

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：37116  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008 ～ 2012  
 課題番号：20590620  
 研究課題名（和文）*Aldh2*欠損マウスを用いたアルコールによる扁平上皮癌発生メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of the development mechanism of the alcohol and acetaldehyde-induced squamous-cell-carcinoma by using *Aldh2* deficient mice.

### 研究代表者

尾崎 真一 (OZAKI SHINICHI)  
 産業医科大学・医学部・非常勤助教  
 研究者番号：70412632

研究成果の概要（和文）：*Aldh2*欠損マウスにアセトアルデヒドを皮下投与することで、肉眼的観察可能な表皮に扁平上皮癌を発生させる。この表皮に発生した扁平上皮癌を分子生物学的・病理学的に検討することで ALDH2 不活性型の人に高頻度に発症する口腔・咽頭癌や食道癌などの発癌メカニズムを考察し、この癌の治療や予防に応用する。

研究成果の概要（英文）：The outer skin can be observed simply. Therefore we administered acetaldehyde to the *Aldh2*-deficient mice subcutaneously. Squamous cell carcinomas occurred on the back skins of the *Aldh2*-deficient mice and we examined them molecular biologically and pathologically.

It is well known that the *Aldh2*-deficient individuals should have greater risks of the incidence of the oropharyngeal or the esophageal cancer by drinking.

We apply this result to the medical treatment and the prevention of cancers.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒、*Aldh2*欠損マウス、癌、アルコール

#### 1. 研究開始当初の背景

国民一人当たりのアルコール消費量は 30 年前の 1.5 倍に漸増し、現在では約 240 万人以上の人が純アルコールに換算して 150mL 以上（日本酒 6 合程度）を毎日摂取する時代となった。さらに、1987 年以降、アルコール性疾患による医療費は一兆円を上回っている。また、慢性飲酒による障害は、アルコール依存

症などの精神的疾患から就業不能状態や家庭崩壊などの社会的問題を含んでいるだけでなく、慢性飲酒によって癌やビタミン不足による身体的アルコール関連疾患を発症させる身体的問題をも含んでいる (Oyama *et al.*, 2005)。厚生労働省から通知された「21 世紀における国民健康づくり運動（健康日本 21）」においても「アルコール（飲酒）」はひ

とつ分野として挙げられており、アルコール性臓器障害を予防することは社会的・医学的に重要な課題となっている。

エタノールから酢酸への代謝においてアセトアルデヒドを酢酸に代謝するアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 2 が最も重要な役割を担っている (Oyama *et al.*, 2005)。近年、ヒトでは *ALDH2* 遺伝子多型により ALDH2 活性が大きく変動することが明らかになった (Chen *et al.*, 2005)。野生型の *ALDH2* 遺伝子のホモ接合体の人では酵素活性を認めるが (ALDH2 活性型)、日本人の約半数を占める変異型 *ALDH2* 遺伝子のヘテロ接合体やホモ接合体では ALDH2 が不活性化している (ALDH2 不活性型) (Oyama *et al.*, 2005)。この ALDH2 不活性型の人では飲酒により顔面紅潮や心悸亢進などのフラッシング反応を示すだけでなく、口腔・咽頭癌や食道癌などの扁平上皮癌を有意に発症しやすいことが疫学的に明らかにされている (Morita *et al.*, 2005)。さらに、ALDH2 活性型の人において ALDH2 は肝臓に発現しているだけでなく食道上皮にも発現しており、食道上皮内 ALDH2 活性は食道癌発症の重要な防御因子であることを我々は報告した (Oyama *et al.*, 2005)。しかし、ヒトに対するアルコールによる発癌実験は不可能であるうえに、レトロスペクティブに ALDH2 不活性型と ALDH2 活性型の人々のアルコールによる扁平上皮癌を比較検討することも非常に困難である。

## 2. 研究の目的

現在まで *ALDH2* 遺伝子の多型により ALDH2 が不活性となっている人では実験が困難であるため、扁平上皮癌の発症メカニズムの報告は少ない (Morita *et al.*, 2005)。今回、動物実験モデルを用いることで *ALDH2* 遺伝子影響による扁平上皮癌発症のメカニズムを分子生物学・病理学的に検討して、アルコールによる扁平上皮癌発症予防へ応用するため、次のような研究を立案した。

## 3. 研究の方法

約 1 年間 (5 日間連続投与後 2 日間の投与休止を繰り返す投与方法) 皮下にアセトアルデヒドとエタノールを投与することで、次の群のマウスを作製した。

A. 6 匹の野生型マウスと 5 匹の *Aldh2* 欠損マウスに 100mg/kg 体重 (LD50 の 1/5 量に相当) のアセトアルデヒドを皮下投与 (アセトアルデヒド投与群)。

B. 6 匹の野生型マウスと 5 匹の *Aldh2* 欠損マウスに 1g/kg 体重 (アセトアルデヒド投与量の 10 倍で、ヒトでは日本酒 600mL 程度に相当) のエタノールを皮下投与 (エタノール投与群)。

## 4. 研究成果

(1) A、B のマウスの体重の変動を検討した結果、A、B ともに野生型マウスに比べ *Aldh2* 欠損マウスで平均体重の減少傾向を認めた。

(2) マクロ写真像と投与部位における皮膚病変 (潰瘍、びらんや発疹など) の範囲を長軸×短軸で記録した結果、A の *Aldh2* 欠損マウス 1 例 (1/5) に投与 3 ヶ月後より表皮を進展する潰瘍を伴った腫瘍発症を認めた (図 1)。この腫瘍部では病理組織学的検査の結果、構造異型と細胞異型を認めたため、扁平上皮癌と診断され、免疫染色法により p53 発現陽性と判定した。さらに、シークエンス法により判定した結果、コドン 346 に A から G への transition 変異を有し、p53 タンパクはグルタミン酸からグリシンへの変異をおこすマウス p53 遺伝子点突然変異と判定された。



図 1 潰瘍を伴う腫瘍

*Aldh2* 欠損マウスにアセトアルデヒドを皮下投与することで肉眼的観察可能な表皮に扁平上皮癌を発生させることが可能である (出願番号: 2003-350407)。このため本研究は ALDH2 不活性型の人々の扁平上皮癌発症のメカニズムの解明と扁平上皮癌の治療面への応用や扁平上皮癌発症の予防法の開発に次の点でインパクトを持って有効性を示すことが可能である。

- ①動物モデルによる扁平上皮癌治療薬の効果判定、扁平上皮癌治療薬の開発。
- ②ALDH2 不活性型の人々がアルコールにより扁平上皮癌を発生するメカニズムの解明。
- ③ALDH2 活性の有無に基づいた口腔・咽頭癌や食道癌などの扁平上皮癌発症の正確な予想。
- ④ALDH2 不活性型の人々に対する食道癌などの扁平上皮癌発症に対する適切な生活習慣指導。
- ⑤食道癌などの扁平上皮癌発症予防による医療費の軽減。
- ⑥食道癌などの扁平上皮癌発症予防により国民の医療福祉を大きく推進。

## 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14件)

①Oyama T, Uramoto H, Kagawa N, Yoshimatsu T, Osaki T, Nakanishi R, Nagaya H, Kaneko K, Muto M, Kawamoto T, Tanaka F, Gotoh A. Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer related to exogenous chemical metabolism. *Front Biosci* S4:1539-1546, 2012. 査読有

②Yu H-S, Oyama T, Matsuda T, Isse T, Yamaguchi T, Tanaka M, Tsuji M, Kawamoto T. The effect of ethanol on the formation of N<sup>2</sup>-ethylidene-dG adducts in mice: implications for alcohol-related carcinogenicity of the oral cavity and esophagus. *Biomarkers* 17: 269-274, 2012 DOI: 10.3109/1354750X.2012.666675. 査読有

③Gu CD, Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Iwanami T, Nakagawa M, Oyama T, Tanaka F. Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* 31:1141-1146, 2011. 査読有

④Oyama T, Nagayoshi H, Matsuda T, Oka M, Isse T, Yu HS, Pham TTP, Tanaka M, Kagawa N, Kaneko K, Kawamoto T. Effects of acetaldehyde inhalation in mitochondrial aldehyde dehydrogenase deficient mice (*Aldh2*<sup>-/-</sup>). *Front Biosci (Elite Ed)* 2:1344-1354, 2010. 査読有

⑤Oyama T, Kagawa N, Sugio K, Uramoto H, Hatano O, Harada N, Kanako K, Kawamoto T, Yasumoto K. Expression of aromatase CYP19 and its relationship with parameters in NSCLC. *Front Biosci* 14: 2285-2292, 2009. 査読有

⑥Matsumoto A, Kawamoto T, Mutoh F, Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Nakayama KI, Ichiba M. Effects of 5-week ethanol feeding on the liver of *aldehyde dehydrogenase 2* knockout mice. *Pharmacogenet Genom* 18: 847-852, 2008 DOI: 10.1097/FPC.0b013e328307a0a9. 査読有

⑦Kunugita 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. *J Toxicol Sci* 33: 31-36, 2008. 査読有

⑧Oyama T, Sugio K, Isse T, Matsumoto A, Nose N, Uramoto H, Nozoe T, Morita M, Kagawa N, Osaki T, Muto M, Yasumoto K, Kawamoto T. Expression of Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer. *Front Biosci* 13: 5787-5793, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

①小山倫浩、浦本秀隆、下川秀彦、宗知子、花桐武志、宗哲哉、吉松隆、長屋寿雄、大崎敏弘、中西良一、後藤章暢、田中文啓、安元公正. Cytochrome P450 (CYP) and p53 immunoreactivity in breast cancer. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、札幌

②小山倫浩、余旭勝、辻真弓、田中政幸、松田知成、浦本秀隆、田中文啓、川本俊弘. The survivals and body weight variations of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋

③小山倫浩, Pham Thi-Thu-Phoung, 余旭勝, 田中政幸、永吉晴奈、松田知成、川本俊弘. N<sup>2</sup>-ethylidene-dG DNA adducts in organs of *Aldh2* knockout mice treated with acetaldehyde inhalation. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪

④小山倫浩, Pham Thi-Thu-Phoung, 余旭勝, 田中政幸、永吉晴奈、若松めぐみ、松田知成、川本俊弘. N<sup>2</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosine DNA adducts in liver and lung of *Aldh2* knockout mice treated with acetaldehyde inhalation. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜

⑤湯河良之、堀貴美子、江副康正、松田知成、小山倫浩、荒井さゆり、黒沢きよ子、蓼沼克嘉、武藤学、千葉勉. ALDH2ノックアウト(KO)マウスを用いたアルコール腹腔内投与による臓器アセトアルデヒド分布とDNAアダクトの検討. 第62回日本食道学会学術集会、2008年6月21日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 真一 (OZAKI SHINICHI)  
産業医科大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号: 70412632

### (2) 研究分担者

小山 倫浩 (OYAMA TSUNEHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 00309965

(3) 研究分担者

川本 俊弘 (KAWAMOTO TOSHIHIRO)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60177748

(4) 研究分担者

後藤 章暢 (GOTOH AKINOBU)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70283885

(5) 研究分担者

一瀬 豊日 (ISSE TOYOHI)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80341494