

学位論文

Doctor's Thesis

グルタミン酸システインリガーゼ調節サブユニット(GCLM)遺伝子の
5'上流非翻訳領域の遺伝子多型は心筋梗塞と関連している

(Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human Glutamate-Cysteine
Ligase Modifier Subunit Gene is Associated With Myocardial Infarction)

中村 伸一

Shinichi Nakamura

指導教官

小川 久雄 教授

熊本大学大学院医学研究科循環器内科学

泰江 弘文 前教授

熊本大学大学院医学研究科循環器内科学

2003年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名: グルタミン酸システインリガーゼ調節サブユニット(GCLM)
遺伝子の5'上流非翻訳領域の遺伝子多型は心筋梗塞と関連している

(Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human Glutamate-Cysteine
Ligase Modifier Subunit Gene is Associated With Myocardial Infarction)

著者名: 中村 伸一

Shinichi Nakamura

指導教官名: 内科学系循環器内科学講座教授

小川 久雄

内科学系循環器内科学講座前教授

泰江 弘文

審査委員名:

代謝内科学担当教授 荒木 栄一

細胞識別学担当教授 栗原 裕基

外科学第一担当教授 川筋 道雄

生化学第二担当教授 堀内 正公

Table of Contents / 目次

1)	要旨	5
2)	発表論文リスト	9
3)	謝辞	10
4)	略語一覧	11
5)	研究の背景と目的	13
5)-1	酸化ストレスと動脈硬化	13
5)-2	グルタチオン	14
5)-3	グルタミン酸システインリガーゼ (GCL)	16
5)-4	研究の目的	18
6)	実験方法	19
6)-1	研究対象	19
6)-2	プロモーター領域における遺伝子多型の検出	20
6)-3	遺伝子多型の解析	20
6)-4	細胞培養	22
6)-5	組み換えプラスミドの作製	22
6)-6	Luciferase Reporter Gene Assay による プロモーター活性の測定	23
6)-7	ヒト単球の分離培養	24

6)-8	培養ヒト単球ーマクロファージにおける GCLM mRNA 発現	25
6)-9	ゲルシフトアッセイ(EMSA)	26
6)-10	ヒト血漿中 GSH レベルの測定	27
6)-11	試薬	28
6)-12	統計学的解析	28
7)	実験結果	30
7)-1	遺伝子多型の検出	30
7)-2	GCLM 遺伝子のプロモーター活性 に -588T 遺伝子多型が及ぼす影響	31
7)-3	培養ヒト単球における GCLM mRNA 発現に -588T 遺伝子多型が及ぼす影響	32
7)-4	-588T 遺伝子多型が EMSA に与える影響	33
7)-5	ヒト血漿中 GSH レベル	33
8)	考察	34
9)	結語	39
	表	40
	図	47
10)	参考文献	61

1) 要旨

【目的】グルタミン酸システインリガーゼ (glutamate-cysteine ligase, GCL) は、血管細胞を含めた多くの哺乳動物細胞での抗酸化防御機構において、欠くことのできない役割を果たすグルタチオン (GSH) 合成の律速酵素である。酸化刺激により GCL 遺伝子の転写活性は亢進し、酸化ストレスによる atherothrombogenic molecule 発現に対する防御機能を有するグルタチオン合成を促進する。酸化ストレスが病因の一つであると考えられる冠動脈疾患と、GCL 遺伝子における遺伝子多型に関連があるのではないかという仮説を検討した。

【方法と結果】 GCL 調節サブユニット (GCLM) 遺伝子の 5' 上流非翻訳領域の遺伝子多型を心筋梗塞あるいは対照患者において調べた結果、-588C/T と -23G/T の 2 つの完全にリンクした遺伝子多型を発見した。Luciferase reporter gene assay により遺伝子多型がプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。その結果、2 つの遺伝子多型のうち、-588C/T 遺伝子多型が機能的遺伝子多型であった (酸化ストレスに対するプロモーター活性が T アレルで C アレルの 40~50% と低下していた)。さらに、ヒト末梢血より分離した単球の GCLM mRNA 発現は、酸化ストレス刺激により増加したが、その増加は、CC 遺伝子型を有する細胞に比べ CT 遺伝子型を有する細胞で有意に減少していた。また血漿 GSH レベルを、電気化学検出器を併用した高速液体クロマトグラフィにより測定した結果、CC 遺伝子型グループに比べ CT+TT 遺伝子型グループで有意に GSH レベルが低下していることが明らかになった (2.1 ± 0.3 versus 3.3 ± 0.2 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.001$)。冠動脈造影にて診断された心筋梗塞患者 429 例とコントロール症例 428 例において、アレル頻度を polymerase chain reaction based analysis of restriction

fragment length polymorphism にて検討した。その結果、-588T 遺伝子多型がコントロール群より心筋梗塞群において有意に高頻度に認められた (CT+TT genotypes: 心筋梗塞群 31.5% versus コントロール群 19.2%, $P < 0.001$)。古典的冠動脈危険因子を含むロジスティック重回帰分析にて、-588T 遺伝子多型は独立した心筋梗塞の危険因子であった (odds ratio, 1.98; 95% confidence interval, 1.38 to 2.83; $P < 0.001$)。

【総括】 GCLM 遺伝子における-588T 遺伝子多型は、酸化ストレスに対する GCLM 遺伝子発現増加と GSH 生成を抑制し、そのことが心筋梗塞の遺伝的危険因子となっている可能性が示唆された。つまり、-588T 遺伝子多型は酸化ストレスに対する細胞内 GSH 生成を弱め、酸化ストレスが引き起こす血管障害に対する感受性を高め、冠動脈疾患の病因の一部となっていると考えられた。

Summary

Background: Human glutamate-cysteine ligase (GCL) is a rate-limiting enzyme for synthesis of glutathione (GSH) that plays a crucial role in antioxidant defense mechanisms in most mammalian cells, including vascular cells. Oxidants transcriptionally upregulate GCL genes for GSH synthesis, providing a protective mechanism against oxidative stress-induced cellular dysfunction. This study examined the hypothesis that variation in the GCL genes may be associated with coronary artery disease in which oxidative stress plays a pathogenetic role.

Methods and Results: We searched for the common variants in the 5'-flanking region of the GCL modifier subunit (GCLM) gene in patients with myocardial infarction (MI). We found a polymorphism (-588C/T) in which T allele showed lower promoter activity (40 to 50% of C allele) in response to oxidants in the luciferase reporter gene assay. Further, the present study showed that GCLM mRNA expression in the cultured human monocytes-macrophages was increased in response to tert-butylhydroquinone (tBHQ), but the induction was less in the cells from CT subjects as compared with CC subjects. In addition, we measured plasma GSH levels by HPLC-electrochemical method in 84 subjects (CC genotypes, n=48; CT+TT genotypes, n=36). Plasma GSH levels were significantly lower in subjects with T allele than those without T allele

(2.1 ± 0.3 versus 3.3 ± 0.2 $\mu\text{mol/L}$; $P=0.001$). Allele frequencies were determined by polymerase chain reaction-based analysis of restriction fragment length polymorphism in 429 patients with MI and 428 control subjects (as defined by angiography) in Kumamoto Prefecture, Japan. The frequency of the T polymorphism was significantly higher in the MI group than in the control group (CT and TT genotypes: 31.5% in MI group versus 19.2% in control group; $P<0.001$). In multiple logistic regression analysis, the T polymorphism was a risk factor for MI independently of traditional coronary artery disease risk factors (odds ratio, 1.98; 95% confidence interval, 1.38 to 2.83; $P<0.001$).

Conclusions: These findings suggest that the -588T polymorphism of GCLM gene may suppress GCLM gene expression and GSH production in response to oxidants and that it is a genetic risk factor for MI.

2) 発表論文

Shinichi Nakamura, Kiyotaka Kugiyama, Seigo Sugiyama, Shinji Miyamoto, Shunichi Koide, Hironobu Fukushima, Osamu Honda, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa.

Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit Gene Is Associated With Myocardial Infarction.

Circulation. 2002;105:2968-2973.

3) 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました熊本大学医学部循環器内科学講座 小川久雄教授、泰江弘文前教授に深甚なる謝意を表しますとともに、直接ご指導いただきました現山梨大学医学部内科学第二講座 久木山清貴教授に深謝いたします。また、適切な御助言をいただきました熊本大学医学部循環器内科学講座 杉山正悟助手、岡秀樹先生、緒方信彦先生に深く感謝いたしますとともに、共同研究者として御協力いただいた熊本大学医学部循環器内科学講座 小出俊一先生、熊本大学病院薬剤部 宮本晋治先生に感謝の意を表します。

4) 略語一覽

AP-1: activator protein-1
Apo E: apolipoprotein E
ARE: antioxidant response elements
BSA: bovine serum albumin
BSO: L-buthionine-(*S,R*)-sulfoximine
DMSO: dimethyl sulfoxide
ECGF: endothelial cell growth factor
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FCS: fetal calf serum
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCL: glutamate-cysteine ligase
GCLC: glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM: glutamate-cysteine ligase modifier subunit
GSH: L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, glutathione, reduced form
GSH-MEE: GSH monoethyl ester
GSSG: oxidized GSH
GPx: GSH peroxidase
 γ -GTP: gamma-glutamyltranspeptidase
H₂O₂: hydrogen peroxide
HBSS: Hanks' balanced salt solution
HeLa: human cervical carcinoma cell line
HEPES: *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HepG2 cells: human hepatocellular carcinoma cell line
HPLC: high performance liquid chromatography
HUVECs: human umbilical vein endothelial cells
JNK: jun kinase
lyso PC: lysophosphatidylcholine
MRE: metal response element
NAC: *N*-acetylcysteine

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NO: nitrogen oxide
OTC: L-2-oxo-4-thiazolidin carboxylate
p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PMSF: phenyl methyl sulfonyl fluoride
RFLP: restriction fragment length polymorphism
ROS: reactive oxygen species
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SOD: superoxide dismutase
SP-1: specificity protein 1
tBHQ: tert-butylhydroquinone
THP-1: human monocytic cell line
uPA: urokinase-type plasminogen activator
uPAR: receptor for uPA

5) 研究の背景と目的

5) - 1 酸化ストレスと動脈硬化

酸化ストレスの増大は、粥状動脈硬化の危険因子である高脂血症、糖尿病、喫煙などに共通している特徴であり¹⁾、酸化ストレスは冠動脈疾患を含む様々な閉塞性血管病変における atherothrombotic complication の病因に重要な役割を果たしている²⁻⁵⁾(酸化ストレスと心血管疾患との関係を Figure 1 に示した)。また、superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)や hydrogen peroxide 等の reactive oxygen species (ROS)のレベルが増加することによって粥状動脈硬化や高血圧、血管形成術後の再狭窄といった心血管疾患の発生に関与していること⁶⁾が明らかとなってきた。血管壁組織における ROS レベルの増加は、内皮依存性血管弛緩反応を抑制し、接着因子の発現を増強させ、また nuclear factor-kappa B (NF- κ B)などの酸化ストレス応答性転写因子を活性化させる⁷⁻¹⁰⁾。当教室においても動脈硬化の病態における酸化ストレスの役割について精力的に研究を続けており、動物実験においてタバコ主流煙抽出液中にふくまれる ROS が内皮の nitric oxide (NO)を不活化することにより、内皮依存性血管弛緩反応が低下し^{11,12)}、臨床的には冠攣縮性狭心症患者や喫煙者の冠動脈内皮 NO 活性が低下していることを報告してきた^{13,14)}。また、抗酸化剤の投与によって粥状動脈硬化が抑制されることが動物やヒトでの研究によって示されている¹⁵⁻¹⁷⁾。高脂血症モデルにおいて probucol や butylated hydroxytoluene を投与することによって粥状動脈硬化や血管平滑筋細胞の増殖が抑制された^{6,18,19)}。当教室のデータでは、動物実験においてタバコ主流煙抽出液による内皮依存性血管弛緩反応の低下が *N*-acetylcysteine (NAC)や

好氣的生物は酸素呼吸をおこなうことで効率的にエネルギーである ATP を産生する能力を獲得したが、その結果、ROS による酸化ストレスにさらされることになった。血管細胞を含む多くの哺乳動物細胞は、GSH³⁰⁾、チオレドキシン³¹⁾、マンガン SOD³²⁾などの細胞内抗酸化物質の誘導による種々の抗酸化防御機構を有している。酸化ストレスの増大と同様に、酸化ストレスに対する防御が減弱することが、冠動脈疾患の進展に部分的に寄与する可能性がある。

Tripeptidethiol (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine)である GSH は、生体内に存在する主要な抗酸化物質の一つであり、非蛋白質性の SH 成分として細胞内に多量に存在する。臓器によって異なるが、その細胞内濃度は一般的に 0.5~10 mmol/L の範囲と言われており、通常還元型である GSH がその大部分を占める。GSH は、細胞内酸化還元調節(細胞の機能調節)を行い、それ自身でラジカルを消去するほか、抗酸化酵素である GSH peroxidase (GPx)の電子供与体としても働き、過酸化脂質除去、酸化障害の修復などにより酸化ストレスから細胞を防御している³³⁾。

GSH は、superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)や hydrogen peroxide 等の reactive oxygen species (ROS)と反応して、安定な GSH radical を形成し、2 量体化(GSSG: oxidized GSH)に変化するが、この GSSG はさらに GSH reductase が NADPH からの電子を GSSG に転移して GSH (reduced GSH)に再生される。また、解毒代謝に関与し、体内の有害物質が GSH と結合し(グルタチオン抱合)、グルタミン酸とグリシンが切れることによって、メルカプツール酸となって排泄されると考えられている。

GSH は多くの哺乳動物細胞内で glutamate-cysteine ligase (GCL)と GSH synthetase の連続した働きにより合成される^{33,34)}。まず、glutamate が ATP の存在下で cysteine と結合し、 γ -glutamylcysteine が生成される(GCL によりこの反応は触媒され

る)。次に γ -glutamylcysteine と glycine が ATP の存在下で結合し、 γ -glutamylcysteine glycine (GSH)が合成される(この反応は GSH synthetase により触媒される)。後者の反応は γ -glutamylcysteine が生成されると直ちに行われるので GSH synthetase は新たな GSH 合成において何ら調節的役割を果たさない。つまり GCL が GSH 合成の律速酵素である(GCL-GSH pathway の schema を Figure 2 に示した)。

5) -3 グルタミン酸システインリガーゼ(GCL)

GCL は catalytic activity を有する 72.8kDa の catalytic, heavy subunit (GCLC) と、modifier activity を有する 30.8kDa の modifier, light subunit (GCLM)のヘテロ2量体から成る^{33,34)}。GCLC は、chromosome 6p12、GCLM は chromosome 1p21-p22、と2つのサブユニットは異なる染色体上に位置している³⁵⁻³⁷⁾。GCLC は、glutamate binding activity を有し、独立して γ -glutamylcysteine 合成の触媒能を有し、GSH による feedback inhibition を受けている。In vitro の実験では、GCLC に GCLM が結合することによって glutamate の Km 値が、18.2 mmol/L から 1.8 mmol/L に低下し、glutamate を競合的に阻害する GSH の Ki 値は、GCLC に GCLM が結合することにより増加した³⁸⁻⁴⁰⁾。また、GCLC cDNA と GCLM cDNA を co-transfection した場合に細胞内 GSH レベルは有意に上昇した⁴¹⁾。つまり GCLM 単体では生理学的条件下において enzymatic activity は有さず、GCLM は、glutamate の生理学的濃度で GCLC の触媒作用が働くのに重要である。

GSH 合成は、最初に転写レベルの調節による GCL 遺伝子発現の誘導と平行している^{30,34,42-44)}。GCLC、GCLM 遺伝子共にその promoter/enhancer 領域に putative oxidative stress-response elements を有している⁴²⁻⁴⁴⁾。細胞実験では、致死量

に近い酸化ストレス投与あるいは選択的 GCL 阻害剤である L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) 投与による細胞内 GSH 減少により、プロモーター領域の oxidative stress-response elements の活性化を通じ、GCLC 及び GCLM mRNA 発現が増加した^{38,43-45)}。GCL 酵素活性に対する GSH の feedback inhibition が一時的に減少するために GSH 合成の一時的増加が結果として生じると同時に、GCL 酵素発現の誘導が起こるために持続的な GSH 増加が認められた³⁸⁾。蛋白合成阻害剤である emetine 投与にて GCLM mRNA 発現増加は抑制されたが、GCLC mRNA 発現は抑制されなかったことより2つの GCL サブユニットの遺伝子発現に関する signaling pathway は異なっていると思われる⁴⁶⁾。

血清 GSH レベルの低値が冠動脈疾患の危険因子であるという最近の報告がある⁴⁷⁾。また、加齢により GSH レベルが低下するという報告もある^{48,49)}。細胞実験において、GSH 減少が内皮細胞での一酸化窒素(NO)生成を抑制し^{50,51)}、動物モデルでは、apo e (-/-) マウスにおいて OTC 投与による GSH レベル上昇が oxidize LDL を減少させ⁵²⁾、また、細胞膜通過性を有する GSH-MEE 投与が加齢による GSH 減少に防御的であった⁵³⁾。当教室の Kugiyama ら^{24,54)}や他の研究グループ⁵⁵⁾は以前に、酸化ストレス暴露が多いと考えられる、冠動脈危険因子や冠攣縮性狭心症を有する患者の冠動脈内に GSH を投与することによって、動脈硬化病変の初期に認められる内皮の血管運動機能不全が改善することを示した。さらに当教室の Doi らは、酸化ストレスにさらされた培養ヒト単球の atherothrombotic molecules 発現が、GSH 投与により抑制されることを示した⁵⁶⁾。このような GSH のアテローム防御的作用は、低 GSH レベルがアテローム性動脈硬化による冠動脈疾患の進展にかかわる可能性があるという仮説を支持する。

冠危険因子は、動脈硬化の進展に共通した機構としての酸化ストレスをもたらすと考えられるが、その冠危険因子を有する個々人全てが、必ずしも冠動脈疾患の発病につながるわけではない。また、GCL-GSH pathway の作用を遺伝子レベルで解析した報告は未だない。そのため、私は、酸化ストレスに対する抗酸化物質レベルの上昇というような抗酸化防御機構の個々人の調節能力が遺伝的に異なっているのではないかという仮説をたてた。GCLC 遺伝子には、いくつかの mutation があり、hemolytic anemia や neurological disorders を引き起こすことが報告されているが^{57,58)}、その遺伝子変異を有する患者において心血管病変についての記述は認められなかった。そのため、私は本研究において、GCLM 遺伝子について検討することにした。

5) -4 研究の目的

以上の背景を踏まえて、私は「酸化ストレスがその病因に関与している冠動脈疾患と、GCLM 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型には関連がある」との仮説を検証するため、ダイレクトシーケンシング法により遺伝子多型を検索し、その遺伝子多型と冠動脈疾患(心筋梗塞)との case-control cross-sectional study を検討した。また、この遺伝子多型が機能的遺伝子多型であるかどうかを細胞実験などにて検討した。

6) 実験方法

6) -1 研究対象

本研究は、熊本大学病院において冠動脈造影と左室造影を施行した心筋梗塞患者 429 例とコントロール症例 428 例の合計 857 例から成る。いずれも熊本大学病院において冠動脈造影検査と左室造影検査を施行した連続症例であり、全症例においてアレル頻度を解析した。心筋梗塞患者とコントロール症例における臨床背景は Table 1 に記載した。全ての心筋梗塞患者と対照症例は、単一種族の日本人であり、一部の症例は以前当教室にて報告したものと重なっている⁵⁹⁾。心筋梗塞診断基準としては、持続する胸痛、特徴的心電図変化、心筋逸脱酵素の正常上限 2 倍以上の上昇が挙げられる。冠動脈造影と左室造影所見は、心筋梗塞診断の補助となった。コントロール症例は非典型的胸痛の存在のために冠動脈造影を施行され、正常冠動脈造影所見 (10% 以下の狭窄)、正常左室造影所見を呈し、冠攣縮性狭心症やシンドローム X の臨床所見を認めないものとした。心筋梗塞症例における冠危険因子の評価は、心筋梗塞慢性期の早朝空腹時に施行された。心筋梗塞症例と対照患者からは全例、遺伝子解析についての書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究のプロトコールは遺伝的解析の国際的ガイドラインに沿っており、熊本大学病院の倫理委員会に承認された。

6) -2 プロモーター領域における遺伝子多型の検出

ゲノミック DNA はフェノールクロロフォルム法を用いて末梢血白血球より抽出した⁶⁰⁾。GCLM 遺伝子のプロモーター領域を、公表されている GCLM 遺伝子プロモーター領域のシーケンス配列^{43,44)}をもとにして、-1900bp から+85bp までをそれぞれ重複した 10 セットのプライマーペアにより心筋梗塞 12 例、コントロール患者 12 例のゲノミック DNA から PCR 法により増幅した。PCR 産物は Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM) を用いて、ABI Genetic Analyzer 373S (PE Biosystem) によりダイレクトシーケンスを行った。既報のプロモーター領域のシーケンス配列ならびに、心筋梗塞症例とコントロール患者のシーケンス配列を比較して GCLM 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型を詳細に検討した。

6) -3 遺伝子多型の解析

心筋梗塞患者 429 例、コントロール患者 428 例の遺伝子多型は PCR-based RFLP 法により決定した。-588C/T 遺伝子多型は C アレル存在下で *Msp*I 制限酵素 (C/CGG) の新たな認識部位を生じる。-588C/T 遺伝子多型部位と異なる部位にインターナルコントロールとして更なる *Msp*I 制限酵素部位を含む 329bp を増幅するようにプライマーペアを設計した。

Sense; 5'-CTCAAGGGCAAAGACTCA-3'

Antisense; 5'-CCGCCTGGTGAGGTAGACAC-3'

PCR は、template DNA 0.2 μ l, 3' primer 0.2 μ l, 5' primer 0.2 μ l, GC-Melt 4 μ l, 5X Buffer 4 μ l, 50X dNTP 0.4 μ l, Advantage GC-cDNA polymerase 0.4 μ l, D₂W 10.6 μ l の total 20 μ l の系で、94°C for 30sec, 58°C for 30sec, 72°C for 1min, 35cycles で行った

(目的とする増幅部位は GC リッチな鋳型であるので通常の Taq では PCR をかけることが困難である。そのため Advantage GC system を用いた PCR を施行した)。その後、PCR product 20 μ l, *Msp*I 1 μ l, NEBuffer2 4 μ l, D₂W 15 μ l, 37°C>3hours で制限酵素 *Msp*I による切断を行い、4% NuSieve Gel で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後に UV 照射を行った (NuSieve GTG Agarose は、10~1,000 bp の核酸の分析回収用に開発された低融点アガロースであり、ゲル上で近接する 100 bp 以下の核酸 (PCR 産物) でも、確実かつ簡便に分離できる)。

CC 遺伝子型は電気泳動にて、200-, 84-, 45-bp のバンドを認め、CT 遺伝子型は 200-, 129-, 84-, 45-bp のバンドを認め、TT 遺伝子型は、200-, 129-bp のバンドで識別することが可能であった (Figure 4)。

同様に、-23G/T 遺伝子多型は G アレル存在下で *Hin*P1I 制限酵素 (G/CGC) の認識部位を生じる。-23G/T 遺伝子多型部位を含む 127bp を増幅するようにプライマーペアを設計した。

Sense: 5'-GCTCCCTCTCGGGTCTCTCT-3'

Antisense: 5'-GCTGTTCGGTGCCCATGGCAC-3'

PCR は、template DNA 0.2 μ l, 3' primer 0.2 μ l, 5' primer 0.2 μ l, GC-Melt 4 μ l, 5X Buffer 4 μ l, 50X dNTP 0.4 μ l, Advantage GC-Genomic PCR polymerase 0.4 μ l, Mg(OAc)₂ 0.88 μ l, D₂W 9.72 μ l の total 20 μ l の系で、94°C for 30sec, 58°C for 30sec, 72°C for 1min, 35cycles で行った。その後、PCR product 20 μ l, *Hin*P1I 1 μ l, NEBuffer2 4 μ l, D₂W 15 μ l, 37°C>3hours で制限酵素 *Hin*P1I による切断を行い、4% NuSieve Gel で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後に UV 照射を行った。電気泳動にて GG 遺伝子型は、88-, 39-bp のバンド、GT 遺伝子型は 127-, 88-, 39-bp のバン

ド、TT 遺伝子型は 127-bp のバンドにより識別することが可能であった (Figure 4)。いずれの PCR 産物も初回実験時には ABI 310S シークエンサーを用いてダイレクトシーケンスを施行し、既知の遺伝子配列と比較検討し、目的の PCR 産物であることを確認している。

6) -4 細胞培養

Human cervical carcinoma cell line である HeLa 細胞と、Human monocytic cell line である THP-1 細胞は、Health Science Research Resources Bank より購入した。HeLa 細胞は抗生物質、5%FCS 添加 DMEM で培養し、THP-1 細胞は抗生物質、5% FCS 添加 RPMI 1640 にて継体培養した。ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) の Primary culture は、collagenase digestion で得られ、15% FCS、endothelium growth supplement (30 mg/L)、heparin (100 mg/L)、penicillin (100,000 unit/L)、streptomycin (100 mg/L) 添加の medium 199 にて 37°C、5% CO₂ incubator で培養した^{56,61}。HUVECs の 2 回目の継代を本実験では使用した。

6) -5 組み換えプラスミドの作成

プロモーター活性を調べるために、GCLM 遺伝子のプロモーター領域を pGL3-Basic Vector (Promega) に挿入し、組み換え発現ベクターを作製した (Figure 5)。野生型ホモ接合体 (wildtype homozygote) である -588C/-23G もしくは変異型ホモ接合体 (variant homozygote) である -588T/-23T 由来のゲノミック DNA から、GCLM 遺伝子プロモーター領域の -1338bp から +85bp までの 1424bp を、LA Taq による long PCR で増幅した。いずれもダイレクトシーケンスによりその配列を詳細に検討し、-588C/T と

-23G/T の遺伝子多型も確認した。この遺伝子断片を *KpnI/XhoI* 制限酵素により切断し、pGL3-Basic Vector の *KpnI/XhoI* 制限酵素切断部位に挿入し、組み換えプラスミド pGL3-GCLM_{wildtype} (with -588C/-23G) と pGL3-GCLM_{variant} (with -588T/-23T) を作製した。2 箇所の遺伝子多型部位は完全にリンクしているため、自然界には -588C/-23G あるいは -588T/-23T しか存在しないのであるが、2 箇所の遺伝子多型部位のうちどちらが機能的遺伝子多型か調べるために、1 箇所のみの遺伝子多型部位を有するコンストラクトを作製した。pGL3-GCLM_{wildtype} からの *KpnI/SacII* 制限酵素切断断片 (-588C を含む -1338bp から -345bp まで) を pGL3-GCLM_{variant} の *KpnI/SacII* 切断部位 (-23T を含む) に挿入し、-588C と -23T を有する pGL3-GCLM_{-588C/-23T} を作製した。同様に、pGL3-GCLM_{wildtype} からの *SacII/PstI* 制限酵素切断部位 (-23G を含む -345bp から +62bp まで) を *SacII/PstI* で切断された pGL3-GCLM_{variant} (-588T を含む) に挿入し、-588T と -23G を有する pGL3-GCLM_{-588T/-23G} を作製した。

6) – 6 Luciferase Reporter Gene Assay

HUVECs、THP-1、HeLa 細胞には、カチオン性脂質を用いてトランスフェクションを施行した⁶¹⁾。トランスフェクションには上述したような種々の GCLM プロモーター領域を含んだ PGL3 Luciferase Reporter Vector 1 µg と、Renilla Luciferase の基本的発現を見るために、単純ヘルペスウイルスの Thymidine Kinase プロモーター領域を含んだ pRL-TK control Vector (Promega) 0.1 µg を使用した。カチオン性脂質としては、HeLa 細胞とヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) には LIPOFECTIN Reagent と PLUS Reagent (いずれも GIBCO BRL) を用い、THP-1 細胞のトランスフェクションには Effectene Reagent (QIAGEN) を用いた。トランスフェクション 24 時間後にトランス

フェクションされた細胞を酸化物質の存在、非存在下で 18 時間処理した。酸化物質としては、tert-butylhydroquinone (tBHQ) 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 、Menadione 10 $\mu\text{mol/L}$ 、Hydrogen peroxide (H_2O_2) 100 $\mu\text{mol/L}$ のいずれかを用いた。処理後の細胞は、Passive Lysis Buffer (Promega) で集め、細胞溶解物は debris を除くために遠心分離した。Luciferase Activity は、Dual Luciferase Assay System (Promega) と Luminometer を用いて測定した。Luciferase Level はコントロールとしての Renilla Luciferase Level との比で表した。

6) -7 ヒト単球の分離培養

GCLM mRNA 発現における-588C/T 遺伝子多型の与える影響を調べるためにアレル頻度を調べたなかから選ばれた CC 遺伝子型 19 人、CT 遺伝子型 19 人の計 38 人からヒト末梢血単球を分離した。対象例よりクエン酸添加末梢静脈血を採り、デキストラン沈降後、Ficoll-Hypaque 法にて単核球を分離し^{27,62)}、抗生物質添加 medium-199 (M-199) 中に懸濁してペトリ皿に播いた。2 時間静置した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 3 回洗浄して非付着細胞を除き、付着細胞を 0.05% EDTA 含有 PBS を加えて剥離した。M-199 にて洗浄した後、10% ヒト血清及び抗生物質添加 M-199 に懸濁して実験に必要な細胞数濃度溶液を作成し、6-well dish にて単層付着培養を行った。37°C に保温した CO₂ 培養器内で 2 日毎に培地を交換しながら 5 日間培養した。培養細胞はこの時点で形態的および機能的にマクロファージと同一の性格を有しており、本研究では「ヒト単球由来マクロファージ」としてこの細胞を研究対象とした。なお、培養細胞は 98% 以上が前述の特徴を備えた細胞 (マクロファージ) であり、trypan blue 試験にて 98% 以上は生細胞であることが確認された²⁷⁾。

5 日間培養した単球—マクロファージは、培地を交換した後、50 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ(対照としてDMSO)を加えて18時間培養した。以上の処理を施した細胞を回収し、GCLM mRNA の発現の程度を検討した(Figure 8)。

6) – 8 ヒト単球—マクロファージにおける GCLM mRNA 発現

処理後のヒト単球—マクロファージからの Total RNA は、Qiagen RNeasy Kit and DNase I(QIAGEN)を用いて抽出した。GCLM mRNA 発現は、5' nuclease activity of Taq polymerase に基づく ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems)を用いた real-time one-step RT-PCR assay により測定した。PCR primer と TaqMan probe は、GCLM cDNA の 113bp 産物を増幅するために、GenBank databases (NM002061)から Primer Express (PE Applied Biosystems)を用いて設計した。

Sense: 5'-TTGACATGGCCTGTTCAGTCCT-3'

Antisense: 5'-CCAGTAAGGCTGTAAATGCTCCA-3'

TaqMan probe: 5'-FAM-AGTTGCACAGCTGGATTCTGTGATCATTGC-TAMRA-3'

Total RNA 5 μl 、Sense primer 900 nmol/L、Antisense primer 900 nmol/L、Taqman probe 250 nmol/L、2X Master mix 25 μl 、40X MultiScribe and RNase inhibitor mix 1.25 μl 、の計 50 μl の混合液を作成し、ABI PRISM 7700 を用いて、48°Cx30 分間、95°Cx10 分間の加熱処理後、PCR 反応(95°Cx15 秒間、60°Cx1 分間、50 サイクル)を行った。

GCLM 遺伝子発現を補正するために house keeping gene である GAPDH を用いた。ヒト GAPDH の PCR primer と TaqMan probe は PE Applied Biosystems から購入した。

Sense: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

Antisense: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC

TaqMan probe: 5'-*JOE*-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-*TAMRA*-3'

Total RNA 5 μ l, Sense primer 200 nmol/L, Antisense primer 200 nmol/L, Taqman probe 100 nmol/L, 2X Master mix 25 μ l, 40X MultiScribe and RNase inhibitor mix 1.25 μ l, の計 50 μ l の混合液を作成し、ABI PRISM 7700 を用いて、48°Cx30 分間、95°Cx10 分間の加熱処理後、PCR 反応(95°Cx15 秒間、60°Cx1 分間、50 サイクル)を行った。

GCLM mRNA 発現レベルは、GAPDH との比で表した (Figure 9.10)。検量線作成には HeLa cells から抽出した Total RNA の希釈系列を用いた。

6) - 9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Flask にて培養した THP-1 cells を 50 μ mol/L の tBHQ もしくは Vehicle (DMSO) にて 12 時間刺激した後、3000 回転で 5 分間遠心し上清を除去し、ペレットに 800 μ l の Buffer-A (mmol/L: HEPES 10, pH 7.9; KCl 10; EDTA 0.1; DTT 1.0; PMSF 1.2; pepstatin A 2 μ g/ml) を加えて 1.5 ml tube に回収し、4°C で 15 分間静置した。その後、10% Nonidet P-40 を各 tube に 50 μ l 加え 10 秒間 vortex した。この懸濁液を 4°C、5000 回転で 10 分間遠心し上清を除去した後、ペレット(細胞核)に 10 μ l の Buffer-C (mmol/L: HEPES 20, pH 7.9; NaCl 400; EDTA 1.0; EGTA 1.0; DTT 1.0; PMSF 1.2; pepstatin A 2 μ g/ml) を加え、hand homogenizer にて懸濁した。4°C、8000 回転で 5 分間遠心して夾雑物を除いたものを核蛋白抽出液として EMSA に使用した^{7,61)}。抽出液の蛋白濃度はウシ血清アルブミンを対照として Bradford 法を用いて測定した。2 本鎖合成 oligonucleotide は [γ -³²P]ATP と T4 polynucleotide kinase を用いて 5' 端を標識し

た。本研究に使用した oligonucleotide は、

-588C probe: CGACCTGAACGCGCGGGAGACCTCACC

-588T probe: CGACCTGAACGCTGGGAGACCTCACC

であった。

20 μ l の系 (25 μ mol/L HEPES-KOH [pH 7.6], 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L DTT, 0.5 mmol/L spermidine, 0.5 mmol/L PMSF, 10% glycerol, 0.1 mg/ml poly[dI-dC], 1 fmol probe [約 2×10^3 cpm], 5 μ g nuclear protein) にて反応を行った^{7,61)}。最後に標識 oligonucleotide を加えて氷上で 30 分静置した後、5 μ l の Ficoll dye を加えて 5% の polyacrylamide gel に 4°C、100V で 90 分泳動した。泳動後 gel を乾燥させ、BAS-IP MS 2040 Film (Fuji film) を用いて autoradiography を行った後、Bio-Imaging analyzer FLA-2000 (Fuji film) にて解析した。

6) -10 ヒト血漿中 GSH レベルの測定

-588C/T 遺伝子多型において、年齢、性別、及び冠危険因子をマッチングさせた CC 遺伝子型 48 例、CT+TT 遺伝子型 36 例について、血漿中 GSH レベルを検討した。対象症例から早朝空腹時に EDTA 添加末梢静脈血を採り、遠心分離により血漿に分離した。分離血漿はアッセイに用いるまで、50 μ mol/L acivicin (γ -glutamyltranspeptidase inhibitor) を加えた後 -80°C で保存した (Figure 13)。

GSH レベルの測定は、電気化学検出器と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組み合わせて施行した⁶³⁾。HPLC は、カラムとして Lichrosper RP-18e (Merk KGaA) を用い、移動相として 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.15 mmol/L SOS (1-オレイン酸スルホン酸 Na)/ CH_3CN =98/2 (pH=2.7: H_3PO_4 により補正) を用いた。カラム温度は 35°C で、

分離時の流速は 0.6 ml/min であった。電気化学検出器は、Coulochem II (ESA, Inc.) を用い、設定電圧は、Guard cell が 800 mV、Detector I が 450 mV および Detector II が 750 mV であった。保存血漿 200 μ l に 50 μ l 2N HClO₄ を添加し (最終 HClO₄ 濃度は 0.4N)、除蛋白後、上清を 50 μ l インジェクションして GSH レベルを測定した。以上の実験は熊本大学病院薬剤部宮本先生にご協力いただいた。

6) - 11 試薬

細胞培養に使用した培地等はすべて GIBCO-BRL 製 (現在は Invitrogen/life technologies) である。Poly (dI-dC) は Pharmacia Biotech より、T4 polynucleotide kinase は TAKARA Biomedicals より、NuSieve GTG Agarose は Cambrex より、Advantage GC system は CLONTECH より、collagenase は WAKO Chemical より、FCS は Atlantic Bio. より、ECGF は Collaborative Biomedical Products より購入した。Penicillin/streptomycin、tBHQ、menadione、hydrogen peroxide、DMSO、その他の試薬についてはいずれも Sigma Chemical 製を使用した。

6) - 12 統計学的解析

測定値は特に断らない限り平均値 \pm 標準偏差で表した。2 群間の正常分布と頻度の連続変数の平均値は unpaired Student's *t* test と χ^2 analysis を用いて、また 3 群間以上の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて解析した。また、心筋梗塞患者グループとコントロール症例グループ間において、-588T 遺伝子多型 (CT+TT) が独立下危険因子であるかどうか評価するために、以下のようなカテゴリー変数、高齢 (70 歳以上)、性別 (男性)、喫煙歴 (10 本/日以上、10 年間以上)、高血圧

(140/90 mmHg 以上または、降圧剤の服用)、糖尿病(ADA レポートに準じる⁶⁴⁾)、高コレステロール血症(220 mg/dL 以上または、抗高脂血症剤の服用)、肥満(BMI>26 kg/m²)を用いたロジスティック重回帰分析を施行した。統計学的有意は P<0.05 とした。統計解析は StatView 5.0(SAS Institute, USA)を用いて行った。

7) 結果

7) -1 遺伝子多型の検出

心筋梗塞患者 12 例、コントロール症例 12 例における GCLM 遺伝子のプロモーター領域(-1900bp から+85bp まで)のシーケンス配列を詳細に検討した結果、Figure 3 に示すように-588C/T と-23G/T の 2 箇所の新しい遺伝子多型を発見した。心筋梗塞患者 429 例、対象症例 428 例における遺伝子多型の頻度を調べるために PCR-based RFLP analysis を施行した。それぞれの PCR 産物を適当な制限酵素 (-588C/T, *MspI*: -23G/T, *HinfI*) で切断した後に、4% Nusieve Gel にて電気泳動して得られたパターンにより遺伝子多型を判断した (Figure 4)。遺伝子多型の決定は、心筋梗塞患者あるいは対象症例の冠動脈造影所見や臨床データを知ることもない実験者によって行われた。2 つの遺伝子多型は完全にリンクしていた (-588C→T, -23G→T)。心筋梗塞患者 429 例のなかで、-588TT 遺伝子型は 16 例 (3.7%)、-588CT 遺伝子型は 119 例 (27.8%)、-588CC 遺伝子型は 294 例 (68.5%) 認められた。同様にコントロール症例では、-588TT 遺伝子型は 2 例 (0.5%)、-588CT 遺伝子型は 80 例 (18.7%)、-588CC 遺伝子型は 346 例 (80.8%) 認められた。この遺伝子多型分布は、Hardy-Weinberg equilibrium に合致していた。

Table 2 に示すように、-588T 遺伝子多型の recessive, additive, dominant effect は、いずれの場合においてもその頻度はコントロール群に比して心筋梗塞群で有意に高かった。心筋梗塞患者とコントロール症例におけるロジスティック重回帰分析では、-588T アレル (-588C/T 遺伝子多型 + -588TT 遺伝子多型) は、男性、高齢 (70 歳以上)、

高コレステロール血症、糖尿病、高血圧と同様に独立した心筋梗塞の危険因子であった (Table 3)。

Table 1 に示されるように、心筋梗塞患者とコントロール症例の間には、年齢 (心筋梗塞群が高齢)、性別 (心筋梗塞群は男性が多い)、糖尿病 (心筋梗塞群に多い)、喫煙 (心筋梗塞群に多い)、高血圧 (心筋梗塞群に多い)、高コレステロール血症 (心筋梗塞群に多い) の変数において有意差を認める。冠危険因子をマッチングすることは症例とコントロールの間に固有の selection bias を生じさせると考え、その selection bias を出来るだけ少なくさせるために、本研究では本院で冠動脈造影検査を施行した心筋梗塞患者とコントロールの連続症例を対象とした。しかしながら、computer-assisted method により性別と年齢をマッチングさせた後でも、ロジスティック重回帰分析において -588T 遺伝子多型は、他の従来言われているような冠危険因子と独立した心筋梗塞の危険因子であった (Table 4~6)。また、-588C/T 遺伝子多型が従来言われているような冠危険因子に関係があるかどうか調べるために、T アレルを有するグループと T アレルを有さないグループに分けて比較検討してみたが、年齢、性別、その他の冠危険因子には関連がなく、唯一有意差を持って T アレルグループに多かったのは心筋梗塞のみであった (Table 7)。

7) -2 GCLM 遺伝子のプロモーター活性に -588T 遺伝子多型が及ぼす影響

pGL3-GCLM_{variant} (-588T/-23T) を transfection した HUVECs, THP-1, HeLa cells と、pGL3-GCLM_{wildtype} (-588C/-23G) を transfection した HUVECs, THP-1, HeLa cells における酸化ストレスを与えないコントロール条件での Luciferase activity はほぼ

同一であった (Figure 6)。プロモーター活性は、Renilla activity で補正した Luciferase activity で表した。Transfection 後のそれぞれの細胞を、tBHQ (HUVEC と HeLa cell は 100 $\mu\text{mol/L}$ 、THP-1 cells は 10 $\mu\text{mol/L}$) で 18 時間刺激したところ、pGL3-GCLM_{wildtype} を transfection した細胞の Luciferase activity は有意に上昇したが、pGL3-GCLM_{variant} を transfection した細胞の Luciferase activity は上昇しなかった (Figure 6)。pGL3-GCLM_{-588T/-23G} を transfection した細胞の tBHQ 刺激に対する反応は、pGL3-GCLM_{wildtype} を transfection した細胞の Luciferase activity と比べ、有意に低かった。pGL3-GCLM_{-588C/-23T} を transfection した細胞の tBHQ 刺激に対する反応は、pGL3-GCLM_{wildtype} を transfection した細胞の Luciferase activity とほぼ同じであった (Figure 6)。つまり、tBHQ 刺激に対する GCLM 遺伝子のプロモーター活性は、-23T 遺伝子多型ではなく、-588T 遺伝子多型によって抑制されることが示された。同様の結果は、異なる酸化ストレス (10 $\mu\text{mol/L}$ の menadione、100 $\mu\text{mol/L}$ の hydrogen peroxide) を用いた HeLa cells における実験でも得られた (Figure 7)。

7) -3 培養ヒト単球-マクロファージにおける GCLM mRNA 発現に -588T 遺伝子多型が及ぼす影響

危険因子をマッチングさせた CT 及び CC 遺伝子型グループ由来の培養ヒト単球-マクロファージの、酸化ストレスを与えないコントロール条件下での GCLM mRNA 発現レベルはほぼ同一であった。50 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ で培養細胞を 18 時間刺激したところ、両グループともに GCLM mRNA 発現レベルは上昇したが、その上昇は CC 遺伝子型グループに比べ、CT 遺伝子型グループ由来の培養ヒト単球-マクロファージで有意に低下していた (Figure 11)。

7) -4 核蛋白 DNA 複合体形成に-588T 遺伝子多型が及ぼす影響

コンピューターによるデータベース解析では、-588C/T 遺伝子多型を含む近辺のシーケンス配列には、一般に云われている enhancer element を検出することが出来なかった。そこで、-588C あるいは-588T の遺伝子多型を有する-600 から-576 bp までのシーケンスに相当する double strand oligonucleotide probe を用いて EMSA を行った。Oligonucleotide probe は THP-1 cells から得られた核蛋白抽出物と incubate したが、THP-1 cells を 50 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ で 12 時間刺激すると、C あるいは T アレルを有する oligonucleotide probe とある核蛋白との binding activity は両者ともに増加した。しかしながら、tBHQ 刺激によるその binding activity の増加は、T allele-oligonucleotide probe において有意に減少していた (Figure 12)。

7) -5 ヒト血漿中 GSH レベル

Figure 14 に示したように、CC 遺伝子型 48 例の血漿中 GSH レベルが $3.31 \pm 0.25 \mu\text{mol/L}$ であるのに対し、CT+TT 遺伝子型 36 例では $2.06 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$ であり、CT+TT 遺伝子型で有意に GSH レベルが低下していた。

8) 考 察

私は本研究において、GCLM 遺伝子の 5' 上流非翻訳領域に、完全にリンクした2つの遺伝子多型(-588C/T と-23G/T)を発見した。Dual luciferase reporter gene assay では、GCLM 遺伝子の遺伝子変異が酸化ストレスに対するプロモーター活性の反応的増加を抑制すること、また 2 箇所ある遺伝子多型のうち-588C/T 遺伝子多型が機能的遺伝子多型であることが示された。遺伝子多型と心筋梗塞との association study では、コントロール群と比べ心筋梗塞患者群において、-588T 遺伝子多型の頻度が有意に高かった。またロジスティック重回帰分析では、-588T 遺伝子多型は、従来いわれているような冠危険因子と同様に、心筋梗塞に対する独立した危険因子であった。さらに、ヒト培養単球-マクロファージにおける GCLM mRNA 発現は、酸化ストレス刺激により増加したが、その増加の程度は CC 遺伝子型由来のヒト培養単球-マクロファージに比べ CT 遺伝子型由来のヒト培養単球-マクロファージで有意に低かった。つまり、これらのデータは-588T 遺伝子多型が、酸化ストレスに対する反応性の(細胞防御的な)GCLM 遺伝子発現の増加を抑制し、そのことが心筋梗塞の遺伝的危険因子になっていることを示唆した。

tBHQ は phenolic antioxidant として分類されるが、実際にはその分解によって ROS を生み出し、細胞の活性化と nuclear responses の発生につながる^{65,66)}。Galloway ら⁴⁴⁾は HepG2 cells を 100 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ で刺激すると、刺激しなかった細胞に比べ GSH レベルが 2.5 倍に上昇し、GCL 蛋白は GCLC が 2 倍、GCLM が 3 倍に上昇することを示した。さらに、THP-1 cells を 50 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ で刺激すると redox-sensitive molecules である JNK、p38 MAPK、hemo oxygenase-1 が著明に上昇することが報告さ

れている^{67,68})。このように本研究で使用された tBHQ の濃度は種々の細胞において、GCL-GSH pathway の活性化を含めた様々な redox-sensitive molecules を誘導すると考えられる。本研究でのプロモーター活性に対する tBHQ の効果は dose-dependent であり、さらに、100 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ 刺激は 100 $\mu\text{mol/L}$ の H_2O_2 刺激 (in-vivo あるいは in-vitro の実験において血管細胞における atherothrombotic molecules 発現を増強させる自然界に存在する酸化物質⁶⁹) とほぼ同等の効果があった。以上のことより、10~100 $\mu\text{mol/L}$ の tBHQ 刺激は、様々な redox-sensitive molecules が誘導される動脈硬化壁に存在する酸化ストレスと同程度の刺激とみなすことができる。

血漿中 GSH レベルは、T アレルを有さない CC 遺伝子型グループに比べ T アレルを有する CT+TT 遺伝子型グループで有意に低かった。心筋梗塞患者群 (n=14) における血漿中 GSH レベルはコントロール群 (n=70) に比べ低い傾向にあったが、有意差は認めなかった (心筋梗塞群 $2.83 \pm 0.21 \mu\text{mol/L}$ 、コントロール群 $3.21 \pm 0.54 \mu\text{mol/L}$)。これは GSH レベルを測定した対象症例の数が少ないためと考えられた。GSH は血漿中で GSSG、CySS、cysteine-cysteine-glycine (CySS-mono-Gly)、cysteine-cystine-bis-glycine (CySS-bis-Gly) などの様々な代謝産物に分解される⁷⁰が、主に GCL 活性を通じて産生される GSH からの代謝産物を全て測定することは不可能なので、GSH とその代謝産物の総和の指標として、GSH レベルを測定し評価した。T アレルが、酸化ストレスに対する細胞内 GSH 産生を抑制して、冠動脈疾患の病因に部分的に関与していると思われる酸化ストレスにより誘導される血管障害の感受性を高めていると考えた。

gclc (+/-) マウスは、GSH レベルの減少とともに代償的に ascorbate が上昇しているとの報告⁷¹があるが、マウス、ラットと異なりヒトは ascorbate を生体内で合成するこ

とは出来ない^{72,73)}。ヒトの血漿中 ascorbate レベルは、酸化ストレス同様に食事に大きく影響を受けており、また、冠動脈疾患を有するグループの血漿中の ascorbate レベルは対照と比較して有意に減少していた^{74,75)}という報告もある。そのため、血漿中の ascorbate レベルは GCL-GSH pathway 活性を反映しないと考え、本研究では ascorbate レベルの測定は施行しなかった。GCL 活性の選択的抑制剤である BSO 投与マウスは、GSH レベルが、コントロールマウスの 80%以上減少し、結果的に腎・肺・脳の障害を生じたが、心血管系の異常は指摘されていない^{34,76)}。また、GCLC 遺伝子の coding lesion の遺伝子変異が hemolytic anemia や neurological disorders を引き起こすという報告^{57,58)}があるが、心血管系についての記載はない。これらの動物モデルや GCLC 遺伝子変異を有する患者に、隠れた心血管病変が存在することは除外できない。また、動脈硬化による心血管病変は、中程度の GCL-GSH pathway の抑制が非常に長い期間続くことによって進展すると考えられるので、BSO 投与マウスは動脈硬化モデルとしては適当ではない。最近、Yang らによって、gclm (-/-)マウスが作製されたが、gclm (-/-)マウスは生存し、生殖能力があり、現時点にて明らかな phenotype を示さなかった⁷⁷⁾。しかしながら、肝・肺・脾・赤血球・血漿の GSH レベルはコントロールマウスの 9-16%に減少していた。つまり、GCLM サブユニットと GSH の果たす役割を評価するのに有効である、酸化ストレスに関係する慢性的な GSH 減少を表す動物モデルになると考えられる。

GSH はその構成アミノ酸から、GCL と GSH synthetase の2つの酵素により合成される^{33,34)}。GCL は新規 GSH 合成の律速酵素であるのに対し、GSH synthetase は何ら調節的役割を果たさない。GCLM 遺伝子は、そのプロモーター/エンハンサー領域にいくつかの oxidative stress-responsive elements を有していると言われている^{43,44)}。

細胞が、致死的な酸化ストレスや細胞内 GSH の減少にさらされると、プロモーター領域の oxidative stress-responsive elements の活性化を通じて、GCLM mRNA 発現は増加した^{38,43,44)}。これらは結果として新規 GSH 合成になり、酸化ストレスに対する防御的・適合的機構を備えることとなる。GCLM 遺伝子における-588C/T 遺伝子多型が、GCL の酵素活性や GCLM と GCLC の heterodimer formation にどのような影響を与えるかに関してはデータを示すことが出来ない。しかしながら、GCLM 蛋白の合成は転写レベルで調節されており⁷⁸⁾、GCLM 遺伝子転写の相対的減少が GSH 産生を抑制する⁷⁹⁾という報告があるのは本研究のデータと矛盾しない。コンピューターによるデータベース解析では、-588C/T 遺伝子多型部位を含む enhancer element はなかったが、Moinova らは-718 bp から-344 bp までの範囲が、強力な phase II enzyme inducer である β -naphthoflavone の刺激によるプロモーター活性の増加に寄与していることを示した^{43,80)}。つまり、-588 部位の近辺にある確認されていない cis-element と核蛋白との結合を、-588T アレルが変えることによって酸化ストレスが誘導する GCLM 遺伝子の発現増加を抑制する可能性と考えられた。

血清 GSH レベルの低値が、冠動脈疾患の危険因子であり⁴⁷⁾、ヒトの動脈硬化病変において、GSH 関連酵素による抗酸化防御機構の減弱が認められた⁸¹⁾という最近の報告がある。細胞実験において、GSH 減少が内皮細胞での一酸化窒素(NO)生成を抑制するという報告もある^{50,51)}。当教室の Kugiyama ら^{24,54)}や他の研究グループ⁵⁵⁾は以前に、酸化ストレス暴露が多いと考えられる、冠動脈危険因子や冠攣縮性狭心症を有する患者の冠動脈内に GSH を投与することによって、動脈硬化病変の初期に認められる内皮の血管運動機能不全が改善することを示した。さらに当教室の Doi らは、酸化ストレスにさらされた培養ヒト単球の動脈硬化血栓性に働く分子発現が、

GSH 投与により抑制されることを示した⁵⁶⁾。このような GSH のアテローム防衛的作用は、低 GSH レベルがアテローム性動脈硬化による冠動脈疾患の進展にかかわる可能性があるという仮説を支持する。

GCL-GSH pathway は、様々な薬物や化学物質の解毒あるいは放射線障害に対する防衛としても非常に重要な役割を果たす^{82,83)}。GCLM 遺伝子の機能的遺伝子多型(-588C/T)が化学療法や放射線療法に対する感受性や抵抗性に影響を与えていて、この遺伝子多型をスクリーニングすることがこれらの治療に対して反応する患者とそうでない患者を区別できる可能性がある。つまり、-588C/T 遺伝子多型がテーラーメイド医療に有用である可能性がある。

本研究は、比較的少ない対象症例数によって制限されている。さらに、GCLM 遺伝子のプロモーター領域に存在する-588C/T 遺伝子多型と心筋梗塞発症との間の正確なメカニズムは大部分明らかにされていない。-588C/T 遺伝子多型は、本遺伝子あるいは近接する遺伝子に存在する別の機能的な遺伝子変異の単なるマーカーである可能性は否定できない。また、本研究の心筋梗塞患者は、急性心筋梗塞の生存者しか登録されていない。冠危険因子がほぼ等しくなるような大規模な対象患者を持つ長期的な研究が、冠動脈疾患の病因における-588C/T 遺伝子多型の正確な役割を評価するのに必要である。

9) 結 語

GCLM 遺伝子の 5' 上流非翻訳領域に 2 つの遺伝子多型 (-588C/T と -23G/T) を発見した。GCLM 遺伝子の -588T 遺伝子多型は、酸化ストレスに対する GCLM 遺伝子発現増加と GSH 産生を抑制し、本遺伝子多型は心筋梗塞と有意に関連していた。つまり、GCLM 遺伝子の -588T 遺伝子多型は、心筋梗塞の遺伝的危険因子であった。

TABLE 1. Clinical Characteristics of Control Subjects and Patients With MI

	Control subjects (n=428)	Patients with MI (n=429)	<i>P</i>
Age, y	62±12	68±11	<0.001
Men/Women, n	212/216	315/114	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)	80 (18.7)	141 (32.9)	<0.001
Cigarette smoking, n (%)	133 (31.1)	196 (45.7)	<0.001
Hypertension, n (%)	180 (42.1)	236 (55.0)	<0.001
Hypercholesterolemia, n (%)	116 (27.1)	155 (36.1)	0.004
Body mass index, kg/m ²	23.8±3.5	23.5±3.4	0.192

Data presented are mean value±SD or number of patients (%).

TABLE 2. Genotype Frequencies of GCLM Promoter Polymorphisms in Control Subjects and Patients With MI

	Control subjects (n=428)	Patients with MI (n=429)	OR (95% CI)	<i>P</i>
<i>-588C/T and -23G/T, n (%)</i>				
GCLM /TT-TT	2/428 (0.5)	16/429 (3.7)	-	-
GCLM /CT-GT	80/428 (18.7)	119/429 (27.8)	-	-
GCLM /CC-GG	346/428 (80.8)	294/429 (68.5)	-	-
<i>-588T allele vs. C allele</i>	-	-	1.96 (1.41-2.65)	<0.001
<i>-588TT and CT vs. CC</i>	-	-	1.94 (1.47-2.61)	<0.001
<i>-588TT vs. CT and CC</i>	-	-	8.25 (1.89-36.11)	<0.001*

Data presented are number of patients (%). CI, confidence interval; OR, odds ratio.

* Fisher's exact test

TABLE 3. Multiple Logistic Regression Analysis for Variables Differing Between Controls and Patients With MI

Variables	β	SEM	<i>P</i>	OR (95% CI)
-588T polymorphism	0.68	0.18	<0.001	1.98 (1.38-2.83)
Sex (men)	1.06	0.19	<0.001	2.89 (1.99-4.22)
Age (≥ 70 y)	0.77	0.17	<0.001	2.15 (1.55-3.00)
Hypercholesterolemia	0.74	0.18	<0.001	2.09 (1.48-2.96)
Diabetes mellitus	0.63	0.18	<0.001	1.88 (1.32-2.68)
Hypertension	0.51	0.16	0.002	1.66 (1.21-2.28)
Cigarette smoking	0.31	0.18	0.088	1.37 (0.96-1.96)
Body mass index (>26 kg/m ²)	0.04	0.19	0.832	1.04 (0.72-1.51)
Constant	-1.95	0.22	<0.001	-

-588T polymorphism; -588TT and -588CT combined

TABLE 4. Clinical Characteristics of Control Subjects and Patients With MI After Matching of Age and Sex

	Control subjects (n=248)	Patients with MI (n=248)	<i>P</i>
Age, y	65±10	65±10	N.S
Men/Women	163/85	163/85	N.S
Body mass index, kg/m ²	24.1±3.5	23.8±3.3	0.395
Hypertension, n (%)	112 (45.2)	136 (54.8)	0.031
Cigarette smoking, n (%)	97 (39.1)	119 (48.0)	0.046
Diabetes mellitus, n (%)	49 (19.8)	85 (34.3)	<0.001
Hypercholesterolemia, n (%)	59 (23.8)	95 (38.3)	<0.001

Data presented are mean value±SD or number of patients (%).

TABLE 5. Genotypes Frequencies of GCLM Promoter Polymorphisms in Control Subjects and Patients With MI After Matching of Age and Sex

	Control subjects (n=248)	Patients with MI (n=248)	OR (95% CI)	<i>P</i>
-588C/T, -23G/T				
GCLM/TT-TT, n (%)	1/248 (0.4)	6/248 (2.4)	-	-
GCLM/CT-GT, n (%)	46/248 (18.5)	65/248 (26.2)	-	-
GCLM/CC-GG, n (%)	201/248 (81.0)	177/248 (71.4)	-	-
-588T allele vs. C allele	-	-	1.72 (1.17-2.52)	0.006
-588TT and CT vs. CC	-	-	1.72 (1.13-2.62)	0.011
-588TT vs. CT and CC	-	-	6.12 (0.73-51.3)	0.061*

Data presented are number of patients (%). CI, confidence interval; OR, odds ratio.

* Fisher's exact test

TABLE 6. Multiple Logistic Regression Analysis: Variables Differing Between Controls and Patients With MI After Matching of Age and Sex

Variables	β	SEM	<i>P</i>	OR (95% CI)
-588T polymorphism	0.50	0.23	0.032	1.66 (1.05-2.62)
Hypercholesterolemia	0.79	0.23	<0.001	2.21 (1.41-3.44)
Diabetes mellitus	0.73	0.23	0.001	2.08 (1.33-3.27)
Cigarette smoking	0.50	0.23	0.029	1.64 (1.05-2.56)
Hypertension	0.42	0.21	0.043	1.52 (1.01-2.28)
Sex (men)	-0.18	0.24	0.470	0.84 (0.52-1.35)
Age (≥ 70 y)	0.07	0.21	0.726	1.08 (0.71-1.63)
Body mass index (>26 kg/m ²)	-0.18	0.24	0.939	0.98 (0.62-1.56)
Constant	-0.94	0.27	<0.001	-

-588T polymorphism: -588TT and -588CT combined

TABLE 7. Clinical Characteristics of Study Subjects With or Without T-Allele

	CC Genotypes (n=640)	CT+TT Genotypes (n=217)	<i>P</i>
Age, y	65±12	66±12	0.228
Men/Women, n	386/254	141/76	0.222
Diabetes mellitus, n (%)	160 (25.0)	61 (28.5)	0.311
Cigarette smoking, n (%)	243 (38.0)	86 (40.2)	0.564
Hypertension, n (%)	311 (48.6)	105 (48.4)	0.958
Hypercholesterolemia, n (%)	201 (31.4)	70 (32.3)	0.816
Body mass index, kg/m ²	23.5±3.4	23.9±3.6	0.143
Myocardial Infarction, n (%)	294 (45.9)	135 (62.2)	<0.0001

Data presented are mean value±SD or number of patients (%).

Figure 1. Oxidative Stress and Cardiovascular Disease

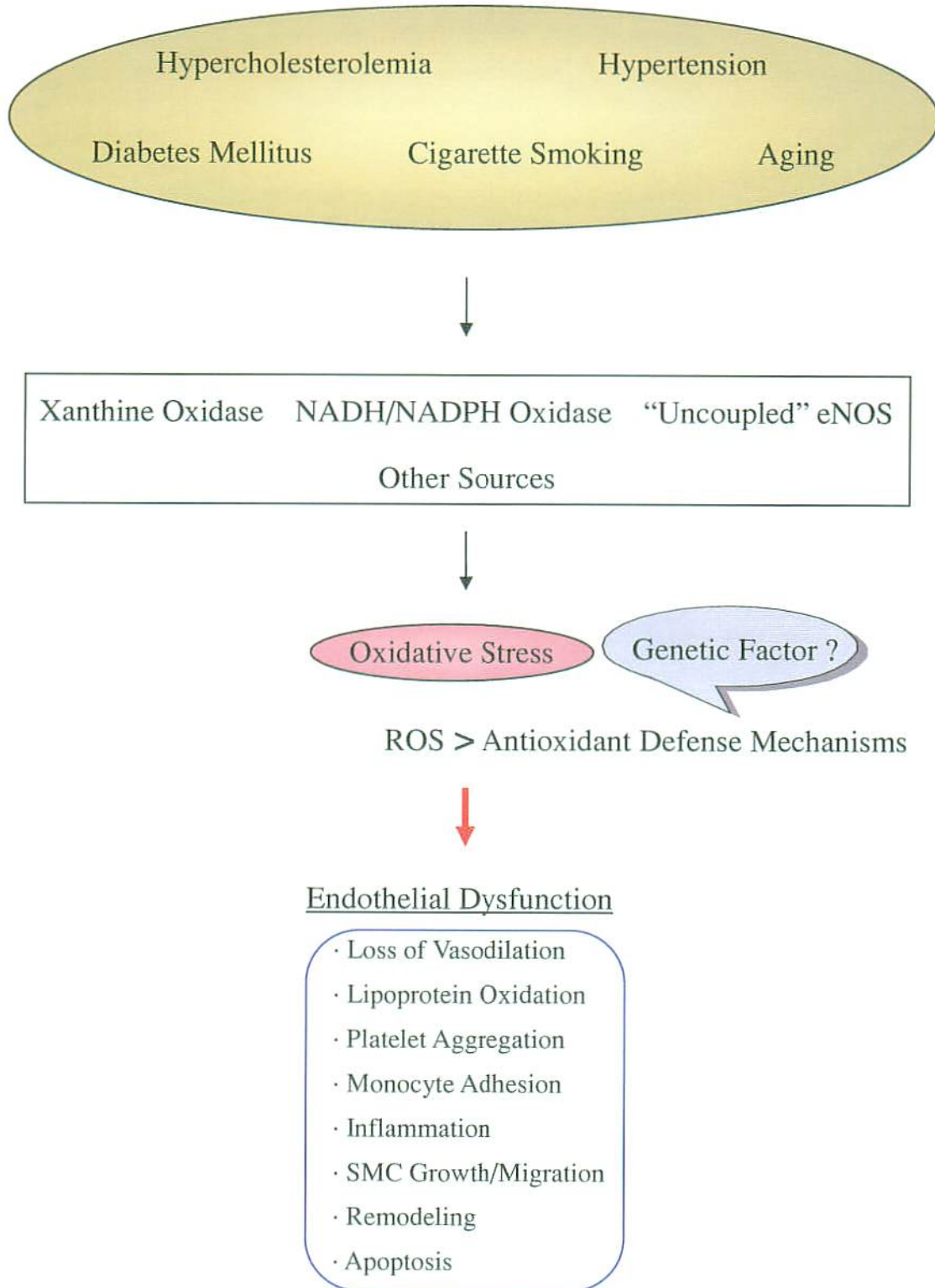


Figure 2. Schema for the GCL-GSH Pathway

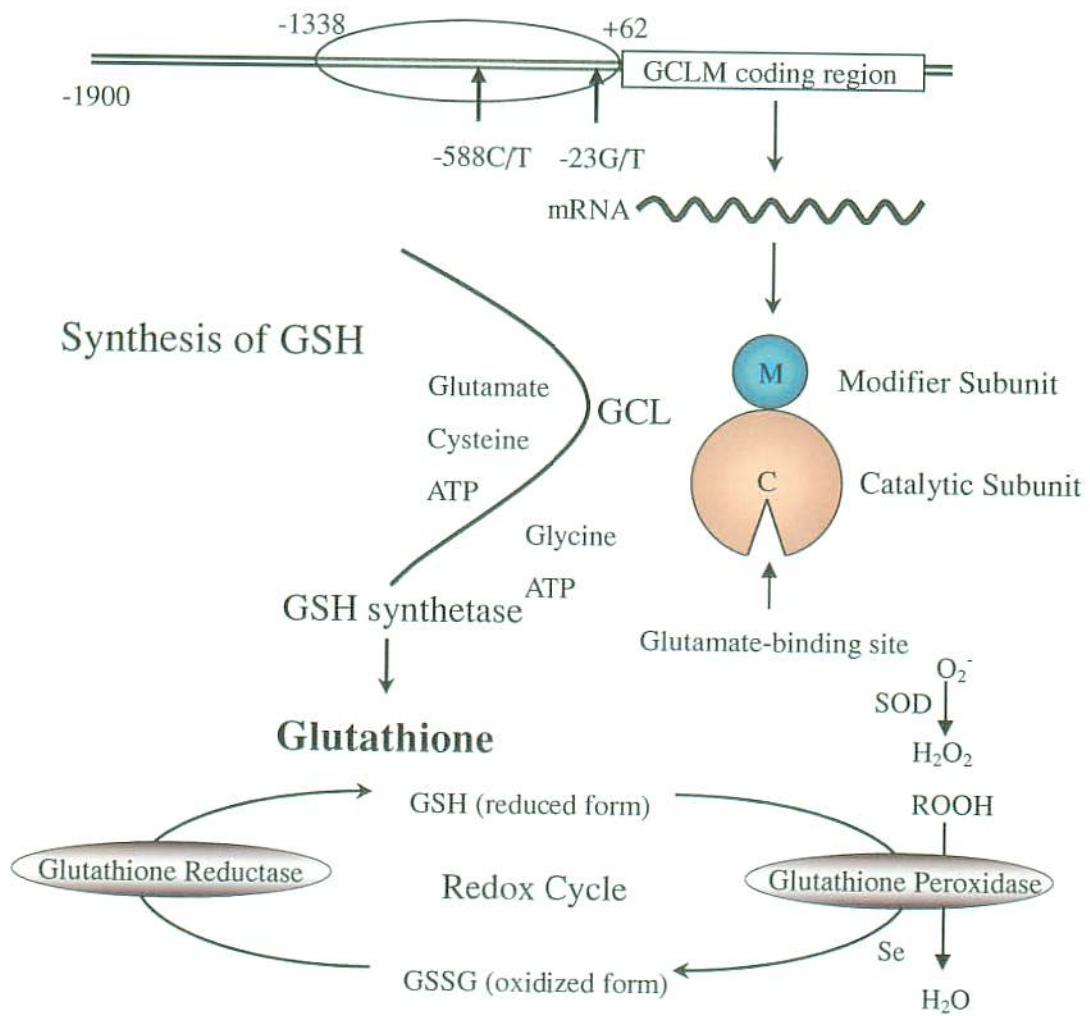


Figure 3. Structure of 5'-Flanking Region of the GCLM Gene (Nucleotide Position -1900 to +85) and Polymorphic Sites

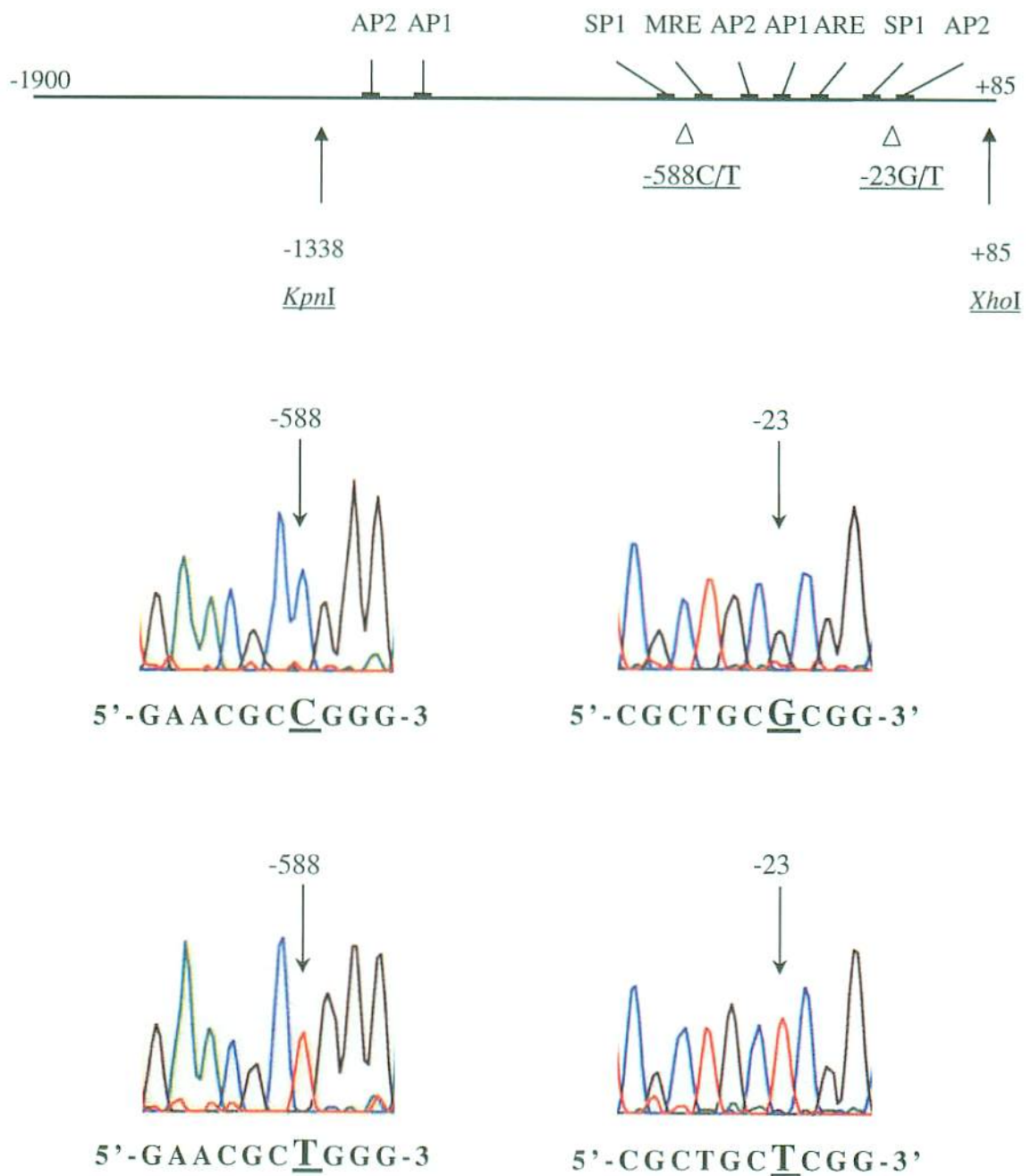
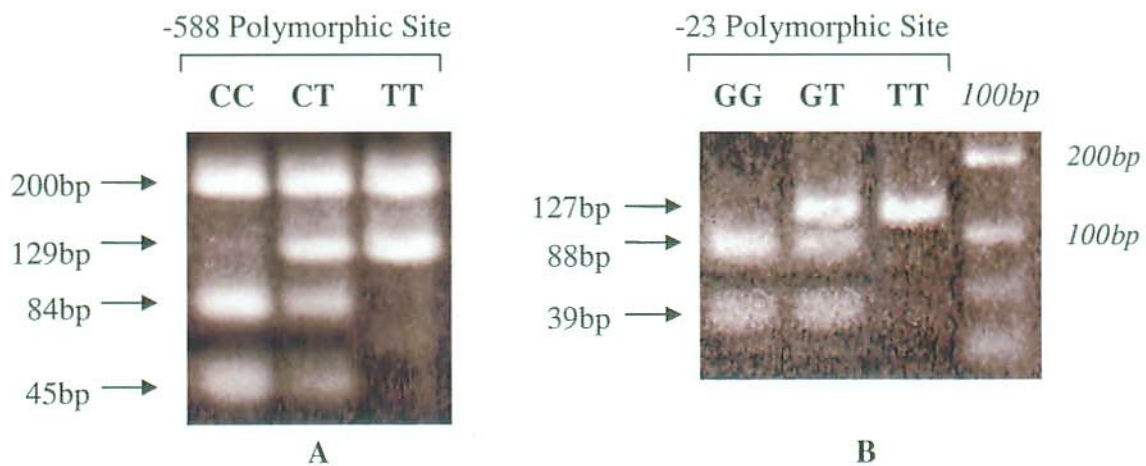
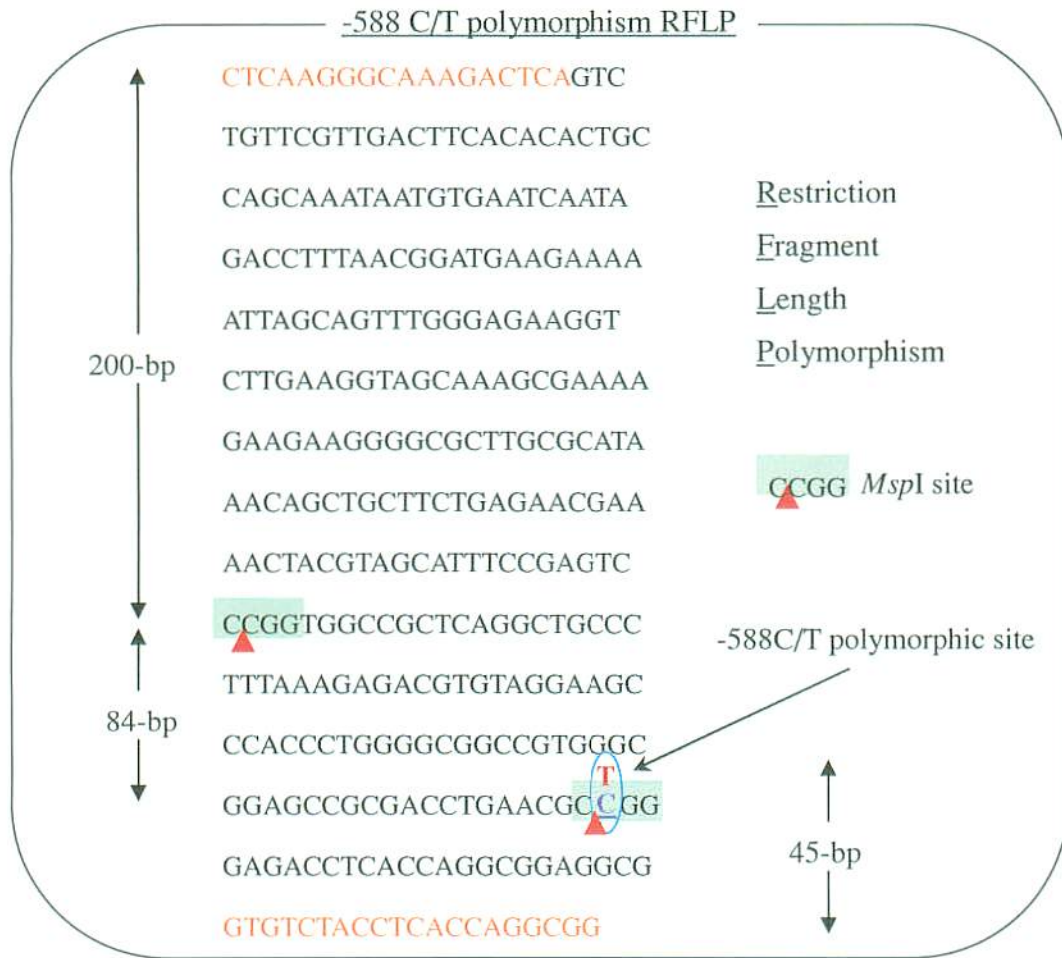


Figure 4. Genotyping



Ethidium bromide gels showing the three genotypes from polymorphisms (-588C/T and -23G/T) in the promoter region 588 bases upstream (A) and 23 bases upstream (B) of GCLM gene, respectively.

Figure 5. Recombinant Plasmid Constructions

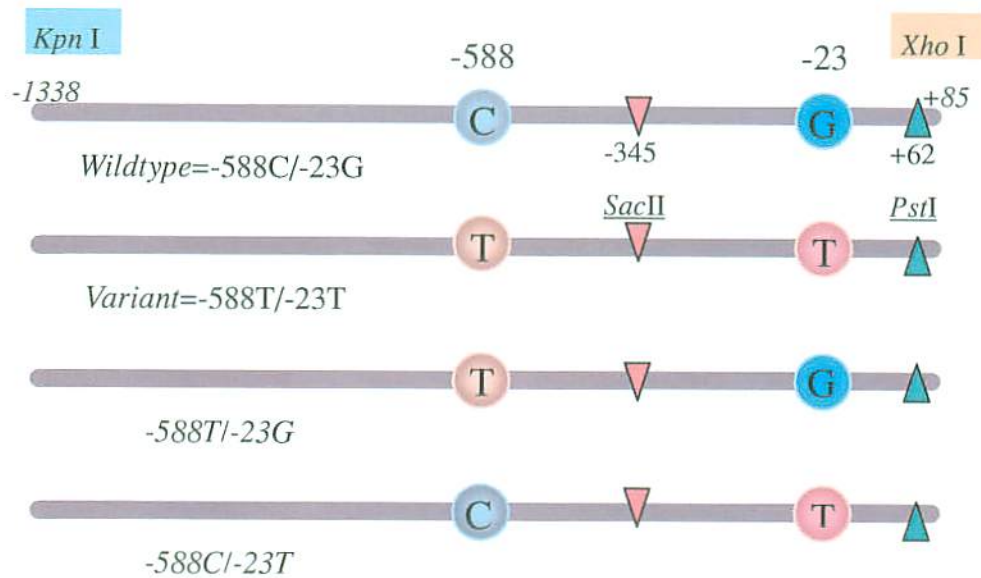
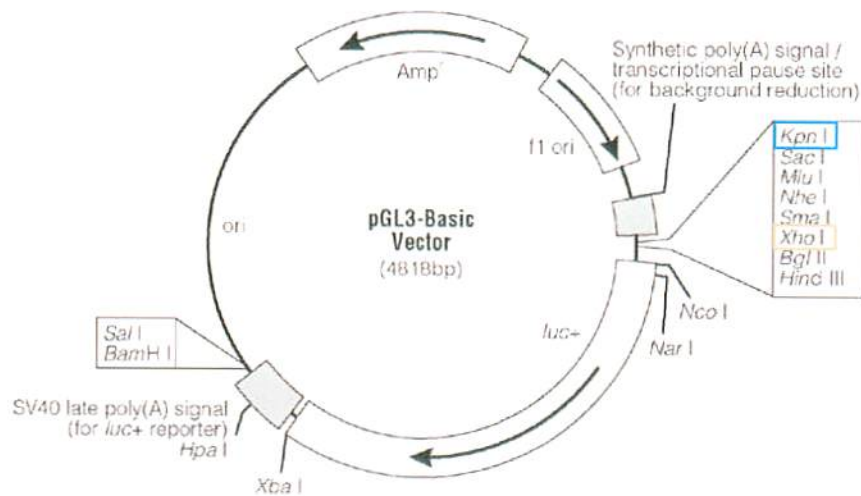
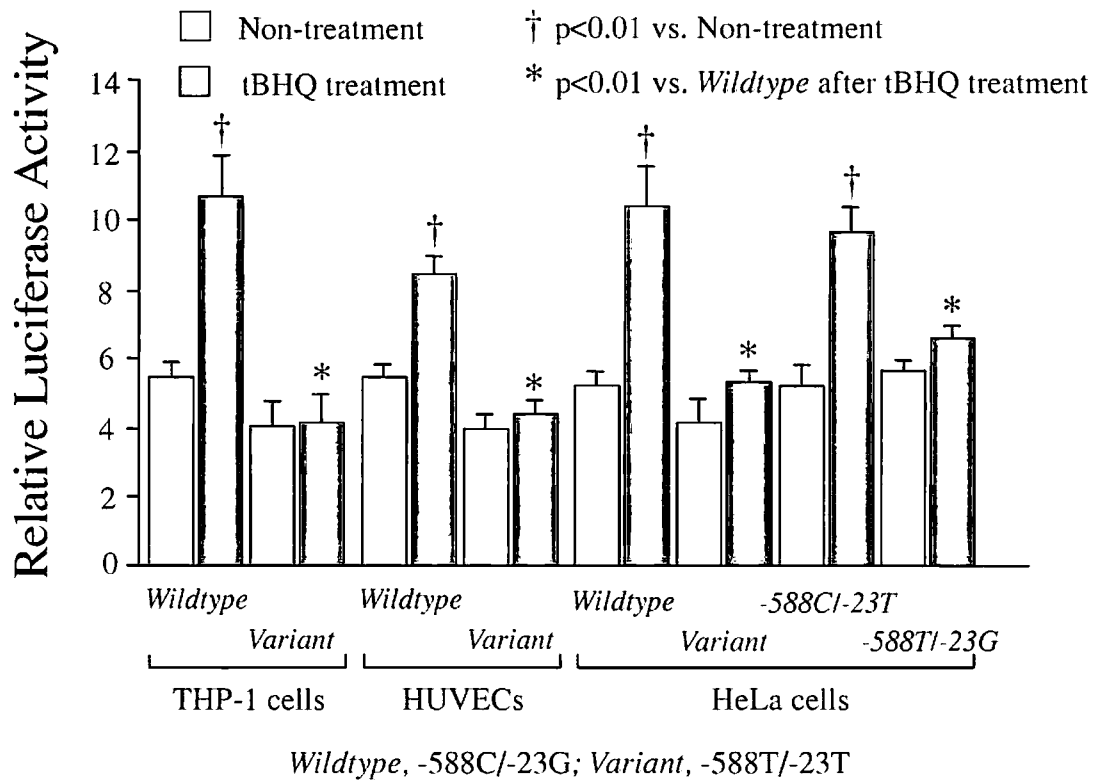
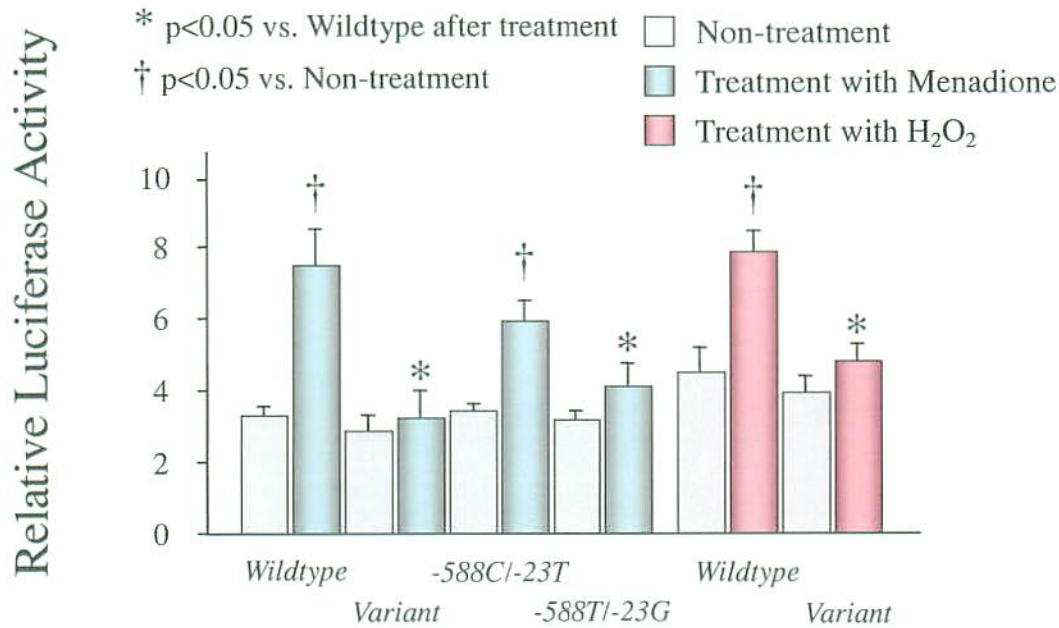


Figure 6. Effects of Polymorphisms on the Promoter Activity of GCLM Gene



Effects of polymorphisms on the promoter activity of GCLM gene. The promoter activity is expressed as relative luciferase activity normalized to Renilla activity. The transfected cells were incubated for 18 hr with or without tBHQ (100 $\mu\text{mol/L}$ for HUVECs and HeLa cells, 10 $\mu\text{mol/L}$ for THP-1 cells). *Wildtype* indicates the promoter construct containing major alleles, -588C and -23G alleles, *Variant*; the construct containing minor alleles, -588T and -23T alleles. -588C/-23T; the construct containing major C allele at -588 and minor T allele at -23, -588T/-23G; the construct containing minor T allele at -588 and major G allele at -23. Data are means \pm SEM (bars) values from eight independent experiments.

Figure 7. Effects of polymorphisms on the promoter activity of GCLM gene



Effects of polymorphisms on the promoter activity of GCLM gene. The promoter activity is expressed as relative luciferase activity normalized to Renilla activity. The transfected cells (HeLa cells) were incubated for 18 hr with or without 10 $\mu\text{mol/L}$ of menadione or 100 $\mu\text{mol/L}$ of H_2O_2 . *Wildtype* indicates the promoter construct containing major alleles, -588C and -23G alleles, *Variant*; the construct containing minor alleles, -588T and -23T alleles, -588C/-23T; the construct containing major C allele at -588 and minor T allele at -23, -588T/-23G; the construct containing minor T allele at -588 and major G allele at -23. Data are means \pm SEM (bars) values from eight independent experiments.

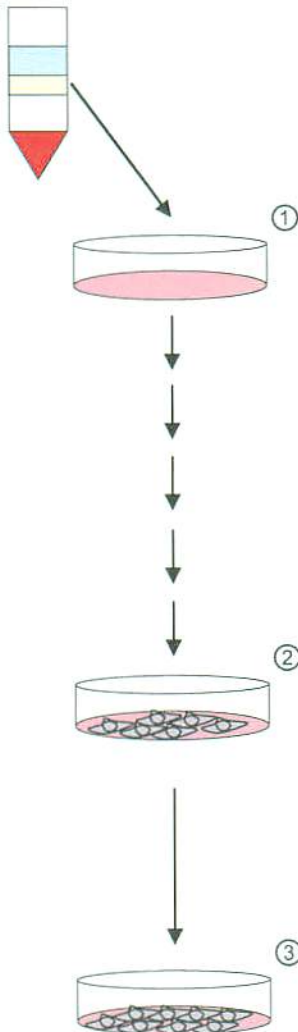
Figure 8. Preparation and Culture of Human Monocytes Macrophages

Whole blood from risk factor matched subjects

CC Genotype: n=19

CT Genotype: n=19

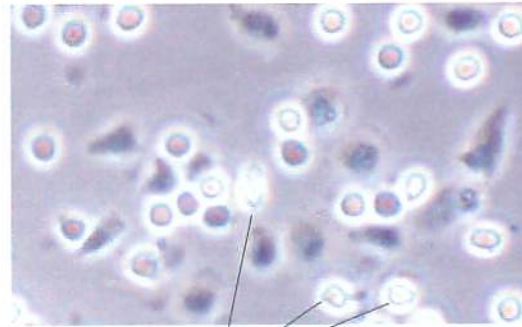
NycoPrep™ 1.068



① Mononuclear cells were plated for 2 hours.



The non-adherent cells were removed by washing.



Non-adherent cells

② After 5-days of culture, the monocytes-macrophages were washed and then treated for 18 hours with 50 $\mu\text{mol/L}$ of tBHQ or vehicle.

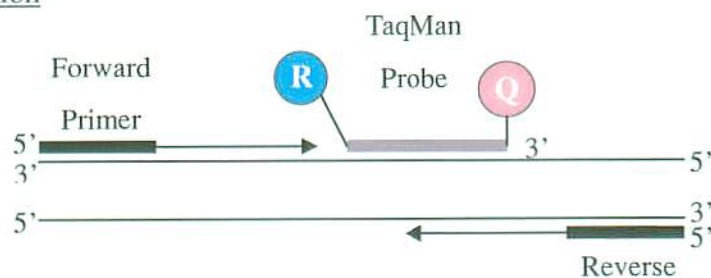
③ Total RNA was extracted with a Qiagen RNeasy Kit and DNase I (QIAGEN).



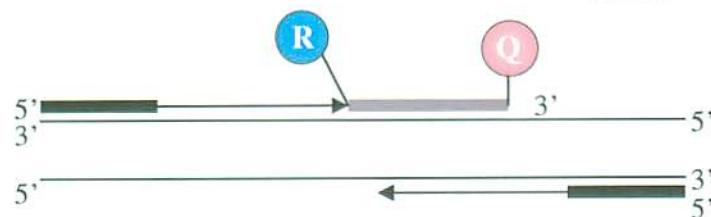
The expression of the GCLM mRNA was quantified by a real-time one-step RT-PCR assay (ABI PRISM 7700).

Figure 9. The fork-like-structure-dependent, polymerization associated, 5'-3' nuclease activity of *rTth* DNA Polymerase during PCR.

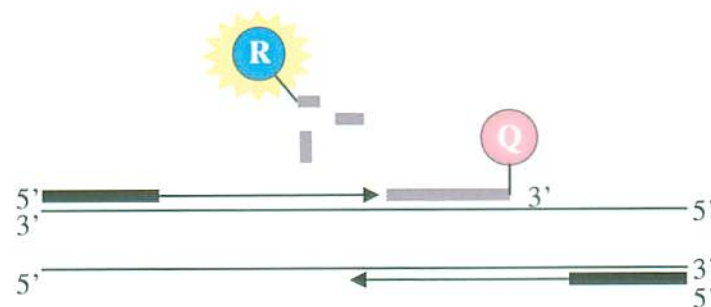
Polymerization



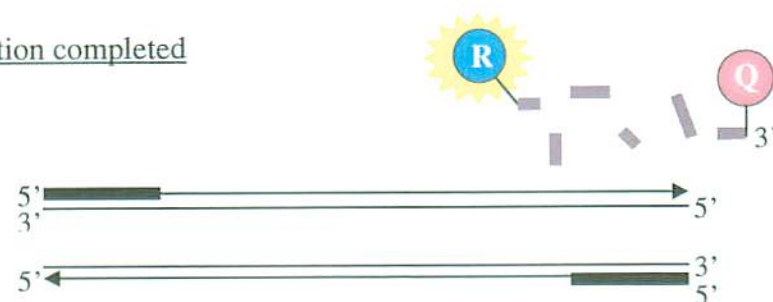
Strand displacement



Cleavage

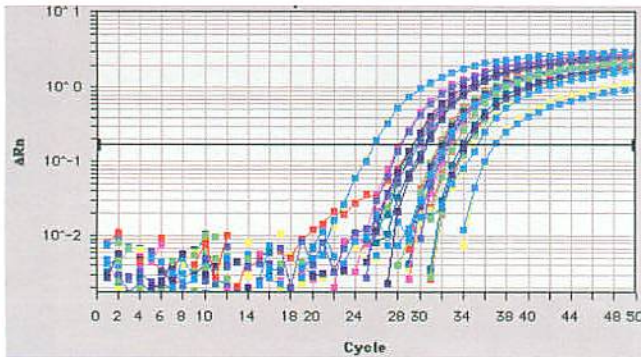


Polymerization completed



-  Reporter
-  Quencher

Figure 10. Real-Time RT-PCR for GCLM and GAPDH (ABI PRISM 7700)



GCLM

Forward;

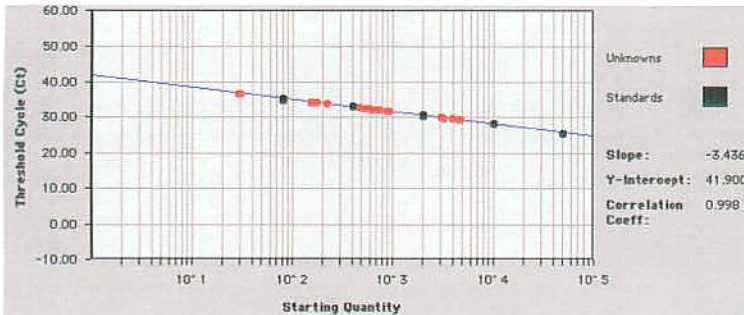
TTGACATGGCCTGTTCAGTCCT

Reverse;

CCAGTAAGGCTGTAAATGCTCCA

Taqman probe;

AGTTGCACAGCTGGATTCTGTGATCATTGC



GAPDH

Forward;

GAAGGTGAAGGTCGGAGT

Reverse;

GAAGATGGTGATGGGA

Taqman probe;

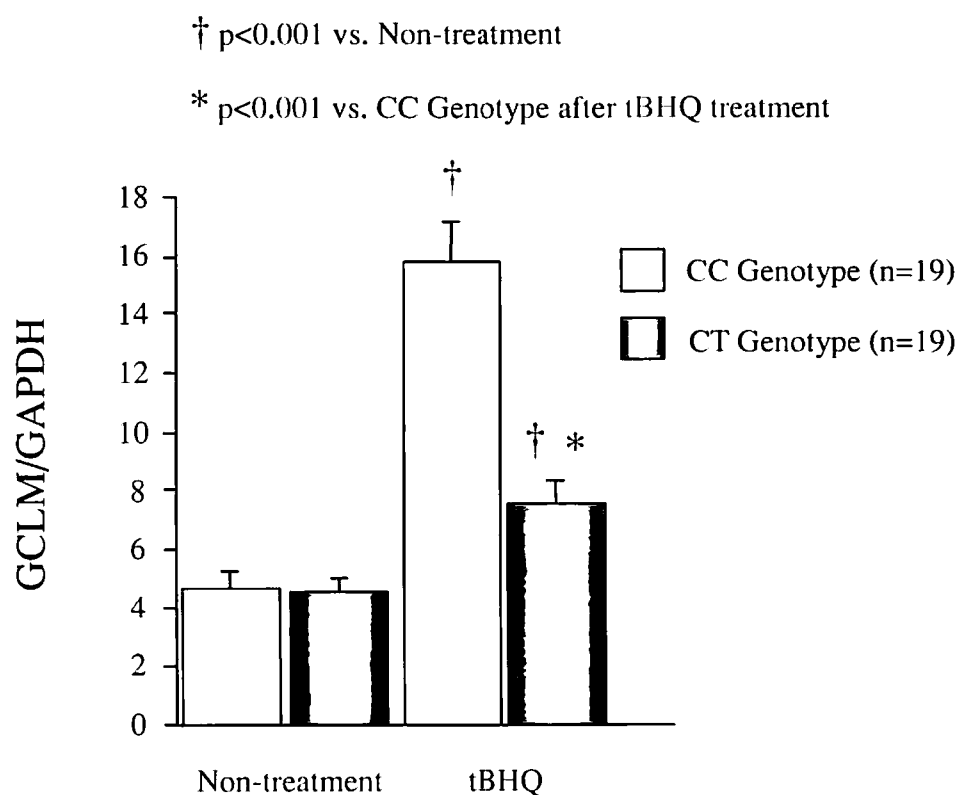
CCGACTCTTGCCCTTCGAAC

Clinical Characteristics of Study Patients Examined for GCLM mRNA Expression in the Cultured Human Monocytes-Macrophages

	C/C Genotype (n=19)	C/T Genotype (n=19)	P
Age, y	65±10	65±10	N.S
Men/Women	11/8	10/9	N.S
Hypertension, n (%)	9 (47.3)	8 (42.1)	N.S
Diabetes mellitus, n (%)	4 (21.2)	3 (15.8)	N.S
Cigarette smoking, n (%)	6 (31.6)	6 (31.6)	N.S
Myocardial infarction, n (%)	4 (21.1)	5 (26.3)	N.S
Total cholesterol (mg/dL)	197±41	211±25	N.S
LDL-C (mg/dL)	120±30	121±34	N.S
HDL-C (mg/dL)	47±8	55±21	N.S
Triglyceride (mg/dL)	160±80	170±88	N.S

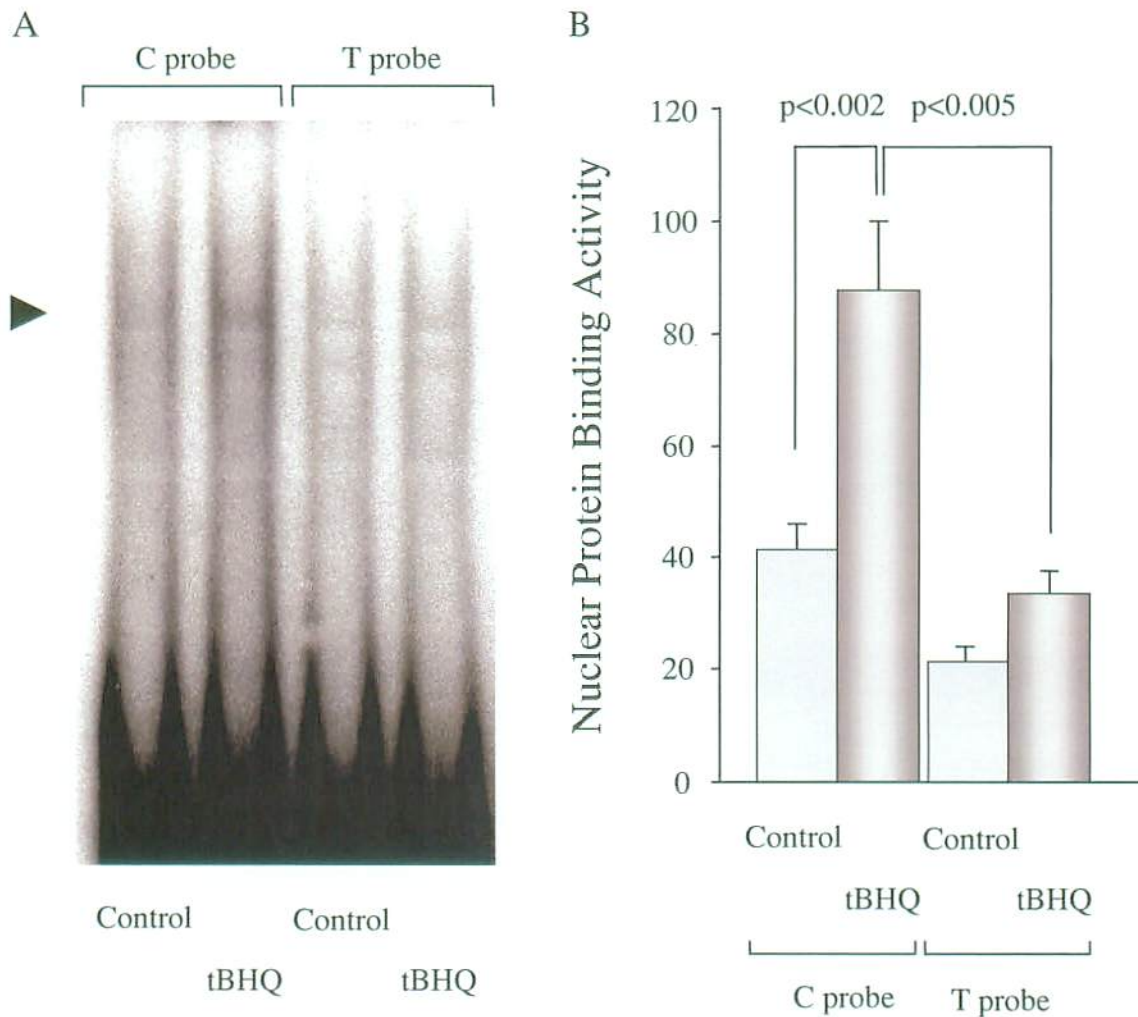
Data presented are mean value±SD or number of patients (%).

Figure 11. GCLM mRNA Expression in Cultured Human Monocytes-Macrophages



GCLM mRNA expression in cultured human monocytes-macrophages. The cultured cells were incubated with or without 50 $\mu\text{mol/L}$ of tBHQ for 18 hr. The levels of mRNA expression of GCLM were expressed as a ratio of its own expression to GAPDH expression. Values are expressed as mean \pm SEM (bars) of the results obtained from 19 subjects in each genotype.

Figure 12. Electrophoretic Mobility Shift Assay



(A) The effects of oxidant stress to the binding activity of one or more nuclear proteins prepared from THP-1 cells to the sequence surrounding the -588 polymorphic site. THP-1 cells were exposed to 50 $\mu\text{mol/L}$ of tBHQ for 12 hours. An arrow indicates the binding of one nuclear protein factor to oligonucleotide probes with C and T allele. The result shown is a representative of seven independent experiments.

(B) Data are mean \pm SEM (bars) values from seven independent experiments.

Figure 13.

Plasma GSH Assay

EDTA-Plasma + acivicin (γ -glutamyltranspeptidase inhibitor)



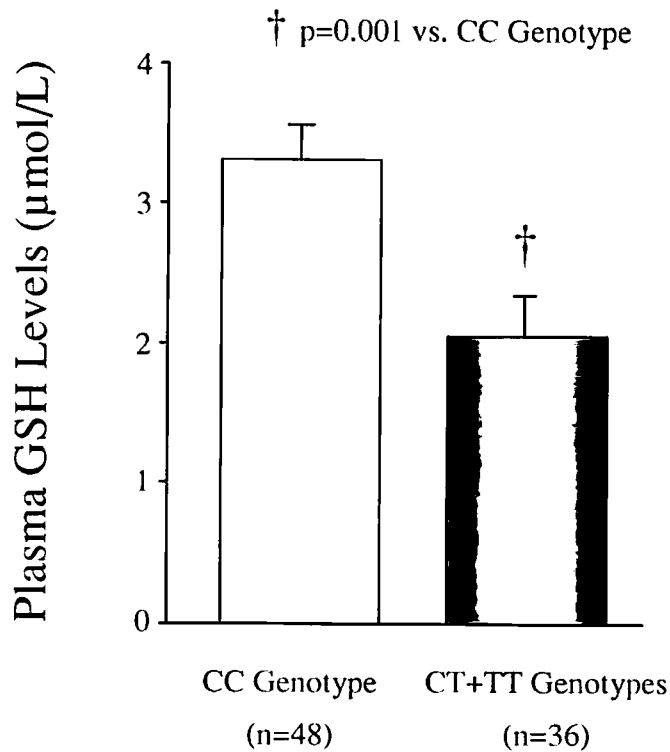
HPLC with electrochemical method

Clinical Characteristics of Study Subjects Examined for Plasma GSH Levels

	CC Genotype (n=48)	CT+TT Genotypes (n=36)	<i>P</i>
Age, y	61±8	59±11	N.S
Men/Women	20/48	12/36	N.S
Hypertension, n (%)	27 (56.3)	12 (33.3)	0.037
Diabetes mellitus, n (%)	16 (33.3)	7 (19.4)	N.S
Cigarette smoking, n (%)	24 (50.0)	17 (47.2)	N.S
Myocardial infarction, n (%)	8 (16.7)	4 (11.1)	N.S
Hypercholesterolemia, n (%)	21 (43.8)	8 (22.2)	0.040
Body mass index, kg/m ²	23.8±3.1	23.2±2.9	N.S

Data presented are mean value±SD or number of patients (%).

Figure 14. Plasma GSH Levels in CC Genotype and CT+TT Genotypes



Plasma GSH levels in CC genotype and CT+TT genotypes. Traditional risk factors and frequency of previous MI were matched between the selected subjects with CC genotype and CT+TT genotypes. Values are expressed as mean±SEM (bars) of the results obtained from 48 subjects in CC genotype and 36 subjects in CT+TT genotypes (CT:34; TT:2).

10) 参 考 文 献

- [1] Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997;96(10):3264-3265.
- [2] Kugiyama K, Kerns S, Morrisett J, Roberts R, Henry P. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344(6262):160-162.
- [3] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87(10):840-844.
- [4] Vita JA, Frei B, Holbrook M, Gokce N, Leaf C, Keaney JFJ. L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylic acid reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 1998;101(6):1408-1414.
- [5] Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000;87(5):349-354.
- [6] Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989;70(6):737-757.
- [7] Sugiyama S, Kugiyama K, Ogata N, Doi H, Ota Y, Ohgushi M, Matsumura T, Oka H, Yasue H. Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-kappaB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(4):568-576.
- [8] Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91(6):2546-2551.
- [9] Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial

- cells. *J Clin Invest* 1993;92(4):1866-1874.
- [10] Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993;68(5):499-508.
- [11] Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Yasue H. Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. *Am J Physiol* 1994;266(3 PT 2):H874-880.
- [12] Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, Ohgushi M, Matsumura T, Doi H, Ogata N, Oka H, Yasue H. Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract--role of free radicals and attenuation by captopril. *Atherosclerosis* 1997;131(2):195-202.
- [13] Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K, Yoshimura M, Motoyama T, Inobe Y, Kawano H. Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation* 1996;94(3):266-271.
- [14] Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, Hirashima O, Sugiyama S. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. *J Am Coll Cardiol* 1996;28(5):1161-1167.
- [15] Keaney Jr JF, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celentano J, Shwaery GT, Loscalzo J, Vita JA. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(24):11880-11884.
- [16] Keaney Jr JF, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 1995;95(6):2520-2529.
- [17] Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney Jr JF, Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996;93(6):1107-1113.

- [18] Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7725-7729.
- [19] Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, Ross R. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest* 1994;94(1):155-164.
- [20] Sugiyama S, Kugiyama K, Ohgushi M, Matsumura T, Ota Y, Doi H, Ogata N, Oka H, Yasue H. Supersensitivity of atherosclerotic artery to constrictor effect of cigarette smoke extract. *Cardiovasc Res* 1998;38(2):508-515.
- [21] Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. *Am J Physiol* 1997;273(4 PT 2):H1644-1650.
- [22] Kugiyama K, Motoyama T, Hirashima O, Ohgushi M, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Yasue H. Vitamin C attenuates abnormal vasomotor reactivity in spasm coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(1):103-109.
- [23] Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(6):1672-1679.
- [24] Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Hirashima O, Soejima H, Misumi K, Yoshimura M, Ogawa H, Sugiyama S, Yasue H.

- Intracoronary infusion of reduced glutathione improves endothelial vasomotor response to acetylcholine in human coronary circulation. *Circulation* 1998;97(23):2299-2301.
- [25] Kugiyama K, Motoyama T, Doi H, Kawano H, Hirai N, Soejima H, Miyao Y, Moriyama Y, Mizuno Y, Tsunoda R, Ogawa H, Sakamoto T, Sugiyama S, Yasue H. Improvement of endothelial vasomotor dysfunction by treatment with alpha-tocopherol in patients with high remnant lipoproteins levels. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(6):1512-1518.
- [26] Kugiyama K, Sugiyama S, Soejima H, Kawano H, Sakamoto T, Takazoe K, Ogawa H, Doi H, Yasue H. Increase in plasma levels of oxidized low-density lipoproteins in patients with coronary spastic angina. *Atherosclerosis* 2001;154(2):463-467.
- [27] Oka H, Kugiyama K, Doi H, Matsumura T, Shibata H, Miles L, Sugiyama S, Yasue H. Lysophosphatidylcholine induces urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human macrophages partly through redox-sensitive pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(1):244-250.
- [28] Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328(20):1444-1449.
- [29] Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328(20):1450-1456.
- [30] Cho S, Hazama M, Urata Y, Goto S, Horiuchi S, Sumikawa K, Kondo T. Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26(5-6):589-602.
- [31] Makino Y, Okamoto K, Yoshikawa N, Aoshima M, Hirota K, Yodoi J, Umesono K, Makino I, Tanaka H. Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant

- defense system. *J Clin Invest* 1996;98(11):2469-2477.
- [32] Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, Pill J, Wagner M, Kamencic H, Hou D, Chen M, Schmiedt W, Schrader M, Kovacs G, Kato K, Metz J. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J* 1997;11(14):1317-1328.
- [33] Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-760.
- [34] Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999;277(6 PT 1):L1067-1088.
- [35] Tsuchiya K, Mulcahy RT, Reid LL, Disteché CM, Kavanagh TJ. Mapping of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene (GLCLC) to human chromosome 6p12 and mouse chromosome 9D-E and of the regulatory subunit gene (GLCLR) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3H1-3. *Genomics* 1995;30(3):630-632.
- [36] Sierra-Rivera E, Summar ML, Dasouki M, Krishnamani MR, Phillips JA, Freeman ML. Assignment of the gene (GLCLC) that encodes the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase to human chromosome 6. *Cytogenet Cell Genet* 1995;70(3-4):278-279.
- [37] Sierra-Rivera E, Dasouki M, Summar ML, Krishnamani MR, Meredith M, Rao PN, Phillips JA 3, Freeman ML. Assignment of the human gene (GLCLR) that encodes the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase to chromosome 1p21. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72(2-3):252-254.
- [38] Tian L, Shi MM, Forman HJ. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* 1997;342(1):126-133.
- [39] Huang CS, Anderson ME, Meister A. Amino acid sequence and

- function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1993;268(27):20578-20583.
- [40] Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1993;268(26):19675-19680.
- [41] Mulcahy RT, Bailey HH, Gipp JJ. Transfection of complementary DNAs for the heavy and light subunits of human gamma-glutamylcysteine synthetase results in an elevation of intracellular glutathione and resistance to melphalan. *Cancer Res* 1995;55(21):4771-4775.
- [42] Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, Gipp JJ. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem* 1997;272(11):7445-7454.
- [43] Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem* 1998;273(24):14683-14689.
- [44] Galloway DC, Blake DG, Shepherd AG, McLellan LI. Regulation of human gamma-glutamylcysteine synthetase: co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells. *Biochem J* 1997;328(Pt 1):99-104.
- [45] Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* 1994;269(42):26512-26517.
- [46] Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt

- 1):L861-869.
- [47] Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, Robinson K, Khoury P, Daniels SR. Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease. *Circulation* 1999;100(22):2244-2247.
- [48] Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg Jr P, Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998;24(5):699-704.
- [49] Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002;20(1):61-66.
- [50] Murphy ME, Piper HM, Watanabe H, Sies H. Nitric oxide production by cultured aortic endothelial cells in response to thiol depletion and replenishment. *J Biol Chem* 1991;266(29):19378-19383.
- [51] Ghigo D, Alessio P, Foco A, Bussolino F, Costamagna C, Heller R, Garbarino G, Pescarmona GP, Bosia A. Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;265(3 PT 1):C728-732.
- [52] Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2002;163(1):17-28.
- [53] Chen TS, Richie JP, Nagasawa HT, Lang CA. Glutathione monoethyl ester protects against glutathione deficiencies due to aging and acetaminophen in mice. *Mech Ageing Dev* 2000;120(1-3):127-139.
- [54] Kugiyama K, Miyao Y, Sakamoto T, Kawano H, Soejima H, Miyamoto S, Yoshimura M, Ogawa H, Sugiyama S, Yasue H. Glutathione attenuates coronary constriction to acetylcholine in patients with coronary spastic angina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(1):H264-271.
- [55] Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M, Quyyumi AA. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric

- oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(2):507-514.
- [56] Doi H, Kugiyama K, Oka H, Sugiyama S, Ogata N, Koide S, Nakamura S, Yasue H. Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. *Circulation* 2000;102(6):670-676.
- [57] Beutler E, Gelbart T, Kondo T, Matsunaga AT. The molecular basis of a case of gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood* 1999;94(8):2890-2894.
- [58] Ristoff E, Augustson C, Geissler J, de Rijk T, Carlsson K, Luo JL, Andersson K, Weening RS, van Zwieten R, Larsson A, Roos D. A missense mutation in the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. *Blood* 2000;95(7):2193-2196.
- [59] Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kiyotaka K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1506-1510.
- [60] Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997;90(7):2730-2737.
- [61] Ogata N, Yamamoto H, Kugiyama K, Yasue H, Miyamoto E. Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2000;45(2):513-521.
- [62] Matsumura T, Kugiyama K, Sugiyama S, Ota Y, Doi H, Ogata N, Oka H, Yasue H. Suppression of atherosclerotic development in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits treated with an oral antiallergic drug, tranilast. *Circulation* 1999;99(7):919-924.
- [63] Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal*

- Biochem* 1997;247(1):63-68.
- [64] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20(7):1183-1197.
- [65] Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991;266(18):11632-11639.
- [66] Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry* 1995;34(1):81-88.
- [67] Ng D, Kokot N, Hiura T, Faris M, Saxon A, Nel A. Macrophage activation by polycyclic aromatic hydrocarbons: evidence for the involvement of stress-activated protein kinases, activator protein-1, and antioxidant response elements. *J Immunol* 1998;161(2):942-951.
- [68] Li N, Venkatesan MI, Miguel A, Kaplan R, Gujuluva C, Alam J, Nel A. Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* 2000;165(6):3393-3401.
- [69] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10(8):2247-2258.
- [70] Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2000;28(4):625-635.
- [71] Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG, Nebert DW. Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(2):324-329.
- [72] Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals.

- J Biol Chem* 1994;269(13):9397-9400.
- [73] Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* 1986;314(14):892-902.
- [74] Dincer Y, Akcay T, Konukoglu D, Hatemi H. Erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in patients with coronary atherosclerosis. *Acta Med Okayama* 1999;53(6):259-264.
- [75] Singh RB, Ghosh S, Niaz MA, Singh R, Beegum R, Chibo H, Shoumin Z, Postiglione A. Dietary intake, plasma levels of antioxidant vitamins, and oxidative stress in relation to coronary artery disease in elderly subjects. *Am J Cardiol* 1995;76(17):1233-1238.
- [76] Jain A, Martensson J, Mehta T, Krauss AN, Auld PA, Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(11):5093-5097.
- [77] Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. Initial Characterization the Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit *Gclm(-/-)* Knockout mouse. *J Biol Chem* 2002;277(51):49446-49452.
- [78] Tipnis SR, Blake DG, Shepherd AG, McLellan LI. Overexpression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases gamma-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance. *Biochem J* 1999;337(Pt 3):559-566.
- [79] Kijima H, Tsuchida T, Kondo H, Iida T, Oshika Y, Nakamura M, Scanlon KJ, Kondo T, Tamaoki N. Hammerhead ribozymes against gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA down-regulate intracellular glutathione concentration of mouse islet cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247(3):697-703.
- [80] Moinova HR, Mulcahy RT. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261(3):661-668.

- [81] Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, Cuccurullo F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97(19):1930-1934.
- [82] O'Brien M, Kruh GD, Tew KD. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(2):480-487.
- [83] Iwanaga M, Mori K, Iida T, Urata Y, Matsuo T, Yasunaga A, Shibata S, Kondo T. Nuclear factor kappa B dependent induction of gamma glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 1998;24(7-8):1256-1268.