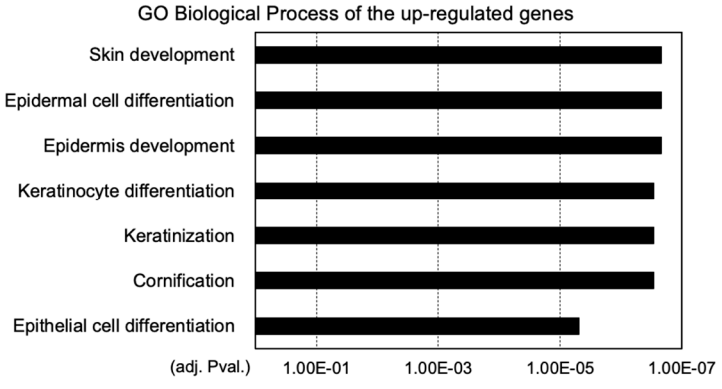
| 107　電子タバコと歯周組織のDNAメチル化　–老化への影響– | 植原　治 |
|---|---|

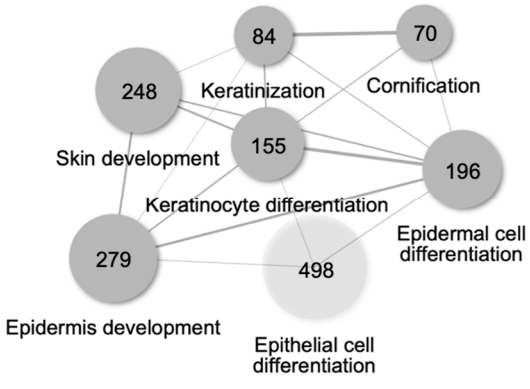
**【目的】**近年、本邦では、加熱式たばこが製造・販売されている。燃焼タバコは、心臓血管疾患、呼吸器疾患、口腔がん、歯周炎の発症に関係している。加熱式たばこは、燃焼式たばこと同様にエアロゾルが発生するため、加熱式たばこによる種々の疾病の発症リスクは、可燃性の紙巻きタバコと同じかそれ以上になる可能性も考えられる。最近になって加熱式たばこの使用が気道上皮細胞と血管内皮細胞に損傷を与えることが報告された。加熱式たばこを使用すると、エイジングのリスクも高まる可能性がある。本研究では、加熱式たばこ抽出物（HTP）が、歯肉上皮細胞のエイジングのメカニズムを解明するために、RNA-seq にて遺伝子発現および RRBS にて DNA メチル化を網羅的に解析した。

**【方法】**Ploom TECH$^{+}$たばこカプセルを分解し、たばこカプセル内のたばこ葉を 1.5 ml チューブに回収した。タバコ葉 1 g あたり 3 ml の水を添加混合後、60℃で 120 分間加熱した。加熱後、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離によりタバコの葉と上澄みを分離し、上澄みを回収して抽出物（HTP）とした。正常歯肉上皮細胞（HGEP）は Epithelial Culture Medium に HTP を添加したものと非添加したものを 3 日間ずつ交互に交換し、1 ヶ月間培養を行った。コントロールには超純水を添加したものを用いた。それぞれ RNA および DNA を抽出した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的にゲノム解析を行った。RNA-seq のデータは、Trimmomatic、HISAT2、featureCounts で処理した。さらに、iDEP を用い生物学的解釈について検討した。RRBS のデータは、Trim galore、Bismark、metylKit で処理し、CpG-island のメチル化レベルを解析した。

**【結果】**全遺伝子中、2 倍以上の遺伝子発現増加が認められたのは 284 遺伝子、1/2 以下の遺伝子発現低下が認められたのは 145 遺伝子であった。GO 解析では、HTP の長期刺激により Cornification、Keratinization、Epidermis development、Epidermal cell differentiation、Skin development、Keratinocyte differentiation、Epithelial cell differentiation のパスウェーが上昇した。HTP の長期刺激により歯肉上皮細胞の上皮の角化に影響する可能性が示唆された。RRBS から CpG-island のメチル化が 2 倍以上に上昇したものは 158 遺伝子、1/2 以下に低下したものは 171 遺伝子認められた。これらの CpG-island のメチル化と遺伝子発現レベルの変化に相関性は認められなかった。一方、老化に関連する遺伝子に関して RNA-seq および RRBS からは認められなかった。

遺伝子発現プロファイリング



# 107. 電子タバコと歯周組織の DNA メチル化 −老化への影響

植原　治

北海道医療大学 歯学部 口腔構造・機能発育学系 保健衛生学分野

Key words : 加熱式たばこ，歯肉上皮細胞，RNA-seq，RRBS，DNA メチル化

## 緒　言

近年、電子たばこや加熱式たばこ（E-cig）市場は、欧米や日本を中心に急成長している。E-cig を吸っている人は、2011 年の 700 万人から、2016 年には 3,500 万人に達した。E-cig の有害性については、様々な議論があったが、世界保健機関（WHO）は、E-cig は健康上のリスクを減らすわけではなく有害であると報告し、紙巻きたばこと同様に規制を行うべきとの見解を示している。E-cig はタバコ葉を使用せず、カートリッジ内の液体を電気加熱し、霧化した蒸気を吸引する。その主成分はニコチンやプロピレングリコールやグリセリンであり、国立保健医療科学院は、それらが加熱されて霧化する過程でホルムアルデヒド、アセトアルデヒドといった発がん性物質を発生すると報告している［1］。これまでの我々の研究で、がん細胞にはジェネティックな遺伝子異常に加えて、DNA メチル化やヒストンの化学修飾などのエピジェネティック異常が蓄積していることが明らかになってきた。エピジェネティック異常はがんの発生早期の段階から発育進展にいたるまで、その特性に大きく影響を与え広範に遺伝子制御異常に及ぶと考えられており［2］、がんにおけるエピジェネティック異常の解明は、がん医療を考えていく上で喫緊の課題である。しかしながら E-cig とエピジェネティクスとの関連に着目した口腔がんの発症や進行に関する報告はほとんどなく、近年若者を中心に急速に普及している E-cig による口腔粘膜組織におけるエピジェネティクスプロファイルの構築は解明すべき重要課題として認識するようになった。

加熱式たばこを使用すると、エイジングのリスクも高まる可能性がある。本研究では、加熱式たばこ抽出物（HTP）がもたらす、歯肉上皮細胞のエイジングのメカニズムを解明するために、RNA-seq にて遺伝子発現および RRBS にて DNA メチル化を網羅的に解析した。

## 方　法

### 1. 細胞培養及び試薬

Ploom TECH$^{+}$（日本たばこ産業）たばこカプセルを分解し、たばこカプセル内のたばこ葉を 1.5 ml チューブに回収した。タバコ葉 1 g あたり 3 ml の水を添加混合後、60℃で 120 分間加熱した。加熱後、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離によりタバコの葉と上澄みを分離し、上澄みを回収して抽出物（HTP）とした。正常歯肉上皮細胞（HGEP）は Epithelial Culture Medium（CELLnTEC）に HTP を添加したものと非添加したものを 3 日間ずつ交互に交換し、1 ヶ月間培養を行った（図 1）。

### 2. 細胞増殖能測定

細胞増殖試薬 WST-1 を使用して測定した。はじめに HGEP を培地中の 96 ウェルプレートに播種し培養した。その後 HGEP に異なる濃度の HTP（0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10%）を添加した。24、48、72 時間培養後、WST-1 を各ウェルに添加し、吸光度を測定した（n＝6）。

### 3. RNA-seq および RRBS

サンプルから RNA および DNA を抽出した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的にゲノム解析を行った。RNA-seq のデータは、Trimmomatic、HISAT2、featureCounts で処理した。さらに、iDEP を用い生物学的解釈について

検討した。RNA-seq のデータから遺伝子の上昇が認められた遺伝子について、Real time PCR を用いて再現性の確認を行った（n＝6)。RRBS のデータは、Trim galore、Bismark、metylKit で処理し、CpG-island のメチル化レベルを解析した（n＝3)。

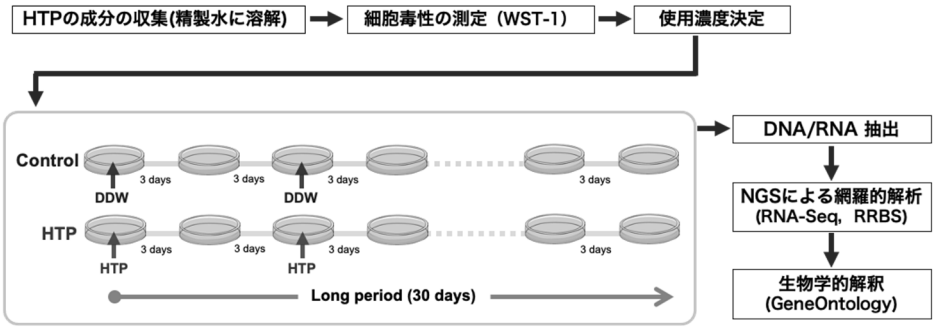



図 1. 実験のフローチャート

HTP の歯肉上皮細胞の影響について細胞増殖能測定、RNA-seq および RRBS を用いた網羅的解析、生物学的解釈を検討した。

## 結果および考察

### 1. 細胞増殖能

歯肉上皮細胞に 0～10%までの濃度で HTP を添加し 24、48、72 時間後の増殖を測定した結果、HTP 1%までは 72 時間後まで増殖することが明らかとなった（図 2)。

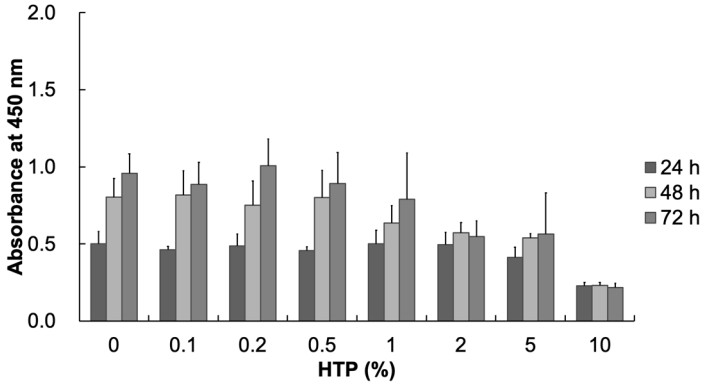



図 2. 細胞増殖能

HTP を添加し 24、48、72 時間後の歯肉上皮細胞の増殖能を測定した。

### 2. 遺伝子発現

HTP 1%で 1 ヶ月間歯肉上皮細胞を培養した。RNA-seq から全遺伝子中、2 倍以上の遺伝子発現増加が認められたのは 284 遺伝子、1/2 以下の遺伝子発現低下が認められたのは 145 遺伝子であった（図 3c)。ヒートマップは、CONT 群と HTP 群間で遺伝子の違いを示した（図 3a)。PCoA プロットから CONT 群と HTP 群間に明確な遺伝的分布が存在することが明らかになった(図 3b)。GeneOntology 解析では、HTP の長期刺激により Cornification、Keratinization、Epidermis development、Epidermal cell differentiation、Skin development、Keratinocyte differentiation、Epithelial cell differentiation の GO が上昇した（図 3d、e)。低下した GO は認められなかった。上昇した GO に関わる 4 遺伝子（*KRT13*、*KLK12*、*S100A7*、*PI3*）について再現性の確認を行なった結果、4 遺伝子とも遺伝子発現上昇が確認された（$p<0.05$、t 検定)。

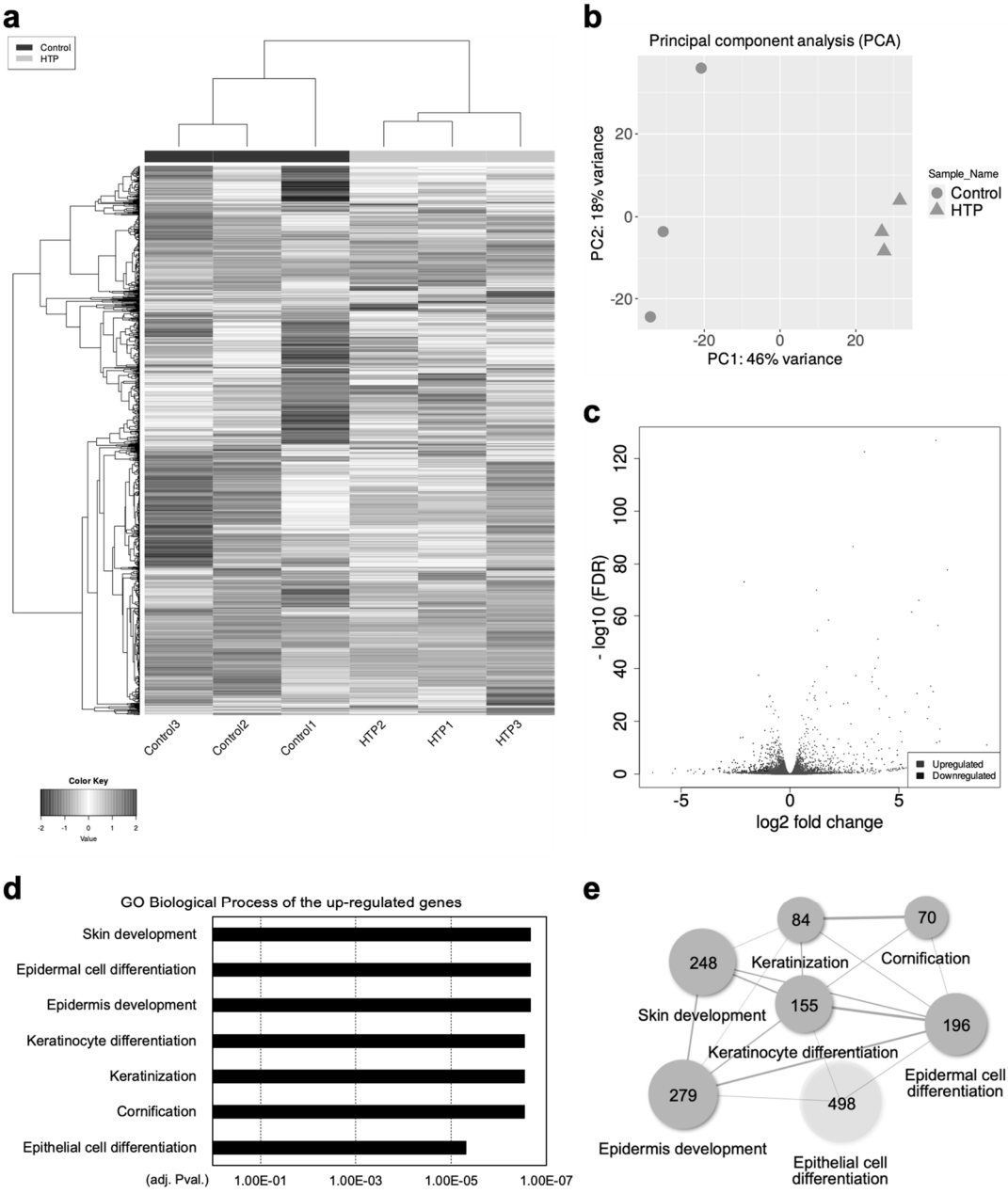



図 3. Gene expression profiles

a) CONT 群と HTP 群間のヒートマップ。

b) PCoA プロット。

c) Summary plots for differential expression analysis。

d, e) GeneOntology 解析。

### 3. DNA メチル化

RRBS から CpG-island のメチル化が 2 倍以上に上昇したものは 158 遺伝子、1/2 以下に低下したものは 171 遺伝子認められた（図 4a）。これらの CpG-island のメチル化と遺伝子発現レベルの変化に相関性は認められなかった（図 4b）。

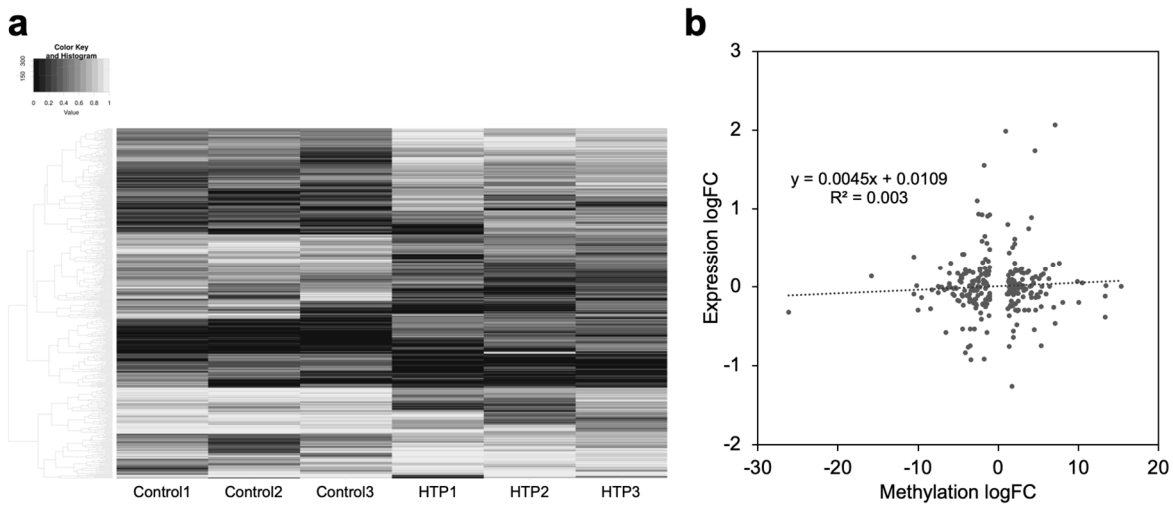



図 4. DNA メチル化解析

a）プロモーター領域の DNA メチル化。

b）メチル化と遺伝子発現レベルの Scatter plot。

本研究から、HTP の長期刺激は歯肉上皮細胞の上皮の角化に影響することから、細胞の角化亢進に関与することが示唆され、過角化を伴った口腔粘膜疾患の原因となりうるものと思われた。これらのメカニズムに DNA のメチル化は関与しないことが示唆された。老化に関連する遺伝子に関して RNA-seq および RRBS からは認められなかった。

喫煙は口腔がんの最大の危険因子と言われている。特に問題は、口腔粘膜に何かしらの症状が出るまでに、気付くことなく、重症化してしまうというケースが多い。通常のたばこの煙には、ニコチン、タール、一酸化炭素などの多くの有害物質が含まれている。一方、加熱式たばこは、タール、一酸化炭素が発生しないという見解がある。タールは有害物質なのは間違いないが、炎症を抑える作用や抗ウイルス作用を有する。加熱式たばこに変えることで、今まで抑え込んできた元々の口腔内の炎症症状が表面化する可能性を考えた。以上のことから E-cig による口腔がん発症・進行のメカニズムを網羅的に解明し、新たな口腔疾患の診断方法や治療への臨床応用することは重要である。今後、日本においてもこれらをどのように規制していくべきか法規制に関し、諸外国の実情も鑑み、規制体系を整理し有害性について検討されることが望まれる。E-cig の利用に伴う口腔領域への有害性について、本研究も含むエビデンスベースで検討・企画立案していくことが重要であると考えられる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道医療大学歯学部保健衛生学分野の三浦宏子、北海道医療大学歯学部臨床口腔病理学分野の安彦善裕および徳島大学大学院医歯薬学研究部消化器内科学分野の河野豊である。

## 文　献

1） 欅田尚樹、内山茂久、戸次加奈江、稲葉洋平。【たばこ規制枠組み条約に基づいたたばこ対策の推進】無煙たばこ、電子たばこ等新しいたばこおよび関連商品をめぐる課題（解説／特集）. 2015; 64(5):501-510.

2） Zheng Y, Yu Z, Zhang S, Kong X, Michaels W, Wang W, Chen G, Liu D, Lai JC, Prine N, Zhang W, Nikzad S, Cooper CB, Zhong D, Mun J, Zhang Z, Kang J, Tok JB, McCulloch I, Qin J, Gu X, Bao Z. A molecular design approach towards elastic and multifunctional polymer electronics. Nat Commun. 2021 Sep 29;12(1):5701. doi: 10.1038/s41467-021-25719-9. PMID: 34588448; PMCID: PMC8481247.