

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310043

研究課題名 (和文) アルデヒド脱水素酵素が生体内酸化ストレスに及ぼす影響評価

研究課題名 (英文) Evaluation of effects of aldehyde dehydrogenase on oxidative stress

研究代表者

櫻田 尚樹 (KUNUGITA NAOKI)

国立保健医療科学院・生活環境部・部長

研究者番号：90178020

研究成果の概要 (和文) : *Aldh2* ノックアウトマウス (*Aldh2* KO) を用いて、アルデヒド曝露時、あるいは無処理時の影響を評価した。その結果、*Aldh2* KO マウスにおいてアルデヒド曝露により体細胞突然変異頻度の有意な高値を認めた。また無処置状態においても *Aldh2* KO マウスにおいては野生型マウス (*Aldh2* WT) に比べ尿中 8-OHdG レベルが増加しており、さらに変異原性試験においても *Aldh2* WT マウスに比べ高値を示していた。これらのことは *Aldh2* KO マウスにおいては何らかの内因性の酸化ストレスの増加が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) metabolizes acetaldehyde produced from ethanol into acetate and plays a major role in the oxidation of acetaldehyde in vivo. Half of Japanese have inactive ALDH2. In order to investigate the mutagenicity of acetaldehyde, micronucleus (MN) assay and T cell receptor (*TCR*) gene mutation assay were performed in *Aldh2* KO mice and wild type (*Aldh2* WT) mice exposed to acetaldehyde or ethanol in vivo. We also observed the urine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), hemoglobin-associated acetaldehyde (Hb-AA), and mutation on tRNA gene of mitochondrial DNA. In results, frequencies of micronuclei in reticulocytes significantly increased by acetaldehyde exposure in *Aldh2* KO mice, but not in *Aldh2* WT mice. In addition, frequencies of micronuclei, *TCR* mutation, and 8-OHdG levels in urine were significantly high in *Aldh2* KO mice than in *Aldh2* WT mice even in control groups. These results indicate that *Aldh2* plays a major role not only in acetaldehyde detoxification but also in oxidative stress in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：衛生・公衆衛生学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・環境物質影響化学

キーワード：アルデヒド脱水素酵素、酸化ストレス、ヘモグロビン付加体、*Aldh2* ノックアウトマウス、アセトアルデヒド、ミトコンドリア DNA、体細胞突然変異

1. 研究開始当初の背景

我々は、代謝酵素に関する遺伝子多型と各種バイオマーカーや生体影響の関係について長年研究を行ってきた。しかし、種々の有害物質をヒトに曝露して研究することは倫理的に許されるものではない。そこで日本人を含む東洋人に多いアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) の欠損多型の生体影響を動物実験で評価するために世界に先駆け *Aldh2* ノックアウト (*Aldh2* KO) マウスを作成することに成功した (FEBS Lett, 476, 306-311, 2000)。一方最近他研究室からの報告で、ALDH2 活性の欠損が、晩期発症型アルツハイマー発症のリスクを増加させることや、糖尿病性神経障害の発症などに関与する可能性が報告されてきた。また、細胞内エネルギー工場ともいえるミトコンドリア機能の障害と老化現象の関連は、酸化ストレスとの関連から関心が持たれ幅広く研究が進められてきている。これらのことより、ALDH2 は内因性の酸化ストレスにおいても重要な役割を果たしていると推察し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)は主にアルコール代謝に関与する酵素として広く認識されている。日本人の約半数には *ALDH2* 遺伝子多型変異による ALDH2 活性の欠損のため、飲酒による気分不良を訴える人がおり、さらに飲酒による発がんリスクが高まる可能性が報告されている。このように ALDH2 活性は、主に飲酒の生体影響を評価する上で問題視されてきたが、ヒト以外のお酒を飲まない生物にもこの酵素は幅広く分布しており、生体内においてはアルデヒドの解毒以外にも、本来の役割として何らかの作用、たとえば生体内酸化ストレス応答などに関連するのではないかと考えられ、その影響を検討した。

3. 研究の方法

われわれが作成した *Aldh2* KO マウスおよび *Aldh2* WT 野生型マウスを用いて、アルデヒド曝露時、あるいは無処理時の酸化ストレス指標として以下の検討を行った。

(1) 代表的な酸化ストレスマーカーである尿中の 8-hydroxydeoxy-guanosine (8-OHdG) を ELISA 法で測定し、両系統で比較した。

(2) T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子突然変異および網状赤血球小核頻度の解析：われわれが開発した手法で、フローサイトメーター (FACS) を用い、TCR 遺伝子突然変異を検出する系により、*Aldh2* WT マウスおよび *Aldh2* KO マウスにおける、自然突然変異頻度

の蓄積の比較を行った。あわせて網状赤血球小核頻度を FACS にて解析した。

(3) ミトコンドリア DNA (MtDNA) における突然変異の検出：定法に従い DNA を抽出し、われわれが開発した MtDNA 上の全 tRNA 領域を増幅する各 PCR プローブセットにて DHPLC (Denaturing high-performance liquid chromatography) 法を実施し老化に伴う内因性の MtDNA 中の突然変異蓄積の有無を比較検討した。

(4) アセトアルデヒド・ヘモグロビン付加体測定：アセトアルデヒド曝露時 (腹腔内投与、あるいは 125、500ppm 濃度で 1 日 24 時間、10 日間の連続経気道曝露) のヘモグロビン付加体量 (Hb-AA) を HPLC により分離定量し観察した。

4. 研究成果

(1) 8-OHdG：無処置の状態において、尿中 8-OHdG 濃度は、*Aldh2* KO マウスにおいて *Aldh2* WT 野生型マウスに比べ有意に高値を示した。

(2) TCR 遺伝子突然変異および網状赤血球小核頻度：無処置の状態において、TCR 遺伝子突然変異および末梢赤血球中の小核頻度は、*Aldh2* KO マウスにおいて *Aldh2* WT 野生型マウスに比べ有意に高値を示した。さらにアルデヒド曝露においては、*Aldh2* WT 野生型マウスでは増加を認めなかったが、*Aldh2* KO マウスにおいてのみ末梢赤血球中及び網状赤血球中の小核頻度、TCR 遺伝子突然変異頻度の増加を観察した。

(3) MtDNA における突然変異の検出：無処置 62~66 週齢のマウス肝臓より DNA を抽出し、DHPLC 法により MtDNA 中の突然変異蓄積の差異を比較検討した結果では、老化に伴う内因性酸化ストレスにより突然変異蓄積が認められことを仮定したが、両マウスに有意な相違は観察されなかった。

(4) アセトアルデヒド・ヘモグロビン付加体 (Hb-AA) 測定：①アセトアルデヒド 300mg/kg を腹腔内投与後、Hb-AA は速やかな増加を認め、その後 *Aldh2* WT では半減期 350 分で減衰したのに対し、*Aldh2* KO では 957 分とゆるやかに減衰を認めた。②アセトアルデヒド 10 日間経気道曝露後、*Aldh2* WT マウスにおいて 125ppm 曝露群では Hb-AA 濃度の増加は観察されなかったが、500ppm 曝露群では、コントロール、125ppm 曝露群に対して有意に高値を示した。さらに *Aldh2* KO

マウスでは *Aldh2* WT マウスに比し有意に高値を示した。

以上のように *Aldh2* KO マウスにおいてはアルデヒドあるいはエタノール曝露により各種変異原性試験において *Aldh2* WT マウスに比し有意に高い影響が観察され、ALDH2 酵素活性欠損者における飲酒による発がんリスクの増加が示唆された。また無処置状態においても *Aldh2* KO マウスにおいては野生型マウスに比べ尿中 8-OHdG レベルが増加しており、さらに小核頻度および TCR 突然変異頻度においても野生型マウスに比べ高値を示していた。近年、この *Aldh2* KO マウスを用いた他施設の研究により、ALDH2 がミトコンドリアにおける ROS 産生に関与し、加齢に伴う血管損傷の防護にきわめて重要な働きをしていることが報告されている (Wenzel P et al, Cardiovascular Research (2008) 80, 280-289)。

これらのことはアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) が、アルデヒド類の代謝に加えて、生体内の酸化ストレスの防護において重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Win-Shwe TT, Kunugita N, Yamamoto S, Arashidani K & Fujimaki H. Strain differences influence N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene expression in olfactory bulb of an allergic mouse model following toluene exposure. Neuroimmunomodulation 2010; 17(5): 340-347. 査読有
- ② Yu HS, Oyama T, Isse T, Kitakawa K, Ogawa M, Pham TT & Kawamoto T. Characteristics of aldehyde dehydrogenase 2 (*Aldh2*) knockout mice. Toxicol Mech Methods. 2009; 19(9): 535-540. 査読有
- ③ Yamamoto S, Tin Tin Win S, Yoshida Y, Kunugita N, Arashidani K & Fujimaki H. Suppression of Th1- and Th2-type immune responses in infant mouse spleen after prenatal and postnatal exposure to low-level toluene and peptidoglycan. Inhalation toxicology 2009; 21(9): 793-802. 査読有
- ④ Yoshida Y, Liu J, Sugiura T, Ishidao T, Ueno S, Yanagita H, Fueta Y, Kunugita N, Hori H & Yamashita U. The indoor air pollutant 2-ethyl-hexanol activates CD4 cells. Chemico-biological interactions 2009; 177(2):137-141. 査読有

- ⑤ Kunugita N, Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, Kinaga T & Kawamoto T. Increased frequencies of micronucleated reticulocytes and T-cell receptor mutation in *Aldh2* knockout mice exposed to acetaldehyde. The Journal of toxicological sciences 2008; 33(1): 31-36. 査読有
- ⑥ Kunugita N, Mei N, Goncharova T & Norimura T. Measurement of mutant frequency in T-cell receptor (TCR) gene by flow cytometry after X-irradiation on EL-4 mice lymphoma cells. The Journal of toxicological sciences 2007; 32(4): 377-386. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 藤巻秀和、Tin Tin Win-Shwe、櫻田尚樹、吉田安宏、嵐谷奎一、低濃度トルエン曝露によるマウス肺の炎症反応修飾と TLR4 の役割 第 80 回日本衛生学会学術総会 平成 22 年 5 月 9-11 日 仙台市
- ② 吉田安宏、Ding Ning、野口順子、櫻田尚樹、杉浦勉、STAT5 is activated in formaldehyde-exposed mice. 第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会 平成 21 年 10 月 29-31 日 秋田市
- ③ Y. Yoshida, N. Ding, J. Liu, J. Noguchi, T. Sugiura, N. Kunugita., Formaldehyde inhalation activates signal transducer and activator of transcriptopn 5 in thymocytes. 2nd European Congress of Immunology 平成 21 年 9 月 13-16 日 ベルリン、ドイツ
- ④ Tin Tin Win Shwe, N. Kunugita, S. Yamamoto, K. Arashidani, H. Fujimaki, Effect of perinatal toluene exposure at different developmental phases on memory function-related gene expressions in mouse brain 第 50 回大気環境学会年会 平成 21 年 9 月 16-18 日 横浜市
- ⑤ 櫻田尚樹, Tin Tin Win Shwe, 山元昭二, 吉田安宏, 嵐谷奎一, 藤巻秀和, マウス系統差で探るトルエン曝露に対する免疫系感受性要因 第 50 回大気環境学会年会 平成 21 年 9 月 16-18 日 横浜市
- ⑥ 小山倫浩、一瀬豊日、PHAM Thi Thu Phuong、山口哲右、松本明子、市場正良、櫻田尚樹、永吉晴奈、松田知成、川本俊弘、アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウスの臓器内 DNA アダクト 第 82 回日本産業衛生学会 平成 21 年 5 月 20-22 日 福岡市
- ⑦ 小山倫浩、一瀬豊日、PHAM Thi Thu Phuong、山口哲右、櫻田尚樹、永吉晴

- 奈、松田知成、川本俊弘、エタノール摂取によるアルデヒド脱水素酵素2ノックアウトマウスの生存率とDNA障害 第8回分子予防環境医学研究会 平成21年1月23-24 東京
- ⑧ Kunugita N, Yoshida Y, Oyama T, Isse T, Kawamoto T & Arashidani K. Measurement of Hb-associated acetaldehyde in *Aldh2* knockout mice exposed to acetaldehyde JEMS2008 平成20年10月 宜野湾市
- ⑨ 小山倫浩、一瀬豊日、Pham, TTP., 山口哲右、櫻田尚樹、川本俊弘、エタノール摂取によるAldh2ノックアウトマウスの生存率は低下するか？ 第26回産業医科大学学会総会 平成20年10月北九州市
- ⑩ 櫻田尚樹、吉田安宏、山元昭二、藤巻秀和、嵐谷奎一、マウス系統差で探る低濃度有機化合物に対する感受性要因—免疫系— 大気環境学会 平成20年9月金沢市
- ⑪ 藤巻秀和、Tin-Tin-Win-Shwe、山元昭二、塚原伸治、櫻田尚樹、嵐谷奎一、マウス系統間差で探る低濃度有機化合物に対する感受性要因—神経成長因子— 大気環境学会 平成20年9月金沢市
- ⑫ Matsui, Y., Kunugita, N., Arashidani, K., Uchiyama, I., Determination of Formaldehyde Hemoglobin Adducts in Mice as a Biological Exposure Index for Multiple Chemical Sensitivity, Indoor Air 2008,平成20年8月Copenhagen, Denmark
- ⑬ 小山倫浩、一瀬豊日、Pham, TTP., 山口哲右、櫻田尚樹、川本俊弘、エタノール摂取によるアルデヒド脱水素酵素2ノックアウトマウスの生存率 平成20年度日本産業衛生学会九州地方会 平成20年7月北九州市
- ⑭ 櫻田尚樹、嵐谷奎一、小山倫浩、一瀬豊日、川本俊弘、アルデヒド脱水素酵素2ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒド曝露時のヘモグロビン付加体量的変化 第81回日本産業衛生学会 平成20年6月札幌市
- ⑮ 川本俊弘、小山倫浩、一瀬豊日、市場正良、松本明子、王瑞生、小川真規、圓藤陽子、櫻田尚樹、北川恭子、遺伝子多型の動物モデルを用いた解析から個人の医療・予防への展望「公募シンポジウム13：個の医療、個の健康増進をめざして」、第78回日本衛生学会総会 平成20年3月 熊本市
- ⑯ Kunugita, N., Mittelstaedt, RA., Von Tunglen, LS., Beland, FA., Heflich, RH., Mitochondrial DNA Sequence Variants in

Mice Treated Transplacentally with AZT. 38th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society 平成19年10月 アトランタ、アメリカ

- ⑰ 小山倫浩、一瀬豊日、PHAM Thi Thu Phuong, 小川真規、山口哲右、木長健、八嶋康典、尾崎真一、松本明子、市場正良、櫻田尚樹、川本俊弘、アルデヒド脱水素酵素2ノックアウトの呼吸器系組織におけるアセトアルデヒド感受性 第80回日本産業衛生学会 平成19年4月 大阪市
- ⑱ 櫻田尚樹、佐藤房枝、嵐谷奎一、アセトアルデヒド経気道曝露による生体影響評価 第80回日本産業衛生学会 平成19年4月 大阪

〔図書〕(計2件)

- ① Matsui Y, Kunugita N, Arashidani K & Uchiyama I: Determination of formaldehyde hemoglobin adducts in mice as a biological exposure index for multiple chemical sensitivity. In: Proceedings of Indoor Air 2008, Copenhagen, Denmark; 2008: Paper ID: 47. 査読有
- ② Kunugita N, Arashidani K, Yamato H, Tanaka I, Nakashima T & Kikuta A: Evaluation of formaldehyde exposure during a gross anatomy dissection course. In: Proceedings of the 6th International Conference on Indoor Air Quality, Ventilation & Energy Conservation in Buildings (IAQVEC2007). vol. II. Sendai, Japan; 2007: 609-616. 査読有

6. 研究組織

- (1)研究代表者
櫻田 尚樹 (KUNUGITA NAOKI)
 国立保健医療科学院・生活環境部・部長
 研究者番号：90178020
- (2)研究分担者
 吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)
 産業医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10309958
川本 俊弘 (KAWAMOTO TOSHIHIRO)
 産業医科大学・医学部・教授
 研究者番号：60177748
- (3)連携研究者
 ()
 研究者番号：