

(服部尚子) 論文内容の要旨

主 論 文

Compounds in cigarette smoke induce EGR1 expression via the AHR,
resulting in apoptosis and COPD

タバコの煙に含まれる化合物は AHR を介して EGR1 の発現を誘導し
アポトーシスと COPD を引き起こす

服部尚子、中川武弥、米田光宏、林田広美、中川香をり、山本一男、
Myo Win Htun、柴田恭明、小路武彦、伊藤敬

(The Journal of Biochemistry 172 巻 6 号 365-376 2022 年)
〔12〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：伊藤敬教授)

緒 言

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) は、世界的に主要な死亡原因の一つである。様々な COPD 発症の環境的、遺伝的危険因子の中で、喫煙は重要な因子と考えられている。また、COPD 患者で観察されるアポトーシス肺胞上皮細胞の増加は、肺組織の破壊と肺気腫および COPD の発症にアポトーシスが関与していることを示唆している。

以前、我々はタバコ抽出物を気管支上皮細胞株 BEAS-2B に添加することで Early growth response protein1 (EGR1)の発現が上昇し、アポトーシスを引き起こすことを明らかにした。EGR1 は、ヒト肺胞上皮細胞においてダイオキシンの新規標的の可能性があることが指摘されている。ダイオキシンは芳香族炭化水素の一種であり、Aryl hydrocarbon receptor (AHR)と高い親和性を持つ。

今回、我々はタバコ抽出物やそれに含まれる芳香族炭化水素によるアポトーシスの分子機構を検討した。

対象と方法

BEAS-2B に、タバコ抽出物、加熱式タバコ抽出物を添加し、Annexin-V assay でアポトーシスが引き起こされた細胞の割合を調べた。次に、BEAS-2B のアポトーシスが EGR1 の高発現によることを調べるために、EGR1 を BEAS-2B に強制発現させ、Annexin-V assay でアポトーシスが引き起こされる細胞の割合を調べた。さらに、EGR1 の発現増加が AHR により制御されているかどうか検討するために、EGR1 もしくは AHR をノックダウンした BEAS-2B において、RT-qPCR を用いて EGR1 と AHR の発現を調べ、Annexin-V assay を用いてアポトーシスが引き起こされる細胞の割合を調べた。

COPD の in vivo モデルとしては、喫煙装置を用いて動物をタバコの煙に曝露するの

が一般的な手順であるが、今回はタバコ抽出物や加熱式タバコ抽出物を胸腔内注射することにより、COPDモデルとした。このモデルを用いて、タバコ抽出物や加熱式タバコ抽出物が肺に与える影響を調べた。マウスの胸腔内にタバコ抽出物、加熱式タバコ抽出物を投与し、24時間後に bronchoalveolar lavage fluid (BALF)を回収し、Annexin-V PE染色を行い、アポトーシスを評価した。また、7日後に肺を回収、組織切片を作成し、ヘマトキシレン-エオジン染色を行うことで、肺胞腔の破壊を評価した。

肺胞上皮細胞のアポトーシスを引き起こす芳香族炭化水素を同定するために、タバコに含まれるとされる芳香族炭化水素を BEAS-2B に添加し、RT-qPCR による EGR1 の発現評価、Annexin-V assay によるアポトーシスの評価を行なった。さらに、芳香族炭化水素による BEAS-2B のアポトーシスに AHR が関与しているかどうかを調べるために、タバコ抽出物に加えて AHR アンタゴニストもしくは拮抗を期待して芳香族炭化水素構造をもつ薬剤を添加し、BEAS-2B の EGR1 の発現と Annexin-V assay によるアポトーシス評価を行なった。

結 果

0.1%タバコ抽出物を添加した6時間後には、100%の BEAS-2B がアポトーシスを引き起こしたが、加熱式タバコ抽出物の添加ではアポトーシスは検出できなかった。また、EGR1 を BEAS-2B に強制発現させることで、約10%の細胞がアポトーシスを引き起こした。さらに、AHR をノックダウンした BEAS-2B では EGR1 の発現は低下したが、EGR1 をノックダウンした BEAS-2B では AHR の発現に変化がなかった。

In vivo の実験では、タバコ抽出物投与24時間後のマウスの BALF には、Annexin-V PE 陽性細胞が含まれていたが、コントロールや加熱式タバコ抽出物を添加したマウスの BALF には含まれなかった。タバコ抽出物投与7日後のマウスの肺胞壁は破壊されており、肺胞腔の面積は増大していた。

In vitro では、タバコに含まれるとされる芳香族炭化水素のうち、1-アミノアントラセンや2-アミノアントラセンを BEAS-2B に添加すると、EGR1 の発現上昇とアポトーシスが引き起こされた。

さらに、タバコ抽出物に加えて AHR アンタゴニストを添加した BEAS-2B では、タバコ抽出物のみ添加した BEAS-2B と比較して、EGR1 の発現が有意差はないものの低下傾向にあり、アポトーシスした細胞も減少した。タバコ抽出物に加えて芳香族炭化水素構造をもつ薬剤であるセリプロロールを添加すると EGR1 の発現は抑制された。

考 察

本論文では、タバコ抽出物によるアポトーシスに EGR1 が関与していること、AHR が EGR1 の発現を制御していることを明らかにした。さらに、芳香族炭化水素である1-アミノアントラセンや2-アミノアントラセンなどが、タバコ抽出物による EGR1 発現およびアポトーシスに関与している可能性を示した。また、このアポトーシスは、AHR アンタゴニストにより予防できることが示唆された。