

氏名（本籍）	<small>せきね たかし</small> 関根 崇（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 364 号
学位授与の日付	令和元年 7 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 藤原 泰之 教授 早川 磨紀男 教授 佐藤 隆 教授 井上 勝央

論文内容の要旨

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、慢性気管支炎・肺気腫などの呼吸器疾患など、数多くの疾患の発症に深く関係している。公衆衛生上の観点から喫煙による健康懸念への対策としては、喫煙防止対策が重要であることはいうまでもない。しかしながら、徐々に喫煙率は低下しているものの、世界的にみれば喫煙者数はほとんど変化していない現状がある。そのような中、「たばこハームリダクション」と言われる新しい方針が欧米を中心に広まってきている。「たばこハームリダクション」とは、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悪影響を低減させるという考えである。複数の国や機関がこの方針を支持しており、米国などいくつかの国では、シガレットと比較して有害性の低減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が導入された。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。また最近の研究では、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、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に理解されていない。さらに先行研究では、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引き起こされることが報告されているが、必ずしも一致した結果は得られていない。また、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。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。

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

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探索することを目的として、異なる 3 種類の試験シガレット (100%黄色種を用いた flue-cured cigarette: FC、100%バーレー種を用いた 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 m2R4F) の煙を捕集し DMSO 抽出した試験溶液 (cigarette smoke extract, CSE) をヒト気道上皮細胞株 (NCI-H292 細胞) にそれぞれ曝露し、網羅的遺伝子発現解析を行った。CSE 曝露により発現変動した遺伝子およびシグナル伝達経路 (パスウェイ) の解析の結果、シガレット煙抽出液 CSE に曝露した NCI-H292 細胞では、たばこ葉の組成の違いに関わらず、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ならびにパスウェイが有意に変動した。これらの結果から、Table 1 に示す複数の転写因子の活性化が CSE の急性曝露により引き起こされることが示唆された。

Table 1 Transcription factors selected from the results of gene expression analysis in NCI-H292 cells.

Transcription factors	Response elements
cyclic AMP response element binding protein (CREB)	cyclic AMP response element (CRE)
nuclear factor-kappa B (NF-κB)	NF-κB response element (NF-κB-RE)
nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2)	anti-oxidant response element (ARE)
activating transcription factor 6 (ATF6)	ATF6 response element (ATF6-RE)
heat shock factor (HSF)	heat shock response element (HSE)
hypoxia-inducible factor 1 (HIF1)	hypoxia response element (HRE)
aryl hydrocarbon receptor (AhR)	xenobiotic response element (XRE)
activator protein 1 (AP-1)	AP-1 response element (AP-1-RE)
signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/2	interferon-stimulated response element (ISRE)
STAT 3	sis-inducible element (SIE)

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

第 2 章では、第 1 章において CSE 曝露で発現変動した遺伝子群の結果から選定した 10 種類の転写因子 (Table 1) の中から、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の特定を試みた。各々の転写因子の活性化に応答してルシフェラーゼ発光を示すベクターを構築し、ヒト気管支上皮細胞株である BEAS-2B 細胞および NCI-H292 細胞に安定的に発現させた。なお、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、捕集したシガレット煙を DMSO 抽出した CSE (DMSO の終濃度 2%) を用いて検討を行ったが、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、リン酸緩衝液を抽出溶媒とした試験溶液

(aqueous cigarette smoke extract, AqCSE) を用いて検討した。AqCSEを曝露させルシフェラーゼアッセイを行った結果、両細胞において、転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) の応答配列である anti-oxidant response element (ARE) を有するレポーターが最も著しい反応を示した (Fig. 1 (A))。一方、炎症性遺伝子の発現を制御する nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 経路にも着目したが、両細胞において AqCSE 曝露による NF- κ B 経路の活性化は認められなかった (Fig. 1 (B))。したがって、少なくとも検討した中で NRF2 は AqCSE の曝露に対して最も反応性の高い鋭敏な転写因子であると考えられた。そこで次章では、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。

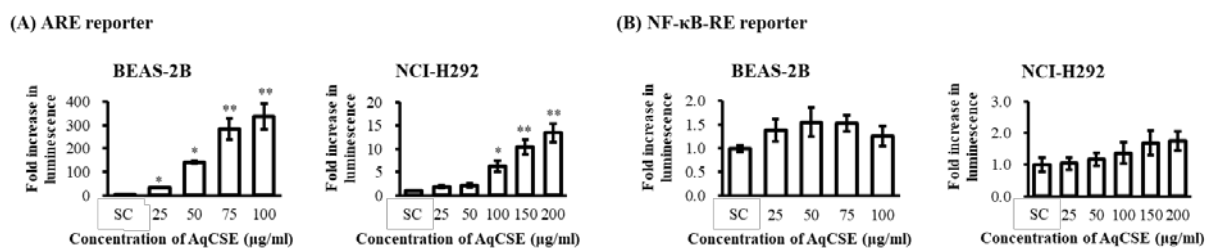


Fig. 1 Results of (A) ARE and (B) NF- κ B-RE reporter assays in BEAS-2B and NCI-H292 cells. Cells were exposed to AqCSE for 5 h and lysed for luciferase detection. Luciferase activity is expressed as the fold change relative to the solvent control (SC). Values are means plus standard errors ($n = 3$). Values that are significantly different from that of the SC ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) by Dunnett's test are indicated.

第3章 NRF2/ARE 評価系を用いたシガレット煙中成分の評価

第3章では、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 (BEAS-2B 細胞) 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探索を試みた。検討可能であった 1395 種のシガレット煙中成分の影響を検討した結果、9,10-phenanthrene-quinone (9,10-PQ) が最も高い NRF2 の転写活性を示した (Fig. 2 (A))。さらに、9,10-PQ は肺胞上皮由来細胞株である A549 細胞において、 Ca^{2+} 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 (TRAP1) の活性化を介して細胞内生理機能に悪影響を与える可能性が示唆された (Fig. 2 (B))。また、9,10-PQ に加えて 1,4-naphthoquinone などキノン構造を

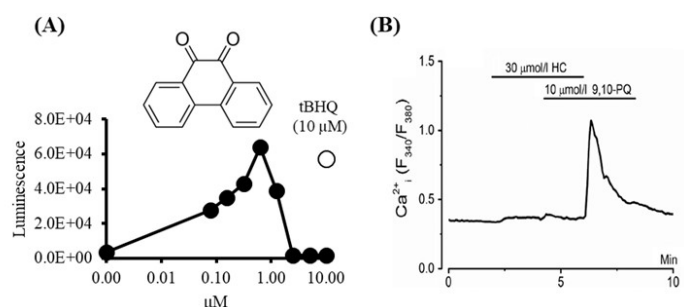


Fig.2 (A) Chemical structure of 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) and result of ARE-reporter assay in BEAS-2B cells exposed to 9,10-PQ. *Tert*-butylhydroquinone (tBHQ, 10 μ M) was exposed to cells as a positive control. (B) Ca^{2+} response in A549 cells to 9,10-PQ (10 μ mol/l) in the presence or absence of the TRPA1 specific inhibitor HC-030031 (HC, 30 μ mol/l).

もつ化合物や acrolein など、呼吸器細胞に対して有害性を示すことが報告されている成分が高い NRF2 の転写活性を示した。したがって、NRF2/

ARE 経路は有害物質の感知・応答という点で非常に鋭敏であり、この経路の活性化を指標とすることで、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が可能であることが示された。

第4章 三次元培養モデルによる転写因子活性化の評価

第4章では、より *in vivo* に近似した三次元培養系をヒト初代気管支上皮細胞 (HBECs) を用いて構築し、AqCSE 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を用いた評価系の優位性について検討した。三次元培養 HBECs 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 (Fig. 3 (A))、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唆された。また、単層培養系と同様に、三次元培養系においても AqCSE 曝露による NF- κ B の活性化は認められなかった (Fig. 3 (B))。一方で、AqCSE 曝露により、NF- κ B の活性化が認められないにも関わらず、CXCL8 など NF- κ B による制御が主とされている複数の炎症性遺伝子が強く発現上昇していた。そのため、AqCSE の急性曝露で発現上昇した NF- κ B 下流の遺伝子を解析したところ、AqCSE の急性曝露における炎症性遺伝子の発現誘導には、NF- κ 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。実際、AqCSE の急性曝露により AP-1 (c-Jun) の活性化も認められた (Fig. 3 (C))。三次元培養系は、単層培養系と比べてより *in vivo* への予測性が高くなると考えられることやシガレットから発生させた煙を直接気管支上皮細胞に反復曝露させることも可能であることから、単層培養細胞を用いた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。

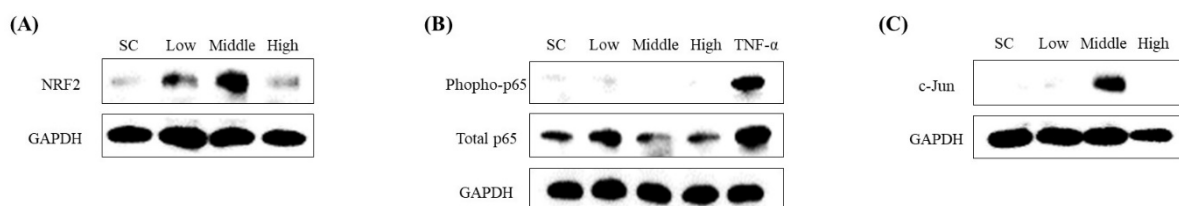


Fig. 3 Transcription factor protein expression in 3D-cultured HBECs. (A) NRF2, (B) phosphorylated and total-p65 (NF- κ B), and (C) c-Jun (AP-1) protein expression were measured in whole cell lysates of HBECs following 6 h exposure to AqCSE at 250, 500 or 750 μ g/ml (Low, Middle or High) or 10 ng/ml tumor necrosis factor alpha (TNF- α) as a positive control for p65 expression. GAPDH protein expression was measured as an internal control. SC: solvent control.

総括

本研究では、シガレット煙抽出液曝露に対して鋭敏に反応する NRF2/ARE 経路の活性化を指標とした単層培養細胞を用いた評価系が、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すことができた。また、本研究において構築した単層培養細胞ならびに三次元培養細胞を用いた評価手法は、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・製品の評価に応用できる可能性が期待できる。さらに、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、結果的に喫煙ならびに受動喫煙による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。

【研究結果の掲載誌】

1. Sekine *et al.*, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **67**, 143-151 (2015)
2. Sekine *et al.*, *Toxicology Mechanisms and Methods*, **26**, 22-31 (2016)
3. Muraki, Sekine *et al.*, *Pharmacology Research & Perspectives*, **5**, e00342 (2017)
4. Sekine *et al.*, *Journal of Applied Toxicology*, **39**, 717-725 (2019)

論文審査の結果の要旨

喫煙は、肺がんや呼吸器疾患などをはじめとする数多くの疾患の発症に深く関係している。公衆衛生上の観点から喫煙による健康懸念への対策としては、喫煙防止対策が重要であることはいうまでもない。しかしながら、世界的にみれば喫煙者数はほとんど変化していない現状がある。一方で、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で、喫煙が公衆衛生に及ぼす悪影響を低減させることを目指す「たばこハームリダクション」と呼ばれる考えがある。米国などいくつかの国では、この考えに則りシガレットと比較して有害性の低減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が導入されている。しかしながら、リスク低減製品かどうかを判断するための評価方法について、コンセンサスを得た方針や枠組みは現在まだ存在しない。さらに先行研究では、シガレット煙抽出液に対する呼吸器上皮細胞の細胞応答として、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引き起こされることが報告されているが、必ずしも一致した結果は得られていなかった。また、シガレット煙抽出液曝露による急性応答も明確でなかった。これらの背景を受け、本研究で申請者は、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新規のシガレット煙有害性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、異なる3種類の試験シガレットの煙を捕集し dimethyl sulfoxide (DMSO) で抽出した試験溶液 (cigarette smoke extract, CSE) をヒト気道上皮細胞株 (NCI-H292 細胞) にそれぞれ曝露し、網羅的遺伝子発現解析およびシグナル伝達経路 (パスウェイ) の解析を行った。その結果、3種類の試験シガレットに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ならびにパスウェイが有意に変動することを明らかにし、さらに CSE の急性曝露により活性化される可能性の高い転写因子を 10 種類選定した。

第2章では、第1章で選定した 10 種類の転写因子に応答してルシフェラーゼ発光を示すベクターを構築し、ヒト気管支上皮細胞株である BEAS-2B 細胞および NCI-H292 細胞に安定的に発現させた。リン酸緩衝液をシガレット煙の抽出溶媒とした試験溶液 (aqueous cigarette smoke extract, AqCSE) を曝露させルシフェラーゼアッセイを行った結果、両細胞において、転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) の応答配列である anti-oxidant response element (ARE) を有するレポーターが最も著しい反応を示すことを見出した。したがって、検討した中で NRF2 は AqCSE に対して最も反応性の高い鋭敏な転写因子であることを明らかにした。

第3章では、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探索を試みた。検討可能であった 1395 種のシガレット煙中成分の中から、9,10-phenanthrenequinone や 1,4-naphthoquinone などキノン構造をもつ化合物や acrolein など、呼吸器細胞に対して有害性を示すことが報告されている成分が高い NRF2 の転写活性を示すことが確認され、本評価系が有害成分の急性曝露影響評価に有用であることが示された。

第4章では、より *in vivo* に近似した三次元培養系をヒト初代気管支上皮細胞 (human

bronchial epithelial cells, HBECs) を用いて構築し、AqCSE 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を用いた評価系の優位性について検討した。三次元培養 HBECs 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、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確認された。また、三次元培養系は単層培養系と比べてより *in vivo* への予測性が高くなると考えられることやシガレットから発生させた煙を直接気管支上皮細胞に反復曝露させることも可能であることから、本評価系の有用性も高いことが示唆される。

以上、本論文はシガレット煙抽出液曝露に対して鋭敏に応答する NRF2/ARE 経路の活性化を指標とした単層培養細胞を用いた評価系が、呼吸器上皮細胞に対して急性影響を与える有害成分の特定並びにシガレット煙の有害性評価に有用であることを示した。加えて本研究で構築した三次元培養細胞を用いた評価手法の有用性並びに発展性が示唆された。今後本研究成果を活用し、将来的に禁煙を望まないまたは禁煙できない喫煙者に対して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、結果的に喫煙ならびに受動喫煙による健康影響の低減に貢献できることが期待される。以上のように、公衆衛生の向上に資する新規たばこ有害性評価手法の開発という研究課題の成果を纏めた本論文は、新規性、有用性並びに発展性があり、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。