

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15241

研究課題名(和文) タバコ成分の新規発がん機構の解明と、副流煙暴露による発がんに対する予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the novel mechanisms of carcinogenesis induced by the cigarette and development of cancer prevention for carcinogenesis by sidestream smoke

研究代表者

酒井 敏行 (Sakai, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20186993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、抗腫瘍免疫を担う「TRAIL経路」に対するタバコ成分の影響の検証を行った。まず、ヒト免疫細胞におけるTRAIL産生能に対するタバコ成分の影響を検討した。種々の条件について検討を行ったが、ニコチンのTRAIL発現抑制効果は認められなかった。また、文献から喫煙との因果関係が明らかとされているヒト膀胱癌細胞を用い、細胞増殖、アポトーシス阻害分子であるXIAP、survivinの発現量に対するタバコ成分の影響を検討した。その結果、種々の条件においても、細胞増殖促進効果は認められなかった。XIAP、survivinの発現増強に関して、今回の膀胱癌細胞では認められなかった。

研究成果の概要(英文)：TRAIL is a cytokine which can induce apoptosis against cancer cells and contribute to cancer prevention. We examined the effects of cigarette nicotine for "the TRAIL pathway". At first, we investigated the influence of the nicotine on the ability of TRAIL production in the human immune cells. As the results, nicotine did not suppress or induce the TRAIL expression in various kinds of conditions. In addition, we investigated the influence of the nicotine on cell proliferation and the expressions of anti-apoptotic molecules XIAP and survivin using human bladder cancer cells. As the results, nicotine did not suppress or enhance the cell proliferation, and the expressions of XIAP and survivin in various kinds of conditions.

研究分野：がん予防

キーワード：がん 予防 喫煙 がん細胞死 TRAIL

1. 研究開始当初の背景

がんは、我が国の疾患別死亡原因の第一位であり、その克服は国家的課題である。発がんにとって、タバコ成分が最も大きなリスク要因の一つであることは明らかである。加えて、厚生労働省の研究報告では、副流煙は主流煙に比して有害物質を数倍から 100 倍以上もの濃度で含むことが示されており、非喫煙者の受動喫煙による発がんリスクについて、近年広く研究が行われている。実際、我が国における複数の報告においても、副流煙によって生じる非喫煙者の受動喫煙と、がん罹患・死亡との関連性が日本人を対象とした疫学調査からも示されている (Int J Cancer, 114, 317, 2005)。受動喫煙は、公共の場、飲食店、職場環境あるいは家庭などの様々な場所や状況における公衆衛生上の問題の一つであり、がん予防を考える上でも重要な問題である。

申請者らは、これまでに抗腫瘍免疫を担うサイトカインの TRAIL が発がん抑制に極めて重要であること (J Immunol, 175, 5586, 2005) に着目し、TRAIL 経路の活性化によるがん予防を目指した研究を進めてきた (EHPM, 15, 203, 2010、他 17 報)。タバコ成分には免疫抑制能 (Inflamm Res, 57, 497, 2008) が知られているが、免疫機能の調節は非常に複雑であり、タバコ成分の影響は未だ十分には解明されていない。そこで申請者らは、タバコ成分によって、生体内での TRAIL 発現調節機構に異常が生じ、その結果が発がんの一助となっている可能性を考えた。

一方、タバコ成分に曝露されたがん細胞が、アポトーシス阻害分子である XIAP と survivin の発現増加によって抗がん剤に対する耐性を獲得しているという報告がなされたことから (PNAS, 103, 6332, 2006)、タバコ成分による発がん予防やがん治療において、XIAP と survivin が重要な分子であることが判ってきている。今回、タバコ成分がヒトがん細胞に対し、XIAP と survivin の発現増加による TRAIL 耐性の獲得に寄与しているという可能性を考えた。その発現誘導を、がん予防成分によって抑えることができれば、アポトーシスは実行される。近年、我々は、身近に購入できる NSAIDs のイブプロフェンが、ヒトがん細胞に対し、XIAP と survivin の発現を抑え、TRAIL 誘導性のアポトーシスを増強することを見出し、報告している (Oncol Rep, 30, 2379, 2013)。タバコ成分によるがん細胞のアポトーシス耐性に対する、NSAIDs の有効性については未知である。

2. 研究の目的

ヒト免疫細胞における、TRAIL 産生に対するタバコ成分の影響について検証する。

タバコ成分によるがん細胞のアポトーシス耐性に対する、NSAIDs のイブプロフェンの有効性について検証する。

3. 研究の方法

ヒト免疫細胞における TRAIL 産生能に対する、タバコ成分の影響の検討

健常人ボランティアよりインフォームド・コンセントを得た後、採血を行い、ヒト正常末梢血単核球 (PBMC) および好中球 (PMN) を分離した。タバコ成分としてニコチンを使用した。ニコチンの曝露によって、PBMC および PMN からの TRAIL 産生量に及ぼす影響について、定常レベルと免疫賦活剤存在下において検討した。フローサイトメトリー (細胞表面 TRAIL 発現量) および ELISA (培養上清中 TRAIL 量) にて評価を行った。

癌細胞の増殖に対するタバコ成分の影響の検討

多くの文献から、肺がん、大腸がん、膀胱がんが喫煙との因果関係が明らかにされている。さらにニコチン曝露によって、癌細胞の増殖が促進するという報告に着目し、ヒト膀胱癌 T24 細胞を用い、ニコチン曝露が細胞増殖におよぼす影響について検討した。

癌細胞のアポトーシス阻害分子 XIAP、survivin の発現量に対するタバコ成分の影響の検討

既報では、ヒト肺がん細胞において、ニコチン曝露による、XIAP、survivin の発現増強効果が認められている。本研究では、ヒト膀胱癌細胞に対し、同様に XIAP、survivin の発現増強効果が認められるか否か、Western blotting によって検討した。

TRAIL 感受性に対するタバコ成分の影響の検討

ニコチン曝露によって、TRAIL 誘導性アポトーシスが減弱するか否か、フローサイトメトリーによって検討した。

4. 研究成果

ヒト免疫細胞における TRAIL 産生能に対する、タバコ成分の影響の検討

PBMC、PMN の細胞表面の TRAIL 発現量に対するニコチンに影響はほとんど認められなかった (図 1、2: ニコチン添加後 6 時間のデータ)。その他、曝露時間については、24、48、72 時間と検討を行ったが定常レベルの TRAIL 産生量に対しても、乳酸菌刺激による TRAIL 誘導に対しても、目立ったニコチンの影響は認められなかった。

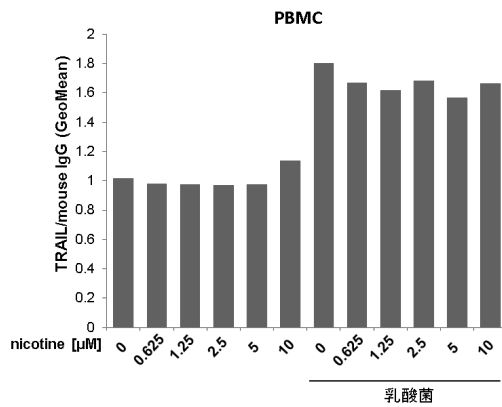


図1 PBMC細胞表面におけるTRAIL発現量に対するニコチンの影響
 <フローサイトメトリー>

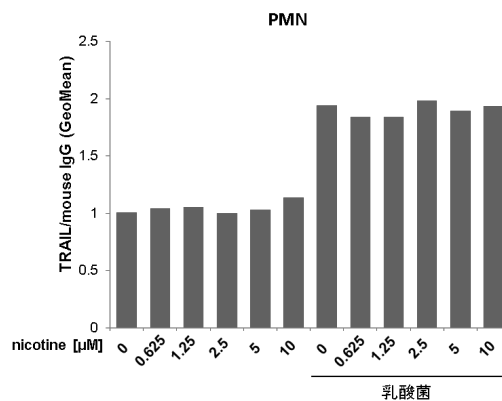


図2 PMN細胞表面におけるTRAIL発現量に対するニコチンの影響
 <フローサイトメトリー>

次に、ニコチン添加後 3 時間と 6 時間に PMN 培養上清を回収し、TRAIL ELISA にて TRAIL 量を測定した (図 3)。TRAIL 産生能について有意差はあるものの、効果は弱いという結果であった。

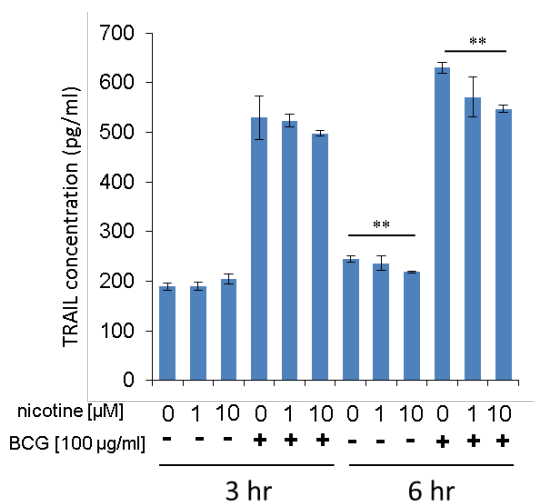


図3 PMN培養上清におけるTRAIL量に対するニコチンの影響
 <ELISA>

癌細胞の増殖に対するタバコ成分の影響の検討

ニコチン曝露が、ヒト膀胱癌 T24 細胞の増殖速度におよぼす影響について検討した (図 4)。細胞の播種数、ニコチン曝露時間、培養上清の連日交換など、種々の条件について検討を行ったが、ニコチン曝露によって増殖が増すという現象は認められなかった。

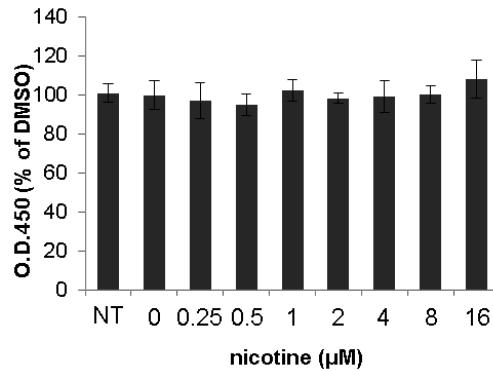


図4 ヒト膀胱癌T24細胞における細胞増殖に対するニコチンの影響 day7
 <WST-8 assay>

癌細胞のアポトーシス阻害分子 XIAP、survivin の発現量に対するタバコ成分の影響の検討

ヒト膀胱癌細胞 3 株に対し、ニコチン曝露による、XIAP、survivin の発現増強効果が認められるか否か、Western blotting によって検討したが、いずれの細胞においても、ニコチンの影響は認められなかった (図 5)。

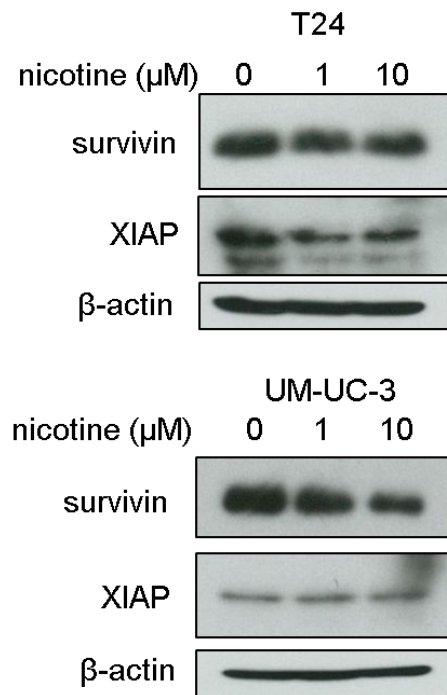


図5-1 ヒト膀胱癌T24細胞、UM-UC-3細胞におけるアポトーシス阻害因子の発現に対するニコチンの影響 (48時間) <Western blotting>

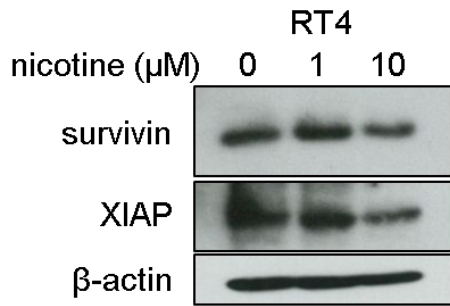


図5-2 ヒト膀胱癌RT4細胞におけるアポトーシス阻害因子の発現に対するニコチンの影響 (48時間)
<Western blotting>

TRAIL 感受性に対するタバコ成分の影響の検討

TRAIL (100 ng/ml) 添加によるアポトーシスが、ニコチン曝露によって、減弱するか否か、フローサイトメトリーによって検討した (図6)。曝露時間など種々の条件について検討を行った結果、ニコチンによる TRAIL 誘導性アポトーシスへの影響は認められなかった。

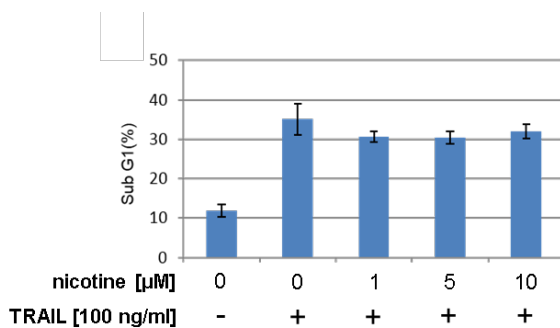


図6 膀胱癌に対するTRAIL誘導アポトーシスに対するニコチンの影響
<フローサイトメトリー>

以上より、本研究期間内に行った実験の結果からは、タバコ成分による膀胱癌細胞のアポトーシス耐性に対する寄与が認められなかったことから、NSAIDs を用いたアポトーシス耐性克服の検討実験は行っていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 敏行
(SAKAI, Toshiyuki)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：20186993

(2)研究分担者

友杉 (堀中) 真野
(TOMOSUGI (HORINAKA), Mano)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80512037

(3)連携研究者

()

研究者番号：