

喫煙と消化器がん

川野 淳*、塚原 祐子*

はじめに

日本において、悪性新生物による死亡者は男女ともに増加している。1981 年以降死因の第一位となり全死亡者数の約 30% をしめ、その数は 30 万人に達し、今後もさらに増加する傾向にある。近年、アスピリンなどの非ステロイド系消炎鎮痛剤 non-steroid-anti-inflammatory drugs (NSAIDs) の長期服用者では大腸がんによる死亡率が 40~50% 有意に低下することが報告されている¹⁾。このことは NSAIDs の標的酵素である cyclooxygenase (COX) の阻害によると考えられている。COX は prostaglandin (PG) 合成に関与する酵素であるが多くの組織で恒常的に発現している COX-1 と成長因子や炎症性サイトカイン等で発現が誘導される COX-2 が存在する。多くのがん組織では COX-2 が高発現していることが報告されており胃・大腸がんなどの消化器がんにおいても同様の報告が多い。COX-2 高発現により血管新生因子、たとえば vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生増加、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制、腫瘍細胞の浸潤性の亢進等が報告され、これらの因子があいまって腫瘍の発育・進展に COX-2 発現が大きく関わっていることが知られてきた(図-1)。したがって COX-2 発現機序の解明は COX-2 発現抑制を介する抗腫瘍治療にも極めて重要な事項となる。

一方、喫煙者では非喫煙者に比して悪性新生物の発生頻度が高いことが報告されている。胃がん、大腸がんにおいても喫煙者ではそのリスクは 2.5~3.0 倍高くなり、喫煙がその発症・進

展に関与している可能性が高い。本稿ではたばこ水抽出液及びたばこに含まれる物質のうちニコチン、ベンツピレン、コチニンの COX-2 の誘導について検討するとともに COX-2 プロモーター領域への影響をあわせて検討した結果をまとめて報告する。

材料と方法

培養細胞はラット小腸上皮細胞由来の培養細胞株 rat intestinal epithelial cells (RIE cells) と、RIE cells に *v-H-ras* 遺伝子を導入し、がん化した RIE-ras 培養細胞を用いた。培養液は 10% FBS、100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin sulfate、0.25 µg/ml amphotericin B を添加した D-MEN (low glucose) を用い、37 °C、5% CO₂ 濃度にて細胞を培養した。starvation には FBS 無添加の D-MEN (low glucose) を用いた。

たばこ水抽出液はたばこ (Mild Seven) 1 本を 10% FBS、100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin sulfate、0.25 µg/ml amphotericin B を添加した D-MEN (low glucose) 15 ml に激しく攪拌後 24 時間浸した後、フィルターで濾過した液を原液として用いた。

ニコチン、コチニン、ベンツピレンは D-MEN に溶解し使用した。

1) たばこ水抽出液の RIE 及び RIE-ras 細胞における COX-2 発現、PGE₂、VEGF 産生に対する影響

RIE および RIE-ras 細胞を 6-well plate で前述の培養液 (D-MEN) を用いて培養し、confluent 状態になったのを確認後、FBS 無添加の培養液に交換し、48 時間 starvation を行った。その

* 大阪大学大学院保健学専攻機能診断科学

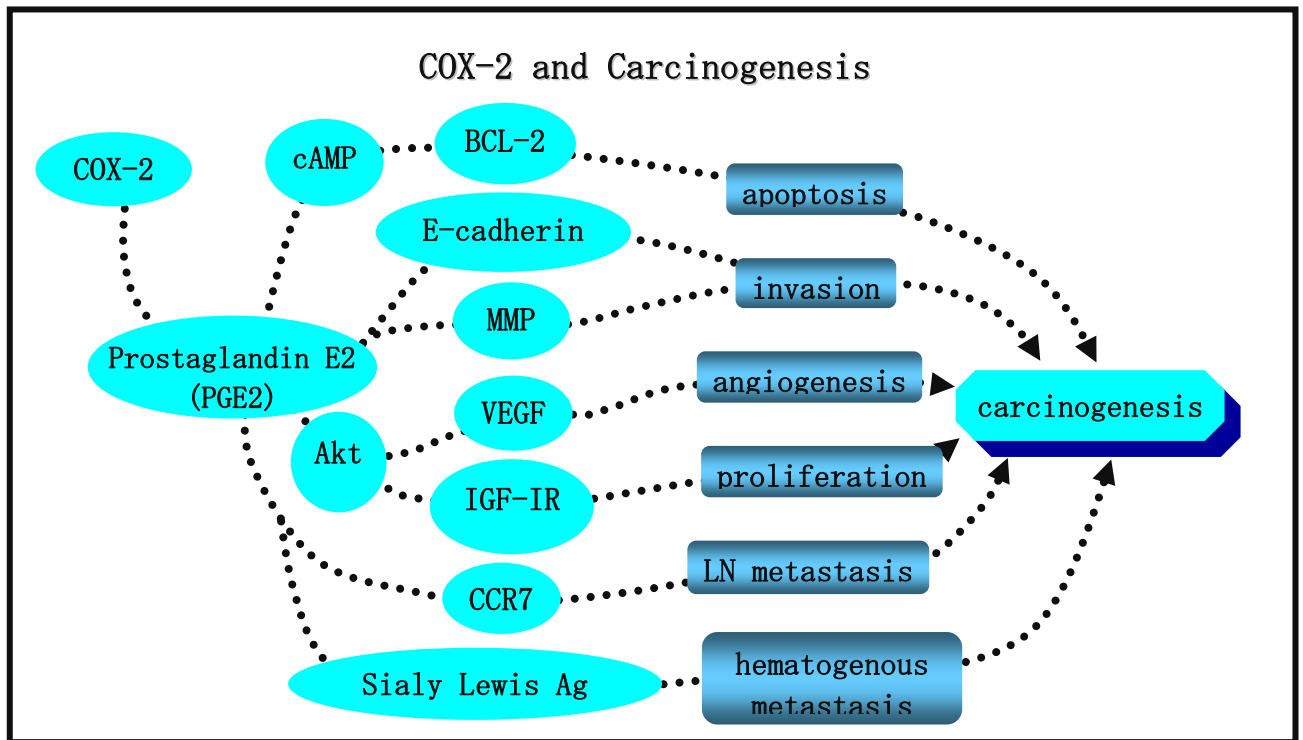


図-1 多くの消化器がん（食道がんを含む）では cyclooxygenase-2 (COX-2) の過剰発現が報告されている

後、たばこ水抽出液原液、10倍希釈液、100倍希釈液、1000倍希釈液の各濃度のたばこ水抽出液を添加し、それぞれを0、6、12、24時間、37℃、5% CO₂濃度下で培養した。培養上清を回収し、PGE2およびVEGF濃度を測定した。また上清回収後の培養細胞はRIPA buffer (PBS、1% NonidetP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、10 mg/ml PMSF in isopropanol add at 10 μl/ml、aprotinin add at 30 μl/ml)を1 wellあたり150 μl添加し、スクレイパーにて細胞を剥離し、30分間氷上にてincubateし細胞を融解させた後、15000 rpm、4℃、20分間遠心後、上清を回収し、これをサンプルとして、western blotting analysisを行った。

① PGE2測定

PGE2 EIA kit (Cayman Chemical Company, USA)を使用した。7.8 pg/mlから1000 pg/mlの各濃度に調整したPGE2スタンダードと100倍希釈および1000倍希釈したサンプルを各々96-well plateに50 μlずつ注入した。次に各wellにPGE2 acetylcholinesterase tracerを50 μl、PGE2 monoclonal antibodyを加え、4℃で18

時間incubateした後、wash bufferにて5回洗浄後、Ellman's reagentを各wellに200 μlずつ加え、室温で60分間incubateした。その後Microplate reader (BIO Rad, USA)を用いて420 nmの吸光度を測定した。

② VEGF測定

VEGF immunoassay kit (R&D System Inc, USA)を使用した。96-well plateの各wellに50 μl assay diluentを加え、7.8 pg/mlから500 ng/mlの各濃度に調整したVEGFスタンダードとサンプルを各々50 μlずつ加え、室温で2時間incubateした。洗浄bufferで5回洗浄後、各wellにsubstrate solutionを100 μl注入し、遮光下、室温で30分間incubateした。反応停止液を100 μl加え反応停止後、microplate readerを用いて570 nmの吸光度を測定した。

③ Western blotting analysis

回収したサンプルに5×sample buffer (12% SDS、60% グリセロール、300 mM Tris-HCl pH 6.8、6% 2ME、0.6% bromophenol blue)を融解し、100℃、7分間加熱し、S-S結合を切断した。10% SDS-ポリアクリルアミドを電気泳動槽にセット

し、分子量マーカー (Prestained SDS-PAGE standard, broad range) を 5 μ l、サンプル 35 μ l を各 well に注入し、100 V、2 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを切り出し、ブロット装置にて 75 mA で 1 時間通電し、PVDF 膜に transfer した。transfer 終了後、membrane を 5% スキムミルクを加えた TBST 液に浸し、1 時間ブロッキングを行った。5 分間 \times 6 回洗浄を行った後、一次抗体 (Santa Cruz Biotechnol Inc, USA) を含む 5% スキムミルク液と membrane を一夜反応させた。membrane を TBST 液で 5 分間 6 回洗浄後、二次抗体の HRP 標識 rabbit anti-goat immunogloblins (DACO, Denmark) を 45 分間反応させた。そして membrane を super signal (Poece, USA) に 5 分間浸した後各時間曝露し蛋白を検出した。

2) たばこ水抽出液の COX-2 発現に関する転写調節部位に対する影響

実験 1) と同様に RIE-ras 細胞を培養し、細胞が sub-confluent に達した状態で図-1 に示す 4 種類の COX-2 プロモーター領域を含む reporter gene と control expression vector (ピッカジーンデュアルシーパンジー、東洋インキ) とともにリポフェクション法にて co-transfection を行った。24 時間 starvation した後、100 倍希釈たばこ水抽出液を添加した D-MEN 培養液で 24 時間培養した。細胞を溶解しスクレイパーで剥離後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C、2 分間遠心し、上清を回収した。そしてホタルルシフェラーゼ活性、シーパンジールシフェラーゼ活性を測定した。

① リポフェクション法による co-transfection 実験

24-well plate にて sub-confluent に達した状態の RIE-ras 細胞を使用した。15 ml チューブに 1 well あたり DNA 2 μ g、OPTI-MEN (GIBCO BRL, USA) 200 μ l、pRL-TK 40 μ l、lipofectamin 8 μ l を混和し室温にて 30 分間放置した。30 分後に 1 well あたり 1 ml/well を加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 3 時間 incubate した。その後、20% FBS

および抗生物質を添加した D-MEN を 1 ml 添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 24 時間 incubate した。

② ルシフェラーゼ活性測定

ピッカジーンデュアルシーパンジー測定キット (PG-DUAL-SP、東洋インキ) を使用した。1 assay につきサンプル 10 μ l、ピッカジーンおよびシーパンジーの各発光試薬を 100 μ l ずつ準備した。サンプルを 1.5 ml チューブに注入し、ルミノメータにてホタルおよびシーパンジールシフェラーゼ活性を測定し、比活性 (ホタル/シーパンジールシフェラーゼ活性) を算出した。

3) ニコチン、コチニン、ベンツピレンの COX-2 発現、PGE2、VEGF 産生に及ぼす影響

RIE-ras 細胞を 24-well plate で 10% FBS および抗生物質を添加し、D-MEN を用いて培養し、confluent 状態で 48 時間 starvation 後、ニコチン (0.5、1 μ g/ml)、コチニン (0.5、1 μ g/ml)、ベンツピレン (1、5 μ M) をそれぞれ添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。培養上清を回収し PGE2、VEGF を測定した。また上清回収後の培養細胞は実験 1) と同様に、RIPA buffer を用いて融解し、15000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20 分間遠心後上清を回収し western blotting analysis を行った。

4) ニコチン、コチニン、ベンツピレンの COX-2 発現に関する転写領域の解析

実験 2) と同様に RIE-ras 細胞を培養し、細胞が sub-confluent 状態に達した後、4 種の COX-2 プロモーター領域を含む reporter gene と control expression vector をともにリポフェクション法にて 3 時間遺伝子導入を行った。24 時間 starvation 後、ニコチン、コチニン、ベンツピレンを添加した D-MEN 培養液で 3 時間培養し、その後細胞を融解し、スクレイパーで剥離後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C、2 分間遠心し上清を回収しホタル、シーパンジールシフェラーゼ活性を測定した。

結 果

1) たばこ水抽出液の RIE 及び RIE-ras 細胞における COX-2 発現、PGE2、VEGF 産生に対する影響

Western blotting analysis の結果、RIE-ras 細胞ではたばこ水抽出液を添加しなかったものに比して、たばこ水抽出液の 100 倍希釈液で明らかな COX-2 発現の誘導が見られた。そのピークは 6 時間であり COX-2 発現増加は 24 時間持続した。たばこ水抽出液添加後、経時的に PGE2、VEGF 産生は増加し、その増加はたばこ水抽出液の濃度依存性であった。またたばこ水抽出液 (10 倍、100 倍、1000 倍希釈液) 添加 24 時間後では PGE2、VEGF 産生量はたばこ水抽出液無添加に比して有意の増加が見られた。一方、RIE 細胞では 100 倍希釈たばこ水抽出液を添加しても COX-2 発現は見られず、また PGE2 産生量も有意差は認められなかった。

2) たばこ水抽出液の COX-2 発現に関与する転写調節部位に対する影響

COX-2 プロモーター領域に存在する NF- κ B、NF-IL6、CRE を含む vector を control vector とし、NF- κ B、NF-IL6、CRE の各々に mutation を含む vector を用い、4 種の vector を遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を比較検討した結果、たばこ水抽出液 (100 倍希釈) 添加において control では有意にプロモーター活性の増加を示した。Mutation を含んだ 3 種の vectors 導入細胞ではルシフェラーゼ活性は有意に低下し、たばこ水抽出液無添加のものに比して有意差は見られなくなった。

3) ニコチン、コチニン、ベンツピレンの COX-2 発現、PGE2、VEGF 産生に及ぼす影響

Control に比して、ニコチン (0.5、1 μ g/ml) またはベンツピレン (1、5 μ M) 添加では COX-2 発現は増加し、PGE2、VEGF 産生量も有意に増加した。一方、コチニン添加では COX-2 発現、PGE2、VEGF 産生には差は見られなかった。

4) ニコチン、コチニン、ベンツピレンの COX-2 発現に関与する転写領域の解析

Control ではニコチン (0.5 μ g/ml) 刺激により、刺激しないものに比して有意のプロモーター活性の増加を示したが、NF- κ B、CRE に mutation を挿入したものではニコチン刺激による変化は見られず、ニコチンがこの両方の転写調節部位を介して COX-2 発現に関与していると考えられた。

一方、ベンツピレン (1 μ M) 刺激では control では有意にルシフェラーゼ活性の増加を認めたが、NF- κ B、NF-IL6、CRE に mutation を含むものでは明らかな活性の増加は見られずベンツピレンは 3 種の転写調節領域を介して COX-2 発現に関与していると考えられた。

コチニンでは有意な活性上昇は見られなかった。

考 察

多くの悪性新生物において、喫煙者では非喫煙者に比し、その発生頻度が高いことが報告されている。喫煙者に扁平上皮がんの発生率が有意に高いことは広く知られているが、胃がん、大腸がんなどの消化管がんにおいてもその傾向は同様である。疫学的検討により胃がんにおいては喫煙者ではそのリスクは 1.5 倍~3 倍²⁾³⁾ に上昇することが報告されている。また胃がん、大腸がんの約 15% において喫煙がその発症に関係している可能性が示唆されている⁴⁾。

一方、慢性関節リウマチや心血管系血栓治療薬としてアスピリンなどの NSAIDs の長期服用者では、大腸がんによる死亡率が 40~50% 低値をしめすこと¹⁾、また NSAIDs に属するスリダク²⁾の服用により家族性大腸腺腫症の患者のポリープの数、大きさが著明に減少することが報告されている⁵⁾。また、大腸がんの動物実験では NSAIDs 投与は有意に大腸腫瘍の発生を抑制し、大腸がん発生に予防的に働き、chemoprevention の可能性を示している⁶⁾。

NSAIDs は COX の活性を抑制し PG 合成を抑制することにより抗炎症作用を示す。多くの悪性

腫瘍では COX-2 の過剰発現が観察され PGE2 産生も亢進していることが明らかになっている⁷⁾⁸⁾。胃がん⁹⁾、大腸がん患者¹⁰⁾ では正常大腸粘膜に比してがん組織での COX-2 mRNA の増加と PGE2 産生の亢進が報告されている。我々は COX-2 過剰発現により PGE2 の産生増加が VEGF の産生増加とそれに伴う血管新生、がん細胞の apoptosis 抑制、浸潤性の亢進などを報告した¹¹⁾。これらの作用は COX-2 過剰発現が腫瘍の発育、進展に密接に関与していることを示している。

一方、たばこそのものや喫煙による COX-2 発現に対する影響は明らかでない。そこで、本研究ではたばこ水抽出物の COX-2 発現に対する影響を検討した。その結果、たばこ水抽出物は COX-2 発現を亢進し、PGE2、VEGF 産生も亢進した。またたばこに含まれるものの中でもニコチン、ベンツピレンはこの作用を有しており、コチニンはこの作用を有していないことが明らかとなった。さらに、COX-2 プロモーター領域に対する影響を検討した結果、たばこ水抽出液では今回検討した 3 つの転写活性調節領域を介して COX-2 発現に関与していることが明らかとなった。これはたばこ水抽出液に多くの物質が含まれている為にすべての転写活性調節領域に影響が出たものと考えられる。そこで、ニコチン、ベンツピレンを用いて同様の検討を加えた結果、ニコチンは主に NF- κ B を介して、ベンツピレンは 3 種の転写活性領域を介して、COX-2 発現に関わっていることが明らかになった。

たばこに含まれる物質は 500~4000 種類あるいはそれ以上と報告されている。本実験ではたばこ水抽出物を用いたが、現在、たばこ煙水抽出物を用いた実験も行っているがほぼ同様の結果を得ている。さらに、たばこの種類による差も検討中である。

たばこに含まれる物質による COX-2 発現誘導が実験的に明らかになったが、まだ、人における喫煙前後での成績や、喫煙者と非喫煙者での消化管粘膜細胞における COX-2 の発現に違いが

あるのか、また、正常粘膜とがん組織での違いがあるのかどうか等は不明の点が残されており、さらに詳細な検討が必要であろう。さらに、喫煙による COX-2 誘導の抑制が NSAIDs 等の薬剤投与により可能であれば喫煙による発がんの抑制につながる可能性が残されており今後の検討課題と考えている。

文 献

- 1) Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333: 609-14.
- 2) Tredaniel J et al. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 1997; 72: 565-73.
- 3) Potter JD, Bigler J et al. Colorectal adenomatous and hyperplastic polyps: smoking and N-acetyltransferase 2 polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 69-75.
- 4) Giovannucci E, Martinez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1717-30.
- 5) Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1313-6.
- 6) Reddy BS, Rao CV, Rivenson A et al. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1493-7.
- 7) Oka M, Inaba A, Uchiyama T et al. Prostaglandin E2 levels and lymphocyte subsets in portal venous drainage of colorectal cancers. *Am J Surg* 1994; 167: 264-7.
- 8) Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994; 35: 675-8.
- 9) Murata H, Kawano S, Tsuji S et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 451-5.
- 10) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-8.
- 11) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16.