

研究ノート

キノン型多環芳香族炭化水素による活性酸素種の生成と
NF- κ B の活性化およびシクロオキシゲナーゼ-2 の誘導発現木 津 良 一 眞 田 法 子 後 藤 由 佳
薬学部・医療薬学科 薬学部・医療薬学科 薬学部・医療薬学科

Abstract

Tobacco smoke and the atmosphere consist of a wide variety of compounds with adverse health effects. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are principal toxic compounds. Some of PAHs containing oxygen (quinoid PAHs) generate reactive oxygen species (ROS) through enzymatic and nonenzymatic redox cycling reactions. ROS can cause severe oxidative stress leading to various diseases such as cancer and inflammation. In this study, we estimated the intracellular ROS production and nuclear factor kappa B (NF- κ B) translocation in A549 cells exposed to isomers of quinoid PAHs having two to four rings. We found that both acenaphthenequinone (AcQ) and phenanthrene-9,10-quinone (PQ) enhanced ROS generation and that AcQ translocated NF- κ B from the cytosol to the nucleus. In addition, AcQ induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and prostaglandin E2 (PGE2) production were mediated by the activation of NF- κ B. Upregulation of NF- κ B and COX-2 expression and PGE2 production by AcQ treatment was suppressed by the antioxidant N-acetylcysteine. These results provide that AcQ might play an important role in human lung cancer and inflammatory diseases.

1. 目 的

アスベストによる種々の肺疾患、特に悪性中皮腫と肺がんの惹起が極めて重大な社会問題・環境問題になっている。一方、アスベスト作業労働者における悪性中皮腫・肺がんの発症は非喫煙者に比べて喫煙者で著しく高いこと (アメリカ合衆国労働省労働安全衛生局 1990; Nelson and Kelsey 2002)、タバコ煙の有害成分の一つである多環芳香族炭化水素類 (PAH) がアスベストの発がんリスクを著しく高めること (Kimizuka *et al.* 1993; Lori *et al.* 2004) が

報告されている。これらの報告は、タバコ煙や PAH の促進作用を阻害できれば、アスベストによる悪性中皮腫・肺がんの発症を抑制できる可能性を示している。アスベストの発がんメカニズムは未だ殆ど明らかにされていないが、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の産生と DNA の酸化的損傷の寄与が指摘されている (Schürkes 2004)。そこで著者等は、繊維状アスベスト (和光純薬) を粉砕器で粉砕してヒト正常中皮細胞 MeT-5A 細胞を処理し、ROS の発生量ならびに DNA 酸化的損傷量を検討した。種々の条件において慎重に検討したが、いずれの項目についても有意な増加は見られなかった。これは、アスベストを培養液中に添加するだけではアスベストが細胞内に入らず、検出できるほどには細胞内で ROS を産生しな

Quinoid Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Mediated Production of Reactive Oxygen Species and Subsequent Activation of NF- κ B and Induction of Cyclooxygenase-2.

いためと考えられた。以上の結果から、アスベストを直接用いる研究を終了した。

タバコ煙や一般大気中の環境汚染物質が呼吸器系に悪影響を及ぼすことは広く知られている。タバコ煙や一般大気に普遍的に存在する主要な有害汚染物質の一つはPAHであるが、近年、PAHがROSを産生し、酸化ストレス（細胞内外の分子の障害）をもたらすことが報告された（Bolton *et al.* 2000; Shima *et al.* 2006）。著者等は従来から、PAHの酸化ストレス発現メカニズムについての研究を行って来た。そこで本研究では、環境汚染物質やその酸化還元感受性の転写因子であるNF- κ B（Huang *et al.* 2002; Stancovski and Baltimore 1997）とNF- κ B依存性酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）（Chung *et al.* 2002; Zha *et al.* 2004）に着目し、PAHによるROS産生がNF- κ Bの活性とCOX-2とプロスタグランジンE2（PGE2）の産生に及ぼす影響を検討した。

2. 実験

2-1. 試薬

過酸化水素水、N-アセチルシステイン（NAC）、アセナフトキノン（AcQ）、フェナンスレン-9,10-キノン（PQ）およびクリセン（Chr）はSigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）から購入した。アセナフテン（ANT）フェナンスレン（PA）およびクリセン-1,4-キノン（CQ）は関東化学（東京）から購入した。BAY 11-7085は和光純薬（大阪）から購入した。その他の試薬は全てSigma-Aldrichから購入した。

2-2. 細胞と培養

ヒト肺がん由来細胞A549は理化学研究所（和光）から入手した。細胞は、ダルベコ変法MEM—10%胎児牛血清—100 IU/mLペニシリン—100 mg/mLストレプトマイシン培地を用い、37℃、水蒸気飽和、5% CO₂条件下で培養した。

2-3. 細胞内ROS量の測定

A549細胞を96穴プレートに播種し、過酸化水素、PAHと酢酸2',7'-ジクロロフルオレセイン（DCFDA）を含む培地に交換した。一定時間培養したのち、励起波長485 nm、蛍光波長530 nmで各ウェルの蛍光強度を測定した。

2-4. タンパク質試料の調製とウエスタンブロット解析

全細胞溶解試料は、細胞を細胞溶解液 [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) — 20 mM NaF — 150 mM NaCl — 5 mM EGTA — 1 mM EDTA — 0.5% Tween 20 — 0.5% NP-40 — 5% デイキシコール酸 — 1 mM DTT — 2 μ g/mL リューベプチン] で溶解して調製した。細胞質画分および核画分は、CellLytic NuClear Extraction Kit (Sigma-Aldrich) を用いて調製した。

ウエスタンブロット解析は以下のように行った。調製した各試料のタンパク質を7~12% SDS-PAGEで分離した後、Immobilon-P transfer membraneにブロットした。一次抗体は、Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)、ペルオキシダーゼ結合二次抗体はAmersham Life Science (Arlington, IL, USA) のものを使用し、enhanced chemiluminescence detection system (Pierce; Rockford, IL, USA) により可視化した。

2-5. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

活性型NF- κ Bの存在下でルシフェラーゼを発現するレポーターベクターpTAL-NF- κ B (Takara-Bio; 東京) をLipofectAMINE試薬 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) を用いて細胞内に導入し、48穴プレートに播種した。細胞を各PAHで処理した後、PicaGene細胞溶解試薬 (東洋インキ; 東京) にて溶解し、PicaGeneルシフェラーゼキット (東洋インキ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

2-6. PGE2のエンザイムイムノアッセイ

細胞内のPGE2濃度は、エンザイムイムノ

アッセイキット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

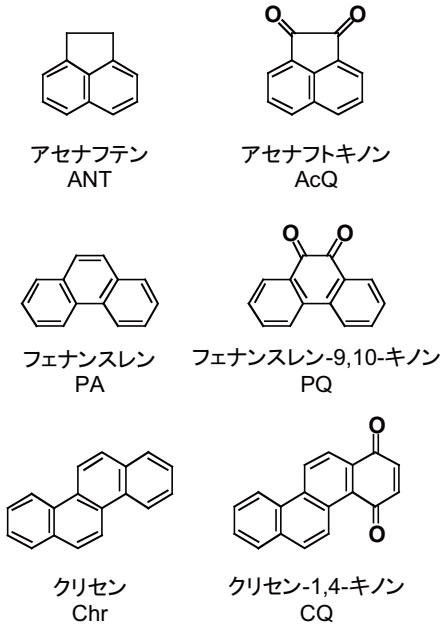


図1 本研究で用いた化合物の構造式

2.7. 統計処理

実験は、相互に独立して繰り返し行ない、得られた結果は、平均値 \pm SE で表示した。平均値間の統計学的有意差は、片側 ANOVA により検定し、 $p < 0.05$ の場合には統計学的に有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. PAHs の ROS 産生促進作用

タバコ煙や一般大気中に普遍的に存在する PAH の中から、著者等のこれまでの研究結果に基づき、2 環 PAH として ANT と AcQ、3 環 PAH として PA と PQ、4 環 PAH として Chr と CQ を選び、ROS 産生促進作用を検討した。用いた PAH の構造式を図 1 に、得られた結果を図 2 に示した。非キノン型の ANT、PA および Chr とキノイド型の CQ には促進効果は見られなかったが、キノン型の AcQ と PQ は促進効果を示し、その効果は濃度依存的であった。

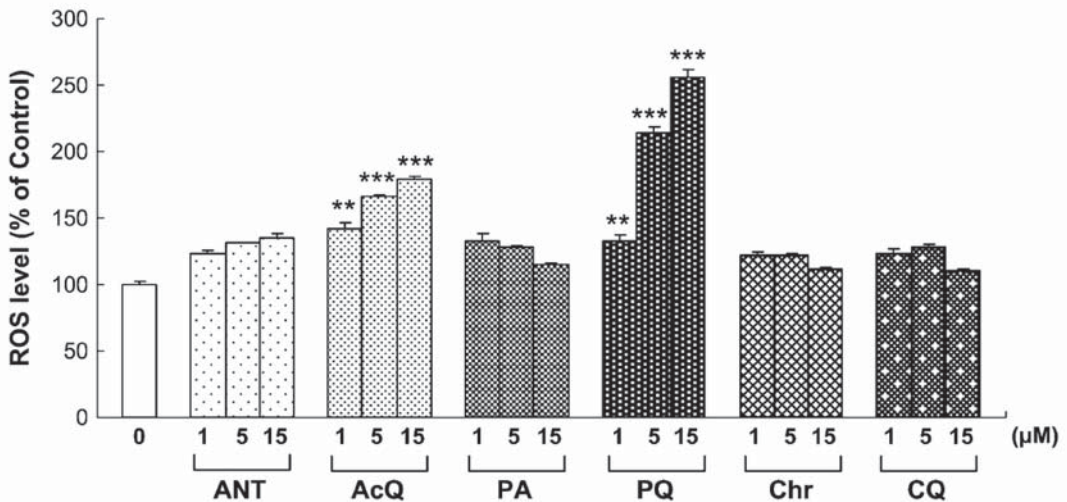


図2 PAH による ROS 産生

各化合物で A549 細胞を 1 時間処理した後、細胞内の ROS を分析した。ROS レベルは、コントロールサンプルを 100 とした相対値で表示されている。

n=5, mean \pm SE, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

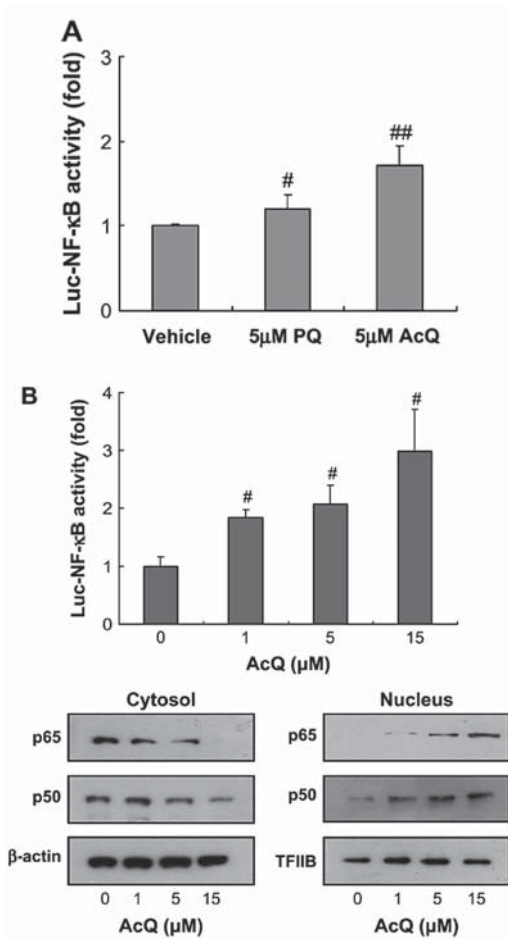


図3 AcQとPQによるNF-κBの活性化

(A) ルシフェラーゼレポーターアッセイによるAcQとPQのNF-κB活性化。

n=5, mean ± SE, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control.

(B) AcQによるNF-κBの活性化の濃度依存性とNF-κBサブユニットの細胞内分布。

n=5, mean ± SE, # $P < 0.05$ vs control.

3.2. NF-κB活性に及ぼすAcQの効果

AcQとPQのNF-κB活性化作用について、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法とウエスタンブロット法により検討した。その結果を図3に示した。AcQ (5 μM)とPQ (5 μM)の処理のいずれにおいても、ルシフェラーゼの活性は有為に上昇し(図3-A)、このルシフェラーゼ活性上昇はAcQとPQの濃度依存的で

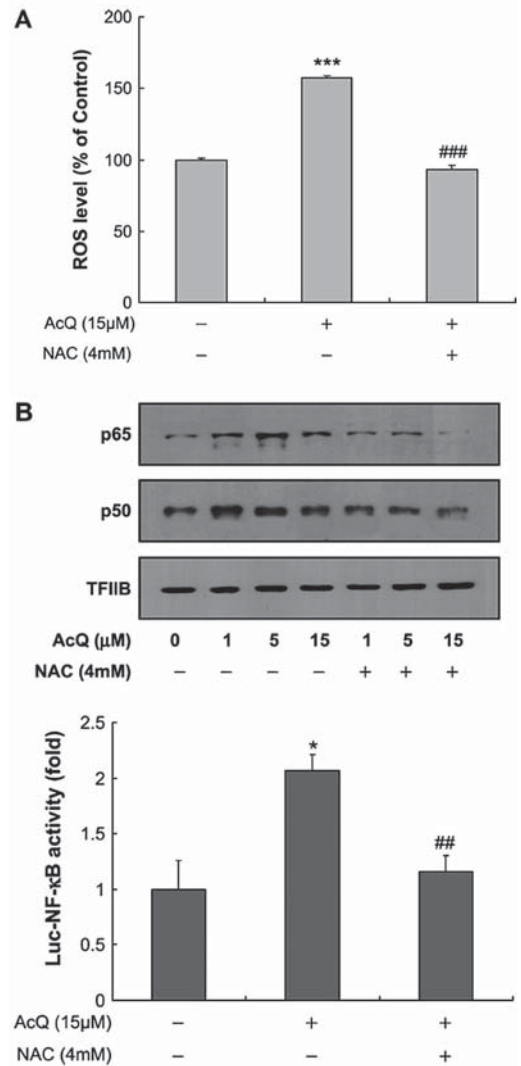


図4 AcQによるNF-κB活性化におけるROSの関与

(A) AcQによるROS産生に及ぼすNACの効果。n=5, mean ± SE, *** $P < 0.001$ vs control, ### $P < 0.001$ vs AcQ処理。

(B) AcQによるNF-κBの活性化とNF-κBサブユニットの細胞内分布。

n=5, mean ± SE, * $P < 0.05$ vs control,

$P < 0.01$ vs AcQ処理。

あった(図3-B上段)。また、NF-κBはp65とp50の2つのサブユニットから構成され、不活性化状態では細胞質画分に存在するが、活性化されると核内に移行する。図3-B下段に示した

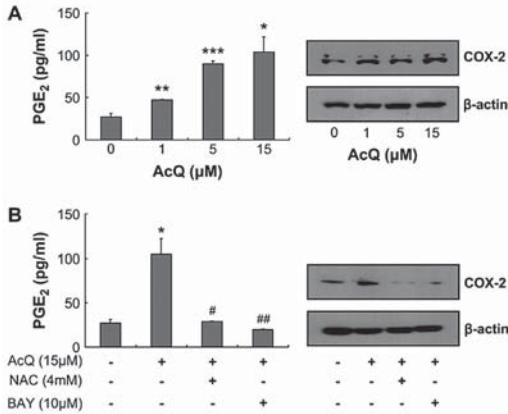


図5 AcQによるCOX-2の誘導発現とPGE2産生増大 (A) COX-2発現レベルおよびPGE2産生に対するAcQの効果の濃度依存性。

n=5, mean ± SE, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs AcQ濃度 0 μM.

(B) AcQによるCOX-2の誘導発現およびPGE2産生増大に対するNACおよびBAY 11-7085の効果。

n=5, mean ± SE, * P < 0.05, # P < 0.01, ## P < 0.001 vs AcQ濃度 0 μM.

ように、p65とp50はともにAcQの濃度依存的に、細胞質画分の濃度が減少し、核画分中の濃度が上昇した。PQでも同様の結果が得られた。尚、β-actinとTFIIDはそれぞれ、細胞質画分と核画分のマーカータンパクである。以上の結果からAcQおよびPQはNF- κ Bを活性化し、活性化されたNF- κ Bは細胞質から核内に移行することが明らかになった。

3.3. AcQによるROS産生およびNF- κ B活性化に対するNACの効果

ROS消去効果をもつNACを併用して、AcQによるNF- κ Bの活性化におけるROSの関与について検討した。その結果を図4に示した。AcQによるROS産生量はNACの共存により著しく低下した(図4-A)。更に、NACの共存によりAcQによるNF- κ Bの核内移行が抑制され(図4-B上段)るとともに、レポーター系でのNF- κ Bの活性化が著しく抑制された(図4-B下段)。以上の結果から、AcQによるNF-

κ Bの活性化にはAcQで産生されたROSが関与していることが明らかになった。

3.4. COX-2発現レベルとPGE2産生に及ぼすAcQの効果

AcQ処理がCOX-2発現レベルとPGE2産生に及ぼす効果について検討した。その結果を図5に示した。A549細胞をAcQで処理すると、濃度依存的にCOX-2発現量とPGE2濃度が上昇した(図5-A)。一方、細胞をROS消去剤のNACまたはCOX-2阻害剤のBAY 11-7085で共処理すると、COX-2発現量とPGE2濃度の上昇がともに抑制された(図5-B)。以上の結果から、AcQにより産生されたROSがCOX-2を誘導発現し、それに伴いPGE2産生量が増加したことが明らかになった。

4. 考察

PAHは、空気、水、食品など身の回りの環境中に普遍的に存在する有害環境汚染物質である。PAHは燃焼の際に有機化合物から生成する非意図的生成物であり、自動車排気、ゴミ焼却廃棄、タバコ煙などを通して大気中に排出されることから、呼吸による恒常的な摂取が続き、特に呼吸器系におけるがん、アレルギー、炎症などの感性疾患との関連が関心を集めている(Durant *et al.* 1996; Knize *et al.* 1999; Takizawa *et al.* 2003; Wogan *et al.* 2004)。

一方、生体内におけるROS産生とそれによる細胞内外の障害(酸化ストレス)ががんや炎症をはじめとする種々の疾患の要因になっていることは広く知られている。PAHの中にはキノン構造を持つものも多い。キノン型PAHが生体内に入ると、セミキノン型構造との間で酸化還元サイクルが生じてROSが産生するとともに、このROSが脂質過酸化やDNAの酸化的損傷を引き起こすことが報告されている(Bolton *et al.* 2000; Shima *et al.* 2006; Bai *et al.* 2005)。非キノン型PAHも体内でシクロP450異物代謝酵素で代謝されて一部はキノン体となることから、キノン型PAHによる

ROS 産生と疾患の関係を明らかにすることは重要な課題である。

種々の外部刺激で活性化される代表的なタンパク質の一つに NF- κ B がある。NF- κ B は転写因子として機能し、NF- κ B で転写調節される遺伝子は、酵素類 (COX-2, iNOS など) サイトカイン類 (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, ケモカインなど) 接着分子、細胞周期調節因子など約 400 にのぼる。また、NF- κ B の活性化によりで誘導発現されるタンパク質の一つに COX-2 がある。COX-2 はアラキドン酸から PGE2 の産生に関わる酵素で、PGE2 は炎症因子である。このような観点から本研究では、PAH による ROS 産生が NF- κ B の活性化と COX-2 の発現レベルに及ぼす影響に着目した。

本研究において、非キノン型 PAH の ANT、PA、Chr は A549 細胞における ROS 産生を促進しなかったが、キノン型 PAH の AcQ と PA は ROS を産生した (図 2)。ルシフェラーゼレポーターアッセイと核内移行を指標とした NF- κ B の活性評価において、AcQ と PA は NF- κ B を活性化した (図 3)。更に、ROS 消去剤の NAC を用いて AcQ で産生される ROS を消去すると、NF- κ B の活性化の低減した (図 4) ことから、AcQ や PQ により産生された ROS が NF- κ B を活性化していることが明らかになった。また、AcQ により COX-2 と PGE2 の発現レベルが上昇したが、この効果は ROS 消去剤の NAC または COX-2 阻害剤の BAY 11-7085 により抑制された (図 5) ことから、COX-2 と PGE2 の発現レベルは ROS に依存していることが明らかになった。

これらの結果を総合すると、本研究で用いたキノン型 PAH の AcQ と PQ は細胞内で ROS を産生し、ROS が NF- κ B を活性化する。活性化された NF- κ B は COX-2 を誘導発現し、PGE2 産生が亢進するというスキームで反応が進行することが明らかとなった。

NF- κ B はがんをはじめとする種々の疾患に関わる重要な因子であるとともに、NF- κ B の活性化により産生が亢進する PGE2 は炎症因

子であることから、呼吸や喫煙によりキノン型 PAH の摂取により、長期間にわたり恒常的に NF- κ B の活性化と PGE2 による炎症状態が続くことは、がんをはじめとする多くの慢性疾患の惹起・増悪につながるものと考えられる。

5. 謝 辞

本研究の一部は、2006 年度同志社女子大学研究助成金 (個人研究) により行われた。

6. 引用文献

- アメリカ合衆国労働省労働安全衛生局編 (1990) アスベストの人体への影響. 中央洋書出版.
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G and Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 13 : 135-160.
- Durant JL, Busby Jr. WF, Lafleur AL, Penman BW and Crespi CL. (1996) Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat. Res.*, 371 : 123-157.
- Huang C, Huang Y, Li J, Hu W, Aziz R, Tang MS, Sun N, Cassady J and Stoner GD. (2002) Inhibition of benzo[a]pyrene diol-epoxide-induced transactivation of activated protein 1 and nuclear factor kappaB by black raspberry extracts. *Cancer Res.*, 62 : 6857-6863.
- Kimizuka G, Azuma A and Ishibashi M. (1993) Co-carcinogenic effect of chrysotile and amosite asbestos with benzo[a]pyrene in the lung of hamsters. *Acta Pathol. Jpn.*, 43 : 149-153.
- Knize MG, Salmon CP, Pais P and Felton JS. (1999) Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 459 : 179-193.
- Lori P, Topinka J, Georgiadis P, Dusinska M, Hurbánková M, Kováčiková Z, Volkovová K and Kyrtopoulos SA. (2004) Benzo[a]pyrene-enhanced mutagenesis by asbestos in the lung of λ -lacI transgenic rats. *Mutation Res.*, 553 : 79-90.
- Nelson HH and Kelsey KT. (2002) The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene*, 21(48) : 7284-7288.
- Shima H, Koike E, Shinohara R and Kobayashi T.

- (2006) Oxidative ability and toxicity of *n*-hexane insoluble fraction of diesel exhaust particles. *Toxicol. Sci.*, 91 : 218-226.
- Schürkes C, Brock W, Abel J and Unfried K. (2004) Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine by man made vitreous fibres and crocidolite asbestos administered intraperitoneally in rats. *Mutation Res.*, 553(1-2), 59-65.
- Stancovski I and Baltimore D. (1997) NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell*, 91 : 290-302.
- Takizawa H, Abe S, Okazaki H, Kohyama T, Sugawara I, Saito Y, Ohtoshi T, Kawasaki S, Desaki M, Nakahara K, Yamamoto K, Matsushima K, Tanaka M, Sagai M and Kudoh S. (2003) Diesel exhaust particles upregulate eotaxin gene expression in human bronchial epithelial cells via nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 284 : 1055-1062.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH and Loeb LA. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 14 : 473-486.
- Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB and De Marzo AM. (2004) Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.*, 215 : 1-20.