

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590917

研究課題名(和文)アセトアルデヒドによる扁平上皮発がん機序の解明と予防医学への応用

研究課題名(英文) Research on the mechanism of acetaldehyde related esophageal carcinogenesis and clinical application for prevention

研究代表者

武藤 学 (MUTO, Manabu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40360698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アセトアルデヒドが食道扁平上皮のDNA損傷を起こし、DNA修復タンパクであるp53のリン酸化を起こすとともに、細胞老化を引き起こすことを明らかにした。アセトアルデヒド暴露によるDNA損傷の程度は、食道上皮の前がん病変である異型上皮の発生程度と相関することも見いだした。ALDH2タンパクの発現を低下させる(すなわち活性を低下させる)と、DNA損傷が増加することも示した。アセトアルデヒドの長期暴露により、食道扁平上皮の分化過程(角化)は変化し、異型上皮に類似したような基底細胞および傍基底細胞の核の極性のみだれ、空胞化、錯角化を来すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that acetaldehyde exposure in vitro causes acetaldehyde derived DNA adducts formation in the esophageal squamous epithelium, phosphorylation of p53 protein and cellular senescence. In human, the extent of DNA damage induced by acetaldehyde exposure was also correlated with the degree of change in the esophageal precancerous dysplasia. Inhibition of ALDH2 expression by siRNA increased DNA damage. Long-term exposure of acetaldehyde to the esophageal squamous epithelium in vitro affected esophageal squamous differentiation (keratinization), and caused confusion of polarity of nuclei of basal or parabasal cell, ballooning and parakeratotic changes, it was similar to the dysplastic squamous epithelium.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：癌 臨床 アルコール

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌、頭頸部癌は難治性癌であり、早期発見、予防が望まれる。また、食道癌、頭頸部癌の主な組織型は扁平上皮癌で、飲酒・喫煙が2大危険因子とされてきたが、癌化のメカニズムは明らかにされていない。なかでも、アルコール代謝酵素であるアルデヒド脱水素酵素2型(ALDH2)の低活性型では、エタノール代謝産物であるアセトアルデヒドの蓄積が食道癌、頭頸部癌の原因に寄与していると考えられているが、なぜ摂取されたアルコールが肝臓で代謝された後に食道・頭頸部の発癌につながるのかは不明な点が多い。

2. 研究の目的

国際がん研究機関(IARC)は、エタノール代謝産物であるアセトアルデヒドが、食道・頭頸部の扁平上皮癌の明らかな発癌物質と認定している。しかし、アセトアルデヒドがどのようにこれらの発癌に関与しているかは、いまだ十分解明されていない。本研究は、食道扁平上皮におけるアセトアルデヒド暴露によるDNA損傷、遺伝子発現異常を検討し、癌発生のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とする。さらにその成果を、発癌予防と早期発見、そして創薬に役立たせることも目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道粘膜におけるアセトアルデヒド由来DNAアダクトと異型上皮の関連性の検討

アセトアルデヒドに由来するDNアダクトを質量分析器(LC/MS/MS)にて測定する。食道内の異型上皮の程度は、以下のようにヨード染色で評価する。

Grade A : ヨード不染を認めない。

Grade B : AとBの間。

Grade C : 1視野に大小不同のヨード不染を10カ所以上認める。



(2) ヒト食道正常扁平上皮におけるアセトアルデヒド暴露後の細胞内分子と形態的变化の検討

ヒト食道正常扁平上皮(HEEC)を培養し、アセトアルデヒド暴露によるp53経路の変化を検討する。形態変化は、細胞老化をSABGアッセイで検討する。

(3) ALDH2 活性低下におけるアセトアルデヒド由来DNAアダクトの変化の検討

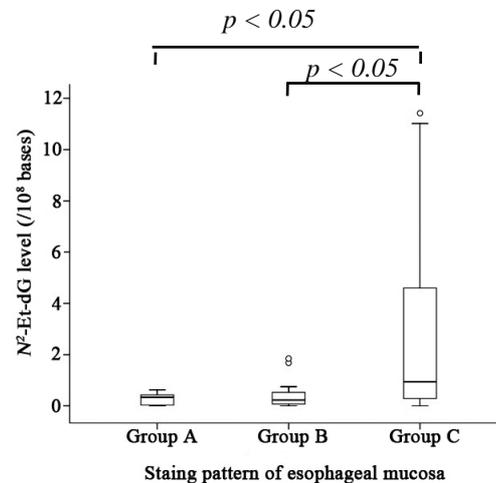
hTERT(ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 Human telomerase reverse trasncriptase)を導入

して不死化させたヒト食道正常扁平上皮(EPC2-hTERT)を用いて siRNA にて ALDH2 ノックアウトにおけるアセトアルデヒド暴露後の DNA アダクト量を野生型 ALDH2 の EPC2-hTERT と比較検討する。

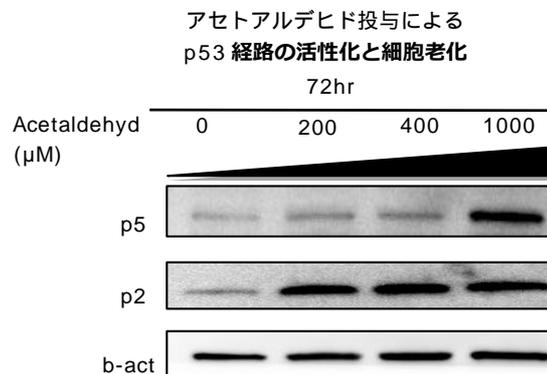
(4) 長期的アセトアルデヒド暴露ヒト食道正常扁平上皮細胞における形態変化の検討  
ヒト食道正常扁平上皮(EPC2-hTERT)を用いて、長期的アセトアルデヒド暴露の組織構築の変化を、繊維芽細胞との共培養による3次元培養で検討する。具体的には、組織学的に重層化構造を形成し、基底細胞、傍基底細胞、角化細胞と分化する過程で、アセトアルデヒドを暴露しない細胞と比較して暴露群がどのような形態変化をおこすかを3次元培養を用いて検討する。

4. 研究成果

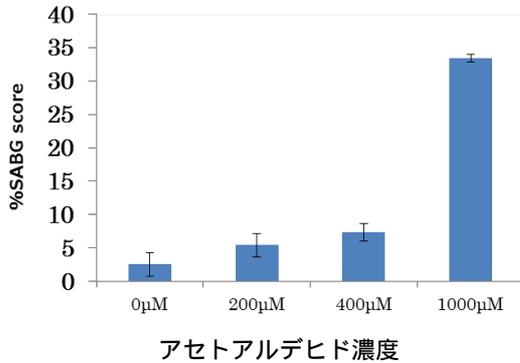
(1) ヒト食道粘膜において前がん病変である異型上皮が多発している Grade C の粘膜では、Grade A および Grade B の粘膜と比較して、明らかに DNA 由来のアセトアルデヒド N2-Et-dG が高値を示した。



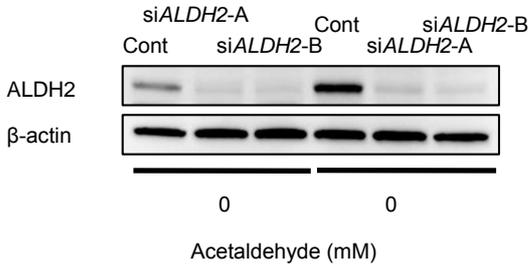
(2) アセトアルデヒド暴露により濃度依存的に p53 および p21 のリン酸化がおきることを明らかにした。



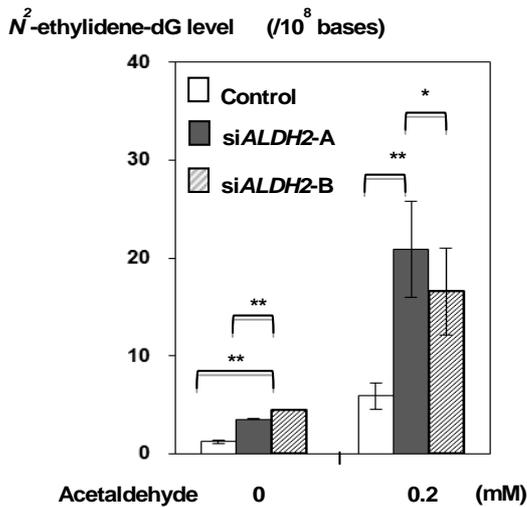
SABG アッセイにおいては、アセトアルデヒド暴露により濃度依存性に細胞老化が起きることを明らかにした。



(3) siRNA により ALDH2 発現が低下することを確認した。



siRNA により ALDH2 の発現を抑制すると、アセトアルデヒド暴露による DNA アダクトが増加することを明らかにした。

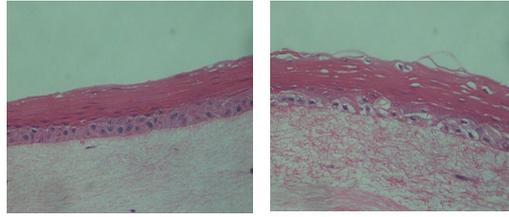


4) アセトアルデヒドの長期暴露により、細胞分化は極性が乱れ、錯角化を来した。また基底細胞の核の極性も乱れるようになった。傍基底細胞には空胞化が目立つようになった。

アセトアルデヒド暴露

40 日間後の 3D 培養

アセトアルデヒド暴露なし    アセトアルデヒド暴露あり



## 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 11 件)

Seiji Ishikawa, Ichiro Tateya, Takahiro Hayasaka, Noritaka Masaki, Shigeru Hirano, Morimasa Kitamura, Manabu Muto, Shuko Morita, Mitsutoshi Setou, Juichi Ito. Phosphatidylcholine with arachidonic acid was increased in the submucosal microinvasive region of hypopharyngeal carcinoma. Cancer science. 2014 (in press) 査読有

Kataoka Kozo, Aoyama Ikuo, Mizusawa Junki, Eba Junko, Minashi Keiko, Yano Tmonori, Tanaka Masaki, Hanaoka Noboru, Katayama Hiroshi, Takizawa Kohei, Fukuda Haruhiko and Manabu Muto, on behalf of the Gastrointestinal Endoscopy Study Group(GIESG)of the Japan Clinical Oncology Group. A randomized controlled Phase II/III study comparing endoscopic balloon dilation combined with steroid injection versus radial incision and cutting combined with steroid injection for refractory anastomotic stricture after esophagectomy: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1207. Jpn J Clin Oncol. 2015 Apr;45(4):385-9. doi: 10.1093/jjco/hyv006. Epub 2015 Jan 27. 査読有

Katada C, Muto M, Tanabe S, Higuchi K, Sasaki T, Azuma M, Ishido K, Katada N, Sakuramoto S, Yamashita K, Masaki T, Nakayama M, Okamoto M, Koizumi W. Factors associated with the presence of multiple Lugol-voiding lesions in patients with esophageal squamous-cell carcinoma. Dis Esophagus. 2014 Jul;27(5):457-62. doi:10.1111/j.1442-2050.2012.01429.x. 査読有

Ichiro Tateya, Shuko Morita, Manabu

Muto, Shinichi Miyamoto, Tomomasa Hayashi, Makiko Funakoshi, Ikuo Aoyama, Shigeru Hirano, Morimasa Kitamura, Seiji Ishikawa, Yo Kishimoto, Mami Morita, Patnarin Mahattanasakul, Satoshi Morita, Juishi Ito. Magnifying endoscope with NBI topredict the depth of invasion in laryngo-pharyngeal cancer. *Laryngoscope*. 2014 Nov 24. doi: 10.1002/lary.25035. [Epub ahead of print] 査読有  
Yoshiyuki Yukawa, Shinya Ohashi, Yusuke Amanuma, Yukie Nakai, Mihoko Tsurumaki, Osamu Kikuchi, Shin'ichi Miyamoto, Tsunehiro Oyama, Toshihiro Kawamoto, Tsutomu Chiba, Tomonari Matsuda, Manabu Muto. Impairment of aldehyde dehydrogenase 2 increases accumulation of acetaldehyde-derived DNA damage in the esophagus after ethanol ingestion. *Am J Cancer Res*. 4(3):279-284. 2014 .  
<http://www.ajcr.us/> 査読有  
Shinya Ohashi, Osamu Kikuchi, Mihoko Tsurumaki, Yukie Nakai, Daisuke Kuriyama, Hiroi Kasai, Takahiro Horimatsu, Shin'ichi Miyamoto, Akira Shimizu, Tsutomu Chiba, Manabu Muto, Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*.9(8):e103126. doi: 10.1371/journal.pone.0103126. eCollection 2014. 査読有  
Yoko Mashimo, Yasumasa Ezoe, Kosuke Ueda, Yoshinao Ozaki, Yusuke Amanuma, Ikuo Aoyama, Takahiro Horimatsu, Shuko Morita, Shinichi Miyamoto, Tomonori Yano, Koji Higashino, Tsutomu Chiba, Manabu Muto. Salvage photodynamic therapy is an effective and safe treatment for patients with local failure after definitive chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Therapy (JCT)*. 5(7):647-656.2014.  
DOI:10.4236/jct.2014.57073 査読有  
Takeshi Setoyama, Shinichi Miyamoto, Takahiro Horimatsu, Shuko Morita, Yasumasa Ezoe, Manabu Muto, Go Watanabe, Eiji Tanaka, Tsutomu Chiba. Multimodal endoscopic treatment for delayed severe esophageal stricture caused by incomplete stent removal. *Dis Esophagus*. 27(2):112-115.2014.  
DOI:10.1111/dote.12041 査読有  
Yoshiyuki Yukawa, Manabu Muto, Yusuke Amanuma, Yasumasa Ezoe, Yoko Mashimo,

Kimiko Hori, Takahiro Horimatsu, Shuko Morita, Shinichi Miyamoto, Sashiko Minamiguchi, Tsutomu Chiba. Elimination of esophageal multiple precancerous lesions by chemotherapy: potential chemoprevention of metachronous multiple cancer development after curative treatment. *Esophagus*. 9(4):203-209.2012  
DOI 10.1007/s10388-012-0339-3. 査読有  
Yoshiyuki Yukawa, Manabu Muto, Kimiko Hori, Haruna Nagayoshi, Akira Yokoyama, Tsutomu Chiba, Tomonari Matsuda. Combination of ADH1B\*2/ALDH2\*2 polymorphisms alters acetaldehyde-derived DNA damage in the blood of Japanese alcoholics. *Cancer Sci*. 103(9):1651-1655. 2012  
doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02360.x. 査読有  
Kimiko Hori, Shin'ichi Miyamoto, Yoshiyuki Yukawa, Manabu Muto, Tsutomu Chiba, Tomonari Matsuda. Stability of acetaldehyde-derived DNA adduct in vitro. *Biochem a Biophys Res Commun*. 423(4):642-646. 2012  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.158. 査読有

[学会発表](計7件)

Yusuke Amanuma, Shinya Ohashi, Mihoko Tsurumaki, Yukie Nakai, Shin'ichi Miyamoto, Tsutomu Chiba, Hiroshi Nakagawa, Tomonari Matsuda, Manabu Muto. Induction of aldehyde dehydrogenase-2(Aldh-2) expression in esophageal epithelial cells suppresses the acetaldehyde-mediated DNA damage, *Digestive Disease Week2014 (DDW2014)*, Chicago Illinois USA, May 3rd-6th 2014  
Yusuke Amanuma, Shinya Ohashi, Manabu Muto. Aldehyde dehydrogenase-2 regulates esophageal epithelial cell senescence checkpoint functions activated by an alcohol metabolite. *Digestive Disease Week 2013 (AGA)*, Orland FL, May 18th 2013  
Shinya Ohashi, Osamu Kikuchi, Yasumasa Ezoe, Manabu Muto. "Regulation of chemotherapy resistance through epithelial-mesenchymal transition by Zinc finger E-box-binding proteins ZEB1 in esophageal squamous cell carcinoma" Poster Session. April 3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup> 2013 MD Anderson cancer Center / GAP conference in Houston, TX USA  
大橋 真也、天沼 祐介、鶴巻美穂子、中井由起恵、菊池 理 宮本 心一、千葉 勉、松田 知成、武藤 学。食道上皮におけるALDH2 発現誘導アセトアルデヒドに起因する

食道上皮傷害を制御する. 第 68 回日本食道学会学術集会 一般演題 ポスター38-1「実験1」第5会場(シンシア)東京ドームホテル(2014年7月3日)

天沼 裕介、大橋 真也、武藤 学. 食道扁平上皮におけるアルコール関連発癌機序の解明. 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム2(消化管癌の分子病態学に関する進歩)(2014年4月23日) 第8会場 東京国際フォーラム

天沼 裕介、大橋 真也、宮本 心一、千葉 勉、武藤 学. 食道扁平上皮で誘導されるALDH2はアセトアルデヒドによる細胞老化を制御する. 第67回日本食道学会学術集会 一般講演(口演)07-1(2013年6月14日) 大阪国際会議場

湯河 良之、江副 康正、松田 知成、武藤 学、千葉 勉. 食道におけるアセトアルデヒド由来 DNA 付加体蓄積と食道発癌の関係. 第66回食道学会日本食道学会学術集会 一般口演8 リサーチ (08-1)(2012年6月22日) 軽井沢プリンスホテル ウエスト

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 終末呼吸を利用する高精度なアルデヒド分解酵素活性遺伝子型判別方法、

発明者: 武藤 学、青山 育雄(京都大学)  
田中 克之、花田 真理子(エフアイエス株式会社)

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2013-227301

出願年月日: 2013年10月31日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武藤 学 (MUTO, Manabu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40360698

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし