

タバコ主流煙による肺胞マクロファージの DNA 損傷の誘導とアポトーシスの抑制

廣 野 由 里 子
竹 内 実

(平成 21 年 9 月 24 日提出)
(平成 21 年 12 月 3 日修正)

要 旨

タバコ喫煙は肺疾患や肺癌などの発症と深く関わっていることが知られている。タバコ煙の中には約 6000 種類以上の化学物質が含まれる。肺には、肺の免疫系において重要な役割を果たしている肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages: AM) が常在し、吸入されたタバコ煙が AM の機能に影響を与える可能性が考えられる。我々は以前より、喫煙による AM の抗原提示能、食作用、サイトカイン産生などの免疫機能の抑制を報告してきたが、この抑制機構についてはいまだ解明されていない。この抑制の機序の一つとして、喫煙による AM の DNA 損傷とそれに引き続く細胞反応が関わっている可能性が考えられる。そこで今回、タバコ主流煙曝露による AM の DNA 損傷への影響、それに引き続くアポトーシスの誘導、細胞増殖および DNA 修復の可能性について検討した。

タバコ喫煙は、C57BL/6 マウスに 1 日 20 本、10 日間、タバコ主流煙を曝露し、AM は気管支肺胞洗浄により回収した。喫煙により AM 数の増加、AM の大型化と細胞内部構造の複雑化、AM の細胞質内への封入体の出現が認められ、喫煙による AM の形態学的な変化が認められた。AM は食作用により異物を取り込み、活性酸素を産生し取り込んだ異物を殺菌、除去する。喫煙により AM がタバコ煙粒子を取り込み、活性酸素種を産生することが考えられたため、喫煙による AM の活性酸素種産生への影響を検討した。AM の活性酸素種 (H_2O_2 , O_2^-) 産生は、喫煙により増加した。活性酸素種は DNA 損傷を誘導することから、喫煙による AM の DNA 損傷への影響を検討したところ、喫煙により、AM の DNA 損傷が誘導されることが確認された。DNA 損傷に続く細胞反応のひとつに、アポトーシスが知られていることから、喫煙により誘導された DNA 損傷が、アポトーシスを引き起こすか否かについて検討した。Fas レセプター (CD95) の発現は、喫煙により減少した。アポトーシスの初期の特徴であるミトコンドリア膜電位の低下が喫煙により認められた。一方、アポトーシスの実行役である Caspase-3 mRNA 発現および Caspase-3/7 活性は減少し、喫煙によって AM のアポトーシスが抑制されることが明らかになった。次にアポトーシス抑制因子である XIAP, survivin の mRNA 発現を検討したが、非喫煙群と喫煙群で差はなかった。また、細胞の生存に重要な役割を果たす Akt の mRNA 発現およびリン酸化は、喫煙により有意に減少した。喫煙によるアポトーシス抑制は、DNA 損傷の修復もしくは細胞増殖が原因であることが考えられたため、AM の DNA 合成について検討した。喫煙により 3H -Thymidine の取り込みが増加し、喫煙が AM の DNA 合成を促進することが確認された。この DNA 合成が細胞増殖のためであるかどうかを検討したが、生存細胞数は非喫煙群と喫煙群で差はなかった。また、細胞周期に関しても、非喫煙群と喫煙群で差はなかった。さらに、喫煙群から回収した AM を 24 時間培養することにより、DNA 損傷が修復されたことから、喫煙による AM の 3H -Thymidine の取り込みの増加は、細胞増殖ではなく DNA 損傷の修復によることが示唆された。

以上の結果より、喫煙による DNA 損傷と修復の繰り返しや修復の間違いが、AM の免疫機

能抑制に関わり、機能低下した AM がアポトーシスを起こさず DNA 修復を通して肺内に留まり続けることが、喫煙による肺疾患や肺癌の発症と密接に関わっている可能性が示唆された。

キーワード：肺胞マクロファージ，喫煙，DNA 損傷，アポトーシス

1. 緒言

タバコ煙は慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) を含む、多くの肺疾患の重要なリスクファクターであり、喫煙関連疾患は、世界的に疾病率や死亡率の主な原因のひとつで、2020 年までに死亡原因の第 3 位になることが予測されている [1, 2]。

タバコ煙は主流煙，副流煙，成長煙，拡散煙，流出煙，くすぶり煙と主流煙を吸った後に喫煙者から吐き出される吹き出し煙（剰余煙）からなり，副流煙，成長煙，拡散煙，流出煙および剰余煙はまとめて環境タバコ煙 (Environmental Tobacco Smoke: ETS) と呼ばれている。タバコ煙の中には約 6000 種類以上の化学物質が含まれ，物質の状態によりガス相と粒子相に分けられる。タバコの熱分解により生じるガス相には一酸化炭素，二酸化炭素，一酸化窒素，アンモニアガスなどが含まれ，多くの微粒子を含む粒子相にはタバコの主成分であるニコチン，発癌・発癌促進物質であるベンツピレン，ジメチルニトロソアミン，ウレタンなどが含まれており，粒子層とガス層の両方に高濃度のフリーラジカルや他の酸化剤が含まれている [1, 3, 4]。

タバコ煙は喫煙により経気道的に肺内に到達する [5]。肺胞には単核食細胞である肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages: AM) が常在する。AM は気管支肺胞領域に存在する細胞の主な集団で，吸入された外来物質や微生物に常に曝されており，これらの外来物質に対する初期防御として機能する。AM は単球に由来し，走化因子に反応して肺に移動し，分化・成熟し AM となる [6–8]。マクロファージの免疫系における主な働きは，食作用と活性酸素産生を通して初期の防御機構を与えること，抗原処理と提示を通して免疫反応を介在すること，サイトカインの放出により局所炎症反応を調節することなどである。また，マクロファージは癌細胞に直接的な細胞傷害作用，および多種のサイトカイン放出を通して抗腫瘍効果を与える [9]。肺胞領域に到達したタバコ煙は AM と直接接触することから，AM のこれらの機能に影響を与える可能性が十分に考えられる。

喫煙が免疫系に及ぼす影響についての報告は，1970 年に Howell らが非喫煙者に比べ，喫煙者で末梢白血球の増加を報告したのが最初であり，1973 年には Esber らがマウスにおいて喫煙による抗体産生機能の低下を報告している [3]。その後，気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar Lavage: BAL) 術が開発され，容易に AM，リンパ球などの肺の細胞が得られるようになったことで，実験動物およびヒトで多くの報告がされるようになった [10, 11]。これまでに多くの研究者によって，タバコ煙，タバコ煙抽出物およびタバコ煙成分などの AM への影響が調べられており，AM

数の増加，活性酸素種産生の増加，DNA 損傷の誘導，炎症性サイトカイン産生の低下と抗炎症性サイトカイン産生の増加，貪食機能の低下，付着能の低下，細胞表面抗原発現の低下，細胞傷害活性の低下などが報告されている [12-18]．特に，タバコと酸化ストレスおよびそれに続く反応についての研究が多く行われている．活性酸素種 (ROS) は核酸やタンパク質，膜脂質を酸化することで細胞の損傷を引き起こす．細胞の DNA に損傷が起こると，それに続く様々な反応が生じ，しばしばアポトーシスを起こすことが知られている [19, 20]．アポトーシスは，過剰な酸化ダメージ (特に DNA 損傷) への中心的な防御反応であり，また胚発生や形態形成，胸腺内の T 細胞の分化など正常な免疫機能に必要な不可欠であり，アポトーシスシグナルの異常な調節は様々な細胞反応を引き起こし，疾病の原因となる [21-23]．これまでに，タバコ煙が種々の細胞において DNA 損傷をもたらすことが一貫して報告されているが，それに続くアポトーシスの反応についての報告は一定ではなく，タバコ煙により引き起こされた DNA 損傷が修復もしくはアポトーシスを導くかどうかは十分に解明されていない [20, 24, 25]．

我々の研究室でも，従来より，環境分野で重要な問題として取り上げられている大気汚染のモデルとしてタバコ喫煙に着目し，喫煙の肺免疫系の影響について検討を重ねており，タバコ煙曝露 AM による肺 NK 細胞活性の低下や LPS 刺激 B 細胞の増殖の抑制，AM の貪食能，抗原提示能および抗体産生能の低下などを報告してきた [10, 26-29]．しかし，この免疫機能の抑制機構はいまだ解明されておらず，喫煙による AM の DNA 損傷やそれに引き続く細胞反応が関わっていることが考えられる．

そこで今回，タバコ主流煙曝露による AM の DNA 損傷への影響，それに引き続くアポトーシスや細胞増殖および DNA 修復の可能性について検討した．

2. 材料及び方法

2.1 実験動物

実験動物は，8～10 週齢の C57BL/6 雌マウス (日本 SLC) を使用した．尚，本研究の動物実験に関しては，京都産業大学動物実験規定に基づき，本大学動物実験委員会により承認されたものである．

2.2 タバコ

タバコは，タバコ研究用標準タバコであるフィルター付き紙巻きタバコ CORESTA APPROVED MONITOR No. 6 (Borgwaldt, ニコチン 1.384 mg, タール 14.40 mg) を使用した．

2.3 タバコ主流煙のマウスへの喫煙

マウスを 1 匹ずつチャンパーに入れ，Hamburg II 自動喫煙装置を用いて，1 puff/35 ml/2 秒の

主流煙（空気：タバコ煙=7：3）を，1日20本，10日間，喫煙の間隔を3日間以上空けないようにしてマウスに喫煙操作を行った（図1a）．これを喫煙（Smoking: S）群とし，喫煙操作を行っていないマウスを非喫煙（Non-Smoking: NS）群とした．

2.4 タバコ主流煙中の粒子数

今回使用したタバコ1本分の主流煙中の粒子数は，パーティクルカウンター（PARTICLE MEASURING SYSTEMS）を用いて，粒子径0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1.0 μm の7段階のサイズについて，空気で400倍希釈し測定した．

2.5 血液中の一酸化炭素結合ヘモグロビン（COHb）濃度

血液中のCOHb濃度は，喫煙終了後，30分以内にマウスを麻酔死させ，後大静脈より採血し，Rapidpoint405（Bayer Healthcare）を用いて測定した．

2.6 気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar Lavage: BAL）

BALは，10日間喫煙終了後1日目にS群マウスを麻酔死させた後，眼科用のハサミとピンセットを用いて腹部から頸部にかけて皮膚を切開し，肺及び気管支を露出させ，26G注射針付きのツベルクリン用1mlシリンジを気管支に差し込み，ピンセットで注射針を押さえながら冷PBS(-)（日水製薬株式会社，Ca²⁺, Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液）1mlを気管支から肺へ注入

a) タバコ主流煙のマウスへの喫煙



b) タバコ主流煙中の粒子サイズと粒子数

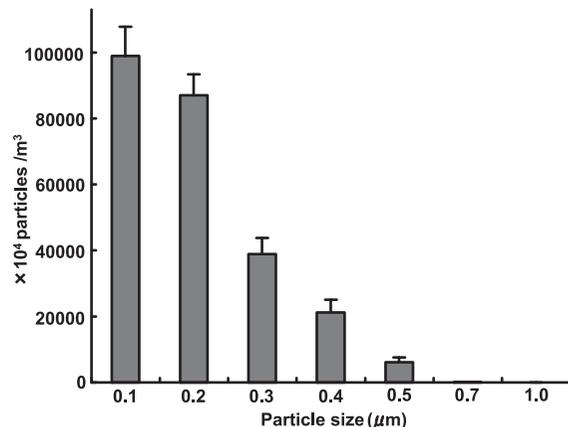


図1 タバコ主流煙のマウスへの喫煙とタバコ主流煙中の粒子数

a) 喫煙操作は，C57BL/6 マウスに研究用タバコである CORESTA APPROVED MONITOR No.6 を1日20本，10日間，Hamburg II 自動喫煙装置を用いてタバコ主流煙を喫煙させた．b) タバコ主流煙中に含まれる粒子数は，パーティクルカウンター（LASAIR）を用いて空気で400倍希釈し測定した．mean \pm S.D.

し、回収する操作を 5 回行った。この回収液を気管支肺胞洗浄液 (Broncho Alveolar Lavage Fluid: BALF) とした。NS 群も同様の操作を行った。

2.7 肺胞マクロファージの調製

上記のとおり回収した BALF を遠心 (1000 rpm, 4°C, 10 分) 後、上清を除去し、RPMI1640(+)(ナカライテスク, 10% FCS, ペニシリン 100 unit/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml を含む, 以下 R(+) と表記) 500 μ l で再懸濁し、肺胞マクロファージ (AM) を調製した。生細胞数は 0.2% トリパンブルー色素排除法を用いて測定した。なお、BAL により回収した細胞比率は 98% 以上が AM であった。

2.8 Dot plot 解析と細胞形態

2.8.1 Dot Plot 解析

BAL により回収した AM を FACS Buffer (Ca²⁺, Mg²⁺ を含むリン酸緩衝液 (PBS(+)) に最終濃度がそれぞれ 1% と 0.1% になるように FCS と NaN₃ を加えたもの) 300 μ l で再懸濁し、FACS Calibur により、Dot Plot 解析を用いて、FSC (Forward Scatter: 前方散乱光) と SSC (Side Scatter: 側方散乱光) 値を測定した。

2.8.2 光学顕微鏡による細胞形態

2.7. で得た AM を R(+) で 5×10^5 /ml に調製し、ラプテックチャンバー (NUNK) にこの細胞浮遊液 200 μ l 加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 1 時間放置し、ラプテックチャンバーに AM を附着させた。その後、上清と非附着細胞を除き、あらかじめ 37°C 温浴槽で温めておいた PBS(-) でチャンバー内を 2 回洗浄し、カバーとゴムを取り除き、直ちにドライヤーの冷風でスライドを乾かした。乾燥後、メタノールを滴下し 3 分間固定し、メタノールを振り落とした後、ギムザ染色溶液を滴下し 20 分間染色した。染色終了後、スライドの片側から水道水で染色液を洗い流し、ドライヤーの冷風で乾燥させ、顕微鏡下で AM の形態を観察した。

2.8.3 透過電子顕微鏡による細胞内微細構造

BAL により回収した AM を 2.5% グルタルアルデヒド固定し、ポリカチオン処理したプレート (セルデスク, 住友ベークライト) 上に載せ、10 分間静置後、0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄し、1% 四酸化オスミウムを用いて室温で 20 分間、後固定した。蒸留水で洗浄した後、エタノール上昇系列によって脱水し、無水アセトンに 2 回浸した。その後細胞をエポン 812 樹脂に包埋し、60°C で一晩重合させた。その後、超薄切片 (厚さ 100 nm) を作製し、酢酸ウラニルと酢酸鉛で電子染色を行い、透過電子顕微鏡 (日立 H-7100, 加速電圧 70 kV) を用いて AM の細胞内微細構造を観察した。

2.9 細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) 産生

2.9.1 H₂O₂ 産生細胞陽性比率

H₂O₂ 産生は 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて測定した。DCFH-DA は細胞膜を透過し細胞質内に取り込まれ、二酢酸塩部分の酵素的切断を受けて蛍光を発しない dichlorofluorescein (DCFH) を生成する。膜非透過性の DCFH は細胞内に留まり、H₂O₂ により酸化され、蛍光を発する dichlorofluorescein (DCF) になる [30]。BAL により回収した AM を R(+) で 5×10^5 /ml に調製した細胞浮遊液 100 μ l にさらに R(+) を加えて 990 μ l にし、ジメチルスルフォキシド (DMSO) で希釈した 2 mM DCFH-DA (Molecular Probes, ストック溶液 20 mM in エタノール) を 10 μ l 加え、37°C, 30 分間振揺反応を行った。反応終了後、PBS(+) を 2 ml 加え、1000 rpm, 10 分間遠心洗浄を 2 回行い、上清を取り除き、FACS Buffer を 300 μ l 加え、FACSCalibur を用いて、H₂O₂ 産生細胞陽性比率を測定した。

2.9.2 O₂⁻ 産生細胞陽性比率

O₂⁻ 産生は hydroethidine (HE) を用いて測定した。非蛍光の HE は細胞膜を透過し細胞質内に取り込まれ、O₂⁻ により酸化されて蛍光を発する ethidium となる [30]。BAL により回収した肺胞マクロファージを R(+) で 5×10^5 /ml に調製した細胞浮遊液 100 μ l にさらに R(+) を加えて 960 μ l にし、PBS(+) で希釈した 250 μ M HE (Polysciences, ストック溶液 25 mM in DMSO) を 40 μ l 加え、37°C, 30 分間振揺反応を行った。反応終了後、PBS(+) を 2 ml 加え、1000 rpm, 10 分間遠心洗浄を 2 回行い、上清を取り除き、FACS Buffer を 300 μ l 加え、FACSCalibur を用いて、O₂⁻ 産生細胞陽性比率を測定した。

2.10 DNA 損傷

DNA 損傷は Comet Assay により測定した。Comet Assay は単細胞電気泳動法 (SCGE 法) とも呼ばれ、個々の細胞の DNA 損傷および DNA 修復を短時間で感度よく検出でき、一般的に使用されている方法である。Comet Assay の原理は、スライドガラス上で細胞をアガロースゲルに包埋し、溶解、アルカリ処理、電気泳動を行い、DNA 結合蛍光色素で染色することで、損傷した DNA が陽極に移動し彗星のような形で現れることを利用したものである [31]。

2.10.1 アガロースゲルの調製

粉状アガロース (LONZA) 0.5 g を PBS(-) 49.5 ml に加え、121°C, 20 分オートクレーブにより完全に溶かし、1% アガロースゲルを作製し室温で保存した。使用の際はこのアガロースゲルを電子レンジで 30 ~ 60 秒加熱して液状にし、42°C の湯浴上で 10 分間放置した後、AM を PBS(-) で 2.5×10^5 /ml に調製した細胞浮遊液 20 μ l と 1% アガロースゲル 200 μ l をマイクロチューブ内で混合し、その内の 75 μ l をスライドガラス上にゲルが平らになるように広げた。その後 4°C,

暗下で 15 分間静置した。

2.10.2 タンパク質の分解

上記のスライドガラス上のゲルを、あらかじめ 4°C で冷やしておいた Lysis solution (塩化ナトリウム 2.5 M, 100 mM EDTA pH 10.0, 10 mM トリス塩基, 1% ラウリル硫酸ナトリウム, 1% Triton X-100 を含む) に浸し, 4°C 暗下で 60 分間静置した。

2.10.3 DNA の変性

上記の反応終了後, スライドガラス上の Lysis solution を慎重に除去し, ゲルを Alkali solution (水酸化ナトリウム 0.6 g, 200 mM EDTA 250 μ l, 蒸留水 49.75 ml, pH > 13) に浸し, 室温, 暗下で 30 分間静置した。

2.10.4 電気泳動

上記の反応終了後, スライドガラス上の Alkali solution を慎重に除去し, ゲルを 1×TBE buffer (トリス塩基 10.8 g, ホウ酸 5.5 g, EDTA 0.93 g, pH 8.0) に 5 分間浸し, 洗浄する操作を 2 回行った。その後, 1×TBE buffer を注いだサブマリン泳動装置を用いて, 9 mA, 10 分間, 電気泳動を行った。

2.10.5 固定

泳動装置から慎重にスライドガラスを取り出し, ゲルを 70% エタノールに 5 分間浸して固定し, 自然乾燥させた。

2.10.6 染色

TE buffer (pH 8.0) 500 μ l と SYBR green I (Invitrogen) 0.1 μ l を混合し, この染色液 20 μ l を乾かしたゲル上に滴下し, 空気が入らないようにカバーガラスで覆った。

2.10.7 観察と解析

染色後, 落射型蛍光顕微鏡により 425 ~ 500 nm の波長で染色された DNA 鎖を検出し, 画像を取り込んだ。一つのサンプルにつき, 細胞を無作為に 30 個選び, コメットアナライザ (ユーワークス) で, Tail Moment と Tail Length を測定した。Tail Moment は DNA 損傷の程度を示し, 核の中心座標と尾の重心座標の距離 \times (尾の輝度合計 / 細胞全体の輝度合計) で算出した。また Tail Length は損傷された DNA 断片の大小の程度を示し, 核を除く尾の部分の長さを測定した。

2.11 Fas レセプター (CD95) の発現

BAL により回収した AM を FACS Buffer で再懸濁した細胞浮遊液 100 μ l (5 \times 10⁴ 個) に, PE (phycoerythrin) 標識抗マウス CD95 抗体 (BD) を希釈した溶液 100 μ l (1 μ g/100 μ l in PBS(-) としたもの) と混合し, 遮光し 4°C で 45 分間反応させた. 非染色には抗体希釈液の代わりに 100 μ l の PBS(-) を加えて同様に反応させた. 反応後, FACS Buffer を 2 ml 加え, 1000 rpm, 10 分間遠心洗浄し, 上清を捨て, FACS Buffer 300 μ l に懸濁後, FACSCalibur により CD95 陽性細胞比率を測定した.

2.12 ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$)

AM のミトコンドリアの膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の変化は, ApoAlert™ Mitochondrial Membrane Sensor Kit (Clontech) を用いて検出した. このキットに含まれる陽イオン性色素は, 通常, ミトコンドリア内に取込まれ, そこで集合体を形成して強い赤色蛍光を発する. アポトーシス細胞中では $\Delta\Psi_m$ が変化するため, 色素はミトコンドリア内に蓄積されずに単量体のまま細胞質内に留まり, その結果, 緑色の蛍光を発する. このことを利用し, $\Delta\Psi_m$ の変化を検出することができる. BAL により回収した AM 5 \times 10⁴ 個を MitoSensor Reagent 1 μ l と Incubation Buffer 1 ml を混合し, 遠心 (14000 rpm, 20°C, 5分) した後の上清で懸濁し, 37°C, 5% CO₂ 下で 20 分間放置した. その後, Incubation Buffer 1 ml を加え, 遠心 (1000 rpm, 4°C, 10 分) し, 上清を除去し, FACS Buffer 300 μ l で懸濁し, FACSCalibur を用いて $\Delta\Psi_m$ が低下した AM の比率を測定した.

2.13 Caspase-3/7 活性

AM の Caspase3/7 活性は Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) を用いて測定した. R(+) で調製した AM をルシフェラーゼ発光測定用白色 96 well 細胞培養プレートに 2 \times 10⁴ 個/100 μ l/well ずつ加え, 37°C, 5% CO₂ 下で 3 時間培養したのち, プレートをインキュベーターから取り出し, 室温になるまで放置した後, 各 well に Caspase-Glo® 3/7 Reagent を 100 μ l ずつ加えた. プレートシェイカーで 30 秒間震盪し, 室温で 1 時間放置した. 反応終了後, wallac 1420 マルチラベルカウンター (PerkinElmer) を用いて発光を測定した.

2.14 Caspase-3, Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) および Akt の mRNA 発現

2.14.1 細胞抽出液の調製

2.7. で得た AM 1 \times 10⁵ 個/200 μ l をマイクロチューブに入れ, 遠心 (1000 rpm, 4°C, 10 分) して, 上清を除去し, 沈殿を Solution D (4 M グアニジンチオシアン酸塩, 25 mM クエン酸ナトリウム, 0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム, 0.1 M 2-メルカプトエタノール) 200 μ l に溶解し, 細胞抽出液とした.

2.14.2 全 RNA の抽出

上記の NS 群, S 群の細胞抽出液から AGPC 法により全 RNA を抽出した。細胞抽出液 100 μ l, H₂O-phenol 100 μ l, 2 M-Sodium Acetate (pH 4) 10 μ l, CIAA 40 μ l を混合し, 4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心をした。遠心後, 上清 100 μ l に 100% エタノール 200 μ l を加えて攪拌した後, -80°C で 15 分間静置した。4°C, 15000 rpm, 30 分間遠心後, 上清を除き, 沈殿に Solution D 300 μ l, phenol/CIAA 300 μ l を加えて攪拌後, 20°C, 15000 rpm, 5 分間遠心をした。遠心後, 上清 300 μ l に 100% エタノール 700 μ l を加えて攪拌し, -80°C で 15 分間静置した。4°C, 15000 rpm, 20 分間遠心後, 上清を除き, 沈殿に 75% エタノール 1000 μ l を加えて攪拌し, 4°C, 15000 rpm, 10 分間遠心した。遠心後, 上清を除き, アスピレーターを用いて減圧乾燥させた。これを全 RNA とした。

2.14.3 cDNA の調製

前述で得た全 RNA に滅菌蒸留水 10 μ l, random primer (宝酒造) 1 μ l を加えて攪拌し, パラフィルムを巻いて 65°C で 5 分間静置した後, 氷中で 5 分間静置した。その後, DTT (invitrogen) 2 μ l, 5×First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3)) 4 μ l, 25 mM dNTP 0.8 μ l, 滅菌水 15.2 μ l, MLV (invitrogen) 1 μ l 加えて, 37°C で 45 分間静置し, 全 RNA から cDNA への逆転写反応を行った。この後, 65°C 10 分間で MLV を失活させ, 10 分間氷中で静置した。これを cDNA サンプルとした。

2.14.4 PCR (polymerase chain reaction)

前述で調製した cDNA サンプル 1 μ l, 下記の primer の sense, anti-sense (invitrogen) をそれぞれ 0.75 μ l, 2×GoTaq Green Master Mix (Promega) 10 μ l, 滅菌水 7.5 μ l を混合し, DNA Engine Thermal Cycler (BIO-RAD) を用いて, β -actin は 30 サイクル, Caspase-3 は 36 サイクル, XIAP は 35 サイクル, survivin は 38 サイクル, Akt は 34 サイクルで cDNA を増幅した。なお, 1 サイクルは 94°C denature, 56°C annealing, 72°C extension を各 30 秒とした。primer は以下の配列のものを使用した。

β -actin (250 bp)

sense 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'

anti-sense 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

Caspase-3 (242 bp)

sense 5'-GGGCCTGTTGAACTGAAAA-3'

anti-sense 5'-CCGTCCTTTGAATTTCTCCA-3'

XIAP (300 bp)

sense 5'-GACACCGTGCAATGTTTCAG-3'

anti-sense 5'-AGGGTTCCTCGGGTATATGG-3'
 survivin (177 bp)
 sense 5'-CATCGCCACCTTCAAGAACT-3'
 anti-sense 5'-TGCTCCTCTATCGGGTTGTC-3'
 Akt (201 bp)
 sense 5'-ACTCATTCCAGACCCACGAC-3'
 anti-sense 5'-GCATGAGGTTCTCCAGCTTC-3'

2.14.5 電気泳動

前述で増幅させた cDNA サンプル 20 μ l を 8% アクリルアミドゲルを用いて、40 mA で 90 分、電気泳動を行った。分子量マーカーは、pBR322DNA-MSP I Digest (BioLabs) を使用した。電気泳動後、ゲルを 1 μ g/ml エチジウムブロマイドで 20 分間染色し、滅菌水で軽く洗ったあと、BioDoc-It システム (UVP) で泳動画像を取り込んだ。

2.14.6 mRNA の発現

取り込んだ泳動画像を Scion image により cDNA のデンストメトリー解析を行い、 β -actin, Caspase-3, XIAP, survivin, Akt の発現量を求め、 β -actin に対する Caspase-3, XIAP, survivin, Akt の発現比を求めた。

2.15 Akt のリン酸化

AM の Akt のリン酸化はリン酸化 Akt に対するモノクローナル抗体を用いて測定した。BAL により回収した AM を PBS(-) で 5×10^4 個/200 μ l 調製し、そこに 100% エタノールと PBS(-) を 7:3 で混合した溶液 2 ml を加え、4°C で 30 分放置し、細胞膜を透過させた。反応終了後、遠心 (1500 rpm, 4°C, 10分) し、上清を除去し、FACS Buffer 100 μ l で再懸濁し、PE 標識抗 Akt 抗体 (pT308) (BD) もしくは Alexa Fluor[®] 647 標識抗 Akt 抗体 (pS473) (BD) を 20 μ l 加え、遮光し室温で 30 分間反応させた。反応終了後、FACS Buffer を 1 ml 加え、遠心洗浄 (1500 rpm, 4°C, 10分) し、上清を除き、300 μ l の FACS Buffer で懸濁後、FACSCalibur によりリン酸化 Akt 陽性細胞比率を測定した。

2.16 DNA 合成

BAL により回収した AM を R(+) で 1×10^5 /ml に調整し、この細胞浮遊液を 96 well 細胞培養プレートに 200 μ l ずつ加え、さらに 18.5 kBq/25 μ l の ³H-Thymidine を加え、37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。培養終了後、フィルターメイトハーベスター (Packard) を用いて細胞を回収し、

トップカウント NXT (Packard) で放射活性を測定し、この放射活性を DNA 合成の指標とした。

2.17 細胞増殖

2.7. で得た AM を R(+) で 5×10^5 個/ml に調製し、この細胞浮遊液 $100 \mu\text{l}$ ずつを 96 well 細胞培養プレートに加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 24 時間培養した。培養終了後、各 well に Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を $10 \mu\text{l}$ ずつ加え、さらに 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 2 時間呈色反応を行った後、wallac 1420 マルチラベルカウンター (PerkinElmer) を用い、 450nm における吸光度を測定し、この吸光度を生存細胞数の指標とした。

2.18 細胞周期

BAL により回収した AM を PBS(-) で 5×10^4 個/ $200 \mu\text{l}$ に調製し、そこに 100% エタノールと PBS(-) を 7:3 で混合した溶液 2ml を加え、 4°C で 30 分放置し、細胞膜を透過させた。反応終了後、遠心 (1500rpm , 4°C , 10分) し、上清を除去し、沈殿を PBS(-) で懸濁し、 1mg/ml Ribonuclease (Wako) $100 \mu\text{l}$ と $400 \mu\text{g/ml}$ ヨウ化プロピジウム (ナカライテスク) $100 \mu\text{l}$ を加え、 37°C 温浴槽で 30 分間反応させた。その後、FACS Buffer を 1ml 加え遠心洗浄を行った後、FACS Buffer $300 \mu\text{l}$ で再懸濁し、FACSCalibur を用いて DNA 含有量を測定した。

2.19 DNA 修復

DNA 修復は、BAL により回収した AM を PBS(-) で $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製した細胞浮遊液を 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 24 時間培養した後、前述と同様に Comet Assay を行い、培養前後で DNA 損傷の程度を測定した。

2.20 統計解析

全ての実験において、成績値は平均値 (mean) \pm 標準偏差 (Standard Deviation: S.D.) で示した。有意差検定は Student's t test により行い、NS 群と S 群を比較し、 $p < 0.05$ を有意差とした。

3. 成績

3.1 タバコ主流煙中の粒子数

今回使用したタバコ 1 本分の主流煙に含まれる粒子数は、粒径 $0.1 \mu\text{m}$ の粒子 $98884 \pm 8891 \times 10^4$ 個/ m^3 (mean \pm S.D.)、粒径 $0.2 \mu\text{m}$ の粒子 $87006 \pm 6315 \times 10^4$ 個/ m^3 、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の粒子 $38877 \pm 4867 \times 10^4$ 個/ m^3 、粒径 $0.4 \mu\text{m}$ の粒子 $21180 \pm 3900 \times 10^4$ 個/ m^3 、粒径 $0.5 \mu\text{m}$ の粒子 $6084 \pm 1508 \times 10^4$ 個/ m^3 、粒径 $0.7 \mu\text{m}$ の粒子 $93 \pm 28 \times 10^4$ 個/ m^3 、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ の粒子 $1 \pm 1 \times 10^4$ 個/ m^3 で、総粒子数は $252126 \pm 14407 \times 10^4$ 個/ m^3 であり、直径 $0.1 \mu\text{m}$ の粒子数が最も多かった (図 1b)。

3.2 喫煙による血液中の COHb 濃度

喫煙の指標として静脈血中の COHb 濃度を測定した。COHb 濃度は、NS 群 $0.9 \pm 1.11\%$ (mean \pm S.D.)、S 群 $20.1 \pm 4.24\%$ で、喫煙により有意な ($p < 0.001$) 増加が認められ、本喫煙操作によりマウスが喫煙していたことが確認された (図 2a)。

3.3 喫煙による AM 数

BAL により回収された肺胞マクロファージ (AM) の総細胞数は、NS 群 $2.81 \pm 0.6 \times 10^5$ 個/匹 (mean \pm S.D.)、S 群 $4.36 \pm 0.6 \times 10^5$ 個/匹であり、喫煙により有意な ($p < 0.001$) 増加が認められた (図 2b)。なお、BAL により回収した細胞比率は、NS 群、S 群ともに 98% 以上が AM であり両群で差は認められなかった。また、AM の生存率はトリパンブルー色素排除法により、NS 群、S 群ともに 95% 以上であり両群で差は認められなかった。

3.4 喫煙による AM の形態

3.4.1 Dot Plot 解析

AM の Dot Plot は、NS 群では FSC 値 200 ~ 520、SSC 値 80 ~ 320、S 群では FSC 値 200 ~ 560、SSC 値 120 ~ 480 であり、FSC 値、SSC 値ともに S 群で増加していることから、喫煙によって肺胞マクロファージの大型化、細胞内部構造の複雑化が認められた (図 3a)。

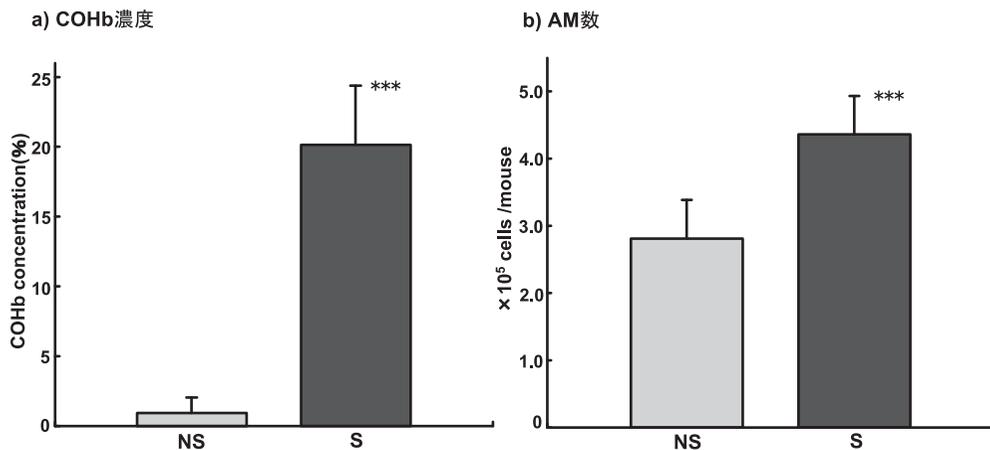


図 2 喫煙による血液中の COHb 濃度と AM 数

a) 血液中の COHb 濃度は、タバコ煙曝露後 30 分以内にマウスを麻酔死させ、後大静脈より採血し、Rapidpoint405 (Bayer Healthcare) を用いて測定した。b) AM は、マウスを麻酔死させ気管支肺胞洗浄 (BAL) により回収した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, ***: $p < 0.001$, mean \pm S.D.

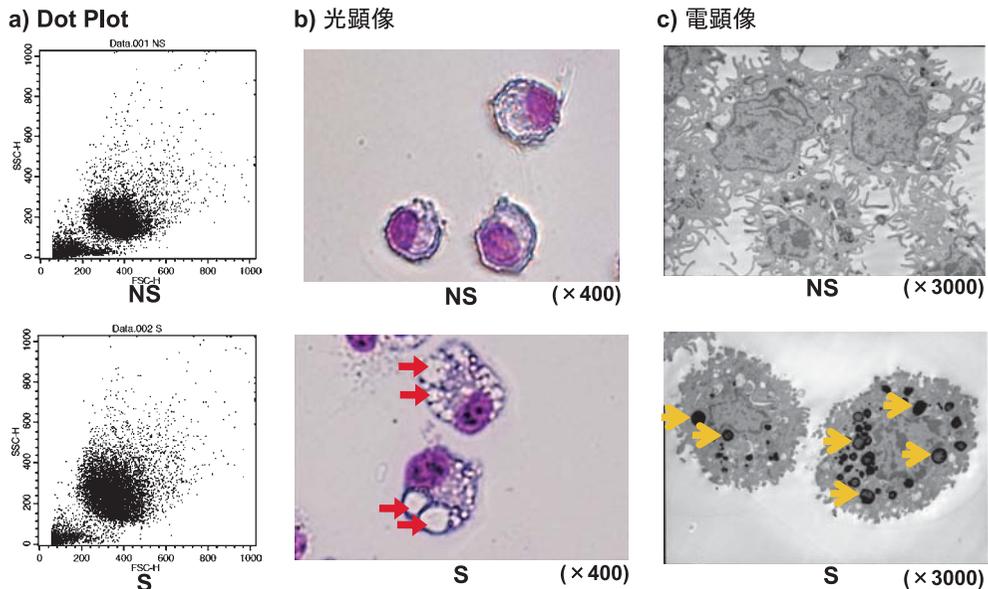


図3 喫煙による AM の Dot Plot , 形態および細胞内構造

a) AM の Dot Plot 解析は FACSCalibur を用いて行った . b) AM の形態の変化は , AM をギムザ染色し , 光学顕微鏡下で観察した . c) AM の細胞内構造は , AM を 2.5% グルタルアルデヒドで固定 , 1% 四酸化オスミウムで後固定した後 , エポン 812 樹脂に包埋して超薄切片を作製し , 酢酸ウラニルと酢酸鉛で電子染色した後 , 透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した . NS: 非喫煙群 , S: 喫煙群 , \rightarrow : 空胞 , \blacktriangleright : 封入体

3.4.2 光学顕微鏡による細胞形態

AM の細胞形態は , NS 群の AM に比べ S 群の AM は細胞胞体が大きく , また細胞質内に空胞形成が認められた (図 3b) .

3.4.3 透過電子顕微鏡による細胞内微細構造

AM の細胞内微細構造は , S 群の AM の細胞質内に , NS 群の AM には認められない電子密度の高い約 $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ の楕円形の封入体の出現が確認された (図 3c) .

3.5 喫煙による AM の ROS 産生

喫煙により , AM がタバコ煙粒子を異物と認識し取り込み , ROS を産生することが考えられることから , 喫煙による AM の ROS 産生について検討した . H_2O_2 産生は , NS 群の H_2O_2 産生細胞比率を 1.0 とした場合 , S 群では 2.35 ± 0.47 (mean \pm S.D.) であり , NS 群に比べ有意 ($p < 0.001$) に増加した . また , O_2^- 産生は , NS 群の O_2^- 産生細胞比率を 1.0 とした場合 , S 群では 1.64 ± 0.30 であり , NS 群に比べ有意 ($p < 0.01$) に増加し , S 群で H_2O_2 と O_2^- の両方の産生の増加が認められた (図 4) .

3.6 喫煙による AM の DNA 損傷

ROS が DNA 損傷を誘導することが知られていることから，喫煙による AM の DNA 損傷への影響を検討した．Tail Moment と Tail Length は図 5a で示したとおりに算出した．S 群の AM で，コメット像のテールの伸長が認められた（図 5b）．Tail Moment は，NS 群で 0.143 ± 0.014 (mean \pm S.D.)，S 群で 0.718 ± 0.191 であった．Tail Length は，NS 群で 23.3 ± 2.7 ，S 群で 57.1 ± 8.4 であった．Tail Moment, Tail Length とともに，NS 群にくらべ S 群で有意な ($p < 0.001$) 増加が認めら

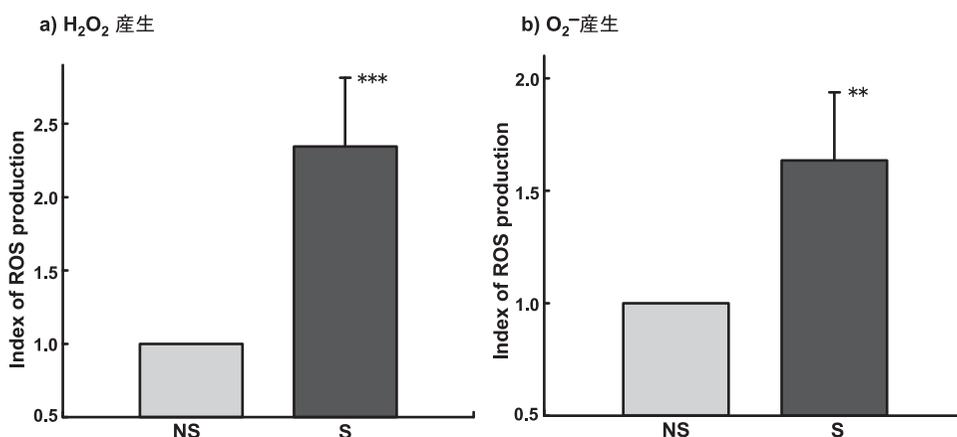
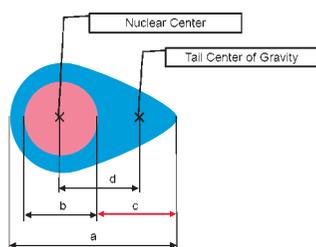


図 4 喫煙による AM の ROS 産生

H₂O₂ および O₂⁻ 産生はそれぞれ，DCFH-DA と HE を用いて FACSCalibur により解析した．NS の ROS 産生の値を 1 として示した．NS: 非喫煙群，S: 喫煙群，***: $p < 0.001$ ，**: $p < 0.01$, mean \pm S.D.

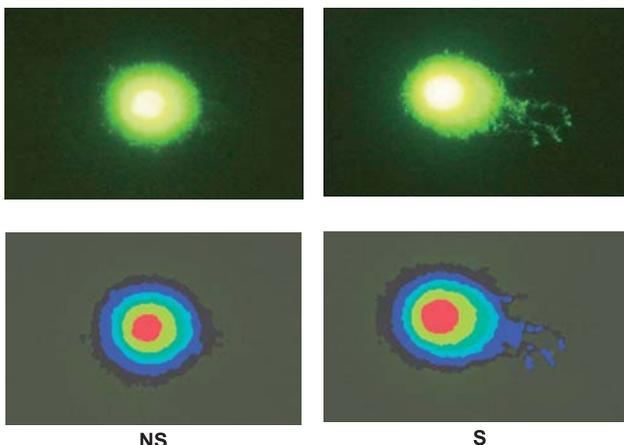
a) Tail Moment と Tail Length



- Total Length
- Nuclear Diameter
- Tail Length
- Tail Distance

Tail Moment : Tail Distance \times (尾の輝度合計/細胞全体の輝度合計)

b) コメット像



NS

S

図 5 喫煙による AM の DNA 損傷 (1)

AM の DNA 損傷は，Comet Assay により測定した．コメット像はコメットアナライザを用いて解析した．NS: 非喫煙群，S: 喫煙群

れ, S 群で AM の DNA 損傷が認められた (図 6).

3.7 喫煙による AM の Fas レセプター (CD95) 発現

喫煙によりアポトーシスの引き金となる DNA 損傷が誘導されたことから, これが AM のアポトーシスにつながるか否かを調べた. なお, アポトーシスの経路は図 7 に示した. まず受容

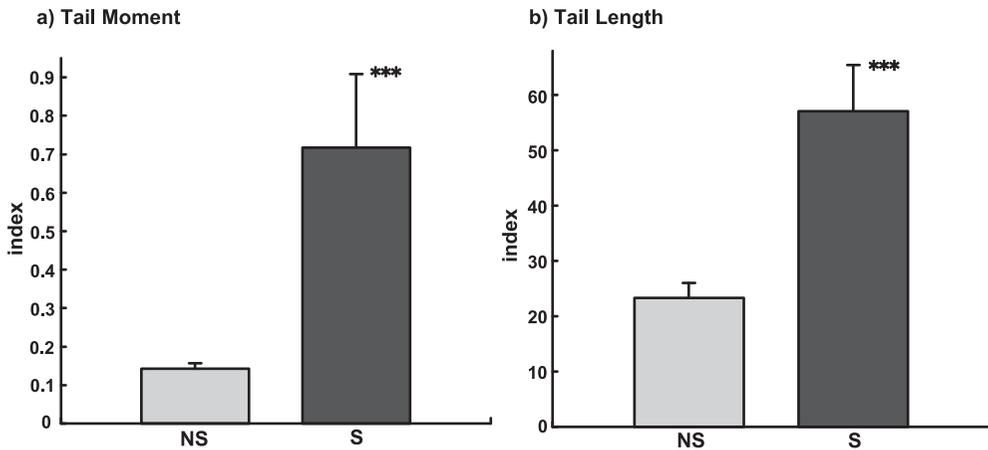


図 6 喫煙による AM の DNA 損傷 (2)

DNA 損傷の指標として, コメットアナライザにより算出した Tail Moment と Tail Length を使用した. NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, ***: $p < 0.001$, mean \pm S.D.

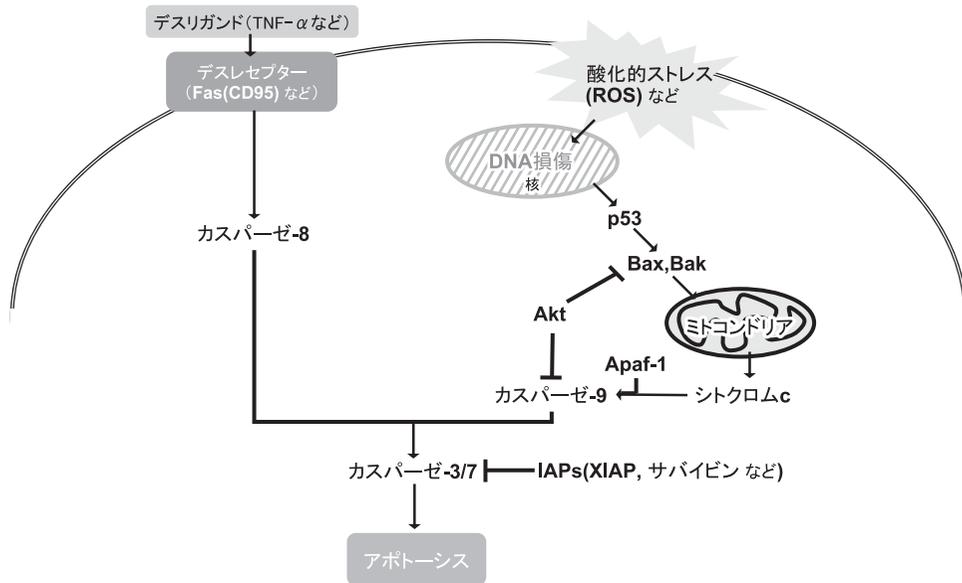


図 7 アポトーシスの経路

体介在性アポトーシスの可能性について、Fas レセプター (CD95) の陽性細胞比率を測定し検討した。CD95 陽性細胞比率は、NS 群で $89.93 \pm 2.62\%$ (mean \pm S.D.)、S 群で $61.14 \pm 9.79\%$ であり、NS 群に比べ S 群で有意 ($p < 0.01$) に減少した (図 8a)。

3.8 喫煙による AM のミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$)

受容体介在性アポトーシスの可能性が否定されたので、次にミトコンドリア介在性アポトーシスの可能性について検討するため、アポトーシス初期の特徴であるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下が喫煙により誘導されるか否か検討した。 $\Delta\Psi_m$ が低下した AM の比率は、NS 群の値を 1.0 としたとき、S 群では 1.87 ± 0.42 (mean \pm S.D.) であり、NS 群に比べ有意 ($p < 0.001$) に増加した (図 8b)。

3.9 喫煙による AM の Caspase-3 mRNA 発現および Caspase-3/7 活性

喫煙により AM の $\Delta\Psi_m$ が低下することから、アポトーシスの実行役である Caspase-3 の mRNA 発現および活性を測定した。Caspase-3 mRNA 発現比率は、NS 群で 0.47 ± 0.13 (mean S.D.)、S 群で 0.29 ± 0.08 であり、NS 群に比べ S 群で有意 ($p < 0.01$) に減少した (図 9a)。Caspase-3/7 活性は、NS 群で 5561 ± 974.0 (mean \pm S.D.) で、S 群で 3792 ± 2381.3 であり、NS 群に比べ S 群で有意 ($p < 0.05$) に減少した (図 9b)。

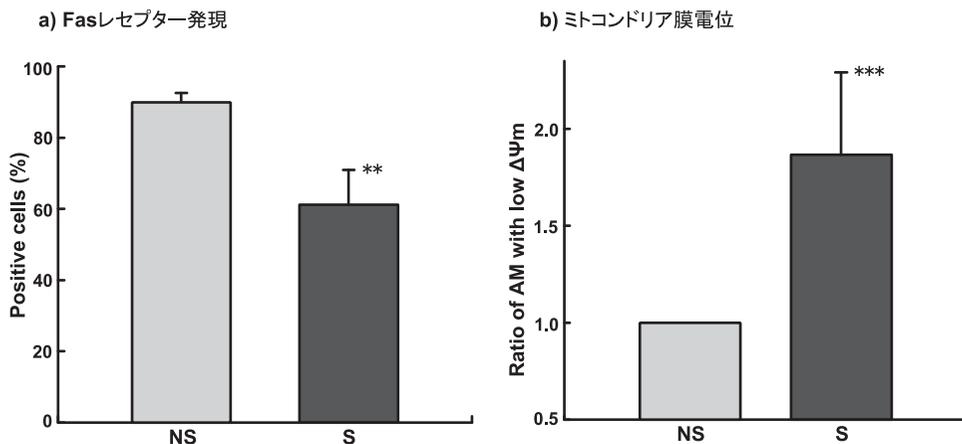


図 8 喫煙による AM の Fas レセプター (CD95) 発現とミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$)
 a) AM の FAS レセプター (CD95) の発現は、PE 標識抗 CD95 抗体を用いて FACSCalibur により解析した。b) ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の変化は ApoAlert Mitochondrial Membrane Sensor Kit を用いて、FACSCalibur により測定した。 $\Delta\Psi_m$ が減少した AM の比率は、NS 群の値を 1.0 として示した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, mean \pm S.D.

3.10 喫煙による AM の IAPs および Akt mRNA 発現

喫煙により AM の DNA 損傷が認められたにも関わらず、アポトーシスは引き起こされなかったことから、アポトーシス抑制因子 (Inhibitors of Apoptosis Proteins) である XIAP, survivin および細胞の生存に重要な役割を果たす Akt の mRNA 発現を調べた。XIAP mRNA 発現比率は、NS 群で 0.77 ± 0.05 (mean \pm S.D.), S 群で 0.76 ± 0.15 , survivin mRNA の発現比率は、NS 群で 0.76 ± 0.06 , S 群で 0.77 ± 0.08 であり、XIAP, survivin とともに、NS 群と S 群の間で差はなかった (図 10)。Akt mRNA 発現比率は、NS 群で 0.63 ± 0.06 (mean \pm S.D.), S 群で 0.51 ± 0.14 であり、NS 群に比べ、S 群で有意 ($p < 0.05$) に減少した (図 11a)。

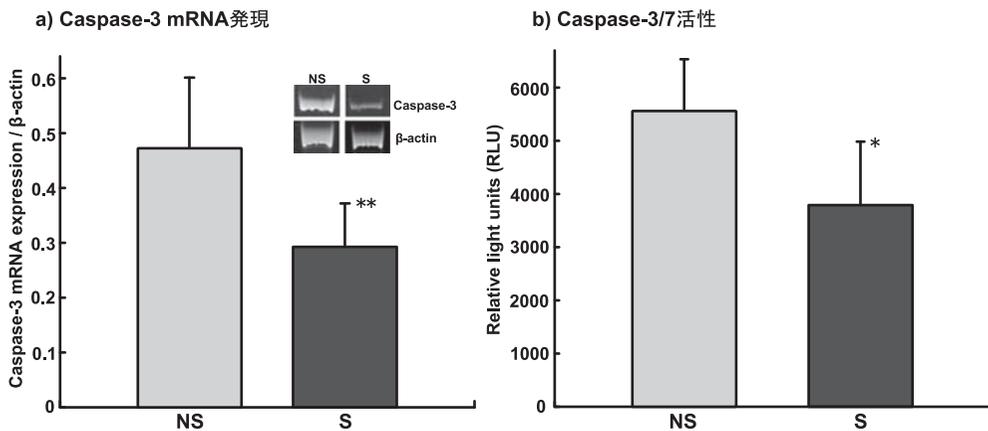


図 9 喫煙による AM の Caspase-3 mRNA 発現と Caspase-3/7 活性

a) Caspase-3 mRNA 発現は、RT-PCR 法を用いて検討した。b) Caspase-3/7 活性は、Caspase-Glo[®] 3/7 Assay を用いて測定した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, mean \pm S.D.

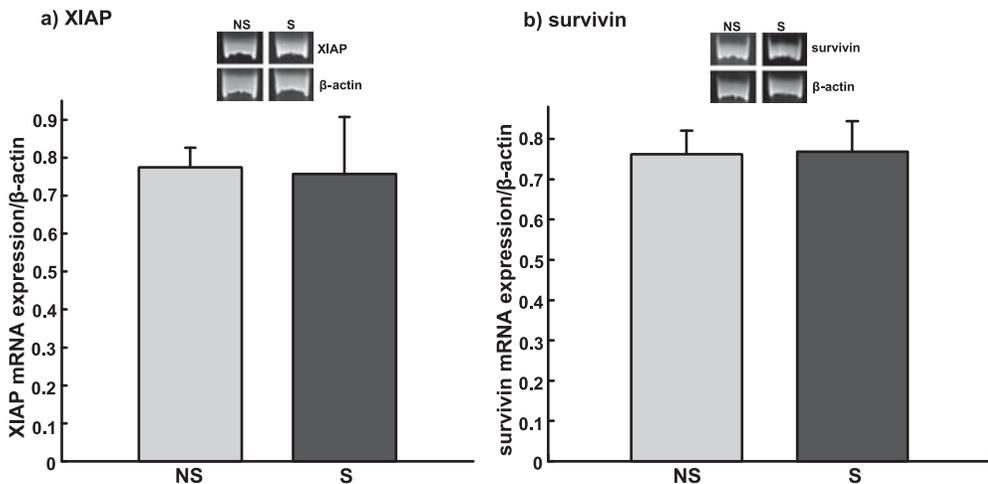


図 10 喫煙による AM のアポトーシス抑制因子 (IAPs)mRNA 発現

XIAP と survivin の mRNA 発現は RT-PCR 法を用いて検討した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, mean \pm S.D.

3.11 喫煙による AM の Akt のリン酸化

Akt の活性化には Thr308 と Ser473 の 2 カ所のリン酸化が必要である．Akt Thr308 リン酸化陽性細胞比率は，NS 群で $69.26 \pm 3.71\%$ (mean \pm S.D.)，S 群で $60.83 \pm 2.76\%$ ，Akt Ser473 リン酸化陽性細胞比率は，NS 群で $72.73 \pm 6.10\%$ ，S 群で $40.65 \pm 2.55\%$ であり，Thr308 と Ser473 のどちらのリン酸化も，NS 群に比べ，S 群で有意 ($p < 0.01$, $p < 0.001$) に減少していた (図 11b)．

3.12 喫煙による AM の DNA 合成

喫煙による AM のアポトーシスの抑制への IAPs および Akt の関与が否定されたため，喫煙により誘導された AM の DNA 損傷に対する修復もしくは細胞増殖の可能性を検討するために， ^3H -Thymidine の取り込みにより AM の DNA 合成について検討した．AM による ^3H -Thymidine の取り込みを示す放射活性は，NS 群で 1713.4 ± 561.4 cpm (mean \pm S.D.)，S 群で 3107.8 ± 1062.0 cpm であり，NS 群に比べ S 群で，DNA 合成が有意 ($p < 0.01$) に増加した (図 12a)．

3.13 喫煙による AM の細胞増殖

喫煙による AM の DNA 合成の増加が認められたことから，これが AM の細胞増殖のためであるかどうかを調べた．生存細胞数の指標である吸光度は，NS 群で 0.668 ± 0.166 ，S 群で 0.647 ± 0.148 であり，NS 群と S 群の間で差はなかった (図 12b)．

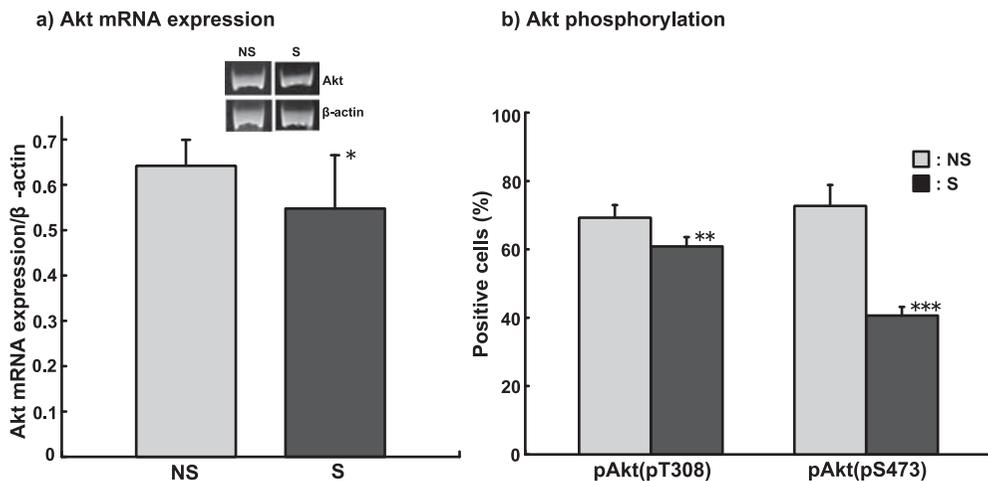


図 11 喫煙による AM の Akt mRNA 発現と Akt リン酸化

a) Akt mRNA 発現は RT-PCR 法を用いて検討した．b) リン酸化 Akt は，PE 標識抗 Akt(pT308) 抗体と Alexa Fluor[®] 647 標識抗 Akt(pS473) 抗体を用いて FACSCalibur により解析した．NS: 非喫煙群，S: 喫煙群，*: $p < 0.05$ ，**: $p < 0.01$ ，***: $p < 0.001$, mean \pm S.D.

3.14 喫煙による AM の細胞周期

細胞増殖の可能性についてさらに検討するために、喫煙が AM の細胞周期進行に影響を及ぼすか否かを検討した。細胞周期は AM の DNA 量を測定することで決定した。NS 群では G0/G1 期：93.68 ± 0.63%，S 期：3.37 ± 0.44%，G2/M 期：2.74 ± 0.58% で、S 群では G0/G1 期：94.20 ± 0.45%，

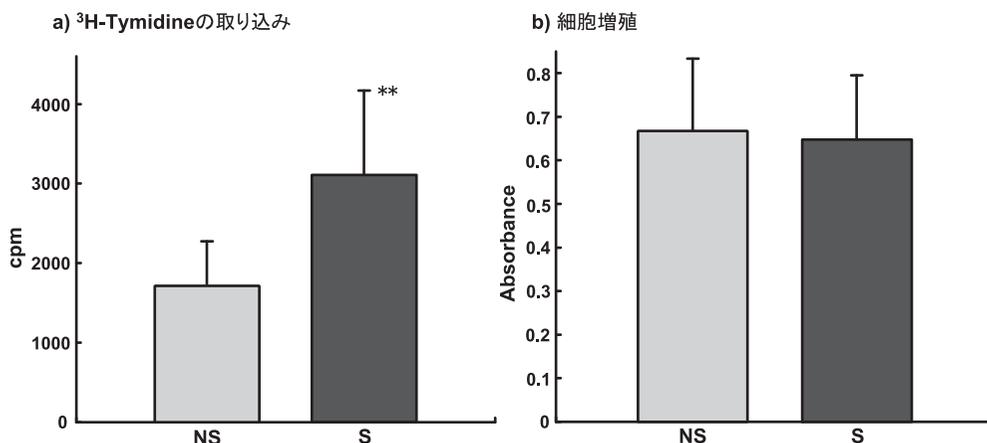


図 12 喫煙による AM の ³H-Thymidine の取り込みと細胞増殖

a) ³H-Thymidine の取り込みは、AM を 18.5 kBq の ³H-Thymidine と 37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養後、細胞を回収し、放射活性を測定することで検討した。b) 細胞増殖は、AM を 37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養後、Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を加え、吸光度を測定することで検討した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, **: p < 0.01, mean ± S.D.

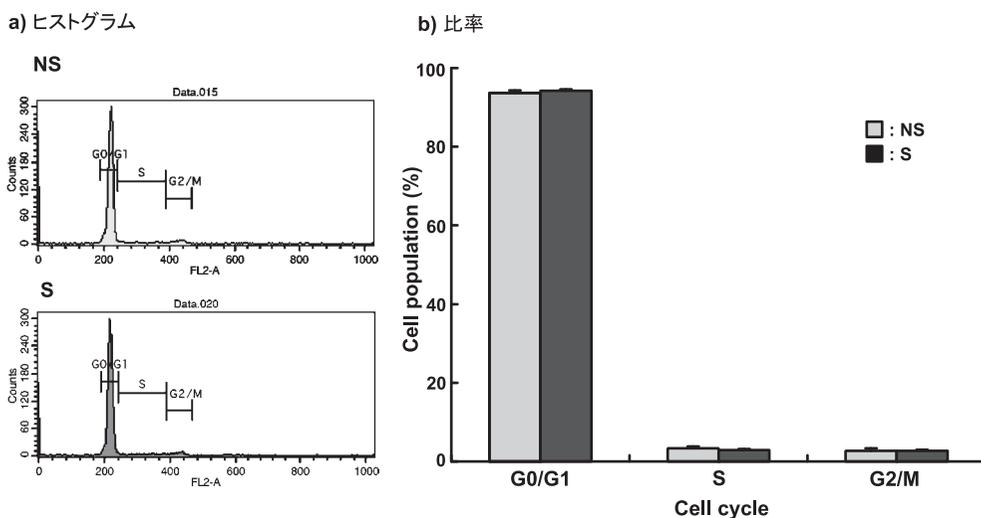


図 13 喫煙による AM の細胞周期

細胞周期は、AM の細胞膜を 70% エタノールで透過させた後、ヨウ化プロピジウムを反応させ、FACSCalibur を用いて DNA 含有量を測定することで検討した。NS: 非喫煙群, S: 喫煙群, **: p < 0.01, mean ± S.D.

S 期： $2.91 \pm 0.24\%$ ，G2/M 期： $2.69 \pm 0.39\%$ であり，どの周期においても NS 群と S 群の間で差はなかった（図 13）。

3.15 AM の DNA 修復

喫煙により AM の DNA 合成が増加したが，細胞増殖に差が認められなかったことから，次に

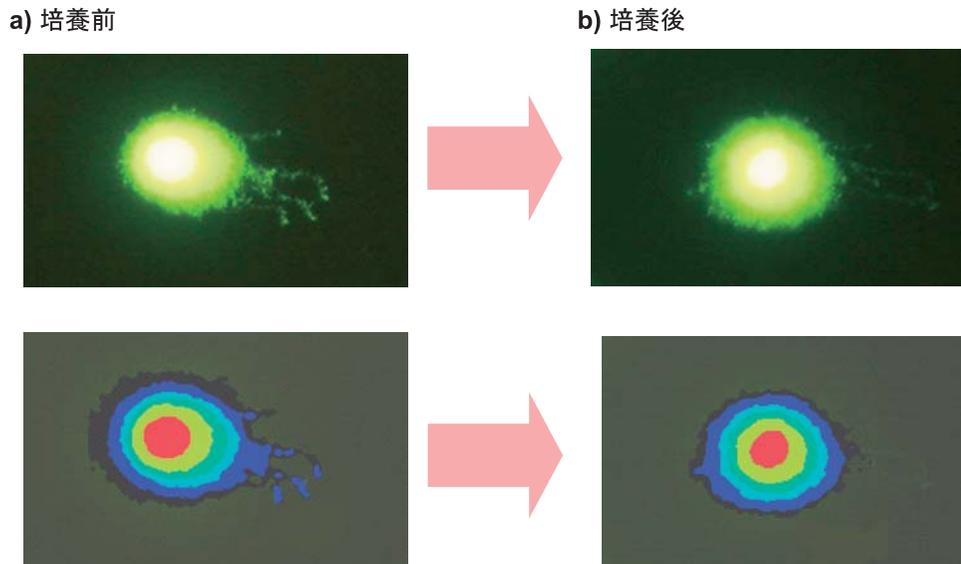


図 14 喫煙により誘導された AM の DNA 損傷に対する修復 (1)

DNA 修復は，24 時間培養後の S 群の AM と培養前の S 群の AM を用いて Comet Assay を行い検討した．培養前：喫煙群 AM，培養後：24 時間培養した喫煙群 AM

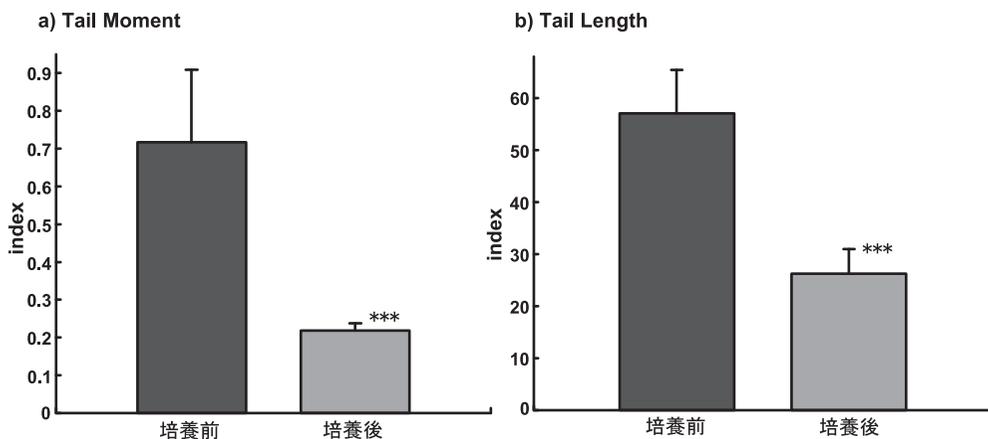


図 15 喫煙により誘導された AM の DNA 損傷に対する修復 (2)

DNA 損傷の指標として，Comet Analyzer により算出した Tail Moment と Tail Length を使用した．培養前：喫煙群 AM，培養後：24 時間培養した喫煙群 AM，***: $p < 0.001$, mean \pm S.D.

喫煙により誘導された DNA 損傷が修復される可能性について検討した。S 群より回収した AM を 24 時間培養した後に Comet Assay を行い、DNA 損傷の修復について検討したところ、Tail Moment は、培養前で 0.718 ± 0.191 (mean+S.D.)、培養後で 0.218 ± 0.020 であった。Tail Length は培養前で 57.1 ± 8.4 、培養後で 26.2 ± 4.8 であった。Tail Moment, Tail Length とともに、培養前に比べ培養後で有意な ($p < 0.001$) 減少が認められ、喫煙により誘導された DNA 損傷が修復されることが認められた (図 14, 15)。

4. 考察

タバコ煙は、多くの肺疾患発症の重要な危険因子である。タバコ煙の中には約 6000 種類以上の化学物質が含まれ、物質の状態によりガス相と粒子相に分けられる。タバコの熱分解により生じるガス相には一酸化炭素、二酸化炭素、一酸化窒素、アンモニアガスなどが含まれ、多くの微粒子を含む粒子相にはタバコの主成分であるニコチン、発癌・発癌促進物質であるベンツピレン、ジメチルニトロソアミン、ウレタンなどが含まれ、また、粒子層とガス層の両方に高濃度のフリーラジカルや他の酸化剤が含まれている [1, 3, 4]。

タバコ煙は経気道的に肺内に入り肺胞領域に到達する。肺胞には外来物質に対する初期防御として機能する肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages: AM) が常在する。AM の機能は大きく分けて、食作用、抗原提示作用、サイトカインや活性酸素の産生などがあり、肺の免疫系において重要な役割を担っている [5, 6, 29]。肺胞領域に到達したタバコ煙は AM と直接接触することから、AM に影響を与えることが考えられる。

今までにタバコ主流煙中の粒子サイズと粒子数をあわせて示した報告はされていない。今回使用したタバコ 1 本分の主流煙には約 25 億個/ m^3 の粒子が含まれ、直径 $0.1 \mu m$ および $0.2 \mu m$ の粒子数が全体の約 75% を占めていた。

血中のカルボキシヘモグロビン (COHb) は、喫煙の指標として用いられている。一酸化炭素 (CO) は、タバコ、木材および化石燃料など炭素を含む物質の不完全燃焼により産生される。CO は赤血球中のヘモグロビンから酸素を外し COHb を生成するため、COHb は一酸化炭素曝露の敏感で明確な指標として用いられる [2, 32]。本研究の喫煙操作により、マウスの血中 COHb 濃度が有意に増加したことから、本喫煙操作により、マウスが喫煙していることが確認された。この結果は、タバコ煙曝露により煙濃度依存的にマウスの血中 COHb 濃度が上昇する報告や、1 日 20 本以上のタバコを吸う喫煙者の血中 COHb 濃度が 3.29%、非喫煙者で 0.32% であり、喫煙により血中 COHb 濃度が 10 倍以上上昇する報告と一致した [2, 32]。

喫煙による AM 数への影響について、BAL により回収された肺胞マクロファージの総細胞数は、NS 群に比べ S 群で有意な増加が認められた。これまでにヒトおよび実験動物レベルで喫煙による AM 数の増加が数多く報告されており [2, 12, 13, 33, 34]、今回の実験でも同様の結果が得

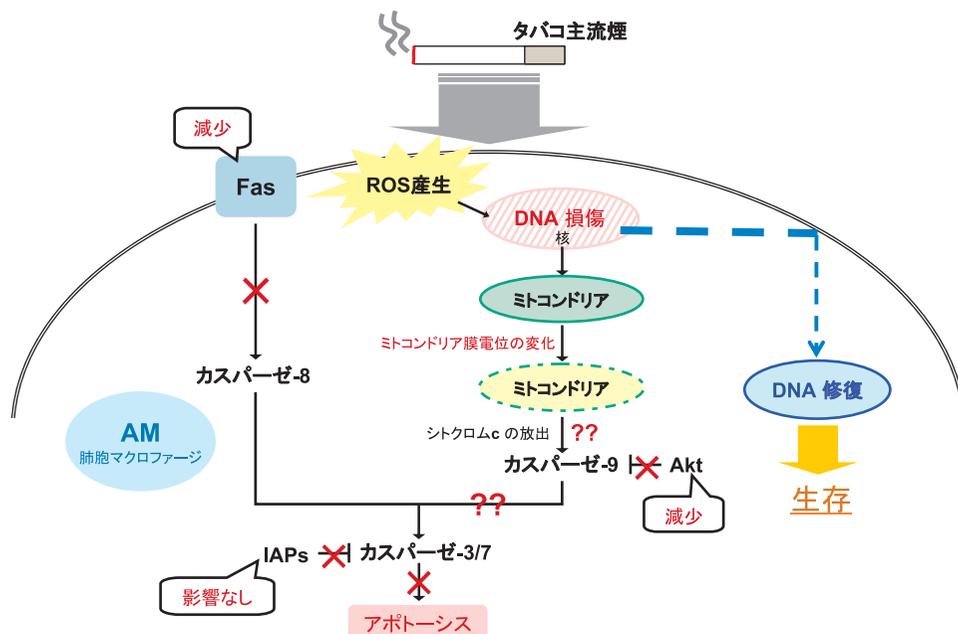


図 16 喫煙による AM のアポトーシス抑制機構

られた．この AM 数の増加は，喫煙により肺内に取り込まれた多量のタバコ煙粒子を排除するために AM が集積したためや，AM のアポトーシスが抑制されることによる可能性がある．また，喫煙による BALF 中の単球遊走性因子の増加による可能性も報告されている [33]．

喫煙が AM の形態に及ぼす影響について検討した．Dot Plot 解析により NS 群に比べ S 群の AM で FSC 値および SSC 値の増加が認められた．これは細胞が大型化し，細胞内部構造が複雑化したことを示す．AM をギムザ染色すると，NS 群の AM に比べ S 群の AM は，細胞胞体が大型化し，細胞質内に空胞形成が認められた．また，透過電子顕微鏡による観察で，S 群の AM の細胞質内に，NS 群の AM には認められない，オスミウムに強酸化される電子密度の高い封入体の出現が確認された．これまでに，喫煙者の AM の直径が非喫煙者に比べ大きくなることが報告されている [35, 36]．また，喫煙者の AM の細胞質内には様々な特徴的な封入体が見られ，それらは電子密度の高い物質であり，脂質様のものであることが報告されている [6, 36, 37]．今回 S 群の AM の細胞質内に認められた封入体も同様のもので，タバコ煙に含まれる物質ではなく，むしろタバコ煙刺激により生じた二次的な産物であると考えられる．

好中球やマクロファージのような食細胞は，異物を細胞内に取り込むと，NADPH オキシダーゼを活性化することで活性酸素種 (ROS) を産生し，異物を処理する．活性型 NADPH オキシダー

ぜは、NADPH から電子を受け取り、酸素 (O_2) を一電子還元してスーパーオキシド (O_2^-) を生成する。さらに O_2^- から、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の働きにより、過酸化水素 (H_2O_2) が生成される [38, 39]。喫煙により、AM がタバコ煙粒子を異物と認識し取り込み、ROS を産生することが考えられる。また、呼吸により空気を吸入する肺は、特に ROS が産生されやすい臓器であると考えられる。そこで ROS 産生について、 H_2O_2 産生細胞比率と O_2^- 産生細胞比率をそれぞれ dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) および hydroethidine (HE) を用いて FACS 解析により調べた。 H_2O_2 および O_2^- 産生細胞比率は、NS 群に比べ S 群で有意な増加が認められた。これまでにタバコ煙抽出物処理により、AM やヒト肺繊維芽細胞の ROS 産生の増加が報告されており [18, 24]、これらの結果と一致した。これは、AM が喫煙により吸入されたタバコ煙粒子を貪食し、それらを殺菌・除去するために過剰に ROS を産生したためであると考えられる。

スーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシルラジカル (OH^-)、過酸化水素 (H_2O_2) などの ROS は、酸化ストレスと総称され、核酸やタンパク質、膜脂質を酸化することで細胞の損傷を引き起こすことが知られている [19]。これまでに、抗酸化剤であるアスコルビン酸 (VC) や酢酸トコフェロール (VE)、N-アセチル-L-システイン (NAC)、グルタチオンがタバコ煙処理による DNA 損傷を減少させることができることから、タバコ煙処理による酸化ストレスの増加が DNA 損傷の誘導に関与していることが報告されている [40, 41]。そこで、Comet Assay を用いて喫煙による AM の DNA 損傷への影響を検討した。Comet Assay はアルカリ性条件下で泳動すると DNA 一本鎖損傷を、中性条件下で泳動すると DNA 二本鎖損傷を検出することができる [31]。今回は、変異や発癌につながる可能性のある DNA 二本鎖切断を検出するため、中性条件下での Comet Assay を行った。DNA 損傷の指標である Tail Moment および Tail Length の両方が、NS 群に比べ S 群の AM で有意に増加し、喫煙により DNA 損傷が誘導されたことが証明された。DNA 損傷に関しては、*in vitro* では、Comet Assay による解析で、タバコ煙抽出物が肺線維芽細胞や気管支上皮細胞に DNA 損傷を誘導することが報告されている [20, 24]。AM ではタバコ煙抽出物による、DNA の酸化的損傷である 8-OHdG レベルの増加が報告されている [14]。また、*in vivo* ではタバコ煙曝露したマウスの肺、胃、肝臓組織で、アルカリ Comet Assay により DNA 単鎖切断が検出されている [40]。さらに、タバコ煙濃縮物がヒト気管支上皮細胞と肺腺癌細胞において DNA 二本鎖切断を誘導することが報告されている [41]。しかし、*in vivo* での喫煙による AM の DNA 損傷の誘導はこれまでに報告されておらず、本研究が最初の報告であり、タバコ煙粒子の除去の為に AM が過剰に産生した ROS により、AM 自身の DNA 損傷が誘導された可能性が示された。

細胞の DNA に損傷が起こると、それに続く様々な反応が生じ、しばしばアポトーシスが起る [20]。細胞死には、ネクローシスとアポトーシスの 2 つの異なった形式がある。ネクローシスは急激な損傷などによる偶発的な細胞死であり、細胞の膨化と細胞膜の破裂を伴う。ネクローシスによる細胞死では、細胞内の酵素や有害物質が細胞外に放出されるため周辺の組織が

損傷を受ける。一方、アポトーシスは生理的な条件下で起こる能動的な細胞死であり、核クロマチンの濃縮、DNAの断片化、核の断片化、細胞の萎縮を伴い、最終的にはマクロファージに取り込まれて消化され、炎症を伴うことなく処理される [42-44]。アポトーシスは過剰な酸化的ダメージ、特にDNA損傷への中心的な防御反応であり、また胚発生や形態形成、正常な免疫機能に必要な不可欠である。成人の体では細胞分裂によって毎秒数十万の細胞が作られ、恒常性の維持や免疫細胞の選択や活性の調節の為に、同じくらいの数の細胞がアポトーシスにより死ぬ。アポトーシスシグナルの異常な調節は様々な細胞反応を引き起こし、疾病の原因となる [21, 23]。これまでに、喫煙やタバコ成分による、種々の細胞や組織のアポトーシスの可能性が検討されているが、その報告は一定ではない [1, 14, 48, 49]。アポトーシスにはいくつかの経路があるが、主要な経路として、デスレセプターから生じるアポトーシスとミトコンドリアを介するアポトーシスがある。デスレセプターから生じるシグナルでは初めに、Caspase-8を活性化するDeath Inducing Signaling Complex (DISC) が形成される。ミトコンドリアを介するアポトーシスでは、ミトコンドリア膜電位の減少、ミトコンドリアの膨化、それに伴うミトコンドリア外膜の崩壊が生じることで、ミトコンドリア膜間腔から細胞質へ cytochrome c が放出され、Caspase-9を活性化する apoptosome が形成される。活性型 Caspase-8 および活性型 Caspase-9 により、エフェクターである Caspase-3, -6, -7 が活性化され、Caspase の基質であるポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP)、核内の Lamin, Actin など切断することでアポトーシスを引き起こす [23, 45, 46]。デスレセプターのひとつである Fas レセプター (CD95) は、TNF/NGF レセプターファミリーに属し、アポトーシスを仲介する [47]。Fas レセプター陽性細胞比率を調べると、NS群に比べS群で有意に減少しており、喫煙により Fas レセプターを介したアポトーシスが誘導される可能性は低いと考えられた。次に、ミトコンドリア介在性アポトーシスの誘導の可能性について検討した。アポトーシスの初期の特徴であるミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) が低下しているAMの比率は、NS群に比べS群で有意に増加した。しかしながら、アポトーシスのエフェクターである Caspase-3 mRNA 発現および Caspase-3/7 活性は有意に減少していた。これまでに Jurkat T 細胞において、タバコ煙濃縮物処理が apoptosome の形成を阻害することでミトコンドリアより下流のアポトーシス因子が活性化せずアポトーシスが抑制されることや、肺上皮細胞においても、タバコ煙抽出物がスタウロsporinに誘導された Caspase-3, -7 活性を打ち消すことが報告されており [48, 49]、AMにおいても同様の結果が示された。これらの報告はどちらもアポトーシスが阻害され、むしろネクローシスが誘導されると報告しているのに対し、今回AMの生存率およびLDH放出に関して、NS群とS群で差は認められず、ネクローシスも引き起こされないことが示された。しかし、これまでにタバコ煙曝露マウスのAMにおいて、アポトーシスの誘導と抑制の両方が報告されており [1, 14]、一致した見解が得られていないのが現状である。

喫煙によりアポトーシスが抑制されていたことから、アポトーシス抑制因子 (IAPs) である XIAP

および survivin の mRNA 発現について検討した。IAPs はアミノ末端に Baculoviral IAP Repeat (BIR) ドメインという約 70 アミノ酸からなる繰り返し構造を共通に持つ。BIR ドメインはアポトーシスの抑制に必要であり、Caspase との結合に関与する。XIAP は IAP ファミリーの中でも特に強い Caspase 阻害活性を示し、survivin は細胞分裂が激しい癌細胞に多く発現する [45]。以前に、ヒト非小細胞肺癌細胞において、ニコチンが化学療法薬により誘導されるアポトーシスを抑制し、これに XIAP および survivin の正調節が関与していると報告されている [50]。しかし、今回の研究では、NS 群と S 群で XIAP および survivin の mRNA 発現に変化は認められなかった。次に、喫煙による Akt への影響について検討した。セリン/スレオニンキナーゼであり、原癌遺伝子として単離された Akt は、アポトーシス促進因子である Bad や Caspase-9 をリン酸化して不活性化することでアポトーシスを抑制する。また、細胞周期の進行にも関わり、細胞の生存に重要な役割を果たす [51, 52]。これまでにニコチンやタバコ特有発癌物質である NNK が肺癌細胞およびヒト気管支上皮細胞で Akt を活性化し、細胞の生存、増殖に関与していることが報告されている [52]。しかし、今回の研究では NS 群に比べ S 群の AM で、Akt の mRNA 発現およびリン酸化の両方が有意に減少した。

喫煙によるアポトーシスの抑制への IAPs および Akt の関与が否定されたため、次に、喫煙による DNA 損傷が修復される、あるいは喫煙の刺激により細胞が増殖し、AM が生存し続ける可能性について検討した。NS 群に比べ S 群の AM で、³H-Thymidine の取り込みが有意に増加しており、DNA 合成が促進されていたことから、DNA 損傷の修復もしくは細胞増殖の可能性が示唆された。この結果は、マウスへの 6 日間のタバコ煙曝露により AM の DNA 合成が増加した報告 [34] と一致した。

喫煙による AM の DNA 合成の増加が確認されたため、まず喫煙による細胞増殖の可能性について検討した。これまでに、喫煙者の AM の増殖、タバコ煙濃縮物による気管支上皮細胞の増殖や、タバコ煙成分であるニコチンや NNK による非小細胞肺癌細胞の増殖が報告されている [17, 53, 54]。しかし、本研究では喫煙による AM の細胞増殖は認められなかった。さらに、細胞周期に及ぼす喫煙の影響についても検討した。細胞周期には 4 つの区分：DNA 複製期 (S 期)、有糸分裂期 (M 期)、M 期と S 期間の G1 期、S 期と M 期間の G2 期に分けられる。細胞周期には前のステップが完了しないと次のステップへ進行できなくなるようなメカニズムが働いておりこれをチェックポイントと言い、異常を感知すると細胞周期が停止する。細胞周期の異常は種々の疾患、特に癌の発生の原因となっている [55]。これまでに、ニコチンの長期曝露により、マウス肺上皮細胞が血清飢餓状態にも関わらず G1 期で停止せず細胞周期を進行することや、タバコ煙抽出物により気管支上皮細胞の細胞周期が S 期で停止することが報告されている [25, 26]。しかし、本研究では NS 群と S 群の間で、AM の細胞周期への影響は認められなかった。この相違は、使用した細胞や曝露条件の違い、また、in vitro と in vivo の実験系の違いによると考えられる。

喫煙による AM の DNA 合成の増加が、細胞増殖によるものではない可能性が考えられたため、次に喫煙により誘導された AM の DNA 損傷が修復される可能性について検討した。DNA が修復される際、様々な種類の DNA ポリメラーゼおよび DNA リガーゼにより、切断され失われた DNA 鎖の再合成と DNA 鎖の再結合が行われる [57]。³H-Thymidine の取り込みが 24 時間の培養で増加していたため、24 時間培養後と培養前の S 群の AM の DNA 損傷の程度を比較し、DNA 損傷が修復されているか否かについて検討した。培養前の S 群に比べ、培養後の S 群の AM で Tail Moment および Tail Length の両方が有意に減少しており、喫煙により誘導された DNA 損傷が修復されることが明らかになった。DNA 修復については、*in vitro* の実験系で、タバコ煙抽出物処理により誘導された気管支上皮細胞の DNA 損傷は致命的なものではなく、48 時間で非処理群と変わらないレベルに修復されたことが報告されている [20]。DNA 二本鎖損傷の修復機構には、主に、相同組換え修復 (homologous recombination: HR) と非相同末端修復 (non-homologous end joining: NHEJ) の 2 つがある。HR が細胞周期の S 期の後期と G2 期に限定されるのに対し、NHEJ は全ての細胞周期を通して働くことができ、多細胞真核生物において、DNA 二本鎖切断の修復の主要な経路である。しかし、NHEJ は切断した DNA 鎖が再結合するだけの修復様式であるため、正確に修復を完了できず、しばしば染色体異常を引き起こし、癌や遺伝子疾患の原因となることが知られている [57, 58]。免疫機能に関しては、これまでにタバコ煙やタバコ成分による、AM の貪食機能の低下、付着能の低下、炎症性サイトカイン産生の低下（特に細菌やウイルスによる刺激下で）と抗炎症性サイトカイン産生の増加、細胞表面抗原発現の低下、抗原提示能の低下、細胞傷害活性など、さまざまな機能低下が報告されている [12, 13, 15–18, 59]。今回、喫煙により生じた AM の DNA 二本鎖損傷も前述のような機構で修復されると考えられ、連続した喫煙による DNA 損傷と修復の繰り返しや修復のミスが突然変異などにつながり、喫煙による AM の機能低下に関わっていると考えられる。

今回の成績より、AM が喫煙により肺に吸入されたタバコ煙粒子を貪食し、これらの除去、殺菌のために過剰に産生された ROS が、AM 自身の DNA 損傷を引き起こしたが、アポトーシスは誘導されず、AM は DNA 修復を行うことで生存し続けることが示唆された。そして、DNA は修復され、喫煙により生じた特有の封入体を細胞質内に保持し、免疫機能が低下した異常な AM が肺内に留まり続けることが、正常な上皮細胞に影響を与え、COPD などの肺疾患や肺発癌の発症に密接に関わっている可能性が示された。

参 考 文 献

- [1] Machiya, J., Shibata, Y., Yamauchi, K., Hiramata, N., Wada, T., Inoue, S., Abe, S., Takabatake, N., Sata, M., Kubota, I. 2007. Enhanced expression of MafB inhibits macrophage apoptosis induced by cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36: 418–426.
- [2] Hodge-Bell, K. C., Lee, K. M., Renne, R. A., Gideon, K. M., Harbo, S. J., McKinney, W. J.

2007. Pulmonary inflammation in mice exposed to mainstream cigarette smoke. *Inhal Toxicol*, 19: 361–376.
- [3] 竹内 実 . 2001 . 喫煙と免疫機能 . *臨床免疫* , 36: 843–850.
- [4] Burns, D. M. 1991. Cigarette and cigarette smoking. *Clin Chest Med*, 12: 631–642.
- [5] 長井苑子, 竹内 実, 泉 孝英 . 1898 . 喫煙の肺における炎症反応, 免疫反応に及ぼす影響 . *最新医学* , 44: 1388–1393.
- [6] Hocking, W. G., Golde, D. W. 1979. The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *N Engl J Med*, 301: 580–587.
- [7] Kuda, T., Yasumoto, K., Yano, T., Nakahashi, H., Sugimachi, K., Nomoto, K. 1987. Role of antitumor activity of alveolar macrophages in lung cancer patients. *Cancer Res*, 47: 2199–2202.
- [8] Polosukhin, V. V., Manouilova, L. S., Romberger, D. J., Matthews, K. I., Pirruccello, S. J., West, W., Daughton, D. M., Millatmal, T., Umino, T., Rennard, S. I. 2001. Ultrastructural heterogeneity of the alveolar macrophages from tobacco smokers with chronic bronchitis. *Ultrastruct Pathol*, 25: 5–11.
- [9] Pouniotis, D. S., Plebanski, M., Apostolopoulos, V., McDonald, C. F. 2005. Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin Exp Immunol*, 143: 363–372.
- [10] 竹内 実 . 2007 . 喫煙による抗体産生抑制 . *臨床免疫・アレルギー科* , 48: 673–681.
- [11] 泉 孝英, 長井苑子, 竹内 実, 清水義治 . 1988 . 喫煙と肺 . *日本免疫学会会誌* , 11: 315–321.
- [12] Ortega, E., Huseo, F., Collazos, M. E., Pedrera, M. I., Barriga, C., Rodríguez, A. B. 1992. Phagocytosis of latex beads by alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 15: 137–142.
- [13] Pankow, W., Neumann, K., Rüschoff, J., Von Wichert, P. 1995. Human alveolar macrophages: comparison of cell size, autofluorescence, and HLA-DR antigen expression in smokers and non-smokers. *Cancer Detect Prev*, 19: 268–273.
- [14] Aoshiba, K., Tamaoki, J., Nagai, A. 2001. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L1392–L1401.
- [15] Therriault, M. J., Proulx, L. I., Castonguay, A., Bissonnette, É. Y. 2003. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*, 132: 232–238.
- [16] Green, G. M. 1985. Mechanisms of tobacco smoke toxicity on pulmonary macrophage cells. *Eur J Respir Dis Suppl*, 139: 82–85.
- [17] Hodge, S., Hodge, G., Ahern, J., Jersmann, H., Holmes, M., Reynolds, P. N. 2007. Smoking alters alveolar macrophages recognition and phagocytic ability. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37: 748–755.
- [18] Proulx, L. I., Paré, G., Bissonnette, E. Y. 2007. Alveolar macrophage cytotoxic activity is inhibited by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a carcinogenic component of cigarette smoke. *Cancer Immunol Immunother*, 56: 831–838.
- [19] Camhi, S. L., Lee, P., Choi, A. M. 1995. The oxidative stress response. *New Horiz*, 3: 170–182.
- [20] Liu, X., Conner, H., Kobayashi, T., Kim, H., Wen, F., Abe, S., Fang, Q., Wang, X., Hashimoto, M., Bitterman, P., Rennard, S. I. 2005. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33: 121–129.

- [21] Payne, C. M., Bernstein, C., Bernstein, H. 1995. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma*, 19: 43–93.
- [22] 岸 裕幸, 長田拓哉, 村口 篤. 2002. T細胞. *臨床免疫*, 38: 165–172.
- [23] Gewies, A. 2003. ApoReview. Introduction to apoptosis. (<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>)
- [24] Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., Scatena, F., Paggiaro, P., Celi, A., Giuntini, C. 2003. Cigarette smoke extract induced oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284: L955–L963.
- [25] Liu, X., Togo, S., Al-Mugotir, M., Kim, H., Fang, Q., Kobayashi, T., Wang, X., Mao, L., Bitterman, P., Rennard, S. 2008. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respir Res*, 9: 66. (<http://respiratory-research.com/content/9/1/66>)
- [26] Takeuchi, M., Nagai, S., Nakajima, A., Shinya, M., Tsukano, C., Asada, H., Yoshikawa, K., Yoshimura, M., Izumi, T. 2001. Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration*, 68: 262–267.
- [27] Ishida, T., Pinkerton, K.E., Takeuchi, M. 2009. Alveolar macrophage from cigarette smoke-exposed mice inhibits B lymphocyte proliferation stimulated with LPS. *Respiration*, 77: 91–95.
- [28] 竹内 実, 浅田秀基, 長井苑子. 2005. 喫煙と肺胞マクロファージの抗原提示能. *臨床免疫*, 44: 546–550.
- [29] Takeuchi, M., Nakajima, A., Yoshikawa, K., Shinya, M., Asada, H., Yoshimura, M., Tsuchihara, C., Nagai, S., Izumi, T. 2000. Effect of smoking on immunological functions of alveolar macrophages in mice. In: *Tobacco counters health*. Vaema, A.K.(ed), Macmilan Ltd, pp. 168–171.
- [30] Takeuchi, T., Nakajima, M., Morimoto, K. 1996. Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis*, 17: 1543–1548.
- [31] Speit, G., Hartmann, A. 2006. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 314: 275–286.
- [32] Whincup, P., Papacosta, O., Lennon, L., Haines, A. 2006. Carboxyhaemoglobin levels and their determinants in older British men. *BMC Public Health*, 6: 189. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/6/189>)
- [33] Koyama, S., Rennard, S. I., Daughton, D., Shoji, S., Robbins, R. A. 1991. Bronchoalveolar lavage fluid obtained from smokers exhibits increased monocyte chemokinetic activity. *J Appl Physiol*, 70: 1208–1214.
- [34] Hornby, S. B., Kellington, J. P. 1990. DNA synthesis in alveolar macrophages and other changes in lavaged cells following exposure of CBA/H mice to cigarette smoke. *Environ Health Perspect*, 85: 107–112.
- [35] Harris, J. O., Swenson, E. W., Johnson, J. E. III. 1970. Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J Clin Invest*, 49: 2086–2096.
- [36] Pratt, S. A., Smith, M. H., Ladman, A. J., Finley, T. N. 1971. The ultrastructure of alveolar

- macrophages from human cigarette smokers and nonsmokers. *Laboratory Investigation*, 24: 331–338.
- [37] Leuenberger, P., Vonmoos, S., Vejdovsky, R. 1985. Morphologic changes of alveolar macrophages in smoking sarcoidosis patients. *Eur J Respir Dis Suppl*, 66: 72–75.
- [38] Forman, H. J., Torres, M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: S4–S8.
- [39] 網脇祥子 . 1996 . マクロファージの活性化と活性酸素生成能 . *臨床免疫* , 28: 49–57.
- [40] Tsuda, S., Matsusaka, N., Ueno, S., Susa, N., Sasaki, Y. F. 2000. The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol Sci*, 54: 104–109.
- [41] Albino, A. P., Huang, X., Jorgensen, E. D., Gietl, D., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. 2006. Induction of DNA double-strand breaks in A549 and normal human pulmonary epithelial cells by cigarette smoke is mediated by free radicals. *Int J Oncol*, 28: 1491–1505.
- [42] Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., Kerr, J. F. 1988. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13: 18–54.
- [43] 矢田純一 . 2007 . 医系免疫学 . 改訂 10 版 , 中外医学社 , pp. 89–91.
- [44] 田沼靖一 . 1997 . アポトーシスの分子機構 . *臨床免疫* , 29: 442–447.
- [45] 丸田英晴 , 田沼靖一 . 2002 . Caspase . *臨床免疫* , 38: 145–153.
- [46] Green, D. R., Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381): 1309–1312.
- [47] 村田 興 , 小林信之 . 2002 . Fas . *臨床免疫* , 38: 16–22.
- [48] Wickenden, J. A., Clarke, M. C., Rossi, A. G., Rahman, I., Faux, S. P., Donaldson, K., MacNee, W. 2003. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29: 562–570.
- [49] Van der Toorn, M., Slebos, D. J., De Bruin, H. G., Leuvenink, H. G., Bakker, S. J., Gans, R. O., Koëter, G. H., Van Oosterhout, A. J., Kauffman, H. F. 2007. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292: L1211–L1218.
- [50] Dasgupta, P., Kinkade, R., Joshi, B., DeCook, C., Haura, E., Chellappan, S. 2006. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6332–6337.
- [51] 田村隆明 , 山本雅之 (編) . 2006 . 転写因子・転写制御キーワードブック . 羊土社 , pp. 53–54.
- [52] West, K. A., Brognard, J., Clark, A. S., Linnoila, I. R., Yang, X., Swain, S. M., Harris, C., Belinsky, S., Dennis, P. A. 2003. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, 111: 81–90.
- [53] Luppi, F., Aarbiou, J., Van Wetering, S., Rahman, I., De Boer, W. I., Rabe, K. F., Hiemsta, P. S. 2005. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione. *Respir Res*, 6: 140. (<http://respiratory-research.com/content/6/1/140>)
- [54] Tsurutani, J., Castillo, S. S., Brognard, J., Granville, C. A., Zhang, C., Gills, J. J., Sayyah, J., Dennis, P. A. 2005. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 26: 1182–1195.

- [55] 中山敬一 . 2005 . 細胞周期の基本概念 . キーワードで理解する細胞周期イラストマップ , 中山敬一 (編) , 羊土社 , pp. 14–21.
- [56] Chu, M., Guo, J., Chen, C. Y. 2005. Long-term exposure to nicotine, via ras pathway, induces cyclin D1 to stimulate G1 cell cycle transition. *J Biol Chem*, 280: 6369–6379.
- [57] 花田克浩 , 池田日出男 . 2001 . DNA 修復ネットワークとその破綻の分子病態 . 保井 明 , 花岡文雄 , 田中亀代次 (編) , 共立出版 , pp. 1063–1072.
- [58] Lieber, M. R. 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 283: 1–5.
- [59] Gaschler, G. J., Zavitz, C. C., Bauer, C. M., Skrtic, M., Lindahl, M., Robbins, C. S., Chen, B., Stämpfli, M. R. 2008. Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38: 218–226.

Cigarette Smoke Exposure Induces DNA Damage and Inhibition of Apoptosis in Alveolar Macrophages

Yuriko HIRONO

Minoru TAKEUCHI

Abstract

It is known that cigarette smoking is associated with pathogenesis of lung diseases and lung cancer. Cigarette Smoke (CS) contains more than 6000 kinds of chemicals. Alveolar Macrophages (AM) play an important role in pulmonary immune system. CS is inhaled into lung and reaches alveolar space, and then directly contacts with AM. We have reported that CS inhibited AM functions such as antigen presentation, phagocytosis and production of cytokine, however the mechanism of inhibition is still unclear. To demonstrate the possibility that DNA damage and/or following cellular reaction are involved with the mechanism of inhibition, we investigated whether CS induces DNA damage and apoptosis in AM. C57BL/6 mice were exposed to CS (20 cigarettes/day) during 10 days, and AM were obtained by bronchoalveolar lavage after CS exposure. The number of AM was increased, size of AM was enlarged, intracellular structure became complicated and inclusion bodies were appeared in cytoplasm of AM from smoked mice. When microorganisms and/or particles were inhaled, AM phagocytize and kill incorporated-them by production of reactive oxygen species (ROS). Production of hydrogen peroxide or superoxide of AM was significantly increased in smoked mice compared with non-smoked mice. It is known that ROS induce DNA damage, therefore we detected DNA damage by Comet assay. CS exposure induced DNA damage of AM. DNA damage often leads to apoptosis of cells, we investigated whether DNA damage induced by CS leads to apoptosis. Fas (CD95) expression on AM was significantly decreased in smoked mice. The percentage of AM with low mitochondria membrane potential was significantly increased in smoked mice, however, both of Caspase-3 mRNA expression and Caspase-3/7 activity of AM were significantly decreased in smoked mice. mRNA expressions of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) such as XIAP and survivin, were not affected by CS. mRNA expression and phosphorylation of Akt, controls cell growth or survival, were significantly decreased by CS. ³H-Thymidine incorporation in AM was significantly increased in smoked mice, but the number of viable cell did not changed between non-smoked and smoked mice. Furthermore, progression of cell cycle of AM was not affected by CS. DNA damage induced by CS was repaired after 24h incubation of CS-exposed AM, this phenomenon indicated that increase of ³H-Thymidine incorporation was due to repair of DNA damage. These results suggest that repeat of DNA damage and DNA repair or mistake of DNA repair is related with suppression of AM function. Furthermore, it was indicated that impaired AM by smoking does not cause apoptosis and survive in the lung through repair of DNA damage. Such changed AM could be closely associated with incidence of smoking-related diseases.

Keywords: smoking, alveolar macrophage, DNA damage, apoptosis