

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

森下 佳学

論文題目

ヒト口腔ケラチノサイトに対するタバコ煙抽出液の
細胞毒性、DNA 損傷、修復遺伝子の発現変動解析

I. 緒言

世界保健機関 (WHO) の国際がん研究機関は、喫煙は口腔がんおよび中咽頭がんによる死亡の主な原因であると結論づけている。タバコの煙には、何千もの有害物質が含まれており、これらは DNA 損傷を誘発する。蓄積した DNA 損傷は突然変異や染色体再配列を引き起こし、発がんに関連するゲノムの不安定性をもたらす。DNA 損傷の中でも、二本鎖切断 (Double Strand Break : DSB) は最も深刻で修復が困難な損傷とされ、喫煙と DSB との関連が報告されている。

MDC1 (Mediators of DNA damage checkpoint 1) および ATR (ataxia telangiectasia, and Rad3-related)、CHK1 (checkpoint kinase 1) は、DNA 損傷応答 (DNA damage response : DDR) 機構において重要な役割を果たす。DSB は、ATM (ataxia-telangiectasia mutated) のキナーゼ活性をトリガーとして、DDR を活性化する。DSB 部位に存在する histone H2AX がリン酸化 (γ H2AX) され、アダプタータンパク質である MDC1 を含む他の DDR 因子が導入され、ATM 経路のシグナルカスケードが開始される。MDC1 は、ATM シグナル活性を増幅させ、 γ H2AX の割合を高め、DNA 損傷部位における追加の DDR 因子の導入と保持に貢献する。また ATR は CHK1 をリン酸化し活性化させ、ATR-CHK1 経路における DNA 修復が開始される。

メッセンジャーRNA (mRNA) を標的として遺伝子発現を制御するマイクロRNA (miRNA) が、発がん分野で注目されている。近年、miR-22 や miR-185

などいくつかの miRNA が、ATM 経路における MDC1 や ATR-CHK1 経路を制御することにより、DSB の修復やゲノムの安定性に重要な役割を果たすことが明らかにされている。

タバコの葉の燃焼に由来する有害物質への曝露を低減するとして、加熱式タバコ (Heated Tobacco Products : HTPs) である IQOS の販売のパイロットプログラムが 2014 年から世界に先駆けて日本で開始された。

近年、HTPs と肺がんなどの呼吸器系疾患、ラットの肺における遺伝毒性、心血管系への影響や肝毒性などの関連について報告がなされている。しかし、HTPs と口腔がんの関連については、まだ解明されていないので現状である。口腔粘膜は、体の中で最初にタバコの有害物質に曝露される部位であり、その結果、細胞毒性、DNA 損傷、DNA 修復遺伝子への影響が現れやすい。

本研究は、HTPs と従来の紙巻きタバコ (Conventional Cigarettes : CCs) からタバコ煙抽出液 (Solutions of cigarette smoke extract : CSE) を作製し、細胞毒性、DNA 損傷、修復遺伝子発現変動を解析し、HTPs が口腔がんに関与する可能性について検討した。細胞毒性は、細胞生存率を測定し、DNA 損傷は DSB を検出し、また修復遺伝子発現変動を解析するために、miRNA-mRNA axis に着目して網羅的な遺伝子発現解析を行った。

II. 材料および方法

1. CSE の作製

CCsとして市販のMarlboro (PMI : Lausanne, Switzerland)、HTPsとしてIQOS (PMI)を使用した。既報論文を参考に、あらかじめ温めておいた100 mLのリン酸緩衝生理食塩水を入れた容器を真空にして、CCsとHTPsの主流煙を別々に吸引し、2種類のCSEを作製した。CCsは完全燃焼するまで、HTPsは14 puffまでしかその製品規定上、吸うことができないため14puffを真空にて吸引した。次にCSEをoral keratinocyte medium (ScienCell Research Laboratories, USA)を用いて、濃度計算式(%)： $(\text{CSE ml} \div \text{CSE} + \text{oral keratinocyte medium mL}) \times 100$ より5%、20%濃度に調製した。

2. 細胞培養

培養細胞は、初代培養正常ヒト口腔ケラチノサイト (Primary human oral keratinocytes : HOKs, ScienCell Research Laboratories, USA)を用いた。500 mLのoral keratinocyte mediumに5 mL oral keratinocyte growth supplementと5 mL penicillin/streptomycin溶液を添加し培養液として用いた。細胞は、37°C、5% CO₂/95% 空気の雰囲気インキュベータで培養した。HOKsは、CELLSTAR Advanced TC 100×20 mm細胞培養シャーレ (Greiner Bio-One International GmbH, 日本)で80%コンフルエンスまで増殖させて各実験に使用した。

3. 細胞生存率

実験群はCSE (5%, 20%)を細胞培養シャーレに添加し、コントロール群はoral keratinocyte mediumで培養した。6、12、24時間後の細胞生

存率を測定した (各群 n=3 または 4)。6、12、24 時間後の細胞密度をコントロールの細胞密度で割り、細胞生存率を算出した。各時点で各 CSE の同濃度間 (5%HTPs vs. 5%CCs, 20%HTPs vs. 20%CCs) で比較した。

4. DSB

γ H2AX は DSB の指標とされているため、抗 γ H2AX 抗体 (DOJINDO, 日本) による蛍光抗体法を用いて HOKs の γ H2AX foci を定量化し、DSB を検出した。CSE 曝露 6 時間後の HOKs を蛍光顕微鏡 (BZ-X710: キーエンス, 日本) を用いて観察した。 γ H2AX foci は、1 視野当たりで測定した (各群 n=4 または 5)。コントロールと各 CSE を比較した (コントロール vs. 5%HTPs, コントロール vs. 20%HTPs, コントロール vs. 5%CCs, コントロール vs. 20%CCs)。

5. マイクロアレイ

1) mRNA マイクロアレイ

RNeasy Mini Kit (Qiagen, ドイツ) を用いて、CSE 曝露 6 時間後の HOKs から Total RNA を抽出した。miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, ドイツ) を用いて逆転写反応を行い、Human DNA Damage Signaling RT2 Profiler PCR Array (Qiagen, ドイツ) を用いて、mRNA 発現プロファイリングを実施した。このアレイは、ATM や ATR-CHK1 経路を含む DDR に関連に関与する 84 の遺伝子の発現をプロファイリングしている。

2) miRNA マイクロアレイ

GeneChip™ miRNA 4.0 Array (Affymetrix, USA) を用いて miRNA 発現プロファイリングを実施した。このアレイには、約 36,249 の遺伝子転写産物が含まれている。異なるグループ間の発現を比較するため、ヒートマップによる階層的クラスター解析とベンダイアグラム解析を行なった。

6. Real-time RT-qPCR

1) mRNAs

MDC1 と ATR の Real-time RT-qPCR を One Step TB Green PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (タカラバイオ株式会社, 日本) と Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて行なった。GAPDH をハウスキーピング遺伝子として用い、 $\delta\delta Ct$ 法にて比較定量した (各群 n=3)。コントロールと各 CSE で発現を比較した (コントロール vs. 5%HTPs, コントロール vs. 20%HTPs, コントロール vs. 5%CCs, コントロール vs. 20%CCs)。

2) miRNAs

hsa-miR-22-3p と hsa-miR-185-5p の Real-time RT-qPCR を miRCURY LNA miRNA PCR Starter Kit (Qiagen, ドイツ) と Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて行なった。hsa-miR-103a-3p を内在性コントロールとして用い、 $\delta\delta Ct$ 法にて比較定量した (各群 n=3)。 (コントロール vs. 5%HTPs, コントロール vs. 20%HTPs, コントロール vs. 5%CCs, コントロール vs.

20%CCs)。

7. 統計解析

コントロールと各サンプル間に対する統計解析には JMP Pro16 software (JMP, USA) を用いて Wilcoxon 検定を行なった。P<0.05 である場合に統計学的に有意差があるとした。

III. 結果

1. 細胞生存率 (細胞毒性)

HTPs、CCsのいずれにおいてもHOKsの細胞生存率は、濃度および時間依存的に減少傾向を認めた。各時点における細胞生存率は、5%CCsと5%HTPsおよび20%CCsと20%HTPsの同一濃度間には、有意差を認めなかった。

2. DSB

γ H2AX fociの形成は、濃度依存的に増加した。 γ H2AX fociは、CCsおよびHTPsでコントロール群と比べ有意差を認めた (P<0.05)。

3. マイクロアレイ

1) mRNA マイクロアレイ

MDC1 の Fold-change は、20%HTPs では 0.18 と低下し、20%CCs では 0.15 と低下した。ATR の Fold-change は、20%HTPs では 0.36 と低下し、20%CCs では 0.30 と低下した。

2) miRNA マイクロアレイ

ヒートマップによる階層的クラスタ解析では、20%HTPsと20%CCsの

miRNAの発現は異なる様相を示した。ベンダイアグラム解析では、2倍以上または1/2以下に発現変動するmiRNAの数は、20%HTPsで180、20%CCsで253であった。また両方に共通するmiRNAの数は、115であった。これらのmiRNAの中には、DNA修復に関与すると報告されているmiR-22、miR-24、miR-101、miR-421が確認された。本研究では、MDC1とATRを標的にすることが報告されているmiR-22とmiR-185に着目した。miR-22のFold-changeは、20%HTPsでは1.23と上昇し、20%CCsでは1.53と上昇した。しかしmiR-185のFold-changeは、20%HTPsでは0.99、20%CCsでは1.03と変動を認めなかった。

4. Real-time RT-qPCR

1) mRNAs

CCs および HTPs に曝露した HOKs では、MDC1 および ATR の発現がコントロールと比較して有意差をもって減少していた ($P < 0.05$)。

2) miRNAs

miR-22 と miR-185 の発現は、コントロールと比較して有意差は認めなかった。

IV. 考察

HTPs は、タバコの葉の燃焼に由来する有害物質が低減されるとして発売された。しかし、HTPs には CCs と同等のニコチンや有害物質が含まれていることも報告されている。本研究では、体の中で最初にタバコの有害物質

に曝露される口腔粘膜に着目した。細胞生存率から、HTPs は口腔粘膜細胞において CCs と同等の細胞毒性を有する可能性が示唆された。

DSB は、喫煙など様々な化学的・物理学な DNA 損傷物質によって誘発され、動脈硬化性心血管疾患、神経変性疾患、癌などに関与している。γH2AX は、DSB の高感度マーカーとして報告されており、HTPs は口腔粘膜細胞において、CCs と同様に DNA 損傷が生じる可能性が示唆された。

DNA 修復に関して CCs および HTPs に曝露した 6 時間後の細胞では、MDC1 および ATR の発現が減少した。CSE 曝露により DSB が増加する一方で、MDC1 および ATR の発現が減少したことから、DNA 損傷が蓄積されても修復経路が十分に機能しない可能性がある。MDC1 と ATR は、ゲノムの不安定性と発がんを抑制する過程において重要な役割を担っており、これらの結果から HTPs は、CCs と同様に発がん性を有する可能性が示唆された。

miRNA は 21-25 塩基の短い non-coding RNA で、遺伝子の転写後発現調節に関与する。本研究では、miRNA-mRNA axis に関して MDC1 と ATR を標的にすることが報告されていることから miR-22 と miR-185 に着目した。しかし、miR-22 と miR-185 の発現に有意差はなく、miRNA-mRNA axis は認めなかった。

有害物質に関して HTPs は、CCs と比較して、WHO が指定した 9 種類の特定有害物質が削減されている。また PMI は、食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) の潜在的に有害な成分 (harmful and potentially

harmful constituents : HPHC) リストにある 93 種のうち 40 種のレベルが、HTPs では CCs よりも低いことを報告している。しかし、FDA の HPHC リストに含まれていない 56 種の成分は、HTPs の方が高く、22 種は 200%以上、7 種は 1000%以上高かった。これらの物質の多くは、 α 、 β -不飽和カルボニル化合物、フラン、エポキシドなどの著しい細胞毒性を引き起こすものであった。いくつかの有害物質の濃度は、HTPs の方が CCs よりも低いですが、一部の細胞毒性物質や遺伝毒性物質は、デバイスを加熱すると発生量が増加し、CCs と同様の影響を引き起こすと推測された。本研究では、CCs と比べ HTPs の細胞毒性、DNA 損傷、DNA 修復遺伝子への影響は、軽減されないことが示唆された。

V. 結語

HTPs は、初代培養正常 HOKs において、最も脅威とされる DNA 損傷である DSB を引き起こし、MDC1 を介した ATM 経路および ATR-CHK1 経路における DNA 修復を阻害する。CCs は、発がんに関与することが報告されているが、HTPs も同様に発がん性を有することが示唆された。