

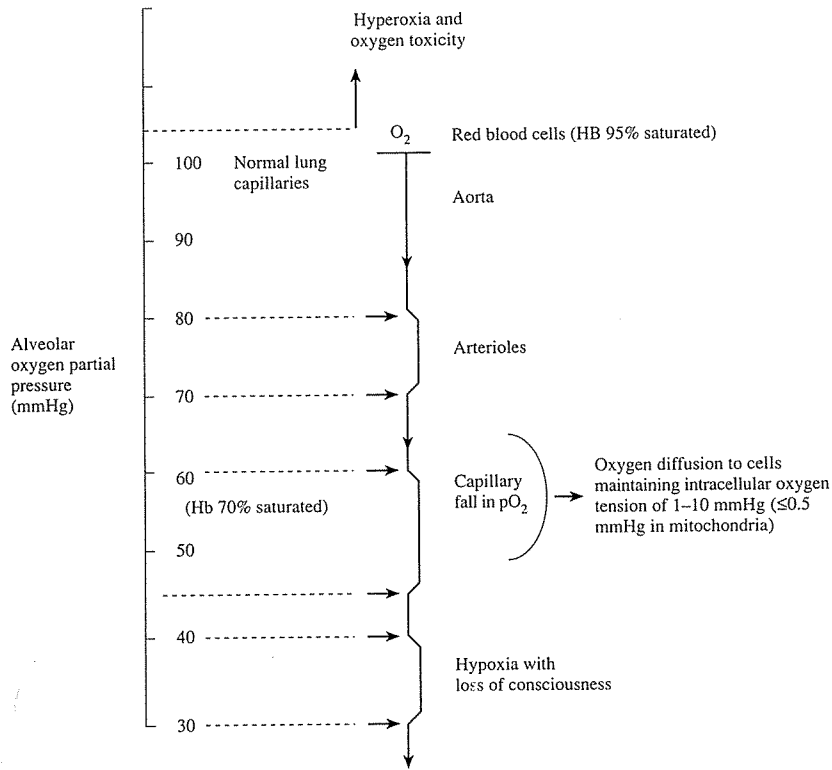
活性酸素の病理学

平成 27 年 4 月 6 日 (月曜日、豊國)

活性酸素 Reactive oxygen species ・ フリーラジカル Free radicals とは？

1. 酸素毒性

ヒトは 100% 1 気圧の酸素を吸って何日間生きられるだろうか？



放射線の酸素効果

Oxygen toxicity in aerobes

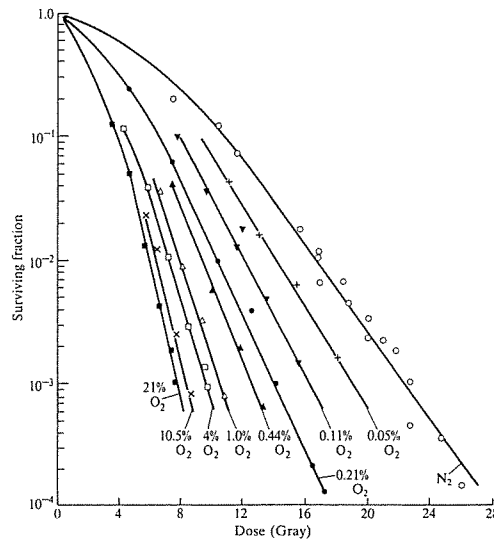


Fig. 1.9. The 'oxygen effect' in exposing cultured Chinese hamster ovary cells to ionizing radiation. Figure by courtesy of Dr H.B. Michaels.

動物の寿命と体重あたり酸素消費量との関係 (酸化ストレスマーカー)

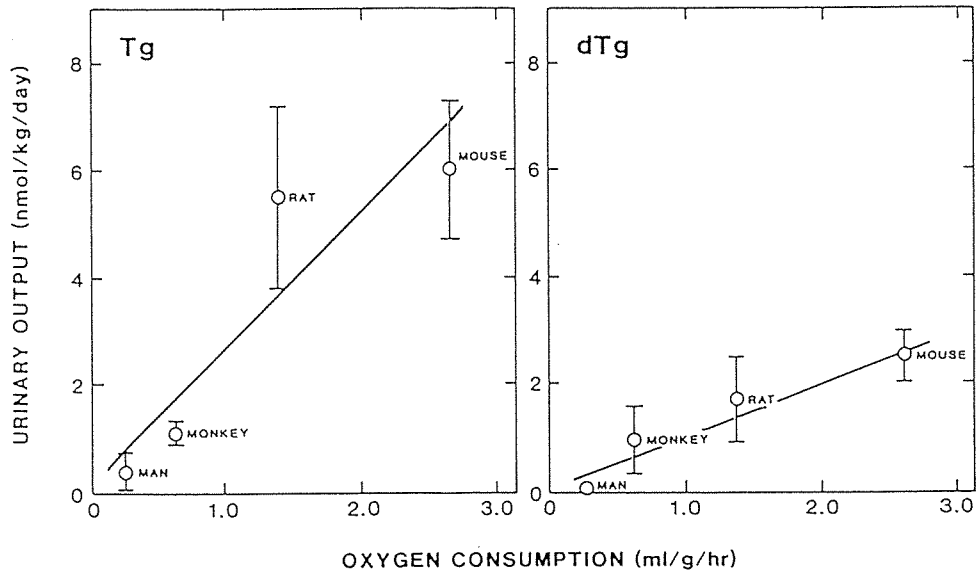


FIG. 1. Levels of thymine glycol (Tg) and thymidine glycol (dTg) in urines of four species expressed as a function of specific metabolic rate for that species (in O₂ per g/hr). Urine levels are mean values \pm SEM for 10 humans (8), for nine rats (8), for four mice on 3 days, and for three monkeys.

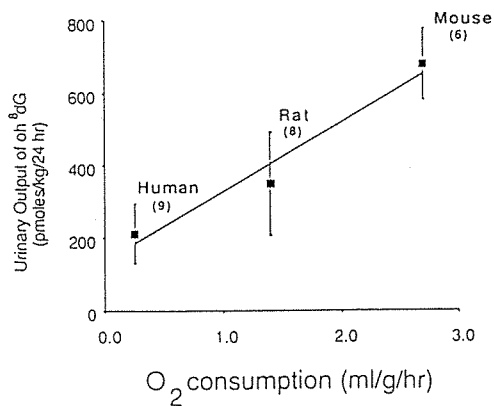
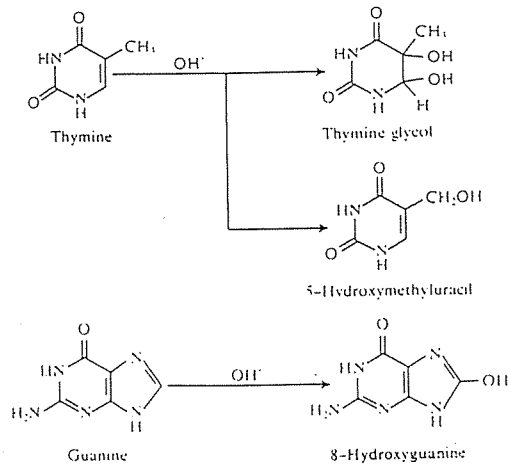
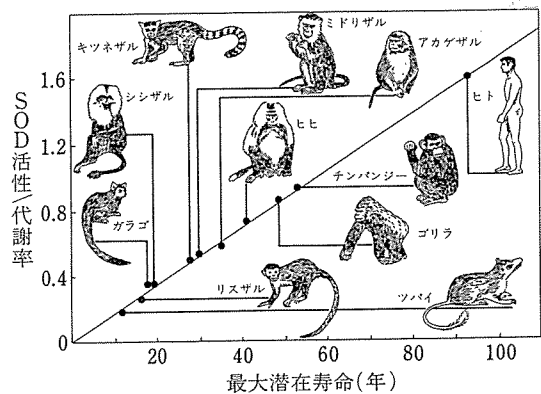
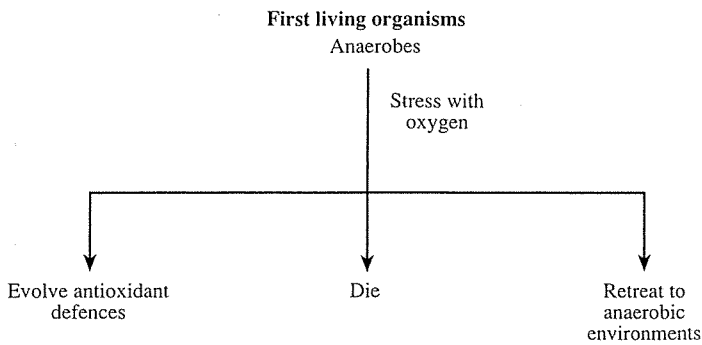


FIG. 4. Comparison of urinary 8-hydroxydG levels (mean \pm SEM) from human, rat, and mouse vs. species-specific metabolic rates. Numbers of samples analyzed are shown in parentheses.



進化との関係

Shigenaga M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 86: 9697-9701, 1989



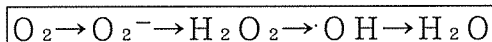
2. フリーラジカルとは？

- 1つ以上の（ ）を持つ化学種
- 反応性に富み、寿命が短い（不安定である）。
- 単にラジカルともいう。一般用語として極端な改革を求める人たち、過激派を指す。
- 有機物質、無機物質にかかわらず、あらゆる分子と反応する。
- フリーラジカルは（ ）を開始し、これと反応した分子が新たにフリーラジカルとなり、傷害を拡大していく。不対電子を2個持つものをバイラジカル(bi-radical)という（酸素分子）。
- 私たちの体の中では常にフリーラジカルが発生している。消費する酸素の3～5%がフリーラジカルになっていると考えられている。

3. フリーラジカルと活性酸素との違い

フリーラジカルは明確に定義されるが、活性酸素とは酸素原子を含んだラジカルあるいは非ラジカルでもラジカルと同じように反応性の高いものを指す。

酸素は一電子還元されやすい＝他の分子を酸化しやすい



酸素→スーパーオキシド→過酸化水素→ヒドロキシラジカル→水

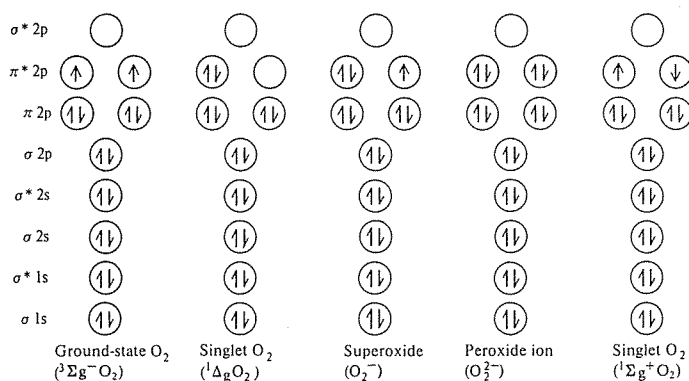


Fig. 1.12. A simplified version of bonding in the diatomic oxygen molecule and its derivatives. Atomic oxygen (atomic number 8) has a total of eight electrons. In O_2 16 electrons are present.

Table 1.4. Reactive oxygen species

Radicals	Non-radicals
Superoxide, $O_2^{\cdot -}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\cdot}	Hypochlorous acid, $HOCl^a$
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Ozone, O_3
Alkoxy, RO^{\cdot}	Singlet oxygen $^1\Delta_g$
Hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	Peroxynitrite, $ONOO^-^b$

^aCould equally well be called a 'reactive chlorinating species'. Discussed in Section 2.5.2.

^bDiscussed in Section 2.5.4. Could equally well be called a 'reactive nitrogen species'.

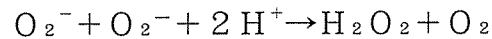
4. 体内で生じる活性酸素の主な役者

- O_2^- : スーパーオキシド (superoxide anion)

有機溶媒中で安定

反応性はさほど高くなく、水溶液中では可逆性の酸化還元反応を行う

Spontaneous dismutation reaction



この反応は SOD (superoxide dismutase) によって 10^4 に促進される。

生体内ではミトコンドリアから生じるほか、xanthine oxidase や NADPH oxidase といった酵素により産生される

肝臓での濃度は $10^{-11} M$

- H_2O_2 : 過酸化水素 (hydrogen peroxide)

同じく単独では反応性が弱い、細胞膜を自由に透過できる

生体内のあらゆるところに低濃度で存在する

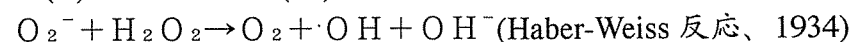
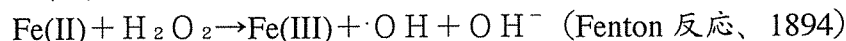
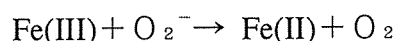
肝臓での濃度は $10^{-7} \sim 10^{-9} M$

生体内での産生は種々の oxidase や SOD など酵素による

- $\cdot OH$: ヒドロキシラジカル (hydroxyl radical)

生物系のラジカルの中では最も反応性が高い

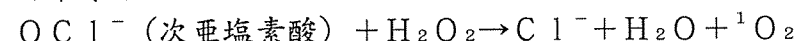
発生は以下の非酵素的な反応による



この反応では触媒となる鉄や銅などの遷移金属 (transition metal) の存在が問題となる。中性では、鉄や銅は水酸化物となるため、何らかのキレートが必要となる：生理的にはリン酸化合物やクエン酸がこの役割を果たしていると考えられている。キレートの中には desferrioxamine (desferal) のように鉄の有効な配位子をすべてブロックし触媒としての作用をうち消してしまうようなものもある。Transferrin, ceruloplamin, hemoglobin などの蛋白に配位している鉄は、炎症などで活性酸素が多量に発生して蛋白から遊離しない限り触媒としては作用しない。

- 1O_2 一重項酸素 (singlet oxygen)

好中球あるいはマクロファージ食胞内で以下の反応により作られる



光増感反応による発生

生体内色素：ポルフィリン、ビリルビン、クロロフィルなど

増感剤：メチレンブルー、トルイジンブルー、ローズベンガル、アクリジンオレンジなど

ヒドロキシラジカルの次に反応性が高い

5. 酸化ストレス (Oxidative stress)

フリーラジカル・活性酸素による負荷から、その防御能・消去能・修復能を差し引いた概念、一般には負荷が上回ることをいう

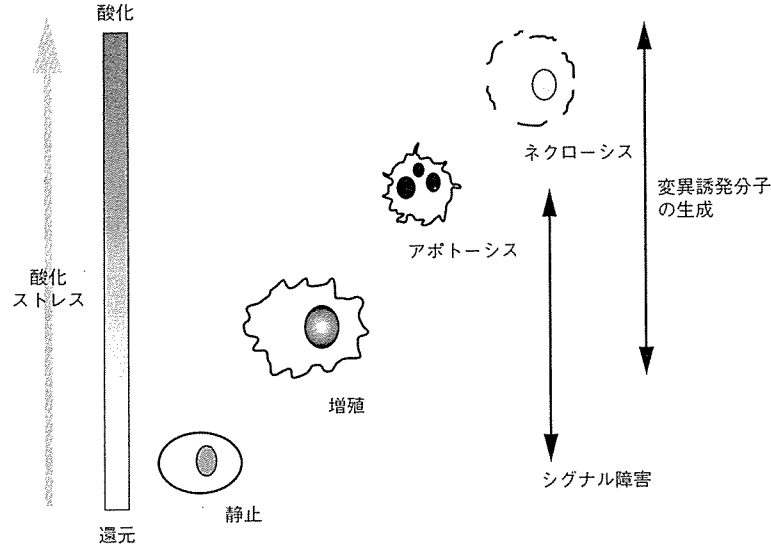


図3 酸化ストレスの生物学的意義に関する概念図

6. フリーラジカルの基本的作用

- 反応性の高いもの：分子の修飾・切断・重合（近傍のすべての分子が標的となるため、その産物は限りなく多い）
- 反応性の低いもの：可逆的な酸化還元反応、とくに蛋白のシステイン残基（-S H vs. -S S -）

7. 酸化ストレスマーカー

表 2 3群の酸化ストレスマーカー

1. modified molecules by ROS : 8-hydroxyguanine, 4-hydroxy-2-nonenal, malondialdehyde *et al.*
2. antioxidant enzymes and molecules : glutathione (GSH), thioredoxin (TRX), GSH peroxidase, GSH S-transferase, TRX peroxidase, glutaredoxin, catalase, superoxide dismutase, heat shock protein, DNA repair enzymes *et al.*
3. transcription factors : NF- κ B, c-myc, c-fos, c-jun *et al.*

Toyokuni S. Pathol Int 49: 91-102, 1999

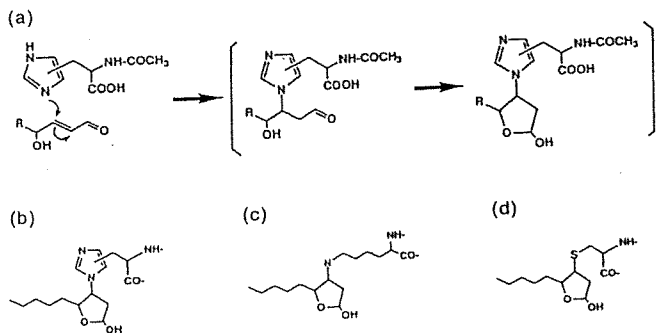


Figure 3 Reaction of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) with protein residues (Michael addition). (a) Proposed mechanisms for HNE-histidine adduct formation; (b) HNE-histidine adduct; (c) HNE-lysine adduct; and (d) HNE-cysteine adduct. Note that an hemiacetal structure is common for all three adducts.

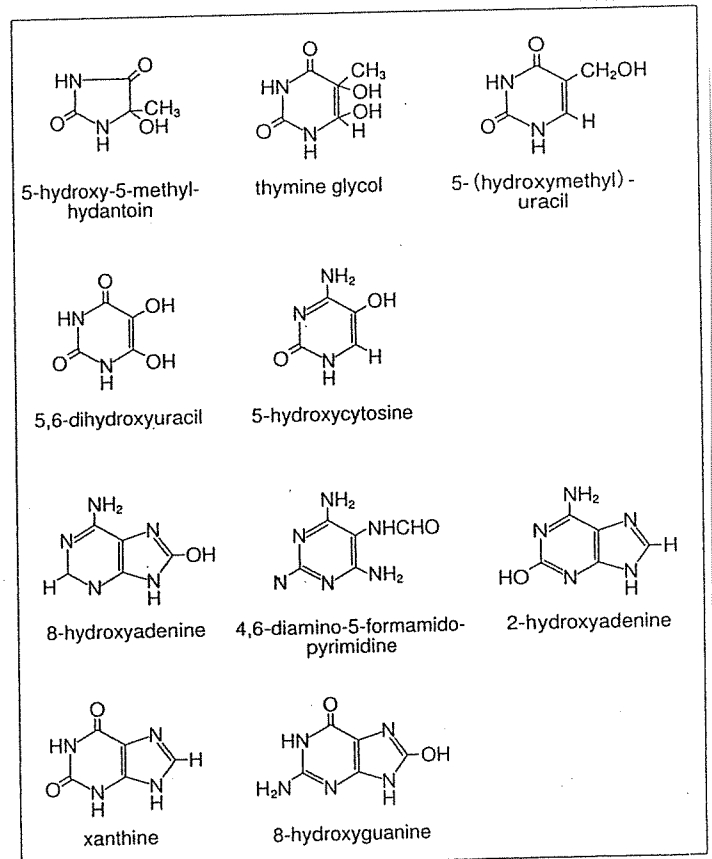


図 4 ヒドロキシラジカルとの反応による代表的な DNA 修飾塩基 上段よりチミン, シトシン, アデニン, グアニンの修飾塩基.

7. フリーラジカルの生物学的作用とその防御体制

膜脂質：脂質過酸化（アルデヒドによる2次的作用もあり）、細胞膜の破壊、透過性の亢進

タンパク質：酵素の不活性化、構造蛋白の破壊、反応性の低いフリーラジカルの場合はシステイン残基を介して構造変化をおこし、それにより転写因子の活性化や細胞内の位置移動が起こることがある

核酸：ゲノムあるいはミトコンドリア DNA の損傷と変異

研究上の話題：4-hydroxy-2-nonenal(HNE), acrolein, Nrf2, thioredoxin, glutathione, 8-hydroxyguanine, NF-κB

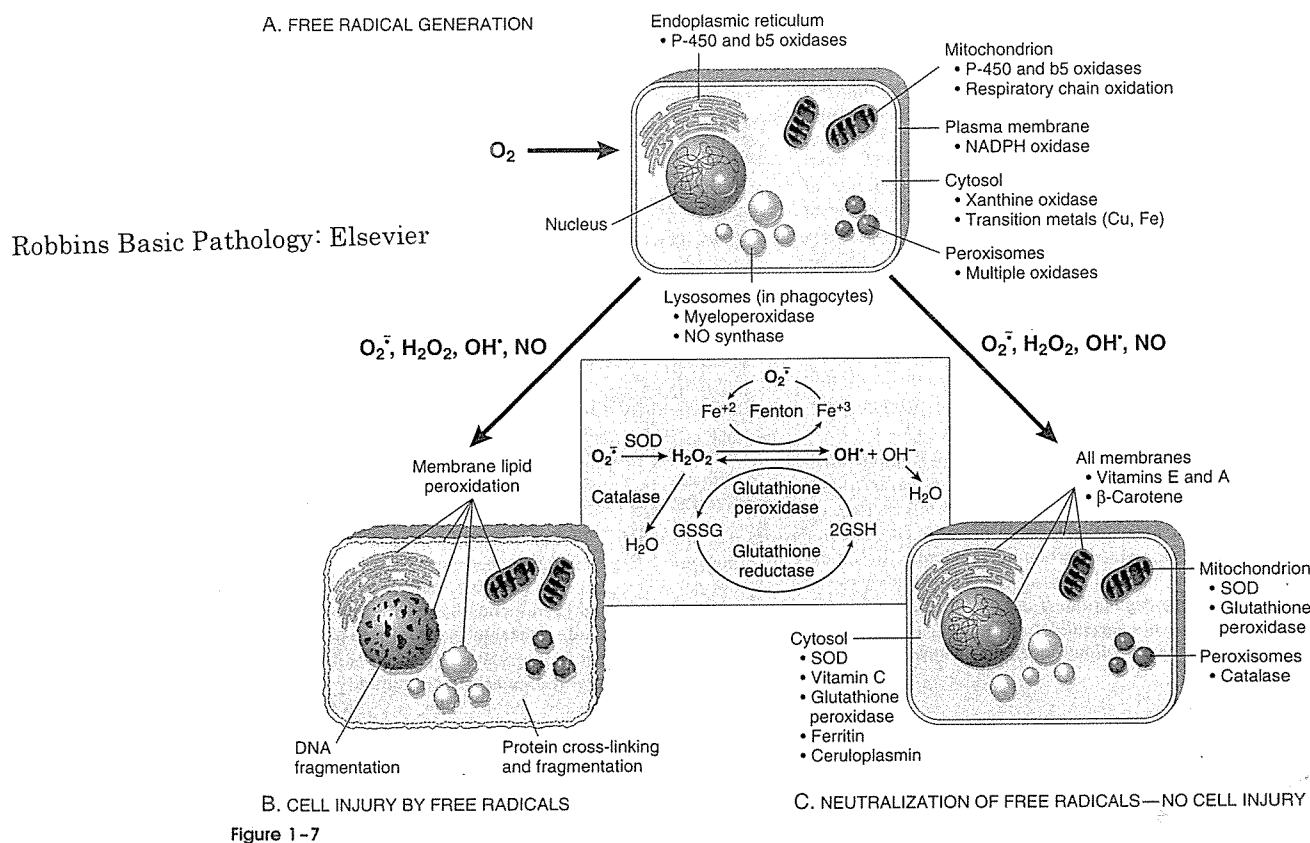


Figure 1-7

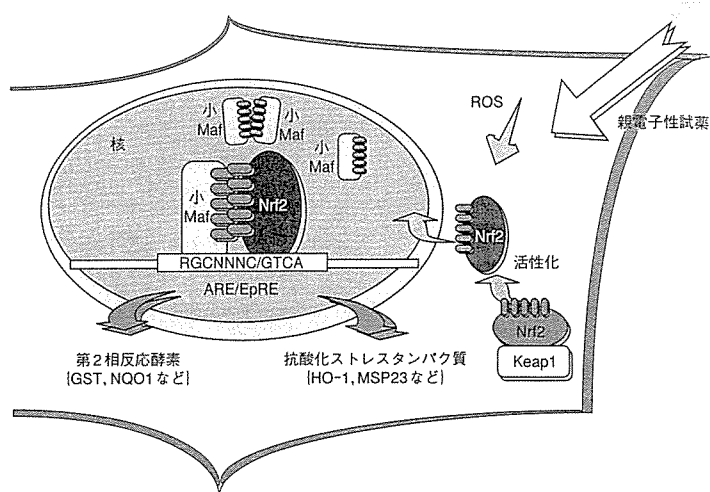


図1 親電子性試薬およびROSによるNrf2の活性化とARE/EpREをGRR上に有した第2相反応酵素群遺伝子および抗酸化ストレスタンパク質遺伝子発現スキーム

防御体制は三段構え

生成を抑制：遷移金属キレート作用（トランスフェリン、アルブミン、フェリチン、緑茶のカテキン）

消去：酵素（グルタチオン・チオレドキシソ系）、chain-breaking antioxidants（ビタミンE=α-トコフェロール、グルタチオン、ビタミンC、尿酸、ビリルビン、β-カロテン、緑茶のカテキンなど）

生成した産物の修復：8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

（下線は食事よりの摂取）

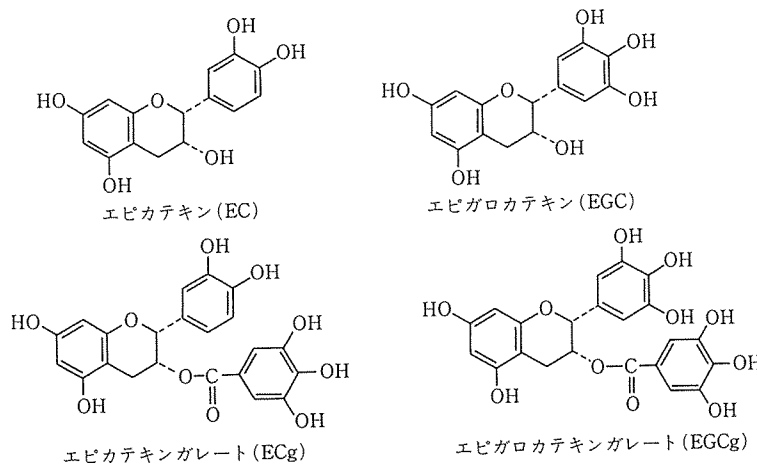
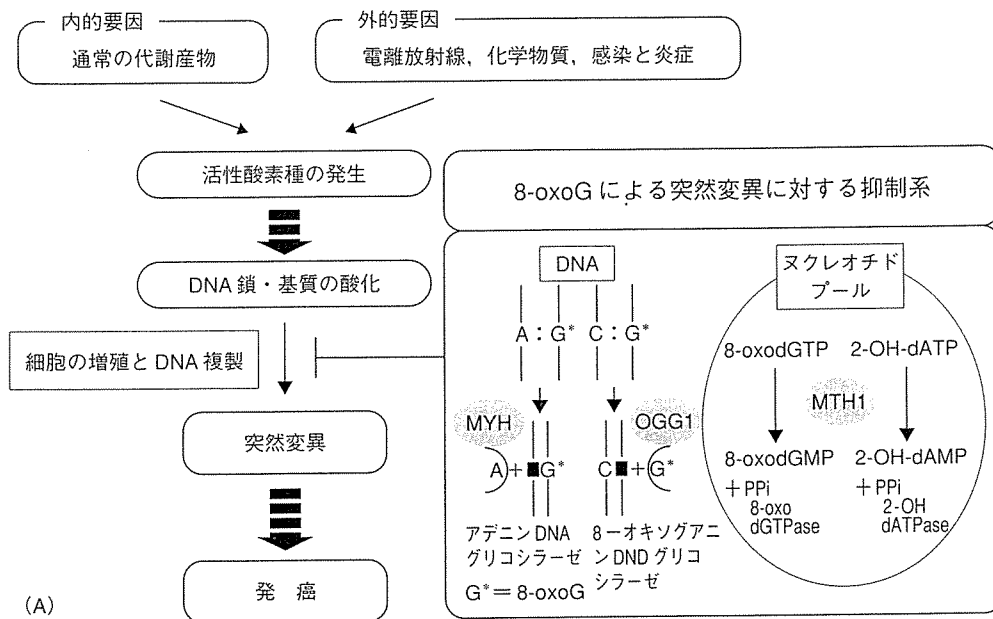


図 1 茶カテキン類の構造式



α -Tocopherol and β -Carotene Supplements and Lung Cancer Incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: Effects of Base-line Characteristics and Study Compliance

Demetrius Albanes, Olli P. Heinonen, Philip R. Taylor, Jarmo Virtamo, Brenda K. Edwards, Matti Rautalahti, Anne M. Hartman, Juni Palmgren, Laurence S. Freedman, Jaason Haapakoski, Michael J. Barrett, Pirjo Pietinen, Nea Malila, Eero Tala, Kari Liippo, Eija-Riitta Salomaa, Joseph A. Tangrea, Lyly Teppo, Frederic B. Askin, Eero Taskinen, Yener Erozan, Peter Greenwald, Jussi K. Huttunen*

Background: Experimental and epidemiologic investigations suggest that α -tocopherol (the most prevalent chemical form of vitamin E found in vegetable oils, seeds, grains, nuts, and other foods) and β -carotene (a plant pigment and major precursor of vitamin A found in many yellow, orange, and dark-green, leafy vegetables and some fruit) might reduce the risk of cancer, particularly lung cancer. The initial findings of the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (ATBC Study) indicated, however, that lung cancer incidence was increased among participants who received β -carotene as a supplement. Similar results were recently reported by the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET), which tested a combination of β -carotene and vitamin A. **Purpose:** We examined the effects of α -tocopherol and β -carotene supplementation on the incidence of lung cancer across subgroups of participants in the ATBC Study defined by base-line characteristics (e.g., age, number of cigarettes smoked, dietary or serum vitamin status, and alcohol consumption), by study compliance, and in relation to clinical factors, such as disease stage and histologic type. Our primary purpose was to determine whether the pattern of intervention effects across subgroups could facilitate further interpretation of the main ATBC Study results and shed light on potential mechanisms of action and relevance to other populations. **Methods:** A total of 29 133 men aged 50-69 years who smoked five or more cigarettes daily were randomly assigned to receive α -tocopherol (50 mg), β -carotene (20 mg), α -tocopherol and β -carotene, or a placebo daily for 5-8 years (median, 6.1 years). Data regarding smoking and other risk factors for lung cancer and dietary factors were obtained at study entry, along with measurements of serum levels of α -tocopherol and β -carotene. Incident cases of lung cancer ($n = 894$) were identified through the Finnish Cancer Registry and death certificates. Each lung cancer diagnosis was independently confirmed, and histology or cytology was available for 94% of the cases. Intervention effects were evaluated by use of survival analysis and proportional hazards models. All P values were derived from two-sided

statistical tests. **Results:** No overall effect was observed for lung cancer from α -tocopherol supplementation (relative risk [RR] = 0.99; 95% confidence interval [CI] = 0.87-1.13; $P = .86$, logrank test). β -Carotene supplementation was associated with increased lung cancer risk (RR = 1.16; 95% CI = 1.02-1.33; $P = .02$, logrank test). The β -carotene effect appeared stronger, but not substantially different, in participants who smoked at least 20 cigarettes daily (RR = 1.25; 95% CI = 1.07-1.46) compared with those who smoked five to 19 cigarettes daily (RR = 0.97; 95% CI = 0.76-1.23) and in those with a higher alcohol intake (≥ 11 g of ethanol/day [just under one drink per day]; RR = 1.35; 95% CI 1.01-1.81) compared with those with a lower intake (RR = 1.03; 95% CI = 0.85-1.24). **Conclusions:** Supplementation with α -tocopherol or β -carotene does not prevent lung cancer in older men who smoke. β -Carotene supplementation at pharmacologic levels may modestly increase lung cancer incidence in cigarette smokers, and this effect may be associated with heavier smoking and higher alcohol intake. **Implications:** While the most direct way to reduce lung cancer risk is not to smoke tobacco, smokers should avoid high-dose β -carotene supplementation. [J Natl Cancer Inst 1996;88:1560-70]

The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study, or ATBC Study, a large, double-blinded, placebo-controlled intervention trial, tested whether the use of α -

***Affiliations of authors:** D. Albanes, P. R. Taylor, B. K. Edwards, A. M. Hartman, L. S. Freedman, J. A. Tangrea, P. Greenwald, Division of Cancer Prevention and Control, National Cancer Institute, Bethesda, MD; O. P. Heinonen, Department of Public Health, University of Helsinki, Finland; J. Virtamo, M. Rautalahti, J. Palmgren, J. Haapakoski, P. Pietinen, N. Malila, J. K. Huttunen, National Public Health Institute, Helsinki, Finland; M. J. Barrett, Information Management Services, Inc., Silver Spring, MD; E. Tala, K. Liippo, E.-R. Salomaa, Department of Diseases of the Chest, Turku University Hospital, Finland; L. Teppo, Finnish Cancer Registry, Helsinki; F. B. Askin, Y. Erozan, Department of Pathology, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD; E. Taskinen, University of Helsinki School of Medicine.

Correspondence to: Demetrius Albanes, M.D., National Institutes of Health, Executive Plaza North, Rm. 211, Bethesda, MD 20892-7326.

See "Notes" section following "References."

8. 一酸化窒素 (NO)

1862年 ノーベルのダイナマイト

1879年 ニトログリセリンが狭心症に使用される

1998年度のノーベル生理学医学賞 (イグナロ、ファーチゴット、ムラド)

血管拡張 (血管内皮由来弛緩因子: endothelium-derived relaxing factor)

- 酵素的に作られる
- スーパーオキシドと反応するとペルオキシナイトライト(peroxynitrite: ONOO⁻)を生成、この化合物はヒドロキシラジカルと同じくらい反応性が高い
- ペルオキシナイトライトの形態学的存在証明は、ニトロチロシンに対する抗体を使用して評価される

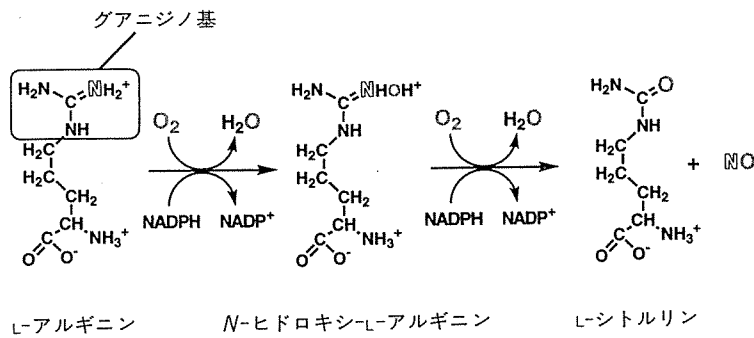


図 4.2 NO 合成酵素が L-アルギニンから NO をつくる反応

表 4.1 3種類の NO 合成酵素 (ヒト) の特徴

	構成型		誘導型NO合成酵素 (iNOS)
	神経型 NO 合成酵素 (nNOS)	血管内皮型 NO 合成酵素 (eNOS)	
染色体の位置	12 番	7 番	17 番
アミノ酸残基数	1433	1203	1153
分子量の計算値	160,000	133,000	130,000
カルシウムイオン依存性	(+)	(+)	(-)
カルモジュリン依存性	(+)	(+)	(+)
細胞内の存在場所	細胞質/細胞膜	細胞膜	細胞質
産生細胞の種類	神経細胞, マスト細胞, 骨格筋細胞, 膵臓β細胞, 睾丸, 胃粘膜上皮細胞, 細気管支上皮細胞, 腎マクラデンサ細胞	血管内皮細胞, 神経細胞 (海馬・錘体細胞), 心筋細胞	マクロファージ, 好中球, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 肝細胞, クッパー細胞, グリア細胞, 腎メサンギウム細胞, 腸上皮細胞, 心筋細胞, 巨核球, ケラチノサイト, 膵臓β細胞

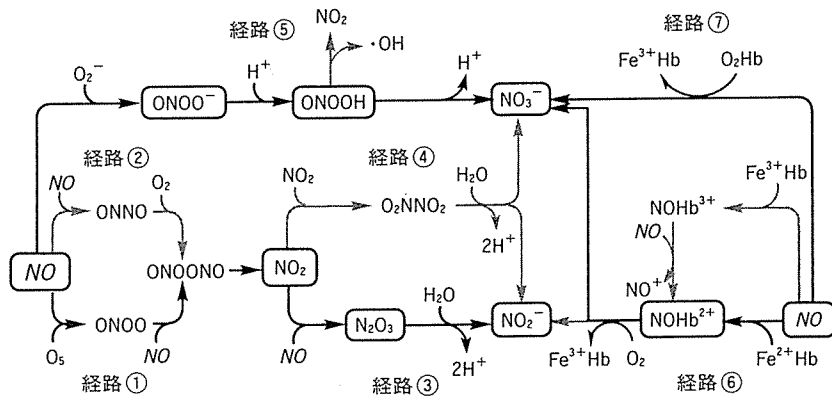


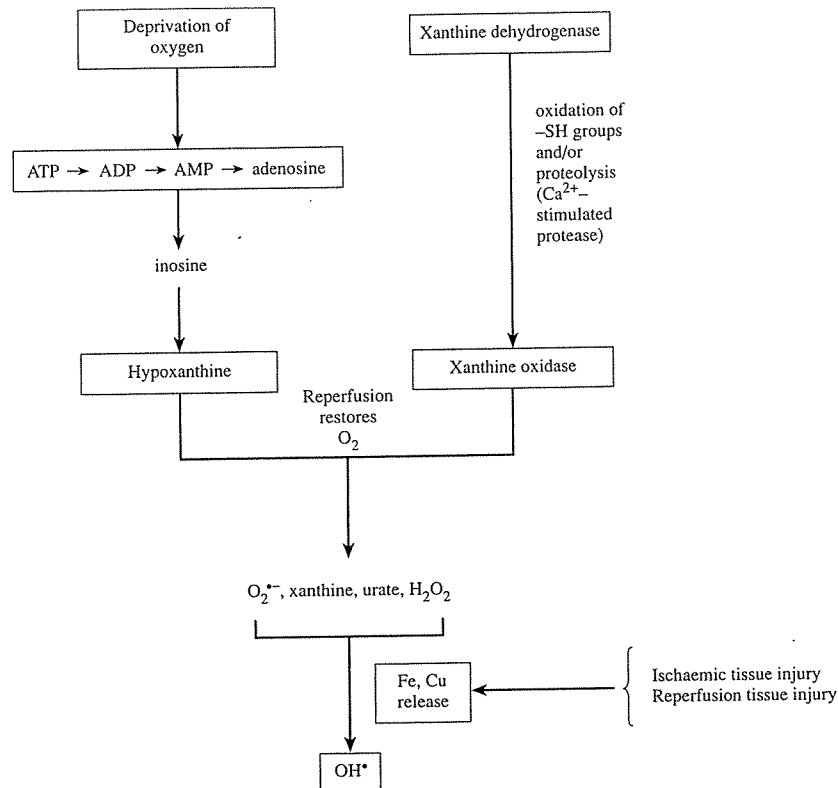
図 5.2 生体内 NO の酸化反応過程

表 6.1 体の中につくられ NO の作用のおもな功罪

器官・組織		正常時の NO の生理的役割など	NO 産生異常が関係する病気など
循環器系	血管	血圧調節, 血小板凝集・粘着抑制, 白血球接着抑制	敗血症性ショック, 動脈硬化, 高血圧, 高脂血症
	心臓	冠血流維持・調節	心不全, 心筋梗塞, 虚血性心疾患, 冠動脈攣縮
脳神経系		神経伝達, 記憶, 学習, 視覚, 嗅覚, 痛覚	神経細胞障害, 癲癇, 知覚過敏, 脳虚血障害
消化器系	肝臓	肝循環制御, 肝障害抑制	肝硬変
	膵臓	微小血管の血流調節, 分泌調節	インスリン分泌能低下, β細胞破壊, インスリン依存糖尿病, 膵炎
	消化管	血流調節, ぜん動運動, 腸管平滑筋弛緩, 粘膜保護	粘膜障害, 潰瘍性大腸炎
呼吸器系	気管	気管の弛緩, 気管支繊毛運動, 粘液分泌	気管支喘息, 気管支拡張症
	肺	換気・血流調節	肺高血圧症
腎・泌尿器系	腎臓	腎循環調節, 糸球体濾過, レニン分泌, 排尿調節	腎不全, 腎炎, 頻尿
生殖器系		陰茎勃起, 排卵調節, 子宮筋弛緩	インポテンス
免疫系		抗菌作用, 抗腫瘍作用	敗血症性ショック, 自己免疫疾患, 炎症, リウマチ

9. 酸化ストレス関連疾患（生活習慣病のほとんどが含まれる）

● 虚血・再灌流傷害(Ischemia-reperfusion injury)



● 発がん(Carcinogenesis)

持続する酸化ストレスは発がんと密接に関係する

鉄過剰に関連した発がん（アスベスト症、hemochromatosis）

炎症に関連した発がん（ピロリ菌誘発慢性胃炎、義歯やパイプによる舌癌、重度のやけどによる皮膚癌、結核性胸膜炎後の悪性リンパ腫など）

放射線による白血病

紫外線による皮膚癌

喫煙による肺癌

● 動脈硬化症(Atherosclerosis)

● 老化(Aging)

● 神経変性疾患(Neurodegenerative disease：筋萎縮性側索硬化症（ALS：家族性のものの一部は Cu,Zn-SOD 遺伝子の突然変異）、アルツハイマー病、パーキンソン病

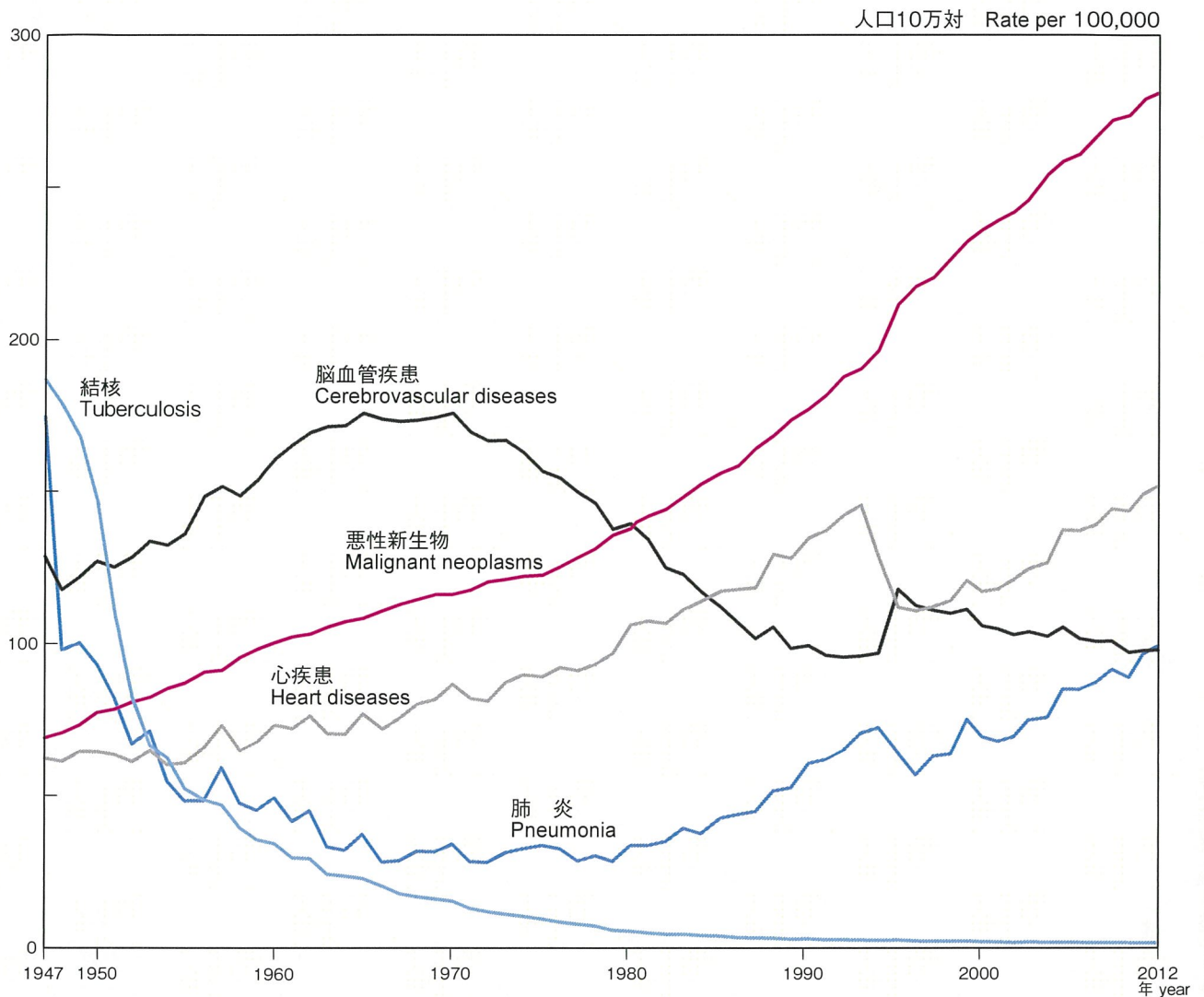
● 糖尿病(Diabetes mellitus)

● 膠原病（自己免疫疾患、Collagen disease, autoimmune disease)

11

主要死因別粗死亡率年次推移 (1947年～2012年)

Trends in Crude Mortality Rate for Leading Causes of Death (1947-2012)



年次推移
Trend in Cancer Statistics

- ◆ 第2次世界大戦後、結核、肺炎などの感染症の死亡率は減少し、がん、心疾患などの生活習慣病の死亡率が増加。
- ◆ がんは1981年から死因の第1位で、最近では総死亡の約3割を占める。
- ◆ After the end of the World War II, the mortality of infectious diseases such as tuberculosis and pneumonia decreased, while the mortality of life-style diseases such as cancer and heart diseases increased.
- ◆ Cancer has been the leading cause of death since 1981, accounting for 30% of all deaths recently.

わが国における死亡率の年次推移を死因別にみると、明治から昭和初期まで多かった結核、肺炎などの感染症が第2次世界大戦後急速に減少し、かわっていわゆる生活習慣病（がん、心疾患、脳血管疾患など）による死亡が上位を占めるようになった。

がん（悪性新生物）は昭和56（1981）年から死因の第1位を占め、平成24（2012）年には36万963人、人口10万対死亡率286.6であり、総死亡の28.7%を占めている。

1990年代半ばの急激な死亡率の増加および減少は、1995年の国際疾病分類（ICD）第9版から第10版への変更の影響である。

Until the middle of this century, deaths caused by infectious diseases such as pneumonia, tuberculosis and gastroenteritis pre-

vailed in Japan.

However, since the end of the World War II, these diseases have rapidly decreased and have been replaced by so-called life style related diseases such as malignant neoplasms (cancer), heart diseases and cerebrovascular diseases.

Cancer ranks first in the causes of deaths since 1981. The number of cancer deaths in 2012 was 360,963, and the death rate per 100,000 was 286.6, accounting for 28.7% of the total number of deaths.

The sudden increases and decreases in mortality rate observed in the middle of 1990's were the artifact caused by the change from ICD version 9 to 10 in 1995.

※ 表と出典は78～79ページ参照。See p.78-79 for tables and references.