

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17047

研究課題名（和文）アセトアルデヒド曝露により誘発される突然変異パターンの同定

研究課題名（英文）Identification of mutation patterns induced by acetaldehyde exposure

研究代表者

玉置 将司（Tamaoki, Masashi）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00796948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：正常ヒト食道由来食道上皮細胞へのフラスコ内でのアセトアルデヒド（AA）非曝露と曝露について、全ゲノム解析（各条件：1フラスコから2サンプル）を行ったところ、全ゲノム領域の変異数は平均1243.5、1644.5であった。さらに、約11カ月水またはエタノール投与野生型マウス、および約8カ月水またはエタノール投与Aldh2KOマウスの食道上皮細胞の全ゲノム解析（各群：3匹から計6サンプル）を行い、全ゲノム領域の変異数は平均1852.2、1572.3、および959.8、1042.7であった。シグネチャー解析では、AA曝露との関連が示唆される突然変異パターンの同定に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国際がん研究機関（WHO-IARC）は、アルコール飲料に関連するアセトアルデヒドを食道の明らかな発がん物質として認定している。本研究では、食道上皮がアセトアルデヒドに曝露されることにより誘導される突然変異パターンの同定に至っておらず、更なる検討が必要であるが、今回の結果は、食道発がんの機序解明を目的として検討を進める上で重要な意義をもつと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In whole genome analysis of the normal human esophageal epithelial cells unexposed or exposed to acetaldehyde in flask (each condition: 2 samples from 1 flask), the average number of mutations in the whole genome region were 1243.5 and 1644.5. Furthermore, whole genome analysis was performed on the esophageal epithelium cells of about 11 months water-fed or ethanol-fed wild-type mice, and about 8 months water-fed or ethanol-fed Aldh2 knockout mice (each group: total 6 samples from 3 mice). The average number of mutations in the whole genome region were 1852.2, 1572.3, and 959.8, 1042.7. Mutation pattern considered an association with acetaldehyde exposure could not be identified by signature analysis.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：アセトアルデヒド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道がんは、世界で年間約 100 万人が罹患し約 65 万人が死亡する難治がんである。食道癌には扁平上皮がんと腺がんが 2 大組織型であるが、本邦含め世界的にも、多くは扁平上皮がんであり、国際がん研究機構(WHO-IARC)は、“アルコール飲料に関連するアセトアルデヒド”を食道の“明らかな”発がん物質として認定している。アルコール飲料に含まれるエタノールは、胃および小腸から吸収されたあと、肝細胞内のミトコンドリアに局在するアルコール脱水素酵素によりアセトアルデヒドへ代謝され、アセトアルデヒド脱水素 2 型酵素 (Acetaldehyde dehydrogenase2: *ALDH2*)により酢酸に分解される。アセトアルデヒドは様々な DNA 傷害、遺伝子変異、染色体異常などを誘発し発がんに関与する(1)。

*ALDH2*には遺伝子多型(野生型:*ALDH2**1、変異型:*ALDH2**2)があり、日本人の約 40%は *ALDH2**2 遺伝子をもつ。*ALDH2**2 保有者のアセトアルデヒド代謝能は正常者の約 10~50%と低く、*ALDH2**1/*2 型保有のアルコール多飲者では食道がんのリスクが 6.2 倍となる(2)。一方、次世代シーケンズの技術進歩により、様々ながんにおける遺伝子異常の全体像が解明されている。近年では喫煙と強く関連する突然変異パターンが同定されており、実際に培養細胞をたばこ由来の発がん物質で処理すると、ヒトのがんで見られた突然変異パターンと非常に類似した突然変異パターンが誘発されることが証明されている(3)。アルコール摂取に関連した発がんについて、東アジアの食道扁平上皮がんの統合解析の結果において、アルコール多飲者において ApTpN→ApCpN の突然変異パターンが明らかに多く、日本人においても *ALDH2**1/*2 型保有のアルコール多飲者で同変異パターンが多いことが報告されている(4)。この突然変異パターンは、イギリスのサンガー研究所から報告されている COSMIC シグネチャーの中でもシグネチャー16 の突然変異パターンとして報告されており(5)、喫煙に関係するシグネチャー4、紫外線に関係するシグネチャー7と並び、strand bias が認められることから、何らかの環境因子の曝露が原因であることが示唆される。また、日本人における肝がんの全エクソン解析では、一般的に女性に比べ飲酒量の多い男性においてシグネチャー16 が高頻度に認められている(6)。さらに、我々の研究グループでもアルコール摂取に関連した食道発がんに関し、飲酒および喫煙歴といった発がんリスクの高いヒトにおいてシグネチャー16 が多いことを報告している(7)。アルコール摂取に関連した発がんにおいて、疫学的にエタノールの代謝産物であるアセトアルデヒドが食道がんの重要な危険因子であるとされ、また上述の通り臨床検体を用いた解析でもアルコール摂取に関連するシグネチャー(突然変異パターン)についての知見が集積しているにも関わらず、アセトアルデヒドにより誘発された突然変異と考えられるかどうかは証明されていない。

2. 研究の目的

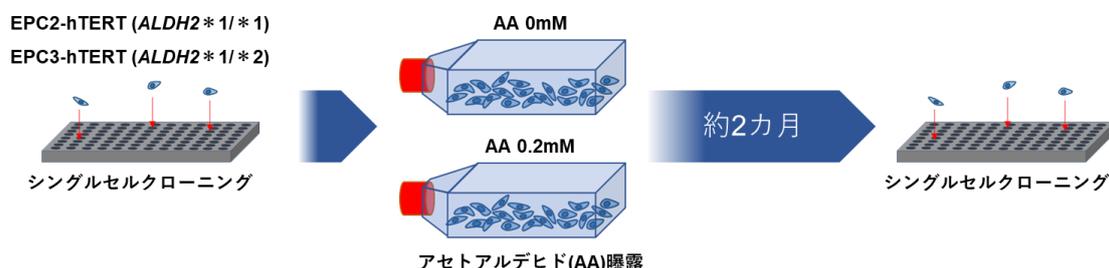
「食道上皮にアセトアルデヒドを曝露することにより誘導される突然変異パターンを明らかにすること」を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) *In vitro* 実験では、正常ヒト食道から樹立された食道上皮細胞 (EPC2-hTERT) および *ALDH2**1/*2 遺伝子多型保有者から樹立された食道上皮細胞 (KEPC-HE1-hTERT (現在は名称を変更し EPC3-hTERT)) を使用した。EPC2-hTERT、KEPC-HE1-hTERT とともにヘテロな集団であると考えられたため、EPC2-hTERT、KEPC-HE1-hTERT から限界希釈法を用いてそれぞれシングルセルクローニングして得た細胞を使用した。

EPC2-hTERT を用い、密封したフラスコ内で約 2 カ月間アセトアルデヒド (AA) 曝露 (AA0mM、AA0.2mM) を行い、シングルセルクローニングしたのち DNA を抽出し、EPC2-hTERT のアセトアルデヒド非曝露 (AA0mM) 細胞 (1 フラスコから 2 サンプル) とアセトアルデヒド曝露 (AA0.2mM) 細胞 (1 フラスコから 2 サンプル) について全ゲノム解析を行った。

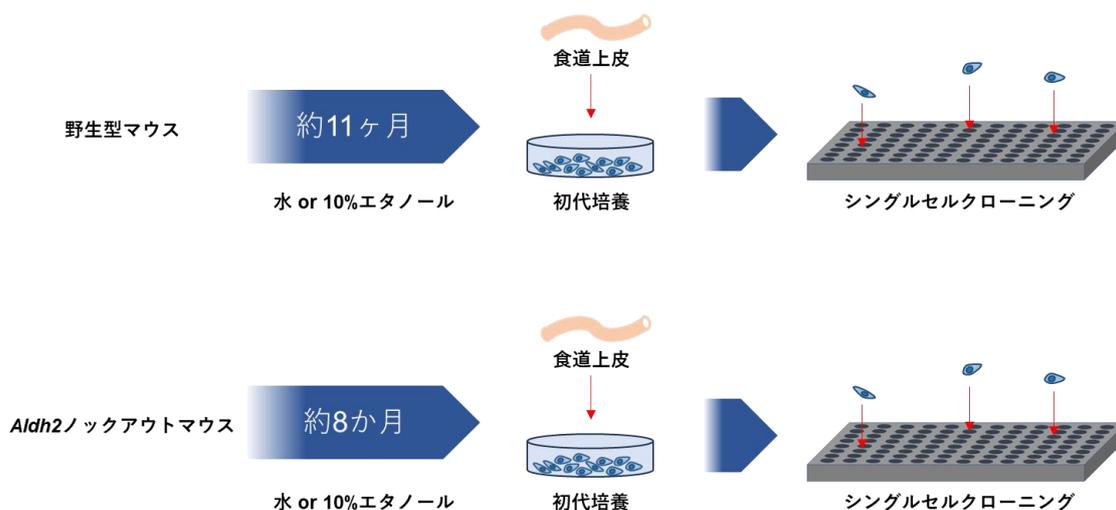
KEPC-HE1-hTERT について、密封したフラスコ内で約 2 カ月間アセトアルデヒド曝露 (AA0mM、AA0.2mM) を行い、シングルセルクローニングしたのち DNA を抽出した。KEPC-HE1-hTERT のアセトアルデヒド曝露 (AA0.2mM) 細胞 (1 フラスコから 2 サンプル) について全ゲノム解析を行った。KEPC-HE1-hTERT のアセトアルデヒド非曝露 (AA0mM) 細胞については解析に至っていない。(下図)



当初、他の *ALDH2**1/*2 遺伝子多型保有者から樹立された食道上皮細胞 (KEPC-HE2-hTERT (現在は名称を変更し EPC4-hTERT)) も用いて検討する予定であったが、アセトアルデヒド長期曝露に不耐でありサンプル回収が困難であった。

Mutational Patterns を用いてシグネチャー解析を行った。

2) In vivo 実験では、当初、マウス食道上皮からパンチバイオペシーデバイスを用いてサンプルを採取する予定であったが、クローニングの効率が悪いことが判明したため、クローニング効率を高めるために微小サンプルの回収の工程は省略し、限界希釈法を用いたシングルセルクローニング法を用いてサンプルを採取することとした。生後 11 週間以内のマウスを用いた。野生型マウスに約 11 カ月間水もしくは 10%エタノールを経口投与し、食道上皮細胞を初代培養し、シングルセルクローニングした。DNA を抽出後、水投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) およびエタノール投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) について全ゲノム解析を行った。また、*Aldh2* 機能を欠失させた *Aldh2* ノックアウトマウスにおいても約 11 カ月間水もしくは 10%エタノールを経口投与したが、十分なサンプルを得られなかったため、エタノール投与期間を短くして *Aldh2* ノックアウトマウスに約 8 カ月間水もしくは 10%エタノールを投与し、食道上皮細胞を初代培養したのち、シングルセルクローニングした。DNA を抽出後、水投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) およびエタノール投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) について全ゲノム解析を行った。(下図)



Mutational Patterns を用いてシグネチャー解析を行った。

4. 研究成果

1) EPC2-hTERT のアセトアルデヒド非曝露細胞 (1 フラスコから 2 サンプル) とアセトアルデヒド曝露細胞 (1 フラスコから 2 サンプル) について、全ゲノム領域の変異数は平均 1243.5、1644.5、全エクソン領域の変異数は平均 11、11 であった。

KEPC-HE1-hTERT のアセトアルデヒド曝露細胞については、アセトアルデヒド非曝露細胞との比較ができていない。

また、シグネチャー解析では、アセトアルデヒド曝露との関連が示唆される突然変異パターンの同定に至らなかった。

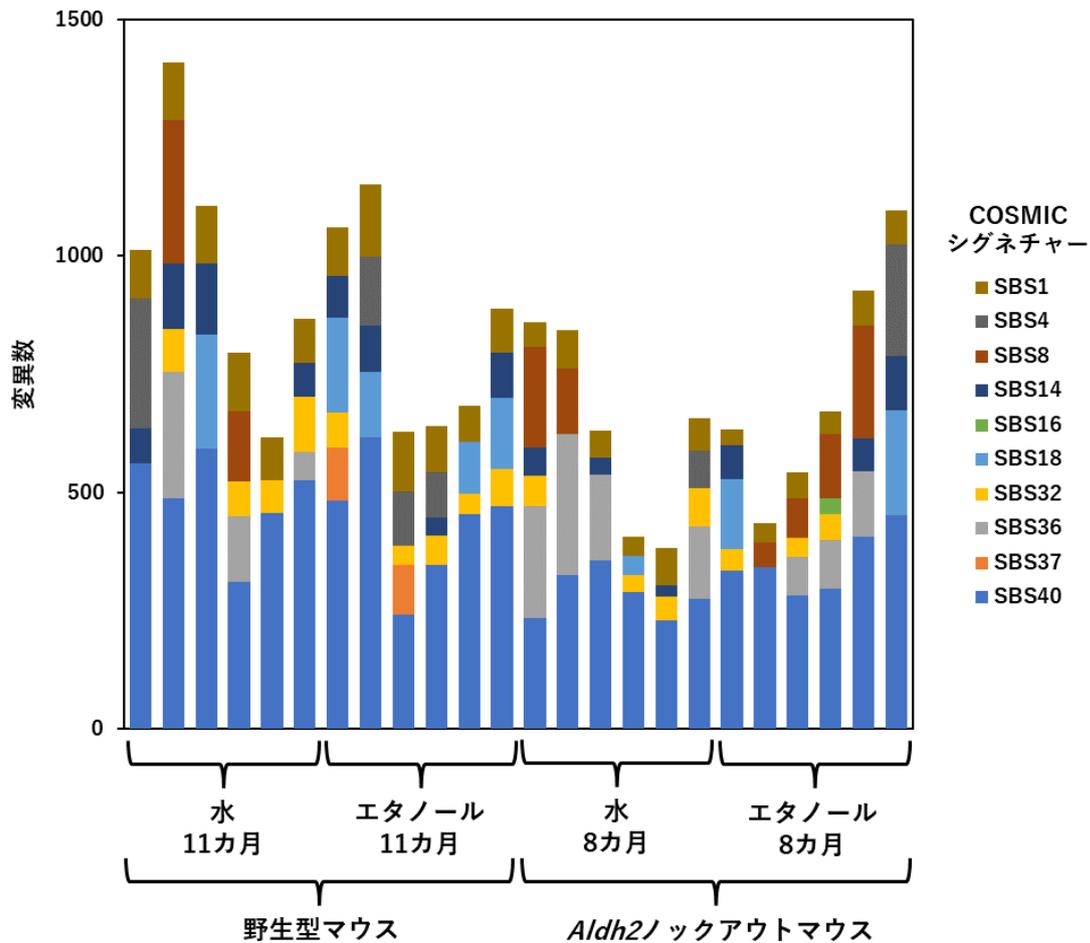
今後はアセトアルデヒドの曝露条件を改良し、さらに長期間のアセトアルデヒド曝露による遺伝子変異を検討する必要がある。

2) 野生型マウスの 11 カ月水投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル)、11 カ月エタノール投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) における全ゲノム領域の変異数はそれぞれ平均 1852.2、1572.3、全エクソン領域の変異数は平均 13.7、41 であった。

Aldh2 ノックアウトマウスの 8 カ月水投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル)、8 カ月エタノール投与群 (マウス 3 匹から計 6 サンプル) における全ゲノム領域の変異数はそれぞれ平均 959.8、1042.7、全エクソン領域の変異数は平均 10.7、12.3 であった。

また、シグネチャー解析では、アセトアルデヒド曝露との関連が示唆される突然変異パターンの同定に至らなかった (下図)。

今回、*Aldh2* ノックアウトマウスにおいては 11 カ月間エタノール投与後の検討が困難であったため、8 カ月間エタノール投与後に解析に用いている。今後は *Aldh2* ヘテロマウスを用いてさらに長期間のエタノール投与モデルを作成し、解析することも必要と考えられる。



<引用文献>

1. Matsuda T, Matsumoto A, Uchida M, et al. Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2-knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 2363-6.
2. Cui R, Kamatani Y, Takahashi A, et al. Functional variants in ADH1B and ALDH2 coupled with alcohol and smoking synergistically enhance esophageal cancer risk. *Gastroenterology*. 2009; 137: 1768-75.
3. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 2016; 354: 618-622.
4. Chang J, Tan W, Ling Z, et al. Genomic analysis of oesophageal squamous-cell carcinoma identifies alcohol drinking-related mutation signature and genomic alterations. *Nat Commun*. 2017; 8: 15290.
5. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013; 500: 415-21.
6. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014; 46: 1267-73.
7. Yokoyama A, Kakiuchi N, Yoshizato T, et al. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature*. 2019; 565: 312-317.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------