

単球系細胞における生体異物 benzo[a]pyrene および
活性型ビタミン D₃ による plasminogen activator
inhibitor-1 の発現誘導 (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系血液内科学専攻

中川 優

2015 年

指導教員 壺井 功

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は tissue-type/urokinase-type plasminogen activator (tPA/uPA)の特異的阻害因子で、tPA/uPA を阻害することで線溶反応を抑制し、血栓形成を促進する。血管内皮細胞の他、脂肪細胞や単球/マクロファージなど多種の細胞から PAI-1 が分泌される。

interleukin-6 (IL-6) や tumor necrosis factor (TNF) などの炎症性サイトカインによって PAI-1 の発現が誘導されるため、PAI-1 は急性期炎症性タンパクのひとつとしても考えられている。糖尿病や肥満、喫煙によって血清中の PAI-1 が上昇することから動脈硬化との関わりも指摘されている。

喫煙によって動脈硬化性疾患が引き起こされる。その原因物質のひとつとして考えられているのが喫煙中の有害物質である benzo[a]pyrene (BaP) である。

BaP はダイオキシン受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) のリガンドとして AhR を活性化する。活性化された AhR は核内に移行し、異物代謝に関わる遺伝子を発現させる。BaP は誘導された生体異物代謝系で無毒化され排泄されるが、その中間代謝産物は化学的に不安定であり、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 産生による酸化ストレスの増加や DNA 付加体形成の増加によって遺伝子の突然変異などが誘発され、動脈硬化やがんの原因となる。

活性型ビタミン D である $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) は核内受容体の vitamin D receptor (VDR) を活性化することによって、カルシウム代謝に関連する遺伝子の発現を誘導し、骨・カルシウム代謝を調節することが知られているが、生体異物代謝に関わる遺伝子の発現も誘導する。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の前駆体の血中濃度低値は発がんとは逆相関となる報告があるため、がんに対して $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は抑制する効果があると考えられている。また動脈硬化・心血管病変の抑制効果も知られている。

AhR を介した経路と VDR を介した経路の 2 つの生体異物代謝経路は動脈硬化や炎症、発がんに対して正反対の態度を取るため、この 2 者間にはクロストークが存在すると考えられている。これまでに AhR と VDR のクロストーク解析として BaP と $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を同時に薬剤処理した際の遺伝子発現などを検討してきており、BaP、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の代謝酵素の誘導がそれぞれ増強され、BaP の代謝活性化およびビタミン D の不活性化が起きることがわかっている。

本研究では AhR と VDR のクロストーク解析の一環として、PAI-1 を分泌する単球系血液細胞株を用いて、BaP と $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による共刺激が動脈硬化に関わる PAI-1 の遺伝子発現および細胞表現型に及ぼす影響について検討した。

単球系血液細胞株の THP-1 細胞、U937 細胞において BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用処理をしたところ、薬剤処理後 6 時間から有意に PAI-1 mRNA 発現が上昇し、以後薬剤処理後 72 時間まで経時的に遺伝子発現が増強された。このとき 1,25(OH)₂D₃ および BaP 単剤では PAI-1 mRNA は誘導されなかった。また薬剤処理後 48 時間にタンパクレベルでも PAI-1 が発現していることを確認した。

PAI-1 誘導の報告がある炎症性サイトカインの遺伝子の発現を検証したが、TNF- α mRNA、IL-6 mRNA、TGF- β 1 mRNA の発現には増強効果は観察されなかった。de novo タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) を前処理し、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用処理を行ったところ、PAI-1 mRNA の発現誘導には影響を与えなかったため、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用による PAI-1 mRNA の遺伝子発現誘導は、新規のタンパク合成を介さない直接的な調節を受けていることが示された。

THP-1 細胞、U937 細胞において BaP と 1,25(OH)₂D₃ を併用することによる細胞への影響を検証した。May-Grünwald-Giemsa 染色による形態学的な評価として薬剤処理後 72 時間では大きな変化を認めなかったが、薬剤処理後の細胞数を経時的に測定したところ、薬剤処理後 48 時間以降では 1,25(OH)₂D₃、BaP 単剤

でも細胞数の減少が見られたが、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用ではさらに細胞数の減少が観察された。このとき BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用では培養上清中の LDH 活性が薬剤処理後 48 時間以降、有意に上昇しており、バイアビリティも薬剤処理後 72 時間で有意に減少していたことから、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用は単球/マクロファージに対して細胞傷害を増強し、増殖抑制に働いていることが示された。

BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用による細胞増殖抑制のメカニズムにアポトーシスが関与しているかを検証したところ、BaP 単剤でアポトーシスを誘導し、1,25(OH)₂D₃ と併用することでさらにアポトーシスが誘導されることが示された。その機序として酸化ストレスの関与が考えられたため、ROS 産生を評価した。1,25(OH)₂D₃ および BaP 単剤処理 48 時間では ROS 産生は認めなかったが、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用では ROS 産生が上昇する傾向が見られた。ROS のスカベンジャーである N-acetyl-L-cysteine (NAC) を前処理してから、BaP と 1,25(OH)₂D₃ の薬剤処理をしたところ、ROS 産生増加が抑制され、アポトーシスの誘導も有意に抑制された。これらの結果から BaP と 1,25(OH)₂D₃ の併用によって酸化ストレスの増加を介してアポトーシスが増強されていることが示さ

れた。このとき NAC で PAI-1 mRNA 発現誘導は抑制されないため、PAI-1 mRNA の発現誘導は酸化ストレスの結果ではないことが示された。

本研究で明らかになったことは以下の三点である。単球系血液細胞において

①BaP 単独による PAI-1 の遺伝子発現誘導は観察されなかったが、BaP と 1,25(OH)₂D₃ を併用することによって PAI-1 の遺伝子発現が顕著に誘導されること、②BaP と 1,25(OH)₂D₃ を併用することによって、酸化ストレスが増強し、アポトーシスが増強すること、③BaP と 1,25(OH)₂D₃ を併用による PAI-1 の発現誘導は、酸化ストレス抑制剤によって影響されないこと。

1,25(OH)₂D₃ は一般には抗炎症作用を持ち、酸化ストレスも抑制すると考えられる。だが、本研究では BaP による酸化ストレスが 1,25(OH)₂D₃ を併用することで増強され、アポトーシスも増強されている。この現象も BaP による AhR 活性化が 1,25(OH)₂D₃ によって増強されたことで起きていると推察できる。

タバコが原因と考えられる疾患には肺がんや喉頭がんなど多くのがんに加え、慢性閉塞性肺疾患や間質性肺炎などの呼吸器疾患、心筋梗塞や脳梗塞などの循環器疾患が挙げられ、いずれも PAI-1 高値が病態に関わっている可能性がある。

本研究により BaP に 1,25(OH)₂D₃ を併用すると BaP による毒性が高まること

が想定されるため、喫煙によってタバコ中の BaP を吸入した際に 1,25(OH)₂D₃ からのシグナルも入ることでタバコ関連疾患の発症リスクを大きくしてしまう可能性を示している。

本研究では PAI-1 発現誘導の意義は示せていない。PAI-1 阻害薬や PAI-1 のノックダウンを行い、アポトーシスとの関わりについて検討する必要がある。さらに本研究における PAI-1 誘導のメカニズムは明らかになっていないことから、今後の研究でプロモーター領域あるいはエンハンサー領域への AhR および VDR の結合を解析して、本研究における PAI-1 誘導メカニズムを解明していく予定である。また本研究は単球系血液細胞株のみで確認された現象であるため、今後は他の細胞株、ヒト末梢血から分離した単球などの *in vitro*、あるいはマウスモデルなどの *in vivo* で BaP と 1,25(OH)₂D₃ を併用した際の PAI-1 誘導効果、酸化ストレス、アポトーシスについて解析する必要がある。