

## 2. 公募研究

### 1) マルチオミックス解析による加熱式たばこ誘発口腔疾患発症メカニズムの解明と基盤創出

研究代表者：歯学部 保健衛生学分野	植原 治
研究分担者：歯学部 臨床口腔病理学分野	安彦 善裕
研究分担者：歯学部 組織再建口腔外科学分野	平木 大地
研究分担者：歯学部 臨床口腔病理学分野	森川 哲郎
研究分担者：先端研究推進センター	Durga Paudel

#### 【背景】

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 3500 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。これまでの申請者らの研究で、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、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。

#### 【目的】

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、新たな口腔がん予知診断方法や治療への臨床応用に展開するという着想に至った。本研究では、加熱式たばこ抽出物（HTP）が、歯肉上皮細胞にどのような影響を生じさせるかを明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

加熱式たばこ抽出物を使用した。タバコ葉 1g あたり 3ml の水を添加混合後、加熱し、加熱後の上澄みを回収して抽出物 (HTP) とした (未添加: CONT)。正常歯肉上皮細胞 (HGEP) は HTP を添加したものと添加しなかったものを 1 ヶ月間培養した。RNA と DNA を抽出した後、RNA-seq と RRBS を用いて網羅的解析を行った。さらに網羅的解析データの再現性の確認に Real-time PCR およびウエスタンブロットを行った。

#### 【結果および考察】

RNA-seq から 2 倍以上の遺伝子発現増加は 284 遺伝子、1/2 以下の発現低下は 145 遺伝子であった ( $p < 0.05$ )。ヒートマップは、CONT 群と HTP 群間で遺伝子の違いを示した。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した。GeneOntology 解析 (GO) では、HTP の長期刺激により Cornification、Keratinization など 4 つの GO が上昇した。一方、低下した GO は認められなかった。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 ( $p < 0.05$ )。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。タンパクレベルでは、HTP 群で S100A7 の発現も上昇した。以上から HTP の長期刺激が歯肉上皮細胞の角化に影響し、細胞の角化亢進に関与することが示唆された。その結果、加熱式たばこの使用は過角化を伴った口腔粘膜疾患の原因となりうることが示された。なお、これらのメカニズムに DNA のメチル化は関与しない。

#### 【研究成果】

本研究計画の審査において評価者の 1 人から総合評価「1」と評価されていたが、本研究内容に関して先端研究推進センターの指定する期限内に以下に示す歯周病の領域で最も歴史があり権威のある英文誌にアクセプトさせることができた。したがって、本研究は、総合評価「1」に該当するような研究内容ではないと考えており、今後も本研究で得られた知見をもとにさらに加熱式タバコによる口腔疾患への作用機序を解明していきたい。

Effects of prolonged stimulation with heated tobacco products (Ploom TECH<sup>+</sup>) on gingival epithelial cells. **Uehara Q**, Nakamoto N, **Hiraki D**, **Paudel D**, Sugiyama N, **Morikawa T**, Yoshida K, Kawano Y, Shimo T, Furuichi Y, Miura H, **Abiko Y**. J Periodontal Res. 2023. In press.