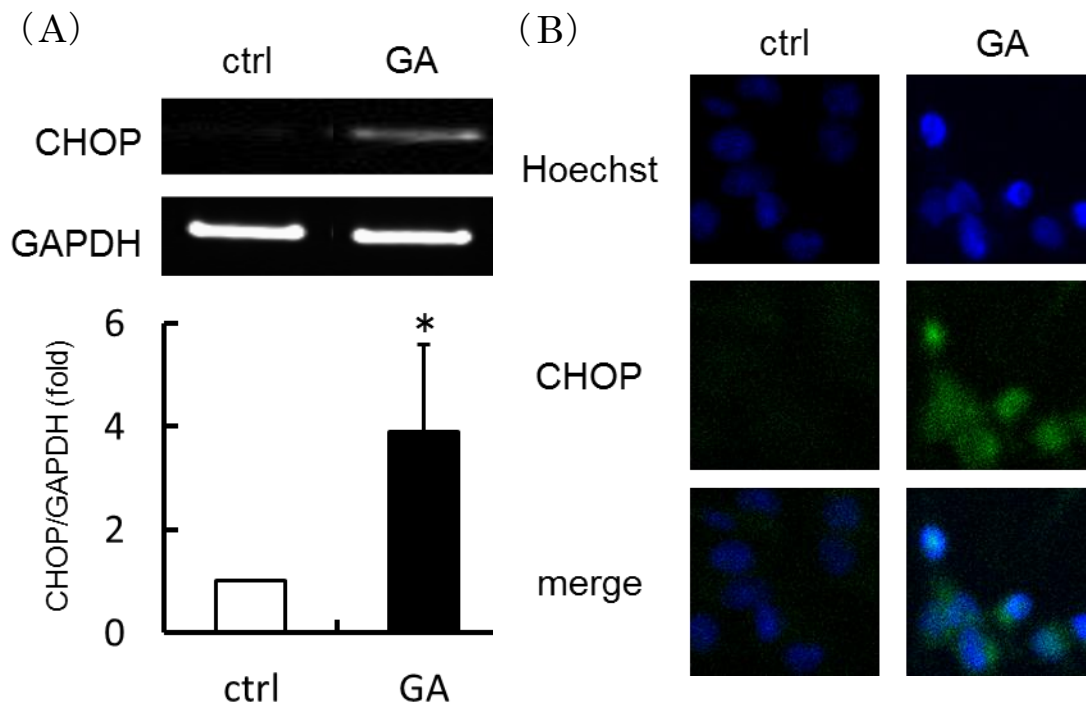


Fig. 20 CHOP 対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu\text{M}$  GA で 24 時間処理した。(A) CHOP mRNA レベルは RT-PCR 法により評価した。標準物質として GAPDH を用いた。グラフはコントロール細胞の平均蛍光強度を 1 としたときの相対値で表した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p<0.05$ : コントロールと比較。(B) CHOP タンパク質発現量は、共焦点レーザー顕微鏡により評価した。緑の蛍光は CHOP、青の蛍光は核を示している。

## 6. 膜受容体に対する GA の影響

アポトーシス誘導に関わる膜受容体に対する GA の影響について検討した。Fas 受容体は、デスレセプターの 1 つであり、誘導されると下流に位置するカスパーゼ-8 が活性化され、次いでカスパーゼ-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導する。シュワン細胞を GA (500  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間処理し、Fas 受容体およびカスパーゼ-8 に対する影響について検討した (Fig. 21)。GA は Fas 受容体 mRNA 量を約 2 倍に増加させ、さらにカスパーゼ-8 の活性化を引き起こした。このことから、GA によるアポトーシスには小胞体ストレスと共に、膜受容体を介したアポトーシス経路も関与していることが推察される。



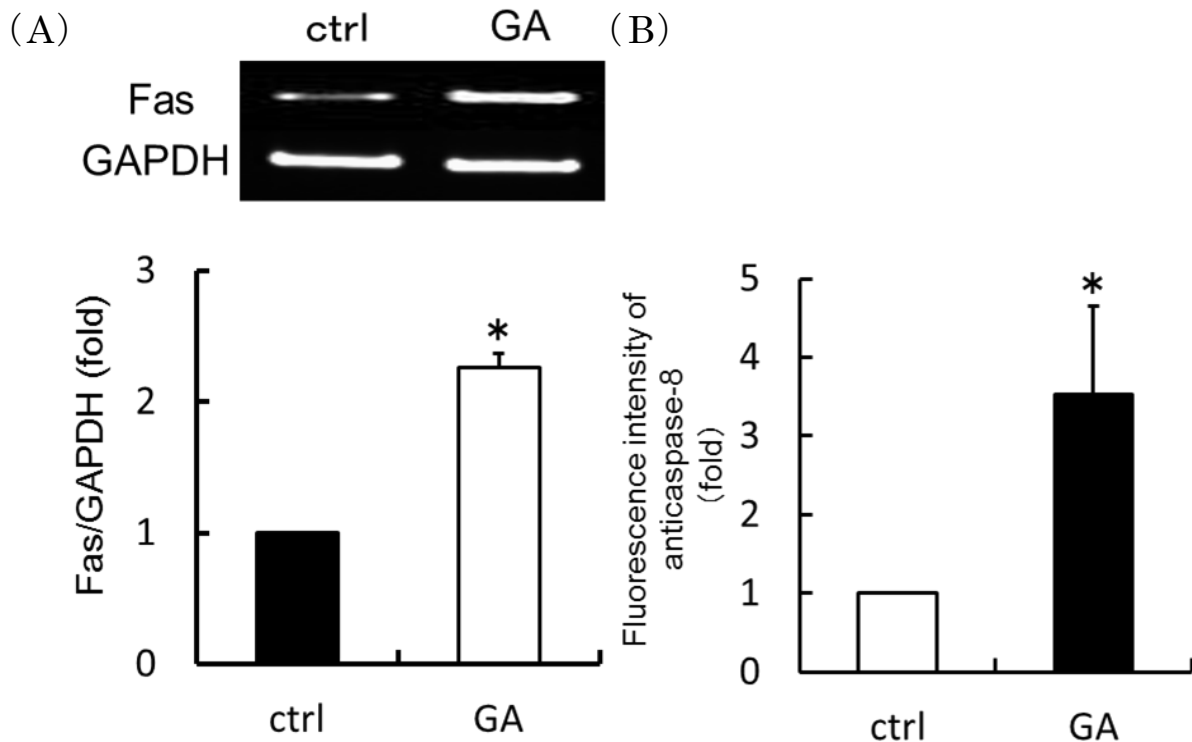


Fig. 21 膜受容体に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。(A) Fas mRNA レベルは、RT-PCR 法により評価した。標準物質として GAPDH を用いた。平均蛍光強度は、コントロール細胞の平均蛍光強度を 1 としたときの相対値で表した (下図)。(B) カスパーゼ-8 活性は、フローサイトメーターにより評価した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p$ <0.05 : コントロールと比較。

#### 第 4 節 考察

第 2 章では、シュワン細胞における GA のアポトーシス誘導機構を明らかにする目的で、ROS 生成およびミトコンドリアへの影響、小胞体ストレスとの関連性、膜受容体に対する影響について検討した。その結果、小胞体ストレスセンサーの活性化、さらに小胞体ストレス誘導性アポトーシスを決定づける CHOP が誘導活性化されていることが明らかになった。

初めに、ROS 生成およびミトコンドリアに対する GA の影響について検討

した。3種の蛍光プローブ HE、CDF、CellRox® Green を用い細胞内 ROS 量を測定した結果、いずれの場合も GA の影響は認められなかった (Fig. 16)。さらに、ROS の存在を鋭敏に感知して失活することが知られているアコニターゼ<sup>60, 61)</sup>の活性を測定したが、細胞内 ROS 量の増加を確認することはできなかった (Fig. 17)。ヒト乳がん細胞において、GA は glyoxalase の存在下ジカルボニル化合物である GO と O<sub>2</sub><sup>-</sup>に変換され、GO による毒性および ROS 産生の両作用によりアポトーシスを誘導する<sup>35)</sup>。この報告では、GA による HE 蛍光強度の増加およびアコニターゼ活性低下に基づき、ROS の関与を述べている。しかし、シュワン細胞を用いた本研究では、ROS 量の増加を確認できず、ヒト乳がん細胞を用いた結果と一致しなかった。また、第1章で示したように、シュワン細胞では GO による細胞傷害は認められなかった (Fig. 8)。従って、ヒト乳がん細胞とラットシュワン細胞では GA により誘導されるアポトーシスのメカニズムが異なると考えられる。おそらく glyoxalase 発現量の違いがそのメカニズムに影響を及ぼしていると考えられる。一方、MG や AGEs によるアポトーシス誘導機構には、ミトコンドリア傷害に続く酸化ストレスの関与が示唆されているが<sup>18, 19)</sup>、GA によるミトコンドリアの傷害は認められなかった (Fig. 15)。以上より、シュワン細胞における GA 誘導アポトーシスには、従来まで報告されてきた ROS 生成やミトコンドリア傷害とは異なる主要メカニズムが関与していると推察される。

小胞体は、細胞内外からのストレスをいち早く感知し、小胞体ストレス応答機構を活性化させるが、過剰なストレスが生じて細胞機能を維持できない場合はアポトーシスを誘導することが知られている。小胞体ストレスは、unfolded proteins が小胞体に蓄積する状態である。これを感知する小胞体ストレスセンサーには PERK、IRE1、ATF6 の3つがあり、PERK および IRE1 はリン酸化により、ATF6 は断片化により活性化される。しかし、重度の小胞体ストレスの下では、小胞体ストレスセンサーの下流に位置する転写因子 CHOP が高発現し、核へ移行することで活性化され、アポトーシスが誘導される。まず、3種の小胞体ストレスセンサーに対する GA の影響について検討した。PERK mRNA 発現量に対する GA の影響は見られなかったが、PERK の活性化を示すリン酸化が認められた (Fig. 18)。さらに、IRE1 mRNA 発現

量の増大と IRE1 のリン酸化が顕著に認められた (Fig. 18)。ATF6 の場合、mRNA 発現量に変化は見られず (Fig. 18)、活性化を示す ATF6 の断片化を検討するまでには至らなかった。これらの結果から、少なくとも 2 つの小胞体ストレスセンサー PERK および IRE1 が GA により活性化されていることが明らかになった。また、小胞体内腔の unfolded proteins の蓄積を示すオートファゴソーム形成が観察された (Fig. 19)。CHOP は、小胞体ストレス誘導アポトーシスを決定づける転写因子である。GA は、CHOP の mRNA およびタンパク質の両発現量を増加し、さらに活性化を示す CHOP の核への移行も確認された (Fig. 20)。以上の結果より、GA は小胞体ストレス誘導性アポトーシスを引き起こすことが示唆される。近年、AGEs がヒト軟骨細胞およびヒト大動脈内皮細胞において CHOP を誘導することが明らかとなり、小胞体ストレスの関与が示唆されている<sup>51, 57)</sup>。一方、糖化反応から AGEs が生成する過程では、GA や MG をはじめとする様々な中間体が形成されるが、現在までにこれら中間体が小胞体ストレスに関与することを示す報告はない。本研究は、糖化反応中間体により小胞体ストレスが生じることを示す初めての報告である。

アポトーシスは複雑なプロセスを経て、最終的にはカスパーゼ-3 等の活性化が起こり、DNA が断片化される。カスパーゼ-3 の活性化を引き起こす主な経路として、①ミトコンドリア経由、②小胞体経由、③膜受容体経由が挙げられる。それぞれの大きな特徴をまとめると、①ミトコンドリア経由：ミトコンドリアの傷害により内膜から細胞質へシトクロム c が遊離し、主にカスパーゼ-9 の活性化を経てカスパーゼ-3 が活性化され、一般に ROS 産生を伴う。②小胞体経由：小胞体内腔に異常タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスセンサーが活性化される。次いで転写因子である CHOP の活性化が起こり、主に x カスパーゼ-12 の活性化を経てカスパーゼ-3 が活性化される。③膜受容体経由：サイトカインである TNF や Fas リガンドが細胞表面のデスレセプターに結合し、主にカスパーゼ-8 の活性化を経てカスパーゼ-3 が活性化される。これまでの結果から、シュワン細胞における GA 誘導アポトーシスの経路には、①が関与する可能性は低い。②については、今回カスパーゼ-12 活性は調べていないが、小胞体ストレスセンサーおよび CHOP の誘導、活性

化が明らかになった。③については、デスレセプターの1つである Fas 受容体の mRNA 発現量の増加と、カスパーゼ-8 の活性化が認められた (Fig. 21)。さらに、TNF- $\alpha$  mRNA 量の増加を確認した (data not shown)。以上の結果から、GA 誘導アポトーシスには、小胞体ストレスとデスレセプターを介した経路が関与していると考えられる。近年、小胞体ストレスセンサーである IRE1 が活性化されるとデスレセプターを介したアポトーシス経路が活性化されることが報告されている<sup>62)</sup>。従って、②と③の経路が別々に、あるいは小胞体ストレスが基になり2つの経路がリンクしてアポトーシスが誘導されていると推察される。本章で得られた GA による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの推定機構を Fig. 22 に示す。

第2章では、シュワン細胞における GA のアポトーシス誘導メカニズムに小胞体ストレスが関与していることを示した。近年、小胞体ストレスは糖尿病、アルツハイマー病、がん、炎症性疾患など多様な疾患の発症要因であることが報告されている<sup>63, 64)</sup>。小胞体ストレスが惹起されるとインスリン抵抗性が増強し<sup>65)</sup>、ごく最近では小胞体ストレスが糖尿病性神経障害に関与している可能性が示唆されている<sup>66)</sup>。GA による小胞体ストレスと糖尿病性神経障害との関連性は明らかではないが、糖化反応から AGEs 形成過程で生じる GA をはじめとする種々な中間体が小胞体ストレスを介して糖尿病合併症の発症や進展に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

小胞体ストレスが生じると、細胞はそのストレスから回避するために小胞体ストレス応答機構と呼ばれる防御システムを活性化し、細胞機能を回復させる<sup>27-30)</sup>。小胞体内に蓄積した unfolded proteins を小胞体ごと分解排除するため、オートファジーの機構が働き、オートファゴソームが形成される。ストレスが強く十分適応できない場合は、アポトーシス、あるいはバルク分解亢進によるオートファジー細胞死が起こり、最終的に異常な細胞は駆除される<sup>67)</sup>。GA 処理シュワン細胞において、オートファゴソームの形成が認められた (Fig. 19)。オートファゴソームの形成は細胞死抑制に寄与していることから、シュワン細胞は GA によるストレスを回避するため、オートファジー機構を活性化することで細胞機能の回復、維持を図るが、そのストレスが強いためにアポトーシスを誘導して死に至ると推測される。一方、小胞体ス

トレスやオートファジー時には、小胞体ストレス応答機構が活発に働いていると考えられる。Keap1/Nrf2 システムは小胞体ストレス応答機構の中心的役割を果たしており、GSH 生合成の律速酵素である  $\gamma$ -GCS や HO-1 をはじめとする様々なストレス応答タンパク質の発現制御に関わっている<sup>27-30)</sup>。そこで第3章では、小胞体ストレス応答機構に対する GA の影響について検討した。

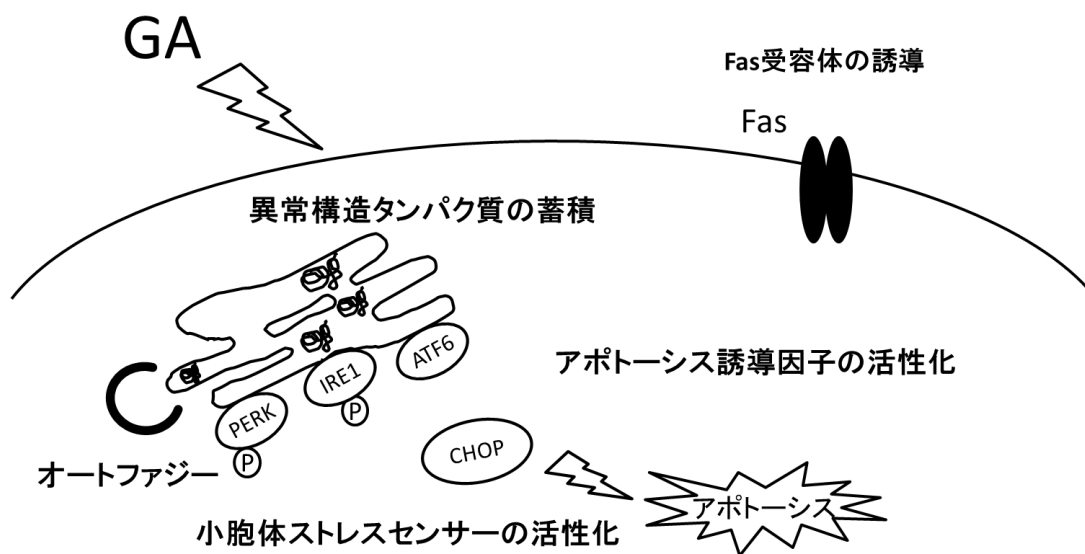


Fig. 22 GA による小胞体ストレスの誘導

## 第3章 グリコールアルデヒド (GA) によるストレス応答機構の誘導

### 第1節 序論

細胞はストレスに対する応答機構、即ち防御機構を構築している。小胞体は細胞内外からのストレスを感知すると、そのストレスを回避するために小胞体ストレス応答 **unfolded protein response** と呼ばれる防御機構を活性化させる<sup>27-30)</sup>。小胞体ストレス応答機構が活性化されると、抗酸化酵素群や第II相解毒酵素群をはじめとする様々なストレス応答タンパク質の発現誘導が起こる (Fig. 5)。第2章では、GAが小胞体ストレスを誘導することを示した。このことから、小胞体ストレス応答機構に対して、GAは何らかの影響を与えている可能性が考えられる。そこで第3章では、ストレス応答機構に対するGAの影響について検討した。

**Keap1/Nrf2** システムは、ストレス応答機構の中心的役割を担っている。2000年以降、**Keap1/Nrf2** システムに関する研究が急速に進み、糖尿病をはじめとする多くの疾患に関与する報告がなされている<sup>68)</sup>。Fig. 23に示すように、転写因子 **Nrf2** は、正常な状態では細胞質で **Keap1** と結合して不活化している<sup>27-30)</sup>。一方、細胞が何らかのストレスを受けると、**Nrf2** は **Keap1** から解離し核内へ移行して活性化し、様々なストレス応答遺伝子の発現を誘導する。**Keap1/Nrf2** システムによって制御されている代表的タンパク質として **HO-1** がある<sup>27-30)</sup>。また、**Keap1/Nrf2** システムは **GSH** 生合成の律速酵素である  $\gamma$ -**GCS**、抗酸化酵素である **SOD** や **catalase**、薬物代謝酵素 **GSH S-トランスフェラーゼ**、薬物トランスポーターである **MRP1** など多くのストレス応答タンパク質の発現を制御することで、細胞機能の維持、回復に重要な役割を担っている<sup>27-30)</sup>。

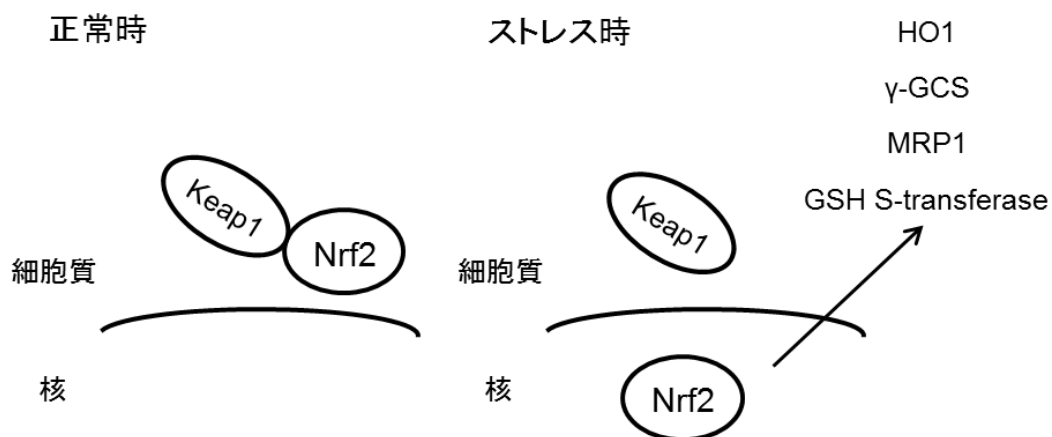


Fig. 23 Keap1/Nrf2 システム

GSH はストレス誘導性アポトーシス抑制因子の 1 つである。小胞体ストレスが起こると、 $\gamma$ -GCS が誘導され GSH が増大し、GSH は小胞体内腔に蓄積した *unfolded proteins* を修復することで防御作用を示す<sup>69)</sup>。GSH のストレス誘導性アポトーシス抑制作用は多様であるが、酸化ストレスや異物代謝において主要な役割を果たしている。GSH は ROS の捕捉や、グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタレドキシンの補因子として作用することで、酸化ストレスを抑制する。また、GSH S-トランスフェラーゼの介在により GSH 抱合体を形成することで、薬物トランスポーターである MRP1 と共に異物代謝に寄与する。しかし、GA による小胞体ストレスおよびアポトーシスに対し、GSH が防御作用を示しているかどうかは不明である。一方、MG および AGEs 誘導細胞傷害に酸化ストレスが関与することは既に述べたが、これらの細胞傷害が GSH の前駆体である *N-acetyl-L-cysteine* (NAC) の添加により抑制されることが明らかにされている。例えば、NAC の添加は、MG によるラットシュワン細胞の細胞傷害<sup>70)</sup>、AGEs によるヒト角膜上皮細胞の細胞傷害を抑制する<sup>71)</sup>。当研究室においても、NAC の添加により MG による血管内皮細胞の細胞傷害が抑制されることを確認している (data not shown)。これらの報告では、NAC の抑制作用は、細胞内 GSH の上昇に伴う酸化ストレスの抑制に基づくと示されている。しかし、GA による細胞傷害に ROS の関与は認められず (第 2 章)、GA 誘導細胞傷害に対し NAC がどのような影響

を与えるのか興味を持たれる。

第3章では、初めに GA による細胞傷害に対する NAC の影響について検討した。続いて、細胞内 GSH 量、Keap1/Nrf2 システムによって発現が制御されている  $\gamma$ -GCS、MRP1、HO-1 の発現量を測定し、ストレス応答機構に対する GA の影響について検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

NAC、GSH、酸化型グルタチオン (GSSG) は Sigma Aldrich より、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) は、和光純薬工業株式会社より、グルタチオンレダクターゼ (yeast 由来) は、Oriental Yeast Co., Ltd. (東京) より購入した。ウサギ由来抗 HO-1 抗体は、Cell Signaling Technology Inc. より、ウサギ由来抗 Nrf2 抗体は、Santa Cruz Biotechnology Inc. より購入した。TransAM<sup>®</sup> Nrf2、Nuclear Extract Kit は Active Motif (東京) より、Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent、Opti-MEM は Life Technologies Corporation より、ヒト由来抗 MRP1-phycoerythrin 抗体は、R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA) より購入した。その他の試薬は、第1章および第2章で使用したもの、あるいは市販特級品を用いた。

### 2. 細胞培養、GA および SH 化合物処理

細胞培養と GA 処理は、第1章と同様の方法で行った。NAC、GSH、GSSG の添加実験の場合は、GA 処理時に同時添加した。なお、細胞生存率、細胞膜構造の変化、CHOP タンパク質発現量の評価は、第1章および第2章の実験方法に準じて行った。

### 3. 細胞内 GSH 量と $\gamma$ -GCS mRNA 発現量

細胞内 GSH 量：細胞内 GSH 量は、DTNB 酵素リサイクリング法により測定した<sup>72)</sup>。12 well plate にて培養したシュワン細胞に GA (100~500  $\mu$ M) を



添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで 0.1% の Triton X-100 を含む PBS を加えて可溶化して遠心分離し、得られた上清を測定試料とした。0.1 M リン酸バッファー (pH7.5、含 5 mM EDTA) に試料、0.6 mM DTNB、0.2 mM NADPH を添加して 30 °C でプレインキュベーション後、1.3 U/mL のグルタチオンレダクターゼを加え反応開始した。生成した 2-ニトロ-5-チオ安息香酸の 412 nm における吸光度変化を測定した。なお、タンパク定量には Bradford 法を用いた。

γ-GCS mRNA 発現量：γ-GCS mRNA 発現量は、real time- RT- PCR 法により測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に GA (100~500 μM) を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む反応液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、RNA spin Mini を用いて RNA の抽出を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用して逆転写を行い、cDNA を作成した。mRNA 発現量は、7500 Fast Real-Time PCR System を使用して、標準物質として GAPDH を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。なお、γ-GCS のプライマーには Life Technologies Corporation より購入した Rn00689046\_g1 を使用した。

#### 4. MRP1 発現量

MRP1 タンパク質発現量は、フローサイトメーターを用いた免疫染色法により測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、抗 MRP1-phycoerythrin 抗体を含む SAP バッファー (0.1% サポニン、0.05% アジ化ナトリウムを含む Hanks' Balanced Salt Solution) を加えて、室温で 1 時間インキュベーションした。フローサイトメーター (FL-2 チャンネル：585 nm) を用いて測定した。

#### 5. HO-1 発現量

タンパク質発現量：12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA

を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄した。次いで、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。DPBS で洗浄後、氷冷メタノールを用い、細胞透過処理した。その後、0.5% blocking agent でブロッキングし、同溶液で希釈した抗 HO-1 抗体 (1:200) により室温で 1 時間インキュベーションした。次いで、Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG 抗体 (1:1,000) により、室温で 30 分インキュベーションした。Alexa Fluor 488 の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長: 488 nm) を用い測定した。

mRNA 発現量: HO-1 mRNA 発現量は、real time-RT-PCR 法により測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む反応液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、RNA spin Mini を用いて RNA の抽出を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用して逆転写を行い、cDNA を作成した。mRNA 発現量は、7500 Fast Real-Time PCR System を使用して、標準物質として GAPDH を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。なお、HO-1 のプライマーには Life Technologies Corporation より購入した Rn01536933\_m1 を使用した。

## 6. Nrf2 発現量

タンパク質発現量: Nrf2 タンパク質発現量は、ELIZA キット、共焦点レーザー顕微鏡を用い免疫染色法により求めた。

ELIZA 法による測定は、以下のように行った。直径 10cm シャーレにて培養したシュワン細胞に GA (250~500 μM) を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、細胞を回収した。遠心分離後、上清を除去し Nuclear Extract Kit の製品マニュアルに従い、核タンパクを抽出した。次いで、ELIZA キット TransAM<sup>®</sup> Nrf2 を使用して核内に移行した Nrf2 タンパク質を測定した。

免疫染色法による測定は、以下のように行った。12 well plate にて培養したシュワン細胞に 500 μM GA を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む溶液を除去し、DPBS で細胞を洗浄し

た。次いで、4% パラホルムアルデヒドを用い細胞を固定した。DPBS で洗浄後、氷冷メタノールを用い、細胞透過処理した。その後、0.5% blocking agent でブロッキングし、ブロッキング溶液で希釈した抗 Nrf2 抗体 (1:200) により室温で 1 時間インキュベーションした。次いで、Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG 抗体 (1:1,000) と Hoechst33258 (1:1,000) により、室温で 30 分インキュベーションした。Hoechst33258 と Alexa Fluor 488 の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長 : 405 nm, 488 nm) を用い測定した

mRNA 発現量 : Nrf2 mRNA 発現量は、real time- RT- PCR 法により測定した。6 well plate にて培養したシュワン細胞に 500  $\mu$ M GA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーションした。GA を含む反応液を除去し、DPBS で細胞を洗浄後、RNA spin Mini を用いて RNA の抽出を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用して逆転写を行い、cDNA を作成した。mRNA 発現量は、7500 Fast Real-Time PCR System を使用して、標準物質として GAPDH を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。なお、Nrf2 のプライマーには Life Technologies Corporation より購入した Rn00477784\_m1 を使用した。

## 7. ノックダウン細胞の作製

Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent を Opti-MEM で希釈した。同様に Ambion より購入した Negative control siRNA と siRNA (MRP1 ノックダウン細胞の場合 MRP1 siRNA、Nrf2 ノックダウン細胞の場合 Nrf2 siRNA) を Opti-MEM で希釈した。これらを混合し、室温で 20 分間インキュベーション後、細胞に添加した。16 時間後、培地を交換して、24 時間後に実験に使用した。ノックダウン効率は 70% 以上であった。

## 8. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。F 検定による等分散の検定後、t 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 第3節 実験結果

#### 1. GAによる細胞傷害に対するNACの影響

GA誘導細胞傷害に対するGSHの影響について、GSHの前駆体であるNACを用いて検討した。NAC (1 mM) は細胞にGA (500  $\mu$ M) を添加する際に同時添加し、24時間後MTS試験により細胞生存率を測定した (Fig. 24)。GAによる細胞生存率の低下は、NACの共存によりほぼ完全に抑制された。GSHを共存させた場合も抑制作用が見られた。GSHの抑制効果はNACよりやや劣っているが、これはNACに比べ、添加したGSHが細胞内へ取り込まれにくいことに起因すると考えられる。一方、GSSGは抑制作用を示さなかった。次に、GAによる小胞体ストレスおよびアポトーシスに対するNACの影響について、CHOP発現量および細胞膜構造の変化を指標として検討した。GAによるCHOPの誘導は、NACの共存により抑制された (Fig. 25A)。細胞膜構造の変化についてアネキシンVおよびPIの二重染色によるフローサイトメトリー解析を行った結果、NACはGAにより誘導される早期および後期アポトーシス細胞の増加をほぼ完全に抑制した (Fig. 25B)。これらの結果から、GAによる細胞傷害に対し、GSHは防御因子として作用していることが示唆される。

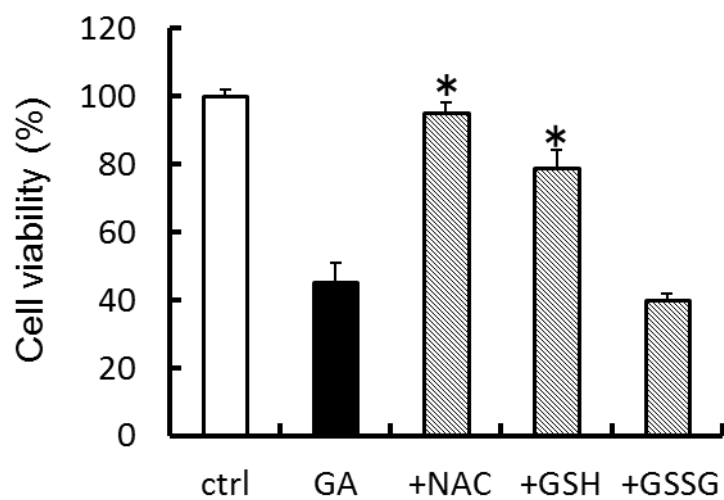


Fig. 24 GAによる細胞傷害に対するNACの影響

シュワン細胞を500  $\mu$ M GAで24時間処理し、同時添加したNAC、GSH、GSSG（各1 mM）存在下における細胞生存率をMTS試験により測定した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差（n=6）で示している。\* $p$ <0.05：コントロールと比較。

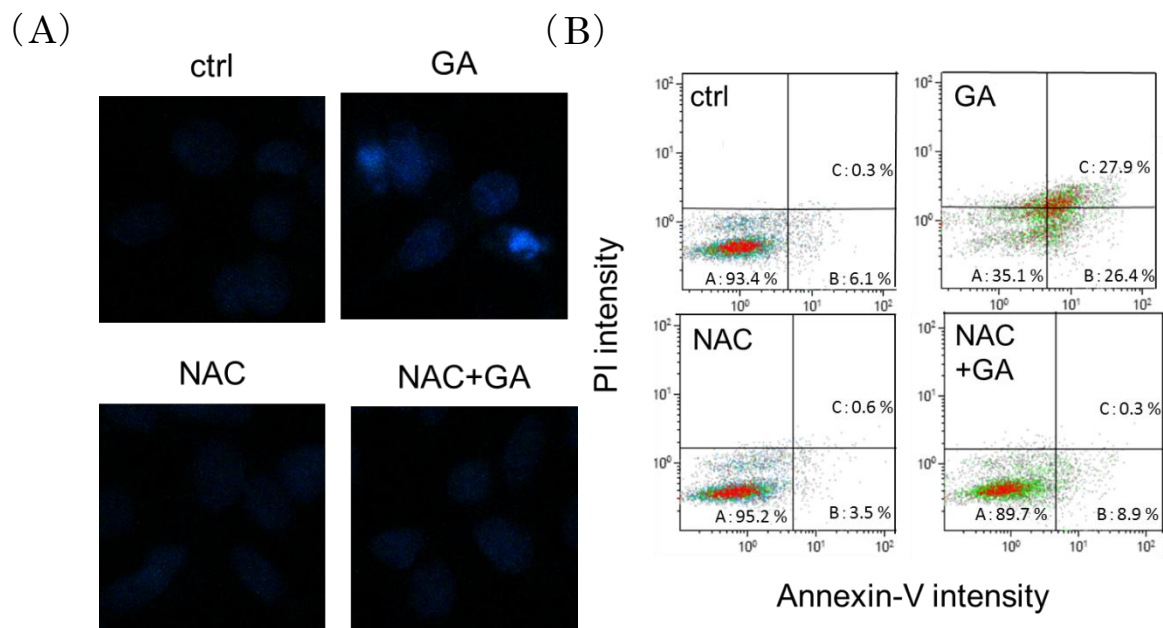


Fig. 25 GAによるCHOPの活性化および細胞膜構造の変化に対するNACの影響

シュワン細胞を500  $\mu\text{M}$  GAで24時間処理し、1 mM NAC存在下におけるCHOP発現量、細胞膜構造の変化に対するGAの影響を調べた。(A) CHOPタンパク質発現量は、免疫染色により共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。(B) 細胞膜構造の変化は、アネキシンV/PIの二重染色法によりフローサイトメーターを用いて評価した。

## 2. 細胞内GSH量に対するGAの影響

次に、シュワン細胞をGA (100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ) で24時間処理し、細胞内GSH量に及ぼすGAの影響について測定した。Fig. 26Aに示すように、細胞傷害が認められる250  $\mu\text{M}$  および500  $\mu\text{M}$  GA処理において (Fig. 6)、細胞内GSH量はいずれも約4倍まで有意に増加した。GSH合成の律速酵素である $\gamma$ -GCSのmRNA発現量を測定した結果、GA 500  $\mu\text{M}$  処理では有意に上昇し、GA 250  $\mu\text{M}$  処理では有意ではないものの2~3倍の上昇傾向を示した (Fig. 26B)。

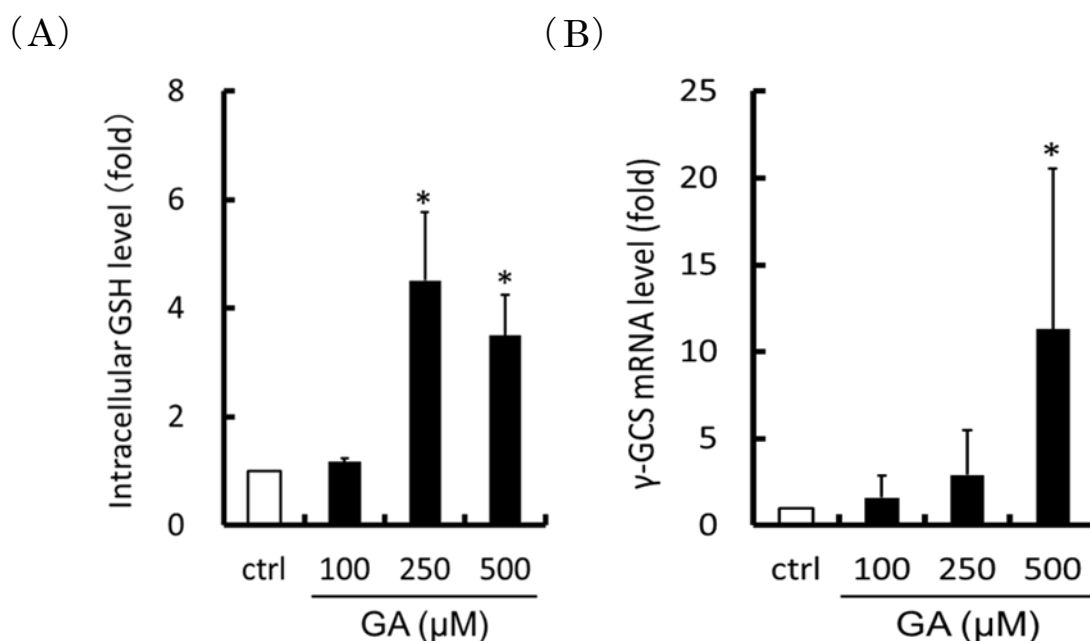


Fig. 26 細胞内 GSH 量および  $\gamma$ -GCS に対する GA の影響

シュワン細胞を 100, 250, 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。(A) 細胞内 GSH 量は、DTNB 酵素リサイクリング法により測定した。(B)  $\gamma$ -GCS mRNA は、real time RT-PCR により測定した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p$ <0.05 : コントロールと比較。

### 3. MRP1 発現量に対する GA の影響

MRP1 は GSH や GSSG、GSH 複合体の輸送に関わる薬物トランスポーターとして知られている<sup>73)</sup>。シュワン細胞の MRP1 タンパク質発現量をフローサイトメーターにより測定した (Fig. 27)。GA 500  $\mu$ M 処理細胞において、MRP1 タンパク質発現量を示す領域 A から領域 B への細胞集団のシフトが認められた。平均蛍光強度は、GA 500  $\mu$ M 処理では 3.4 倍に上昇し、GA 250  $\mu$ M では有意ではないが約 2 倍の上昇傾向を示した。次に、MRP1 ノックダウン細胞を用い、GA 誘導細胞傷害における MRP1 の役割について検討した。MRP1 mRNA 発現量で評価したノックダウン効率は 90%であった。Fig. 28 に示すように、MRP1 ノックダウン細胞では、GA による細胞傷害の増強が有意に認められた。

以上 1~3 の結果より、GA が  $\gamma$ -GCS および MRP1 の発現量を増加させる

こと、GSH および MRP1 は GA 誘導細胞傷害に防御作用を示すことが明らかになった。これらの結果から、GSH は unfolded proteins の修復に寄与すると共に、MRP1 と連携して GA 誘導細胞傷害を防御していると考えられる。

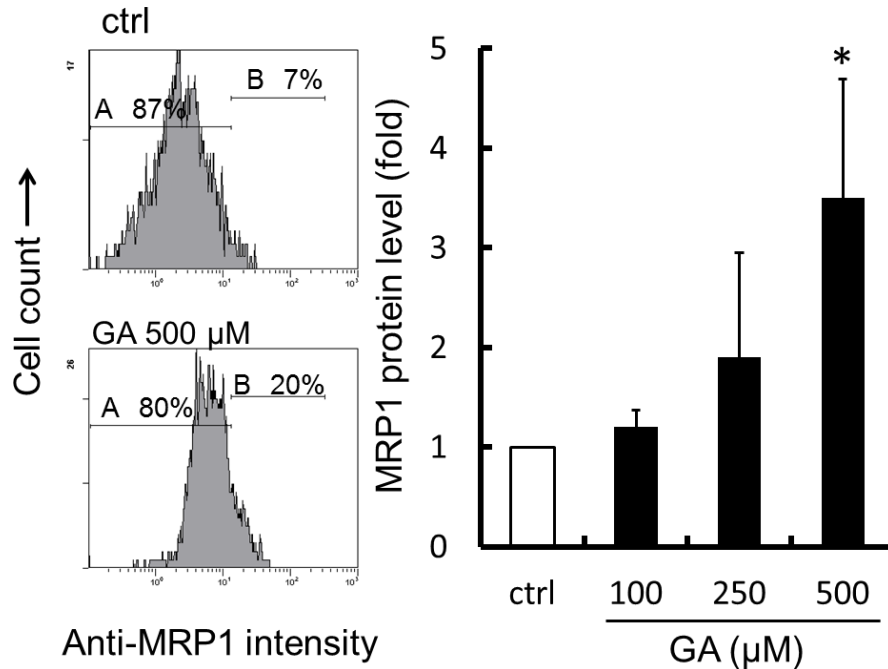


Fig. 27 GA による MRP1 発現量に対する影響

シュワン細胞を 500 μM GA で 24 時間処理した。MRP1 タンパク質発現量は、抗 MRP1-PE 抗体を用いてフローサイトメーターにより測定した。グラフはコントロール細胞の平均蛍光強度を 1 としたときの相対値で表した。データは、平均値±標準偏差 (n=3) で示している。\* $p<0.05$  : コントロールと比較。



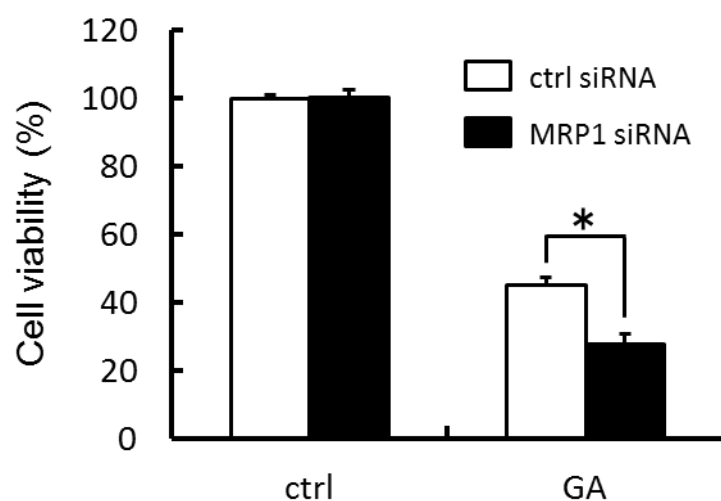


Fig. 28 MRP1 ノックダウン細胞における GA の細胞生存率に対する影響

MRP1 ノックダウン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。細胞生存率は MTS 試験により測定した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=6) で示している。\* $p$ <0.05

#### 4. Keap1/Nrf2 システムに対する GA の影響

Keap1/Nrf2 システムは、ストレス応答機構の中心的役割を担っている。 $\gamma$ -GCS や MRP1 の発現誘導に関与するだけでなく、様々なストレス応答タンパク質の発現を制御していることが知られている<sup>27-30</sup>。なかでも HO-1 は、Keap1/Nrf2 システムによって制御されている代表的なタンパク質である<sup>27-30</sup>。HO-1 に対する GA (500  $\mu$ M) の影響について解析した (Fig. 29)。その結果、HO-1 mRNA およびタンパク質の両発現量の著しい増加が認められた。

そこで次に、GA によるストレス応答機構に Keap1/Nrf2 システムが関与している可能性について、Nrf2 に着目して検討した。GA 500  $\mu$ M 処理細胞では、Nrf2 mRNA 発現量は約 3 倍に上昇し (Fig. 30A)、ELIZA 法で測定した核内 Nrf2 タンパク質量の増加も認められた (Fig. 30B)。GA 250  $\mu$ M では、Nrf2 に対する有意な影響は見られなかったが、mRNA およびタンパク質の両発現量とも僅かながら上昇傾向を示した。GA 500  $\mu$ M 処理細胞における Nrf2 タンパク質発現量の増加を共焦点レーザー顕微鏡により確認した (Fig. 30C)。

さらにヘキスト染色を行った結果、Nrf2 の活性化を示す Nrf2 タンパク質の核への移行が認められた。これらの結果から、GA が Nrf2 を活性化することが明らかとなり、Nrf2 の活性化が細胞内 GSH の上昇、 $\gamma$ -GCS および MRP1 の発現誘導に結びついていることが示唆された。

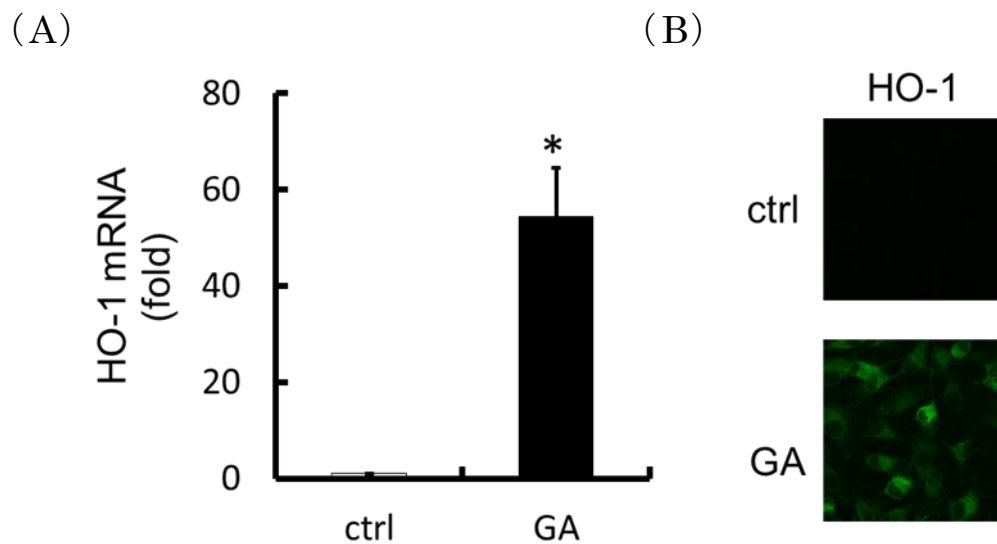


Fig. 29 HO-1 に対する GA の影響

シュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。HO-1 mRNA 発現量(A)は、real time RT-PCR 法により、HO-1 タンパク質発現量(B)は、共焦点レーザー顕微鏡により評価した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p$ <0.05: コントロールと比較。

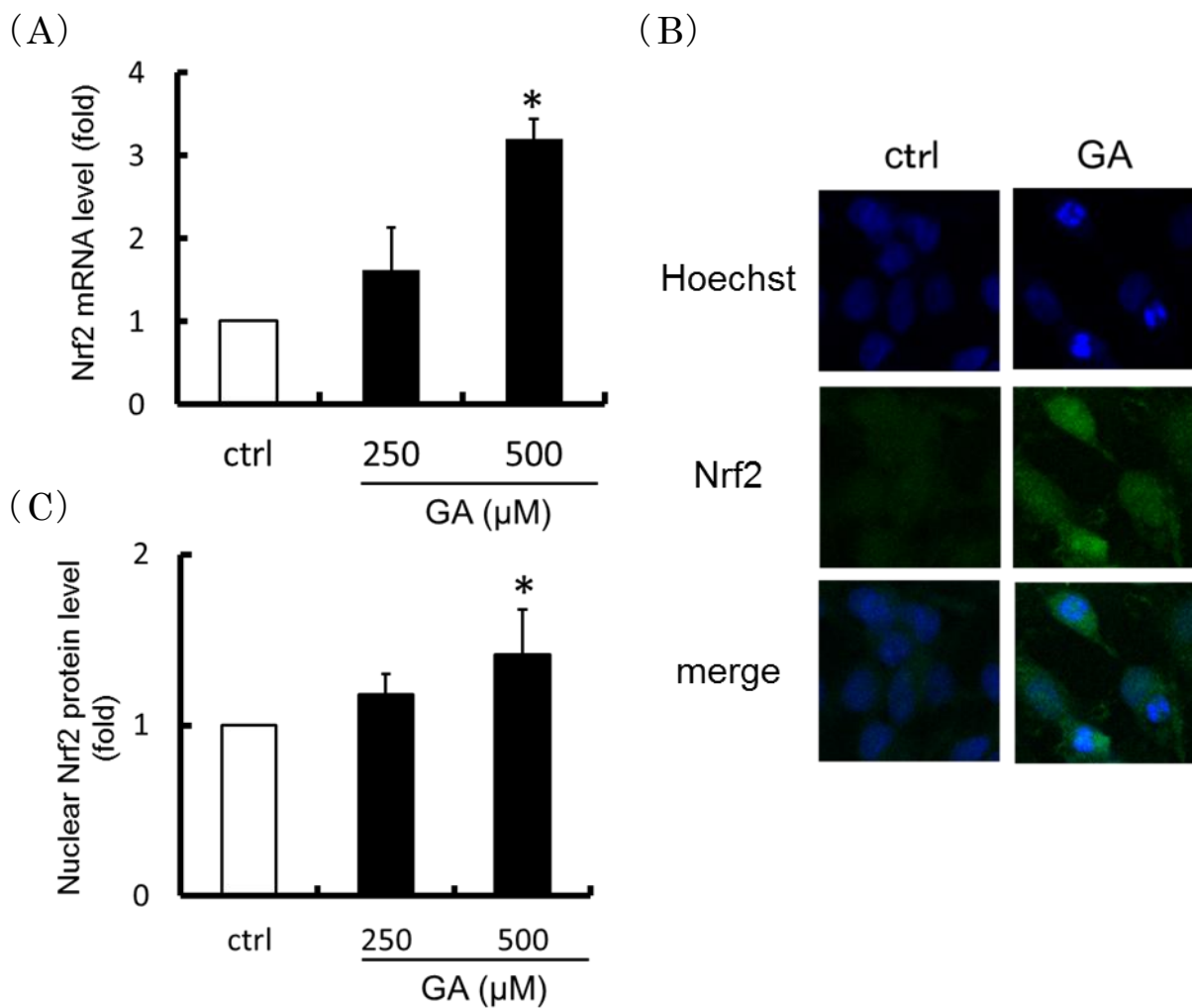


Fig. 30 Nrf2 mRNA に対する GA の影響

シュワン細胞を 500 μM GA で処理した。(A) GA 処理 24 時間後、Nrf2 mRNA は、real time RT-PCR により評価した。(B) GA 処理 24 時間後、Nrf2 タンパク質発現量は、免疫染色法により共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。(C) GA 処理 8 時間後、核内 Nrf2 タンパク質量は、ELISA 法により測定した。データは、平均値±標準偏差(n=3)で示している。\* $p < 0.05$  : コントロールと比較。

## 5. Nrf2 ノックダウン細胞における GA の影響

Nrf2 ノックダウン細胞を用いて GA の影響について検討した。Nrf2 mRNA 発現量で評価したノックダウン効率は 70%であった。

Nrf2 ノックダウン細胞において、GA (500  $\mu$ M) により誘導される  $\gamma$ -GCS mRNA 発現量および細胞内 GSH 量の増大は顕著に抑制された (Fig. 31)。さらに Nrf2 ノックダウン細胞では、GA による細胞生存率の低下が僅かながら有意に亢進されることが明らかになった (Fig. 32)。

以上のことから、GA は小胞体ストレスおよびアポトーシスを誘導するが、この過程においてストレス応答機構である Keap1/Nrf2 システムの活性化が起こっていることが示唆される。シュワン細胞は Keap1/Nrf2 システムを活性化し、GA による小胞体ストレスの回避を図るが、そのストレスが過度なためにアポトーシスに至ると推察される。

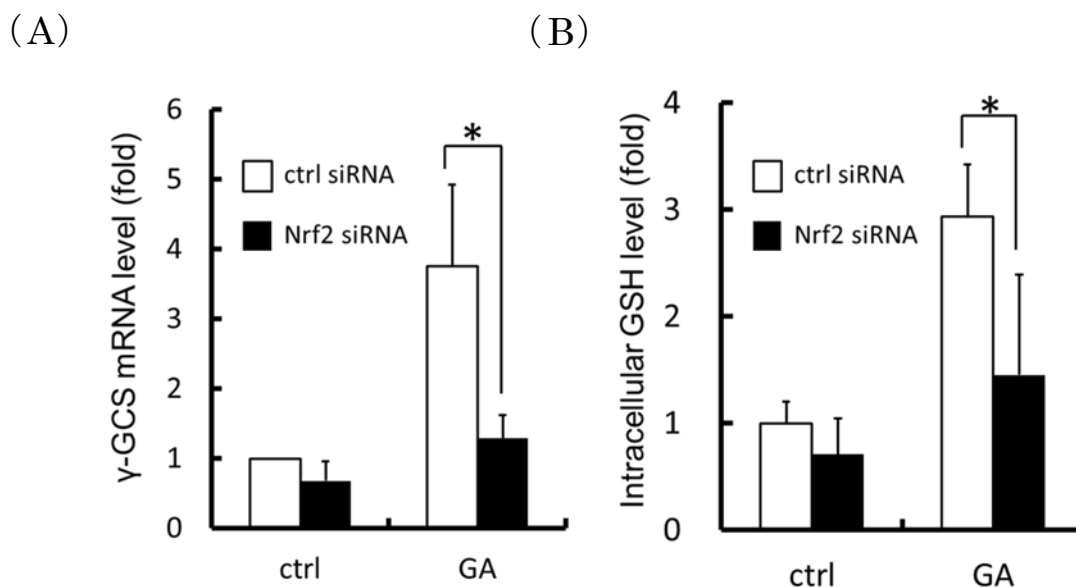


Fig. 31 Nrf2 ノックダウン細胞における GA の細胞内 GSH に対する影響

Nrf2 ノックダウンシュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。(A)  $\gamma$ -GCS mRNA は real time RT-PCR 法により、(B) 細胞内 GSH 量は DTNB 酵素リサイクリング法により測定した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示している。\* $p < 0.05$

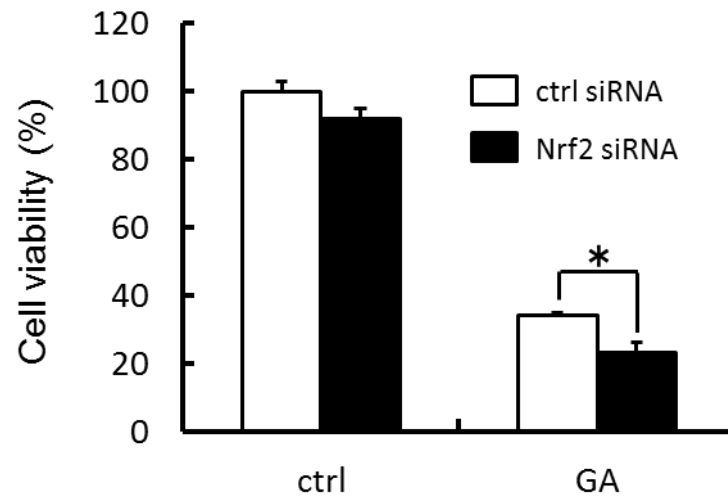


Fig. 32 Nrf2 ノックダウン細胞における GA の細胞生存率に対する影響

Nrf2 ノックダウンシュワン細胞を 500  $\mu$ M GA で 24 時間処理した。細胞生存率は MTS 試験により測定した。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=6) で示している。\* $p$ <0.05

#### 6. GA による細胞傷害に対する Keap1/Nrf2 システム活性化の影響

当研究室では、シュワン細胞を糖尿病性神経障害治療薬であるエパルレスタット (EPS) で処理すると、Keap1/Nrf2 システムが活性化することを報告している<sup>74)</sup>。Fig. 33 に示すように、GA により誘導される細胞傷害は EPS (50  $\mu$ M) を共存させると有意に抑制された。この結果は、GA 誘導細胞傷害に対して Keap1/Nrf2 システムが防御作用を果たしていることを示唆するものである。

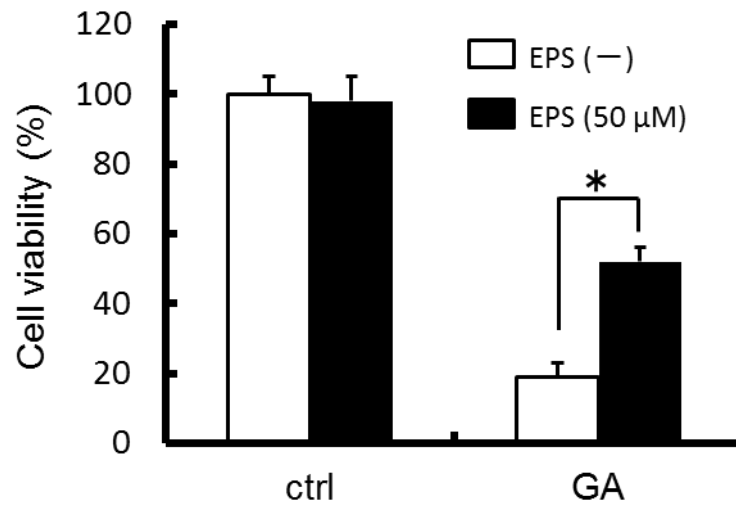


Fig. 33 GA 誘導細胞傷害に対する EPS の影響

シュワン細胞を 500 μM GA で 24 時間処理し、同時添加した 50 μM EPS 存在下における細胞生存率の測定を行った。細胞生存率は、MTS 試験により測定した。データは、平均値±標準偏差 (n=6) で示している。\* $p < 0.05$

#### 第 4 節 考察

小胞体ストレスやオートファジー誘導時には、ストレス応答機構が活発に働いていると考えられる。Keap1/Nrf2 システムは、小胞体ストレス応答機構の中心的役割を果たしており、GSH 生合成の律速酵素である  $\gamma$ -GCS や、HO-1 をはじめとする様々なストレス応答タンパク質の発現を制御する<sup>27-30)</sup>。従って、GA により小胞体ストレスやアポトーシスが誘導される過程では、これに対抗するためにストレス応答機構が活性化されている可能性が考えられる。第 3 章では、シュワン細胞において GA は  $\gamma$ -GCS および HO-1 の発現量を増加すること、Nrf2 を活性化することを示した。また、細胞内 GSH 量および MRP1 発現量を増加させることが明らかになった<sup>75)</sup>。

初めに、GA 誘導細胞傷害に対する GSH の影響を調べるため、GSH の前駆体である NAC を用い検討した。NAC (1 mM) を添加すると、GA (500 μM) による細胞生存率の低下、小胞体ストレスを示す CHOP の誘導、アポトーシ

スを示す細胞膜構造の変化は、いずれも顕著に抑制された (Fig. 24, 25)。MG および AGEs 誘導細胞傷害における NAC の抑制作用は抗酸化作用に起因している と報告されている<sup>69, 70)</sup>。しかし、GA 誘導細胞傷害の過程では ROS の増大は認められなかった (第 2 章)。データには示さなかったが、膜透過性の polyethylene glycol-SOD や polyethylene glycol-catalase、SOD/catalase mimetic の MnTMPyP を添加しても GA 誘導細胞傷害が抑制されないことを確認した。これらの結果から、GA 誘導細胞傷害において、NAC の抑制作用が抗酸化作用に基づくとは考えにくい。一方、抑制作用は GSH (1 mM) を添加した場合も認められた (Fig. 24)。GSH は一般に細胞内に数 mM の濃度で存在し、添加した GSH は細胞内へ取り込まれにくい。このことから、GSH を添加しても、細胞内 GSH 濃度は大きく上昇しないと推測される。従って、添加した GSH や NAC は細胞外において抑制効果を発揮していると考えられる。GSH および NAC が細胞外 (培地中) で GA と非酵素的に複合体を形成し、GA の細胞内への取り込みが阻害されている可能性について検討した。試験管内で GSH あるいは NAC と GA を共存させても、それらの SH 基は保たれていた (data not shown)。このことから、GSH と GA との複合体は非酵素的には生成しないと考えられる。以上より、本研究では GSH および NAC 添加による抑制機構を明らかにすることは出来なかったが、SH 化合物が細胞外に多く存在することが GA 誘導細胞傷害の抑制に重要であることを明らかにした。

シュワン細胞を MG で処理すると、細胞内 GSH 量は減少することが報告されている<sup>70)</sup>。シュワン細胞を GA で処理し、細胞内 GSH 量、 $\gamma$ -GCS および MRP1 発現量に対する GA の影響について検討した。GA 500  $\mu$ M 処理細胞では、細胞内 GSH 量は顕著に増加し、併せて  $\gamma$ -GCS mRNA 発現量の上昇が認められた (Fig. 26)。さらに MRP1 の発現誘導が認められ (Fig. 27)、MRP1 ノックダウン細胞を用いて検討したところ、GA 誘導細胞傷害に対し MRP1 が防御作用を示していることが明らかになった (Fig. 28)。これらの結果から、GA は細胞内 GSH の生合成を誘導し、増加した細胞内 GSH は、小胞体ストレスにより蓄積した unfolded proteins の修復に関わると共に、MRP1 と連携して GA 誘導細胞傷害を防御していると考えられる。その機構として以

下の2つの可能性を考えている。①前述したように、細胞外においてSH化合物は抑制作用を示す。MRP1はGSHやGSH複合体の輸送するトランスポーターである<sup>73)</sup>。このことから、細胞内GSHがMRP1を介して輸送され、輸送された細胞外GSHが防御機能を果たす。②前述したように、GSHとGAとの複合体は非酵素的には生成しない。しかし、細胞内では酵素反応により複合体を生じる可能性がある。例えば、細胞内に取り込まれたGAはGSH S-トランスフェラーゼの触媒によりGS-GA複合体となり、このGSH複合体がMRP1を介して輸送される。その結果、細胞内GA濃度が減少し、細胞傷害が抑制される。なお、本研究では測定していないが、GSH S-トランスフェラーゼはKeap1/Nrf2システムに制御されていることから<sup>27-30)</sup>、GAによる発現誘導が起こっていると推測される。以上より、細胞内GSHとMRP1は連携してGAによる細胞傷害を防御していることが考えられるが、現段階でGS-GA複合体が形成するのか、あるいはMRP1の基質になり得るのかは解明できなかった。また、GSHやGSH複合体の輸送に他のトランスポーターが関与している可能性も否定できない。一方、GAの代謝については、glyoxalaseを除き、他の報告はなされていない。Glyoxalaseは、GSHを基質としてGAをジカルボニル化合物のGOおよびO<sub>2</sub><sup>-</sup>へ変換するが、シュワン細胞ではGAによるROSの増加は認められず、glyoxalaseによるGAの代謝の影響は低いと推測される。

Keap1/Nrf2システムは、小胞体ストレス応答機構において重要な役割を果たしている。通常、転写因子Nrf2は、細胞質に存在するKeap1に結合し不活性状態にある<sup>27-30)</sup>。しかし、ストレス存在下ではKeap1から解離し、核に移行することで活性化される。核に移行したNrf2は、抗酸化酵素や第II相解毒酵素などの遺伝子上流に位置する抗酸化剤応答配列antioxidant response elementに結合し、これら遺伝子の発現を調節している。Keap1/Nrf2システムは、 $\gamma$ -GCSやMRP1だけでなく、多くのストレス応答タンパク質の発現制御に関わっている<sup>27-30)</sup>。なかでもHO-1は、Keap1/Nrf2システムによって制御されている代表的なストレス応答タンパク質である<sup>27-30)</sup>。HO-1に対するGA(500  $\mu$ M)の影響について検討した。その結果、HO-1 mRNAおよびタンパク質の両発現量は著しく増大し(Fig. 29)、GA処理細胞ではスト



レス応答機構が誘導されていることが明らかになった。そこで次に、GA によるストレス応答機構の誘導に、Keap1/Nrf2 システムが関与しているかどうか検討した。GA 500  $\mu$ M 処理細胞では、Nrf2 mRNA およびタンパク質発現量の増大、Nrf2 活性化を示す核へ移行が認められた (Fig. 30)。さらに、Nrf2 ノックダウン細胞において、GA による  $\gamma$ -GCS および細胞内 GSH の両方の増加が顕著に抑制された (Fig. 31)。このことから、GA による  $\gamma$ -GCS の発現誘導と、それに続く細胞内 GSH の増大は、Nrf2 の活性化を介して起こっていると示唆される。今回の研究では、MRP1 発現誘導と Nrf2 の関連性について検討を行っていないが、MRP1 も  $\gamma$ -GCS 同様 Keap1/Nrf2 システムに制御されていることから、MRP1 発現誘導にも Nrf2 活性化の関与が考えられる。なお、GA 250  $\mu$ M 処理細胞では、細胞内 GSH 量は増加し、 $\gamma$ -GCS や MRP1、Nrf2 発現量も有意ではないが上昇傾向を示した (Fig. 26, 27, 30)。おそらく、GA 250  $\mu$ M 処理細胞においても Nrf2 活性化を介して  $\gamma$ -GCS や MRP1 の発現が誘導され、GSH 量が増加していると推測される。一方、GSH 量の増加は GA 250  $\mu$ M および 500  $\mu$ M で同程度 (約 4 倍) であった。この場合、測定上 GSH 濃度が飽和に達していないことは確認している。GSH 量が同程度であった理由は明らかではないが、GA 500  $\mu$ M 処理細胞では小胞体ストレスが強いために GSH が unfolded proteins の修復に多く使われていること、MRP1 発現増大のために GSH の細胞外へ輸送が促進されていること、膜傷害により GSH 漏出が起こっている可能性が考えられる。

以上のことから、GA によるストレス応答機構の誘導に Keap1/Nrf2 システムの関与が示唆される。Nrf2 ノックダウン細胞では GA による細胞傷害の亢進が認められ (Fig. 32)、Keap1/Nrf2 システムが防御的に作用していることが明らかになった。Keap1/Nrf2 システムは種々ストレスにより活性化されるが、小胞体ストレスにより活性化するメカニズムについては小胞体ストレスセンサーである PERK のリン酸化により Keap1 がリン酸化され Nrf2 が活性化されることが報告されている<sup>76)</sup>。

第 2 章で示したように、GA 処理細胞では PERK のリン酸化が認められた。このことから、PERK のリン酸化が GA による Nrf2 活性化に関与していると考えられる。本章で得られた結果の推定機構を Fig. 34 に示す。

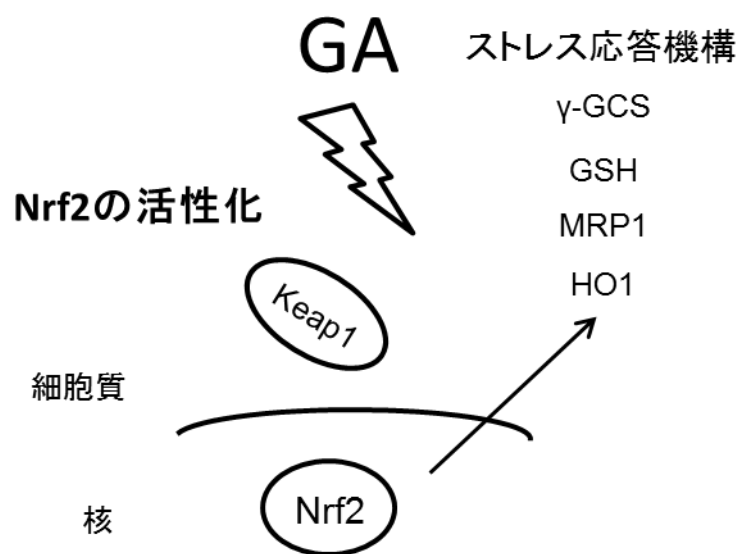


Fig. 34 GA によるストレス応答機構の誘導

著者らは、糖尿病性神経障害治療薬 EPS のドラッグリプロファイリングに関する研究を行い、EPS が Keap1/Nrf2 システムを活性化することを明らかにしている<sup>74)</sup>。GA により誘導される細胞傷害は、EPS により抑制された (Fig. 33)。この結果は、Keap1/Nrf2 システムが GA による細胞傷害に対し防御作用を示すことに一致する。

## 総括

糖尿病の合併症の中でも神経障害は比較的早期かつ高頻度に発症する合併症であり、その発症メカニズムはプロテインキナーゼ C の活性化、ポリオール経路、糖化反応などが考えられている。糖化反応は血中グルコースとタンパク質の非酵素的な反応により始まり、HbA<sub>1c</sub> のようなアマトリ化合物の形成を経由して、GA などの  $\alpha$ -ヒドロキシアルデヒドや MG などのジカルボニル化合物を生成する。糖化反応は最終的に AGEs が生成する反応であり、AGEs の蓄積が糖尿病合併症に関与していることが示唆されている。なかでも GA 由来の AGE-3 は、生物作用が強いことが報告されている。現在までに、MG や AGEs はミトコンドリアを傷害し、酸化ストレスを介してアポトーシスを起こすことが報告されている。一方、GA の影響については明らかにされていない。そこで本研究では、末梢神経構成細胞であるシュワン細胞を用い、GA の影響について検討を行った。

第 1 章では、GA がシュワン細胞において細胞傷害を引き起こすことが明らかになった。GA の細胞傷害能は、MG などのジカルボニル化合物に比べて強かった。GA の細胞傷害の過程では、アポトーシスの形態学的特徴である細胞膜構造の変化、DNA の断片化が認められた。さらに、生化学的特徴であるカスパーゼ-3 の活性化が認められた。これらの結果から、GA はシュワン細胞のアポトーシスを誘導すると示唆される。

第 2 章では、GA によるアポトーシス誘導機構について検討した。アポトーシスは一般にミトコンドリア、小胞体、膜受容体を経由して誘導される。GA によるミトコンドリアの傷害および ROS 産生の増加は認められず、MG および AGEs とは異なるアポトーシス誘導機構が存在すると考えられる。一方、小胞体ストレスセンサーである PERK および IRE1 の活性化と、unfolded proteins の蓄積を示すオートファゴソームの形成が認められた。さらに、小胞体ストレス誘導アポトーシスを決定づける CHOP の活性化が明らかとなった。これらの結果から、GA は小胞体ストレス誘導性アポトーシスを惹起すると示唆される。また、Fas 受容体 mRNA の増大やその下流に位置するカスパーゼ-8 の活性化が認められ、GA によるアポトーシスには膜受容体を介

する経路も関与していることが考えられる。

第3章では、ストレス応答機構に対するGAの影響について検討した。GAによる細胞傷害は、GSHの前駆体であるNACの添加により抑制された。NACの抑制作用は、小胞体ストレスおよびアポトーシスに対しても認められた。GA処理細胞では、GSH生合成の律速酵素である $\gamma$ -GCSの発現誘導と共に、細胞内GSH量は上昇した。また、GSHやGSH複合体の輸送に関わるMRP1発現量の増大が観察された。さらに、MRP1ノックダウン細胞において、GAによる細胞傷害の増強が認められた。これらの結果から、GSHはunfolded proteinsの修復に関わると共に、MRP1と連携してGAによる細胞傷害に対して防御的役割を担っていると考えられる。

Keap1/Nrf2システムは、小胞体ストレス応答機構の中心的役割を担っている。 $\gamma$ -GCSやMRP1の発現誘導に関与するだけではなく、様々なストレス応答タンパク質の発現を制御していることが知られている。なかでもHO-1は、Keap1/Nrf2システムによって制御されている代表的なストレス応答タンパク質である。GA処理細胞では、HO-1の発現量は顕著に増大し、ストレス応答機構の誘導を示した。そこで次に、GAによるストレス応答機構の誘導に、Keap1/Nrf2システムが関与している可能性について検討した。GA処理細胞ではNrf2の活性化が認められた。Nrf2ノックダウン細胞において、 $\gamma$ -GCSの発現誘導やGSH量の増大が抑制された。このことから、GAによるストレス応答機構の誘導にKeap1/Nrf2システムの関与が示唆される。さらに、Nrf2ノックダウン細胞では、GAによる細胞傷害が亢進され、Keap1/Nrf2システムが防御的に作用していることが明らかになった。

以上より、本研究ではシュワン細胞においてGAは小胞体ストレス誘導性アポトーシスを惹起すること、小胞体ストレス応答機構を活性化することを明らかにし、この推定機構をFig. 35にまとめた。

シュワン細胞において、GAは①アポトーシスを引き起こす。この過程では②小胞体ストレスが起こり、小胞体ストレスを感知したPERK、IRE1のセンサーが活性化され、小胞体内腔のunfolded proteinsを除去するためのオートファジー機構が働く。一方で、③ストレス応答機構であるKeap1/Nrf2システムの活性化に伴い $\gamma$ -GCS、MRP1、HO-1が誘導され、GAによるストレス

の回避を図る。しかし、GA によるストレスがストレス応答機構を上回るために CHOP の活性化が起こり、アポトーシスに至ると推察される。

糖尿病性神経障害の発症メカニズムには、シュワン細胞のアポトーシスの関与が示唆されている<sup>36)</sup>。最近では、2型糖尿病患者において膵β細胞の生細胞数が減少していることが明らかになってきている<sup>56)</sup>。この一因として、小胞体ストレスによるアポトーシスが注目されている。GA による小胞体ストレス誘導性アポトーシス、そのストレス応答機構に関する本研究の成果は、GA をはじめとする種々の糖化反応生成物が小胞体ストレスを介して糖尿病合併症の発症や進展に影響を及ぼしている可能性を示すものである。

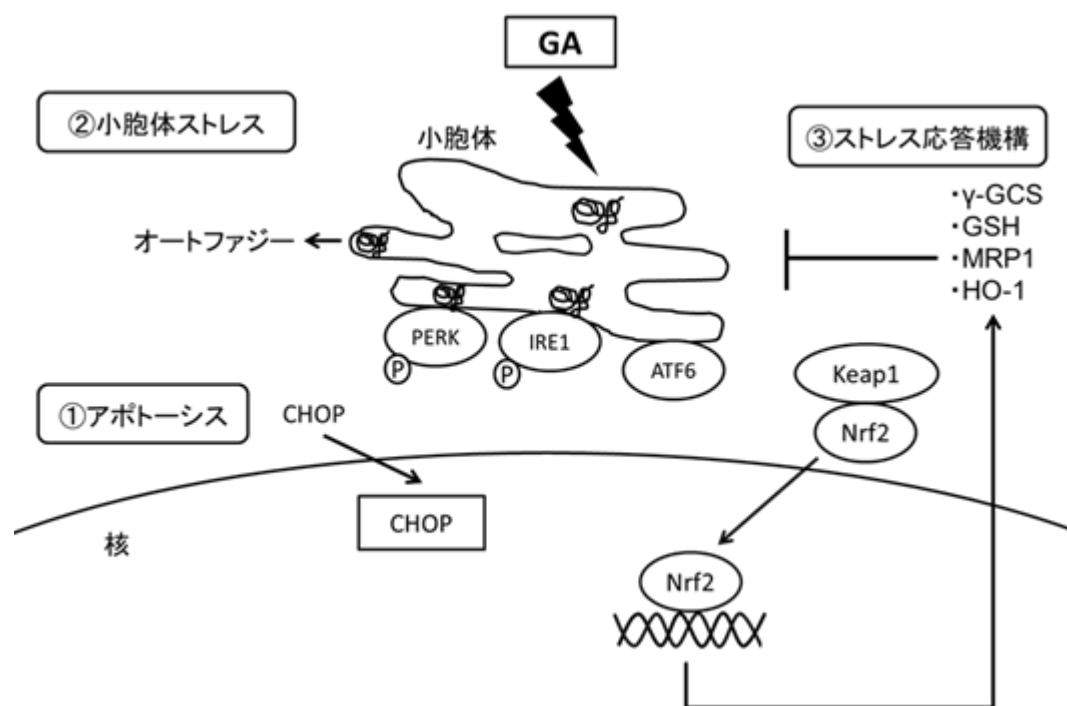


Fig. 35 GA による小胞体ストレス誘導性アポトーシス推定機構

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始親身に御指導、御鞭撻を賜りました北海道薬科大学公衆・環境衛生学分野 丹保好子教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究に御協力、御助言を頂きました北海道薬科大学公衆・環境衛生学分野 立浪良介講師に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究にあたり御協力頂きました北海道薬科大学大学院博士課程 2年 山佳織氏、1年 村尾優氏に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Diabetes Atlas 2012 update.
- 2) Obrosova I. G., *Curr. Diab. Rep.*, **3**, 439-445 (2003).
- 3) 竹内正義, 北陸大学紀要, **28**, 33-48 (2004).
- 4) Sugimoto K., Nishizawa Y., Horiuchi S., Yagihashi S., *Diabetologia*, **40**, 1380-1387 (1997).
- 5) 鈴木猛志, 岐阜薬科大学紀要, **57**, 55-64 (2008).
- 6) Jack M., Wright D., *Transl. Res.*, **159**, 355-365 (2012).
- 7) Glomb. M. A., Monnier V. M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10017-10026 (1995).
- 8) Wells-Knecht K. J., Zyzak. D. V., Litchfield J. E., Thorpe S. R., Baynes. J. W., *Biochemistry*, **34**, 3702-3709 (1995).
- 9) Thornalley P. J., Langborg A., Minhas H. S., *Biochem. J.*, **344**, 109-116 (1999).
- 10) Takeuchi M., Makita Z., Yanagisawa K., Kameda Y., Koike T. *Mol. Med.*, **5**, 393-405 (1999).
- 11) Takeuchi M., Makita Z., Bucala R., Suzuki T., Koike T., Kameda Y., *Mol. Med.*, **6**, 114-125 (2000).
- 12) Takeuchi M., Yanase Y., Matsuura N., Yamagishi S., Kameda Y., Bucala R., Makita Z., *Mol. Med.*, **7**, 783-791 (2001).
- 13) Anderson M. M., Hazen S. L., Hsu F. F., Heinecke J. W., *J. Clin. Invest.*, **99**, 424-432 (1997).
- 14) Ota K., Nakamura J., Li W., Kozakae M., Watarai A., Nakamura N., Yasuda Y., Nakashima E., Naruse K., Watabe K., Kato K., Oiso Y., Hamada Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 270-275 (2007).
- 15) Li S. Y., Sigmon V. K., Babcock S. A., Ren J., *Life Sci.*, **80**, 1051-1056 (2007).
- 16) Hsuuw Y. D., Chang C. K., Chan W. H., Yu J. S., *J. Cell Physiol.*, **205**, 379-386 (2005).
- 17) Weinberg E., Maymon T., Weinreb M., *J. Mol. Endocrinol.*, **52**, 67-76

- (2014).
- 18) Du J., Suzuki H., Nagase F., Akhand A. A., Yokoyama T., Miyata T., Kurosawa K., Nakashima I., *J. Cell Biochem.*, **77**, 333-344 (2000).
  - 19) Sekido H., Suzuki T., Jomori T., Takeuchi M., Yabe-Nishimura C., Yagihashi S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 241-248 (2004).
  - 20) Eizirik D. L., Cardozo A. K., Cnop M., *Endocr. Rev.*, **29**, 42-61 (2008).
  - 21) Laybutt D. R., Preston A. M., Akerfeldt M. C., Kench J. G., Busch A. K., Biankin A. V., Biden T. J., *Diabetologia*, **50**, 752-763 (2007).
  - 22) Kaufman R. J., *Genes Dev.*, **13**, 1211-1233 (1999).
  - 23) Gardner B. M., Pincus D., Gotthardt K., Gallagher C. M., Walter P., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5** (2013).
  - 24) Rutkowski D. T., Kaufman R. J., *Trends Cell Biol.*, **14**, 20-28 (2004).
  - 25) Logue S. E., Cleary P., Saveljeva S., Samali A., *Apoptosis*, **18**, 537-546 (2013).
  - 26) Wang X. Z., Lawson B., Brewer J. W., Zinszner H., Sanjay A., Mi L. J., Boorstein R., Kreibich G., Hendershot L. M., Ron D., *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4273-4280 (1996).
  - 27) Kensler T. W., Wakabayashi N., Biswal S., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89-116 (2007).
  - 28) Kalyanaraman B., *Redox Biol.*, **1**, 244-257 (2013).
  - 29) Kansanen E., Kuosmanen S. M., Leinonen H., Levonen A. L., *Redox Biol.*, **1**, 45-49 (2013).
  - 30) Okita Y., Kamoshida A., Suzuki H., Itoh K., Motohashi H., Igarashi K., Yamamoto M., Ogami T., Koinuma D., Kato M., *J. Biol. Chem.*, **288**, 20658-20667 (2013).
  - 31) Brown B. E., Dean R. T., Davies M. J., *Diabetologia*, **48**, 361-369 (2005).
  - 32) Morgan P. E., Dean R. T., Davies M. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **403**, 259-269 (2002).
  - 33) Ukeda H., Hasegawa Y., Ishi T., Sawamura M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 2039-2042, (1997).



- 34) Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 89-93 (1999).
- 35) Al-Enezi K. S., Alkhalaf M., Benov L. T., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1144-1151 (2006).
- 36) Sango K., Yanagisawa H., Takaku S., Kawakami E., Watabe K., *Exp. Diabetes Res.*, **2011**, (2011).
- 37) Dyck P. J., Giannini C., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55**, 1181-1193 (1996).
- 38) Eckersley L., *Int. Rev. Neurobiol.*, **50**, 293-321 (2002).
- 39) Oba T., Tatsunami R., Sato K., Takahashi K., Hao Z., Tampo Y., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 117-126 (2012).
- 40) Miller A. G., Smith D. G., Bhat M., Nagaraj R. H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 11864-11871 (2006).
- 41) Okado A., Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fujii J., Taniguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 219-224 (1996).
- 42) Kimura R., Okouchi M., Fujioka H., Ichiyanagi A., Ryuge F., Mizuno T., Imaeda K., Okayama N., Kamiya Y., Asai K., Joh T., *Neuroscience*, **162**, 1212-1219 (2009).
- 43) 高橋恭兵, 立浪良介, 丹保好子, 薬学雑誌, **128**, 1443-1448 (2008).
- 44) Alikhani M., Maclellan C. M., Raptis M., Vora S., Trackman P. C., Graves D. T., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**, C850-856 (2007).
- 45) Chen B. H., Jiang D. Y., Tang L. S., *Life Sci.*, **79**, 1040-1048 (2006).
- 46) Ishibashi Y., Yamagishi S., Matsui T., Ohta K., Tanoue R., Takeuchi M., Ueda S., Nakamura K., Okuda S., *Metabolism*, **61**, 1067-1072 (2012).
- 47) Yamagishi S., Inagaki Y., Okamoto T., Amano S., Koga K., Takeuchi M., Makita Z., *J. Biol. Chem.*, **277**, 20309-20315 (2002).
- 48) Mercer N., Ahmed H., Etcheverry S. B., Vasta G. R., Cortizo A. M., *Mol. Cell Biochem.*, **306**, 87-94 (2007).
- 49) Berridge M. V., Tan A. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 474-482 (1993).
- 50) Che W., Asahi M., Takahashi M., Kaneto H., Okado A., Higashiyama S., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18453-18459 (1997).

- 51) Yamabe S., Hirose J., Uehara Y., Okada T., Okamoto N., Oka K., Taniwaki T., Mizuta H., *FEBS J.*, **280**, 1617-1629 (2013).
- 52) Yim H-S., Kang S-O., Hah Y-C., Chock P. B., Yim M. B., *J. Biol. Chem.*, **270**, 28228-28233 (1995).
- 53) Kang J. H., *Mol. Cells*, **15**, 194-199 (2003).
- 54) Lee A. S., *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 504-510 (2001).
- 55) Kaufman R. J., *J. Clin. Invest.*, **110**, 1389-1398 (2002).
- 56) Butler A. E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R. A., Butler P. C., *Diabetes*, **52**, 102-110 (2003).
- 57) Adamopoulos C., Farmaki E., Spilioti E., Kiaris H., Piperi C., Papavassiliou A. G., *Clin. Chem. Lab. Med.*, **52**, 151-160 (2014).
- 58) Towbin H., Staehelin T., Gordon J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 59) Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5727-5732 (2005).
- 60) Kennedy M. C., Emptage M. H., Dreyer J. L., Beinert H., *J. Biol. Chem.*, **258**, 11098-11105 (1983).
- 61) Plank D.W., Kennedy M.C., Beinert H., Howard J.B., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20385-20393 (1989).
- 62) Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H. P., Ron D., *Science*, **287**, 664-666 (2000).
- 63) Yanagitani K., Imagawa Y., Iwawaki T., Hosoda A., Saito M., Kimata Y., Kohono K., *Mol. Cell*, **34**, 191-200 (2009).
- 64) Gotoh T., Endo M., Oike Y., *Int. J. Inflam.*, **2011** (2011).
- 65) Otda T., Takamura T., Misu H., Ota T., Murata S., Hayashi H., Takayama H., Kikuchi A., Kanamori T., Shima K. R., Lan F., Takeda T., Kurita S., Ishikura K., Kita Y., Iwayama K., Kato K., Uno M., Takeshita Y., Yamamoto M., Tokuyama K., Iseki S., Tanaka K., Kaneko S., *Diabetes*, **62**, 811-824 (2013).
- 66) Wu Y. B., Li H. Q., Ren M. S., Li W. T., Lv X. Y., Wang L., *Cell Physiol.*

- Biochem.*, **32**, 367-379 (2013).
- 67) Lockshin R. A., Zakeri Z., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2405-2419 (2004).
- 68) Xu X., Luo P., Wang Y., Cui Y., Miao L., *J. Int. Med. Res.*, **41**, 13-19 (2013).
- 69) Malhotra J. D., Kaufman R. J., *Antioxid. Redox signal.*, **9**, 2277-2293 (2007).
- 70) Fukunaga M., Miyata S., Liu B. F., Miyazaki H., Hirota Y., Higo S., Hamada Y., Ueyama S., Kasuga M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 689-695 (2004).
- 71) Shi L., Yu X., Yang H., Wu X., *PLoS One*, **8** (2013).
- 72) Griffith O. W., *Anal. Biochem.*, **106**, 207-212 (1980).
- 73) Cole S. P., Deeley R. G., *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 438-446 (2006).
- 74) Sato K., Kaori Y., Murao Y., Tatsunami R., Tampo Y., *Redox Biol.*, **2**, 15-21 (2014).
- 75) Sato K., Tatsunami R., Yama K., Tampo Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1111-1117 (2013).
- 76) Cullinan S. B., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R. J., Diehl J. A., *Mol. Cell Biol.*, **23**, 7198-7209 (2003).