

たばこ煙中に含まれる血管壁構成細胞傷害因子の同定及び その性状解析の試み

三輪 聡一*、朝野 拓史*、堀之内 孝広*、西屋 禎*

緒 言

喫煙は、動脈硬化症をはじめとする様々な心血管系疾患の危険因子であることが、疫学的研究により明らかになっている。たばこの煙には、およそ 4,000 種の化学物質が含まれており、そのうち、約 200 種類は、健康に悪影響を及ぼす可能性が高い成分であるといわれている。たばこ煙に含まれる代表的な有害物質であるニコチンは、直接的または間接的に血管内皮細胞や平滑筋細胞に作用することにより、動脈硬化症の発症リスクを高めると考えられている。しかしながら、血管平滑筋細胞に対するニコチンの細胞増殖促進作用は、極めて弱いことから¹⁾²⁾、ニコチン以外にも、動脈硬化形成を促進させる成分がたばこ煙中に含まれていると推測されている。

近年、たばこ煙中に低比重リポ蛋白 (LDL) を酸化する水溶性物質が存在し、この酸化性物質が喫煙による動脈硬化形成に深く関与していることが明らかになりつつある³⁾。実際に、ニコチン・タール除去たばこ煙抽出液 cigarette smoke extract (CSE) をウサギの静脈内へ反復投与することによって、血中 LDL が酸化され、その結果、動脈硬化が促進されることが確認されている⁴⁾。これらの事実は、喫煙者において、抗酸化作用を有するビタミン E 及びビタミン C の血中濃度が減少している一方、血中過酸化脂質濃度が上昇していることとよく一致している⁵⁾。また、最近では、CSE 中に、強力な酸化力を有する peroxynitrate 様物質が存在しているこ

とも示唆されている⁶⁾。しかしながら、CSE 中に含まれる酸化性物質は完全に同定されておらず、また、動脈硬化形成に関与する CSE 中の細胞傷害因子ならびにその傷害機序の詳細は未だに不明な点が多い。

そこで、本研究では、血管壁構成細胞である血管内皮細胞及び平滑筋細胞を傷害する CSE 中の有害物質を同定し、その細胞傷害機序を解明することを目的とした。そして、喫煙と動脈硬化症との関係を科学的に究明することにより、喫煙の危険性を正確に把握するだけでなく、喫煙による動脈硬化症の発症を低減できる新たな予防戦略を提唱することを目指す。

研究計画の概要

図-1 に研究計画の概要をまとめた。まず、定法に従って調製した CSE を用いて、細胞に対する CSE の各種作用を評価できる試験方法を確立する。後述するが、調製した CSE は、ロット間で生物学的活性が異なるため、CSE の作用を定量的に解析する上で、一定の活性を示す CSE を再調製する必要がある。即ち、CSE 処理により細胞から漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH) 量の測定及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた成分の定量分析を行い、ロット間の補正を行う。なお、この補正を「CSE の標準化」とよぶことにする。CSE の標準化により、一定の生物学的活性を示す CSE が得られるので、CSE の作用を定量的に解析することが可能になる。また、HPLC により、細胞傷害活性を示す分画を分取し、細胞傷害因子を同定する。そして、HPLC を用いて分取した分画を、ヒトの血管内皮細胞

* 北海道大学大学院医学研究科細胞薬理学分野

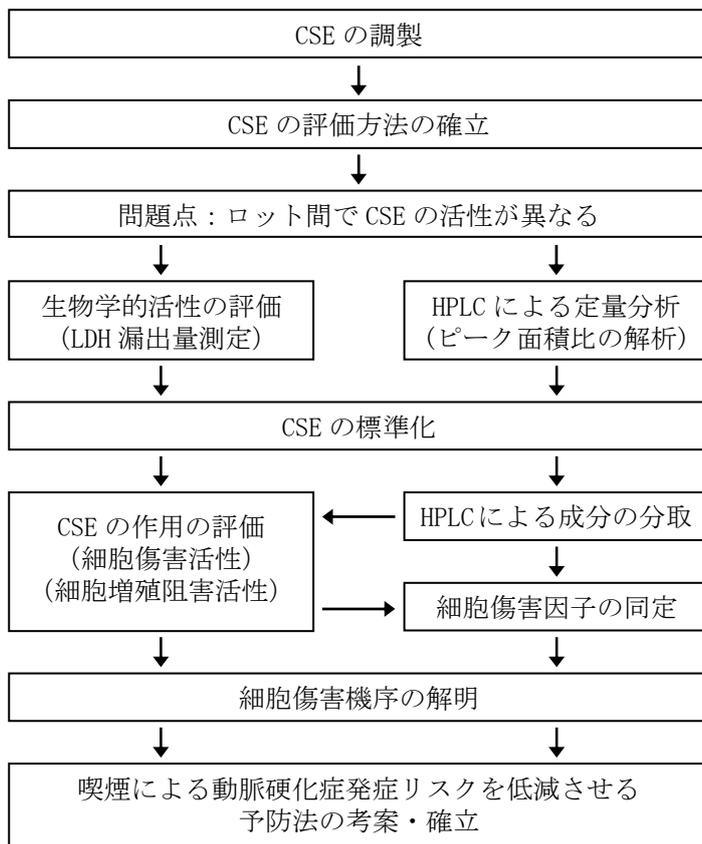


図-1 研究計画の概要

及び平滑筋細胞に適用し、CSEによる細胞傷害機序の解明を行う。さらに、CSEの細胞傷害作用を抑制する薬物等を網羅的に探索し、喫煙による動脈硬化症発症リスクを低減させる予防法を考案、確立する。

CSEの評価方法

CSEの生物学的活性作用を評価する方法として、以下の試験方法を確立した。

- 1) CSEの細胞膜傷害活性の評価
 - DNA結合性蛍光プローブ (7-amino actinomycin D: 7-AAD)の蛍光強度測定実験
 - LDHの細胞外漏出量測定実験
- 2) CSEの細胞増殖活性の評価
 - ブロモデオキシウリジン (BrdU)の取込量測定実験
- 3) CSEの細胞増殖促進作用もしくは細胞毒性作用の評価
 - 生細胞数の測定実験 (MTS assay)

4) CSEの細胞形態に及ぼす影響の評価

- 位相差顕微鏡による細胞形態変化の観察

なお、上述の評価方法のうち、「LDHの細胞外漏出量測定実験」及び「生細胞数の測定実験 (MTS assay)」は、迅速、簡便かつ安価な測定方法であり、また、結果の定量性も非常に優れているので、本研究では、この2つの試験方法を主に用いて、CSEの作用を評価することにした。

CSEの標準化

一定の生物学的活性作用を有するCSEを調製することは非常に困難であり、通常、CSEの効力はロット間で大きく異なる。図-2は、異なる日に調製したCSEの効力を比較した結果を示している。LDH漏出量を指標とした場合、ロット1 (○)の方がロット2 (△)より、活性が1.8倍強いことがわかる。そこで、両者の活性作用を同一にするため、ロット1を1.8倍希釈して、同様の検討を行った。その結果、ロット1の1.8倍希釈溶液 (●)とロット2 (△)の活性作用はほぼ一致した。また、HPLCを用いて、これら2ロットの定量分析を行ったところ、主要なピーク面積の比はおよそ2倍であった (データは示さない)。このことから、CSE活性作用のロット間の違いは、CSEに含まれる成分濃度の違いによるものと考えられた。

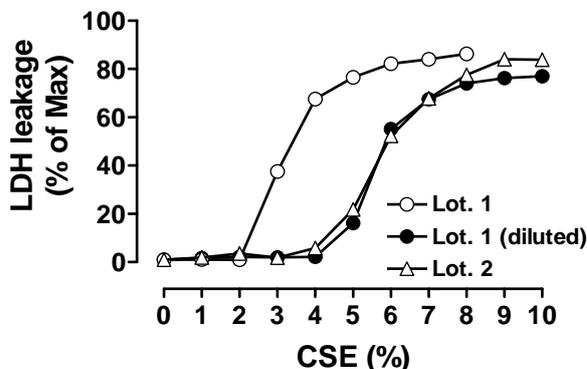


図-2 C6細胞におけるLDH漏出量を指標としたCSEの濃度反応曲線及びCSEのロット間における活性作用の違い

本研究では、このようなロット間の効力差を補正するため、CSE の標準化が必要不可欠と考え、次のような定義を考案した。

CSE 標準溶液の定義: 最大 LDH 漏出量の 1/2 の LDH を漏出させるのに必要な CSE の用量が 4% となるような細胞傷害活性を示す溶液を調製し、これを CSE 標準溶液とする。

今後、本定義の妥当性を多角的に検証する必要がある。

CSE に対する細胞の感受性の解析

CSE の作用の全体像を把握するため、体系的に LDH の細胞外漏出量測定実験を行った。

まず、各種培養細胞における CSE に対する感受性を比較したところ、C6 細胞は HEK293 細胞よりも CSE に対する感受性が高いことが明らかになった (図-3A)。一方、データは示さないが、CHO 細胞、RAW 細胞においては、CSE (~10%) による LDH の漏出は、ほとんど認められなかった。このことから、CSE に対する感受性は、細胞の種類によって、大きく異なることが明らかになった。

次に、CSE に対する感受性が高い C6 細胞を用い、細胞密度と CSE に対する感受性との関係について、検討を行った。96 ウェルプレートに、5,000~40,000 個/100 μl /well の細胞を播種し、CSE 4 時間処理による LDH の漏出量を測定した。

その結果、細胞密度が高くなると、CSE に対する感受性が低下することが明らかになった (図-3B)。

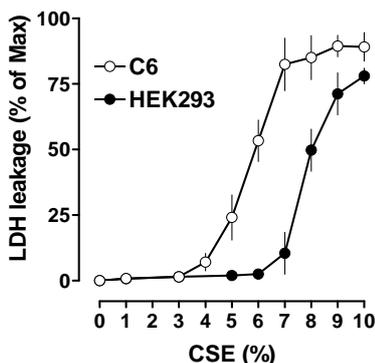
また、図-3C に示したように、細胞の CSE に対する感受性は、細胞密度だけではなく、培養に使用する液体培地の種類によっても、変化した。C6 細胞 (10,000 個/100 μl /well) を F12 で前培養した場合、1.5% CSE 処理により、顕著な LDH の細胞外漏出が認められた。一方、DMEM を用いた場合、3% CSE 処理によっても、LDH の細胞外漏出は観察されなかった。これらの知見は、F12 に CSE の細胞毒性を高める成分、もしくは、DMEM に CSE の細胞毒性を弱める成分が存在していることを示唆しており、CSE による細胞傷害発生メカニズムの解明ならびに CSE の細胞傷害作用に対する細胞保護法の確立の端緒になりうる可能性が十分に考えられる。

上述した LDH 細胞外漏出量測定実験の妥当性を検証するため、細胞数を指標とした MTS 法においても、同様の結果が得られるかどうか検討した。

C6 細胞を F12 で前培養した場合、5,000~20,000 個/100 μl /well の細胞密度では、CSE 24 時間処理により、濃度依存的な細胞数の減少が観察された (図-4A)。しかしながら、細胞密度を 30,000~50,000 個/100 μl /well へと増加させると、CSE による細胞数の減少は認められな

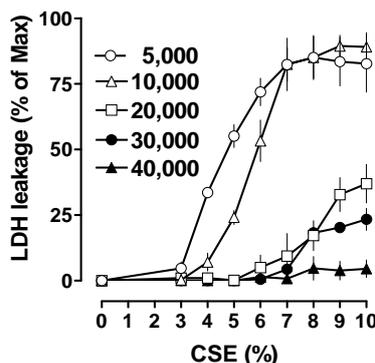
A CSE 感受性の比較

10⁴ cells/100 μl /well
CSE 4 時間処理



B 細胞密度の影響

C6 (0.5-4 x 10⁴ cells/100 μl /well)
CSE 4 時間処理



C 液体培地の影響

C6 (10⁴ cells/100 μl /well)
CSE 4 時間処理

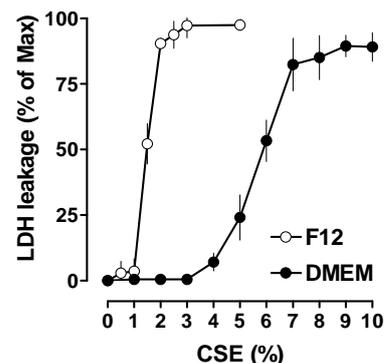
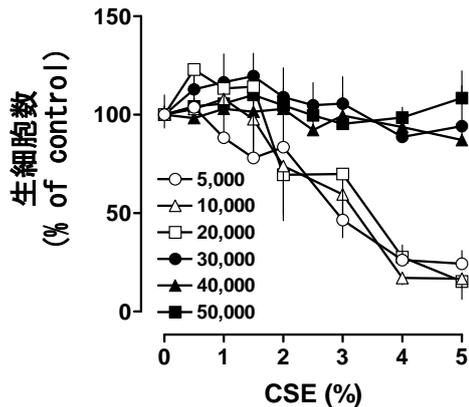


図-3 LDH の細胞外漏出量を指標とした CSE の作用の評価

A. F12



B. DMEM

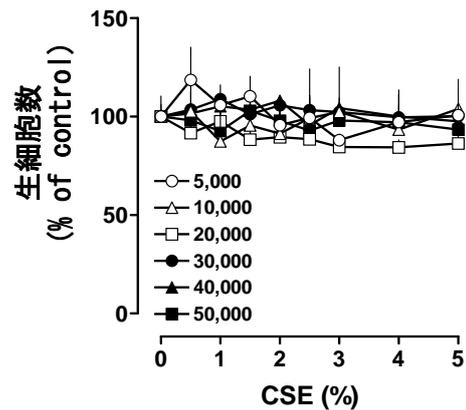


図-4 細胞数を指標としたCSEの作用の評価（CSE 24時間処理）

かった（図-4A）。一方、C6細胞をDMEMで前培養した場合、CSE処理による細胞数の減少は、まったく認められなかった（図-4B）。

このように、LDHの細胞外漏出量測定実験から得られた結果は、MTS法による細胞数測定実験の結果と相関性が高いことから、C6細胞を用いた場合、LDHの細胞外漏出量測定実験はもとより、MTS法もまた、CSEの細胞障害活性を評価する上で、妥当な試験法であると考えられた。

以上、LDHの細胞外漏出量測定実験ならびにMTS法を用いた細胞数測定実験により得られた知見から、細胞のCSEに対する感受性は、細胞の種類、細胞密度、液体培地の種類によって、大きく変化することが明らかになった。

CSEの性状解析

CSEに含まれる細胞傷害因子を同定するため、HPLCを用いたCSEの定量分析方法を確立した（図-5）。この分析条件は、CSEの成分分析に十分適用可能であるものの、移動相が有機溶媒を含む上に、強酸（pH 2.3）であるため、分取したHPLC分画をそのまま細胞へ適用することは困難である。従って、この分析方法に加えて、移動相が水もしくは、塩類緩衝液100%の分取HPLC用の分析条件を別途、確立する必要がある。

この他、血管壁構成細胞であるウシ血管内皮細胞（BAEC）及び平滑筋細胞（BVSMC）を用いた予備実験を行い、CSEの細胞傷害活性に関する

以下の知見を得ている⁷⁾（データは示さない）。

- CSE中には、細胞増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する成分が含まれている。
- その成分に対する感受性は、BAECの方が、BVSMCよりも高い。
- 細胞増殖阻害活性を示す成分は、室温で安定であり、昇華性及び極性の高い物質である。
- 細胞増殖阻害活性に、過酸化水素やスーパーオキシドアニオンは関与していない。
- 細胞傷害活性を示す物質は、たばこ煙中に存在し、細胞毒性を有することが報告されているアクロレインをはじめとする8種のカルボニル化合物とは異なる。
- 細胞傷害活性を示す成分は、フリーラジカル様物質または、これらと付加化合物を形成する物質である。

今後、上述の実験をさらに発展させた上で、ヒト血管内皮細胞や平滑筋細胞を用いたCSEの細胞傷害因子の同定ならびにその作用機序の解明に着手する予定である。

総括

本稿では、たばこ煙中に含まれる細胞傷害因子の性状解析に関する研究の現状と今後の検討課題、ならびに将来の展望について、概説した。本研究で得られる知見により、喫煙の生体に及ぼす作用が正確に理解されると共に、動脈硬化

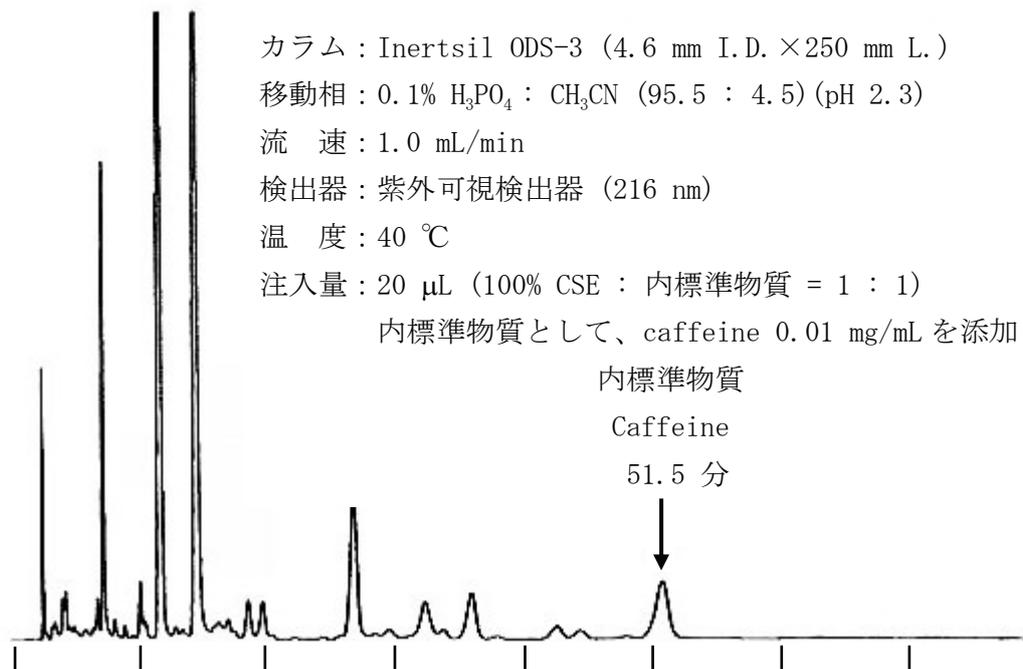


図-5 高速液体クロマトグラフィーを用いた CSE の分析結果の一例

症の発症といった喫煙の持つ様々なリスクが低減されることが期待される。

文 献

- 1) Carty CS, Huribal M, Marsan BU, Ricotta JJ, Dryjski M. Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 1997; 25: 682-8.
- 2) 三輪聡一、川那辺吉文. 血管系に及ぼすニコチンの影響. 平成 11 年度喫煙科学研究財団研究年報 2000; 219-21.
- 3) Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M. Cholesteryl ester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2344-8.
- 4) Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Oxidants in cigarette smoke extract modify low-density lipoprotein in the plasma and facilitate atherogenesis in the aorta of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 156: 109-17.
- 5) Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costantini F, Riario-Sforza G, Imbastaro T, Neri M, Cuccurullo F. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 1995; 112: 91-9.
- 6) Yamaguchi Y, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Participation of peroxy-nitrite in oxidative modification of LDL by aqueous extracts of cigarette smoke. *FEBS Lett* 2002; 512: 218-22.
- 7) 三輪聡一、水上達三、滝川修. 血管内皮による平滑筋の機能調節に及ぼす影響. 平成 16 年度喫煙科学研究財団研究年報 2005; 274-9.