

セトアルデヒド皮下投与開始4週間後の *Aldh2*^{-/-}における Cyp2e1 発現は低下傾向を示した。

【考察】

研究 3-1)の結果を Table3-I-1 にまとめて示す。

- *Aldh2*・Cyp2e1 ともに表皮に発現し、表皮局所においてアセトアルデヒド代謝に関与している可能性が示された。
- *Aldh2*^{+/+}においてアセトアルデヒドに曝露されることによって表皮局所の *Aldh2*・Cyp2e1 ともに発現が誘導される可能性が示された。
- アセトアルデヒドに曝露の有無に関わらず *Aldh2*^{+/+}に比べ *Aldh2*^{-/-}では表皮の Cyp2e1 発現は高値である可能性が示された。

ALDH2 活性型のヒトに比べ ALDH2 不活性型のヒトでは飲酒により食道癌や口腔・咽頭癌が有意に多く発症していることが疫学的調査で明らかになっている。しかし、それらの悪性腫瘍の臓器特異性を生じる原因については明らかにされていない。今回、扁平上皮においてアセトアルデヒド代謝酵素である *Aldh2*・Cyp2e1 が発現しておりアセトアルデヒド曝露により *Aldh2*・Cyp2e1 発現は誘導されることが示された。本研究結果は ALDH2 不活性型のヒトにおける扁平上皮癌発症に関する機序を解明する一助となることが考えられる。

Table3-I-1 「アセトアルデヒド皮下投与による表皮内 Aldh2・Cyp2e1 発現の変動— *Aldh2*^{+/+}と *Aldh2*^{-/-}の比較—」研究のまとめ

	<i>Aldh2</i> ^{+/+}		<i>Aldh2</i> ^{-/-}	
	コントロール群	アセトアルデヒド 4週間投与後	コントロール群	アセトアルデヒド 4週間投与後
免疫組織化学染色結果				
Aldh2	●	●●	—	—
Cyp2e1	●	●●	●	●●
ウェスタンブロット法結果				
Aldh2	●	▲	—	—
Cyp2e1	●	●●●	●●●●●	●●●●

● : *Aldh2*^{+/+}のコントロール群における発現量

(●●~●●●●●●●● : 野生型マウスのコントロール群における発現量より増加)

▲ : *Aldh2*^{+/+}のコントロール群における発現量より低下

3-II) アセトアルデヒド・エタノール皮下投与による発癌に関するパイロット研究
- *Aldh2*^{+/+}と *Aldh2*^{-/-}の比較-

【対象】

10週齢雄の *Aldh2*^{+/+}および *Aldh2*^{-/-}を対象とした。6匹の *Aldh2*^{+/+}と5匹の *Aldh2*^{-/-}にエタノール 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) を皮下に約1年間投与した (エタノール投与群)。また、6匹の *Aldh2*^{+/+}と5匹の *Aldh2*^{-/-}にアセトアルデヒド 100mg/kg 体重 (経口投与 LD50 の 1/5 量に相当) を皮下に約1年間投与した (アセトアルデヒド投与群)。

【方法】

エタノール投与群・アセトアルデヒド投与群ともに背部を 3cm×3cm 以上の範囲で剃毛し、エタノールとアセトアルデヒドは右側の背部表皮に投与し、生理食塩水を左側の背部表皮に投与した (Figure 3-II-1)。エタノールとアセトアルデヒドともに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で約一年間の慢性投与実験を行った。マウスは一回/週で体重を測定してマクロ写真を記録し、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。アセトアルデヒド皮下投与群5匹中一匹に背部表皮の表面を表皮に沿って進展する病変を認め (腫瘍発症マウス)、皮下投与開始4ヶ月後と5ヶ月後に病変部を生検した。Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による生検材料の病理標本を作成して病変部の病理学的変化を検討し、免疫組織化学染色法 (IHC) により病変部の p53 の発現も検出した。マウス p53 の IHC は1次抗体としてマウス、ラットやヒトに反応する goat polyclonal 抗体 (Santa Cruz, California, USA) を用いた。

病変部から Rneasy mini kit (QIAGEN, Tokyo) 用いて RNA を抽出し、First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham, Tokyo) により RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) を行なった。cDNA (complementary DNA) からは ABI PRISM™310 automated sequencer (PE biosystems, Tokyo) を用いて *p53* 遺伝子のシークエンスを行い、*p53* 遺伝子突然変異を検出した。

National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースによる C57BL/6J の *p53* 遺伝子のシークエンスを Table3-II-1 に示す。また、NCBI データベースによる C57BL/6J の *p53* 遺伝子の cDNA シークエンスを Table3-II-2 に示す。*p53* 遺伝子の cDNA シークエンスは Exon4 領域のプライマー-837U21 (CAGGGCAACTA TGGCTTCCAC) と Exon11 領域のプライマー-1678L2 (TGGTCAAGAA AGTGGGCCT) を用いた。Table3-II-3 には p53 タンパクに翻訳される cDNA 配列を示し、Table3-II-4 には p53 タンパクのアミノ酸配列を示す。

【結果】

体重と皮膚病変の変化については、*Aldh2*^{-/-}・エタノール投与群で投与 62 日後、*Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群で 103 日後、*Aldh2*^{+/+}・アセトアルデヒド投与群で 271 日後、*Aldh2*^{+/+}・エタノール投与群で 292 日後の各群一匹ずつ他病死（病死でない衰弱死）を認めた。各群の平均体重の変化を Figure3-II-2 に示す。Figure3-II-2 において他病死のため n が一匹減少した時期を矢印で示す。エタノールとアセトアルデヒド投与開始後 *Aldh2*^{+/+}・エタノール投与群に比べ *Aldh2*^{-/-}・エタノール投与群で平均体重の減少傾向を認め、*Aldh2*^{+/+}・アセトアルデヒド投与群に比べ *Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群で平均体重の減少傾向を認めた。Figure3-II-2 には投与 1 年後の体重の検定結果も示す。Figure3-II-3 には各群におけるマウス皮膚病変の長軸径 (mm) の平均値の変化を示す。*Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群で 1 例後に示す腫瘍発症を認め、実験開始 4 ヶ月以降はアセトアルデヒド投与中止としている。また、11 ヶ月以降は全身の皮膚に病変を認め、測定不能となった。腫瘍発症例の皮膚病変の長軸径の変化は独立して示す。*Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群で皮膚病変は投与 10 ヶ月後まで拡大傾向を認めたが、以後収縮している。また、各群の間に有意な差は認めなかった。

Figure3-II-4-(1)から(13)にはエタノールとアセトアルデヒド投与部の代表的な皮膚病変像を示す。*Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群として腫瘍発症マウスの病変像を示した。Figure 3-II-4-(1)で示したようにアセトアルデヒド投与早期より潰瘍を伴う病変を認める。投与 2 ヶ月後において、表皮表面を浸潤して進展する中心に潰瘍を有する病変を認める (Figure 3-II-4-(2))。投与 3 ヶ月後において、病変は後肢へと進展した (Figure3-II-4-(3))。投与 4 ヶ月後において、病変は後肢から前肢、腹部へと進展している (Figure3-II-4-(4))。投与 4 ヶ月後よりアセトアルデヒド投与は中止し、4 ヶ月後と 5 ヶ月後の 2 回病変部の生検を行い遺伝子変異の検討と、免疫不全マウスへの移植を行った (免疫不全マウスを用いた研究結果は次の III) において示す)。投与 5-7 ヶ月後で病変部は腹部方向へ進展した (Figure3-II-4-(5)~(7))。投与 8 ヶ月後において、病変は投与の反対側の後肢まで進展している (Figure3-II-4-(8))。投与 9 ヶ月後において、病変は陰囊まで進展し、睾丸が脱出した (Figure3-II-4-(9))。投与 10 ヶ月後において、病変は全腹部と四肢に進展し、頭部を除いて脱毛を著名に認めた (Figure3-II-4-(10))。投与 11 ヶ月後において、脱肛を認め (Figure3-II-4-(11))、全身の表皮に病変は進展したため病変の範囲の測定は不能と判定した。投与 12 ヶ月後において、頭部を除く全身に病変を認める (Figure3-II-4-(12))。この腫瘍発症マウスはアセトアルデヒド投与開始から 394 日後に死亡した。剖検により、明らかな転移巣は認めなかった。

Aldh2^{+/+}・エタノール投与群と *Aldh2*^{-/-}・エタノール投与群、*Aldh2*^{+/+}・アセトアルデヒド投与群はびらんや潰瘍を伴う病変は認めたが病変の拡大と縮小を繰り返し、進行性に増殖する病変は認めなかった。

Figure3-II-5 には腫瘍発症マウスにおける皮下投与 4 ヶ月後の皮膚生検所見を示す。腫瘍発症マウスの正常皮膚の生検から IHC による p53 発現異常を検討し (病変部のコントロール)、皮膚病変の生検から IHC による p53 発現異常とシークエンスによる p53 遺伝子異常の検出を行った。

Figure3-II-6には皮膚生検におけるHE染色とIHCの結果を示す。病変部では腫瘍胞巣内中央に角化巣を認め(cancer pearl様構造)、構造異型を疑う。大小不同のある腫瘍細胞は大きな核小体を有し、細胞異型を疑う。このため、皮膚病変部は高度異型上皮あるいは扁平上皮癌と診断された。正常皮膚のp53染色では角化層が非特異的に染色されているが、扁平上皮に明らかな陽性所見を認めない。一方、腫瘍細胞は腫瘍核が褐色に染色されておりp53発現陽性と判定した。

シークエンス法により判定したマウスp53遺伝子点突然変異をTable3-II-2とTable3-II-3に赤字で示す。コドン346にAからGへのtransition変異を認めた。Table3-II-4に示すように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と考えられる。

【考察】

- ・ エタノール投与群・アセトアルデヒド投与群ともに *Aldh2*^{+/+}に比べ *Aldh2*^{-/-}で体重減少傾向を認めた。
- ・ *Aldh2*^{-/-}・アセトアルデヒド投与群で皮膚表面を進展する腫瘍発症を20% (1/5) に認めた。
- ・ 腫瘍は構造異型と細胞異型を有し、腫瘍細胞はp53発現異常とp53遺伝子点突然変異を認めた。

ALDH2活性型のヒトに比べALDH2不活性型のヒトでは飲酒により食道癌や口腔・咽頭癌などの扁平上皮癌が有意に発症していることが疫学的調査で明らかになっている。本パイロット研究でもアセトアルデヒド投与により *Aldh2*^{-/-}においてp53変異を有する腫瘍発症を認めた。今後、本研究はALDH2不活性型のヒトにおいてアセトアルデヒドによる扁平上皮の悪性化のメカニズムを解明する一助となることが考えられる。

Table9-II-1 National Center for Biotechnology Information (NCBI)データベースによるマウスのp53遺伝子のシークエンス (Exon領域はGreenで示す)

1 **gccttaccct acacattgac ggcgaagg gaccctagct gtagggtta gactgacag**
 61 **ccacagcgt ccaggatgc ctttattgc aatagcctc cctgctcttg caatctctt**
 121 **gactgattt agtagagac tctcttggc atgttaaag atcccaacc gaagtcaaa**
 181 **ggagtgccc ctaggccca tctgtttac aatgttagt atatgaat tgtttttt**
 241 **gttttttt tttttata agcaactt tggagatat ttaccctgt cttccagtt**
 301 **ctctctctg aataattac tgcagaggg ttgggaatg tctggatgg gtagtatg**
 361 **cccttaant atgttaaat cactctago ttacataga cctgcacg taatgttat**
 421 **taantaant gttaccgtg tcactgaaa agggagccg gctgacitgg gaccggitg**
 481 **tgcaagcct taacccaaa gctaggagg ccggagcag tcaatatac agatcagcg**
 541 **agccaaga taicagga gccctatct caaaaaga aatagtcc gtaigtlaa**
 601 **ttcaactg acacagata acctgctct acgttagt agcagtgg agctcgaac**
 661 **ctctgact ccagaccac gttccagac catacaga gtaggttca gttatcctt**
 721 **ctctgtag tttagctg acttgagat atgagatg tcttcnana cagagaaga**
 781 **gtacaaagt taacttgg aaacagag ctactggct tctctgat ggttaata**
 841 **ggagctct atggccctg cctttaag taaccttt gggatctga ggttaactgg**
 901 **gtaactag aagacctgt ctacagagg caaacagct gtagatctga ggttaactg**
 961 **ttactacc tggcaaat gataacct gtttaaac tgaaccaa aaaaacagt**
 1021 **taaacagc ttacaaagt gcaattgc ctatgagc tgtattgaa tcaaacaga**
 1081 **atctatga ttcaagag taacctctg gcaatctc gcaatctc agagagcga**
 1141 **ctgactgc cctcctct ttctgcaat cctttact gttogaatca taattgttt**
 1201 **ctctgaca ggtttctt gtagtctt gctgctct gcaactcct ctgtagcca**
 1261 **ggctggct caactctc tgcctctat tgcctctat caaagtgcc tgcacccc**
 1321 **gctggctc tttagctgg gcaaacctc gaagtaagt gtagctag gatccagca**
 1381 **ctactgtgt taagacagta atgaattaa gcccagctg gatacatag tgaagctg**
 1441 **tctcaazaa ggggaata agttcaaaa gtagcattt ccaagtgcc aagcgaatg**
 1501 **ttccttag aagtgaagt tggagggac agaatgaat ttgactcct agtttaant**
 1561 **ttgtataga tttagacct gataaaaaa ctggttaagt ttgggaaga agttaaagt**
 1621 **ggcagcat ctttaagct tggttgttg gttttttt gctctggct gataaagta**
 1681 **aaccactg cttgtctg gtcagaga gggctctac tggctattt caaagtttg**
 1741 **caataaaca cttaccagt tctctgtat ccagtttta gttacataa cagcttana**
 1801 **ccagatgg tgcctaac ctgcaagcc aatgctcag agctcagc agaaagatg**
 1861 **caatitago cggcccaag agtagagca ctgtcaga gtaacaaa taactaaat**
 1921 **aaactaat gtaacttt atcacatga gtaagcgc ggcggcgt gtagcgtt**
 1981 **gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtagcgtc**
 2041 **tgactaca tttagctg tgcagaggt gctgacaa ctaataga attagttg**
 2101 **ggctactag tcttggacc aggtgctat tctggccca cagaccacc taattctga**

Exon 1 は 5'UTR 領域

6241 gaagaatga cctgctgctg aatgctgctg tggggggggg agtccctcc cagagggaa
6301 gggagagag atgagatga ggtgcaeat gtagggggg tggggctag agtcaactc
6361 ctgataact gttccctgaa cagctgctg gttggagag ctgatagaa gccagggaa
6421 gcttgagca gctgaataa agacaggaag agctgcccc ttccctctc ttggaatg
6481 gttccctca cggccactt ggtctctac ttctctca agggcctgg ccgactctt
6541 gctactgt aactttgco ttcccccc tgcataagt ttctgaaat aatgacttg
6601 aaactcaaa tatattaca aaacactgg ctgtagctt ggtttgct ctgactgtt
6661 tatactaa tatccctt attcaact aactttgco agttctgco agtggctg ttacctg
6721 tcaagcccg gctctgco tccctgco tggggaaac cctacactt cagaattaa
6781 ttccacta ggtctcca cctctttt attctacc ttctataag ccaataaggt
6841 ttgttttt gtagtttt taatgaaa gtagtcat catacagac acaactctt
6901 ctctctacg **ttactcaaa tggggaaac agctggaa atcagctcc agctccctc**
6961 gacagaaa acatttca gttatgaa agttagt gacttttg gggccttaa
7021 gataactcc gcataactg tatctccc ttccctgaga gaacaaaa cagtagtgt
7081 caaaaatgt atggtttgg gttctgaa atctgctgg cggggggg gggggggg
7141 gggactgca ggtctcaga agtttaggt catcattgac tcatagcaa gttggagcc
7201 agctggat agtgaatt ctctctca aaaaagaa gaaatcaga actaacctc
7261 tctctgtt ttcaaat cctcaaaa atctgctgt aagccaga tctggaggt tctctgt
7321 actggctt ggtttggg ctgtagct gaaacagac tctggaggt tctctgt
7381 cccctaca gctgactt agctgctg gactgctt gttggggg gttggggg
7441 acttttga agcccaat gacacttc gactgctg gactgctg gactgctg
7501 gttctgaa ggggtgaa gactgctg gactgctg gactgctg gactgctg
7561 gtttttga gactgctg gactgctg gactgctg gactgctg gactgctg
7621 gctgctg gactgctg gactgctg gactgctg gactgctg gactgctg
7681 gttgactt tcaatgctc ttctctg ttctctg gactgctt gactgctt cttctctc
7741 agctgctc tcaatgctc ttctctg ttctctg gactgctt gactgctt cttctctc
7801 atctctg cactctca gggggggg actctctc actctctc cctcaact cttctctc
7861 ttgtaaat aactctga agcagcag agggctgt gctgtagc cagctgtag
7921 agcagctg gctgctg gctgctg gctgctg gctgctg gctgctg gctgctg
7981 ccaaaaaa aaacagcga tggggggg aaacactgt agctcagca ctgggggg
8041 caaagctga gaaacag ttggggca ttctgact cacagagag tgcctctc
8101 aaaaazaga agtcaagt gttggcaic ttgtagt ctgagcag ctggtaca
8161 aagtgtc caagcagc agctctac agaaaacc tctctgaa acacagaa
8221 ggggagaa agaaagct cactctct cttgtgag tccctctg cactgag
8281 gcttcaat gctgctg actgctg actgctg actgctg actgctg actgctg
8341 actgctg tcccaact cgtctctc tctctctc cagactc **ctgctctc**

Exon 2

Exon 3

Exon 4

4081 ttgtataa ctattttag tttttacc aatctatc ctaccact gtttttaa
4141 agttttca agcctgtt ttatgtct gttcccco agtggttg gattctctt
4201 tctccaac cggaaatg gctcaagg cagttttg tcaagctc ctctgctc
4261 ttctttag actgacta gttgtttt tctgctga gttgtgtt ttatgata
4321 caagcaag cctctaat tttcttga acaaaata tctgctc ttgctctc
4381 cccatgccc ctttttca agctgggg ttgacagg agctttag ataacacg
4441 actctgag ctgagctc ctgcaact cgaagatt gatactag ttatgaaa
4501 caataagg gtttttca ggttaagg tgcctctg ctccctgg tccactctt
4561 gtagtggg ggttagct gttcttca ttctctg gttttg gttttg gcaagctt
4621 gcaactcc actgttca cctcaagc caaataaa ggttaaga ttctctcc
4681 ttctctgt caatagc ctgctgct tctgagat caatgag gggcctga
4741 gaaagcag gcccctgg cctgaggg cagcctgt tgaactaa cctctggt
4801 ctattgct tccagcaa ctttttca caatcagc ctctgag actgactc
4861 tctgctg gttctgta aacttcat atggcaat ttcttag gtttag aaacatga
4921 aactaata ctactaga cctgagat agcagaaa gactctat tctgctg
4981 gctgctc caactgag acttggcc gctctcag ctgctgag gggcctg
5041 caacacaa caacacaa cagtctca tagcaagag ttcttga ggtgaact
5101 gcttaacg gtagtga gcccacaa agactgct cctcaaaa aatgagctg
5161 tcaactcc aggtctgct tctactga gttgctg gttgctg gttgctg
5221 gcccagcc tcaactga agctcctc agggcaat ctcaaaa gaaagctc
5281 aagtaacg cttcaata gatacagag atgataat taacaaa atgataaa
5341 atctaacg tttaatat gactgag cgtctgag tctctgag cctttcag
5401 gctcagcc cttactc agatgtag gctataat accagctt ttctctt
5461 cactagct attcaagag acttctct aagcctgt gactgctg atgttggg
5521 gctcactt taataagag tctctcct gcccaggg agatgtag atgagcag
5581 atgaatag ccaatgaa agtttca aactttaa taatgaaa ctgattgt
5641 ctactaaa gtaatat taatgtaa gattatgc agtataaa gtaattat
5701 tgaatgct gcttctg ttgaaaga aactgagt ccaagggg ttgctcaact
5761 caatcccg acccaact ttatgctg tcaatgaa tcaactca tctctgca
5821 ctttaata agcaataa taatgtaa tctcaaga agaaataa tagctctg
5881 gttataaa agaaatg agtggagag tctctcag cttaactc aaagagctg
5941 gttgtgt gctgctg agtctgct gctgctg tctctgca gctatgct
6001 caaagtag gaagctc cctcagcc taggagaa agaaactg acttctct
6061 tgaagtag acccaact ttcaagc agaaag agaaag ttctctag agcctggg
6121 gaagagca gtagaact tctgact ctgactt ctgactt gtagcctt gggagctt
6181 cctagggg cagatgag actgaggg gtaactag attgcaat gttgctt

10561 gtaagtgag caagcttaag ttggagacca aotttagaa aagaattgt taanaatcgtg

10621 aagatggttg ttgtaocttg tccagtgctt cactcaact taatctctgc tgcagctcc

10681 ggggctcaaa gctcttcgaa ttttcggaga gctcaatgag gctcttaagt taagaatg

10741 caatctaca gaaatctc gaaacacag gctcaatcc agtaaatg cctggaccag

10801 ggcctcctg ttgtctcta cccagacct cctccagctc agcctttgta gtaaaata

10861 aaaaaccac cctctagat gcttaggctt gaaacctag gaaacctgct tcttgacttt

10921 ttggctctg ttaagggtta ttgggacaa gttatggtg catctctca taatctcag

10981 agtaagaaag acaaatgca gaggattgg gaaatttga agccttcaaa aactatata

11041 aactttagg cagctaggc tagctacaat agcaaaccc tctctctag tcatggtat

11101 gttgtgttg gttgtacag ttgtgtaat aatggcagtg ttgtgtatg tcatggtat

11161 gttgtatg ttgtgtgta aaggaggat aactgattc tcaagaatg tccagtgct

11221 ttgttaata tccctacca tagtagaag catcttaaat tcttttttt cagctccag

11281 ccttagcct tccagcctt gatacagag gaaagccaa actgctagct cccatcact

11341 cctccctcc cttttctg ttcctatag ttctcaaga gaaagcaga actgctagct

11401 tccagccaa aaaaacaaat gatacagaa ttgtgtctg actgctagct cttgctctg

11461 cttccctcc cctccacag cctccctcc tctctctg cttatgact caggctcag

11521 acaaatcct ccagctcct tctctgct tttttacct ttatctagg ctacgcccc

11581 tctctgata ttgtctctg gccaatgig ggaatagat tcatattgt cagctctcig

11641 ctggccagc gaaatctat ccagcagtt gttggacct ggcacctaa atgaanaatc

11701 acctacccc acacccctga agattctatc ttggccctc ataggctca tatctccag

11761 ggcctactt ccttccctc tgaagacct gctgcaatt atccacccc caccctgct

11821 cctcttttt tttttttta cccctttta tatctcaatt tctatttta caataaatt

11881 ttgtatac tt

Exon 10

Exon 11

8401 taactctc tccagctag ccaagctc caatctccg gcttctgact tattctctg

8461 tcaactgag agctctcag gctcctagg cactcaaac aactcaaac aactcagc

8521 gttatata cctctccaa aactcagc atctccat gttatgta agcctcaac

8581 acccctgag ggttagaac tgcagctc caatctccg gcttctgact tattctctg

8641 cttagctc actctctaa agatctat cctctctaa gaaatctg atctccatg

8701 tttaaacg aagcactt ttccacag cctctctaa gaaatctg atctccatg

8761 ctgtaatttt gtttggttt gctctctaa gaaatctg atctccatg

8821 ttactctca gcaacctt ttccctccc tctctctg tagctagct tagagctca

8881 agctcctg ccagctcag gctctctt aacagctc tctctctg tagagctca

8941 cttccagag gaaatagag agctcagtc agttctct cctctctg caagctgag

9001 gcccacag tccagcag ttcccaaa gttgaaat cctctctc caactaaac

9061 tgaactat tagagctat agccagat tccagctc tgcagctc ctgtagtag

9121 ttggagag actctccag gctctctg ctctccag tccagctc ctgtagtag

9181 cctctctc aactcaat ttctctaa ctctctaa gaaatctg atctccatg

9241 cctctctc aactcaat ttctctaa ctctctaa gaaatctg atctccatg

9301 ctgttttc cccagctt gctctctt ttccagag tccgcccc taccacagc

9361 ccaagctt ttgtttca cctctctc ctcaatag tctctctc ttttctct

9421 ttgctctg gactctct atctctct tctctctg cctctctg gactctct

9481 tcaatag agcaagag ttggagag gttggcct agtttaca cagctcagat

9541 gggccccc ttctctct cctctctg gctctctt ttccagag ctgtagtag

9601 ttctctct gaaatctt gttctctg ttctctct cctctctg ctgtagtag

9661 gaaatata aactctct aaaaacaa tctctctc ttctctct gaaatctt

9721 aaaaacaa ttctctct gaaatctt gttctctg ttctctct cctctctg

9781 agtacctt tctctctc tccagag ctctctct ttccagag ctgtagtag

9841 caaacaaa aactctct ttctctct ttctctct gttctctg ctgtagtag

9901 gctctcag agcaagct taccattt gctctctc tctctctg ataaatagt

9961 gttattaga gttctcag tctctctc ttctctct tctctctg acattagct

10021 gaaactat gctctcag ttctctct cctctctg ttctctct aactaactg

10081 caaacaaa ctcaacat agcaagct ctctctct ggtctctg acatgctca

10141 gaaactac cataatga aataacaa gcaaaaat gtttttag ctggctctg

10201 ttctctct ctgtaatc agactcag aggtctct aagctctc agaaaagta

10261 acccaaga agcaatgt gtttaagz tataactc ttccagata ctgcaagt

10321 gttctcag cctctctc gttctctc gttctctc gttctctc caactaac

10381 acaactgac tctctctc gttctctc gttctctc gttctctc caactaac

10441 gaaatctc agctctct taccctct gttctctc gttctctc caactaac

10501 ataaagatg atctctct cctctctc aaaaacaa acaaacaaa acaaacctt

Exon 5

Exon 6

Exon 7

Exon 8

Exon 9

Table3-II-2 National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースによる
 C57BL/6J の p53 遺伝子のシークエンス (Exon 領域は Green で交互に示す)

1 **g**cccttgcct acagagcgc tgccttgcct atcagccctg agctccctct gagccaggag
 61 **g**atctttcag gcttatgaaa actacttctc ccagagata tcttgccatc accctactgc
 121 **t**ttccacg ttttctgccc ccagatgatt gaggatggtt ttgaaggccc aagtgaggcc
 181 **t**ctccaggtt caggagctcc tgcagcacag gacctctgca ctgagaccoc tggcagagtg
 241 **g**cccttgcgc cagccactcc atggcccctg tcatcttttg tcccttctca aaaaacttac
 301 **c**aggcaact atgcttcca ccgggcttc ctgagctctg ggcagcccaa gtcgtttatg
 361 **t**gcagctact cctctccct caataagcta ttctgccagc tggcagcctg tccggccat ggcctctac
 421 **c**agtttggg tgcagctcc accctcagct gggagcctg agagcctgc ccaccatga ggcctgctc
 481 **a**gaagctac agcacatgac agggtctg tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 541 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 601 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 661 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 721 **t**ccagctgc atgcttacc caacatccac tctcttacc atctatccc tggagagc cagtgaggac
 781 **c**ttctggac ggcagcctt tgggttctg gtttggctt gctctggag agaccgctt
 841 **a**cagaagag aaatttccg caaaaaggaa gttctttgc ctgactgcc ccagggagc
 901 **g**caagagag agtctccac ctgcaacagc gctctcccc cgaagaaga aaaccactt
 961 **g**atgagagt atttaccct caagctccg ggggtaac gcttccagat gttccggag
 1021 **c**tgaatagg ccttagagt aaagatgcc catgctaac agagctctgg agacagcagg
 1081 **g**ctactoca gctactgaa gaccagagag ggcagctcta cttcccgcca taanaaaa
 1141 **a**tggtaaga agtggggcc tgatgctca gactga
 Exon1
 Exon2
 Exon3
 Exon4
 Primer: 837U21
 Exon5
 Exon6
 Exon7
 Exon8
 Exon9
 Exon10
 Primer: 1678L2
 Exon11

p53 遺伝子の cDNA シークエンス領域はブルーで示す。
 腫瘍発症マウスの p53 遺伝子突然変異は赤字で示す。A—G transition 変異であった。
 837U21 : CAGGCAACTA TGGCTTCAC
 1678L2 : TGGTCAGAA AGTGGGGCT

Table3-II-3 National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースによる
 C57BL/6J の p53 遺伝子のタンパク翻訳領域の cDNA シークエンス

1 **a**tactgcca tggagagtc acagtggat atcagccctg agctccctct gagccaggag
 61 **a**ctttttcag gcttatgaaa actacttctc ccagagata tcttgccatc accctactgc
 121 **a**tgagctgc tgttctgccc ccagatgatt gaggatggtt ttgaaggccc aagtgaggcc
 181 **c**ctccaggtt caggagctcc tgcagcacag gacctctgca ctgagaccoc tggcagagtg
 241 **g**cccttgcgc cagccactcc atggcccctg tcatcttttg tcccttctca aaaaacttac
 301 **c**aggcaact atgcttcca ccgggcttc ctgagctctg ggcagcccaa gtcgtttatg
 361 **t**gcagctact cctctccct caataagcta ttctgccagc tggcagcctg tccggccat ggcctctac
 421 **c**agtttggg tgcagctcc accctcagct gggagcctg agagcctgc ccaccatga ggcctgctc
 481 **a**gaagctac agcacatgac agggtctg tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 541 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 601 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 661 **g**atggtatg agcagctcc tccccagcat cttatccgg tgaagagaaa ttgtatccc
 721 **t**ccagctgc atgcttacc caacatccac tctcttacc atctatccc tggagagc cagtgaggac
 781 **c**ttctggac ggcagcctt tgggttctg gtttggctt gctctggag agaccgctt
 841 **a**cagaagag aaatttccg caaaaaggaa gttctttgc ctgactgcc ccagggagc
 901 **g**caagagag agtctccac ctgcaacagc gctctcccc cgaagaaga aaaccactt
 961 **g**atgagagt atttaccct caagctccg ggggtaac gcttccagat gttccggag
 1021 **c**tgaatagg ccttagagt aaagatgcc catgctaac agagctctgg agacagcagg
 1081 **g**ctactoca gctactgaa gaccagagag ggcagctcta cttcccgcca taanaaaa
 1141 **a**tggtaaga agtggggcc tgatgctca gactga
 腫瘍発症マウスの p53 遺伝子突然変異は赤字で示す。A—G transition 変異であった。

Table3-II-4 National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースによる
 C57BL/6J の p53 タンパクのアミノ酸配列

MTAEESSDS ISLELPLSOE IFSGLWLLP PEDILPSPH CMODLLLPD VEEFFEGPSE ALRVSGAPAA QDPYETEPCP
 VAPAPATFMP LSSFVPSOKT YQGNVGFHLG FLQSGTAKSY MCTYSPPLN KLFQCLAKTCP VOLWYSATPPA GSRVRAMATY
 KKSQHWTEW RRGPHHERGS DGDGLAPPOH LIRVEGNLYP EYLEDROIFR HSWWVYEPPE EAGSEYTTIH YKYWCKSSCM
 GGNVRRPILT IITLEDSSGN LLGRDSFEVR VCACPGRRRR TEEENFRKKE VLCELEPPGS AKRALPTCTS ASPPOKKKPL
 DGEYFTLKIR GRRKFEWRE LNEALELQDA HATEESGDSR AHSSYLKTKK GOSTSRHKKT WYKKGPDOS D

腫瘍発症マウスの p53 遺伝子突然変異は赤字で示す。グルタミン酸からグリシンへの変異であつた (E→G)。

3-III) 腫瘍発症マウスの扁平上皮癌確認に関する研究

—スキッドマウスへの腫瘍組織移植実験—

【方法・結果】

スキッド (SCID; severe combined immunodeficiency) マウスは重度の複合免疫不全を表現形質とする突然変異系統のマウスである。細胞性免疫と体液性免疫両者ともに欠損しているため癌研究を含めた多様な疾患に応用されている。このため、スキッドマウスを用いて腫瘍移植実験を行った。

研究 3-II) で示したようにアセトアルデヒド投与 4 ヶ月後と 5 ヶ月後の 2 回皮膚病変生検を行った。Figure 3-III-1 に腫瘍発症マウスの皮膚生検部位を示す。投与 4 ヶ月後の生検時には、無菌操作により 3 匹のスキッドマウスの背部表皮に皮下ポケットを作成し、そのポケット内に 5mm × 3mm の腫瘍生検を移植して表皮を縫合した (Figure 3-III-1)。3 匹中 1 匹のスキッドマウスに増大する腫瘍を認めた。切除腫瘍は類円径で 7mm × 7mm の大きさであった (Figure 3-III-1)。切除腫瘍の内部は大部分に壊死を認めた。辺縁部の腫瘍病理所見を示す (Figure 3-III-1)。腫瘍細胞巢には構造異型を認め、腫瘍細胞の異型も認める。p53 抗体による IHC で主として細胞質に p53 発現を認めた。シーケンス法による p53 遺伝子の検討では、研究 II) の結果と同様にコドン 346 に A から G への transition 変異を認めた。

投与 5 ヶ月後の生検時には、Figure 3-III-1 と同様にして 3 匹のスキッドマウスの背部表皮下にポケットを作成し、そのポケット内に 5mm × 3mm の腫瘍生検を移植した。3 匹中 1 匹のスキッドマウスに増大する腫瘍を認めた。長径 5cm × 4cm に増大した腫瘍の中央には潰瘍形成を認める (Figure 3-III-3)。切除した腫瘍の肉眼所見を示す (Figure III-3)。腫瘍中央部は広範に壊死し、辺縁の viable な細胞を鋭的に組織片として cell line 作成の試料とした。細胞培養液は 10% fetal calf serum (Equitech-Bio, Inc., Ingram, TX, USA) を添加した RPMI-1640 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) を用いた。デオキシリボヌクレアーゼ、コラゲナーゼとヒアルロニダーゼ添加 (0.1mg/mL deoxyribonuclease type I, 1mg/mL collagenase type IV, 0.5mg/mL hyaluronidase) (Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA) した細胞培養液で組織片を 37°C で 1 時間培養し、細胞の接着能が低下して浮遊細胞となったことを確認した。浮遊細胞となった腫瘍細胞を Hanks' balanced salt solution で洗浄した後、プレートにより 5% CO₂, 37°C で培養した。培養開始 2 ヶ月後の腫瘍細胞の立体顕微鏡所見を示す (Figure 3-III-4)。プレートに付着する腫瘍細胞巢を認める。腫瘍細胞は増殖したが、培養開始 3 ヶ月後全てのプレートは真菌により汚染され、腫瘍細胞の cell line 化は断念した。

【考察】

研究 3-II)からアセトアルデヒド皮下投与により *Aldh2*^{-/-}で皮膚扁平上皮癌が発症したことが病理学的・分子生物学的所見より明らかとなった。この皮膚病変が扁平上皮癌であることを、腫瘍組織移植実験により再度確認し、さらに cell line 化することで今後の研究に応用することを目的として本研究を施行した。

研究 3-III)の結果を次にまとめて示す。

- ・ 3匹ずつ2度、スキッドマウスへの腫瘍組織移植を行い、両方ともに1匹ずつ腫瘍の増大を認めた。
- ・ スキッドマウス内で増殖した腫瘍細胞は移植した腫瘍細胞と同様に構造異型と細胞異型を有していた。
- ・ スキッドマウス内で増殖した腫瘍細胞は p53 発現異常を有し、移植した腫瘍細胞と同じ *p53* 遺伝子点突然変異を認めた。
- ・ 本研究では腫瘍細胞の cell line 化はできなかったが、腫瘍細胞は培養液中で2ヶ月以上増殖を続けた。

以上、扁平上皮癌であることは腫瘍細胞の移植研究により病理学・分子生物学的に確認された。再度、*Aldh2*^{-/-}より発症した扁平上皮癌を cell line 化することで今後の研究に応用することを考えている。

Figure3-I-1 アセトアルデヒド皮下投与部位

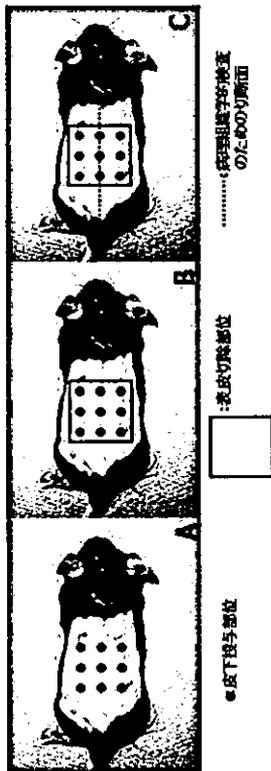


Figure3-I-3 Aldh2 ノックアウトマウスの表皮におけるAldh2、GYP2E1 発現

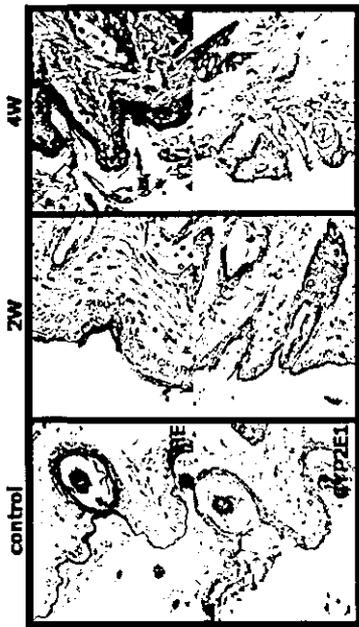


Figure3-I-2 野生型マウスの表皮におけるAldh2、GYP2E1 発現

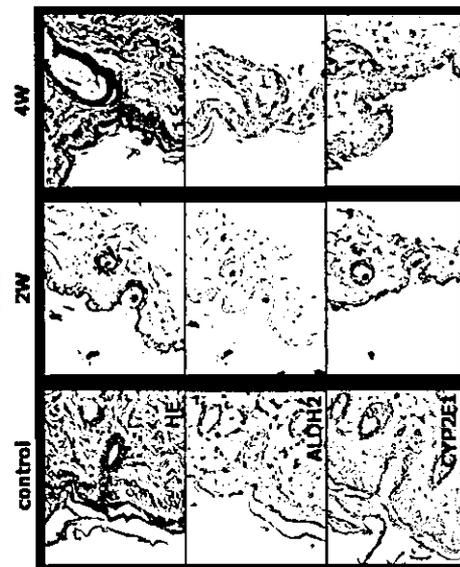


Figure3-I-4 マウス皮下投与実験の表皮ミトコンドリア中Aldh2・ミクロソーム中Cyp2e1発現

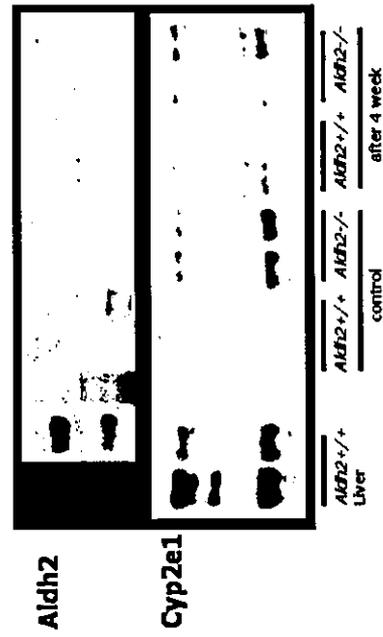


Figure3-II-3 マウス皮膚病変の変化

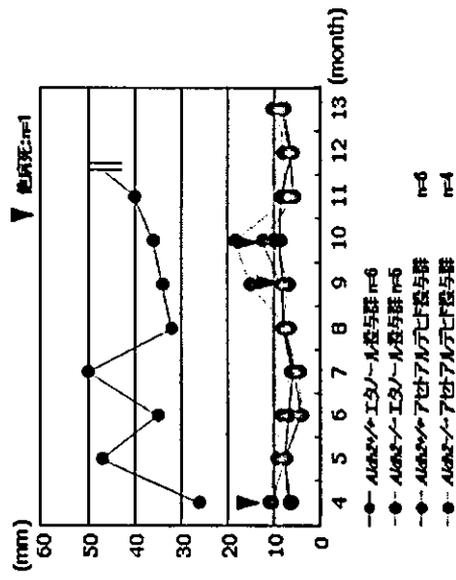


Figure3-II-4(1) 投与1ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-1 アセトアルデヒド・エタノールの皮下投与部位

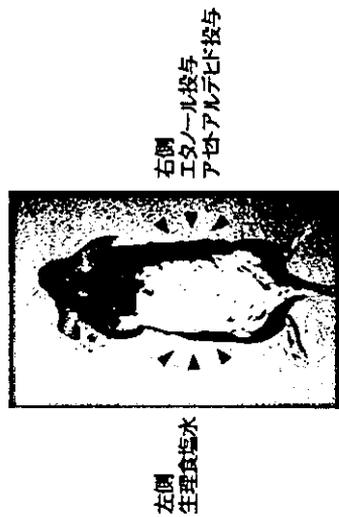
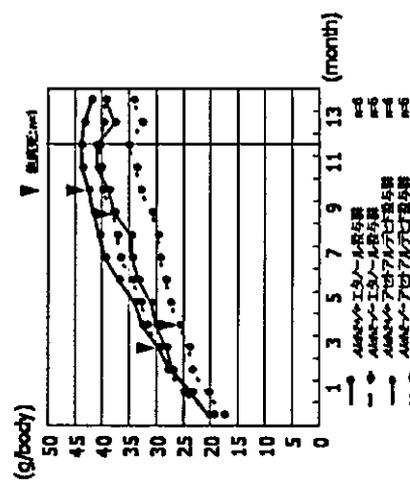


Figure3-II-2 マウス平均体重の変化



投与1年後のALC投与群・ALC+エタノール投与群の体重の有意差検定
 投与1年後のALC+7DHC投与群・ALC+7DHC+エタノール投与群の体重の有意差検定

p<0.01
 p<0.01

Figure3-II-4-(2) 投与2ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(4) 投与4ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(3) 投与3ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(5) 投与5ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(8) 投与8ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(10) 投与10ヶ月後のマウス皮膚病変

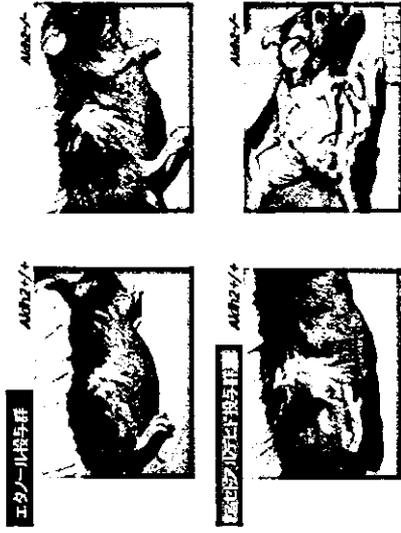


Figure3-II-4-(9) 投与9ヶ月後のマウス皮膚病変



Figure3-II-4-(11) 投与11ヶ月後のマウス皮膚病変