

## 略 歴

1999年	3月	大阪大学理学部	卒業
2001年	3月	大阪大学理学研究科 博士前期過程	修了
2007年	3月	埼玉大学工学研究科 博士後期過程	修了
2011年	4月	京都大学医学研究科	助教
2021年	4月	東京都医学総合研究所 副参事研究員	現在に至る

## アルコール代謝産物アセトアルデヒドの細胞内動態解析

本共同研究の目的は、アルコール代謝物であるアセトアルデヒドの生体内での分子挙動、中でもDNAとの相互作用の分子機構を明らかにすることである。慢性的な過剰飲酒は、アルコール中毒や肝不全につながる脂肪肝を引き起こすだけでなく、臓器特異性発がんを招く。世界保健機関（WHO）の最新の研究によると、全世界でがんと診断された約4%、75万人がアルコール摂取に起因するとされている。WHOの報告によると過剰飲酒で最も多いがんは、食道がんと肝臓がん、女性の乳がんである。とくに東アジア圏のアルコールに起因するがん比率は最も多い。がんの共通形質は、ゲノムDNAが不安定化を伴う変異が蓄積である。

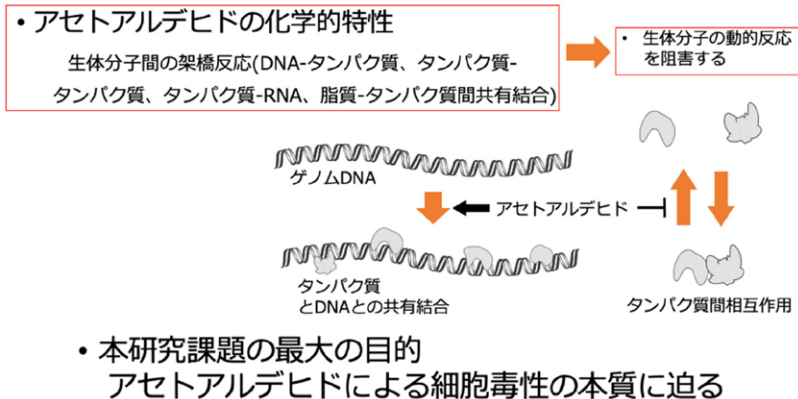
本研究では、アルコール代謝物アセトアルデヒドがDNAへの変異原であることに着目し、アルデヒドの細胞・個体に与える影響を研究した。アセトアルデヒドがDNA損傷をもたらすかどうかを解析するため、さまざまなDNA修復経路を欠損した変異細胞にアセトアルデヒドを曝露し、細胞生存率を測定した。その結果、複数ある修復経路の中で、相同組換えに関与する遺伝子変異細胞において顕著に生存率が低下した。これらのことから、アセトアルデヒドには潜在的にDNA損傷を発生させること、また発生したDNA損傷は相同組換え経路により修復されることを明らかにすることができた。これらの成果は、アルコールの適正飲酒の啓蒙活動に貢献する。

## 概 要

本共同研究の目的は、アルコール代謝物であるアセトアルデヒドの生体内での分子挙動、中でもDNAとの相互作用の分子機構を明らかにすることである。アセトアルデヒドは化学反応性に富み、試験管内では生体分子（DNA, RNA, 蛋白質, 脂質）間の架橋反応（共有結合）を促進する。アセトアルデヒドを含むアルデヒド類の濃度は、諸説あるが非飲酒下でも約50 $\mu$ Mと言われる。飲酒時ではこの数倍の濃度になると想定される。これだけの高い濃度に体内の細胞はさらされているにもかかわらず、細胞内あるいは組織内におけるアセトアルデヒド代謝と細胞に与える影響を研究した例は少ない。

本研究では、アセトアルデヒドによるゲノム DNA に対する毒性に着目した。DNA 損傷修復に変異をもつ RAD54 欠損細胞では、アセトアルデヒドに感受性を示した。感受性を示すということは、RAD54 遺伝子が関与する修復である相同組換え経路がアセトアルデヒドによる DNA 損傷の修復に関わっているということを示唆している。本助成研究により、アセトアルデヒドによって発生する DNA 毒性がゲノム DNA に対する生体分子（おそらく蛋白質）の架橋反応であることを明らかにすることができた。

## 背景：アセトアルデヒドによる架橋反応



### 背景

アルコールは主として肝臓で代謝され、アセトアルデヒドに変換される。アセトアルデヒドは、その化学的性質から細胞毒性が高い分子とされる。したがって飲酒により大量のアセトアルデヒドを産生する肝細胞でのがんの発症が高いと予想されるが、実際には飲酒による肝がんの発症リスクはそれほど上昇しない。一方で、飲酒は、咽頭と食道がんを有意に上昇させる<sup>1</sup>。このことはアセトアルデヒドに対する毒性が臓器によって大きく異なることを示唆する。例えば、肝細胞はアセトアルデヒドを含むアルコール代謝物に対して耐性を持つか、あるいは代謝物に対する細胞毒性を排除する活性が極めて高いという可能性が考えられる。臓器 / 組織におけるアセトアルデヒドに対する毒性の違いやアセトアルデヒドが細胞毒性をもつメカニズムは不明である。

生体分子の分子数を考えた場合、一細胞中にゲノム DNA は 2 コピーしかないのに対し、RNA や蛋白質分子は 106 分子以上存在する。分子数が多いほど、架橋反応に耐性になると考えられるため、アセトアルデヒドが細胞毒性を示す原因として最も考えられる生体分子間の架橋反応は、ゲノム DNA である。蛋白質と DNA との相互作用は本来動的（結合と乖離）であり、この動的反応は DNA 複製や転写の制御に必須である（図 1）。架橋（共有結合）反応は、動的反応を阻害するため細胞死を招く。

近年、アセトアルデヒドを含むアルデヒド代謝異常が、再生不良性貧血や白血病の症状を引き起こすことが明らかとなった<sup>2</sup>。アルデヒド代謝異常を示す遺伝的に ADH5 と ALDH2 二重変異を持つ患者の細胞では、がん細胞でよくみられる染色体不安定性を示し、患者の多くは小児で貧血や白血病を発症する。これらの結果は、血球系幹細胞の維持また発がん抑制の観点から、アルデヒド代謝異常が細胞増殖に与える影響がかなり大きいことを示唆する。面白いことに、ADH5 と ALDH2 二重変異を持つ

患者では、血球系細胞の異常しか認められない。このことは、他の臓器に比べて血球系細胞（主として、造血幹細胞）が、アルデヒドに高感受性であることを示唆する。しかしなぜ血球系細胞がアセトアルデヒドやアルデヒドに高感受性であるのか、またアルデヒドによる DNA-蛋白質間架橋反応の修復過程は不明である。

申請者は、ゲノム DNA に架橋（共有結合）する蛋白質の除去修復に関わる遺伝子の同定を行ってきた。その結果、DNA に架橋された蛋白質の除去に必要な遺伝子とその分子機構を詳細に明らかにした。この研究背景をもとに本研究は、細胞内におけるアセトアルデヒド毒性を DNA 架橋反応という観点から、アルコールの細胞毒性を理解することを目的とした。

## 方法

### (1). 使用する細胞

本研究は、ヒト B 細胞由来の TK6 細胞を使用した<sup>3</sup>。TK6 細胞は、がん細胞由来ではなく、TP53 正常でありほぼ二倍体の核型を持ち、形質が極めて安定している。

### (2). アセトアルデヒド曝露による細胞生存率測定

約  $1 \times 10^6$  細胞を 1.5mL チューブに入れ、アセトアルデヒド（Nacalai, Japan）処理を 30 分間行なった。その後、遠心によってアセトアルデヒド培地を取り除いた。その後、通常培地で細胞を培養した。

### (3). 蛍光タンパク質 GFP を発現する野生型細胞の作製

細胞生存率を簡便に測定する目的で、GFP 遺伝子をニワトリ beta-Actin プロモーターの下流に組み込んだレンチウイルスベクターを LentiX293T 細胞（Clontech, Japan）にパッケージングプラスミドと共に形質転換した。作製したレンチウイルスを含む培養上清に LentiX concentrator（Clontech, Japan）を加え、ウイルス濃縮をおこなった。濃縮したウイルスを野生型 TK6 細胞に感染させ、細胞を抗生物質 Puromycin（Nacalai, Japan）を含む培地で培養し、感染細胞を選択した。

### (4). 細胞へのアセトアルデヒド処理条件の最適化

培地には血清由来の大量の蛋白質が含まれる。そのため、アセトアルデヒドを培地中に添加した場合、ほとんどのアセトアルデヒドは、培地中の蛋白質に反応してしまい、細胞への影響を測定することは困難である。また、アセトアルデヒドは揮発しやすい性質があり、培地中に添加し、長期間（数日間）細胞に対する影響を調べることも困難であった。そこで、培養した細胞をリン酸バッファー（PBS）で洗い、PBS で懸濁した細胞に対して、テストチューブ内で 1 時間、100 $\mu$ M と 10mM 濃度のアセトアルデヒドで処理した。処理後、PBS で細胞を洗うことでアセトアルデヒドを除去し、細胞生存率を測定した。

## 結果

### 感受性を測定する手法の開発

浮遊細胞のメチルセルロースを用いた生存率測定は、最も信頼のおける解析手法として現在使用されている。メチルセルロースによる方法の欠点は、メチルセルロース培地作製が煩雑であること、メチルセルロース培地中に塗布した細胞がコロニーを形成するまで二週間ほどかかる点である。より簡便に細胞生存率を測定する目的で、フローサイトメーターを用いた生存率測定法の開発を行なった(図1)。まず、GFP 蛍光タンパク質を発現した野生型細胞とGFP 蛍光タンパク質を発現していないDNA 損傷修復欠損細胞を50%ずつ混ぜる。その後、混ぜた細胞を「方法」に記述した方法でアセトアルデヒド処理を行った。細胞を通常培地で培養5日間培養した。培養後、GFP 陽性細胞と非陽性細胞の割合をフローサイトメーターによって解析した。

### 開発した感受性を測定する手法の検証

GFP 発現野生型細胞とRAD54 欠損細胞を1:1の割合で混ぜた。RAD54は、放射線によるDNA 損傷を修復するために必要な遺伝子である。RAD54 欠損細胞は、放射線に感受性を示す。1:1の割合で混ぜた細胞に放射線照射し、5日間培養を行なった。その結果、野生型細胞同士を混ぜた場合には、放射線照射の有無に関わらず GFP 陽性と非陽性の割合は、約50%であった。一方で、GFP 発現野生型細胞とRAD54 欠損細胞を1:1の割合で混ぜた細胞に放射線照射した場合には、GFP 陽性細胞の割合が増加し、非陽性細胞の割合が低下した(図2)。このことは、放射線照射によってRAD54 欠損細胞が死滅あるいは増殖阻害を受け、結果としてGFP 非陽性細胞の割合が低下したと考えられる。以上のことから、本研究で開発した新しい感受性試験は、メチルセルロース法と遜色なく使用できることがわかった。

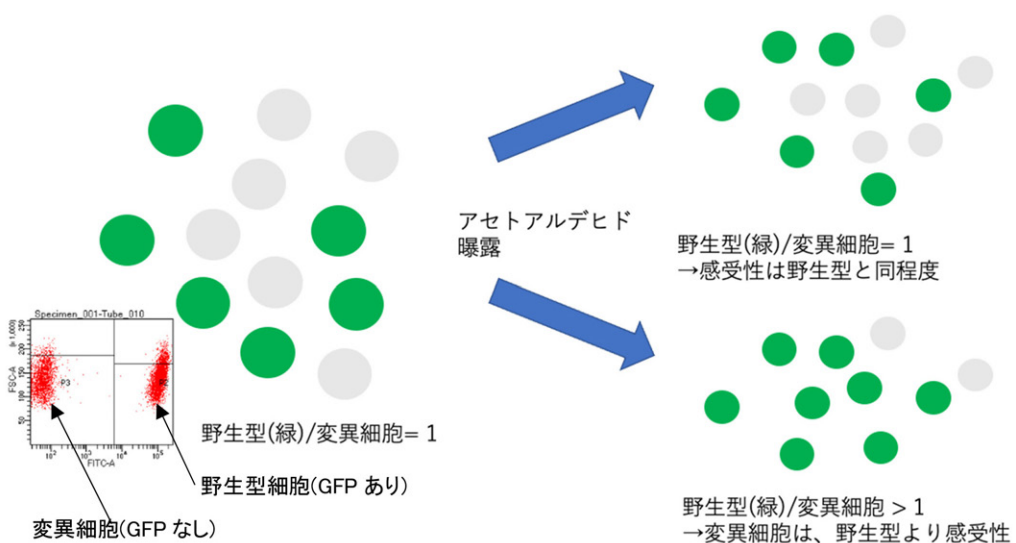


図1 蛍光タンパク質を利用した感受性試験法の開発

野生型細胞にGFPを発現させる。GFP陽性野生型細胞と変異細胞を混ぜ合わせ、混ぜた細胞培養液を二つに分ける。一つはアセトアルデヒド処理有り、もう片方を処理無しで実験を行う。5日間の培養後、フローサイトメーターを用いて、GFP陽性細胞の割合を測定する。アセトアルデヒド処理有りのGFP陽性細胞の割合が、アセトアルデヒド処理無しのものに比べて大きくなっていれば、変異細胞はアセトアルデヒドに対して感受性であることがわかる。

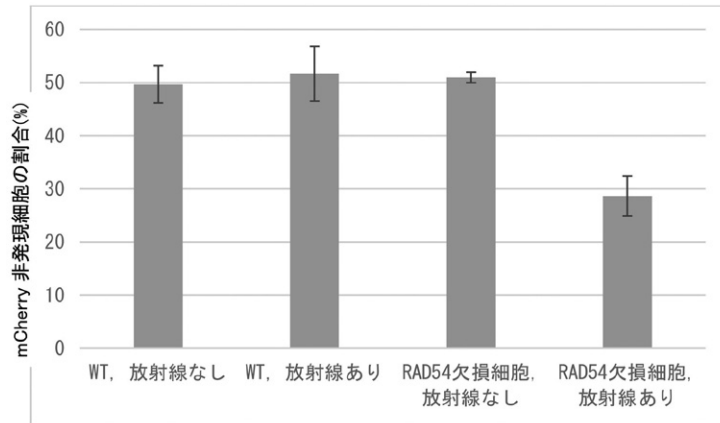


図2 蛍光蛋白質を利用した感受性試験法の検証

本研究で開発した感受性試験の検証を行った。RAD54 遺伝子は相同組換えに重要な役割を果たしている。細胞に 0.8Gy の放射線を照射し、5 日間培養を行なった。RAD54 欠損細胞は放射線に感受性であることはわかっている。放射線照射によって発生する DNA 損傷を RAD54 欠損細胞は修復できないため、細胞は死滅する。一方で、mCherry を発現している野生型細胞 (WT) は、RAD54 欠損細胞に比べ放射線に対して耐性であり、mCherry 発現細胞の割合は、相対的に増加する。Y 軸は、mCherry 非発現細胞の割合を示す。

RAD54 欠損細胞は、アセトアルデヒドに対して感受性を示す。

本研究で開発した感受性試験をアセトアルデヒドに対して行なった。RAD54 欠損細胞をアセトアルデヒドに 10mM、30 分間曝露後、通常培地で 5 日間培養し、FACS で解析した (図 3)。またメチルセルロース法でもアセトアルデヒド感受性を調べた (図 4)。細胞を 10mM、30 分間アセトアルデヒドに曝露させたのち、メチルセルロースに播種した。形成したコロニーを数え、アセトアルデヒド無しで形成したコロニー数で割ることにより、アセトアルデヒド感受性を計算した (図 4)。いずれの方法においても、RAD54 欠損細胞はアセトアルデヒドに対して感受性を示した。一方で、DNA 修復の非同末端結合経路に参与する LIG4 遺伝子の変異細胞は、感受性を示さなかった。この結果は、アセトアルデヒドが DNA 損傷を発生させていること、発生した DNA 損傷は LIG4 遺伝子ではなく RAD54 遺伝子依存的に修復されていることを示唆している。

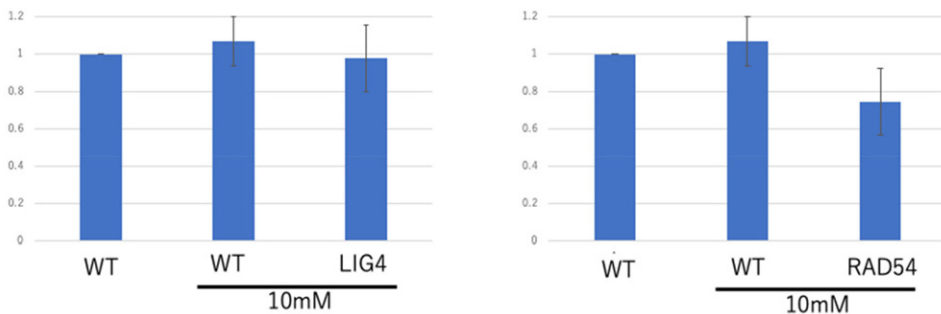


図3 フローサイトメーターを使用した感受性試験の結果

図1に示す方法で、アセトアルデヒド 10mM に対する感受性試験を行なった。使用した細胞は、野生型細胞 (WT)、LIG4 と RAD54 遺伝子を欠損した細胞である。アセトアルデヒド処理なしの野生型細胞の GFP 非陽性細胞の割合を 1 とした時に、それぞれアセトアルデヒド処理した細胞の GFP 非陽性細胞の割合を示す。

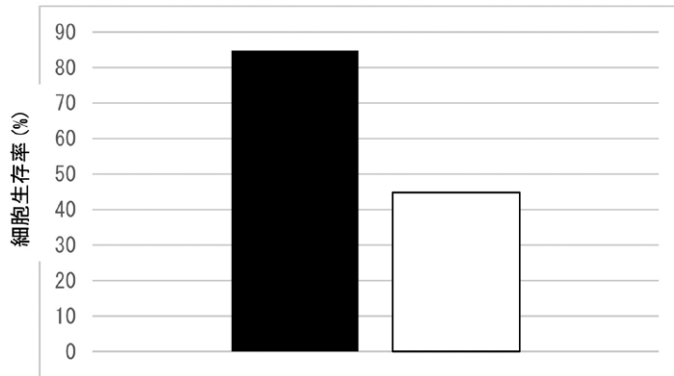


図4 メチルセルロースによるコロニー形成実験の結果

図4に示す実験を、野生型細胞とRAD54欠損細胞で実施した。アセトアルデヒド、10mM曝露後の細胞コロニー数をアセトアルデヒド曝露なしの細胞のコロニー数で割ることにより、生存率を計算した。RAD54欠損細胞は、野生型に比べて有意に感受性を示した。■は野生型細胞、□はRAD54欠損細胞の生存率を示す。

## 考 察

アセトアルデヒドを含むアルデヒド分子は、生体分子を架橋することが知られている。中でもDNA分子への架橋は転写やDNA複製反応を阻害する。しかしながら、アルデヒドがたとえばタンパク質とDNA分子を架橋した場合に、どのように修復されるのかは不明であった。本研究によって、アセトアルデヒドが発生させるDNA損傷の修復において、RAD54遺伝子が重要な働きをしていることを明らかにできた。一方で、非同末端結合経路に関与するLIG4遺伝子の欠損細胞は、アセトアルデヒドに感受性を示さなかった。これらのことから、DNA二重鎖切断修復経路である2つの経路、相同組換えと非同末端結合経路のうち、アセトアルデヒドによるDNA損傷は主に相同組換えによって修復されることを示唆する。アセトアルデヒドによってなぜ相同組換え経路が活性化するのは現在のところ不明である。しかし、アセトアルデヒドによってDNAとタンパク質間架橋反応を促進することを考慮すると、アセトアルデヒドによってDNAにタンパク質が架橋した場合、S期のDNA複製フォークによって架橋部位が認識されている可能性が考えられる。相同組換えは、S期とG2期に活性化する修復機構でありDNA複製フォークにより認識された架橋部位は、相同組換えを利用して修復される可能性が高い。DNA-タンパク質架橋がなぜDNA二重鎖切断を発生させるかは不明であるが、DNAからタンパク質を除去する過程で、共有結合したペプチドをDNA鎖ごと取り除いているのかもしれない。一つのタンパク質分子がワトソン/クリック、両鎖と架橋した場合には、ヌクレアーゼがその領域をDNAごと切り取ってしまうのかもしれない。その場合は、DNA二重鎖切断が発生するため、元通りに直るためには相同組換え経路により修復される必要がある。

ヒト細胞のゲノムは、転写因子のみならずヒストンタンパク質がゲノムDNAに巻き付いている。ホルムアルデヒドはヒストンや転写因子がゲノムとの共有結合反応を促進していると考えられる。野生型細胞の場合は、10mMという高濃度のアセトアルデヒドに曝露しても細胞増殖や細胞生存率にほとんど影響が出ない。このことは、野生型においては、アセトアルデヒドによって発生するDNAタンパク質架橋分子を高精度かつ高速に修復している可能性がある。DNAに架橋したタンパク質分子の除去反応の

分子メカニズムの解明は、背景で述べたとおり、適正飲酒の啓蒙活動に役に立つだけでなく、アセトアルデヒドを含むアルデヒド代謝異常が、再生不良性貧血や白血病の症状を引き起こすメカニズム解明に大きく貢献するものと考えられる。

## 参考文献

1. Rungay, H., Shield, K., Charvat, H., Ferrari, P., Sornpaisarn, B., Obot, I., Islami, F., Lemmens, V.E.P.P., Rehm, J., and Soerjomataram, I. (2021). Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. *Lancet Oncol* 22, 1071–1080. 10.1016/S1470-2045(21)00279-5.
2. Dingler, F.A., Wang, M., Mu, A., Millington, C.L., Oberbeck, N., Watcham, S., Pontel, L.B., Kamimae-Lanning, A.N., Langevin, F., Nadler, C., et al. (2020). Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell* 80, 996-1012.e9. 10.1016/J.MOLCEL.2020.10.012.
3. Yatagai, F., Sugasawa, K., Enomoto, S., and Honma, M. (2009). An approach to estimate radioadaptation from DSB repair efficiency. *J Radiat Res* 50, 407–413. 10.1269/JRR.09050.