

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙	第 号	論文提出者名	森下 佳学
論文審査 委員氏名	主査	長尾 徹	副査	三谷 章雄 長谷川 義明
論文題名	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			

インターネットの利用による公表用

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 (PMI : Lausanne, Switzerland) 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。

紙巻きタバコ (Conventional Cigarettes : CCs) と口腔がんとの関連については、明らかにされているが HTPs と口腔がんについては、まだ解明されていない。

本研究は、HTPs と 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。

材料および方法を以下に示す。

1. CSE の作製

CCs として市販の Marlboro (PMI)、HTPs として IQOS を使用した。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。次に CSE を oral keratinocyte medium 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) を用いた。細胞は、37°C、5% CO₂/95% 空気の雰囲気

気のインキュベータで培養し、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。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、DNA 損傷における二本鎖切断 (Double Strand Break : DSB) の指標とされているため、抗 γ H2AX 抗体による蛍光抗体法を用いて DSB を検出した。CSE 曝露 6 時間後の HOKs を蛍光顕微鏡を用いて観察した。 γ H2AX foci は、1 視野当たりで測定した。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. Real-time RT-qPCR (mRNAs)

RNeasy Mini Kit を用いて、CSE 曝露 6 時間後の HOKs から Total RNA を抽出した。Human DNA Damage Signaling RT2 Profiler PCR Array を用いて、mRNA 発現プロファイリングを実施した。DNA 修復に関与する MDC1 と ATR の発現低下を認めたため、MDC1 と ATR の Real-time RT-qPCR を行なった。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。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)。

6. 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 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。

結果を以下に示す。

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. Real-time RT-qPCR (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)。

考察を以下に示す。

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、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。

以上より、本研究は HTPs が CCs と比べ健康リスクの軽減とならないことを示し、特に HTPs は青少年や若年成人の間での使用が増加しており、その使用は口腔がんのリスクも高めることを啓発し、口腔外科学、口腔微生物学、歯科保存学および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。