

NM_133854	Synaptoosomal-associated protein, 25 kDa, binding protein	Snap25
NM_009295	Syntaxin binding protein 1	Sxbp1
NM_011503	Syntaxin binding protein 2	Sxbp2
NM_011504	Syntaxin binding protein 3	Sxbp3
NM_009652	Thymoma viral proto-oncogene 1	Akt1
NM_007434	Thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2
NM_011765	Thymoma viral proto-oncogene 3	Akt3
NM_009367	Transforming growth factor, beta 2	Tgfb2
NM_009368	Transforming growth factor, beta 3	Tgfb3
NM_009464	Uncoupling protein 3, mitochondrial	Ucp3
NM_009505	Vascular endothelial growth factor A	Vegfa
NM_009496	Vesicle-associated membrane protein 1	Vamp1
NM_009497	Vesicle-associated membrane protein 2	Vamp2
NM_018766	Vesicle-associated membrane protein 4	Vamp4
NM_018872	Vesicle-associated membrane protein 5	Vamp5
NM_013933	Vesicle-associated membrane protein, associated protein A (33 kDa)	Vepa
NM_019806	Vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C	Vapb

Fig 1-IV-2-1 戻し交配の際の染色体

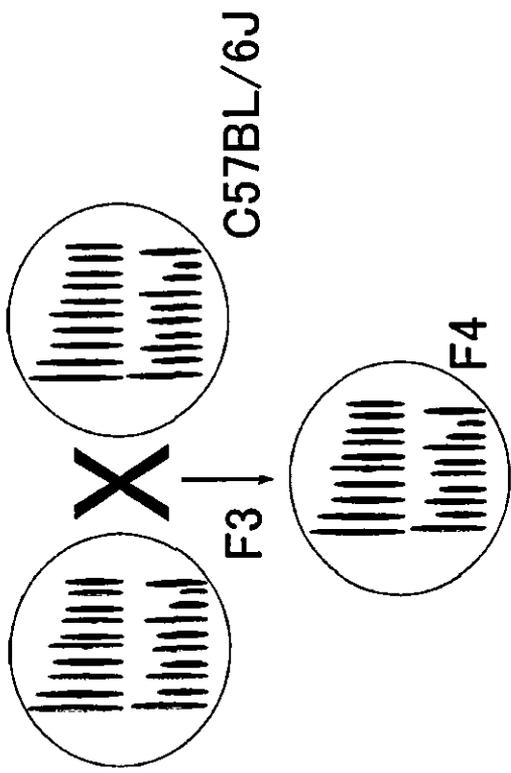


Fig 1-IV-2-2 戻し交配の際に生じる相組み換え

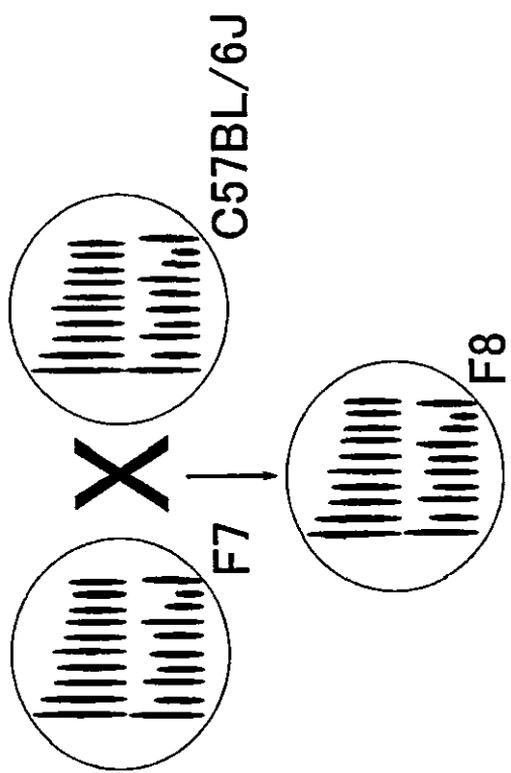
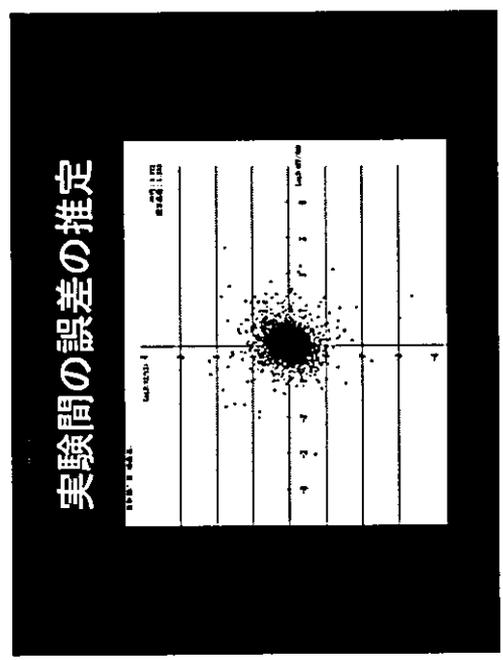


Fig 1-IV-4 実験誤差の推定



x 軸 : 非曝露群の *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の発現差

$$\log_2 \frac{x_1}{x_2}$$

y 軸 : 500ppm 曝露群の *Aldh2*<sup>+/+</sup> と *Aldh2*<sup>-/-</sup> の発現差

$$\log_2 \frac{y_1}{y_2}$$

## 資料 2



## 2) アセトアルデヒド吸入曝露による酸化ストレスの検討

- *Aldh2*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>のアセトアルデヒド2週間吸入曝露における比較-

### 【方法】

尿中 8-ヒドロキシグアニン (8-OHdG) 測定するため、曝露前、曝露 6 日目、曝露 12 日目の同一時刻に各個体からスポット採尿を行い、8-OHdG ELISA キット (日本老化制御研究所) を用いて尿中 8-OHdG 濃度を測定した。なお尿濃度補正のためクレアチニン補正を行った。また、血漿中マロンジアルデヒド (MDA) を測定するため、2 週間の吸入曝露終了後、直ちに心臓からヘパリンコートシリンジで採血し、採血後直ちに遠心分離し血漿を採取した。過酸化脂質比色定量キット (Oxis) にて血漿中の MDA 濃度を測定した。

### 【結果】

#### ・尿中 8-OHdG 濃度について

*Aldh2*<sup>+/+</sup>の尿中 8-OHdG は、125ppm 曝露群では曝露前と曝露 6 日目および 12 日目の比較において、尿中 8-OHdG 濃度の明らかな変化は認められなかった。500ppm 曝露群は、曝露 6 日目、12 日目ともに曝露前に比べ尿中 8-OHdG 濃度の有意な上昇を認めた (Fig.2-1)。125ppm 曝露群の *Aldh2*<sup>-/-</sup>は、曝露 12 日目では曝露前に比べ、尿中 8-OHdG 濃度が約 1.6 倍高値であった。また、500ppm 曝露群は、6 日目、12 日目ともに曝露前に比べ尿中 8-OHdG 濃度が有意に高値を示した (Fig.2-1)。

#### ・血漿中 MDA 濃度について

非曝露群、125ppm 曝露群、および 500ppm 曝露群の比較で血漿中 MDA 濃度は有意な変化は認めなかった (Fig.2-2)が、曝露濃度の上昇に伴い血漿中 MDA 濃度が上昇の傾向を認めた。各群の *Aldh2*<sup>+/+</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup>間の比較において有意差は認められなかった (Fig.2-2)。

### 【考察】

*Aldh2*<sup>-/-</sup>ではアセトアルデヒドの代謝速度が *Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ小さいため、血中アセトアルデヒド濃度が高値を示す。そのためアセトアルデヒドの吸入曝露の結果、*Aldh2*<sup>+/+</sup>に比べ酸化的 DNA 損傷が増加する傾向にあると考えられた。

### 【結論】

ALDH2 不活性型のヒトのモデル動物である *Aldh2*<sup>-/-</sup>で上記の結果が示されたことから、日本人の約半数を占める ALDH2 不活性型のヒトでは低濃度のアセトアルデヒドでも酸化的 DNA 損傷が増加する可能性が示された。

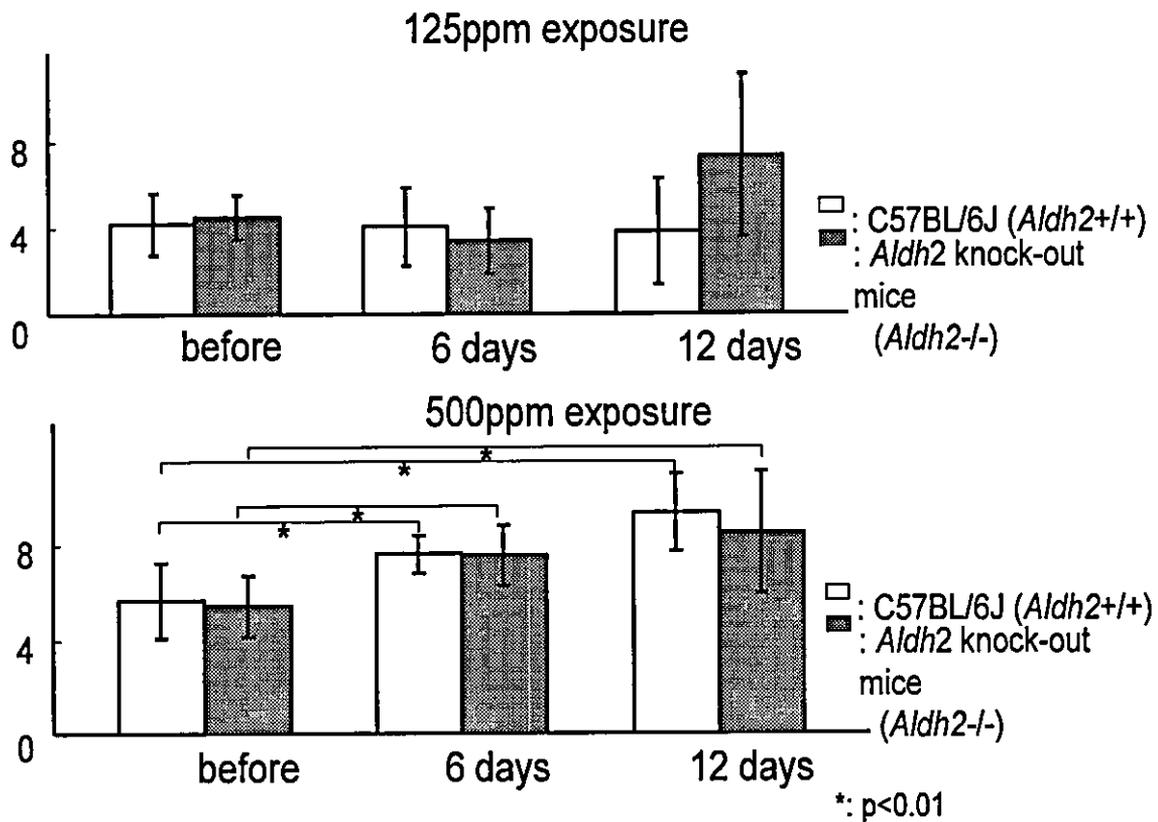


Fig.2—1. Urinary 8-OHdG levels under 125ppm and 500ppm acetaldehyde exposure.

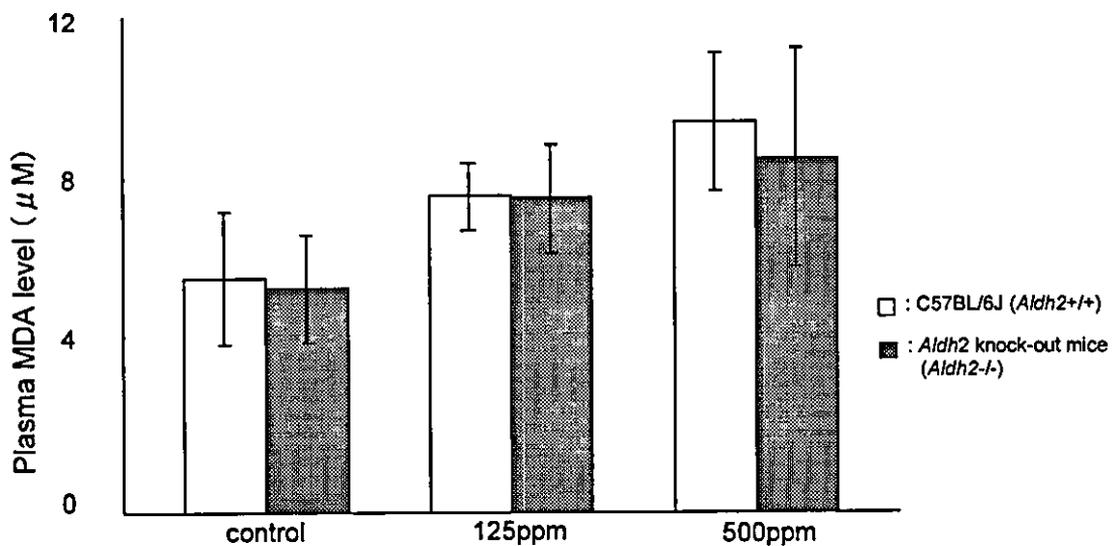


Fig.2—2. Plasma MDA levels under 125ppm and 500ppm acetaldehyde exposure.

There was no significant difference between each group.

## 資料 3



### 3-I) 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<sup>+/+</sup>と Aldh2<sup>-/-</sup>の比較—

##### 【対象】

10 週齢雄の Aldh2<sup>+/+</sup>および Aldh2<sup>-/-</sup>を対象とした。2 週と 4 週の間には生理食塩水 0.9mL/匹/日の量で Aldh2<sup>+/+</sup>・Aldh2<sup>-/-</sup>に皮下投与してコントロール群とした (各群 n=4)。一方、2 週と 4 週の間には生理食塩水で調節した 0.5%アセトアルデヒドを 0.9mL/匹/日をそれぞれ 4 匹ずつの Aldh2<sup>+/+</sup>・Aldh2<sup>-/-</sup>に皮下投与してアセトアルデヒド皮下投与群とした (各群 n=4)。

##### 【方法】

コントロール群・アセトアルデヒド皮下投与群ともに背部を 3cm×3cm 以上の範囲で剃毛し、皮下投与部位が互いに 1cm 間隔となるように 3 行×3 列に 0.1mL ずつ計 0.9mL/匹皮下投与した (Figure3-I-1-A)。アセトアルデヒド皮下投与群では実験終了時に 2 週間と 4 週間皮下投与したマウス背部表皮を皮下投与部位が中央に含まれるように 2.5cm×2.5cm の範囲で切除した (Figure 3-I-1-B)。切除した表皮の中央部矢状断による標本より Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による表皮の病理標本を作成して背部表皮の 2 週間・4 週間アセトアルデヒド皮下投与による病理学的変化を検討し、免疫組織化学染色法 (IHC) により Aldh2、Cyp2e1 の発現も検出した (Figure3-I-1-C)。また、4 週間のアセトアルデヒド皮下投与の後、切除表皮よりそれぞれミトコンドリア分画とミクロソーム分画を抽出して、ミトコンドリア分画から Aldh2 発現をウェスタンブロット法 (WB) により検出し、ミクロソーム分画から Cyp2e1 の発現を WB により検出した。

##### 【結果】

Aldh2<sup>+/+</sup>におけるアセトアルデヒド皮下投与による病理学的所見を示す (Figure3-I-2)。2 週間のアセトアルデヒド皮下投与の後には表皮下の浮腫を認め、4 週間の投与の後には表皮下の脂肪細胞の集簇を認めた。Aldh2 の発現は投与開始 2 週間後には減少していたが、4 週間後にはコントロール群に比べ明らかに増加していた。Cyp2e1 の発現は投与開始 2 週間後から 4 週間後にかけてコントロール群に比べ増加していた。Aldh2<sup>-/-</sup>におけるアセトアルデヒド皮下投与による病理学的所見を示す (Figure3-I-3)。アセトアルデヒド皮下投与 2 週間後には表皮下の浮腫を認め、4 週間後には表皮において軽度の細胞異型を認めた。また、Aldh2 の発現は認めず、Cyp2e1 の発現は投与開始 2 週間後から 4 週間後にかけてコントロール群に比べ増加していた。アセトアルデヒド皮下投与開始 4 週間後の表皮のウェスタンブロット法による解析には、各群 2 匹ずつ使用した。2 回の Aldh2・Cyp2e1 発現結果を示す (Figure3-I-4)。ミトコンドリア分画による Aldh2 発現では Aldh2<sup>-/-</sup>で認めず、Aldh2<sup>+/+</sup>においてアセトアルデヒド皮下投与開始 4 週間後にはコントロール群に比べ Aldh2 発現は減少していた。Aldh2<sup>+/+</sup>においてアセトアルデヒド皮下投与開始 4 週間後にはコントロール群に比べミクロソーム分画による Cyp2e1 発現は増加していた。コントロール群の Aldh2<sup>+/+</sup>に比べ Aldh2<sup>-/-</sup>における Cyp2e1 発現は明らかに増加しており、コントロール群に比べ

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

#### 【考察】

研究 3-I)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*<sup>+/+</sup>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*<sup>+/+</sup>に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>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*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>の比較—」研究のまとめ

	<i>Aldh2</i> <sup>+/+</sup>		<i>Aldh2</i> <sup>-/-</sup>	
	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*<sup>+/+</sup>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*<sup>+/+</sup>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*<sup>+/+</sup>と *Aldh2*<sup>-/-</sup>の比較-

#### 【対象】

10週齢雄の *Aldh2*<sup>+/+</sup>および *Aldh2*<sup>-/-</sup>を対象とした。6匹の *Aldh2*<sup>+/+</sup>と5匹の *Aldh2*<sup>-/-</sup>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*<sup>+/+</sup>と5匹の *Aldh2*<sup>-/-</sup>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像を記録し、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 TGGCTCCAC) と Exon11 領域のプライマー-1678L2 (TGGTCAAGAA AGTGGGGCCT) 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*<sup>-/-</sup>・エタノール投与群で投与 62 日後、*Aldh2*<sup>-/-</sup>・アセトアルデヒド投与群で 103 日後、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・アセトアルデヒド投与群で 271 日後、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・エタノール投与群で 292 日後の各群一匹ずつ他病死（癌死でない衰弱死）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*<sup>+/+</sup>・エタノール投与群に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>・エタノール投与群で平均体重の減少傾向を認め、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・アセトアルデヒド投与群に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup>・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*<sup>-/-</sup>・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*<sup>-/-</sup>・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*<sup>-/-</sup>・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、睪丸が脱出した (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*<sup>+/+</sup>・エタノール投与群と *Aldh2*<sup>-/-</sup>・エタノール投与群、*Aldh2*<sup>+/+</sup>・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 発現異常とシーケンスによる 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*<sup>+/+</sup> に比べ *Aldh2*<sup>-/-</sup> で体重減少傾向を認めた。
- ・ *Aldh2*<sup>-/-</sup> ・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*<sup>-/-</sup> 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。





Exon 5

8401 taactatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc  
8411 tccacatc  
8521 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

8581 accgctcgg ggtttagac tggcagcgc ccactcccg gcttcagct tctcttctg  
8641 cttagcctc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

8701 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

Exon 6

8761 ctgtaattt gtttggttt ttgcttcta gagaagtg gacagtg accctagct agactgatg  
8821 tgccttcta gaaaccgtt tgcctacc cctgagtc tctgagtc tagctagct tagagttca  
8881 agctccgtc ccagccag gctctactt accagagtc ccagcagc tctggagaa gggcttccc  
8941 catccaggg gaaatag agcttagtc agttccctc ccagtctag ccagtctgg  
9001 gccacagc tccagcagc gtcagaca ggtggaat cctactcta caactaaac  
9061 tgaacttat tagggctat agccagcat tcccgctgc tggagtcac ctgtagtag  
9121 tagggagc acttccact gatctgtt ctcccccg tccctctc tccctctc tccctctc

9181 tccacatc  
9241 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

9301 ctgtttctc ccagctctt gctgtttt gttccagc tccgcccc taccacatg  
9361 ccaagctct tggttcta cctatctac ctaaatgag tctctctc tgtttctct  
9421 tggcttagc gaactctt atctgtct tctgagct tctgagct cctgtaactg gactttgco  
9481 tgcagatg accagagc tggagagc gtagggct agtttaca cagtcagat  
9541 gggccccc ttcttact ccttctg gctcttct gctcttct gctcttct gctcttct gctcttct gctcttct

9601 tccacatc  
9661 tccacatc  
9721 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

9781 agtccctt gctctctc tccacagc ctccacat tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc  
9841 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

Exon 7

9901 ccagtcagc agacaagc taccattat tgcctctc tctgctatg ataaatagt  
9961 gttattgca gttgccag tttttttag tggcttctc tctagccctg acattagctt  
10021 gagagctat gctctagc tggctctc ccagcagtg ttcttagtg acttaacttg  
10081 acaacacaa cttaaccat agacaagg ctctccact gggagtgga acatgtccta  
10141 gaaactcac cataactga aataacaa ccacaaaaa gtttttagc ccagcctgg  
10201 tggcaccgc ctgtaattc agactgag aggtgttc aaagtggca agaaaaagta  
10261 accaaagaa agaacattg gtttaagg tataactag ttccagata ctggcaagt  
10321 ttgtgccag cccagatta gttccccc ggtccaggt gcttttagc caactaacc  
10381 acaactggc tctaacctc agtccctgt tgcctgta agctctgtt cctctactt  
10441 gaaagatcc agcttctg taccgttct actgaagc tgttacttc acaccatctt  
10501 attaaagtg atctccccc cccccaaa aaaaaaaa acaaaaaa acaaaaaa

9981 tccacatc  
10041 tccacatc  
10101 tccacatc  
10161 tccacatc  
10221 tccacatc  
10281 tccacatc  
10341 tccacatc  
10401 tccacatc  
10461 tccacatc  
10521 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

Exon 8

10581 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

Exon 9

10661 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

Exon 10

10661 gtaaggag ccagcttag tggagaca actttccaa actttccaa actttccaa actttccaa actttccaa actttccaa  
10621 aaactgtt gttccctg tccagctt cactcact cactcact cactcact cactcact cactcact cactcact cactcact

10681 tccacatc  
10741 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

10801 agctccctg tggctctc ccagcctc cctccagc agcttctg agcttctg agcttctg agcttctg agcttctg agcttctg  
10861 aaaaacac ccctctag ctttaggt gccacctg gccacctg gccacctg gccacctg gccacctg gccacctg gccacctg  
10921 tttagctg ttaggggta tggagaaa gttatggt catgctcta taatctcagc  
10981 agtaaggag acaagctag gaggattg gaaattga agcttcta actataaa  
11041 aactttag ccagctagc tagctaac agcaagcc tctctatg tctctatg tctctatg tctctatg tctctatg tctctatg  
11101 gatgtgtg ttgtgacg ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag  
11161 gttgatg ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag ttgtgata aatggcag  
11221 tcttgaata tccctaca tagtgaag agggagat aactgatic tgaagatg tccagctg  
11281 cctagcct tccagcct gatcaagc tagtgaag agggagat aactgatic tgaagatg tccagctg  
11341 cctccccc cttttctg tttctatg tttctatg tttctatg tttctatg tttctatg tttctatg tttctatg tttctatg

11401 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

11461 cctccctc ccactcag cctccctc tcttctgt cttatgact cagggctg  
11521 acaaatct ccagctct tctgtcct tttttact tttttact tttttact tttttact tttttact tttttact tttttact

11581 tctctgta gttttctg gcccaagt ggaatagt ttagttgt caggtctg  
11641 ctggccag gaaattct ccagcagt ttggacct ggcacctc aagaaatc  
11701 accctacc acacctga agttctat tgggctc ataggcca tatctcag  
11761 gctcaatt cctccact tcaagct gtcgaatt atccacccc caccctct  
11821 cctctttt ttttttta ccccttta tatabaant tctatttta caataaant

11881 tttttact tt

Exon 11

11941 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

11981 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12041 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12101 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12161 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12221 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12281 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12341 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12401 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12461 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12521 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12581 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12641 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12701 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12761 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12821 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc

12881 tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc tccacatc



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

MIAEESQSD ISLELPSDE IFSGLWKLIP PEDILPSPH CDDDLLPOD VEEFFEPSE ALRYSGAPAA QDPVTEIPGP  
 VAPATPWP LSSFPSPKTY YQHYGFHLG FLOSGTAKSV MCTYSPLN KLFQGLAKTCP VOLWYSATPPA GSRVRAAMAY  
 KKSQHMTEW RRCPHHERCS DGDGLAPPOH LIRVEGNLYP EYLEDROGTER HSYWYVEPP EAGSEYTTIH YKYMNSSCH  
 GGMRRPRLT IITLEDSSGN LLGRDSEVR VCACPRDRR TEENFRKKE VLPCLPPGS AKRALPTCTS ASPPKKKPL  
 DGEYTLKIR GRKRFWRE LNEALELDA HATEESGDSR AHSSYLKTKK GQSTSHHKKT WYKKGPDSDS 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。Figure3-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 (Figure3-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 (Figure3-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 (Figure3-III-1)。腫瘍胞巣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% fatal 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 typeIV, 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% CO<sub>2</sub>、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巣を認める。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。