

【奨励賞受賞者研究トピックス】

老化指標 DNA メチル化に影響を及ぼす因子の評価

佐藤 綾美、石神 昭人

東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 分子老化制御

キーワード：DNA methylation, Smoking, Heated tobacco products, RRBS

1. はじめに

喫煙は、老化を促進する代表的なリスクファクターである。喫煙者の寿命は約 10 年短いとの調査結果もあり^[1]、世界で毎年 800 万人以上がたばこを原因として亡くなっている^[2]。喫煙によるニコチン摂取は快感を得られる一方、たばこ煙への曝露は、酸化ストレスや慢性炎症を介して老化や加齢性疾患につながる。また、喫煙はエピジェネティクス異常を引き起こすことが知られる。エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構であり、DNA メチル化 (DNAm) やヒストン修飾に代表される。DNAm の加齢変化は、エピジェネティック時計と称され、老年病罹患リスクや寿命の予測への応用研究が加速している。即ち、DNAm は老化指標として注目される。一方、喫煙による DNAm 変化は、喫煙が原因となる疾患の発症メカニズムの一つである^[3]。喫煙者と非喫煙者で血球の DNAm 状態を調べた複数の研究により、多くの CpG サイトでメチル化の変化が認められた^[4]。対して、喫煙者が禁煙することにより、一部の DNAm は元の状態に戻ることもわかっている^[4]。さらに、喫煙による DNAm 変化は肺がん発症を予測するマーカーになり得ることが報告されており^[5]、DNAm 変化がみられる主な遺伝子には p16 などが含まれる^[6]。以上のように、DNAm に影響する喫煙のようなリスク因子の理解は、老化制御を目指す上で重要である。

近年、従来の紙巻きたばこに代わり、加熱式たばこ (heated tobacco product: HTP) が普及している。2023 年現在、HTP は日本のたばこ市場の 3 割を占めており、使用者は増加している。HTP は、たばこ葉を燃焼せずに、加熱して発生する蒸気 (エアロゾル) を喫煙する製品であり、従来の紙巻きたばこのような煙や副流煙、灰は出ない。しかし、HTP が使用者の健康に与える影響は未だ十分に調査されていない。現在、世界中でさまざまな種類の HTP が使用されており、その生体へのリスク評

価は急務である。以上の背景より、本稿では、HTP が DNAm に及ぼす影響を調べた我々の研究成果^[7]を概説する。

2. DNAm への HTP の影響

我々は、ヒト肺胞上皮由来の細胞株 A549 を用い、市販の HTPs エアロゾル抽出液の曝露による細胞毒性、DNAm、および遺伝子発現への影響を生化学的に解析した。比較対象には、紙巻きたばこ標準品である 1R6F (reference cigarette: RC) の煙抽出液を用いた。たばこ煙抽出液は、専用の吸引システムでガラス繊維フィルターに捕集したエアロゾル中の総粒子相 (total particulate matter: TPM) を DMSO に溶解し、培養液に添加した。まず細胞毒性を WST-8 法と LDH (lactate dehydrogenase) アッセイにより評価した結果、RC では 0.1mg TPM/mL から毒性を示したが、HTPs では 1mg TPM/mL まで毒性を示さなかった。しかし、HTP でも 2mg TPM/mL では細胞生存活性の減少がみられた。たばこ煙中の芳香族アミンやフェノール化合物などは、細胞毒性に関与することが知られている^[8]。これらの有害成分は、RC より HTP の方が少ないが、HTP はグリセロールやプロピレングリコールの含有量が多いという特徴がある。HTP は加熱温度が高い製品の方がエアロゾル中の粒子状物質が多く発生しやすく^[9]、一部の HTP は酸化ストレスを惹起し炎症マーカー (IL-6 など) を増加させることが報告されている^[10]。次に我々は、HTP エアロゾル抽出液曝露による DNAm 関連因子への影響を検討した^[7]。Dot blot 法によるゲノム全体での DNAm 定量の結果、RC では有意な減少がみられたが、HTPs では変化は認められなかった。しかしながら、DNAm シーケンス (reduced representation of bisulfite sequencing: RRBS) 法を用いて CpG サイトのメチル化変化を網羅的に解析した結果、HTP は相対的にメチル化率を減少した (図 1 A)。可変メチル化シトシン (differentially methylated cytosine: DMC) サイト数を図 1 B に示す。RC より小さいが、HTP でもメチル化の変動がみられた。さらに、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、HTP (2mg TPM/mL) は DNAm 関連遺伝子セットや老化関連遺伝子 (GDF15 など) の発現レベルに影響した。しかし、RC (0.1 mg

連絡先：佐藤 綾美

〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

TEL : 03-3964-3241 ext. 4304

E-mail : ayamis@tmig.or.jp

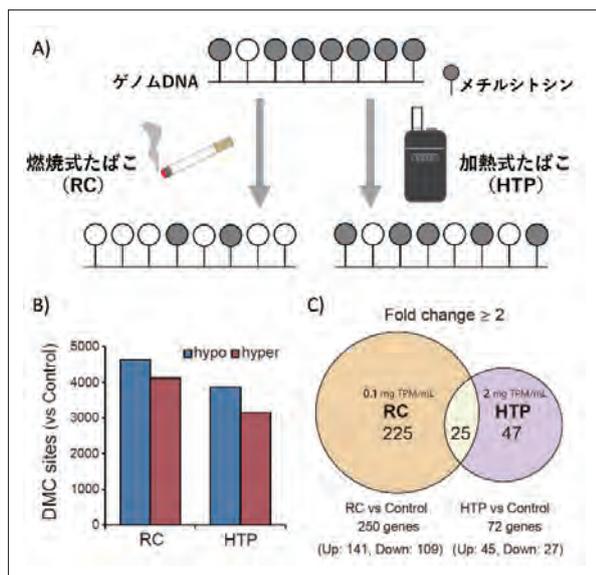


図1 HTPの影響

A) たばこ煙による DNAm 変化の概念図。B) 可変メチル化シトシン (DMC) への影響。A549 細胞に 0.1mg TPM/mL RC または 2mg TPM/mL HTP を 12h 曝露した。RRBS 解析よりメチル化率の差が 25% 以上であったサイト数を示す。C) 発現変動がみられた遺伝子数。DNA マイクロアレイ解析より Fold change 2 倍以上であった遺伝子数を示す。

TPM/mL) と比較するとその程度は小さかった (図 1 C)。注目すべき点として、HTP は特にシトクロム P450 の一種 CYP1A1 (cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1) のプロモーター領域メチル化を大きく変化させ、mRNA 発現量を増加した。しかし、RC と比較するとその程度は小さかった。CYP1A1 は、たばこ煙に含まれるベンゾピレンのような多環芳香族炭化水素に対し、体内で変異原性・発がん性のある物質へ代謝するはたらきをもつため、肺がんのリスク因子として注目される^[11]。本研究より、HTP は CpG 領域のメチル化に影響するが、RC ほど大きな遺伝子発現変化にはつながらない可能性が示された。

3. おわりに

HTP は、DNAm および遺伝子発現を変化させるリスクはあるが、そのリスクは紙巻きたばこよりは低いと考えられる。コホート研究では、HTP 使用者は紙巻きたばこ喫煙者と比べて血球のメチル化への影響は小さい可能性が示されている^[12]。一方、現状では多くの対象者が紙巻きたばこの喫煙歴があるため、今後、HTP のみを使用する若年層を対象とした調査が望まれる。また、HTP の長期的な使用による影響など、まだ分かっていないことも多い。今後、紙巻きたばこと同様に HTP も喫煙というくくりで、老化の交絡因子として考えてよいのかなど、注視していく必要がある。

引用文献

1. Doll R, Peto R, Boreham J, *et al.* Mortality in relation to smoking : 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328 (7455) : 1519, 2004.
2. WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco> (2023-08).
3. Gao X, Jia M, Zhang Y, *et al.* DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults : a systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics* 7 : 113, 2015.
4. Joehanes R, Just AC, Marioni RE, *et al.* Epigenetic signatures of cigarette smoking. *Circ Cardiovasc Genet* 9 : 436-47, 2016.
5. Zhang Y, Elgizouli M, Schöttker B, *et al.* Smoking-associated DNA methylation markers predict lung cancer incidence. *Clin Epigenetics* 8 : 127, 2016.
6. Kaur G, Begum R, Thota S, *et al.* A systematic review of smoking-related epigenetic alterations. *Arch Toxicol* 93 (10) : 2715-40, 2019.
7. Sato A, Ishigami A. Effects of heated tobacco product aerosol extracts on DNA methylation and gene transcription in lung epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 475 : 116637, 2023.
8. Schaller JP, Keller D, Poget L, *et al.* Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2 : Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regul Toxicol Pharmacol* 81 (2) : S27-47, 2016.
9. Horinouchi T, Miwa S. Comparison of cytotoxicity of cigarette smoke extract derived from heat-not-burn and combustion cigarettes in human vascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 147 (3) : 223-33, 2021.
10. Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, *et al.* Increased oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products aerosol exposure to mice. *Biochem Biophys Res Commun* 610 : 43-8, 2022.
11. Denissenko MF, Pao A, Tang M, *et al.* Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274 (5286) : 430-2, 1996.
12. Ohmomo H, Harada S, Komaki S, *et al.* DNA methylation abnormalities and altered whole transcriptome profiles after switching from combustible tobacco smoking to heated tobacco products. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 31 (1) : 269-79, 2022.