

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	山田 英忠
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	相澤 秀紀	
審査委員	講師	青木 志郎	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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. 今回申請者らは, 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に本研究を行った.</p> <p>前駆期 AD モデルマウスであるヒト APP ノックインマウスを使用し, 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 法)を HTPs 曝露の指標とし, 非換気型チャンバーを喫煙曝露環境として用いて HTPs 曝露マウスモデルを作出した. HTPs の曝露環境は複数の条件を検討した結果, 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. 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. 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), 酸化ストレス関連遺伝子(Nfe2l2), 白血球遊走因子(Ccl2)の遺伝子発現レベルを RT-qPCR を用いて評価し, 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. RNA-seq では $\log_2FC > 1$ 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. 統計解析方法として, 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.</p> <p>結果は以下のごとくまとめられる. まず, 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×30 分間曝露後の血清コチニン値(47.4±20.9 ng/mL)が既報と同程度であり, 同条件を喫煙曝露のための環境として決定しその後の実験に用いた. 長期曝露実験において, 全身曝露の評価として HTPs 群の体重(31.5±5.2g)は空気群(33.2±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). また, 肺における遺伝子発現は IL-</p>			

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。免疫組織学的定量については HTPs 群のアミロイドプラークは海馬(Aβ40, p=0.915 ; Aβ42, p=0.657), 大脳皮質(Aβ40, p=0.999 ; Aβ42, 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。最後に RNA-seq での探索的評価において, $|\log_2FC| > 1$ 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。

以上のように, 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。また, 本モデルを用いた長期曝露実験では, 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。このことから, 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, 今後の HTPs の CNS への影響に関する包括的な検討の必要性を示す重要な報告と考えられた。

よって審査委員会委員全員は, 本論文が山田英忠氏に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。