

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09281

研究課題名(和文)アセトアルデヒド代謝機能改善に基づく食道発がん予防法の開発

研究課題名(英文)Preventive effects of ALDH2 activator on esophageal carcinogenesis

研究代表者

大橋 真也(Ohashi, Shinya)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20435556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアセトアルデヒド代謝酵素(ALDH2)の活性を高める薬剤(Alda-1)が、アルコール摂取後の食道上皮におけるDNA障害を抑制する効果を有するか検討した。本研究ではヒトと同一のALDH2遺伝子変異(Glu504Lys)をノックインしたマウス(ALDH2*2マウス)を作成した。同マウスにAlda-1を投与し、肝組織中のALDH2活性を測定すると、Alda-1投与によりALDH2活性は有意に改善した。同マウスにAlda-1とともに10%アルコールを7日間飲酒させ、食道上皮に生じるDNA障害を測定すると、アルコール摂取により食道上皮に生成するDNA障害は有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道発がんにおいてアセトアルデヒドは重要な発癌物質の一つであり、本研究結果により、ALDH2活性化剤を用いて、アルコール飲酒後の食道DNA傷害を軽減できたという結果は、将来の食道発がん予防に関する研究の重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the protective effects of Alda-1, a small molecule ALDH2 activator, on alcohol-mediated esophageal DNA damage. Here, we generated novel genetically engineered knock-in mice that express the human ALDH2*1 (wild-type allele) or ALDH2*2 gene (mutant allele). Those mice were crossed, and human ALDH2*1/*1, ALDH2*1/*2, and ALDH2*2/*2 knock-in mice were established. They were given 10% ethanol for 7 days in the presence or absence of Alda-1, and we measured the levels of esophageal DNA damage, represented by DNA adduct (N2-ethylidene-dG). Alda-1 significantly increased hepatic ALDH2 activity both in human ALDH2*1/*2 and/or ALDH2*2/*2 knock-in mice, and reduced esophageal DNA damage levels after alcohol drinking. These results indicate the protective effects of Alda-1-mediated ALDH2 activation on esophageal DNA damage levels in individuals with ALDH2 gene polymorphism,

研究分野：消化器内科

キーワード：食道癌 食道扁平上皮癌 アセトアルデヒド 発癌 ALDH2 ALDH2遺伝子多型 ALDH2活性化 Alda-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルコール飲酒は食道扁平上皮癌における重要なリスク因子である。特にアルコールの代謝産物であるアセトアルデヒドは DNA 傷害、染色体異常、また蛋白構造や機能に影響を及ぼし、発がんに関与すると考えられている。またアセトアルデヒドの代謝酵素である ALDH2 遺伝子に変異を有するヒトは、アセトアルデヒド代謝機能の低下から、飲酒後の高アセトアルデヒド血症をきたし、これも食道扁平上皮癌における重要なリスク因子の一つである。このように、ALDH2 遺伝子保有者のアルコール飲酒は、食道発がんのリスクを高めるが、これらの病態に関する発がん予防法は確立されていない。我々は、ALDH2 酵素活性を上昇させるような薬剤が、アルコール摂取に起因する食道 DNA 傷害を抑制し、食道発がん抑制に貢献するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ALDH2 酵素活性を改善する低分子化合物 Aida-1 に着目し、アセトアルデヒド代謝機能低下に起因する食道発がん予防法を確立するための基盤研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト変異型 ALDH2(ALDH2*2) ノックインマウスの作成:

ヒト ALDH2 遺伝子変異と同一の遺伝子変異 (ALDH2 遺伝子の第 12 エクソン 114 番目塩基の G から A への 1 塩基置換により成熟タンパク質中 504 番目アミノ酸をグルタミン酸 (GAA) から リジン (AAA) に置換したもの) ノックインマウスを作成する。同マウスは、内在性のマウス *Aldh2* 遺伝子をヒト変異型 *ALDH2* 遺伝子に置換するよう遺伝子組み換えされたマウスで、ヒト変異型 ALDH2 により ALDH2 酵素活性が低下しているという点において、ヒトの ALDH2 遺伝子多型の病態を忠実に再現するモデルマウスと考えられる。本マウスの作製の工程は主に以下の 4 つの工程、すなわち、相同組み換えベクターの構築 (相同組み換え領域のクローニング、クローニング産物と薬剤耐性遺伝子の組み合わせによる相同組み換えベクターの構築、およびコントロールベクターの作製)、組み換え ES 細胞株の樹立 (ES 細胞株へのトランスフェクション、薬剤耐性 ES クローンのピックアップ、PCR によるスクリーニング、相同組み換え ES クローンの樹立)、キメラマウスの作製、F1 ヘテロマウスの作製 で行う。コントロールとして、ヒト正常型 ALDH2(ALDH2*1) 遺伝子をノックインしたマウスを作成した。この方法で ALDH2*1/*1 マウス、ALDH2*2/*2 マウスが作成できる。さらに ALDH2*1/*1 ノックインマウスと ALDH2*2/*2 ノックインマウスを交配し、ALDH2*1/*2 ノックインマウスを作成した。

作成したマウスの ALDH2 のジェノタイプを PCR 法で、ALDH2 活性を肝臓組織から抽出したタンパクを用いて蛍光法で測定した。

(2) ヒト変異型 ALDH2(ALDH2*2) ノックインマウスに対する Aida-1 投与:

Aida-1 投与後のアセトアルデヒド代謝能を評価するため、ALDH2 野生型および ALDH2 変異遺伝子ノックインマウスに Aida-1 を投与した後、肝臓中の ALDH2 酵素活性を蛍光法で測定した。

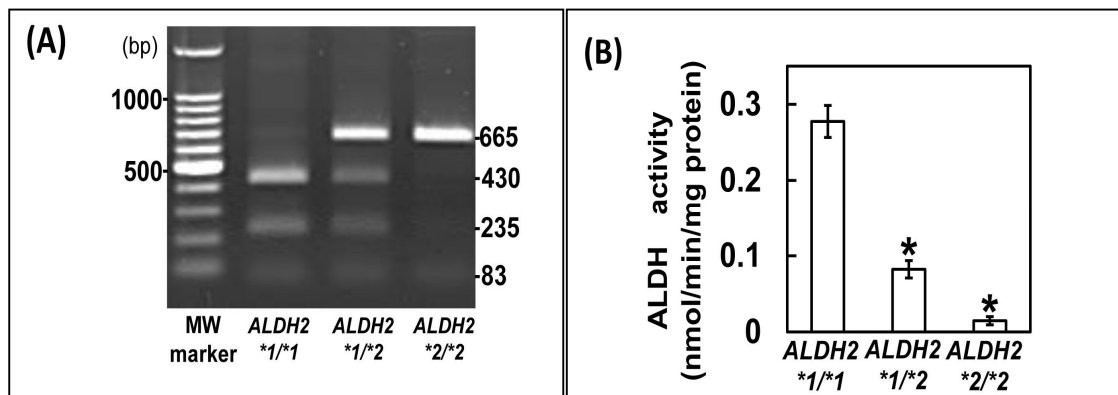
(3) 変異型 ALDH2 ノックインマウスに対するエタノール及び Aida-1 投与後の DNA 障害の評価:

Aida-1 を 20mg/kg の濃度で 1 日 1 回皮下注射、これを 14 日間繰り返し、剖検後、食道組織を回収し、食道組織中 DNA アダクト (*N*²-ethylidene-dG) 値測定を行った。

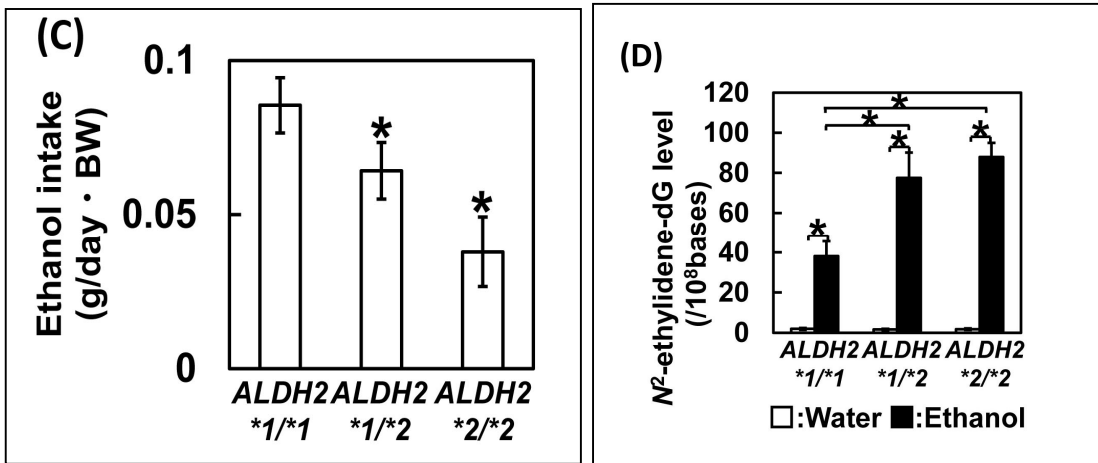
食道組織中の *N*²-ethylidene-dG レベル測定は、食道組織からの DNA 抽出、DNA の定量および限外ろ過による DNA の脱塩処理、DNA の消化、液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: LC/MS/MS) による解析の手順で行った。

4. 研究成果

(1) ヒト変異型 ALDH2(ALDH2*2) ノックインマウスの作成:



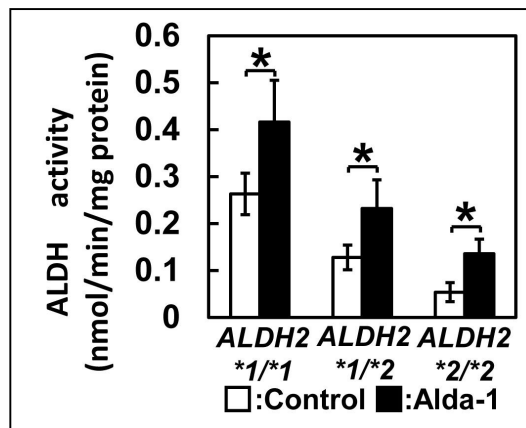
- (A) マウスの尾より DNA を抽出し、PCR 法で genotype を確認した。
 (B) 各マウスの ALDH2 活性を測定すると、ALDH2*1/*2, ALDH2*2/*2 ノックインマウスは ALDH2*1/*1 マウスと比較し、有意に ALDH2 活性が低下していた。



C) 各マウスに 10% アルコールを飲酒させ、1 日平均摂取量を比較した。ALDH2 活性値に相応し、ALDH2*1/*2 マウス、ALDH2*2/*2 マウスは、ALDH2*1/*1 マウスと比較し、1 日平均飲酒量は有意に低下した。

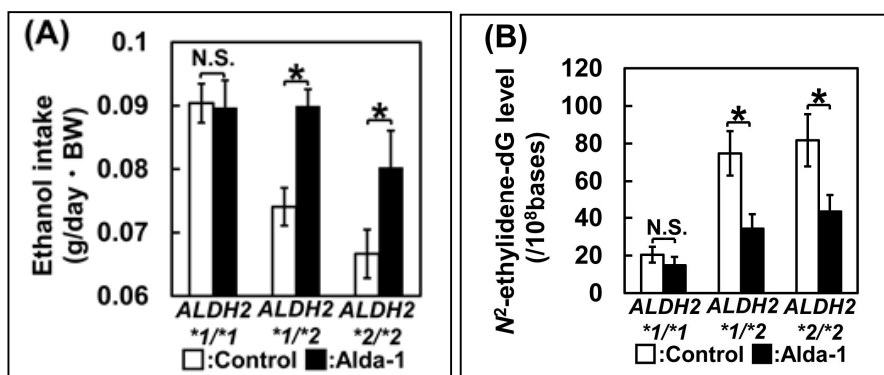
(D) 各マウスに 10% アルコールを 7 日間飲酒させた後の食道 DNA アダクト測定を行った。各マウス群において、アルコール飲酒により DNA アダクト値は有意に上昇した。また、C に示したように、ALDH2*1/*2 マウス、ALDH2*2/*2 マウスは ALDH2*1/*1 マウスより 1 日飲酒量が低下しているにもかかわらず、ALDH2 活性の低下により、食道組織中 DNA アダクト値は、ALDH2*1/*1 マウスより ALDH2*1/*2 マウス、ALDH2*2/*2 マウスのほうが有意に高かった。

(2) ALDH2*1/*2, ALDH2*2/*2 ノックインマウスに対する Alda-1 投与：



各マウスに Alda-1 を 20mg/kg の濃度で腹腔内投与し、3 時間後の ALDH2 活性を測定したところ、すべてのマウス群で ALDH2 活性は Alda-1 投与により有意に上昇した。ALDH2*1/*2 のマウス群の ALDH2 活性は Alda-1 投与により、ALDH2*1/*1 のマウス群の無治療時と同等のレベルまで上昇した。

(3) 変異型 ALDH2 ノックインマウスに対するエタノール及び Alda-1 投与後の DNA 障害の評価：



- (A) Alda-1 投与後の 1 日飲酒量の変化を測定した。Alda-1 投与により、ALDH2*1/*2 マウス、ALDH2*2/*2 マウスの 1 日飲酒量は有意に増加した。
- (B) Alda-1 投与の下、10%エタノールを 7 日間飲酒した後の、食道 DNA アダクト値を測定した。ALDH2*1/*2 マウス、ALDH2*2/*2 マウスにおいて、Alda-1 投与群は、コントロール群と比較し、(1 日飲酒量は増加したが、ALDH2 活性の回復により) 食道 DNA アダクト値が有意に低下した。

以上の結果より、ALDH2 活性化促進剤は ALDH2 機能の低下した個体において、飲酒後の食道組織に誘導される食道 DNA 傷害を有意に軽減させることが明らかとなった。本研究成果は、今後の食道発がん予防研究の重要な知見となりうると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Hirohashi K, Ohashi S, Amanuma Y, Nakai Y, Ida T, Baba K, Mitani Y, Mizumoto A, Yamamoto Y, Kikuchi O, Matsubara J, Yamada A, Miyamoto S, Seno H, Matsuda T, Muto M. Protective effects of Alda-1, an ALDH2 activator, on alcohol-derived DNA damage in the esophagus of human ALDH2*2(Glu504Lys) knock-in mice. *Carcinogenesis* 2019, in press. 査読有、doi: 10.1093/carcin/bgz091
2. Mizumoto A, Ohashi S, Kamada M, Saito T, Nakai Y, Baba K, Hirohashi K, Mitani Y, Kikuchi O, Matsubara J, Yamada A, Takahashi T, Lee H, Okuno Y, Kanai M, Muto M. Combination treatment with highly bioavailable curcumin and NQO1 inhibitor exhibits potent antitumor effects on esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Gastroenterology*. 査読有、2019. doi: 10.1007/s00535-019-01549-x
3. Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M. Molecular mechanisms of acetaldehyde-mediated carcinogenesis in squamous epithelium. *Int J Mol Sci*. 査読有、18(9):2017, E1943. doi: 10.3390/ijms18091943.
4. Yoshioka M, Ohashi S, Ida T, Nakai Y, Kikuchi O, Amanuma Y, Matsubara J, Yamada A, Miyamoto S, Natsuzaka M, Nakagawa H, Chiba T, Seno H, Muto M. Distinct effects of EGFR inhibitors on epithelial-and mesenchymal-like esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 査読有、36(1) : 2017, 101. doi: 10.1186/s13046-017-0572-7.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kenshiro Hirohashi, Shinya Ohashi, Yusuke Amanuma, Yukie Nakai, Shin'ichi Miyamoto, Tomonari Matsuda, Manabu Muto. Protective effects of Alda-1, an ALDH2 activator, against alcohol-derived DNA damage in the esophagus of human ALDH2*2 (Glu504Lys) knock-in mice: activating aldehyde dehydrogenase 2 decreases DNA damage in the esophagus of mice that consume alcohol. Digestive Disease Week and the 118th annual meeting of the American Gastroenterological Association, McCormick Place, Chicago, May 6-9 (May 8), 2017 Poster presentation.
2. Ayaka Mizumoto, Shinya Ohashi, Kenshiro Hirohashi, Yukie Nakai, Junichi Matsubara, Masashi Kanai, Manabu Muto. Anti-tumor effect of Theracurmin®, highly bioavailable curcumin, for esophageal squamous cell carcinoma. Digestive Disease Week and the 118th annual meeting of the American Gastroenterological Association, McCormick Place, Chicago, May 6-9 (May 8), 2017 Poster presentation (Poster of Distinction).

3. Kenshiro Hirohashi, Shinya Ohashi, Yusuke Amanuma, Yukie Nakai, Shin'ichi Miyamoto, Tomonari Matsuda, Manabu Muto: ALDH2 inactivation due to cyanamide exacerbates DNA damage in the esophagus of mice that consume alcohol. Digestive Disease Week and the 117th annual meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, May 21-24, 2016 Poster presentation
4. Kenshiro Hirohashi, Yusuke Amanuma, Shinya Ohashi, Yukie Nakai, Shin'ichi Miyamoto, Hiroshi Nakagawa, Tomonori Matsuda, Manabu Muto: p53-dependent senescence contribute to suppress proliferation of esophageal epithelial cells with acetaldehyde-derived DNA damage. Digestive Disease Week and the 117th annual meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, May 21-24, 2016 Poster presentation
5. 廣橋研志郎、大橋真也、武藤学：アルコール摂取による食道上皮 DNA 傷害と ALDH2 活性を制御する薬剤の発がん予防薬としての可能性について パネルディスカッション 9-2 第 103 回日本消化器病学会総会 2017.4.20-22 京王プラザホテル(東京) 4.21
6. 馬場希一郎、大橋真也、天沼裕介、廣橋研志郎、松原淳一、松田知成、武藤学 エタノール投与後マウスにおける食道組織内 DNA アダクト (N2-ethylidene-dG) の動態 第 71 回日本食道学会学術集会 2017.6.15-16, 軽井沢プリンスホテル、2017.6.15(木)ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。