

2018年度 博士論文

ニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液の  
がん転移抑制作用の解析と活性本体の特定

Analysis of the anti-metastatic action of nicotine and tar removed-  
cigarette smoke extract and the specification of its active ingredients

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科  
高橋 雄太

## 目次

略語表.....	4
緒論 .....	5
第 1 章 マウスメラノーマ細胞の浸潤抑制を介したニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液の血行性肺転移抑制作用 .....	9
第 1 節 はじめに .....	9
第 2 節 実験方法 .....	10
1-2-1 供試化合物等 .....	10
1-2-2 動物 .....	10
1-2-3 細胞培養実験 .....	11
1-2-4 CSE の調製.....	11
1-2-5 実験的癌転移モデルを用いた解析.....	12
1-2-6 マトリゲルを用いた細胞浸潤アッセイ .....	12
1-2-7 細胞遊走アッセイ .....	12
1-2-8 In vitro における癌細胞の生存曲線の作成 .....	13
1-2-9 統計解析 .....	13
第 3 節 結果 .....	14
1-3-1 B16-BL6 細胞の血行性肺転移に及ぼす CSE の影響.....	14
1-3-2 B16-BL6 細胞の浸潤および遊走に及ぼす CSE の影響 .....	16
1-3-3 B16-BL6 細胞の増殖に及ぼす CSE の影響.....	18
第 4 節 考察 .....	19
第 5 節 小括 .....	20
第 2 章 L-チロシンとの反応に基づくタバコ煙中の活性成分の同定ならびに B16-BL6 細胞に対する CSE 中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用の検討.....	21
第 1 節 はじめに .....	21
第 2 節 実験方法 .....	24

2-2-1	供試化合物等 .....	24
2-2-2	CSE の調製.....	24
2-2-3	Triple-Quadrupole Mass Spectrometer および HPLC の条件.....	25
2-2-4	GC-MS 条件.....	26
2-2-5	CSE と Tyr の化学的反応性.....	26
2-2-6	細胞培養 .....	27
2-2-7	細胞増殖アッセイ .....	27
2-2-8	細胞浸潤アッセイ .....	27
2-2-9	統計解析 .....	27
第 3 節	結果および考察.....	28
2-3-1	Tyr と CSE の反応生成物の分析 .....	28
2-3-2	Tyr と CSE の反応生成物における反応時間の影響 .....	31
2-3-3	CSE 中の活性成分の GC/MS 分析 .....	33
2-3-4	化合物 Tyr+70 の同定.....	35
2-3-5	MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の増殖抑制活性.....	37
2-3-6	MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の浸潤抑制活性.....	39
第 4 節	小括 .....	41
第 3 章	タバコ煙水抽出液中に存在するメチルビニルケトンによるマウスメラノーマ細胞内のグルタチオン修飾作用.....	42
第 1 節	はじめに .....	42
第 2 節	実験方法 .....	44
3-2-1	供試化合物等 .....	44
3-2-2	CSE の調製.....	44
3-2-3	細胞培養、処置および細胞増殖実験 .....	45
3-2-4	CSE 処置した B16-BL6 細胞の細胞溶解サンプルの調製.....	45
3-2-5	In Vitro における CSE もしくはその活性成分である CA と MVK に対する GSH の反応 .....	45

3-2-6	Triple-Quadrupole Mass Spectrometer および HPLC の条件.....	46
3-2-7	統計解析 .....	46
第 3 節	結果および考察.....	47
3-3-1	細胞生存率における CSE、CA、MVK の影響の比較.....	47
3-3-2	CSE で処置したマウスメラノーマ細胞の LC-MS 分析 .....	49
3-3-3	GSH と MVK および GSH と CA の反応生成物の同定 .....	53
3-3-4	GSH-MVK の構造的評価.....	56
第 4 節	小括 .....	58
総括	.....	59
謝辞	.....	62
引用文献	.....	63

## 略語表

ACR	acrolein
B16-BL6	B16-BL6 mouse melanoma
CA	crotonaldehyde
CSE	nicotine and tar-removed cigarette smoke extract
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum
GC	gas chromatography
GSH	glutathione
HMBC	hetero-nuclear multiple-bond connectivity
HMQC	hetero-nuclear multiple quantum coherence
HR	high resolution
LC	liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
Mr	molecular weight
MS	mass spectrometry
MVK	methyl vinyl ketone
NAC	N-acetyl-cysteine
NMR	magnetic resonance spectrometry
ODS	octadodecyl silica
PBS (-)	Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium
ROS	reactive oxygen species
SE	standard error
SIM	selected ion monitoring
SRM	selected reaction monitoring
TIC	total ion current
TOF	time-of-flight
tR	retention time
Tyr	L-tyrosine
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 緒論

近年の医学の進歩に伴い、早期発見に基づく外科的切除により、限局的な癌であれば完治させることが可能となっている。しかし、国内の統計によると、癌は昭和 56（1981）年より死因の第 1 位であり、平成 27（2015）年には年間約 37 万人が亡くなり、生涯のうちに約 2 人に 1 人が癌にかかると推計されている。こうしたことから、依然として癌は国民の生命と健康にとって重大な問題である。<sup>[1]</sup> 早期発見、早期治療が重要であると言われており、その最大の要因として癌細胞の原発巣から遠隔臓器への転移が挙げられる。“転移を制するものは癌を制す”と言っても過言ではないほど癌転移の克服は困難な課題である。もし、癌転移を抑制できれば、癌による死亡率は大幅に低減すると予想される。

癌転移の過程は、下記に示されるように、様々な要因が絡み、多段階を経て生じる。<sup>[2]</sup>

①原発部位における癌細胞の増殖、悪性化、②原発巣（腫瘍）からの癌細胞の離脱と周辺組織への浸潤・遊走、③脈管への侵入、④脈管内での移動（循環）と癌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転移先組織へ浸潤し増殖して最終的に転移巣が形成される。中でも、浸潤・遊走能は癌転移能と高い相関を示し重要なステップの 1 つであると考えられている。（Fig. I）臨床的には、癌細胞への栄養供給や癌転移の経路となり得る血管の新生を調節する主要因子である血管内皮成長因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）が注目されている。VEGF に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブが先行して承認されており、他の抗悪性腫瘍薬との併用で、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌、肺癌、乳癌、悪性神経膠腫、卵巣癌に適応がある。<sup>[3]</sup> しかしながら、現在のところ転移抑制作用を薬効機序とする医薬品は市販されていない。

喫煙は発癌およびその促進における要因の 1 つとされており、広く一般的にヒトの健康に有害であることは周知の事実である。喫煙は頭頸部癌、肺癌、膀胱癌の主たる原因であるとされており、食道癌、膵臓癌、腎臓癌への寄与が報告されている。<sup>[4,5]</sup> 特に、喫煙が肺

癌のリスクを上昇させることは明らかであり、<sup>[6]</sup> 肺癌の原因の 80~90%は喫煙であるという報告や癌転移を促進させるという報告も成されている。<sup>[7,8]</sup>

一方、Sayed らはタバコ葉の成分からアルツハイマーやパーキンソン病などの疾患の治療に有用な物質を見出している。<sup>[9]</sup> 加えて、Saito らはフォルボールエステル類の1つである 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate の発癌プロモーション作用がタバコ煙濃縮物から単離した cembratriene-4,6-diol によって抑制されることを明らかにしている。<sup>[10]</sup> さらに、Sayed らは cembratriene-4,6-diol が癌細胞の浸潤を抑制することも報告している。<sup>[11]</sup> このように、タバコ煙は有害ではあるものの、有益な物質も含んでおり、それらの物質を探索することは新薬のシーズ発見の可能性を秘めている。

一般的に、いかなる研究においても試薬の定量性は必須であり、タバコ煙やその成分に関する研究においても例外はないが、タバコ煙を定量的に扱うことは非常に困難である。しかしながら、タバコ煙をガラス繊維フィルターである Cambridge filter を用いて、粒子相とガス相に分離することは可能である。そのため、Cambridge filter によって捕集されたタバコ煙成分を有機溶媒で溶解させたタバコ煙濃縮物、もしくは生理緩衝溶液にタバコ煙を通気させることにより調製するタバコ煙抽出液が用いられている。<sup>[12,13]</sup> とりわけ、タバコ煙のガス相成分に関する研究ならびにニコチンの影響を取り除く必要のある研究では、タバコ煙ガス相成分を抽出したニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液 (CSE) が良く用いられる。なお、本研究の CSE は、機械的に吸引したタバコ煙を Cambridge filter、リン酸生理緩衝溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium; PBS (-)) の順に通すことで、タバコ煙からニコチン・タール等の粒子相成分を除き、ガス相成分を抽出することで調製した (Fig. II)。

以上を踏まえ、著者は、タバコ煙の中に含まれているニコチン・タール以外の活性成分に注目して、CSE が癌転移に及ぼす影響の解析ならびに活性本体の特定を試みた。本論文は、以下の一連の研究成果をまとめたものである。

第 1 章では、尾静脈から注入された高転移性 B16-BL6 マウスメラノーマ (B16-BL6) 細胞が肺転移結節を形成することのできる同種可移植性の C57BL/6NCr マウスを用いた血行性肺転移モデルを用いて、B16-BL6 細胞の増殖に影響を及ぼさない濃度での CSE 前処置が肺転移能に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。さらに、CSE が B16-BL6 細胞の遊走ならびに浸潤に及ぼす影響についても検討した。

第 2 章では、CSE 中の浸潤および遊走抑制作用を有する活性成分候補を探索するために、まず、反応性の高い水酸基をもつアミノ酸であるチロシン (Tyr) との反応性を指標として、液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS) や液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) で反応生成物を同定した。次に、ガスクロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography-mass spectrometry; GC-MS) を用いて Tyr に結合した CSE 中の活性成分を同定・定量した。さらに、B16-BL6 細胞に対する CSE 中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用について検討した。

第 3 章では、CSE の転移抑制機序を解明する一端として、CSE 中の成分による細胞内の成分の修飾を LC-MS および LC-MS/MS で検討し、CSE の継続的な処置が B16-BL6 細胞の生存に及ぼす影響および細胞内グルタチオン (GSH) の関与を検討した。



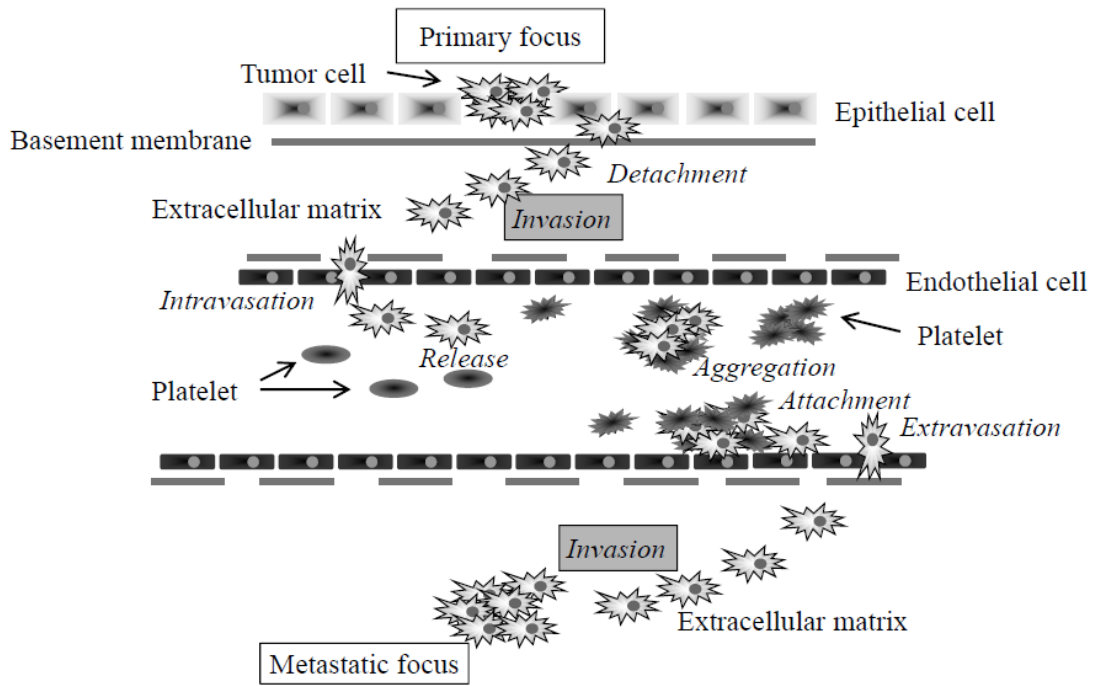


Fig. I Process of hematogenic tumor metastasis

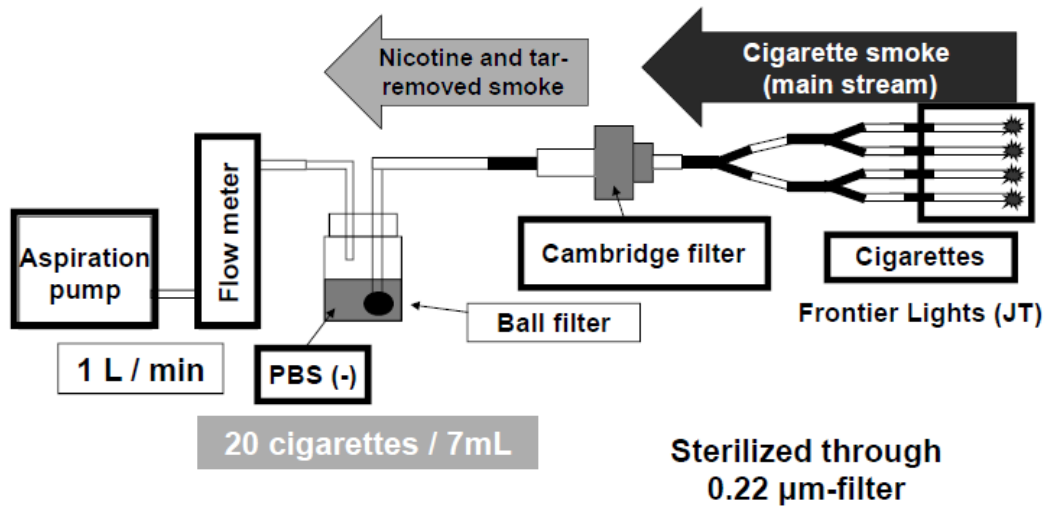


Fig. II Preparation of cigarette smoke extract (CSE)

## 第 1 章 マウスメラノーマ細胞の浸潤抑制を介したニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液の血行性肺転移抑制作用

### 第 1 節 はじめに

喫煙は頭頸部癌、肺癌、膀胱癌の主たる原因であるとされており、食道癌、膵臓癌、腎臓癌に寄与する要因である。<sup>[4,5]</sup> 動物実験を用いた既報では、ニコチンやその誘導体ならびにタバコ煙のほとんどすべての成分を含むタバコ煙濃縮物が実験的な癌転移を促進させることが報告されている。<sup>[14,15]</sup>

タバコ煙は前述のように有害な成分を含んでいるが、タバコ煙およびタバコの葉や花には多くの有益な成分も含まれている。<sup>[9]</sup> Saito らはタバコ煙の粒子相抽出物であるタバコ煙濃縮物から抗腫瘍プロモーション作用薬として *cembratriene-4,6-diol* の同定を報告しており、<sup>[10]</sup> *cembratriene-4,6-diol* が癌細胞の浸潤を抑制することも報告されている。<sup>[11]</sup> しかしながら、タバコ煙のガス相成分が癌細胞の転移を促進させるのか、抑制するのかについての報告は見られない。

第 1 章では、タバコ煙の中に含まれているニコチン・タール以外の活性成分に注目して、タバコ煙のガス相が癌転移に及ぼす影響を検討した。まず、高転移性のマウスメラノーマ細胞株である B16-BL6 細胞を静脈から接種する実験的な癌転移モデルにおいて、マウスメラノーマ細胞に対する CSE 前処置の影響を検討した。さらに、CSE の抗転移作用の機序を検討するために、*in vitro* において、CSE を前処置した癌細胞の浸潤および遊走の活性を検討した。

## 第 2 節 実験方法

### 1-2-1 供試化合物等

実験用タバコとして、タバコ 1 本のあたりの煙にタール 1 mg およびニコチン 0.1 mg を含む市販品のフロンティアライトを Japan Tobacco, Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。タバコ煙の粒子の 99.9% およびニコチンの 99.998% を除去するために用いた、ガラス繊維を薄型円形に製したフィルターパッドである Cambridge filter は Heinr. Borgwaldt GmbH (Hamburg, Germany) から調達した。Fetal bovine serum (FBS) は BioWest Co. (Nuaille, France) 製であった。Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) trypsin solution (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%) は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA) 製であった。Penicillin/streptomycin solution (penicillin: 50,000 U/ml, streptomycin: 50 mg/ml) は Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 製であった。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with L-glutamine は Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA) 製であった。PBS (-) は Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 製であった。Growth factor-reduced Matrigel matrix および FALCON cell culture inserts は Becton Dickinson Labware (Bedford, MA, USA) 製であった。

### 1-2-2 動物

特定病原体除去の雄性 C57BL/6Cr マウス 7 週齢を Japan SLC, Inc. (Hamamatsu, Japan) から調達して、転移性メラノーマの同系動物として 8 週齢で実験に用いた。マウスは空調の整った飼育室 (23°C ± 2°C and 60% ± 10% humidity) において人為的な 12 時間明暗サイクル (7:00 a.m. - 7:00 p.m.) 条件下で飼育した。実験期間中、食餌と水は自由に摂取させた。すべての実験手順や手続きは日本薬理学会によって提唱されている「動物実験に関する日本薬理学会指針」に準じ、武庫川女子大学動物実験委員会において承認を受けた。

### 1-2-3 細胞培養実験

C57BL/6Cr マウスに可移植性の高転移性マウスメラノーマ細胞である B16-BL6 細胞は鳥取大医学部の岡田太教授よりご供与いただいた。細胞は、37 度、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下で、10%の FBS および 0.1%の Penicillin/streptomycin solution を加えた DMEM の中で培養した。すべての実験において、サブコンフルエントに培養した B16-BL6 細胞を継代数 50 以下で用いた。CSE (0%、0.1%、0.3%および 1%) を添加後、37°Cで 3 時間放置し、前処理した B16-BL6 細胞は EDTA trypsin solution で回収し、PBS(-)もしくは DMEM に再懸濁した。

### 1-2-4 CSE の調製

タバコ煙ガス相成分抽出液として、既報を参考にして CSE を調製した。<sup>[12, 13]</sup>

真空ポンプ (Nippon Rikagaku Kikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) による吸引条件下で、タバコ 4 本の同時に燃焼させることで発生した主流煙を Cambridge filter に通すことでニコチンとタールを除去した後、PBS (-)に通気した。PBS (-) 1 mL あたり 3 本分の主流煙を通気して調製した溶液を 0.22 μm ポアサイズの滅菌フィルターに通すことで得られた溶液を 100%CSE とした。真空ポンプ (Nippon Rikagaku Kikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) は 1 L/min の空気流量になるように設定し、点火後 1 分間タバコ煙を採取しポンプを停止した。調製した CSE は使用直前まで-80°Cで冷凍保存した。CSE は必要に応じて PBS (-)で様々な濃度に希釈し、これらの CSE の最終濃度は%値で表示した。

#### 1-2-5 実験的癌転移モデルを用いた解析

B16-BL6 細胞に対して CSE (0%、0.1%、0.3%および 1%) で 3 時間前処置した後、定法に従って回収し、 $5 \times 10^6$  cells / 10 mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液  $1 \times 10^5$  cells / 0.2 mL / mouse を尾静脈から接種した。接種 15 日後、ペントバルビタール麻酔下で解剖し、肺を採取した。ホルマリン緩衝溶液に浸漬保存した。肺転移結節は肺の中で黒色の塊として視認性があるので、拡大鏡下で肺転移結節数を測定した。

#### 1-2-6 マトリゲルを用いた細胞浸潤アッセイ

In vitro において、B16-BL6 細胞の浸潤アッセイを既報に基づいて行った。<sup>[16]</sup>

簡潔にまとめると、有孔のポリエチレンテレフタレート製フィルター膜を有する 6.4-mm-diameter Transwells (8- $\mu$ m pore size) に 150  $\mu$ g/mL マトリゲル DMEM 溶液 100  $\mu$ L を添加し、37°C で 4 時間放置することにより、マトリゲルをコーティングした。B16-BL6 細胞に対して CSE (0%、0.1%、0.3%および 1%) を 3 時間前処置した後、定法に従って回収し、DMEM に適切な密度で懸濁した。B16-BL6 細胞  $2 \times 10^5$  cells を含む細胞懸濁液 500  $\mu$ L をチャンバー上層に添加した。下層には 20  $\mu$ g/mL fibronectin 含有 serum-free DMEM をケモアトラクタントとして添加した。細胞培養インキュベーター内で 24 時間放置した後、細胞は 0.1% crystal violet 10% methanol 溶液で固定および染色を施し、フィルター上面の浸潤しなかった細胞は綿棒で完全に除去した。フィルター下面に浸潤した細胞は 2% sodium acetate trihydrate, 1% acetic acid, および 50% methanol を含有する溶解バッファーで溶解し、細胞溶解液の吸光度を波長 550 nm で測定した。

#### 1-2-7 細胞遊走アッセイ

In vitro において、B16-BL6 細胞の遊走アッセイを既報に基づいて行った。<sup>[17]</sup>

簡潔にまとめると、チャンバーの上層から下層に遊走した細胞を methanol で固定した後に 3% Giemsa PBS (-) 溶液で染色し、顕微鏡下で細胞数を計測した。

#### 1-2-8 In vitro における癌細胞の生存曲線の作成

サブコンフルエントの B16-BL6 細胞を CSE (0%, 0.1%, 0.3%, and 1%) で 3 時間前処置した後、定法に従って回収し、10%FBS 含有 DMEM に再懸濁した。12-well culture plate のそれぞれのウェルに  $1 \times 10^5$  cells/2 mL の細胞懸濁液を播種した。細胞培養インキュベーター内 37°C で 24、48、72 時間培養した後、定法に従って接着している生細胞を回収し、生存細胞数をコールターカウンター (Coulter Z1, Beckman Coulter, Inc.) を用いて計測し、増殖曲線を作成した。

#### 1-2-9 統計解析

データは mean  $\pm$  standard error (S.E.) で表記した。統計解析には Graphpad Prism 4 software package (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、Dunnett test を実施した。 $p$  値が 0.05 未満の場合に統計学的有意差を認めた。

### 第3節 結果

#### 1-3-1 B16-BL6細胞の血行性肺転移に及ぼすCSEの影響

CSE (0%、0.1%、0.3%、1%) で3時間前処置したB16-BL6細胞を接種したマウスにおいて、接種から14日後に視認性のある肺転移結節を観察することができた。Fig. 1-1にはメラノーマ細胞の転移結節を確認することのできる典型的な肺の写真をそれぞれの実験群ごとに示した。CSEの前処置(0%、0.1%、0.3%、1%)の実験群ごとに見ると、肺の転移結節数はそれぞれ $89.6 \pm 13.6$ 、 $62.1 \pm 18.9$ 、 $49.9 \pm 11.8$ 、 $41.0 \pm 8.1$ であった(Fig. 1-2)。1% CSEで前処置されたB16-BL6を接種された群の肺転移結節数は溶媒コントロール群と比較して有意に54%減少した。

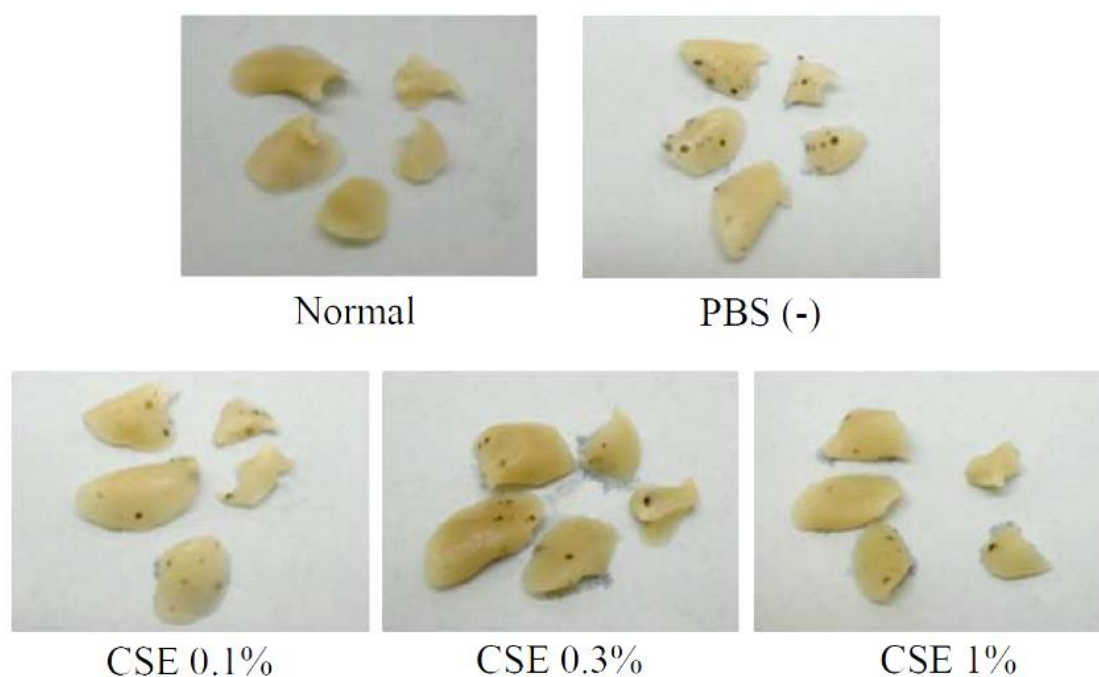


Fig. 1-1 Appearance of the lungs of C57BL/6Cr mice injected intravenously with highly metastatic B16-BL6 melanoma cells ( $1 \times 10^5$ ), after pretreatment with 0, 0.1, 0.3, and 1% CSE for 3 hours at 37°C. Fourteen days later, mice were anesthetized with pentobarbital and the lungs were excised. Each photograph shows a representative specimen from each group.

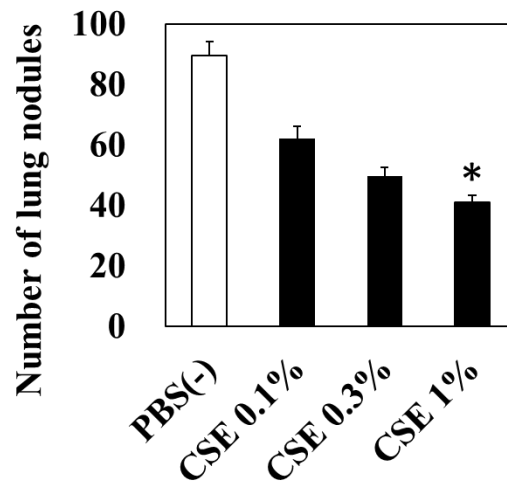


Fig. 1-2 Number of lung nodules in C57BL/6Cr mice injected intravenously with highly metastatic B16-BL6 melanoma cells ( $1 \times 10^5$ ), after pretreatment with 0, 0.1, 0.3, and 1% CSE for 3 hours at 37°C. Fourteen days later, mice were anesthetized with pentobarbital and the lungs were excised. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. of 7 samples. \*P<0.05 vs. control.



### 1-3-2 B16-BL6 細胞の浸潤および遊走に及ぼす CSE の影響

CSE の抗転移作用の機序を明らかにするために、腫瘍が転移を成し遂げるために必須である浸潤能および遊走能に注目し、B16-BL6 細胞を用いた浸潤アッセイおよび遊走アッセイを行った。その結果、CSE で前処置した B16-BL6 細胞の浸潤は用量依存的に減少し、1% CSE 処置において、溶媒コントロールと比較して、B16-BL6 細胞の浸潤は有意に 32% 減少した。(Fig. 1-3) 0.3% および 1% CSE で前処置した B16-BL6 細胞の遊走は、溶媒コントロールと比較して、用量依存的にそれぞれ有意に 32% および 49% 減少した。(Fig. 1-4)

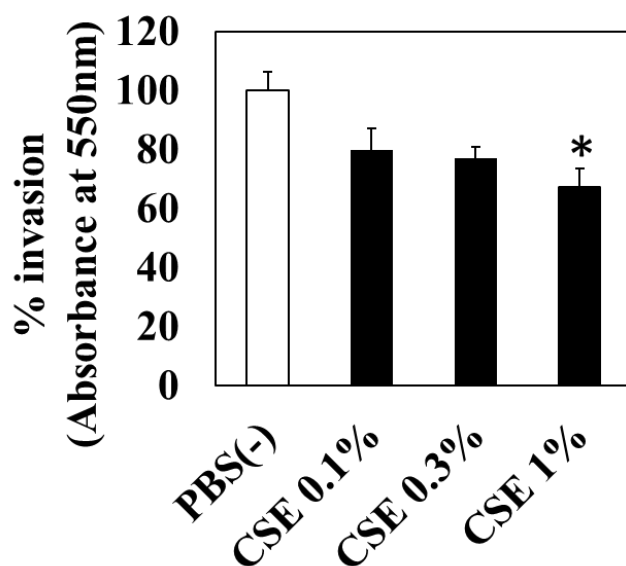


Fig. 1-3 Inhibitory effect of CSE on B16-BL6 melanoma cell invasion. Sub-confluent cells were pretreated with CSE (0, 0.1, 0.3, and 1%) for 3 hours at 37°C. Cells ( $2 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ ) obtained as a monodisperse suspension by trypsinization were seeded into the upper compartment of matrigel coated-Transwell chambers. Lower chambers contained serum-free medium with 20  $\mu\text{g/mL}$  fibronectin as a chemoattractant. After incubation for 24 hours, invading cells on the lower surface were stained with crystal violet, and cell lysates were measured at 550 nm. Data are expressed as the mean $\pm$ SE of 6 samples. \* $P < 0.05$  vs. control.

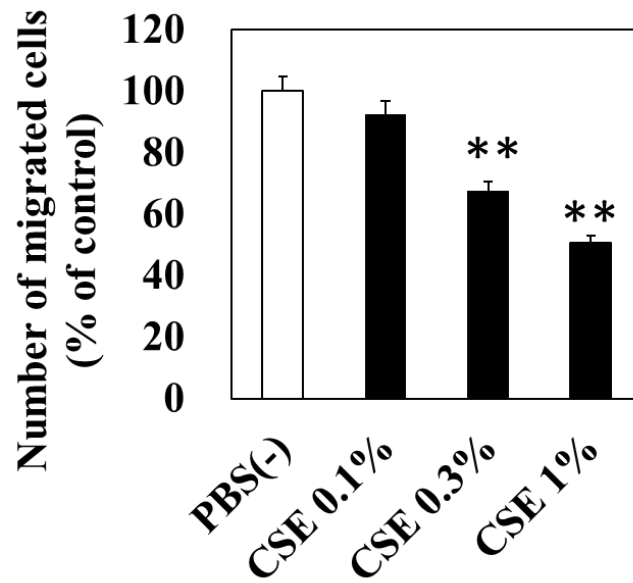


Fig. 1-4 Inhibitory effect of CSE on B16-BL6 melanoma cell migration. Sub-confluent cells were pretreated with CSE (0, 0.1, 0.3, and 1%) for 3 hours at 37°C. Cells ( $2 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ ) obtained as a monodisperse suspension by trypsinization were seeded into the upper compartment of Transwell chambers. Lower chambers contained serum-free medium with 20  $\mu\text{g/mL}$  fibronectin as a chemoattractant. After incubation for 6 hours, migrating cells on the lower surface were counted microscopically. Data are expressed as the mean $\pm$ SE of 6 samples. \*\*P<0.01 vs. control.

### 1-3-3 B16-BL6 細胞の増殖に及ぼす CSE の影響

CSE による血行性肺転移抑制作用、浸潤抑制作用および遊走抑制作用が B16-BL6 細胞に対する CSE の増殖抑制作用に基づくものではないことを明らかにするため、B16-BL6 細胞の増殖曲線に及ぼす CSE 前処置の影響を検討した。その結果、CSE (0.1%、0.3%および1%)で3時間前処置をした B16-BL6 細胞の増殖曲線は溶媒コントロールと違いがなかった。

(Fig. 1-5)

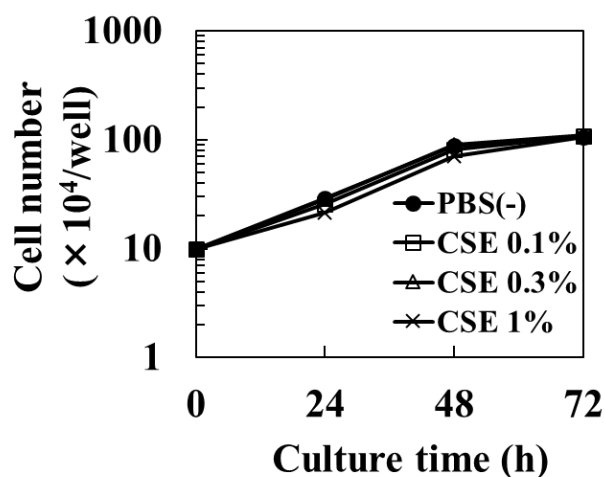


Fig. 1-5 Effect of CSE on growth curves for B16-BL6 melanoma cells. Sub-confluent cells were pretreated with CSE (0%, 0.1%, 0.3%, and 1%) for 3 hours at 37°C. At time 0,  $1 \times 10^5$  cells in 2 mL of medium per well obtained as a monodisperse suspension by trypsinization were seeded into a 12-well culture plate. At the times indicated, triplicate cultures were trypsinized and viable cells in samples were enumerated using a Coulter counter.

#### 第4節 考察

第1章では、高転移性のメラノーマ細胞を同系のマウスの静脈から接種することにより肺に転移結節が形成される実験的転移モデルを用いた。<sup>[18]</sup> このモデルは原発巣から転移巣までのすべての段階を模倣したものではない。しかしながら、実験に必要な期間が短く、再現性良く、腫瘍が血管外へ脱出し、肺において転移結節を形成する能力を測定することができることから、この方法をファーストスクリーニングとして適用した。今回の検討の結果、CSE が抗転移薬候補となる成分を含んでいることを実証した。将来的な応用のためには、同じ癌転移モデルや他の転移モデルを用いて、CSE の腹腔内投与が癌転移に及ぼす影響を検討する必要がある。

メラノーマ細胞の転移はいくつかのステップを経て達成される。癌細胞は原発巣から離脱して基底膜を浸潤し、血管もしくはリンパ管の循環に侵入する能力を獲得しなければならない。その後、循環する癌細胞は標的臓器の間質に脱出して転移巣を形成するために増殖しなければならない。癌細胞の増殖抑制作用もまた、抗転移に寄与する。CSE が肺の線維芽細胞の増殖を抑制することが報告されている。<sup>[19]</sup> しかしながら、CSE (0%, 0.1%, 0.3%, および 1%) の前処置はメラノーマ細胞の増殖を変化させなかった。これらの知見は、今回の実験条件において、CSE の成分がメラノーマ細胞の増殖抑制を介することなく、*in vivo* での転移抑制作用を発揮したことを示唆している。

いくつかの研究では、マクロファージによって血管壁に沿って分泌される上皮成長因子が原発巣の癌細胞の循環への侵入を誘導する一方、骨およびリンパ節、脳から分泌されるケモカインが循環している癌細胞の脱出を強く促進することを示唆している。<sup>[20,21]</sup> このように、侵入と脱出はケモタキシスによって調節されており、ケモタキシスは化学的な刺激の細胞外勾配を検出し、より高い部位へと遊走するために必須である。<sup>[20,22]</sup>

実際に、癌細胞の転移は癌細胞の浸潤および遊走を止めることによって抑制されることが判明している。<sup>[23]</sup> 今回の検討では、CSE の前処置が *in vivo* のメラノーマ細胞の実験

的転移および *in vitro* の浸潤および遊走を抑制した。したがって、CSE による転移の抑制が癌細胞の浸潤および遊走の抑制を介することが示唆された。実験条件が異なることから厳密な比較ではないが、CSE を処置した B16-BL6 細胞の浸潤抑制率に対して、遊走抑制率のほうが大きいことから、CSE は主に B16-BL6 細胞の遊走を抑制していると考えられた。また、La Rocca らはタバコ煙の曝露が癌細胞の浸潤に重要な酵素である細胞外マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-2 (gelatinase A) の活性を抑制することをヒト肺線維芽細胞で報告している。<sup>[24]</sup> 本章では MMP-2 の活性については検討していないが、CSE が B16-BL6 細胞の MMP 活性の抑制を介して癌細胞の浸潤を抑制している可能性が推察された。

タバコ煙は我々の健康にとって有害であることは明らかであり、最も良いアドバイスは禁煙を勧めることである。しかしながら、本章の結果はタバコ煙に有益な成分が含まれているかもしれないことおよび適したフィルターを用いてタバコ煙からニコチンやタールを除去することが重要であることを示している。

## 第 5 節 小括

本章では、B16-BL6 細胞を用いた実験的肺転移モデルマウスにおいて、B16-BL6 細胞に対する CSE の前処置が癌転移抑制作用を示すことを実証した。さらに、CSE の転移抑制作用は B16-BL6 細胞の浸潤および遊走の抑制を介することが示唆された。癌細胞におけるこれらの CSE の作用が細胞毒性によるものであるか否かを解決するために、細胞増殖曲線に対する CSE の影響を検討した。その結果、CSE 前処置された癌細胞の細胞増殖曲線は溶媒コントロールと比較して変化しなかった。

これらの結果は CSE が癌転移抑制成分を含んでいることを示唆している。

## 第2章 L-チロシンとの反応に基づくタバコ煙中の活性成分の同定ならびに B16-BL6 細胞に対する CSE 中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用の検討

### 第1節 はじめに

第1章において、CSE が B16-BL6 細胞の血行性癌転移を抑制するか否かを検討し、CSE 中の活性成分のいずれかが、B16-BL6 細胞の浸潤および遊走の抑制を介し、実験的な血行性癌転移を抑制することが示唆された。

タバコ煙は多くの発癌物質や毒物を含む 4800 種類を超える化学物質の混合物である。<sup>[25]</sup> Table 2-1 にはその一部を示す。<sup>[26]</sup> ガス相は粒子相と同様にフリーラジカルやオキシダント、プロオキシダントのような多くの成分を含んでいる。<sup>[27-29]</sup> パーオキシナイトライトやフリーラジカルのようなタバコ煙のガス相中の活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は一般的に反応性が高いものであるが、それらの半減期は極めて短い。したがって、ROS は抗転移作用を示すことのできる CSE 中の活性成分ではないかもしれない。

一方、癌細胞の浸潤や遊走に対する CSE の影響についての報告はみられないが、タバコ煙のガス相は多核白血球のケモタキシスを阻害することが示されており、その作用はシステインによって一部拮抗され、<sup>[30]</sup> タバコ煙のガス相は acrolein (ACR) や crotonaldehyde (CA) などの  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドやケトンを含んでおり、<sup>[31]</sup> それらはチオールアルキル化剤である。<sup>[32]</sup> 加えて、ヒト肺線維芽細胞<sup>[19]</sup>、ラット胃上皮細胞<sup>[33]</sup>、ヒト臍帯静脈内皮細胞<sup>[34]</sup>、マウス神経堤細胞<sup>[35]</sup>など多くの正常細胞の遊走がタバコ煙の抽出物(液)によって抑制されることは明らかにされている。特に、Bridges と Hsieh らはタバコ煙濃縮物の ACR や CA を含む画分が多核白血球の遊走を強く抑制することを明らかにしている。<sup>[36]</sup> したがって、CSE 中のアルデヒドやケトンが癌細胞の浸潤・遊走の抑制に関与している可能性は十分に考えられる。

喫煙は冠血管障害、動脈硬化、肺疾患や癌の疾患の主なリスク要因であり、<sup>[37]</sup> タバコ煙のガス相成分は微小な気道や肺胞を通過すると考えられ、呼吸器や全身的な疾患の発症に

重要な役割を果たすとされており、<sup>[27,38]</sup> CSE は様々な細胞に対して細胞毒性を示すことが知られている。<sup>[39-42]</sup> しかしながら、タバコ煙の成分が生体分子に作用することが可能であるかどうか、ならびに喫煙関連疾患の発症を引き起こすことが可能かどうかについてはよくわかっていない。

タバコ煙中の活性物質の化学分析は最も挑戦的な研究の一つであり、多くの分析手法を用いた研究が行われている。通常、反応性の高いカルボニル化合物のような揮発性成分の分析には GC や GC-MS が使用されている。<sup>[43,44]</sup> 多くの研究が成されているにもかかわらず、タバコ煙と機能的な生体内分子との反応によって生成する物質の分析に関する報告は限られている。その中でも、國友らは、喫煙科学研究財団の特定研究「リポ蛋白および血管壁を酸化変性させるタバコ煙成分の同定ならびにその機構の解明」において、生体機能調節に重要なアミノ酸残基であるチロシン (Tyr) と CSE との反応生成物に注目している。

[45]

第 2 章では、CSE 中の浸潤および遊走抑制作用を有する活性成分候補を探索するために、まず、反応性の高い水酸基をもつアミノ酸である Tyr との反応性を指標として、LC-MS や LC-MS/MS で反応生成物を同定した。次に、ガスクロマトグラフィー質量分析 GC-MS を用いて Tyr に結合した CSE 中の活性成分を同定・定量した。さらに、B16-BL6 細胞に対する CSE 中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用について検討した。

Table 2-1 Cigarette Smoke Compounds<sup>[26]</sup>

<i>m/z</i>	compounds
17	NH <sub>3</sub>
30	NO
34	H <sub>2</sub> S
39	unidentified combustion fragment
40	propyne
42	propene
43	carbohydrate fragment: C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> <sup>+</sup> , C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
44	acetaldehyde
45	dimethylamine, ethylamine
48	methanthiol
52	1-buten-3-yne,
54	1,3-butadiene, 1-butyne
56	2-propenal, butene, 2-methylpropene
58	acetone, propanal
66	cyclopentadiene
67	pyrrole
68	furan, isoprene, 1,3-pentadiene, cyclopentene
69	pyrroline
70	2-butenal, methyl vinyl ketone, methylbutene, pentene, butenone, 2-methyl-2-propenal
71	pyrrolidine
72	2-methylpropenal, 2-butanone, butanal
74	water-eliminated glycerol, tetrahydrofuran
78	benzene
79	pyridine
80	pyrazine
81	methylpyrrole
82	methylfuran, methylcyclopentene, cyclohexene, 2-cyclopenten-1-one
84	nicotine fragment, cyclopentanone, dimethylbutene, hexene, 3-methyl-3-buten-2-one
85	methylpyrrolidine, piperidine
86	methylbutanal, 3-methyl-2-butanone, pentanone, 2,3-butanedione
92	toluene
93	aniline, methylpyridine
94	phenol, 2-vinylfuran
95	pyridinol, ethylpyrrol, dimethylpyrrol
96	dimethylfuran, furfural
106	xylene, ethylbenzene, benzaldehyde
108	anisol, dimethylpyridine, methylphenol
110	dihydroxybenzene, 2-acetylfuran, methylfurfural
112	acetylcyclopentane, 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one
136	limonene, methoxybenzaldehyde, 2-ethyl-5-methylphenol
162	nicotine, anabasine



## 第2節 実験方法

### 2-2-1 供試化合物等

実験用タバコとして、市販品のフロンティアライトを Japan Tobacco Inc. (Tokyo, Japan) より購入した。Cambridge filter は Borgwaldt (Germany) より購入した。Tyr は LC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) を用いて精製した。N-acetyl-Tyr は Sigma-Aldrich Inc. (Tokyo, Japan)、O-acetyl-Tyr は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.) より購入した。Methyl vinyl ketone (MVK)、ACR および CA は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., (Tokyo, Japan) より購入した。(Fig. 2-1) LC-MS グレードの水およびメタノール、特級の酢酸は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。LC-MS グレードのギ酸、特級の無水酢酸、ならびにオクタドデシル(octadodecyl silica; ODS) カラムとして、Cosmosil 5C18-AR-II 4.6 mm×150 mm を Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。

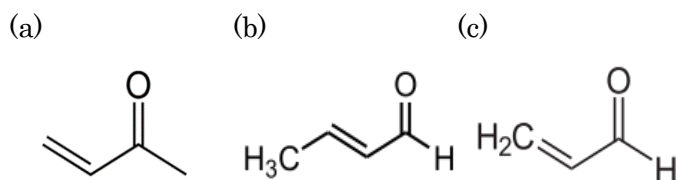


Fig. 2-1 Structures of (a)methyl vinyl ketone (MVK), (b)croton aldehyde (CA), and (c)Acrolein (ACR).

### 2-2-2 CSE の調製

1-2-4 と同様に、タバコ煙ガス相成分抽出液として、既報を参考にして CSE を調製した。

[12,13,46]

反応時間の検討以外においては、CSE は 2 mM Tyr 溶液と 37°C で 24 時間反応させた。反応生成物は LC-MS および LC-MS/MS にて分析した。

### 2-2-3 Triple-Quadrupole Mass Spectrometer および HPLC の条件

Quattro Premier triple-quadrupole LC-MS (Micromass, Manchester, U.K.) および electrospray ionization (ESI) source を Alliance HT2795 Separations Module (Waters Co., Milford, MA, U.S.A.) に接続し、陽イオンおよび陰イオンモード Q1 scan と MS/MS 分析に用いた。MS は selected reaction monitoring (SRM) モードにおいて Q1 および Q3 とともに低分解能で用いた。質量分析計の条件を source temperature:120°C、desolvation temperature:350°C、cone nitrogen:50 L/h、desolvation nitrogen:800 L/h、capillary voltage:3.0 kV、cone voltage:15-25 V に最適化した。SRM モードにおけるフラグメント化に用いる argon collision gas flow rate は 0.3 mL/min ( $3.37\text{-}3.39\times 10^{-3}$  mbar) に固定し、Tyr およびその他の分析対象に対する collisional energy は 10-13 eV に最適化した。LC 条件は、column:Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 mm×150 mm)、mobile phase A:0.05% formic acid、および mobile phase B:methanol を用いて、flow rate:0.4 mL/min、column oven temperature:27°C に設定した。主な分析は以下のリニアグラジエント条件で行った。開始 2 分後まで移動相 B を 5% に維持し、開始 12 分までに 40% に上昇させ、開始 15 分まで 3 分間維持した。さらに、開始 18 分までに 95% に上昇させ、開始 23 分まで 5 分間維持した。最終的に、移動相 B を開始 24 分までに 5% に下降させ、その後 2 分間維持した。他のグラジエント分析条件は Fig. 2-2 の図説に示した。サンプル注入量は 5  $\mu$ L に設定した。

High-Resolution (HR) MS による成分分析には、HR MS matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-Spiral time-of-flight (TOF)/TOF (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。マスキャリブレーションのための内部標準物質として、血小板活性化因子同様に、N-acetyl-Tyr とそのナトリウム付加体イオンとカリウム付加体イオンを用いた。

#### 2-2-4 GC-MS 条件

CSE 中の Tyr 反応性成分の分析には GC (6890N, Agilent Technology Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.) および MS (Automass SUN, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を組み合わせて用いた。GC/MS は ionization energy:70 eV、current, 300  $\mu$ A、PM voltage:500 V、source temperature:250°C、interface temperature:250°C、inlet temperature:250°C、He gas:1.0 mL/min、splitless モードの条件で用いた。Total ion current (TIC) chromatography と selected ion monitoring (SIM) chromatography GC/MS により、目的化合物を同定および定量した。クロマト分離には Zebtron capillary GC column ZB-WAX (Phenomenex Inc., Torrance, CA, U.S.A.), 30 m long $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 1.00  $\mu$ m film thickness, phase:100% polyethylene glycol を用いた。

CSE 中の活性成分の分離は以下の GC 条件で行った。まず、oven temperature は 40°C で 2 分間維持した後、4°C/min ずつ 100°C まで加温し、2 分間維持した。次に、15°C/min ずつ 220°C まで加温した後、3 分間維持した。その後、30°C/min で冷却し、1 分間維持した。

#### 2-2-5 CSE と Tyr の化学的反応性

反応時間を最適化するために、CSE を 2 mM Tyr と穏やかに混合した後、混液を 37°C で 0.017 (1 分)、1、3、6、12 および 24 時間反応させた。反応温度はヒトの平均正常体温と同じ 37°C とした。その後、反応液を SRM モードで分析した。それぞれの反応時間における反応生成物の SRM クロマトグラムのピーク面積を反応時間 24 時間のピーク面積と比較した。

N-(3-Oxobutyl)-Tyr [3-(4'-hydroxyphenyl)-2-(3''-oxobutylamino) propanoic acid] は超純水 100 mL 中で 5.5 eq の Tyr、MVK および NaHCO<sub>3</sub> と混合して 80°C で 4 時間反応させることにより合成した。反応液を濃縮し、目的物を HPLC で精製し、分取した。LC を mobile phase: 0.1% trifluoroacetic acid を含有する 5% CH<sub>3</sub>CN および 95% water、flow

rate: 1.4 mL/min、column: Cosmosil 5C18-AR-II packed column (3.0 mm×150 mm)の条件で用いた。<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, hetero-nuclear multiple quantum coherence (HMQC) および hetero-nuclear multiple-bond connectivity (HMBC) NMR スペクトルは ECP-500 (JEOL) を用いて CD<sub>3</sub>OD 溶液中 500 MHz で解析した。高分解能高速原子衝撃質量スペクトル(HR-FAB-MS)を JMS-700 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で解析した。

#### 2-2-6 細胞培養

1-2-3 と同様にして、B16-BL6 細胞を培養し、実験に用いた。

#### 2-2-7 細胞増殖アッセイ

サブコンフルエントの B16-BL6 細胞を示された候補物質濃度で 3 時間前処置した後、定法に従って回収した。1-2-8 と同様にして、生存細胞数を計測し、細胞増殖曲線を作成した。

#### 2-2-8 細胞浸潤アッセイ

1-2-6 と同様にして、前述の方法にしたがって浸潤アッセイを行った<sup>[16]</sup>。

#### 2-2-9 統計解析

データは mean ±S.E. で表記した。統計解析には Graphpad Prism 4 software package (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、Dunnett test を実施した。p 値が 0.05 未満の場合に統計学的有意差を認めた。

### 第3節 結果および考察

#### 2-3-1 Tyr と CSE の反応生成物の分析

CSE と Tyr の反応により生成した化合物を分析するために、LC/MS 分析 および MS/MS 解析として、product ion scan, neutral loss scan および高感度 SRM を行った。

まず、MS 条件を最適化し、陽イオンモードおよび陰イオンモード ESI 条件下で Tyr のプロトン化イオン  $[\text{Tyr}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  182 および脱プロトン化分子イオン  $[\text{Tyr}-\text{H}]^-$ ,  $m/z$  180 を検出した。

次に、CSE および Tyr の反応前後の溶液を分析して、マススペクトルの差を比較した (Fig. 2-2)。その結果、neutral loss scan において  $m/z$  46 u の減少を示す化合物 3 種を検出した。 $m/z$  46 u の減少、すなわち、 $[\text{Tyr}+\text{H}]^+$   $m/z$  182 から  $m/z$  136 への減衰は MS/MS スペクトルにおける Tyr 誘導体の特徴である。

これらの物質の構造式を決定するために、陽イオンモードおよび陰イオンモードのマススペクトルの質量数から分子量 (Mr) を検討した。その結果、3 種のピークの保持時間 (tR) はそれぞれ 11.1、14.8、16.7 min であり、これらの Mr はそれぞれ 251、223、223 であると推定できた。この結果から、Tyr (Mr 181) よりも  $m/z$  42 u 質量が多かったことから、Mr 223 の化合物は acetyl-Tyr (Tyr+42) と推定した。なお、SRM モードで 3 種のピークのプロダクトイオンを検出する際には、分子の選択とフラグメント化のステップが加わり、検出のタイミングが遅れるため、tR 11.1、14.8、16.7 min はそれぞれ 11.2、15.2、16.8 min となった。(Table 2-2, 2-3)

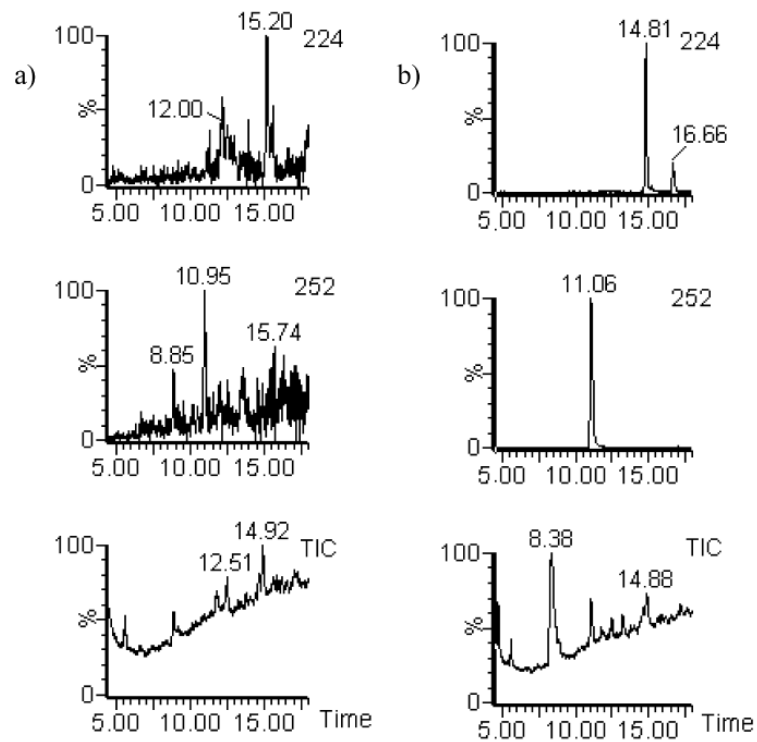


Fig. 2-2 Mass Chromatogram of the CSE Solutions before (a) and after (b) Reaction with the Tyr Solution for 24 h at 37°C. LC condition, a binary mobile phase consisting of 0.05% HCOOH (solvent A) and CH<sub>3</sub>OH (solvent B) was used in the following program: 2 min, 5% B; 12-15 min, 40% B; 16 min 5% B.

さらに、N-acetyl-Tyr および O-acetyl-Tyr はそれぞれの合成標準品を用いて、これらの tR および LC-MS クロマトグラムのプロダクトイオンスペクトルのパターンに基づいて同定した (Table 2-2)。その結果、tR 15.2 min の化合物は O-acetyl-Tyr、tR 16.8 min の化合物は N-acetyl-Tyr として同定した (Figs. 2-3a, b)。

Table 2-2 Comparison of Retention Time tR and SRM Analyte Peak Area Ratio between Tyr Derivatives (m/z 224, tR 15.2 and 16.8 min) Produced by CSE and the Respective Authentic O-Acetyl-Tyr and N-Acetyl-Tyr

Compound	tR (min)	Peak area ratio of SRM chromatogram	
		222>180/224>178	222>205/224>178
Mr 223 (Tyr+42)	15.2	0.0060	0.0023
O-Acetyl-Tyr	15.2	0.0061	0.0025
		224>178/224>182	222>180/224>182
Mr 223 (Tyr+42)	16.8	1.431	0.095
N-Acetyl-Tyr	16.8	1.485	0.093

HPLC conditions: flow rate, 0.4 mL/min; column oven temperature, 27°C; linear gradient analysis system. Mass transition pattern: negative ion mode, m/z 222>180, 222>205; positive ion mode, m/z 224>178, 224>182.

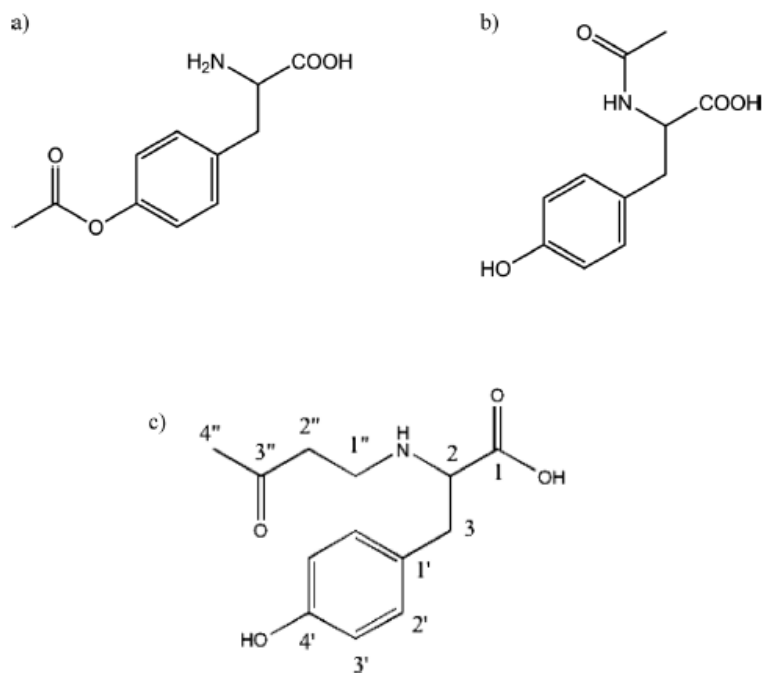


Fig. 2-3 Structures of (a)O-Acetyl Tyrosine, (b)N-Acetyl Tyrosine, and (c)N-(3-Oxobutyl)-tyrosine [3-(4'-Hydroxyphenyl)-2-(3''-oxobutylamino)propanoic Acid]

その後、高分解能質量分析計を用いて Mr 251 (Tyr+70)の原子組成を検討した。その結果、測定精密質量は  $252.1233 \pm 0.00048$  であった。測定精密質量と  $C_{13}H_{18}NO_4$  の計算精密質量との差は  $-0.00017$  u かつ、mass error が 0.67 ppm であったことから、Tyr+70 の化合物の分子式は  $C_{13}H_{18}NO_4$  であることが判明した。

### 2-3-2 Tyr と CSE の反応生成物における反応時間の影響

本章の検討により、CSE と Tyr の反応生成物 3 種を得たが、CSE 中の活性成分と Tyr との反応性は不明であることから、CSE と Tyr の反応時間が 3 つの Tyr 誘導体 N-acetyl-Tyr、O-acetyl-Tyr および Tyr+70 の収率に与える影響を検討した。LC-MS および SRM 法を用いて、それぞれのプロダクトイオンの質量変化パターンをマススペクトルで確認した (Table 2-3)。



Table 2-3 Mass Transition Patterns of Three Tyr Derivatives Obtained by Reaction of Tyr with CSE

tR (min)	Estimated Mr	Mass transition pattern from [M+H] <sup>+</sup> and [M-H] <sup>-</sup>
11.2	N-(3-Oxobutyl)-Tyr	m/z 252>194, 148
	251	m/z 250>180
15.2	O-Acetyl-Tyr	m/z 224>178, 180
	223	m/z 222>205
16.8	N-Acetyl-Tyr	m/z 224>182, 178
	223	m/z 222>180

HPLC conditions: flow rate, 0.4 mL/min; column oven temperature, 27°C; linear gradient analysis system.

CSE と Tyr の反応時間は 0.017 (1 分)、1、3、6、12 および 24 時間として、それぞれの化合物の SRM クロマトグラムのピーク面積を測定した。それぞれの化合物の収率を 24 時間後の収量に対する割合で評価した。その結果、O-acetyl-Tyr (tR 15.2 min、Mr 223) のピーク面積は 1 分後に最大となり、24 時間後まで同じレベルで経過した。O-acetyl-Tyr の生成速度は 3 つの化合物の中で最も早く、N-acetyl-Tyr (tR 16.8 min、Mr 223) の生成が次に早かった。N-acetyl-Tyr の収率は 24 時間後に対して 1 時間後に 50% となった。一方、Tyr+70 (tR 11.2 min、Mr 251) の生成は最も遅く、その収率は 24 時間後に対して 3 時間後に 50% であった。これらの化合物のピークは CSE そのものからは検出されなかった。

### 2-3-3 CSE 中の活性成分の GC/MS 分析

Tyr+42 および Tyr+ 70 を生成させる CSE 中の活性成分を同定するために、GC-MS を用いた。

Tyr+42 について検討した結果、CSE に含まれていた酢酸は Tyr と全く反応しないことが判明したが、無水酢酸は PBS 溶液中で CSE と容易に反応し、N-acetyl-Tyr および O-acetyl-Tyr が生成した。このことから、無水酢酸がフレッシュな CSE に含まれており、それが時間経過とともに徐々に酢酸へと加水分解されていることが示唆された。この結果に従って、市販の酢酸および無水酢酸の標品を用いて、GC-MS 分析結果を比較した。両者の TIC クロマトグラムにおいてピークを tR 23 min に検出し、マススペクトルにおいても同じ m/z 43 のピークを検出した。(Fig. 2-4) これらの結果より、無水酢酸は GC のカラムを通過する途中で容易に酢酸へと加水分解されることが推察された。

次に、CSE 中の Try+70 を生成させる CSE 中の活性成分の同定を試みた。2つの化合物を m/z 70 のマスクロマトグラムにおいて tR 6.3 min および 9.5 min に検出した。(Fig. 2-5) これらのマススペクトルのライブラリーサーチの結果、tR 9.5 min のピークは CA 由来であり、tR 6.3 min のピークは MVK 由来であることが判明した。(Fig. 2-6) これらの tR は市販の標品と同時間であった。SIM モードにおいてこれらを定量したところ、CSE 中の CA および MVK の濃度はそれぞれ  $520 \pm 66 \mu\text{M}$  および  $550 \pm 58 \mu\text{M}$  (mean $\pm$ SE, n=3) であった。

さらに、CSE に含まれていることが報告されている ACR (Mr 56) の定量を試みた。m/z 56 は tR 4.1 min でピークが検出され、この tR は市販の標品と同時間であった。SIM モードにおいてこれを定量したところ、 $540 \pm 49 \mu\text{M}$  (mean $\pm$ SE, n=3) であった。

したがって、無水酢酸は容易に加水分解されることから、CSE の抗転移作用および浸潤、遊走抑制作用を担う活性成分としては MVK、CA および ACR が有望であると考えられた。

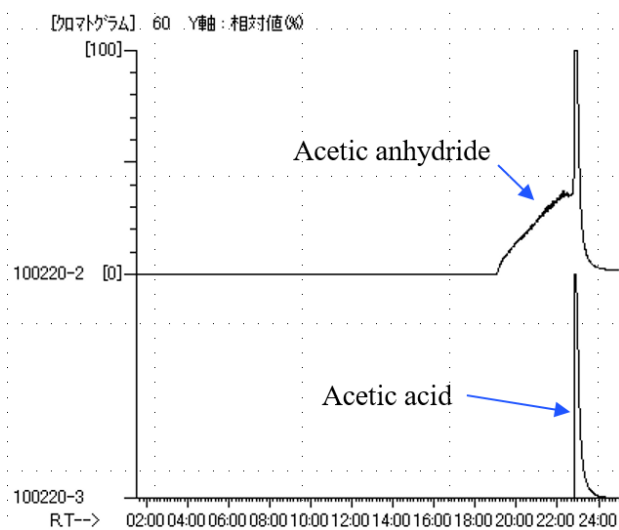


Fig. 2-4 Mass chromatograms of  $m/z$  60 in mass spectra of authentic preparations, acetic acid and acetic anhydride.

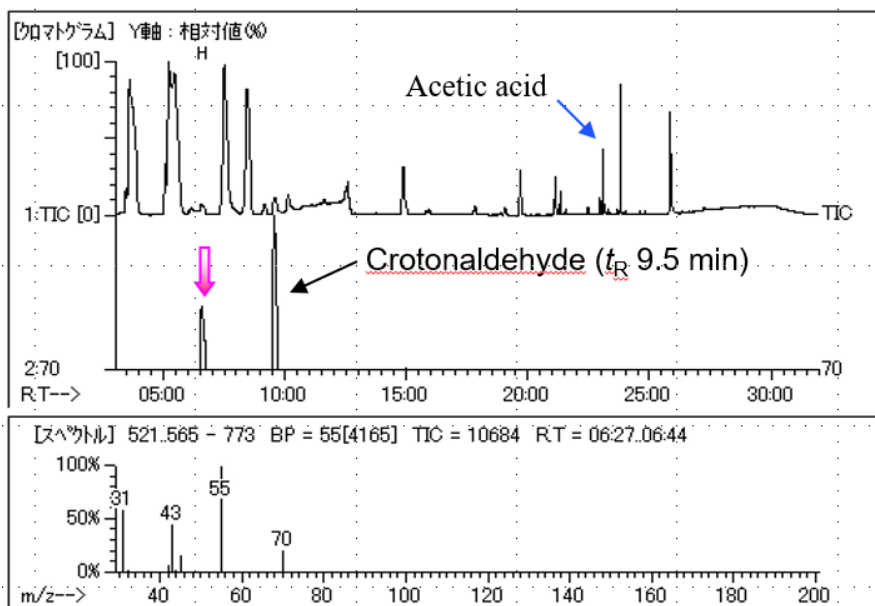


Fig. 2-5 Mass chromatograms of fresh CSE/PBS and mass spectrum of the peak at  $t_R$  6.3 min.

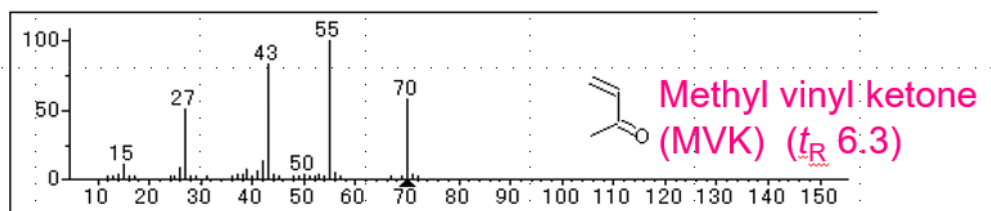


Fig. 2-6 The result of library search of the peak at  $t_R$  6.3 min.

#### 2-3-4 化合物 Tyr+70 の同定

Tyr+70 の構造を明らかにするために、本章で CSE に含まれていることを明らかにした CA および MVK を Tyr と 37°C で反応させた。Tyr+70 のピークは MVK と Tyr の反応液の SRM スペクトルにおいて検出されたが、CA の反応液においてはほとんど検出されなかった。この結果、MVK が Tyr と反応して Tyr+70 を生成させていることが示唆された。また、MVK と Tyr の反応によって合成された Tyr+70 の分析結果は CSE と Tyr の反応によって得られた Tyr+70 の分析結果と一致していた。(Fig. 2-7) さらに、<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and 2D-(HMQC, HMBC) NMR スペクトルを解析した。

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) の結果、 $\delta$ : 2.17 (3H, s), 2.91 (2H, dd, J=6.4 Hz), 3.19 (2H, d, J=6.4 Hz), 3.26 (2H, d, J=6.4 Hz), 4.18 (H, dd, J=6.4 Hz), 6.77 (2H, d, J=8.7 Hz), 7.11 (2H, d, J=8.7 Hz)であった。

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) の結果、 $\delta$ : 29.6, 35.9, 39.6, 43.1, 63.0, 116.9, 125.6, 131.6, 158.5, 170.9, and 207.6 であった。

HR-FAB-MS の結果、m/z ([M+ H]<sup>+</sup>)は測定値として 252.1238 が得られ、Tyr+70 の分子式は計算精密質量 252.1235 である C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub> と同定した。

これらの結果より、生成物は 1 級アミンとカルボニル化合物のシッフ塩基反応を介するものではなくマイケル付加反応によって得られる N-(3-oxobutyl)-Tyr であることが示唆された。近年、同様の報告がされており、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である MVK と ACR が不飽和結合を介してタンパク質のリジン残基と反応してマイケル付加体を生成させることが明らかになっており、この反応はシッフ塩基付加より効率的である。<sup>[48]</sup> したがって、Tyr+70 は N-(3-oxobutyl)-Tyr [3-(4'-hydroxyphenyl)-2-(3"-oxobutylamino)propanoic acid] (Fig. 2-3c) であり、この化合物は反応液の中で新たに生成したものであることが明らかになった。

一方、CSE 中の CA と ACR はヒト血清アルブミンのリジン、システインおよびヒスチジ

ン残基にカルボニル付加を生じさせることが蛍光検出により示されている。<sup>[47]</sup> 今後の検討としては、CSE が上述のアミノ酸と反応しカルボニル付加体を生じさせるか否かについての評価も必要である。

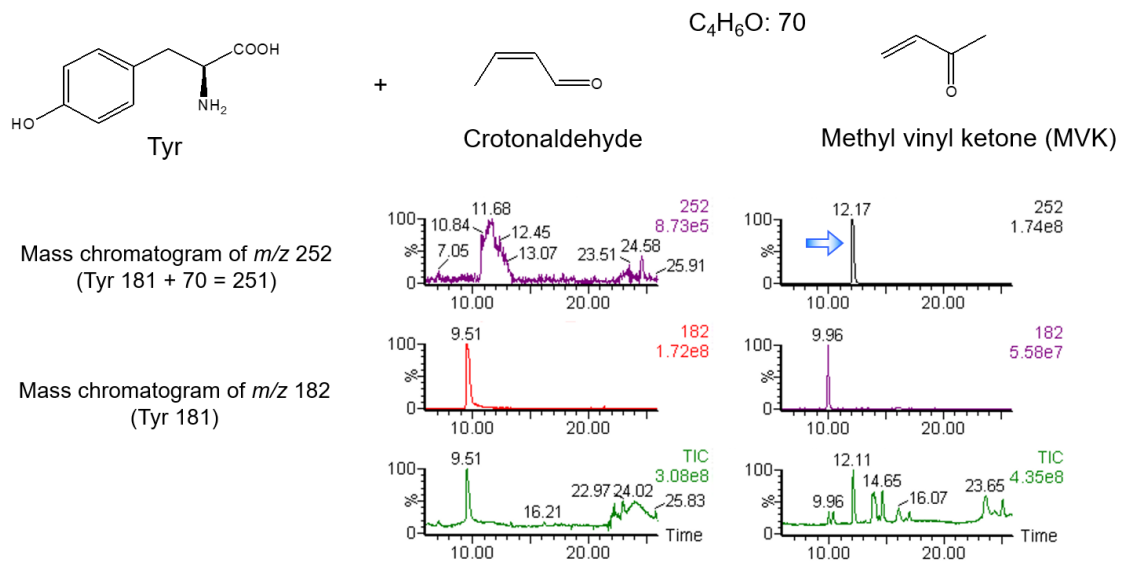


Fig. 2-7 Mass chromatogram of Tyr before (lower panels, m/z 182 and TIC) and after (upper panels, m/z 252) reaction with crotonaldehyde (left side) or methyl vinyl ketone (right side). A binary mobile phase consisting of 0.05% HCOOH (solvent A) and CH<sub>3</sub>OH (solvent B) was used in the following program: 2 min, 5% B; 12-15 min, 40% B; 18-23 min 95% B; 24 min 5% B.

### 2-3-5 MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の増殖抑制活性

MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の浸潤抑制活性を検討する際に、浸潤特異的な作用濃度で実験を行うために、増殖抑制を示さない処置濃度を決定する必要がある。CSE を用いた実験と同様に、MVK、CA および ACR のそれぞれを 0、10、30、100  $\mu\text{M}$  にて 3 時間前処置し、その後の B16-BL6 細胞の増殖曲線に及ぼす影響を検討した。

その結果、MVK は 30  $\mu\text{M}$  以上で顕著な B16-BL6 細胞の増殖抑制を示し (Fig. 2-8A)、CA および ACR は 100  $\mu\text{M}$  でのみ顕著な増殖抑制活性を示した (Fig. 2-8B、2-8C)。

2-3-3 の結果より、CSE 中の MVK、CA および ACR の濃度はそれぞれ約 550、520、540  $\mu\text{M}$  であり、CSE1%あたりでは、いずれも約 5  $\mu\text{M}$  であった。

したがって、浸潤アッセイにおいて、MVK は 10  $\mu\text{M}$  以下、CA および ACR は 30  $\mu\text{M}$  以下の濃度で 3 時間前処置する条件が適切であると判断した。

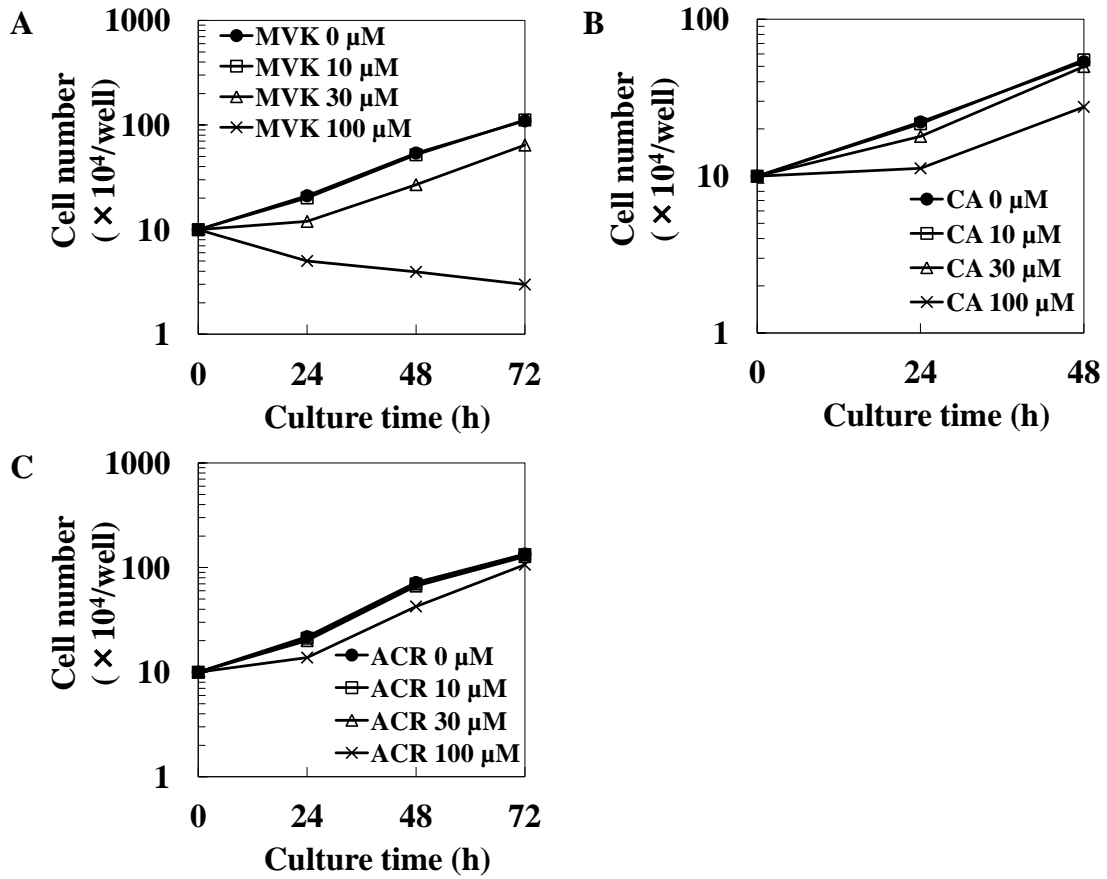


Fig. 2-8 Effect of MVK (A), CA (B), and ACR (C) on growth curves for B16-BL6 melanoma cells. Sub-confluent cells were pretreated with each reagent for 3 hours at 37°C. At time 0,  $1 \times 10^5$  cells in 2 mL of medium per well obtained as a monodisperse suspension by trypsinization were seeded into a 12-well culture plate. At the times indicated, triplicate cultures were trypsinized and viable cells in samples were enumerated using a Coulter counter.

### 2-3-6 MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の浸潤抑制活性

MVK、CA および ACR による B16-BL6 細胞の増殖抑制活性の検討結果に基づいて、B16-BL6 細胞に MVK 0、1、3、10  $\mu\text{M}$ 、CA 0、3、10、30  $\mu\text{M}$  および ACR 0、3、10、30  $\mu\text{M}$  をそれぞれ 3 時間前処置し、その後 24 時間での B16-BL6 細胞の浸潤能を検討した。

その結果、MVK は 3  $\mu\text{M}$  および 10  $\mu\text{M}$  において浸潤を抑制する傾向は見られたものの、有意差は認められなかった (Fig. 2-9A)。一方、CA は 10  $\mu\text{M}$  以上で濃度依存的に B16-BL6 細胞の浸潤を抑制し、10  $\mu\text{M}$  では有意ではないものの 33.7%の減少、30  $\mu\text{M}$  では有意な 45.3%の減少を示した (Fig. 2-9B)。ACR は B16-BL6 細胞の浸潤能を 30  $\mu\text{M}$  でのみ有意に 34.7%抑制した (Fig. 2-9C)。

したがって、MVK、CA および ACR が CSE による B16-BL6 細胞の浸潤抑制作用の少なくとも一部を担う可能性が示唆された。



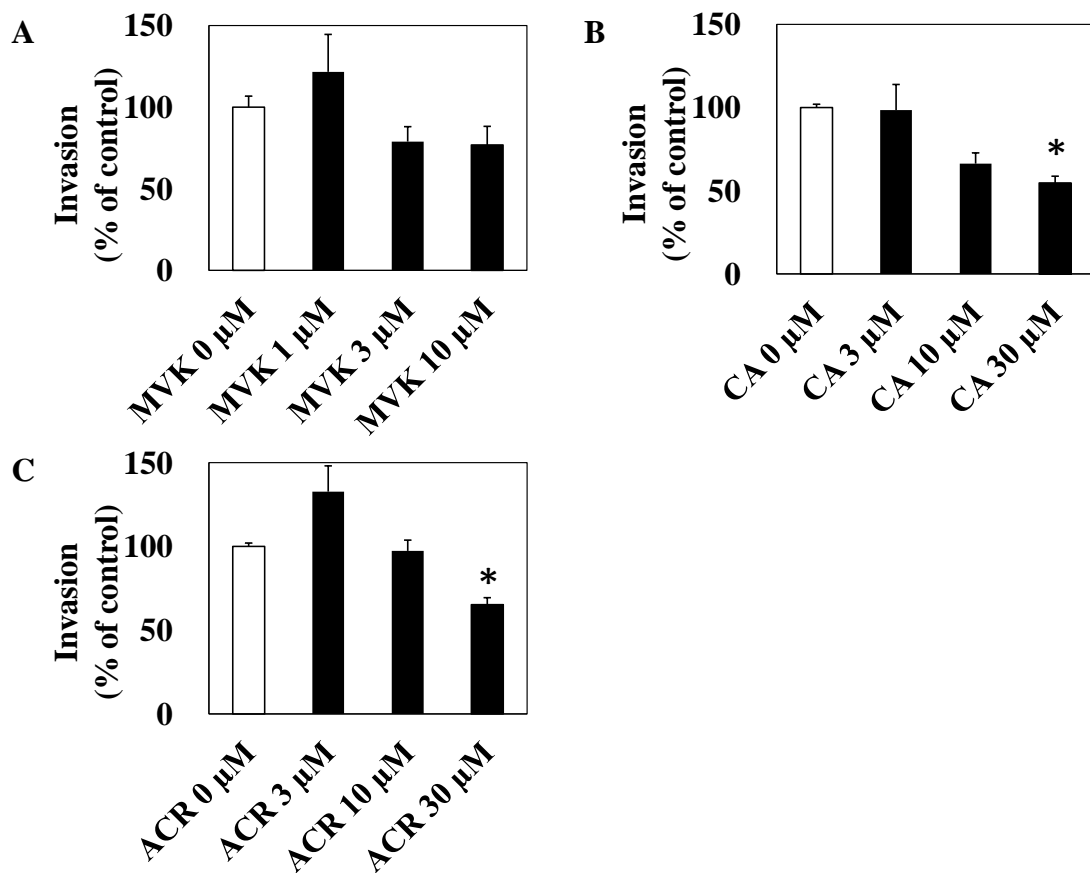


Fig. 2-9 Effect of MVK (A), CA (B), and ACR (C) on B16-BL6 melanoma cell invasion. Sub-confluent cells were pretreated with each reagent for 3 hours at 37°C. Cells ( $2 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ ) obtained as a monodisperse suspension by trypsinization were seeded into the upper compartment of matrigel coated-Transwell chambers. Lower chambers contained serum-free medium with 20  $\mu\text{g/mL}$  fibronectin as a chemoattractant. After incubation for 24 hours, invading cells on the lower surface were stained with crystal violet, and cell lysates were measured at 550 nm. Data are expressed as the mean $\pm$ SE of 6 samples. \* $P < 0.05$  vs. control.

#### 第4節 小括

本章では、CSE が 37°C において Tyr と容易に反応し N-acetyl-Tyr、O-acetyl-Tyr、および N-(3-oxobutyl)-Tyr を生成させることを示した。これらの反応生成物を生じさせる CSE の活性成分として MVK や無水酢酸が含まれていることを明らかにした。注目すべきは CSE 中の MVK と Tyr の反応によってマイケル付加体が生成されることである。無水酢酸は容易に加水分解を受けることから、MVK を始めとする CSE 中のアルデヒドやケトンが有望であると考えられた。

MVK は B16-BL6 細胞の浸潤を抑制する傾向があり、CA および ACR は B16-BL6 細胞の浸潤を抑制することを示した。MVK、CA および ACR の定量結果より、複合的に B16-BL6 細胞の浸潤を抑制しうる濃度で CSE に含まれていた。したがって、MVK、CA および ACR は CSE による浸潤抑制作用の少なくとも一部を担う活性成分である可能性が示唆された。

### 第 3 章 タバコ煙水抽出液中に存在するメチルビニルケトンによるマウスメラノーマ細胞内のグルタチオン修飾作用

#### 第 1 節 はじめに

第 1 章では、CSE が B16-BL6 細胞の転移抑制作用、浸潤および遊走抑制作用を有することを明らかにした。第 2 章では、Tyr を用いた検討により、CSE 中に無水酢酸や MVK が含まれていることを明らかにした。無水酢酸が加水分解を受けやすいことから、MVK を初めとする CSE 中のアルデヒドやケトンに注目し、CSE による B16-BL6 細胞の浸潤抑制を少なくとも一部 MVK、CA、ACR が担うことを明らかにした。

喫煙は冠動脈疾患や癌および慢性閉塞性肺疾患の発生率の増加に関与する主要な因子として知られている。<sup>[49]</sup> とりわけ、タバコ煙のガス相の主要な成分であるオキシダントやアルデヒドは喫煙関連疾患の病因として関与している酸化ストレスを仲介すると考えられている。<sup>[50-52]</sup> 反応性の高い  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である ACR や CA はタバコ煙のガス相に豊富に含まれており、タバコ煙誘導性のマクロファージ活性化の主な介在物質である。<sup>[53]</sup> また、これらの化合物は酸化ストレス誘導性の炎症や血管障害に寄与すると考えられている。<sup>[54]</sup> さらに、ACR や CA はマイケル付加反応を介して、グルタチオン(GSH) のチオール基と直接反応することが報告されており、<sup>[55]</sup> 非還元性の GSH アルデヒド誘導体を生成させる。それ故に、利用可能なすべての GSH 貯蔵を枯渇させる。<sup>[56,57]</sup> GSH は細胞の酸化障害に対する抗酸化防御において重要な役割を果たしているため、GSH の枯渇はタバコ煙誘導性の細胞毒性を引き起こす。<sup>[58,59]</sup> 同様に、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である MVK は求核性のマイケル付加でフリー体の GSH と反応することが示されている。<sup>[60]</sup> MVK 誘導性のアポトーシスには GSH の枯渇、ミトコンドリアの膜電位の障害、活性酸素種の発生増加が関与することが報告されている。<sup>[61]</sup>

一方、健常者や乳癌患者と比較して、転移のある乳癌患者において血清 GSH が上昇することや脳転移部位において、健常脳組織と比較して GSH ペルオキシダーゼおよび GSH レ

ダクターゼの活性が高まっていることが報告されており、<sup>[62,63]</sup> 転移性の癌細胞では GSH の酸化還元サイクルが亢進している可能性が考えられる。さらに、高転移性のメラノーマ細胞株である B16-F10 は低転移性のメラノーマ細胞株 B16-F1 と比較して GSH 含量が有意に高く、経脾肝転移モデルでは、GSH 合成阻害薬である L-buthionine (S,R)-sulphoximine で GSH 含量を低下させた B16-F10 の転移が減少したことが報告されている。<sup>[64]</sup>

これらの報告をまとめると、細胞内では CSE 中のアルデヒドやケトンが GSH と反応する可能性が高く、CSE による B16-BL6 細胞の転移抑制や浸潤抑制にも GSH の減少が関与している可能性が考えられる。

第 3 章では、CSE の転移抑制機序を解明する一端として、CSE の浸潤および抑制作用を担うアルデヒドやケトンが細胞内で直接生成させる物質を明らかにするために、CSE 中の成分による細胞内の成分の修飾を LC-MS および LC-MS/MS で検討した。加えて、将来的に、B16-BL6 細胞担癌マウスに対する CSE 投与の効果を検討する際に、CSE が癌細胞の浸潤のみを抑制するのか、もしくは抗癌作用も有するのかを明らかにしておく必要があることから、CSE の継続的な処置が B16-BL6 細胞の生存に及ぼす影響および細胞内 GSH の関与を検討した。

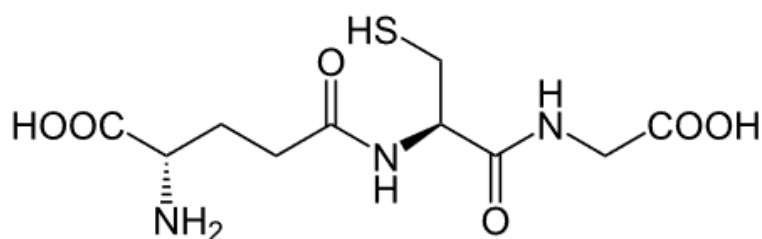


Fig. 3-1 Structure of Glutathione

## 第2節 実験方法

### 3-2-1 供試化合物等

実験用タバコとして、市販品のキャストーフロンティアワンを Japan Tobacco Inc. (Tokyo, Japan)から調達した。Cambridge filter は Hiener Borgwaldt KC (Hamburg, Germany)から調達した。CA および MVK は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)から購入した。N-acetyl cysteine (NAC)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)製であった。FBS は BioWest Co. (Nuaille, Regular Article France)製であった。EDTA trypsin solution (EDTA: 2.2 mM, trypsin: 0.25%)は Mediatech, Inc. (Manassas, VA, U.S.A.)製であった。Penicillin/streptomycin solution (penicillin: 50000 U/mL, streptomycin: 50 mg/mL)は Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製であった。DMEM with L-glutamine は Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, U.S.A.)製であった。PBS (-)は Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製であった。LC-MS グレードの水およびメタノールは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。LC-MS グレードのギ酸および ODS カラムとして、Cosmosil 5C18-AR-II 4.6 mm×150 mm を Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)から調達した。

### 3-2-2 CSE の調製

1-2-4 と同様にして、タバコ煙ガス相成分抽出液として、既報を参考にして CSE を調製した。<sup>[12,13,46]</sup>

### 3-2-3 細胞培養、処置および細胞増殖実験

1-2-3 と同様にして、B16-BL6 細胞を培養し、実験に用いた。定法に従って回収した細胞を 10%FBS 含有 DMEM に再懸濁し、 $1 \times 10^5$  個/2 mL/well に調整し、12 well プレートに播種した。その後、B16-BL6 細胞は CSE (0.03, 0.1, 0.3, 1%)、CA (3, 10, 30, 100  $\mu$ M) もしくは MVK (3, 10, 30, 100  $\mu$ M) で 24 時間処置した。NAC は、必要に応じて、CSE もしくは MVK を処置する直前に加えた。1-2-8 と同様にして、生存細胞数を計測し、細胞増殖曲線を作成した。生存率は処置有りでの細胞数と処置無しでの細胞数を比較して算出し、% 表記で示した。

### 3-2-4 CSE 処置した B16-BL6 細胞の細胞溶解サンプルの調製

B16-BL6 cells ( $5 \times 10^6$  個) を 1% CSE で 30 分間 37°C 処置した。定法に従って細胞を回収し、PBS(-) 1 mL に懸濁した。分析用サンプルは既報を参考にして調製した。

簡潔にまとめると、細胞を PBS (-) 1 mL で懸濁し、その後 200 $\times$ g で 5 分間遠心分離することにより洗浄した。<sup>[65]</sup> 同様にして細胞を 3 回洗浄した。次に細胞塊を回収し、70%メタノール 50  $\mu$ L で溶解した。<sup>[66]</sup> 細胞溶解物を 4°C、17,400 $\times$ g で 5 分間遠心分離することにより、上清を回収した。LC-MS および LC-MS/MS を用いて、得られた上清を分析した。

### 3-2-5 In Vitro における CSE もしくはその活性成分である CA と MVK に対する GSH の反応

細胞内 GSH と CSE の反応における主生成物を明らかにするために、2 mM GSH PBS (-) 溶液と 2% CSE、20  $\mu$ M CA もしくは 20  $\mu$ M MVK 溶液を同容積で混合した。37°C で 30 分間放置した後、LC/MS および LC-MS/MS を用いて反応溶液中の GSH 付加体の化学構造を分析・同定した。

### 3-2-6 Triple-Quadrupole Mass Spectrometer および HPLC の条件

Quattro Premier triple-quadrupole LC/MS (Micromass, Manchester, U.K.) および electrospray ionization (ESI) source を Alliance HT2795 Separations Module (Waters Co., Milford, MA, U.S.A.) に接続し、陽イオンおよび陰イオンモード Q1 scan と MS/MS 分析に用いた。質量分析計の条件を source temperature: 120°C、desolvation temperature: 350°C、flow rate of cone nitrogen: 100 L/h、flow rate of desolvation nitrogen: 1000 L/h、capillary voltage: 3.0 kV、cone voltage: 20 V に最適化した。SRM モードにおけるフラグメント化に用いる argon collision gas flow rate は 0.3 mL/min ( $3.37\text{--}3.39\times 10^{-3}$  mbar) に固定し、GSH のフラグメントイオンに対して最適化された collisional energy は 5–25 eV であった。LC 条件として、column: Cosmosil 5C18-AR-II column (4.6 mm×150 mm)、mobile phase A: 0.05% formic acid および mobile phase B: methanol を用いて、flow rate: 0.3 mL/min、column oven temperature: 27°C に設定した。主な分析は以下のリニアグラジエント条件で行った。初期は移動相 B を 1% として、開始後 2 分まで維持した後、開始後 12 分までに 40% まで上昇させた。移動相 B を 40% で開始後 15 分までの 3 分間維持し、開始後 18 分までに 95% に上昇させた。移動相 B を 95% で開始後 21 分まで 3 分間維持した後、最終的に開始 22 分までに 1% に低下させ、2 分間維持した。サンプル注入量は 5  $\mu$ L に設定した。

### 3-2-7 統計解析

結果は mean  $\pm$  SE で表記した。統計解析には Graphpad Prism 4 software package (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、Dunnett test もしくは Tukey test を実施した。*p* 値が 0.05 未満の場合に統計学的有意差を認めた。

### 第3節 結果および考察

#### 3-3-1 細胞生存率における CSE、CA、MVK の影響の比較

B16-BL6 細胞は黒色で転移を確認しやすく、高転移性であり、<sup>[67]</sup> 再現性の高い転移実験を行うことができる。CSE の細胞毒性作用は様々な細胞で報告されていることから、<sup>[40,68]</sup> 将来的に、担癌マウスに対する CSE やその有効成分の投与効果を検討するにあたり、CSE が癌細胞の浸潤のみを抑制するのか、もしくは抗癌作用も有するのかを明らかにする必要があり、CSE や CA、MVK の継続的な処置が B16-BL6 細胞の生存に及ぼす影響を検討した。

その結果、CSE は B16-BL6 細胞の生存率を用量依存的に減少させることを明らかにした。(Fig. 3-2a) CSE1%処置 24 時間後の生存率は有意に約 45.3%に低下していた。CSE の有効成分を明らかにするために、CSE に含まれている  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である CA、MVK が細胞生存率に及ぼす影響を検討した。30  $\mu\text{M}$  の濃度において、CA および MVK は細胞生存率をそれぞれ 54.2%および 8.4%に減少させた。(Fig. 3-2b) それゆえに、MVK は CA よりも強力な細胞毒性作用を有すると考えられた。さらに、ACR や CA などの  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドやケトンチオールはチオールアルキル化剤であることから、<sup>[32]</sup> GSH の前駆体である NAC を処置したところ、CSE および MVK の細胞毒性は NAC によって有意に阻害された。(Fig. 3-3a, b)

したがって、NAC が直接もしくは細胞内 GSH に変換された後に、CSE や MVK による GSH の消費を抑制する可能性が示唆された。



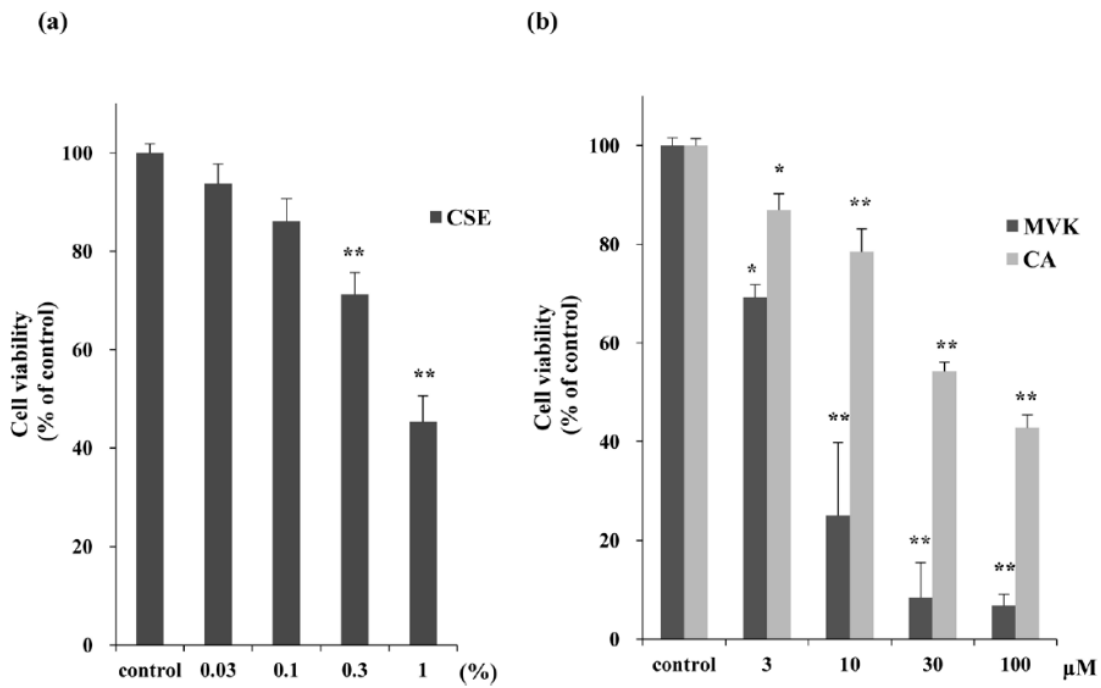
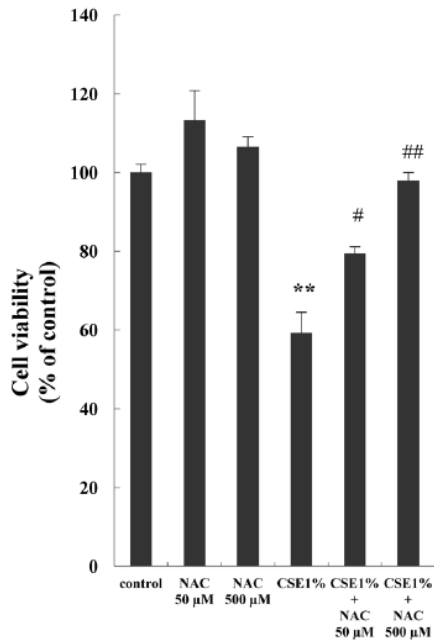


Fig. 3-2 Viability of B16-BL6 mouse melanoma cells exposed to (a) Cigarette smoke extract (CSE), (b) Methyl vinyl ketone (MVK) or Crotonaldehyde (CA) for 24 h. Values are expressed as means±S.E. (n=4–6). \* p<0.05, \*\* p<0.01, statistical difference compared with the corresponding untreated control.

(a)



(b)

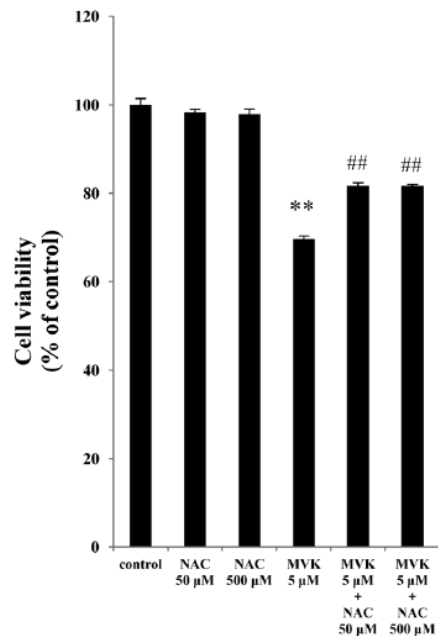


Fig. 3-3 Effect of N-acetyl cysteine (NAC) on B16-BL6 mouse melanoma (B16-BL6) cell viability inhibited by (a) CSE or (b) MVK for 24 h. Values are expressed as means±S.E. (n=4–6). \*\* p<0.01, statistical difference compared with the corresponding untreated control. # p<0.05, ## p<0.01, statistical difference compared with (a) CSE 1% or (b) MVK 5 μM.

### 3-3-2 CSE で処置したマウスメラノーマ細胞の LC-MS 分析

次に、CSE の浸潤および抑制作用を担うアルデヒドやケトンが細胞内で直接生成させる物質を明らかにするために、CSE 中の成分による細胞内の成分の修飾を LC-MS および LC-MS/MS で検討した。第 1 章の結果に基づいて、B16-BL6 細胞は生存率への影響がない濃度において CSE で処置した。つまり、細胞は CSE 1% で 30 min 処置し、その後、70%メタノール/PBS (-)を用いて、除タンパクおよび抽出処理した。高速遠心分離後、上清を直接 LC-MS のサンプルとした。質量分析条件として、陽イオンおよび陰イオンモードの m/z

52 から 720 の範囲の ESI Q1 スキャン、HPLC 条件として、グラジエントシステムを用いた。CSE 処置細胞サンプルを陽イオンモードで測定した結果、総イオンクロマトグラムにおいていくつかの新規ピークを検出した。(Fig. 3-4a)  $t_R$ 16.1 min で最も高い新規の鋭いピークのマススペクトルを Fig. 3-5 に示した。この新規ピークは  $m/z$  378 のプロトン化イオンに対応するものであった。一方、10.5-13.6 min のまとまったピークを処置の有無にかかわらず、Figs. 3-4a および 3-4b の TIC クロマトグラム上に認め、 $m/z$  308 のプロトン化イオンを基準ピークとして検出した。(Fig. 3-5b) 主要な抗酸化物質である GSH は細胞の中に約 5 mM といった高濃度で含まれていることが良く知られているので、 $m/z$  308 のピークはプロトン化 GSH イオンに対応するものであると考えられた。実際に、細胞サンプルから検出された  $m/z$  308 イオンが市販の GSH と同じプロダクトイオンスペクトルを示すことを確認した。(Fig. 3-6)

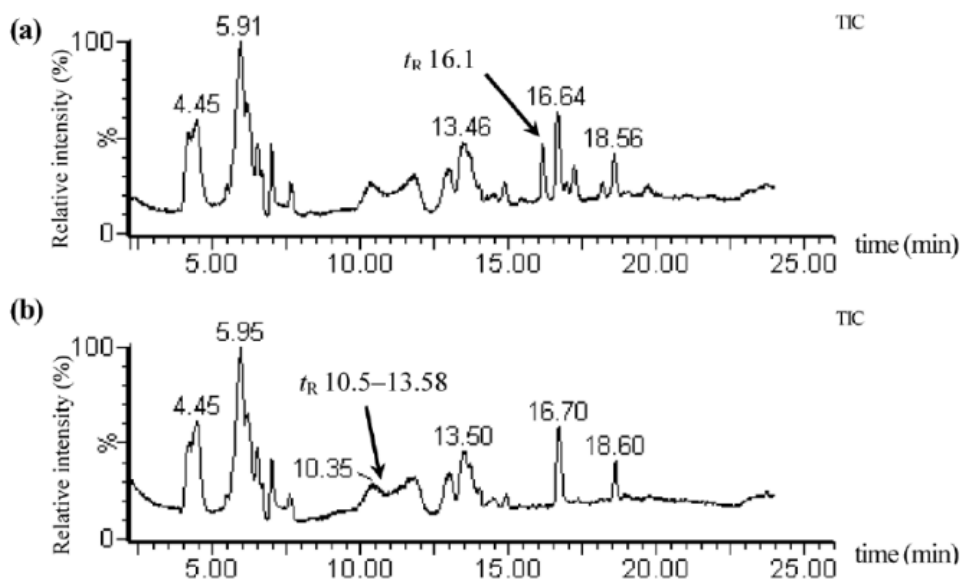


Fig. 3-4 Total ion current (TIC) chromatogram of the deproteinized sample obtained from (a) B16-BL16 Cells exposed to 1% CSE at 37°C for 30 min and (b) Unexposed control cells. Some new peaks appeared in the upper TIC chromatogram as exemplified by the peak of  $t_R$  16.1 min.

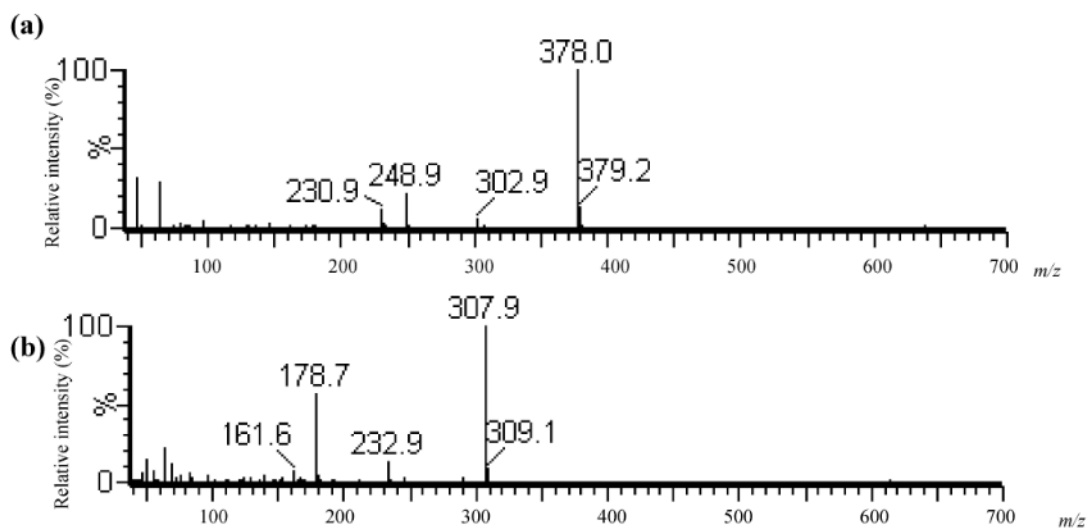


Fig. 3-5 Mass Spectra of the Peaks at (a)  $t_R$  16.1 min and (b)  $t_R$  10.5–13.6 min are shown in the TIC Chromatogram in Fig. 3-2. Mass spectral data indicate that the protonated ions of (a) and (b) were  $m/z$  378 and  $m/z$  308, respectively.

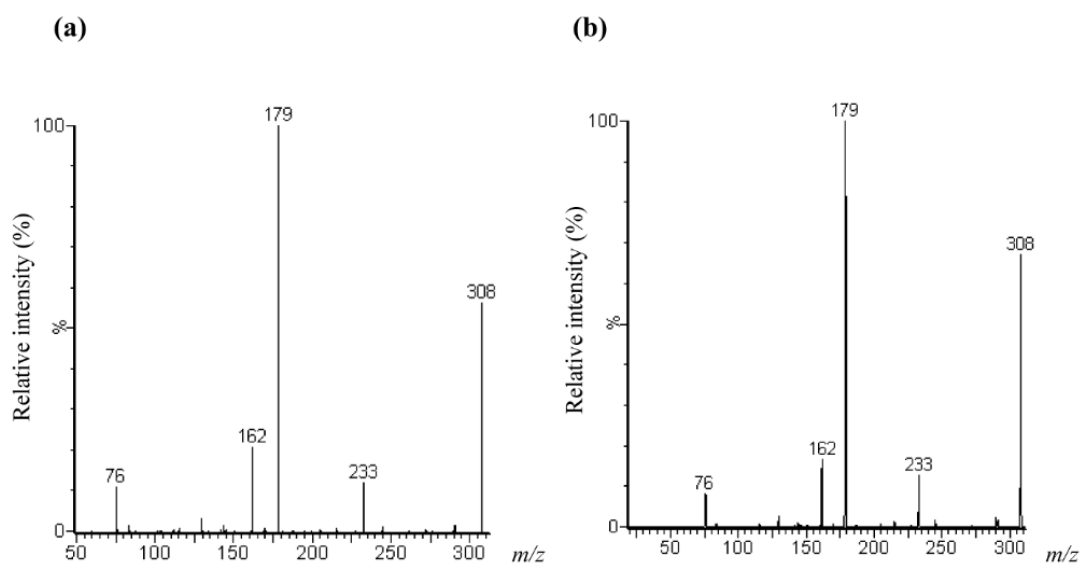


Fig. 3-6 Product ion spectra of (a) the ion at  $m/z$  308 detected in Fig. 3-3b (B16-BL16 Cells) and (b) the authentic GSH ( $[M+H]^+$   $m/z$  308). The two products' ion spectra show good similarity.

また、 $m/z$  378 から  $m/z$  308 を差し引くことによって、 $m/z$  70 は  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物である CA および MVK であると推定した。なぜなら、これらの化合物が CSE の中に大量に含まれているからである。第 2 章において、GC/MS の選択イオンモニタリングモードで測定した結果、CSE 100%溶液中の CA および MVK 濃度はそれぞれ約 520、550  $\mu\text{M}$  であり、他の研究者も同様の報告をしている。<sup>[53,69]</sup> Van der Toorn らは MS 分析の結果、タバコ煙のガス相を曝露させた気道上皮細胞において相当量の GSH が不可逆的に GSH-CA 誘導体に修飾されており、それによって利用可能な GSH 貯蔵が枯渇することを明らかにしている。<sup>[56]</sup> さらに、Reddy らはタバコ煙のガス蒸気相と GSH の反応において GSH-CA 付加体が主要な生成物であることを報告している。<sup>[70]</sup> NAC を前処置した実験結果 (Fig. 3-3) から、CSE の細胞毒性は GSH の消費によって引き起こされる可能性が示唆されており、上記の報告と一致している。しかしながら、細胞に対する CSE もしくはタバコ煙の曝露が GSH-MVK 付加体を生じさせるといった報告は見られない。

本検討では、1% CSE でたった 5 min 処置した B16-BL6 細胞のプロトン化 GSH イオンのピーク面積が溶媒処置コントロールの約 40% に減少した。(data not shown) それ故に、CSE 中の  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物と GSH が反応し、容易に GSH 付加体を生成させると考えられた。

Mishra らの臨床研究では、健常者と比較して、乳癌患者において血清 GSH が上昇し、転移のある患者ではさらに上昇することが明らかにされており、<sup>[62]</sup> Dudek らの研究では、脳転移部位において、健常脳組織と比較して GSH ペルオキシダーゼおよび GSH レダクターゼの活性が高まっていたことから、<sup>[63]</sup> 転移性の癌細胞では GSH の酸化還元サイクルが亢進している可能性が考えられた。基礎研究では、高転移性のメラノーマ細胞株である B16-F10 は低転移性のメラノーマ細胞株 B16-F1 と比較して GSH 含量が有意に高く、経脾肝転移モデルにおいて、GSH エステルで GSH 含量を増加させた B16-F1 の転移は亢進し、GSH 合成阻害薬である L-buthionine (S,R)-sulphoximine で GSH 含量を低下させた

B16-F10 の転移は減少した。<sup>[64]</sup> 同様に、Li らはグルタチオンレダクターゼの阻害によって実験的な肺転移、細胞遊走および浸潤が抑制されることを明らかにしており、<sup>[73]</sup> 酸化型のグルタチオンが増加し GSH が減ることにより癌転移、遊走、浸潤が抑制される可能性が考えられた。さらに、アクチンが癌細胞の運動性に重要な役割を果たすことに注目し、<sup>[74]</sup> グルタチオンレダクターゼの阻害に浸潤および遊走の抑制はグルタチオニル化を伴うアクチンのリモデリングにより起こっていると結論付けている。<sup>[73]</sup> 一方、Dalle-Donne らはアクチンのシステイン残基が  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドおよびケトンによって修飾されることを明らかにしている。<sup>[75]</sup>

第 1 章において、CSE による浸潤および遊走の抑制作用では遊走の抑制が優位だったことおよび本章の知見をまとめると、浸潤および遊走の抑制を介する CSE の癌転移抑制作用には GSH の減少が関与していると考えられる。また、CSE による B16-BL6 細胞の浸潤および遊走抑制作用には、運動性に重要なアクチンなどのタンパク質の修飾が関与している可能性が推察された。

### 3-3-3 GSH と MVK および GSH と CA の反応生成物の同定

MVK に関して、GSH の枯渇を介してニューロン細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。<sup>[61]</sup> 加えて、GSH は MVK と反応して不活性な GSH-MVK 付加体を形成する。<sup>[71]</sup> したがって、細胞で MVK および CA はいずれも GSH と付加体を形成する可能性は十分にあることから、B16-BL6 細胞に対する CSE 処置によって生ずる GSH-カルボニル付加体を同定するために GSH と CSE とを直接反応させることを試みた。

CSE 処置した細胞で検出された  $m/z$  378 のイオンが CA および MVK のいずれの GSH 付加体に由来するものであるかを明らかにするために、1 mM GSH をそれぞれ 10  $\mu$ M の CA および MVK と 37°C で 30 分反応させた。その結果、CA と MVK に対応する  $m/z$  378 のピークはそれぞれ tR 17.1 min と 16.1 min に見られた。(Fig. 3-7a, b) GSH を 1% CSE

と 37°C で 30 min 反応させたときには、 $m/z$  378 のピークは  $tR$  16.1 min に見られた。(Fig. 3-7d) これらの知見は  $m/z$  378 のピークが GSH-MVK 付加体に由来することを示している。さらに、LC-MS/MS 分析において、CSE 処置した細胞で検出した  $m/z$  378 のプロダクトイオンスペクトルは GSH-CA 付加体よりも GSH-MVK のスペクトルによく一致していた。(Fig. 3-8a, b, and c) したがって、これらの結果は CSE 処置した細胞において検出した  $m/z$  378 のプロトン化分子は大部分が GSH-MVK 由来であることを実証している。CSE 中の MVK が細胞内において、CA と比較して、より速やかに GSH と反応し、それによって主に GSH-MVK 付加体を生成させる。Yarbrough と Schultz は脂肪族  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニルがマイケル求核付加によって GSH と反応することや末端に位置するオレフィンである MVK などは、同族体の中で内部に位置するオレフィンである CA などよりも反応性が高く、毒性が高いことを報告しており、<sup>[72]</sup> 本章の結果とも一致する。

本章では、GSH-CA および GSH-ACR は検出されなかったが、その後の検討により、CA および ACR が結合した後、還元を受けたアルコールとして検出したことから、<sup>[76]</sup> CSE を処理した B16-BL6 細胞において、CA および ACR も GSH と結合することが確認された。

したがって、CSE による B16-BL6 細胞の GSH の減少において、少なくとも一部 MVK、CA および ACR が関与している可能性が示唆された。

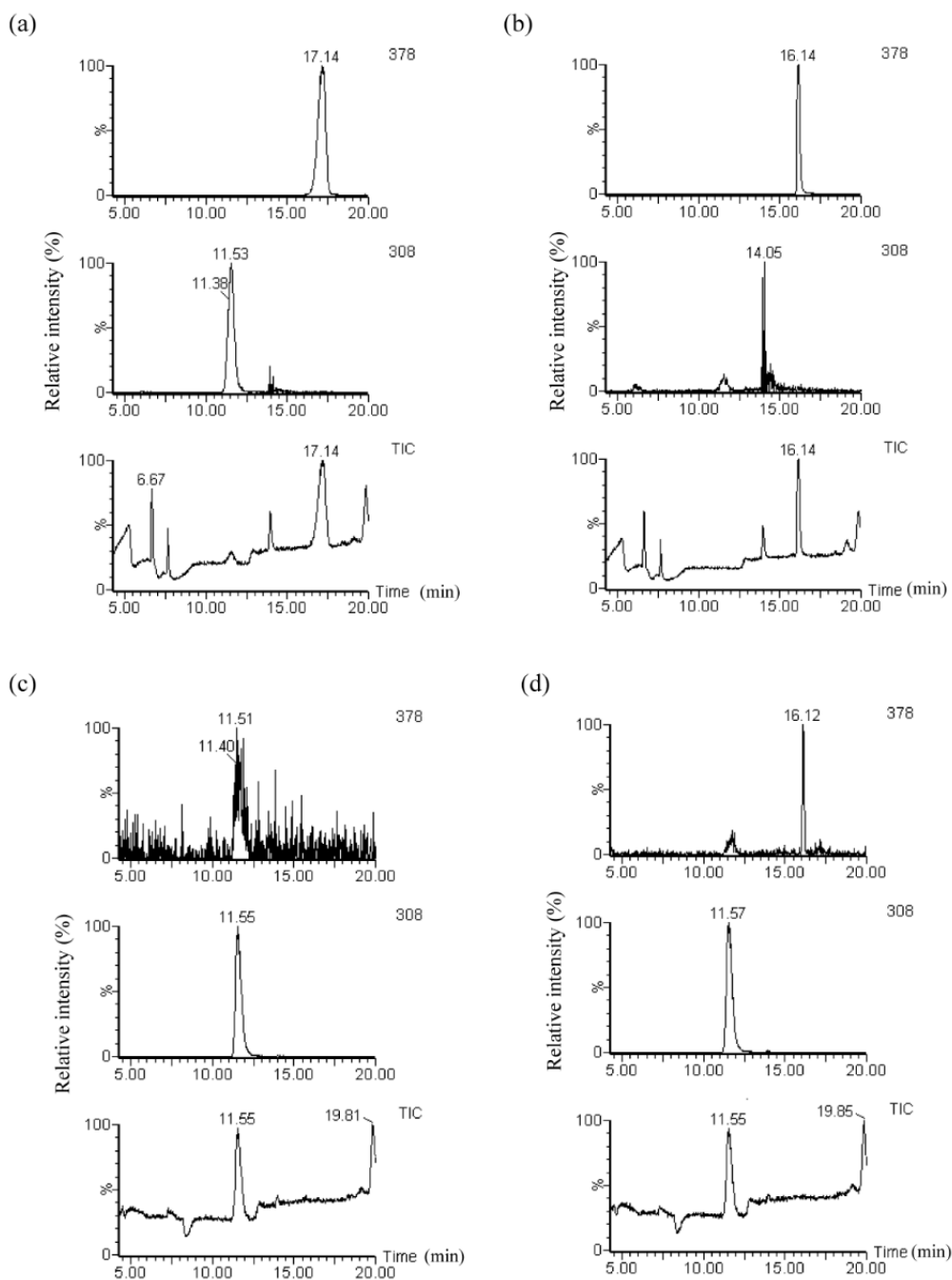


Fig. 3-7 Total ion current (TIC) chromatogram and extracted ion chromatograms of  $m/z$  308 and  $m/z$  378 obtained from reaction products of GSH with (a) CA, (b) MVK, (c) PBS (-) and (d) 1% CSE at 37°C for 30 min. Extracted ion chromatograms of  $m/z$  378 of (b) and (d) have the same retention time. This indicates that GSH is modified by MVK in CSE. The chromatograms of (c), GSH with PBS (-), are shown as controls.



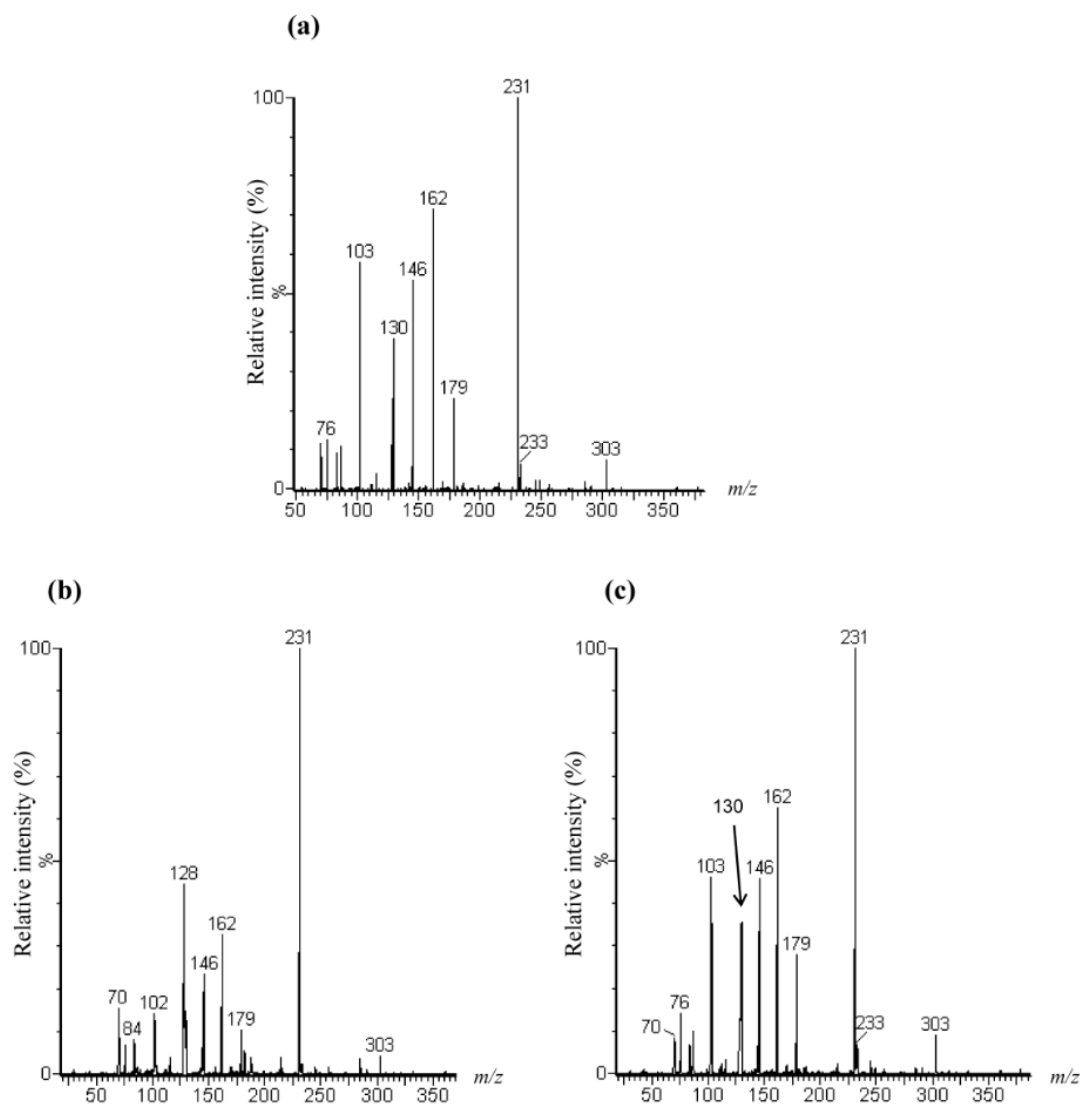


Fig. 3-8 Comparison with product ion spectra of the ion at  $m/z$  378 obtained from (a) the B16-BL16 cells exposed to 1% CSE (Fig. 3-3a) and those of the reaction products of GSH with (b) CA and (c) MVK. The product ion spectra of (a) and (c) have very similar fragmentation.

### 3-3-4 GSH-MVK の構造的評価

GSH および GSH-MVK 付加体のプロダクトイオンスペクトルを Fig. 3-9 に示した。

Collision energy を目的のプロダクトイオンに対して最適化した。プロダクトイオン分析の

ために、y1 のフラグメントイオンをプロダクトイオンスペクトルとして検出する条件として、10 eV に設定した。フラグメントイオンは通常、「b1」イオンおよび「y1」イオンのように命名する。電荷が N 末端断片に保持されている場合、イオンは a、b または c として分類される。電荷が C 末端に保持されている場合、イオンタイプは x、y または z である。添え字は、フラグメント中の残基の数を示す。m/z 179 の生成物イオンは GSH の y1 開裂に由来し、MVK-GSH 付加物の m/z 249 での生成物イオンは m/z 179 で 70 単位の生成物イオンの添加によって増加した。別の m/z 233 の生成物イオンは、GSH の b2 開裂に由来した。MVK-GSH 付加物の m/z 303 での生成物イオンは、GSH の m/z 233 で 70 単位の生成物イオンの添加によって増加した。MVK-GSH 付加物は、MVK と GSH の SH 基との 1,4 マイケル付加反応生成物であった (Fig. 3-9)。

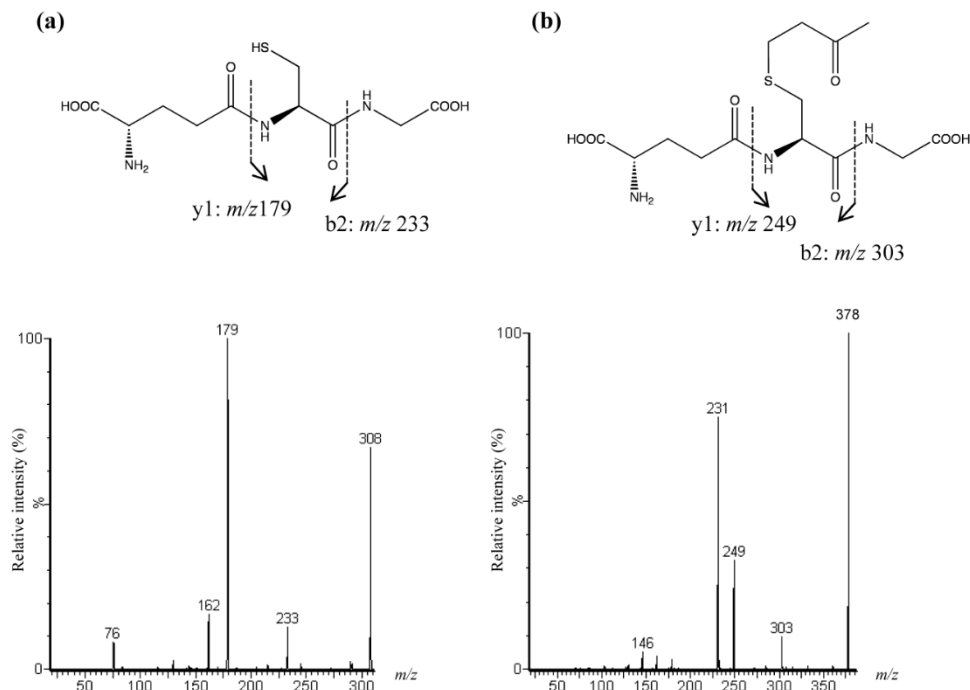


Fig. 3-9 Product ion spectra of (a) the authentic GSH ( $[M+H]^+$  m/z 308) and (b) the reaction product of GSH with MVK ( $[M+H]^+$  m/z 378). The collision energy for this analysis was 10 eV.

#### 第4節 小括

本章では、CSEによるB16-BL6細胞の増殖抑制がNACにより拮抗されることを明らかにし、CSE処置したB16-BL6細胞の細胞内GSHが主にMVKによって修飾されることをLC/MSおよびLC-MS/MS分析で初めて実証した。主な生成物はマイケル付加を介したGSH-MVK付加体であり、GSH-CA付加体ではなかった。併せて、細胞内GSHレベルはCSE処置により顕著に減少した。後続研究により、CSE処置したB16-BL6細胞において、GSHに対するCAおよびACRの結合も起こっていたことが確認された。

これらの知見により、CSEによるB16-BL6細胞の癌転移、浸潤、遊走の抑制に細胞内GSHの減少が関与している可能性が示唆された。このCSEによるB16-BL6細胞の細胞内GSHの減少には、少なくとも一部MVK、CA、ACRが関与している可能性が示唆された。

## 総括

「転移を制するものは癌を制す」と言われるほど、癌治療において癌転移をコントロールすることは重要な課題であると考えられている。癌転移の抑制や阻止は癌患者の予後や死亡率を大きく改善させることが期待される。

喫煙は呼吸器障害、血管障害、癌などの疾患の主要なリスクファクターであることが明らかにされている。特に、癌の発症や進展に対して、ニコチン、ニコチン誘導体やタールが重要な役割を果たすと考えられている。喫煙が有害なことは言うまでもないが、その一方で、タバコの葉や煙の中にはいくつかの疾患に対して有用な成分が含まれていることが明らかにされている。特に、タバコ煙濃縮物の中には、癌転移を抑制する成分が含まれていることが明らかにされている。しかしながら、有害であるとされているニコチンやタールを除いたガス相成分については検討されていない。

本研究では、タバコ煙のガス相成分に癌転移抑制物質が含まれている可能性に注目し、ニコチン・タールの影響を除くため、粒子相を除去したタバコ煙をリン酸緩衝生理食塩水に通気して調製した CSE が癌転移に及ぼす影響を検討し、その作用の解析ならびに活性成分の探索を行った。

第 1 章では、可移植性かつ高転移性のマウスメラノーマ細胞株である B16-BL6 細胞に対して、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度で CSE を前処置した後、同種の C57BL マウスに尾静脈を介して接種した。その結果、B16-BL6 細胞に対する CSE 前処置が肺転移結節数を減少させることが明らかになった。次に、CSE 前処置による血行性肺転移の抑制機序を検討し、CSE 前処置が B16-BL6 細胞の浸潤能および遊走能を低下させることを明らかにし、浸潤の抑制に対して、遊走の抑制が顕著であった。したがって、CSE 中には、B16-BL6 細胞の浸潤および遊走活性を抑制することにより、血行性癌転移を抑制する成分が含まれていることが示唆された。

第2章では、CSE中の浸潤および遊走抑制作用を有する活性成分候補を探索するために、まず、反応性の高い水酸基をもつアミノ酸であるTyrとの反応性を指標として、LC-MSやLC-MS/MSで反応生成物を同定に取り組んだ。その結果、Mr 181のTyrにMr 42の物質が付加した分子量223のTyr誘導体(Tyr+42)を2種類、Mr 70の物質が付加したMr 251のTyr誘導体(Tyr+70)を1種類検出した。それぞれ、N-acetyl-Tyr、O-acetyl-TyrおよびN-(3-oxobutyl)-Tyrであると同定した。これらはそれぞれTyrが無水酢酸もしくはMVKと反応することによって生成されることを明らかにした。次に、GC-MSを用いてTyrに結合したCSE中の活性成分を同定・定量した。その結果、無水酢酸およびMVKならびに細胞遊走の抑制作用を有することが報告されているタバコ煙の成分である $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドおよびケトンであるCA、ACRがCSEに含まれていることを明らかにした。これらの結果はTyrがCSE中の活性成分と容易に反応することを示しており、本法はタバコ煙の活性成分の探索を助けるものである。さらに、CSEの浸潤抑制作用を担う活性成分を明らかにするために、B16-BL6細胞に対するCSE中アルデヒドおよびケトンの浸潤抑制作用について検討した。ACRとCAについては浸潤抑制活性を示し、MVKについては浸潤を抑制する傾向が認められた。さらに、MVK、CAおよびACRはCSE中で複合的にB16-BL6細胞の浸潤を抑制しうる濃度で含まれていることが明らかとなった。

第3章では、CSEの転移抑制機序を解明する一端として、CSEの浸潤および抑制作用を担うアルデヒドやケトンが細胞内で直接生成させる物質を明らかにするために、CSE中の成分による細胞内の成分の修飾をLC-MSおよびLC-MS/MSで検討した。加えて、将来的に、B16-BL6細胞担癌マウスに対するCSE投与の効果を検討する際に、CSEが癌細胞の浸潤のみを抑制するのか、もしくは抗癌作用も有するのかを明らかにしておく必要があることから、CSEの継続的な処置がB16-BL6細胞の生存に及ぼす影響および細胞内GSHの関与を検討した。CSEおよびMVK、CAによる濃度依存的なB16-BL6細胞の生存率低下が認められ、このCSEおよびMVKによる細胞生存率の低下はチオール性の抗酸化剤であ

る NAC によって拮抗された。また、CSE および活性成分（それぞれ Mr 70）は、細胞死を引き起こさない濃度で、GSH（Mr 308）と不可逆的に反応して Mr 378 の GSH 付加物を形成し、細胞内 GSH レベルを著しく低下させた。質量スペクトルデータは、CSE 処置した細胞において形成された主要生成物が、マイケル付加を介した GSH-MVK 付加物であり、GSH-CA 付加物ではないことを示した。これらの結果は、CSE に含まれる MVK が細胞中の GSH と反応して GSH-MVK 付加物を形成することを示した。さらに、後続研究により、CA および ACR も B16-BL6 細胞内で GSH と反応することが明らかにされた。したがって、CSE による B16-BL6 細胞の癌転移、浸潤、遊走の抑制に細胞内 GSH の減少が関与している可能性が示唆された。この CSE による B16-BL6 細胞の細胞内 GSH の減少には、MVK、CA、ACR を始めとする CSE 中のアルデヒドやケトンが関与している可能性が示唆された。

以上をまとめると、(1) B16-BL6 細胞において、CSE 前処置は浸潤および遊走の抑制を介し、血行性肺転移を抑制すること、(2) *In vitro* において、Tyr が CSE 中の成分と 37°C 条件下で容易に反応すること、(3) CSE の浸潤抑制作用を、少なくとも一部、MVK、ACR および CA が担う可能性があること、(4) CSE、CA および MVK は B16-BL6 細胞の生存率を低下させ、CSE および MVK の作用は NAC によって拮抗されること、(5) *In vitro* において、CA および MVK は GSH と結合すること、(6) MVK は細胞内 GSH と結合すること、(7) CSE は生存率に影響を与えない濃度において GSH の低下を引き起こすこと、が明らかになった。さらに、後続研究により、CA および ACR も B16-BL6 細胞内で GSH と反応することが明らかにされた。これらの結果から、CSE 前処置による B16-BL6 細胞の浸潤および遊走の抑制を介する血行性転移抑制作用を、少なくとも一部、CSE 中に含まれている ACR、CA および MVK が担っており、細胞内 GSH の低下が関与する可能性が示唆された。本研究成果は、タバコ煙中のガス相成分に癌転移抑制作用を有する成分が含まれていることを初めて明らかにしたもので、今後の進展が期待できると考えられた。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、温かいご指導・ご助言を賜りました武庫川女子大学薬学部 中村一基教授および吉川紀子准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、常に親身に相談に乗ってくださった武庫川女子大学薬学部 國友勝名誉教授および堀山志朱代助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、貴重なご助言を賜り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、木元容子氏、畑井麻友子助手、本田千絵助教、諏訪紀代子助手、京都大学 市川厚名誉教授、横浜市立大学 高山光男教授、大阪大学 豊田岐聡教授、新聞秀一准教授、大阪市立工業研究所 静間基博先生、佐藤博文先生、理化学研究所 伊達沙智子先生、故 升島勉先生に感謝の意を表します。

本研究を共に行ってくくださった武庫川女子大学薬学部薬理学講座の修了生および卒業生に感謝いたします。

本論文の提出にあたり、貴重なご助言とご高配を賜りました高崎健康福祉大学薬学部 林正弘教授および大林恭子教授に厚くお礼申し上げます。

本論文の提出にあたり、貴重なご助言とご校閲を賜りました高崎健康福祉大学薬学部 平野和也教授、松岡功教授、常岡誠教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、何年もの間、物心両面でいつも支えてくれた妻、息子たち、娘、両親に心より感謝いたします。

## 引用文献

- [1] がん対策推進基本計画, 厚生労働相策定, 平成30年3月.  
<https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000196969.pdf> 2018年9月23日ダウンロード.
- [2] Liotta LA. *Cancer Res* 46, 1-7 (1986).
- [3] アバスチン®インタビューフォーム.  
[https://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/ava\\_via0400/if/PDF/ava\\_if.pdf](https://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/ava_via0400/if/PDF/ava_if.pdf)  
2018年9月23日ダウンロード.
- [4] National Institutes of Health (US), “Tobacco and the Clinician: Interventions for Medical and Dental Practice,” Bethesda (MD), US Department of Health, NIH Publication No. 94-3693, 1994.
- [5] US Office on Smoking and Health, “Smoking and Health: A Report of the Surgeon General,” Washington (DC), US Department of Health, Education, and Welfare, DHEW Publication No. 79-50066, 1979.
- [6] Wakai K, Inoue M, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Nagata C, Tsugane S. *Jpn J Clin Oncol* 36: 309-324 (2006).
- [7] Villeneuve PJ, Morrison HI. *Can Soc Trends* 39, 8-11 (1995).
- [8] Kobrinsky NL, Klug MG, Hokanson PJ, Sjolander DE, Burd L. *J Clin Oncol* 21, 907-913 (2003).
- [9] El Sayed KA, Sylvester PW. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 877-887 (2007).
- [10] Saito Y, Takizawa H, Konishi S, Yoshida D, Mizusaki S. *Carcinogenesis* 6, 1189-1194 (1985).
- [11] El Sayed KA, Laphookhieo S, Baraka HN, Yousaf M, Hebert A, Bagaley D, Rainey



- FA, Muralidharan A, Thomas S, Shah GV. *Bioorg Med Chem* 16, 2886-2893 (2008).
- [12] Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85, 2344-2348 (1988).
- [13] Yamaguchi Y., Matsuno S., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M. *Atherosclerosis* 172, 259–265 (2004).
- [14] Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, Chellappan S. *PLoS One* 4, e7524 (2009).
- [15] Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12233-12237 (1994).
- [16] Ogasawara M, Suzuki H. *Biol Pharm Bull* 27, 578-582 (2004).
- [17] Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 13221-13226 (1998).
- [18] Fidler IJ. *Nat New Biol* 242, 148-149 (1973).
- [19] Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Adachi Y, Mio T, Sisson JH, Spurzem JR, Rennard SI. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1497-1503 (1995).
- [20] Zlotnik A. *Semin Cancer Biol* 14, 181-185 (2004).
- [21] Condeelis J, Pollard JW. *Cell* 124, 263-266 (2006).
- [22] Devreotes P, Janetopoulos C. *J Biol Chem* 278, 20445-20448 (2003).
- [23] Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. *Nature* 410, 50-56 (2001).
- [24] La Rocca G, Anzalone R, Magno F, Farina F, Cappello F, Zummo G. *Respir Res* 8, 23 (2007).

- [25] Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. *Chem Res Toxicol* 14, 767-790 (2001).
- [26] Adam T, Mitschke S, Streibel T, Baker RR, Zimmermann R. *Chem Res Toxicol* 19, 511-520 (2006).
- [27] Kunitomo M, Yamaguchi Y, Kagota S, Yoshikawa N, Nakamura K, Shinozuka K. *J Pharmacol Sci* 110, 354-361, (2009).
- [28] Pryor WA, Stone K. *Ann NY Acad Sci* 686, 12-27 (1993).
- [29] Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. *Biochem J* 277, 133-138 (1991).
- [30] Bridges RB, Kraal JH, Huang LJ, Chancellor BM. *Infect Immun* 15, 115-123 (1977).
- [31] Hatzinikolaou DG, Lagesson V, Stavridou AJ, Pouli AE, Lagesson-Andrasko L, Stavrides JC. *Anal Chem* 78, 4509-4516 (2006).
- [32] Dixon M, Webb EC, "Enzymes", Academic Press Inc., New York, 937-943 (1964).
- [33] Shin VY, Liu ES, Koo MW, Wang JY, Matsui H, Cho CH. *Exp Biol Med* 227, 114-124 (2002).
- [34] Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A. *J Mol Cell Cardiol* 41, 275-284 (2006).
- [35] Sanbe A, Mizutani R, Miyauchi N, Yamauchi J, Nagase T, Yamamura K, Tanoue A. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 380, 569-576 (2009).
- [36] Bridges RB, Hsieh L. *J Leukoc Biol* 40, 73-85 (1986).
- [37] Shah PK, Helfant RH. *Chest*, 94, 449-452 (1988).
- [38] Gould NS, Min E, Gauthier S, Martin RJ, Day BJ, *Respir Res* 12, 133 (2011).
- [39] Hoshino S, Yoshida M, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Mawatari H, Yamane H, Kijima T, Kumagai T, Osaki T, Tachiba I, Kawase I. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 58-63 (2005).
- [40] Baglolle CJ, Bushinsky SM, Garcia TM, Kode A, Rahman I, Sime PJ, Phipps RP. *Am*

- J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291, L19–L29 (2006).
- [41] Ramage L, Jones AC, Whelan CJ. J Inflamm (Lond) 3, 3 (2006).
- [42] Guzik K, Skret J, Smagur J, Bzowska M, Gajkowska B, Scott DA, Potempa JS. Cell Death Dis 2, e131 (2011).
- [43] Miyake T, Shibamoto T. J Chromatogr A 693, 376-381 (1995).
- [44] Fujioka K, Shibamoto T. Environ Toxicol 21, 47-54 (2006).
- [45] 國友勝, 篠塚和正, 中村一基, 籠田智美, 吉川紀子. リポ蛋白および血管壁を酸化変性させるタバコ煙成分の同定ならびにその機構の解明. 喫煙の血管生物, 31-40 (2010).
- [46] Takahashi Y, Horiyama S, Kimoto Y, Yoshikawa N, Kunitomo M, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K. Pharmacol Pharm 3, 316-321 (2012).
- [47] Kaminskas LM, Pyke SM, Burcham PC. Chem Res Toxicol 18, 1627-1633 (2005).
- [48] Colombo G, Aldini G, Orioli M, Giustarini D, Gornati R, Rossi R, Colombo R, Carini M, Milzani A, Dalle-Donne I. Antioxid Redox Signal 12, 349-364 (2010).
- [49] Ezzati M, Lopez AD. Lancet 362, 847-852 (2003).
- [50] Aoshiba K, Nagai A. Tob Induc Dis 1, 219-226 (2003).
- [51] Fearon IM, Faux SP. J Mol Cell Cardiol 47, 372-381 (2009).
- [52] Tudor RM, Petrache I. J Clin Invest 122, 2749-2755 (2012).
- [53] Facchinetti F, Amadei F, Geppetti P, Tarantini F, Di Serio C, Dragotto A, Gigli PM, Catinella S, Civelli M, Patacchini R. Am J Respir Cell Mol Biol 37, 617-623 (2007).
- [54] Lee SE, Park YS. Oxid Med Cell Longev 2013, 629028 (2013).
- [55] Cooper KO, Witz G, Witmer C, Fundam Appl Toxicol 19, 343–349 (1992).
- [56] van der Toorn M, Smit-de Vries MP, Slebos DJ, de Bruin HG, Abello N, van Oosterhout AJ, Bischoff R, Kauffman HF. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293, L1156–L1162 (2007).

- [57] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. *Free Radic Biol Med* 11, 81–128 (1991).
- [58] Rahman I, MacNee W. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277, L1067–L1088 (1999).
- [59] Colombo G, Dalle-Donne I, Orioli M, Giustarini D, Rossi R, Clerici M, Regazzoni L, Aldini G, Milzani A, Butterfield DA, Gagliano N. *Free Radic Biol Med* 52, 1584–1596 (2012).
- [60] Portoghese PS, Kedziora GS, Larson DL, Bernard BK, Hall RL. *Food Chem Toxicol* 27, 773–776 (1989).
- [61] Sathishkumar K, Rangan V, Gao X, Uppu RM. *Free Radic Res* 41, 469–477 (2007).
- [62] Mishra S, Sharma DC, Sharma P. *Indian J Clin Biochem* 19, 71-75 (2004).
- [63] Dudek H, Farbiszewski R, Michno T, Kozłowski A. *Wiad Lek* 55, 252-256 (2002).
- [64] Obrador E, Carretero J, Ortega A, Medina I, Rodilla V, Pellicer JA, Estrela JM. *Hepatology*, 35, 74-81 (2002).
- [65] Roche S, Sewell L, Meiller J, Pedersen K, Rajpal R, O’Gorman P, Clynes M, O’Connor R. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 902, 16–26 (2012).
- [66] Robbins BL, Nelson SR, Fletcher CV. *J Pharm Biomed Anal* 70, 378–387 (2012).
- [67] Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ. *Cancer Res* 40, 1636–1644 (1980).
- [68] Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L509–L516 (2001).
- [69] Noya Y, Seki KI, Asano H, Mai Y, Horinouchi T, Higashi T, Terada K, Hatate C, Hoshi A, Nepal P, Horiguchi M, Kuge Y, Miwa S. *Toxicology* 314, 1–10 (2013).
- [70] Reddy S, Finkelstein EI, Wong PS, Phung A, Cross CE, van der Velt A. *Free Radic Biol Med* 33, 1490–1498 (2002).
- [71] Esterbauer H, Zollner H, Scholz N, *Z Naturforsch C* 30, 466–473 (1975).
- [72] Yarbrough JW, Schultz TW. *Chem Res Toxicol* 20, 558–562 (2007).

- [73] Li X, Wu J, Zhang X, Chen W. *Free Radic Biol Med* 129, 256-267 (2018).
- [74] Y Licon-Munoz V, Michel CA, Fordyce KJ Parra, *Biol Open* (2017).
- [75] Dalle-Donne I1, Carini M, Vistoli G, Gamberoni L, Giustarini D, Colombo R, Maffei Facino R, Rossi R, Milzani A, Aldini G. *Free Radic Biol Med* 42, 583-598 (2007).
- [76] Horiyama S, Hatai M, Takahashi Y, Date S, Masujima T, Honda C, Ichikawa A, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Takayama M. *Chem Pharm Bull*, 64, 585-593 (2016).