

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659129

研究課題名（和文）タバコ煙中傷害因子による細胞傷害の分子機構の解明と無害化方法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of cell damage by cigarette smoke extract and development of cigarette smoke detoxification methods

研究代表者

三輪 聡一 (MIWA SOICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40157706

研究成果の概要（和文）：喫煙は動脈硬化症の危険因子の一つである。申請者らはタバコ主流煙に含まれる細胞傷害成分として複数のカルボニル化合物を同定した。これらの化合物はグリオーマ細胞において、細胞内カルシウム依存的に PKC を活性化し、細胞膜傷害及びアポトーシスを誘導した。更にこれらの化合物は、血管壁構成細胞や血球系細胞においても細胞内カルシウム依存的に細胞傷害を惹起すること、また単球からマクロファージへの分化を促進することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Cigarette smoking is one of the major risks for atherosclerosis. We have identified several carbonyl compounds responsible for cell injury from cigarette main stream. These chemicals activated PKC and caused cell membrane damages and apoptosis in intracellular Ca^{2+} -dependent manner in rat glioma C6 cells.. Furthermore, these compounds also caused intracellular Ca^{2+} -dependent cell injury in blood vessel cells (epithelial cells and smooth muscle cells) and blood cells, and promoted differentiation of monocytes into macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：タバコ煙、メチルビニルケトン、シクロペンテノン、細胞傷害、PKC

1. 研究開始当初の背景

喫煙は、アテローム動脈硬化症をはじめとする虚血性循環器疾患の危険因子の一つである。タバコの主流煙には、4,000 種類を超える化合物が含まれるとされる。このうち、動脈硬化症の発症に寄与する代表的な化合物として、活性酸素種 (ROS) が挙げられる。

一般に、ROS による血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞の損傷、並びに ROS によって変性した低比重リポタンパク質を取り込んだマクロファージの泡沫細胞化が、動脈硬化症の発症において重要な役割を果たすことが知られている。しかし、動脈硬化症の病態基

盤となる血管壁構成細胞に対するタバコ煙成分の作用については、これまでのところ殆ど分かっていなかった。

申請者らは、最近、ニコチン及びタール除去タバコ煙水抽出物 (cigarette smoke extract, CSE) がラットグリオーマ C6 細胞において NADPH オキシダーゼ (NOX) を介して細胞膜傷害を引き起こすことを見出した。更に CSE 中に含まれる、比較的長寿命の細胞傷害性因子として、既知のアクロレイン (ACR) の他に複数のカルボニル化合物の同定に成功した。これらの長寿命性化合物は、CSE と同様に NOX 依存的に細胞膜傷害

を惹起することを見出した。しかしながら、その分子機構については、現在まで不明とされている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、以下の3点について検討を行うこととした。

- (1) CSE および CSE に含まれる長寿命性細胞傷害因子が引き起こす、細胞傷害のシグナル伝達機構の解明
- (2) CSE 中の長寿命性細胞傷害因子の標的分子の解析
- (3) 血管壁構成細胞及び血球系細胞に対するタバコ煙成分の作用

3. 研究の方法

(1) CSE 調製方法

CSE は、紙巻タバコ (Hi-Lite, JT) 4 本の主流煙を真空ポンプで吸引し、ケンブリッジフィルターを通すことでニコチン・タールを除去した後、25°C に保温した PBS に通気して調製した。PBS 1 mL あたり Hi-Lite 4 本の主流煙を通気した溶液を 100% CSE として実験に供した。なお調製後の CSE は分注の上、使用直前まで -80°C で保存した。

(2) 細胞培養

ラットグリオーマ C6 細胞、ヒト血管内皮由来 HUVEC、ラット血管平滑筋 A7r5 細胞の培養には 10% FBS 添加 DMEM を使用した。マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞、ヒト単球由来 THP-1 細胞及び U937 細胞の培養には 10% FBS 及び 100 μ M 2-メルカプトエタノール添加 RPMI1640 を使用した。

(3) MTS 還元活性測定

細胞を CSE、ACR 等で 4 時間処理した後、CellTiter 96™ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて測定を行った。

(4) PI 染色による細胞膜傷害の検出

細胞を CSE、ACR 等で 4 時間処理した後、propidium iodide の細胞への取込みを蛍光顕微鏡観察により評価した。

(5) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出測定

細胞を CSE、ACR 等で 4 時間処理した後、培養上清に漏出した LDH 量を CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega) を用いて測定した。

(6) 細胞内 Ca²⁺測定

細胞に 37°C で 1 時間、蛍光性 Ca²⁺指示薬である Fura2-AM を負荷した。Ca²⁺濃度測定は 30°C

で CAF-110 (日本分光) を用いて行った。

(7) PKC アイソザイムの局在解析

C6 細胞からクローニングした PKC アイソザイムを、GFP 融合タンパク質として細胞内で発現させた。これらの細胞を、CSE、ACR 等で 4 時間処理した後の PKC-GFP の細胞内局在を、蛍光顕微鏡 (IX-71, Olympus) を用いて解析した。

(8) リアルタイム PCR 法

RNeasy Mini Kit (Qiagen) によって細胞から抽出した RNA をテンプレートにして、SuperScript III (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。cDNA の定量には Light Cycler Nano (Roche) を用いた。遺伝子発現量の規格化にはハウスキーピング遺伝子である β -actin 及び RPL37A を使用した。

4. 研究成果

(1) タバコ煙成分による PKC 活性化

申請者らは、これまで CSE 及び CSE 中の細胞傷害因子である ACR とメチルビニルケトン (MVK) が NOX 依存的に細胞膜傷害を惹起することを明らかにしてきた。そのため NOX を制御する因子である PKC が、CSE、ACR、MVK によって影響を受けるかどうかを調べた。RT-PCR 法を用いてラット C6 グリオーマ細胞における PKC アイソザイムの発現を確認したところ、PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ 及び PKC ι が発現していることが分かった。そこでこれら 4 種類の PKC アイソザイムを GFP 融合タンパク質として C6 細胞で発現させ、局在変化を指標として活性化の評価を行った。その結果、C6 細胞においては、CSE、ACR、MVK は PKC α および PKC ϵ を活性化することが判明した。一方、CSE 中から同定された他の細胞傷害因子であるシクロペンテノン (CPO) は PKC を活性化しなかった。

Conventional PKC は Ca²⁺依存的に活性化されることが知られているため、タバコ煙成分に起因する PKC の活性化に細胞内 Ca²⁺ が関与するかどうかを調べた。細胞内 Ca²⁺キレート薬である BAPTA-AM 処理によって、CSE、ACR 及び MVK によって惹起される細胞膜傷害とアポトーシス誘導、及び PKC 活性化が抑制された。また、細胞内 Ca²⁺測定の結果、タバコ煙成分による細胞傷害の原因となる Ca²⁺は、細胞内 Ca²⁺ストアから動員されることが分かった。一方、細胞外 Ca²⁺キレート薬である BAPTA は、タバコ煙成分による細胞傷害を抑制しなかった。これらの結果から、タバコ煙を原因とする細胞傷害には、細胞内における Ca²⁺の動員が重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) タバコ煙成分が血管壁構成細胞及び血球系細胞に与える影響

動脈硬化症の発症及び進展において、血管壁構成細胞(血管内皮細胞、血管平滑筋細胞)や単球/マクロファージの果たす役割は重要である。そこで、これらの細胞に対するタバコ煙成分の作用について検討を行った。

まず、血管壁構成細胞である血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞のタバコ煙成分に対する感受性を調べた。ヒト臍帯静脈内皮由来細胞系である HUVEC は CSE、ACR 及び MVK に対して高い抵抗性を有していた。その反面、ラット血管平滑筋由来の A7r5 細胞は、これらに対して高い感受性を示した。

次に、動脈硬化症の発症に深く関与する血液細胞である単球及びマクロファージのタバコ煙成分に対する感受性を評価した。単球である THP-1、U937 及び HL60 は全て高い感受性を示したのに対し、マクロファージ由来の RAW264.7 細胞は高い抵抗性を示した。更に、フォルボールエステルを用いて分化誘導した THP-1 細胞は、タバコ煙成分に対して抵抗性を獲得した。

フォルボールエステルは PKC を活性化して単球/マクロファージの分化を誘導することが知られている。そこで、PKC を活性化することがわかった CSE、ACR、あるいは MVK が単球/マクロファージの分化を促進しうるかどうかを調べた。マクロファージの分化マーカーである CD36 発現量をリアルタイム PCR 法によって定量することにより、細胞分化の評価を行った。U937 細胞における CD36 の発現量は、アクロレイン処理によって約 2 倍に上昇した。以上の結果から、タバコ煙成分は、単球/マクロファージの分化を促進することで動脈硬化症の発症及び進展に関与している可能性が示唆された。

(3) タバコ煙中の細胞傷害因子の標的分子の同定

ACR や MVK のような反応性の高いカルボニル化合物は、タンパク質中のリジン残基や DNA 中の塩基を修飾することが知られている。カルボニル化されたタンパク質を検出可能な Aldehyde reactive probe (ARP) を用いて細胞中の ACR あるいは MVK で修飾されたタンパク質の検出を試みた。ACR もしくは MVK で処理した細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によって分離した後に ARP で検出したところ、複数のバンドが検出された。このことから、ACR や MVK は細胞中で特定のタンパク質と特異性を持って反応していることが示唆された。現在、該当するタンパク質の同定を試みている。

(4) 今後の展望

本研究により、タバコ主流煙中の ACR 及び

MVK が、喫煙による細胞傷害に重要な役割を果たしていることが明らかになった。タバコ煙成分中の細胞傷害因子が判明したことで、分子メカニズムに立脚した喫煙による健康被害の防止やタバコ煙の無害化・無毒化に繋がるものと考えられる。

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 4 件)

- (1) Horinouchi T, Higashi T, Higa T, Terada K, Mai Y, Aoyagi H, Hatate C, Nepal P, Harada T, Miwa S. Different binding property of STIM1 and its novel splice variant STIM1L to Orai1, TRPC3, and TRPC6 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 428: 252-258 (2012). 査読有
- (2) Mai Y, Higashi T, Terada K, Hatate C, Nepal P, Horiguchi M, Harada T, Miwa S, Horinouchi T. Nicotine and tar-free cigarette smoke extract induces cell injury via intracellular Ca^{2+} -dependent subtype-specific protein kinase C activation. *J Pharmacol Sci* 120: 310-314 (2012). 査読有
- (3) Asano H, Horinouchi T, Mai Y, Sawada O, Fujii S, Nishiya T, Minami M, Katayama T, Iwanaga T, Terada K, Miwa S. Nicotine and tar-free cigarette smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *J Pharmacol Sci* 118: 275-287 (2012). 査読有
- (4) Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, Nishiya T, Terada K, Miwa S. Adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca^{2+} entry mediated via transient receptor potential canonical 6 channels. *Pharmacol Exp Ther* 340: 143-151 (2012). 査読有

[学会発表] (計 2 2 件)

- (1) 堀之内孝広、小胞体 Ca^{2+} センサー STIM1 の新規スプライズバリエーション STIM1L の同定とその薬理学的特徴、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3

- 月 22 日、福岡国際会議場（福岡県）
- (2) 寺田晃士、エンドセリン B 型受容体の動態制御におけるユビキチン化修飾の役割、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場（福岡県）
- (3) 東恒仁、ニコチン及びタール除去タバコ煙水抽出物は Ca^{2+} 依存的に PKC を活性化することで細胞傷害を引き起こす、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡国際会議場（福岡県）
- (4) 堀之内孝広、アデニル酸シクラーゼ-cAMP-プロテインキナーゼ A 系によるエンドセリン受容体活性化型 TRPC6 チャンネルを介した受容体作動性 Ca^{2+} 流入の抑制性制御、第 42 回日本心臓血管作動物質学会、2013 年 2 月 8 日、奈良県立新公会堂（奈良県）
- (5) 堀之内孝広、小胞体 Ca^{2+} センサー STIM1 とその新規スプライスバリエントによる TRPC3 及び TRPC6 チャンネルを介したエンドセリン A 型受容体作動性 Ca^{2+} 流入の抑制性制御、第 22 回日本循環薬理学会、2012 年 11 月 30 日、富山国際会議場（富山県）
- (6) 寺田晃士、ユビキチン化によるエンドセリン受容体の動態制御機構の解析、第 22 回日本循環薬理学会、2012 年 11 月 30 日、富山国際会議場（富山県）
- (7) 堀之内孝広、肺高血圧症の発症・進展に寄与する TRPC6 チャンネルの抑制性機能制御機構、第 1 回日本肺循環学会学術集会、2012 年 9 月 22 日、東京ステーションコンファレンス（東京都）
- (8) 堀之内孝広、小胞体 Ca^{2+} センサー STIM1 の新規バリエントの同定とその分子薬理学的特性の解析、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、朱鷺メッセ（新潟県）
- (9) 東恒仁、ニコチン及びタール除去タバコ煙抽出物の細胞傷害作用に関与する PKC アイソザイムの同定と活性化機構の解明、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、朱鷺メッセ（新潟県）
- (10) 寺田晃士、エンドセリン B 型受容体の動態制御におけるユビキチン化の役割の解析、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、朱鷺メッセ（新潟県）
- (11) 眞井洋輔、ニコチン及びタール除去タバコ煙抽出物の細胞傷害作用に関与する PKC アイソザイムの同定とその活性化機構の解明、第 26 回北海道薬物作用談話会、2012 年 7 月 28 日、北海道大学（北海道）
- (12) 堀之内孝広、タバコ煙抽出液で同定された細胞傷害活性因子群の心血管系に対する影響の解析と傷害活性除去法開発の試み、第 27 回喫煙科学研究財団助成研究発表会、2012 年 7 月 18 日、京王プラザホテル（東京都）
- (13) 堀之内孝広、エンドセリン受容体活性化型 TRPC6 チャンネルの機能制御機構、第 8 回 TRP チャンネル研究会、2012 年 6 月 14 日、岡崎カンファレンスセンター（静岡県）
- (14) 眞井洋輔、ニコチン・タール除去タバコ煙水抽出物による NADPH オキシダーゼ依存性細胞傷害の分子メカニズム、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場（京都府）
- (15) 堀之内孝広、PKA リン酸化によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの抑制性制御機構、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場（京都府）
- (16) 比嘉綱己、エンドセリン A 型受容体刺激によって誘発される TRPC3 及び TRPC6 チャンネルを介した受容体作動性 Ca^{2+} 流入の制御機構、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場（京都府）
- (17) 寺田晃士、エンドセリン受容体の動態制御におけるユビキチン修飾の役割、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場（京都府）
- (18) 比嘉綱己、プロテインキナーゼ A による TRPC6 チャンネルを介したエンドセリン A 型受容体作動性 Ca^{2+} 流入の抑制性制御の分子機構、第 21 回日本循環薬理学会、2011 年 12 月 2 日、岡山大学（岡山県）
- (19) 堀之内孝広、エンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの抑制性機能制御に関与する PKA リン酸化部位の同定、第 39 回薬物活性シンポジウム、2011 年 11 月 21 日、福大メディカルホール（福岡県）
- (20) 堀之内孝広、Phos-tag™ biotin を用いたエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの PKA によるリン酸化部位の同定、第 62 回日本薬理学会北部会、2011 年 9 月 30 日、江陽グランドホテル（宮城県）
- (21) 松本一馬、誘導型 NO 合成酵素のユビキチン・プロテアソーム依存性分解制御機構、第 25 回北海道薬物作用

談話会、2011年7月23日、酪農学園大学（北海道）

- (22) 堀之内孝広、タバコ煙抽出液で同定された細胞傷害活性因子群の心血管系に対する影響の解析と傷害活性除去法開発の試み、第27回喫煙科学研究財団助成研究発表会、2011年7月22日、京王プラザホテル（東京都）

[その他]

ホームページ等

<http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 聡一 (MIWA SOICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40157706

(2) 研究分担者

堀之内 孝広 (HORINOUCHI TAKAHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20307771

(3) 連携研究者

なし