

肺細胞の遺伝子発現に対するニコチンの制御と疾患との関連

吉村 邦彦*

はじめに

喫煙は多くの呼吸器疾患の発症や増悪に関わる重要な外的要因であり、肺がんのみならず、慢性気道炎症、肺の気腫化や線維化の発症などにも習慣性喫煙が大きく関わっているが、その分子機序についてはいまだ不明な点が多い。たばこ煙の主要薬理成分であるニコチンの肺細胞の遺伝子発現に対する制御機構を解析する目的で、主に 1) 肺がんの発症と治療に関する臨床的・基礎的分子生物学的研究、および 2) 気道炎症に関わる肺構成細胞の遺伝子発現とニコチンによるその制御と将来的な治療への応用、に関する研究を行なった。

肺細胞におけるニコチン性受容体発現

喫煙に伴ってニコチンが気道や肺胞上皮細胞に直接作用する際、ニコチン作動性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介するものと考えられる。ニコチン作動性アセチルコリン受容体は α ないし β 鎖からなる 5 量体を形成しているが、肺では主として subtype- $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 鎖が発現していると報告されている¹⁾。実際、ヒト由来の肺がん細胞 HS-24 (扁平上皮がん)、A549 (肺胞上皮がん)、H128、SBC-5 (ともに小細胞がん) 細胞株をモデルとして、nAChR- $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 遺伝子 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討すると、nAChR- $\alpha 5$ mRNA は検討したすべての肺上皮細胞に定常的に発現され、さらにニコチン刺激によって明らかな発現の増強効果が濃度依存性に認められた。一方、nAChR- $\alpha 7$ の mRNA 発現は細胞種によってその様相が異なり、HS-24、SBC-5 細胞では定常

状態で発現され、ニコチン刺激による発現量の変化は観察されなかったが、A549 細胞では無刺激では発現は認められないものの、ニコチン曝露により濃度依存的に発現誘導が認められた。

切除されたヒト肺がん組織における、これら nAChR- $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 蛋白発現を免疫組織化学法で検討すると、複数例の細気管支肺胞上皮がんの細胞核および細胞質に $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 蛋白両者の発現が確認された (図-1)。

以上から、肺組織では特異的な nAChR subtype ($\alpha 5$ 、 $\alpha 7$) を介して、ニコチンによる遺伝子発現調節、あるいは神経伝達作用が行使され、かつニコチン自体によりこれらの nAChR- $\alpha 5$ 、 $\alpha 7$ 発現が直接制御されているものと考えられる。

肺がん細胞の増殖シグナルとニコチンの作用

気道上皮細胞で発現・産生され、肺の発達や傷害修復、肺細胞の分化、増殖、さらにはがん化に関与する gastrin-releasing peptide (GRP)²⁾、およびその受容体 GRP receptor (GRPR)³⁾ が喫煙、とくにニコチンによりどのような制御を受けるか、大変興味深い。GRP の前駆体である proGRP は小細胞肺がんの鋭敏な腫瘍マーカーとして臨床で用いられているが⁴⁾、小細胞がん腫瘍細胞内ではきわめて複雑な mRNA 発現と splicing 調節を受けている⁵⁾。

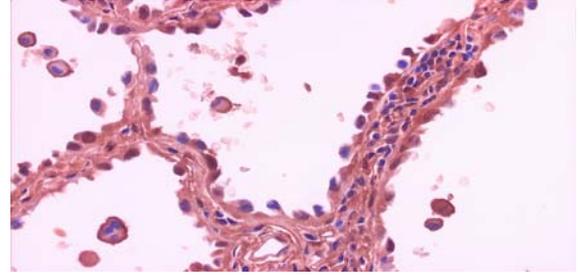
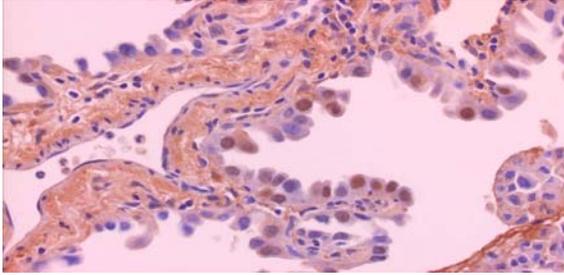
まず、肺扁平上皮がん細胞 HS-24、肺胞上皮がん細胞 A549、小細胞がん細胞 H128 を用いて、定常状態で増殖中の細胞に対して異なった濃度のニコチン (100 nM、10 μ M、1 mM) を培養上清中に加え、24 時間培養後に RNA を抽出し、oligo (dT) primer を用いた逆転写 (RT) と、PCR 増幅による mRNA 定量実験を行った。H128 細胞において、ニコチン 1 mM の 24 時間曝露に

* 冲中記念成人病研究所・国家公務員共済組合連合会虎の門病院

73 yrs F, smoker

65 yrs F, non-smoker

AChR- α 5



AChR- α 7

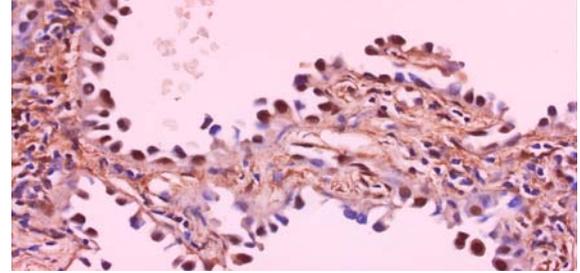
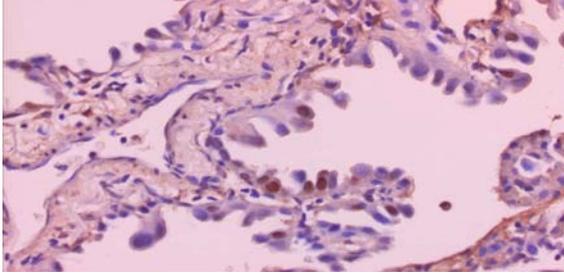


図-1 細気管支肺胞上皮がん組織における nAChR- α 5、 α 7 発現

より、*proGRP*、*GRPR* 両遺伝子の発現の増強が認められた。一方、GRP を発現しない非小細胞肺癌 HS-24 および A549 細胞においても、その受容体である *GRPR* 遺伝子の発現がニコチンの濃度依存的に増強した。

肺小細胞がんにおいて、*proGRP*-*GRPR* 系が autocrine 増殖機構に関与していることが古くから注目されているが⁶⁾、長期間喫煙者の気道上皮細胞において *GRPR* 遺伝子の発現が増強し、通常の気道内の神経内分泌細胞から産生される正常レベルの GRP によっても、これら気道上皮細胞の *GRPR* の発現亢進を受けて、悪性形質の獲得後の異常増殖が起こり得ることが推測される。たばこ煙に含まれるニコチンがこの作用に強く関わっていることが示唆され、ニコチン自身の腫瘍プロモーターとしての作用や、*GRP*-*GRPR* 系を介した細胞の分化と増殖への能動的関与が在るものと考えられる。

次いで、このニコチンによる *proGRP* 遺伝子発現増強作用機序が、同遺伝子の 5' 上流領域の塩基 -1, 128 から -793 までの小細胞肺癌特異的エンハンサーによることを確認した⁷⁾。さらに、このニコチンにより転写活性が亢進する *proGRP* 遺伝子のプロモーターと、*Cre/LoxP* による発現制御系を利用して、*proGRP* を特異的に発

現するヒトの肺小細胞がん細胞への治療遺伝子の特異的かつ高度な導入発現が可能であるか否かを検討した。まず、転写開始塩基を起点として、-1, 201 から +106 までの DNA 断片を大腸菌由来の *Cre* 発現プラスミド pBS185 の *MuII-XhoI* 認識部位に組込み *proGRP* プロモーターで駆動される *Cre* 発現プラスミドベクター pGRP-*Cre* を作成したのち、アデノウイルスベクター AdGRP-*Cre* を作成した。一方、CAG プロモーターの下流に *loxP* 配列に挟まれた stuffer 領域と *Bax- α* 遺伝子を持つ標的 Ad ベクター (AxCALNLh*Bax- α*) を用いて、アポトーシス誘導効果を *in vitro*、*in vivo* で検討した。対照として CAG プロモーターで *Cre* を発現する Ad ベクター (AxCAN*Cre*) と CAG プロモーターで *lacZ* 遺伝子を発現させる AxCAN*lacZ* を用いた。これらの実験の結果、*proGRP* 遺伝子 5' 上流域の小細胞肺癌特異的なプロモーターの使用と Ad ベクターの二重感染法により、小細胞肺癌に特異的な *Bax- α* mRNA および BAX- α 蛋白の発現が誘導され、さらに *in vitro* において小細胞肺癌細胞のアポトーシス誘導と殺細胞効果が得られたのみならず、マウスを用いた *in vivo* 実験においても、皮下に植え付けた小細胞肺癌腫瘍のみで、AdGRP-*Cre* と AxCALNLh*Bax- α* の二

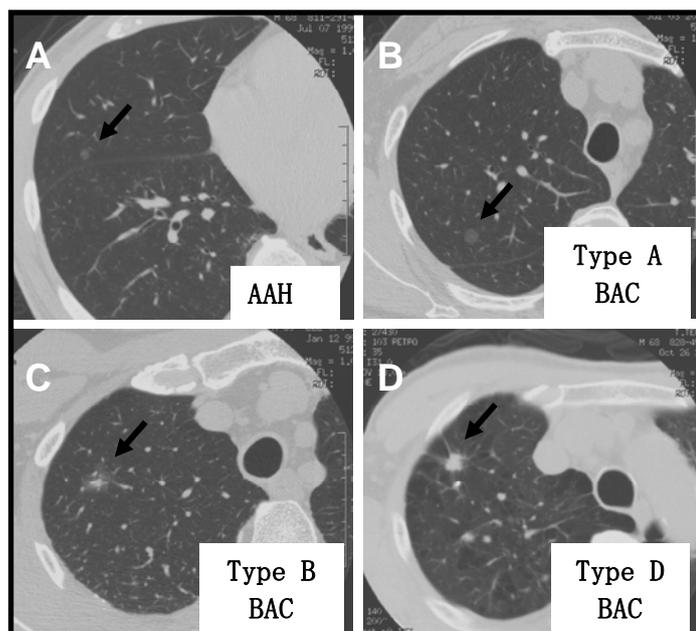


図-2 長径 10 mm 以下の微小腫瘍 (AAH および BAC) の高解像度 CT スキャン所見

重感染による特異的腫瘍増殖抑制が観察された⁷⁾。

このように小細胞がん組織特異的な *proGRP* 遺伝子プロモーターを用いた *Cre/LoxP* システムにより、細胞特異的かつ高レベルな治療遺伝子の導入と発現が可能であり、さらにニコチンの体外からの事後投与により、治療効果の増強が得られる可能性が示唆された⁷⁾。

微小肺がんの画像所見と病理形態像

肺がんの発症に関して男性では 90%、女性では 80% が習慣性喫煙に起因するといわれているが、非喫煙者にしばしば見られる前がん病態の異型性腺腫様過形成 (AAH) や、細気管支肺胞上皮がん (BAC) の発症機序については依然不明である。1997 年から 2001 年までの期間に、虎の門病院呼吸器センターにて胸腔鏡下手術 (VATS) ないし開胸術にて腫瘍を切除された 38 名の肺がん患者より摘出された、長径 10 mm 以下の計 44 腫瘍性病変に関して、臨床的特徴、放射線学的所見と、病理組織学的所見を検討した⁸⁾。まず、小結節性のスリガラス濃度 (GGO) を呈する腫瘍は腺がんが 32 病変 (73%) で最も多く、野口分類 type A、B の BAC

がそれぞれ 12、13 病変を占めた (図-2)。AAH がそれらに次いで多く 8 病変を、扁平上皮がんが 4 病変を占めた。さらに対象 38 例中 3 例は多発病変を有し、4 重がん 1 例、重複がん + AAH 1 例、肺がん + AAH 1 例であった。また、内部高濃度領域の割合と組織型にはある程度の相関が認められた。すなわち、小結節性 GGO 病変では AAH ないし type A、B の BAC が最も頻度が高く、発症には喫煙やニコチンは必ずしも関与していないため、その発がん機序に関してはさらなる解析を要するものと考えられる⁸⁾。

慢性気道炎症とニコチンの関与

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は、欧米人に好発する常染色体劣性遺伝性疾患、嚢胞性線維症 cystic fibrosis (CF) の責任分子であり、cAMP で制御される塩素 Cl^- イオンチャネルなど複数の機能を有する細胞膜貫通型蛋白である⁹⁾。CF ではほぼ全例で緑膿菌などによる慢性気道感染症を合併し、CFTR 自体が気道炎症の制御蛋白の側面をもつが、ニコチンがこの CFTR にいかなる影響を及ぼすかきわめて興味ある問題である。

まず、*CFTR* 遺伝子を定常的に発現する HS-24 細胞を用いて、ニコチンの *CFTR* 遺伝子 mRNA 発現に対する作用と、エクソン 9 の inframe alternative splicing に与える影響を検討した。無刺激状況の HS-24 細胞では、ニコチンにより濃度依存的に *CFTR* 遺伝子 mRNA 発現が up-regulate され、10 μ M では刺激前に対して 2.3 倍の発現量を示した。一方、HS-24 細胞におけるエクソン 9+ mRNA/9- mRNA 比は 75%/25% であったが、ニコチン添加によってもこの比に有意な変化は見られなかった。このように、ニコチンが *CFTR* 遺伝子 mRNA 発現を増強する作用がある事実は、気道分泌や慢性気道炎症の病態を考える上で、きわめて重要な観察結果であると考えられる。

次いで、*CFTR* 遺伝子の病的変異の状況をわが国の CF 症例において解析した。PCR-SSCP 解析と直接塩基配列解析を用いた遺伝子変異の検出系を構築して、約 20 症例での *CFTR* 遺伝子全域を検討した。その結果、元来わが国にはほとんど存在しないとされた CF 患者の *CFTR* 遺伝子変異が明らかにされた¹⁰⁾¹¹⁾。これまでの解析結果からは、日本人 CF 患者における *CFTR* 遺伝子変異は欧米人のそれと明らかに様相を異にしており、欧米に多い Δ F508 変異は見られず、またほとんどがこれまで報告のない稀な変異か、新たに見いだされたものであった。今後、日本独自の *CFTR* 遺伝子変異スクリーニング体制を確立する必要があるものと考えられる。さらに、喫煙と *CFTR* 発現および気道病態形成との相関もさらに検討されなければならないであろう。

文 献

- 1) Sekhon HS, Jia Y, Raab R et al. Prenatal nicotine increases pulmonary α 7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 1999; 103: 637-47.
- 2) Spindel ER. Roles of bombesin-like peptides in lung development and lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 407-8.
- 3) Carney DN, Cuttitta F, Moody TW et al. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res* 1987; 47: 821-5.
- 4) Miyake Y, Kodama T, Yamaguchi K. Pro-gastrin-releasing peptide(31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 2136-40.
- 5) Uchida K, Kojima A, Morokawa N et al. Expression of progastrin-releasing peptide and gastrin-releasing peptide receptor mRNA transcripts in tumor cells of patients with small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 633-40.
- 6) Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985; 316: 823-6.
- 7) Morokawa N, Kojima A, Aoki K et al. Adenovirus-mediated specific expression of the *Bax* gene using the *Cre/loxP* system to induce apoptosis in small cell lung cancer cells. *Jikei Med J* 2004; 51: 77-89.
- 8) Kishi K, Homma S, Kurosaki A et al. Small lung tumors with the size of one centimeter or less in diameter: clinical, radiological and histopathological characteristics. *Lung Cancer* 2004; 44: 43-51.
- 9) Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly et al., Eds, McGraw-Hill, New York, pp5121-88, 2000.
- 10) Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S et al. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the *CFTR* gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet* 1999; 56: 173-5.
- 11) Morokawa N, Iizuka S, Tanano A et al. Severe cystic fibrosis in a Japanese girl caused by two novel *CFTR* (ABCC7) gene mutations: M152R and 1540del10. *Hum Mutat* 2000 ((On line, May); 15: 485.