

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860166

研究課題名(和文) タバコ煙中の細胞傷害因子による動脈硬化発症機構の解明と細胞傷害因子除去法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for development of atherosclerosis by cytotoxic factors in cigarette smoke

研究代表者

東 恒仁 (Higashi, Tsunehito)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：90453018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙は動脈硬化症などの心血管系疾患の危険因子である。本研究では、タバコ煙ガス相に含まれる不飽和カルボニル化合物の病態生理学的意義の解明とその影響の抑制方法の開発を目的とした。タバコ煙ガス相に含まれる不飽和カルボニル化合物は、細胞内カルシウム依存的にプロテインキナーゼCを活性化し、細胞傷害を引き起こすことを見出した。また、還元型グルタチオンやビタミンEなどの抗酸化物質が効果的に不飽和カルボニル化合物による細胞傷害を抑制できることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoking is one of the risk factors for cardiovascular diseases. The objective of this study is to elucidate the molecular mechanism(s) for cell injury induced by unsaturated carbonyl compounds in the gas phase of cigarette smoke. First, the method for preparation of gas phase extract of cigarette smoke was optimized. The cell injury caused by both gas phase extract of cigarette smoke and unsaturated carbonyl compounds was intracellular calcium-dependent. They also activated protein kinase C in intracellular calcium-dependent manner. Several antioxidants such as reduced form of glutathione and vitamin E suppressed cell injury induced by unsaturated carbonyl compounds.

研究分野：薬理学

キーワード：タバコ煙ガス相 不飽和カルボニル化合物 細胞傷害 プロテインキナーゼC

## 1. 研究開始当初の背景

喫煙は、動脈硬化症を始めとする虚血性心疾患の危険因子の一つである。タバコの煙には4,000種類を超える化合物が含まれているとされるが、その中には活性酸素種・活性窒素種・不飽和カルボニル化合物など、化学反応性に富んだ化合物が数多く存在する。これまで、喫煙に起因する動脈硬化の形成には、タバコ煙に由来する活性酸素種などの酸化性物質による血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の傷害と、喫煙によって酸化変性した低比重リポタンパク質を貪食した泡沫化マクロファージが重要であると考えられてきた。

ところが、活性酸素種の半減期は極めて短く、喫煙者の肺に達するまでにその活性が消失することから、タバコ燃焼時に発生した活性酸素種が喫煙による動脈硬化症の発症に直接的に関与するという説は否定的になった。そのため、近年、タバコ煙中に含まれる、比較的半減期の長い細胞傷害因子であるアクロレイン(ACR)が注目されるようになった。

申請者は、タバコ煙ガス相にふくまれる主要な細胞傷害因子として、既知のACRの他に、同じく不飽和カルボニル化合物であるメチルビニルケトン(MVK)や2-シクロペンテン-1-オン(CPO)を同定した。更にACRやMVKは、タバコ煙ガス相と同様にプロテインキナーゼC(PKC)依存的に細胞傷害を惹起することを示した。

しかしながら、不飽和カルボニル化合物による細胞傷害の分子機構や、動脈硬化を始めとする病態とこれら不飽和カルボニル化合物との関連については、殆ど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、「タバコ煙ガス相中の不飽和カルボニル化合物によるタンパク質修飾を分子基盤とした動脈硬化発症の新規メカニズムの解明」を目的とした。同時に、喫煙を原因とする動脈硬化症発症のリスク低減を目指して「タバコ煙ガス相中から不飽和カルボニル化合物を分子特異的に除去する方法の確立」も目指すこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) タバコ煙ガス相抽出物の作製方法

紙巻タバコ「ハイライト」(JT)の主流煙を、ケンブリッジフィルターを通すことでニコチンを含むタール相を除去した。残ったガス相をPBS中でバブリングすることで、ガス相中の水溶性成分を抽出した。これをタバコ煙ガス相抽出物として用いた。

### (2) 細胞生残率の評価

細胞生残率は、MTS還元活性の変化を基準に算出した。MTS還元活性の測定にあたっては、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット(Promega)を用

いた。

### (3) 細胞膜傷害の評価

細胞膜傷害の評価に当たっては、蛍光色素propidium iodide (PI)による細胞核染色を評価基準とした。PIの蛍光は、蛍光顕微鏡観察もしくはフローサイトメーターを用いて評価・測定した。

### (4) 免疫染色

細胞を4%パラホルムアルデヒドで10分間処理することで固定した。0.1% Triton X-100による細胞膜透過処理、1% BSAによるブロッキング処理の後、細胞を一次抗体および経口標識二次抗体でインキュベートした。蛍光顕微鏡IX-71(Olympus)を用いて蛍光画像の撮像を行った。

### (5) 免疫沈降法によるタンパク質カルボニル化の検出

細胞をNP-40 bufferで可溶化した後、細胞抽出液をビオチンが結合したアルデヒド検出試薬であるAldehyde Reactive Probe(Dojindo)で処理した。目的タンパク質を、免疫沈降法で精製した後、カルボニル化の有無を、HRP標識ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロッティングで検出した。

## 4. 研究成果

### (1) タバコ煙ガス相抽出物の作製方法の確立

タバコ煙ガス相の生体への影響を薬理的に正確に評価するため、まずタバコ煙ガス相抽出物の作製方法の確立を試みた。タバコ煙ガス相抽出物を用いて薬理的解析を試みるには、まずガス相の濃度を正確に表現することが必要である。ところが、ガス相の濃度の簡便な測定方法は存在しなかった。ガス相作製の際にケンブリッジフィルターに吸着されるタール相が、全てPBSに溶け込んだと仮定した「仮想タール濃度」を用いた場合に、再現性よく、かつタバコ煙ガス相の作製に用いた紙巻きタバコの銘柄に依存せず、タバコ煙ガス相の濃度を表現できることを示した(図1)。

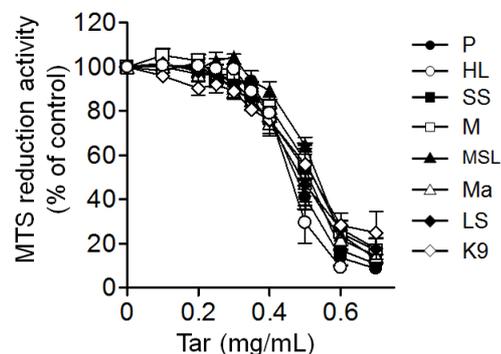


図1 様々な紙巻タバコを用いて作製したタバコ煙ガス相抽出物の細胞傷害活性

様々な銘柄の紙巻タバコを用いてタバコ煙ガス相抽出物を作製し、それらの細胞傷害活性を MTS 還元活性測定により評価した。P: Peace (JT); HL: Hi-Lite (JT); SS: Seven Stars (JT); M: Mevius (JT); MS�: Mevius Super Light (JT); Ma: Marlboro (Philip Morris); LS: Lucky Strike (British American Tobacco); K9: KENT 9 mg (British American Tobacco)。発表論文 より改変。

加えて、仮想タール濃度で表現したタバコ煙ガス相は、その作製方法に依らず、一定の細胞傷害活性を有することが分かった(図2)。

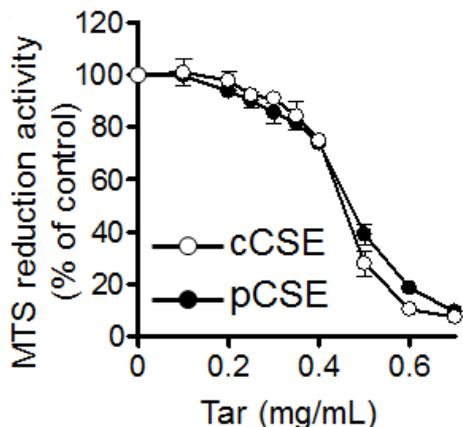


図2 喫煙方法とタバコ煙ガス相抽出物の細胞傷害活性

2種類の喫煙方法、連続喫煙(cCSE)と間欠喫煙(pCSE)によりそれぞれタバコ煙ガス相抽出物を作製し、細胞傷害活性を MTS 還元活性アッセイにより評価した。発表論文 より改変。

### (2) ACR・MVKによる細胞傷害の分子機構の解明

タバコ煙ガス相は、肺でのガス交換を介して血中に移行し、心血管系に影響を及ぼすと考えられている。そこで、心血管系を構成する細胞のうち、どの細胞がタバコ煙ガス相によって傷害を受けやすいかを調べた。その結果、血管構成細胞では、血管平滑筋細胞が、血液系細胞では単球系細胞が、それぞれタバコ煙ガス相抽出物に対して比較的高い感受性を示すことが判明した(図3)。

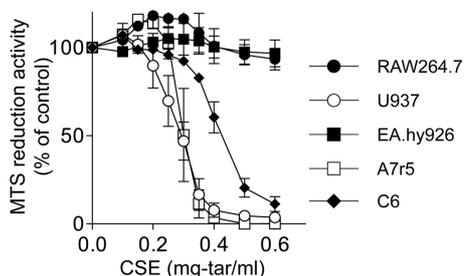


図3 様々な細胞のタバコ煙ガス相感受性  
様々な細胞をタバコ煙ガス相抽出物で処理

し、各細胞のタバコ煙ガス相感受性を MTS 還元活性アッセイにより評価した。発表論文 より改変。

不飽和カルボニル化合物である ACR・MVK は、タバコ煙ガス相中の主要な細胞傷害因子であるので、これらの化合物による血管平滑筋細胞の傷害メカニズムを調べた。その結果、ACR・MVKによる細胞傷害は、PKC $\alpha$ の活性化(細胞膜移行)を誘導すること、さらに ACR・MVKによる PKC $\alpha$ の活性化や細胞傷害は、細胞内カルシウムに依存することが判明した。以上の結果から、タバコ煙ガス相に含まれる不飽和カルボニル化合物は、細胞内カルシウム依存的に血管平滑筋細胞や単球系細胞を傷害することで動脈硬化症をはじめとする疾病の原因となっていることが示唆された。

### (3) タバコ煙ガス相による細胞傷害を抑制できる因子の探索と抑制メカニズムの解明

タバコ煙や不飽和カルボニル化合物による生体への悪影響を抑制することは、人類の健康増進の上で重要な課題であると言える。そこで、タバコ煙ガス相による細胞傷害を抑制できる因子の探索と、その抑制メカニズムの解明を試みた。その結果、含硫アミノ酸であるシステインやその誘導体である N-アセチルシステイン、還元型グルタチオンなどの化合物が、効果的にタバコ煙ガス相による細胞傷害を抑制できることを見出した。また高速液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いた解析、ならびに細胞内タンパク質のカルボニル化解析により、これらの化合物は、タバコ煙ガス相に含まれる不飽和カルボニル化合物と細胞外で直接反応することで、タバコ煙ガス相による細胞傷害を抑制していることを見出した。

### 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10件)

Sugimoto C, Hirofani M, Yoshikiyo K, Koshimizu U, Wakao R, Horinouchi T, Mazaki Y, Higashi T, Fukazawa T, Fujita H, Sasaki H, Wakao H. The dynamics of mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. SpringerPlus vol. 5, No. 1, pp. 1-16 (2016). 査読有  
DOI: 10.1186/s40064-016-2923-9

Horinouchi T, Higashi T, Mazaki Y, Miwa S. Carbonyl compounds in the gas phase of cigarette mainstream smoke and their pharmacological properties. Biol Pharm Bull vol. 39, No. 6, pp. 909-916 (2016). 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00025

Higashi T, Mai Y, Mazaki Y,

Horinouchi T, Miwa S. A standardized method for the preparation of a gas phase extract of cigarette smoke. *Biol Pharm Bull* vol. 39, No. 6, pp. 898-902 (2016). 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00062  
Horinouchi T, Terada K, Higashi T, Miwa S. Using Phos-Tag in western blotting analysis to evaluate protein phosphorylation. *Methods Mol Biol* vol. 1397, pp. 267-277 (2016). 査読無  
DOI: 10.1007/978-1-4939-3353-2\_18  
Horinouchi T, Hoshi A, Harada T, Higa T, Karki S, Terada K, Higashi T, Mai Y, Nepal P, Mazaki Y, Miwa S. Endothelin-1 suppresses insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake via GPCR kinase 2 in skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* vol. 173, No. 6, pp. 1018-1032 (2016). 査読有  
DOI: 10.1111/bph.13406  
Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Ito T, Kiuchi T, Ono A, Miyajima S, Nagai K, Higashi T, Matsuno Y, Dosaka-Akita H, Nishimura M, Miwa S, Kasahara M. Decreased proteosomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Lab Invest* vol. 95, No. 6, pp. 625-634 (2015). 査読有  
DOI: 10.1038/labinvest.2015.43  
寺田晃士、堀之内孝広、東恒仁、Prabha Nepal、三輪聡一、エンドセリン受容体のユビキチン化 ユビキチン化によるエンドセリン受容体の細胞内トラフィック制御、*日本薬理学雑誌* vol. 145, No. 1, pp. 4-9 (2015). 査読無  
DOI: 10.1254/fpj.145.4  
Terada K, Horinouchi T, Fujioka Y, Higashi T, Nepal P, Horiguchi M, Karki S, Hatate C, Hoshi A, Harada T, Mai Y, Ohba Y, Miwa S. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. *J Biol Chem* vol. 289, No. 51, pp. 35283-35295 (2014). 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M113.544171  
Higashi T, Mai Y, Noya Y, Horinouchi T, Terada K, Hoshi A, Nepal P, Harada T, Horiguchi M, Hatate C, Kuge Y, Miwa S. A simple and rapid method for standard preparation of gas phase extract of cigarette smoke. *PLOS ONE* vol. 9, No. 9, pp. e107856 (2014). 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0107856  
Harada T, Horinouchi T, Higa T, Hoshi A, Higashi T, Terada K, Mai Y, Nepal P,

Horiguchi M, Hatate C, Miwa S. Endothelin-1 activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 via transactivation of platelet-derived growth factor receptor in rat L6 myoblasts. *Life Sci* vol 104, No. 1-2, pp. 24-31 (2014). 査読有  
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.04.002

[学会発表](計8件)

Higashi T, Mai Y, Mazaki Y, Horinouchi T, Miwa S. Unsaturated carbonyl compounds in the gas phase extract of cigarette smoke induce cell death through intracellular  $Ca^{2+}$ -dependent PKC activation. American Society for Cell Biology 2016 Annual Meeting. 2016年12月3日-7日. San Francisco (USA).

真崎雄一、東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、三輪聡一、タバコ煙ガス相水抽出物の簡便な標準的作製方法の開発、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日-11日、パシフィコ横浜(横浜市)

東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、真崎雄一、三輪聡一、タバコ煙ガス相による細胞傷害の抑制因子の探索と抑制メカニズムの解明、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日-11日、パシフィコ横浜(横浜市)

東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、真崎雄一、堀口美香、三輪聡一、タバコ煙に起因する細胞傷害の抑制物質の探索と抑制メカニズムの解明、第25回日本循環薬理学会、2015年12月4日、東大寺総合文化センター金鐘ホール(奈良市)

東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、真崎雄一、堀口美香、三輪聡一、タバコ煙に起因する細胞傷害の抑制方法の開発およびその分子機構の解明、第66回日本薬理学会北部会、2015年9月18日、富山国際会議場(富山市)

東恒仁、眞井洋輔、Enas Elmeligy、堀之内孝広、寺田晃士、星暁壮、堀口美香、Prabha Nepal, Sarita Karki, 旗手千鶴、三輪聡一、グルタチオン・N-アセチルシステイン・システインはタバコ煙ガス相抽出物による細胞傷害に対する保護作用を有する、第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日-20日、名古屋国際会議場(名古屋市)

Higashi T, Mai Y, Horinouchi T, Terada K, Elmeligy E, Hoshi A, Nepal P, Harada T, Karki S, Horiguchi M, Hatate C, Miwa S. Gas phase extract of cigarette smoke and its cytotoxic compounds induce cell death via protein kinase C and NADPH oxidase. American Society for Cell Biology 2014

Annual Meeting. 2014年12月6日-10日. Philadelphia (USA).

東恒仁、タバコ煙中の細胞傷害因子の同定とその細胞傷害メカニズムの解明、日本生物物理学会・北海道分子生物学研究会・日本生化学会北海道支部 2014年度合同シンポジウム、2014年11月19日、北海道大学農学部（札幌市）

〔その他〕

ホームページ等

[http://plaza.umin.ac.jp/cellular\\_pharm](http://plaza.umin.ac.jp/cellular_pharm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 恒仁 (HIGASHI, Tsunehito)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90453018

### (4) 研究協力者

眞井 洋輔 (MAI, Yosuke)