

博士論文

たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延に関する研究

A study on the cigarette sidestream smoke-induced delay of nucleotide excision
repair

2018年2月

静岡県立大学大学院
薬食生命科学総合学府
環境科学専攻
博士後期課程
光環境生命科学研究室

楊 光

目次

緒論.....	1
第一章 たばこ副流煙抽出物 (CSS) のヌクレオチド除去修復 (NER) に対する影響.....	5
1-1 序論.....	5
1-2 実験材料および方法.....	5
1-2-1 CSS の抽出法 (水溶性分画)	5
1-2-2 マウス皮膚組織サンプルの作製.....	6
1-2-3 組織染色の準備.....	6
1-2-4 TUNEL 法による CSS 作用効果の確認.....	6
1-2-5 組織免疫染色法による CPDs の検出.....	7
1-2-6 ヒト培養細胞の培養法及び CSS の作用.....	7
1-2-7 UVB 照射法.....	7
1-2-8 トリパンプルー色素排除試験法による細胞生存率の測定.....	8
1-2-9 ELISA による 6-4PPs の検出.....	8
1-2-10 Dot-blot 法による 6-4PPs の検出.....	9
1-2-11 免疫蛍光染色法による CPDs、6-4PPs 生成と修復の検出 (局所照射法).....	10
1-2-12 検定法.....	12
1-3 実験結果.....	12
1-3-1 CSS 作用による NER の遅延 <i>-in vivo</i> における検討.....	12
1-3-2 CSS 作用による UVB 照射後 NER の遅延 <i>-in vitro</i> の検討.....	15
1-3-2-1 CSS と UVB の複合暴露による細胞死の亢進.....	15
1-3-2-2 CSS 作用による UV 照射後の NER の遅延.....	16
1-3-3-3 細胞株の違いにおける CSS 効果の差についての検討.....	18
1-4 考察.....	21
第二章 CSS 作用による NER 遅延のメカニズム.....	20

2-1 序論.....	21
2-2 実験材料および方法.....	21
2-2-1 CSS の抽出法.....	21
2-2-2 細胞の培養法.....	21
2-2-3 局所照射法による NER 関連蛋白質集積の検出.....	21
2-2-4 Western blot 法による NER 関連蛋白質総量の検出.....	22
2-2-5 検定法.....	23
2-3 実験結果.....	23
2-3-1 CSS 作用による NER 関連蛋白質集積の遅延.....	23
2-3-2 CSS 作用による NER 関連蛋白質の分解.....	28
2-4 考察.....	29
第三章 CSS 作用による NER 遅延原因物質の究明.....	31
3-1 序論.....	31
3-2 実験材料および方法.....	31
3-2-1 細胞の培養及び UVB の照射法.....	31
3-2-2 細胞へのアルデヒド類等の作用法.....	31
3-2-3 生存率の測定.....	32
3-2-4 ELISA で 6-4PPs の測定.....	32
3-2-5 局所照射法による CPDs、6-4PPs 及び照射後 NER 関連因子集積の検出.....	32
3-2-6 Western blot 法による NER 関連蛋白質総量の検出.....	32
3-2-7 検定法.....	32
3-3 実験結果.....	33
3-3-1 SEM によるアルデヒド類の除去と CSS 作用による NER 阻害効果.....	33
3-3-2 FA 作用による NER の阻害.....	35
3-3-3 SEM による FA 作用による NER 阻害効果の変化.....	38

3-3-4 飽和及び不飽和アルデヒド類と UVB 複合暴露による感受性の変化.....	40
3-3-5 飽和及び不飽和アルデヒド類作用による NER 効率の変化.....	41
3-3-6 飽和及び不飽和アルデヒド類作用による NER 関連蛋白質集積変化.....	43
3-3-7 飽和及び不飽和アルデヒド類作用後の NER 関連蛋白質レベルの変動...	45
3-4 考察.....	46
第四章 ROS とたばこ煙及びアルデヒド類による NER 遅延の関連性.....	47
4-1 序論.....	47
4-2 実験材料および方法.....	47
4-2-1 たばこ煙の抽出.....	47
4-2-2 細胞への CSS 等の作用法.....	47
4-2-3 ROS の生成による細胞内酸化状態の測定.....	47
4-2-4 ELISA による 6-4PPs の測定.....	47
4-2-5 局所照射法による CPDs、6-4PPs 及び照射後 NER 関連因子集積の検出...	48
4-2-6 検定法.....	48
4-3 実験結果.....	48
4-3-1 たばこ煙、アルデヒド類作用後の細胞内酸化状態の変化.....	48
4-3-2 抗酸化剤 NAC は NER の遅延を回復する.....	50
4-3-3 過酸化水素作用による NER の阻害及び NER 関連蛋白質集積の変化.....	51
4-4 考察.....	53
第五章 たばこフィルター効果の評価.....	55
5-1 序論.....	55
5-2 実験材料および方法.....	55
5-2-1 細胞の培養及び UVB の照射法.....	55
5-2-2 試薬の調製と細胞への CSS 等の作用法.....	55
5-2-3 生存率の測定.....	56

5-2-4 ELISAによる6-4PPsの測定.....	56
5-2-5 局所照射法によるCPDs、6-4PPs及び照射後NER関連因子集積の検出...	56
5-2-6 Western blot法によるNER関連蛋白質総量の検出.....	56
5-2-7 たばこ煙中アルデヒド類濃度の測定.....	56
5-2-8 ROSの生成による細胞内酸化状態の測定.....	56
5-2-9 検定法.....	56
5-3 実験結果.....	57
5-3-1 FCSSとCSS作用によるUVB感受性亢進の比較.....	57
5-3-2 FCSSとCSS作用によるNER遅延の差.....	57
5-3-3 FCSSとCSS作用によるNER関連蛋白質集積の遅延の差.....	59
5-3-4 FCSSとCSS作用によるNER関連蛋白質分解の差.....	60
5-3-5 FCSSとCSS阻害効果の違いの原因についての検討.....	60
5-3-5-1 FCSSとCSS中に含まれるアルデヒド類濃度の差についての検討.....	60
5-3-5-2 FCSSとCSSによる細胞内酸化量の差についての検討.....	62
5-4 考察.....	64
総括.....	65
謝辞.....	68
参考文献.....	69

緒論

たばこはお茶やお酒と同様に軽度な覚醒作用やリラックス作用を持ち、昔から嗜好品として使われている。2016年日本では約18,000トン、中国では約280,000トンのたばこ製品が生産された [1]。2015年経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) の調査によると日本の15歳以上の喫煙者は18.2%、中国では24.7%であった [2]。初めに、たばこはアメリカ先住民により宗教的な行事に用いられていた。大航海時代にコロンブスによりスペインに持ち込まれ、さらにヨーロッパの各地に広がり、喫煙という習慣が広まっていた。貴族たちしか使えない貴重品であったが、19世紀イギリスの第一次産業革命以降、紙巻きたばこの大量生産ができるようになったことで、一般庶民にも急速に広まり始めた。日本におけるたばこの伝来は1543年といわれている。その後、各地への栽培が広がり、喫煙習慣もともに広がっていた [3,4]。中国において、たばこは16世紀に輸入されたと言われており。1980年に明王朝後期 (約1549年) の喫煙用具が発見された。

喫煙者の増加につれ、喫煙が起こす問題も注目された。初めは悪臭と火災、その後、健康に対する影響も危惧された。英国の国王ジェームスI世 (1566-1625) はたばこ煙を“肺や脳に悪い悪魔の煙”と形容し、たばこに重税を課した。1931年 Roffo [5] はたばこ抽出物を hairless マウスやウサギに塗布すると腫瘍ができると発表した。本格的に喫煙を発がんに結び付けたのは、1939年 Müller [6] の研究であった。彼の研究は男性肺癌患者83人を調査し、その中にヘビースモーカーは56人であり、非喫煙者は3人しかいない。対照として、肺癌患者ではない同じ年齢層の83人を調査した結果、ヘビースモーカーが31人、非喫煙者は14人であることを報告し、初めて肺癌と喫煙の関係を示した。この結果は英国やアメリカの研究者たちにより追試され、確認された。1954年 Doll ら [7] の研究で、性別や年齢と関係なく、喫煙は肺の病気を罹患するリスクを高めることが報告された。Hammond ら [8] や Ubell ら [9] は Doll らの結果をさらに確認した。現在、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) は喫煙により世界全体で700万人が死亡していることを報告し [10]、また、がんによる死亡人数の22%はたばこによるものと推測している [11]。国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) では、たばこ煙を class 1 (発がん性のある環境要因) に分類した [12]。また、たばこ煙はフィルターを介して吸入するたばこ主流煙 (Cigarette mainstream smoke: CMS) と、たばこ燃焼末端からリリースするたばこ副流煙 (Cigarette sidestream smoke: CSS) に分けられる。CSS は CMS より量が多いと報告され、現在、受動喫煙の影響が危惧されている [13]。

たばこ煙の中には約4800種類の化学物質が含まれている [14]。その中の60種類は動物実験で発がん性ありと報告され、多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs) やニトロソアミンなど10種類は人間に対して発がん性を示すと報告されている。

発がんの原因は遺伝子の変異と言われている。DNA 損傷は遺伝子変異の一要因で

ある [15]。DNA の損傷形式は様々であり、DNA 二重らせん構造に影響するものが多い。例として、DNA 塩基の酸化、メチル化、付加体の形成や DNA 鎖の切断が挙げられる。1985 年中山ら [16] はたばこ煙が DNA 一本鎖切断を誘導することを報告し、Fielding ら [17] はこの結果を確認した。Leanderson ら [18] はたばこ煙が活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生に繋がり、酸化的な DNA 損傷である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxo-dG) を誘導することを報告した。たばこ煙は一般的にフィルターを介して吸入するが、フィルターを介した、tar, aerosol フリーのたばこ煙でも、DNA 損傷修復に関連する蛋白質 TP53 の集積を誘導させることが報告されている [19]。

たばこ煙中に存在する PAHs の 1 つである benzo[a]pyrene は人体内でシトクロム P450 により酸化され、benzo[a]pyrene diol epoxide になり、DNA と結合し、付加体を形成することが知られている [20]。ニトロソアミン類、例として N¹-nitrosornicotine (NNN) や 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) は強力な発がん物質であり、喫煙者の肺に検出される。NNN と NNK の代謝物は活性化され、DNA と結合し、付加体が形成されることが報告されている [21,22]。PAHs やニトロソアミンなど、代謝により活性化される前発がん物質以外に、化学物質そのものが生体分子と直接に結合することによって発がん性を表す化学物質もたばこ煙の中に含まれている [13]。例として、アルデヒド類、その中でもホルムアルデヒド (formaldehyde: FA) や α,β -不飽和アルデヒド類は DNA と結合し、N²-(3-oxopropyl)-dG (N²-dG) 付加体を形成する。また、N²-dG 付加体は N²-dG : N²-dG 結合を形成し、DNA 鎖間クロスリンクや DNA-蛋白質架橋付加体ができることが報告されている [23]。以上の報告より、たばこ煙による DNA 損傷は、たばこ煙中に含まれる化学物質や ROS の産生がその主な原因と思われる。

DNA 損傷は、様々な修復経路により修復され、時には複数の修復経路を使う場合もある。ROS により生成される酸化的な DNA 損傷や小さい DNA 付加体は主に塩基除去修復 (base excision repair:BER) により修復される [24,25]。BER で修復されないような大きい DNA 付加体や DNA-蛋白質架橋はヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair:NER) により修復され、その過程中二本鎖切断を修復する相同組換え (homologous recombination:HR) や非相同末端結合 (non-homologous end joining :NHEJ) も関与することが報告されている [26,27]。

一方、たばこ煙による DNA 損傷の生成については多くの研究があるが、たばこ煙の損傷修復に対する影響についての研究は数少ない。しかしながら、生成した DNA 損傷は修復される必要がある。Holcomb ら [28] はたばこ煙抽出物を人肺細胞 IMR-90 に 24 時間作用し、NER の効率を検討した。その結果、NER が阻害され、NER に関連する蛋白質の分解も認められた。Lee ら [29] はたばこ煙抽出物が BER や NER に関連する蛋白質の分解を誘導したことを報告した。たばこ煙に含まれる化学物質、例として benzo[a]pyrene は DNA ミスマッチ修復を阻害した [30]。アルデヒド類が NER や BER を阻害することも報告されている [31]。しかし、たばこ煙が NER を阻害するメ

カニズムやその原因物質は未だ完全に解明されていない。

NER は Transcription coupled repair (TCR) と Global genomic NER (GGR) に分けられる。TCR は転写とともに、RNA polymerase が DNA 損傷によりブロックされることから始まる NER である。GGR は常に全ゲノム範囲に起こり、NER 修復因子のひとつである Xeroderma pigmentosum C (XPC) が DNA 損傷を認識することから始まる NER である [27]。認識された DNA 損傷を修復するため、まず TFIIH、XPA などヘリカーゼ活性の持つ NER 修復関連蛋白質が DNA 二本鎖構造を拡張し、切り易くする。そして、XPG や XPF が損傷部位から 20~30bp の塩基を切り、除去する。最後に DNA polymerase、PCNA などが DNA の欠けた部分を修復し、DNA が正常に戻る (Fig. 1) [27]。NER を利用する DNA 損傷の修復に、紫外線 (ultraviolet rays: UV) の照射によるピリミジンダイマーの修復がある。

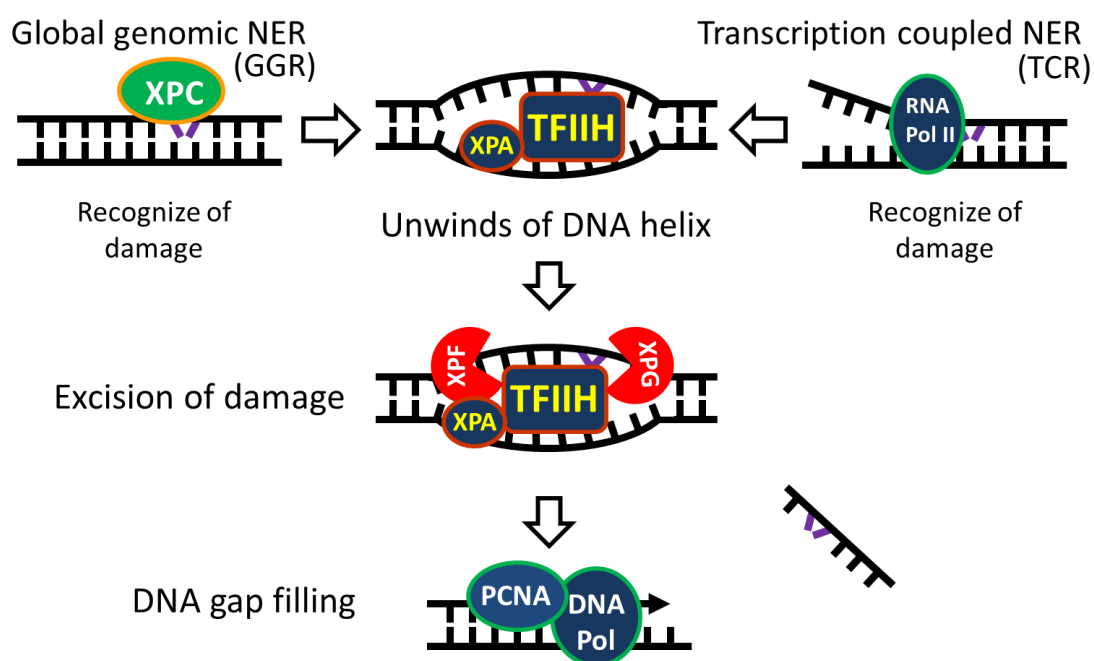


Figure 1 Nucleotide excision repair (NER) [27]

NER is a complex system composed of more than 30 factors with the ability to repair lesions. These factors are needed in the steps of recognition of DNA lesions, dual incision, repair and ligation, in which xeroderma pigmentosum complementation group proteins (XPs), which include XPA through XPG, and others such as proliferating cell nuclear antigen are involved in mammals. These factors need to rapidly accumulate at DNA lesions, and their deficiency and dysfunction have been shown to result in diseases involving cancers and neurological disorders.

DNA の塩基はアデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C) により構成されている。その中のピリミジン塩基である T と T、T と C、C と C が UV 照射を受けると、同一鎖に隣接するピリミジン残基の 5 位および 6 位間に共有結合が形成され、ダイマーになる [32]。UV による誘導されるピリミジンダイマーは主に cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) と 6,4 pyrimidine-pyrimidone photo products (6-4PPs) により構成される [32] (Fig. 2)。6-4PPs の生成は DNA に歪みを与え、それは CPDs に比べ大きい。よって、細胞に対する影響が大きいため、CPDs に比べ比較的迅速に修復される [32]。6-4PPs は約 4 時間、CPDs は 24 時間で半分程度が修復されると報告されている [33]。NER はピリミジンダイマーのみではなく、様々な DNA 損傷を修復する。たばこ煙中の化学物質による DNA 損傷の一部も NER により修復されると考えられる [20]。

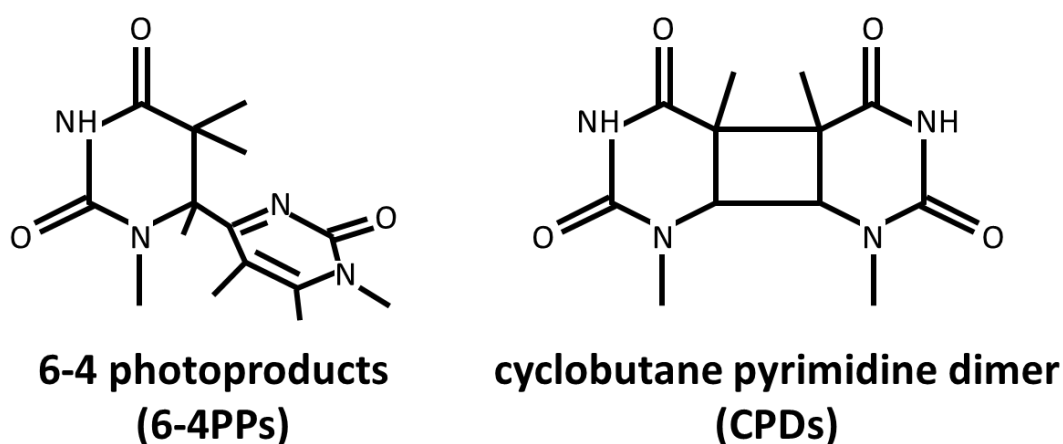


Figure 2 Formation of pyrimidine dimers after UV irradiation

UVB and UVC radiation that may lead to the formation of two major classes of DNA lesions, such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts (6-4PPs)

本研究ではたばこ煙、特に、CSS の NER に対する影響を検討することで、たばこ発がんのメカニズムにおいて DNA 損傷修復の影響という新しい角度から *in vivo* や *in vitro* でアプローチした。第一章では、CSS の NER に対する影響を検討し、CSS が NER を阻害することを明らかにした。第二章では、CSS による NER の遅延は NER 関連蛋白質の分解によることを解明した。第三章では、CSS による NER の遅延の原因物質はアルデヒド類であることを証明した。第四章では、ROS が CSS による NER の遅延に一部関与している可能性を明らかにした。第五章では、CSS と CMS の NER 阻害効果を比較した。

第一章 たばこ副流煙抽出物 (CSS) のヌクレオチド除去修復 (NER) に対する影響

1-1 序論

たばこ煙が DNA 付加体や酸化的な DNA 損傷などの種々の DNA 損傷を形成させることを緒論にて説明した。たばこ煙の中でも CSS は毒性が高いとされ、最近になってその健康影響が危惧されている[13]。CSS 暴露により DNA 付加体や酸化的な DNA 損傷が形成されるが、それらは BER や NER により修復される [25-27]。一方、CSS がそれら DNA 損傷修復に影響するのかどうかはほとんど研究されていない。

NER は DNA 損傷修復経路の一つであり、主に BER が修復できないような大きな DNA 付加体を修復する [26]。NER により修復される代表的な DNA 損傷として、UV 照射により生成されるピリミジンダイマーが挙げられる [32]。そこで本章では、CSS 暴露の NER に対する影響を調べるため、HR-1 hairless マウスに CSS を塗布し、UV に暴露させ、生成したピリミジンダイマーの修復を検討した。また、*in vivo* での事象を確認するために、ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT) や扁平上皮癌細胞 (HSC-1) を用いて同様な検討を行った。また、たばこ煙吸入暴露の主なターゲットは肺と考え、ヒト肺胞基底上皮線癌細胞 (A549) を用いて、皮膚のみならず、肺細胞の NER に対する影響も検討した。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 CSS の抽出法 (水溶性分画)

たばこ(seven stars: tar; 14 mg, nicotine; 1.2 mg, Japan Tobacco Co.)を 5 本燃焼させ、その煙を真空ポンプで、100 mL 25°C の DMEM 培地にバブリングトラップした (Fig. 3)。この溶液を 100% として実験に用いた (100% CSS)。動物実験の場合、DMEM の代わりに PBS (-) を用いて同じ条件で CSS を抽出した。100% CSS 溶液を 10 mL ずつ分注し、20% で凍結保存した。使用直前に融解させ、培地または PBS (-) で所定濃度に希釈した。また、一回融解し、使い切らなかった CSS は品質管理のために廃棄した。

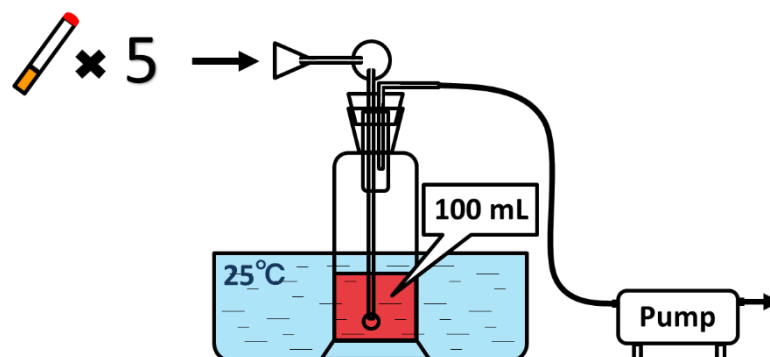


Figure 3 Preparation of CSS

CSS generated by the spontaneous combustion of five cigarettes was trapped in 100 ml of DMEM or PBS by bubbling using a dry vacuum pump. DMEM or PBS containing CSS is hereafter referred to as 'CSS (100%)'.

1-2-2 マウス皮膚組織サンプルの作製

動物実験は、静岡県立大学動物実験規程指針を順守し行った（許可番号：165131）。

[CSS の作用及び UV 照射条件]

1-2-1 において PBS で抽出した 100% CSS をアセトン:オリーブオイル 4:1 の混合液で 50%に希釈し、8 週齢の HR-1 ヘアレスマウス（♀, 8 weeks, SLC Inc., Shizuoka, Japan）背部皮膚の所定場所（耳から背骨の中心点まで）に、12 時間ごとに 100 μ L、6 回塗布した。6 回目塗布の 1 時間後、UVB (0.378 J/cm², 3 MED) (TL-20W/01, peak: 318 nm, Philips Lighting Holding B.V., Amsterdam, Netherland) に暴露させた。CSS 作用させないコントロールは、PBS を混合液で 50%希釈したものを塗布した。背部皮膚は照射後 0, 24, 36 時間後にハサミで切断し回収した。

[皮膚サンプルブロックの作製]

回収した皮膚は histochoice (Amresco, LLC., Solon, OH) で 6 時間固定し、その後、70% エタノール 1 時間、80% エタノール 1 時間、95% エタノール 3 時間、100% エタノール 6 時間の順で処理した。その後、新しい 100% エタノールの中に一晩置いた。翌日に、キシレンを 1 時間で 3 回処理し、64°Cパラフィン(Pathoprep; Wako Ltd., Osaka, Japan) で 3 回処理させた。その後、皮膚を相同面積 (0.5 cm X 1.5 cm)の 4 枚に切り、パラフィンに包埋させ、ブロックを作成した。

1-2-3 組織染色の準備

皮膚サンプル（パラフィンプロック）は回転式マイクロトーム (Leica RM2125 RTS; Leica Microsystems K.K., Tokyo, Japan) を用いて厚さ 5 μ m に切り、スライドガラスに一晩固定させた。サンプルの固定しているスライドガラスをキシレン 5 分間 (2 回)、100% エタノール 3 分間 (2 回)、80% エタノール 3 分間 (2 回)、70% エタノール 3 分間 (2 回)の順で処理した。処理後のサンプルは 1-2-4 の TUNEL 染色や 1-2-5 の組織免疫染色に用いた。

1-2-4 TUNEL 法による CSS 作用効果の確認

DeadEnd Fluorometric TUNEL System G2350 キット(Promega Co., Madison, WI)を用いて組織蛍光染色した。実験はキットに添付されていたプロトコール通りに行った。1-2-3 で処理したサンプルに、20 μ g/mL proteinase K 100 μ L を 10 分間、室温で反応させた。その後、PBS で洗浄し、4 % paraformaldehyde で 5 分間固定させた。PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄したのちに、タッピングで水を除き、 Equilibrate buffer 100 μ L を組織表面に垂らし、10 分間室温で反応させた。反応してる間に、rTdT Incubation Buffer (rTdT Incubation Buffer 46 μ L: Equilibrate buffer 45 μ L+ Nucleotide Mix 5 μ L+rTdT Enzyme 1 μ L) を調製した。10 分後、Equilibrate buffer を吸い取り、サンプルの上に rTdT Reactions Mix を垂らし、cover slip で cover し、37°C遮光で 1 時間反応させた。その後、サンプルを 2x SSC buffer の中に 15 分間浸し、反応を停止させた。PBS で 3 回洗浄したのち、propidium iodide (PI)を PBS で 1 μ g/mL になるように溶かし、15 分間を反応させた。最

後に、純水で5分、3回ずつ洗浄し、サンプルを封入した。TUNEL positive 細胞は500-540nmの波長で蛍光顕微鏡 (IX70: Olympus Ltd., Japan)で観察し、撮影した。

1-2-5 組織免疫染色法による CPDs の検出

1-2-3 で処理したサンプルは3% H₂O₂ でブロッキングさせ、オートクレーブ 121°C で15分間賦活化させた。FBS で30分ブロッキングした後に、一次抗体(CPDs (1:200, Cosmo Bio Ltd., Tokyo, Japan)), 二次抗体 (biotin-F(ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (1:500, Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA)), horseradish peroxidase streptavidin conjugate (1:500, Zymed Laboratories Inc.) を1時間ずつ作用させた。最後に、3,3'-diaminobenzidine substrate kit (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA) を用いて、発色させた。サンプルの写真は蛍光顕微鏡 (IX70: Olympus Ltd., Japan)の40倍明視野で撮り、すべて細胞の輝度を一つずつ Image J で測定し、記録した。Sample ごと2500個以上細胞の輝度を統計し、Excel でグラフ化した。その後、マン・ホイットニーの U 検定で有意差を求めた。

1-2-6 ヒト培養細胞の培養法及び CSS の作用

本研究に用いたヒト皮膚角化細胞 (HaCaT) は Dr. Norbert (German Cancer Research Center, Germany) のご好意により分与された。扁平上皮癌細胞 (HSC-1), ヒト肺胞基底上皮線癌細胞 (A549) は JCRB Cell Bank (Osaka, Japan) より購入した。

細胞培養用培地 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) は以下の手順で作成した。DMEM 粉末 (Nissui pharmaceutical Co.Ltd., Japan) を超純水で溶かし、9.5 g/L にした後に、120°C で15分間高圧滅菌した。その後、滅菌済の L-glutamine (Lonza Walkersville, Inc., USA) を最終濃度 2 mM、penicillin G/streptomycin (Sigma-Aldrich Inc., USA) を最終濃度 100 U/ 0.1 mg/mL になるように添加した。培地の pH 調整は 120°C で15分間高圧滅菌した 10% NaHCO₃ を使って行った。pH 7.0 に調整した培地は使用直前まで冷暗所 (4°C) に保存し、使用時 fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies Inc., USA)を 10% (HSC-1 は 20%) になるように添加した。

細胞は 37°C、5% CO₂ の条件で培養し、継代用細胞は 80%コンフルエントになった時に 0.05% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) で一回洗浄し、さらに 0.05% EDTA を 12min 作用した後、trypsin 0.05%と EDTA 0.025%を添加した PBS (-)で剥がし、100 mm 又は 35 mm dish に継代した。実験用細胞は 35 mm dish に撒いた後、90-100%コンフルエントになった時点で、0.5% FBS を含む DMEM に交換し、24 時間培養した後で実験に用いた。

CSS の作用は血清フリー24 時間培養後、0.5 % FBS を含む DMEM で所定濃度 (~100%)に希釈し、1 時間作用した。

1-2-7 UVB 照射法

UVB の照射は ATTO 社の卓上 UV 照射装置 (HP-30LM) を使い、UVB 線量の制御

は ATTO 社の UV 強度測定装置 (ATR-3WX) で行った (wavelength: 305-315 nm, main peak: 311 nm)。照射直前に PBS (+) (100 mL PBS (-) に 1 M CaCl₂ 90 μL と 1 M MgCl₂ 45 μL を入れたもの) に交換し、照射後直ちに 0.5% FBS を含む DMEM に交換し、一定時間 (~48 時間) 培養した。

1-2-8 トリパンプルー色素排除試験法による細胞生存率の測定

トリパンプルーは細胞膜が破損した死細胞を染めるが、破損のない細胞膜を持つ生細胞を染めることはできない。この特性を利用して、死細胞をマーキングして、全細胞数に占めた割合を求め、生存率を計算した。

[試薬調製]

トリパンプルー溶液: trypan-blue (Merck Ltd., Germany) 1 g、NaN₃ 0.065 g を PBS で 100 mL にし、溶液を室温で保存した。

[生存率の測定]

細胞を trypsin 0.05% と EDTA 0.025% を添加した PBS (-) で剥がし、低回転数 (1300 rpm) で遠心した。その後、trypsin を除去するため、上澄みを吸い取り、0.5% FBS を含む DMEM を 1 mL 追加し懸濁させた。懸濁液から 50 μL を取り、トリパンプルー溶液を 1:1 の割合で混合した。改良ノイバウエル血球計算盤にカバーガラスをかぶせ、混合液を隙間にゆっくり入れ、計算盤の目盛りある部分の 4 つの 4x4 マス内 (1x1x0.1 mm) の細胞数を数え、死細胞の数と総細胞数の割合で生存率の平均値を計算した。

1-2-9 ELISA による 6-4PPs の検出

[試薬調製]

クエン酸リン酸 buffer : citric acid monohydrate 5.1 g, Na₂HPO₄ 7.3 g, 1 L 蒸留水でメスアップした。

発色基質溶液 : クエン酸リン酸 buffer に、o-phenylene diamine (0.4 mg/ml) , 0.006% H₂O₂ になるように添加した。実験直前に調製を行った。

[DNA の抽出]

HaCaT 細胞を所定時間で培養した後に、細胞を回収し、QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) で DNA を抽出し、NanoDrop (Thermo Disher Scientific, MA, USA) を用いて、260 nm の吸収波長で定量した。

[Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)]

50 μL/well 0.003% protamine sulfate solution でポリ塩化ビニル 96-well dish を 37°C 一晩でコーティングした。DNA を 100°C で 10 分間煮沸し、15 分間氷冷させ、変性させた。その後、DNA を 10 ng/well で添加し、37°C の条件で 5 時間コーティングした。

ELISA を行うために、dish を 0.05% TPBS で 5 回洗浄し、2% FBS-PBS でブロッキングした。37°C で 30 分間インキュベートした後に、0.05% TPBS で 3 回洗い、一次抗体 (6-4PPs (1:1500, Cosmo Bio Ltd.)) を 37°C、30 分間インキュベートした。0.05% TPBS で 3 回洗浄後、二次抗体 (biotin-F(ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (1:2000 Zymed Laboratories, Inc.)) を 30 分間作用させた。その後、0.05% TPBS で 3 回洗浄し、Peroxidase-Streptavidin (1:10000 Zymed Laboratories, Inc.) を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。最後に、0.05% TPBS で 5 回洗浄し、クエン酸リン酸 buffer で 2 回洗浄した後に、基質溶液を添加し、インキュベートした。発色を目確認後、2 M H₂SO₄ で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて、492 nm で吸光度を測定した。

1-2-10 Dot-blot 法による 6-4PPs の検出

[試薬調製]

Tris-EDTA (TE): MQ 水に最終濃度 10 mM の Tris と 1 mM の EDTA を入れた後、pH を 8.0 に調整し、4°C 冷暗所に保存した。

1%サルコシル: TE に 1% N-lauroylsarcosine sodium salt を入れ、混合し、4°C 冷暗所に保存した。

CsCl 溶液: MQ 水に CsCl を溶かし、1.5 g/mL にした後、室温に保存した。

KP1 buffer: K₂HPO₄ を 348.36 mg/200 mL で MQ 水に溶かした後、リン酸で pH 7.0 に調整し、室温で保存した。

20x SSPE buffer: 175.3 g NaCl, 35.88 g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 9.4 g EDTA を水に溶かし、1 L にした後、NaOH で pH を 7.4 に調整し、室温で保存した。

T-PBS: 0.1%/0.3% の割合で tween 20 (Wako Pure Chemical Ltd., Japan) と PBS を混合した後、室温で保存した。

[DNA 抽出法]

HaCaT 細胞を所定時間で培養した後に、trypsin 0.05% と EDTA 0.025% を添加した PBS (-) で剥がし、遠心回収した。回収された sample に 1%サルコシル溶液を 400 μL を加え、ペレットが完全に溶解するまでピペティングして、超音波 2 分間処理した。超遠心用 tube (1PC TUBE: Hitachi Ltd., Japan) に 600 μL CsCl を入れ、その上に sample 液を混ぜないように静かに入れ、27°C、365000 × g で 16 時間超遠心 (Himac CS 150GX II Micro Ultracentrifuge: Hitachi Ltd., Japan) した。遠心終了した tube の底に透明な DNA ペレットを確認した後、上澄みをきれいに吸引し廃棄した。100 μL TE を加え、DNA ペレットを溶解した。

DNA sample に proteinase K (PK) を 0.25 mg/mL になるように混合し、52°C で 12 時間振動反応し、蛋白質を除去した。DNA の長さをあわせ、DNA 定量の精度を上げるため、2 分間超音波処理 (Bioruptor: Cosmo bio LTD., JAPAN) した。その後、分光光度計 (NanoDrop 2000: Thermo Fisher Scientific Inc., USA) で DNA 濃度を測定し、KP1 buffer と混合し、一定の濃度に合わせた。

[Dot-blot 法]

5 × 9 cm に切ったニトロセルロース膜 (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.45: Bio-Rad Ltd., USA) を用意し、20x SSPE buffer に浸し、15 分以上振動した後、dot blot 装置にセットした。濃度を合わせた sample を 100°C でボイルし、15 分間氷中冷却した。その後、sample を dot blot 装置の well にロード、吸引し、DNA を膜に吸着させた。5x SSPE buffer で 30 分間洗浄した膜を 80°C の温度で 2 時間加熱し、DNA を膜に固定させた。

0.1% skim milk PBS で膜を 30 分間ブロッキングした後、0.1% tween PBS と 0.1% skim milk PBS 1:1 で一次抗体 (Mouse anti-(6-4)photoproducts (6-4PPs) (Cosmo Bio Ltd., Japan)) を溶かし、膜を 12 時間以上反応させた。その後、膜を 0.1% Tween PBS で 3 回洗浄し、0.1% tween PBS: 0.1% skim milk PBS = 1:1 で溶かした二次抗体 (FITC-conjugated AffniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA) 1:300) を膜に 2 時間以上反応させた。

0.3% Tween PBS で 3 回洗浄した後、化学発光キット Immuno star LD (Wako Pure Chemical Ltd., Japan) を使い、検出を行った。

1-2-11 免疫蛍光染色法による CPDs、6-4PPs 生成と修復の検出 (局所照射法)

UVC がポリカーボネートフィルターに遮断される特性を利用して、細胞の局所照射を行った。フィルターの穴に透過した UVC に照射された部分にのみ、CPDs、6-4PPs がフォーカスとして生成するため、この方法で CPDs、6-4PPs の生成と修復が確認できる (Fig. 4)。

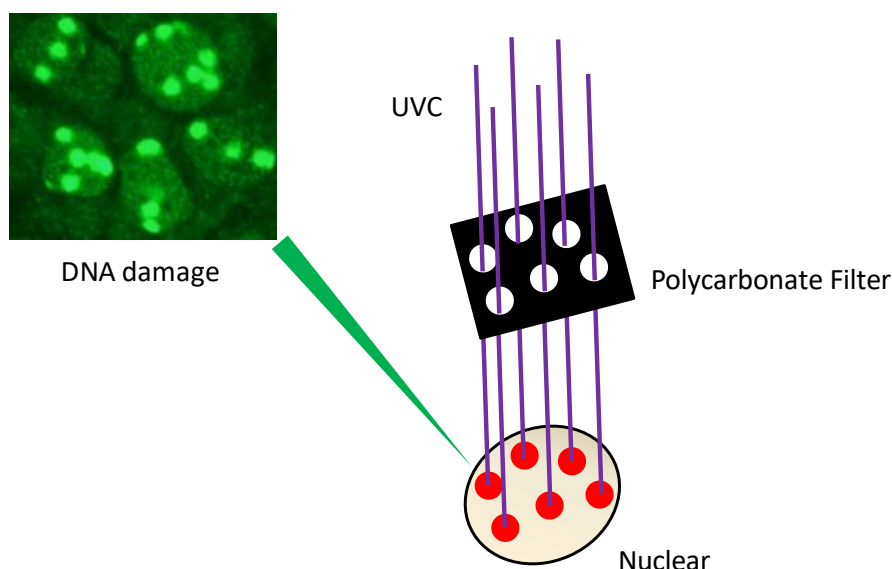


Figure 4 Local UV-irradiation method

Cells were irradiated with UVC through a polycarbonate isopore membrane filter. UVC only passes through the pores in the filter and generation DNA damage locational. With immunofluorescent staining, damage can be seen as focus in nuclear.

[試薬調製]

0.2% triton X-100 1% BSA 溶液: PBS に triton X-100 を 0.2%, BSA を 1%になるように溶解し、-20°Cで保存した。

2% triton X-100 溶液: PBS に Triton X-100 を 2% になるように混合し、4°C冷暗所に保存した。

5% formalin 溶液: 実験を始まる前に 10% formalin 溶液 (Wako Pure Chemical Ltd., Japan) と PBS を 1:1 の割合で混合した。

2N HCl 溶液: 18 ml HCl を MQ 水で 100 ml にした後、室温で保存した。

[照射方法]

35 mm dish に 10-mm ϕ glass (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) 一定枚数を入れ、その上に HaCaT 細胞を播いた。HSC-1, A549 細胞の場合、付着力が弱いので、COLI-coated 12mm micro glass dish (Iwaki glass based dishes: Asahi Glass LTD., Japan) を使った。このことによって、細胞は同様な条件で CSS や UV に暴露されるが、時間を分けて glass dish を回収できる。1 時間 CSS を作用した後、培地を除去し、PBS (-) で 1 回洗浄した。あらかじめ PBS (-) に浸したフィルター (3 μ m, Isopore Membrane Filters: Milipore Co., USA) を glass dish 上にかぶせ、UVC 照射 (HP-50C, wavelengths: 250~258 nm, peak: 254 nm, Atto Co. Ltd., Tokyo, Japan) を行った。照射線量は予め UV 強度測定装置 (ATR-3W, ATTO Co., Ltd, Japan) で計算し、一定線量に達する必要な時間を測定、照射した。

[蛍光免疫染色法]

UV 照射後、0.5% FBS DMEM 培地で一定時間培養した。その後、glass dish を 5% formalin 溶液で 15 分間固定、回収した。抗体と反応しやすくするため、2% triton X-100 溶液で 3 分間反応させた。抗体を 0.2% triton - 1% BSA 溶液に溶かし、室温で 1 時間以上反応させた。さらに、2N HCl を加え、20 分間反応させ、DNA 二本鎖構造を解き、CPDs 並びに 6-4PPs の抗体と反応しやすいようにした。一次抗体 (Mouse anti- CPDs (Cosmo Bio Ltd., Japan) 1:600; Mouse anti-6-4PPs (Cosmo Bio Ltd., Japan) 1:600) と二次抗体 (FITC-conjugated AffniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA) 1:300) を作用させた後、PI 溶液を PBS で 1/1000 の割合で希釈し、核の DNA を染めた。最後に glass dish をマウント剤 (Flouoroshild: ImmunoBioScience Co., USA) でスライドガラスに固定させ、蛍光顕微鏡 (IX70: Olympus Ltd., Japan) で観察した。

[統計処理法]

蛍光顕微鏡でランダムに数枚写真を撮り、細胞核内のフォーカスの有無を目視で確認し、フォーカスがあった細胞の数と全細胞数を数えた。Sample ごと 200 個細胞以上

を統計し、Excel でグラフ化した後に、マン・ホイットニーの U 検定で有意差を求めた。

1-2-12 検定法

すべての実験は、3~4 回繰り返し、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している (n=4~200)。有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置 analysis of variance (ANOVA) により行った。統計的な有意性は、* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 で表した。

1-3 実験結果

1-3-1 CSS 作用による NER の遅延 -*in vivo* における検討-

CSS の NER に対する影響を *in vitro* で検討するため、HR-1 hairless マウス背部皮膚の所定範囲に、CSS を 12 時間間隔で 6 回塗布した。CSS が真皮にまで到達したことを確認するため、皮膚細胞にできた DNA の鎖切断を TUNEL 法で確認した (Fig. 5)。CSS 塗布した場合、TUNEL positive 細胞が検出されたことから、塗布された CSS は浸透し、周辺の細胞にアポトーシスを引き起こしたことが考えられた。

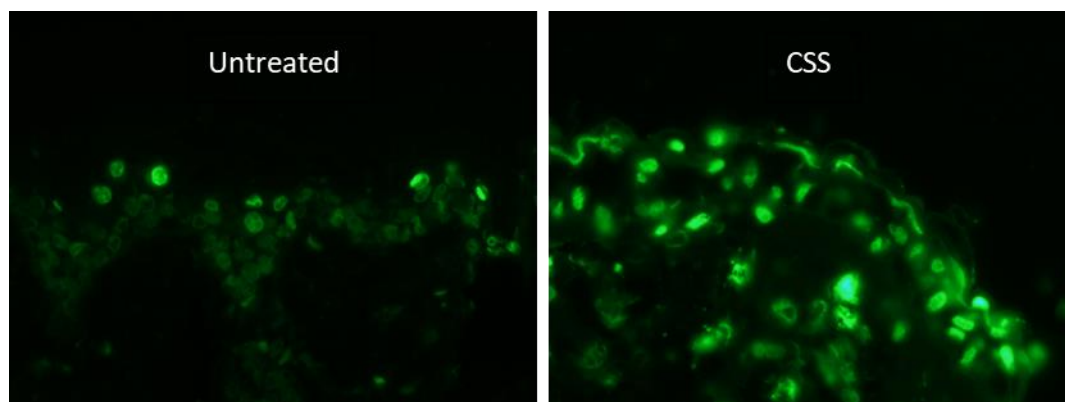


Figure 5 Histological TUNEL assay on CSS-applied skin

DeadEnd Fluorometric TUNEL System G2350 (Promega Co., Madison, WI) was used to detect DNA strand breaks. The experiment was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, paraffin blocks of skin were vertically sectioned at 5 μ m and substituted with xylene and ethanol for a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling reaction. Sections were incubated with a nucleotide mix and rTdT enzyme dissolved in equilibration buffer for 1 h. The reaction was stopped by immersing the sections in 2x sodium citrate buffer for 15 min. Images were acquired on a fluorescence microscope (BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

CSS 作用後、UVB を照射し、0, 24, 36 時間後、マウスの背部皮膚を回収し、CPDs 抗体による組織免疫染色法を行った (Fig. 6)。マウスの皮膚を使った理由は、*in vivo* で NER を調べるためには UV 照射操作が一番簡単であり、照射後ピリミジンダイマーの生成と修復についての検出も方法が確立されているためである。CPDs を持つ細胞は茶色く染められ、色の濃さは CPDs の量を示している。UVB に暴露されなかった場合、CPDs に染色された細胞は確認できなかった。UVB 照射直後の場合、CSS 塗布の有無にかかわらず、CPDs の染色はほぼ同じであったが、24 時間経過すると、CSS 塗布による CPDs 修復の遅延が認められた (Fig. 6A)。36 時間では、UVB のみの場合より、CSS 塗布されたマウスの皮膚における CPDs の示す色が明らかに濃かった。

写真をグラフ化した結果を Fig. 6B、C に示す。Fig. 6B は細胞輝度の平均値を表す。照射直後、CSS 作用の有無にかかわらず、ほぼ同じ輝度であったが、24 時間、36 時間と、時間依存的に修復が見られ、36 時間後にはその輝度はコントロールとほぼ同じになった。一方、CSS を作用させた場合、24 時間や 36 時間で CPDs 修復の遅延が認められた。Fig. 6C は各細胞の輝度分布を示す。右に行くほど輝度が高い、つまり CPDs が多い細胞である。UVB のみの場合、時間経過につれ、左にシフトし、CPDs は修復されたが、CSS 作用させた場合、そのシフトが抑えられ、修復が遅延していることが示された。UVB 照射後 6-4PPs の生成及び修復についても組織免疫染色法で同様に検出を行ったが、うまく染色されなかった。他の研究においても、6-4PPs の組織染色例は少ない。原因は不明だが、今回は CPDs の染色のみにとどめた。

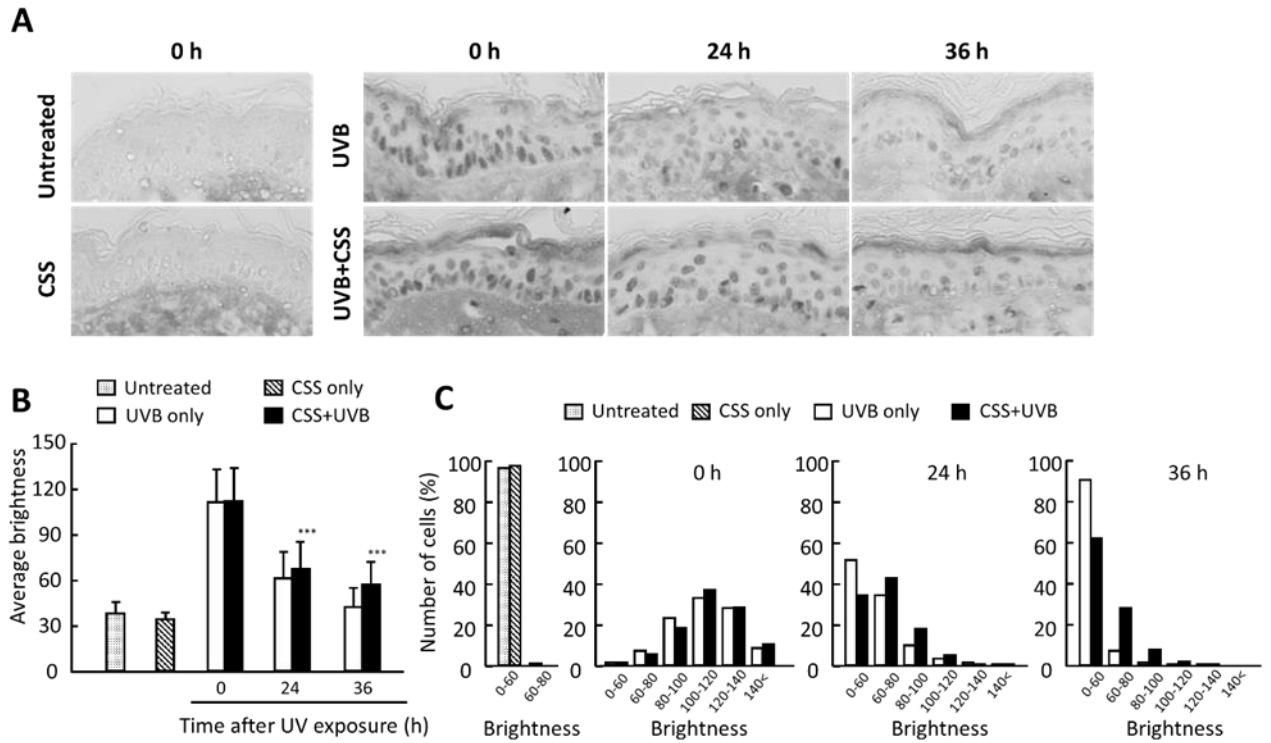


Figure 6 CSS delays NER *in vivo*

(A) Vertical paraffin sections of skin exposed to CSS and/or irradiated with 3 MED of UVB 0, 24, and 36 h post-exposure were made as described in the Materials and Methods. Four sections were obtained from similar back skin areas of each animal (n=2, repeated twice). Sections were stained with an antibody for CPDs. Positive cells are stained brown in the epidermal layer.

(B) The average brightness of all cells (more than 2500 cells per epidermis section) was calculated using ImageJ ver1.49. The strongest brightness of positive cells was 177 and that of negative cells was approximately 40. Data are presented as the mean \pm S.D. *** $p < 0.001$ (UVB only vs. CSS plus UVB).

(C) Brightness was sectioned into six groups (<60, 60~80, 80~100, 100~120, 120~140, and 140<) and the % of each group was expressed.

1-3-2 CSS 作用による UVB 照射後 NER の遅延 *-in vitro* の検討-

1-3-2-1 CSS と UVB の複合暴露による細胞死の亢進

HaCaT 細胞を用いて、CSS と UVB 複合暴露 24 時間後の生存率を測定した (Fig. 7)。

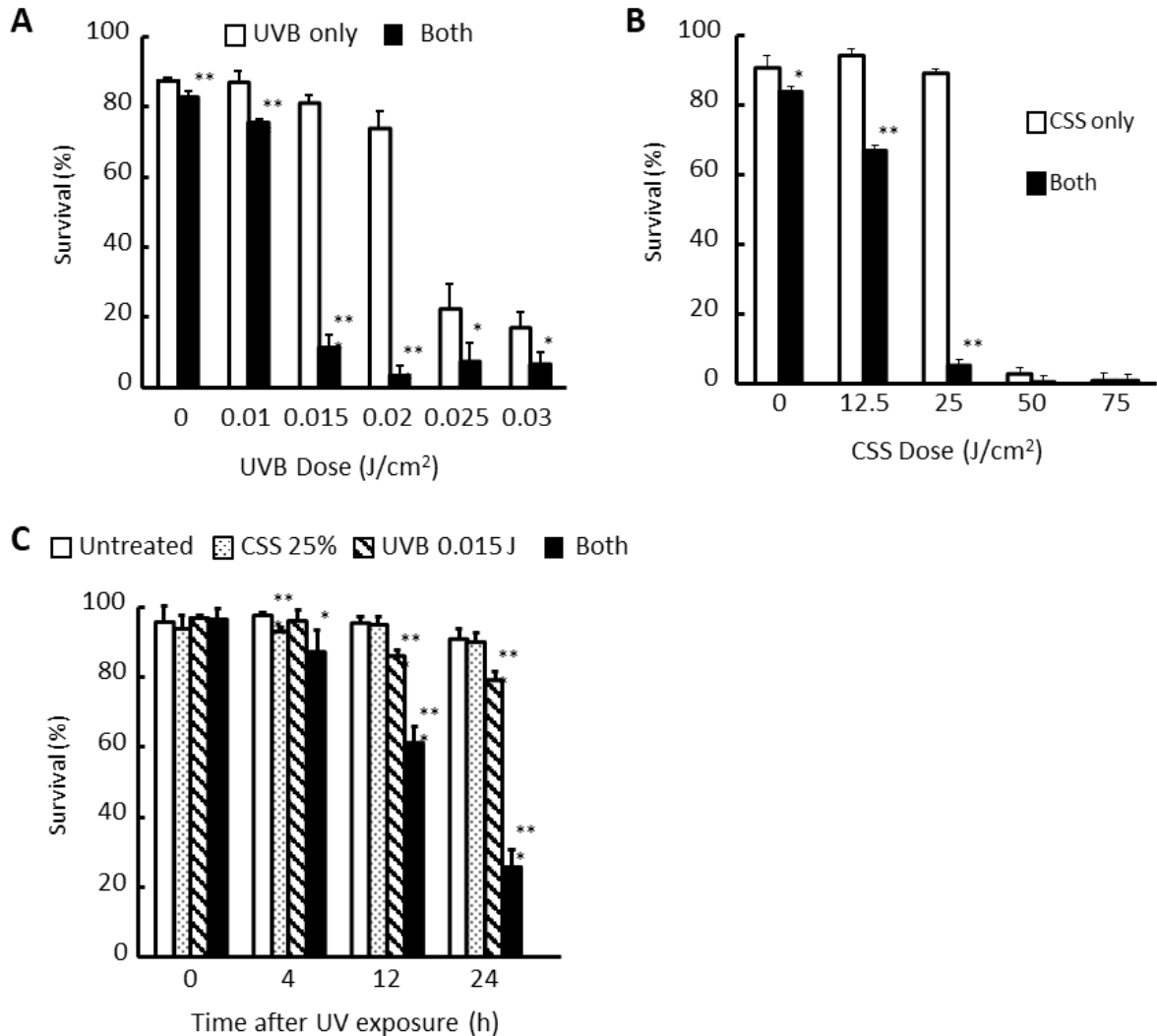


Figure 7 CSS enhances UV-induced cell death

(A) HaCaT cells were treated with CSS (25%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (~0.03 J/cm²). After a further culture for ~24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. Data are presented as the mean ± S.D. (n=3). * p<0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (UVB vs. both).

(B) HaCaT cells were treated with CSS (~75%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.015 J/cm²). After a further culture for ~24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. Data are presented as the mean ± S.D. (n=3). * p<0.05, *** p < 0.001 (CSS vs. both).

(C) HaCaT cells were treated with CSS (25%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.015 J/cm²). After a further culture for ~24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. Data are presented as the mean ± S.D. (n=3). * p<0.05, *** p < 0.001 (vs. untreated).

UVB 照射後、生存率は線量依存的に下がった。0.025 J/cm²では 80%程度の細胞死が確認された。一方、CSS 25%を前処理した場合、0.015 J/cm²で 90%程度の細胞死が認められた (Fig. 7A)。CSS 濃度依存性を調べた結果、CSS のみでは 50%の濃度で細胞死が認められたが、UVB と複合暴露した場合、12.5%, 25%の条件で濃度依存的に劇的な細胞死が検出された (Fig. 7B)。さらに、照射後の時間経過による細胞死をカウントした。コントロールや 25% CSS のみの場合、細胞死が認められなかった。UVB のみの場合、照射後 24 時間で約 20%の細胞死が認められた。一方、複合暴露した方は時間依存的に劇的な細胞死が確認され、例えば 24 時間後では約 80%の細胞死が検出された (Fig. 7C)。

1-3-2-2 CSS 作用による UV 照射後の NER の遅延

HaCaT 細胞を用いて検討を行った。CSS 作用 1 時間後、PBS (+) に変え、UVB の照射を行った。まず、照射後 6-4PPs の生成と修復を ELISA で調べた (Fig. 8A)。照射後 6-4PPs の生成量は CSS 作用の有無にかかわらず、ほぼ同じであった。2 時間経つと、6-4PPs の修復が認められたが、CSS 作用によりこの修復は遅延した。この遅延は濃度依存的にであった。

Dot-blot 法においても同じ傾向が確認された (Fig. 8B)。6-4PPs 量を示す黒いバンドは 90 分経つとほぼ消失した。一方、CSS 作用させた方はその消失が遅くなった。

さらに、6-4PPs、CPDs の修復への影響を局所照射法で調べた。6-4PPs や CPDs を示すフォーカスを持つ細胞数は CSS 作用の有無にかかわらず、ほぼ同じであった。一方、6-4PPs のフォーカスは 1 時間経つと半分程度が消え、修復されたが、25%や 50% CSS を作用した場合、6-4PPs のフォーカスの消失は阻害された (Fig. 8C)。CPDs のフォーカスは 24 時間後で半分程度消失したが、CSS 作用によりフォーカスの消失が阻害された。この阻害現象は 36 時間まで続くことが観察された (Fig. 8D)。

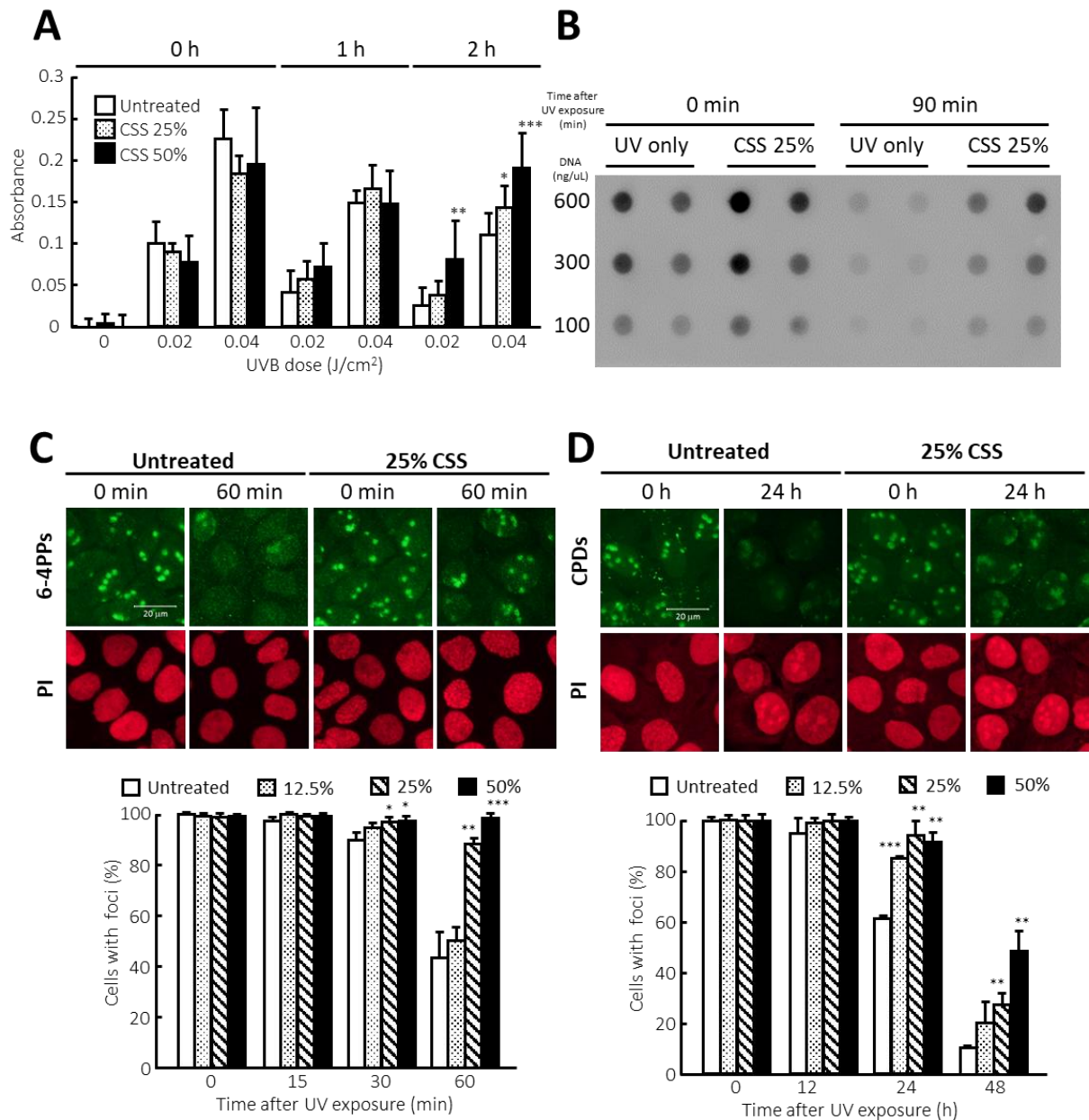


Figure 8 CSS inhibits NER *in vitro*

(A) HaCaT cells were treated with CSS (25 or 50%) and exposed to UVB (~0.04 J/cm²). The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA.

(B) HaCaT cells were treated with CSS (25%) and exposed to UVB (0.02 J/cm²). A dot-blot assay was used to detect the formation or repair of 6-4PPs.

(C) HaCaT cells were treated with CSS (~50%) and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). After an ~1 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs (green). Nuclei were stained with PI (red). The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

(D) HaCaT cells were treated with CSS (~50%) and exposed to UVC with a filter. After an ~48 h incubation, immunofluorescence staining was performed for CPDs (green). Nuclei were stained with PI (red).

1-3-3-3 細胞株の違いにおける CSS 効果の差についての検討

これまでヒト表皮角化細胞である HaCaT を用いて検討してきたが、さらに、扁平上皮がん細胞である HSC-1 (Fig.9A, C), ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 (Fig. 9B, D) を用いて CSS 作用による NER の遅延について検討した。HSC-1 細胞は CSS 75%から濃度依存的に生存率の減少を示した。UVB 照射により、CSS 作用した場合は濃度依存的に細胞死が亢進した(Fig.9A)。A549 の場合、CSS のみの場合、100%を作用しても、生存率の低下が認められなかったが、UV に暴露させると、50%以上の CSS を作用した場合のみ、CSS 濃度依存的な細胞死の亢進が認められた(Fig.9B)。CSS 作用による UV 照射後の細胞死の亢進は、HSC-1 細胞と A549 細胞は HaCaT 細胞 (Fig. 7) に比べ、効果が弱かった。

6-4PPs の生成や修復を局所照射法で調べた。HaCaT 細胞に 50% CSS 作用した場合は 1 時間経過しても修復が認められなかった (Fig. 8C)。一方、HSC-1 細胞の場合、照射後 6-4PPs の生成は CSS 作用の有無にかかわらず、ほぼ同じであった。修復は ~100%まで CSS 濃度依存的に阻害されたが、1 時間後、50% CSS を作用した場合半分程度の修復が認められた(Fig. 9C)。A549 細胞の場合、CSS 作用による NER 阻害効果は HaCaT 細胞や HSC-1 細胞より弱く、75%, 100%の濃度を作用しでも、1 時間後 6-4PPs は半分程度に修復された (Fig. 9D)。

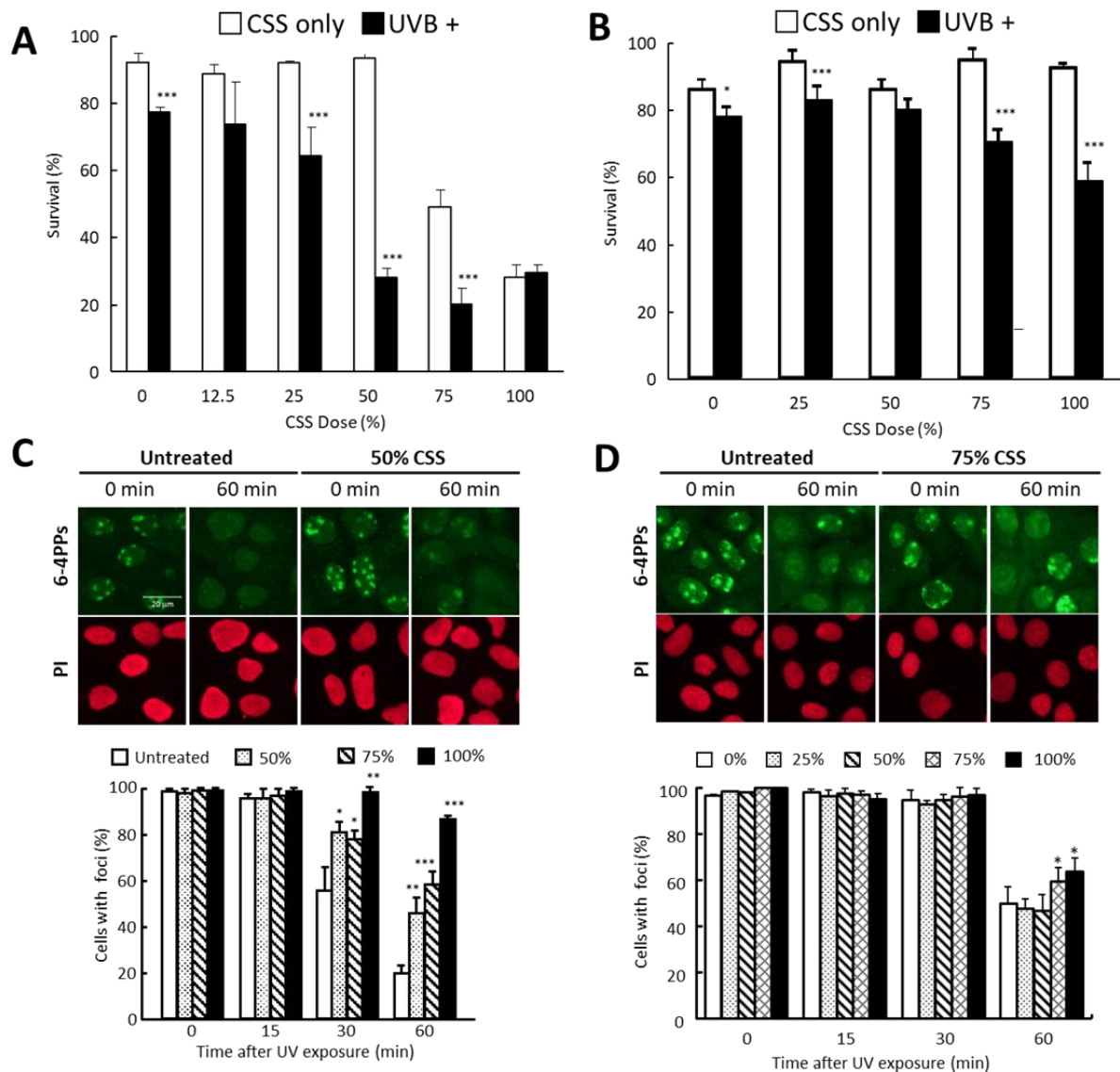


Figure 9 Difference in efficiency of CSS between cell lines

(A) HSC-1 cells were treated with CSS (~100%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.015 J/cm²). After a further culture for ~24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. Data are presented as the mean ± S.D. (n=3). *** p < 0.001 (CSS vs. both).

(B) A549 cells were treated with CSS (~100%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.03 J/cm²). After a further culture for ~24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. Data are presented as the mean ± S.D. (n=3). * p<0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (UVB vs. both).

(C) The repair of 6-4PPs was detected in HSC-1 cells. Cells were treated with CSS (~100%) and exposed to UVC with a filter. After an ~1 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs (green). Nuclei were stained with PI (red).

(D) The repair of 6-4PPs was detected in A549 cells. Cells were treated with CSS (~100%) and exposed to UVC with a filter. After an ~1 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs (green). Nuclei were stained with PI (red).

1-4 考察

NER は UV 照射により生成されるピリミジンダイマーや PAHs 暴露により生成される DNA 付加体など、DNA 螺旋構造をかく乱するような DNA 損傷を修復することが知られている [27]。たばこ煙は DNA 付加体を生成させるような化学物質が大量に含まれており、多種類の DNA 付加体を形成させることが *in vivo* や *in vitro* で検証されている [34, 35]。それらたばこ煙による DNA 付加体は NER により修復されない場合、たばこ煙暴露による発がんにつながる可能性がある。例として、ヒト頭頸部扁平上皮がん発がん要因の一つとしてたばこ煙暴露による NER 抑制が挙げられる [36, 37]。ヒ素への慢性暴露は皮膚がんや肺がんなど数種類のがんに繋がるが、NER を阻害するという報告もある [38]。たばこ煙中のヒ素は NER を阻害し、たばこ煙暴露による皮膚がんや肺がんを促進する可能性が示唆されている [38]。たばこ煙暴露により生成された酸化的な DNA 損傷もたばこ煙暴露による発がんにつながる。たばこ煙の長期暴露は BER を抑制し、細胞内抗酸化物質のレベルを下げ、たばこ煙暴露により肺部損傷に繋がることが報告された [39]。細菌に酸化的な DNA 損傷や DNA 付加体の修復に関与するホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼを過剰発現させると、たばこ煙の変異原性が下がるという報告がある [40]。これらの研究は主にたばこ煙の DNA 損傷や発がん性について検討したものであり、CMS より多いとされる CSS の検討はなされていない。

本章は *in vivo*、*in vitro* の両方において、CSS 暴露による NER の遅延を証明した。マウスの皮膚で検出された CSS 塗布による NER の阻害は培養細胞より効果が低かったが、それは真皮に浸透しにくいためと思われる。しかしながら、*in vivo* で NER 遅延効果を明らかにしたことは価値が高い。

CSS 作用による NER 阻害効果は HSC-1 や A549 細胞より、HaCaT 細胞の方が高かった。本研究室の先行研究で、細胞株の間にグルタチオン (glutathione: GSH) 濃度に差があることを解明した。よって、細胞株の間に CSS 作用により NER 阻害効果の差は細胞内 GSH 量にかかわると考えられた。CSS 中に含まれた NER を阻害するような反応性の高い化学物質が GSH と結合し、NER 阻害効果が軽減されたと思われる。これについて以後の章でその理由について明らかにしていく。

また、肺がん細胞 A549 に対して、CSS 作用による NER 阻害効果は低いですが、肺がんモデルとして考慮するには、正常組織とがん組織の両者を用いて CSS による NER 阻害効果の違いを考察しなければならない。従って、肺がん細胞のみならず、正常肺細胞 (WI-38 など) を用いて今後検討すべきと考えている。

第二章 CSS 作用による NER 遅延のメカニズム

2-1 序論

第一章において、*in vivo*、*in vitro* 両方において CSS 作用による NER の遅延を証明した。NER を行うためには、NER に関連する蛋白質が損傷部位に集積する必要がある。NER では損傷部位が認識されることで修復が始まり、その後、ヘリカーゼ活性を持つ TFIIH や XPA など蛋白質が集積し、二本鎖構造を拡張させ、XPF と XPG が損傷部位に集積し切断を行う。最後に PCNA や DNA ポリメラーゼが切られた部分を修復し、NER を完了させる [30]。

本研究における NER の阻害メカニズムの可能性として次の 3 つが考えられた。一つ目は CSS による DNA 損傷を修復するために、NER 関連蛋白質が使われることによって、UV 照射後の DNA 損傷修復に使う NER 関連蛋白質が不足した可能性である。XPA ノックアウト細胞を用いて、ホルムアルデヒド (formaldehyde:FA) 作用後生存率の変化を調べた結果、細胞死が亢進したことは、その可能性を示唆している[41]。二つ目は、CSS 中の反応性の高い化学物質が NER 関連蛋白質と結合し、NER 関連蛋白質の動きを遅延させた可能性である。Luch らは、FA は NER 関連因子である DDB2 や XPC 照射後の集積や DNA との結合を阻害することを報告している [42]。三つ目は NER 関連蛋白質と CSS 中に含まれる反応性の高い化学物質が結合し、NER 関連蛋白質が分解された可能性である。例として、Tang ら[31]の研究で、CSS 中に含まれる acrolein が XPA や XPC を減少させることが報告されている。アルデヒド類に暴露することにより、アルデヒドが付加した蛋白質はプロテアソームにより分解されることが知られているので [43, 44]、NER 関連蛋白質は CSS 作用により分解される可能性が考えられる。

そこで本章では、GGR や TCR 両方に関連する蛋白質 TFIIH や XPA, XPG の集積を局所照射法で可視化し、NER 関連蛋白質のピリミジンダイマー生成部位への移行に対する CSS 作用の影響を検討した。また、CSS 作用後、TFIIH など NER 関連蛋白質総量を検討した。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 CSS の抽出法

1-2-1 と同様に行った。

2-2-2 細胞の培養法

1-2-6 と同様に行った。

2-2-3 局所照射法による NER 関連蛋白質集積の検出

細胞の培養や照射条件は 1-2-11 と同様に行った。実験方法として UVC 照射後、0.5% FBS DMEM 培地に交換し、一定時間で glass dish を 5% formalin 溶液で 15 分間固定、

回収した。その後、抗体と反応しやすくするため、2% triton X-100 溶液で3分間反応させた。抗体を0.2% triton 1% BSA 溶液に溶かし、室温で1時間以上反応させた。一次抗体 (Rabbit anti-TFIIH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:200; Rabbit anti-XPA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:200; Rabbit anti-XPG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:200) 作用後 PBS (-) で3回洗浄し、二次抗体(FITC-conjugated*AffniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA) 1:300)を作用させ、再度 PBS (-) で3回洗浄した。二重染色をするため、5% formalin 溶液で15分間固定し、さらに、2N HClを20分でDNA二本鎖構造を解き、CPDs、6-4PPsの抗体と反応しやすくようにした。一次抗体 (Mouse anti-CPDs (Cosmo Bio Ltd., Japan) 1:600; Mouse anti-6-4PPs (Cosmo Bio Ltd., Japan) 1:600) と二次抗体 (Cy5-conjugated AffniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA) 1:300) を作用させた後、PI溶液をPBSで1/1000の割合で希釈し、核のDNAを染めた。最後に glass dish をマウント剤 (Fluoroshield: ImmunoBioScience Co., USA) でスライドガラスに固定し、蛍光顕微鏡 (IX70: Olympus Ltd., Japan) で観察し、写真撮影した。数枚の写真が無作為に選択し、全細胞 (60-80 個/枚) のフォーカスの有無を計数し、統計処理した。照射に用いたフィルターに存在する穴の数はランダムなので、細胞一つに対して複数のフォーカスが存在しても、一つしかフォーカスが存在しなくても、フォーカス「有」と判定した。

2-2-4 Western blot 法による NER 関連蛋白質総量の検出

[試薬調製]

Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40 の割合で混合した後、4°C冷暗所で保存した。

電極液: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate の割合で混合した後、室温で保存した。

Blotting buffer: 100 mM Tris, 192 mM glycine, 5% methanol の割合で混合した後、室温で保存した。

CBB 染色液: 25% ethanol, 10% acetic acid の割合で混合した後、CBB を適量に入れ、室温で保存した。脱色液は CBB を入れてない混合液を使用した。

T-PBS: 0.1%と0.3%の割合で tween 20 と PBS を混合した後、室温で保存した。

1% skim milk: 実験直前に skim milk を1%の割合で PBS に溶解した。

[細胞の溶解]

CSS 作用後、細胞を回収し、適量な lysis buffer で懸濁し、超音波処理した。2時間氷上で静置後、12000 rpm で遠心し上澄みを採集した。

蛋白質定量キット (DC Protein Assay: Bio-Rad Ltd., USA) で蛋白質を定量した後、蛋白質量を lysis buffer で合わせ、2x sample buffer と1:1で混合し、電気泳動用サンプルとした。

[Western blotting]

15%アクリドアミドゲルで電気泳動した。先端マーカークがゲルの一番下に到達するまで泳動分離した。セミドライブロットング装置 (AE6675: ATTO Co. Japan) で 80 mA、1 時間 PVDF 膜 (Immobilon Transfer Membranes Immobilon-P: Millipore Ltd., USA) に蛋白質を転写した。

CBB 染色液で 5 分間染色した後、脱色液で 10 分間 3 回脱色した。その後、PBS で 5 分間洗浄し、泳動パターンをスキャンした。膜を 1% skim milk で 30 分間ブロッキングした後、一次抗体を 0.1% TPBS:1% skim milk (1:1) の溶液で希釈し、4°Cで 8 時間以上振とう反応させた。一次抗体 (Rabbit anti-TFIIH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Rabbit anti-XPA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Goat anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Goat anti-Actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)) 反応後、0.1% TPBS で 3 回洗浄し、TPBS/milk 混合液で二次抗体 (Peroxidase-conjugated AffniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA); Peroxidase-conjugated AffniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Ltd., USA)) を希釈し、2 時間以上室温で振とう反応させた。その後、0.3% TPBS で 3 回、0.1% TPBS で 1 回洗浄し、化学発光キット ECL+ (Pierce Western Blotting Substrate Plus: Thermo Scientific Ltd., USA) を用いて検出を行った。

2-2-5 検定法

すべての実験は、3~4 回繰り返し、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している。有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置分散分析 (analysis of variance :ANOVA) により行った。統計的な有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ で表した。

2-3 実験結果

2-3-1 CSS 作用による NER 関連蛋白質集積の遅延

HaCaT 細胞を用いて、局所照射法で NER 関連蛋白質照射後の集積を検討した (Fig. 10-13)。照射後 15 分間、TFIIH (Fig. 10), XPA (Fig. 11), XPG (Fig. 12) の集積が認められた。そして、30 分から 60 分にかけて DNA 損傷の修復とともに、それらは DNA から離れた。CSS 作用は NER 関連蛋白質の集積を濃度依存的に阻害した。CSS 12.5%や 25%を作用した場合、比較的弱い集積の阻害が認められたが、50%ではほぼ完全に阻害された。

HSC-1 細胞において同様に検討を行った (Fig. 13)。その結果、CSS 75%や 100%を作用した場合集積の遅延が認められた。HaCaT 細胞は 50%で完全に TFIIH の集積が阻害されたので (Fig.10)、HSC-1 細胞において CSS 作用による NER 関連蛋白質集積阻害の効果は HaCaT 細胞より弱いことが明らかになった。

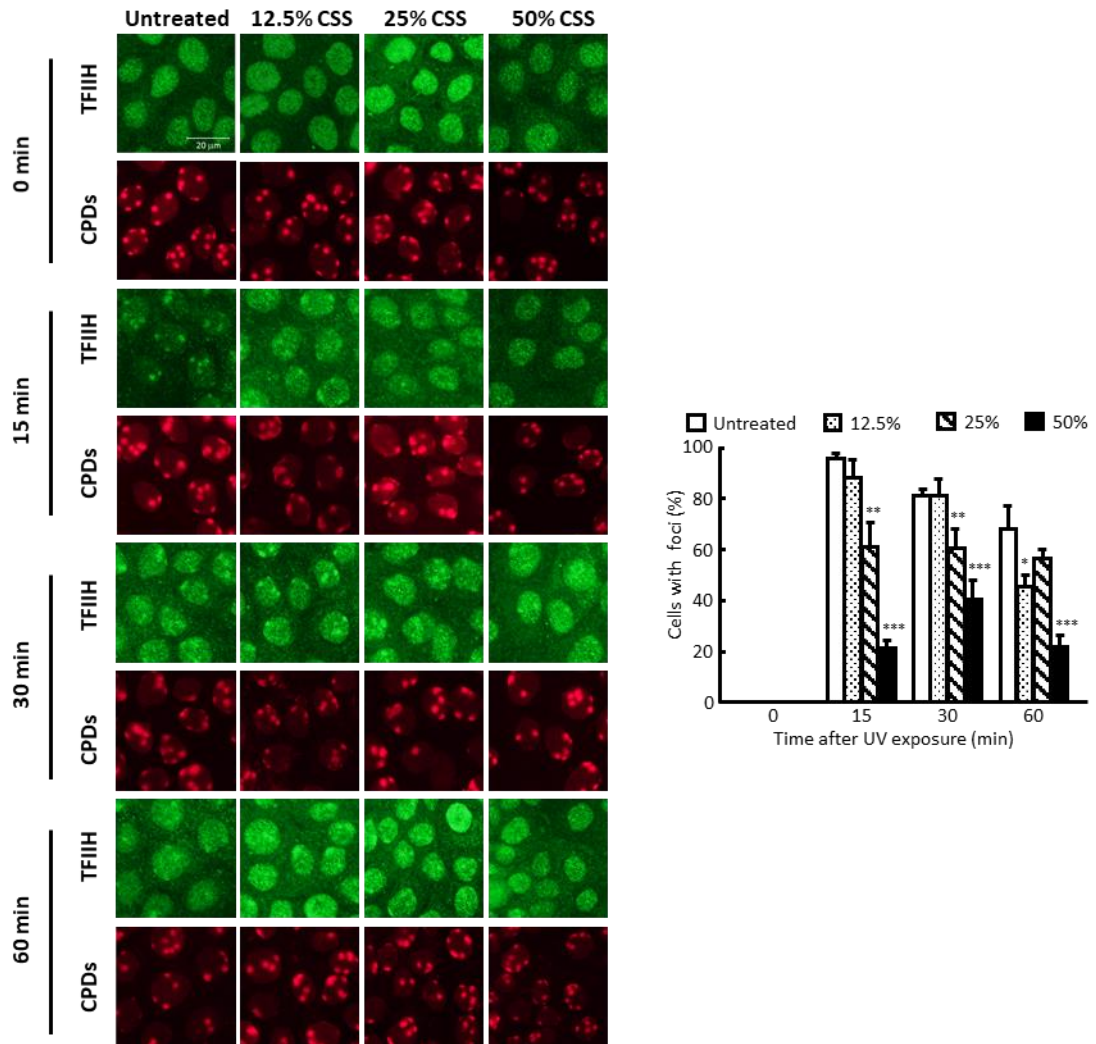


Figure 10 CSS inhibits the recruitment TFIIH

HaCaT cells were treated with CSS (~50%) for 1 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). The recruitment of TFIIH was detected by immunofluorescence staining. CPDs were stained to find the sites of DNA damage. 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated. Data are presented as the mean ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p < 0.001 (vs. untreated).

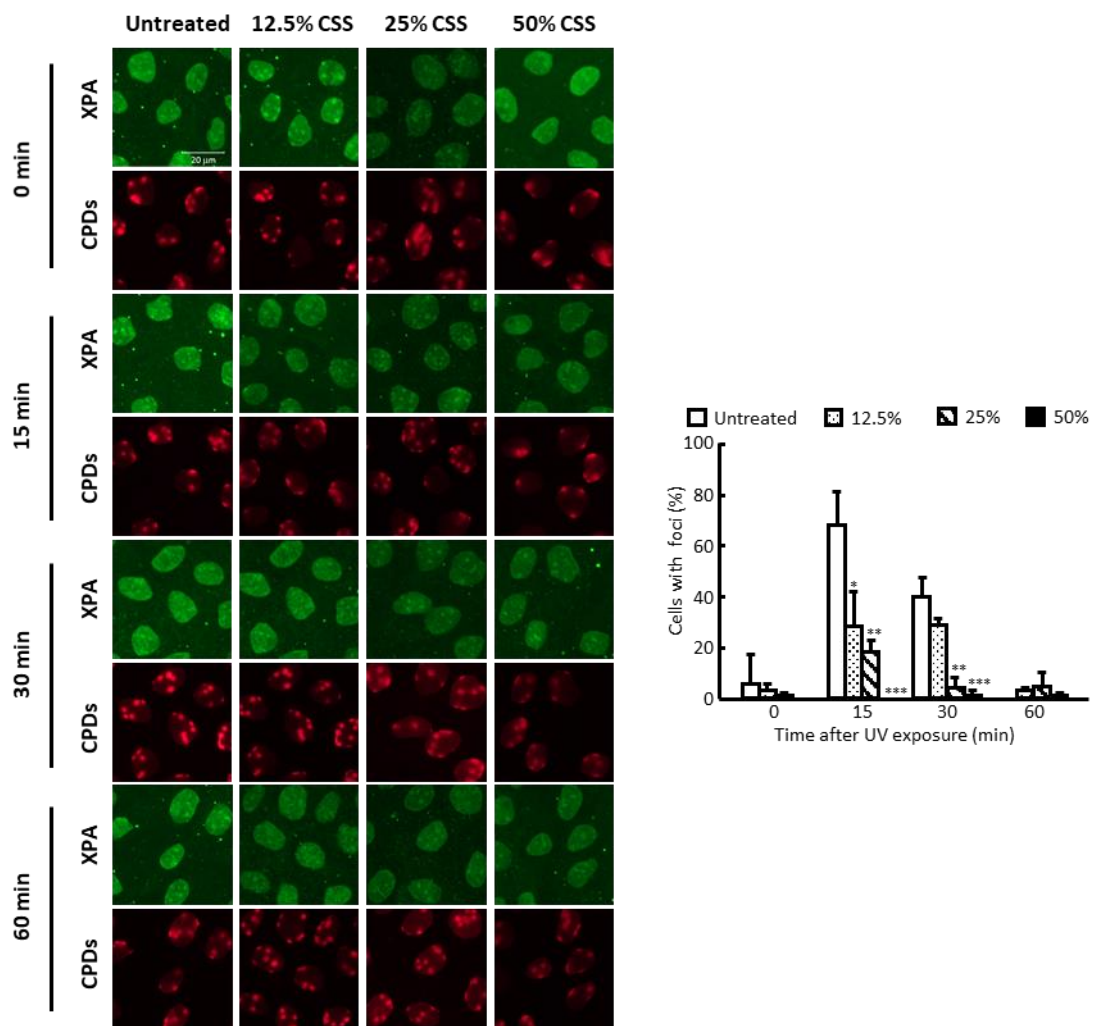


Figure 11 CSS inhibits the recruitment of XPA

HaCaT cells were treated with CSS (~50%) for 1 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). The recruitment of XPA was detected by immunofluorescence staining. CPDs were stained to find the sites of DNA damage. 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated. Data are presented as the mean ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p < 0.001 (vs. untreated).

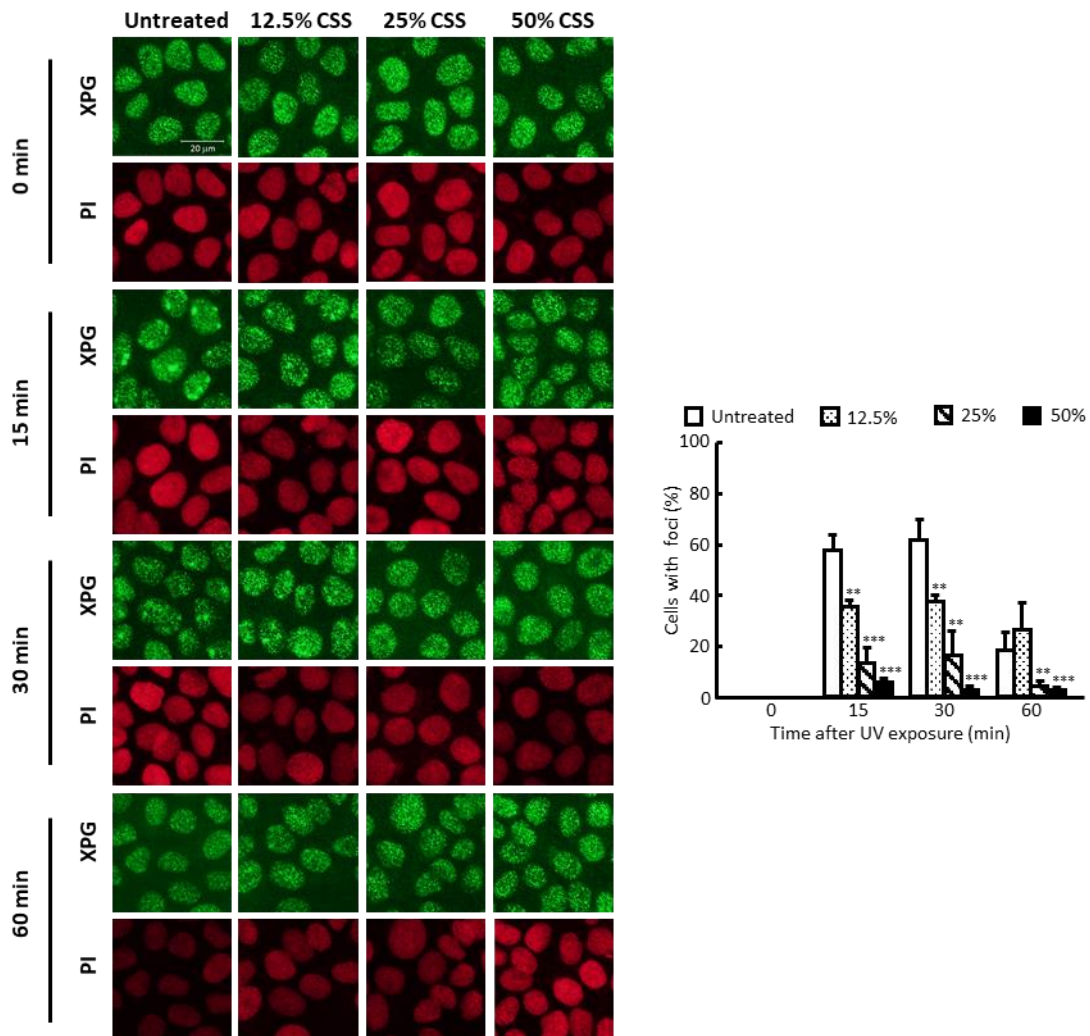


Figure 12 CSS inhibits the recruitment of XPG

HaCaT cells were treated with CSS (~50%) for 1 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). The recruitment of XPG was detected by immunofluorescence staining, nuclei were stained with PI because the antibody for XPG originated from mice, similar to the antibodies for pyrimidine dimers. 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated. Data are presented as the mean ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p < 0.001 (vs. untreated).

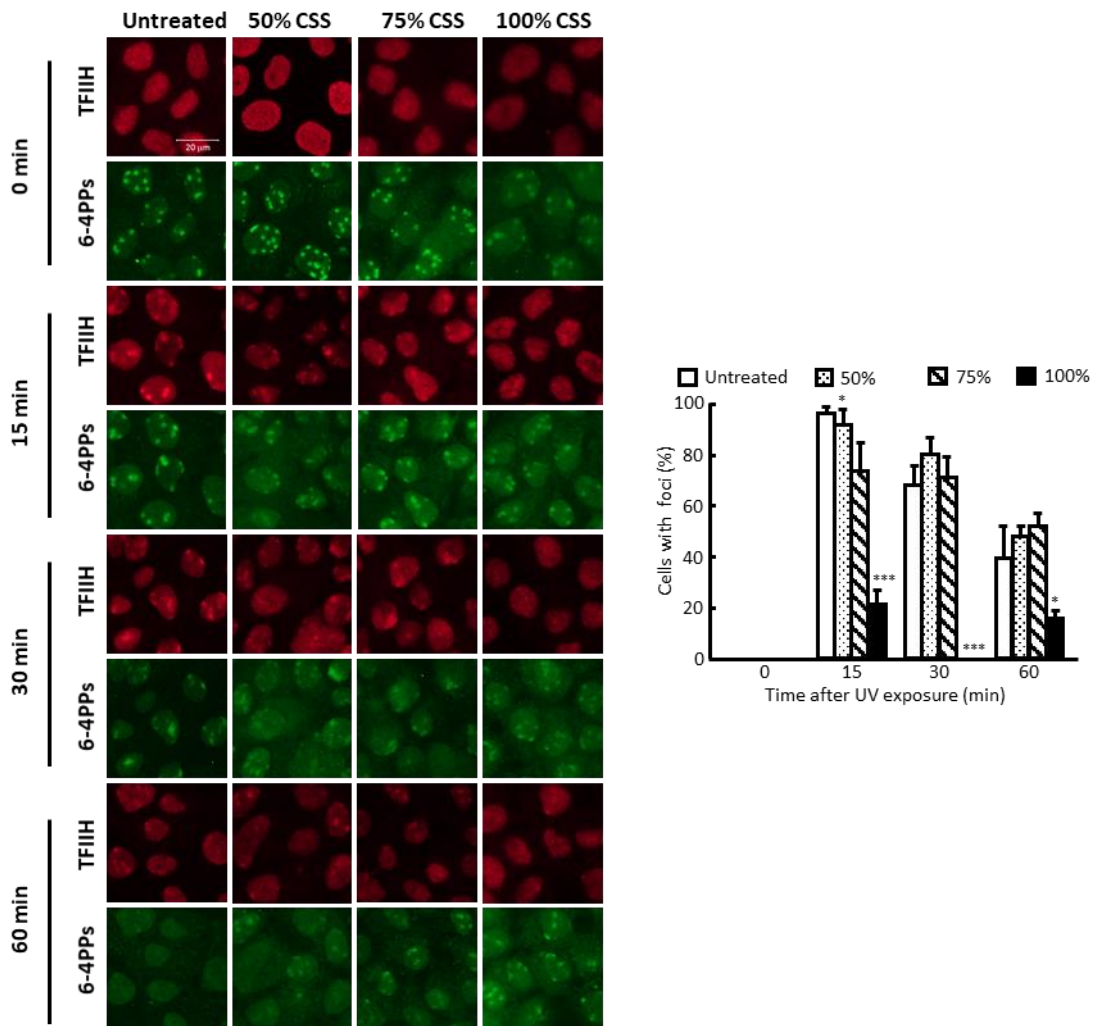


Figure 13 CSS inhibits the recruitment of TFIIH in HSC-1 cells

HSC-1 cells were treated with CSS (~100%) for 1 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). The recruitment of TFIIH was detected by immunofluorescence staining. 6-4PPs were stained to find the sites of DNA damage. 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated. Data are presented as the mean ± S.D. *p<0.05, **p<0.01, ***p < 0.001 (vs. untreated).

2-3-2 CSS 作用による NER 関連蛋白質の分解

CSS 作用後、NER 関連蛋白質の総量を Western blot 法で検討した (Fig. 14A)。Actin を loading control として検出した。TFIIH と XPA の場合、CSS 作用後 30 分から 1 時間に時間や濃度依存的な減少が認められた。PCNA では CSS 作用による分解は認められなかった。NER ではなく、ほかの DNA 修復に関連する蛋白質 Mre11 や Ku70 についても検討した。その結果、Mre11 は TFIIH や XPA と同じよう CSS 作用により分解されたが、Ku70 では分解が認められなかった。

プロテアソーム阻害剤である MG132 を前作用させると、CSS 作用による NER 関連蛋白質の減少が抑えられた (Fig. 14B)。

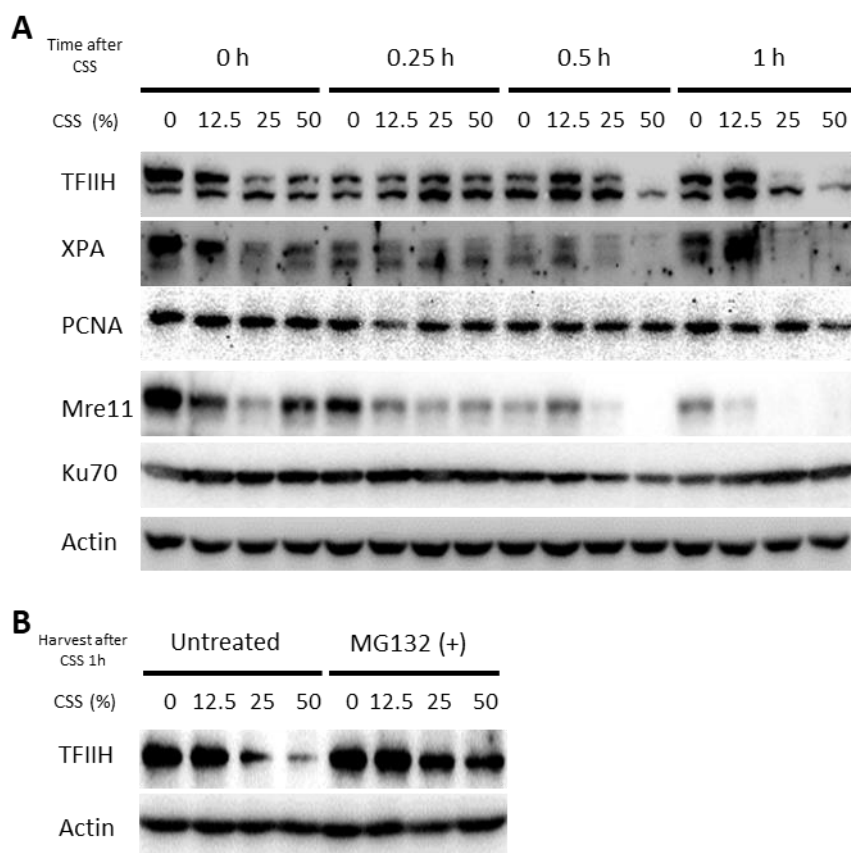


Figure 14 CSS degrades NER-related proteins

(A) HaCaT cells were treated with CSS (12.5, 25 or 50%) for ~1 h. Then were harvested and lysed for western blotting to detect expression levels of TFIIH, XPA, XPG, Mre11 and Ku70. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

(B) HaCaT cells were pretreated with MG132 (10 mM) for 30 min followed by treatment with CSS (12.5, 25 or 50%) for 1 h.

2-4 考察

序論で述べたように、NER は GGR と TCR に分けられる。GGR は DNA 二重らせん構造に歪みができるような損傷を発見し、修復することで遺伝子の変異を防ぐ。一方、TCR は転写をブロックするような DNA 損傷を修復し、正常な遺伝子の転写を確保することで、細胞死を防ぐ [26,27]。第一章で示されたように、CSS 作用により細胞生存率の低下が認められたので、本実験においては TCR が阻害された可能性が考えられる。

NER を行うには、まず DNA 二重らせん構造の歪みのある部分を認識する。次にヘリカーゼ活性を持つ複合体により二重らせん構造を切り開く [26,27]。そして、エンドヌクレアーゼ活性を持つ因子が損傷を切り取る。最後に、切られた部分が埋め込まれる。本章では、CSS 作用後、TFIIH や XPG 及び XPA 照射後の挙動について、局所照射法で可視化させ、検討を行った。TFIIH は 9 つサブユニットで構成した複合体であり、ヘリカーゼ活性を持ち、DNA の二重らせん構造を切り開く。XPG はエンドヌクレアーゼ活性を持ち、DNA 損傷の 3' から切断する役割を持つ NER 関連蛋白質である [26,27]。XPA は RPA, ERCC1, DDB2 や TFIIH など修復関連蛋白質と結合し、TFIIH により切り開いた構造を支える [26,27]。これらの NER に関連する蛋白質は照射後迅速に DNA 損傷に集積することが知られている。XPG の場合、照射後迅速に DNA 損傷部位に集積し、半減期約 200 秒で DNA 損傷部位と約 4 分間結合する。この結合は正常機能を持つ TFIIH が必要と報告されている [45]。本実験においては、TFIIH など NER 関連因子が照射後急速に損傷部位へ集積したことを観察できた (Fig. 10)。一方、CSS を前作用した場合、紫外線照射後の蛋白質集積の遅延が認められた。TFIIH や XPA は二本鎖構造を拡張する役割を持ち、NER 修復の上流で働くが、その上流にさらに DDB2 や XPC など DNA 損傷を認識する蛋白質が存在する [26,27]。今回は NER 全体について検討するため、GGR と TCR を共有し、かつ最上流である TFIIH や XPA を検討した。XPC や DDB2 などは今回検討していないが、仮に CSS 作用によりそれら損傷認識蛋白質集積が抑制されたとしたら、下流にある蛋白質の集積が必要とされるので、TFIIH や XPA など下流にある蛋白質の集積が抑制される可能性も考えられる。XPG の集積は遅延されたが、XPG の集積は正常機能を持つ TFIIH が必要という報告があるので [45]、CSS と XPG の直接的な結合だけではなく、TFIIH と XPG の相互作用の抑制も XPG 集積の抑制の原因になる可能性が考えられた。

これまでにたばこ煙を作用し、紫外線照射後、NER 関連する蛋白質である XPC、XPA、XPG の挙動について検討した研究はいくつかある。Holcomb らはたばこ煙抽出物~200 µg/mL を人肺細胞 IMR-90 に 24 時間作用した。その結果、NER が阻害され、NER に関連する XPC の分解も認められた。一方、NER 関連因子である XPA の方は分解されなかった [28]。Lee らはたばこ煙をマウスに吸入暴露させたところ、8 週間の連続暴露では、蛋白質に影響はなかったが、16 週間の連続暴露では NER 関連因子である XPG 及び BER 関連因子である hOGG1 の減少を誘導した [29]。本章では、二本鎖切断や DNA-蛋白質架橋など DNA 損傷修復に関連する Mre11 の CSS 作用後の分

解を示した。つまり、CSS 作用は NER だけではなく、他の DNA 損傷修復経路にも影響する可能性を示した。また、NER 関連蛋白質である PCNA と NHEJ に関連する Ku70 は CSS 作用による減少は認められなかったことで、すべての蛋白質が CSS の影響を受けるわけではないことが明らかになった。

序論に述べたように、アルデヒド類により付加体ができただ蛋白質はプロテアソーム、その中でも 20S プロテアソームにより分解される [43, 44]。本章では、プロテアソーム阻害剤 MG132 作用後、CSS 作用による TFIIF 減少の阻害を明らかにした(Fig.14B)。よって、CSS 作用による NER 関連蛋白質集積の阻害は NER 蛋白質プロテアソームにより TFIIF が分解されたことによると考えられた。

また、CSS 作用後、NER とは別の DNA 修復経路を使う DNA 損傷を誘発する複数の試薬を作用し、DNA 二本鎖切断マーカーである γ -H2AX を検出したところ [63]、酸化的な DNA 損傷を誘導する H_2O_2 、一本鎖切断を誘導する etoposide や二本鎖切断を誘導する bleomycin のいずれも γ -H2AX の抑制が認められた(データ示さず)。 γ -H2AX は DNA 損傷修復にとって重要な役割を果たしているため [64]、CSS は NER 以外の DNA 損傷の修復にも影響すると考えられる。

本章では、NER 関連因子集積は CSS 作用により抑制されること、この集積の抑制の原因は NER 関連蛋白質の CSS 作用による分解であることを明らかにした。

第三章 CSS 作用による NER 遅延原因物質の究明

3-1 序論

第一、二章において、CSS は NER を遅延させることを証明した。また、CSS による NER 遅延の原因は TFIIH など NER 関連蛋白質が分解されることによる集積の抑制である可能性が示された。では、CSS 中の何が NER 関連蛋白質と結合し、NER 関連蛋白質の分解を誘導したのであろうか？そこで、原因となる化学物質について本章で検討した。

たばこ煙の中には約 4800 種類の化学物質が含まれる。その中に幾つか反応性の高い、もしくはその代謝物の反応性が高い化学物質が存在する [14]。代謝による活性化を必要としない最も反応性の高い化学物質として、アルデヒド類が挙げられる。CSS に含まれるアルデヒド類は、最も構造が単純な FA のようなアルデヒド類、 α,β -不飽和アルデヒド類、飽和アルデヒド類の 3 種類に分けられる [47]。単純アルデヒドである FA はアルキル基を持たないため、反応性がアルデヒド類の中で特に高いといわれる。 α,β -不飽和アルデヒド類はアルデヒド基に加え、 α と β 炭素の間に二重結合を持ち、求電子攻撃を受けやすいため反応性が高いといわれる [47-48]。FA や不飽和アルデヒド類である acrolein や crotonaldehyde は蛋白質やペプチド中の SH 基と結合し、蛋白質の分解を誘導することが報告されている [49-52]。Hilton らは NER 関連因子 XPA には、アルデヒド類と反応しやすいリジン残基が構造中に多数存在していることを明らかにした [46]。これらの報告から CSS 中の FA や不飽和アルデヒド類は NER 蛋白質と結合し、分解を誘導させる可能性が考えられる。

そこで本章では、まず、アルデヒド類と反応しやすいアミノ基を構造中に持つセミカルバジド (Semicarbazid: SEM) を用いて、CSS からアルデヒド類を除去し、NER 阻害におけるアルデヒド類の関与を検討した。また、FA, acrolein, crotonaldehyde, *trans*-2-pentenal, propionaldehyde, butyraldehyde, valeraldehyde 7 種類のアルデヒドを作用し、UV 照射後の NER の効率について検討した。*trans*-2-pentenal や valeraldehyde は CSS 中にほとんど存在しないが、飽和及び不飽和アルデヒド類との比較のため検討した。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 細胞の培養及び UVB の照射法

HaCaT 細胞は 1-2-4 と同様に培養した。UVB の照射は 1-2-5 と同様に行った。

3-2-2 細胞へのアルデヒド類等の作用法

コンフルエント約 90%の細胞を 0.5% FBS の含まれる DMEM で培養し、アルデヒド類を 2 時間作用した。その後、PBS (+)に変え、UVB を照射した。SEM 前処理する場合には、pH を 5N NaOH で中性に調整した 3 mM の SEM を CSS 作用する 30 分間前に作用させた。CSS の作用は 1-2-1 と同様に行った。

アルデヒド類は単純アルデヒドである formaldehyde (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) を使用した。飽和アルデヒド類は propionaldehyde, n-butyraldehyde, and n-valeraldehyde (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) を使用した。不飽和アルデヒド類は acrolein (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan), crotonaldehyde (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), trans-2-pentenal (Sigma-Aldrich Co., LLC., St. Louis, MO) を使用した。それらの構造は Fig. 15 に示す。

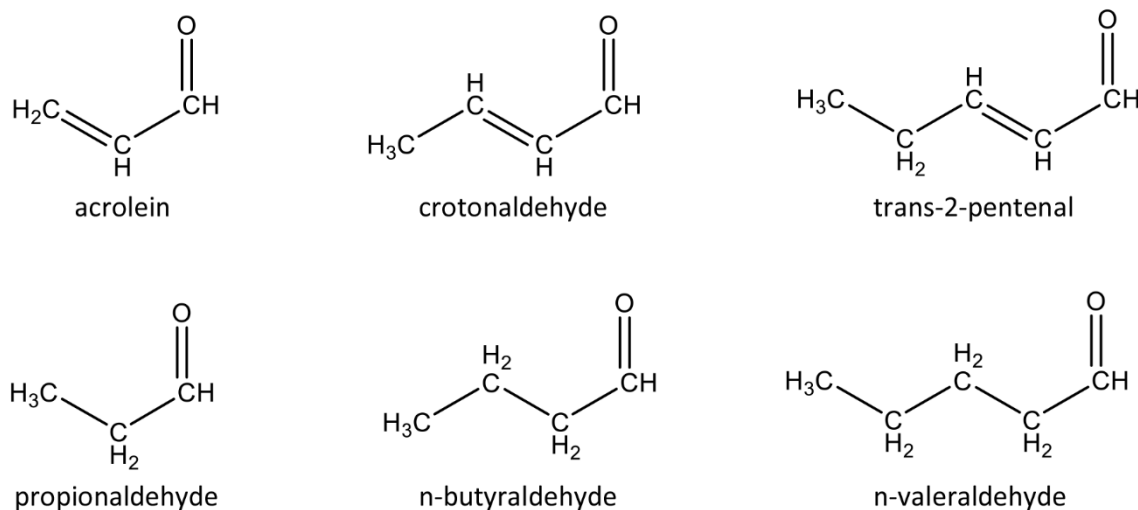


Figure 15 structure of aldehydes

3-2-3 生存率の測定

1-2-8 と同様に行った。

3-2-4 ELISA で 6-4PPs の測定

1-2-9 と同様に行った。

3-2-5 局所照射法による CPDs、6-4PPs 及び照射後 NER 関連因子集積の検出

1-2-11、2-2-3 と同様に行った。

3-2-6 Western blot 法による NER 関連蛋白質総量の検出

2-2-4 と同様に行った。

3-2-7 検定法

すべての実験は、3~4 回繰り返し、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している (n=4~200)。有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置 analysis of variance (ANOVA) により行った。統計的な有意性は、* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 で表した。

3-3 実験結果

3-3-1 セミカルバジド (semicarbazide :SEM) によるアルデヒド類の除去と CSS 作用による NER 阻害効果

SEM は 3 つのアミノ基を構造中に持ちアルデヒドと結合する。本研究室の先行研究で、SEM は FA と結合することを質量分析計により確認している [53]。そこで、SEM を用いてアルデヒドを除去し、CSS 作用による 6-4PPs 修復の遅延に対する影響を ELISA で検討した (Figure. 16A)。UVB 照射直後、6-4PPs の生成は CSS 作用有無にかかわらず、ほぼ同じであったが、2 時間後の修復は CSS 作用により阻害された。この NER の阻害は SEM 前処理により回復した。

局所照射法で SEM 作用後の 6-4PPs の修復をさらに調べた (Fig. 16B)。その結果は ELISA と同様であり、CSS 作用による濃度依存的な NER 遅延は SEM 前作用により軽減した。50% CSS 作用させた場合は、90 分経過しても 6-4PPs のフォーカスを持つ細胞は約 10%しか修復されていない。一方、SEM を前処理すると、90 分後の修復率は約 40%程度にまで回復した。

さらに、SEM で前作用し、CSS 作用後の NER 関連因子集積の阻害を検出した (Fig. 16C)。TFIIH の場合、CSS 作用による集積の阻害は SEM 前作用により大幅に回復した。50% CSS を作用した場合でも、TFIIH は通常とほぼ同じ割合で集積した。

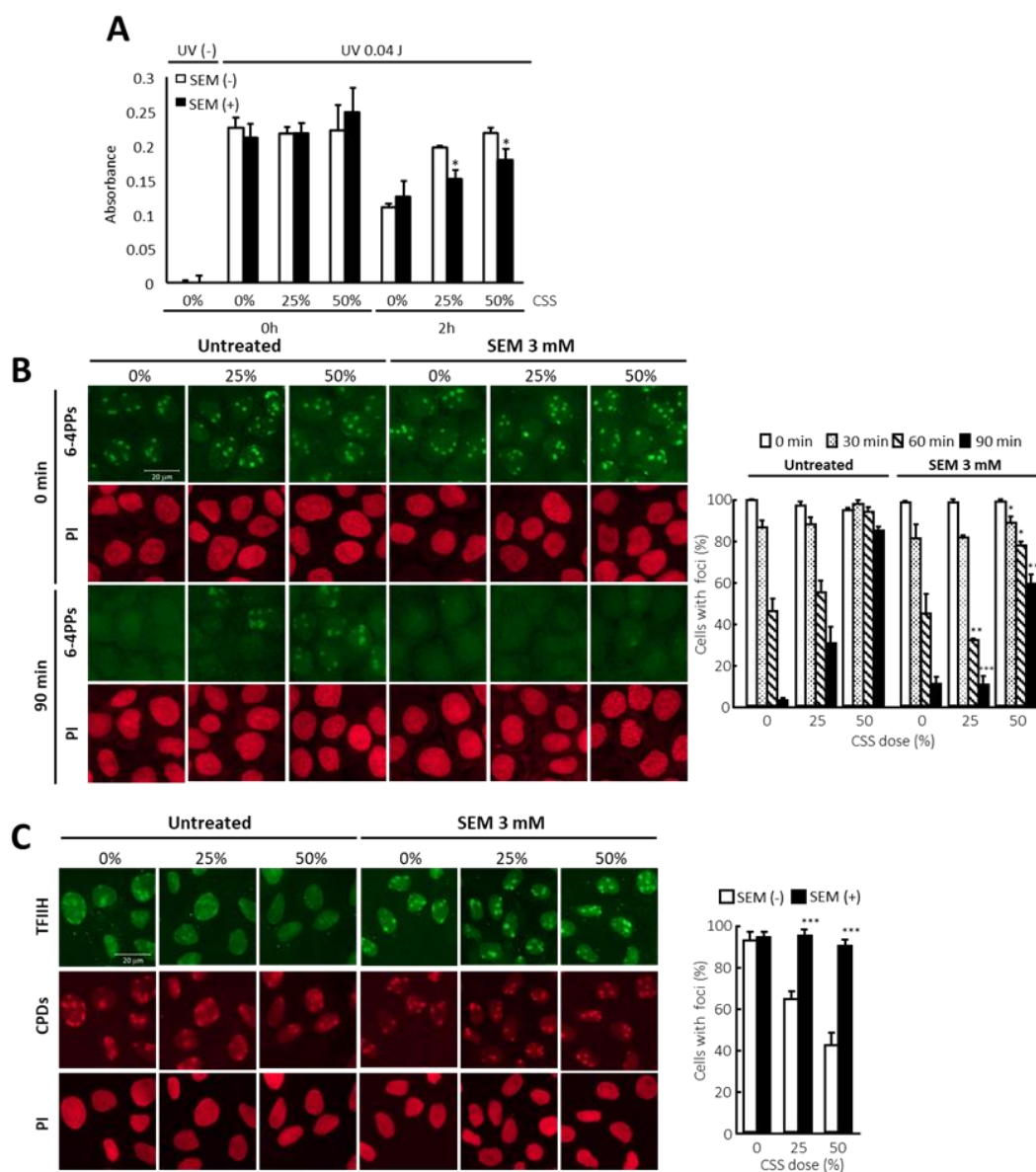


Figure 16 SEM recovers the CSS-induced delay in NER

HaCaT cells were treated with SEM (3 mM) for 1 h, treated with CSS (25 or 50%) for 1 h, and then irradiated with UV.

(A) Cells were exposed to UVB (0.04 J/cm²). The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA.

(B) Cells were exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). After an incubation for ~90 min, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs. Nuclei were stained with PI. The images obtained are shown in Supplementary Fig. 4A. The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

(C) Cells were exposed to UVC locally and the recruitment of the NER factor, TFIH was detected by immunofluorescence staining. CPDs were stained to find the sites of DNA damage. Nuclei were stained with PI. The images obtained are shown in Supplementary Fig. 4B. 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated.

3-3-2 FA 作用による NER の阻害

FA を HaCaT 細胞に作用させ、6-4PPs 生成と修復について検討した (Fig. 17)。照射直後、FA 作用の有無にかかわらず、ほぼ同じ量の 6-4PPs が生成した。照射後 1 時間や 2 時間を経過すると、時間依存的な 6-4PPs の修復が認められた。FA を作用した場合、NER の遅延が認められた (Fig. 17A)。

Dot blot 法においても同じ傾向が確認された (Fig. 13B)。FA 作用の有無にかかわらず、6-4PPs を示すバンドはほぼ同じであった。FA を作用させない場合、4 時間経つと 6-4PPs が殆ど修復されたが、FA を 0.3 mM で作用させた方は、4 時間経っても修復されなかった (Fig. 17B)。

局所照射法においても同じ阻害傾向が確認された (Fig. 17C)。FA 作用の有無にかかわらず、6-4PPs を示すフォーカスの生成はほぼ同様であった。1 時間経つと 6-4PPs を示すフォーカスはほとんど修復され、消失したが、0.3 mM FA を作用させた場合、照射 1 時間後、FA なしより 6-4PPs を示すフォーカスが残存していた (Fig. 17C)。CPDs の修復も FA 作用により抑えられた (Fig. 17D)。

HSC-1 細胞で FA の NER 阻害効果を検討した (Fig. 17E)。HaCaT 細胞の場合、0.3 mM FA を作用した場合、120 分で約 60% の 6-4PPs フォーカスが残存していた。一方、HSC-1 細胞の場合、0.3 mM FA を作用させても、120 分で 6-4PPs 修復の阻害は認められなかった。つまり、FA は CSS と同様に、HSC-1 に対する効果は HaCaT より弱かった。

CSS の代わりに FA を作用させ、UV 照射後の NER 関連因子の集積を調べた。CSS と同様に、FA によっても、TFIIH (Fig. 18A), XPA (Fig. 18B), XPG (Fig. 18C) の集積の阻害が認められた。5~15 分で集まった NER 関連因子は、0.3 mM FA 作用により集積がほぼ完全に阻害された。

HaCaT 細胞の代わりに HSC-1 細胞で検討した (Fig. 18D)。HaCaT 細胞で 0.3 mM から TFIIH 集積を抑制したが、HSC-1 細胞では 1 mM から TFIIH 集積の阻害効果が認められた。CSS と同様に、FA 作用により TFIIH の遅延が認められたが、効果は弱いことが示された。

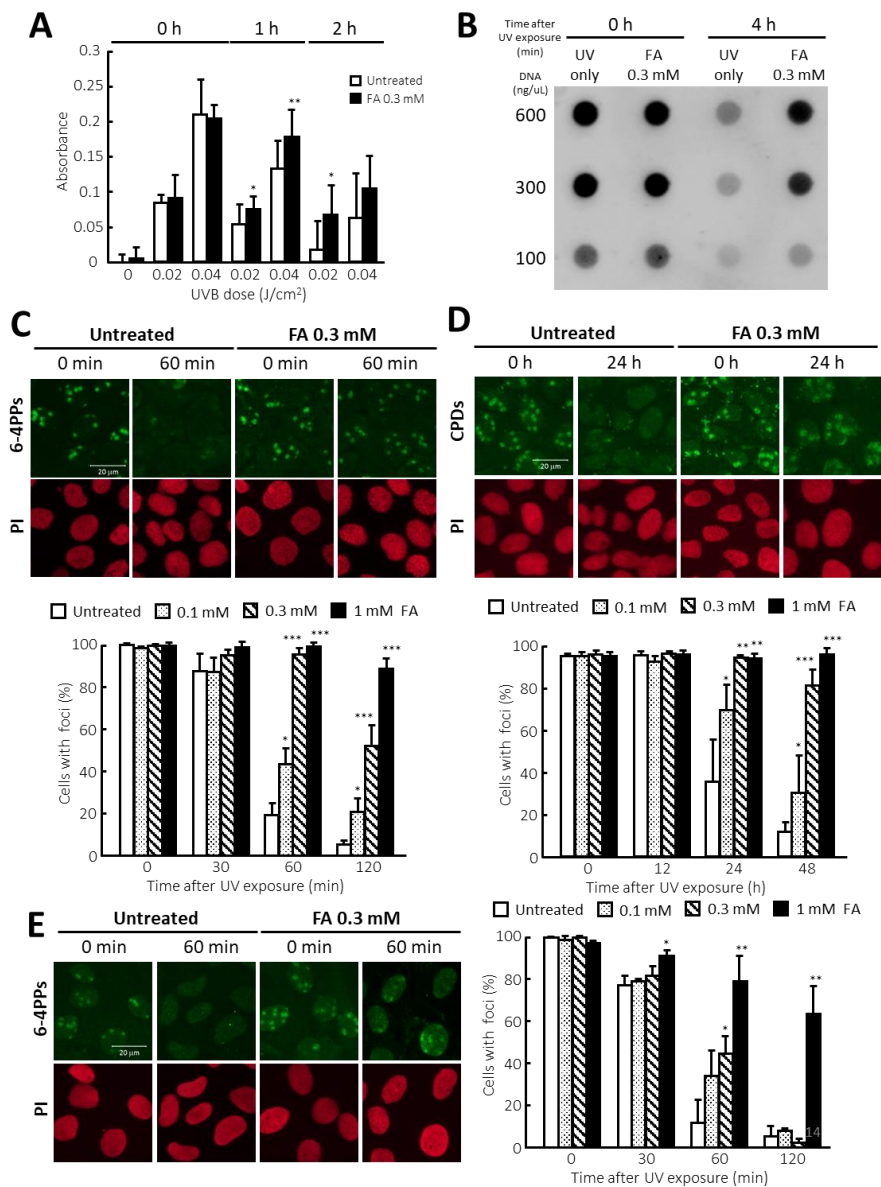


Figure 17 FA inhibits NER

(A) HaCaT cells were treated with FA (0.3 mM) and exposed to UVB (0.02 and 0.04 J/cm²). The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA. *p<0.05, **p<0.01.

(B) HaCaT cells were treated with FA (0.3 mM) and exposed to UVB (0.02 J/cm²). A dot-blot assay was used to detect the formation or repair of 6-4PPs.

(C) HaCaT cells were treated with FA (~1 mM) and exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²). After an ~2 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs. Nuclei were stained with PI.

(D) HaCaT cells were treated with FA (~1 mM) and exposed to UVC with a filter. After an ~48 h incubation, immunofluorescence staining was performed for CPDs.

(E) HSC-1 cells were treated with FA (~1 mM) and exposed to UVC with a filter. After an incubation for ~2 h, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs.

The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

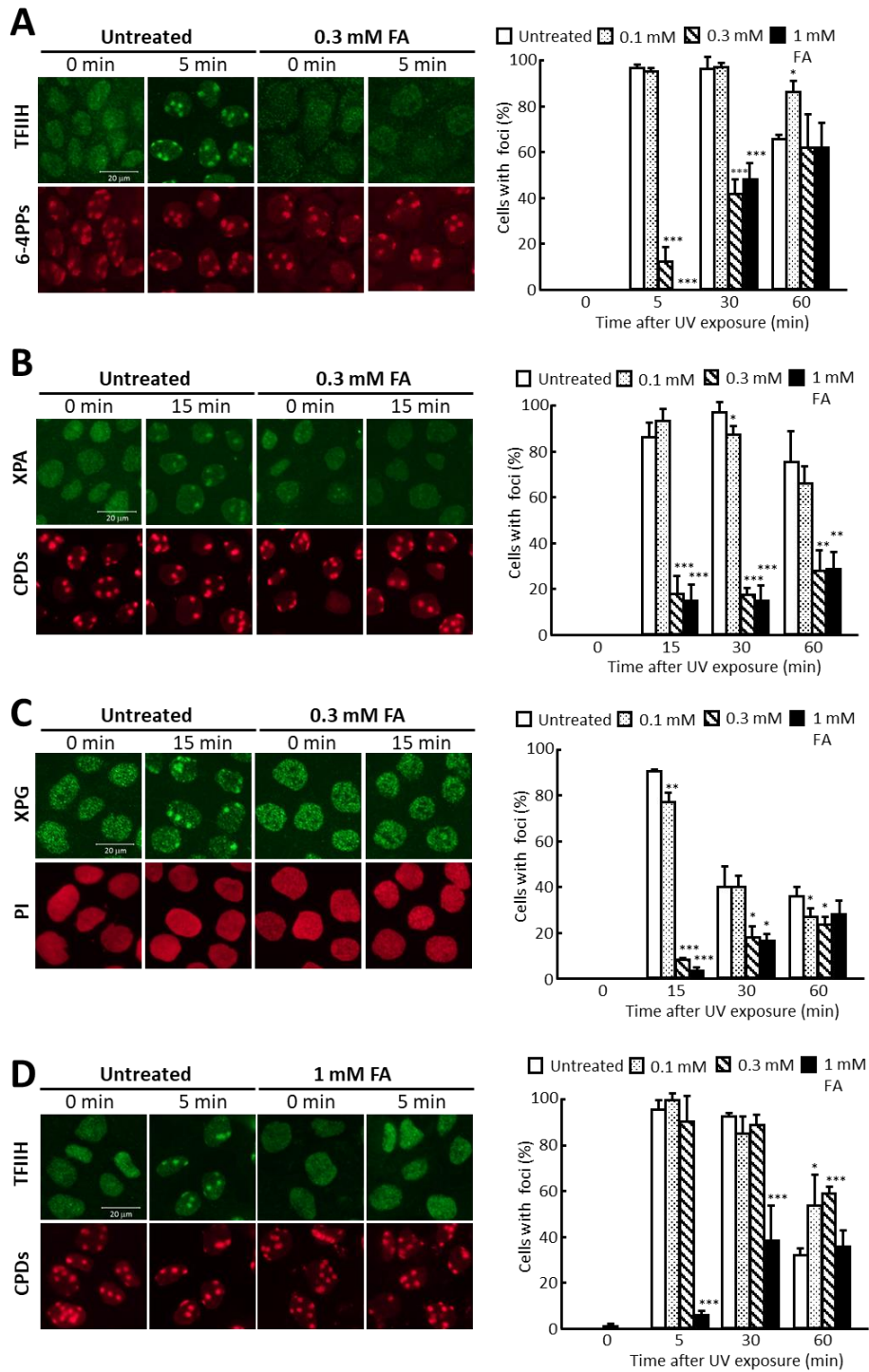


Figure 18 FA inhibits the recruitment of repair molecules

HaCaT cells (A~C) or HSC-1 cells (D) were treated with FA (~1 mM) for 2 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μm , 0.01 J/cm²). The recruitment of the NER factors, (A, D) TFIIH, (B) XPA, and (C) XPG was detected by immunofluorescence staining. CPDs or 6-4PPs were stained to find the sites of DNA damage. Nuclei were stained with PI.

3-3-3 SEMによるFA作用によるNER阻害効果の変化

3-3-1においてSEMでCSSのNER阻害が抑制されることが示された。そこで、SEMを前処理し、FAを作用させ、UVB照射後6-4PPsの生成や修復についてELISAで検討した (Fig. 19A)。その結果、6-4PPsの生成に影響はなかったが、SEM前処理はFA作用によるNERの遅延を大幅に回復させた。SEM存在下2時間後6-4PPsの修復はコントロールとほぼ同じ程度であった。

局所照射法で同様に検討した結果、FA作用によりNERの遅延はSEM前処理により大幅に回復した (Fig. 19B)。0.3 mM FA作用した場合、60分経過してもフォーカスのある細胞が55%残っているが、SEM前処理により20%まで低下した。

さらに、NER関連因子の集積について検討した (Fig. 19C)。CSSと同様に、FA作用により遅延したTFIIHはSEM前処理により集積が回復した。FA作用した方は、40%の細胞にTFIIHのフォーカスが認められたが、SEMを前処理させるとほぼ100%の細胞でフォーカスが見られた。

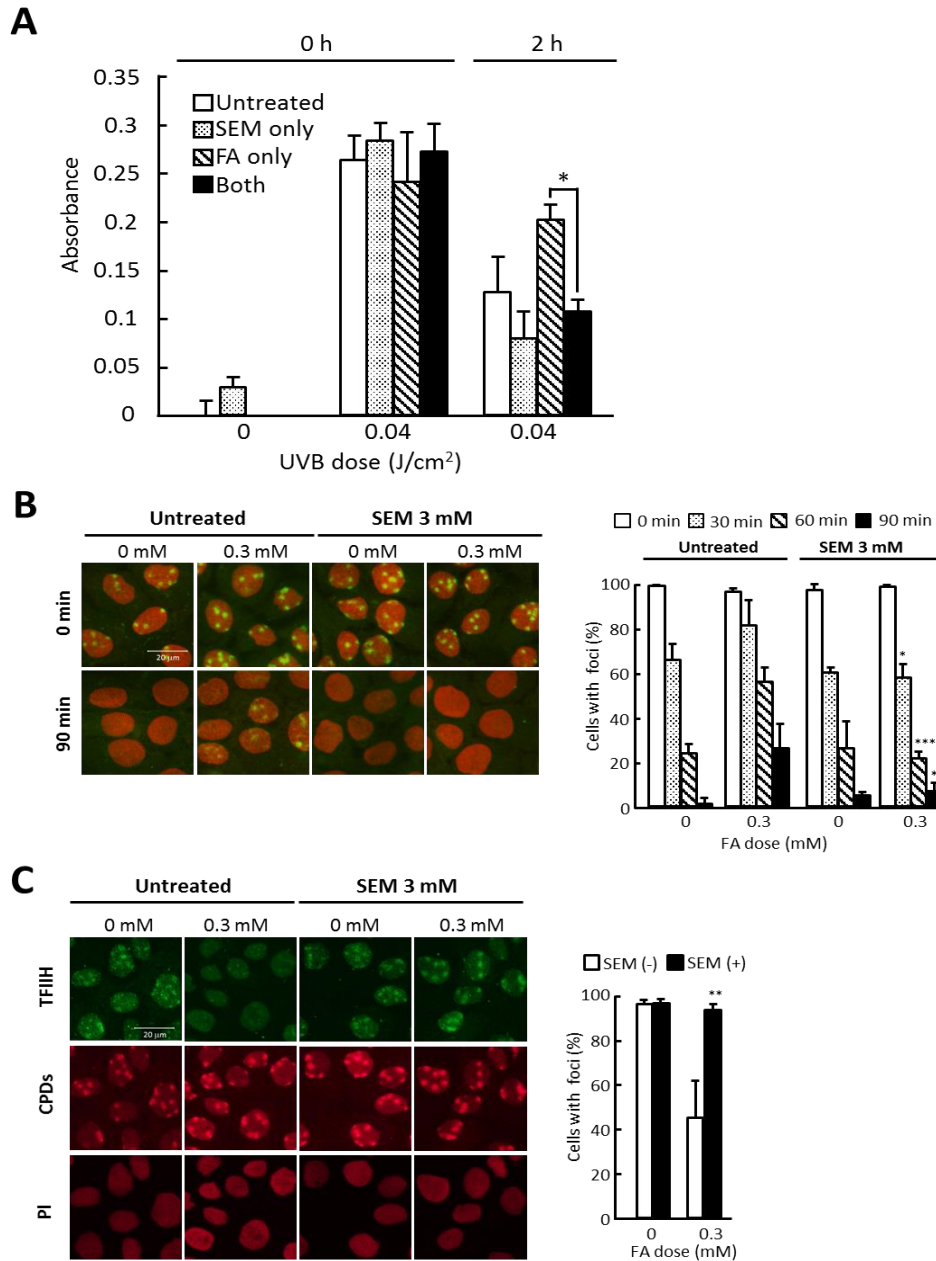


Figure 19 SEM recovers FA-induced delays in NER

(A) Cells were exposed to UVB (0.04 J/cm^2). Formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA.

(B) Cells were exposed to UVC locally with a filter ($3 \mu\text{m}$, 0.01 J/cm^2). After an incubation for $\sim 90 \text{ min}$, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs (green). Nuclei were stained with PI (red). The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

(C) Cells were exposed to UVC locally and the recruitment of the NER factor, TFIIH was detected by immunofluorescence staining (green) 15 min after irradiation. CPDs (red) were stained to find the sites of DNA damage. Nuclei were stained with PI (red). 5-6 pictures per sample were taken randomly and the percentage of cell with foci were calculated. Data are presented as the mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (untreated vs. treated with SEM).

3-3-4 飽和及び不飽和アルデヒド類と UVB 複合暴露による感受性の変化

FA 以外のアルデヒド類作用による UVB 感受性の亢進について検討した (Fig.20)。飽和アルデヒド類と不飽和アルデヒド類を HaCaT 細胞に作用し、まず細胞毒性を調べた。飽和アルデヒド類を作用した場合、3 mM でも細胞死が認められなかった。一方、不飽和アルデヒド類では、~3 mM まで濃度依存的に細胞死が認められた (Fig. 20A)。acrolein は 0.3 mM で細胞は全部死滅した。crotonaldehyde や *trans*-2-pentenal の場合、1 mM の濃度段階で劇的な細胞死が認められた。

次に、細胞死を誘導しない濃度のアルデヒド類を HaCaT 細胞に作用し、次に来る UVB に対する感受性を調べた。その結果、UVB では~0.03 J/cm² までに線量依存的な細胞死が認められた。飽和アルデヒド類を作用した後、UV を照射した場合、生存率に変化は認められなかった。一方、不飽和アルデヒド類を作用させた場合、UVB 感受性の亢進が認められ、劇的な細胞死の亢進が確認された (Fig. 20B)。

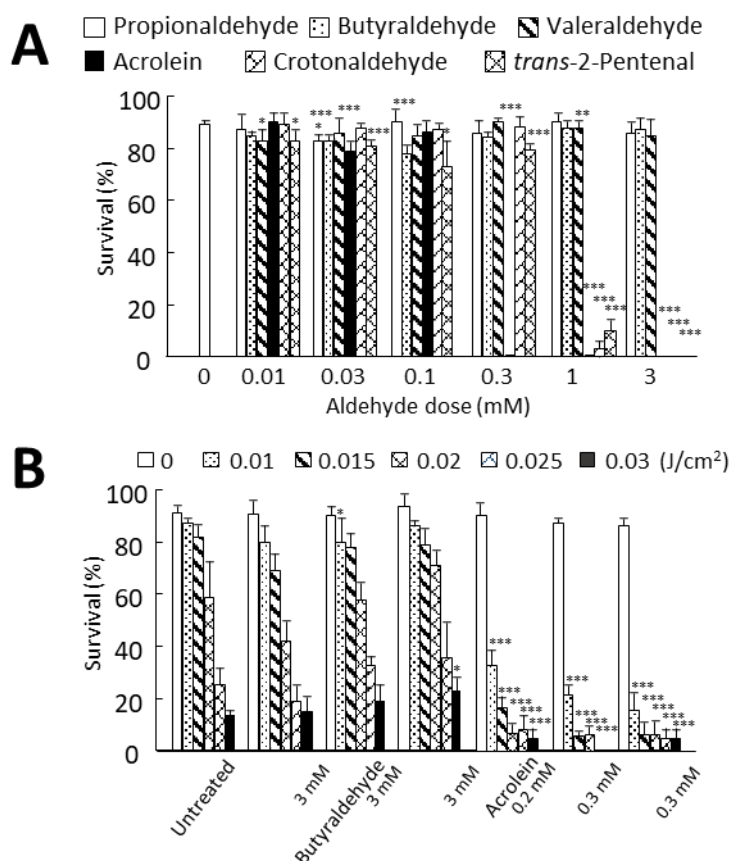


Figure 20 Unsaturated aldehydes enhance UV-induced cell death

(A) Unsaturated aldehydes, not saturated aldehydes, induced cell death. HaCaT cells were treated with aldehydes (~3 mM) for 2 h, and aldehydes were then removed. After a further culture for 24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay.

(B) UV-induced cell death was enhanced by unsaturated aldehydes. HaCaT cells were treated with aldehydes (~3 mM) for 2 h, followed by irradiation with UVB (~0.03 J/cm²/~30 sec). After a further culture for 24 h, cell survival was assessed using the trypan blue assay. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs. untreated with aldehydes).

3-3-5 飽和及び不飽和アルデヒド類作用による NER 効率の変化

飽和及び不飽和アルデヒド類を HaCaT 細胞に作用させ、UVB 照射後、6-4PPs の生成と修復を ELISA で検討した (Fig. 21)、飽和アルデヒド類では不飽和アルデヒド類の 10 倍濃度でも 6-4PPs の修復阻害はほとんど認められなかった。一方、不飽和アルデヒド類を作用させた場合、6-4PPs の修復を劇的に阻害した。阻害効果は acrolein>crotonaldehyde \approx trans-2-pentenal であった (Fig. 21A)。trans-2-pentenal 単独作用で阻害効果の濃度依存性を調べた (Fig. 21B)。その結果、照射後 1~2 時間において明らかな濃度依存的(~0.3 mM)な NER 阻害が確認された。

さらに、局所照射法でこの結果を確認した (Fig. 21C)。照射 20 分後、6-4PPs のフォーカスはほぼ消失した。飽和アルデヒド類の高い濃度 (10 mM) で作用した場合、6-4PPs のフォーカスは修復され、阻害効果は認められなかった。一方、不飽和アルデヒド類を作用した場合は濃度依存的な 6-4PPs 修復の阻害が認められた。acrolein 0.2 mM, crotonaldehyde 0.3 mM, trans-2-pentenal 0.3 mM では完全に 6-4PPs の修復を阻害し、6-4PPs のフォーカスが残存していた。

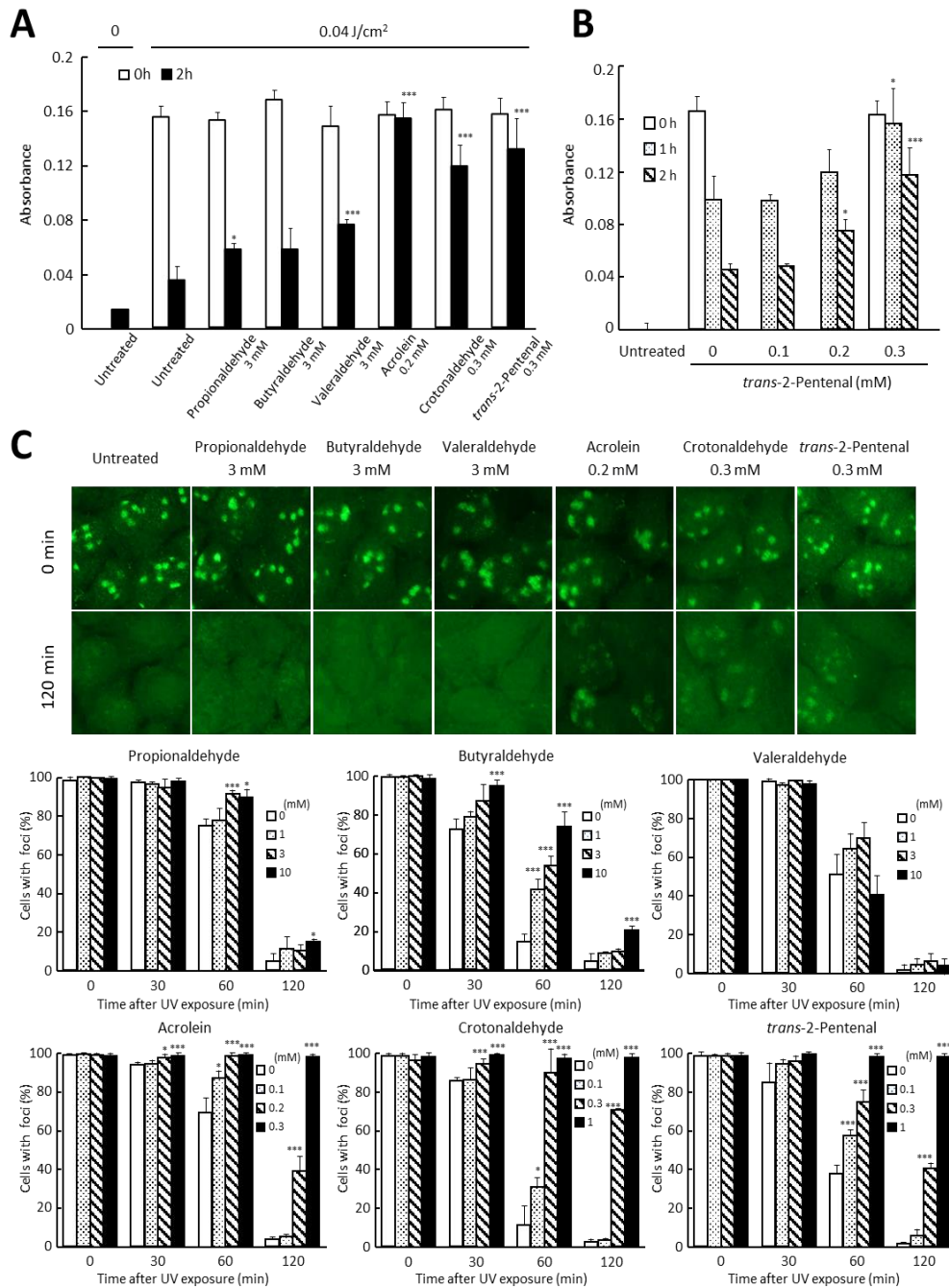


Figure 21 Unsaturation aldehydes inhibit the repair of 6-4PPs

(A) The repair of 6-4PPs was inhibited by unsaturated aldehydes. HaCaT cells were treated with aldehydes for 2 h, exposed to UVB ($0.04 \text{ J/cm}^2/40 \text{ sec}$), and then incubated to allow for repair for 2 h. The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA.

(B) The repair of 6-4PPs was inhibited by trans-2-pentalal dose-dependently. HaCaT cells were treated with trans-2-pentalal ($\sim 0.3 \text{ mM}$) for 2 h, followed by an exposure to UVB ($0.04 \text{ J/cm}^2/40 \text{ sec}$), and then incubated to allow for repair for $\sim 2 \text{ h}$. 6-4PPs were detected with ELISA.

(C) The repair of 6-4PP positive foci was inhibited by unsaturated aldehydes. HaCaT cells were treated with aldehydes ($\sim 10 \text{ mM}$) for 2 h and exposed to UVC locally with a filter ($3 \mu\text{m}$, $0.01 \text{ J/cm}^2/50 \text{ sec}$). After an incubation for $\sim 2 \text{ h}$, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs.

3-3-6 飽和及び不飽和アルデヒド類作用による NER 関連蛋白質集積変化

アルデヒド類作用後の NER 関連因子の損傷部位への集積を局所照射法で検討した (Fig. 22A)。その結果、飽和アルデヒド類は、1 mM では NER 関連蛋白質集積阻害を示さなかった。3, 10 mM の濃度では propionaldehyde, butyraldehyde は濃度依存的に照射 5 分後の集積を阻害したが、30 分後の集積はコントロールと同じレベルになった。一方、不飽和アルデヒド類を作用した場合、照射 5 分後、0.3 mM ではいずれも劇的な集積の阻害が認められた。crotonaldehyde, *trans*-2-pentenal は時間経過で集積が認められたが、acrolein は集積しなかった。*trans*-2-pentenal を作用した場合 (Fig. 22B)、照射後 XPG の集積を検討した結果、0.3 mM の濃度で、5 分後の集積はある程度抑制されたが、時間経過とともに集積した。1 mM の濃度では、XPG の集積が完全に阻害された。

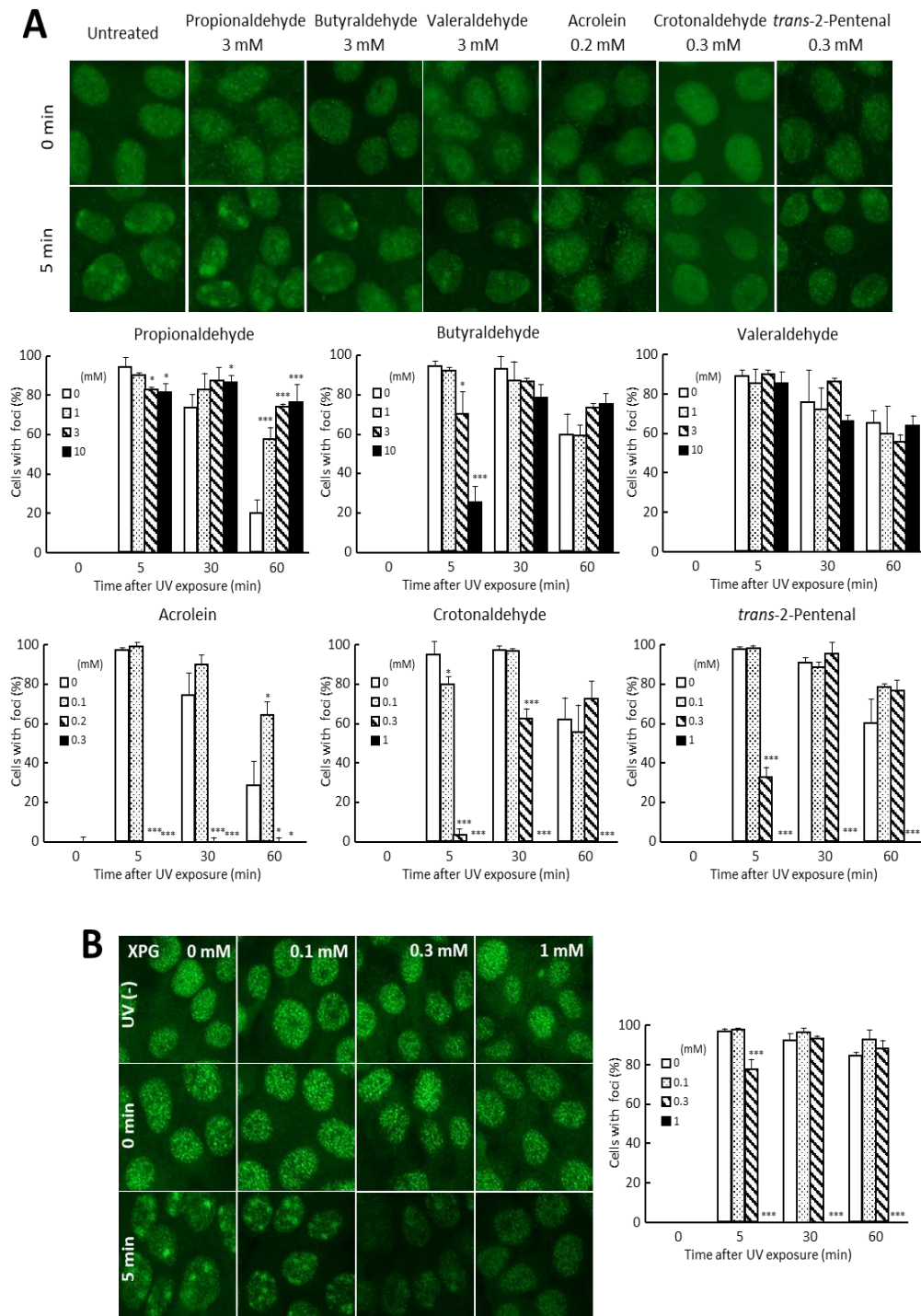


Figure 22 Unsaturated aldehydes inhibit the recruitment of repair molecules

(A) The recruitment of TFIIH was inhibited by unsaturated aldehydes. HaCaT cells were treated with aldehydes (~10 mM) for 2 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μ m, 0.01 J/cm²/50 sec). The recruitment of TFIIH was detected by immunofluorescence staining.

(B) The recruitment of XPG was inhibited by *trans*-2-pental. HaCaT cells were treated with *trans*-2-pental (~1 mM) for 2 h and exposed to UVC locally with a filter (3 μ m, 0.01 J/cm²/50 sec). The recruitment of XPG was detected by immunofluorescence staining.

3-3-7 飽和及び不飽和アルデヒド類作用後の NER 関連蛋白質レベルの変動

アルデヒド類作用後の NER 関連蛋白質の分解を western blot 法で調べた(Fig. 23)。その結果、FA や不飽和アルデヒド類作用した 2 時間後 TFIIH の分解が認められた。分解効果は FA ≒ acrolein > crotonaldehyde ≒ *trans*-2-pentenal である。飽和アルデヒド類を作用させた場合蛋白質の分解は認められなかった (Fig. 20A)。さらに、アルデヒドを除去できる SEM を前処理させた場合、CSS 作用による TFIIH の分解が回復した (Fig. 20B)。これらの結果から、CSS 作用による NER 蛋白質の分解は CSS 中のアルデヒド類が NER 関連蛋白質と結合し、分解させた結果と考えられる。

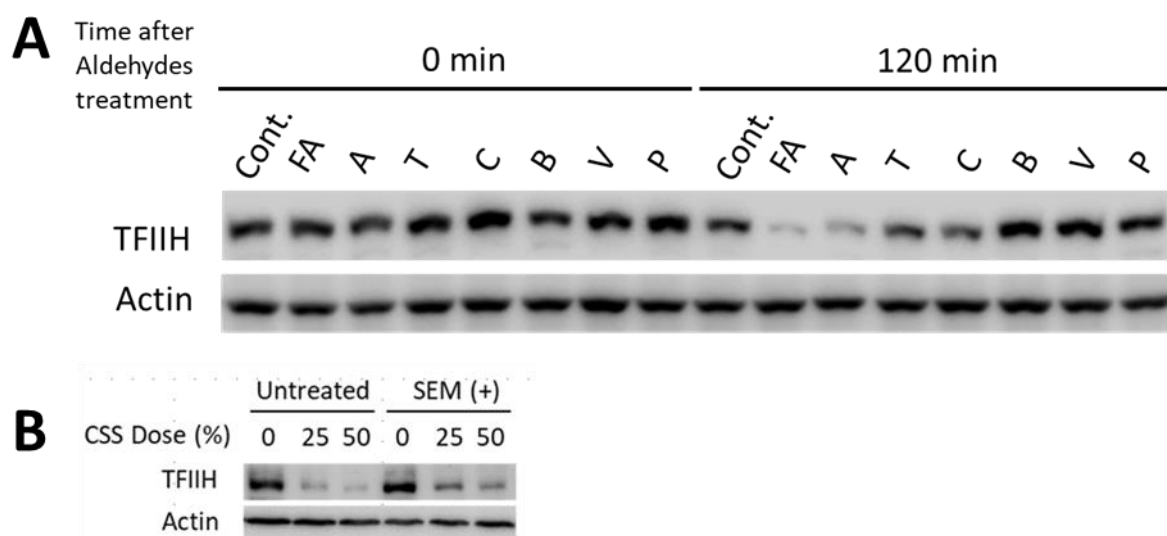


Figure 23 Aldehyde degrades NER-related proteins

(A) HaCaT cells were treated with aldehydes (FA:0.3 mM; Acrolein:0.2 mM; *trans*-2-Pentenal:0.3 mM; butyraldehyde:3 mM; valdehyde:3 mM; propionaldehyde:3 mM) for 2 h. Then were harvested and lysed for western blotting to detect expression levels of TFIIH, XPA and XPG. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

(B) HaCaT cells were pretreated with SEM (3 mM) for 30 min followed by CSS (25 or 50%) for 1 h.

3-4 考察

ホルムアルデヒドは求電子剤である。飽和アルデヒドは、カルボニル炭素原子上で低い電子密度を示し、比較的極性が低いが、 α,β -不飽和アルデヒドは、炭素 2 と 3 (α, β) との間に二重結合を有し、 β -炭素はチオレート基やシステイン残基と同様に、求電子攻撃を受けやすい [46-48]。そして、生体内分子と反応し結合することによって、遺伝毒性、変異原性への関与や発がん性が危惧される。

エタノール代謝物であるアセトアルデヒドは付加体を形成するため、アルコールによる発がんのリスク因子の一つと報告されている。FA は DNA に N²-hydroxymethyl-dG 付加体を形成させ、さらに DNA-蛋白質架橋を作ることが報告されている [23]。さらに、低濃度の FA は NER を遅延させ、XPC や DDB2 の集積を遅延させた [42]。人体内で生成される *trans*-4-hydroxy-2-nonenal も NER を阻害し、脂質の過酸化による発がんの可能性が提示されている [40]。

本研究では、SEM で CSS 中のアルデヒドを除去し、検討を行ったことで、アルデヒド類は CSS 作用による NER の遅延や NER 関連因子集積の遅延に関連することを明らかにした。アルデヒド類による NER に対する影響について、いくつかの研究がある [42,54]。Wang らは、acrolein は DNA と結合し、Acr-dG 付加体を形成させ、正常ヒト肺線維芽細胞 NHLF や正常なヒト気管支上皮細胞 NHBE、肺癌細胞 A549 の NER や BER を阻害し、NHLF、NHBE 細胞においては NER 関連因子 XPC や XPA の分解を誘導させることを報告している [31]。Luch らは FA 作用による NER の関連因子である DDB2 の集積遅延を報告し、NER の遅延についても明らかにしている [42]。

本研究で不飽和アルデヒド類は飽和アルデヒド類より毒性が高かった。飽和アルデヒド類は 3 mM を作用しても細胞死が認められなかったが、不飽和アルデヒド類では ~1 mM で濃度依存的に劇的な細胞死が認められた。飽和、不飽和アルデヒド類の電子特性を考えるとこの結果は不思議ではない。不飽和アルデヒド類の反応性は acrolein >> crotonaldehyde > *trans*-2-pentenal という報告があり [46]、本研究で示したアルデヒド類の毒性の強さと一致した。NER の阻害効果も反応性の高さと一致した。不飽和アルデヒド類作用後 NER 阻害効果は acrolein が crotonaldehyde と *trans*-2-pentenal より強かった。これらの効果は主にアルデヒド類と蛋白質に含まれた求核性 ϵ -アミノ、チオール、イミダゾール基や DNA に含まれた塩基の環外アミノ基に反応する結果と考えられる。アルデヒドによる DNA 付加体の修復は、NER 関連因子 XPA や XPF が必要と報告されている [54, 55]。FA や不飽和アルデヒド類は DNA 付加体を形成するとともに、NER 関連蛋白質等、生体内因子と反応しやすく、DNA 損傷修復を阻害することが考えられた。よって、DNA 損傷の誘導、損傷修復の阻害という両面から CSS の発がん性を上昇させることが考えられる。

第四章 ROS とたばこ煙及びアルデヒド類による NER 遅延の関連性

4-1 序論

第三章では、FA や不飽和アルデヒド類が CSS 作用による NER 阻害の原因物質であることを明らかにした。細胞は FA などアルデヒド類に暴露させると ROS が産生されることが知られている [49-52]。Saito らの研究は Jurkat E6-1 細胞に FA を作用すると細胞内の酸化生成物量が上昇したことを報告した[49]。さらに、アルデヒド類は体内で aldehyde dehydrogenase (ALDH)により代謝される。その過程で ROS の一種である superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) が生成される[51,56]。Superoxide radical は superoxide dismutase (SOD) により除去されるが、ROS は DNA や蛋白質を酸化させ、酸化的な DNA 損傷である 8-oxo-dG などを形成させることが報告されている。

8-oxo-dG は主に BER により修復されることが知られているが、NER にも関与する [24]。ROS による大きな DNA 損傷は NER により修復され、NER はもちろん NER 関連因子を使うが、BER でも XPG や PCNA を使う報告がある [24]。

そこで、本章では、細胞に CSS やアルデヒド類作用後の細胞内酸化産物の生成量を検討した。さらに、ROS と CSS やアルデヒド類作用後 NER 阻害の関係を調べるため、 H_2O_2 を作用し、照射後の NER への影響や NER 関連蛋白質の挙動について検討した。

4-2 実験材料および方法

4-2-1 たばこ煙の抽出

1-2-1 と同様に CSS を抽出した。

4-2-2 試薬の作用

HaCaT 細胞を 24 時間血清フリーの状態 で培養した。その後、CSS の作用は 1 時間、不飽和アルデヒド類の作用は 2 時間に設定し、実験を行った。NaOH で pH を 7.0 に調整した 1 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC)を試薬作用前 1 時間に前処理した。

4-2-3 ROS の生成による細胞内酸化状態の測定

細胞内酸化状態は 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (DCFHDA) (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて、検討を行った。DCFHDA は細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し、DCFH になる。DCFH は ROS に酸化されると蛍光特性の持つ DCF になる。そこで、本研究では 10 mM DCFHDA を 1 時間前処理し、試薬を作用した。その後、細胞を回収し、PBS に懸濁させ、DCFHDA を指標としてフローサイトメーター (FCM) で測定した。

4-2-4 ELISA による 6-4PPs の測定

1-2-7 と同様に行った。

4-2-5 局所照射法による CPDs、6-4PPs 及び照射後 NER 関連因子集積の検出

1-2-9 と同様に行った。

4-2-6 検定法

すべての実験は、3~4 回繰り返し、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している (n=4~200)。有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置 analysis of variance (ANOVA) により行った。統計的な有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ で表した。

4-3 実験結果

4-3-1 たばこ煙、アルデヒド類作用後の細胞内酸化状態の変化

CSS 及びアルデヒド類を HaCaT 細胞に作用させ、ROS の生成による細胞内酸化状態を調べた。横軸は DCFHDA の蛍光量を示しており、右に移動するほど、細胞内酸化生成物量が多くなる。CSS 作用により濃度依存的に細胞内酸化状態が上昇した。そして、CSS 作用により生成された ROS は NAC 作用により阻害された(Fig. 24A)。不飽和アルデヒド類を作用させると CSS と同様に、細胞内酸化状態の上昇が検出された。一方、飽和アルデヒド類については、少量な細胞内酸化しか検出されなかった。NAC を前作用させると、不飽和アルデヒド類作用による細胞内酸化は阻害された(Fig. 24B)。

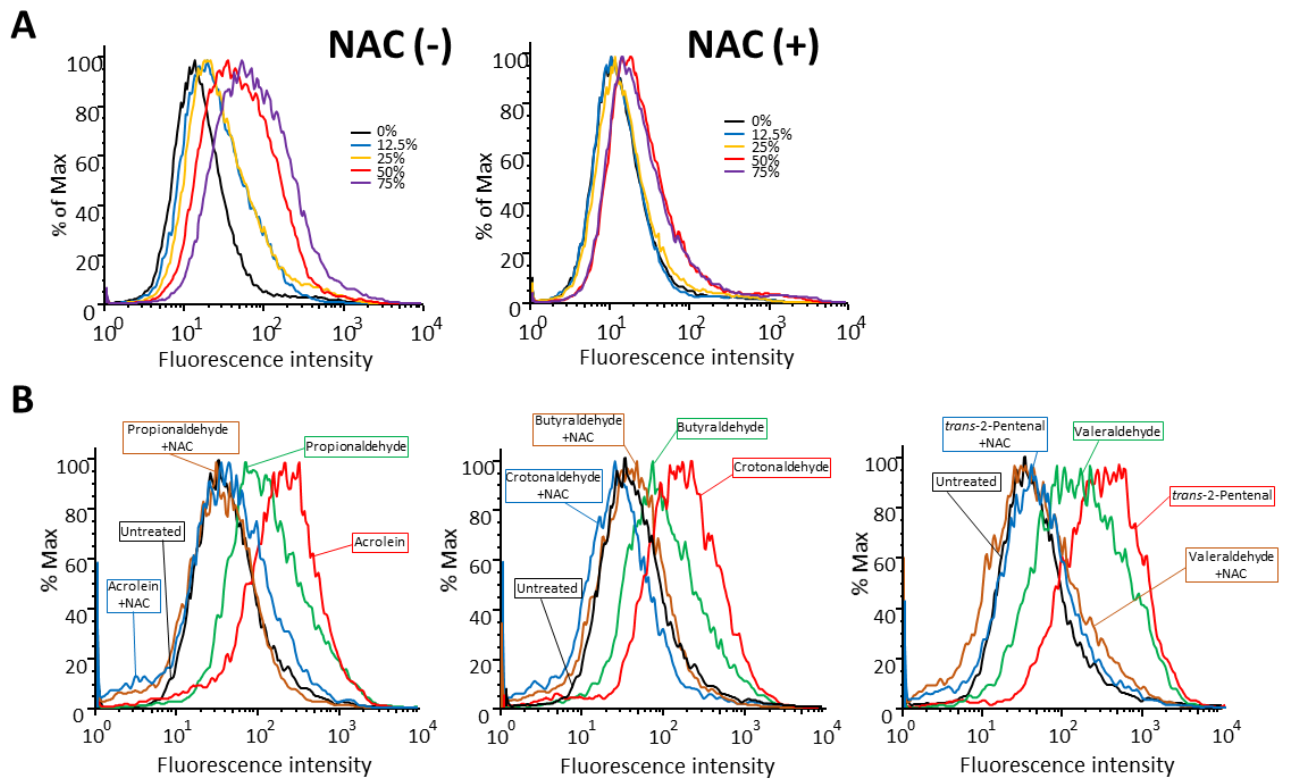


Figure 24 ROS produced by CSS and aldehydes

(A) HaCaT cells were treated with DCFHDA for 1 h, followed by NAC (1 mM) for 30 min. After an incubation with CSS (~75 %) 1 h, fluorescence was detected with FCM.

(B) HaCaT cells were treated with DCFHDA for 1 h, followed by NAC (1 mM) for 30 min. After an incubation with aldehydes (~3 mM) for 2 h, fluorescence was detected with FCM.

4-3-2 抗酸化剤 NAC は NER の遅延を回復する

NAC を HaCaT 細胞に前作用し、CSS 作用後 NER の阻害を検討した (Fig. 25)。その結果、CSS 作用により NER の阻害が回復した (Fig. 25A)。さらに、NAC を前作用し、局所照射法で *trans*-2-pentenal 作用後、6-4PPs 修復の阻害を調べた (Fig. 25B)。*trans*-2-pentenal 作用後 6-4PPs 修復の阻害は NAC 作用により大幅に回復した。

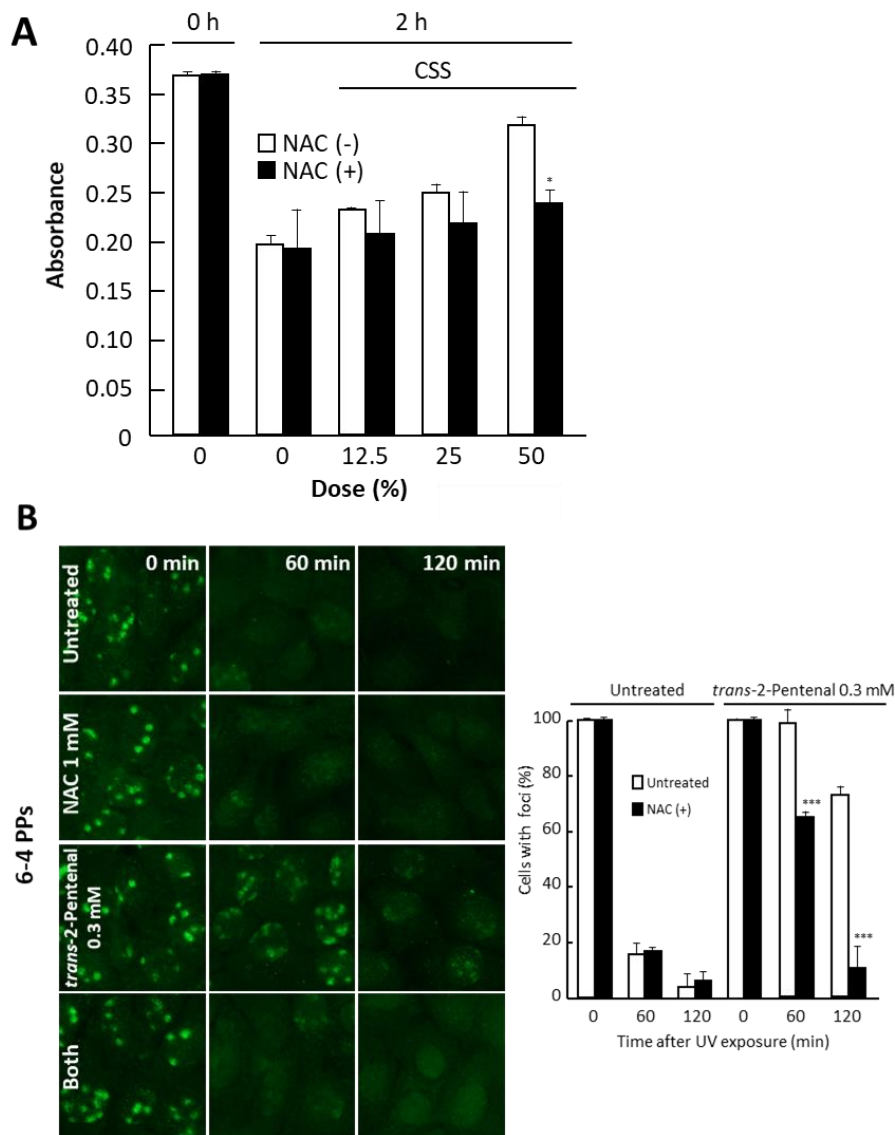


Figure 25 Relationship between ROS formation and the delay of NER

(A) After pretreatment with NAC (1 mM) for 30 min, HaCaT cells were treated with CSS (12.5, 25 and 50%) for 1 h. They were exposed to UVB (0.04 J/cm²), and then cultured for 2 h to undergo repair. The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA. *p<0.05, (NAC(-) vs. NAC(+)).

(B) NAC recovered the *trans*-2-pentenal-induced inhibition of 6-4PP repair. After the pretreatment with NAC (1 mM) for 30 min, cells were treated with *trans*-2-pentenal (0.3 mM) for 2 h, then exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm² /50 s). After an ~2 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs. The picture was taken randomly, and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5–6 pictures) were evaluated). ***p < 0.001 (vs untreated with NAC).

4-3-3 過酸化水素作用による NER の阻害及び NER 関連蛋白質集積の変化

DCFHDA を用いて、不飽和アルデヒド類作用後の細胞内の酸化生成物の量と H₂O₂ 作用後の細胞内の酸化生成物の量を比較した(Fig. 26A)。その結果、不飽和アルデヒド類の作用は 0.3 mM H₂O₂ とほぼ等しい細胞内酸化生成物の量であることが判明した。そこで、アルデヒドの代わりに 0.3 mM の H₂O₂ を用いて、NER に対する影響を局所照射法で検討した(Fig. 26B)。照射後 60 分から 90 分の H₂O₂ 作用により濃度依存的に 6-4PPs 修復の阻害が確認された。さらに、H₂O₂ を作用し、UVC 照射後 NER 関連因子の集積を確認した。XPA (Fig. 26C) と XPG (Fig. 26D) の場合、H₂O₂ 作用により濃度依存的に集積の阻害が確認された。一方、CSS や不飽和アルデヒド類作用と異なり、TFIIH (Fig. 26E) は H₂O₂ 作用と関係なく集積した。

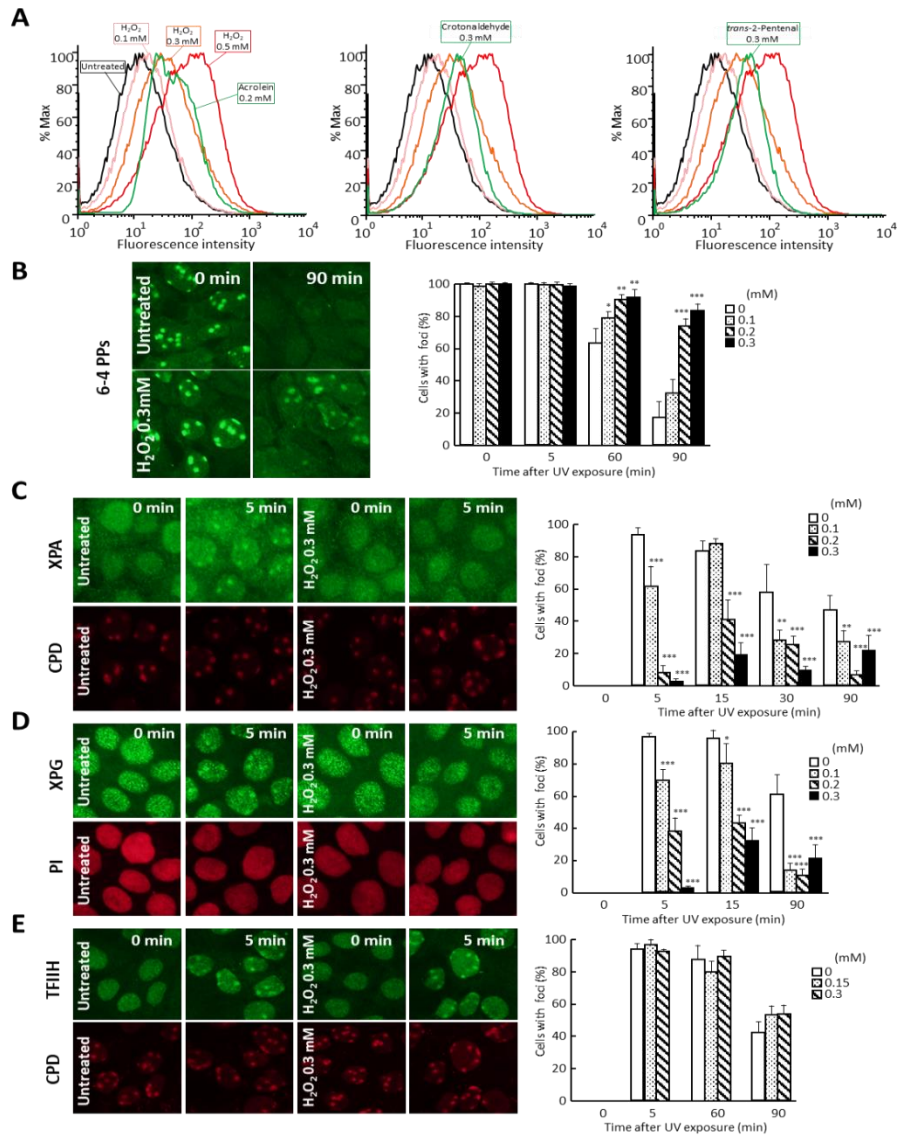


Figure 23 H₂O₂ delays NER

(A) Comparison of the fluorescent increase of DCFHDA after treatment with H₂O₂ and aldehydes. HaCaT cells were treated with DCFHDA for 1 h, followed by H₂O₂ (~0.5 mM) for 1 h or aldehydes for 2 h. Fluorescence was detected with FCM.

(B) H₂O₂ inhibited the repair of 6-4PPs. HaCaT cells were treated with H₂O₂ (~0.3 mM) for 1 h, then exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²/50 sec). After an ~1.5 h incubation, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs. The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

(C) (D) (E) H₂O₂ inhibited the accumulation of XPA and XPG, not TFIIH. HaCaT cells were treated with H₂O₂ (~0.3 mM) for 1 h, then exposed to UVC locally with a filter (3 μm, 0.01 J/cm²/50 sec). After an ~1.5 h incubation, the recruitment of the NER proteins, (C) XPA, (D) XPG, and (E) TFIIH (green) was detected by immunofluorescence staining. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) (red) were stained to find sites of DNA damage. In XPG staining, nuclei were stained with PI (red) because the antibody for XPG originated from mice, similar to the antibodies for pyrimidine dimers. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs. untreated with H₂O₂).

4-4 考察

CSS や不飽和アルデヒド類は細胞内酸化生成物の量を上昇させた。これまでに FA などのアルデヒド類により細胞内酸化生成物の量が上昇することが報告されている。例えば Jurkat E6-1 細胞において 1 mM FA を作用させると細胞内酸化生成物の量の上昇が認められた [49]。不飽和アルデヒド類作用による ROS の産生は NADPH オキシダーゼと関連するという報告がある [51]。不飽和アルデヒドのチオールとの反応性、NADPH オキシダーゼ活性を上昇させる。したがって、チオール剤である N-エチルマレイミドも ROS の産生を増幅させる [55]。よって、アルデヒドも ROS の産生を増幅させる可能性が考えられる。

本研究では、不飽和アルデヒド類作用とほぼ同じような細胞内酸化を誘導する H₂O₂ 濃度 (0.3 mM) で実験を行った。CSS や不飽和アルデヒド類作用と同様に、H₂O₂ の作用は NER を阻害した。修復蛋白質である Ku 複合体や HRCC3 蛋白質の酸化損傷は二本鎖切断の修復を阻害することが報告されている [56]。酸化損傷 8-oxo-dG は BER により修復されるが、BER 修復に関連する蛋白質である OGG-1 や MUTYH DNA glycosylases の酸化損傷は BER を阻害する [57]。NER 関連蛋白質が酸化され、DNA 修復に影響する報告もある。XPA はヒスチジン残基を介して、酸化による NER 関連蛋白質である PCNA との架橋が形成され、NER を抑制する可能性も考えられている [58]。アルデヒド類作用による、直接的な結合だけでなく、アルデヒド類作用に誘導される ROS により、蛋白質や DNA が酸化損傷を受け、それらの機能を失い、最終的には DNA 損傷修復を阻害することが考えられた。

CSS や不飽和アルデヒド類と異なり、H₂O₂ 作用後 TFIIH は通常通り集積が認められた。蛋白質のヒスチジン残基は ROS に攻撃される。酸化されたヒスチジン残基は修復に関連する領域に存在する時に蛋白質の修復機能に影響する可能性が考えられる。結果的にはなぜ、XPG や XPA は CSS や不飽和アルデヒドと同様に集積が阻害されたのに、TFIIH だけ集積が阻害されなかったのかは不明のままであり、さらに検討する必要である。

一方、第三章においても考察したが、アルデヒド類作用による DNA 損傷や酸化損傷は DNA 修復に関連する蛋白質を消費し、NER を阻害することも考えられる。アルデヒド類や ROS による DNA 損傷は主に DNA 付加体である。DNA 付加体の修復は BER だけでなく、NER 修復経路も使う。例として、NER 関連因子である XPG は酸化損傷の除去に関与している [24]。つまり、アルデヒド類作用により生成される DNA 損傷や ROS による酸化損傷を修復するために、NER 関連因子を消費するので、その後に UVC を照射しても、残りの NER 関連因子が少なく、修復が阻害されたことも考えられる。

NAC の作用は CSS や不飽和アルデヒド類作用による NER 遅延を緩和させたが、そこに二つ可能性が考えられる。一つ目は、NAC 作用により、ROS が除去され、NER 効率が回復した可能性である。二つ目は SEM と同様に、NAC に含まれるチオール基とアルデヒドが結合し、アルデヒド類がトラップされた可能性である。SEM 作用後の

NER の回復は完全ではなかったが、NAC を作用させた方は、NER 回復効果が SEM より強かった。SEM 作用はアルデヒドしか除去できないが、NAC はアルデヒドだけではなく、ROS も除去できることから、CSS やアルデヒドの NER 阻害には ROS が一部関与していることが示唆された。

第五章 たばこフィルター効果の評価

5-1 序論

たばこ煙は CMS と CSS に分けられる。CMS はフィルターを越して吸入する煙を指し、CSS はフィルターを介してない、たばこ先端の燃焼による煙である。フィルターを介してないので、CSS 中に含まれるニトロサミンや PAHs, アルデヒド類は CMS より多いと報告されている。例として、CSS の中に FA は CMS の 14.8 倍、acrolein は 2.53 倍もある [13]。発がん性に関しては、Mohtashamipur ら [59]の実験では、CSS を作用させたマウスの皮膚は、CMS の 6 倍以上であった。一方、それを低濃度で作用させた場合、マウスの皮膚の腫瘍生成数について、CSS は CMS とほぼ同じレベルになった。さらに、皮膚損傷だけ見ると、CSS は CMS の倍程度に損傷を起こしたことが報告されている。Schick ら[60]の研究で、CSS を塗布したマウスの生存率は CMS に暴露させた方より低いことが示された。80 週後の発がん性を調べたところ、CSS は CMS の 3 倍程度に腫瘍を起こした。さらに、興味深いことに、7,12 dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)を CSS や CMS と複合的に暴露させると、CSS の場合、腫瘍の数は 4 倍程度に上昇した。一方、CMS と DMBA を複合的に暴露した場合、腫瘍の数は 3 倍程度に急増した。CSS や CMS は発がんのイニシエーターでもあり、プロモーターでもあることと、CSS は CMS より発がん性が強いことが示された。Gairola ら [61]の研究ではマウスを吸入暴露させ、CSS と CMS 効果の差を検討した。その結果、CSS や CMS 暴露後、マウス血液カルボキシヘモグロビンレベルではほぼ同じであったが、肺組織にできた DNA 付加体を検討した結果では、CMS は CSS より多くの DNA 付加体の形成を誘導した。しかしこれらは有意な差ではなかった。これらの研究により、CSS は CMS より強い毒性を持つが、CMS についても、低濃度領域では CSS と同様の毒性を示す場合があることが示されている。

CSS と CMS 有害性の差について、たばこフィルターのろ過は一要因と考えられる。そこで本章では、CSS とたばこフィルターでろ過した CSS (Filtered cigarette sidestream smoke : FCSS)のアルデヒド類濃度や毒性及び NER 阻害効果の差を検討した。

5-2 実験材料および方法

5-2-1 細胞の培養及び UVB の照射法

HaCaT 細胞は 1-2-4 と同様に培養した。UVB の照射は 1-2-5 と同様に行った。

5-2-2 試薬の調製と細胞への CSS 等の作用法

CSS の調製法や作用時間は前章と同様に行った。FCSS を調製する際は 5 本のたばこからフィルターを抜き取り、tube 内につめ、フィルターでろ過したたばこ煙を DMEM 培地にトラップした。

3 mM SEM の前処理は試薬を作用する 30 分前に行った。NaOH で pH を中性に調整

した 1 mM NAC は試薬作用前 1 時間で前処理した。

5-2-3 生存率の測定

1-2-6 と同様に行った。

5-2-4 ELISA による 6-4PPs の測定

1-2-76 と同様に行った。

5-2-5 局所照射法による CPDs、6-4PPs 及び照射後 NER 関連因子集積の検出

1-2-9 と同様に行った。

5-2-6 Western blot 法による NER 関連蛋白質総量の検出

2-2-4 と同様に行った。

5-2-7 たばこ煙中アルデヒド類濃度の測定

CSS や FCSS 中アルデヒド類濃度は Amplite™ Colorimetric Aldehyde Quantitation Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA) を用いて測定した。測定はプロトコール通りに行った。CSS や FCSS を所定濃度 (~100%) に希釈し、96-well plate に 50 μ L ずつ分注した。アルデヒド standard (~1 mM) を同様に 50 μ L ずつ分注した。その後、2 x AldeView™ Yellow reaction mixture を 50 μ L をさらに追加した。室温で 30 分静置した後、550 nm 吸光度 (Power wave XS, BioTek Instruments, Inc., VT) で検出した。

5-2-8 ROS の生成による細胞内酸化状態の測定

4-2-3 と同様に行った。

5-2-9 検定法

すべての実験は、3~4 回繰り返して、再現性のあることを確認した。データは 1 回の実験の平均値として表している (n=4~200)。有意差検定は Dunnett's test を用いて一元配置 analysis of variance (ANOVA) により行った。統計的な有意性は、#, +, *p<0.05, ##, **, **p<0.01, ###, +++, ***p<0.001 で表した。

5-3 実験結果

5-3-1 FCSS と CSS 作用による UVB 感受性亢進の比較

FCSS と CSS (~100%) を HaCaT 細胞に 1 時間作用させ、UVB (0.015 J/cm²) を照射し、24 時間後の生存率を測定した (Fig. 27)。CSS と FCSS はいずれも濃度依存的に生存率を低下させた、50%濃度で作用させた場合、CSS は 10%程度の細胞死が認められたが、FCSS では細胞死を認められなかった。CSS や FCSS 作用後、UVB の照射はそれらの細胞死を亢進させた。CSS や FCSS 単独で細胞死が認められなかった 25%の濃度で作用後 UV を照射させた場合、CSS 作用させた場合は FCSS より 20%程度細胞死の亢進が認められた。50%の場合、CSS では 80%、FCSS では 40%の細胞死が認められた。

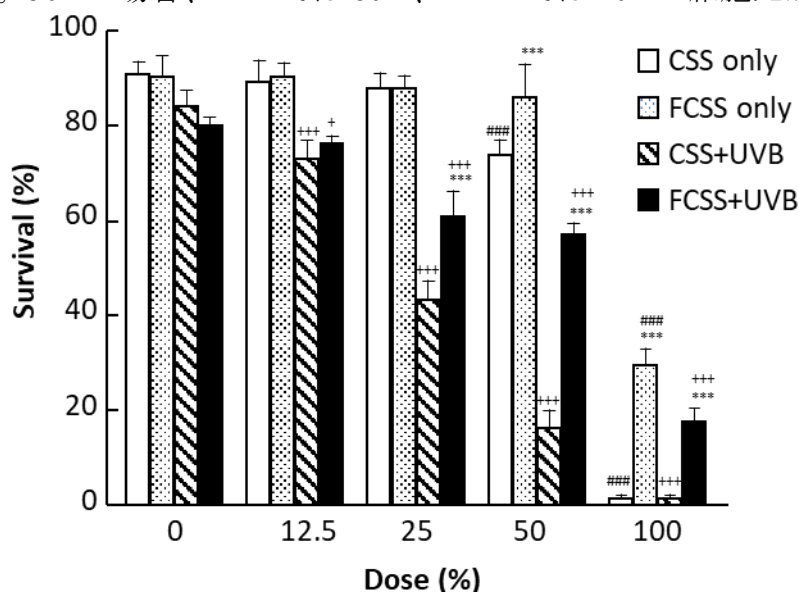


Figure 27 CSS enhances UV-induced cell death more effectively than FCSS

HaCaT cells were treated with CSS or FCSS (~100%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.015 J/cm²). After further culturing in fresh medium for 24 h, cell survival was assessed using the trypan blue dye exclusion assay. ***p<0.001 (CSS vs. FCSS). ###p<0.001 (untreated vs. treated with CSS or FCSS), +p<0.05, +++p<0.001 (UVB only vs. CSS+UVB or FCSS+UVB).

5-3-2 FCSS と CSS 作用による NER 遅延の差

FCSS と CSS を作用し、UV 照射後の 6-4PPs の生成と修復を ELISA で検出した (Fig. 28A)。通常、2 時間経つと 6-4PPs は半分程度に修復されたが、CSS 作用させた場合、濃度依存的に阻害が認められた。FCSS の場合、50%の濃度で阻害効果が認められたが、阻害効果は 25%CSS と同じレベルであった。

CSS は FCSS より NER 阻害効果が高いことを確定するために、局所照射法で 6-4PPs の生成と修復を調べた (Fig. 28B)。その結果、CSS や FCSS 作用にかかわらず、6-4PPs の生成量はほぼ同じであった。ELISA の結果と同様に、CSS は 25%、50%で濃度依存的に NER 阻害が認められた。一方、50% FCSS を作用させた場合に NER 阻害が認められたが、その効果は CSS に比べ弱かった。

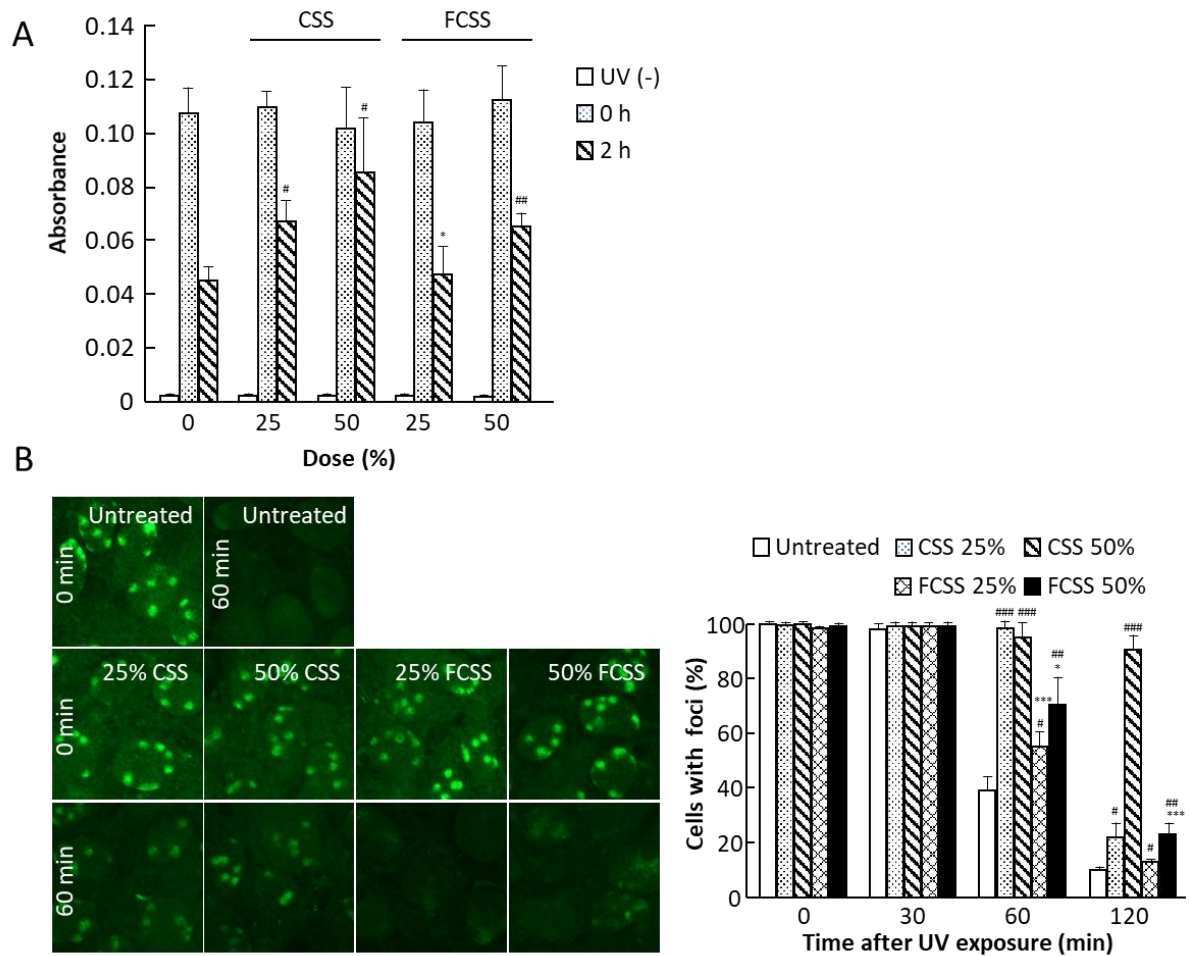


Figure 28 CSS inhibits the repair of 6-4PPs more effectively than FCSS

(A) HaCaT cells were treated with CSS or FCSS (25 or 50%) for 1 h, followed by irradiation with UVB (0.04 J/cm²). The treated cells were cultured for 2 h in fresh medium to undergo repair. The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA.

(B) HaCaT cells were treated with CSS or FCSS (25 or 50%) for 1 h and exposed to UVC (0.01 J/cm²) locally with a filter (3 μm pore size). After an incubation for 1 h, immunofluorescence staining was performed for 6-4PPs (green). The time-dependent foci remaining up to 2 h was counted. The picture was taken randomly and the % of cells with 6-4PP-positive foci was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated).

*p<0.05, ***p<0.001 (CSS vs. FCSS). #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 (untreated vs. treated with CSS or FCSS).

5-3-3 FCSS と CSS 作用による NER 関連蛋白質集積の遅延の差

FCSS と CSS 作用し、照射後の TFIIH や XPG の集積を局所照射法で検討した (Fig. 29)。TFIIH や XPG は 5 分間で損傷部位に集まったが、CSS や FCSS 作用によりその集積は阻害された。CSS 作用させた場合、濃度依存的に集積が阻害された。一方、FCSS の場合、50%の濃度でも阻害効果が弱かった。

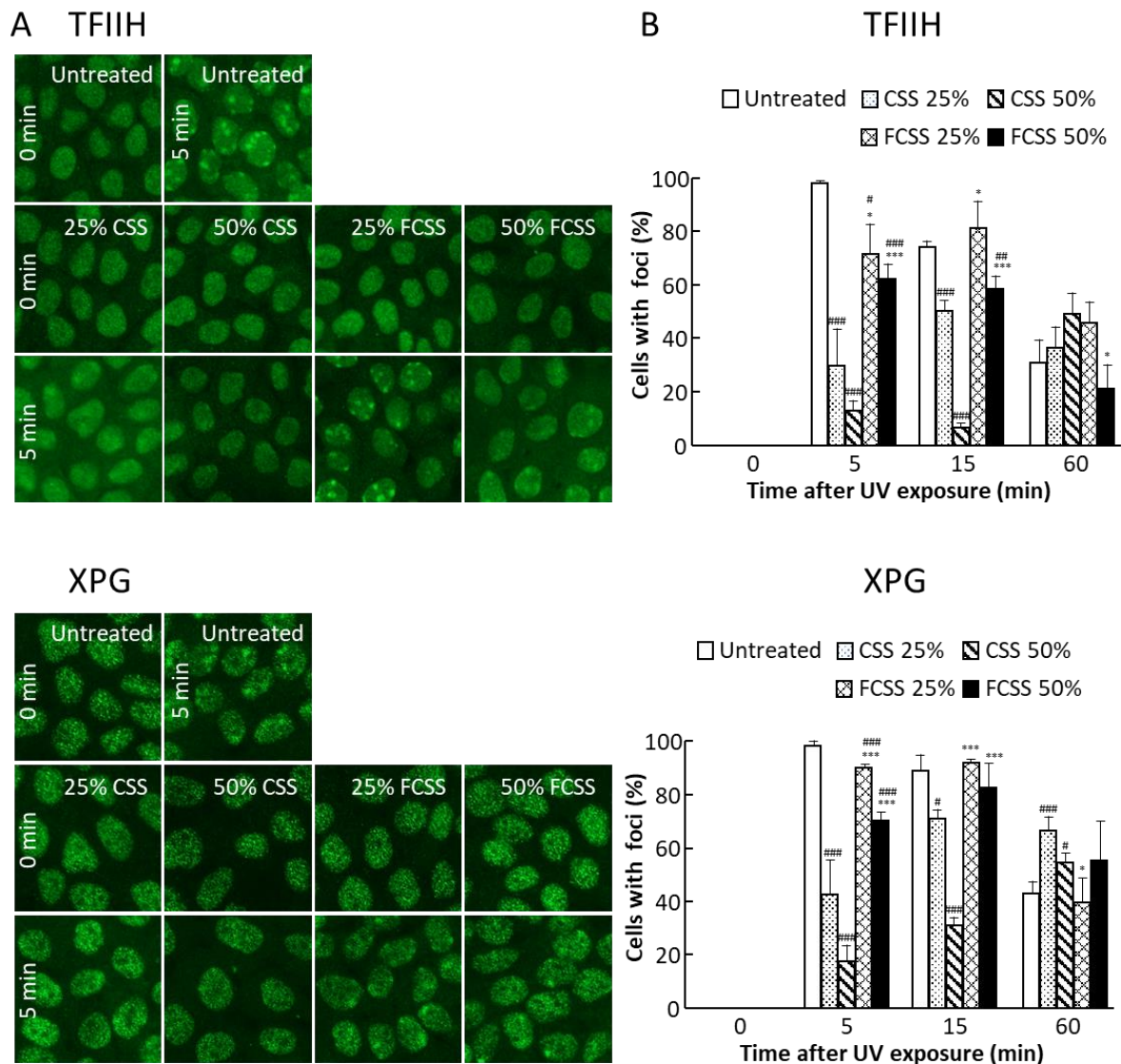


Figure 29 CSS inhibits the accumulation of NER-related proteins more effectively than FCSS

(A) HaCaT cells were treated with CSS or FCSS (25 or 50%) for 1 h and exposed to UVC (0.01 J/cm^2) locally with a filter ($3 \mu\text{m}$ pore size). The recruitment of TFIIH and XPG was detected by immunofluorescence staining.

(B) Cells with foci of TFIIH or XPG in Figure 15A were calculated. Pictures were taken randomly and the % of cells with positive foci for repair molecules was calculated (more than 200 cells per sample (5-6 pictures) were evaluated). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (vs. CSS with FCSS). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (untreated vs. treated with CSS or FCSS).

5-3-4 FCSS と CSS 作用による NER 関連蛋白質分解の差

CSS と FCSS 作用後、TFIIH の分解を western blot 法で検討した (Fig. 30)。1 時間後、CSS を作用させた場合、1 時間後 TFIIH は濃度依存的な減少を示した。FCSS を作用させた場合、CSS に比べ分解は顕著ではなかった。

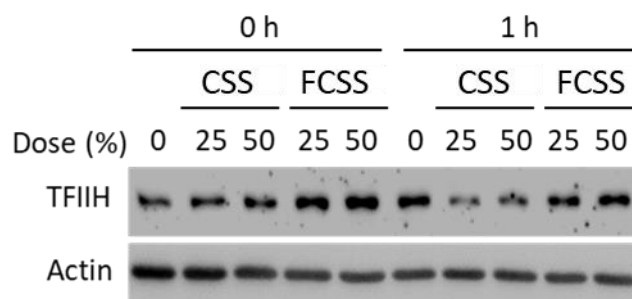


Figure 30 CSS degrades NER-related proteins

HaCaT cells were treated with CSS or FCSS (25 or 50%) for 1 h. They were harvested and lysed for western blotting to detect expression levels of TFIIH. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

5-3-5 FCSS と CSS 阻害効果の違いの原因についての検討

5-3-5-1 FCSS と CSS 中に含まれるアルデヒド類濃度の差についての検討

CSS 作用による NER 阻害の原因物質は主にアルデヒド類であると第三章で証明した。CSS と FCSS 作用による NER 阻害効果の差を検討するために、まず、アルデヒド定量キットを用いて CSS や FCSS 中に含まれるアルデヒド類の量を検討した (Fig. 31A)。100% CSS の中には約 250 μ M アルデヒド類が存在した。FCSS 中のアルデヒド類濃度は FCSS の半分程度であった。

そこで、SEM を用いて、アルデヒド類除去後、CSS や FCSS 作用による UVB 感受性の変化を調べた (Fig. 31B)。CSS 作用による UVB 感受性亢進は SEM 前作用により大幅に回復したが、完全ではなかった。FCSS 作用の場合も SEM により軽減された。こちらも完全な回復ではなかった。

さらに、この結果を ELISA で検証した (Fig. 31C)。CSS のデータは第四章で示したものと同一である。FCSS のデータを Fig. 25A に付け加えたものである。SEM は CSS や FCSS 作用による NER 阻害を軽減させた。しかし、CSS による強い NER 阻害は一部回復したものの、100%ではなかった。この SEM の効果は、生存率の結果と同様であった。

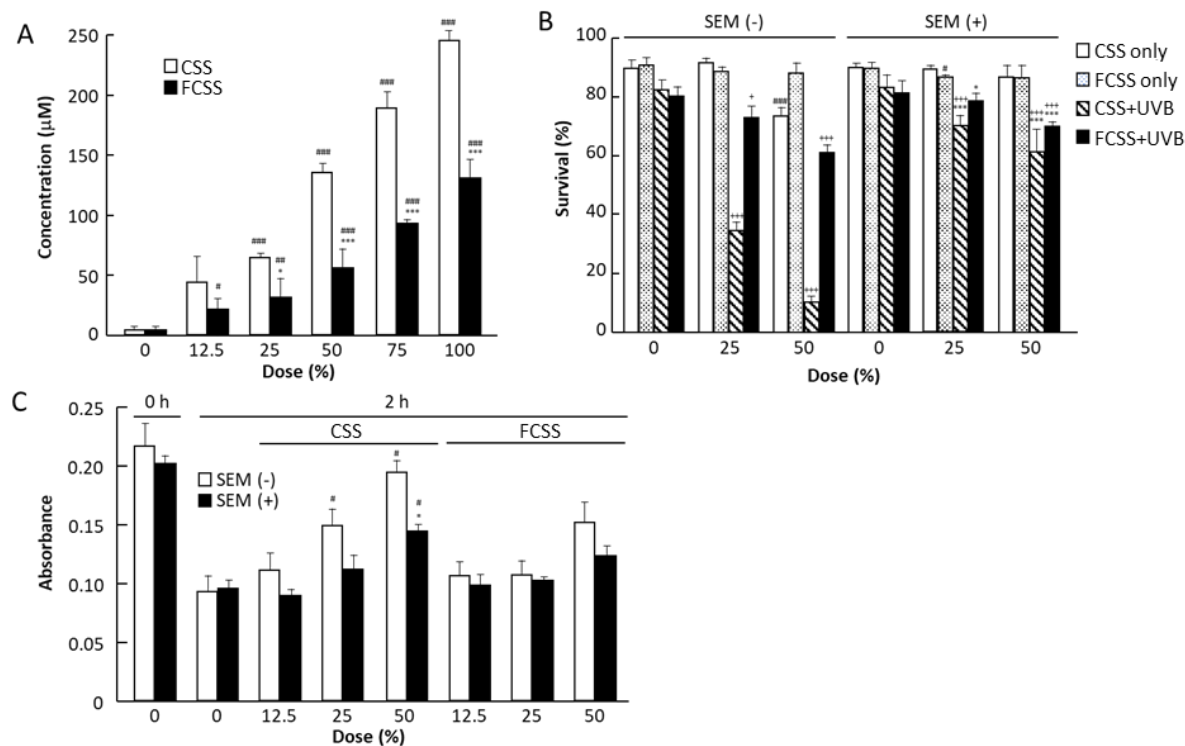


Figure 31 Amounts of aldehydes are related to the different potency for NER inhibition between CSS and FCSS

(A) Concentrations of aldehydes in CSS or FCSS were quantified with Amplite™ Colorimetric Aldehyde Quantitation Kit. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (vs. CSS with FCSS). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (untreated vs. treated with CSS or FCSS).

(B) HaCaT cells were pre-treated with SEM (3 mM) for 1 h, followed by CSS or FCSS (25 or 50%) for 1 h, then irradiation with UVB (0.015 J/cm²). After further culturing for 24 h, cell survival was assessed using the trypan blue dye exclusion assay. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (SEM(-) vs. SEM(+)), # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ (untreated vs. treated with CSS or FCSS), + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ (UVB only vs. CSS+UVB or FCSS+UVB).

(C) After pretreatment with SEM (3 mM) for 1 h, cells were treated with CSS or FCSS (~50%) for 1 h, exposed to UVB (0.04 J/cm²). Then, they were further cultured for 2 h to undergo repair. The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA. * $p < 0.05$ (SEM(-) vs. SEM(+)). # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ (untreated vs. treated with CSS or FCSS).

5-3-5-2 FCSS と CSS による細胞内酸化生成物量の差についての検討

CSS は第三章で示したデータと同様に細胞内酸化生成物量を上昇させた (Fig. 32A)。FCSS 作用した場合、細胞内酸化生成物量は上昇したが、CSS より上昇量が低かった。FCSS を 75%濃度で作用しても、細胞内酸化生成物量は CSS 25%と近いレベルであったが、CSS 50%を作用した場合、劇的な細胞内酸化生成物量の上昇が認められた。抗酸化剤 NAC の前処理は、CSS と FCSS 作用による細胞内酸化生成物量の上昇を阻害しコントロールと同じレベルに戻した。NAC 前処理後、CSS や FCSS 作用による NER 阻害効果の変化について ELISA で検討した (Fig. 32A)。CSS のデータは第四章で示したものと同一のものである。照射 2 時間後、6-4PPs は修復されたが、CSS や FCSS 作用はそれを濃度依存的に阻害した。NAC 前処理させると、CSS と FCSS 作用による 6-4PPs 修復の阻害を大幅に回復させ、UVB のみとほぼ同じレベルになった。

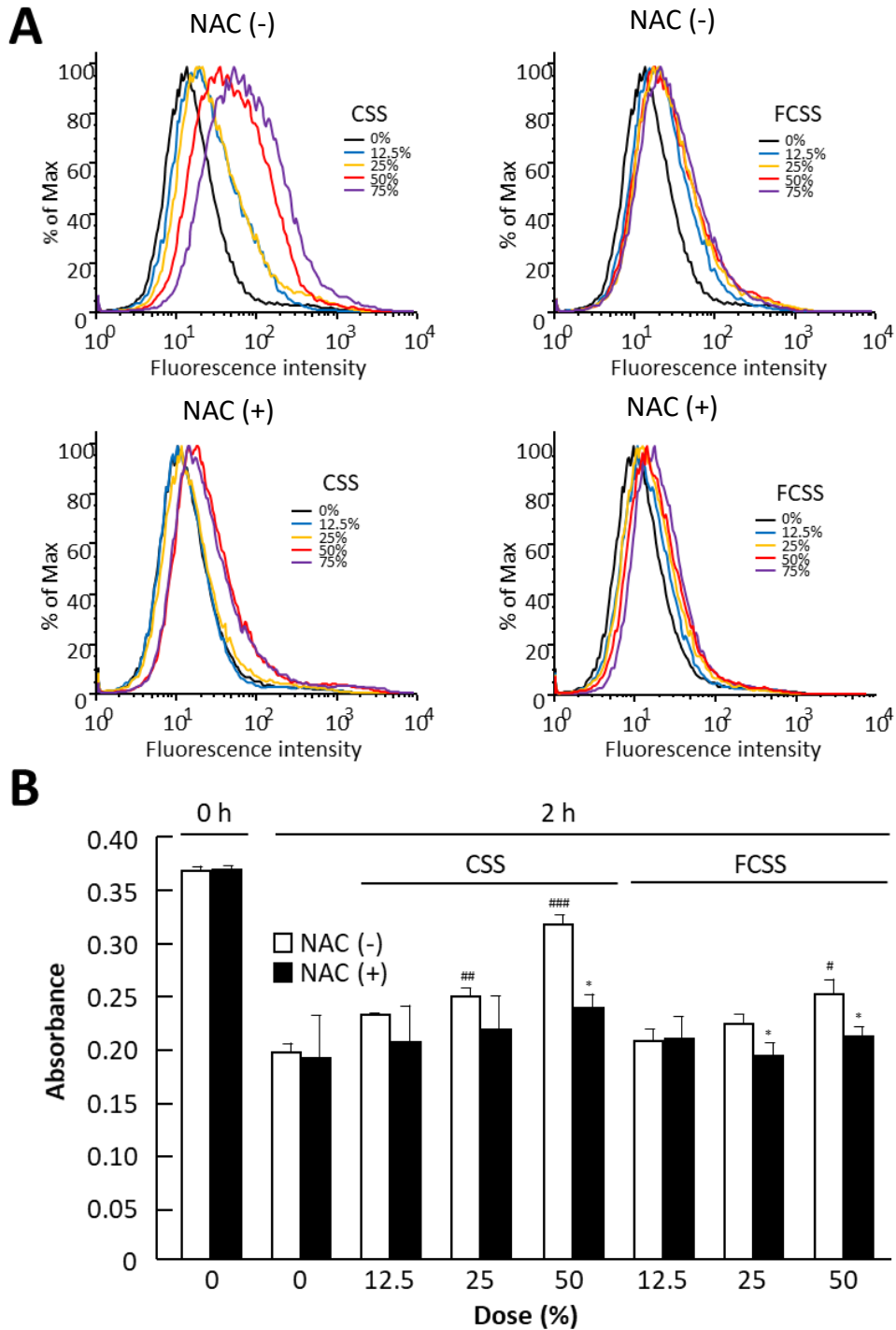


Figure 32 ROS are related to the different potency for NER inhibition between CSS and FCSS

(A) HaCaT cells were treated with DCFHDA for 1 h, followed by NAC (1 mM) for 30 min. After an incubation with CSS and FCSS (~75 %) for 1 h, fluorescence was detected with FCM.

(B) After pretreatment with NAC (1 mM) for 30 min, cells were treated with CSS or FCSS (~50%) for 1 h, exposed to UVB (0.04 J/cm²). Then, they were further cultured for 2 h to undergo repair. The formation and repair of 6-4PPs were detected with ELISA. **p*<0.05 (NAC(-) vs. NAC(+)). #*p*< 0.05, ###*p*< 0.001 (untreated vs. treated with CSS or FCSS).

5-4 考察

たばこ煙中には多くの発がん性化学物質が含まれている。そのほとんどが benzo[a]pyrene のような前発がん物質、つまり生体内代謝により活性化させる物質である。一方、FA や不飽和アルデヒド類など DNA や蛋白質と直接に結合するような発がん物質も存在する [13]。1999 年 Massachusetts Benchmark の研究 [13] で、CSS 中に含まれる FA 濃度は CMS 中に含まれる濃度の 14.78 倍にも高く、その他のアルデヒド類においても CMS に比べ 1-2 倍程度高いことが報告されている。本研究で CSS や FCSS 中に含まれるアルデヒド類濃度を調べた結果、CSS は FCSS の倍程度にアルデヒド類が存在することが明らかになり、Massachusetts Benchmark の研究とほぼ一致した。アルデヒド類は水性溶媒に溶けやすいので、本研究で DMEM 培地にバブリングトラップすることで、ほとんどのアルデヒド類をトラップできたと考えられる。

アルデヒド類は DNA や蛋白質の付加体や架橋を引き起こし、蛋白質の機能を影響することを前章までに紹介した。CSS や FCSS 両方とも NER 遅延や NER 関連因子集積の遅延を引き起こしたが、CSS は FCSS より遥かに効果的であった。SEM で処理されると CSS と FCSS 作用による NER の阻害は大幅に回復され、最終的に、両方は近いレベルになった。これで、CSS や FCSS 中に含まれるアルデヒド類濃度の差は NER 阻害効果差の主要因であることが考えられた。第三章では、CSS 中に含まれる FA や不飽和アルデヒド類は NER を阻害することを報告した。また、FA や acrolein 暴露により NER が遅延することはすでにいくつかの研究で報告されている [31, 42, 53]。本研究でアルデヒド類濃度を測定したが、これはバルクの測定であり、特定のアルデヒド濃度は測れなかったが、不飽和アルデヒド類は FCSS に比べ、CSS の方が高いと想定できた。

また、CSS や FCSS の暴露後産生した ROS による細胞内酸化生成物量は、CSS の方が高かった。第四章で述べたように、NAC はアルデヒド類と反応し、ROS をトラップすることもできる。NAC は CSS、FCSS の効果を完全に阻害した。一方、SEM 作用後、CSS、FCSS 作用による 6-4PPs 修復の遅延は回復したが、完全ではなかった。よって、たばこ煙中に含まれるアルデヒド類に加え、たばこ煙暴露による ROS の産生も CSS と FCSS 作用後の NER 阻害効果の差に関係がある可能性が考えられた。

総括

たばこ煙は、CMS と CSS に大きく分けられる。CMS の有害性についてはこれまでよく研究されているが、最近になって、CSS についてもその有害性が危惧されている。CMS と同様に CSS 中の化学物質やその代謝物は DNA と結合し、付加体などの DNA 損傷を形成するため、発がんの原因となることが知られている。それら DNA 損傷は NER や塩基除去修復などの DNA 損傷修復経路を介して修復されるが、DNA 損傷修復不全は発がん率を上昇させることが報告されている。これまで、CSS による DNA 損傷生成については研究がなされてきたが、DNA 損傷修復に対する影響については十分な検討が行われていない。そこで本研究では、CSS 作用による NER への影響について検討を行った。

第一章では、マウス皮膚ならびにヒト皮膚培養細胞を使用して、CSS 作用後に、NER をその修復経路とする代表的な DNA 損傷であるピリミジンダイマー (cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts (6-4PPs))を形成する UV (UVB, UVC)を照射し検討した。CSS は 5 本のたばこを燃焼させ、その煙を 100 mL DMEM 培地または PBS にバブリングさせトラップした。この溶液を 100%として実験に用いた。HR-1 hairless mouse (8 weeks)の背部皮膚に CSS を 12 時間間隔で 6 回塗布し、UVB 照射後、CPDs の生成と修復を組織免疫染色法で調べた。その結果、照射直後の CPDs 量は CSS 塗布の有無に関わらず同じであったが、CSS を塗布した場合、36 時間後 CPDs の修復が大幅に遅延した。この結果を確認するため、ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT) を用いて実験を行った。HaCaT 細胞を 24 時間血清フリー DMEM で培養した。その後、CSS を 1 時間作用させ、UVB を照射した。はじめに、生存率を測定したところ、CSS 前処理により、UVB による細胞死が有意に亢進した。次に ELISA 法で 6-4PPs の生成と修復を検討した。6-4PPs の生成量は CSS 作用により変化しなかった。2 時間後、6-4PPs は半分程度まで修復されたが、50% CSS を作用させた場合、6-4PPs の修復はほぼ認められなかった。さらに、UVC がポリカーボネートフィルターに遮断される特性を利用して局所照射を行い、免疫蛍光染色法による損傷検出を行った。フィルターの穴を通過し UVC に照射された部分にのみ、CPDs、6-4PPs がフォーカスとして生成した。その生成は CSS の有無に関わらず同程度だった。一方、そのフォーカスの消失は CSS 作用により遅延した。以上の結果より、CSS は NER を阻害することが示された。

第二章では、CSS による NER 遅延メカニズムについて検討した。NER を行うためには、NER に関連する分子が損傷部位に集まらなければならない。NER 関連分子 (TFIIH, XPA, XPG) の損傷部位への集積を局所照射法で検討した。UVC 照射 5~15 分後それら分子は照射部位に集積し、1 時間後遊離した。一方、CSS 作用によりそれらの集積は CSS 濃度依存的に阻害された。NER 分子の集積遅延の理由の一つとして、NER 分子が CSS 中の化学物質と反応し分解された可能性が考えられる。そこで、CSS 作用後 NER 関連分子の分解を Western blot 法で検討した。その結果、CSS 作用後 TFIIH の分解が認められ、さらに、proteasome 阻害剤により分解が抑制された。以上の結果

より、CSS は NER 分子を分解することによって、DNA 損傷部位への NER 分子の集積を阻害し、NER を遅延させることが明らかになった。

第三章では、CSS による NER 遅延を引き起こす CSS 中の化学物質について検討を行った。第二章で明らかになったように、その化学物質は NER 分子を急速に分解する。蛋白質に結合しやすい CS 中の化学物質にアルデヒド類がある。そこでまず始めに、CSS 中のアルデヒド類を除去し、NER に対する影響について検討した。アルデヒド類と反応する SH 基を持つ semicarbazide (SEM) を前処理すると、CSS による NER の遅延が抑制され、NER 分子の集積阻害も回復した。次に、CSS 中に含まれると考えられるアルデヒド類を CSS の代わりに作用させ、NER に対する影響を検討した。アルデヒド類としては最も単純な構造の formaldehyde、 α,β -不飽和アルデヒド類(acrolein, crotonaldehyde, trans-2-pentenal)、飽和アルデヒド類(propionaldehyde, n-butyraldehyde, n-valeraldehyde)の 7 種を作用させた。その結果、formaldehyde や α,β -不飽和アルデヒド類は CSS と同様の NER に対する阻害を示した。一方、飽和アルデヒド類は NER に対する阻害が認められなかった。また、CSS と同様に、NER 分子集積の阻害や蛋白質の分解が formaldehyde や α,β -不飽和アルデヒド類において認められたことから、CSS 作用による NER の遅延は、CSS 中に含まれる formaldehyde や α,β -不飽和アルデヒド類がその原因物質であると考えられた。

第四章では、CSS およびアルデヒド類により生成する活性酸素種 reactive oxygen species (ROS)の NER 阻害への関与について検討した。CSS およびアルデヒド類を作用させると、ROS が産生した。抗酸化剤である n-acetyl-L-cysteine (NAC)により ROS を除去すると、NER 効率はほぼ完全に回復した。NAC は、SEM 同様のアルデヒド類と結合する機能も有し、ROS も除去するため、SEM に比べ NER が完全に回復したと考えられた。CSS による NER の阻害には、アルデヒド類による NER 分子の分解だけでなく ROS による酸化なども一部関与している可能性が示された。

第五章では、CSS と FCSS の NER に対する阻害効果の差を評価した。CSS 作用させた場合、6-4PPs の修復が遅延したが、FCSS 作用させた場合、CSS と比べ、NER 阻害効果が弱かった。また、NER 関連因子の集積においても、TFIIH や XPG では CSS の阻害効果が FCSS より強かった。CSS と FCSS 中に含まれるアルデヒド類の濃度を測定した結果、100%CSS に含まれるアルデヒド類の濃度は約 250 μM であり FCSS(約 130 μM)より倍程度高かった。SEM 前処理は CSS、FCSS 作用による NER の遅延を完全ではないが回復させたことから、アルデヒド類は CSS と FCSS の NER 阻害の主要因であり、両者の NER 阻害効果の差は、その濃度の違いによることが考えられた。本研究では、CSS は NER 関連分子に影響することによって、NER を遅延することを明らかにした。また、CSS 中のアルデヒド類がその原因となる化学物質であることを証明した。

これまで、CS による有害性、中でも発がん機構については、CS 中の化学物質の DNA との反応を中心に考えられてきたが、本研究は CSS が DNA 損傷修復速度を変化させることを明らかにし、DNA 損傷と同時にその修復についても検討することの重要性

を明示した。また、NER 阻害の点から、CS 中の化学物質の中で、アルデヒド除去の必要性を提言するものである。最後に、CSS は NER 阻害の効果が高く、他の DNA 損傷修復における阻害も考えられる。DNA 損傷修復の阻害は様々な病気や発がんに関係していることが明らかになっているため、日常生活において CSS 暴露の低減を心掛ける必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を頂きました本大学 大学院薬食生命科学学府 環境科学専攻 光環境生命科学研究室 伊吹裕子教授、小牧裕佳子助教および豊岡達士元助教に厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査および推敲をして頂きました本学府同専攻 生体機能研究室 下位香代子教授、本学府同専攻 大気環境研究室 雨谷敬史教授、並びに本学府食品栄養科学専攻 栄養化学研究室 三浦進司教授に深謝申し上げます。

加えて、本研究研究生活全般にわたり、御支援および御指導頂きました皆様に深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Food and Agriculture Organization (FAO) data base: Corp <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- 2) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) data base: Daily smokers <https://data.oecd.org/healthrisk/daily-smokers.htm>
- 3) 公益財団法人 日本学校保健会 喫煙防止教育パンフレット <http://www.hokenkai.or.jp/3/3-5/3-55-01.html>
- 4) Musk, AW. and de Klerk, NH.: History of tobacco and health. *Respirology*, **8**, 286-90 (2003).
- 5) Roffo, AH.: Durch Tabak beim Kaninchen entwickeltes Carcinom. *Zeitschrift für Krebsforschung* **33**, 321 (1931).
- 6) Müller, FH.: Tabakmissbrauch und Lungencarcinom. *Zeitschrift für Krebsforschung* **49**, 57-85 (1939).
- 7) Doll, R. and Hill, AB.: The mortality of doctors in relation to their smoking habits. *BMJ.*, **1**, 1451-1455 (1954).
- 8) Hammond, EC. and Horn, D.: The relationship between human smoking habits and deathrates: a follow-up study of 187,766 men. *JAMA.*, **155**,1316-1328 (1954).
- 9) Ubell, E.: CigarettedLung Cancer Link Proved, Dr Hammond Says. *Herald Tribune*, (1954). <http://legacy.library.ucsf.edu/tid/zke6aa00>
- 10) World Health Organization (2017) Tobacco. Fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>
- 11) World Health Organization (2017) Cancer. Fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- 12) Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–120 http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- 13) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **83**, 1-1438 (2004).
- 14) Hoffmann, D. and Hecht, SS.: Advances in Tobacco Carcinogenesis, In: C.S. Cooper, P.L. Grover (Eds), Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I. Handbook of Experimental Pharmacology, *Springer.*, Berlin Heidelberg, vol. 94 / 1. (1990).
- 15) Hoeijmakers, JH.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-74. 2001
- 16) Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M. and Nagata, C.: Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, **314**, 462-4 (1985).
- 17) Fielding, S., Short, C., Davies, K., Wald, N., Bridges, BA. and Waters, R.: Studies on the ability of smoke from different types of cigarettes to induce DNA single-strand breaks in cultured human cells. *Mutat. Res.*, **214**, 147-51 (1989).

- 18) Sipowicz, MA., Amin, S., Desai, D., Kasprzak, KS. and Anderson, LM.: Oxidative DNA damage in tissues of pregnant female mice and fetuses caused by the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Cancer Lett.*, **117**, 87-91 (1997).
- 19) Hess, RD. and Brandner, G.: DNA damage by filtered, tar- and aerosol-free cigarette smoke in rodent cells: a novel evaluation. *Toxicol. Lett.*, **88**, 9-13 (1996).
- 20) Geacintov, NE., Broyde, S., Buterin, T., Naegeli, H., Wu, M., Yan, S. and Patel, DJ.: Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery. *Biopolymers*, **65**, 202-210 (2002).
- 21) Hecht, SS.: Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 559-603 (1998).
- 22) Xue, J., Yang, S. and Seng, S.: Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers (Basel)*, **6**, 1138-1156 (2014).
- 23) Esterbauer, H., Schaur, RJ. and Zollner, H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81-128 (1991).
- 24) Memisoglu, A. and Samson, L.: Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.*, **451**, 39-51 (2000).
- 25) David, SS., O'Shea, VL. and Kundu, S.: Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, **447**, 941-950 (2007).
- 26) Schärer, OD.: Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **5**, a012609 (2013).
- 27) De Laat, WL., Jaspers, NG. and Hoeijmakers, JH.: Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, **13**, 768-85 (1999).
- 28) Holcomb, N., Goswami, M., Han, SG., Clark, S., Orren, DK., Gairola, CG. and Mellon, I.: Exposure of Human Lung Cells to Tobacco Smoke Condensate Inhibits the Nucleotide Excision Repair Pathway. *PLoS One*, **11**, e0158858 (2016).
- 29) Lee, HW., Wang, HT., Weng, MW., Chin, C., Huang, W., Lepor, H., Wu, XR., Rom, WN., Chen, LC. and Tang, MS.: Cigarette side-stream smoke lung and bladder carcinogenesis: inducing mutagenic acrolein-DNA adducts, inhibiting DNA repair and enhancing anchorage-independent-growth cell transformation. *Oncotarget*, **6**, 33226-33236 (2015).
- 30) Chen, Y., Huang, C., Bai, C., Gao, H., Ma, R., Liu, X. and Dong, Q.: Benzo[*a*]pyrene repressed DNA mismatch repair in human breast cancer cells. *Toxicology*, **304**, 167-172 (2013).
- 31) Wang, HT., Hu, Y., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Wu, XR., Chung, FL., Li, GM. and Tang, MS.: Effect of carcinogenic acrolein on DNA repair and mutagenic susceptibility. *J. Biol. Chem.*, **287**, 12379-12386 (2012).
- 32) Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. and

- Horikawa, T.: UV-induced skin damage. *Toxicology*, **189**, 21-39 (2003).
- 33) Nakagawa, A., Kobayashi, N., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, MW., Ikenaga, M. and Mori, T.: Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J. Invest. Dermatol*, **110**, 143-148 (1998).
- 34) DeMarini, DM.: Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.*, **567**, 447-474 (2004).
- 35) Hecht, SS.: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 733-744 (2003).
- 36) Sliwinski, T., Markiewicz, L., Rusin, P., Kabzinski, J., Dziki, L., Milonski, J., Olszewski, J., Blaszczyk, J., Szemraj, J. and Majsterek, I.: Impaired nucleotide excision repair pathway as a possible factor in pathogenesis of head and neck cancer. *Mutat. Res.*, **716**, 51-58 (2011).
- 37) Wang, LE., Hu, Z., Sturgis, EM., Spitz, MR., Strom, SS., Amos, CI., Guo, Z., Qiao, Y., Gillenwater, AM., Myers, JN., Clayman, GL., Weber, RS., El-Naggar, AK., Mao, L., Lippman, SM., Hong, WK. and Wei, Q.: Reduced DNA repair capacity for removing tobacco carcinogen-induced DNA adducts contributes to risk of head and neck cancer but not tumor characteristics. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 764-774 (2010).
- 38) Holcomb, N., Goswami, M., Han, SG., Scott, T., D'Orazio, J., Orren, DK., Gairola, CG. and Mellon, I.: Inorganic arsenic inhibits the nucleotide excision repair pathway and reduces the expression of XPC. *DNA Repair (Amst)*, **52**, 70-80 (2017).
- 39) Kiyohara, C., Takayama, K. and Nakanishi, Y.: Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis. *Lung Cancer*, **54**, 267-283 (2006).
- 40) Foresta, M., Izzotti A, La Maestra, S., Micale, R., Poggi, A., Vecchio, D. and Frosina, G.: Accelerated repair and reduced mutagenicity of DNA damage induced by cigarette smoke in human bronchial cells transfected with E.coli formamidopyrimidine DNA glycosylase. *PLoS One*, **9**, e87984 (2014).
- 41) Luch, A., Frey, FC., Meier, R., Fei, J, and Naegeli, H.: Low-dose formaldehyde delays DNA damage recognition and DNA excision repair in human cells. *PLoS One*, **9**, e94149 (2014).
- 42) Rosado, IV., Langevin, F., Crossan, GP., Takata, M. and Patel, KJ.: Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1432-1434 (2011).
- 43) Zhang, H. and Forman, HJ.: Signaling by 4-hydroxy-2-nonenal: Exposure protocols, target selectivity and degradation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 145-154 (2017).
- 44) Grune, T. and Davies, KJ.: The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol. Aspects. Med.*, **24**, 195-204 (2003).

- 45) Zotter, A., Luijsterburg, MS., Warmerdam, DO., Ibrahim, S., Nigg, A., van Cappellen, WA., Hoeijmakers, JH., van Driel, R., Vermeulen, W. and Houtsmuller, AB.: Recruitment of the nucleotide excision repair endonuclease XPG to sites of UV-induced dna damage depends on functional TFIIH. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8868-8879 (2006).
- 46) Benigni, R., Conti, L., Crebelli, R., Rodomonte, A. and Vari', MR.: Simple and alpha,beta-unsaturated aldehydes: correct prediction of genotoxic activity through structure-activity relationship models. *Environ. Mol. Mutagen*, **46**, 268-280 (2005).
- 47) Schwöbel JA, Koleva YK, Enoch SJ, Bajot F, Hewitt M, Madden JC, Roberts DW, Schultz TW, Cronin MT. Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology. *Chem Rev.* 2011 Apr 13;111(4):2562-96.
- 48) Kuykendall JR, Bogdanffy MS. Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat Res.* 1992 Oct;283(2):131-6.
- 49) Saito, Y., Nishio, K., Yoshida, Y. and Niki, E.: Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology*, **210**, 235-245 (2005).
- 50) Adams, JD. Jr., and Klaidman, LK.: Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 187-193 (1993).
- 51) Pei, Z., Zhuang, Z., Sang, H., Wu, Z., Meng, R., He, EY., Scott, GI., Maris, JR., Li, R. and Ren, J.: α,β -Unsaturated aldehyde crotonaldehyde triggers cardiomyocyte contractile dysfunction: role of TRPV1 and mitochondrial function. *Pharmacol. Res.*, **82**, 40-50 (2014).
- 52) Liu, XY., Yang, ZH., Pan, XJ., Zhu, MX. and Xie, JP.: Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Lett.*, **195**, 90-98 (2010).
- 53) Yoshida, I. and Ibuki, Y.: Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutat. Res.*, **770**, 9-18 (2014).
- 54) Emri, G., Schaefer, D., Held, B., Herbst, C., Zieger, W., Horkay, I. and Bayerl, C.: Low concentrations of formaldehyde induce DNA damage and delay DNA repair after UV irradiation in human skin cells. *Exp. Dermatol.*, **13**, 305-315 (2004).
- 55) Kim, H. and D'Andrea, AD.: Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.*, **26**, 1393-1408 (2012).
- 56) Jaimes, EA., DeMaster, EG., Tian, RX. and Raji, L.: Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1031-1036 (2004).
- 57) Girard, PM., Graindorge, D., Smirnova, V., Rigolet, P., Francesconi, S., Scanlon, S. and Sage, E.: Oxidative stress in mammalian cells impinges on the cysteines redox state of human XRCC3 protein and on its cellular localization. *PLoS One*, **8**, e75751 (2013).
- 58) McAdam, E., Brem, R. and Karran, P.: Oxidative Stress-Induced Protein Damage

- Inhibits DNA Repair and Determines Mutation Risk and Therapeutic Efficacy. *Mol. Cancer Res.*, **14**, 612-622 (2016).
- 59) Gueranger, Q., Li, F., Peacock, M., Larnicol-Fery, A., Brem, R., Macpherson, P., Egly, JM. and Karran, P.: Protein oxidation and DNA repair inhibition by 6-thioguanine and UVA radiation. *J. Invest. Dermatol.*, **134**, 1408-1417 (2014).
- 60) Mohtashamipur, E., Mohtashamipur, A., Germann, PG., Ernst, H., Norpoth, K. and Mohr, U.: Comparative carcinogenicity of cigarette mainstream and sidestream smoke condensates on the mouse skin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **116**, 604-608 (1990).
- 61) Schick, S. and Glantz, S.: Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob. Control*, **14**, 396-404 (2005).
- 62) Gairola, CG., Wu, H., Gupta, RC. and Diana, JN.: Mainstream and sidestream cigarette smoke-induced DNA adducts in C7Bl and DBA mice. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 253-255 (1993).
- 63) Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J Invest Dermatol.* **131**, 1313-1321 (2011).
- 64) Scully R, Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res.* **750**, 5-14 (2013).