

論文内容要旨

The long-term effects of heated tobacco product exposure on the central nervous system in a mouse model of prodromal Alzheimer's disease

(加熱式たばこ長期曝露によるアルツハイマー病前駆期モデルマウス中枢神経に対する影響)

Scientific Reports, 14(1):227,2024.

主指導教員：丸山 博文 教授

(医系科学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：川上 秀史 教授

(原爆放射線医科学研究所 分子疫学)

副指導教員：山崎 雄 講師

(医系科学研究科 脳神経内科学)

山田 英忠

(医系科学研究科医歯薬学専攻)

1. 背景・目的

1.1 背景：加熱式たばこ(Heated tobacco products : HTPs)は従来型の燃焼式たばこと異なる機序のたばこ製品であり、販売会社による”健康リスク低減効果”の宣伝により、使用者が増加しているが、健康リスク低減効果についての科学的根拠は十分ではない。加えて、科学的知見の多くは呼吸器および循環器系への影響に関する報告であり、中枢神経系(central nervous system : CNS)への影響に関する情報は少ない。認知症の主要な原因であるアルツハイマー病(Alzheimer’s disease : AD)は全身および CNS における慢性炎症との関連が示唆されており、疫学研究、動物実験から孤発性 AD 発症の環境要因として喫煙の重要性が示されている。一方で、HTPs のエアロゾル成分は燃焼式たばこのそれとは異なり、燃焼式たばこの研究結果を外挿し、HTPs の安全性と危険性の評価を行うことの科学的妥当性は低い。

1.2 目的：本研究では、HTPs と AD の病態との関連に着目し、前駆期 AD モデルマウスを用いて HTPs の長期曝露に伴う CNS への影響を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 マウスモデル：ヒト APP ノックインマウス(前駆期 AD モデルマウス)を使用し、広島大学学長の承認を得た動物実験計画に従って実施した。

2.2 実験概要：喫煙曝露環境の決定、長期曝露実験の順に実施した。ニコチンの主な代謝物である血清コチニン値(ELISA)を HTPs 曝露の指標とし、喫煙曝露環境を決定した。長期曝露実験では、全身曝露の指標として体重、肺および右大脳皮質の炎症性サイトカイン(IL-6)、酸化ストレス(Nfe2l2)、白血球遊走因子(Ccl2)遺伝子発現レベル(RT-qPCR)を評価し、CNS への影響の評価として免疫組織化学染色(Aβ40, Aβ42, GFAP, Iba1)および遺伝子発現解析(RNA-sequence : RNA-seq)を行った。

2.3 喫煙曝露環境：非換気型チャンバーを用いて HTPs 曝露マウスモデルを作出した。HTPs は複数の吸入回数(パフ)/1カートリッジ、時間の検討から吸入回数：4パフ/1カートリッジ、吸入時間：30分が先行研究と同程度の血清コチニン濃度(ELISA)であると結論付けた。

2.4 長期曝露実験：上述の曝露条件を用いて、HTPs 吸入群、空気吸入群に合計 32 匹の AD モデルマウス(15 週齢、5-7 匹/sex/group)を割り当て、週 5 日間、16 週間の長期曝露を行った。

2.5 RT-qPCR：全肺および右大脳皮質より RNA を抽出し、IL-6, Nfe2l2, Ccl2 の遺伝子発現量を測定した。GAPDH を内在性コントロールとして用い、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法により遺伝子発現量を定量した。

2.6 RNA-seq：右大脳皮質より抽出した RNA を Illumina 用 Ultra II Directional RNA ライブラリー調製試薬を用いて調整後に Illumina NovaSeq 6000 システムによりシーケンスを行い、DESeq2 により発現変動遺伝子を抽出した。 $|\log_2FC| > 1$ および調整 p 値または非調整 p 値を用いて発現変動遺伝子(differentially expressed genes :DEGs)を同定し GO(gene ontology) エンリッチメント解析を行った。

2.7 免疫組織学的定量：左半脳を固定(4%パラホルムアルデヒド)、パラフィン包埋後、ブレグマ後方-1.34mm の位置より 300 μ m 毎に 6 枚の冠状断スライスに対して免疫組織化学染色を行

い定量した. 使用抗体はそれぞれ anti-Human Amyloid β (1-42) Rabbit IgG (IBL), anti-Human Amyloid β (1-40) Rabbit IgG (IBL), anti-GFAP Rabbit IgG (Abcam), anti-Iba1 Rabbit IgG (Wako)を用い, 抗体陽性部分を DAB Substrate で発色後, cellSens Dimension (Olympus)を用いて定量した.

2.8 統計解析: 正規分布を示すものは t 検定を, 非正規分布を示すものは Wilcoxon 符号付順位検定を選択した. JMP Pro 16(SAS Institute)を用い, 有意水準は 5%とした.

3. 結果

3.1 喫煙曝露環境の決定: HTPs 曝露による血清コチニン値は吸入回数依存的に上昇したが曝露時間には関係しなかった. 4 パフ \times 30 分間曝露後の血清コチニン値(47.4 \pm 20.9 ng/mL)が既報と同程度であった.

3.2 全身曝露の評価: HTPs 群の体重(31.5 \pm 5.2g)は空気群(33.2 \pm 6.7g)と比較して軽度低値であったが有意な差は認めなかった($p=0.382$). 肺における遺伝子発現は IL-6 (Fold Change [FC] =1.8, $p=0.093$), Nfe2l2 (FC =1.4, $p=0.136$), Ccl2 (FC =1.7, $p=0.004$)であり白血球遊走因子のみ有意に発現が亢進していた. CNS についてはいずれも有意な発現亢進は認めなかった.

3.3 免疫組織学的定量: HTPs 群のアミロイドプラークは海馬(A β 40, $p=0.915$; A β 42, $p=0.657$), 大脳皮質(A β 40, $p=0.999$; A β 42, $p=0.916$)のいずれも空気群との差は認めず, 神経炎症についても海馬(GFAP, $p=0.494$; Iba1, $p=0.803$), 大脳皮質(GFAP, $p=0.925$; Iba1, $p=0.906$)のいずれも空気群との差を認めなかった.

3.4 RNA-seq: $|\log_2FC| > 1$ および調整 p 値を用いた解析では有意な DEGs を認めなかった. 一方で, $|\log_2FC| > 1$ および非調整 p 値を用いた解析では 282 個の DEGs(発現上昇, 95; 発現減少, 187)を認めた. これらを用いた GO エンリッチメント解析では, 脳下垂体ホルモン活性, 神経ペプチドホルモン活性, ガラニン受容体活性に関連する遺伝子群の発現亢進が同定された.

4. 考察

血清コチニン値, 肺における遺伝子発現解析の結果から, 本動物実験モデルは HTPs 曝露モデルとしての妥当性を有していると考えられた. 本モデルを用いた慢性曝露実験では, HTPs による AD 病理への影響は限定的であった. 一方で, 脳下垂体ホルモン活性, 神経ペプチドホルモン活性, ガラニン受容体活性に関連する遺伝子群など, 従来型の燃焼式たばこで指摘されている遺伝子群の発現亢進を認めた. 本研究の結果は HTPs の前駆期 AD モデルマウスに対する非炎症性経路を介した影響を示し, HTPs の CNS への影響に関する包括的な検討の必要性を示していると考えられた.