

マウス大腸がん Colon-26 細胞に対するたばこ煙ガス相
抽出液の抗転移作用とグルタチオン抱合能に基づく
未知の抗がん活性成分の探索

2020 年

畑井 麻友子

目次

緒論	1
第 1 章 ニコチン・タール除去たばこ煙水抽出液 (CSE) によるマウス大腸がん Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する影響	3
第 1 節 経脾肝転移モデルマウスに対する CSE の影響	3
第 2 節 Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する CSE の影響	9
第 3 節 細胞外基質分解酵素に対する CSE の影響	14
小括	17
第 2 章 Methyl vinyl ketone (MVK) による Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する影響	18
第 1 節 MVK および crotonaldehyde (CA) の Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖におよぼす影響	18
第 2 節 Colon-26 細胞の浸潤に対する MVK の影響	22
第 3 節 MVK、CA および ACR の代謝	25
小括	35
第 3 章 グルタチオン (GSH) 抱合能に基づく Colon-26 細胞の増殖を抑制するたばこ煙中の α,β -不飽和カルボニル化合物の探索	36
第 1 節 CSE 中に存在することが判明した α,β -不飽和カルボニル化合物と GSH との反応性の検討	36
第 2 節 Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖におよぼす 8 種類の α,β -不飽和カルボニル化合物の影響	45
小括	48
結論	49

謝辭	50
論文目錄	51
参考文献	52

緒論

還元型グルタチオン (GSH) はグルタミン酸、システインおよびグリシンから成るトリペプチドである。細胞内の非タンパク質性チオール¹⁾の 90%を占める GSH は、重要な細胞内抗酸化物質である¹⁾。GSH の主要な生理的機能として、過酸化物質や活性酸素種を還元して消去すること、様々な毒物・薬物・伝達物質などを細胞外に排出することが挙げられる。しかし、Huang ら²⁾は、正常肝臓よりも肝がん細胞において GSH 含量が上昇していること、GSH 含量の増加は細胞増殖を促進することを報告した。また、Carretero ら³⁾は、GSH 含量の高い B16 マウスメラノーマ細胞は、脾臓から肝臓への転移活性が高いことを報告した。彼らの報告より、がん細胞内の GSH 含量を減少させることは、がん細胞の増殖および転移を抑制することにつながると考えられる。

喫煙は慢性閉塞性肺疾患および心血管疾患などを誘発することから、極めて有害な習慣の一つである。しかし、たばこ煙は生体内の抗酸化物質である GSH 含量を低下させることが報告されている⁴⁻⁸⁾。

申請者の研究室ではこれまでに、たばこ煙ガス相成分を集めたニコチン・タール除去たばこ煙水抽出液 (nicotine- and tar-removed cigarette smoke extract ; CSE) を調製し、CSE ががん細胞に及ぼす影響を検討してきた。CSE を 3 時間前処置した高転移性マウスメラノーマ B16-BL6 細胞を、可移植性の C57BL/6NCr マウスの尾静脈に接種したところ、CSE 未処置の B16-BL6 細胞を接種したマウスと比べ、CSE を 3 時間前処置したマウスメラノーマ B16-BL6 細胞を尾静脈に接種したマウスは、肺転移結節数が減少することを報告した⁹⁾。また、CSE は B16-BL6 細胞の GSH 含量を減少させること、CSE 中に存在する、 α,β -不飽和カルボニル化合物である acrolein (ACR), crotonaldehyde (CA) および methyl vinyl ketone (MVK) は細胞内 GSH と

容易にマイケル付加して GSH-付加体を形成することにより、細胞内の GSH 含量を減少させることを明らかにした。また、B16-BL6 細胞において、MVK が CA よりもかなり強い細胞毒性を有することも明らかにした¹⁰⁾。

そこで本研究では、CSE がマウスメラノーマ細胞以外のがん細胞の増殖および転移を抑制するか否かを明らかにするため、マウス大腸がん Colon-26 細胞を用いて検討した。次に、CSE 中の GSH との反応性が高い化合物に着目し、抗がん剤の有効なシード化合物を見いだすため、検討を行った。大腸がんを選択したのは、日本において 2017 年のがんで死亡した者のうち、大腸がんは男性の部位別死亡数第 3 位、女性においては第 1 位であったと報告されているからである¹¹⁾。

第 1 章 ニコチン・タール除去たばこ煙水抽出液 (CSE) によるマウス大腸がん Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する影響

第 1 節 経脾肝転移モデルマウスに対する CSE の影響

本章の第 1 節では、Colon-26 細胞を可移植性 BALB/c マウスの脾臓に接種することによる肝転移モデルマウスに対する CSE の影響を検討した。大腸がん細胞の肝転移モデルを用いたのは、申請者の研究室では、CSE を 3 時間前処置したマウスメラノーマ B16-BL6 細胞を尾静脈に接種したマウスは、CSE 未処置の B16-BL6 細胞を接種したマウスと比べ、肺転移結節数が減少すること、および *in vitro* において CSE は増殖に影響のない濃度で浸潤及び遊走を抑制したことから⁹⁾、CSE には増殖抑制だけでなく、転移抑制作用も有すると考えたためである。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) および RPMI 1640 培地は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈して EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1% を用いた。

(2) CSE の調製方法

CSE はたばこ 4 本分の主流煙を同時に吸引ポンプ (日本理化学研究所、東京、日本) で吸引 (流速 1.0 L/min) し、ケンブリッジフィルターを通過させることでニコチンおよびタールを除去した後、PBS (-) に通気して調製した (Fig. 1)。なお、ケンブリッジフィルターのタール吸着量を測定し、タール吸着量 150 mg (当研究室では 12 本分に相当) 当たり 15 mL の PBS (-) で抽出した溶液を CSE 100% とした¹²⁾。CSE は適宜 PBS (-) で希釈して実験に使用した。調製した CSE は、0.22 μm ポアサイズのフィルターにて濾過滅菌した後、使用直前まで -80°C で冷凍保存した。

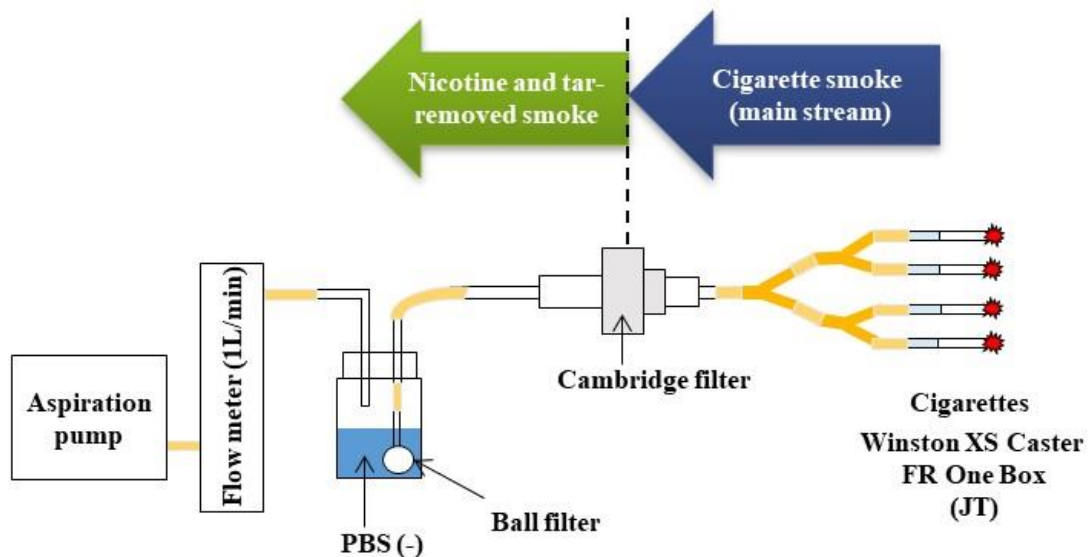


Fig. 1. Schematic diagram of an apparatus for the preparation of CSE.

(3) 使用細胞

BALB/c マウス由来の大腸がん細胞である Colon-26 細胞は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター (茨城, 日本) から入手した。Colon-26 細胞は 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地を用い、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。

(4) 実験動物

Specific pathogen-free (SPF) の雌性 BALB/cCrSlc マウス (7 週齢) を日本エスエルシー株式会社 (静岡、日本) から購入した。雌性マウスを選択した理由は、Colon-26 細胞が *N*-nitroso-*N*-methylurethane を雌性 BALB/c マウスに投与することによって確立された細胞であること¹³⁾ および袴田ら¹⁴⁾ の方法を基に経脾肝転移モデルを作製するためである。1 週間馴化させた後に実験に使用した。飼料として CE-2 (日本クレア株式会社、東京、日本) を与えた。実験期間中、飼料と水道水は自由摂取とし、室温 23±2°C、湿度 60±10%、明暗サイクル 12 時間 (照明時間: 点灯 7 時~消灯 19 時) の環境下でマウスを飼育した。動物実験は武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得た後 (承認番号 : P-11-2014-03-A)、動物愛護法を遵守し、「武庫川女子大学動物実験規定」に基づいて実施した。

(5) 経脾肝転移モデルマウス

サブコンフルエントの Colon-26 細胞を EDTA-トリプシン溶液でフラスコから剥離し、遠心分離後 PBS (-) に懸濁した。麻酔下で細胞 (1×10^5 cells/50 μ L) をマウスの脾臓内に接種した。

(6) 群分け

非担がんマウスに PBS (-) を投与した群を Normal 群 (n=13)、CSE 100%を投与した群を CSE only 群 (n=7) とした。担がんマウスに PBS (-) を投与した群を Control 群 (n=13)、CSE 10%を投与した群を CSE 10%群 (n=13)、CSE 30%を投与した群を CSE 30%群 (n=14)、CSE 100%を投与した群を CSE 100%群 (n=14) とした。PBS (-) または CSE (10、30 および 100%) を 16 mL/kg 体重でがん細胞接種日から 1 日 1 回 14 日間連続で腹腔内投与した。投与量を決める方法の 1 つと

して、動物への投与量を、動物の体重当たりの表面積を考慮した係数を用いてヒト等価用量 (human equivalent dose; HED)を決める方法がある¹⁵⁾。山口ら¹⁶⁾が CSE を遺伝性高脂血症 (WHHL) ウサギに投与していた用量から HED を算出し、その値を基にそれ以下の用量になるように本実験の用量を算出した。

(7) 体重測定、臓器重量の測定

実験中、毎日体重測定を行った。死亡したマウスから脾臓と肝臓を摘出して重量を測定し、それぞれ原発巣と転移巣に対する CSE の効果を検討した。相対的肝臓重量および相対的脾臓重量は、次の計算式を用いて算出した。

$$(\text{摘出した臓器の重量})/(\text{体重})\times 100$$

(8) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、logrank 検定を用いて比較した。2 群間の比較には対応のない *t* 検定を用い、多群における対照群との比較には Dunnett 法を用いた。 $p < 0.05$ で有意と判定した。

2. 実験結果

(1) 生存曲線

Control 群の平均生存期間は 24.2 ± 2.0 日であった。CSE 10、30 および 100% 群の平均生存期間はそれぞれ 24.8 ± 2.2 、 30.0 ± 3.0 および 25.2 ± 1.9 日であった。CSE 投与群の生存期間は Control 群と比較して有意な差を示さなかったが、CSE 30%群は Control 群より生存期間を延長する傾向を示した (Fig. 2A)。

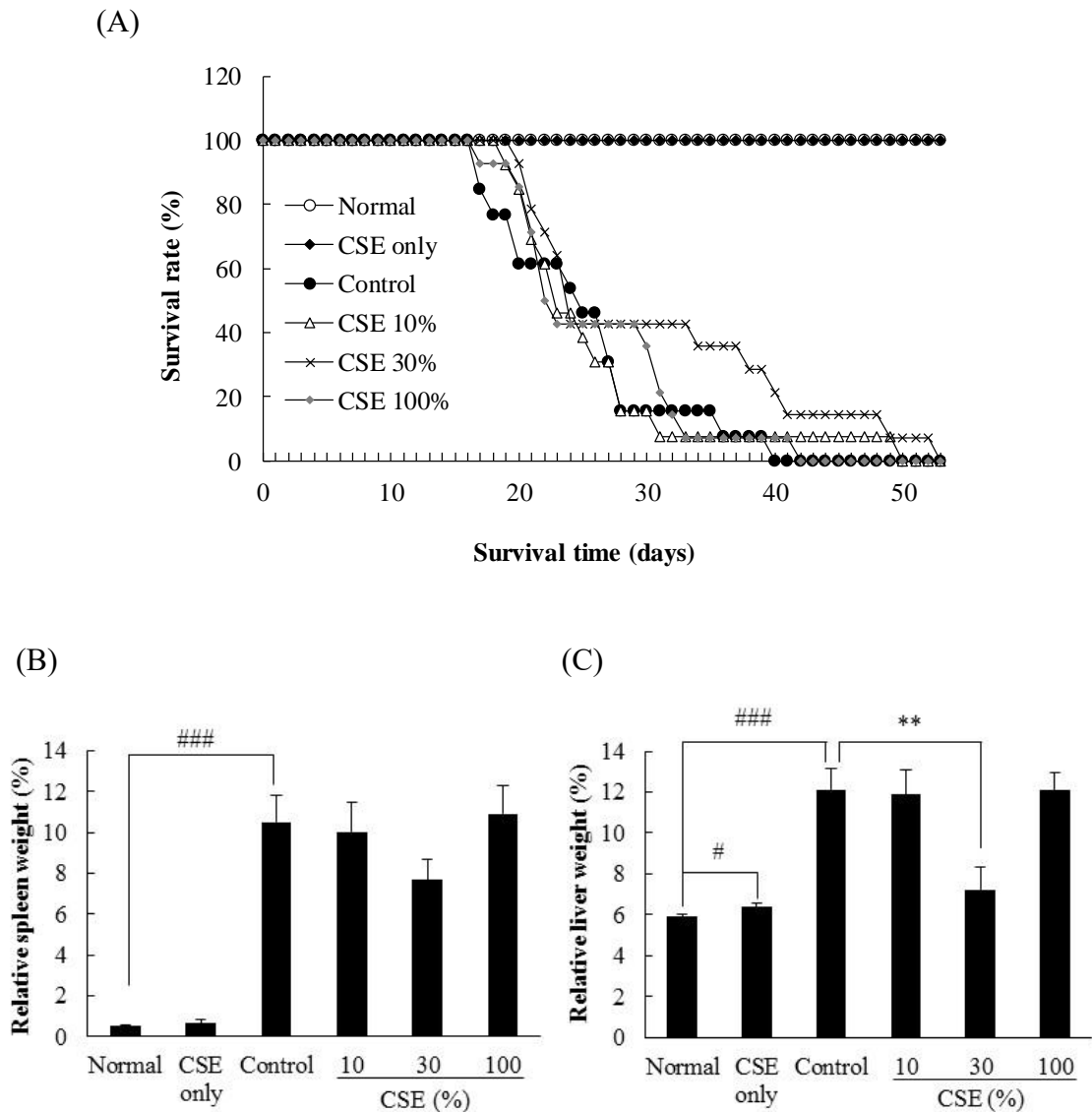


Fig. 2. Effects of CSE on survival time (A), relative spleen weight (B), and relative liver weight (C) in an experimental mouse model of metastasis from the spleen to the liver using Colon-26 cells. Data are the mean \pm SE. Significantly different at: # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ vs. normal using t -test; ** $p < 0.01$ vs. control using Dunnett's test.

(2) 腫瘍重量

原発巣を反映する相対的脾臓重量および転移巣を反映する相対的肝臓重量は Normal 群に比べ Control 群で有意に増加しており、Control 群において Colon-26 細胞の脾臓での増殖および肝転移が確認できた。Control 群と比較して CSE 30%

群では、相対脾臓重量が減少傾向を示し (Fig. 2B)、相対肝臓重量は有意に減少した(Fig. 2C)。

3. 考察

大腸がん細胞は門脈を介して肝臓に血行性転移しやすいため、今回の検討では、門脈系臓器である脾臓に大腸がん細胞を接種することにより作成した経脾肝転移モデルマウスを用いて CSE の影響を調べた。本実験で肝転移作製に使用した Colon-26 細胞は、可移植性の BALB/c マウスによって樹立された大腸がん由来の株である。

結果から、CSE 30%は脾臓から肝臓への転移を抑制することにより、生存日数を延長させる傾向に働いたのではないかと示唆された。

CSE 10%は効果がなく、CSE 30%は転移抑制作用を示したが、CSE 100%は効果がなかった。Fig. 2C によれば、正常なマウスに CSE 100%を投与したところ、相対的な肝臓重量の有意な増加を示したことから、CSE 100%がマウスの肝臓に悪影響をおよぼしたと考えられた。Bourgeois ら¹⁷⁾は、CSE 曝露に対する細胞の反応は、名目上の CSE 濃度だけでなく、総細胞数や使用した CSE 溶液の量などを含む特定の実験変数にも依存することを実証した。彼らは、CSE の有効量が細胞あたりの生物学的に利用可能な化学物質の量に関連していることを示唆した。特に、CSE 成分と細胞および他の物理的因子との相互作用は CSE のバイオアベイラビリティを制限する。彼らの報告から、今回の検討で、経脾肝転移マウスモデルにおいてその転移抑制作用を示すのに適した用量の CSE があることを示唆している。

第 2 節 Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する CSE の影響

がん転移の過程は複雑であり、様々な要因により、また数多くの段階を経て生じる。Liotta¹⁸⁾ の仮説を中心とするがん転移過程は、①原発部位におけるがん細胞の増殖、②原発巣 (腫瘍塊) から一部のがん細胞の離脱と周辺組織への浸潤、③脈管への侵入、④脈管内での移動 (循環) とがん細胞と宿主免疫細胞との相互作用、⑤遠隔臓器の脈管内に着床、⑥脈管外への脱出、⑦転移先組織への浸潤と増殖、を経て最終的に転移巣が形成される。血行性がん転移の過程を Fig. 3 に示す。がん転移の過程のうち、浸潤はとりわけ重要である。がん細胞が原発巣から離脱し、周囲の細胞外基質を浸潤した後に脈管内に侵入し、また脈管内から脱出し標的臓器を浸潤しなければ、転移は成立しないためである。第 2 節では、*in vitro* において Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する CSE の影響を検討した。

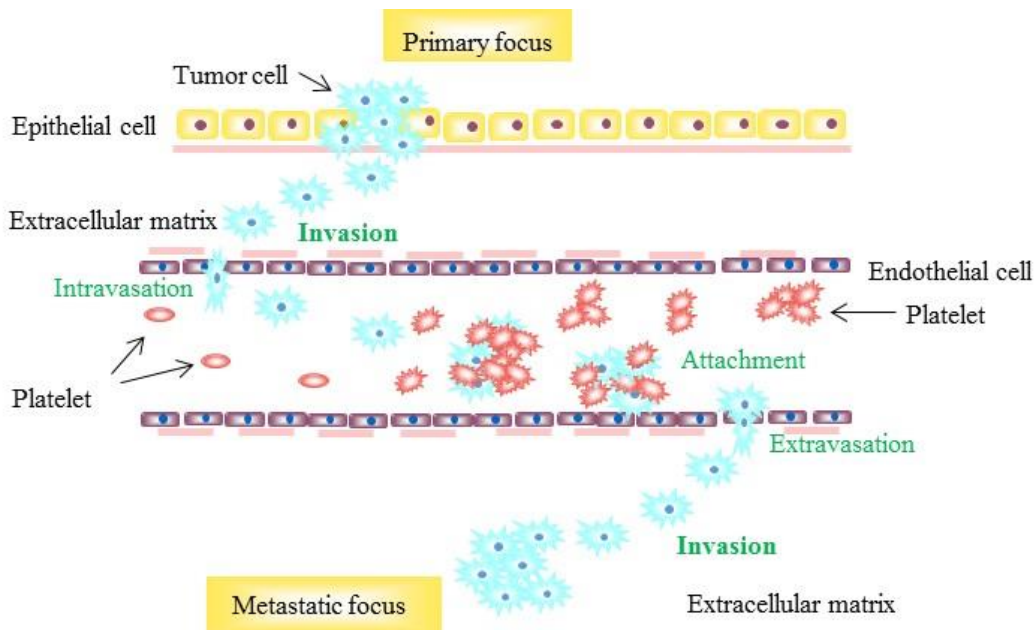


Fig. 3. Process of hematogenic tumor metastasis.

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) および RPMI 1640 培地は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈して EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1%を用いた。

Matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, #356230) および transwells (FALCON® cell culture inserts, #353097) は Corning Inc. (NY, USA) から購入した。Bovine serum albumin (BSA) および fibronectin は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。

(2) CSE の調製方法

第 1 章、第 1 節に記載した方法で調製した。

(3) 使用細胞

Colon-26 細胞を用いた。細胞培養の条件は第 1 章、第 1 節に記載した方法と同様に行った。

(4) 増殖アッセイ

サブコンフルエントの細胞を 12 well プレーートの 1 well あたり 1×10^5 cells/2 mL に

なるよう播種した。CSE は 2mL/well 中での最終濃度が 100 倍希釈になるように PBS (-) で調整し、各 well に 20 μ L ずつ添加した。薬物添加後、37°C、CO₂ インキュベーター中で 24、48 および 72 時間培養し、各時間に EDTA-トリプシン溶液で 12 well プレートから細胞を剥離し、コールターカウンター (Coulter Z1, Beckman Coulter, Inc., CA, USA) を用いて生細胞数を計測した。

(5) 浸潤アッセイ

Albini ら¹⁹⁾の方法に従って行った。8 μ m の孔を有する transwell のフィルター上に 25 μ g の matrigel をコーティングし、transwell を 24 well プレートに移した。チャンバー上室にはサブコンフルエントの Colon-26 細胞を EDTA-トリプシン溶液で剥離し、FBS 不含 0.1% BSA 含有 RPMI 1640 培地で 5×10^5 cells/500 μ L/well に調整し播種した。チャンバー下室にはケモアトラクタントとして fibronectin を含有した FBS 不含 RPMI 1640 培地を加えた。Colon-26 細胞の増殖に影響を与えなかった濃度の CSE を添加した。72 時間後にフィルター下面に浸潤した細胞を Diff-Quik キット (Sysmex、兵庫、日本) で染色し、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

(6) 遊走アッセイ

サブコンフルエントの Colon-26 細胞を EDTA-トリプシン溶液で剥離し、FBS 不含 0.1% BSA 含有 RPMI 1640 培地に再懸濁し、 5×10^4 cells/500 μ L/well に調整し、matrigel をコーティングしていない transwell の上室に播種した。下室には fibronectin を含有した FBS 不含 RPMI 1640 培地を加えた。Colon-26 細胞の増殖に影響を与えなかった濃度の CSE を添加した。24 時間後、フィルター下面に遊走した細胞を Diff-Quik キット (Sysmex、兵庫、日本) で染色し、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

(7) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。多群における対照群との比較には Dunnett 法を用いた。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

2. 実験結果

CSE 0.3 および 1%は細胞増殖を有意に阻害した (Fig. 4A)。細胞増殖に影響のなかった CSE 0.03 および 0.1% は浸潤を有意に抑制したが、CSE は遊走には影響をおよぼさなかった (Fig. 4B および 4C)。

3. 考察

In vitro において CSE の Colon-26 細胞の浸潤に対する影響を検討した結果、細胞増殖に影響のなかった CSE 0.03 および 0.1%は浸潤を有意に抑制した。このことから CSE は浸潤を抑制することにより、転移を抑制したと示唆された。

がん細胞の浸潤過程において、がん細胞の原発巣からの離脱、運動能の亢進および細胞外基質の分解が重要である。そこで、運動能に対する CSE の影響を評価するため、遊走アッセイを行ったところ、CSE は遊走に影響をおよぼさなかった。このことから CSE は 細胞外基質の分解を抑制することにより、浸潤を抑制していることが考えられる。

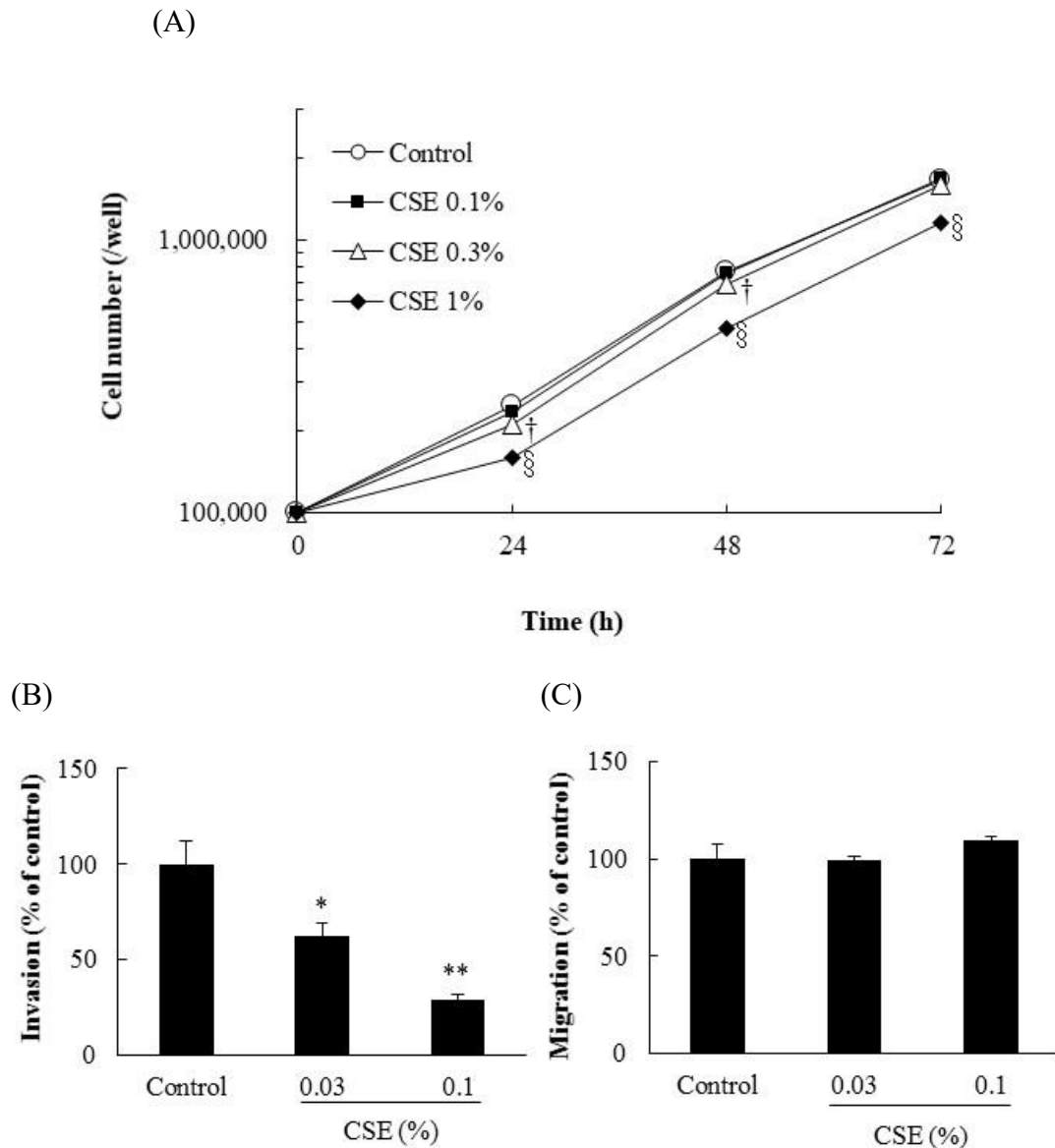


Fig. 4. Effects of CSE on the proliferation (A), invasion (B), and migration (C) of Colon-26 cells. Data are the mean \pm SE (n=3). Significantly different at: $\dagger p < 0.01$ CSE 0.3% vs. control, $\S p < 0.01$ CSE 1% vs. control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control using Dunnett's test.

第 3 節 細胞外基質分解酵素に対する CSE の影響

がん化した上皮細胞が組織を浸潤するにはまず基底膜を壊す必要があり、がん細胞が基底膜を浸潤する能力は転移の指標の 1 つとして重要であると考えられている。細胞外基質は上皮の下にある結合組織とその境界面に膜状に存在する基底膜から構成される。基底膜には IV 型コラーゲンが特異的に存在し、網目状の構造を構成している。細胞外基質分解を担う主要なタンパク質分解酵素が matrix metalloproteinase (MMP) である²⁰⁾。MMP は活性中心に亜鉛を有する金属要求性タンパク質分解酵素で、細胞外に分泌される分泌型と細胞膜上に結合している膜型に分類される^{21, 22)}。基底膜の IV 型コラーゲンを切断するのは主として MMP-2 である。MMP-2 はプロペプチド鎖をアミノ末端に持つ不活性な潜在型酵素である pro-MMP-2 として産生される。La Rocca ら²³⁾ は、たばこ煙抽出液がヒト肺線維芽細胞 (HFL-1 細胞) における細胞外の MMP2 活性を阻害することを報告した。一方、Ning ら²⁴⁾ は、たばこ煙抽出液がヒト正常肺線維芽細胞 (NL9 細胞) の MMP-2 タンパク質発現と MMP-2 ゼラチナーゼ活性の増加を誘導することを報告した。そこで本章の第 3 節では、CSE が MMP-2 におよぼす影響を Western blotting を用いて検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heintz Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Fetal bovine serum (FBS)、RPMI 1640 培地、フェノールレッドフリーの RPMI 1640 培地は Thermo Fisher

Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈して EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1% を用いた。10% SDS-polyacrylamide gel は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から入手した。PVDF メンブレンは Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。スキムミルク、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween-20) およびウェスタンブロットティング用化学発光検出試薬 (Chemi-Lumi One Super) はナカライテスク株式会社 (京都、日本) から購入した。MMP-2 (D2O4T) Rabbit mAb (#87809) および Goat anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase は Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA) から購入した。

(2) CSE の調製方法

第 1 章、第 1 節に記載した方法で調製した。

(3) 使用細胞

Colon-26 細胞を用いた。細胞培養の条件は第 1 章、第 1 節に記載した方法と同様に行った。

(4) Western blotting

Colon-26 細胞を 2×10^6 cells/10 mL となるように 75 cm² フラスコに播種した。24 時間後、FBS 不含、フェノールレッドフリーの RPMI 1640 培地に交換し、CSE (終濃度 0.03 および 0.1%) を添加して、さらに 24 時間培養した。その後、培養上清を回収し、微量用遠心濃縮機 (MV-100、株式会社トミー精工、東京、日本) を用いた遠心

分離によって培養上清を濃縮し、上清をサンプルとして用いた。各サンプルを 10% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動し、セミドライブロットティング装置を用いて、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを 5%スキムミルク、0.1% Tween-20 含有 PBS (-) でブロッキング後、一次抗体 MMP-2 (D2O4T) Rabbit mAb で一晩インキュベートした。その後、二次抗体 goat anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase と 1 時間反応させ、Chemi-Lumi One Super を用い、X 線フィルムで検出した。ImageJ を用いてバンドの密度を定量化した。

(5) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。多群における対照群との比較には Dunnett 法を用いた。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

2. 実験結果

細胞増殖に影響のない濃度である CSE 0.03 および 0.1% は pro-MMP-2 分泌量を有意に減少させ、CSE 0.1%では MMP-2 分泌量が有意に減少した (Fig. 5)。

3. 考察

CSE は MMP-2 分泌量を抑制することにより、Colon-26 細胞の浸潤能を抑制していることが示唆された。

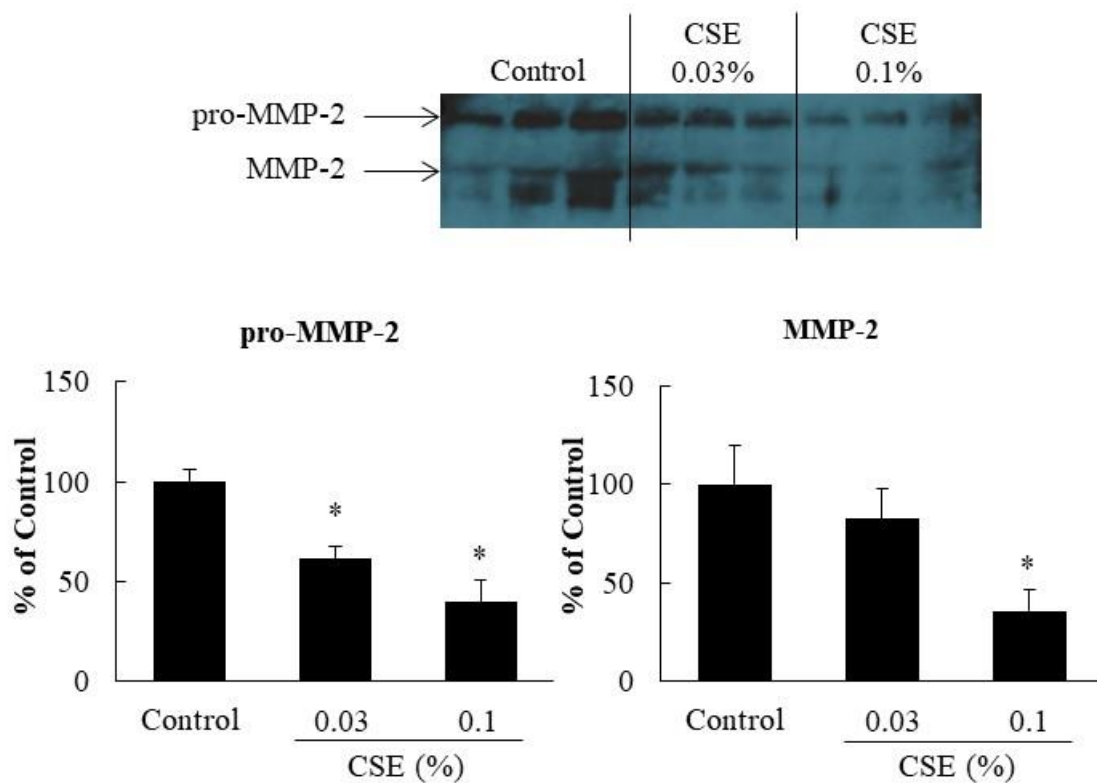


Fig.5. Effect of CSE on the secretion of pro-MMP-2 and MMP-2. Data are the mean±SE (n=3). Significantly different at: * $p < 0.05$ vs. control using Dunnett's test.

第 1 章 小括

本章では、Colon-26 細胞を用いた経脾肝転移モデルマウスにおいて、CSE 30%は肝転移抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに *in vitro* において、CSE は Colon-26 細胞の増殖に影響のない濃度で浸潤を抑制した。その作用機序の 1 つとして、CSE は Colon-26 細胞の MMP-2 分泌量を減少させることが示唆された。

第 2 章 Methyl vinyl ketone (MVK) による Colon-26 細胞の増殖および浸潤に対する影響

第 1 節 MVK および crotonaldehyde (CA) の Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖におよぼす影響

申請者の研究室では、GC/MS を使用して、CSE 中に α,β -不飽和ケトンの MVK が存在し²⁵⁾、B16-BL6 細胞において、MVK が CA よりも強い細胞毒性を有することも明らかにした¹⁰⁾。そこで、本章の第 1 節では、B16-BL6 細胞で確認された MVK および CA による細胞増殖抑制作用¹⁰⁾が、Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞でも同様の作用を示すか検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウinston・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。MVK および CA は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Fetal bovine serum (FBS)、minimum essential medium (MEM) および RPMI 1640 培地は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。 Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈し、EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1%を用いた。*N*-acetyl-L-cysteine (NAC) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から入手した。

(2) CSE の調製方法

第 1 章、第 1 節に記載した方法で調製した。

(3) 使用細胞

Colon-26 細胞を用いた。細胞培養の条件は第 1 章、第 1 節に記載した方法と同様に行った。BALB/c マウスの胎仔由来の準正常細胞である BALB/3T3 clone A31 細胞は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城、日本）から入手した。BALB/3T3 clone A31 細胞は 10% FBS 含有 MEM 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

(4) 増殖アッセイ

第 1 章、第 2 節に記載した方法と同様に行った。MVK および CA の濃度は次の通りに考えた。CSE は 0.3%で有意に Colon-26 細胞の増殖を抑制した (Fig. 4)。MVK および CA の CSE 100%中の MVK および CA 濃度はそれぞれ 約 100 μM および 120 μM である (Fig. 16)。CSE 0.3%中の MVK の濃度は 0.3 μM、CA は 0.36 μM と概算できる。よって、MVK および CA を 0.3 μM の濃度から処置した。

(5) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。有意差検定には Dunnett 法または Tukey 法を用いた。 $p<0.05$ で有意差ありと判定した。

2. 実験結果

B16-BL6 細胞の結果と同様に、MVK のほうが CA よりも Colon-26 細胞に対する細胞増殖抑制作用が強かった (Fig. 6A および 6C)。MVK は準正常細胞である BALB/3T3 clone A31 細胞に対する細胞増殖抑制作用は Colon-26 細胞に比べると弱かった (Fig. 6A および 6B)。また、NAC により細胞内システインを増加させ、GSH 量を増加させると、CSE および MVK において増殖抑制作用はいずれも阻害された (Fig. 7)。

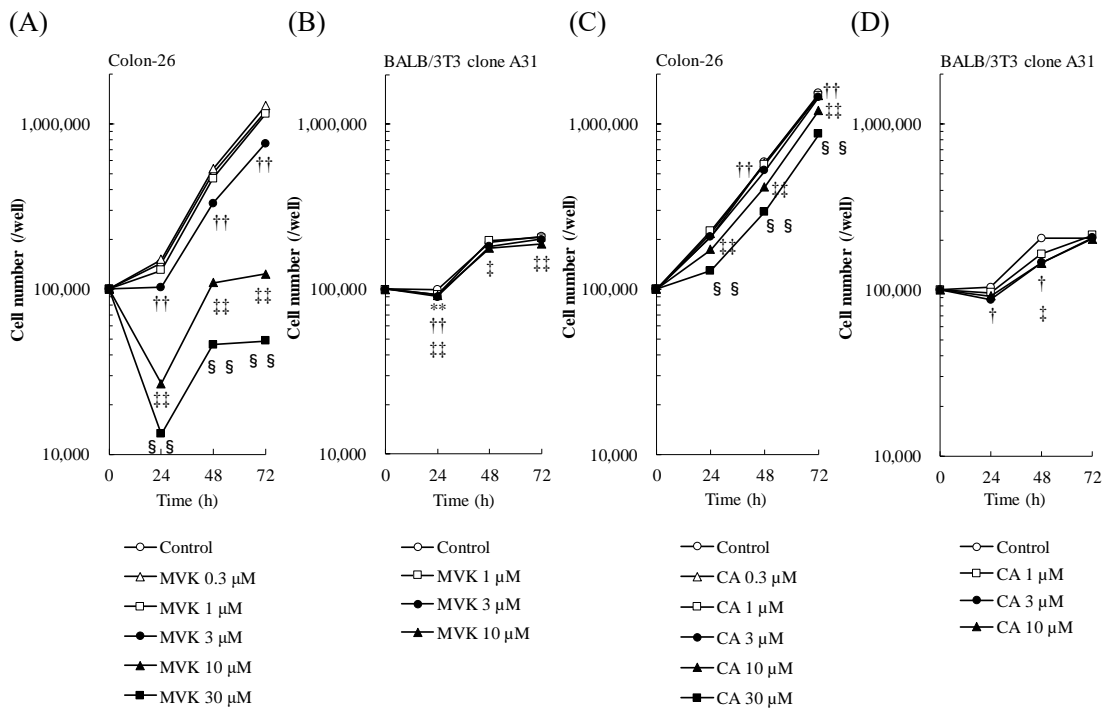


Fig. 6. Effects of MVK on the proliferation of (A) Colon-26 cells or (B) BALB/3T3 clone A31 cells, and effects of CA on the proliferation of (C) Colon-26 cells or (D) BALB/3T3 clone A31 cells. Data are the mean \pm SE (n=3-4). Significantly different at: ** $p < 0.01$ MVK 1 μ M vs. control, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ MVK or CA 3 μ M vs. control, ‡ $p < 0.05$, ‡‡ $p < 0.01$ MVK or CA 10 μ M vs. control, § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ MVK or CA 30 μ M vs. control using Dunnett's test.

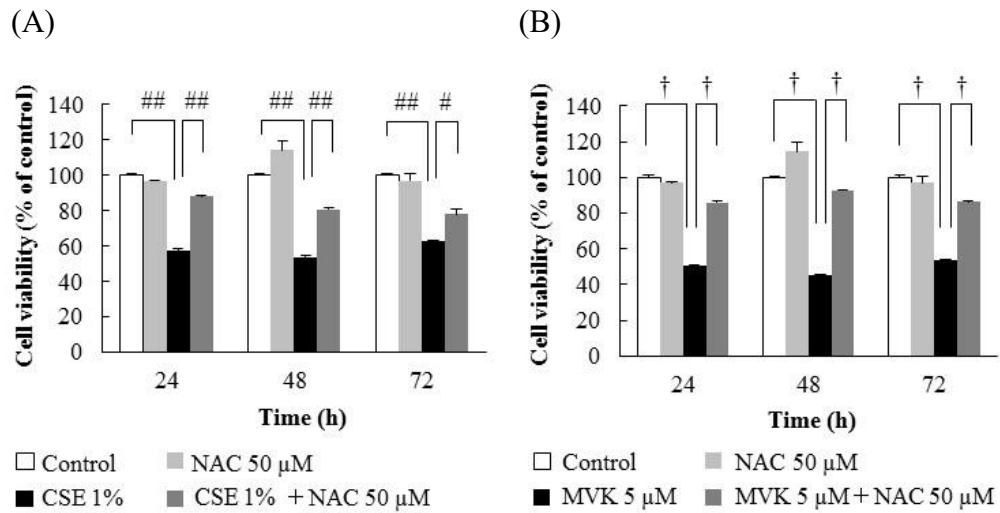


Fig. 7. Antagonized effects of 50 μM NAC on Colon-26 cell growth inhibited by (A) CSE 1% and (B) 5 μM MVK. Data are mean ± SE (n=3).

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. CSE 1% using Tukey's test. † $p < 0.001$ vs. MVK 5 μM using Tukey's test

3. 考察

MVK と CA は同じ分子量の化合物であるが、MVK のほうが CA よりもがん細胞の増殖抑制作用が強いことが明らかとなった。興味深いことに、準正常細胞である BALB/3T3 clone A31 細胞に対する MVK の増殖抑制作用はがん細胞よりも弱かった。また、CSE および MVK において GSH 量を増加させる NAC を併用したところ、それらの増殖抑制作用はいずれも阻害された。従って、CSE および MVK による増殖抑制作用には細胞内 GSH 量の減少が関与していると示唆された。

第 2 節 Colon-26 細胞の浸潤に対する MVK の影響

第 1 章、第 2 節で CSE が Colon-26 細胞の浸潤を抑制することを示したが、MVK が浸潤抑制作用を有するか否か検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

MVK は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) および RPMI 1640 培地は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。 Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈し、EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1% を用いた。Matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, #356230) および transwells (FALCON® cell culture inserts, #353097) は Corning Inc. (NY, USA) から購入した。Bovine serum albumin (BSA) および fibronectin は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。

(2) 使用細胞

Colon-26 細胞を用いた。細胞培養の条件は第 1 章、第 1 節に記載した方法と同様に行った。

(3) 浸潤アッセイ

第 1 章、第 2 節に記載した方法と同様に行った。

(4) 遊走アッセイ

第 1 章、第 2 節に記載した方法と同様に行った。

(5) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。多群における対照群との比較には Dunnett 法を用いた。 $p < 0.05$ で有意と判定した。

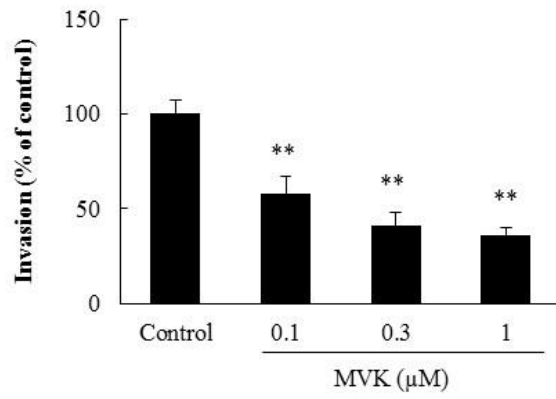
2. 実験結果

増殖に影響のない濃度で MVK (0.1, 0.3 および 1 μM) は Colon-26 細胞の浸潤を有意に抑制した (Fig. 8A)。しかし、CSE と同様に、Colon-26 細胞の遊走には影響をおよぼさなかった (Fig. 8B)。

3. 考察

MVK はがん細胞の Colon-26 細胞および準正常細胞の BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖に影響を与えない濃度で Colon-26 細胞の浸潤を抑制したことから、MVK は抗がん剤の有力なシード化合物あるいはアジュバントとなり得る可能性が考えられる。今後、MVK が浸潤を抑制した詳細な作用機序を検討していく必要がある。

(A)



(B)

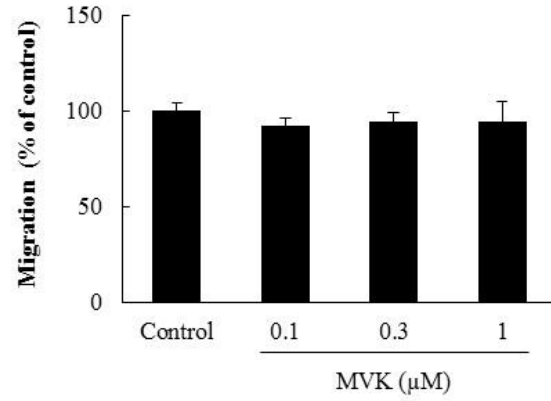


Fig. 8. Effects of MVK on invasion (A), and migration (B) of Colon-26 cells. Data are the mean \pm SE (invasion: n=8–9, migration: n=9–15). Significantly different at: ** $p < 0.01$ vs. control using Dunnett's test.

第 3 節 MVK、CA および ACR の代謝

GSH は活性酸素種や求電子的化合物と反応し、自身は酸化型グルタチオン (GSSG) やグルタチオン抱合体 (GS-X) となる。GSH をたばこ煙に曝露すると、GSH-ACR および GSH-CA が検出され、GSH が枯渇することが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。しかし、B16-BL6 細胞を用いた我々の実験では、GSH-ACR および GSH-CA は、ほとんど検出されなかった。この理由を明らかにするために、まず、ACR、CA および MVK と GSH を *in vitro* で反応させ、次に B16-BL6 細胞を用いて CSE を処置して反応させ、両者で生成する GSH 抱合体について、詳細に比較検討した²⁹⁾。ACR、CA および MVK と GSH の *in vitro* の実験で得た反応生成物を LC/MS で分析すると、GSH-ACR ($[M+H]^+$ m/z 364)、GSH-CA ($[M+H]^+$ m/z 378) および GSH-MVK ($[M+H]^+$ m/z 378) の質量値が得られた。一方、B16-BL6 細胞では、GSH-ACR ($[M+H]^+$ m/z 364) および GSH-CA ($[M+H]^+$ m/z 378) はほとんど検出されず、2 Da 高質量側に m/z 366 および m/z 380 が出現した。精密質量値の測定結果から、これらのアルコール体である GSH-ACR-OH および GSH-CA-OH が生成していること、MVK では GSH-MVK および GSH-MVK-OH の両方が生成していることを明らかにした。これらの結果は、細胞内には GSH に抱合された ACR、CA および MVK のカルボニル基を還元する酵素が存在することを示唆している。アルド-ケトレダクターゼ (AKR) スーパーファミリーは構造的類似性と基質特異性を共有しており、生体異物解毒、浸透圧調節、ホルモン代謝、脂肪酸と脂質の合成、糖尿病合併症、発がん物質活性化およびがん治療などに広く関与している³⁰⁻³⁸⁾。AKR1B1 と AKR1B10 はいずれも、幅広い範囲の生体異物に対して活性を持ち、それらのカルボニル基をアルコール型に還元する、reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 依存性酵素である。細胞内に存在する、このようなレダクターゼ

により、GSH に抱合された ACR、CA および MVK はアルコール体に還元され、代謝されると考えられる。第 3 節では、がん細胞である B16-BL6 細胞で観察された ACR、CA および MVK の代謝が哺乳類の血液でも認められるのかについて、ヒツジ血液を用いて検討した。これらの GSH 抱合体のアルコール体への還元に AKR が関与するのか否か、ヒト由来 AKR1B1 およびその阻害薬であるエパルレスタットを使用して検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。ACR、CA および MVK は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。ヒツジ保存血液は株式会社日本バイオテスト研究所 (埼玉県、日本) から購入した。このヒツジ保存血液は、無菌的に採血後直ちに保存液 (アルセバー氏液) と血液が 1:1 になるように調整されたものである。アルセバー氏液は 2.05%グルコース、0.8%クエン酸ナトリウム、0.055%クエン酸および 0.42%塩化ナトリウムからなる抗凝固剤である。アルドースレダクターゼ (ヒト組換え AKR1B1) は BioVision, Inc. (Milpitas, CA, USA) から購入した。 β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form tetrasodium salt (β -NADPH)、エパルレスタット、LC/MS グレードの H₂O および CH₃OH は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から入手した。LC/MS グレードの formic acid および octa decyl silyl (ODS) column (Cosmosil 5C18-AR-II 4.6 mm×150 mm) はナカライテスク株式会社 (京都、日本) から購入した。

(2) CSE の調製方法

第 1 章、第 1 節に記載した方法で調製した。

(3) CSE のヒツジ血液への曝露

アルセバー氏液中のヒツジ血液 (97% volume) と CSE (3% volume) を 37°C で 1, 5, 15, 60 および 120 分間混合した。混合物を室温で 10 分間、2690×g で遠心分離し、血球成分と上清を分離した。両方の画分を、体積の 9 倍の 75%アセトニトリルを添加することにより除タンパク質を行い、さらに室温で 10 分間、2690×g で遠心分離した。両画分の上清中の ACR、CA および MVK の代謝産物を LC/MS/MS によって分析した。

(4) GSH-MVK の合成

AKR の活性を測定するための基質として、GSH-MVK [L- γ -glutamyl-S-4-(2-oxobutyl)-L-cysteinyl-glycine] を合成した。1 mM GSH/PBS (-) 溶液を等容量の 1 mM MVK/PBS (-) に添加し、室温で 24 時間反応させた。合成した GSH-MVK は、LC/MS と NMR を測定し、構造を確認した。LC/MS 測定では質量値 m/z 378、保持時間を確認した。NMR 測定では DMSO- d_6 に溶解し、 ^1H -および ^{13}C -NMR を測定した。NMR 装置には JNM-ECA500 (JEOL, Tokyo, Japan) を用いた。ケミカルシフト値とカップリングコンスタントは次の通りであった。 δ (^1H , ppm) 8.52 (1 H), 8.28 (1 H), 4.42 (1 H), 3.70 (2 H), 3.29 (1 H), 2.90 (1 H), 2.64 (1 H), 2.70 (2 H), 2.66 (2 H), 2.32 (2 H), 2.09 (3 H), 1.90 (2 H); δ (^{13}C , ppm) 206.97, 171.97, 170.81, 170.67, 169.98, 53.29, 52.44, 42.92, 41.22, 33.54, 31.63, 29.68, 26.90, 25.43.

(5) ヒツジ血液中のレダクターゼ活性の測定

GSH により抱合されたこれらの化合物の還元反応に AKR が関与するか明らかにするため、AKR、酵素活性阻害剤としてエパルレスタットおよび基質として GSH-MVK を用いて酵素活性を調べた。

ヒツジ血球中のレダクターゼ活性を測定する前に、細胞の非存在下での AKR による GSH-MVK の還元反応に対するエパルレスタットの効果を調べた。NADPH [2 mM/PBS (-), 240 μ L] を含む AKR (1 mg/mL, 10 μ L) を 37°C で 5 分間混合した。このレダクターゼ溶液 85 μ L に 10 μ L のエパルレスタット (1 mM) または対照として PBS (-) を添加し、37°C で 10 分間反応させた。次に、GSH-MVK (0.5 mM, 5 μ L) を両方の溶液に加え、37°C で 30~35 分間反応させた。これらを LC/MS 測定用のサンプルとした。

次に、ヒツジ血球の存在下での AKR による GSH-MVK の還元反応に対するエパルレスタットの効果を調べた。ヒツジ血液 180 μ L にエパルレスタット (1 mM) または対照として PBS (-) を 20 μ L 添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後、基質として MVK (1 mM, 2 μ L) を両方の溶液に添加した。1, 5, 15, 30 および 60 分後、各反応溶液中のヒツジ血球を遠心分離により回収し、次いで 9 倍の容量の冷却した 75% CH₃CN/H₂O を添加することにより除タンパク質し、さらに 2690 \times g で 10~15 分間遠心分離した。各上清を LC/MS 分析用の試料として使用した。

(6) 三連四重極型質量分析計および HPLC の測定条件

エレクトロスプレーイオン化法 (electro spray ionization: ESI) を備えた Quattro Premier triple-quadrupole LC/MS (Micromass, Manchester, UK) を、Alliance HT 2795 分離モジュール (Waters Co., Milford, MA, USA) に連結された正および負イオンモード Q1 測定および 択反応モニタリング (selected reaction monitoring : SRM) 法測

定分析に使用した。クロマトグラフィーによる分離はすべて Cosmosil 5C18-AR-II column (4.6 mm×150 mm) を用いて行った。移動相は溶媒 A として 0.05% formic acid /H₂O および溶媒 B として CH₃OH を用い、流速は 0.3 mL/分に設定した。分離における LC 条件には線形勾配法を用いた。溶出条件は既報と同じ条件を用いた²⁹⁾。

2. 実験結果

(1) CSE 曝露によるヒツジ全血における α,β -不飽和カルボニル化合物の代謝

ヒツジ血液に CSE を添加すると、CSE 中の MVK、CA および ACR は細胞内 GSH と迅速に反応し、GSH 抱合体の GSH-MVK、GSH-CA および GSH-ACR を生成した。これらの GSH 抱合体はそれぞれ、SRM 法のトランジションとして、 m/z 378>231 (保持時間 : t_R 16.2 分)、 m/z 378>231 (t_R 17.2 分) および m/z 364>217 を用いて分析した。SRM トランジションに用いた開裂イオンは、化合物の還元体 (アルコール体) では y_1 の開裂 (グルタミン酸の C=O と NH の結合が開裂し、システインを含む側の開裂イオン) m/z 251, 237 を用い、アルデヒドとケトン体では、 y_1 からの脱水イオン m/z 231, 217 を使用した。血球 (Fig. 9A) および赤血球外液 (Fig. 9B) において、GSH-MVK (m/z 378>231) のわずかなピークのみが検出され、GSH-CA (m/z 378>231) および GSH-ACR (m/z 364>217) は全く検出されなかった。一方、アルコール体の SRM トランジション GSH-MVK-OH (m/z 380>251 [t_R 16.90 min]) , GSH-CA-OH (m/z 380>251 [t_R 17.14 min]) および GSH-ACR-OH (m/z 366>237) のピークが血球で検出された (Figs. 9C, 10A, 11A)。また、赤血球外液中では、3 つのアルコール体のピークは時間の経過と共に徐々に増加し始めた (Figs. 9D, 10B, 11B)。GSH に関与するマイケル付加を伴う α,β -不飽和カルボニル化合物の代謝経路およびその後の酵素還元反応を Fig. 12 に示す。

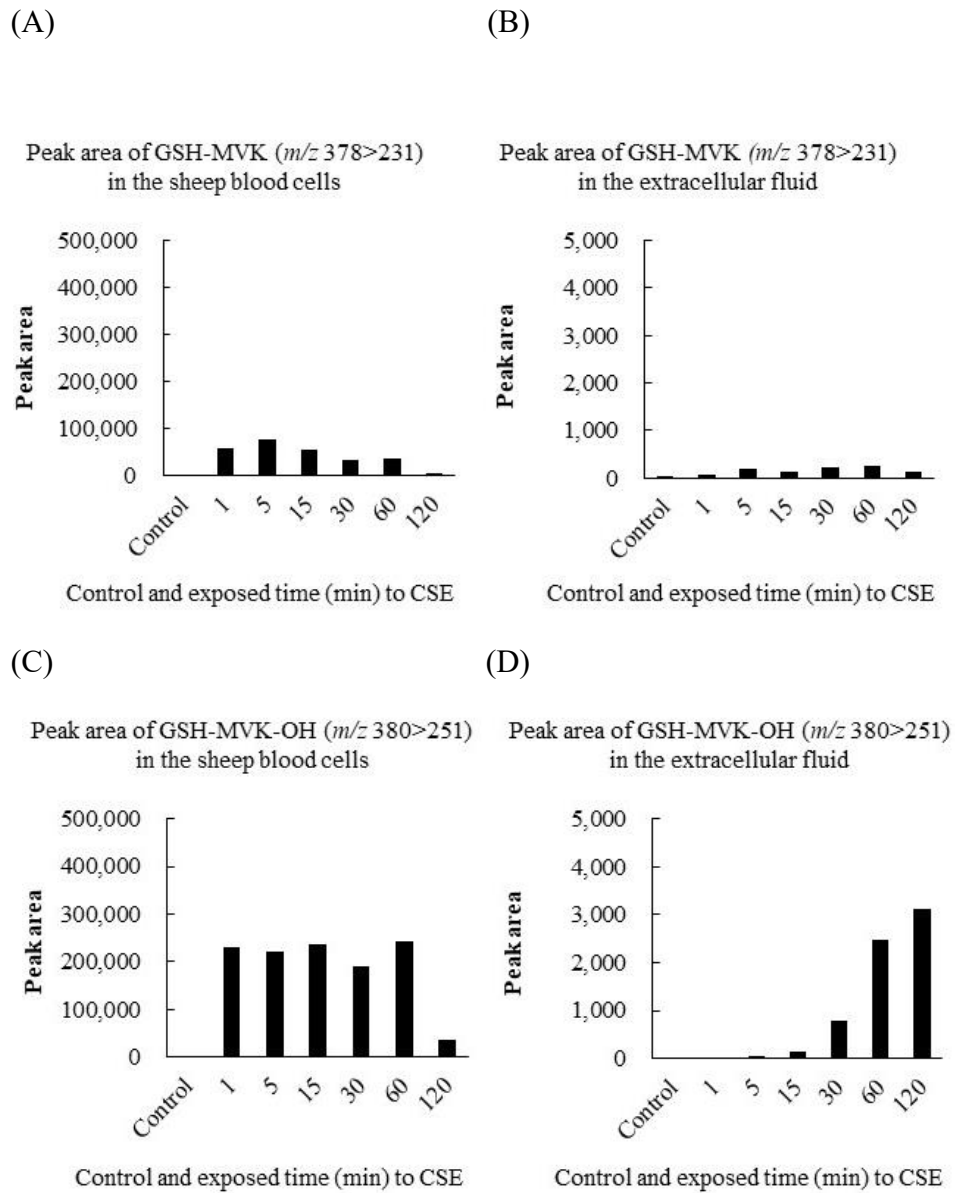


Fig. 9. Time course of changes in peak area of GSH-MVK adduct (SRM transition of m/z 378>231).

(A) In the blood cells and (B) in the extracellular fluid, after exposure of sheep blood cells to CSE. Peak area of GSH-MVK-OH (alcohol form of GSH-MVK adduct) (SRM transition of m/z 380>251) (C) in the sheep blood cells and (D) in the extracellular fluid, after exposure of sheep blood cells to CSE.

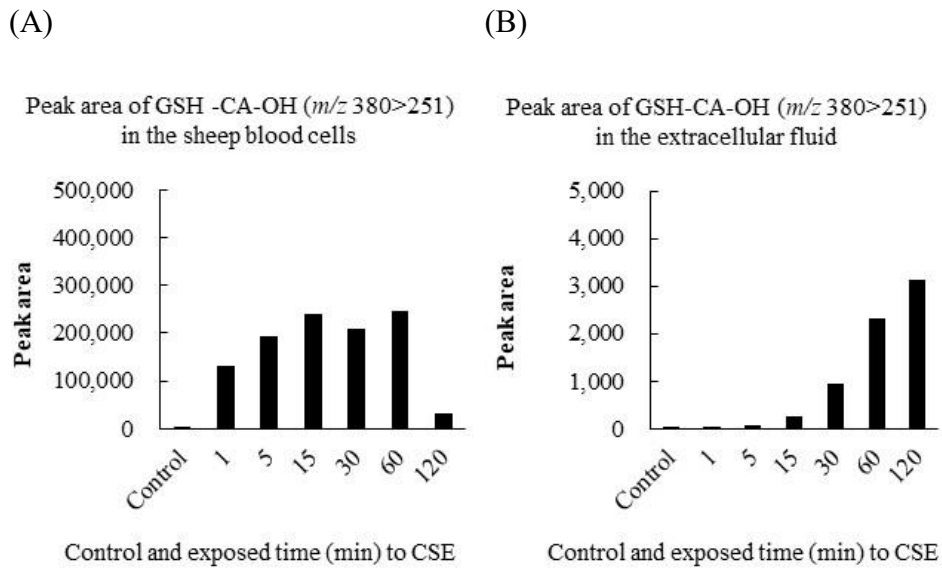


Fig. 10. Time course of changes in peak area of GSH-CA-OH (alcohol form of GSH-CA adduct) (SRM transition of m/z 380>251). (A) In the sheep blood cells and (B) in the extracellular fluid, after exposure of sheep blood cells to CSE.

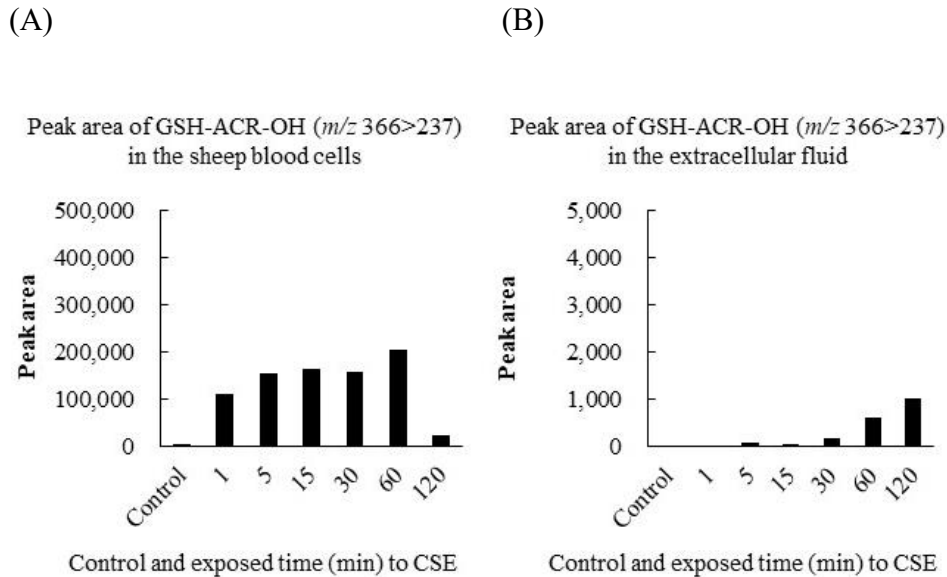


Fig. 11. Time course of changes in peak area of GSH-ACR-OH (alcohol form of GSH-ACR adduct) (SRM transition of m/z 366>237). (A) In the sheep blood cells and (B) in the extracellular fluid, after exposure of sheep blood cells to CSE.

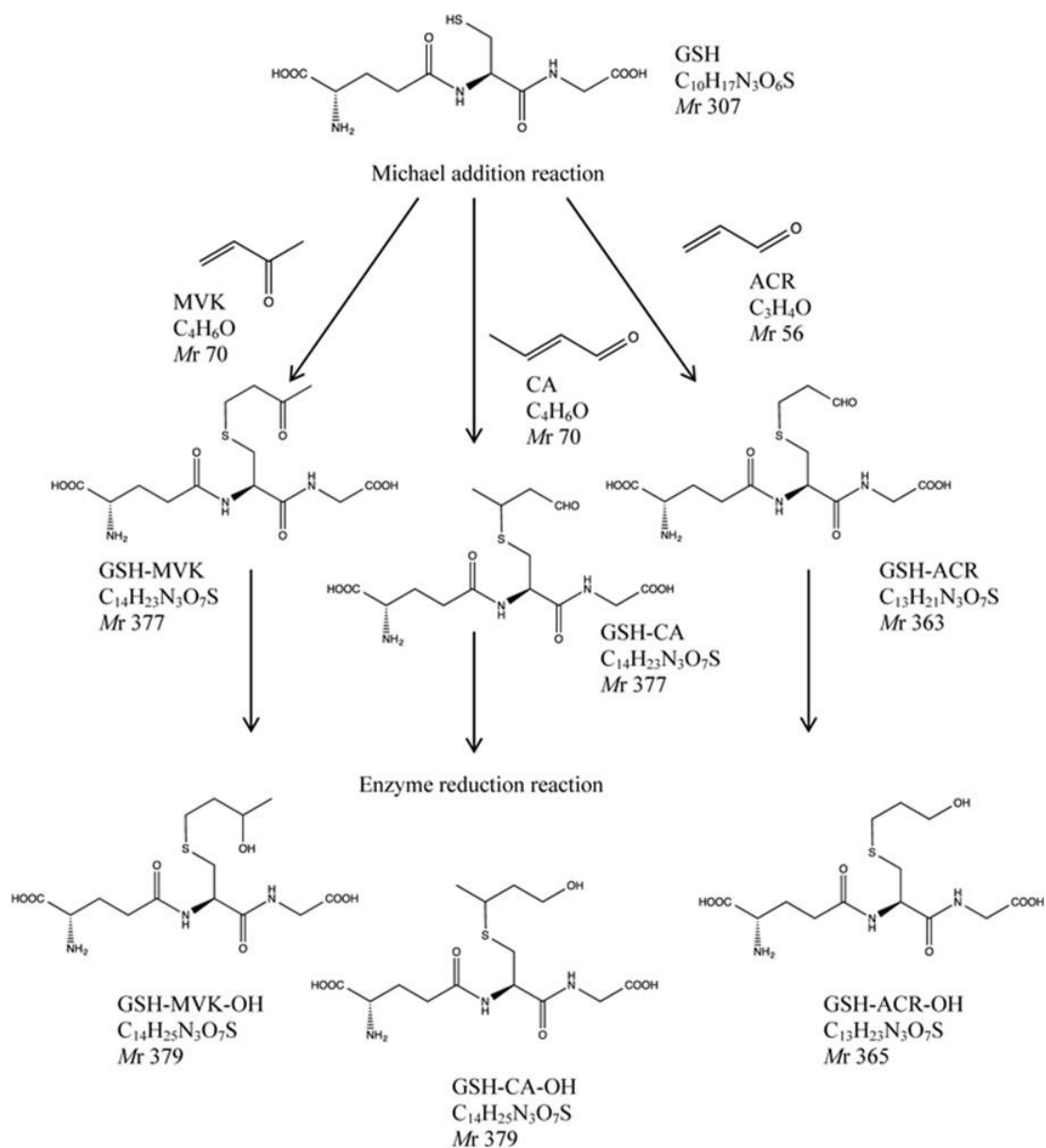


Fig. 12. Proposed metabolic pathway of α,β -unsaturated carbonyl compounds with Michael addition involved in GSH and subsequent enzymatic reduction reaction.

(2) GSH-MVK の還元反応を触媒する酵素の検討

AKR が α,β -不飽和カルボニル化合物の GSH 抱合体の還元に関与するか否かを明らかにするために、GSH-MVK を基質として用い、AKR により還元されて検出される GSH-MVK-OH の SRM ピーク面積から評価した。さらに、酵素阻害剤存在下

と非存在下で比較した。

先に、AKR の 1 つである AKR1B1 の活性を確認した。AKR1B1 に NADPH の存在下で基質として GSH-MVK を反応させたところ、GSH-MVK のピークが減少する一方、そのアルコール体 (GSH-MVK-OH) のピークが現れたことから、AKR1B1 酵素の活性が確認された。その結果を Fig. 13A に示す。GSH-MVK-OH/GSH-MVK の SRM ピーク面積比は、時間とともに増加し、経時的に還元されていた。

次に、AKR1B1 を阻害するエパルレスタットの酵素活性の阻害効果を確認した。NADPH の存在下、AKR1B1 にエパルレスタットを前処置した後、GSH-MVK を添加した。GSH-MVK のピークはほとんど変化を示さず、GSH-MVK-OH のピークは、長い時間経過の後、弱く現れた程度で、エパルレスタットは AKR1B1 の活性を完全に阻害した (Fig.13B)。

エパルレスタットで前処置したヒツジ血液に MVK を添加して除タンパク質した反応液の上清を分析した SRM クロマトグラムにおいて、MVK を処置して 30 分後までは GSH-MVK および GSH-MVK-OH が、エパルレスタット未処置と同程度現れた。その後、エパルレスタットを前処置した血液ではエパルレスタット未処置と比べ、GSH-MVK-OH は減少した (Fig. 14)。

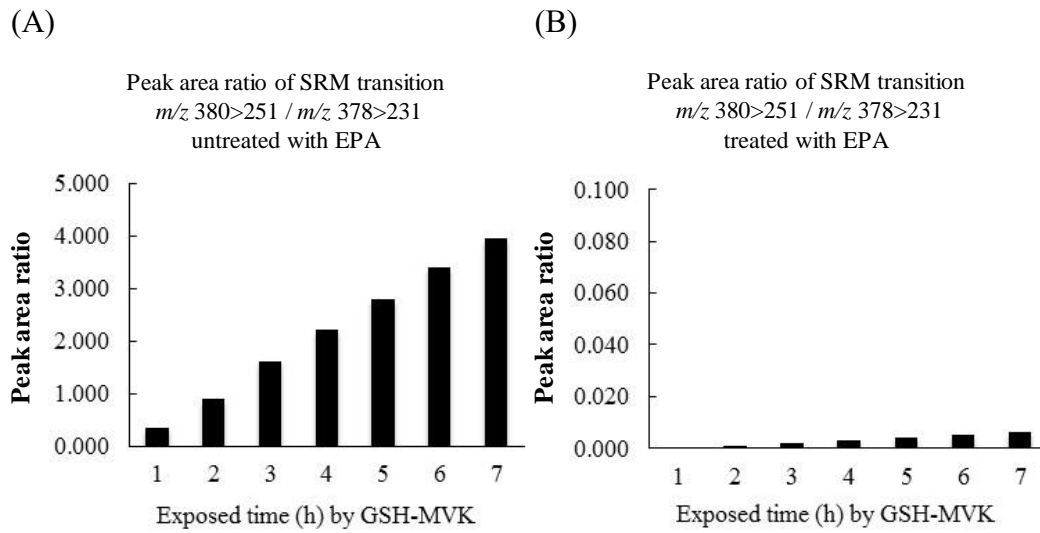


Fig. 13. Effects of Epalrestat (EPA) on the time course of changes in the peak area ratio of GSH-MVK-OH (m/z 380>251)/GSH-MVK adduct (m/z 378>231) in the absence of sheep blood cells, (A) untreated and (B) pretreated with EPA before reacting GSH-MVK with aldose reductase.

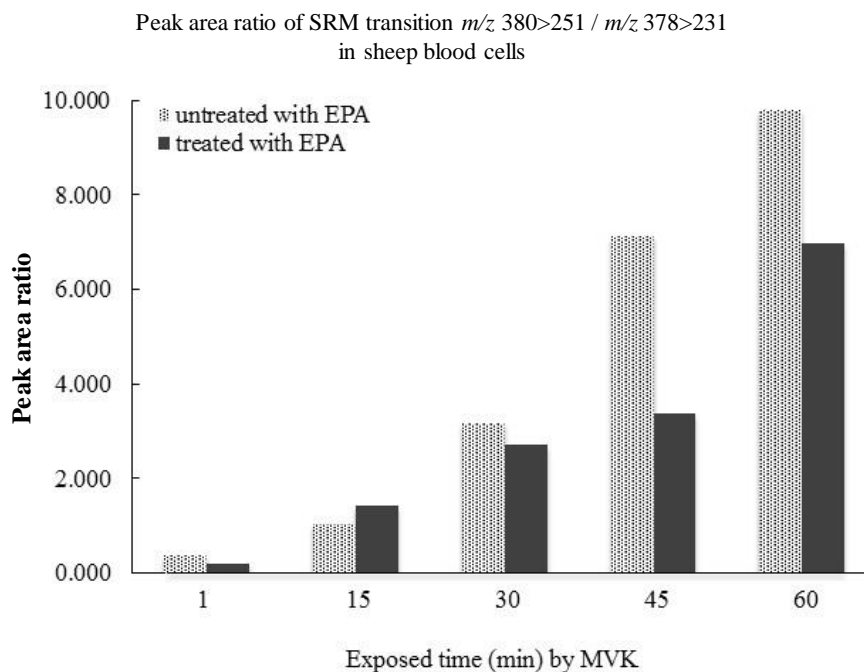


Fig. 14. Effects of EPA on the time course of changes in peak area ratio of GSH-MVK-OH (m/z 380>251)/GSH-MVK (m/z 378>231) in sheep blood cells treated with MVK.

3. 考察

本研究の結果は、CSE 中の MVK、CA および ACR が速やかにヒツジ赤血球に取り込まれ、赤血球内 GSH と反応してそれぞれのマイケル付加物を生成し、さらに直ちにアルコール体に還元され、そして細胞外液中に排出されることを示す。以前の論文で、CSE にさらされた B16-BL6 細胞における MVK、CA および ACR の代謝とよく一致した結果を示したが、赤血球ではアルコール体への還元酵素の活性が強く、B16-BL6 細胞における還元酵素活性は赤血球より弱いことも示された²⁹⁾。また、エパルレスタットに感受性を示す AKR がヒツジ赤血球中に存在する可能性が示された。これらの知見は、哺乳動物の赤血球とがん細胞が、たばこ煙中の MVK、CA および ACR を同じ機構で代謝することを示しており、 α,β -不飽和カルボニル化合物などの有毒な化学物質から体を保護するには血液が重要な役割を果たすと推測される。MVK は血液中でグルタチオン抱合されることが明らかになったので、抗がん剤としてより効率的に使用するには、血液をあまり介さず、局所投与のほうが良いと示唆される。

第 2 章 小括

MVK はがん細胞の Colon-26 細胞および準正常細胞の BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖に影響を与えない濃度で Colon-26 細胞の浸潤を抑制したことから、MVK は抗がん剤および抗転移薬の有力なシード化合物あるいはアジュバントとなり得る可能性が考えられる。今後、MVK が浸潤を抑制した詳細な作用機序を検討していく必要がある。

第 3 章 グルタチオン (GSH) 抱合能に基づく Colon-26 細胞の増殖を抑制する たばこ煙中の α,β -不飽和カルボニル化合物の探索

第 1 節 CSE 中に存在することが判明した α,β -不飽和カルボニル化合物と GSH との反応性の検討

Huang ら²⁾は、正常肝臓よりも肝がん細胞において GSH 含量が上昇していること、GSH 含量の増加は細胞増殖を促進することを報告した。また、Carretero ら³⁾は、GSH 含量の高い B16 マウスメラノーマ細胞は、脾臓から肝臓への転移活性が高いことを報告した。彼らの報告より、がん細胞内の GSH 含量を減少させることはがん細胞増殖を抑制することにつながると考えられる。実際、申請者らは CSE および MVK が細胞内の GSH 含量を減少させることにより Colon-26 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。その GSH 含量の減少作用は、MVK が GSH と不可逆的に付加体を形成することによる。そこで本章では、 α,β -不飽和カルボニル化合物が容易に GSH の SH 基とマイケル付加する反応性の高さを利用して Colon-26 細胞の増殖を抑制する CSE 中の α,β -不飽和カルボニル化合物を探索した。第 1 節ではまず、CSE と GSH を混合し、高分解能質量分析計を用いて反応溶液を分析し、新たに出現したピークの精密質量値から組成演算を行い、組成式を求め、候補化合物を選択した。次に、候補化合物および CSE の GC/MS 分析を行い、マススペクトルおよび保持時間を比較し、これらの候補化合物の中から CSE に新たに存在することが判明した化合物を同定した。これらの候補化合物と GSH を反応させ、反応生成物を LC/MS 法を用いて測定し、反応性を評価した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。2-Cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, *trans*-2-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-butenal, 2, 4-hexadienal および furfural は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Ethyl vinyl ketone および 2-ethylacrylaldehyde は Alfa Aesar Co., Inc. (Heysham, UK) から購入した。2-Methyl-2-cyclopenten-1-one は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から入手した。3-Methyl-2-cyclopenten-1-one は Combi-Blocks, Inc. (San Diego, CA, USA) から購入した。LC/MS グレードの H₂O および CH₃OH は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から入手した。LC/MS グレードの formic acid および octa decyl silyl (ODS) column (Cosmosil 5C18-AR-II 4.6 mm×150 mm) はナカライテスク株式会社 (京都、日本) から購入した。

(2) CSE の調製

第 1 章、第 1 節に記載した方法で調製した。

(3) CSE における有効な新規 α,β -不飽和カルボニル化合物の探索

GSH と CSE を混合した反応液を高分解能質量分析装置により分析した。反応後のクロマトグラムに出現した、新たなピークの精密質量値を求め、組成演算を行い、得られた組成式から GSH および付加した水素の組成式を差し引いた組成式を用いて、いくつかの候補化合物を選択し、標準品を購入した。購入した各候補化合物 (10

mM) を GSH 溶液 (1 mM) と混合し、37°C で 30 分間反応させた後、反応生成物を正イオンモードの LC/ESI/MS で分析した。CSE および購入した候補化合物について GC/MS 分析も行った。

(4) 高分解能三連四重極型質量分析計

HPLC として、Prominence UFLC (LC-20AD) (島津製作所、京都、日本) を装着した、高分解能質量分析計 Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific K. K., 横浜、日本) を精密質量値の測定および組成解析に使用した。スプレー電圧は 3,500 V に、装置の分解能は 100,000 に、キャピラリー温度は 250°C に設定した。測定範囲は m/z 100 から 650 とした。

(5) 三連四重極型質量分析計および HPLC の測定条件

第 2 章、第 3 節と同様の方法で行った。

(6) GC/MS の条件

GC (6890N, Agilent Technology Inc., Santa Clara, CA, USA) を備えた質量分析計 (Automass SUN、日本電子株式会社、東京、日本) を、GSH と反応する CSE 中の反応活性な化合物の分析に使用した。GC/MS 条件は、イオン化エネルギー 70 eV、電流 300 μ A、PM 電圧 500 V、供給源温度 250°C、インターフェース温度 250°C、注入口温度 250°C、He ガス 1.0 mL/分 (一定流速)、スプリットレスモードとした。全イオン電流クロマトグラム (Total ion current chromatogram, TIC) および選択イオンモニタリング (Selected ion monitoring, SIM) を用いて、検索化合物を同定および定量した。キャピラリーカラムには、長さ 30 m×内径 0.25 mm×1.00 μ m フィルム厚で、液相がポリエチレングリコールの Zebron capillary GC column ZB-WAX (Phenomenex Inc.,

Torrance, CA, USA) を使用した。CSE 中の反応活性な化合物を分離するための GC 条件は、40°C (1 分) → (4°C/分) → 100°C (2 分) → (15°C/分) → 220°C (3 分) → (30°C/分) → 40°C (1 分) とした。

2. 実験結果

(1) CSE 中の新規 α,β -不飽和カルボニル化合物の検索

α,β -不飽和カルボニル化合物が容易に GSH とマイケル付加することを利用して、CSE 中の ACR、CA および MVK 以外の α,β -不飽和カルボニル化合物の検出を試みた。まず、GSH 溶液を CSE に加えて、37°C で 30 分間反応させた後、高分解能 LC/MS を用いて反応生成物を分析した。測定した精密質量値に基づいて、GSH と反応した化合物の分子組成を計算し、候補化合物を推定した。測定精密質量値、推定した不飽和カルボニル化合物の元素組成およびその計算精密質量値を Table 1 に示す。元素組成の結果から、市販の標準品を購入した。購入した化合物を Table 2 に示し、それらの構造を Fig. 15 に示す。

Table 1. Composition analyses of products after the reaction of CSE with GSH.

Retention time	[M+H] ⁺	Measured accurate mass	Estimated elemental composition	Calculated exact mass	Difference (mDa)	Increased mass value from GSH	The elemental composition of the candidate compound
16.4 min	390	390.13298	C ₁₅ H ₂₄ O ₇ N ₃ S	390.13295	0.03	82	C ₅ H ₆ O
18.5 min	392	392.14790	C ₁₅ H ₂₆ O ₇ N ₃ S	392.14860	-0.70	84	C ₅ H ₈ O
15 min (14 min)	404	404.11176	C ₁₅ H ₂₂ O ₈ N ₃ S	404.11221	-0.45	96	C ₅ H ₄ O ₂
18-19 min (16-17 min)	404	404.14851	C ₁₆ H ₂₆ O ₇ N ₃ S	404.14860	-0.09	96	C ₆ H ₈ O

Table 2. Candidate compounds utilized as standards.

Mr 82 (C ₅ H ₆ O)	2-Cyclopenten-1-one
Mr 84 (C ₅ H ₈ O)	<i>trans</i> -2-Pentenal
	<i>trans</i> -2-Methyl-2-butenal
	3-Methyl-2-butenal
	2-Ethylacrylaldehyde
	Ethyl vinyl ketone
Mr 96 (C ₆ H ₈ O)	2, 4-Hexadienal
	2-Methyl-2-cyclopenten-1-one
	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one
Mr 96 (C ₅ H ₄ O ₂)	Furfural

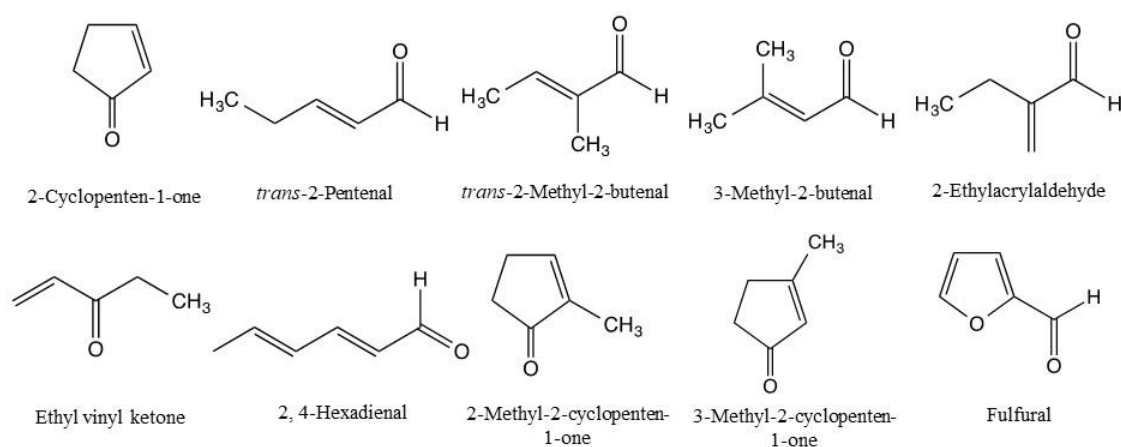


Fig. 15. Structures of candidate effective compound in CSE.

(2) CSE 中の反応性の高い α,β -不飽和カルボニル化合物の同定と定量

GC/MS 分析を用いて CSE 中に存在する標的化合物を同定した。CSE ならびに購入した標準化合物を GC/MS によって分析し、それぞれの保持時間とマススペクトルを比較した。その結果、2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, *trans*-2-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-butenal, ethyl vinyl ketone, 2-methyl-2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-cyclopenten-1-one および furfural が CSE 中に存在する化合物として同定され、2, 4-hexadienal は CSE に含まれていなかった。2-Ethylacrylaldehyde は同

定に至らなかった。抽出イオンクロマトグラムを Table 3 に示す。

GC マススペクトルにおいて高いピーク強度を示した化合物を GC/MS によって定量した。これらの化合物が、非常に反応性の高い化合物である ACR、CA および MVK とほぼ同等の量で CSE に存在することを明らかにした (Fig. 16)。

Table 3. Retention times in GC mass chromatograms of CSE, and commercially available α,β -unsaturated carbonyl compounds that showed the same retention times.

M^{+}	Retention time (min)	Commercially available α,β -unsaturated carbonyl compounds
82	18:38	2-Cyclopenten-1-one
84	6:58	2-Ethylacrylaldehyde
	7:35	-
	8:11	-
	8:28	Ethyl vinyl ketone
	11:00	<i>trans</i> -2-Methyl-2-butenal
	12:08	<i>trans</i> -2-Pentenal
	14:24	-
	14:50	3-Methyl-2-butenal
96	18:52	2-Methyl-2-cyclopenten-1-one
	19:23	-
	19:40	Furfural
	20:09	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one

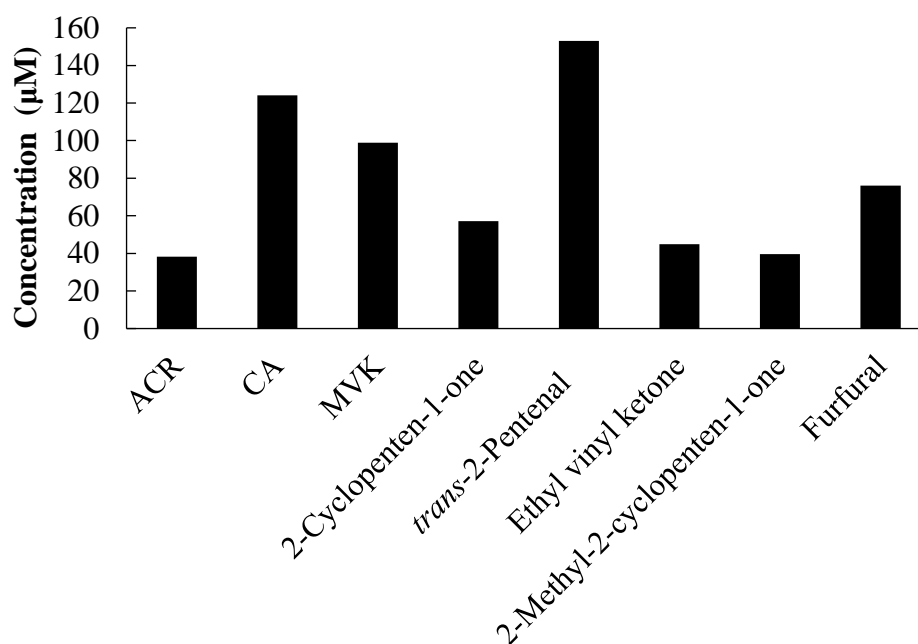


Fig. 16. Concentrations of the main α,β -unsaturated carbonyl compounds in CSE.

(3) CSE 中に存在することが判明した α,β -不飽和カルボニル化合物と GSH との反応性の検討

CSE 中に存在することが判明した 8 種類の化合物と GSH との反応性を調べるため、8 種類の化合物を GSH と反応させ、その混合溶液を LC/MS によって分析した。これらの化合物の GSH 抱合体の $[M+H]^+$ の抽出イオンクロマトグラムを Fig. 17 に示した。2-Cyclopenten-1-one (m/z 390), *trans*-2-pentenal (m/z 392), 3-methyl-2-butenal (m/z 392) および ethyl vinyl ketone (m/z 392) はピーク強度が高かった。しかしながら、*trans*-2-methyl-2-butenal (m/z 392), 2-methyl-2-cyclopenten-1-one (m/z 404) および 3-methyl-2-cyclopenten-1-one (m/z 404) はピーク強度が低かった。Furfural (m/z 404) はピーク強度が弱かった。

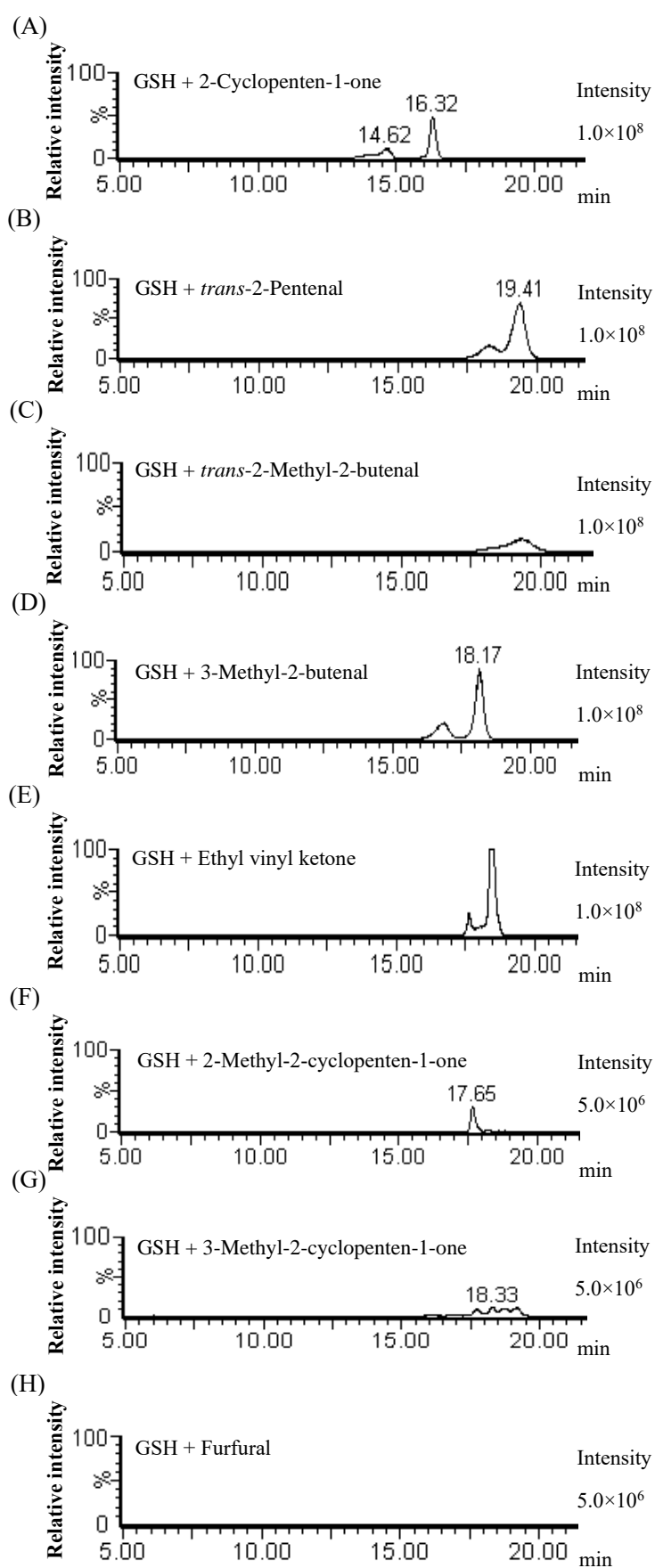


Fig. 17. Extracted ion chromatograms of reaction products of GSH with α,β -unsaturated carbonyl compounds. 1.0×10^8 in (A)~(E) and 5.0×10^6 in (F)~(H) indicated the absolute intensity of ion detection, and each value indicates 100% relative intensity.

3. 考察

α,β -不飽和カルボニル化合物が容易に GSH の SH 基とマイケル付加する反応性の高さを利用して、CSE 中に新たに 8 種類の化合物 (2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, *trans*-2-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-butenal, ethyl vinyl ketone, 2-methyl-2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-cyclopenten-1-one および furfural) が存在することが明らかとなった。定量結果から、*trans*-2-pentenal は、CA より存在量が多く、Colombo ら²¹⁾ が述べた、総 GSH 量の減少は、ACR および CA による GSH の消費以外にも、これらの α,β -不飽和カルボニル化合物による消費も考えられた。これら 8 種類の化合物のうち、2-cyclopenten-1-one、*trans*-2-pentenal、3-methyl-2-butenal および ethyl vinyl ketone は GSH との反応性が比較的高く、*trans*-2-methyl-2-butenal、2-methyl-2-cyclopenten-1-one、3-methyl-2-cyclopenten-1-one および furfural は比較的弱いことが示された。

第 2 節 Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖におよぼす

8 種類の α,β -不飽和カルボニル化合物の影響

本節では、第 3 章、第 1 節で CSE 中に存在することが明らかとなった 8 種類の α,β -不飽和カルボニル化合物が、Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖におよぼす影響を検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

紙巻たばこ (ウィンストン・XS・キャスター・エフアール・ワン・ボックス) は日本たばこ産業株式会社 (東京、日本) から購入した。ケンブリッジフィルターは Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から購入した。Fetal bovine serum (FBS)、MEM 培地および RPMI 1640 培地は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。 Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] は、日水製薬株式会社 (東京、日本) から入手した。EDTA-トリプシン溶液 (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) から入手し、PBS (-) で希釈し、EDTA: 0.88 mM, trypsin: 0.1%を用いた。2-Cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, *trans*-2-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-butenal, 2, 4-hexadienal および furfural 東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Ethyl vinyl ketone および 2-ethylacrylaldehyde は Alfa Aesar Co., Inc. (Heysham, UK) から購入した。2-Methyl-2-cyclopenten-1-one および *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から入手した。3-Methyl-2-cyclopenten-1-one は Combi-Blocks, Inc. (San Diego, CA, USA) から購入した。

(2) 使用細胞

Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた。細胞培養の条件は第 1 章、第 1 節および第 2 章、第 1 節に記載した方法と同様に行った。

(3) 増殖アッセイ

第 1 章、第 2 節に記載した方法と同様に行った。

(4) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析には Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。有意差検定には Dunnett 法または Tukey 法を用いた。 $p<0.05$ で有意差ありと判定した。

2. 実験結果

100 μ M の 2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, 3-methyl-2-butenal および ethyl vinyl ketone は、培養開始 72 時間後において Colon-26 細胞の増殖を 58.4, 97.5, 33.6, および 98.0% 抑制した。一方、*trans*-2-methyl-2-butenal, 2-methyl-2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-cyclopenten-1-one および furfural は、Colon-26 細胞の増殖をほとんど抑制しなかった (Fig. 18)。100 μ M の 2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, 3-methyl-2-butenal および ethyl vinyl ketone は BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖を 39.6, 48.9, 17.9 および 95.9%抑制した。しかしながら、2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal および 3-methyl-2-butenal は Colon-26 細胞と比較して、BALB/3T3 clone A31 細胞に対する増殖抑制作用が弱いことが示された (Fig. 18)。

さらに、2-cyclopenten-1-one, *trans*-2-pentenal, 3-methyl-2-butenal および ethyl vinyl ketone の Colon-26 細胞に対する増殖抑制作用は、NAC によって有意に拮

抗された (Fig. 19)。

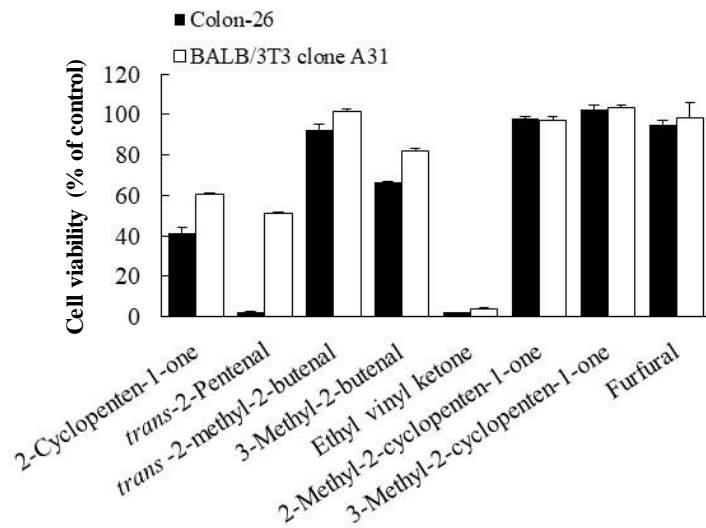


Fig. 18. Effects of the eight identified compounds on the growth of Colon-26 cells and BALB/3T3 clone A31 cells. Both cell types were treated with each compound at 100 μ M concentration for 72 h. Cells were enumerated using a Coulter counter. Data are mean \pm SE (n=3).

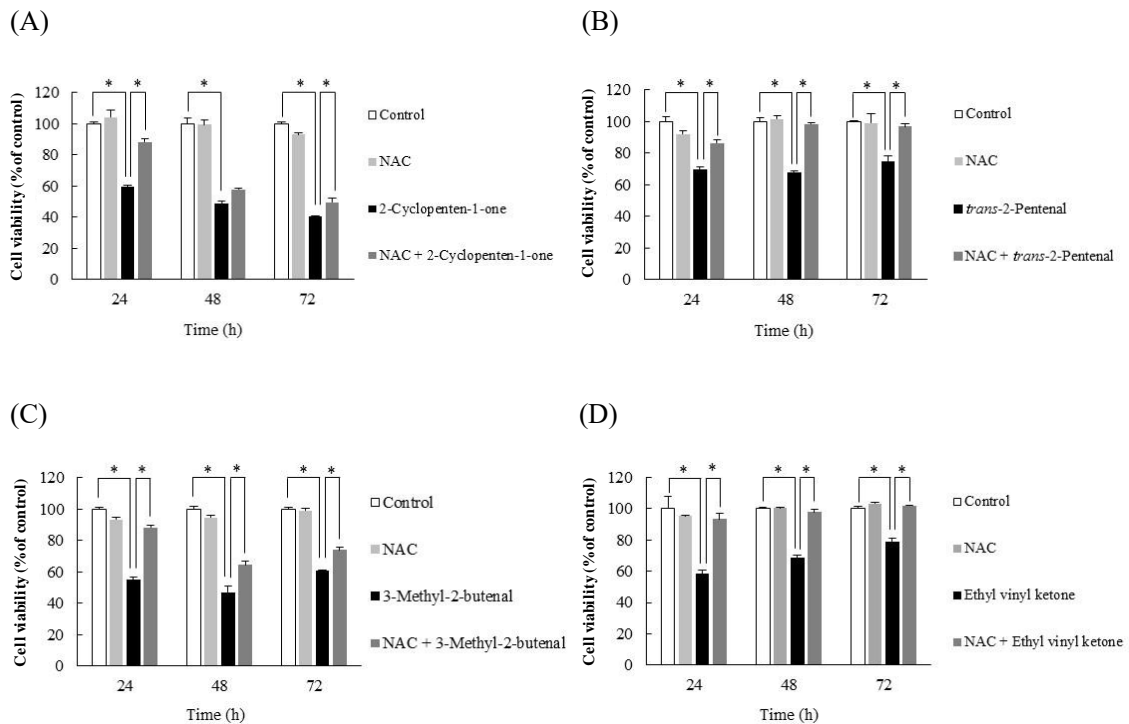


Fig. 19. Antagonistic effects of 50 μ M NAC on Colon-26 cell growth inhibited by (A) 100 μ M 2-cyclopenten-1-one, (B) 10 μ M *trans*-2-pentenal, (C) 100 μ M 3-methyl-2-butenal, or (D) 10 μ M ethyl vinyl ketone. Data are mean \pm SE (n=3). * p <0.05.

3. 考察

今回、比較的 GSH との反応性が強かった ethyl vinyl ketone, *trans*-2-pentenal, 2-cyclopenten-1-one および 3-methyl-2-butenal は Colon-26 細胞の増殖抑制作用を有することが明らかとなった。この結果から、CSE 中の成分と GSH との反応性が、Colon-26 細胞の増殖抑制作用と正に相関している可能性がある。*trans*-2-Pentenal は Colon-26 細胞に対する増殖抑制作用の方が、BALB/3T3 clone A31 細胞に対する増殖抑制作用よりも強力であった。また、ethyl vinyl ketone, *trans*-2-pentenal, 2-cyclopenten-1-one および 3-methyl-2-butenal と NAC を併用したところ、それらの増殖抑制作用はいずれも阻害されたことから、これらの化合物による増殖抑制作用には GSH と付加体を形成することにより、細胞内 GSH 量の減少が関与していることが示唆された。しかし、GSH は、正常細胞でもレドックスに重要な役割を果たしており、枯渇すると大きな影響が出ることに留意しなければならない。

第 3 章 小括

CSE 中の比較的 GSH との反応性が強かった ethyl vinyl ketone, *trans*-2-pentenal, 2-cyclopenten-1-one および 3-methyl-2-butenal は Colon-26 細胞の増殖抑制作用を有することが明らかとなった。この結果から、CSE 中の成分と GSH との反応性が、Colon-26 細胞の増殖抑制作用と正に相関している可能性がある。また、*trans*-2-pentenal は準正常細胞よりも大腸がん細胞に対する増殖抑制作用が強いことが明らかとなった。

結論

1. CSE が Colon-26 細胞を用いた経脾肝転移モデルマウスにおいて、肝転移抑制作用を示すことを明らかにした。その作用機序の 1 つとして、CSE は Colon-26 細胞の MMP-2 分泌量を減少させることにより、浸潤を抑制することが示唆された。
2. MVK は Colon-26 細胞および BALB/3T3 clone A31 細胞の増殖に影響を与えない濃度で Colon-26 細胞の浸潤を抑制した。
3. GSH との反応性が高い *trans*-2-pentenal は Colon-26 細胞の増殖を BALB/3T3 clone A31 よりも低濃度で抑制した。
4. 2. および 3. から、MVK ならびに *trans*-2-pentenal は抗がん剤のシード化合物あるいはアジュバントになり得ると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部 中村一基 教授、吉川紀子 准教授に心より厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行と論文作成にあたり、貴重なご助言とご協力をいただきました、武庫川女子大学薬学部 篠塚和正 教授、籠田智美 教授、国友勝 名誉教授、市川厚 名誉教授に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、貴重なご助言とご協力をいただきました、武庫川女子大学薬学部 森山賢治 教授、西川淳一 教授に心より厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部 堀山志朱代 助教に深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をいただきました武庫川女子大学薬学部 本田千恵 助教、諏訪紀代子 助手に深く感謝いたします。本研究に多大なご協力をいただきました武庫川女子大学薬学部薬理学 I 研究室の皆様、卒業生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、日頃からご助言、ご協力、激励いただきました諸先生をはじめ、先輩、友人、家族に感謝の意を表します。

論文目録

本学位論文は以下の論文により構成される。

原著論文

- 1) **Hatai M**, Yoshikawa N, Kinoshita E, Horiyama S, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K.
trans-2-Pentenal, an Active Compound in Cigarette Smoke, Identified via its Ability to Form Adducts with Glutathione.
Chem Pharm Bull (Tokyo). 2019;67(9):1000-1005.
- 2) Horiyama S, **Hatai M**, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M.
Detoxification Mechanism of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds in Cigarette Smoke Observed in Sheep Erythrocytes.
Chem Pharm Bull (Tokyo). 2018;66(7):721-726.
- 3) **Hatai M**, Yoshikawa N, Kinoshita E, Horiyama S, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K.
Invasion-inhibiting Effects of Gaseous Components in Cigarette Smoke on Mouse Rectal Carcinoma Colon-26 Cells.
In Vivo. 2018;32(3):493-497.

関連論文

- 1) Horiyama S, **Hatai M**, Takahashi Y, Date S, Masujima T, Honda C, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Takayama M.
Intracellular Metabolism of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds, Acrolein, Crotonaldehyde and Methyl Vinyl Ketone, Active Toxicants in Cigarette Smoke: Participation of Glutathione Conjugation Ability and Aldehyde-Ketone Sensitive Reductase Activity.
Chem Pharm Bull (Tokyo). 2016;64(6):585-93.
- 2) Horiyama S, Takahashi Y, **Hatai M**, Honda C, Suwa K, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Date S, Masujima T, Takayama M.
Methyl vinyl ketone, a toxic ingredient in cigarette smoke extract, modifies glutathione in mouse melanoma cells.
Chem Pharm Bull (Tokyo). 2014;62(8):772-8.

参考文献

- 1) Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.* 1989;257(4 Pt 1):L163-73.
- 2) Huang ZZ, Chen C, Zeng Z, Yang H, Oh J, Chen L, Lu SC. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J.* 2001;15(1):19-21.
- 3) Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, Estrela JM. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(7):567-74.
- 4) Cotgreave IA, Johansson U, Moldéus P, Brattsand R. The effect of acute cigarette smoke inhalation on pulmonary and systemic cysteine and glutathione redox states in the rat. *Toxicology.* 1987;45(2):203-12.
- 5) Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W. An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(6):1518-25.
- 6) Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 1):L285-92.
- 7) Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(1):79-86.
- 8) Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol.* 1999;277(6):L1067-88.
- 9) Takahashi Y, Horiyama S, Kimoto Y, Yoshikawa N, Kunitomo M, Kagota S, Shinozuka K and Nakamura K. Inhibitory effect of cigarette smoke extract on experimental lung metastasis of mouse melanoma by suppressing tumor invasion. *Pharmacology and Pharmacy,* 2012;3 (3): 324-329.
- 10) Horiyama S, Takahashi Y, Hatai M, Honda C, Suwa K, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Date S, Masujima T, Takayama M. Methyl vinyl ketone, a toxic ingredient in cigarette smoke extract, modifies glutathione in mouse melanoma cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2014;62(8):772-8.
- 11) 最新がん統計；国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター：
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
(Accessed 1 September 2019)
- 12) Higashi T, Mai Y, Noya Y, Horinouchi T, Terada K, Hoshi A, Nepal P, Harada T, Horiguchi M, Hatate C, Kuge Y, Miwa S. A simple and rapid method for standard

- preparation of gas phase extract of cigarette smoke. PLoS One. 2014;9(9):e107856.
- 13) Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res.* 1975;35(9):2434-9. PubMed PMID: 1149045.
 - 14) 袴田安彦,木村幸三郎,中島厚:マウス colon26 細胞による肝転移に対する放射線効果の実験的研究.東医大誌 47:515-523,1989
 - 15) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). “Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.” : < <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM078932.pdf>>
 - 16) Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Oxidants in cigarette smoke extract modify low-density lipoprotein in the plasma and facilitate atherogenesis in the aorta of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis.* 2001;156(1):109-17.
 - 17) Bourgeois JS, Jacob J, Garewal A, Ndahayo R, Paxson J. The Bioavailability of Soluble Cigarette Smoke Extract Is Reduced through Interactions with Cells and Affects the Cellular Response to CSE Exposure. PLoS One. 2016;11(9):e0163182.
 - 18) Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986;46(1):1-7.
 - 19) Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 1987;47(12):3239-45.
 - 20) Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-74.
 - 21) Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
 - 22) Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.* 1999;107(1):137-43.
 - 23) La Rocca G, Anzalone R, Magno F, Farina F, Cappello F, Zummo G. Cigarette smoke exposure inhibits extracellular MMP-2 (gelatinase A) activity in human lung fibroblasts. *Respir Res.* 2007 12;8:23.
 - 24) Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(4):480-90.
 - 25) Takahashi Y, Horiyama S, Honda C, Suwa K, Nakamura K, Kunitomo M, Shimma

- S, Toyoda M, Sato H, Shizuma M, Takayama M. A chemical approach to searching for bioactive ingredients in cigarette smoke. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2013;61(1):85-9.
- 26) Reddy S, Finkelstein EI, Wong PS, Phung A, Cross CE, van der Vliet A. Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1490-8.
- 27) van der Toorn M, Smit-de Vries MP, Slebos DJ, de Bruin HG, Abello N, van Oosterhout AJ, Bischoff R, Kauffman HF. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(5):L1156-62.
- 28) Colombo G, Dalle-Donne I, Orioli M, Giustarini D, Rossi R, Clerici M, Regazzoni L, Aldini G, Milzani A, Butterfield DA, Gagliano N. Oxidative damage in human gingival fibroblasts exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1584-96.
- 29) Horiyama S, Hatai M, Takahashi Y, Date S, Masujima T, Honda C, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Takayama M. Intracellular Metabolism of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds, Acrolein, Crotonaldehyde and Methyl Vinyl Ketone, Active Toxicants in Cigarette Smoke: Participation of Glutathione Conjugation Ability and Aldehyde-Ketone Sensitive Reductase Activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2016;64(6):585-93.
- 30) Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev*. 2008;40(4):553-624.
- 31) Petrash JM. All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7-8):737-49.
- 32) Jin Y, Penning TM. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:263-92.
- 33) Yasuda N, Fujino K, Shiraji T, Nambu F, Kondo K. Effects of steroid 5 α -reductase inhibitor ONO-9302 and anti-androgen allylestrenol on the prostatic growth, and plasma and prostatic hormone levels in rats. *Jpn J Pharmacol*. 1997;74(3):243-52.
- 34) Jin J, Krishack PA, Cao D. Role of aldo-keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Front Biosci*. 2006;11:2767-73.
- 35) Lee KW, Ko BC, Jiang Z, Cao D, Chung SS. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs*. 2001;12(2):129-32.
- 36) Wang C, Yan R, Luo D, Watabe K, Liao DF, Cao D. Aldo-keto reductase family 1

member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *J Biol Chem.* 2009;284(39):26742-8.

- 37) Ma J, Yan R, Zu X, Cheng JM, Rao K, Liao DF, Cao D. Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase- α in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(6):3418-23.
- 38) Tammali R, Reddy AB, Ramana KV, Petrash JM, Srivastava SK. Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation. *Carcinogenesis.* 2009;30(5):799-807.