

黒にんじん抽出物によるアルコール性肝疾患予防効果と
その作用メカニズム

令和4年度

大阪市立大学大学院

生活科学研究科生活科学専攻

後期博士課程

北野 敦子

目次

序論	1
第1章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) による アルコール性肝疾患予防効果 ～ <i>In vivo</i> 実験系による検討～	
第1節 背景・目的	5
第2節 材料および方法	6
1. BCE の作製	
2. 動物の飼育	
3. 血清の生化学的分析	
4. 肝臓の病理組織学的解析	
5. 統計処理	
第3節 結果	9
1. 肝障害度におよぼす EtOH または BCE の影響	
2. 肝臓の病理組織学的解析	
第4節 考察	12
第2章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) による アルコール性肝疾患予防効果 ～ <i>In vitro</i> 実験系による検討～	
第1節 背景・目的	14
第2節 材料および方法	19
1. BCE の作製および分画	
2. 肝細胞の分離・培養	
3. 細胞生存率の測定 (Neutral red 法)	
4. 細胞生存率の測定 (water-soluble tetrazolium; WST 法)	
5. 培地中乳酸脱水素酵素活性の測定	
6. 細胞内 ROS 産生量の測定	
7. 培地中 malondialdehyde (MDA) 産生量の測定	
8. CYP2E1 活性の測定	
9. アルコール代謝関連酵素 (ADH および ALDH) 活性の測定	
10. 遺伝子発現量の測定 (Real-time quantitative PCR) 法	
11. タンパク質解析 (Western blotting 法)	
12. 細胞内 cAMP 量の測定	

第3節	結果	25
	1. 肝細胞の生存率におよぼす EtOH、BCE または BCE 各抽出画分の影響	
	2. EtOH によって誘導される細胞毒性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	3. 細胞内 ROS 産生量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	4. 培地中 MDA 量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	5. CYP2E1 におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	6. ADH におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	7. ALDH 遺伝子およびタンパク質発現量、活性の測定	
	8. 細胞内 cAMP 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	9. アルコール代謝関連酵素に対する PKA 阻害剤 (H-89) の影響	
	10. アルコール代謝関連酵素に対するアデニル酸シクラーゼ阻害剤 (MDL-12330A) の影響	
	11. PDE4 発現におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
第4節	考察	56
第3章 黒にんじん抽出物 (Black carrot Extract : BCE) による		
アルコール性肝疾患予防効果 ～エピジェネティック修飾～		
第1節	背景・目的	62
第2節	材料および方法	66
	1. 肝細胞の分離・培養	
	2. タンパク質解析 (Western blotting 法)	
	3. 遺伝子発現量の測定 (Real-time quantitative PCR) 法	
	4. 細胞内 SAM および S-アデノシルホモシステイン (S-Adenosyl-L-homocysteine: SAH) 量の測定	
第3節	結果	68
	1. ヒストン H3K9 修飾におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	2. ヒストン H3K9 修飾変化に関与する遺伝子発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	3. 細胞内 SAM 量および SAH 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
	4. メチル基転移酵素におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響	
第4節	考察	78
総括		81
参考文献		83
謝辞		102

序 論

近年、わが国では平均寿命の延伸および出生率の低下によって、高齢化率（65歳以上／日本の総人口の割合）は増加の一途をたどっている。高齢化率は2021年9月15日現在で29.1%に達しており、過去最高を更新した。さらに、2060年には39.9%にまで増加することが予想されている。世界の主要国における高齢化率を比較すると、わが国の高齢化率は1980年代までは下位水準であったのに対して、1990年以降急激に進行し続け、2005年に世界第1位となり、現在まで継続している¹⁾。また、高齢化率の増加に伴って国民医療費も同様に増加しており²⁾、医療費に占める生活習慣病の割合は約3割、死亡者数の約6割であること、要介護・要支援者における介護が必要となった原因についても生活習慣病が約3割を占めていることから、今後さらなる高齢化率が進むわが国においては、医療や介護の負担を軽減するためにも、国民自らが健康を管理し、罹患や重症化の予防に努めることが求められている。生活習慣病は食生活と密接に関わっているため、生活習慣病の1次予防が重要である。

お酒は、古来より「百薬の長」として世界各地で食事、儀式、祝祭などにおいて親しまれてきた嗜好飲料の一種であり、我々の生活に潤いをもたらしている。一方、過度な飲酒は様々な疾患や社会問題を引き起こす。世界保健機関（World Health Organization: WHO）の統計によると、世界における19の主要な健康リスクの中でアルコールは8番目に高い死亡要因となっている。しかし、死亡以外の有病や障害なども加味した障害調整生命年（Disability-adjust life years: DALY）に換算すると3番目に大きな健康リスクとなり、死亡への寄与が高い高血圧や喫煙といった要因よりも重要な位置づけを占める³⁾。また、アルコール摂取による死亡者数は、2016年では年間約300万人（全死亡者数の約5.3%）であることが報告されており⁴⁾、これは結核や human immunodeficiency virus (HIV) / acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)、糖尿病による死亡者数を上回っている⁴⁾。このことを受け、1人当たりの年間アルコール消費量を削減するため、WHOでは「アルコールの有害な使用を低減するための世界戦略」⁵⁾が採択され、さらに、国際連合においては、「2030 Agenda for Sustainable Development」⁶⁾の目標3のひとつに「薬

物乱用やアルコールの有害な摂取を含む、物質乱用の防止・治療を強化する。」を掲げているように、世界的にアルコールによって引き起こされる問題に対し、様々な対策が進められるようになってきた。

アルコールの摂取により全身の臓器に多彩な障害が生じるが、中でもアルコールの代謝を主に行う肝臓においては深刻な障害が生じることが知られている。アルコール性肝疾患 (Alcoholic liver disease: ALD) は、大量かつ常習的なアルコールの摂取を要因とした生活習慣病で、特に西洋で多く認められるアルコール関連臓器障害である⁷⁾。初期病変としてアルコール性脂肪肝を呈し、肝細胞内に脂肪の沈着が認められるが、この段階では禁酒によって沈着した脂肪は消失する。しかしながら、過度な飲酒を持続するとアルコール性肝炎を発症する。アルコール性肝炎は肝細胞の壊死・変性をきたす病変であり、さらにその後も飲酒を継続するとアルコール性肝線維症や肝がんに加え、重症アルコール性肝炎では **acute-on-chronic** 型肝不全を呈して救命率の低い病態となることも、臨床上重要な課題である。そのため、アルコール性脂肪肝や早期のアルコール性肝炎といった比較的初期の段階で疾病の進行を予防することは極めて重要である⁸⁻¹⁰⁾。

わが国における国民一人あたりの年間平均アルコール消費量は、経済成長、国民所得の増加、ライフスタイルの欧米化など様々な要因によって年々増加してきたが、1990年代にピークを迎え、その後はやや減少傾向に転じたものの、近年はほぼ横ばいを示している¹¹⁾。欧米人と比較するとアルコール代謝酵素 (特に **aldehyde dehydrogenase 2: ALDH2**) 活性が低いといわれているアジア諸国民の中でも、日本人の年間平均アルコール消費量は依然として高い水準にある¹²⁾。さらに、わが国における肝疾患に占めるアルコール性肝障害の比率は、1960年代に比べて2000年代で約4倍と増加したことから、アルコール性肝障害の臨床的重要性はますます増大することが予想される。また、2011年の全国集計調査では全肝硬変のうちで非B非C肝硬変の占める割合が約30%であり、さらに、その半数以上がアルコール性であることから¹³⁾、全肝硬変の約20%がアルコール性肝硬変であることが推計される。また、肝がんを発症した非ウイルス性肝硬変患者のうち、半数以上がアルコールによるものとなっている¹³⁾。さらに、男性よりも短期間かつ少量で、アルコール性肝疾患を発症する女性 (若年女性) の飲酒者が増加していること¹⁴⁾から、多量飲酒およびアルコール性肝疾患は国民的な社会問題となっている。一方、アルコールによる障害は、本人の健康の問題であるのみならず、飲酒運転、暴力、

虐待、自殺などの様々な問題にも密接に関連すると考えられており、2013年には「アルコール健康障害対策基本法」が成立し、2016年に「アルコール健康障害対策推進基本計画」が策定されたことから、飲酒を主因とする健康障害の削減は、非常に重要な問題である。

当研究室では、食品成分によるアルコール性肝疾患の予防効果について研究を継続しており、アルコール性肝疾患予防効果を有する食品成分として、マテ茶抽出物¹⁵⁾、褐藻類の一種であるカジメ (*Ecklonia cava*) に含まれるポリフェノール¹⁶⁻¹⁷⁾、甘苦茶 (*Mallotus firetianus*) 抽出物¹⁸⁾ などを見出している。そこで本研究では、黒にんじん (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) に着目した。黒にんじんは、セリ科にんじん属の一種である。にんじんは東洋系品種と西洋系品種に大別することができるが、黒にんじんは原種に近く、その名の通り通常のにんじんと比較して黒みがかかった色をしている。約3000年前からアフガニスタンで栽培されていたものがヨーロッパに伝わり、現在トルコを中心とした一部の地中海周辺国で栽培されるようになった。黒にんじんには、ビタミンCやビタミンEなどの抗酸化物質が含まれているほか、抗酸化力に大きく寄与するフェノール化合物も含まれている。さらには、主要なフェノール化合物であるアントシアニンのほか、カフェ酸などのヒドロキシナメートが豊富に含有されていることが明らかにされている¹⁹⁻²⁰⁾。近年、黒にんじんには抗酸化作用、抗炎症作用、ガン細胞増殖抑制効果、糖尿病予防効果などの生理作用を有することが報告されており²¹⁻²²⁾、ヒトの健康増進への有用性が注目されている。また、わが国においても、2014年に沖縄県で初めて栽培に成功して以来、積極的に栽培され需要が高まりつつある黒にんじんは、今後、沖縄を代表する健康食材となることが期待されている。

黒にんじんによるヒトの健康増進への有用性が注目されている中で、アルコール性肝疾患に対する予防効果についてはいまだ明らかにされていない。そこで本研究では、黒にんじん抽出物によるアルコール性肝疾患予防効果とその作用メカニズムを解明することを目的として、以下の3章に分けて検討した。すなわち、「第1章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) によるアルコール性肝疾患予防効果 ~*In vivo* 実験系による検討~」では、アルコール性肝疾患モデル動物(ラット)を作製し、BCEを飼料として与えた時のBCEによるアルコール性肝疾患の予防効果を血液性状と肝臓の病理組織学的解析から検討した。次に、「第2章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE)

によるアルコール性肝疾患予防効果 ～*In vitro* 実験系による検討～」では、ラット肝臓から単離した初代培養肝細胞を用いて *in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを作製し、BCE およびその抽出画分による肝細胞障害に対する予防効果とその作用メカニズムについてアルコール代謝関連酵素を中心に検討した。さらに、「第 3 章 黒にんじん抽出物 (Black carrot Extract : BCE) によるアルコール性肝疾患予防効果 ～エピジェネティック修飾～」では、第 2 章の結果をもとにして、より詳細な作用メカニズムを明らかにするために、DNA ヒストンのエピジェネティック修飾について検討した。

第1章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) による

アルコール性肝疾患予防効果 ～*In vivo* 実験系による検討～

第1節：背景・目的

アルコール性肝疾患の病態を模倣する動物モデルの作製は、非常に困難であり、長年多くの研究者によって様々なモデルの作製方法が提案されてきた²³⁻²⁴⁾。

近年では、エタノール (EtOH) を含有した液体飼料である Lieber-DeCarli 流動食モデル²⁵⁾ や胃チューブを用いて直接アルコールを摂取させる Tsukamoto-French 胃内アルコール注入モデル²⁶⁾ が一般的な方法としてよく使用されている。しかし、これらのモデルはアルコール性肝疾患の病態を顕著に示す一方、明確な肝線維化を生じにくいことや特殊な器具や設備を要すること²⁷⁾、さらに、飼育時間が長く個体差も大きいなど、様々な問題点を抱えている。このような問題を改善するために、特に肝線維化を誘発するために EtOH とともに鉄や高脂肪食、リポ多糖類や四塩化炭素 (Carbon tetrachloride: CCl₄) などを投与する方法が取られている²⁸⁻³¹⁾。CCl₄ は、細胞毒性が非常に強く、絶食下の齧歯類に対して短期間で強い肝障害を誘発させる確実性が高いことから、急性肝障害モデルの作製に広く用いられている化学物質である³²⁾。当研究室では、ラットに 5% EtOH を 3 週間自由摂取させ、単独投与では肝障害を惹起しない低濃度の CCl₄ を定期的に腹腔内投与することによって、簡便かつ有効なアルコール性肝疾患動物モデルを作製する方法を確立しており、すでに、本モデルを用いて種々の食品成分によるアルコール性肝疾患の予防効果について報告している^{15-17, 33)}。

そこで本章では、当研究室が確立した *in vivo* アルコール性肝疾患モデルを用いて、BCE によるアルコール性肝疾患予防効果について検討した。

第2節 材料および方法

1. BCE の作製

沖縄県で栽培された黒にんじんを粉末状にし、室温下 50% EtOH で 2 時間抽出した。エバポレーターで抽出液を濃縮した後、凍結乾燥したものを BCE として実験に供した。

2. 動物の飼育

日本 SLC 株式会社から入手した 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (約 220 g 体重) を 1 匹ずつケージに入れて、固形飼料 (ラボストック MR; 日本 SLC 株式会社) で 1 週間、さらに粉食の形状をした Control 食で 1 週間予備飼育した。なお、飼料と水道水は自由摂取させた。飼育は午前 8 時から午後 8 時までを蛍光灯で照射する 12 時間の明暗サイクルで、室温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節した動物飼育室にて行った。

予備飼育終了後、1) Control 食群 (C 群)、2) 5% EtOH+CCl₄処理+Control 食群 (ET 群)、3) CCl₄処理+Control 食群 (T 群)、4) 5% EtOH+CCl₄処理+0.48% BCE 食群 (B 群) の 4 群に分け、Table I-1 に示す組成の飼料を給餌した。CCl₄は、単独では肝障害を誘導しない濃度(0.1 ml/kg 体重) になるようにオリーブオイルで 1:4 の割合で希釈したものを週 2 回、腹腔内に投与した³⁴⁾。なお、飼料と 5% EtOH または水道水は自由摂取させた。C 群には等量のオリーブオイルを週 2 回、腹腔内注射した。また、最終回の CCl₄ 注射から 48 時間後に解剖した。血液は飼育 1 週間ごとに尾静脈から、解剖時には麻酔下で下大静脈から採血し、マイクロチューブに回収した。各臓器は生理食塩水で洗浄後、重量を測定した。肝臓は左葉の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン固定液で数日間固定し、病理組織学的解析用に使用した。残りの肝臓組織は液体窒素で凍結させた後 -80°C 下で凍結保存した。血液は、採血後 30 分以上室温下で静置した後、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、血清を採取した。

動物の飼育および動物実験は、大阪市立大学動物実験管理委員会規定³⁵⁾ に基づいて実施した。

Table I-1. Composition of experimental diets

Components (g)	Control	0.48% BCE
Casein	140	140
L-cystine	1.8	1.8
Cornstarch	465.692	460.892
α -cornstarch	155	155
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Cellulose powder	50	50
AIN-93M mineral mix ^{a)}	35	35
AIN-93 vitamin mix ^{b)}	10	10
Choline Hydrogen Tartrate	2.5	2.5
tert-Butylhydroquinone	0.008	0.008
BCE	0	4.8
Total (g)	1000	1000

^{a)} Composition in g/kg diet: Calcium carbonate, anhydrous, 357.00; Potassium phosphate, monobasic, 250.00; Sodium chloride, 74.00; Potassium sulfate, 46.60; Potassium citrate, 28.00; Magnesium oxide, 24.00; Ferric citrate, 6.06; Zinc carbonate, 1.65; Manganous carbonate, 0.63; Cupric carbonate, 0.324; Potassium iodate, 0.01; Sodium selenate, anhydrous, 0.01025; Ammonium paramolybdate, 4 hydrate, 0.00795; Sodium meta-silicate, 9 hydrate, 1.45; Chromium potassium sulfate, 12 hydrate, 0.275; Lithium chloride, 0.0174; Boric acid, 0.0815; Sodium fluoride, 0.0635; Nickel carbonate, 4 hydrate, 0.0306; Ammonium vanadate, 0.0066; Powdered sucrose, 209.7832.

^{b)} Composition in g/kg diet: Nicotinic acid, 3.000; Ca Pantothenate, 1.600; Pyridoxine-HCl, 0.700; Thiamin-HCl, 0.600; Riboflavin, 0.600; Folic acid, 0.200; D-Biotin, 0.200; Vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) (0.1% in mannitol), 2.500; Vitamin E (all-*rac*- α -tocopheryl acetate) (500 IU/g), 15.00; Vitamin A (all-*trans*-retinyl palmitate) (500,000 IU/g), 0.800; Vitamin D₃ (cholecalciferol) (400,000 IU/g), 0.250; Vitamin K (phyloquinone), 0.075; Powdered sucrose, 974.655.

3. 血清の生化学的分析

肝機能のマーカーである血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase: ALT) 活性をトランスアミラーゼ CIIテストキット (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて測定した。

4. 肝臓の病理組織学的解析

肝臓は 10% 中性緩衝ホルマリン固定液で固定した後、パラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。ミトクロームを用いて 5 μm の厚さに薄切してパラフィン標本作製した。一般病理染色として、細胞と組織構造を調べるために Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色法で染色し、肝線維化の有無について評価するために Elastica Van Gieson (EVG) 染色法で染色した。また、それぞれの染色標本は盲検的に評価した³⁶⁾。

5. 統計処理

値は平均値±標準誤差 (standard error: SE) で表した。一元配置分散分析により水準間の差を認めた後、多重比較検定には Tukey-Kramer 法を用いた。5%または1%の危険率で有意差検定を実施した。

第3節 結果

1. 肝障害度におよぼす EtOH または BCE の影響

EtOH によって誘導される肝障害に対する BCE の影響を調べるために、血清 AST および ALT 活性を測定した。その結果、ET 群の血清 AST および ALT 活性は、C 群と比較してそれぞれ約 3 倍、約 8 倍に増加したことから、肝障害が惹起されたことが明らかとなった。一方、T 群における AST および ALT 活性は、C 群と同レベルを維持した。これらのことから、ET 群における肝機能の低下は、 CCl_4 の毒性によるものではなく、EtOH による肝障害に対する誘導剤として機能するものであることが示唆された。一方、B 群の AST および ALT 活性は、ET 群よりも有意に低下した (Fig. I-1, 2)。

2. 肝臓の病理組織学的解析

2-a. H&E 染色

肝組織標本を H&E 染色法によって病理組織学的に評価した。その結果、C 群および T 群では、正常な肝組織像が観察された。一方、ET 群の肝組織は、脂肪肝を呈しており、さらに炎症細胞の浸潤が観察されたが、B 群では、脂肪肝は顕著に抑制された。これらのことから、BCE は EtOH によって誘導されるアルコール性肝障害を抑制する効果を有することが示唆された (Fig. I-3a)。

2-b. EVG 染色

次に、EVG 染色法によって肝線維化の有無を評価した。C 群および E 群では正常な肝組織像を示したのにも関わらず、ET 群ではコラーゲン線維による隔壁の形成など肝線維化の特徴である像が観察された。一方、B 群では、線維性隔壁は形成されておらず、ほぼ正常な肝組織像が観察された (Fig. I-3b)。

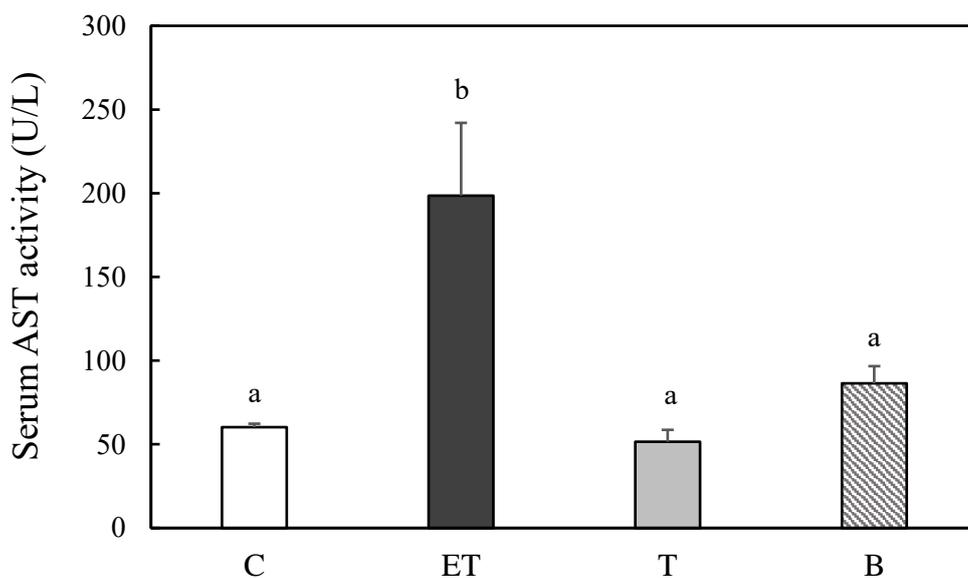


Fig. I-1. Effect of BCE on serum AST activity of EtOH-fed rats after 3 weeks.

Values are means \pm SE (n=5-6). Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). C: control diet; ET: control diet with 5% EtOH and CCl_4 (0.1 ml/kg of body weight); T: control diet with CCl_4 ; B: 0.48% BCE diet with 5% EtOH and CCl_4 (0.1 ml/kg of body weight).

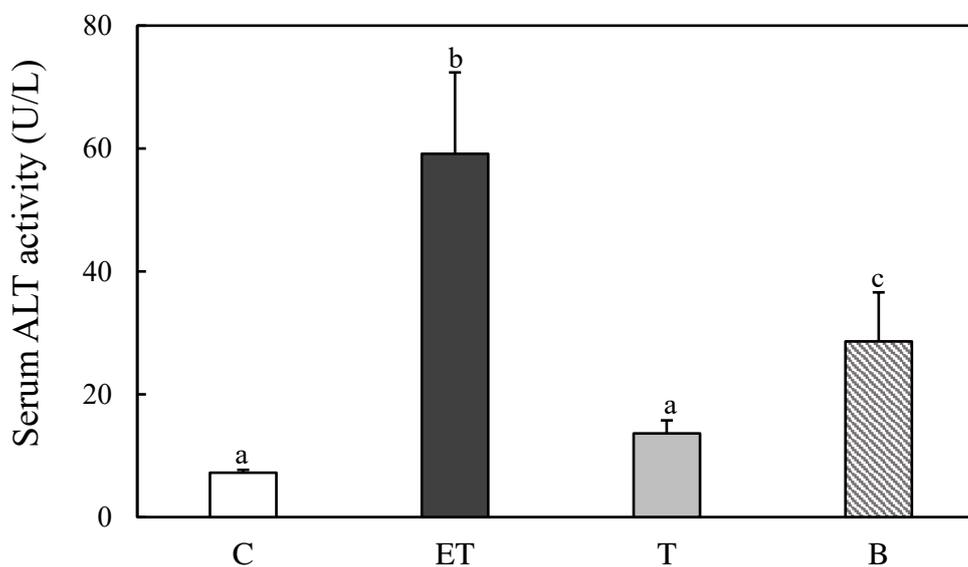


Fig. I-2. Effect of BCE on serum ALT activity of EtOH-fed rats after 3 weeks.

Values are means \pm SE (n=5-6). Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). C: control diet; ET: control diet with 5% EtOH and CCl_4 (0.1 ml/kg of body weight); T: control diet with CCl_4 ; B: 0.48% BCE diet with 5% EtOH and CCl_4 (0.1 ml/kg of body weight).

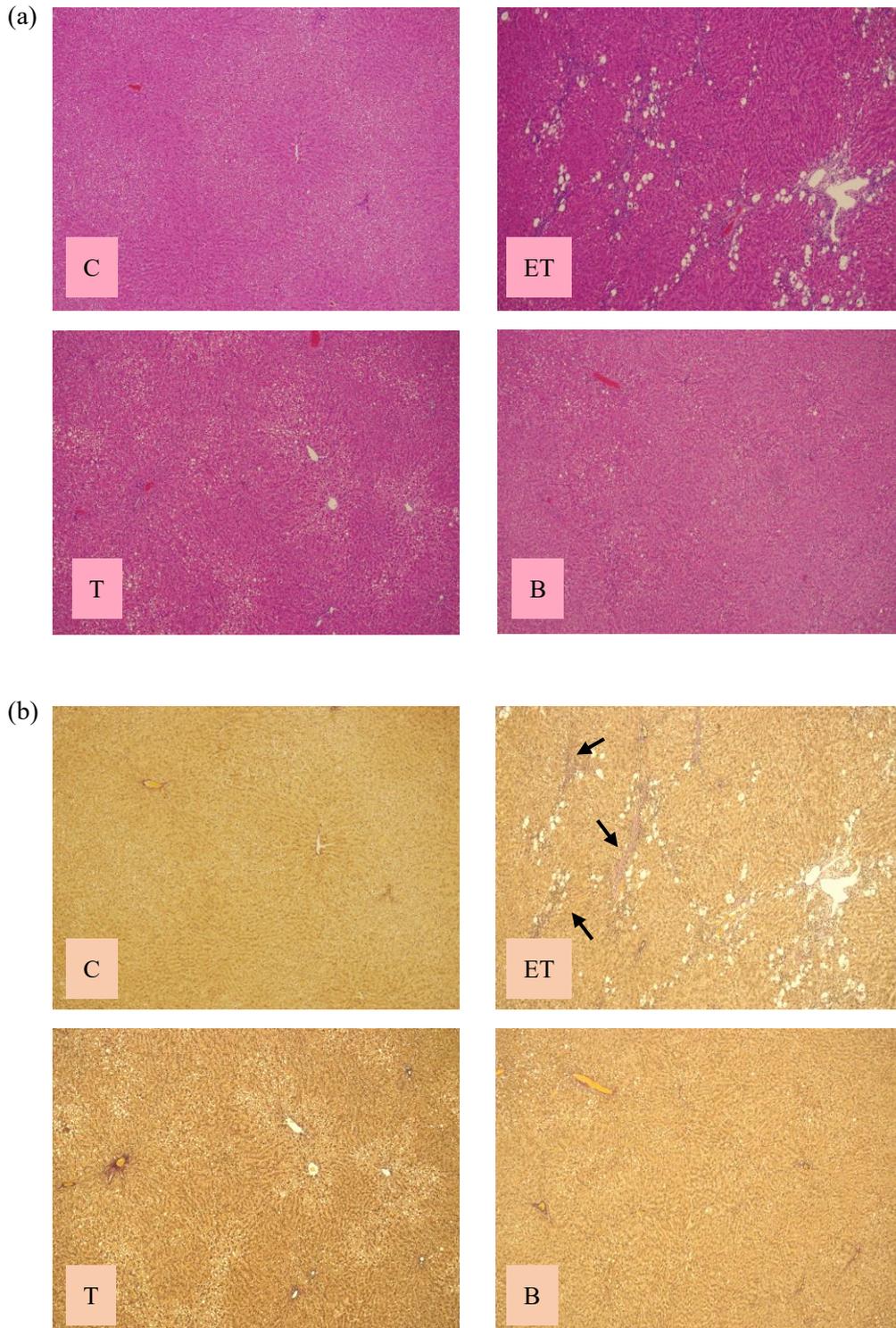


Fig. 1-3: Effect of BCE on liver morphology.

Liver tissue sections were stained with H&E (a) or EVG (b). C: control diet; ET: control diet with 5% EtOH and CCl₄ (0.1 ml/kg of body weight); T: control diet with CCl₄; B: 0.48% BCE diet with 5% EtOH and CCl₄ (0.1 ml/kg of body weight). Arrows indicate fibrous septa.

第4節 考察

本研究では、*in vivo* アルコール性肝疾患モデルを短期間で作製するために、Erman らによる方法³⁴⁾を参考に、本研究室によって確立された 5% EtOH を自由摂取させると共に、単独では肝障害を誘導しない低用量の CCl₄ (0.1 ml/kg 体重) を腹腔内投与する方法で作製した *in vivo* アルコール性肝疾患モデルを使用した。

一般的に CCl₄ は肝障害剤として広く用いられており、急性肝障害モデルを作成する際は、肝障害誘発剤として約 1.0 ml/kg 体重の濃度が採用されている³⁷⁾。また、CCl₄ と EtOH の相互作用として、CCl₄ はアルコール代謝において特にアセトアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) 活性を阻害することによって、肝臓中のアセトアルデヒド濃度を顕著に上昇させることが報告されている³⁸⁾。

EtOH を摂取させた群 (ET 群および B 群) の総摂食量は、有意差は認められなかったが C 群と比較して少なく、体重においては有意な減少が確認された (データは示さない)。EtOH を摂取させた群の体重減少の原因として、アルコール 1 g あたりのエネルギーが 7.1 kcal と高く、他の栄養素の代謝を抑制すること、また、炭水化物の代わりとして体内で利用すると体重の減少が引き起こされること、さらに、アルコールは腸管透過性を亢進させると同時に腸管の絨毛を傷つけてしまうことで腸管からの栄養素の吸収を抑制するなど、様々な要因が推察される³⁹⁾。

アルコール性肝障害によって引き起こされる主要な組織病変は、肝細胞障害、脂肪蓄積および肝線維化などがあげられる²³⁾。そこでまず、肝細胞障害について着目した。AST および ALT は肝細胞内に存在するが、肝細胞が障害を受けると血中に漏出する逸脱酵素である。そのため、臨床の場においても肝障害のマーカーとして用いられている。

それぞれの血中半減期は、AST では 11~15 時間程度、ALT では 41 時間程度といわれており、肝細胞が急激に障害を受ける急性肝炎では AST 優位となり、逆に長期的に疾病が進行する慢性肝炎や肥満による脂肪肝では半減期の長い ALT 優位に、肝硬変や肝がんでは AST 優位となる傾向が認められる。アルコール性肝障害では AST が優位となるが、これはアルコールによって ALT の合成が阻害されるからである。この結果、AST/ALT 比が 2 近くまで上昇することが報告されており、病態鑑別診断の指標として利用されている⁴⁰⁾。

本研究において、血清中 AST および ALT 活性は、T 群では Control レベルを維持したのに対して、ET 群では AST および ALT 活性は有意に亢進した。さらに、活性値は ALT よりも AST の方が高く、AST/ALT 比が増加していた。一方、B 群では、EtOH によって顕著に亢進した AST および ALT 活性は有意に抑制された (Fig. I-1, 2)。

AST および ALT などの血液生化学的データだけでなく、H&E 染色および EVG 染色によって肝組織像を観察したところ、ET 群では、アルコール性脂肪肝さらにはアルコール性肝炎・肝線維化を発症していた。しかしながら、B 群では ET 群で認められた肝組織障害が軽減され、ほぼ正常な肝組織像が観察された (Fig. I-3)。

以上の結果から、*in vivo* アルコール性肝疾患モデル動物を用いた研究において、BCE はアルコール性肝疾患を改善することが明らかとなった。今回、BCE は飼料として供与されたため、経口的に摂取したことになる。BCE によるアルコール性肝疾患予防効果が見出されたことから、BCE は消化管から吸収された後、肝臓に対して有効性を示したことが示唆された。

第2章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) による アルコール性肝疾患予防効果 ～*In vitro* 実験系による検討～

第1節 背景・目的

第1章の結果から、BCEは、*in vivo* 実験系においてアルコール性肝疾患予防効果を有することが示唆された。そこで本章では、BCEによるアルコール性肝疾患予防効果の作用メカニズムを明らかにするために、ラット肝臓から単離した初代培養肝細胞を用いて *in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを作製し、アルコール代謝関連酵素を中心に検討した。

肝細胞における EtOH に対する生体反応は、細胞質に存在するアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH)、ミクロソームに存在するシトクロム P450 ファミリー、ペルオキシソームに存在するカタラーゼなどによって行われる。これら3つすべての経路で毒性の高いアセトアルデヒドが産生され^{41,42)}、さらに ALDH による酢酸への代謝プロセスによって調節されている。通常、適量飲酒によって体内に吸収された EtOH は ADH によってアセトアルデヒドへ、さらに ALDH によって酢酸にまで代謝され、無毒化される。これに対して、高濃度かつ慢性的な飲酒を続けることによって、ミクロソームエタノール酸化システム (microsomal ethanol oxidizing system: MEOS) において薬物代謝酵素であるシトクロム P450 2E1 (cytochrome p450 2E1: CYP2E1) が誘導され、その活性が上昇することで MEOS でのアルコール代謝が亢進し、アセトアルデヒドへと分解される⁴³⁻⁴⁵⁾ (Fig. II-1)。

CYP2E1 は EtOH 以外にもアセトアミノフェンなどの薬物⁴⁶⁾ や長鎖脂肪酸の酸化⁴⁷⁾ にも関与していることが知られている。CYP2E1 は、EtOH を代謝する際に副産物としてスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生する。CYP2E1 はさらに NADPH オキシダーゼ活性を亢進させることによって ROS の産生を誘導すること、さらに PPAR γ の発現を抑制し、脂肪肝形成にも寄与していることが報告されている⁴⁸⁾。

細胞はホメオスタシスの維持のために ROS を産生しており、また、過剰産生された ROS の消去機能も備わっているため、通常では細胞内 ROS 濃度はバランスが保たれて

いる。しかし、ROS 産生量の増加や本来備わっている ROS 消去機能の減衰により、産生系が優位となると細胞内 ROS 産生量は増加し、細胞は酸化ストレス状態となる。ROS は細胞内の高分子との反応性に富み、過剰に産生されることで酵素の不活性化、DNA の損傷、脂質過酸化を引き起こすことによって、Fig. II-2 に示すような連鎖反応が誘導される⁴⁹⁾。また、CYP2E1 は ADH と比較してミカエリス定数 (Km) 値が高く (CYP2E1; Km = 10 mM、ADH; Km = 1 mM)、血中 EtOH 濃度が低い時にはその役割は低いが、血中 EtOH 濃度が高くなると肝臓内の EtOH 代謝量の約 30%まで活性が亢進し、さらに慢性的な EtOH 摂取においては EtOH の全代謝量の 50%以上を担うようになる⁵⁰⁾。また、常習飲酒家の CYP2E1 活性は非飲酒者の 6~9 倍に増加しているという報告もある⁵¹⁾。

EtOH の代謝過程では、CYP2E1 をはじめとした酵素による ROS 産生、脂質過酸化、ミトコンドリア電子伝達系の阻害、肝グルタチオンの枯渇などによって、ROS の産生系と消去系の均衡が乱れ、酸化ストレスが生じるなど様々な要因が複合的に関連し、最終的に消去しきれない酸化ストレスを介してアルコール性肝障害の進展に寄与していくことが数多く報告されている⁵²⁻⁵⁵⁾。そのため、EtOH による肝細胞障害を予防するためには ROS の産生を抑制する、または ROS の消去を促進することが重要である。

さらに、ADH、CYP2E1 および ALDH は連帯して EtOH の代謝を制御しているため、これらの酵素の制御機構を理解することは必要不可欠である。当研究室ではすでに、*in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルに対し、肝細胞の培地に *Ecklonia cava polyphenol* を添加することによって、これらのアルコール代謝関連酵素が制御され、アルコール性肝細胞障害に対する保護効果を発揮すること、さらに、この調節は cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) 依存的であること、また、これらの効果は cAMP-dependent protein kinase の阻害剤である H-89 の添加によって抑制されることを報告している¹⁷⁾。

cAMP は細胞においてホルモン分泌や記憶形成などの重要な生理現象を制御する代表的な細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして知られており、ATP から合成される。細胞内 cAMP 量は様々なシグナル伝達分子に反応し、アデニル酸シクラーゼによって合成され、ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) によって分解されることで調節されている (Fig. II-3)。アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいは PDE の阻害によって細胞内 cAMP 量が増加すると、cAMP シグナル伝達経路を介して cAMP 依存的に様々な細胞応答が惹起される。その大部分は、cAMP 依存的プロテインキナーゼ

である protein kinase A (PKA) が触媒するリン酸化反応によって伝達される^{56,57)}。一方、cAMP は、炎症や細胞の生存など様々な細胞種や臓器で数多くの経路を制御しており、細胞内 cAMP 量の低下に伴って、インターロイキン-23 (IL-23)、インターロイキン-17 (IL-17)、腫瘍壊死因子 (TNF- α) などの炎症性サイトカインの産生が増加することなどが報告されている^{58,59)}。また、これまでに EtOH が cAMP 量に影響をおよぼすことが *in vivo* および *in vitro* 実験系において報告されている⁵⁸⁻⁶¹⁾。しかしながら、ADH、ALDH および CYP2E1 の活性調節機構やこれら 3 つの酵素発現と cAMP の関与については、いまだ十分に明らかになっていない。

そこで本章では、BCE によるアルコール性肝細胞障害に対する保護効果とその作用メカニズムについて、アルコール代謝関連酵素と cAMP-PKA 経路に着目した。

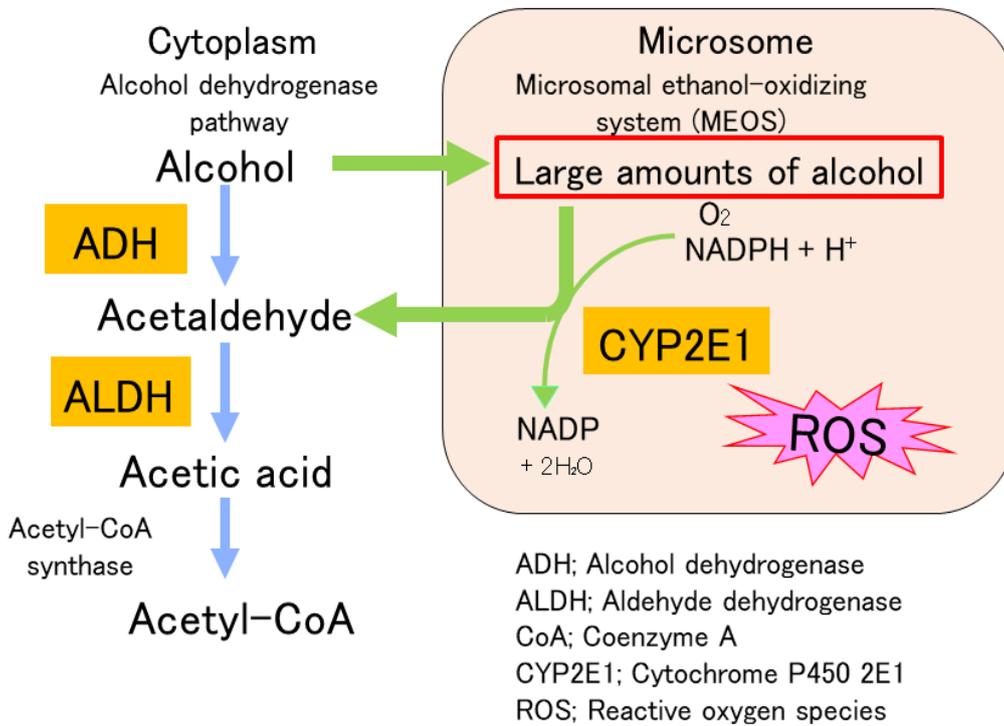


Fig. II-1. Alcohol metabolism pathway

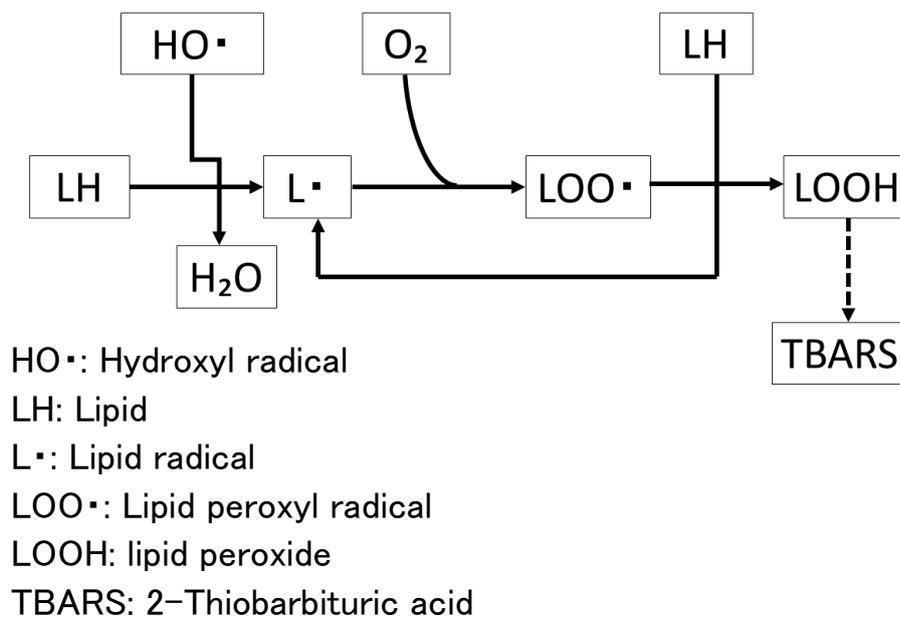


Fig. II-2. Chain reaction of lipid peroxidation

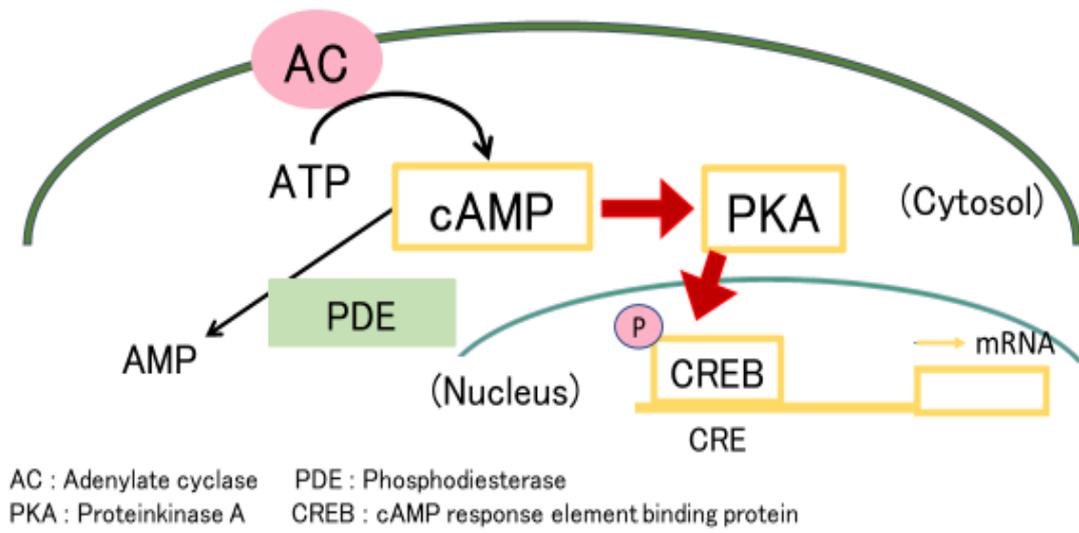


Fig. II-3. Regulatory mechanism of cAMP

第2節 材料および方法

1. BCE の作製および分画

BCE は第1章に記載したように作製した。さらに、BCE の有効成分を明らかにするために、超純水に溶解した BCE をクロロホルム、酢酸エチル、ブタノールの順で分画した。得られたそれぞれの抽出画分をロータリーエバポレーターおよび凍結乾燥機を用いて乾固させた。なお、BCE 10 g から得られたクロロホルム抽出画分 (BCE-CHCl₃抽出画分)、酢酸エチル抽出画分 (BCE-AcOEt 抽出画分)、ブタノール抽出画分 (BCE-BtOH 抽出画分) および水溶性画分 (BCE-water 画分) の粉末重量は、それぞれ 0.2 g、0.08 g、2.54 g および 7.55 g であった。

それぞれの抽出画分は、超純水またはジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) に溶解し、超純水で溶解した場合は 0.22 μm フィルターで滅菌した後、サンプルとして実験に供した。

2. 肝細胞の分離・培養

肝細胞は、10~13 週齢 (300~350 g 体重) の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC 株式会社) の肝臓からコラゲナーゼ灌流法⁶²⁾によって分離した。ラットは解剖当日まで水と固形飼料 (ラボ MR ストック) を自由摂取させた。

肝細胞を単離した後、トリパンブルー色素排除法を用いて細胞生存率を測定し、生存率が 90%以上のものを実験に用いた。

肝細胞を 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) 含有 Williams' E 培地で細胞数を 1.5×10^5 cells/ml に調整し、5% CO₂ インキュベータ (BNA-111; ESPEC 株式会社) 内で培養した。前培養として 24 時間培養した後、本培養として 10% FBS 含有 Williams' E 培地に濃度が 100 mM EtOH になるように添加し、0~24 時間培養した。なお、サンプルは EtOH と同時に添加した。

3. 細胞生存率の測定 (Neutral red 法)

細胞生存率の測定には、Neutral red 法を使用した⁶³⁾。本培養終了後、培地を除去した

後、Neutral red 溶液を添加して 2 時間培養した。その後、1% ホルムアルデヒド/1% 塩化カルシウム溶液で洗浄した。さらに 1% 酢酸/50% EtOH 溶液に置換して 30 分間静置し、肝細胞に取り込まれた Neutral red を抽出した。抽出した溶液の吸光度を分光光度計 (V-530; 日本分光株式会社) にて 540 nm で測定した。

4. 細胞生存率の測定 (water-soluble tetrazolium (WST) 法)

水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-8 を使用することによって色素抽出を行わず、細胞生存率を直接測定することができる Cell counting kit-8 (株式会社同仁化学研究所) を用いた⁶⁴⁾。すなわち、肝細胞の培養液中に Cell counting kit-8 液を添加して 2 時間培養後、450 nm の吸光度をマルチラベルプレートリーダー (Wallc 1420 ARVO_{SX}; 株式会社パーキンエルマージャパン) を用いて測定した。

5. 培地中乳酸脱水素酵素活性の測定

細胞毒性の指標として、培地中に漏出した乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) 活性を測定した。培地に A 液 (60 mM KH₂PO₄、40 mM K₂HPO₄、5 mM CH₃COCOONa) 3 ml と B 液 (15 μM NADH-Na、200 mM NaHCO₃) 50 μl を混合し、紫外可視分光光度計 (V-530) を用いて 340 nm で 3 分間の吸光度を測定することで NADH の減少量を測定した⁶⁵⁾。

6. 細胞内 ROS 産生量の測定

H₂O₂ の比較的特異的なプローブである非蛍光性の 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) は、細胞内に取り込まれた後、ROS によって 2'-7' -dichlorofluorescein (DCF) に酸化される^{66,67)}。この特徴を利用して、生成された DCF 量の蛍光光度の測定または蛍光顕微鏡下での観察によって細胞内 ROS 産生量を測定した。

本培養終了 30 分前に 5 μl の 2.4 mM DCFH-DA を培地に添加してさらに培養を続けた。本培養終了後、リン酸 buffer (phosphate-buffered saline: PBS) で 2 回洗浄した。その

後、蛍光強度の測定では、シャーレ内の細胞を Hank's 溶液に懸濁させ、マルチレベルプレートリーダー (Wallac 1420 ARVO_{SX}) にて励起波長: 458 nm、蛍光波長: 535 nm で蛍光強度を測定した。BCA 法にてタンパク量を定量し、タンパク量あたりの ROS 産生量を算出した。一方、蛍光顕微鏡下による観察では、PBS を除去した後、シャーレの底にカバーガラスを張り付け、オールインワン蛍光イメージングシステム (FSX100 Bio Imaging Navigator; オリンパス株式会社) を用いて細胞の蛍光像を観察した。蛍光強度を Image J ソフトウェアを用いて測定し、細胞内 ROS 産生量を定量化した。

7. 培地中 malondialdehyde (MDA) 産生量の測定

細胞内で産生され、培地中に遊離した MDA 量を TBARS 法によって測定した。FBS-free の Hank's 溶液で培養した後、培地を遠心分離した。上清を試験管に移して 50 mM BHT 液 15 μ l と TBA 試薬 1 ml を加え混合し、加熱後氷上で急冷し、遠心分離した。得られた上清を分光光度計 (V-530) を用いて 532 nm での吸光度を測定した。

8. CYP2E1 活性の測定

培養終了後 PBS で 2 回洗浄した後、9.73 ml の回収 buffer stock (10 mM HEPES、1.5 mM MgCl₂·6H₂O、10 mM KCl, pH 7.4) に細胞を回収する直前に leupeptin 溶液 (10 mg/ml) と pepstatin 溶液 (10 mg/ml) を各 1 μ l ずつ、フッ化ナトリウム (NaF) 溶液 (41.99 mg/ml) を 10 μ l、オルトバナジウム酸ナトリウム (Na₃VO₄) 溶液 (36.78 mg/ml) を 10 μ l 添加したものを回収 buffer とした。

回収 buffer にて細胞を回収し、液体窒素を用いた凍結融解を 2 回繰り返した後、細胞を超音波処理し、15,000 \times g、4°C で 20 分間遠心分離して上清を回収した。CYP2E1 活性は、*p*-ニトロフェノール (PNP) の水酸化率⁶⁸⁾を、546 nm で測定した。すなわち、回収上清を 100 mM KH₂PO₄ (0.2 mM PNP と 2.0 mM NADPH を含有, pH 6.8) に加え、ウォーターバスで 37 °C、20 分間インキュベートした。続いて 0.6 M 過塩素酸 (250 μ l) を用いて反応を停止し、残った上清に 75 μ l の 10 M NaOH を添加した。

CYP2E1 活性は *p*-nitrophenol (nmol/mg protein/min) で表し、4-nitrocatechol の濃度を求めた ($\epsilon = 10.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁶⁹⁻⁷⁰)。また、色素結合法でタンパク定量を行い、タンパク質当たりの CYP2E1 活性を算出した。

9. アルコール代謝関連酵素 (ADH および ALDH) 活性の測定

培養終了後に細胞を 2 回洗浄し、さらに PBS で回収した。2,600 × g、1 分間、4°C で遠心分離した後、緩衝液 (50 mM HEPES, pH 7.5、0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT)、3 mM MgCl₂、1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride) を添加した。液体窒素を用いた凍結融解を 2 回繰り返した後、細胞を超音波処理し、12,000 × g、4°C で 20 分間遠心分離し、上清を回収した。ADH 活性は、エタノール (50 μl) の存在下または非存在下で 1.5 ml 容量 (50 mM HEPES, pH 8.0、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、300 μM NAD⁺) で 25°C にて測定された。一方、ALDH 活性は、アセトアルデヒド (50 μl) の存在下または非存在下で 1.5 ml 容量 (50 mM HEPES, pH 8.0、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、300 μM NAD⁺) で 25°C にて測定された。エタノールまたはアセトアルデヒドを加えて反応を開始し、分光光度計で 340 nm の吸光度を測定した。初期の直線的な吸光度の増加から比活性を測定し、モル吸光係数を 6.2 mM · cm⁻¹ とした⁷¹)。また、細胞内タンパク量の測定には Bradford 法を一部改良した Read と Northcote による色素結合法を用いた^{72, 73})。

10. 遺伝子発現量の測定 (Real-time quantitative PCR) 法

アルコール代謝関連酵素である *Adh1*、*Aldh2*、*Cyp2e1* および *Pde4* family (*Pde4a*、*Pde4b*、*Pde4d*) mRNA 発現量におよぼす EtOH および BCE-BtOH 抽出画分の影響についてリアルタイム PCR 法を用いて検討した。すなわち、肝細胞から total RNA を High Pure RNA Isolation Kit (Roche 株式会社) で抽出し、cDNA を PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ株式会社) を用いて合成した。リアルタイム PCR 法は、リアルタイム PCR 試薬 (iTaQ Universal SYBR Green Supermix; バイオラッドラボラトリーズ株式会社) を用いて Fast Real-Time PCR System (ABI 7500; Life Technologies 社) によって実施した。

プライマー配列は Table II-1 に示す通りである。mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子である β -actin に対して正規化した。定量に用いた Ct (Threshold Cycle) 法には StepOne software v2.2.2 (Thermo Fisher Sciences) を使用した。

Table II-1. The sequence of the primers

	Sense	Antisense
<i>Adh1</i>	5'-CATTGCCGTGGACATCAACA-3'	3'-TGGCAGCTTAACAGGGCAGA-5'
<i>Cyp2e1</i>	5'-ATGGAAGGATGTGCGGAGGT-3'	3'-GGCTGGCCTTTGGTCTTTTTG-5'
<i>Aldh2</i>	5'-AACTGGAAACGTGGTGGTGA-3'	3'-ACCAACCTCAGTGGAACCTGT-5'
<i>Pde4a</i>	5'-AGCTTGAACACCAACGTCCC-3'	3'-CTCCAGCGTACTCCGACACA-5'
<i>Pde4b</i>	5'-ACAGGGAGACAAAGAACGGGA-3'	3'-ACCAACCTGGGACTTTTCCAC-5'
<i>Pde4d</i>	5'-TCCGAATAGCGGAGCTGTCT-3'	3'-TAGGCCACGTCAGCATGGTA-5'
β -actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	3'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-5'

11. タンパク質解析 (Western blotting 法)

本培養終了後、細胞を回収して PBS で 2 回洗浄後、PBS に懸濁した。2,600 × g、1 分間、4°C で遠心分離して上清を除去した後、RIPA buffer (10 mM HEPES, pH 7.6、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.5% Nonidet P40、1 mM dithiothreitol、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を添加して 30 分間氷上に静置した。静置後ピペティングにて細胞を分散させた後、細胞を超音波処理し、12,000 × g、4°C で 10 分間遠心分離した。その後、上清をサンプルとして回収した。その後、各サンプルのタンパク質を等量ずつ 10% SDS-PAGE ゲルの各レーンにロードし、電気泳動を行った。

分離したタンパク質を 0.45 μ m ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Amersham Pharmacia Biotech 社) にブロットした。次に、0.1% Tween-20 と 5% bovine serum albumin (BSA) 含有 Tris Buffered Saline (TBS) で 1 時間ブロッキングした後、メンブレンに抗 CYP2E1 抗体 [(1:5000 希釈) Enzo Life Sciences, Inc.]、抗 ADH1 Antibody [(1:3000 希釈) Cell Signaling Technology, Inc.]、抗 ALDH1/2 Antibody (H-8) [(1:500 希釈) Santa Cruz Biotechnology, Inc.]、抗 PDE4B Antibody (D7R1Y) [(1:1000 希釈) Cell Signaling Technology, Inc.]、抗 GAPDH 抗体 [(1 : 5000 希釈) Cell Signaling Technology, Inc.]、抗 β -Actin 抗体 [(1:2500

希釈) Cell Signaling Technology, Inc.】を一次抗体として室温で1時間インキュベートした。洗浄後、メンブレンに二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン【(1:2500 希釈)DAKO】を滴下し、室温で1時間インキュベートした。さらに、メンブレンを数回洗浄した後、西洋わさびペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン【(1:10000 希釈)DAKO】を滴下し、室温で1時間インキュベートした。数回洗浄した後、Ez West Lumi (アトー株式会社) で発色反応させた。タンパク質バンドのデンストメトリー分析は、ソフトウェア Ez-Capture MG ver. 3.0 (アトー株式会社) を用いた。

12. 細胞内 cAMP 量の測定

細胞内 cAMP 量は DetectX[®] Direct Cyclic AMP enzyme immunoassay kit (Arbor Assays 社) を用いて測定した。

13. 統計解析

値は平均値±標準偏差 (standard deviation: SD) で表した。一元配置分散分析により水準間の差を認めた後、多重比較検定には Tukey-Kramer 法を用いた。5%または1%の危険率で有意差検定を実施した。

第3節：結果

1. 肝細胞の生存率におよぼす EtOH、BCE または BCE 各抽出画分の影響

1-a. 肝細胞の生存率におよぼす EtOH の影響

肝細胞の培地に 0~500 mM EtOH を添加して 24 時間培養後の肝細胞の生存率は、EtOH の添加濃度に依存して有意に低下した (Fig. II-4)。そこで、細胞生存率の有意な低下が認められた 100 mM EtOH を添加したモデルを、*in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルとして以後の実験に用いた。

1-b. EtOH によって有意に低下した肝細胞の生存率におよぼす BCE の影響

肝細胞の培地に 100 mM EtOH と 0~800 µg/ml BCE を同時に添加して 24 時間培養した。その結果、EtOH の添加によって有意に低下した細胞生存率は、BCE の添加濃度に依存して回復し、特に、800 µg/ml BCE を添加することによってコントロールレベルにまで有意に回復した (Fig. II-5)。

1-c. 肝細胞の生存率におよぼす BCE の影響

肝細胞の培地に 0-800 µg/ml BCE を添加しても、細胞生存率はコントロールと変化しなかったことから (Fig. II-6)、BCE の細胞毒性は認められなかった。

1-d. EtOH によって低下した細胞生存率におよぼす BCE 各抽出画分の影響

肝細胞の培地に 800 µg/ml BCE に含まれる相当量の各抽出画分 (BCE-CHCl₃抽出画分、BCE-AcOEt 抽出画分、BCE-BtOH 抽出画分または BCE-water 画分) を 100 mM EtOH と同時に添加して 24 時間培養した。その結果、EtOH によって有意に低下した細胞生存率は、BCE-BtOH 抽出画分の添加によって濃度依存的に回復し、400 µg/ml BCE-BtOH 抽出画分を添加することによってコントロールレベルにまで回復した (Table II-2)。

以降の実験では、BCE の有効成分が含まれている BCE-BtOH 抽出画分を選択し、かつ最も細胞生存率の回復効果が認められた 400 µg/ml を有効濃度と決定した。

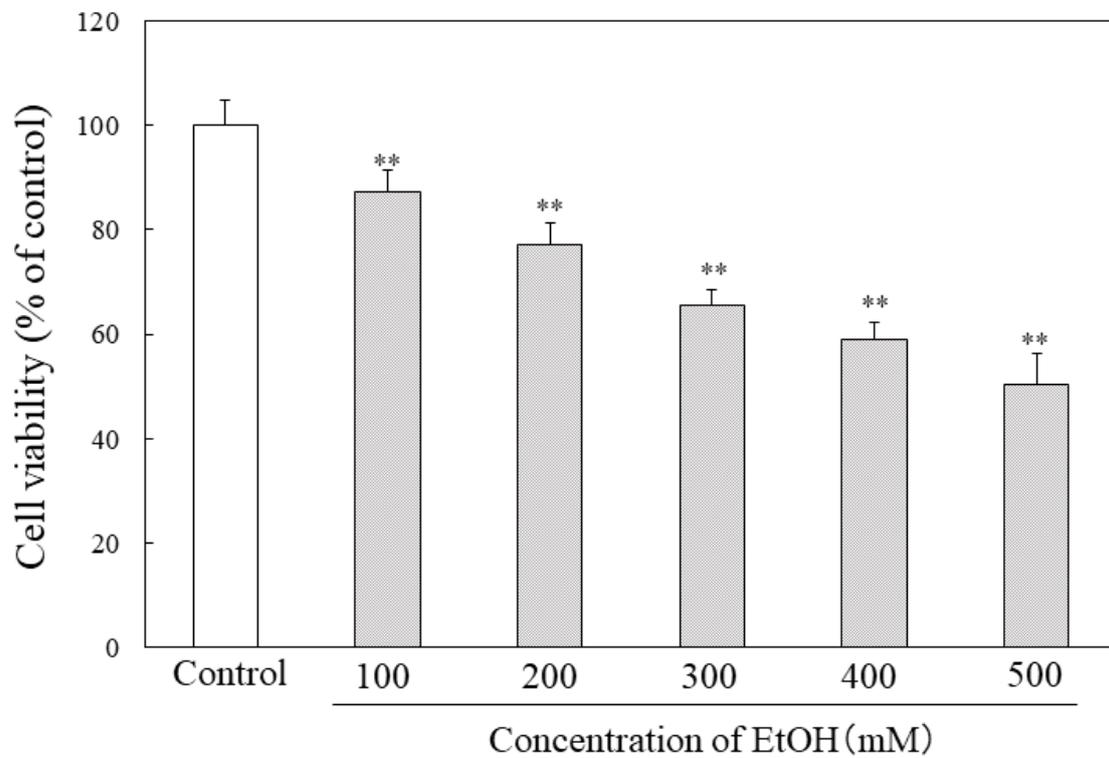


Fig. II-4. Dose-dependently effect of EtOH on cell viability of hepatocytes.

Hepatocytes were incubated with various concentrations of EtOH. Cell viability was measured using the neutral red assay as described in the Materials and Methods section. Data are presented as mean \pm SD of five experiments.

*, $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ vs Control.

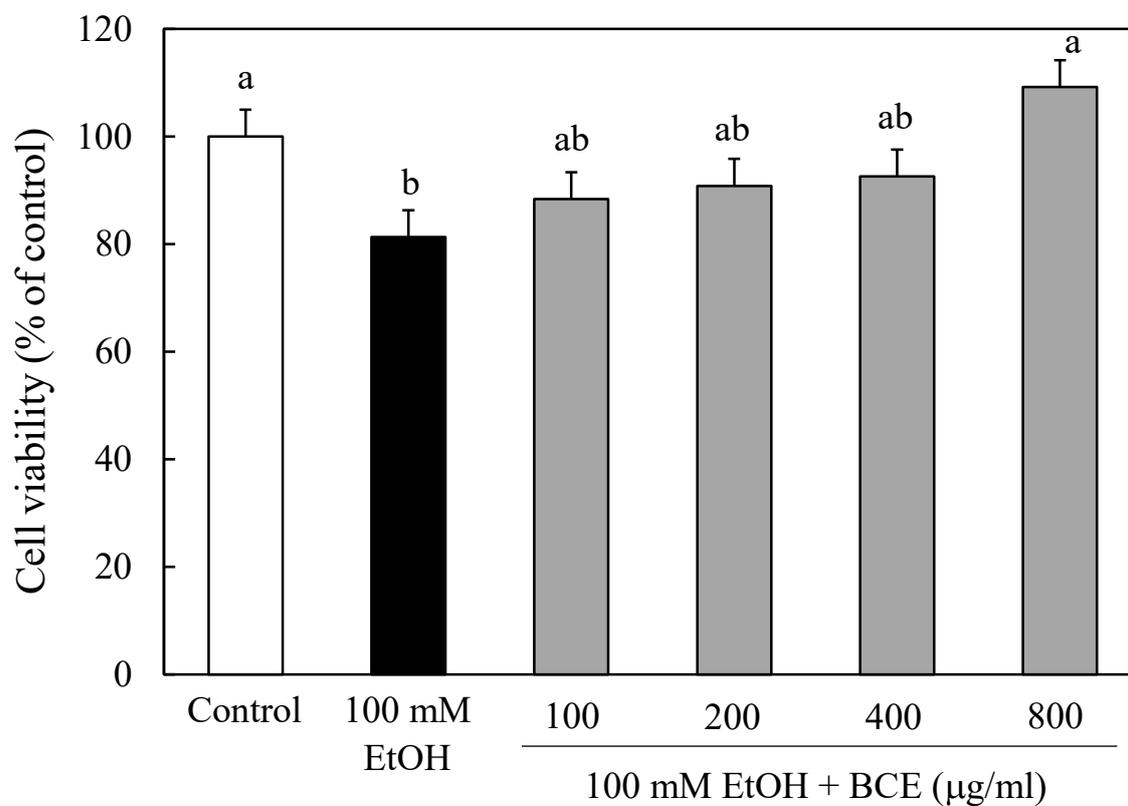


Fig. II-5. Effect of BCE on cell viability of EtOH-treated hepatocytes.

Hepatocytes was incubated with 100 mM EtOH with or without various concentration of BCE. Cell viability was measured using the neutral red assay as described in the Materials and Methods section. Data are presented as mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

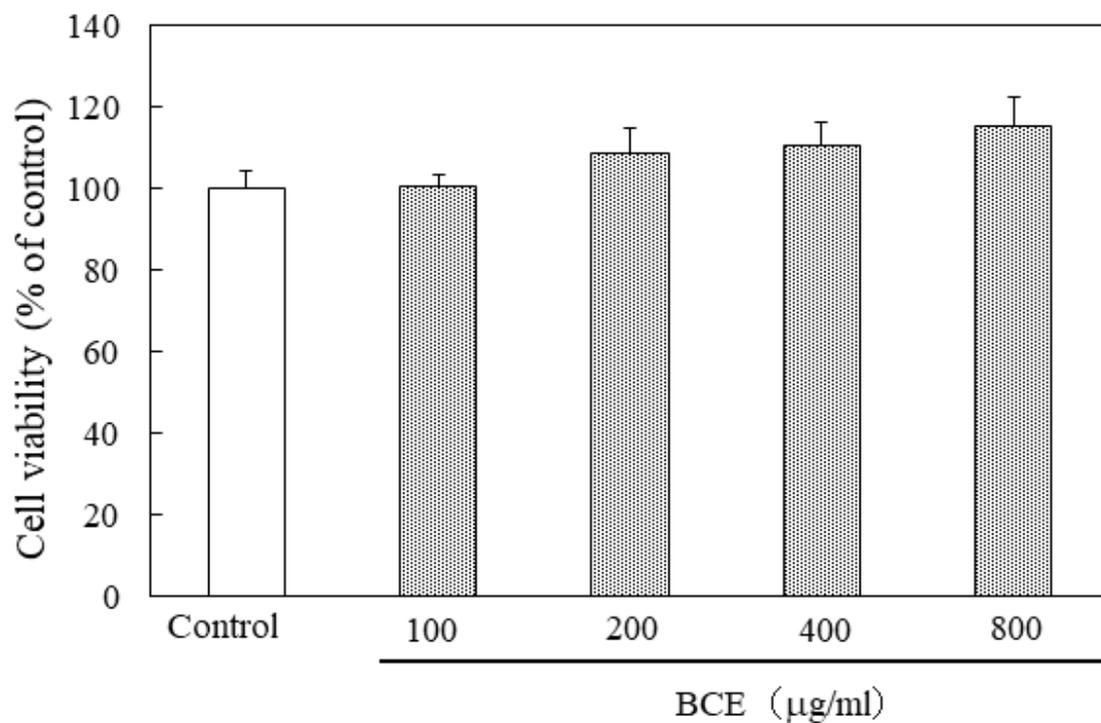


Fig. II-6. Effect of BCE on cell viability of hepatocyte.

Hepatocytes was incubated with various concentration of BCE. Cell viability was measured using the neutral red assay as described in the the Materials and Methods section. Data are presented as mean \pm SD of five experiments.

Table II-2. Effect of various fractions of BCE on the cell viability of ethanol-treated hepatocytes

Groups	Cell viability (% of Control)	Groups	Cell viability (% of Control)	Groups	Cell viability (% of Control)	Groups	Cell viability (% of Control)
Control	100.0 ± 9.2 ^a	Control	100.0 ± 9.2 ^a	Control	100.0 ± 6.6 ^a	Control	100.0 ± 8.2 ^a
EtOH	80.1 ± 8.7 ^b	EtOH	80.1 ± 8.7 ^b	EtOH	85.4 ± 6.0 ^b	EtOH	73.7 ± 3.1 ^b
+ 4 µg/ml BCE-CHCl ₃	93.0 ± 10.2 ^{ab}	+ 1.6 µg/ml BCE-AcOEt	86.8 ± 4.6 ^{ab}	+ 100 µg/ml BCE-BtOH	91.9 ± 7.6 ^b	+ 500 µg/ml BCE-water	87.9 ± 11.5 ^{ab}
+ 6 µg/ml BCE-CHCl ₃	90.8 ± 4.8 ^{ab}	+ 2.4 µg/ml BCE-AcOEt	91.1 ± 7.4 ^{ab}	+ 150 µg/ml BCE-BtOH	95.1 ± 5.4 ^{ab}	+ 750 µg/ml BCE-water	88.4 ± 9.7 ^{ab}
+ 8 µg/ml BCE-CHCl ₃	93.8 ± 7.8 ^{ab}	+ 3.2 µg/ml BCE-AcOEt	92.0 ± 8.2 ^{ab}	+ 200 µg/ml BCE-BtOH	95.6 ± 5.6 ^{ab}	+ 1000 µg/ml BCE-water	87.8 ± 8.4 ^{ab}
+ 12 µg/ml BCE-CHCl ₃	93.4 ± 5.7 ^{ab}	+ 4.8 µg/ml BCE-AcOEt	85.0 ± 5.8 ^{ab}	+ 300 µg/ml BCE-BtOH	98.7 ± 5.1 ^{ab}	+ 1500 µg/ml BCE-water	85.8 ± 7.0 ^{ab}
+ 16 µg/ml BCE-CHCl ₃	94.5 ± 9.7 ^{ab}	+ 6.4 µg/ml BCE-AcOEt	84.6 ± 10.7 ^{ab}	+ 400 µg/ml BCE-BtOH	102.4 ± 6.1 ^a	+ 2000 µg/ml BCE-water	91.5 ± 12.5 ^{ab}

Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without various fractions: chloroform fraction (BCE-CHCl₃), ethyl acetate fraction (BCE-AcOEt), butanol fraction (BCE-BtOH), and water fraction (BCE-water). Cell viability was measured using the neutral red assay as described in the Materials and Methods section. Data are presented as mean ± SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different (p<0.01).

2. EtOH によって誘導される細胞毒性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

2-a. Cell counting kit-8 を用いた検討

EtOH によって有意に低下した細胞生存率におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響を cell counting kit-8 を用いて検討した。その結果、100 mM EtOH と 400 µg/ml BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して 24 時間培養後の細胞生存率は、コントロールレベルを維持したことから、400 µg/ml BCE-BtOH 抽出画分は肝細胞に対して細胞毒性を示さなかった (Fig. II-7)。

2-b. LDH 活性の測定による検討

培地中の LDH 活性を測定することによって、細胞毒性に対する BCE-BtOH 抽出画分を評価した。その結果、肝細胞の培養液に 100 mM EtOH と 400 µg/ml BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して 24 時間培養後の培養液中に漏出した LDH 活性を調べたところ、EtOH の添加によって LDH 活性は有意に亢進したが、400 µg/ml BCE-BtOH 抽出画分は、EtOH によって有意に亢進した LDH 活性をコントロールレベルまで低下したことから、肝細胞に対して細胞毒性を示さないことが明らかとなった (Fig. II-8)。

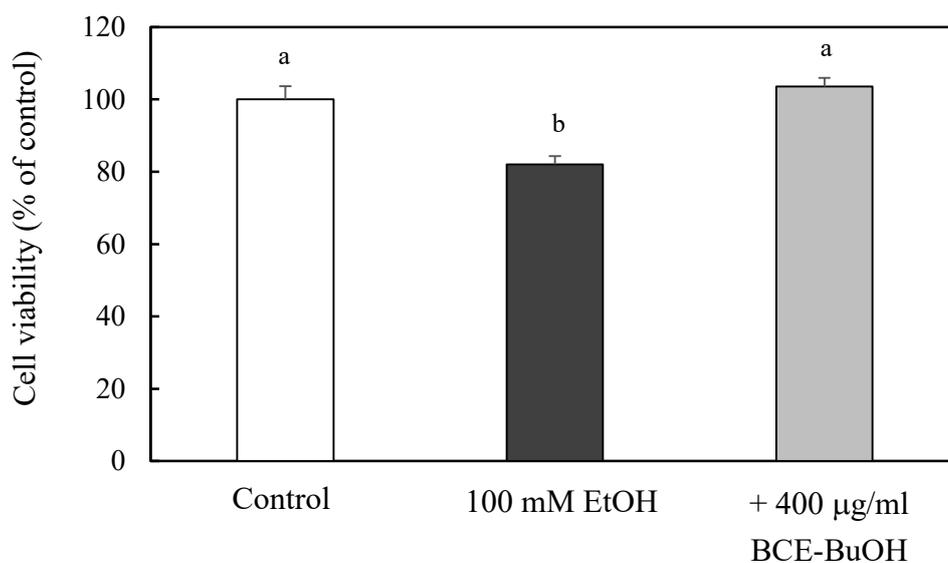


Fig. II-7. Cytotoxicity induced by EtOH and the protective effect of BCE-BtOH. Hepatocytes were incubated for 24 hrs with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Cytotoxicity was assessed by cell counting kit-8. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

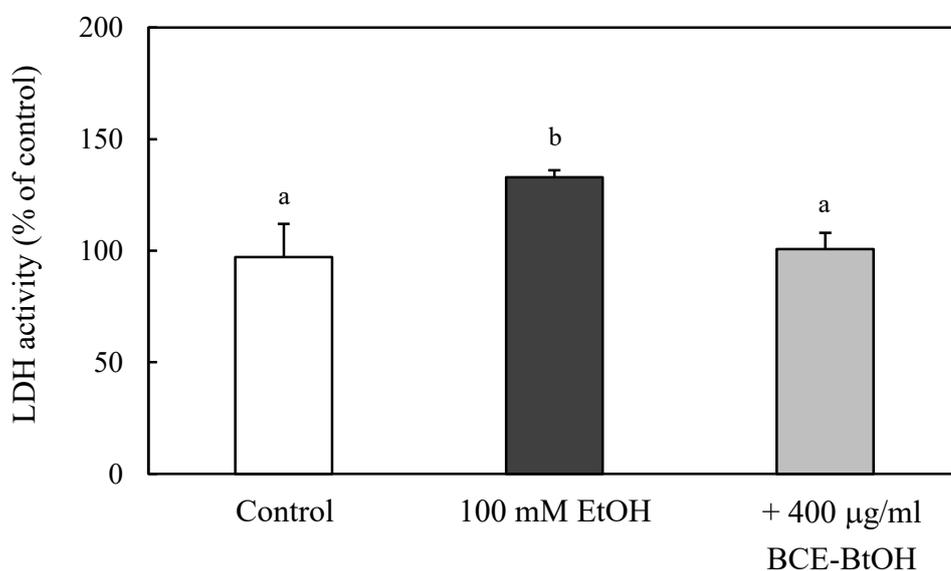


Figure. II-8. Cytotoxicity induced by EtOH and the protective effect of BCE-BtOH. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Cytotoxicity was assessed by measuring LDH activity. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

3. 細胞内 ROS 産生量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

3-a. 細胞内 ROS 産生量の測定 (マルチレベルプレートリーダーによる蛍光強度の測定)

本培養開始 9 時間後における肝細胞の ROS 産生量を DCFH-DA 法を用いてマルチレベルプレートリーダーによる蛍光強度を測定した。その結果、細胞内 ROS 産生量は EtOH の添加によって有意に増加が、400 $\mu\text{g/ml}$ BCE-BtOH 抽出画分を添加するとコントロールレベルにまで有意に抑制された (Fig. II-9)。

3-b. 蛍光顕微鏡下での細胞内 ROS 産生量の観察

本培養開始 9 時間後における肝細胞の ROS 産生量を蛍光顕微鏡下で観察した。上記の実験結果と同様に、細胞内 ROS 産生量は、EtOH を添加することによって顕著に亢進したが、400 $\mu\text{g/ml}$ BCE-BtOH 抽出画分を添加すると、コントロールレベルにまで抑制された (Fig. II-10)。

4. 培地中 MDA 量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

MDA は ROS によって多価不飽和脂肪酸が酸化されて生じた過酸化脂質が分解されて生じる二次生産物である。MDA を測定することは、細胞内 ROS 産生量を反映する間接的なマーカーとして用いられる。そこで、本培養開始 24 時間後の培地中 MDA 量を TBARS 法によって定量した。その結果、EtOH は培地中 MDA 量を有意に増加させたが、BCE-BtOH 抽出画分を EtOH と同時に添加すると、培地中 MDA 量はコントロールレベルにまで有意に低下した (Fig. II-11)。

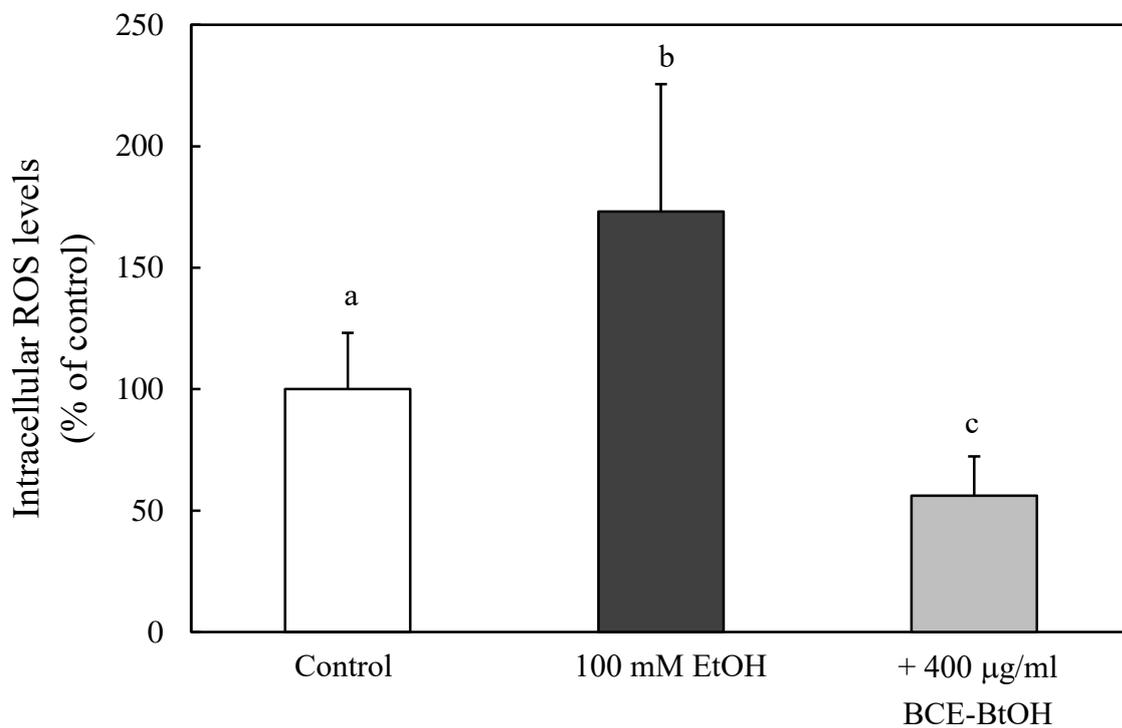


Fig. II-9. Effect of BCE-BtOH on intracellular ROS formation in hepatocytes.

Hepatocytes cultured for 9 hrs were measured with DCFH-DA. Fluorescence intensity was measured using a multilevel plate reader at an excitation wavelength of 458 nm and an emission wavelength of 535 nm. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

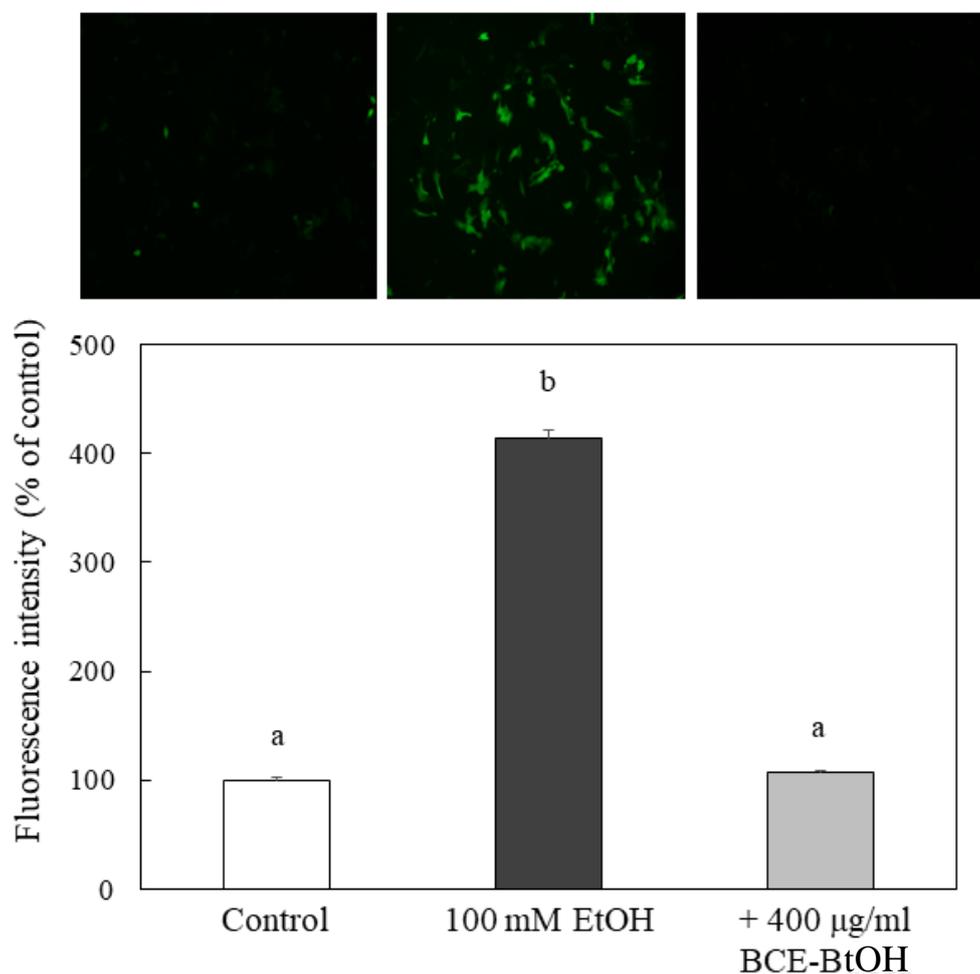


Fig. II-10. Effect of BCE-BtOH fraction on intracellular ROS formation in hepatocytes. Hepatocytes cultured for 9 hrs were measured with DCFH-DA. For visualization of the intracellular fluorescence, the cells were observed with a FSX100 Bio Imaging Navigator, which is an all-in-one fluorescence imaging system. The intracellular ROS expression and fluorescence intensity. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

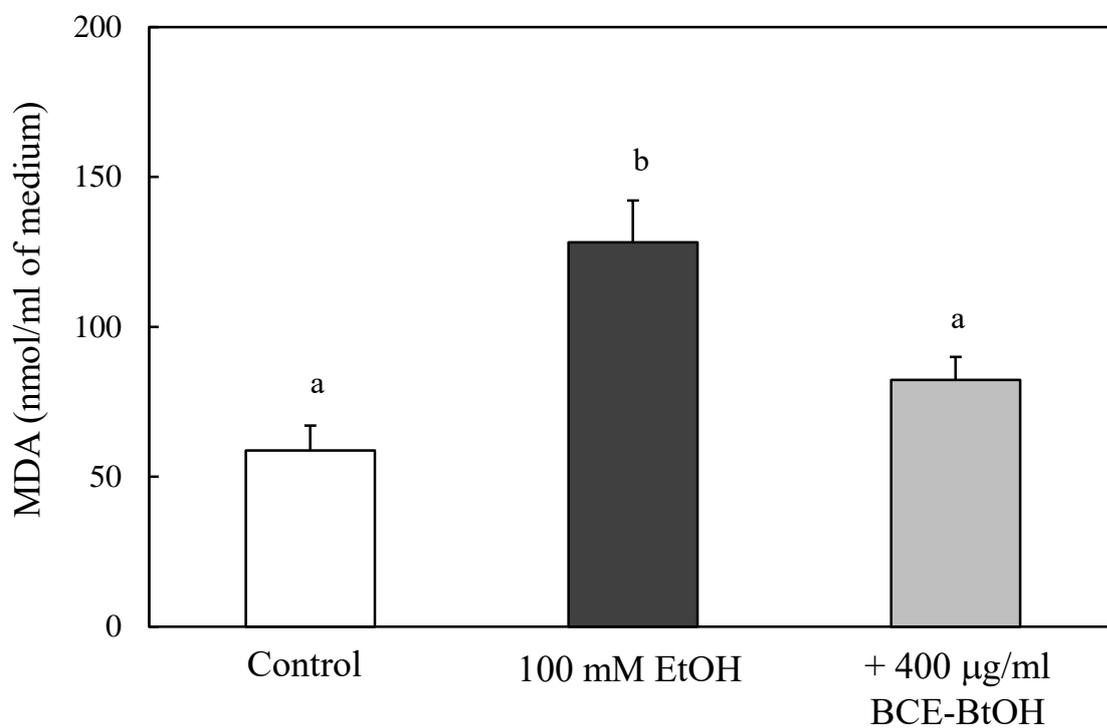


Fig. II-11. Effect of MDA levels in the medium of EtOH- and BCE-BtOH-treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated for 24 hrs with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

5. CYP2E1 におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

5-a. *Cyp2e1* mRNA 発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 6 時間後における *Cyp2e1* mRNA 発現量は、EtOH によって増加する傾向が認められたが、EtOH と BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して培養すると、コントロール群と比較して有意に増加した (Fig. II-12)。

5-b. CYP2E1 タンパク質発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

肝細胞に EtOH と BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して 9 時間培養した時の CYP2E1 タンパク質発現量は、すべての群間で同等な発現量を示し、有意差は認められなかった (Fig. II-13)。

5-c. CYP2E1 活性におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 9 時間後における CYP2E1 活性は EtOH によって有意に亢進したが、BCE-BtOH 抽出画分は EtOH によって亢進した CYP2E1 活性をコントロールレベルにまで有意に抑制した (Fig. II-14)。

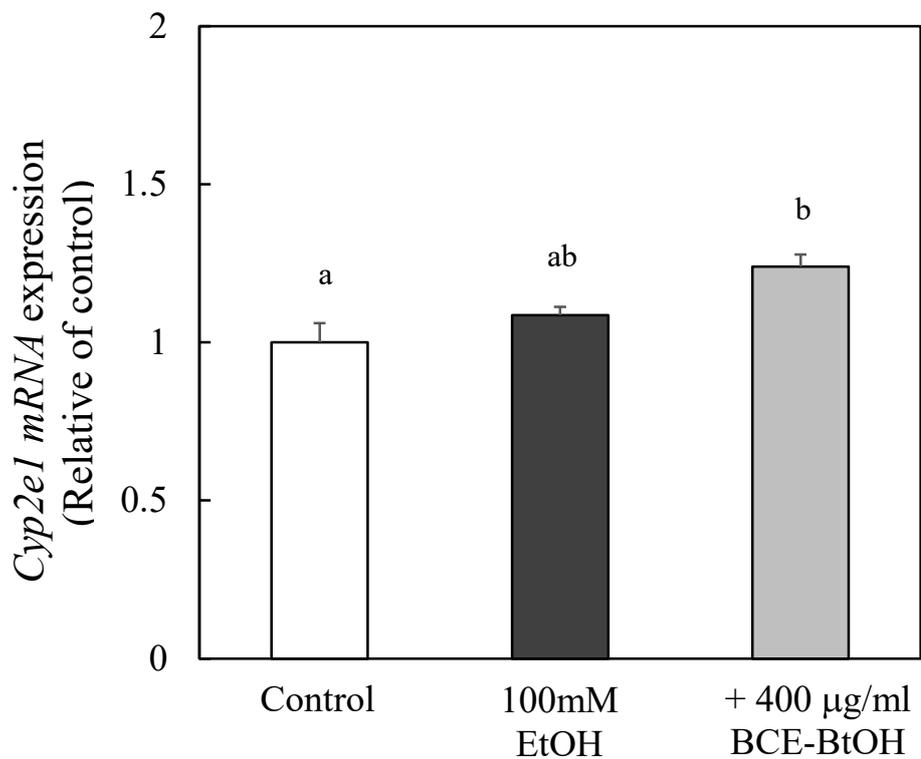


Fig. II-12. Effect of BCE-BtOH fraction on *Cyp2e1* mRNA expression. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. *Cyp2e1* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

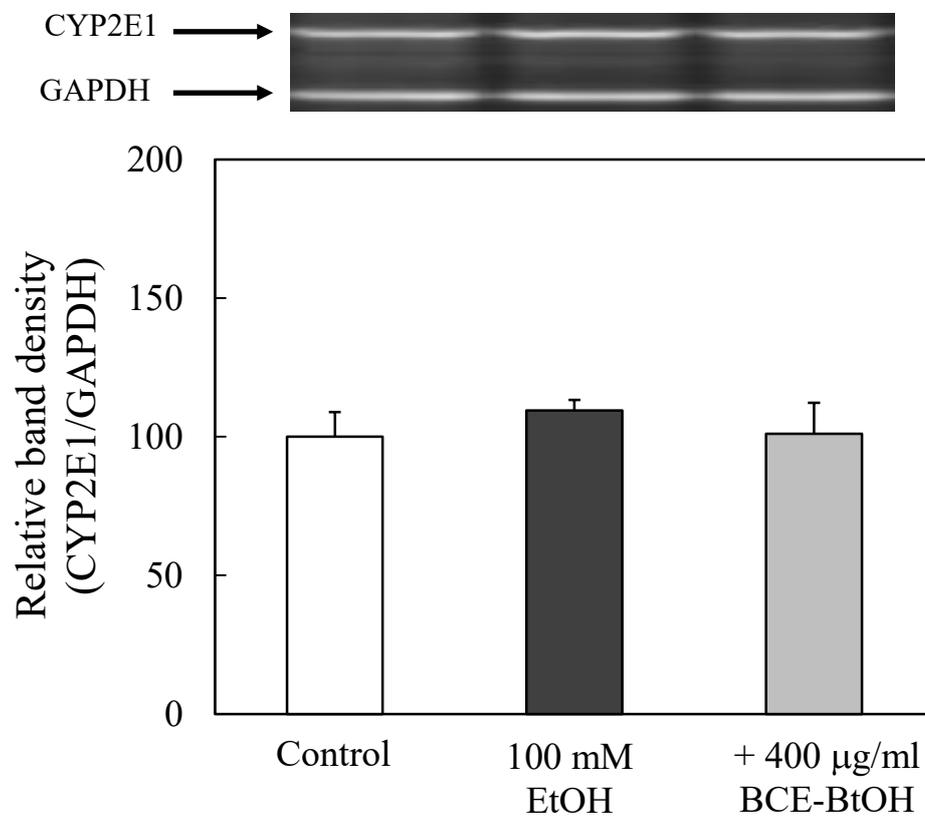


Fig. II-13. Effect of BCE-BtOH fraction on CYP2E1 protein levels. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. CYP2E1 protein level was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments.

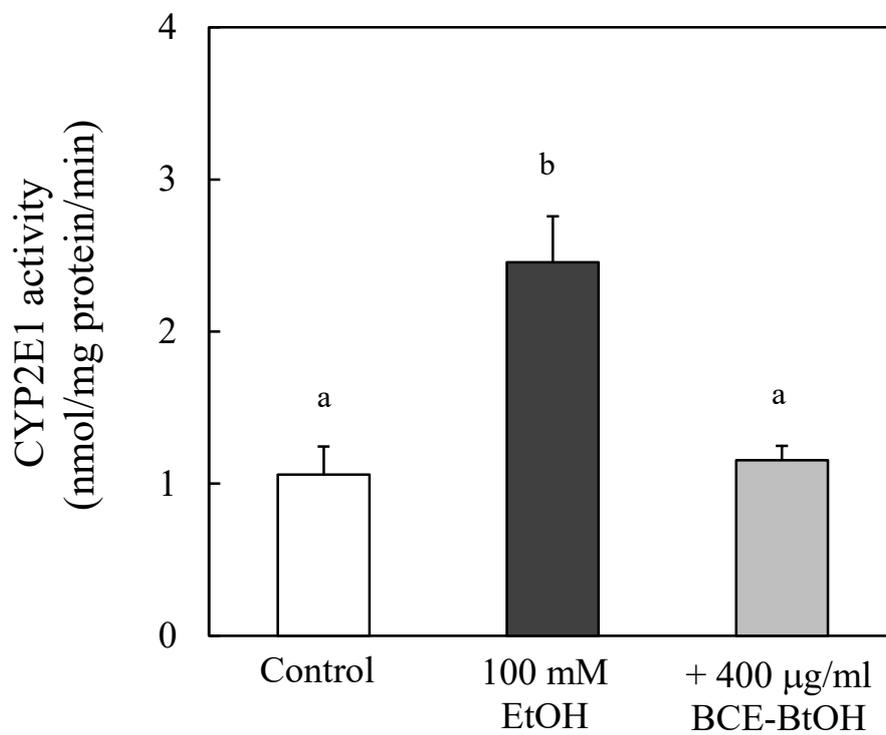


Fig. II-14. Effect of BCE-BtOH fraction on CYP2E1 activity. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. CYP2E1 activity was detected by the oxidation of *p*-nitrophenol to *p*-nitrocatechol as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly

6. ADH におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

6-a. *Adh1* mRNA 発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

肝細胞に EtOH と BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して 3 時間培養した時の *Adh1* mRNA 発現量は、すべての群間で有意差は認められなかった (Fig. II-15)。

6-b. ADH タンパク質発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 4 時間後における ADH タンパク質発現量は、EtOH と BCE-BtOH 抽出画分の同時添加によって有意に亢進した (Fig. II-16)。

6-c. ADH 活性におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 4 時間後における ADH 活性は、ADH タンパク質発現量と同様な挙動を示した。すなわち、BCE-BtOH 抽出画分は ADH 活性を有意に亢進させた (Fig. II-17)。

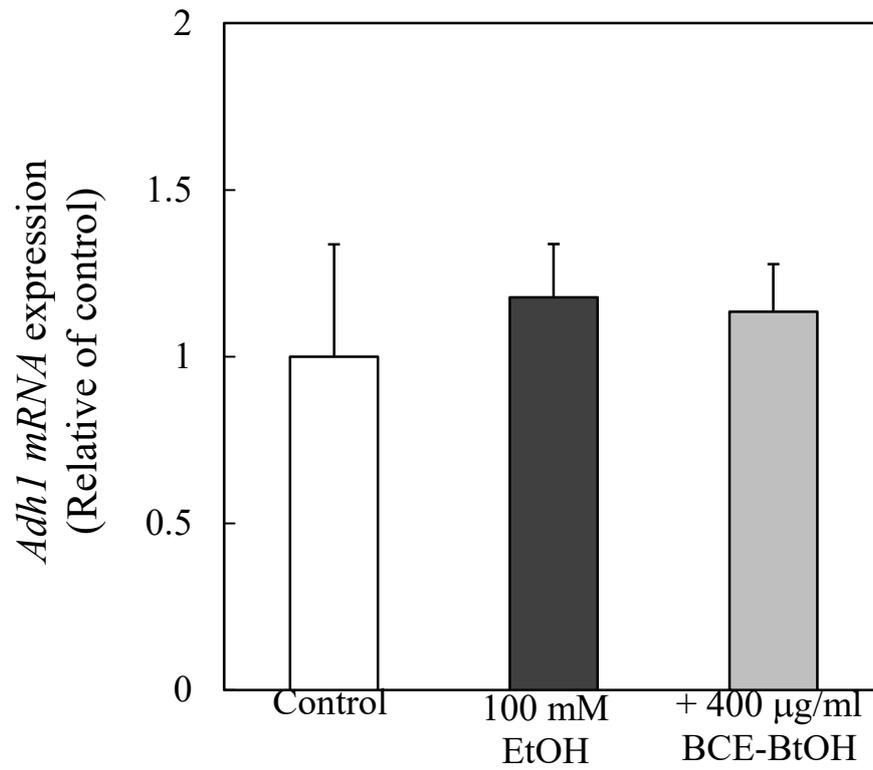


Fig. II-15. Effect of BCE-BtOH fraction on *Adh1* mRNA expression. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. *Adh1* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments.

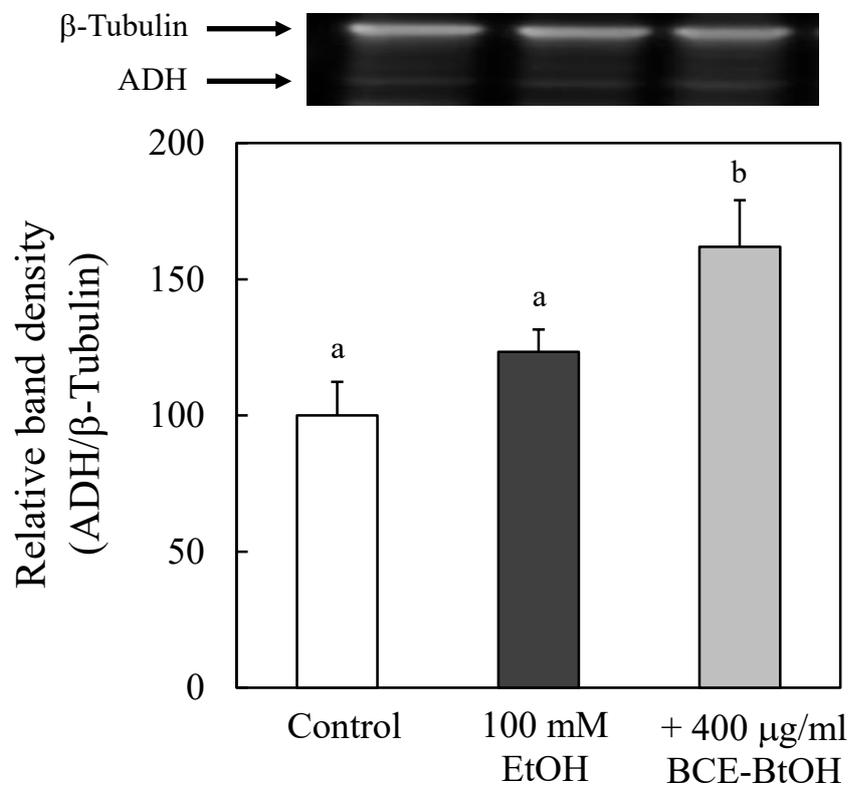


Fig. II-16. Effect of BCE-BtOH fraction on ADH protein levels. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 μ g/ml BCE-BtOH. ADH protein level was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

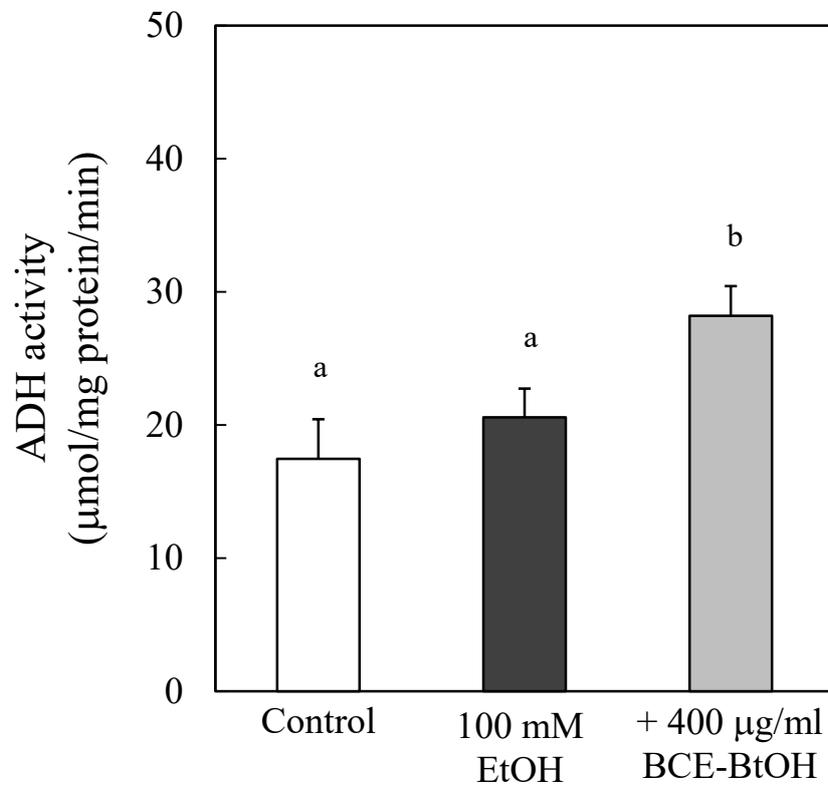


Fig. II-17. Effect of BCE-BtOH fraction on ADH activity. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. ADH activity was measured as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

7. ALDH におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

7-a. *Aldh2* mRNA 発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

肝細胞に EtOH と BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加して 3 時間培養した時の *Aldh2* mRNA 発現量は、有意に増加した (Fig. II-18)。

7-b. ALDH タンパク質発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 4 時間後における ALDH タンパク質発現量は、EtOH と BCE-BtOH 抽出画分の同時添加によって有意に亢進した (Fig. II-19)。

7-c. ALDH 活性におよぼす EtOH および BCE-BtOH 抽出画分の影響

本培養開始 4 時間後における ALDH 活性は、ALDH タンパク質発現量の挙動と同様に、BCE-BtOH 抽出画分の添加によって有意に亢進した (Fig. II-20)。

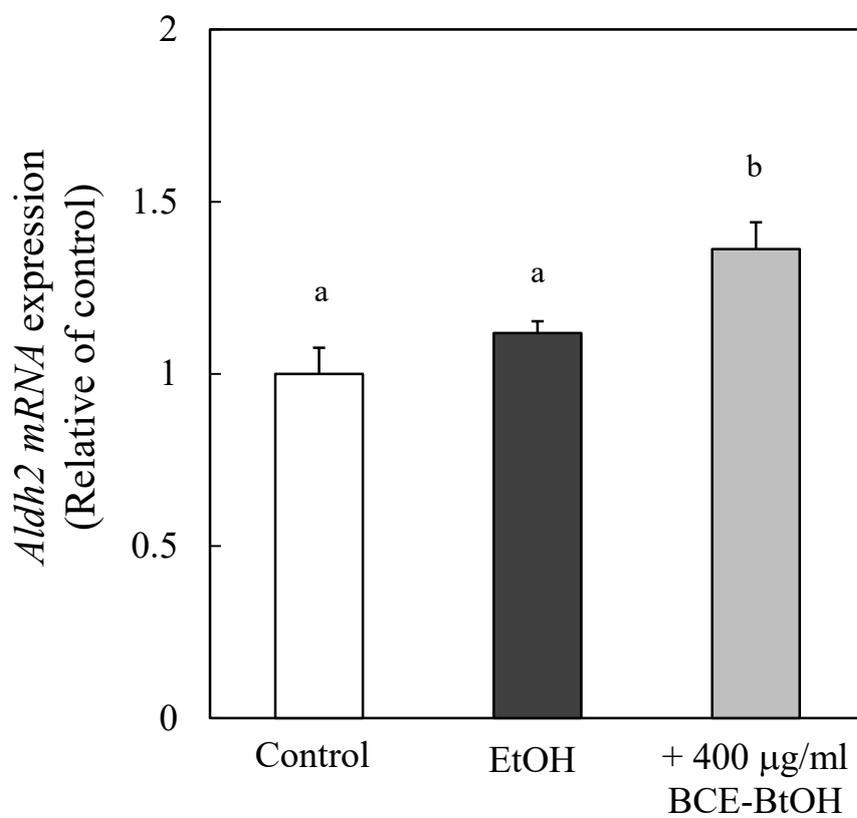


Fig. II-18. Effect of BCE-BtOH fraction on *Aldh2* mRNA expression. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. *Aldh2* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

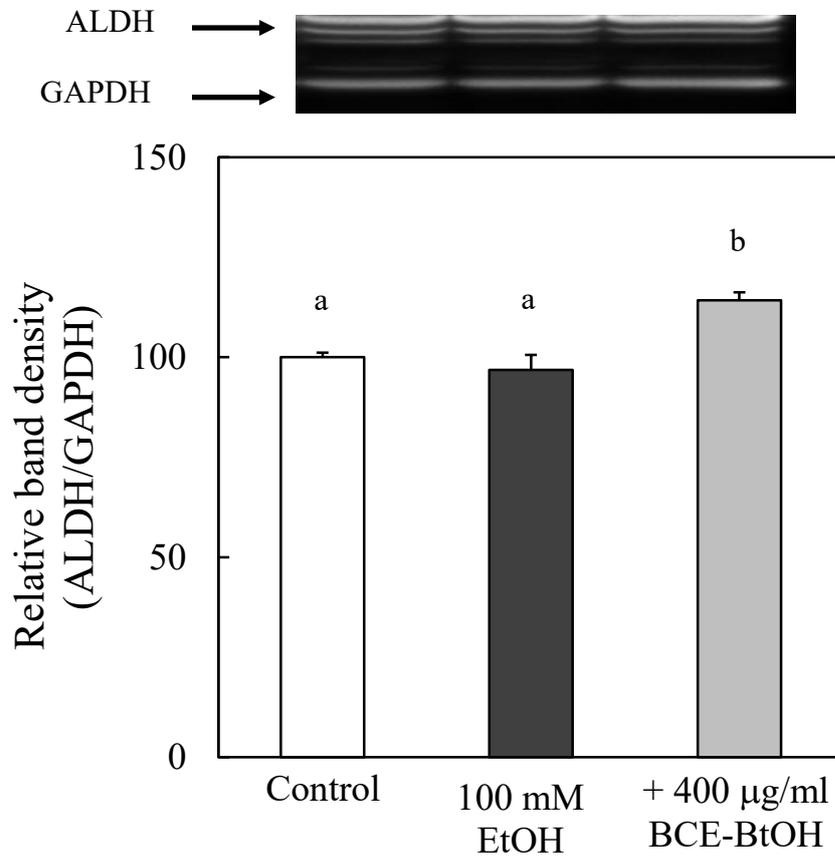


Fig. II-19. Effect of BCE-BtOH fraction on ALDH protein levels. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. ALDH protein level was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

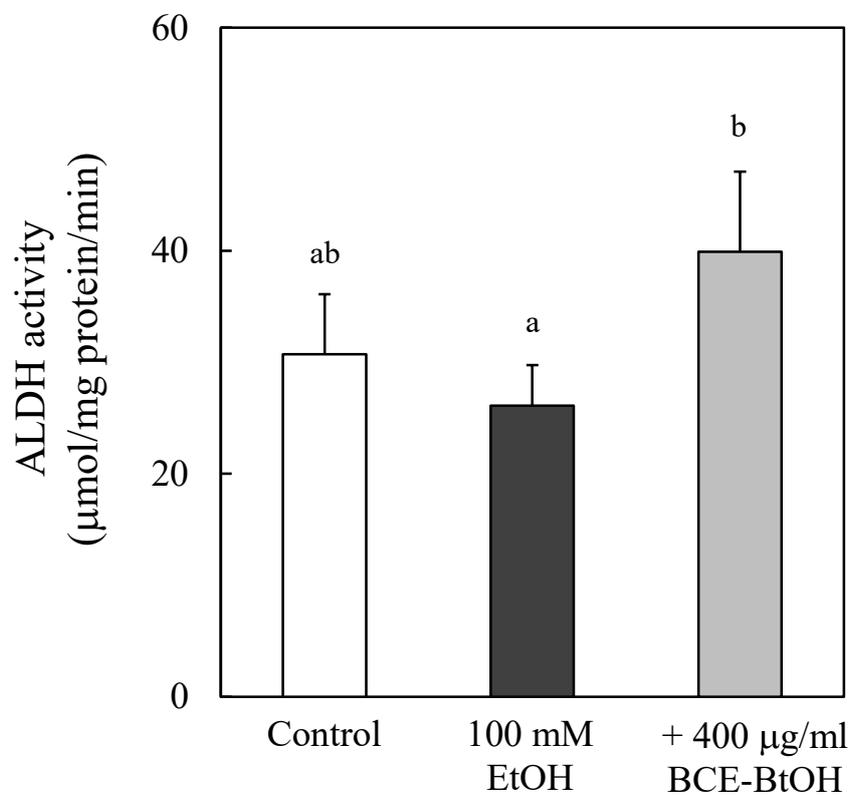


Fig. II-20. Effect of BCE-BtOH fraction on ALDH activity. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. ALDH activity was measured as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

8. 細胞内 cAMP 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

cAMP はアルコール代謝関連酵素活性の調節に関与していることが報告されている。BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性の制御に cAMP が関与しているかを調べるために細胞内 cAMP 量を測定した。その結果、BCE-BtOH 抽出画分は細胞内 cAMP 量を有意に亢進させた (Fig. II-21)。このことから、CE-BtOH 抽出画分は細胞内 cAMP 量を増加させることによってアルコール代謝関連酵素活性を調節していることが示唆された。

9. アルコール代謝関連酵素に対する PKA 阻害剤 (H-89) の影響

PKA は、cAMP 依存性のプロテインキナーゼであり、cAMP によるシグナル伝達を媒介する。cAMP 量が増加するとアルコール代謝関連酵素の発現や活性が調節されることが報告されていることから、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素の制御に cAMP/PKA 経路が関与しているのかどうかを調べるために、PKA の阻害剤である H-89 を用いて検討した。

9-a. ADH 活性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分および H-89 の影響

ADH 活性は EtOH と BCE-BtOH 抽出画分の同時添加によって有意に亢進したが、H-89 を EtOH と BCE-BtOH 抽出画分と同時に添加することによって BCE-BtOH 抽出画分による ADH 活性亢進効果は有意に阻止された (Fig. II-22)。

9-b. CYP2E1 活性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分および H-89 の影響

BCE-BtOH 抽出画分は、EtOH によって有意に亢進した CYP2E1 活性をコントロールレベルにまで抑制したが、H-89 を同時に添加すると、BCE-BtOH 抽出画分による CYP2E1 活性上昇抑制効果は阻止された (Fig. II-23)。

これらの結果より、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性の調節には PKA の活性化が関与していることから、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素の制御に cAMP/PKA 経路を介することが示唆された。

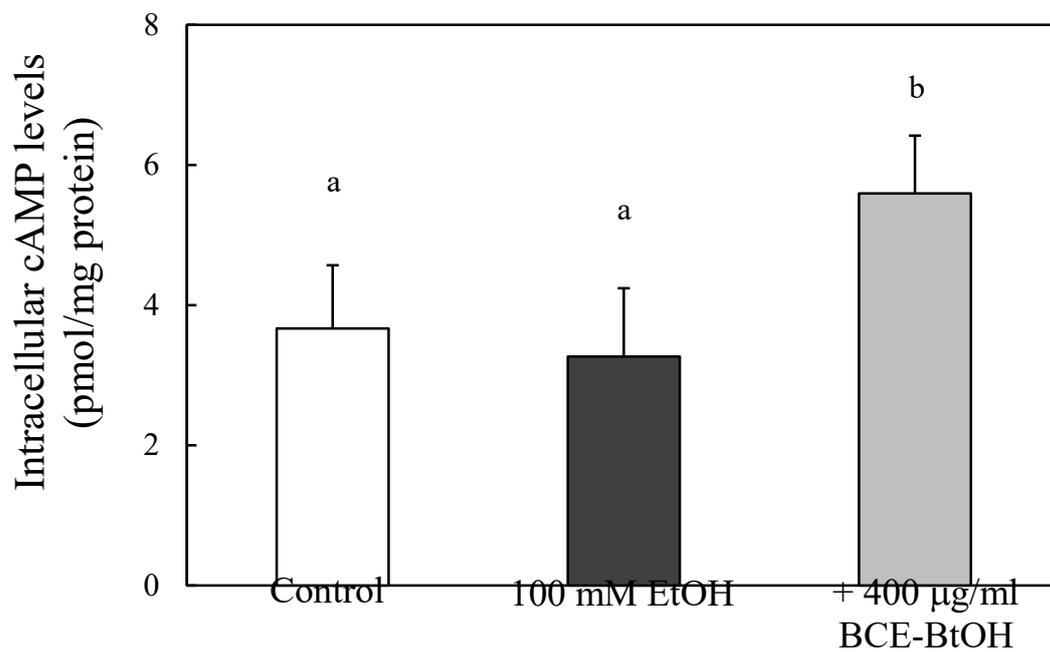


Fig. II-21. Effect of BCE-BtOH fraction on intracellular cAMP levels in ethanol-treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Intracellular cAMP levels were measured as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

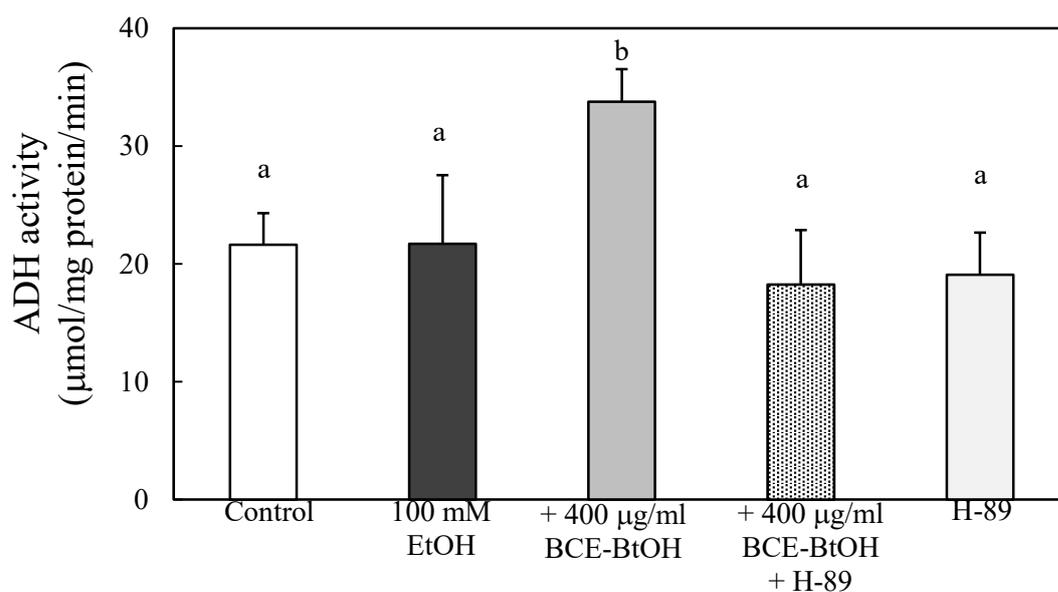


Fig. II-22. Effect of PKA inhibitor on ADH activity in EtOH- and BCE-BtOH fraction treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Data are presented as the mean ± SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

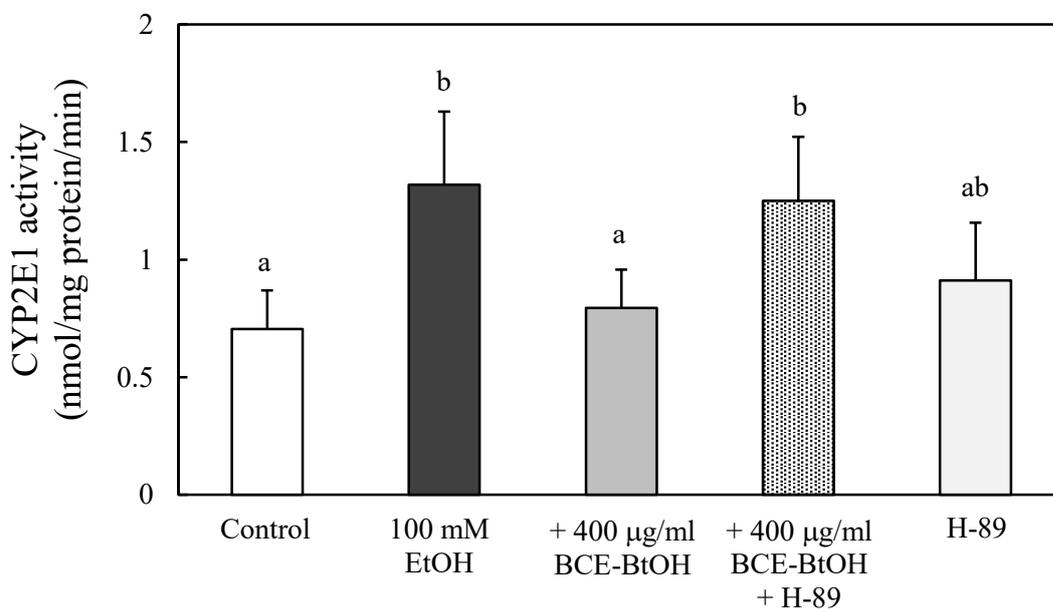


Fig. II-23. Effect of PKA inhibitor on CYP2E1 activity in EtOH- and BCE-BtOH fraction treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Data are presented as the mean ± SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

10. アルコール代謝関連酵素に対するアデニル酸シクラーゼ阻害剤 (MDL-12330A) の影響

BCE-BtOH 抽出画分が細胞内 cAMP 量を増加させたことから、cAMP の調節に関与する因子としてアデニル酸シクラーゼに着目した。アデニル酸シクラーゼとは、細胞膜上に存在し、細胞の多くの生理機能を制御するのに重要な役割を果たしている酵素である。酵素の活性化に伴って基質 ATP から cAMP への生成反応が誘導され、細胞内 cAMP 量を亢進させる。そこで本実験では、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量調節効果へのアデニル酸シクラーゼが関与するかどうかについて明らかにするために、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である MDL-12330A を用いて、アルコール代謝関連酵素活性を測定した。

10-a. ADH 活性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分および MDL-12330A の影響

EtOH は単独では ADH 活性に変化をおよぼさないが、BCE-BtOH 抽出画分の存在下では ADH 活性は有意に亢進した。さらに、MDL-12330A を同時に添加したところ、ADH 活性は低下傾向を示したものの、ADH 活性は亢進されたままであった (Fig. II-24)。

10-b. ADH 活性におよぼす BCE-BtOH 抽出画分および MDL-12330A の影響

EtOH の添加によって有意に亢進した CYP2E1 活性は、BCE-BtOH 抽出画分を同時に添加することによって Control レベルにまで有意に抑制された。さらに、MDL-12330A を同時に添加したところ、BCE-BtOH 抽出画分と同様に CYP2E1 活性の有意な低下が認められた (Fig. II-25)。

これらの結果から、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性の調節効果は、アデニル酸シクラーゼを阻害しても変化しなかったことから、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量の増加には、cAMP 合成系は関与しないことが明らかとなった。

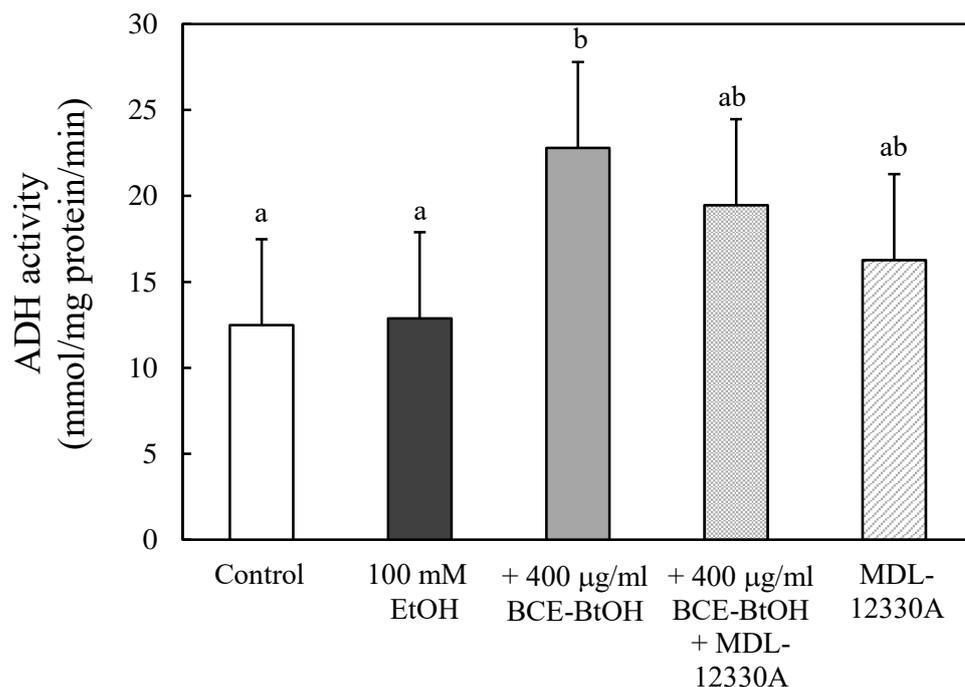


Fig. II-24. Effect of adenylate cyclase inhibitor on ADH activity in ethanol- and BCE-BtOH fraction treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Data are presented as the mean \pm SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

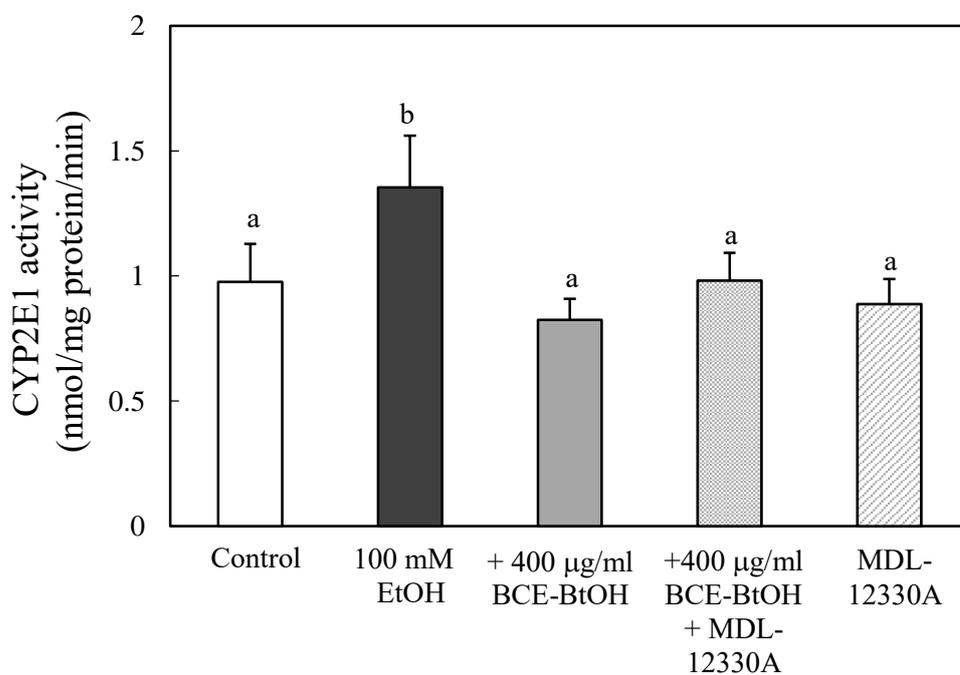


Fig. II-25. Effect of adenylate cyclase inhibitor on CYP2E1 activity in ethanol- and BCE-BtOH fraction treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Data are presented as the mean \pm SD 5 experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

11. PDE4 の発現におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

PDE は細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP および cGMP を分解する酵素である。なかでも PDE4 は cAMP の分解に特異的に働くことが報告されている。PDE4 には 4 つのアイソザイム (PDE4a、PDE4b、PDE4c、PDE4e) が存在しており、その中でも PDE4b は炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられている。

これまでの結果から BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量の増加には、cAMP 合成系には関与していないことが明らかにされたので、BCE-BtOH 抽出画分は cAMP 分解系を抑制している可能性が推察される。そこで、*Pde4b* mRNA および PDE4b タンパク質の発現量を測定した。

11-a. *Pde4b* mRNA 発現量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

BCE-BtOH 抽出画分は、*Pde4b* mRNA 発現量を有意に減少させた (Fig. II-26)。

11-b. PDE4B タンパク質発現量におよぼす EtOH と BCE-BtOH 抽出画分の影響

PDE4b タンパク質発現量は、BCE-BtOH 抽出画分を添加することによって有意に減少した (Figure II-27)。

これらの結果から、BCE-BtOH 抽出画分は PDE4 による cAMP 分解を抑制することによって細胞内 cAMP 量を増加させ、cAMP/PKA 経路を介してアルコール代謝関連酵素活性を調節することが示唆された。

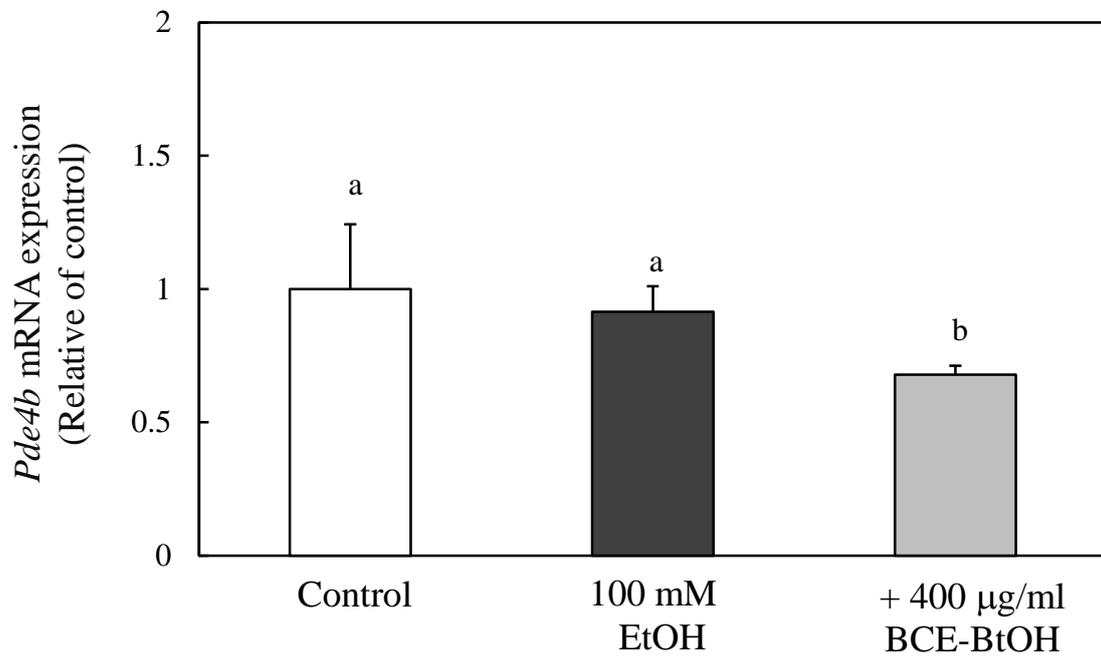


Fig. II-26. Effect of BCE-BtOH fraction on *pde4b* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. *Pde4b* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

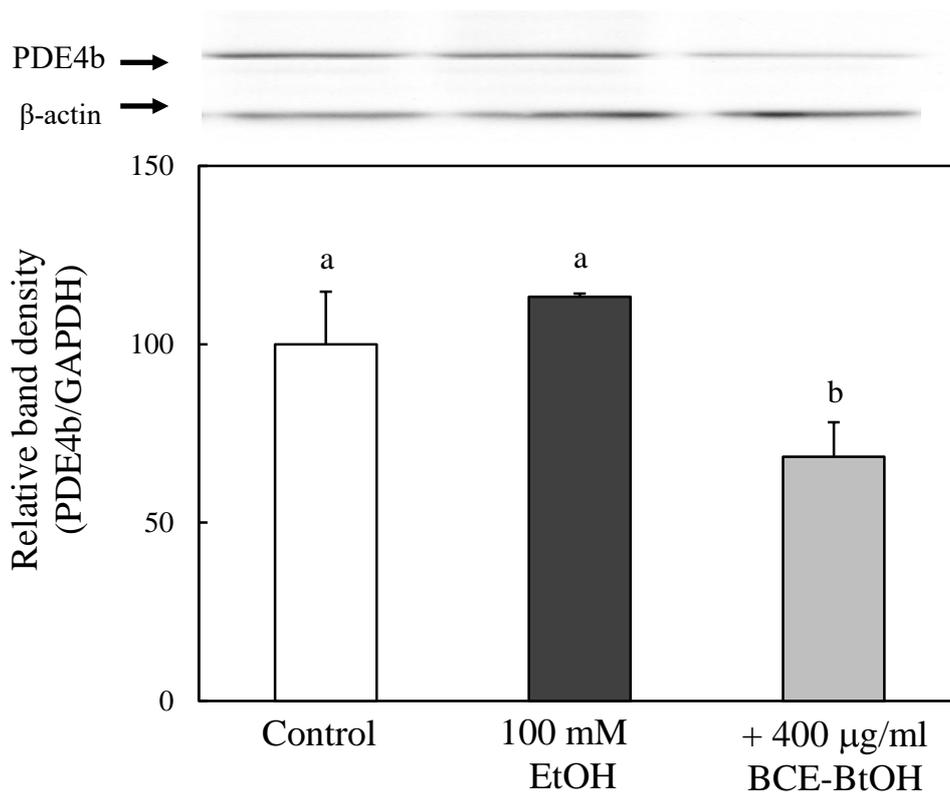


Fig. II-27. Effect of BCE-BtOH fraction on PDE4b protein levels. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. PDE4b protein was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

第4節 考察

本章では、アルコール性肝細胞障害に対する BCE の保護効果とその作用メカニズムを解明するために、細胞障害を惹起する ROS および ROS 産生に関与するアルコール代謝関連酵素に着目した。まず、*in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを作製するために、EtOH の濃度が 0~500 mM になるように肝細胞の培地に EtOH を添加して 24 時間培養した。その結果、肝細胞の細胞生存率は EtOH の添加濃度に依存して低下し、100 mM EtOH 以上の濃度で有意に低下した (Fig. II-4)。また、大量飲酒家の血中アルコール濃度は 100~200 mM であるという報告^{74,75)}があることから、EtOH の添加濃度を 100 mM と決定し、*in vitro* アルコール性肝細胞傷害モデルとして以降の実験に使用した。

次に、100 mM EtOH と同時に BCE を同時に添加して 24 時間培養後の肝細胞の生存率を測定したところ、EtOH によって有意に低下した細胞生存率は、BCE 100 µg/ml 以上の濃度で回復傾向が認められ、800 µg/ml の BCE を添加するとコントロールレベルにまで有意に回復した (Fig. II-5)。さらに、その際、肝細胞に対する細胞毒性も認められなかったことから (Fig. II-6)、800 µg/ml を BCE の有効濃度とした。さらに、BCE を各種有機溶媒 (クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール) によって分画し、得られた抽出画分を用いて細胞生存率を測定したところ、EtOH によって有意に低下した細胞生存率は、BCE-BtOH 抽出画分 100 µg/ml 以上の濃度で回復し、400 µg/ml を添加することによって細胞生存率はコントロールレベルにまで有意に回復した (Table II-2)。さらに、細胞が障害を受けると培地中に放出される逸脱酵素の一つである LDH 活性についても、BCE-BtOH 抽出画分は、EtOH によって有意に亢進した LDH 活性をコントロールレベルにまで抑制した (Fig. II-8)。これらの結果より、BCE および BCE-BtOH 抽出画分にはアルコール性肝障害から肝細胞を保護する効果を有することが示唆された。

ROS は生体内で絶えず産生されており、生体にとって有益な殺菌作用や情報伝達など、様々な場面で利用されている⁷⁶⁾。一方、ROS が過剰に産生されると、産生系と消去系のバランスの崩壊を引き起こし酸化ストレスが生じる。肝臓では多くの代謝が行われており、特に EtOH の代謝においては様々な系で ROS が過剰に産生される⁷⁷⁻⁸⁴⁾。

アルコール性肝障害と酸化ストレスとの関連については多くの先行研究がある。すなわち、慢性的な EtOH 投与によって、抗酸化作用を有する肝臓内グルタチオン (GSH) 量の減少、ミトコンドリア電子伝達系の阻害、カタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と

いった抗酸化酵素系の活性低下、過酸化脂質の増加が見られることが知られている⁸⁵⁻⁹⁰⁾。また、これらの酸化ストレスが脂肪肝や肝線維化を引き起こすという報告もある⁹¹⁻⁹⁵⁾。

これらのことから、アルコール性肝障害から肝細胞を保護するためには、ROS による酸化ストレスを減少させる、または産生された ROS を消去することが重要であると考えられる。そこで、細胞内 ROS 産生量におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響について検討した。細胞内 ROS 産生量は EtOH によって有意に増加したが、BCE-BtOH 抽出画分を添加すると、コントロールレベルにまで顕著に抑制された (Fig. II-9, 10)。さらに、ROS 産生の間接的マーカーとして知られている培地中 MDA 量においても ROS 産生量と同様の結果が得られた (Fig. II-11)。これらのことから、BCE-BtOH 抽出画分は、細胞内 ROS 産生量を顕著に減少させることが明らかとなった。

次に、肝臓において ROS 産生に深く関与するアルコール代謝関連酵素に着目した。アルコールの代謝を担う酵素のうち CYP2E1 は高い NADPH オキシダーゼ活性を介して過剰な ROS 産生を亢進する⁹⁶⁻¹⁰⁴⁾。この CYP2E1 によるアルコールの酸化過程で産生される過剰な ROS が肝障害の進展に寄与することが広く知られている¹⁰⁵⁻¹⁰⁹⁾。BCE-BtOH 抽出画分が EtOH によって顕著に増加した細胞内 ROS 産生量を抑制したことから、アルコール代謝における主要な ROS 産生源のひとつである CYP2E1 におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響について検討した。その結果、CYP2E1 mRNA およびタンパク質発現量はすべての群において変化は認められなかった。しかし、EtOH の添加によって有意に亢進した CYP2E1 活性は、BCE-BtOH 抽出画分を添加するとコントロールレベルにまで抑制された (Fig. II-12-14)。これらの結果から、BCE-BtOH 抽出画分は CYP2E1 に関しては mRNA やタンパク質の発現には干渉せず、ポストトランスレショナルな段階で調節していることが示唆された (Fig. II-12-14)。以上より、BCE-BtOH 抽出画分が EtOH 誘導性 ROS の過剰産生を抑制したことは、アルコール代謝における主要な ROS 産生源である CYP2E1 活性を抑制したことが大きな要因であると示唆された。

さらに、CYP2E1 と同様にアルコールを代謝する主要な酵素である ADH について検討した。BCE-BtOH 抽出画分は ADH の mRNA 発現量を変化させなかったが、タンパク質発現量および ADH 活性を有意に亢進した (Fig. II-15-17)。これらのことから、BCE-BtOH 抽出画分は ADH をトランスレショナルな段階で調節していることが明らかとなった。食品成分のアルコール性肝疾患予防効果についての研究では、亜鉛、クルクミンが CYP2E1 の活性化を

抑制するとともに ADH 活性を亢進させたという本研究と同様の結果を示すことが報告されている^{110,111)}。以上より、BCE-BtOH 抽出画分は、ADH 活性を亢進させることによってアルコール代謝を促進させることで、EtOH からアセトアルデヒドへの速やかな代謝を誘導し、その結果、ROS 産生の増加に寄与する CYP2E1 を介した代謝を抑制することが示唆された。

アルコールの代謝によって産生されるアセトアルデヒドの曝露は、粘膜刺激や皮膚の紅潮などを引き起こすことで悪酔いの原因になるともいわれている。さらに、アセトアルデヒドは反応性が非常に高く、アセトアルデヒド付加物を形成し、その結果、DNA 障害やタンパク質の機能低下、膜機能の減弱、免疫反応など様々な障害を惹起する^{112,113)}。近年、EtOH 摂取によるアセトアルデヒドアダクトの増加^{112,114,115)}が結果的に肝炎や肝線維化などアルコール性肝疾患の進展に寄与することが報告されている¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾。アセトアルデヒドの代謝を担う ALDH を阻害もしくはノックアウトしたマウスにおいて DNA の酸化や細胞傷害が増大したことから、EtOH によって誘導される肝細胞障害を考えるうえでアセトアルデヒドの存在も無視できない因子である。そこで、ALDH についても検討した。BCE-BtOH 抽出画分の添加により ALDH の mRNA 発現量、タンパク質発現量、活性はすべて有意に上昇した (Fig. II-18-20)。一方、EtOH の添加によって ALDH 活性がわずかに減少した。この減少は Agarwal ら¹¹⁹⁾の報告にあるように、EtOH によってアルコール依存症患者の肝臓で ALDH がわずかに減少することや、エタノールが ALDH2 活性をわずかに低下させるという Crabb ら¹²⁰⁾による報告と類似している。本研究において BCE-BtOH 抽出画分は EtOH からアセトアルデヒドへの代謝を促進するだけでなく、毒性が強い代謝産物であるアセトアルデヒドの代謝も促進し速やかに無毒化すること、さらに通常の経路によるアルコール代謝が亢進したことによって CYP2E1 活性が抑制され、その結果、副産物として発生する ROS の産生も抑制したことで肝細胞障害に対する保護効果を有することが示唆された。

さらに本研究では、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール性肝細胞障害に対する保護効果の作用メカニズムについて解明するために cAMP-PKA 経路に着目した。これまでに *in vivo* および *in vitro* 実験系において EtOH の曝露が肝臓内および肝細胞内の cAMP 量に影響をおよぼすことが報告されている^{60,61)}。また、細胞内 cAMP 量の変化にともない PKA 活性が調節されることで肝臓中のアルコール代謝関連酵素の発現が調節されること^{60,121-123)}が報告されていることから、BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素調節効果における cAMP/PKA 経路の関与について検討した。

可逆的なタンパク質のリン酸化はシグナル伝達の中心的な役割を担っており、この反応はあらゆる細胞、細胞小器官、細胞区画で起こっている。主要なリン酸化シグナル伝達経路のひとつに PKA があり、PKA は細胞内 cAMP 濃度の上昇に伴って活性化される。活性化された PKA は酵素タンパク質をリン酸化することで、タンパク質自体の性質を変え、酵素においては活性が左右されることとなる⁵⁸⁾。アルコール代謝関連酵素もこの PKA のリン酸化により制御を受けることが報告されている^{111,112,124)}。Dibutyl cAMP を用いた先行研究において、その添加によって ADH 活性が上昇し¹²⁵⁾、CYP2E1 活性が減少した¹²⁶⁾との報告がある。BCE-BtOH 抽出画分による CYP2E1 活性抑制効果は、PKA 阻害剤である H-89 の添加によって阻害された (Fig. II-23)。この結果より、BCE-BtOH 抽出画分は cAMP/PKA 経路を介して CYP2E1 活性を調節することが示唆された。CYP2E1 活性は自身のリン酸化によって調節されているが、EtOH などの基質の存在によってリン酸化が低下する¹²⁷⁻¹³⁰⁾。In vitro 実験系での報告において、cAMP は CYP2E1 の Ser-129 をリン酸化することで、酵素活性を低下、もしくはタンパク質を分解する¹²⁹⁻¹³³⁾ことが示されており、BCE-BtOH 抽出画分による CYP2E1 活性低下作用にも cAMP/PKA シグナルを介した CYP2E1 の Ser-129 リン酸化が関与していることが推察される。今後、BCE-BtOH 抽出画分による cAMP/PKA 経路を介したより詳細な CYP2E1 活性の調節メカニズムを明らかにすることは課題のひとつである。

さらに ADH 活性についても検討した。BCE-BtOH 抽出画分によって亢進した ADH 活性は H-89 の添加によって阻害された (Fig. II-22)。先行研究において cAMP が ADH タンパク質発現量や ADH 活性、さらには ADH のプロモーター領域の活性化および転写誘導に関連することが報告されている^{134,135)}。このことから、BCE-BtOH 抽出画分は cAMP-PKA 経路を介して ADH の活性を制御していることが示唆された。

BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール代謝関連酵素活性の発現および活性の制御に PKA が関与していることが示唆されたことから、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量におよぼす影響について検討した。cAMP 量と PKA 活性には相関が認められ PKA の活性化は細胞内 cAMP 量に依存することが知られている。すなわち、cAMP 量の増加が誘導されないことには PKA 以降の反応は惹起されないということである^{57,58)}。

細胞外シグナルに対する細胞応答における cAMP の重要性は広く知られている。cAMP は様々な組織において代謝、炎症、線維化の進展に重要な役割を担っており、現在臨床現場においても cAMP 亢進剤および cAMP 分解を担う PDE 抑制剤が炎症、組織線維症、喘息、神

経障害などに対して試験的に使用されている。現在、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) によって重度の慢性閉塞性肺疾患、乾癬および乾癬性関節炎の治療のために 2 つの PDE4 特異的阻害剤が承認されている。肝疾患に関しても広範な PDE 阻害剤である Pentoxifyline がアルコール性肝疾患および NASH (Non-alcoholic steato hepatitis) 患者に使用されており、抗炎症、抗線維化活性を示すことから近年、処方開始されている。このように肝臓内 cAMP 量の維持及び上昇は肝臓における恒常性の維持に重要であり、多くの研究の焦点となっている¹³⁶⁾。

本研究において、細胞内 cAMP 量は BCE-BtOH 抽出画分によって有意に増加した (Fig. II-21)。EtOH の添加に伴い減少すると予想されていた細胞内 cAMP 量は予想に反しコントロールと同レベルを維持した。これに対して、マクロファージおよび Kupffer 細胞では、長期のエタノール処理によって cAMP 量が減少すること⁶⁰⁾。また、長期のエタノール処理の後、25-50 mM EtOH で刺激すると、cAMP 産生は有意に阻害されたという報告もある⁶¹⁾。本研究では、EtOH の曝露に伴い細胞内 cAMP 量が減少するというこれらの報告と一致する結果ではなかった。これに関しては、EtOH の曝露期間が短いことが主な原因と考えられる。以上を踏まえ、BCE-BtOH 抽出画分は EtOH による cAMP 量の減少を抑制するのではなく、細胞内の cAMP 量の増加に関与していることが明らかとなった。次に、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量上昇のメカニズムについて検討した。

細胞内 cAMP 量はアデニル酸シクラーゼの活性化による合成および PDE による分解によって厳格に調節されている。cAMP 量およびシグナル伝達の持続時間や振幅は、PDE による分解によって制御されていることが報告されている¹³⁷⁾。したがって、PDE 発現量の変化が細胞内 cAMP 量およびシグナル伝達に大きな影響を与えていることが推察される。PDE ファミリーの中で cAMP の分解を特異的に担う PDEs (PDE3、PDE4、PDE7)のうち PDE4 は広域的に生体内に分布しており、4 つの遺伝子 (Pde4a、Pde4b、Pde4c、Pde4d) をコードしている。先行研究において PDE4 は EtOH の長期曝露によって発現が増加し、細胞内 cAMP 量を著しく低下させること¹³⁸⁻¹⁴¹⁾、PDE4 酵素自体が動物における肝炎、脂肪肝、組織傷害の発症に病原的な役割を果たすことが報告されている¹⁴²⁾。そこで本研究では、PDE4 をコードする 4 つの遺伝子のうち、発現の増加が肝障害の誘導に深く関与することが報告されている¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾ PDE4b の mRNA およびタンパク質発現量に着目した。その結果、PDE4b の mRNA およびタンパク質発現量はともに、BCE-BtOH 抽出画分を添加することによって有意に減少した

(Fig. II-26, 27)。このことから、BCE-BtOH抽出画分による細胞内 cAMP 量の増加効果は PDE4b 発現を抑制することで誘導されることが見出された。

続いて、cAMP の合成に関与するアデニル酸シクラーゼ (adenylyl cyclase: AC) について検討した。AC は活性化することで cAMP の合成を促進する。BCE-BtOH 抽出画分の cAMP 量増加効果が AC 活性化によるものかどうかについて検討するために、AC 阻害剤である MDL-12330A を BCE-BtOH 抽出画分と同時に添加した際の ADH 活性および CYP2E1 活性を測定した。その結果、MDL-12330A を添加しても BCE-BtOH 抽出画分による酵素活性に変化は認められなかった (Fig. II-24, 25)。すなわち、BCE-BtOH 抽出画分による細胞内 cAMP 量の増加には AC の活性化は関与していないことが明らかとなった。以上より、BCE-BtOH 抽出画分は PDE4b による cAMP の分解を抑制することで細胞内 cAMP 量を増加させ、cAMP/PKA 経路を介してアルコール代謝関連酵素の遺伝子発現量および活性を調節し、アルコール性肝細胞障害に対して予防効果を有することが示唆された。

また、BCE に含まれる成分のうち肝障害予防効果に対する活性成分を同定することは非常に重要である。黒にんじんには様々なポリフェノールが含まれているため、BCE-BtOH 抽出画分をプロトン核磁気共鳴分光法で分析したところ、BCE-BtOH 抽出画分にはベンゼン環を有する様々な化合物や多くの配糖体が含まれており、どの化合物が活性成分であるのかを明らかにすることはできなかった。今後、BCE に含まれる主要活性成分について検討していく必要がある。

第3章 黒にんじん抽出物 (Black carrot extract: BCE) による

アルコール性肝疾患予防効果 ～エピジェネティック修飾～

第1節 背景・目的

第2章では、*in vitro* アルコール性肝細胞障害モデルを用いて BCE-BtOH 抽出画分によるアルコール性肝細胞障害に対する予防効果の作用メカニズムを明らかにした。すなわち、BCE-BtOH 抽出画分は PDE4b による cAMP の分解を抑制することで細胞内 cAMP 量を増加させ、cAMP/PKA 経路を介したアルコール代謝関連酵素の遺伝子発現および活性を制御することによって、アルコール性肝細胞障害に対して予防効果を有することを見出した。そこで本章では、PDE4b の発現調節に影響を与えるエピジェネティックな修飾に着目し、より詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

エピジェネティクスとは、DNA の一次構造の変化を伴わない遺伝子機能の変化とその制御のことであり、主に DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化・メチル化などのヒストン修飾、マイクロ RNA (miRNA) の変化などが知られている^{145, 146)}。エピジェネティクスは個体の発生や細胞の機能維持などヒトの生体に必須の機構である一方、生活習慣の変化によって誤った修飾の変化が発生した場合は、様々な遺伝子発現の制御が発生し、肥満やインスリン抵抗性などの生活習慣病の発症やその進展を招くことが報告されている¹⁴⁷⁻¹⁵¹⁾。近年、肝細胞において、EtOH が様々なエピジェネティックな修飾の変化を誘導することが報告されている¹⁵²⁻¹⁵⁵⁾。

そこで本章では、エピジェネティックな修飾の変化のうちヒストンの修飾に着目した。ヒストンは核に存在する塩基性のタンパク質で、正に荷電した塩基性アミノ酸を豊富に含むことで DNA の負に荷電したリン酸基と相互作用し存在している。真核生物の核の中では、DNA は4種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) から成るヒストン8量体に巻き付くことで、ヌクレオソームを形成している。この DNA とヒストンの複合体であるヌクレオソームが連なった構造がクロマチンである。ヒストンのコア領域に含まれない N 末端・C 末端側の領域をヒストンテールと称し、ここがアセチル化、メチル化、リン酸化、モノユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けていることでクロマチン構造の変化が起き、エピジェネティックな

遺伝子発現の制御が発生する。ヒストンアセチル化とは、ヒストンアセチル基転移酵素 (histone acetyltransferase: HAT) によって、アセチル基がヒストンテールに付加されることである。ヒストンがアセチル化修飾をうけることで正電荷が減少し、ヒストンと DNA の間の電気的な相互作用が減少することで凝集したヌクレオソーム構造が緩み、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に結合しやすくなった結果、遺伝子発現が促進される。一方、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) によってアセチル基が除去されることでヒストンと DNA の結合が強固になり、遺伝子の発現が抑制される。がん細胞において、ヒストン脱アセチル化によってがん抑制遺伝子の発現が負に制御されることが報告されており、現在、HDAC は抗がん剤の標的として注目されている^{156,157)}。これに対して、ヒストンメチル化はアルギニンやリジン残基に生じ、遺伝子発現の促進または抑制のどちらにも作用する。ヒストンメチル化酵素の Set1 によってヒストン H3 の 4 番目のリジンがメチル化されると、遺伝子の発現が促進される一方、SUV39h1 などのヒストンメチル化酵素によって 9 番目のリジンがメチル化されると、HP1 と呼ばれるタンパク質が結合し、ヌクレオソームが凝縮し、ヘテロクロマチンの形成が促進されるため、転写が抑制される。

ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基は、アセチル化とメチル化の両方の修飾を受け、この 2 つの修飾は相反する作用を持つことが報告されている¹⁵⁸⁻¹⁶¹⁾。ヒストン H3K9 のアセチル化 (H3K9Ac) はクロマチン構造を緩め、転写活性化因子がアクセスしやすくなり、遺伝子発現が促進される。これに対して、ヒストン H3K9 のメチル化 (H3K9Me) はクロマチンの閉鎖型であるヘテロクロマチンを形成し、遺伝子転写が抑制される。

EtOH およびその代謝物は、ヒストン H3K9Ac を増加させ、その結果 TNF α などの炎症性サイトカインなどの発現が上昇し、肝障害を誘導する¹⁶²⁻¹⁶⁶⁾。一方で、ヒストン H3K9Me を減少させる¹⁶⁷⁻¹⁷¹⁾ ことが報告されている。

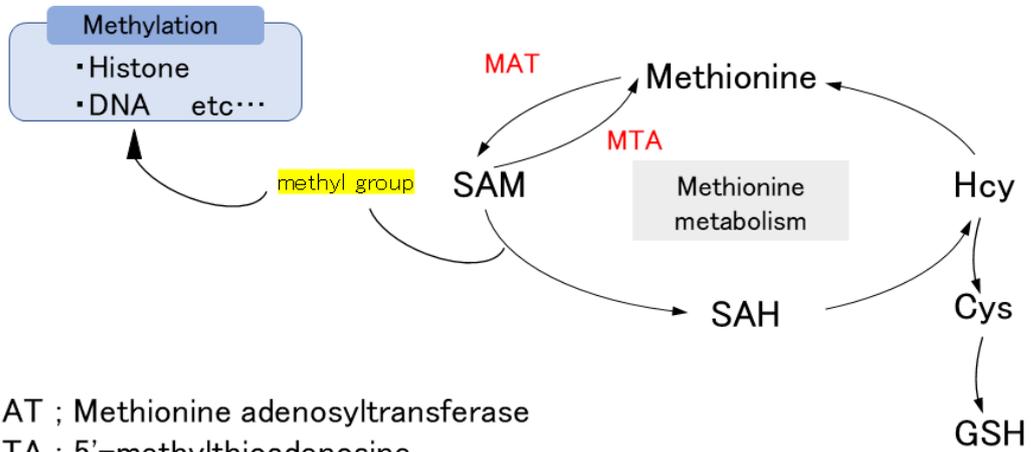
前章において、BCE-BtOH 抽出画分によって発現が抑制される PDE4b は、ヒストン H3K9Me の増加に伴って調節されることが報告されている¹⁷¹⁻¹⁷⁴⁾。

そこで本章では、BCE-BuOH 抽出画分による PDE4b 発現抑制効果にヒストン H3K9Me レベルの増加が関与しているかを明らかにするために、ヒストン H3K9 修飾レベルの変化について検討した。また、同時に H3K9 修飾の変化に影響をおよぼす遺伝子の発現量や細胞内物質についても着目した。H3K9 特異的脱アセチル化酵素である Sirt1¹⁷⁵⁾、H3K9 特異的メチル化酵素である SUV39H および G9a^{176, 177)} が、H3K9 修飾に影響を与える遺伝子として知られ

ている。

さらに、メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM)および SAM 合成に関与するメチオニン代謝経路 (Fig. III-1) についても着目した。強力なメチル化能を有するメチル基供与体である SAM によって H3K9 にメチル基が供与されることで、H3K9 がメチル化修飾される。SAM は必須アミノ酸であるメチオニンと ATP を基質とするメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (methionine adenosyltransferase: MAT) の触媒によって合成される¹⁷⁸⁾。

本章では、ヒストン H3K9 修飾におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響とその関連因子について併せて検討した。



MAT ; Methionine adenosyltransferase
 MTA ; 5'-methylthioadenosine
 SAM ; S-adenosylmethionine
 SAH ; S-adenosylhomocysteine
 Hcy ; homocysteine
 Cys ; Cysteine
 GSH ; Glutathione

Fig. III-1. Methionine metabolism pathway

第2節 材料および方法

1. 肝細胞の分離・培養

肝細胞の分離・培養方法は第2章に記載した通りである。

2. タンパク質解析 (Western blotting 法)

基本的な操作については第2章に記載の通りである。

ヒストン抽出サンプルの調製は、Histone extraction kit (ab113476, Abcam) を用いた。なお、使用した抗体は以下の通りである。Histone H3K9me3 [(1:400 希釈) Gene Tex]、Acetyl-Histone H3 [(1:10000 希釈) #9649 (cell signaling)]、Histone H3(D1H2) [(1:15000 希釈) #4499 (cell signaling)]、Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/Biotinylated [(1:2500 希釈) Dako]。

3. 遺伝子発現量の測定 (Real-time quantitative PCR) 法

ヒストン H3K9 修飾に影響をおよぼす遺伝子として報告されている *Sirt1*、*Mat1a*、*Mat2a*、*Suv39h1* および *G9a* の mRNA 発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響について、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。Total RNA の抽出、cDNA 合成および mRNA 発現量の測定方法は、第2章に記載した通りである。

なお、プライマー配列は以下の表 (Table III-1) に示した通りである。

Table III-1. プライマー配列

	Sense	Antisense
<i>Sirt1</i>	5'- GGATCATTCAGTGTCATGGTTCCT-3	3'-GGCTTCATGATGGCAAGTGG-5'
<i>Mat1a</i>	5'-CTTCCCTGGCTGAGACCTGAT-3	3'-GCATGGCCTCCAGTGTTATGT-5'
<i>Mat2a</i>	5'-AGAGCTGCCATTGATTACCAGA-3'	3'-GTTCCAAGGCAACCAACAC-5'
<i>Suv39h1</i>	5'-TGCAGGATCTGTGCCGACTA-3'	3'-GTCAGGATACCCACGCCATTT-5'
<i>G9a</i>	5'-CCCAGAGGAGTGAATGGTGT-3'	3'-CTTTCGGTGGCCATACACTT-5'
<i>β-actin</i>	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-	3'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-5'

4. 細胞内 SAM および S-アデノシルホモシステイン (S-Adenosyl-L-homocysteine: SAH) 量の測定

SAM は主要なメチル基供与体であり、ヒストンや DNA にメチル基を供与すると SAM は SAH へと代謝される。

本培養終了後、細胞を 0.4 N 過塩素酸 0.4 ml で回収し、液体窒素を用いて凍結融解を 3 回繰り返して細胞を破碎した後、15,000 × g で 15 分間遠心分離し、上清をサンプルとして回収した。上清中の SAM および SAH 量は、逆相分析カラム (Parti Sphere C18、5 μm、Hichrom Ltd.) を備えた HPLC システム (JASCO, LC-Net II/ADC series, 日本分光株式会社) を用いて測定を行った。使用した溶媒および測定方法は以下の通りである。

直線的なグラジエントカーブを用いてプログラムされた溶媒グラジエントでサンプルを溶出した。グラジエントは流速 0.7 ml/min で変化させ、溶媒 A (8 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム, 50 mM 過塩素酸ナトリウム, pH 4.0) の割合は、0~25 分間で 90~50%、溶媒 B は 10~50% に変化させた。25.1 分から 35 分までは溶媒 A 90%、溶媒 B (100% EtOH) 10% で流した。溶出した画分を 6 mM *O*-フタルアルデヒドと混合し (0.7 ml/min)、励起波長: 345 nm と発光波長: 440 nm における褐色蛍光を測定した。

上清回収後の過塩素酸沈殿物中に含まれる DNA 量を Burton¹⁷⁹⁾ による方法を参考にして測定し、DNA あたりの SAM および SAH 量を算出した。

5. 統計処理

統計処理は第 2 章に記載している通りに行った。

第3節：結果

1. ヒストン H3K9 修飾におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

PDE4b mRNA 発現レベルは、ヒストン H3K9 のメチル化によって制御されることが報告されている¹⁷¹⁻¹⁷³⁾ことから、*PDE4b* mRNA 発現抑制におけるヒストン H3K9 のメチル化の関与について検討した。また、ヒストン H3K9 がメチル化修飾を受けるためにはアセチル基が除去されている必要がある。そこで、BCE-BtOH 抽出画分がヒストン H3K9 修飾 (Ac 化および Me 化) におよぼす影響について Western Blotting 法で検討した。

1-a. H3K9 メチル化におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

H3K9 メチル化レベルは、EtOH の添加によって減少した。これに対して BCE-BtOH 抽出画分は H3K9 メチル化レベルを有意に亢進させた (Fig. III-2)。

1-b. H3K9 アセチル化におよぼす EtOH または BCE-BtOH 抽出画分の影響

H3K9 アセチル化レベルは、EtOH を添加することによって有意に増加した。これに対して BCE-BtOH 抽出画分は、H3K9 アセチル化レベルを有意に低下させた (Fig. III-3)。

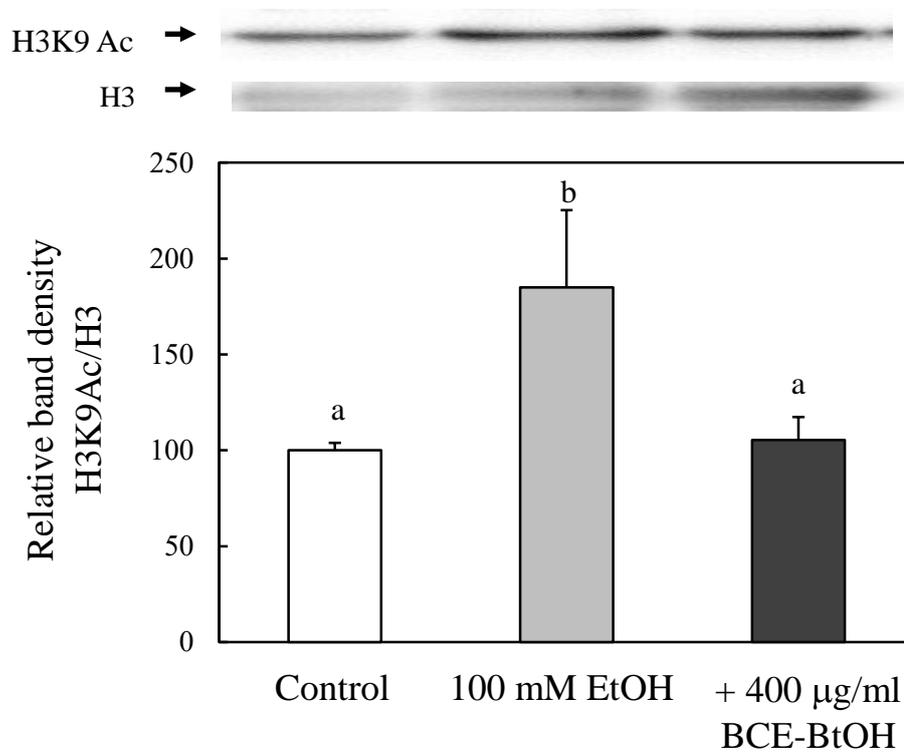


Fig. III-2. Effect of BCE-BtOH fraction on H3K9 acetylation levels.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Acetylation levels was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

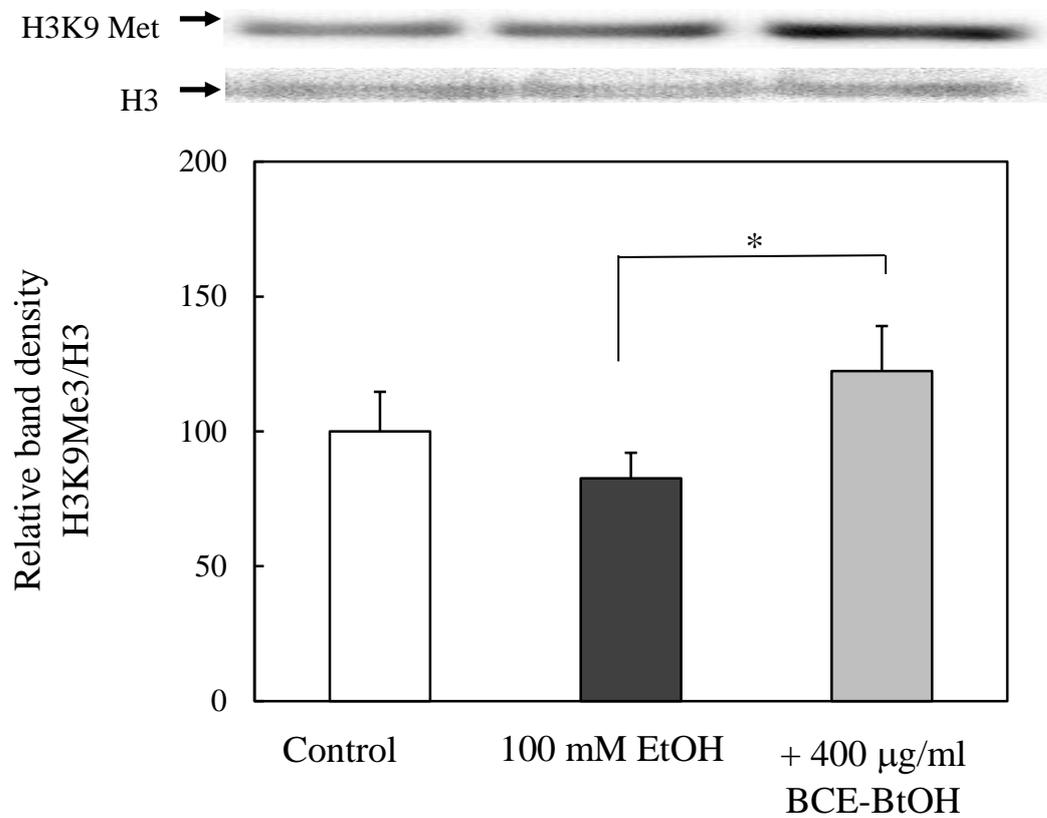


Fig. III -3. Effect of BCE-BtOH fraction on H3K9 methylation levels.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. Methylation levels was measured by Western blot analysis. Data are presented as the mean \pm SD of three experiments.

*: $p < 0.05$.

2. ヒストン H3K9 修飾変化に関与する遺伝子発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

BCE-BtOH 抽出画分は、ヒストン H3K9 修飾の変化を誘導することが明らかとなった。そこで、ヒストン H3K9 修飾に影響をおよぼす遺伝子として、H3K9 特異的ヒストン脱アセチル化酵素である *Sirt1* および H3K9 特異的メチル化酵素である *Suv39h1*、*G9a* に着目し、それぞれの mRNA 発現量について検討した。

2-a. *Sirt1* mRNA 発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

Sirt1 mRNA 発現量は、BCE-BtOH 抽出画分を添加するによって有意に増加した (Fig. III-4)。

2-b. H3K9 メチル化酵素の mRNA 発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

メチル化酵素 (*Suv39h1*、*G9a*) mRNA 発現量は、いずれの酵素ともにすべての群で有意な差は認められなかった (Fig. III-5, 6)。

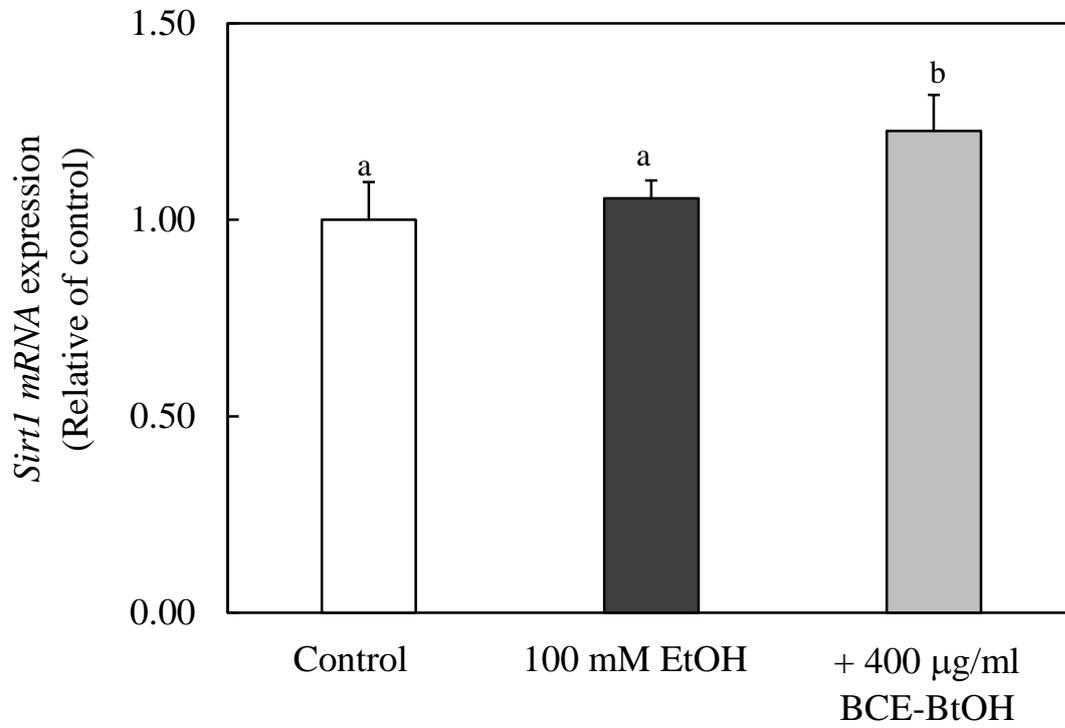


Fig. III-4. Effect of BCE-BtOH fraction on *Sirt1* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. *Sirt1* expression was measured using real-time PCR analysis.

Data are presented as the mean \pm SD of four experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

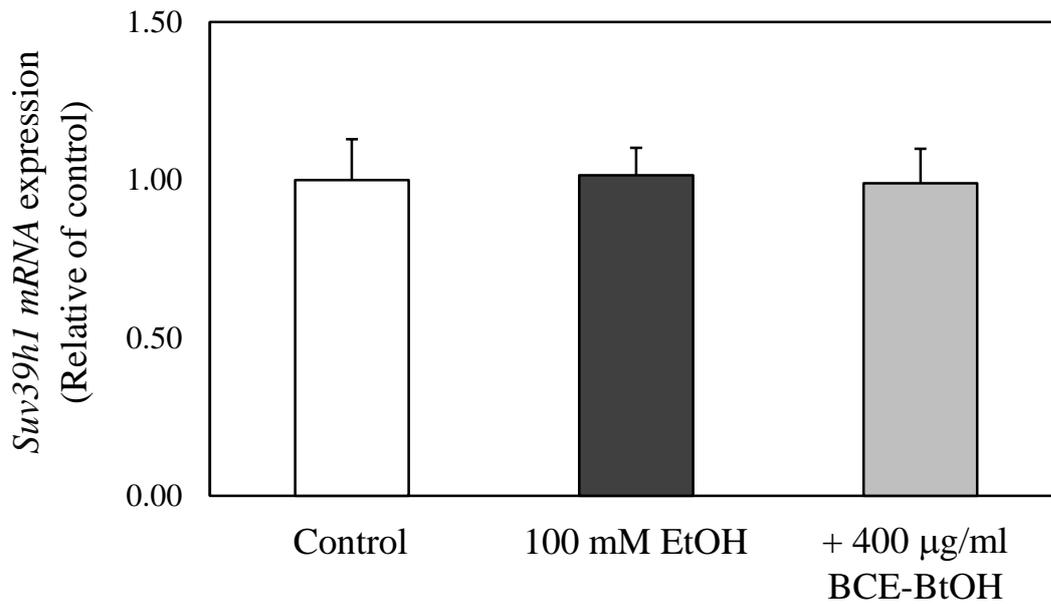


Fig. III -5. Effect of BCE-BtOH fraction on *Suv39h1* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. *Suv39h1* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean ± SD of four experiments.

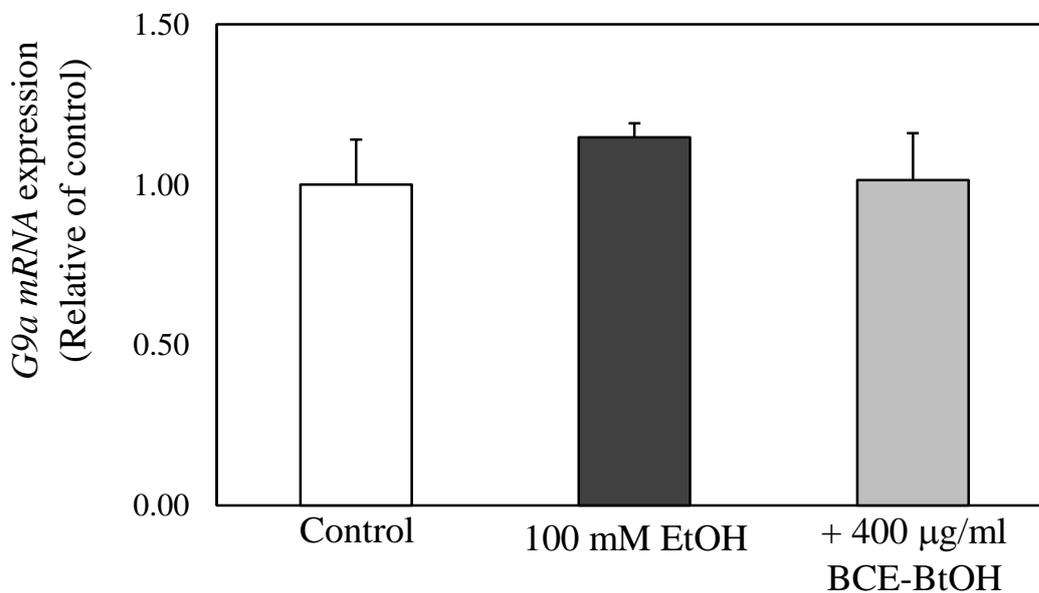


Fig. III -6. Effect of BCE-BtOH fraction on *G9a* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. *G9a* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean ± SD of four experiments.

3. 細胞内 SAM 量および SAH 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

メチル基供与体である SAM によるトランスメチル化反応によりヒストンがメチル化修飾を受ける。メチル基を供与した SAM は SAH へと代謝される。BCE-BtOH 抽出画分による H3K9 メチル化レベルの上昇と細胞内 SAM 量および SAH 量の関与について検討した。

3-a. 細胞内 SAM 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

細胞内 SAM 量は、BCE-BtOH 抽出画分の添加によって有意に増加した (Fig. III-7)。

3-b. 細胞内 SAH 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

BCE-BtOH 抽出画分は、細胞内 SAH 量を有意に増加させた (Fig. III-8)。

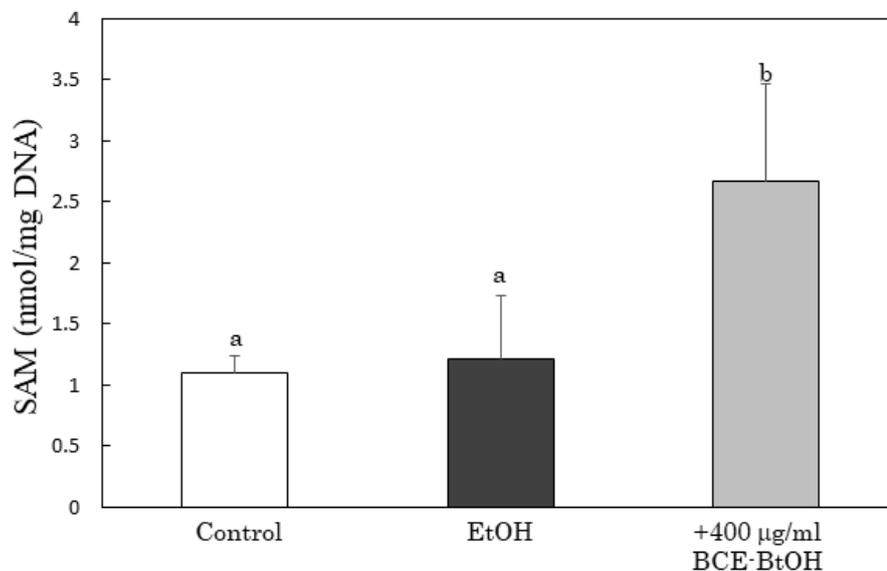


Fig. III-7. Effect of BCE-BtOH on intracellular SAM levels in ethanol-treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. SAM levels were measured as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean ± SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

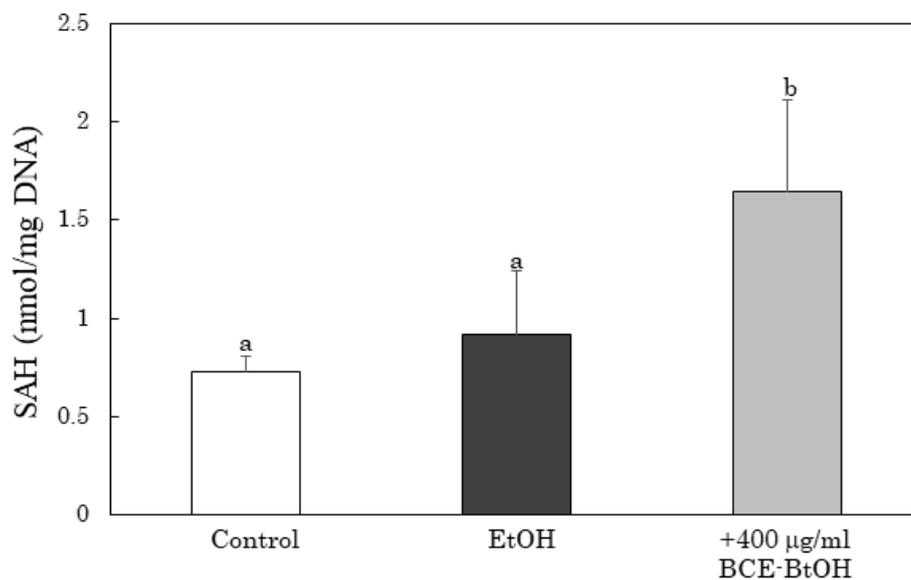


Fig. III-8. Effect of BCE-BtOH on intracellular SAH levels in ethanol-treated hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 100 mM ethanol with or without 400 µg/ml BCE-BtOH fraction. SAH levels were measured as described in the Materials and Methods. Data are presented as the mean ± SD of five experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

4. メチル基転移酵素におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

SAM の合成は、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (methionine adenosyltransferase: MAT) によって触媒される。MAT は発現部位や Km 値などの異なる 3 種類のアイソザイム (MAT1、MAT2、MAT3) が存在しており、中でも MAT2a は SIRT1 の制御下にあることが報告されている¹⁸⁰⁻¹⁸⁴。

BCE-BtOH 抽出画分によって細胞内 SAM 量の増加が確認されたことから、*Mat1a* および *Mat2a* mRNA 発現量について検討した。

4-a. *Mat1a* mRNA 発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

Mat1a mRNA 発現量は、すべての群間で有意な差は認められなかった (Fig. III-9)。

4-b. *Mat2a* mRNA 発現量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響

BCE-BtOH 抽出画分を添加することで、*Mat2a* mRNA 発現量は有意に増加した (Fig. III-10)。

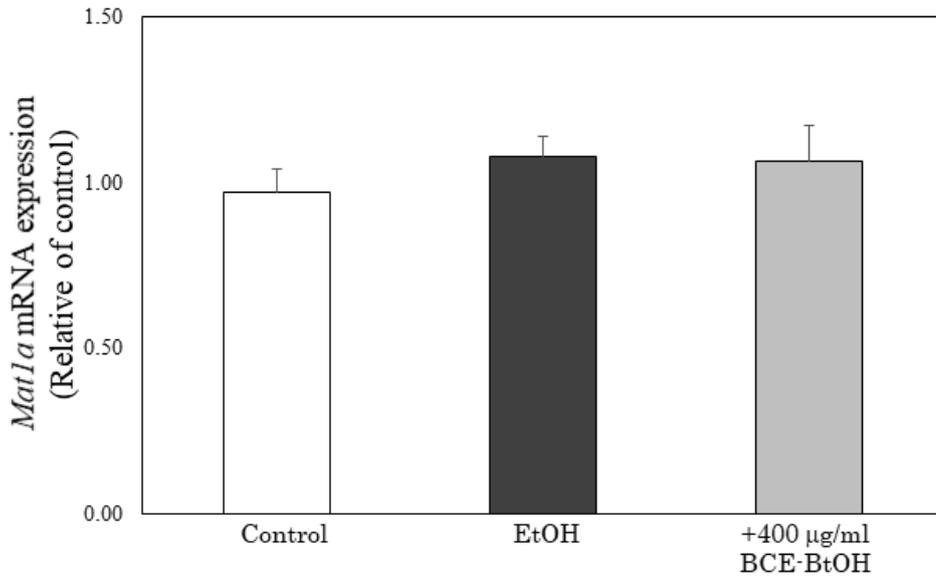


Fig. III-9. Effect of BCE-BtOH fraction on *Mat1a* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. *Mat1a* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean ± SD of four experiments.

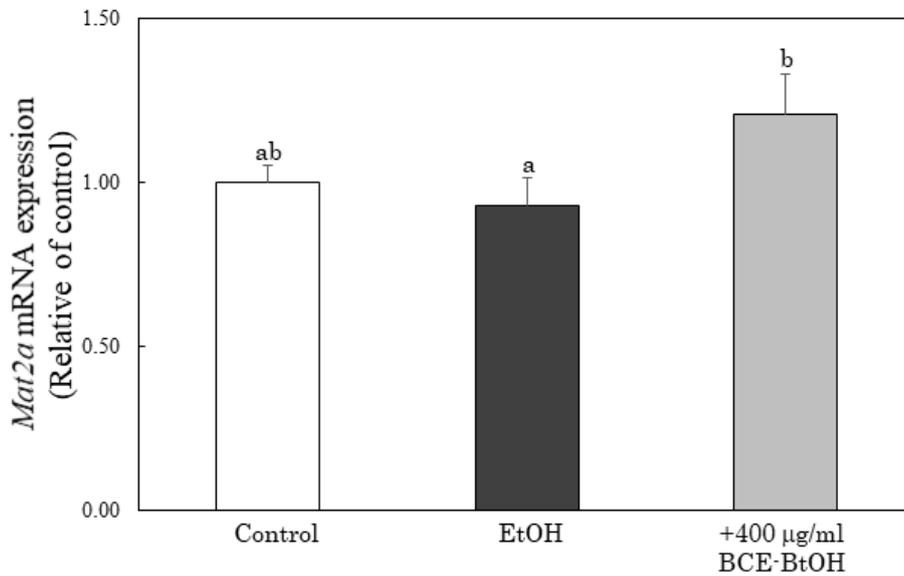


Fig. III-10. Effect of BCE-BtOH fraction on *Mat2a* mRNA expression.

Hepatocytes were incubated with 100 mM EtOH with or without 400 µg/ml BCE-BtOH. *Mat2a* mRNA expression was measured using real-time PCR analysis. Data are presented as the mean ± SD of 4 experiments. Values without a common letter are significantly different ($p < 0.01$).

第4節 考察

生活習慣病は以前まで遺伝的な素因によるところが大きいと考えられてきた。しかしながら近年、代謝関連疾患の多くは多因子疾患であり、遺伝的な素因に加え、栄養環境などの環境因子が複雑に相互作用することで発症することが明らかとなってきた。その一つの基盤として、エピジェネティックな修飾の変化による遺伝子発現の制御が注目されている。これは栄養環境によってエピジェネティックな修飾、つまり DNA のメチル化、ヒストン修飾等に変化が現れた結果、代謝関連遺伝子の発現の制御が行われることである。本研究で着目したヒストンは、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、スーモ化など、さまざまな翻訳後修飾を受け、それらすべてが遺伝子の発現や転写などに影響を与える¹⁸⁵⁻¹⁸⁷⁾。近年、環境・栄養因子によって異常なヒストンへの修飾が発生することでクロマチンの構造と機能が変化し、遺伝子の発現や転写に影響を与えること、またその結果、疾患の発症および進展を引き起こすことが明らかとなってきた¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾。

第2章において、BCE-BtOH 抽出画分によって発現が抑制されることが見出された PDE4b は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン (K9) がメチル化修飾を受けることで発現が制御される¹⁷¹⁻¹⁷³⁾。そこで本章では、BCE-BtOH 抽出画分による PDE4b の発現抑制のメカニズムを明らかにすることを目的とし、まずヒストン H3K9 修飾の変化に対する BCE-BtOH 抽出画分および EtOH の影響を調べた。その結果、H3K9 アセチル化レベルは先行研究と同様に EtOH の添加によって上昇したのに対し、BCE-BtOH 抽出画分はこの上昇をコントロールレベルにまで抑制した。一方、H3K9 メチル化レベルは、BCE-BtOH 抽出画分で処理した結果、EtOH 単独処理群と比較して有意に上昇した (Fig. III-1, 2)。PDE4b mRNA 発現レベルはヒストン H3K9 のメチル化によって制御されることから、BCE-BtOH 抽出画分による PDE4b 発現レベルの抑制は、H3K9 メチル化の上昇に伴って誘導された可能性が示唆された。

ヒストン H3K9 がメチル化修飾を受けるためにはヒストン脱アセチル化酵素による脱アセチル化反応が先行して発生する必要がある¹⁹¹⁾。そこで、H3K9 特異的 NAD⁺依存性脱アセチル化酵素である *Sirt1*^{175, 192)} mRNA 発現量について検討した。その結果、BCE-BtOH 抽出画分を添加することによって *Sirt1* の発現量が有意に増加することを確認した (Fig. III-3)。これらのことから、BCE-BtOH 抽出画分による *Sirt1* mRNA 発現量の増加によって H3K9 の脱アセチル化が促進され、H3K9 はメチル化修飾を受けやすい状態となっていることが考えられる。赤ワインに多く含まれるポリフェノールの一種のレスベラトロールは *Sirt1* 活性化剤

として知られており、様々な生理活性を有することがすでに知られている。先行研究において Adamkova らはレスベラトロールが Sirt1 発現を誘導し H3K9 メチル化レベルを上昇させること¹⁹³⁾、Zhao らは *PDE4b* mRNA の発現量を抑制させることを報告している^{194,195)}。これは本研究の BCE-BtOH 抽出画分によってヒストン H3K9 メチル化レベルが増加し、さらに *PDE4b* mRNA 発現量が減少するという結果と類似している。レスベラトロールについては *PDE4b* の発現を抑制するメカニズムについて調べられていないが、Sirt1 による H3K9 メチル化の促進が *PDE4b* 発現の抑制を誘導した可能性が考えられる。

次に、BCE-BtOH 抽出画分によって H3K9 のメチル化レベルが増加したことから H3K9 特異的メチル化酵素である *Suv39h1* および *G9a* の mRNA 発現量について検討した。その結果、これら両酵素の mRNA 発現量はすべての群において変化しなかった (Fig. III-4, 5)。これらことから、BCE-BtOH 抽出画分は H3K9 メチル化酵素の mRNA 発現量に関しては影響を与えないことが示唆された。しかし、前述した Sirt1 は、ヒストン脱アセチル化酵素でありながら、H3K9 メチル化を促進することも報告されている。SUV39h1 は通常その 266 番目のリジン残基がアセチル化されることで活性が抑制され、負に制御されている。この負の制御は Sirt1 による脱アセチル化を受けることで緩和され、活性化が促進する¹⁹⁶⁻²⁰¹⁾。また、SUV39h1 は遺伝子発現量を変化させることなく H3K9 メチル化を上昇させることが報告されている。これらことから、BCE-BtOH 抽出画分によって Sirt1 発現量が増加し、H3K9 の脱アセチル化およびメチル化酵素の活性化が促進され、H3K9 のメチル化レベルの上昇が誘導された可能性が考えられる。今後 BCE-BtOH 抽出画分による H3K9 のメチル化促進における SUV39h1 の活性化の関与の有無を明らかにすることは課題のひとつである。

続いて、H3K9 メチル化に関与する因子として、主要なメチル基供与体である SAM に着目した。SAM は体内で ATP に次いで多く存在する補酵素であり、メチオニン代謝経路においてメチオニンから合成される。メチル化反応では、SAM からメチル基が基質分子に転移されるとともに残渣骨格は SAH となる。そこで、メチル基供与体である SAM 量および SAH 量におよぼす BCE-BtOH 抽出画分の影響について検討した。その結果、BCE-BtOH 抽出画分によって細胞内 SAM 量および SAH 量が有意に増加した (Fig. III-7, 8)。また、SAM 量だけでなく SAH 量も同時に増加したことから、BCE-BtOH 抽出画分によってメチル基の供与が促進されたことが考えられ、H3K9 のメチル化レベルの増加にも、これら SAM 量および SAH 量増加の関与が示唆される。また、SAM 量の増加によって *PDE4b* の発現量が抑制される¹⁷¹⁾。

¹⁷²⁾ ことが報告されていることから、BCE-BtOH 抽出画分は、ヒストン H3K9 のメチル化レベルおよび細胞内 SAM 量を増加させることで、PDE4b 発現を制御していることが推察される。

SAM の合成は、MAT によって媒介されている。MAT には 3 種類のアイソザイムが存在しており、MAT2 はこの中で最も Km 値が低く SAM レベルが低下すると速やかに誘導され SAM を補充することが知られている²⁰²⁾。SAM は様々な反応に必要な不可欠な存在である一方、過剰に産生されると毒性を呈する。さらに 1 分子の SAM を合成するためには 1 分子の ATP が消費されるため、必要以上に SAM が合成されるとエネルギーのロスが生じてしまう。これに対して、五十嵐らは、MAT2 は他の 2 つのアイソザイム (MAT1、MAT3) に比べてエピゲノムに必要な量のみ SAM を産生することで SAM 量の増加を最小限に保つことが可能であること^{203,204)} を報告しており、これを MAT2 による SAM の地産地消モデルとして提唱している。このことから毒性を示さずに細胞にとって最適な SAM 量の合成のためには、MAT2 の存在が不可欠である。そこで本研究では、*Mat1a* および *Mat2a* の mRNA 発現量の変化について検討した。その結果、*Mat1a* mRNA 発現量はすべての群で変化が認められなかったのに対し、*Mat2a* mRNA 発現量は、BCE-BtOH 抽出画分によって有意に増加した (Fig. III-9, 10)。

以上の結果より、BCE-BtOH 抽出画分は *Mat2a* mRNA 発現量のみを増加させ、メチル基供与体である SAM の合成を必要量のみ促進することで、H3K9 メチル化レベルを上昇させることが示唆された。さらに、BCE-BtOH 抽出画分はヒストン脱アセチル化酵素である *Sirt1* 発現量を有意に増加させることで、H3K9 を脱アセチル化状態とする一方、メチル化基質の合成を担う *Mat2a* mRNA 発現量を亢進させて SAM 量および SHA 量を増加させた結果、H3K9 メチル化レベルが上昇した。さらにこのヒストン H3K9 メチル化レベルの増加に伴って PDE4b の発現量が調節されている可能性が示された。

本研究結果から、BCE-BtOH 抽出画分は、エピジェネティック修飾を誘導することによって、アルコール性肝細胞障害の予防効果を有することが明らかとなった。

総括

本研究では、黒にんじん抽出物によるアルコール性肝疾患予防効果とその作用メカニズムを解明するために、アルコール性肝障害モデルラットを用いた *in vivo* 実験系およびラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系で検討した。

その結果、*in vivo* 実験系において、黒にんじん抽出物を飼料として摂食させた場合、肝機能マーカーである血清逸脱酵素活性値が低下したこと、さらに、アルコール性肝疾患に特徴的な肝細胞障害、脂肪肝、肝線維化などが抑制したことから、黒にんじん抽出物はアルコール性肝疾患の予防効果を有することが示唆された。

さらに、*in vitro* 実験系において、BCE-BtOH 抽出画分はアルコール代謝関連酵素活性を調節することによってアルコール性肝細胞障害を予防することが明らかとなった。その作用メカニズムとして、ヒストン H3K9 のエピジェネティックな修飾を介して PDE4b の発現を抑制することで細胞内 cAMP 量が増加し、その結果、肝細胞障害の主となる原因酵素である CYP2E1 活性を転写レベルで制御することが明らかとなった (Fig. IV-1, 2)。

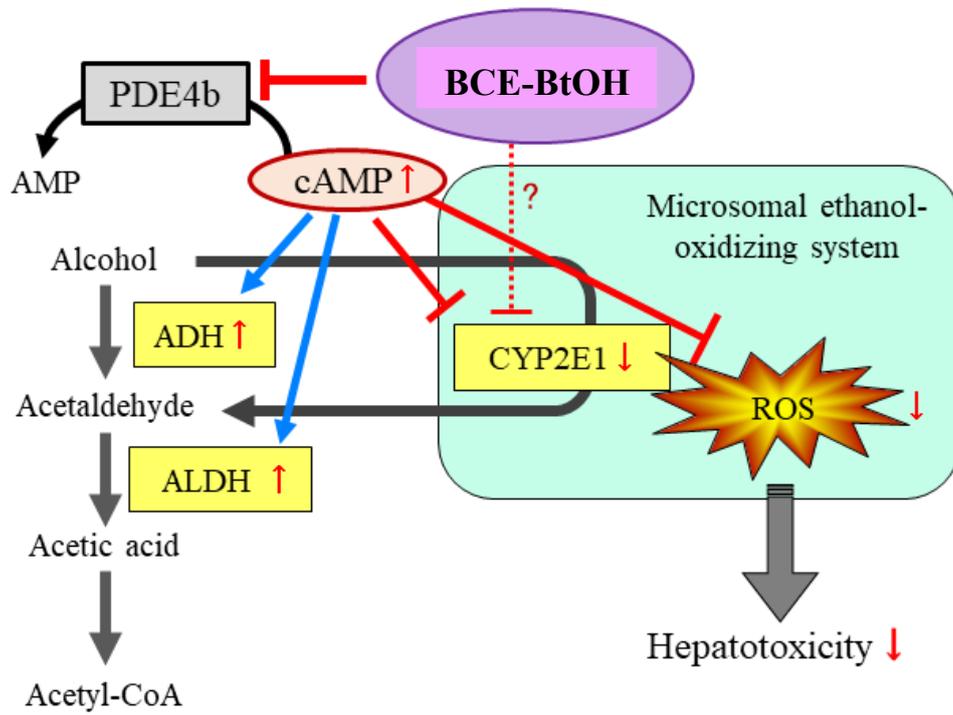


Fig. IV-1. The mechanism of preventive effect of BCE on EtOH-induced hepatotoxicity.

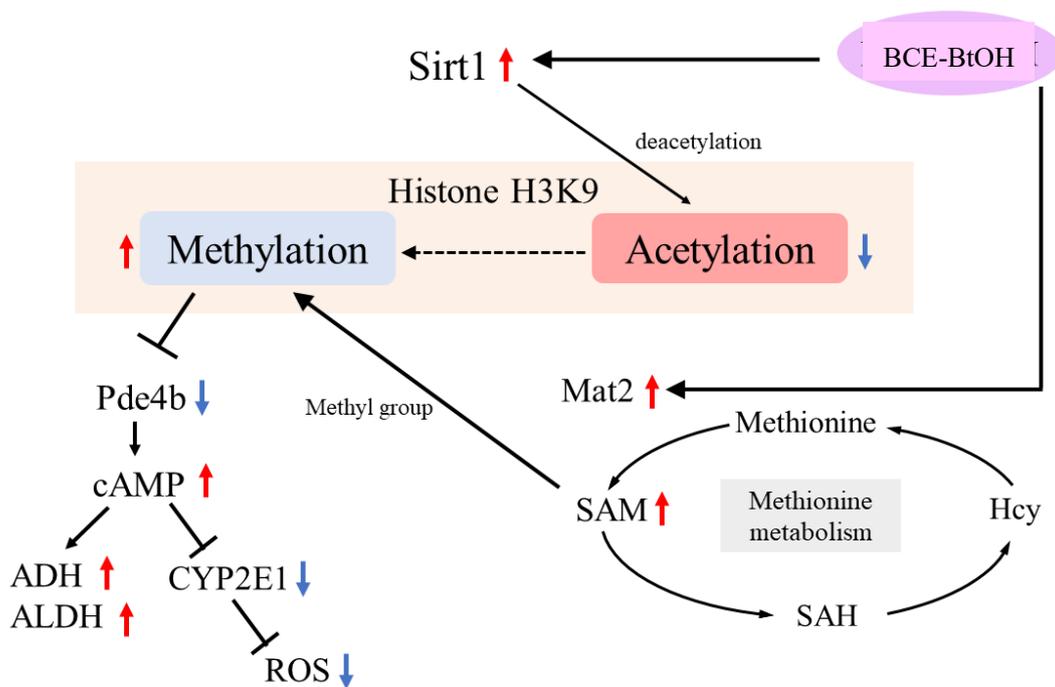


Fig. IV-2. The mechanism of epigenetic modification by BCE.

参考文献

- 1) 令和4年度版 高齢社会白書. 内閣府、2023年1月20日.
<https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/index-w.html>
- 2) 令和2(2020)年度 国民医療費の概況. 厚生労働省、2023年1月20日.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/20/index.html>
- 3) WHO : 2009 Global health risks : mortality and burden of disease attributable to selected major risks.
- 4) Global Status Report on Alcohol and Health 2018. WHO, 2018.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>.
- 5) Global Strategies to reduce the harmful use of alcohol 2010, WHO, 2010.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241599931>.
- 6) 2030 Agenda for Sustainable Development. United Nations, 2015.
https://www.unic.or.jp/activities/economic_social_development/sustainable_development/2030agenda/
- 7) McCullough AJ. Alcoholic liver disease. In: Schiff's Diseases of the Liver, 8th ed, (Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC eds) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA; pp. 941-971,1999.
- 8) 中村丁次. 第3版 栄養食事療法必携. 医歯薬出版株式会社、2005.
- 9) 後藤昌義、瀧下修一. 新しい臨床栄養学 改訂第6版. 南江堂、2014.
- 10) O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology* 51: 307-328, 2010.
- 11) 令和元(2019)年度 国民健康・栄養調査、厚生労働省、2023年1月20日.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryohi/kenkou/eiyohi/r1-houkoku_00002.html.
- 12) Levy RE, Catana AM, Durbin-Johnson B, et al. Ethnic differences in presentation and severity of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 39: 566-574, 2015.

- 13) 高後 裕. 我が国における非 B 非 C 肝硬変の実態調査 2011. 響文社、2012.
- 14) 令和 4(2022)年度 酒のしおり. 国税庁、2023 年 1 月 20 日.
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2022/index.htm>.
- 15) Tamura A, Sasaki M, Yamashita Y, et al. Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. *J Func Foods* 5: 1714-1723, 2013.
- 16) Takahashi M, Satake N, Yamashita H, et al. *Ecklonia cava* polyphenol protects the liver against ethanol-induced injury in rats. *Biochem Biophys Acta* 1820: 978-988, 2012.
- 17) Yamashita H, Goto M, Matsui-Yuasa I, et al. *Ecklonia cava* polyphenol has a protective effect against ethanol-induced liver injury in a cyclic AMP-dependent manner. *Marin Drugs* 13: 3877-3891, 2015.
- 18) Yoshikawa E, Matsui-Yuasa I, Huang X, et al. *Mallotus furetianus* extract protects against ethanol-induced liver injury via the activation of the cAMP-PKA pathway. *Food Sci Nutr* 10: 3936-3946, 2020.
- 19) Montilla EC, Arzaba MR, Hillebrand S, et al. Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze. *J Agric Food Chem* 59: 3385-3390, 2011.
- 20) Kammerer D, Carie R, Schieber A. Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 2407-2412, 2003.
- 21) Akhtar S, Rauf A, Imran M, et al. Black carrot (*Daucus carota* L.), dietary and health promoting perspectives of its polyphenols: A review. *Trends Food Sci Technol* 66: 36-47, 2017.
- 22) Que F, Hou X-L, Wang G-L. Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the *Apiaceae* family. *Horti Res* 669, 2019; doi.org/10.1038/s41438-019-0150-6.
- 23) Simpton KJ, Peters TJ. Animal models of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 7: 609-625, 1993.

- 24) Nanji AA, French SW. Animal models of alcoholic liver disease focus on the intragastric feeding models. *Alcohol Res Health*. 27: 325-330, 2003.
- 25) Lieber CS, Decarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration. *Alcohol*. 24: 197-211, 1989.
- 26) French SW. Intragastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci*. 8: 20-27, 2001.
- 27) Okada Y, Tuzuki Y, Miura S, et al. Pressure loading and ethanol exposure differentially modulate rat hepatic stellate cell activation. *J Cell Physiol*. 215: 472-480, 2008.
- 28) Tsukamoto H, Mkrtychyan H, Dynnyk A. Intragastric ethanol infusion model in rodents. *Methods Mol Biol*. 447: 33-48, 2008.
- 29) Tsukamoto H, Horne W, Brittenham GM, et al. Experimental liver-cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest*. 96: 620-630, 1995.
- 30) Karaa A, Thompson KJ, Schrum LW, et al. S-adenosyl-L-methionine attenuates oxidative stress and hepatic stellate cell activation in an ethanol-LPS-induced fibrotic rat model. *Shock*. 30:197-205, 2008.
- 31) Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, French SW. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high-fat diet. *Hepatology*. 6: 814-822, 1986.
- 32) Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*. 43: 139-154, 1989.
- 33) Kojima-Yuasa A, Hirauchi E, Sawada T, et al. Extract of traditional pickling melon prevents ethanol-induced liver injury in rats. *Int. J. Food Nutr. Sci*. 206: 56-66, 2017.
- 34) Erman F, Balkan J, Uysal M, et al. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids*. 27: 199-20, 2004.
- 35) 大阪市立大学動物実験管理規程／The Regulations on Animal Experiments in Osaka City University 平成 19 年 4 月 1 日施行.

- 36) 高橋清之, 岩信造, 佐々木政臣, 若狭研一, 戸田好信. 病理組織染色ハンドブック. 医学書院, 1999.
- 37) Jiang Z, You DY, Wu J, et al. Monitoring of serum markers for fibrosis during CCl₄-induced liver damage. Effects of antifibrotic agents. *Hepatology*. 16: 282-289, 1992.
- 38) Fu Y, Zheng S, Chen AP, et al. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol*. 73: 399-409, 2008.
- 39) Adaramoye OA, Awogbindin I, Okusaga O. Effect of Kolaviron, a Biflavonoid Complex from *Garcinia kola* Seeds, on Ethanol-Induced Oxidative Stress in Liver of Adult Wister rats. *Journal of Medicinal Food*. 12: 584-590, 2009.
- 40) Cohen JA, Kaplan MM. The SGOT/SGPT ratio-an indication of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci*. 1979; 24 : 835-838.
- 41) Comporti M, Signorini C, Beatrice A, et al. ethanol-induced oxidative stress : basic knowledge. *Genes nutr*. 5: 101-109, 2010.
- 42) Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease : pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroentrol*. 141: 1572-1585, 2011.
- 43) Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 9: 1-35, 2005.
- 44) Ronis MJ, Huang J, Badger TM, et al. Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 264: 944-950, 1993.
- 45) Badger TM, Huang J, Lumpkin CK, et al. Induction of cytochrome P450 2E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP2E1 gene when blood alcohol concentrations are high. *Biochem Biophys Res Commun*. 190: 780-785, 1993.
- 46) Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, et al. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Arch Biochem Biophys*. 271:270-283, 1989.

- 47) Laethem RM, Balazy M, Falck J, et al. Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J. Biol. Chem.* 268: 12912–12918, 1993.
- 48) Lu Y, Zhuge J, Cederbaum AI, et al. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *Hepatology.* 47: 1483-1494, 2008.
- 49) Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 83: 519-548, 2009.
- 50) Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta.* 257: 59-84, 1997.
- 51) Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, et al. The intralobular distribution of ethanol-inducible P4502 E1 in rat and human liver. *Hepatology.* 10: 437-446, 1989.
- 52) Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology.* 124: 778-790, 2003.
- 53) Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 43: 63-74, 2006.
- 54) Henzel K, Thorborg C, Leuschner U, et al. Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1644: 37-45, 2004.
- 55) Cederbaum AI, Wu D, Mari M, et al CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med.* 31: 1539-1543, 2001.
- 56) 山本雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司. イラストで徹底伝達するシグナル伝達キーワード集. 株式会社羊土社, 2012.
- 57) 上代淑人, 佐藤孝哉. シグナル伝達 第2版 生命システムの情報ネットワーク. 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2011.
- 58) Gold MG, Gonen T, Scott JD. Local cAMP signaling in disease at a glance. *J Cell Sci.* 126: 4537-4543, 2013.

- 59) Gobejishvili L, Barve S, Barve JS, et al. Chronic ethanol-mediated decrease in cAMP primes macrophages to enhanced LPS inducible NF-kappaB activity and TNF expression: relevance to alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291: 681-688, 2006.
- 60) Nagy LE, DeSilva SE. Adenosine A1 receptors mediate chronic ethanol-induced increases in receptor-stimulated cyclic AMP in cultured hepatocytes. *Biochem J.* 304: 205-210, 1994.
- 61) Nagy LE, DeSilva SE. Ethanol increases receptor-dependent cyclic AMP production in cultured hepatocytes by decreasing G(i)-mediated inhibition. *Biochem J.* 286: 681-686, 1992.
- 62) Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Method cell biol.* 13: 28-83, 1976.
- 63) Zhang SZ, Lipsky MM, Trump BF, et al. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes, *Cell Biol Toxicol.* 6: 219-234, 1990.
- 64) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 119: 203-210, 1989.
- 65) Cook JA, Mitchell B. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem.* 179: 1-7, 1989.
- 66) Royall A, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial Cells. *Arch Biochem Biophys.* 302: 48-55, 1993.
- 67) Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: 1005-1028, 2000.
- 68) Sapone A, Affatato A, Canistro D, et al. Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res.* 19: 97-80, 2003.

- 69) Duescher RJ, Elfarra AA. Determination of p-nitrophenol hydroxylase activity of rat liver microsomes by high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 233: 212-215, 1993.
- 70) Mishin VM, Koivisto T Lieber CS. The determination of cytochrome P450E1-dependent p-nitrophenol hydroxylation by high-liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*. 233: 212-215, 1996.
- 71) Pathuri IP, Reitberger IE, Proels K, et al. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *J Exp Bot*. 62: 3449-3457, 2011.
- 72) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7: 248-254, 1976.
- 73) Read SM, Northcote DH. Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue-G Dye-Binding Assay for Protein. *Anal Biochem*. 116: 53-64, 1981.
- 74) Henzel K, Thorborg C, Hofmann M, et al. Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1644: 37-45, 2004.
- 75) Baker RC, Kramer RE. Cytotoxicity of short-chain alcohols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 127-150, 1999.
- 76) 大柳善彦. 活性酸素と病気. 株式会社化学同人. 1994.
- 77) Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 49: 1603-1616, 2010.
- 78) Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17: 24-38, 2003.
- 79) Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 18: 655-673, 2000.
- 80) Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*. 52: 2015-2021, 2007.

- 81) Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 14: 27-38, 2009.
- 82) Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 806358, 2015.
- 83) Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 10: 18-25, 2004.
- 84) Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*. 27: 277-284, 2003.
- 85) Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes *Hepatology* 28: 1318-1326, 1998.
- 86) Masayuki A, Hiromasa I. Role of mitochondria in alcohol liver injury. *Free Radic Biol Med*. 32: 487-491, 2002.
- 87) Wu KC, Liu J, Klaassen CD. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 262: 321-329, 2012.
- 88) López VR, Razzeto GS, Giménez MS, et al. Antioxidant properties of *Amaranthus hypochondriacus* seeds and their effect on the liver of alcohol-treated rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 66: 157-162, 2011.
- 89) Peng HC, Chen JR, Chen YL, et al. beta-Carotene exhibits antioxidant and anti-apoptotic properties to prevent ethanol-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytother Res*. 24: S183-S189, 2010.
- 90) Adaramoye OA, Aluko A, Oyagbemi AA. *Cnidioscolus aconitifolius* leaf extract protects against hepatic damage induced by chronic ethanol administration in Wistar rats. *Alcohol Alcohol*. 46: 451-458, 2011.

- 91) Wu D, Wang X, Zhou R, et al. CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 402: 116-122, 2010.
- 92) Wu D, Wang X, Zhou R, et al. Alcohol steatosis and cytotoxicity : the role of cytochrome P4502E1 and autophagy. *Free Radic Biol Med.* 53: 1346-1357, 2012.
- 93) Zhang J, Xue J, Wang H, et al. Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress. *Phytother Res.* 25: 638-643, 2011.
- 94) Szuster-Ciesielska A, Mizerska-Dudka M, Daniluk J, et al. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress. *J Gastroenterol.* 48: 222-237, 2013.
- 95) Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis : a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology.* 43: 872-878, 2006.
- 96) Bièche I, Narjoz C, Beaune P, et al. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics.* 17: 731-742, 2007.
- 97) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 270: 414-423, 1994.
- 98) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem.* 110: 559-65, 1991.
- 99) Wynalda MA, Hauer MJ, Wienkers LC. Oxidation of the novel oxazolidinone antibiotic linezolid in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 28: 1014-1017, 2000.
- 100) Kurose I, Higuchi H, Kato S, et al. Oxidative stress on mitochondria and cell membrane of cultured rat hepatocytes and perfused liver exposed to ethanol. *Gastroenterol.* 112: 1331-1343, 1997.
- 101) Kono H, Rusyn I, Gabele E, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in

- alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest.* 106: 867-72, 2000.
- 102) Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 83: 519-548, 2009.
- 103) Groot HD. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-gastroenterology.* 1: 328-332, 1994.
- 104) Toykuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 49: 91-102, 1999.
- 105) Shukla U, Tumma N, Gratsch T, et al. Insights into insulin-mediated regulation of CYP2E1: miR-132/-212 targeting of CYP2E1 and role of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt (protein kinase B), mammalian target of rapamycin signaling in regulating miR-132/-212 and miR-122/-181a expression in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 41: 1769-1777, 2013.
- 106) Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 91: 14-21, 1991.
- 107) Forsyth CB, Voigt RM, Keshavarzian A. Intestinal CYP2E1: A mediator of alcohol-induced gut leakiness. *Redox Biol.* 3: 40-46, 2014.
- 108) Cederbaum AI, Lu Y, Wang X, et al. Synergistic Toxic Interactions Between CYP2E1, LPS/TNF α , and JNK/p38 MAP Kinase and Their Implications in Alcohol-Induced Liver Injury. *Adv Exp Med Biol.* 815: 145-172, 2015.
- 109) Wang YQ, Guan S, Acharya P, et al. Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P4502E1: identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. *J Biochem.* 286: 9443-9456, 2011.
- 110) Lee HI, Mcgregor RA, Choi MS, et al. Low doses of curcumin protect alcohol-induced liver damage by modulation of the alcohol metabolic pathway, CYP2E1 and AMPK. *Life Sci.* 93: 693-699, 2013.
- 111) Zhou Z, Wang L, Song Z, et al. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. *Am J Pathol.* 166: 1681-1690, 2005.
- 112) Abraham J, Balbo S, Crabb D, et al. Alcohol metabolism in human cells causes DNA damage and activates the Fanconi anemia-breast cancer susceptibility (FA-BRCA) DNA damage response network. *Alcohol Clin Exp Res.* 35: 2113-2120, 2011.

- 113) Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, et al. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology*. 23: 872-880, 1996.
- 114) Swaminathan K, Clemens DL, Dey A. Inhibition of CYP2E1 leads to decreased malondialdehyde-acetaldehyde adduct formation in VL-17A cells under chronic alcohol exposure. *Life Sci*. 92: 325-336, 2013.
- 115) Patel VB, Worrall S, Emery PW, et al. Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. *Alcohol Alcohol*. 40: 485-493, 2005.
- 116) Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med*. 32: 303-308, 2002.
- 117) Labonne BE, Gutiérrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE, et al. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biol Toxicol*. 25: 599-609, 2009.
- 118) Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Sario AD, et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 33: 1130-1140, 2001.
- 119) Agarwal DP, Goedde HW. Biochemical aspects of alcoholism. In Alcohol metabolism, Alcohol Intolerance, and Alcoholism. *Biochem and Pharm Approaches*. 67-95, 1990.
- 120) Crabb DW, Stewart MJ, Xiao Q. Hormonal and chemical influences on the expression of class 2 aldehyde dehydrogenases in rat H4IIEC3 and human HuH7 hepatoma cells. *Alcoholism: Clin Exp Res*. 19: 1414-1419, 1995.
- 121) Diehl AM, Yang SQ, Cote P, Wand GS. Chronic ethanol consumption disturbs G-protein expression and inhibits cyclic AMP-dependent signaling in regenerating rat liver. *Hepatology* 16: 1212-1219, 1992.
- 122) Gobejishvili L, Barve S, Joshi-Barve S, et al. Chronic ethanol-mediated decrease in cAMP primes macrophages to enhanced LPS-inducible NF-kappaB activity and TNF expression : relevance to alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 291; G681-688, 2006.
- 123) Nagy LE. Role of adenosine A1 receptors in inhibition of receptor-stimulated cyclic AMP

- production by ethanol in hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 48: 2091-2096, 1994.
- 124) Oesch-Bartlomowicz B, Padma PR, Becker R, et al. Differential modulation of CYP2E1 activity by cAMP dependent protein kinase upon Ser 129 replacement. *Exp. Cell Res.* 242: 294-302, 1998.
 - 125) Potter JJ, Macdougald OA, Mezey E. Regulation of the rat alcohol dehydrogenase by cAMP in primary hepatocyte culture. *Arch Biochem Biophys.* 321: 329-335, 1995.
 - 126) Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Substrate-, hormone-, and cAMP regulated cytochrome P450 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 3225-3229, 1990.
 - 127) Yang CS, Yoo JS, Hong JY. Cytochrome P450IIE1: Roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev.* 221: 147-159, 1990.
 - 128) Koop D, Tierney DJ. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *Bioessays.* 12: 429-435, 1990.
 - 129) Freeman JE, Wolf R. Evidence against a role for serine 129 in determining murine cytochrome P450 Cyp2e-1 protein levels. *Biochemistry.* 33: 13963-13966, 1994.
 - 130) Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Ligand dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 150: 436-443, 1988.
 - 131) Johansson I, Eliasson E, Ingelman-Sundberg M. Hormone controlled phosphorylation and degradation of CYP2B1 and CYP2E1 in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 174: 37-42, 1991.
 - 132) Yang MX, Cederbaum AI. Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. *Arch Biochem Biophys.* 341: 25-33, 1997.
 - 133) Roberts BJ. Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J Biol Chem.* 272: 9771-9778, 1997.
 - 134) Potter JJ, Yang VW, Mezey E. Regulation of the rat class I alcohol dehydrogenase gene by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 191: 1040-1045, 1993.

- 135) He L, Ronis MJ, Badger TM. Ethanol induction of class I alcohol dehydrogenase expression in the rat occurs through alterations in CCAAT/enhancer binding proteins beta and gamma. *J Biol Chem* 277: 43572-43577, 2002.
- 136) Banridda W, McClain C, Barve S, et al. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. *Cell signal*. 49: 105-115, 2018.
- 137) Bracy AF, George SB. PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J. Cardiovasc.* 5: 8, 2018.
- 138) Walter R, Wahlang B, Wang Y, et al. Phosphodiesterase 4 Inhibition as a Therapeutic Target for Alcoholic Liver Disease: From Bedside to Bench. *Hepatology*. 70: 1958-1971, 2019.
- 139) Enno K. Protein-protein interactions of PDE4 family members - Functions, interactions and therapeutic value. *Cell signal*. 28: 713-718, 2016.
- 140) Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*. 76: 481-511, 2007.
- 141) Ariga M, Neitzert B, Nakae S, et al. Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation. *J Immunol*. 173: 7531-7538, 2004.
- 142) Gobejishvili L, Barve S, Breitkopf-Heinlein K, et al. Rolipram attenuates bile duct ligation-induced liver injury in rats: a potential pathogenic role of PDE4. *J pharmacol exp ther*. 347: 80-90, 2013.
- 143) Diana VA, Barker DF, Zhang JW, et al. Dysregulation of hepatic cAMP levels via altered Pde4b expression plays a critical role in alcohol-induced steatosis. *J pathol*. 240: 96-107, 2016.
- 144) Gobejishvili L, Barve S, Joshi-Barve S, et al. Enhanced PDE4B expression augments LPS-inducible TNF expression in ethanol-primed monocytes: relevance to alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295: 18-24, 2017.
- 145) Weinhold B. Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect*. 114: 160-167, 2006.

- 146) Tchurikov NA. Molecular mechanisms of epigenetics. *Biochemistry (Mosc)*. 70: 406-423, 2005.
- 147) Azam M, Ali MA. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*. 11: 246-258, 2016.
- 148) Pal S, Tyler K. Epigenetics and aging. *Sci Adv*. e1600584, 2016.
- 149) Haddad RA, Karnib N, Assaad RA, et al. Epigenetic changes in diabetes. *Neurosci Lett*. 625: 64-69, 2016.
- 150) Shanmugam MK, Sethi G. Role of epigenetics in inflammation-associated diseases. *Subcell Biochem*. 61: 627-657, 2013.
- 151) Stanzione R, Cotugno M, Bianchi F, et al. Pathogenesis of Ischemic Stroke: Role of Epigenetic Mechanisms. *Genes (Basel)*. 11: 89, 2020.
- 152) Waddington CH. The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology. *London George Allen & Unwin, Ltd.*. 1957.
- 153) Szutorisz H, Hurd YL. Epigenetic effects of cannabis exposure. *Biol Psychiatry*. 79: 586-594, 2016.
- 154) McEwen BS. Allostasis and the epigenetics of brain and body health over the life course: The brain on stress. *JAMA Psychiatry*. 74: 551-552, 2017.
- 155) Hamamoto R, Komatsu M, Takasawa K, et al. Epigenetics analysis and integrated analysis of multiomics data, including epigenetic data, using artificial intelligence in the era of precision medicine. *Biomolecules*. 30: 103-113, 2019.
- 156) Beumer JH, Tawbi H. Role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment. *Curr Clin Pharmacol*. 8: 196-208, 2010.
- 157) Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol*. 12: 579-589, 2012.

- 158) Moghe A, Barve SJ, Ghara S, et al. Histone modifications and alcohol-induced liver disease: Are altered nutrients the missing link? *Gastroenterol.* 17: 2465-2472, 2011.
- 159) Diehl EJ, Laufer BI, Singh SM. Changes to histone modifications following prenatal alcohol exposure: An emerging picture. *Alcohol.* 60: 41-52, 2017.
- 160) Mandrekar P. Targeting Epigenetic Mechanisms to Alleviate Alcoholic Steatosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 9: 713-714, 2020.
- 161) Zakharu S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol.* 35: 6-16, 2013.
- 162) James TT, Aroor AR, Lim RW, et al. Histone H3 phosphorylation (Ser10, Ser28) and phosphoacetylation (K9S10) are differentially associated with gene expression in liver of rats treated in vivo with acute ethanol. *J Pharmacol Exp Ther.* 340: 237-247, 2012.
- 163) Shukla SD, Restrepo R, Philip F, et al. Different mechanisms for histone acetylation by ethanol and its metabolite acetate in rat primary hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 354: 18-23, 2015.
- 164) Park PH, Lim RW, Shukla SD. Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289: 1124-1136, 2005.
- 165) Tian W, Xu Y. Decoding liver injury: A regulatory role for histone modifications. *Int J Biochem Cell Biol.* 67: 188-193, 2015.
- 166) Choudhury M, Park PH, Jackson D, et al. Evidence for the role of oxidative stress in the acetylation of histone H3 by ethanol in rat hepatocytes. *Alcohol.* 44: 531-540, 2010
- 167) Bhadra M, Bhadra U, Jackson DE, et al. Distinct methylation patterns in histone H3 at Lys-4 and Lys-9 correlate with up- & down-regulation of genes by ethanol in hepatocytes. *Life Sci.* 81: 979-987, 2007.
- 168) Park P, Miller R, Shukla SD. Acetylation of histone H3 at lysine 9 by ethanol in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 36: 501-504, 2003.

- 169) Peters A, Mermoud JE, Carroll DO, et al. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet.* 30: 77-80, 2002.
- 170) Lachner M, Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci.* 116: 2117-2124, 2003.
- 171) Gobejishvili L, Avila DV, Barker DF, et al. S-adenosylmethionine decreases lipopolysaccharide-induced phosphodiesterase 4B2 and attenuates tumor necrosis factor expression via cAMP/protein kinase A pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 337: 433-443, 2011.
- 172) Kharbanda KK. Alcoholic liver disease and methionine metabolism. *Semin Liver Dis.* 2:155-165,2009
- 173) Nail A, Dalpatraj N, Thakur N. Global Gene Expression Regulation Mediated by TGF β Through H3K9me3 Mark. *Cancer Inform.* 30: 21, 2022.
- 174) Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol.* 8: 57-64, 2008.
- 175) Katerina A, Jan N, et al. SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *J Anim Sci Biotechnol.* 83: 40104-40117, 2017.
- 176) Costantino S, Paneni F, Viridis A, et al. Interplay among H3K9-editing enzymes SUV39H1, JMJD2C and SRC-1 drives p66Shc transcription and vascular oxidative stress in obesity. *Eur Heart J.* 40: 383-391, 2019.
- 177) Yeung W, Amour JB, Hatano Y, et al. Histone H3K9 Methyltransferase G9a in Oocytes Is Essential for Preimplantation Development but Dispensable for CG Methylation Protection. *Cell Rep.* 27: 282-293. 2019.
- 178) Alam M, Shima H, Matsuo Y, et al. mTORC1-independent translation control in mammalian cells by methionine adenosyltransferase 2A and S-adenosylmethionine. *J Biol Chem.* 298: 102084, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102084>.

- 179) Burton K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology*. 12: 163-166, 1968.
- 180) Tang S, Fang Y, Huang G, et al. Methionine metabolism is essential for SIRT1-regulated mouse embryonic stem cell maintenance and embryonic development. *EMBO J*. 36: 3175-3193, 2017.
- 181) Igarashi K, Katoh Y. Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell Biochem*. 61: 105-118, 2013.
- 182) Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, et al. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N 6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. 21: 3354-3363, 2017.
- 183) Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 23: 73-77, 2008.
- 184) Kera Y, Katoh Y, Ogya M, et al. Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J Biol Chem*. 288: 13592-13601, 2013.
- 185) Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403: 41-45, 2000.
- 186) Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet*. 32: 42-56, 2016.
- 187) Zentner G, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*. 20: 259-266, 2013.
- 188) Casey G. Genetics, epigenetics and disease. *Nurs N Z*. 22: 20-24, 2016.
- 189) Nasir A, Bullo MM, Ahmed Z, et al. Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 60: 1375-1387, 2020.
- 190) Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Adv Nutr*. 10: 4-9, 2019.

- 191) Park JA, Kim AJ, Kang Y, et al. Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression. *Mol Cells*. 4: 343-349, 2011.
- 192) Ren R, Wang Z, Wu M, et al. Emerging Roles of SIRT1 in Alcoholic Liver Disease. *Int J Biol Sci*. 16: 3174-3183, 2020.
- 193) Adamkova K, Yi YJ, Petr J, et al. SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *J Anim Sci Biotechnol*. 8: 83, 2017.
- 194) Zhao P, Chen SK, Cai YH, et al. The molecular basis for the inhibition of phosphodiesterase-4D by three natural resveratrol analogs. Isolation, molecular docking, molecular dynamics simulations, binding free energy, and bioassay. *Biochim Biophys Acta*. 1834: 2089-2096, 2013.
- 195) Yu Y, Wang J, Huang X. The anti-depressant effects of a novel PDE4 inhibitor derived from resveratrol. *Pharm Biol*. 59: 418-423, 2021.
- 196) Vaquero A, Scher M, Bromage H, et al. SIRT1 regulates the histone methyltransferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*. 450: 440-444, 2007.
- 197) Yang G, Weng X, Zhao Y, et al. The histone H3K9 methyltransferase SUV39H links SIRT1 repression to myocardial infarction. *Nat Commun*. 8: 14941, 2017.
- 198) Stewart MD, Li J, Wong J. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*. 25: 2525-2538, 2005.
- 199) Rajan PK, Udoh UA, Sanabria JD, et al. The Role of Histone Acetylation-/Methylation-Mediated Apoptotic Gene Regulation in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 21: 8894, 2020.
- 200) Wang S, Wang C, Turdi S, et al. ALDH2 protects against high fat diet-induced obesity cardiomyopathy and defective autophagy: role of CaM kinase II, histone H3K9 methyltransferase SUV39H, Sirt1, and PGC-1 α deacetylation. *Int J Obes*. 42: 1073-1087, 2018.
- 201) Rodgers JT, Lerin C, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a

complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 434: 113-118, 2005.

- 202) Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, et al. Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell*. 41: 554-566, 2011.
- 203) Igarashi K, Katoh Y. Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell Biochem*. 61: 105-118, 2013.
- 204) Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, et al. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N 6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. 21: 3354-3363, 2017.

謝辞

本研究は、大阪市立大学院 生活科学研究科 食物栄養学分野 栄養機能科学研究室にて行われたものです。本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

本研究を遂行するにあたり、豊富な知識と経験の下、熱心なご指導と適切なお助言をいただき、また日々のディスカッションを通して、ご指導を賜りました 湯浅（小島）明子 准教授に深く感謝致しますとともに、御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、主査および副査をご担当いただきました大阪市立大学大学院 生活科学研究科・羽生 大記 教授、増田 俊哉 教授、由田 克士 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究における考え方や進め方、研究者としての姿勢をご教授いただきました 湯浅 勲 名誉教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、様々なご指導、ご鞭撻を賜りました。青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科 乗鞍 敏夫 准教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究にて使用いたしました黒にんじんをご提供くださいました甲南化工株式会社様にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、様々な面で御協力いただきました大阪市立大学生活科学部栄養機能科学研究室の皆様、卒業生の皆様に深く感謝いたします。