

シガレット煙抽出液曝露による呼吸器上皮細胞の  
生体応答を利用した新規たばこ有害性評価手法の開発

関根 崇

## 目次

### 略語一覧

緒言	1
第1章 シガレット煙抽出液曝露による遺伝子発現変動の検討	4
1.1 背景・目的	4
1.2 実験材料・方法	4
1.2.1 試験デザイン	4
1.2.2 試験シガレット	4
1.2.3 Cigarette smoke extract (CSE) の調製	5
1.2.4 細胞培養および CSE 曝露	6
1.2.5 網羅的遺伝子発現解析	6
1.2.5.1 Total RNA の抽出	6
1.2.5.2 cDNA 合成およびビオチンラベル化 cRNA の作製	7
1.2.5.3 ラベル化 cRNA のハイブリダイゼーションおよび Array のスキャン	7
1.2.6 データ解析	8
1.2.6.1 標準化	8
1.2.6.2 遺伝子発現解析	8
1.2.6.3 パスウェイ解析	8
1.3 結果	9
1.3.1 CSE 曝露により発現変動した遺伝子	9
1.3.2 CSE 曝露により変動したパスウェイ	10
1.3.3 たばこ葉の違いが遺伝子発現変動に与える影響	12
1.4 考察	13
第2章 シガレット煙抽出液の急性曝露による転写因子活性化の検討	15
2.1 背景・目的	15

2.2	実験材料・方法	15
2.2.1	ルシフェラーゼベクターの構築	15
2.2.2	細胞培養	15
2.2.3	レポーターベクターの導入	17
2.2.4	試験シガレットおよび aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) の調製	18
2.2.5	Neutral red 試験	19
2.2.6	遺伝子発現評価	20
2.2.7	レポーターアッセイ	20
2.2.8	ウエスタンブロッティング	20
2.2.9	細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の測定	21
2.2.10	Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) タンパク質中のチオール基の測定	22
2.2.11	p62/KEAP1 複合体形成の評価	22
2.2.12	Inhibitor kappa B-alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) リン酸化の評価	23
2.2.13	NF- $\kappa$ B 核移行の評価	23
2.3	結果	25
2.3.1	AqCSE 曝露における遺伝子発現変動	25
2.3.2	レポーターベクター安定発現株の作製	26
2.3.3	Neutral red 試験結果	26
2.3.4	AqCSE 曝露による転写因子の活性化	27
2.3.5	AqCSE 曝露による NRF2 および関連タンパク質発現の変動	31
2.3.6	AqCSE 曝露による細胞内 ROS 産生	32
2.3.7	AqCSE と KEAP1 中のチオール基の反応性評価	33
2.3.8	AqCSE 曝露による p62 発現と p62/KEAP1 複合体形成の評価	33
2.3.9	I $\kappa$ B $\alpha$ リン酸化の評価	35
2.3.10	NF- $\kappa$ B 核移行の評価	35
2.4	考察	37

第3章	NRF2/ARE 評価系を用いたシガレット煙中成分の評価.....	40
3.1	背景・目的.....	40
3.2	実験材料・方法.....	40
3.2.1	被験液の調製.....	40
3.2.2	ARE レポーターアッセイ.....	41
3.2.3	NRF2 転写活性の指標化.....	41
3.2.4	イオンチャネル TRPA1 活性化評価.....	41
3.2.4.1	細胞培養およびイオンチャネル TRPA1 発現細胞の作製.....	41
3.2.4.2	細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度変動の測定.....	42
3.3	結果.....	43
3.3.1	NRF2 の転写活性を示すシガレット煙中成分の同定.....	43
3.3.2	9,10-PQ のイオンチャネル TRPA1 への作用.....	43
3.4	考察.....	47
第4章	三次元培養モデルによる転写因子活性化の評価.....	50
4.1	背景・目的.....	50
4.2	実験材料・方法.....	50
4.2.1	試験シガレットおよび AqCSE の調製.....	50
4.2.2	HBECs の三次元培養.....	50
4.2.3	三次元培養 HBECs の細胞障害性試験.....	51
4.2.4	転写因子タンパク質発現の測定.....	51
4.2.5	免疫組織染色.....	52
4.2.6	PCR アレイによる遺伝子発現測定.....	52
4.3	結果.....	54
4.3.1	三次元培養 HBECs に対する AqCSE の細胞障害性.....	54
4.3.2	三次元培養 HBECs における転写因子タンパク質発現の変動.....	54
4.3.3	免疫組織染色による転写因子活性化の評価.....	55

4.3.4	NRF2 および NF- $\kappa$ B 下流遺伝子発現の変動 .....	57
4.4	考察 .....	60
総括	.....	62
謝辞	.....	64
掲載論文	.....	65
引用文献	.....	66

## 略語一覽

AEGM: airway epithelial cell growth medium

AhR: aryl hydrocarbon receptor

AK: adenylate kinase

ALI: air-liquid interface

AP-1: activator protein 1

AqCSE: aqueous cigarette smoke extract

ARE: anti-oxidant response element

ATF6: activating transcription factor 6

BEGM: bronchial epithelial cell growth basal medium

BLY: burley cigarette

2.2 Ca SBS: standard HEPES-buffered bathing solution

CBP: CREB-binding protein

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

CRE: cAMP response element

CREB: cAMP response element binding protein

CSE: cigarette smoke extract

CYP: cytochrome P450

DEP: diesel exhaust particles

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FC: flue-cured cigarette

GCOS: GeneChip® Operating Software ver.1.4

H/E: hematoxylin and eosin

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide

HBECs: human bronchial epithelial cells

HEK: human embryonic kidney 293 cells

HMOX1: heme oxygenase 1

HIF-1: hypoxia-inducible factor 1  
HRE: hypoxia response element  
HSE: heat shock response element  
HSF: heat shock factor  
IARC: International Agency for Research on Cancer  
IPA: Ingenuity® Pathways Analysis  
ISO: International Organization for Standardization  
ISRE: interferon-stimulated response element  
IκBα: inhibitor kappa B-alpha  
KEAP1: kelch-like ECH-associated protein 1  
m2R4F: modified 2R4F cigarette  
MEM: Eagle's minimal essential medium  
mRIPA: modified RIPA  
NF-κB: nuclear factor-kappa B  
NF-κB Array: NF-κB Signaling Pathway Plus RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array  
1,2-NQ: 1,2-naphthoquinone  
1,4-NQ: 1,4-naphthoquinone  
NR: neutral red  
NRF2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
Ox-Array: Human Oxidative Stress RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array  
PBS: phosphate buffered saline  
9,10-PQ: 9,10-phenanthrenequinone  
PVDF: polyvinylidene difluoride  
RE: response element  
SC: solvent control  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
SIE: sis-inducible element  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
RIPA: radioimmunoprecipitation assay  
ROS: reactive oxygen species

tBHQ: *tert*-butylhydroquinone

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

TRPA1: transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1

Tris-HCl: 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride

WHO: World Health Organization

XRE: xenobiotic response element



## 緒言

喫煙と健康に関する議論は、古くは 1900 年代半ばより開始され、今日では、肺がんなどの多くのがん、心筋梗塞・脳梗塞などの循環器系疾患、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) などの呼吸器疾患など、数多くの疾病のリスクが喫煙により増加することが指摘されている<sup>1,2)</sup>。

このような喫煙に対する健康懸念の高まりを背景に、たばこ製品に対する規制は国際的に拡大している。世界保健機関 (World Health Organization: WHO) による、たばこの規制に関する世界保健機関枠組条約は、喫煙が健康、社会、環境および経済に及ぼす悪影響から現在および将来の世代を守ることを目的に、2003 年に採択された。公衆衛生分野の初の国際条約であり、2004 年に日本が受諾した他、現在では 180 ヶ国以上が締約国となっている。これを皮切りに、世界各国で、たばこ消費量削減に向けた取り組みが進められている。日本国内においても、2000 年に厚生労働省が 21 世紀における国民健康づくり運動 (健康日本 21 (第 1 次)) を発表して以降、様々なたばこ製品に対する規制が強化された。2012 年 7 月に策定された健康日本 21 (第 2 次) においては、2022 年の喫煙率の目標値を 12% と設定し、更なるたばこ対策の強化を打ち出している。

喫煙によるリスクを回避するには禁煙が最も有効な手段であり、これまでも増税や喫煙場所規制、禁煙支援・喫煙防止教育などにより、喫煙者を禁煙させることを目指した様々な対策が取られてきた。しかしながら、先進国における喫煙率は徐々に低下しているものの、世界規模では新興国における人口増の影響もあり、世界の喫煙人口は 2000 年頃から変化しておらず、未だおよそ 11 億人が喫煙を継続している<sup>3)</sup>。こうした現状を受け、禁煙を望まないあるいは禁煙できない喫煙者への対策として、「たばこハームリダクション」と呼ばれる方針が、主に欧米を中心に広まりつつある。ハームリダクションとは、その行動習慣をすぐにやめることができないときに、リスクを完全にゼロにすることを指すのではなく、その行動に伴う危険や害を軽減することを目的とした公衆衛生上の概念である。この考えに則り、禁煙を望まないあるいは禁煙できない喫煙者に対し、シガレットから有害性を低減した製品への切替えを促すことにより、喫煙が公衆衛生に及ぼす影響を低減させるという方針が、たばこハームリダクションである<sup>4,5)</sup>。この考えは 2000 年代から議論が開始され、複数の国や機関がこの方針を支持している。米国では、たばこ製品を管轄下に置く米国食品医薬品局が、2012 年に世界で初めて、シガレットと比較して有害性が低いことを示した製品に対し、国がリスク低減製品として認証を与える制度を導入した<sup>6)</sup>。米国に続いて、2017 年には、イタリア、ブルガリア、キプロスにおい

て、同様にリスク低減製品に対して国が認証を与える制度が導入され、さらに現在、複数の国がこれらの国を追従する動きを見せている。しかしながら、現在までのところ、どのような技術・製品がリスク低減製品と成り得るかを判断するための評価方法については、コンセンサスを得た方針や枠組みは存在しない。そのため、現在までにリスク低減製品として認められた製品は存在せず、たばこハームリダクションの具現化には至っていない。

近年になり、たばこ葉を燃焼させずに加熱する製品(通称:加熱式たばこ)や、たばこ葉を使用せずニコチンを含む液体を加熱してエアロゾルを発生させる製品(通称:電子たばこ)など様々な新しい技術や製品が登場してきた。これらの技術により発生されたエアロゾルは、シガレット煙と比較して、含有する有害物質が大幅に低いことが報告されている<sup>7-9)</sup>。そのため、これらの技術は、たばこハームリダクションに有効となる可能性が考えられる。実際に、英国公衆衛生庁などは、電子たばこはシガレットと比較して大幅にリスクが低減している可能性が高いと報告し<sup>10,11)</sup>、イギリス、カナダなど複数の国では公衆衛生当局が、電子たばこの普及を推奨する姿勢を示している。一方で、シガレットからこれらの製品に切り替えることにより、実際に生体に与える悪影響が低減されるかについては、十分なデータが存在しない。そのため、これら技術をたばこハームリダクションに活用することに対して懸念する声も少なくない。実際、喫煙に関連しているとされる疾病の多くは、喫煙による影響を即座に受けて発症するのではなく、数十年を経て発症に至ることから、新たに登場した技術・製品に対する疫学データが得られるには今後数十年の歳月が必要である。また、その間にも、新規技術の開発は進展すると予想されることから、それら技術が喫煙のリスクを低減させるのに有効かどうか短期的に判断できる評価系が存在しない限り、たばこハームリダクションの実現は困難である。さらに、有効な評価系の存在が更なる技術革新を促進し、より喫煙のリスクを低減することが可能な技術の誕生を後押しすることも期待できる。例えば、最近の研究ではシガレット煙中に含有される化学成分は、およそ 5000 種類にもものぼるとされるが<sup>12)</sup>、それら成分のうちどのような成分が人体に与える影響が強いのか十分理解されていない。そのため、短期的な評価系により有害成分を特定できれば、それら成分を選択的に除去する技術の開発に貢献することが期待できる。

これらの背景を受け、本研究では、呼吸器上皮細胞において、シガレット煙抽出液の急性曝露に対して鋭敏に反応する細胞応答を特定し、その応答を指標としたシガレット煙の有害性およびそのリスク低減に有効な技術・製品の評価手法を開発することを目的とした。なお先行研究では、シガレット煙抽出液に対する細胞応答として、炎症反応や酸化ストレス、小胞体ストレス、低酸素ストレスなど様々な反応が報告されている<sup>13-18)</sup>が、必ずしも一致した結果は得られていない。また、2次的ならびに3次的な影響も考えられることから、シガレット煙抽出液曝

露を受けた呼吸器上皮細胞における急性応答は明確でなかった。そのため、第 1 章では、シガレット煙抽出液の急性曝露により活性化される転写経路ならびに転写因子を特定するため、網羅的遺伝子解析により、シガレット煙抽出液曝露を受けた呼吸器上皮細胞において発現変動する遺伝子およびその遺伝子の関与するシグナル伝達経路 (パスウェイ) を検討した。第 2 章では、網羅的遺伝子解析の結果より発現変動が認められた遺伝子ならびに活性化したパスウェイから複数の転写因子を選定し、シガレット煙抽出液の急性曝露に対して最も鋭敏に応答する転写因子を特定した。第 3 章では、第 2 章で特定した転写因子の活性化を指標にした評価系を用いて、呼吸器上皮細胞において、その転写因子の活性化を引き起こすシガレット煙中成分の同定を試みた。さらに、第 4 章では、三次元培養した初代ヒト気管支上皮細胞を用いて、第 2 章で構築した単層培養細胞を用いた評価系との比較および三次元培養細胞を用いた評価系の優位性について検討を行った。

## 第1章 シガレット煙抽出液曝露による遺伝子発現変動の検討

### 1.1 背景・目的

本章では、シガレット煙抽出液の急性曝露により活性化される転写経路ならびに転写因子を探索することを目的として、網羅的遺伝子解析により、シガレット煙抽出液に急性曝露した呼吸器上皮細胞において、有意に発現変動する遺伝子およびその遺伝子の関与するシグナル伝達経路 (パスウェイ) の解明を試みた。

なお、シガレットは、たばこ葉、フィルター、たばこ葉を巻く巻紙、フィルターを巻くチップペーパーなどから構成され、その違いにより発生する成分にも違いが生じる。中でも、たばこ葉の品種が与える影響は大きく、代表的な品種である黄色種とバーレー種では、たばこ葉中の糖分量やたばこ特異的ニトロソアミン含有量が異なることから、たばこ葉が燃焼することによって生成されるシガレット煙中に含まれる成分も異なる<sup>19)</sup>。これらの違いが遺伝子発現に与える影響が明確でなかったため、たばこ葉の違いによる影響も検討できるよう、異なるたばこ葉組成を有する3種のシガレットを試験に供した。

### 1.2 実験材料・方法

#### 1.2.1 試験デザイン

粘膜表皮がん由来のヒト気道上皮細胞株である NCI-H292 細胞を、3種の試験シガレットから調製したシガレット煙抽出液 CSE (1.2.2 項ならびに 1.2.3 項参照) に曝露し、網羅的遺伝子解析により遺伝子発現の変動を評価した。各群は、1試験あたり繰り返し数3で取得し、独立した2試験で得られた計6サンプルを解析に供した。

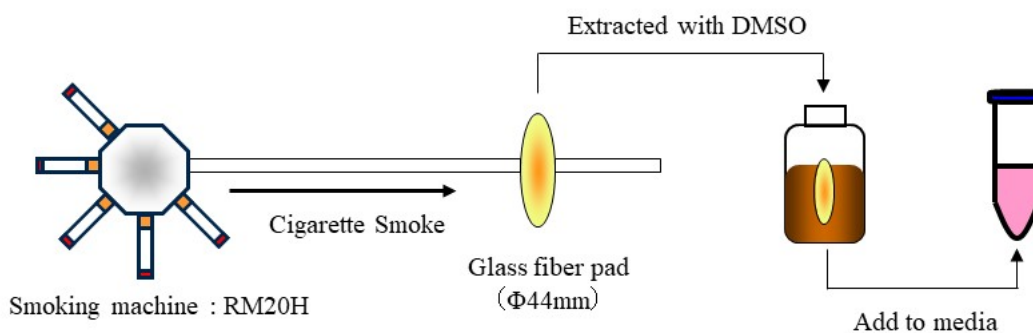
#### 1.2.2 試験シガレット

試験シガレットは、たばこ葉に 100%黄色種を用いた試験用シガレット (flue-cured cigarette: FC)、たばこ葉に 100%バーレー種を用いた試験用シガレット (burley cigarette: BLY) および研究用シガレットとして市販されている 2R4F を改変した modified 2R4F (m2R4F) の3種類を用いた。FC および BLY は、日本たばこ産業株式会社 (Tokyo, Japan) のテストプラントにおいて、それぞれ日本産黄色種および米国産バーレー種を専用巻上機で巻き上げ製造した。フィルターは市販

製品にも使用されるアセテートフィルターを用いた。2R4F は、国際的に研究用シガレットのスタンダードとして市販されている製品であり、たばこ葉は主に黄色種とバーレー種から成るブレンドが用いられている。2R4F は、ケンタッキー大学 Center for Tobacco Reference Products (Lexington, KY) から購入した。フィルターの通気抵抗の違いによる影響を排除するため、2R4F のフィルターをピンセットで抜きとり、FC および BLY と同じアセテートフィルターに交換することで、m2R4F を得た。3 種のシガレットは、全て同等の通気抵抗値 (165 – 170 mm H<sub>2</sub>O) を示すことを確認した。保管条件の違いによる誤差を排除するため、全てのシガレットは、International Organization for Standardization (ISO) の規定に基づき、60% 相対湿度、22°C の条件下で 48 時間以上保管した後、実験に供した<sup>20)</sup>。

### 1.2.3 Cigarette smoke extract (CSE) の調製

各種シガレットは、ロータリー型喫煙器 RM20H (Heinr. Borgwaldt, Hamburg, Germany) にセットし、ISO 喫煙条件下で機械喫煙させた<sup>21)</sup>。発生した主流煙は、シガレット煙捕集用に開発されたガラスファイバーパッド上に捕集した後、ガラス容器中で dimethyl sulfoxide (DMSO, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) に抽出し 10 mg/ml に調整した (Fig. 1-1)。それぞれのシガレットの CSE 原液を RPMI-1640 培地 (FUJIFILM Wako Pure Chemical) に加え、200 µg/ml としたものを被験液とした (DMSO の終濃度は 2%)。溶媒対象コントロール (solvent control: SC) として、2% DMSO を加えた RPMI-1640 培地を用いた。



**Fig. 1-1** Method for preparing of cigarette smoke extract (CSE). Cigarettes were smoked on a RM20H smoking machine under ISO 3308 conditions. Cigarette smoke collected onto glass fiber pads was extracted with dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted with cell culture media.

## 1.2.4 細胞培養および CSE 曝露

NCI-H292 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手し、10% 非働化ウシ胎仔血清 (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) および 50 µg/ml gentamicin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加した RPMI-1640 培地を用いて培養した。培養した細胞をトリプシン処理により剥離し、培地に懸濁後、12-well プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well の濃度で播種し、コンフルエントになるまで培養した。CSE 曝露は、培地を CSE を含む被験液と交換することにより行い、8 時間曝露した。被験液を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) で 2 度洗浄後、1 ml/well の ISOGEN (Nippon gene, Tokyo, Japan) に細胞を溶解し、ピペッティングにより全量をチューブに回収した。回収した ISOGEN 溶液は解析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。

## 1.2.5 網羅的遺伝子発現解析

### 1.2.5.1 Total RNA の抽出

ISOGEN 溶液を融解し、ボルテックスミキサーで攪拌後、500 µl を 1.5 ml チューブに取り、100 µl の chloroform と混合した。室温で 3 分間静置した後、12000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心し、最上層 (水層) を新しい 1.5 ml チューブに移した。このチューブに 70% ethanol 溶液を 300 µl 添加し、ボルテックスミキサーで混合後、溶液を RNeasy Mini spin column (Mini column, Qiagen, Hilden, Germany) へ移し、10000 g で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。次いで RW1 緩衝液を Mini column に 350 µl 添加し、10000 g で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。続いて RPE 緩衝液を Mini column に 500 µl 添加し、10000 g で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。さらに 500 µl の RPE 緩衝液を Mini column に添加し、20400 g で 2 分間遠心した。この Mini column をコレクションチューブに移し、RNase free water を 30 µl 添加し、10000 g で 1 分間遠心した。溶出された溶液を再度 Mini column に添加し、さらに 10000 g で 1 分間遠心後、コレクションチューブ中の溶液を回収することで、total RNA を得た。得られた total RNA は適宜 RNase free water を用いて希釈した後、分光光度計を用いて濃度 (260 nm の吸光度) および純度 (260 nm の吸光度/280 nm の吸光度) を測定した。さらに、total RNA は 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) および RNA 6000 nano キット (Agilent Technologies) を用いて泳動パターンを検査し、18S リボソーム RNA (rRNA) と 28S rRNA の量比 (28S/18S) を計測した。純度が 1.8 以上かつ 28S/18S 比が 1.0 以上である total RNA を以降のステップに用いた。

### 1.2.5.2 cDNA 合成およびビオチンラベル化 cRNA の作製

Total RNA 2 µg を T7 Primer Master Mix 溶液 19 µl と混合し、サーマルサイクラーを用いて、70°C で 10 分間反応させた後、4°C に冷却した。反応後の溶液に、dNTP を含む一本鎖 cDNA 合成溶液を加え、さらに 42°C で 42 分間反応させた。次いで反応後の溶液に SuperScript™ II 200 U/µl を 1 µl 添加し、あらかじめ 42°C に加温したサーマルサイクラーで、42°C で 60 分間反応させた後、4°C に冷却することで、一本鎖 cDNA 溶液を得た。この一本鎖 cDNA 溶液 20 µl を、dNTP、*E.coli* DNA ligase および *E.coli* DNA polymerase を含む二本鎖 cDNA 合成溶液 130 µl と混合し、サーマルサイクラーを用いて、16°C で 120 分間反応させた後、4°C に冷却した。次いで反応後の溶液に T4 DNA polymerase を 2 µl 添加し、サーマルサイクラーを用いて、16°C で 5 分間反応させた後、4°C に冷却することで二本鎖 cDNA を得た。得られた二本鎖 cDNA は cDNA Cleanup Spin Columns (Qiagen) を用いて精製した。精製 cDNA は RNase-free water を加え、全量を 20 µl とした後、添付の Labeling NTP Mix および Labeling Enzyme Mix を含むラベル化 cRNA 合成溶液 20 µl と混合した。この溶液を、サーマルサイクラーを用いて、37°C で 16 時間反応させた後、4°C に冷却することで、ビオチン標識補体 RNA (ラベル化 cRNA) を得た。得られたラベル化 cRNA は cRNA Cleanup Spin Columns (Qiagen) を用いて精製した後、濃度 (260nm の吸光度) および純度 (260 nm の吸光度/280 nm の吸光度) を測定し、全てのサンプルの純度が 1.8 以上であることを確認した。

### 1.2.5.3 ラベル化 cRNA のハイブリダイゼーションおよび Array のスキャン

ラベル化 cRNA は、Fragmentation buffer (Thermo Fisher Scientific) 中に溶解し、94°C で 35 分間反応後、氷冷することで断片化した。断片化したラベル化 cRNA は Hybridization buffer (Thermo Fisher Scientific) と混合した後、GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Thermo Fisher Scientific) に添加した。Array を Affymetrix GeneChip® Hybridization Oven 640 (Thermo Fisher Scientific) にセットし、60 rpm、45°C の条件で 16 時間インキュベートすることにより、断片化ラベル化 cRNA を Array 上にハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後の Array は、洗浄後、GeneChip™ Fluidics Station 450 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、streptavidin を含む R-Phycoerythrin Conjugate Solution Mix 溶液と反応させることにより染色した。次いで染色した Array を GeneChip™ Scanner 3000 (Thermo Fisher Scientific) にセットし、570 nm の蛍光強度をスキ

ヤンした。スキャンされた画像は、GeneChip® Operating Software ver.1.4 (GCOS, Thermo Fisher Scientific) を用いて、Array に搭載されている全遺伝子の発現量に数値化した。

## 1.2.6 データ解析

### 1.2.6.1 標準化

生データファイル (CEL ファイル) を GCOS 標準搭載の MAS5 アルゴリズムで正規化したファイル (CHP ファイル) に変換した後、GeneSpring® GX ver.7.3.1 (Agilent Technologies) 上で数値化し、さらに以下の数値の標準化を行った<sup>22)</sup>。

- 0.01 以下の数値処理 (Set measurements less than 0.01 to 0.01)
- 各 GeneChip 間のばらつき補正 (Normalize to 50<sup>th</sup> percentile)

### 1.2.6.2 遺伝子発現解析

各 CSE 曝露群と溶媒対象コントロールを 2 群比較し、CSE 曝露により統計学的に有意に発現変動した遺伝子を抽出した。各 probe ごとに比較を行い、2 群比較解析は Aspin-Welch の *t* 検定による平均値の差の検定を用いた。検定の有意水準は両側 5% とし、多重比較による擬陽性を除去するため、Holm 法による多重性の調整を行った<sup>23)</sup>。遺伝子発現の変動率は、各 CSE 曝露群における遺伝子発現量の平均値を溶媒対象コントロールにおける遺伝子発現量の平均値で割ることで算出した。

### 1.2.6.3 パスウェイ解析

CSE 曝露による生物学的機能の変動を検討するため、Ingenuity® Pathways Analysis (IPA) (Qiagen) を用いパスウェイ解析を行った。IPA のアルゴリズムを用いて、各 CSE 曝露により有意に発現変動した遺伝子群と各パスウェイ上に登録されている遺伝子群との一致度を Fisher の直接確率検定法により検定し、パスウェイごとに network score ( $= -\log_{10}(p\text{-value})$ ) を算出した。



### 1.3 結果

#### 1.3.1 CSE 曝露により発現変動した遺伝子

各 CSE 曝露により有意に発現変動した遺伝子数を Table 1-1 に示す。m2R4F、FC、BLY 曝露群で有意に変動した遺伝子数は、それぞれ 1515、1207、1151 であった。そのうち、溶媒対象コントロールに対して 2 倍以上有意に発現変動を示した遺伝子数は、m2R4F、FC、BLY 曝露群でそれぞれ 670、934、642、また 4 倍以上有意に発現変動を示した遺伝子数は、それぞれ 127、171、117 であった。m2R4F 曝露群および BLY 曝露群よりも FC 曝露群において、多くの遺伝子が 2 倍以上有意に発現変動した。

**Table 1-1** The number of genes whose expression is significantly altered following exposure to CSE compared to SC.

	All genes	Fold change $> \pm 2$	Fold change $> \pm 4$
m2R4F	1515 (up: 538, down: 977)	670 (up: 279, down: 391)	127 (up: 63, down: 64)
FC	1207 (up: 589, down: 618)	934 (up: 451, down: 483)	171 (up: 92, down: 79)
BLY	1151 (up: 483, down: 668)	642 (up: 311, down: 331)	117 (up: 65, down: 52)

SC: solvent control, CSE: cigarette smoke extract, m2R4F: modified 2R4F, FC: flue-cured cigarette, BLY: burley cigarette

m2R4F 曝露群において、発現上昇および発現抑制が大きかった上位 10 遺伝子を Table 1-2 に示す。これらの遺伝子は、FC 曝露群および BLY 曝露群においても発現変動遺伝子の上位に位置し、*GDF15*、*OKL38* など一部の遺伝子で FC 曝露群で高い発現変動を示した他は、CSE 間で大きな差は見られなかった。3 種の CSE 曝露により共通して最も大きく発現上昇した遺伝子は *MMP1*、次いで *HMOX1* であり、いずれも 100 倍以上の発現上昇が認められた。また *CXCL8*、*FOSL*、*MAFG* も大きく発現変動し、これらの遺伝子はいずれの CSE 曝露群においても 50 倍程度発現上昇した。一方、大きく発現抑制が起きた遺伝子は、*TXNIP*、*SLC2A3*、*MARCKS* などであり、これらの遺伝子の発現変動率も CSE 間で大きな差はなかった。

**Table 1-2** Top 10 fold changes in gene expression following exposure to CSE compared to SC.

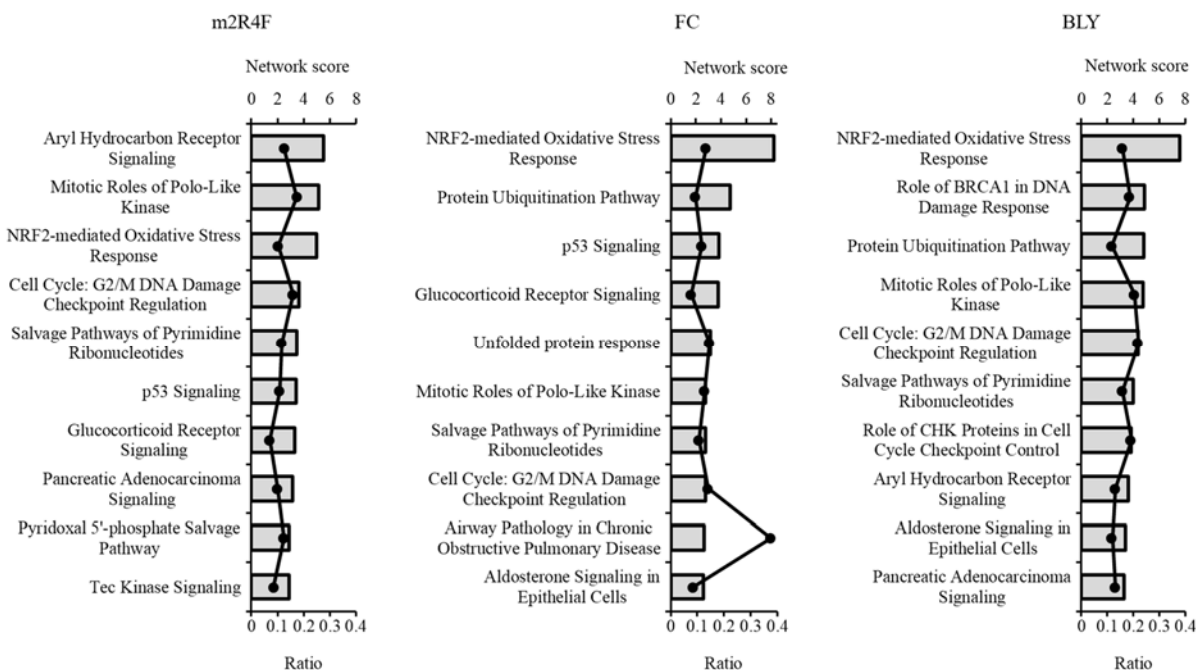
	Genbank ID	Gene Symbol	m2R4F	FC	BLY
up-regulation	NM_002421	<i>MMP1</i>	116.7	184.6	111.1
	NM_002133	<i>HMOX1</i>	107.7	125.1	102.3
	NM_000584	<i>CXCL8</i>	52.9	56.6	49.5
	BG251266	<i>FOSL1</i>	48.0	60.5	52.1
	BC006143	<i>MAFG</i>	39.8	41.8	43.2
	BF508244	<i>AKR1C1/2</i>	12.3	20.1	6.6
	AB040875	<i>SLC7A11</i>	12.2	10.3	12.3
	AF003934	<i>GDF15</i>	12.1	14.1	17.5
	AL121758	<i>SRXN1</i>	10.3	11.8	9.6
	NM_013370	<i>OKL38</i>	10.3	16.2	7.0
down-regulation	NM_003265	<i>TLR3</i>	0.15	0.28	0.18
	AL571375	<i>SCD5</i>	0.14	0.13	0.17
	AI760919	<i>KIAA1238</i>	0.13	0.10	0.16
	AA778684	<i>SLC2A3; SLC2A14</i>	0.12	0.12	0.13
	NM_006018	<i>GPR109B</i>	0.12	0.13	0.11
	BE551073	<i>KIAA1238</i>	0.10	0.08	0.15
	N26005	<i>PPP1R3C</i>	0.10	0.12	0.11
	AI709406	<i>MARCKS</i>	0.10	0.08	0.11
	NM_006931	<i>SLC2A3</i>	0.07	0.06	0.08
	NM_006472	<i>TXNIP</i>	0.03	0.06	0.02

SC: solvent control, CSE: cigarette smoke extract, m2R4F: modified 2R4F, FC: flue-cured cigarette, BLY: burley cigarette

### 1.3.2 CSE 曝露により変動したパスウェイ

各 CSE 曝露により統計学的に有意かつ 2 倍以上発現変動した遺伝子 (m2R4F: 670, FC: 934, BLY: 642 genes) を対象に、パスウェイ解析を実施した。結果を Fig. 1-2 に示す。NRF2-mediated oxidative stress pathway が m2R4F 曝露群では第 3 位、FC 曝露群と BLY 曝露群では第 1 位の network score ( $-\log_{10}(p\text{-value})$ ) を示した。これは *HMOX1* など酸化ストレス応答遺伝子が多く発現上昇した結果と一致した。さらに、glucocorticoid receptor signaling が m2R4F 曝露群では第 7 位、FC 曝露群では第 4 位、BLY 曝露群では上位パスウェイに含まれなかったが有意な変動を示した (network score = 2.51)。Glucocorticoid receptor はステロイドホルモンの受容体として働き、炎症や免疫の制御など様々な機能に関わる<sup>24)</sup>が、IPA 上でこのパスウェイを構成する遺伝子には、*CXCL8* や *MMP1* など、いずれの CSE 曝露においても高い発現上昇を示した炎症性遺伝子が多く含まれており、このパスウェイの有意な変動は主に炎症反応の活性化を示していると考えられ

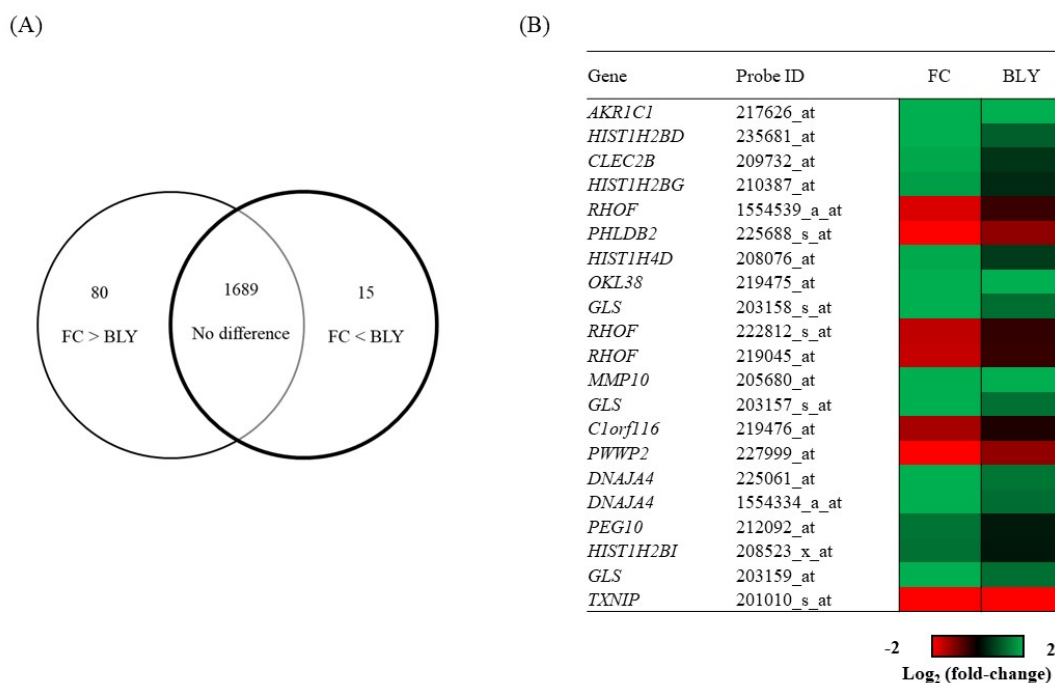
る。また、細胞周期に関与するパスウェイが 3 種の CSE 曝露群において共通して高い network score を示した。Cell cycle: G2/M DNA damage checkpoint regulation に加え、細胞分裂の調節に関わる mitotic roles of polo-like kinase と DNA 合成に関わる salvage pathways of pyrimidine ribonucleotides が全ての CSE 曝露群で上位変動パスウェイとなった。m2R4F 曝露群で最も network score が高かったパスウェイは、aryl hydrocarbon receptor signaling であった。このパスウェイは異物・薬物代謝において主要な第一相代謝酵素として働く cytochrome P450 (CYP) の合成を制御する経路であり<sup>25)</sup>、BLY 曝露群では第 8 位、FC 曝露群においても、上位変動パスウェイには含まれなかったが、有意な変動を示した (network score = 2.52)。



**Fig. 1-2** Canonical pathways derived from ingenuity<sup>®</sup> pathway analysis (IPA) gene ontology algorithms in NCI-H292 cells exposed to each cigarette smoke extract (CSE) of modified 2R4F (m2R4F), flue-cured (FC) or burley (BLY) cigarette. Bars show network score of each pathway (scored as  $-\log_{10}(p\text{-value})$ ) from Fisher's exact test. Dots show the ratio between the number of molecules from the dataset that map to the pathway listed and the total number of molecules that define the canonical pathway from within the IPA knowledgebase.

### 1.3.3 たばこ葉の違いが遺伝子発現変動に与える影響

たばこ葉の品種の違いが遺伝子発現に与える影響を比較検討するため、検討した 3 種の試験シガレットのうち最も特徴の異なる FC (100%黄色種のたばこ葉) と BLY (100%バーレー種のたばこ葉) の CSE を曝露した NCI-H292 細胞における遺伝子発現の差異を検討した。なお 2R4F は、黄色種とバーレー種のたばこ葉のブレンド製品である<sup>26)</sup>。FC 曝露群もしくは BLY 曝露群、または両者で有意に発現変動した遺伝子 1784 種を対象に、FC 曝露群における遺伝子発現変動率と BLY 曝露群における遺伝子発現変動率を 2 群比較したところ、95%にあたる 1689 遺伝子で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められなかった (Fig. 1-3 (A))。有意差が認められた遺伝子のうち、FC 曝露群において強く発現変動した遺伝子は 80 種、BLY 曝露群において強く発現変動した遺伝子は 15 種であったが、2 倍以上の発現変動率の差がある遺伝子に限ると、FC 曝露群において強く発現変動した遺伝子は 18 種 (20 probe)、BLY 曝露群において強く発現変動した遺伝子は 1 種 (*TXNIP*) のみであった。これら 19 種 (21 probe) の遺伝子の発現変動をヒートマップにより比較すると、いずれの遺伝子も FC 曝露群と BLY 曝露群で、同一方向 (上昇もしくは抑制) へ発現変動していた (Fig. 1-3 (B))。



**Fig. 1-3** Comparison of gene expression in NCI-H292 cells exposed to cigarette smoke extract (CSE) of flue-cured (FC) and burley (BLY) cigarettes. (A) Number of genes showing statistical difference by the Apsin-Welch *t*-test. (B) Heat map of genes showing difference in expression between cells exposed to CSE of FC and of BLY. Gene expression was color-coded based on log<sub>2</sub> (fold-change) compared to the solvent control.

## 1.4 考察

3種のCSE曝露により共通して最も大きく発現上昇した *MMP1* は、分泌型のマトリックスメタロプロテアーゼをコードする遺伝子であり、細胞外マトリックスの分解に加え、炎症性反応の亢進にも関与する<sup>37)</sup>。特に、肺組織における *MMP1* の過剰発現は肺気腫の原因の一つとされる<sup>27, 28)</sup>。この *MMP1* 遺伝子の発現は、主に転写因子 activator protein 1 (AP-1) や nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) により制御されることが知られているとともに<sup>29)</sup>、hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) などが関与しているとの報告もある<sup>30)</sup>。したがって、CSE曝露した NCI-H292 細胞において、これらの転写因子の活性化が強く引き起こされている可能性が考えられる。また、3種のCSE曝露により共通して2番目に大きく発現上昇した *HMOX1* は、酸化ストレスをはじめとする種々のストレスで誘導される遺伝子であり、主に転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) により転写制御されることが知られている<sup>31)</sup>。これらの遺伝子に加えて、*CXCL8*、*FOSL1*、*SLC7A11* など、炎症性反応と酸化ストレスに関与する遺伝子が共通して高く発現上昇していたことから、炎症性反応や酸化ストレス応答に関与する NF- $\kappa$ B や NRF2 などの転写因子が活性化している可能性が高いと考えられる。一方、最も発現抑制した *TXNIP* はチオレドキシシン合成の阻害に関与することが報告されている<sup>32)</sup>。したがって CSE曝露への酸化ストレス応答としてチオレドキシシン合成経路が活性化している可能性が考えられる。次いで発現抑制が強かった *SLC2A3* はグルコース輸送に関与し、主に神経細胞や白血球で発現が高いことが知られている<sup>33)</sup>。また、3番目に強く発現抑制された *MARCKS* は、protein kinase C の基質タンパク質であり細胞の運動や接着、細胞周期の調整など様々な細胞機能に関与することが知られている<sup>34, 35)</sup>。NCI-H292 細胞への CSE の曝露におけるこれら遺伝子の制御機構ならびに発現抑制が示す生物学的意義の理解には今後更なる研究が必要とされる。

パスウェイ解析では、炎症性反応、酸化ストレス応答に関与するパスウェイに加えて、細胞周期や DNA 合成に関与するパスウェイの変動が有意となった (Fig. 1-2)。有意に変動したパスウェイとして認められた mitotic roles of polo-like kinase や salvage pathways of pyrimidine ribonucleotides は、DNA 損傷の応答として活性化することが報告されており<sup>36, 37)</sup>、これらパスウェイの変動は、CSE曝露による DNA 損傷を反映していると考えられる。また、aryl hydrocarbon receptor signaling の有意な変動は、CYP 活性の変化を示唆しており、シガレット煙中成分の代謝進行を反映していると考えられる。シガレット煙中に含まれる benzo[*a*]pyrene などの多環芳香族炭化水素は、CYP 代謝により変異原性を獲得することが知られている<sup>38)</sup>。このことから、CSE曝露による転写因子 aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化が DNA 損傷に関与するパスウェイを変動させた可能性が考えられる。

上記の転写因子の他に、酸化ストレス応答、炎症反応、DNA 損傷、異物代謝に関与するいくつかの転写因子が CSE 曝露により活性化することが報告されている。Signal transducer and activator of transcription (STAT) は細胞増殖、分化などに作用する他、サイトカインの生理作用において重要な働きを担う<sup>39)</sup>。肺細胞においては、特に STAT3 が喘息や COPD の発症と関連することが示唆されており<sup>40)</sup>、CSE 曝露で STAT1 および STAT3 が活性化し、それぞれアポトーシスおよび炎症性反応を引き起こすと報告されている<sup>40, 41)</sup>。さらに、ヒト気管支上皮細胞への CSE 曝露で炎症性遺伝子の発現、とりわけ *CXCL8* の発現が *HSP70* により誘導されることが報告されている<sup>42)</sup>。本研究においても CSE に曝露した NCI-H292 細胞で *HSP70* の発現上昇が認められた (m2R4F: 7.0 倍、FC: 8.0 倍、BLY: 5.9 倍 (結果省略)) ことから、*HSP70* の発現を制御する heat shock factor (HSF) が活性化している可能性が考えられる。さらに、*HSP70* は小胞体ストレスにより過剰に発現することが知られており、また小胞体ストレスに応答する転写因子 activating transcription factor 6 (ATF6) が CSE 曝露で活性化することが報告されている<sup>15)</sup>。したがって、ATF6 が CSE 曝露により活性化している可能性が考えられる。さらに、DNA 損傷に関与する転写因子として、cAMP response element binding protein (CREB) が CSE 曝露により活性化することが報告されている<sup>43, 44)</sup>。CREB の主な機能の一つとして、DNA 損傷に対する細胞生存を調節することが知られている<sup>45)</sup>。CSE に曝露した NCI-H292 細胞において、複数の DNA 損傷に関与するパスウェイが共通して有意であったことから、CREB が活性化していることも考えられる。

本章の検討において、異なる 3 種類の試験シガレットから捕集された CSE への曝露の影響を比較すると、*MMP1*、*HMOX1* など上位に発現変動した遺伝子は同様であった (Table 1-2)。また、パスウェイ解析においても、それぞれのパスウェイの順位に違いはあるものの、共通して、酸化ストレス応答、炎症反応、DNA 損傷、異物代謝などに関するパスウェイが有意に変動した (Fig. 1-2)。さらに、FC もしくは BLY 曝露で有意に発現変動した遺伝子 (1784 遺伝子) の 2 群比較では、たばこ葉の品種が異なるにも関わらず、95%にあたる 1689 遺伝子で有意な変動率の差は認められず、有意な変動率の差が認められた遺伝子においても変動方向は同一であった (Fig. 1-3)。このことから、今回用いたたばこ葉の品種の差異が、少なくとも NCI-H292 細胞においては、遺伝子発現に与える影響は少ないと考えられる。

以上より、CSE の急性曝露により発現上昇が認められた遺伝子ならびに活性化が認められたパスウェイの結果から、複数の転写因子の活性化が引き起こされることが示唆された。そこで次章では、これらの転写因子に着目し、その中からシガレット煙抽出液の急性曝露に対して鋭敏に反応する転写因子を探索することとした。

## 第2章 シガレット煙抽出液の急性曝露による転写因子活性化の検討

### 2.1 背景・目的

前章の網羅的遺伝子解析の結果、CSE の急性曝露に対して酸化ストレス応答、炎症反応、DNA 損傷ならびに異物代謝に関与する複数の転写因子が活性化する可能性が示唆された。これら転写因子とシガレット煙抽出液曝露の関係については、これまでに論文で報告されているものもあるが、全ての報告で一致した結果は得られていない。また、複数の転写因子の活性化を同一条件下で同時に比較した研究はないことから、シガレット煙抽出液の急性曝露に対し、どの転写因子が鋭敏に応答するかは不明であった。そのため本章では、前章の結果に基づき、10種類の転写因子を評価対象とし、同一条件下でそれぞれの転写因子の活性化を評価することで、シガレット煙抽出液曝露に対して最も高く、かつ鋭敏に反応性を示す転写因子を特定することを目的とした。

### 2.2 実験材料・方法

#### 2.2.1 ルシフェラーゼベクターの構築

評価対象とした転写因子ならびにその応答配列 (response element: RE)、ルシフェラーゼベクターに導入した配列を Table 2-1 に示す。またこれらの転写因子は、転写因子解析ソフトウェア TRANSFAC<sup>®</sup> (<http://genexplain.com/transfac/>) を用いた解析においても、ランダム抽出した遺伝子群と比較して、CSE の曝露で有意に発現変動した遺伝子群のプロモーター領域において RE の存在比が高いことが示された (Table 2-1)。また、レポーターベクターは pGL4 (Promega, Madison, WI) を用い、各転写因子の RE のベクターへの導入および RE の反復数の最適化は Promega 社に委託した。

#### 2.2.2 細胞培養

本章では、前章で用いた粘膜表皮がん由来ヒト気道上皮細胞株である NCI-H292 細胞に加えて、ヒト気管支上皮細胞である BEAS-2B 細胞を用いた。BEAS-2B 細胞は、剖検によって得られた正常気管支上皮細胞に由来し、SV40/アデノウイルス 12 のハイブリッド感染により不死化された細胞株である。BEAS-2B 細胞は、ヒト初代気管支上皮細胞ならびに NCI-H292 細胞と遺伝子発

現パターンが類似していることが報告されており<sup>46)</sup>、浮遊粒子状物質など、吸入物質の影響評価に幅広く使用されている細胞である<sup>47,48)</sup>。

**Table 2-1** Transcription factors selected for reporter assays.

Response elements	Transcription factors	Ratio*	Inserted sequences (5' → 3')
cyclic AMP response element (CRE)	CREB	2.91	GCGCACCAGACAGTGACGTCAGCTGCCAGAT CCCATGGCCGTCATACTGTGACGTCTTTCAGA CACCCCATGACGTCAATGGGAGAAC
nuclear factor-kappa B response element (NF-κB-RE)	NF-κB	3.49	GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCC GGGGACTTTCCGGGAATTTCC
anti-oxidant response element (ARE)	NRF2	3.14	TAGCTTGAAATGACATTGCTAATGGTGACA AAGCAACTTTTAGCTTGAAATGACATTGCT AATGGTGACAAAGCAACTTT
activating transcription factor 6 response element (ATF6-RE)	ATF6	2.93	TCGAGACAGGTGCTGACGTGGCATTTCATCGA GACAGGTGCTGACGTGGCATTTCATCGAGACA GGTGCTGACGTGGCATTTCATCGAGACAGGTG CTGACGTGGCATTTCATCGAGACAGGTGCTGA CGTGGCATTTC
heat shock response element (HSE)	HSF	2.90	TGGAAGATTCTAGAACGTTCTGGAAGATTCT AGAACGTTTC
hypoxia response element (HRE)	HIF1	2.44	TGACTACGTGCTGCCTAGGTGACTACGTGCT GCCTAGGTGACTACGTGCTGCCTAGGTGACT ACGTGCTGCCTAG
xenobiotic response element (XRE)	AhR	2.27	GAGTTCTCACGCTAGCAGATTGAGTTCTCAC GCTAGCAGATTGAGTTCTCACGCTAGCAGAT
AP-1 response element (AP-1-RE)	AP-1	2.44	TGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCA GTGAGTCAGTGACTCAG
interferon-stimulated response element (ISRE)	STAT1/2	2.01	TAGTTTCACTTTCCCTAGTTTCACTTTCCCTA GTTTCACTTTCCCTAGTTTCACTTTCCCTAGTT TCACTTTCCC
sis-inducible element (SIE)	STAT3	2.01	GCTTCATTTCCCGTAAATCGTCGAAGCTTCAT TTCCCGTAAATCGTCGAAGCTTCATTTCCCGT AAATCGTCGAAGCTTCATTTCCCGTAAATCGT CGAAGCTTCATTTCCCGTAAATCGTCGA

\* Ratio of abundance of each response element on genes regulated in NCI-H292 cells exposed to CSE compared to that on genes randomly selected.



NCI-H292細胞は1.2.4項と同様の方法で培養した。BEAS-2BはAmerican Type Culture Collectionから入手し、bronchial epithelial cell growth basal medium (BEGM, Lonza, Basel, Switzerland) とAdvanced DMEM/F12培地 (Thermo Fisher Scientific) を1/1 (v/v) で混合したものに気管支上皮細胞添加因子セット (human epidermal growth factor, hydrocortisone, epinephrine, transferrin, insulin, retinoic acid, triiodothyronine を含有) (Lonza) を添加して調製した BEGM/DMEM 培地、またはairway epithelial cell growth medium (AEGM, Promcell, Heidelberg, Germany) を用いて培養した。BEAS-2B 細胞の培養に用いたフラスコおよびマイクロプレートは全て type I collagen (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) でコーティングしたものをを用いた。

### 2.2.3 レポーターベクターの導入

各ベクターは *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells (Takara Bio, Shiga, Japan) にヒートショック法で導入した。融解した DH5 $\alpha$  5  $\mu$ l にベクター 1 ng を加え氷上で5分間静置した。さらに42°Cのヒートブロックで30秒加温後、LB培地を90  $\mu$ l 加え、ampicillin を含む寒天LB培地上に播種し、37°Cで24時間インキュベートした。寒天LB培地上に発生したコロニーのうちの数個を爪楊枝で取り、コロニーPCRによりベクターの有無を確認した。ターゲットはルシフェラーゼがコードされた配列 (*luc2*) 内の101 bp とし、Forward プライマー : GATCCTCAACGTGCAAAGAAGC、Reverse プライマー : TCACGAAGGTGTACATGCTTTGG を用いた。ベクターの存在が確認されたコロニーを複数個つまみ取り、ampicillin を含むLB培地に加え37°Cで24時間培養後、Plasmid DNA Purification Kit (Qiagen) を用いベクターを精製した。得られたベクターはアガロースゲル電気泳動および吸光度測定により高純度 (260 nm の吸光度/280 nm の吸光度 > 1.8) であることを確認した。

精製したベクターは Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent (Life Technologies, Santa Clara, CA) を用いたりポフェクション法により、NCI-H292細胞およびBEAS-2B細胞に導入した。1.6  $\mu$ g のベクターと4.0  $\mu$ l の Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を100  $\mu$ l 中の Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Media (Life Technologies) 内で混合し、30分間静置した。12-well プレートにセミコンフルエントに培養した細胞の培地を除去し、PBS で洗浄後、ベクターを含む Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Media 全量 (100  $\mu$ l/well) と細胞培養用培地を400  $\mu$ l/well 加え、6時間培養した。その後、培地を交換し、48時間回復培養した後、200  $\mu$ g/ml の hygromycin B (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む培地で2週間培養し、生存細胞をベクター安定発現細胞とした。細胞は  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で CELLBANKER<sup>®</sup> 1 (Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan) に懸濁させ、1 ml を凍結チューブに入れ-80°C または液体窒素中で凍結保存した。凍結の際に細胞の一部から DNeasy Blood & Tissue

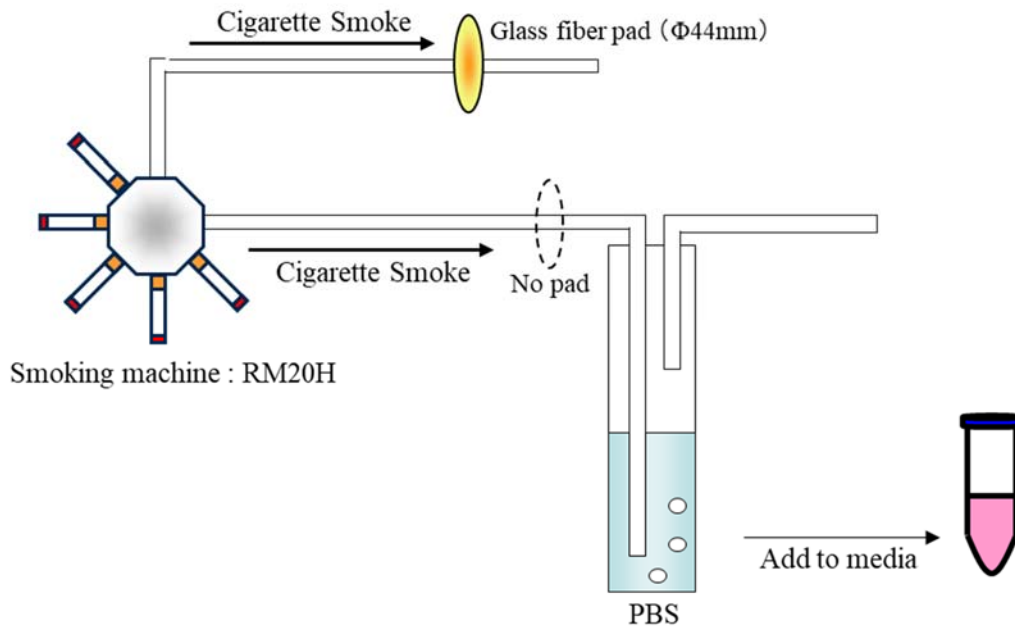
Kit (Qiagen) により DNA を回収し、PCR によりベクターの保持を確認した。ターゲットは luc2 内の 101 bp とし、上記の Forward、Reverse プライマーを用いた。

#### 2.2.4 試験シガレットおよび aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) の調製

前章で用いた試験用シガレット 2R4F の販売が終了したため、後継品として製造された 3R4F を被験シガレットとした。なお、2R4F と 3R4F は ISO 条件に基づいた喫煙方法により発生する主要煙中成分の化学分析の結果、ならびにラットへの 90 日間吸入曝露試験における影響が同等であることが示されている<sup>26)</sup>。3R4F はケンタッキー大学 Center for Tobacco Reference Products から購入し、ISO の規定に基づき、60%相対湿度、22°C の条件下で 48 時間以上保管した後、実験に供した<sup>20)</sup>。

シガレット煙の捕集・抽出方法は、たばこ業界により *in vitro* 試験に適した方法として標準・常用化されているものとして、パッドに捕集したシガレット煙を DMSO に抽出する方法と、シガレット煙を PBS へ直接バブリングし、煙中成分を PBS に回収する方法がある<sup>49-51)</sup>。後者の方法で調製した AqCSE は有機溶剤を含まない点にメリットがあるが、脂溶性成分の溶解度は DMSO を含む CSE に比べて低いと考えられる。第 1 章の網羅的遺伝子解析では、より多くの変動パスウェイを検出することに重きを置き、DMSO 抽出液の CSE (DMSO の終濃度 2%) を用いて検討を行った。一方、本章においては、終濃度 2% の DMSO がルシフェラーゼアッセイに影響を与えることが明らかとなったため、PBS を抽出溶媒とする AqCSE を用いることとした。

シガレット煙は PBS への全煙バブリング法 (Fig. 2-1) を用いて捕集し AqCSE を調製した。12 本の 3R4F をロータリー型喫煙器 RM20H にセットし、ISO 喫煙条件下で機械喫煙させた<sup>21)</sup>。発生した全煙を氷冷した 15 ml の PBS にバブリングすることにより AqCSE を得た。実験に用いた AqCSE の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は、業界で標準・常用化された方法に従い、同一の喫煙条件によりケンブリッジフィルターパッドに捕集されたシガレット煙の重量を PBS 中に溶解したシガレット煙重量と定義し算出した<sup>50,51)</sup>。AqCSE は、直ちに適量の Eagle's minimal essential medium (MEM, Life Technologies) に溶解し被験液とした。全ての被験液における PBS 濃度が 10%となるよう調整し、溶媒対象コントロールとして、PBS (終濃度 10%) を加えた MEM を用いた。



**Fig. 2-1** Method for preparing of aqueous cigarette smoke extract (AqCSE). 3R4F cigarettes were smoked on a RM20H smoking machine under ISO 3308 conditions. AqCSE was prepared by bubbling whole mainstream cigarette smoke through 15 ml phosphate-buffered saline (PBS). The resulting extract was diluted in cell culture media to obtain the required concentrations, calculated as total particulate matter unit per PBS ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 2.2.5 Neutral red 試験

細胞障害性の指標として、neutral red (NR) の取込率による細胞活性の測定を行った<sup>50)</sup>。96-well プレートに細胞を  $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、16 – 20 時間培養した。適切な濃度に調整した AqCSE に 6 時間曝露後、被験液を除去し、MEM 中に溶解した 1.5% NR 溶液を加え、37°C で 3 時間インキュベートした。NR 溶液を除去し、固定液 (0.4% formaldehyde, 10 g/l calcium chloride) を加え、室温で 1 分間静置した。次いで固定液を除去し、抽出液 (1% acetic acid, 50% ethanol) を加え室温で 10 分間振とうし、完全に NR を抽出液中に抽出した。NR が抽出された抽出液を、96-well プレートに 200  $\mu\text{l}$ /well 移し、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。溶媒対象コントロールに対する NR 取込量の割合を細胞障害性の指標として評価とした。統計解析は、Dunnett 法を用い、溶媒対象コントロールとの有意差を多重検定した。

### 2.2.6 遺伝子発現評価

シガレット煙抽出方法の変更による影響を検討するため、第1章で実施した NCI-H292 細胞における網羅的遺伝子解析において CSE 曝露で最も高い発現上昇を示した *MMP1*、*HMOX1*、*CXCL8* を対象に、これらの遺伝子が AqCSE 曝露においても発現上昇するかを検討した。NCI-H292 細胞ならびに BEAS-2B 細胞を 12-well プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well で播種し、16 – 20 時間培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、適切な濃度に調整した AqCSE に 6 時間曝露した。曝露後、被験液を除去し、PBS で 2 度洗浄後、1 ml/well の ISOGEN に細胞を溶解後、1.2.5 項と同様の方法で、total RNA の抽出および cDNA 合成を行った。qPCR は、Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を用い比較  $C_t$ 法により相対定量した。内部標準遺伝子は *GAPDH* を用いた。

### 2.2.7 レポーターアッセイ

レポーターアッセイ用ベクターを安定発現させた NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞を 12-well プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well で播種し、16 – 20 時間培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、適切な濃度に調整した AqCSE に曝露した。Promega 社の内部検討結果より、ルシフェラーゼ活性強度は、ルシフェラーゼ遺伝子転写後 3 時間で上昇し、4.5 時間で最大となることから、細胞の初期応答に焦点を当てるため、AqCSE への曝露時間は 5 時間とした。曝露後、被験液を除去し、PBS で 2 度洗浄後、Luciferase lysis buffer (Promega) を 40  $\mu$ l/well 加え、スクレイパーおよびピペッティングにより細胞を溶解し、マイクロチューブに回収した。回収した細胞溶解液を 14000 rpm で 3 分間遠心分離し上清 20  $\mu$ l を白色 96-well プレートに移した。このプレートをルミノメーターにセットし、Luciferase assay system (Promega) の溶剤を加えた直後の 10 秒間の積算発光強度を測定した。統計解析は、Dunnett 法を用い、溶媒対象コントロールとの有意差を多重検定した。

### 2.2.8 ウェスタンブロッティング

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride (Tris-HCl), 1% triton-X100, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) を作製し、さらに Protease inhibitors cocktail (Roche Applied Science, Upper Bavaria, Germany) および Phosphatase inhibitors cocktail (Roche Applied Science) を添

加した modified RIPA (mRIPA) buffer を細胞溶解液として用いた。被験液に曝露した細胞は、PBS で 2 度洗浄後、mRIPA buffer (100  $\mu$ l/well) に溶解し、全量をマイクロチューブに加え、15000 rpm で 3 分間遠心分離し上清を回収した。回収したサンプルは、使用するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管した。溶解したサンプルは、DC Protein assay (Bio-rad) により総タンパク質量を定量し、必要に応じて mRIPA buffer で希釈した後、sodium dodecyl sulfate (SDS) gel-loading buffer (50 mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 100 mM dithiothreitol) を加え  $95^{\circ}\text{C}$  で 5 分間ボイルした。ボイル後のサンプルを 10% SDS-poly-acrylamide gel にアプライし電気泳動後、ゲル中のタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。次に、取り出した PVDF メンブレンを 10% スキムミルクを加えた Wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100) で 1 時間室温または 16 時間  $4^{\circ}\text{C}$  でインキュベートし、非特異的結合をブロックした。次いで反応液を除去し、Wash buffer で 1000 倍希釈した 1 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。続いて反応液を除去し、Wash buffer で 3 回洗浄後、Wash buffer で 1000 倍希釈した 2 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。さらに Wash buffer で 3 回洗浄後、ECL-Plus Western Detection System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) の発光試薬と反応させ、イメージアナライザー LAS4000 (GE Healthcare) によりバンドを検出した。解析および半定量化には、Image Gauge software program version 4.0 (GE Healthcare) および Image J<sup>52)</sup>を用いた。1 次抗体および 2 次抗体は、以下の抗体を用いた。

- 1 次抗体
  - Anti-NRF2 rabbit antibody: ab62352, abcam (Cambridge, UK)
  - Anti-HMOX1 rabbit antibody: #5061, Cell Signaling Technology (Danvers, MA)
  - Anti-NQO1 rabbit antibody: #5061, Cell Signaling Technology
  - Anti-KEAP1 rabbit antibody: #4678, Cell Signaling Technology
  - Anti-GAPDH mouse antibody: sc-47724, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
  - Anti-p62 rabbit antibody: #5114, Cell Signaling Technology
- 2 次抗体
  - ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked whole antibody (from sheep), GE Healthcare
  - ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked whole antibody (from sheep), GE Healthcare

## 2.2.9 細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の測定

細胞内 ROS の検出試薬として、5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (Life Technologies) を用いた。BEAS-2B 細胞を 96-well プレートに  $4 \times$

10<sup>4</sup> cells/well の濃度で播種し培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、CM-H<sub>2</sub>DCFDA を 10 μM の濃度で溶解した PBS 溶液を 100 μl/well 添加し、60 分間インキュベートした。CM-H<sub>2</sub>DCFDA 溶液を除去し、PBS で3度洗浄後、AqCSE または陽性対象コントロールである hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を 100 μl/well 加え 90 分間曝露した。曝露後の細胞を mRIPA buffer で溶解後、励起波長 495 nm における 525 nm の蛍光強度を測定した。統計解析は、Dunnett 法を用い、溶媒対象コントロールとの有意差を多重検定した。

### 2.2.10 Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) タンパク質中のチオール基の測定

リコンビナント KEAP1 タンパク質は、Sino Biological Inc. (Beijing, China) から購入した。KEAP1 タンパク質は、poly-acrylamide gel において電気泳動した後、coomassie brilliant blue で染色し、タンパク質純度が 90%以上であることを確認した。KEAP1 タンパク質は、PBS 中で AqCSE または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と室温で 90 分間インキュベートした。次いでチオール基と反応する蛍光試薬 (Amplite Fluorimetric Total Thiol Quantitation Assay Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA)) を添加し室温で 10 分間静置後、励起波長 490 nm における 520 nm の蛍光強度を測定した。統計解析は、Dunnett 法を用い、溶媒対象コントロールとの有意差を多重検定した。

### 2.2.11 p62/KEAP1 複合体形成の評価

BEAS-2B 細胞を 6-well プレートに 1 × 10<sup>6</sup> cells/well の濃度で播種し、成長因子を含まない培地で 16 – 20 時間培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、適切な濃度に調整した AqCSE を加え 6 時間曝露した。被験液を除去し、PBS で洗浄後、mRIPA buffer を 100 μl/well 加え、ピペッティングにより全量を回収した。回収した細胞溶解液は、Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、anti-p62 抗体による免疫沈降を行った。Anti-p62 mouse antibody (abcam, #ab56416) を Protein A/G と添付の Coupling buffer 中で転倒攪拌しながらインキュベートし、抗体を固定化した。次いで細胞溶解液を添付の IP Lysis/Wash buffer で 1.5 mg/ml に調整し、600 μl (900 μg タンパク質) を抗体が固定化された担体と混ぜ、転倒攪拌しながら 4°C で 24 時間インキュベートした。タンパク質が結合した担体を回収し、2-mercaptoethanol および SDS を含む添付の Elution buffer (25 μl) を用い、タンパク質を回収した (1 次溶出液)。再度、同様の手順で溶出液を回収した (2 次溶出液)。回収した 1 次および 2 次溶出液は、2.2.8 項と同様の方法で、ウエスタンブロッティングにより p62 および KEAP1 タンパク質量を評価した。

### 2.2.12 Inhibitor kappa B-alpha (IκBα) リン酸化の評価

NCI-H292 細胞を 12-well プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well の濃度で播種し、16 – 20 時間培養後、培地を除去し、AqCSE (100 μg/ml) または陽性対象コントロールとして tumor necrosis factor alpha (TNF-α) (10 ng/ml) に曝露した。曝露時間は最大 6 時間とし、曝露時間経時的に、mRIPA buffer を 100 μl/well 加え、ピペッティングにより細胞を回収した。回収した細胞溶解液は、2.2.8 項と同様の方法で、ウエスタンブロッティングに供した。1 次抗体は以下のものを、2 次抗体は 2.2.8 項と同様のものを用いた。

- Anti-IκBα mouse antibody: #4814, Cell Signaling Technology
- Anti-Phospho-IκBα mouse antibody: #9246, Cell Signaling Technology
- Anti-GAPDH mouse antibody: sc-47724, Santa Cruz Biotechnology

### 2.2.13 NF-κB 核移行の評価

Cellomics® NF-κB Activation HCS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、NCI-H292 細胞における NF-κB の核移行を評価した。NCI-H292 細胞を 96-well プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し 16 – 20 時間培養後、培地を除去し、AqCSE (10 – 100 μg/ml) または TNF-α (10 ng/ml) に最大 3 時間曝露した。被験液を除去後、4% formaldehyde 溶液を加え室温で 15 分インキュベートすることにより、細胞を固定化した。4% formaldehyde 溶液を除去し、添付の Wash buffer I で 3 度洗浄後、添付の Permeabilization buffer で 15 分処理した。次いで Wash buffer I で 3 度洗浄後、添付の Blocking buffer を加え 15 分間インキュベートし、非特異的結合をブロックした。続けて Wash buffer I で 3 度洗浄後、anti-NF-κB (p65) rabbit antibody を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。さらに Wash buffer I で洗浄後、DyLight 488-conjugated goat anti-rabbit と hoechst を添加した添付の Wash buffer II を加え、室温、遮光条件で 10 分間インキュベートした。反応液を除去し、Wash buffer II で洗浄後、プレートをシールし、Cellomics™ ArrayScan® VTI System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、細胞内の蛍光を観測した。NF-κB (DyLight 488) の観測には、励起波長 488 nm および蛍光波長 530 nm、核 (hoechst) の観測には励起波長 343 nm および蛍光波長 482 nm を使い、Cellomics ArrayScan Instrument (Thermo Fisher Scientific) により画像解析を行った。NF-κB 核移行の定量は、Ding らの手法<sup>53)</sup>を参考に、hoechst 染色部位を核、hoechst 染色部位の外側領域 2 ピクセル分を細胞質と定義し、核内と細胞質内の蛍光強度差 (Nucleus-to-cytoplasm Avg

Intensity Difference) を核移行の指標とした。各 well あたり 200 個の細胞を測定し、平均値を定量値とした。

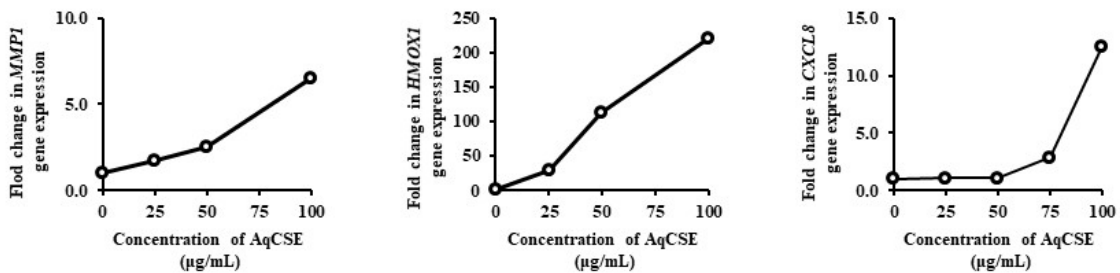


## 2.3 結果

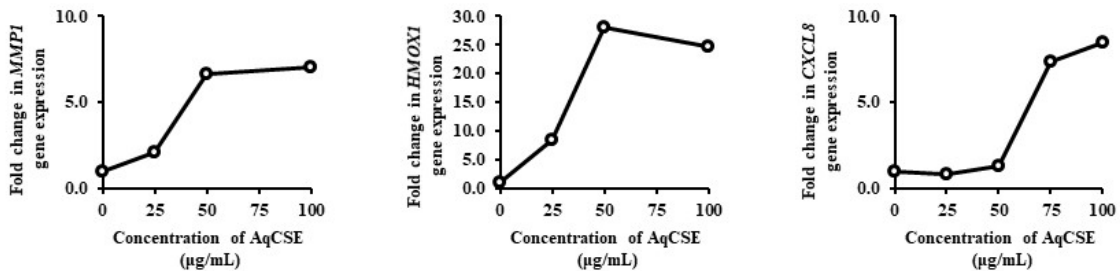
### 2.3.1 AqCSE 曝露における遺伝子発現変動

AqCSE に曝露した NCI-H292 細胞ならびに BEAS-2B 細胞における遺伝子発現の変動を Fig. 2-2 に示す。双方の細胞において、AqCSE 曝露による *MMP1*、*HMOX1* および *CXCL8* の発現上昇が確認された。解析方法が異なることから、発現変動比の比較は難しいが、第 1 章の網羅的遺伝子解析において、m2R4F の CSE に曝露した NCI-H292 において最も高く変動したこれら 3 遺伝子 (Table 1-2) は、3R4F の AqCSE に曝露した NCI-H292 細胞ならびに BEAS-2B 細胞においても、同様に発現上昇することが示された。

#### (A) NCI-H292



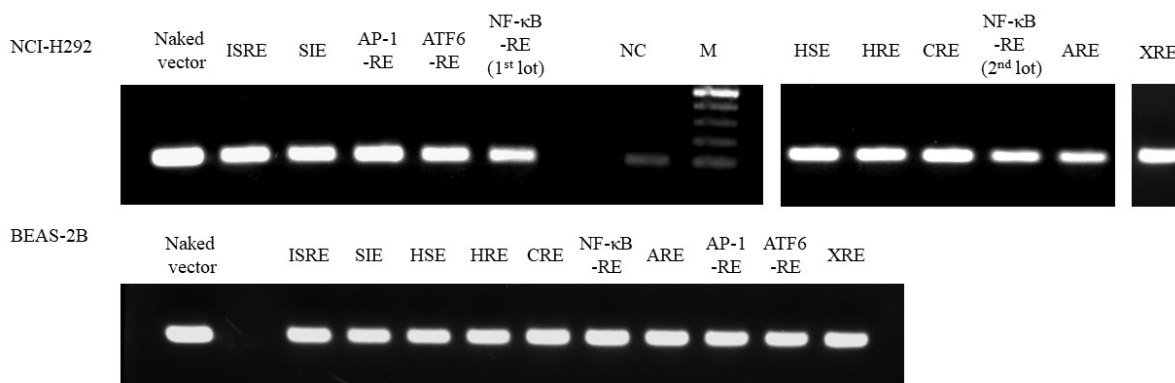
#### (B) BEAS-2B



**Fig. 2-2** Fold change in expression of *MMP1*, *HMOX1*, and *CXCL8* in (A) NCI-H292 and (B) BEAS-2B cells exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) for 6 h. Gene expression is indicated as the fold change relative to the solvent control (SC).

### 2.3.2 レポーターベクター安定発現株の作製

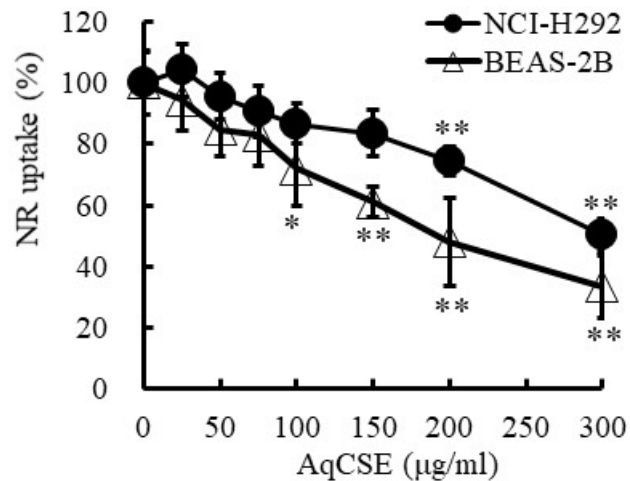
レポーターベクターの安定発現は PCR によって確認し、2 種類のヒト気管支上皮細胞株 NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞を用いて、目的の転写因子の RE を有するレポーターベクターの安定発現細胞株を樹立した (Fig. 2-3)。



**Fig. 2-3** Expression of pGL4 vectors in NCI-H292 and BEAS-2B cells transfected with vectors containing response element (RE) to relevant transcription factors. To confirm the size of PCR amplified product, naked vector was amplified and loaded onto agarose gels. NC: non-treatment cells. M: marker.

### 2.3.3 Neutral red 試験結果

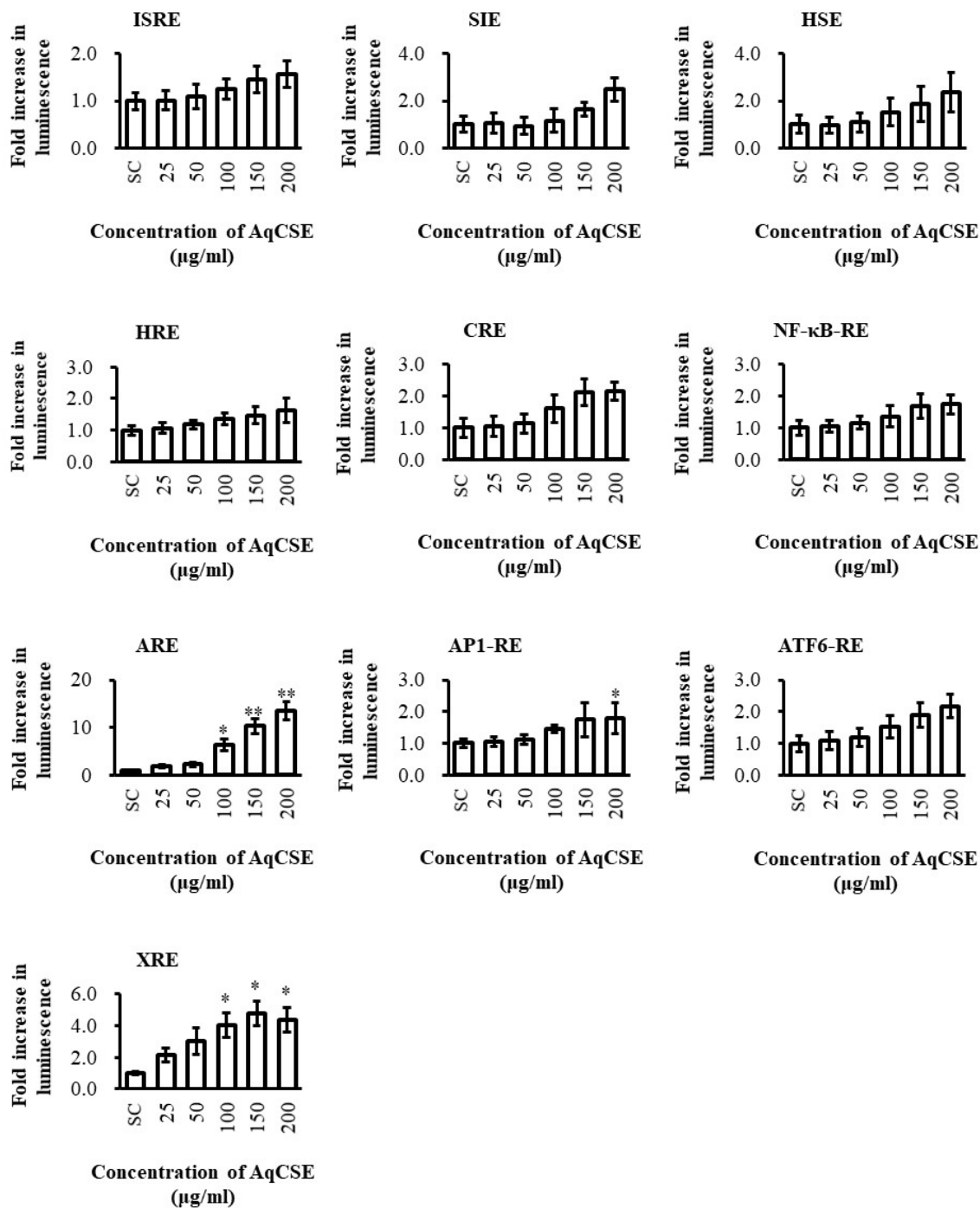
NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞の AqCSE 曝露に対する NR 取込率を Fig. 2-4 に示す。用量依存的に、細胞障害性の指標である NR 取込率の低下が観測され、NCI-H292 細胞では 200  $\mu\text{g/ml}$ 、BEAS-2B 細胞では 100  $\mu\text{g/ml}$  以上の曝露濃度でそれぞれ有意な低下が認められた。そのため、レポーターアッセイ試験における AqCSE の最大曝露濃度は、NCI-H292 細胞では 200  $\mu\text{g/ml}$  (NR 取込率  $74.5 \pm 4.7\%$ )、BEAS-2B 細胞では 100  $\mu\text{g/ml}$  (NR 取込率  $72.1 \pm 12.3\%$ ) と設定した。



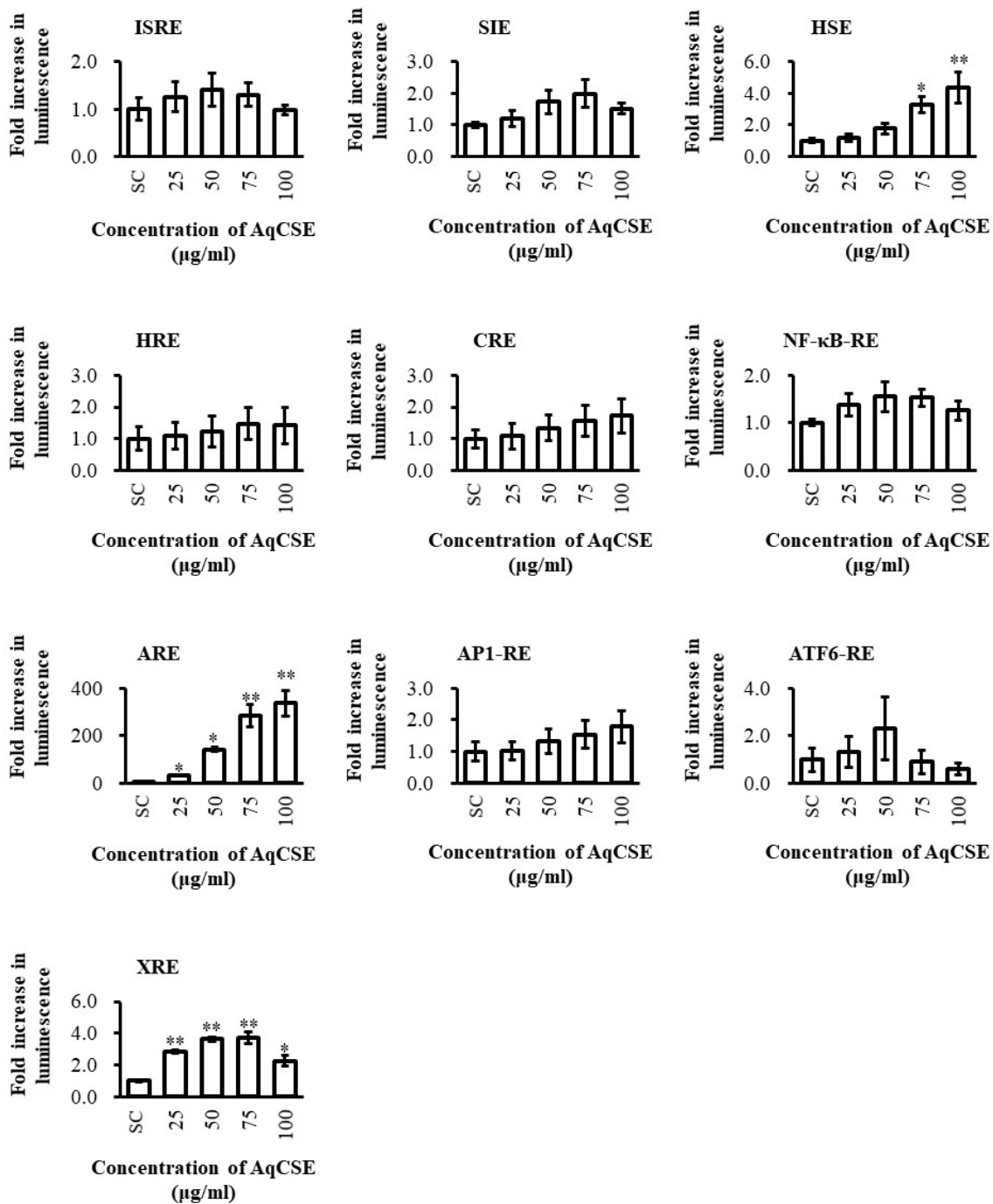
**Fig. 2-4** The effects of aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) on NCI-H292 (closed circle) and BEAS-2B (open triangle) cell viability. Cell viability is expressed by neutral red (NR) uptake following 6 h exposure to AqCSE as a percentage of the solvent control (SC). Values are means plus standard errors (n = 3). Values that are significantly different from that of the SC (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01) by Dunnett's test are indicated.

### 2.3.4 AqCSE 曝露による転写因子の活性化

NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞のレポーターアッセイの結果をそれぞれ Fig. 2-5 および Fig. 2-6 に示す。双方の細胞において最も高い反応性を示したのは、ARE を有するレポーターであった。用量依存的な反応を示し、それぞれ最高用量において、NCI-H292 細胞では溶媒対象コントロールに対して 13.4 倍、BEAS-2B 細胞では溶媒対象コントロールに対して 335 倍のルシフェラーゼ活性を示した。次いで高い反応性を示したのは、XRE を有するレポーターであり、最高用量を除いて、双方の細胞において用量依存的な反応を示した。NCI-H292 細胞においては、150 µg/ml の AqCSE 曝露で最大となり、溶媒対象コントロールの 4.8 倍、BEAS-2B 細胞においては、75 µg/ml の AqCSE 曝露で最大となり、溶媒対象コントロールの 3.7 倍のルシフェラーゼ活性を示した。その他のレポーターは、NCI-H292 細胞においては、AP-1-RE を有するレポーターの活性が 200 µg/ml の AqCSE 曝露で有意な変動を示した。また、BEAS-2B 細胞においては、HSE を有するレポーターの活性が 75 および 100 µg/ml の AqCSE 曝露で有意な変動を示した。し



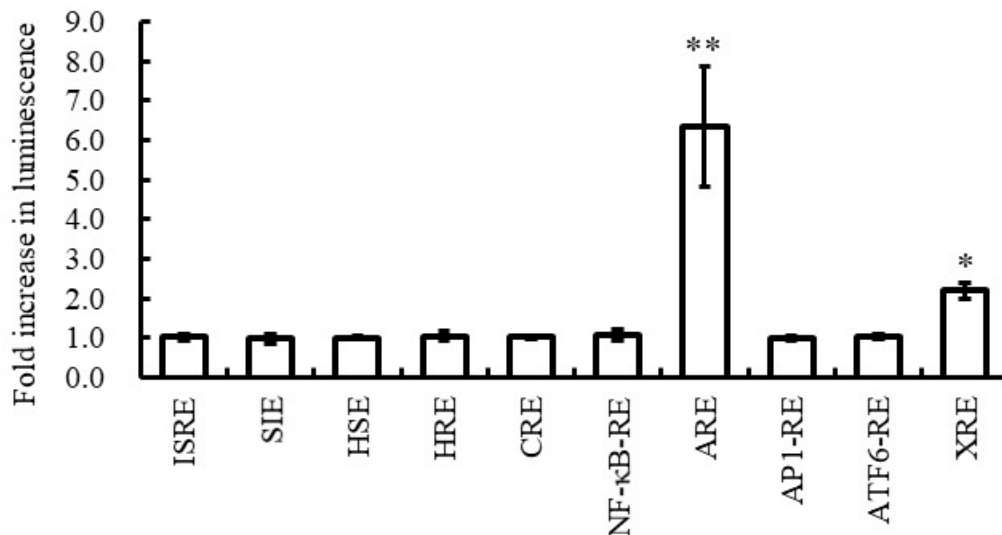
**Fig. 2-5** Results of reporter assay for 10 transcription factors in NCI-H292 cells. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) for 5 h and lysed for luciferase detection. Luciferase activity is expressed as the fold change relative to the solvent control (SC). Values are means plus standard errors (n = 3). Values that are significantly different from that of the SC (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) by Dunnett's test are indicated.



**Fig. 2-6** Results of reporter assay for 10 transcription factors in BEAS-2B cells. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) for 5 h and lysed for luciferase detection. Luciferase activity is expressed as the fold change relative to the solvent control (SC). Values are means plus standard errors (n = 3). Values that are significantly different from that of the SC (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) by Dunnett's test are indicated.

かし、いずれも双方の細胞で用量依存的な活性化は認められなかった。ISRE、SIE、HRE、CRE、NF- $\kappa$ B-RE および ATF6-RE の配列を有するレポーターは、双方の細胞において、いずれの曝露濃度であっても有意に変動しなかった。

さらに、低用量における反応性を比較するため、各転写因子の RE を有するレポーターベクターを導入した BEAS-2B 細胞を 10  $\mu$ g/ml の AqCSE に曝露した。結果を Fig. 2-7 に示す。ARE および XRE を有するレポーターの活性は、それぞれ 6.4 および 2.2 倍に有意に増加した。一方、他の 8 つの転写因子の配列を有するレポーターの変動は見られなかった。

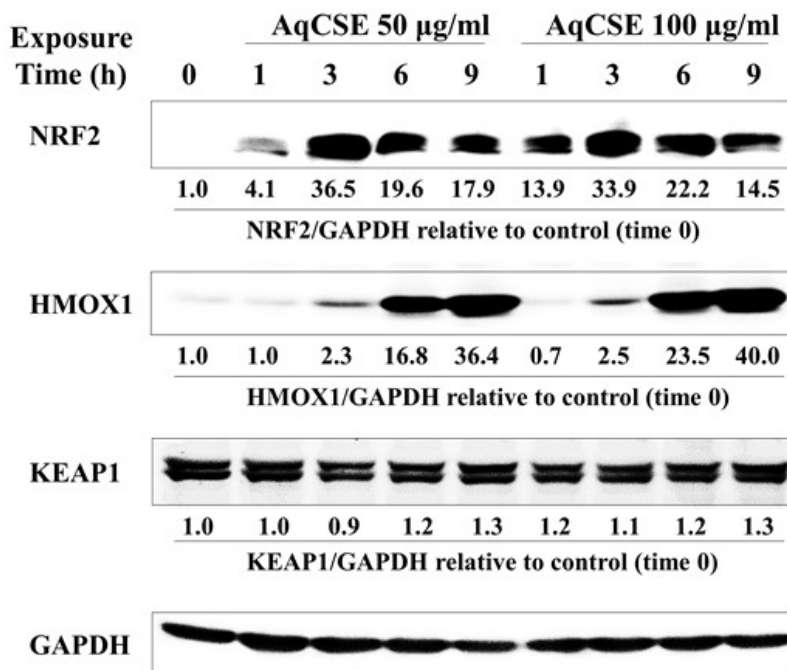


**Fig. 2-7** Results of reporter assay for 10 transcription factors in BEAS-2B cells exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at 10  $\mu$ g/ml. Cells were exposed to AqCSE for 5 h and lysed for luciferase detection. Luciferase activity is expressed as the fold change relative to the solvent control (SC). Values are means plus standard errors ( $n = 3$ ). Values that are significantly different from that of the SC ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ) by two-sided Student's  $t$ -test are indicated.

### 2.3.5 AqCSE 曝露による NRF2 および関連タンパク質発現の変動

AqCSE 曝露に対して ARE を有するレポーターが最も高い反応性を示したため、次に AqCSE による NRF2/ARE 経路の活性化機構を検討した。NRF2 の制御因子として機能する KEAP1 は、1 分子に 25 個のチオール基を有しており、特定のチオール基が親電子性物質などにより修飾を受けると、NRF2 との結合部位に構造変化が起き NRF2 との親和性が低下する<sup>31)</sup>。KEAP1 のチオール基が修飾を受ける経路として、細胞内 ROS の増加により電子的に修飾される場合と、化合物がチオール基と化学結合し、付加体を形成する場合の二つが主とされる<sup>54)</sup>。また、近年、KEAP1 中のチオール基の修飾を伴わない NRF2 活性化の仕組みとして、p62 による NRF2-KEAP1 結合の不安定化が報告された<sup>55)</sup>。そこで、AqCSE 曝露による NRF2 活性化機構として、これら経路の関与について検討した。

はじめに、AqCSE 曝露が、NRF2 関連タンパク質発現に与える影響を検討した結果を Fig. 2-8 に示す。NRF2 タンパク質は、50 および 100  $\mu\text{g/ml}$  の AqCSE に曝露した 1 時間後から検出され、曝露 3 時間後に最大発現に達した。NRF2 の活性化により誘導合成されるタンパク質の一つであ

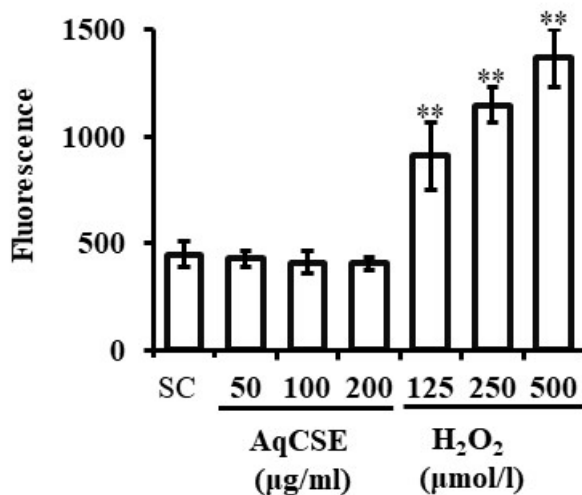


**Fig. 2-8** Protein expression of NRF2, HMOX1, and KEAP1 in BEAS-2B. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at 50 or 100  $\mu\text{g/ml}$  and lysed at various time points up to 9 h. GAPDH was measured as an internal control.

る HMOX1 の発現は、AqCSE の曝露 3 時間後から経時的に増加した。一方、NRF2 の転写活性を抑制する KEAP1 のタンパク質量は、AqCSE 曝露によって変動しなかった。これらの結果から、AqCSE 曝露は KEAP1 のタンパク質量に影響を与えずに、細胞内の NRF2 タンパク質量を増加させることが示された。

### 2.3.6 AqCSE 曝露による細胞内 ROS 産生

NRF2 活性化における細胞内 ROS の関与を検討するため、AqCSE に曝露した細胞における細胞内 ROS 産生量の変化を評価した。結果を Fig. 2-9 に示す。いずれの曝露濃度においても AqCSE に曝露した細胞で細胞内 ROS 量の増加に相当する蛍光の上昇は認められなかった。一方、陽性対象コントロールとして用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露した細胞では、用量依存的な蛍光強度の上昇が認められた。なお、本実験条件下では、90 分間の被験物質処理による細胞数の低下は光顕的に観察されなかった (結果省略)。

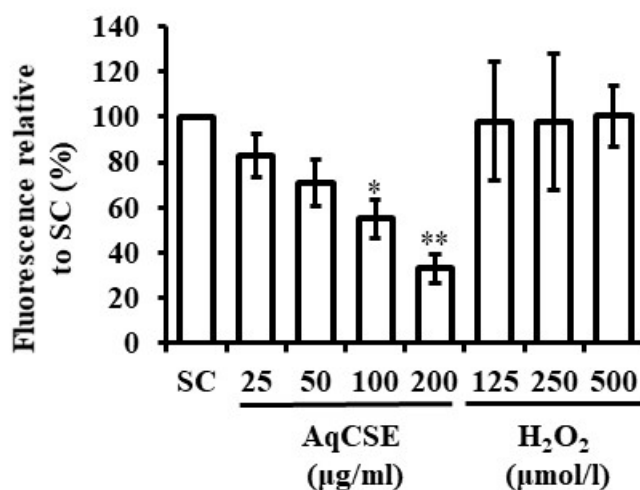


**Fig. 2-9** Result of intracellular reactive oxygen species (ROS) detection assay. BEAS-2B cells were pretreated with the cell-permeable reporter probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA and exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) or hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 90 min. Fluorescence intensity is positively correlated with amount of intracellular ROS. Values are means plus standard errors (n = 3). Values that are significantly different from that of the solvent control (SC) (\*\*p < 0.01) by Dunnett's test are indicated.



### 2.3.7 AqCSE と KEAP1 中のチオール基の反応性評価

次に、リコンビナント KEAP1 タンパク質のチオール基と AqCSE の反応性を評価した結果を Fig. 2-10 に示す。チオール基量に相当する蛍光は、100 および 200  $\mu\text{g/ml}$  の AqCSE 曝露に対して、それぞれ溶媒対象コントロールの 55% および 32% に減少し、用量依存的な変化が見られた。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$  に曝露した細胞では、蛍光強度の変化は見られなかった。



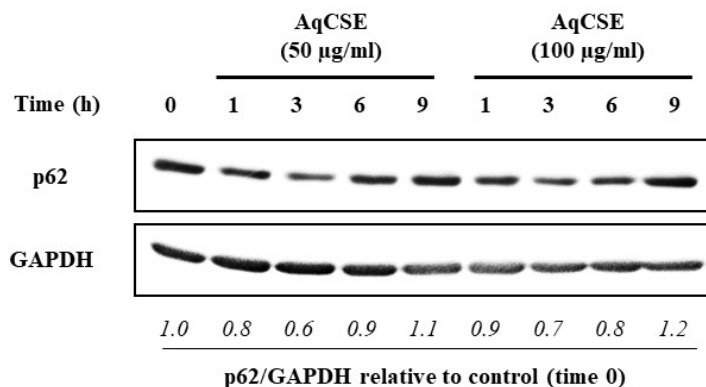
**Fig. 2-10** Quantification of total thiol on KEAP1. Human recombinant KEAP1 protein was incubated with aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) or hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in PBS for 90 min. The amount of total thiol is positively correlated with fluorescence intensity and expressed as a percentage of the solvent control (SC). Values are means plus standard errors ( $n = 3$ ). Values that are significantly different from that of the SC (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) by Dunnett's test are indicated.

### 2.3.8 AqCSE 曝露による p62 発現と p62/KEAP1 複合体形成の評価

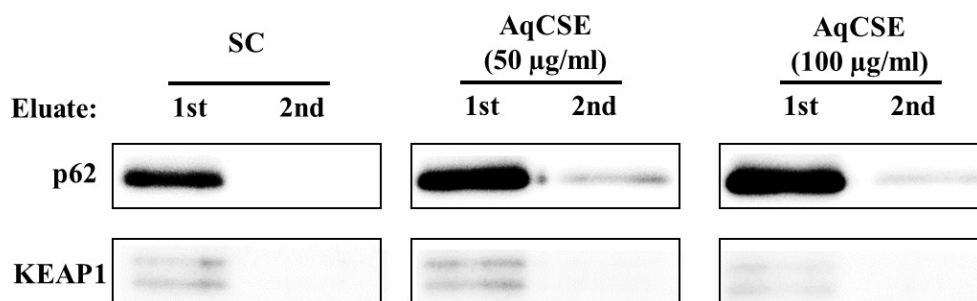
NRF2 活性化への p62 の関与を検討するため、AqCSE 曝露による p62 タンパク質発現の変動を評価した。結果を Fig. 2-11 に示す。いずれの濃度の AqCSE に曝露した細胞においても、GAPDH に対する p62 のタンパク質発現量は変化せず、反対に、曝露 3 時間後をピークにその発現はやや減少する傾向を示した。

次に、p62/KEAP1 複合体の存在量を確認するため、AqCSE に曝露した細胞を用い、anti-p62 抗体で免疫沈降した溶出液中の p62 および KEAP1 のタンパク質発現量を評価した。結果を Fig. 2-12 に示す。p62 の発現は 1 次溶出液では十分に見られたが、2 次溶出液では、わずかであったこ

とから p62 タンパク質の回収に成功した。しかし、溶出液中の KEAP1 のタンパク質発現量は、いずれのサンプルでも 1 次溶出液中にわずかに見られたのみであり、AqCSE 曝露による発現量の増加も認められなかった。



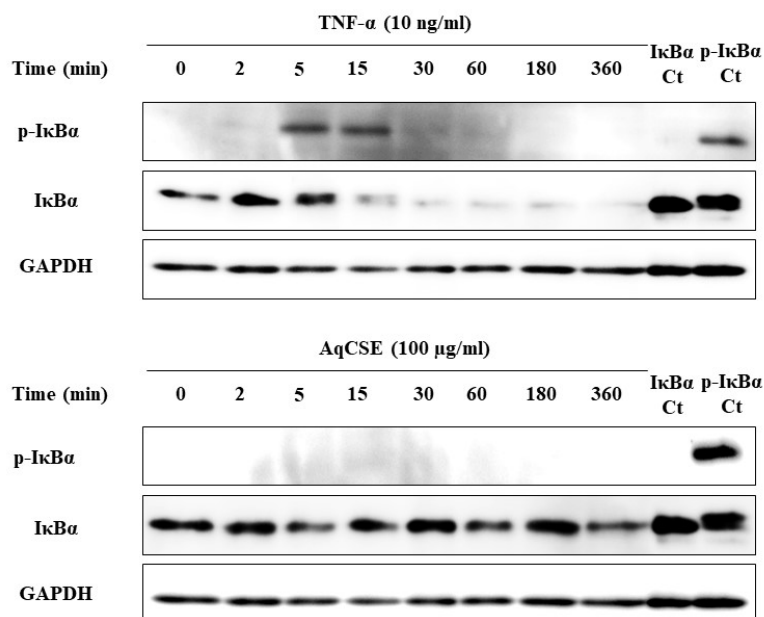
**Fig. 2-11** Protein expression of p62 in BEAS-2B cells. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at 50 or 100 µg/ml for up to 9 h and lysed at the indicated time points. GAPDH was measured as an internal control.



**Fig. 2-12** Protein expression of p62 and KEAP1 in the primary (1st) and secondary (2nd) elutions by immunoprecipitation with an anti-p62 antibody. BEAS-2B cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) and lysed at 6 h treatment. Proteins in cell lysates from the first and second elutions were immunoprecipitated with an anti-p62 antibody, and then resolved using western blotting. SC: solvent control.

### 2.3.9 IκBα リン酸化の評価

NCI-H292 細胞における total IκBα およびリン酸化 IκBα の発現量の変動を Fig. 2-13 に示す。陽性対象コントロールで用いた TNF-α に曝露した細胞では、リン酸化 IκBα の増加が曝露 5 分後と 15 分後に見られた。Total IκBα は、15 分後から発現量の低下が見られ、30 分後以降は低発現を維持した。一方、AqCSE に曝露した細胞においては、total IκBα およびリン酸化 IκBα の発現変動は見られなかった。

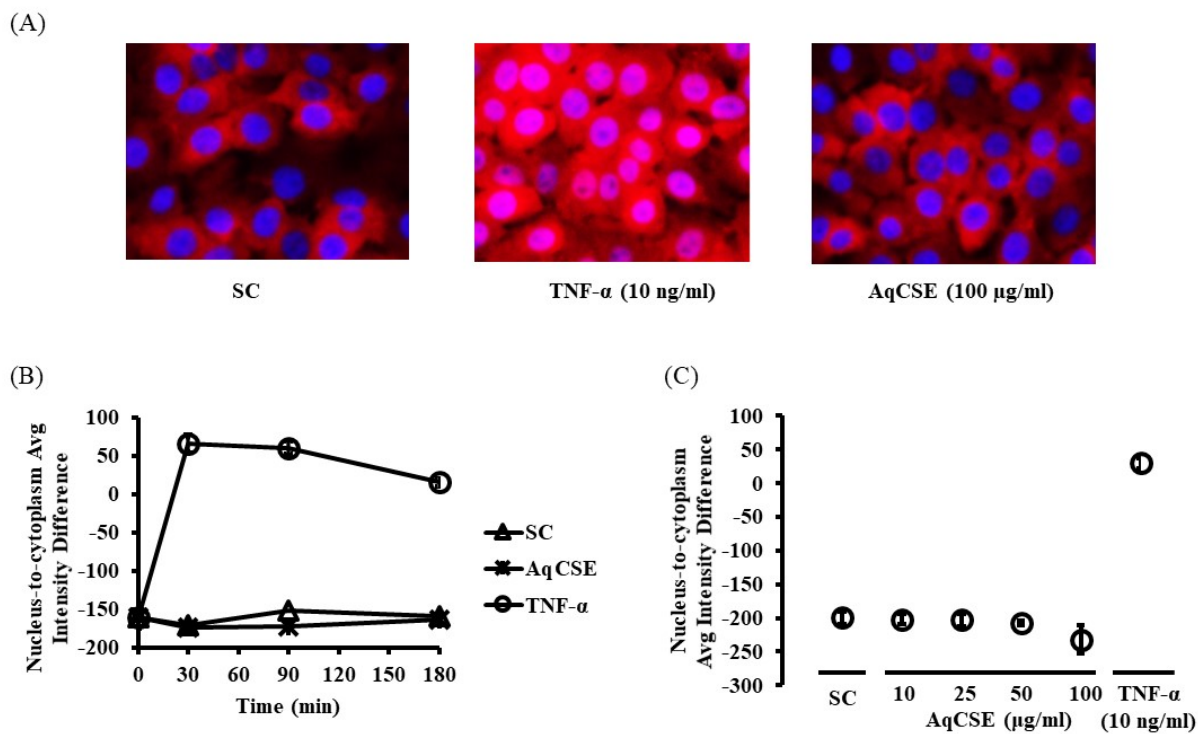


**Fig. 2-13** Protein expression of IκBα and phosphorylated IκBα (p-IκBα) in NCI-H292 cells. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at 100 μg/ml or TNF-α at 10 ng/ml for up to 360 min and lysed at indicated time points. GAPDH was measured as an internal control. Commercial control cell lysate (Ct) was loaded as a positive control for IκBα or p-IκBα, respectively.

### 2.3.10 NF-κB 核移行の評価

NCI-H292 細胞において NF-κB の核移行を蛍光観測した結果を Fig. 2-14 に示す。陽性対象コントロールとして用いた TNF-α (10 ng/ml) に曝露した細胞では、曝露後 30 分から NF-κB (p65) の核移行が明確に観測された。核内と細胞質内の蛍光強度の差は、30 分後で最大の 65.6 となり、90 分後では 60.9、180 分後ではやや減少して 15.5 となったものの、観測した全ての細胞で NF-κB の核局在化が見られた。一方、AqCSE (100 μg/ml) に曝露した細胞では、いずれの曝露時間で

あっても、細胞内 NF- $\kappa$ B の核移行は認められず、核内と細胞質内の蛍光強度の差は、溶媒対象コントロールと同程度であった (Fig. 2-14 (B))。また、AqCSE の濃度を段階的に変更しても、AqCSE 曝露による NF- $\kappa$ B の核移行は見られなかった (Fig. 2-14 (C))。



**Fig. 2-14** NF- $\kappa$ B activation using a Cellomics<sup>®</sup> NF- $\kappa$ B Activation HCS Reagent Kit in NCI-H292 cells. Cells were exposed to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) or TNF- $\alpha$  for up to 180 min. Cells were fixed and nuclei and NF- $\kappa$ B (p65) were stained with hoechst and fluorescent antibodies, respectively. Images were captured with Cellomics<sup>™</sup> ArrayScan<sup>®</sup> VTI System. (A) Image of NCI-H292 cells exposed to AqCSE (100  $\mu$ g/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) and the solvent control (SC) for 30 min. (B) Time-dependent changes in intensity between nucleus and cytoplasm. NCI-H292 cells were exposed to AqCSE (100  $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) or SC for up to 180 min. (C) Dose-dependent changes in intensity difference between nucleus and cytoplasm. NCI-H292 cells exposed to AqCSE (10 to 100  $\mu$ g/ml) for 90 min.

## 2.4 考察

ARE と結合する代表的な転写因子は、NRF2 である<sup>56)</sup>。NRF2 は、1994 年に Moi らにより発見されたロイシンジッパー型の転写因子であり、グルタチオン S-転移酵素や NAD (P) H キノン還元酵素などの異物代謝酵素関連遺伝子群、グルタチオン合成酵素やヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase 1: HMOX1) などの酸化ストレス防御遺伝子群、抗炎症性遺伝子群、ユビキチンプロテアソーム系に関与する遺伝子群などの転写を誘導し、ストレスに対する恒常性維持機構として機能する<sup>56-58)</sup>。AqCSE に曝露した細胞における ARE を有するレポーターの活性化は、用量依存的な反応を示し他の転写因子の RE を有するレポーターと比較して非常に大きかった (Figs. 2-5, 2-6, 2-7)。また、低濃度の AqCSE の曝露でも有意な変動を示したことから、NRF2 は、AqCSE に対して最も反応性の高い転写因子と考えられる。

NRF2 は、定常状態においては細胞質内で KEAP1 と呼ばれるタンパク質と複合体を形成しており、この複合体は細胞質ではユビキチン化を受け分解される<sup>59)</sup>。一方、酸化ストレスなどのストレス下では、KEAP1 から乖離した NRF2 が核内に移行し、プロモーター上の ARE に結合することにより下流遺伝子を活性化する<sup>60)</sup>。AqCSE 曝露による NRF2 活性化機構を、より高い NRF2 の活性化を示した BEAS-2B 細胞で検討した結果、AqCSE 曝露で細胞内 ROS は増加しなかった (Fig. 2-9)。そのため、AqCSE 曝露における NRF2 経路の活性化に細胞内 ROS の関与は大きくないことが示唆された。

AqCSE とリコンビナント KEAP1 タンパク質を混合すると、KEAP1 中の総チオール基の減少が、AqCSE 用量依存的に見られた (Fig. 2-10)。本試験は非細胞系での結果であるが、細胞内に取り込まれた AqCSE 中の成分が KEAP1 のチオール基と付加体を形成する可能性が示唆された。Gebel らは、グルタチオンに対する AqCSE の影響として、酸化還元反応よりも直接付加体を形成する作用が強力であると報告している<sup>61)</sup>。したがって、これと同様に、AqCSE 中の成分が KEAP1 のチオール基と付加体を形成している可能性が高いと考えられる。一方、本研究では KEAP1 のチオール基の修飾を伴わない NRF2 の活性化機構として、p62 の関与にも着目した。細胞のオートファジーが弱まると、細胞内に過剰に蓄積した p62 が KEAP1 と相互作用し、NRF2 を活性化させることが報告されている<sup>55, 62)</sup>。また、シガレット煙の曝露が細胞内オートファジーを弱めるとの報告がある<sup>63)</sup>。p62 を介した NRF2 活性化の影響を検討したが、AqCSE 曝露による p62 タンパク質発現の増加ならびに p62/KEAP1 複合体の形成は認めらなかったことから (Figs. 2-11, 2-12)、p62 を介した経路は AqCSE 曝露における主な NRF2 活性化機構でないと考えられる。

AREの他に、NCI-H292細胞およびBEAS-2B細胞の双方においてAqCSE用量依存的な活性化を示したのはXREを有するレポーターであった。XREは、AhRの認識配列であり、薬物代謝酵素であるCYPの誘導に関与し、異物代謝において重要な役割を占める<sup>25)</sup>。ヒトの肺や気管支の細胞ではCYP1A1、CYP2A6などの特定のCYPが多く発現し<sup>64)</sup>、シガレット煙に含まれる芳香族炭化水素やニコチンはそれぞれCYP1A1とCYP2A6により代謝を受けることが知られている<sup>64, 65)</sup>。そのため、XREレポーターの活性化は、これらの成分に対する代謝応答を反映していると考えられる。

シガレット煙の曝露により、呼吸器組織で炎症反応が惹起されることは広く知られており、そのため炎症性反応の制御因子であるNF-κBの活性化は、シガレット煙による主な炎症メカニズムと考えられている<sup>66-68)</sup>。しかし、本章の検討においてNF-κBのREを有するレポーターは、NCI-H292細胞およびBEAS-2B細胞のいずれにおいても活性化されなかった(Figs. 2-5, 2-6, 2-7)。そのため、レポーターアッセイで得られた結果の妥当性を検討するため、AqCSE曝露におけるNF-κBシグナルの活性化の有無を別の手法で検討した。IκBαはNF-κBの阻害タンパク質と知られ、NF-κBの核移行配列をマスクするように複合体を形成することでNF-κBの活性化を阻害する<sup>69)</sup>。例えばToll-likeレセプターを介したシグナルが入ると、IκBαはリン酸化され、その後プロテアソームによる分解を受けることにより、NF-κBが活性化される<sup>69, 70)</sup>。NCI-H292細胞をTNF-αに曝露すると、5分後と15分後にIκBαのリン酸化が見られ、その後分解を受けたためIκBα発現が低下した(Fig. 2-13)。これに並行して、TNF-αに曝露したNCI-H292細胞では、観測した全ての細胞でNF-κBの核移行が観測された(Fig. 2-14)。一方、AqCSEに曝露した細胞では、NF-κBの活性化は認められなかった。これらの結果より、少なくともNCI-H292細胞へのAqCSEの急性曝露ではNF-κBシグナルの活性化は惹起されていないと考えられる。

喫煙による炎症の亢進や、シガレット煙曝露によるNF-κB下流遺伝子の発現上昇から、曝露後のNF-κBの活性化が示唆されているものの、シガレット煙(あるいはその抽出液)曝露によるNF-κBの活性化を直接的に検討した報告は少ない。Gebelらは、マウス線維芽細胞Swiss 3T3をAqCSEに曝露した際のNF-κBの活性化を核内タンパク質のゲルシフトアッセイ法で示したが、TNF-α曝露では、曝露後30分のサンプルにおいてNF-κBに相当するゲルシフトが溶媒対象コントロールの21倍に変動したのに対し、AqCSE曝露では、曝露4時間後以降に溶媒対象コントロールの2倍以下の変動しか観察されなかった。またこのとき、IκBαのリン酸化も認められていない<sup>71)</sup>。さらに、Carterらは、蛍光イメージング技術を用い、CSEに曝露したBEAS-2B細胞においてNF-κBの核移行を報告しているが、曝露24時間後の観測結果であり、また同時にアクチ

ンフィラメントの変化やカスパーゼ 3 の増加も認められている<sup>72)</sup>。このため、細胞毒性などによる曝露後の 2 次的な影響による NF- $\kappa$ B の活性化の可能性が考えられる。

本研究の結果より、AqCSE の急性曝露に対する細胞応答として、NRF2/ARE 経路によるストレス応答と AhR/XRE 経路による異物代謝応答が、高い応答を示す転写反応であることが示唆された。特に、NRF2/ARE 経路は非常に鋭敏に AqCSE に対して反応した。NRF2 の活性化は、有害化学物質の曝露に対する防御応答の一つであり、この経路の活性化は細胞にとって有害な影響を取り除くための機構である<sup>56-58)</sup>。したがって、細胞の受けた影響に応じた NRF2 の活性化強度は、細胞への影響の強さを反映した指標として活用することが可能であると考えられる。そのため、次章では、NRF2 の活性化を指標にシガレット煙中成分の評価を行い、実際に有害な成分を特定できるか検討することとした。

## 第3章 NRF2/ARE 評価系を用いたシガレット煙中成分の評価

### 3.1 背景・目的

現在までにシガレット煙中に存在すると報告されている成分はおよそ 5000 種類に上る<sup>12)</sup>。それらシガレット煙中成分のうち、規制当局から健康への影響が懸念される成分として提示を受けているものは、主に発がん性の観点からである。例えば、WHO たばこ製品規制のための技術部会は、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) により発がんとの関連が指摘されている物質を中心に、38 成分の有害物質リストを作成した<sup>73)</sup>。一方で、COPD などの非発がん性の疾病や、呼吸器への影響において原因となるシガレット煙中成分の研究はあまり進んでいない。

これまでの検討において、呼吸器上皮細胞 (NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞) へのシガレット煙抽出液曝露において NRF2/ARE 経路が強く活性化することが示された。そのため、第 2 章で構築した NRF2/ARE 経路の活性化を指標とした評価系を用いて、転写因子 NRF2 の活性化を誘導するシガレット煙中成分の同定を試みた。

さらに、NRF2 の転写を活性化する成分は、KEAP1 のみならず、チオール基を有する他の生体分子にも作用する可能性が考えられる。そのため、細胞内 C 末端に多数のシステイン残基を有する Ca<sup>2+</sup>透過性のカチオンチャネルの一種である transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 (TRPA1) を対象に、その作用を検討した。

### 3.2 実験材料・方法

#### 3.2.1 被験液の調製

シガレット煙中成分は、Rodgman らが報告した成分のうち<sup>12)</sup>、日本国内の大手試薬会社 (Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), FUJIFILM Wako Pure Chemical, Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)) のいずれかで取り扱いがあり、かつ室温で粉末または液体状態である 1606 成分の化合物を使用した。それぞれのシガレット煙中成分は、レポーターアッセイに影響を及ぼさない DMSO 濃度 (終濃度として 0.1%) とするため、DMSO に 10 mM もしくは 50 mM の濃度で溶解し、使用するまで密閉し -80°C で保管した。DMSO へ不溶であった成分は、評価対象から除外し、最終的に 1395 種類の成分を評価した。



### 3.2.2 ARE レポーターアッセイ

ARE を有するレポーターベクターを安定発現した BEAS-2B 細胞を type I collagen でコートした白色の 96-well プレートに  $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、16 – 20 時間培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、それぞれのシガレット煙中成分を溶解した被験液を 100  $\mu$ l/well 加え、5 時間曝露した。曝露濃度は、0.01、0.04、0.16、0.63、2.5、10  $\mu$ M とした。低用量において活性の見られた一部の成分については、0.16、0.31、0.63、1.25、2.5、5.0、10  $\mu$ M の濃度で再試験を行った。既知の NRF2 活性化物質である *tert*-butylhydroquinone (tBHQ)<sup>74)</sup> (10  $\mu$ M) に曝露した細胞群 (tBHQ 群) を標準化コントロールとして全てのプレートに用意した。全ての被験液中の DMSO 濃度は、レポーター活性に影響を与えない 0.1% (v/v) とした。曝露後の細胞は、PBS で洗浄後、Luciferase lysis buffer を 20  $\mu$ l/well 加え、室温で 10 分間振とうした後、プレートをルミノメーターにセットし、Luciferase assay system の溶剤を加えた直後の 10 秒間の積算発光強度を測定した。

### 3.2.3 NRF2 転写活性の指標化

ARE レポーターアッセイの結果、溶媒対象コントロール (SC) に対して 3 倍以上の発光値を示した成分を対象に、NRF2 転写活性の指標化を行った。活性指標値は、標準化コントロールとして用いた tBHQ 群の値での標準化に加え、最大発光値 (高値ほど高活性) および最大発光値を示した濃度 (低濃度ほど高活性) の両方を加味し、以下の式で算出した。

$$\text{活性指標値} = \frac{\text{最大発光値 (溶媒対象コントロール比)}}{\text{最大発光値を示した濃度 } (\mu\text{M})} \times \frac{1000}{\text{tBHQ 群の発光値}}$$

### 3.2.4 イオンチャネル TRPA1 活性化評価

#### 3.2.4.1 細胞培養およびイオンチャネル TRPA1 発現細胞の作製

HEK 細胞 (human embryonic kidney cells 293) は HS 研究資源バンク (Osaka, Japan) より購入し、非働化した 10%ウシ胎仔血清および penicillin G (100 U/ml)、streptomycin (100  $\mu$ g/ml) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) を用いて培養した。ヒト TRPA1 を発現させた HEK 細胞 (HEK-TRPA1) は、クローニングした TRPA1 遺伝子を含む pcDNA3.1 を Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 (Thermo Fisher Scientific) で、HEK 細胞へ遺伝子導入することで作製した。

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞である A549 細胞は、DS Pharma Biomedical より購入し、非働化した 10%ウシ胎仔血清および penicillin G (100 U/ml)、streptomycin (100 µg/ml) を加えた DMEM を用いて培養した。

#### 3.2.4.2 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変動の測定

HEK 細胞、HEK-TRPA1 および A549 細胞に、正常細胞外液 (standard HEPES-buffered bathing solution (2.2 Ca SBS) : 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) 中で 10 µmol/l に溶解した Fura2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM, Dojindo, Kumamoto, Japan) を室温で 30 分間負荷した。細胞を 2.2 Ca SBS で 10 分間灌流した後、Imagework Bench 6.0 (INDEC Medical Systems, Santa Clara, CA) により駆動した Argus/HisCa イメージングシステム (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いて、0.1 Hz で Fura-2 蛍光シグナルを測定した。Ca<sup>2+</sup> 濃度の変動は、340 nm 励起時と 380 nm 励起時に得られた蛍光値の比 (F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) を指標とし、0.1 – 10 µM の 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) を投与した際の蛍光値の変動を評価した。測定のばらつきを低減するため、1 枚のカバーガラス上で、50 細胞 (HEK 細胞、HEK-TRPA1) および 12 – 38 細胞 (A549 細胞) を選択し、その記録を平均し、複数のカバーガラスで同様の実験を繰り返した。チャネル特異性の確認には、TRPA1 選択的な阻害剤である HC-030031 (HC, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) を用いた。統計解析は、ANOVA および Student's *t*-test (unpaired) を用いた。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 NRF2 の転写活性を示すシガレット煙中成分の同定

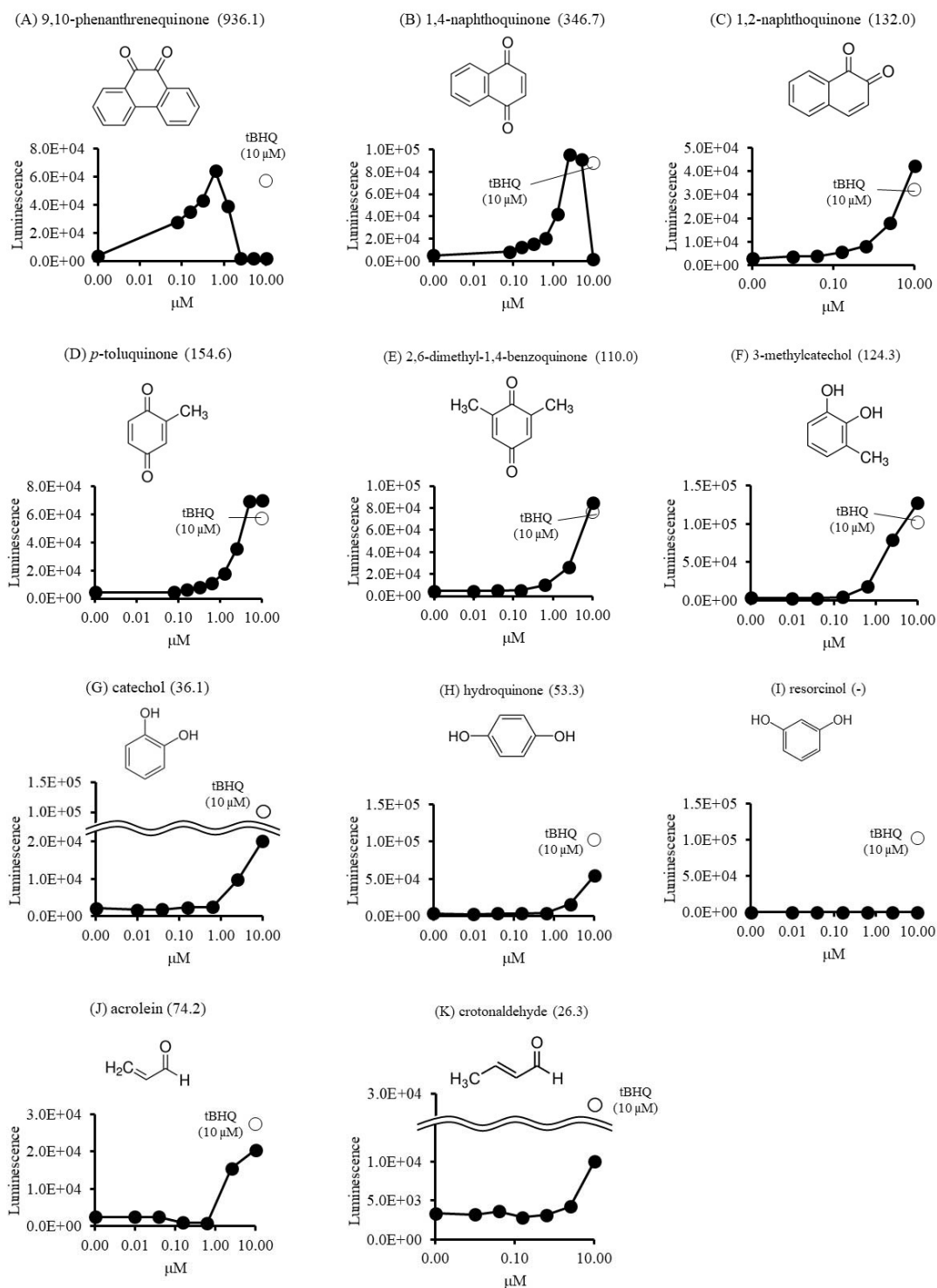
NRF2 の活性化を指標に、呼吸器上皮細胞へ急性的に強く影響を与えるシガレット煙中成分を特定するため、1395 成分に対し、ARE レポーターアッセイを行った。既知の NRF2 活性化物質である tBHQ (10  $\mu$ M) に曝露した細胞は、溶媒対象コントロールと比較して平均でおよそ 30 倍の活性を示した。10  $\mu$ M までのシガレット煙中成分曝露において、溶媒対象コントロールの 3 倍以上の活性を示したのは、58 成分であり、評価した成分の 4.2%であった (Table 3-1)。全評価成分のうち、9,10-PQ が最も高い活性を示し、活性指標値は 936.1 であった (Fig. 3-1 (A))。次いで、1,4-naphthoquinone (1,4-NQ、活性指標値 346.7)、1,2-naphthoquinone (1,2-NQ、活性指標値 132.0) の 2 種のナフトキノンが高い活性を示した (Fig. 3-1 (B), (C))。また、*p*-toluquinone (活性指標値 154.6)、2,6-dimethyl-1,4-benzo-quinone (活性指標値 110.0) などのキノン類、および 3-methylcatechol (活性指標値 124.3) などのベンゼンジオール類が総じて高い活性を示した (Fig. 3-1 (D), (E), (F))。ベンゼンジオール類のうち、高い活性を示した成分のヒドロキシル基の芳香族置換基パターンは、一貫してオルト体またはパラ体であり、最も簡単な構造で比較すると、オルト体の catechol、パラ体の hydroquinone が、それぞれ 36.1 および 53.3 の活性指標値を示したのに対し、メタ体の resorcinol は、活性を認めなかった (Fig. 3-1 (G), (H), (I))。高い細胞毒性を示すことが報告されている  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニルである acrolein<sup>75, 76)</sup> および croton aldehyde<sup>76)</sup> の活性指標値は、それぞれ 74.2 および 26.3 であった (Fig. 3-1 (J), (K))。

#### 3.3.2 9,10-PQ のイオンチャネル TRPA1 への作用

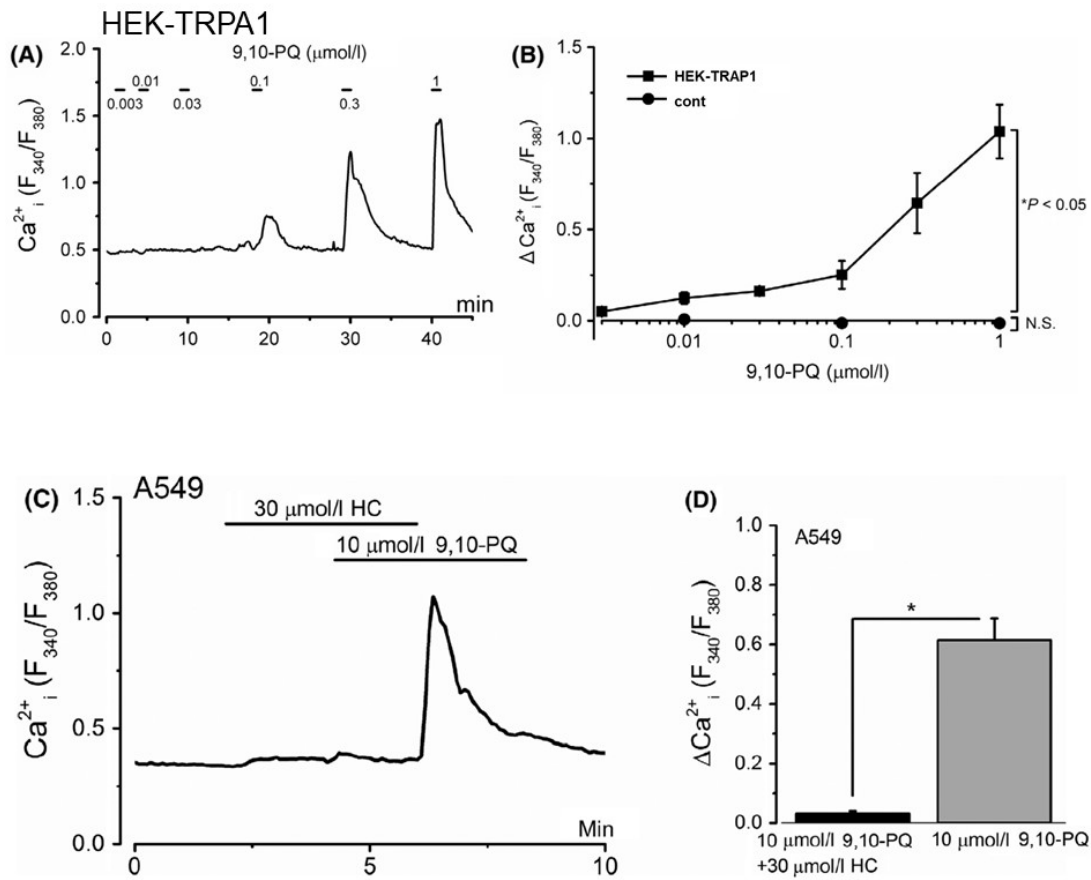
ARE レポーターアッセイにおいて最も高い活性を示した 9,10-PQ が、TRPA1 に与える影響を検討した結果を Fig. 3-2 に示す。HEK-TRPA1 を 9,10-PQ に曝露すると、0.1  $\mu$ M で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が見られ、0.3  $\mu$ M、1.0  $\mu$ M と用量依存的な変化が観察された (Fig. 3-2 (A))。一方、TRPA1 を発現していない HEK 細胞 (cont) では、1.0  $\mu$ M までの 9,10-PQ 曝露において、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動は見られなかった (Fig. 3-2 (B))。さらに、呼吸器系の細胞における影響を確認するため、ヒト肺細胞由来の A549 細胞を 9,10-PQ に曝露したところ、TRPA1 特異的なアンタゴニストである HC 非存在下では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が認められた (Fig. 3-2 (C), (D))。しかし HC 存在下では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動は抑制されたことから、9,10-PQ による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変動は TRPA1 に依存することが示された。

**Table 3-1** Cigarette smoke constituents shown to activate ARE-reporter in BEAS-2B cells.

Rank	Name	CAS	Index value	Rank	Name	CAS	Index value
1	9,10-phenanthrenequinone	84-11-7	936.1	31	catechol	120-80-9	36.1
2	1,4-naphthoquinone	130-15-4	346.7	32	diethyl maleate	141-05-9	34.5
3	<i>p</i> -toluquinone	553-97-9	154.6	33	trimethylhydroquinone	700-13-0	33.1
4	4-ethylresorcinol	2896-60-8	134.6	34	N-ethylmaleimide	128-53-0	31.8
5	1,2-naphthoquinone	524-42-5	132.0	35	skatole	83-34-1	30.5
6	5-aminoindole	5192-03-0	130.1	36	6-Aminochrysene	2642-98-0	27.2
7	3-methylcatechol	488-17-5	124.3	37	crotonaldehyde	123-73-9	26.3
8	2,6-dimethyl-1,4-benzoquinone	527-61-7	110.0	38	$\beta$ -damascone	23726-91-2	24.6
9	4,5-dimethyl-1,2-phenylenediamine	3171-45-7	109.7	39	1-aminoanthracene	610-49-1	22.7
10	4-methylcatechol	452-86-8	109.3	40	4-vinylpyridine	100-43-6	20.5
11	<i>p</i> -xyloquinone	137-18-8	109.1	41	benzylideneacetone	122-57-6	20.4
12	8-hydroxyquinoline	148-24-3	108.0	42	methyl 1H-pyrrole-2-carboxylate	1193-62-0	19.2
13	4-ethylcatechol	1124-39-6	104.5	43	2-phenylindole	948-65-2	18.0
14	2,3-dimethylhydroquinone	608-43-5	98.6	44	2',5'-dihydroxyacetophenone	490-78-8	17.8
15	2-methyl-1,4-naphthoquinone	58-27-5	95.2	45	isoeugenol	97-54-1	17.7
16	1,4-benzoquinone	106-51-4	89.5	46	<i>p</i> -aminodiphenylamine	101-54-2	16.5
17	3-methoxycatechol	934-00-9	83.7	47	dimethyl maleate	624-48-6	16.3
18	methoxyhydroquinone	824-46-4	75.3	48	allylamine	107-11-9	15.9
19	Acrolein	107-02-8	74.2	49	3-aminofluoranthene	2693-46-1	15.8
20	2-methylhydroquinone	95-71-6	67.9	50	2,2'-binaphthyl	612-78-2	15.3
21	<i>o</i> -phenylenediamine	95-54-5	66.4	51	1-naphthylamine	134-32-7	14.4
22	4- <i>tert</i> -butylpyrocatechol	98-29-3	59.7	52	2-methyl-2-pentene	625-27-4	12.8
23	Chalcone	94-41-7	53.5	53	benz[ <i>a,h</i> ]anthracene	53-70-3	10.3
24	Hydroquinone	123-31-9	53.3	54	benzoanthracene	56-55-3	9.1
25	Quinhydrone	106-34-3	53.0	55	2-methylbenzyl alcohol	89-95-2	9.1
26	2,4-hexadienal	142-83-6	50.3	56	2-acetylaminofluorene	153-78-6	8.2
27	2,5-dihydroxybenzaldehyde	1194-98-5	48.2	57	7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracene	57-97-6	7.9
28	2-methoxy-4-vinylphenol	7786-61-0	46.8	58	benzo[ <i>b</i> ]fluorene	243-17-4	7.1
29	4-aminostilbene	834-24-2	41.4				
30	2,3-biphenyldiol	1133-63-7	39.8				



**Fig. 3-1** The effects of individual cigarette smoke constituents on ARE-reporter expression in BEAS-2B cells. ARE-reporter transfected BEAS-2B cells were exposed to each constituent for 5 h and lysed for luciferase detection. Numbers in blankets indicate the index values (see section 3.2.3).



**Fig. 3-2** The effects of 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) on TRPA1 activation. (A) 9,10-PQ induced Ca<sup>2+</sup> responses in HEK-TRPA1 cells. (B) Concentration dependency of 9,10-PQ-induced Ca<sup>2+</sup> response ( $\Delta\text{Ca}^{2+}_i$  [F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>]) in HEK-TRPA1 cells (squares) and HEK cells (control (cont), circles). Values are means plus standard errors. Values that are significantly different between two groups ( $*p < 0.05$ ) by ANOVA are indicated. (C) Ca<sup>2+</sup> response in A549 cells to 9,10-PQ (10 μmol/l) in the presence or absence of HC-030031 (HC, 30 μmol/l). (D) The peak change in Ca<sup>2+</sup> response in A549 cells treated with or without HC. Values are means plus standard errors. Values that are significantly different between two groups ( $*p < 0.05$ ) by two-sided Student's *t*-test are indicated.

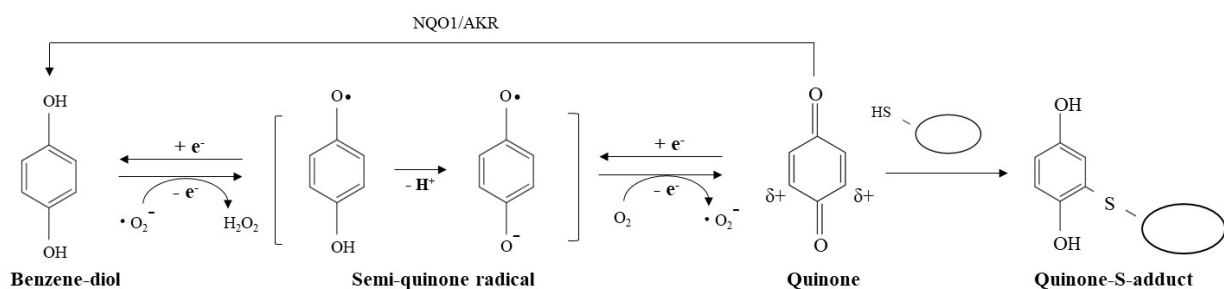
### 3.4 考察

煙中成分 1395 種のうち、最も高い NRF2 活性を示した 9,10-PQ (Fig. 3-1 (A)) は、シガレット煙中のみならずディーゼル排気微粒子 (diesel exhaust particles: DEP) や環境空気中の粒子状物質にも含まれ、大気汚染物質として注目されている化合物である<sup>77)</sup>。9,10-PQ は細胞内においてセミキノラジカル体となり、その酸化還元サイクルの過程で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびヒドロキシラジカルを発生することにより、高い細胞毒性を有することが報告されている<sup>78, 79)</sup>。また、動物個体においても、生体内のタンパク質と反応することで、呼吸器の機能に影響を与える可能性が懸念されており、例えば Koike らは 9,10-PQ の吸入がアレルギー性喘息の症状を増悪させることを報告している<sup>80)</sup>。また、9,10-PQ に次いで高い活性を示した 1,2-NQ と 1,4-NQ (Fig. 3-1 (B), (C)) も DEP 中に含有され、健康への影響が懸念される成分である<sup>78)</sup>。実際、Kikuno らは 1,2-NQ をモルモットに気管内投与すると、気管を収縮させること、またその収縮作用には 1,2-NQ が気道上皮細胞内においてバニロイド受容体を活性化させることが原因である可能性を報告している<sup>68)</sup>。

本研究では、9,10-PQ が呼吸器上皮細胞に与える影響を検討するため、TRPA1 を対象に、その作用を検討した。TRPA1 は、侵害化学物質の感知受容体として機能し、炎症時の痛みなど、様々な生理機能に関与しているイオンチャネルであり、細胞内 C 末端のシステイン残基中のチオール基を外部刺激の受容体として用いている<sup>81, 82)</sup>。そのため、9,10-PQ の化学的特徴から TRPA1 に作用することが考えられた。また CSE ならびに DEP の曝露が TRPA1 を活性化することも報告されている<sup>83)</sup>。TRPA1 の実験においては、これまで用いてきた NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞における検討例がなかったため、TRPA1 が発現し、CSE による TRPA1 の活性化が報告されているヒト肺胞基底上皮細胞の A549 細胞を用いた<sup>83, 84)</sup>。その結果、A549 細胞において、9,10-PQ は TRPA1 に作用することが確認された (Fig. 3-2)。呼吸器細胞における TRPA1 の活性化の機能的役割は不明な点も多いが、痛みや炎症など、生体にとって有害な反応の発生に関与していると考えられている<sup>85-87)</sup>。したがって、9,10-PQ は TRPA1 の活性化を介して呼吸器の生理機能に悪影響を与える可能性が示唆される。

9,10-PQ や 1,2-NQ、1,4-NQ のみならず、総じてキノン類、ベンゼンジオール類が高い NRF2 活性を示した。このとき、高い活性を示したベンゼンジオールのヒドロキシル基の芳香族置換基パターンは、オルト体またはパラ体であった。オルト体およびパラ体のベンゼンジオールは、生体内では銅イオンを介し、セミキノラジカルおよびセミキノラジカルアニオンの構造を経由して、対応するキノンへと還元される<sup>88)</sup>。一方、メタ体のベンゼンジオールは、キノン体へ変化しない。このことから、9,10-PQ や 1,2-NQ、1,4-NQ も含めキノン構造をとる化合物が NRF2 を強く活性化することが示唆された。キノン構造が高い活性を示す理由は、第一に、酸化

還元反応の過程で、セミキノンラジカル体となり、その過程で活性酸素種を発生させ、その際、酸素分子が一電子還元され、スーパーオキシドアニオンを生成、またはスーパーオキシドアニオンが、さらに電子還元を受けることにより、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を発生させることによると考えられる<sup>89)</sup>。第二に、キノン類が、チオール基と付加体を形成し、KEAP1 と共有結合することで NRF2 を乖離すると考えられる<sup>90)</sup> (Fig. 3-3)。単環キノンやベンゼンジオール類は、9,10-PQ などの多環芳香族キノンと比べると動物における有害性の報告は少ないが、上記のような特徴から、グルタチオンなどのチオール基を有する酵素との不可逆的な反応、DNA 損傷、ミトコンドリア機能の阻害など、様々なメカニズムにより細胞に損傷を与えることが報告されている<sup>91)</sup>。また、benzoquinone などいくつかのキノン類は皮膚に対する刺激性および感作性が認められている<sup>92, 93)</sup>。したがって、キノン類は吸入した際に呼吸器に対して強い刺激を与える可能性も示唆される。



**Fig. 3-3** Reactivity of quinones. Quinones can react as electrophiles with the thiol group of cysteine residues *via* thiol-S-alkylation leading to irreversible thiol-S-adduct formation. In the oxidative mode, quinones are incompletely reduced to semiquinone radicals that generate super oxide anions<sup>89, 90)</sup>.

キノン構造以外の化合物では、acrolein が高い NRF2 活性を示した (Fig. 3-1 (J))。Acrolein は非常に反応性の高い  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニルであり、マイケル付加反応により、チオール基などの求核試薬と高い反応性を有することが知られている<sup>94)</sup>。また、脂質酸化、DNA 損傷、炎症反応など様々な影響を引き起こすことが報告されている<sup>95)</sup>。さらに、ラットやウサギへの acrolein の反復吸入曝露により、気道や肺における強い炎症ならびに COPD 様変化を起こすことが報告されている<sup>95)</sup>。

本研究の課題として、シガレット煙中のそれぞれの成分がどの程度、喫煙時に呼吸器上皮細胞に曝露されるか明確でないことがあげられる。カナダ保健省が定めたシガレット煙中成分分



析法では、試験用シガレット 3R4F に acrolein、catechol、hydroquinone が、ISO に定められた喫煙条件下で、それぞれ 1 本あたり約 52.2、38.9、31.1  $\mu\text{g}$  含まれると報告されている<sup>96,97)</sup>。しかし、今回最も活性の高かった 9,10-PQ のシガレット煙中成分量は明らかでない。Toriba らは、トリメチルシリル体に誘導体化した多環芳香族炭化水素キノン類を GC-MS/MS で測定した結果、シガレット 1 本あたり 1,4-benzoquinone が 269~700 ng 検出されたのに対し、9,10-PQ は 0.050~0.279 ng であったことを報告している<sup>98)</sup>。9,10-PQ は、1,4-benzoquinone など環数の少ない化合物に比べ、シガレット煙中存在量は相対的に少ないと考えられる。一方、9,10-PQ の代謝物である 9,10-dihydrophenanthrene の尿中濃度が、非喫煙者と比較して、喫煙者で有意に高いことも報告されている<sup>99)</sup>。したがって、喫煙で 9,10-PQ への曝露が増加する可能性は高いと考えられる。現在のところ、本研究で提示した成分がシガレット煙抽出液曝露による影響にどの程度寄与しているかは明確でないものの、呼吸器の生理機能に悪影響を与えうる成分として注目すべきものである。こうした有害成分を除去することにより、喫煙が起こす呼吸器への影響を低減させる可能性も期待できる。

以上より、BEAS-2B 細胞において、NRF2 の活性化を指標としたレポーターアッセイを用い、呼吸器細胞に対して有害性を示すシガレット煙中成分の同定が可能となった。NRF2 は本来生体に備わっている防御機構であり、有害物質の感知・応答という点で非常に鋭敏であることから、NRF2 の活性化は、呼吸器上皮細胞に対して急性影響を与える成分を特定するうえで有用な指標であると示唆される。

## 第4章 三次元培養モデルによる転写因子活性化の評価

### 4.1 背景・目的

本研究ではこれまで、単層培養した NCI-H292 細胞ならびに BEAS-2B 細胞を用いてシガレット煙抽出液への曝露において最も強く、かつ鋭敏に応答する NRF2/ARE 経路の活性化を指標とした評価系を構築した。しかし、標準的なディッシュ内で培養された単層培養細胞を用いた *in vitro* 試験は、培養が容易であり、再現性が高く、高感度かつ迅速に細胞反応を評価する実験系として有用である反面、実際のヒト組織は、単層培養細胞よりもはるかに複雑な構造や機能を有するため、単層培養細胞における知見は、*in vivo* で起こりえる生体现象を反映しない場合もある<sup>100</sup>。この単層培養細胞試験のデメリットを解消するため、三次元細胞培養 (3D-culture) の活用が進められている。特に呼吸器上皮細胞においては、初代上皮細胞の下面を培地に、上面を気相に曝露させる air-liquid interface (ALI) で培養することで、粘液線毛細胞への分化を誘導し生体に近い構造となる技術が導入され、シガレット煙など、呼吸器上皮細胞に直接曝露される物質の評価に利用され始めている<sup>101,102</sup>。

そこで本章では、三次元培養したヒト初代気管支上皮細胞 (human bronchial epithelial cells: HBECs) を用い、シガレット煙抽出液曝露に対する転写因子の応答について検討を行い、第2章で構築した単層培養細胞を用いた評価系との比較および三次元培養細胞の優位性について検討した。

### 4.2 実験材料・方法

#### 4.2.1 試験シガレットおよび AqCSE の調製

被験シガレット 3R4F の AqCSE は 2.2.4 項と同様の方法で調製した。

#### 4.2.2 HBECs の三次元培養

Lonza から購入した初代正常 HBECs (Lot:CC-2540S, donor; 29 歳男性) を、Supplement Pack (Promocell) を加えた AEGM 培地 (Promocell) に懸濁させ、type I collagen をコートしたフラスコ上で培養した。三次元培養には、HBECs を AEGM 培地に  $3.0 \times 10^5$  cells/ml の濃度で懸濁させ、type IV collagen (Nitta Gelatin) をコートしたインサート (pore size 0.4  $\mu$ m, Corning, Corning, NY) に播種

した。細胞を播種したインサートは 24-well プレートにセットし、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下でコンフルエントに達するまで培養した。コンフルエントに達した HBECs は、インサート上の培地を除去し、hydrocortisone (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) と heparin (Stemcell Technologies) を加えた PneumaCult-ALI medium (Stemcell Technologies) を 24-well プレートに加え、インサート底面から培地を供給し ALI で培養した。インサート底面の培地は 2 日または 3 日おきに交換し、21 日から 23 日間培養し、粘液線毛細胞に分化させた<sup>103)</sup>。

#### 4.2.3 三次元培養 HBECs の細胞障害性試験

三次元培養 HBECs の細胞障害性評価として、アデニル酸キナーゼ (adenylate kinase: AK) 活性を測定した。三次元培養した HBECs の基底面の培地を除去し、AqCSE または Triton X を含む AEGM 培地を加え、24 時間インキュベーター中で曝露した。曝露後の被験液を回収し、ToxiLight bioassay kit (Lonza) に添付の AK detection reagent と 15 分間反応させた後、損傷した細胞から放出された AK の酵素活性に相当する発光値を測定した。統計解析は、Dunnett 法を用い、溶媒対象コントロールとの有意差を多重検定した。

#### 4.2.4 転写因子タンパク質発現の測定

三次元培養した HBECs の基底面の培地を除去し、AqCSE を含む AEGM 培地を加え、6 時間インキュベーター中で曝露した。被験液を除去し、PBS で洗浄後、細胞上面から、mRIPA buffer を 50 µl/well 加え、ピペッティングにより細胞を回収した。回収した細胞溶解液は、2.2.8 項と同様の方法で、ウエスタンブロッティングに供したが、変更点として、電気泳動ゲルには Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad)、ブロッキング溶液には PVDF Blocking Reagent (Toyobo)、1 次抗体および 2 次抗体の希釈液には Can Get Signal Solution (Toyobo) を用いた。また、1 次抗体は以下のものを、2 次抗体は 2.2.8 項と同様のものを用いた。

- Anti-NRF2 rabbit antibody: ab62352, Abcam
- Anti-NF-κB (p65) rabbit antibody: #8242S, Cell Signaling Technology
- Anti-phospho-p65 rabbit antibody: #3033S, Cell Signaling Technology
- Anti-c-Jun rabbit antibody: ab32317, Abcam
- Anti-GAPDH mouse antibody: #3033S, Cell Signaling Technology

#### 4.2.5 免疫組織染色

三次元培養した HBECs の基底面の培地を除去し、AqCSE を含む AEGM 培地を加え、6 時間インキュベーター中で曝露した。被験液を除去し、PBS で 2 度洗浄後、4% paraformaldehyde を細胞基底面に加え、4°C でインキュベートした。固定された細胞は、パラフィンに包埋し、マイクロトームを用いて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで切片を作製した。続いて切片を脱パラフィンし、hematoxylin and eosin (H/E) 染色を行った。また、免疫染色においては、脱パラフィンした切片を、1 mM の I-EDTA pH8.0 (Nacalai Tesque) 中で、90°C で 15 分間熱処理し、抗原の賦活化を行った。次いで、100 倍希釈した anti-NRF2 rabbit antibody (ab62352, Abcam) または anti-NF- $\kappa$ B (p65) rabbit antibody (#8242S, Cell Signaling Technologies) と切片を室温で 1 時間または 4°C で 24 時間インキュベートした。続いて切片を PBS で洗浄後、200 倍希釈した Alexa Fluor 555 をコンジュゲートした donkey anti-rabbit antibody (A-31572, Thermo Fisher Scientific) と室温で 1 時間インキュベートした。さらに切片を PBS で洗浄した後、標本を蛍光顕微鏡用の DAPI (Thermo Fisher Scientific) を含む Antifade Reagent proLong Gold にマウントし、KEYENCE BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) により蛍光画像を得た。NRF2 および NF- $\kappa$ B (p65) の観測には励起波長 470 nm および蛍光波長 535 nm、核の観測には励起波長 360 nm および蛍光波長 460 nm を用いた。

#### 4.2.6 PCR アレイによる遺伝子発現測定

三次元培養した HBECs の基底面の培地を除去し、AqCSE を含む成長培地を加え、6 時間インキュベーター中で曝露した。被験液を除去し、PBS で 2 度洗浄後、細胞上面から Buffer RPE (Qiagen) を 50  $\mu\text{l}$  加え、ピペッティングにより全量をチューブに回収した。細胞溶解液からの total RNA の回収は、RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) を用い、回収した total RNA は濃度調整後、SuperScript<sup>™</sup> IV VILO<sup>™</sup> Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA とした。

酸化ストレス関連遺伝子の測定には、Human Oxidative Stress RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Ox-Array, Qiagen) を用い、*ALB*, *ALOX12*, *AOX1*, *APOE*, *ATOX1*, *BNIP3*, *CAT*, *CCL5*, *CCS*, *CYBB*, *CYGB*, *DHCR24*, *DUOX1*, *DUOX2*, *DUSP1*, *EPHX2*, *EPX*, *FOXM1*, *FTH1*, *GCLC*, *GCLM*, *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX5*, *GPX6*, *GPX7*, *GSR*, *GSS*, *GSTP1*, *GSTZ1*, *HMOX1*, *HSPA1A*, *KRT1*, *LPO*, *MBL2*, *MPO*, *MPV17*, *MSRA*, *MT3*, *NCF1*, *NCF2*, *NOS2*, *NOX4*, *NOX5*, *NQO1*, *NUDT1*, *OXR1*, *OXSRI*, *PDLIM1*, *PNKP*, *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX4*, *PRDX5*, *PRDX6*, *PRNP*, *PTGS1*, *PTGS2*, *RNF7*, *SCARA3*, *SEPP1*, *SFTPD*, *SIRT2*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *SQSTM1*, *SRXN1*, *STK25*, *TPO*, *TTN*, *TXN*, *TXNRD1*, *TXNRD2*, *UCP2* および

VIMP を対象遺伝子とし、ABI 7900 PCR システム (Thermo Fisher Scientific) により測定した。炎症関連遺伝子の測定は、NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Plus RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (NF- $\kappa$ B Array, Qiagen) を用い、AGT、AKT1、ATF1、BCL2A1、BCL2L1、BCL3、BIRC2、CARD11、CASP1、CASP8、CCL2、CCL5、CD40、CFLAR、CHUK、CSF1、CSF2、CSF3、EGFR、EGR1、IKK1、IL1A、IL1B、IL1R1、IRAK1、IRAK2、JUN、LTA、LTBR、MALT1、MAP3K1、MYD88、NFKB2、NOD1、PSIP1、RAF1、REL、RELA、RELB、RHOA、RIPK1、STAT1、TBK1、TICAM1、TIMP1、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR6、TLR9、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A、TNFSF10、TRADD、TRAF2、TRAF3、TRAF6、BIRC3、CCL20、CXCL2、CXCL3、ICAM1、CXCL8、IRF1、NFKB1、NFKBIA、NFKBIE、STX11、TIFA、TNF、TNFAIP2 および TNFAIP3 を対象遺伝子とした。それぞれの Array は、ハウスキーピング遺伝子として ACTB、B2M、GAPDH、HPRT1、RPLP0 および HGDC を対象遺伝子として含み、それぞれの遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の発現量により標準化した。

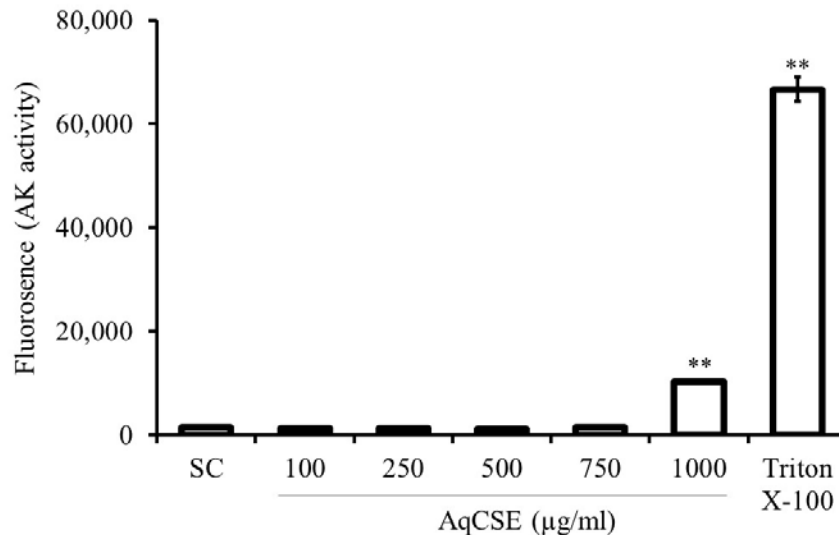
PCR 後のアレイは、Qiagen が提供する RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 を使用して定量化した。遺伝子発現結果は、溶媒対象コントロールからの倍数変化 ( $\log_2$  (fold-change)) および  $t$  検定統計値 ( $-\log_{10}$  ( $p$ -value)) を用い、Volcano plot により解析した。考察においては、明確に変動の見られた遺伝子に着目するため、 $t$  検定の  $p$  値  $\leq 0.005$  および倍数変化  $\geq 4$  以上の変動を示した遺伝子に焦点をあてた<sup>104)</sup>。

NF- $\kappa$ B Array に含まれる遺伝子は、IPA を用い、IPA データベース上にそれぞれの遺伝子の転写制御因子として、NF- $\kappa$ B のみ報告されているもの、NF- $\kappa$ B に加えて AP-1 あるいは NRF2、またはその両方が報告されているものに分類し、ヒートマップを作製した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 三次元培養 HBECs に対する AqCSE の細胞障害性

細胞障害性の指標として、細胞層から培地中に放出された AK の酵素活性を測定した。結果を Fig. 4-1 に示す。100、250、500 および 750  $\mu\text{g/ml}$  の AqCSE に曝露した三次元培養 HBECs は、溶媒対象コントロールと比較して有意な AK 活性の増加を示さなかった。一方、1000  $\mu\text{g/ml}$  の AqCSE に曝露すると AK 活性が有意に増加したため、750  $\mu\text{g/ml}$  までを無毒性領域と定義し、以降の実験で用いる AqCSE の曝露濃度は、低用量: 250  $\mu\text{g/ml}$ 、中用量: 500  $\mu\text{g/ml}$ 、高用量: 750  $\mu\text{g/ml}$  とした。

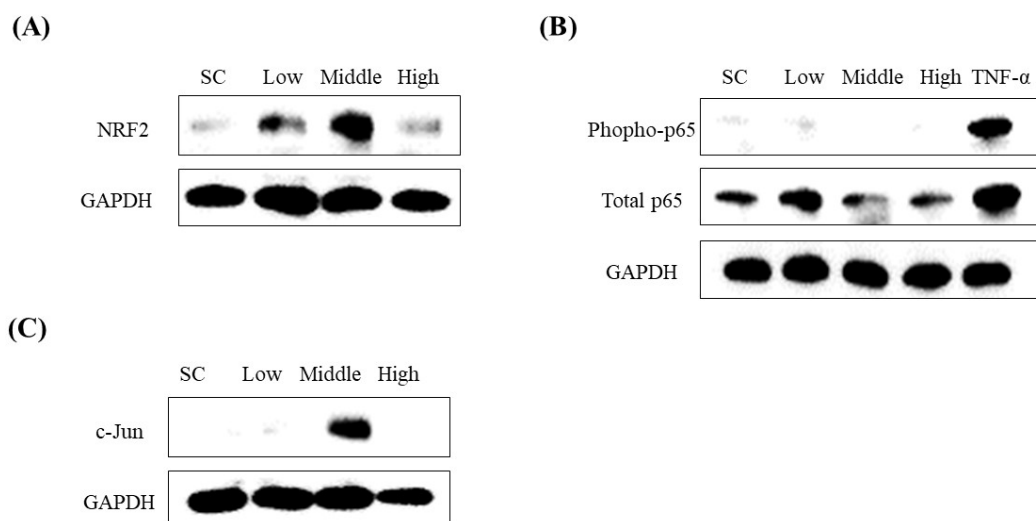


**Fig. 4-1** The effects of aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) on adenylate kinase (AK) activity. AK activity in 3D-cultured human bronchial epithelial cells was assessed following 24 h exposure to AqCSE. Values are means plus standard errors ( $n = 3$ ). Values that are significantly different from that of the solvent control (SC) (\*\* $p < 0.01$ ) by Dunnett's test are indicated.

### 4.3.2 三次元培養 HBECs における転写因子タンパク質発現の変動

AqCSE 曝露による転写因子のタンパク質発現量の変動を Fig. 4-2 に示す。NRF2 の発現は、全ての用量の AqCSE 曝露において増加し、中用量の曝露において最大の発現を示した。NF- $\kappa$ B の構成タンパク質である p65 およびリン酸化 p65 は、いずれの濃度の AqCSE 曝露においても溶媒

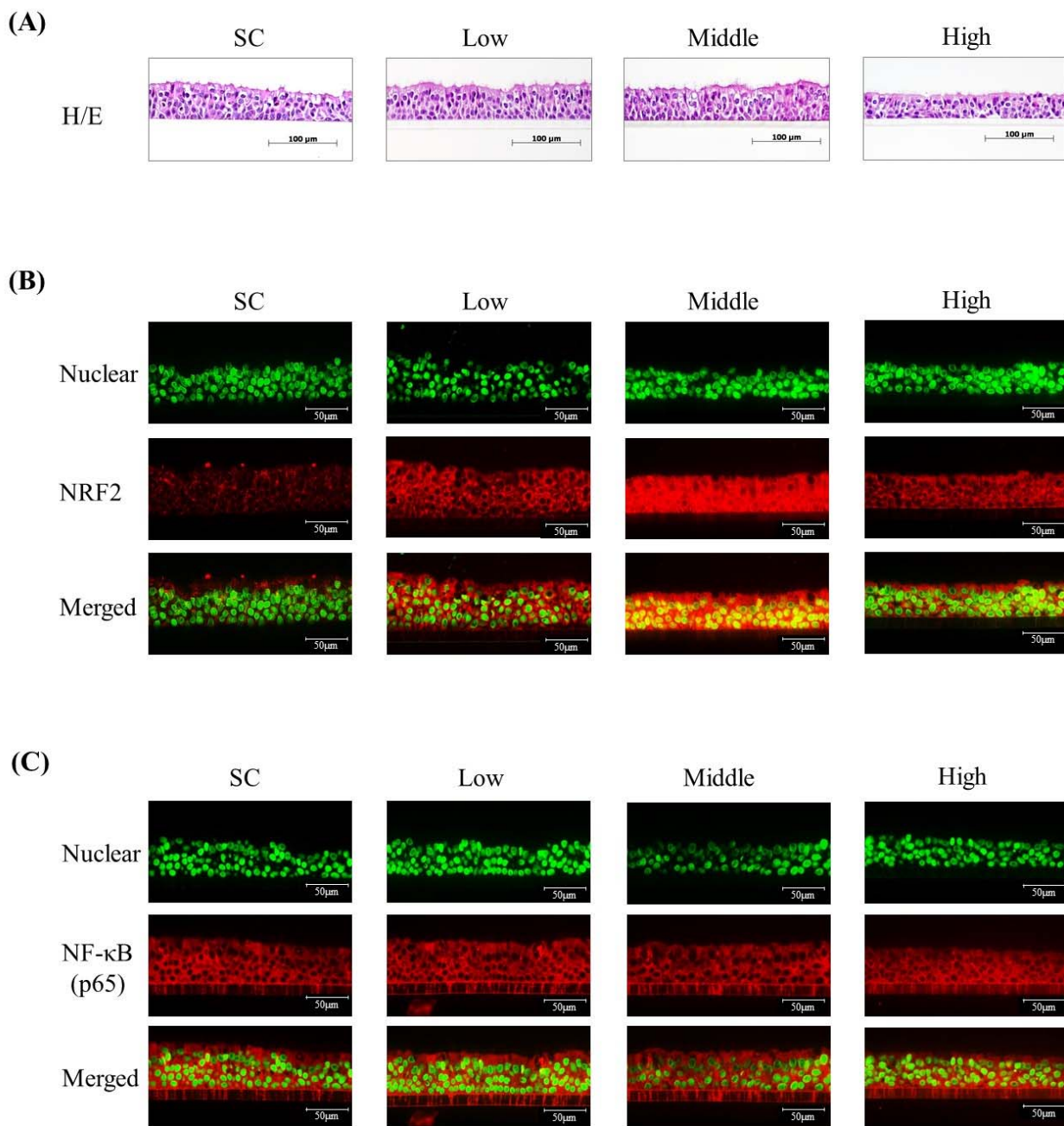
対象コントロールと比較して、発現の変動は見られなかった。一方、陽性対象コントロールの TNF- $\alpha$  曝露においては、p65 およびリン酸化 p65 の発現は顕著に増加し、NF- $\kappa$ B の活性化が示された。AP-1 の構成成分である c-Jun の発現は、低用量および高用量の AqCSE に曝露した細胞では見られなかったが、中用量の AqCSE に曝露した細胞においては顕著な発現増加が観察された。



**Fig. 4-2** Transcription factor protein expression in 3D-cultured human bronchial epithelial cells (HBECs). (A) NRF2, (B) phosphorylated and total-p65, and (C) c-Jun protein expression were measured in whole cell lysates of HBECs following 6 h exposure to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) or TNF- $\alpha$  as a positive control for p65 expression. GAPDH protein expression was measured as an internal control. SC: solvent control.

#### 4.3.3 免疫組織染色による転写因子活性化の評価

三次元培養 HBECs における NRF2 および NF- $\kappa$ B の局在化評価の結果を Fig. 4-3 に示す。AqCSE 曝露で NRF2 の発現は増加し、中用量群で最大の蛍光強度となった (Fig. 4-3 (B), NRF2)。NRF2 の核移行は、低用量の AqCSE 曝露では、いくつかの細胞で、中用量 AqCSE 曝露群では、ほぼ全て (> 90%) の細胞で観察された (Fig. 4-3 (B), Merged)。高用量の曝露では、NRF2 の核移行は、



**Fig. 4-3** Histochemical analysis of 3D-cultured human bronchial epithelial cells (HBECs) after exposure to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at low, middle or high doses (Low, Middle, High). Histological sections of HBECs were fixed and (A) stained with hematoxylin and eosin (H/E), (B) immunostained with anti-NRF2 antibody, and (C) immunostained with anti-NF- $\kappa$ B (p65) antibody. DAPI fluorescent stain was used to stain the cell nuclei. SC: solvent control.



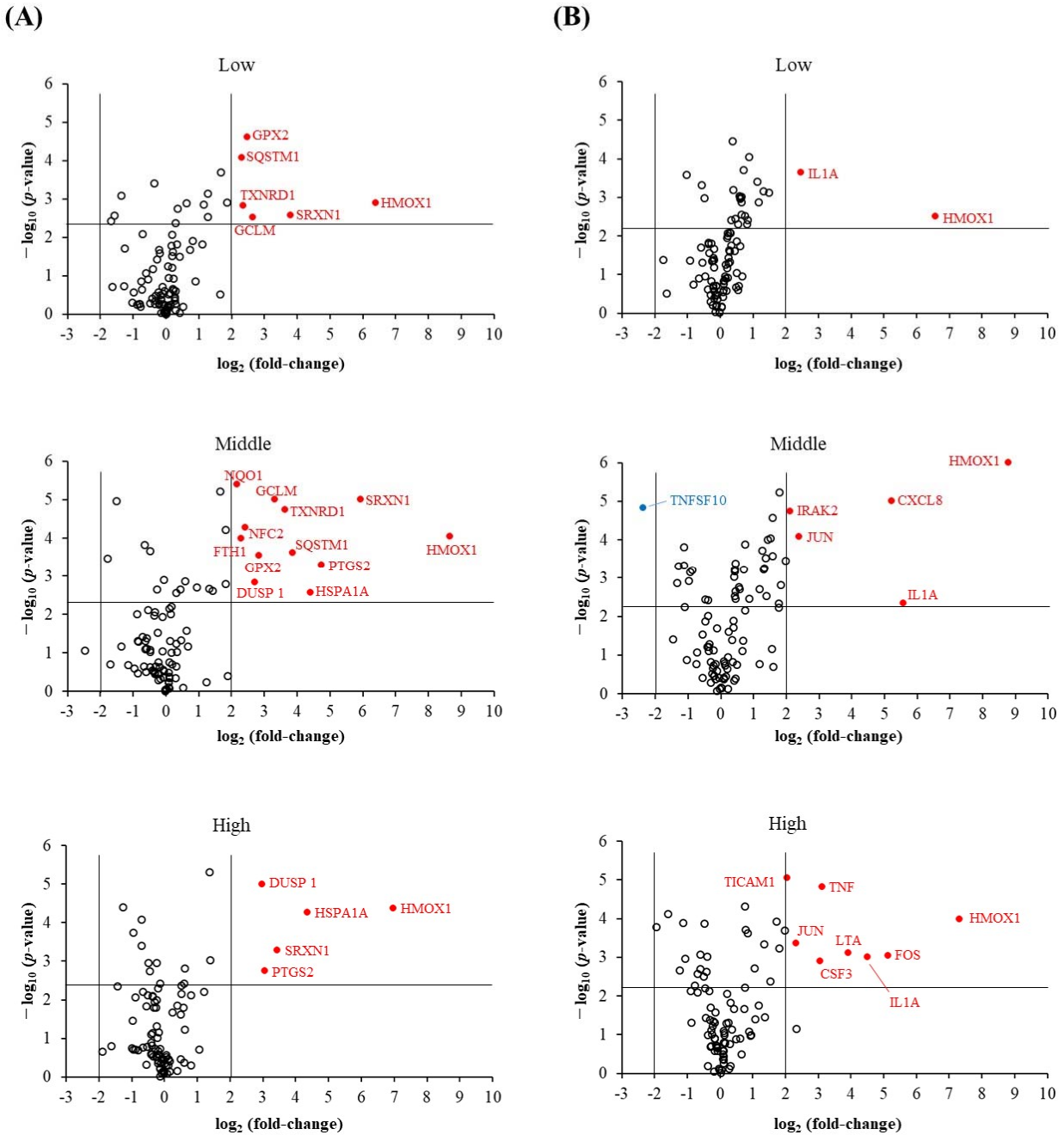
明確には観測されなかった。NF- $\kappa$ B (p65) は、溶媒対象コントロール (SC) および全ての用量の AqCSE 曝露において、細胞質内でのみ発現し、AqCSE 曝露による発現量の変化および核内への移行は、観測されなかった (Fig. 4-3 (C))。これらの結果より、AqCSE 曝露による NF- $\kappa$ B の活性化は、単層培養系だけでなく三次元培養系においても起きないことが示された。

#### 4.3.4 NRF2 および NF- $\kappa$ B 下流遺伝子発現の変動

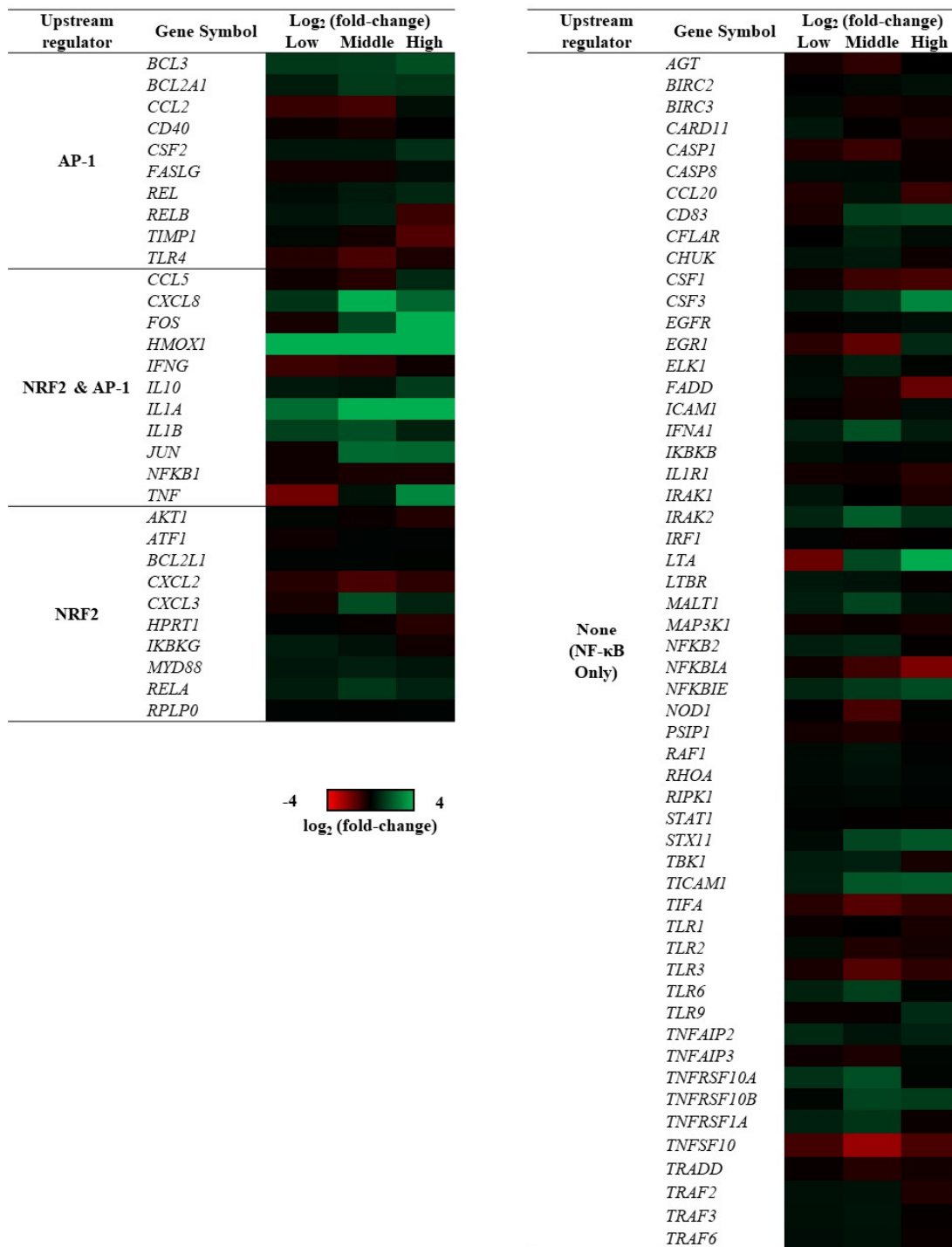
次に、Ox-Array および NF- $\kappa$ B Array を用いた発現変動評価の結果を Fig. 4-4 に示す。Ox-Array の評価では (Fig. 4-4 (A))、低用量の AqCSE 曝露において、*GCLM*、*GPX2*、*HMOX1*、*SQSTM1*、*SRXN1* および *TXNRD1* などの酸化ストレス関連遺伝子の発現が、溶媒対象コントロールと比較して 4 倍以上有意に上昇した。中用量の AqCSE 曝露では、これらに加えて、*NQO1*、*FTH1*、*PTGS2*、*NCF2*、*HSPSA1A* および *DUSP1* の遺伝子発現が上昇し、NRF2 の核移行と一致して、最も多くの遺伝子発現が変動した。高用量の AqCSE 曝露では、*DUSP1*、*PTGS2*、*HSP1A1*、*SRXN* および *HMOX1* の遺伝子発現が中用量曝露と同様に有意に上昇したが、発現変動が認められた遺伝子数は中用量の AqCSE 曝露と比較して減少した。

NF- $\kappa$ B Array の評価では (Fig. 4-4 (B))、Ox-Array においても観察されたように、*HMOX1* は、全ての用量の AqCSE 曝露群で、高い発現変動を示した。*HMOX1* を除くと、低用量の AqCSE 曝露では、溶媒対象コントロールに対して 4 倍以上有意に発現上昇した遺伝子は *IL1A* のみであった。中用量の AqCSE 曝露では、*HMOX1* と *IL1A* に加えて、*IRAK2*、*JUN* および *CXCL8* が、有意に発現上昇した。一方、*TNFSF10* は 4 倍以上有意に発現が抑制された。*CSF3*、*FOS*、*TICAM1*、*TNF* および *LTA* は、低用量および中用量の AqCSE 曝露では発現変動しなかったが、高用量の AqCSE 曝露において、有意に発現上昇した。

NF- $\kappa$ B Array は、NF- $\kappa$ B 経路と関連性が高い遺伝子群で構成されているが、これらの遺伝子発現には NF- $\kappa$ B 以外の転写因子の関与が報告されているものも含まれる。そこで遺伝子発現と転写因子の関係性をさらに検討するため、それぞれの遺伝子の転写制御因子として、NF- $\kappa$ B のみ、NF- $\kappa$ B に加えて AP-1 あるいは NRF2、またはその両者の関与が報告されているものに分類し、ヒートマップを作製した (Fig. 4-5)。その結果、AqCSE 曝露により発現変動した遺伝子は、NF- $\kappa$ B に加えて AP-1 と NRF2 の両者の転写因子による制御が報告されているものが多かった (Fig. 4-5, NRF2 & AP-1)。



**Fig. 4-4** Expression of (A) NRF2 signaling genes and (B) NF- $\kappa$ B signaling genes in 3D-cultured human bronchial epithelial cells (HBECs). Gene expression was measured in total RNA of HBECs following 6 h exposure to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at low, middle or high doses (Low, Middle, High). Gene expression was plotted based on fold change compared to the solvent control (SC) ( $\log_2(\text{fold-change})$ , x-axis) and statistical changes ( $-\log_{10}(p\text{-value})$ , y-axis). Red and blue dots indicate genes that showed greater than 4-fold increased and decreased expression with  $p\text{-value} < 0.005$  compared to the SC, respectively.



**Fig. 4-5** Heat map of NF-κB signaling genes in 3D-cultured human bronchial epithelial cells (HBECs) after exposure to aqueous cigarette smoke extract (AqCSE) at low, middle or high doses (Low, Middle, High). The NF-κB signaling genes are classified according to whether they have been reported to be controlled by AP-1, NRF2, or both, in addition to NF-κB, on the Ingenuity® Pathways Analysis (IPA) knowledge base. Gene expression was color-coded based on log<sub>2</sub> fold change compared to the solvent control.

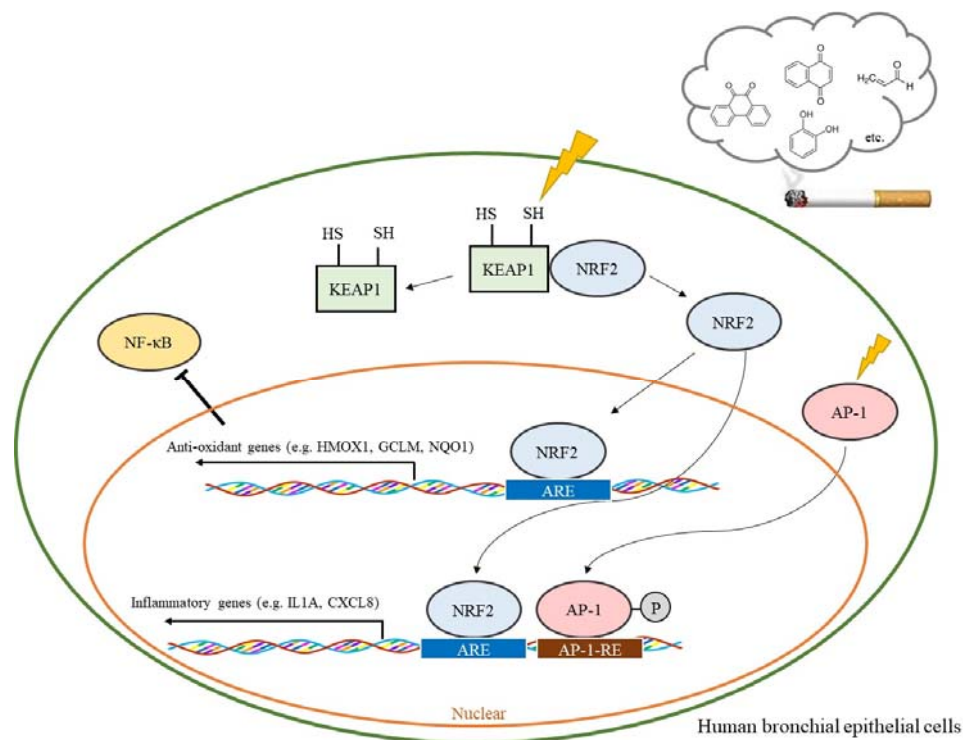
#### 4.4 考察

三次元培養した HBECs を AqCSE に曝露した際の転写因子 NRF2 および NF- $\kappa$ B の変動は、単層培養細胞で観測された結果と同様であり、NRF2 の活性化は顕著であった一方、NF- $\kappa$ B の活性化は認められなかった (Figs. 4-2, 4-3)。この2つの転写因子 NRF2 と NF- $\kappa$ B は、互いにクロストークすることが報告されており、このクロストークが互いの発現を干渉している可能性が考えられる。例えば Li らは、この二つの転写因子が、活性化に転写共役因子 CREB 結合タンパク質 (CREB-binding protein: CBP) を必要とするため、互いに CBP を取り合う形で競合することに加え、NF- $\kappa$ B の活性化で発現するヒストンデアセチラーゼ 3 が NRF2 と DNA の結合を阻害すると報告した<sup>105)</sup>。反対に、Cuadrado らは、NRF2 により発現誘導された HMOX1 が、RAC1 (a small G-protein of the Rho family) を介して NF- $\kappa$ B の活性化を阻害すると報告した<sup>106)</sup>。さらに Zenkov らはこのような NRF2 と NF- $\kappa$ B のクロストークに関して、細胞に負荷されるストレスレベルによって、その優位性が決まると提唱している<sup>107)</sup>。すなわち、低レベルのストレスでは、NRF2 が強く活性化されて炎症の亢進を阻害するため、NF- $\kappa$ B は阻害され NRF2 が支配的になると考えられる。しかしストレスレベルが増加するにつれ、転写因子のパワーバランスは変化し、NF- $\kappa$ B が強く活性化される一方で、NRF2 が抑制されると考えられる。したがって、重度の損傷を伴うような過度のストレス下では、NRF2 は最終的に不活性化されると推察される。これまでの研究で、NRF2 は低濃度の AqCSE 曝露で活性化されたが、その活性強度は NRF2 の活性化物質として知られる tBHQ やスルフォラファンと比較して、非常に大きいことを明らかにした (結果省略)。このことから、呼吸器上皮細胞が AqCSE に急性曝露されると、即座に NRF2 が強度に活性化され、その結果、NF- $\kappa$ B の活性が抑制されている可能性が高いと考えられる。

NRF2 のタンパク質発現および核移行の結果と一致して、遺伝子発現評価では、AqCSE 曝露で Ox-Array の遺伝子が多く発現変動した (Fig. 4-4 (A))。一方、NF- $\kappa$ B Array の遺伝子の発現変動については、AqCSE 曝露により NF- $\kappa$ B のタンパク質の発現変化や核移行が認められないにも関わらず、CXCL8 などいくつかの遺伝子が強く発現誘導された (Fig. 4-4 (B))。このことから AqCSE 曝露による炎症性遺伝子の発現誘導は NF- $\kappa$ B ではなく、他の転写因子の活性化に依存する可能性が考えられる。シガレット煙抽出液曝露による炎症性反応の主要因は NF- $\kappa$ B の活性化と考えられてきたが<sup>16, 108)</sup>、近年、NF- $\kappa$ B の関与を否定する研究結果も散見される。例えば、シガレット煙を吸入したラットの気管支洗浄液や気道上皮細胞の解析により、NF- $\kappa$ B の活性化を伴わない炎症性メディエーターの過剰発現が観察されている<sup>17, 109)</sup>。そのため、本研究において NF- $\kappa$ B 以外の炎症反応に関連する転写因子として AP-1 に着目したところ、AP-1 の構成成分である c-Jun が中用量の AqCSE 曝露で発現上昇した (Fig. 4-2 (C))。また、本研究で使用した NF-

$\kappa$ B Array に含まれる遺伝子を IPA を用いて分類したところ、AqCSE で発現上昇した NF- $\kappa$ B 下流の遺伝子の多くが NRF2 と AP-1 の両方でも制御されていることが判明した (Fig. 4-5)。これらの結果から、AqCSE の急性曝露における炎症性遺伝子の発現誘導には、NF- $\kappa$ B ではなく、NRF2 および AP-1 の転写活性により強く依存している可能性が示唆された (Fig. 4-6)。

本研究において、三次元培養 HBECs においても AqCSE の急性曝露に対して NRF2 経路が強く活性化することが示された。したがって、NRF2 を指標とした単層培養細胞を用いた評価系の妥当性が示された。また、三次元培養とすることで、より *in vivo* への予測性が高くなると考えられることから、単層培養評価系と併用することで、より多くの知見を得ることが可能であると考えられる。さらに、本章で構築した三次元培養モデルは、単球細胞など複数の細胞種を共培養することや、シガレットから発生させた煙に直接細胞を反復曝露する全煙曝露装置へ応用することにより、よりヒトの喫煙を模倣したモデルへ発展できる可能性も考えられる。



**Fig. 4-6** Potential mechanisms of anti-oxidant and inflammatory gene expression by cigarette smoke. Anti-oxidant genes are strongly activated by NRF2 through the modification of SH residues in KEAP1 by quinones in cigarette smoke. While NF- $\kappa$ B is deactivated by anti-oxidants, inflammatory genes are activated by NRF2 and AP-1 rather than NF- $\kappa$ B.

## 総括

本研究では、呼吸器上皮細胞において、シガレット煙抽出液の急性曝露に対して鋭敏に反応する細胞応答を特定し、その応答を指標としたシガレット煙の有害性およびそのリスク低減に有効な技術・製品の評価手法を開発することを目的とした。

第 1 章では、シガレット煙抽出液 CSE に曝露した NCI-H292 細胞では、たばこ葉の違いに関わらず、共通して、酸化ストレス、炎症、DNA 損傷、異物代謝などに関わる遺伝子群の発現が変動したことから、これらの反応を制御する複数の転写因子が活性化される可能性を示した。

第 2 章では、シガレット煙水溶性抽出液 AqCSE に曝露した NCI-H292 細胞および BEAS-2B 細胞では、NRF2/ARE 経路の著しい活性化が認められたことから、NRF2 の活性化を指標とすることで、呼吸器上皮細胞の急性影響を評価できる可能性を示した。

第 3 章では、BEAS-2B 細胞において構築した NRF2 転写活性化評価系を用い、シガレット煙中成分を評価した結果、9,10-PQ、1,2-NQ、1,4-NQ、acrolein など、呼吸器細胞に対して有害性を示す成分が強い NRF2 活性を示すことが確認された。

第 4 章では、より *in vivo* に近似した三次元培養 HBHCs においても、AqCSE への急性曝露に対して NRF2/ARE 経路が強く活性化することが示され、転写因子 NRF2 の活性化を指標としたたばこ有害性の評価系の妥当性を示した。

これにより、本研究において、シガレット煙抽出液曝露に対して鋭敏に反応する NRF2 の活性化を指標とした評価系が、呼吸器上皮細胞に対して急性影響を与える成分を特定することに有効である可能性を示した。本研究において構築した単層培養細胞を用いた NRF2 転写活性化評価モデルは、シガレット煙抽出液ならびに有害物質に対する感度が高く、かつ簡便であることから、シガレット煙のリスクを低減させる新規技術の評価に応用できる可能性があると考えられる。また本研究で用いた三次元培養モデルは、スルーット性は低下するが、反復曝露や全煙曝露へ応用することにより、よりヒトの喫煙を模倣したモデルへ発展させることが期待できる。

本研究で示した転写因子の変動は、シガレット煙抽出液の急性曝露に対する応答であり、慢性曝露の影響は明らかでない。そのため、本研究で確認された急性的な反応が、慢性疾患の発症にどのように結びつくのか、この点については更なる検討が必要である。興味深いことに、COPD 患者の肺組織細胞では、NRF2 の発現が低下していることが報告されている<sup>110)</sup>。そのた

め、NRF2/ARE 経路の恒常性の破綻が疾病発症に関与している可能性が考えられる。今後、例えば三次元培養モデルを用いてシガレット煙 やシガレット煙抽出液の反復曝露を行い、NRF2 転写活性に対する慢性曝露の影響や、NRF2 の活性化が NF- $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子の活性にどのように関連しているのかなど更なる検討を進めることで、シガレット煙による肺疾病の発症進展メカニズムの解明に繋がる可能性も期待できる。

喫煙は、肺がんなどの多くのがん、心筋梗塞・脳梗塞などの循環器系疾患、慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患など、数多くの疾病に関与することが知られている<sup>1,2)</sup>。また、喫煙は喫煙者のみならず、受動喫煙により非喫煙者へ健康影響を与えることが大きな社会問題であり、受動喫煙による健康影響を回避することも重要である。シガレット煙の有害性の低減は、主流煙のみならず副流煙のリスク低減にも繋がることから、本研究で開発した評価手法を用いシガレット煙の有害性の低減に有効な技術・製品の開発研究を進めることで、受動喫煙による健康影響も低減できる可能性が期待される。

以上より、本研究の成果は、シガレット煙のリスク低減に有効な技術・製品の開発研究の一助になるものと期待される。本研究成果を活用し、禁煙を望まないあるいは禁煙できない喫煙者に対して、将来的にシガレットから有害性を低減した製品を提供することができれば、結果的に喫煙者のみならず非喫煙者の健康影響を低減させ、公衆衛生の向上に貢献し得ると考えられる。

## 謝辞

本稿の提出に際し、指導教官を快く受け入れていただき、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学 薬学部 公衆衛生学教室 教授 藤原 泰之 博士に謹んで感謝の意を表します。

本稿の作成にあたり、温かい御指導と貴重な御助言を賜りました、東京薬科大学 薬学部 衛生化学教室 教授 早川 磨紀男 博士、生化学教室 教授 佐藤 隆 博士、薬物動態制御学教室 教授 井上 勝央 博士に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、計画、実験、考察、さらには投稿論文作成に渡る終始懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました愛知学院大学 薬学部 薬効解析学講座 教授 村木 克彦 博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂き、多大なご理解とご協力を頂きました、日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部 R&D グループ 製品評価センター 西川 登志夫 氏、西野 友規 博士ならびに JT International SA, RRP Science Dr. Ian Jones、Dr. Masaomi Fukamachi に深謝致します。また、多大なご協力を頂きました高橋 秀樹 博士、四十八願 弘 氏、小野澤 正浩 氏、これまで共に研究・議論した平田 直 博士、ならびに日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部 R&D グループ 製品評価センターの皆様、JT International SA, RRP Science の皆様に謹んで感謝致します。

最後に、常に温かく見守り支えてくれた家族に万感の思いで感謝致します。



## 掲載論文

本申請論文は以下の論文を中心にまとめた。

### 第1章

1. Takashi Sekine, Chikako Sakaguchi and Yasuo Fukano.  
Investigation by microarray analysis of effects of cigarette design characteristics on gene expression in human lung mucoepidermoid cancer cells NCI-H292 exposed to cigarette smoke. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67, 143-151 (2015)

### 第2章、第3章

2. Takashi Sekine, Tadashi Hirata, Toshiki Mine and Yasuo Fukano  
Activation of transcription factors in human bronchial epithelial cells exposed to aqueous extracts of mainstream cigarette smoke in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26, 22-31 (2016)

### 第3章

3. Katsuhiko Muraki, Takashi Sekine, Yuna Ando, Hiroka Suzuki, Noriyuki Hatano, Tadashi Hirata and Yukiko Muraki  
An environmental pollutant, 9,10-phenanthrenequinone, activates human TRPA1 via critical cysteines 621 and 665. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5, e00342 (2017)

### 第4章

4. Takashi Sekine, Tadashi Hirata, Shinkichi Ishikawa, Shigeaki Ito, Kanae Ishimori, Kazushi Matsumura and Katsuhiko Muraki.  
Regulation of NRF2, AP-1 and NF- $\kappa$ B by cigarette smoke exposure in three-dimensional human bronchial epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 39, 717–725 (2019)

## 引用文献

- 1) International Agency for Research on Cancer, "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans volume 83", World Health Organization, Lyon, 2004.
- 2) Department of Health and Human Services, "The Health Consequences of Smoking - 50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General", U.S. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta, 2014.
- 3) World Health Organization, "WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025", 2<sup>nd</sup> ed., 2014.
- 4) Nitzkin J.L., The case in favor of E-cigarettes for tobacco harm reduction. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, **11**, 6459-6471 (2014).
- 5) Institute of Medicine, "Clearing the Smoke: Assessing the Science Base for Tobacco Harm Reduction", The National Academies Press, Washington DC, 2001.
- 6) Center for Tobacco Products, "Modified Risk Tobacco Product Applications Draft Guidance", U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Rockville, 2012.
- 7) Takahashi Y., Kanemaru Y., Fukushima T., Eguchi K., Yoshida S., Miller-Holt J., Jones I., Chemical analysis and in vitro toxicological evaluation of aerosol from a novel tobacco vapor product: A comparison with cigarette smoke. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **92**, 94-103 (2018).
- 8) Forster M., Fiebelkorn S., Yurteri C., Mariner D., Liu C., Wright C., McAdam K., Murphy J., Proctor C., Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 3: Comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **93**, 14-33 (2018).
- 9) Jaccard G., Tabin Djoko D., Moennikes O., Jeannot C., Kondylis A., Belushkin M., Comparative assessment of HPHC yields in the Tobacco Heating System THS2.2 and commercial cigarettes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **90**, 1-8 (2017).
- 10) McNeill A., Brose L.S., Calder R., Bauld L., Robson D., "E-cigarettes: an evidence update: A report commissioned by Public Health England", Public Health England, London, 2015.
- 11) McNeill A., Brose L.S., Calder R., Bauld L., Robson D., "Evidence review of e-cigarettes and heated tobacco products 2018: A report commissioned by Public Health England", Public Health England, London, 2018.
- 12) Rodgman A., Perfetti TA., "The chemical components of tobacco and tobacco smoke". 2nd ed. CRC Press, Florida, 2013.

- 13) Knorr-Wittmann C., Hengstermann A., Gebel S., Alam J., Muller T., Characterization of Nrf2 activation and heme oxygenase-1 expression in NIH3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1438-1448 (2005).
- 14) Daijo H., Hoshino Y., Kai S., Suzuki K., Nishi K., Matsuo Y., Harada H., Hirota K., Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. *Sci. Rep.*, **6**, 34424 (2016).
- 15) Hengstermann A., Muller T., Endoplasmic reticulum stress induced by aqueous extracts of cigarette smoke in 3T3 cells activates the unfolded-protein-response-dependent PERK pathway of cell survival. *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1097-1107 (2008).
- 16) Ahn K.S., Aggarwal B.B., Transcription factor NF- $\kappa$ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1056**, 218-233 (2005).
- 17) Li Y.T., He B., Wang Y.Z., Exposure to cigarette smoke upregulates AP-1 activity and induces TNF-alpha overexpression in mouse lungs. *Inhal. Toxicol.*, **21**, 641-647 (2009).
- 18) Liu X., Togo S., Al-Mugotir M., Kim H., Fang Q., Kobayashi T., Wang X., Mao L., Bitterman P., Rennard S., NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respir. Res.*, **9**, 66 (2008).
- 19) Abubakar Y., Young J.H., Johnson W.H., Weeks W.W., Changes in moisture and chemical composition of flue-cured tobacco during curing. *Tob. Sci.*, **44**, 51-58 (2000).
- 20) International Organisation of Standardization, "ISO Standard 4387 : Tobacco and Tobacco Products -- Atmosphere for Conditioning and Testing", Geneva, 1999.
- 21) International Organisation of Standardization, "ISO Standard 3308 : Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions", Geneva, 2012.
- 22) rizarry R.A., Bolstad B.M., Collin F., Cope L.M., Hobbs B., Speed T.P., Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e15 (2003).
- 23) Holm S., A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.*, **6**, 65-70 (1979).
- 24) Pace T.W., Hu F., Miller A.H., Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav. Immun.*, **21**, 9-19 (2007).
- 25) Kawajiri K., Fujii-Kuriyama Y., Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **464**, 207-212 (2007).
- 26) Roemer E., Schramke H., Weiler H., Buettner A., Kausche S., Weber S., Berges A., Stueber M., Muench M., Trelles-Sticken E., Pype J., Kohlgrueber K., Voelkel H., Wittke S., Mainstream Smoke Chemistry and in Vitro and In Vivo Toxicity of the Reference Cigarettes 3R4F and 2R4F. *Beiträge zur Tabakforschung international*, **25**, 316 (2012).

- 27) D'Armiento J., Dalal S.S., Okada Y., Berg R.A., Chada K., Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*, **71**, 955-961 (1992).
- 28) Ra H. J., Parks W.C., Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*, **26**, 587-596 (2007).
- 29) Vincenti M.P., Brinckerhoff C.E., Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis. Res.*, **4**, 157-164 (2002).
- 30) Shin D.H., Dier U., Melendez J.A., Hempel N., Regulation of MMP-1 expression in response to hypoxia is dependent on the intracellular redox status of metastatic bladder cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* , **1852**, 2593-2602 (2015).
- 31) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P., Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11908-11913 (2002).
- 32) Nishiyama A., Matsui M., Iwata S., Hirota K., Masutani H., Nakamura H., Takagi Y., Sono H., Gon Y., Yodoi J., Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21645-21650 (1999).
- 33) Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A., Vannucci S.J., The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E242-E253 (2008).
- 34) Blackshear P.J., The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1501-1504 (1993).
- 35) Prieto D., Zolessi F.R., Functional Diversification of the Four MARCKS Family Members in Zebrafish Neural Development. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **328**, 119-138 (2017).
- 36) Donaldson M.M., Tavares A.A., Hagan I.M., Nigg E.A., Glover D.M., The mitotic roles of Polo-like kinase. *J. Cell Sci.*, **114**, 2357-2358 (2001).
- 37) Kinsella A.R., Smith D., Pickard M., Resistance to chemotherapeutic antimetabolites: a function of salvage pathway involvement and cellular response to DNA damage. *Br. J. Cancer*, **75**, 935-945 (1997).
- 38) Uno S., Dalton T.P., Derkenne S., Curran C.P., Miller M.L., Shertzer H.G., Nebert D.W., Oral exposure to benzo[*a*]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.*, **65**, 1225-1237 (2004).
- 39) O'Shea J.J., Gadina M., Schreiber R.D., Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway. *Cell*, **109**, S121-S131 (2002).

- 40) Geraghty P., Wyman A.E., Garcia-Arcos I., Dabo A.J., Gadhvi S., Foronjy R., STAT3 modulates cigarette smoke-induced inflammation and protease expression. *Front Physiol.*, **4**, 267 (2013).
- 41) Lee H., Park J.R., Kim E.J., Kim W.J., Hong S.H., Park S.M., Yang S.R., Cigarette smoke-mediated oxidative stress induces apoptosis via the MAPKs/STAT1 pathway in mouse lung fibroblasts. *Toxicol. Lett.*, **240**, 140-148 (2016).
- 42) Dong J., Guo L., Liao Z., Zhang M., Zhang M., Wang T., Chen L., Xu D., Feng Y., Wen F., Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. Immunopharmacol.*, **17**, 885-893 (2013).
- 43) Srinivasan S., Totiger T., Shi C., Castellanos J., Lamichhane P., Dosch A.R., Messaggio F., Kashikar N., Honnenahally K., Ban Y., Merchant N.B., VanSaun M., Nagathihalli N.S., Tobacco Carcinogen-Induced Production of GM-CSF Activates CREB to Promote Pancreatic Cancer. *Cancer Res.*, **78**, 6146-6158 (2018).
- 44) Meng M., Liao H., Zhang B., Pan Y., Kong Y., Liu W., Yang P., Huo Z., Cao Z., Zhou Q., Cigarette smoke extracts induce overexpression of the proto-oncogenic gene interleukin-13 receptor alpha2 through activation of the PKA-CREB signaling pathway to trigger malignant transformation of lung vascular endothelial cells and angiogenesis. *Cell Signal.*, **31**, 15-25 (2017).
- 45) Shi Y., Venkataraman S.L., Dodson G.E., Mabb A.M., LeBlanc S., Tibbetts R.S., Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 5898-5903 (2004).
- 46) Courcot E., Leclerc J., Lafitte J.J., Mensier E., Jaillard S., Gosset P., Shirali P., Pottier N., Broly F., Lo-Guidice J.M., Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1953-1965 (2012).
- 47) Grilli A., Bengalli R., Longhin E., Capasso L., Proverbio M.C., Forcato M., Biccato S., Gualtieri M., Battaglia C., Camatini M., Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genom.*, **19**, 302 (2018).
- 48) Li Y., Duan J., Yang M., Li Y., Jing L., Yu Y., Wang J., Sun Z., Transcriptomic analyses of human bronchial epithelial cells BEAS-2B exposed to atmospheric fine particulate matter PM2.5. *Toxicol. In Vitro*, **42**, 171-181 (2017).
- 49) Johnson M.D., Schilz J., Djordjevic M.V., Rice J.R., Shields P.G., Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18**, 3263-3304 (2009).
- 50) Health Canada, "Official Method T-502, Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke", 2<sup>nd</sup> ed., 2004.
- 51) Coresta in vitro toxicology taskforce, "The rationale and strategy for conducting in vitro toxicology testing of tobacco smoke", Corporation Center Scientific Relative to Tobacco, 2004,

- <[https://www.coresta.org/sites/default/files/technical\\_documents/main/IVT\\_TF\\_Rationale-IVT-Testing-Tob.-Smoke\\_Report\\_Jun04.pdf](https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/IVT_TF_Rationale-IVT-Testing-Tob.-Smoke_Report_Jun04.pdf)>, accessed in May 2019.
- 52) Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671 (2012).
  - 53) Ding G.J., Fischer P.A., Boltz R.C., Schmidt J.A., Colaianne J.J., Gough A., Rubin R.A., Miller D.K., Characterization and quantitation of NF- $\kappa$ B nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28897-28905 (1998).
  - 54) Suzuki T., Yamamoto M., Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 93-100 (2015).
  - 55) Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y., Sou Y.S., Ueno I., Sakamoto A., Tong K.I., Kim M., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Ueno T., Kominami E., Motohashi H., Tanaka K., Yamamoto M., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 213-223 (2010).
  - 56) Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313-322 (1997).
  - 57) Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y.W., Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9926-9930 (1994).
  - 58) Ma Q., Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**, 401-426 (2013).
  - 59) Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M., Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86 (1999).
  - 60) Motohashi H., Yamamoto M., Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends. Mol. Med.*, **10**, 549-557 (2004).
  - 61) Muller T., Gebel S., Heme oxygenase expression in Swiss 3T3 cells following exposure to aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, **15**, 67-72 (1994).
  - 62) Komatsu M., Waguri S., Koike M., Sou Y.S., Ueno T., Hara T., Mizushima N., Iwata J., Ezaki J., Murata S., Hamazaki J., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Yanagawa T., Uwayama J., Warabi E., Yoshida H., Ishii T., Kobayashi A., Yamamoto M., Yue Z., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka

- K., Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, **131**, 1149-1163 (2007).
- 63) Monick M.M., Powers L.S., Walters K., Lovan N., Zhang M., Gerke A., Hansdottir S., Hunninghake G.W., Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J. Immunol.*, **185**, 5425-5435 (2010).
- 64) Ding X., Kaminsky L.S., Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 149-173 (2003).
- 65) McLemore T.L., Adelberg S., Liu M.C., McMahon N.A., Yu S.J., Hubbard W.C., Czerwinski M., Wood T.G., Storeng R., Lubet R.A., Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **82**, 1333-1339 (1990).
- 66) Tsuji H., Fujimoto H., Lee K.M., Renne R., Iwanaga A., Okubo C., Onami S., Nomura A.K., Nishino T., Yoshimura H., Characterization of biochemical, functional and structural changes in mice respiratory organs chronically exposed to cigarette smoke. *Inhal. Toxicol.*, **27**, 342-353 (2015).
- 67) Tsuji H., Fujimoto H., Matsuura D., Nishino T., Lee K.M., Yoshimura H., Comparison of biological responses in rats under various cigarette smoke exposure conditions. *J. Toxicol. Pathol.*, **26**, 159-174 (2013).
- 68) Sundar I.K., Yao H., Rahman I., Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxid. Redox. Signal.*, **18**, 1956-1971 (2013).
- 69) Karin M., How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, **18**, 6867-6874 (1999).
- 70) Jacobs M.D., Harrison S.C., Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Complex. *Cell*, **95**, 749-758 (1998).
- 71) Gebel S., Muller T., The activity of NF- $\kappa$ B in Swiss 3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke is dependent on thioredoxin. *Toxicol. Sci.*, **59**, 75-81 (2001).
- 72) Carter C.A., Hamm J.T., Multiplexed quantitative high content screening reveals that cigarette smoke condensate induces changes in cell structure and function through alterations in cell signaling pathways in human bronchial cells. *Toxicology*, **261**, 89-102 (2009).
- 73) World Health Organization, "Work in progress in relation to Articles 9 and 10 of the WHO FCTC" : < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/147115>>, Moscow, 2014, accessed in February 2019.
- 74) Kraft A.D., Johnson D.A., Johnson J.A., Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by *tert*-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J. Neurosci.*, **24**, 1101-1112 (2004).
- 75) Kehrer J.P., Biswal S.S., The molecular effects of acrolein. *Toxicol. Sci.*, **57**, 6-15 (2000).

- 76) LoPachin R.M., Gavin T., Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 1081-1091 (2014).
- 77) Schuetzle D., Lee F.S., Prater T.J., The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **9**, 93-144 (1981).
- 78) Chung S.W., Chung H.Y., Toriba A., Kameda T., Tang N., Kizu R., Hayakawa K., An environmental quinoid polycyclic aromatic hydrocarbon, acenaphthenequinone, modulates cyclooxygenase-2 expression through reactive oxygen species generation and nuclear factor kappa B activation in A549 cells. *Toxicol Sci*, **95**, 348-355 (2007).
- 79) Ding Y.S., Trommel J.S., Yan X.J., Ashley D., Watson C.H., Determination of 14 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mainstream Smoke from Domestic Cigarettes. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 471-478 (2005).
- 80) Koike E., Yanagisawa R., Takano H., Toxicological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives on respiratory cells. *Atmospheric Environ.*, **97**, 529-536 (2014).
- 81) Hinman A., Chuang H.H., Bautista D.M., Julius D., TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 19564-19568 (2006).
- 82) Macpherson L.J., Dubin A.E., Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A., Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, **445**, 541-545 (2007).
- 83) Nie Y., Huang C., Zhong S., Wortley M.A., Luo Y., Luo W., Xie Y., Lai K., Zhong N., Cigarette smoke extract (CSE) induces transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) expression via activation of HIF1 $\alpha$  in A549 cells. *Free. Radic. Biol. Med.*, **99**, 498-507 (2016).
- 84) Buch T.R., Schafer E.A., Demmel M.T., Boekhoff I., Thiermann H., Gudermann T., Steinritz D., Schmidt A., Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. *Chem.-Biol. Interact.*, **206**, 462-471 (2013).
- 85) Fernandes E.S., Russell F.A., Spina D., McDougall J.J., Graepel R., Gentry C., Staniland A.A., Mountford D.M., Keeble J.E., Malcangio M., Bevan S., Brain S.D., A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheumatol.*, **63**, 819-829 (2011).
- 86) Kwan K.Y., Allchorne A.J., Vollrath M.A., Christensen A.P., Zhang D.S., Woolf C.J., Corey D.P., TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, **50**, 277-289 (2006).



- 87) Koivisto A., Chapman H., Jalava N., Korjamo T., Saarnilehto M., Lindstedt K., Pertovaara A., TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **114**, 50-55 (2014).
- 88) Roginsky V.A., Barsukova T.K., Stegmann H.B., Kinetics of redox interaction between substituted quinones and ascorbate under aerobic conditions. *Chem.-Biol. Interact.*, **121**, 177-197 (1999).
- 89) Brunmark A., Cadenas E., Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 435-477 (1989).
- 90) Loi V.V., Rossius M., Antelmann H., Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.*, **6**, 187 (2015).
- 91) Monks T.J., Hanzlik R.P., Cohen G.M., Ross D., Graham D.G., Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2-16 (1992).
- 92) Goodwin B.F., Crevel R.W., Johnson A.W., A comparison of three guinea-pig sensitization procedures for the detection of 19 reported human contact sensitizers. *Contact Derm.*, **7**, 248-258 (1981).
- 93) Basketter D.A., Liden C., Further investigation of the prohaptens concept: reactions to benzene derivatives in man. *Contact Derm.*, **27**, 90-97 (1992).
- 94) Cai J., Bhatnagar A., Pierce W.M., Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 708-716 (2009).
- 95) Yeager R.P., Kushman M., Chemerynski S., Weil R., Fu X., White M., Callahan-Lyon P., Rosenfeldt H., Proposed Mode of Action for Acrolein Respiratory Toxicity Associated with Inhaled Tobacco Smoke. *Toxicol. Sci.*, **151**, 347-364 (2016).
- 96) Hyodo T., Maruta Y., Itaya H., Mikita A., Koder T., Meger M., Evaluation of functional relationships for predicting mainstream smoke constituent machine yields for conventional cigarettes from the Japanese market. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **48**, 194-224 (2007).
- 97) Eldridge A., Betson T.R., Gama M.V., McAdam K., Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **71**, 409-427 (2015).
- 98) Toriba A., Hayakawa K., Kameda T., FY2011 Smoking Research Foundation annual research report, Tokyo, 2011, pp. 532-536.
- 99) Asahi M., Kawai M., Toyama T., Kumagai Y., Chuesaard T., Tang N., Kameda T., Hayakawa K., Toriba A., Identification and quantification of in vivo metabolites of 9,10-phenanthrenequinone in human urine associated with producing reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 76-85 (2014).
- 100) Haycock J.W., 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol. Biol.*, **695**, 1-15 (2011).

- 101) Ishikawa S., Ishimori K., Ito S., A 3D epithelial-mesenchymal co-culture model of human bronchial tissue recapitulates multiple features of airway tissue remodeling by TGF- $\beta$ 1 treatment. *Respir. Res.*, **18**, 195 (2017).
- 102) Aufderheide M., Ito S., Ishikawa S., Emura M., Metaplastic phenotype in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure to native mainstream smoke at the air-liquid interface. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **69**, 307-315 (2017).
- 103) Ross A.J., Dailey L.A., Brighton L.E., Devlin R.B., Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **37**, 169-185 (2007).
- 104) Benjamin D.J., Berger J.O., Johannesson M., Nosek B.A., Wagenmakers E.J., Berk R., Bollen K.A., Brembs B., Brown L., Camerer C., Cesarini D., Chambers C.D., Clyde M., Cook T.D., De Boeck P., Dienes Z., Dreber A., Easwaran K., Efferson C., Fehr E., Fidler F., Field A.P., Forster M., George E.I., Gonzalez R., Goodman S., Green E., Green D.P., Greenwald A.G., Hadfield J.D., Hedges L.V., Held L., Hua Ho T., Hoijtink H., Hruschka D.J., Imai K., Imbens G., Ioannidis J.P.A., Jeon M., Jones J.H., Kirchler M., Laibson D., List J., Little R., Lupia A., Machery E., Maxwell S.E., McCarthy M., Moore D.A., Morgan S.L., Munafó M., Nakagawa S., Nyhan B., Parker T.H., Pericchi L., Perugini M., Rouders J., Rousseau J., Savalei V., Schönbrodt F.D., Sellke T., Sinclair B., Tingley D., Van Zandt T., Vazire S., Watts D.J., Winship C., Wolpert R.L., Xie Y., Young C., Zinman J., Johnson V.E., Redefine statistical significance. *Nature Human Behaviour*, **2**, 6-10 (2018).
- 105) Li W., Khor T.O., Xu C., Shen G., Jeong W.S., Yu S., Kong A.N., Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF $\kappa$ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 1485-1489 (2008).
- 106) Cuadrado A., Martin-Moldes Z., Ye J., Lastres-Becker I., Transcription factors NRF2 and NF- $\kappa$ B are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation. *J. Biol. Chem.*, **289**, 15244-15258 (2014).
- 107) Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Tkachev V.O., Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry (Mosc)*, **78**, 19-36 (2013).
- 108) Edwards M.R., Bartlett N.W., Clarke D., Birrell M., Belvisi M., Johnston S.L., Targeting the NF- $\kappa$ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.*, **121**, 1-13 (2009).
- 109) Rastrick J.M., Stevenson C.S., Eltom S., Grace M., Davies M., Kilty I., Evans S.M., Pasparakis M., Catley M.C., Lawrence T., Adcock I.M., Belvisi M.G., Birrell M.A., Cigarette smoke induced airway inflammation is independent of NF- $\kappa$ B signalling. *PLoS One*, **8**, e54128 (2013).
- 110) Suzuki M., Betsuyaku T., Ito Y., Nagai K., Nasuhara Y., Kaga K., Kondo S., Nishimura M., Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **39**, 673-682 (2008).