

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591701

研究課題名（和文） 食道癌発癌における喫煙・飲酒による酸化的 DNA 損傷および癌抑制遺伝子異常の関与

研究課題名（英文） Cigarette smoking, alcohol drinking, oxidative stress and tumor suppressor gene abnormality in the development of esophageal cancer

研究代表者

森田 勝（MORITA MASARU）

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究センター・統括診療部・消化器外科医長
研究者番号：30294937

研究成果の概要（和文）：喫煙は食道粘膜に酸化ストレスをもたらし、食道癌の進展に伴い酸化的 DNA 損傷の蓄積とその修復の障害がおこる可能性が示された。また、食道癌は癌抑制遺伝子 *p53* の変異を高頻度に認め、喫煙、酸化ストレスが関与するトランスポージョン変異が優位であった。さらに *p53* 変異を伴う食道癌においては *p53* 遺伝子座のコピー数変化を伴わない LOH（対立遺伝子座の消失）が発癌の主要メカニズムであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxidative DNA damage, which partially induced by smoking, as well as disturbance of repair system, must be closely related to esophageal carcinogenesis and its progression. The *p53* gene mutation was frequently observed in the esophageal cancer and predominance of transversion mutations, which indicate possible importance of the benzo[a]pyrene metabolite and oxidative DNA damage, were also recognized. Furthermore, LOH without copy number change (copy-neutral LOH) at the *p53* locus might be the major mechanism for inactivation of the intact allele in esophageal squamous cell carcinogenesis associated with *p53* mutation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	10,500,00	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学・食道外科学

キーワード：食道癌、喫煙、飲酒、発癌、癌抑制遺伝子、*p53*、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺、気管支、頭頸部、食道等の上部気道・消化管（Upper aerodigestive tract: UADT）の発癌における喫煙、飲酒は関与は大きい。

(2) 発癌には酸素ラジカルによる酸化的 DNA 損傷がその重要な役割を果たし、近年、注目されている。しかし、喫煙、飲酒が食道粘膜に酸化的 DNA 損傷をもたらすか、さら

には酸化的 DNA 損傷が食道癌発癌への関与は明らかでない。

(3) 癌抑制遺伝子 *p53* はタバコ煙に含まれる発癌物質の標的遺伝子と考えられているが、異常をきたすメカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

(1) 食道癌における喫煙・飲酒の関与を、とく

に UADT の癌多発に着目し、明らかにする。

(2)食道癌発癌における、喫煙・飲酒の標的遺伝子としての癌抑制遺伝子の位置づけおよび癌抑制遺伝子の異常のメカニズムを明らかにする。

(3)喫煙・飲酒が食道粘膜に酸化 DNA 損傷をもたらすか否かを明らかにするとともに、食道癌の発癌、進展における酸化 DNA 損傷の関与およびその修復系の異常の有無を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 酸化 DNA 損傷の解析

8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxoG) は酸化 DNA 損傷の指標であり、glycosylase (OGG1) により修復される。一方、MutYH 細胞死を誘導し癌の発生を抑制している。

①臨床検体の免疫組織化学染色による検討
食道癌切除標本において、8-oxoG, OGG1, MutYH を染色し、正常食道上皮、癌部の発現を観察した。

②食道癌細胞株を用いた検討

食道癌細胞株 (TE1 と TE5) において qRT-PCR により OGG1 と MutYH の発現量を比較し、menadione (Vitamin K3) で DNA に酸化ストレスを誘導してアポトーシスの程度を caspase3 の免疫組織化学染色にて比較した。

(2)癌抑制遺伝子 p53 異常の解析

食道扁平上皮癌切除標本と食道癌細胞株 10 株を対象とした。

①p53 遺伝子変異はダイレクトシーケンス法にて解析し、さらに胃癌、大腸癌症例とも比較検討した。

②臨床検体における LOH (loss of heterozygosity: 対立遺伝子座の消失) は p53 遺伝子近傍の 2 つのマイクロサテライトマーカーを用いて検討した。

③さらに LOH の詳細なメカニズムを解析するため、comparative genomic hybridization (CGH)、fluorescence in situ hybridization (FISH)、single nucleotide polymorphism-CGH (SNP-CGH) を行った。

4. 研究成果

(1) 酸化 DNA 損傷の解析

①臨床検体の免疫組織化学染色による検討

1)喫煙指数が多いほど食道上皮で 8-oxoG が蓄積していた (図 1)。

2)食道上皮に対し癌部では OGG1 の発現が低下していた。

3)正常食道では 8-oxoG と OGG1 の発現は正の相関を示したが、癌部では相関を認めなかった。

4)MutYH は正常上皮ではほとんどの症例で検

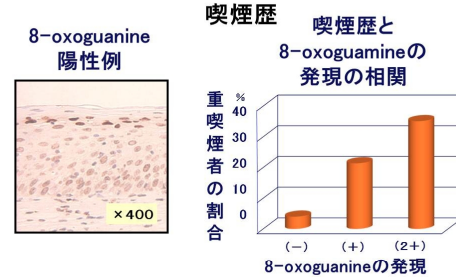
出できなかったが、癌部では過半数で発現をみとめた。

5) MutYH 強発現例で腫瘍径が大きい傾向にあった。

②食道癌細胞株を用いた検討

MutYH の発現量の低い TE1 は TE5 に比較して、OGG1 の発現量が高く menadione 処理でより多くアポトーシスが誘導された。

【図 1】食道上皮における 8-oxoguanine の発現と



以上より、タバコの暴露によって食道粘膜に酸化ストレスが惹起されることが示された。さらに、食道癌においては、癌の進展にもなって酸化 DNA 損傷と核 DNA 修復の障害が蓄積している可能性が示唆された。また、食道癌においてもアポトーシス誘導に酸化 DNA 損傷修復酵素の発現が関係している可能性が示唆された。

(2)癌抑制遺伝子 p53 異常の解析

①p53 遺伝子変異および LOH

食道癌においては 61%に p53 遺伝子変異を認めた。その変異スペクトラムは他の癌腫と異なり、喫煙、酸化ストレスが関与するトランスバージョン変異が優位であった。一方、p53 遺伝子座の LOH を 68%に認めた。また、p53 遺伝子変異と LOH の間に有意な相関を認めた。食道癌における p53 機能異常は、遺伝子変異、LOH とともに高頻度であり、点突然変異及び染色体異常の両方がその発生に関与している。これらの p53 の異常は食道癌において重要であると考えられる。(Digestion 2009, J Surg Oncol 2011, 消化器科 2009)

②LOH のメカニズムに関する検討

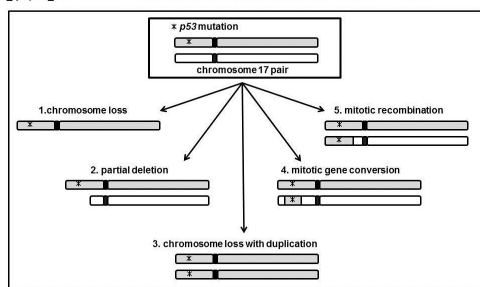
食道癌細胞株 10 株中 4 株に p53 遺伝子変異を認めたが、すべてにおいて野生型シグナルが変異シグナルに完全に置換されていた。p53 遺伝子領域の LOH の存在が示唆されたため、CGH により遺伝子コピー数を解析したが明らかなコピー数減少を認めなかった。また、食道癌臨床検体と細胞株を用いて FISH を施行したところ、p53 遺伝子変異に伴う LOH の 85.7%がコピー数変化を伴わない LOH (コピーニュートラル LOH) であることが明らかとなった。以上より、p53 遺伝子変異を伴う食道癌においては p53 遺伝子座

のコピーニュートラル LOH が発癌の主要メカニズムであることが示唆された。(図 2、Clin Cancer Res 2011)。

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)

【図2】食道扁平上皮癌におけるp53 mutation/LOHメカニズム



3, 4, 5はコピー数減少を伴わないコピーニュートラルLOH

[雑誌論文] (計 32 件)

1. Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, 他1名うち6番目、8番目、9番目. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. DNA Repair (Amst). 査読有, Vol. 11. 2012. pp. 247-258.
2. Kakeji Y, Yamamoto M, Ito S, 他7名、うち5番目、7番目. Lymph node metastasis from cancer of the esophagogastric junction, and determination of the appropriate nodal dissection. Surg Today. 査読有, Vol. 42. 2012. pp. 351-358.
3. Sugiyama M, Morita M, Yoshida R, 他8名、うち5番目、9番目. Patterns and time of recurrence after complete resection of esophageal cancer. Surg Today. 査読有. 2012. DOI: 10.1007/s00595-012-0133-9.
4. Saeki H, Morita M, Harada N, 他7名、うち3番目、6番目、7番目. Esophageal replacement by colon interposition with microvascular surgery for the patients with thoracic esophageal cancer. The utility with super drainage. Dis Esophagus. 査読有, 2012. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2012.01327.x.
6. Morita M, Nakanoko T, Fujinaka Y, 他8名、うち4番目、5番目、9番目. In-hospital mortality after a surgical resection for esophageal cancer : analyses of the associated factors and historical changes. Ann Surg Oncol. 査読有. Vol. 18, 2011,

pp. 1757-1765

7. Morita M, Nakanoko T, Kubo N, 他11名、うち6番目、9番目、10番目. Two-stage operation for high-risk patients with thoracic esophageal cancer: An old operation revisited. Ann Surg Oncol. 査読有, Vol. 18, 2011, pp. 2613-2621.
8. Morita M, Kumashiro R, Hisamatsu Y, 他9名、うち5番目、8番目、9番目. Clinical significance of salvage esophagectomy for remnant or recurrent cancer following definitive chemoradiotherapy. J Gastroenterol. 査読有, Vol. 46, 2011, pp. 1284-1291.
9. Saeki H, Kitao H, Yoshinaga K, 他5名、うち6番目、7番目. Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. Clin Cancer Res. 査読有, Vol. 17, 2011, pp. 814-819.
10. Egashira A, Morita M, Yoshida R, 他6名、うち7番目. Loss of p53 in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with survival: analyses of gene mutations, protein expression, and loss of heterozygosity in Japanese patients. J Surg Oncol. 査読有, Vol. 104, 2011, pp. 169-175.
11. Sugiyama M, Kakeji Y, Tsujitani S, 他10名、うち8番目、9番目. Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascites. Mol Cancer Ther. 査読有, Vol. 10, 2011, pp. 540-549.
12. Saeki H, Morita M, Nakashima Y, 他7名、うち6番目、8番目、9番目. Neoadjuvant chemoradiotherapy for clinical stage II-III esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 査読有. Vol. 10 4, 2011, pp. 3073-3077.
13. Toshima T, Morita M, Sadanaga N, 他5名、うち5番目、7番目. Surgical removal of a denture with sharp clasps impacted in the cervico-thoracic esophagus: Report of three cases. Surgery Today. 査読有. Vol. 41, 2011, pp. 1275-1279.
14. Hisamatsu Y, Morita M, Saeki H, 他7名、うち4番目、5番目、6番目. Staged resection and reconstruction following definitive chemoradiotherapy for perforated cervico-thoracic esophageal cancer with mediastinal abscess: report of a case. Esophagus. 査読有. Vol. 8, 2011, pp. 197-201.

15. Morita M, Kumashiro R, Kubo N, 他9名、うち6番目、8番目、9番目. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *Int J Clin Oncol*. 査読無, Vol. 15. 2010. pp. 126-134.
16. Toh Y, Oki E, Ohgaki K, 他9名、うち6番目、8番目、9番目. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. *Int J Clin Oncol*. 査読無, Vol. 15. 2010. pp. 135-144.
17. Ando K, Takeji Y, Kitao H, 他9名、うち8番目、10番目. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci*. 査読有, Vol. 101. 2010. pp. 639-645.
18. Saeki H, Masuda T, Okada S, 他10名、うち6番目、9番目、10番目、11番目. Impact of perioperative peripheral blood values on postoperative complications after esophageal surgery. *Surgery Today*. 査読有, Vol. 16. 2010. pp. 626-631.
19. Maehrara Y, Saeki H, Morita M. Molecular mechanism of esophageal squamous cell carcinogenesis: Clues to improve treatment outcomes. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 査読無, Vol. 16, 2010, pp. 387-388.
20. Morita M, Ikeda K, Sugiyama M, 他8名、うち4番目、6番目、9番目. Repair using the pectoralis major muscle flap for anastomotic leakage after esophageal reconstruction via the subcutaneous route. *Surgery*. 査読有, Vol. 147(2), 2010. pp. 212-218.
21. Yoshida R, Morita M, Ando K, 他7名、うち5番目、9番目. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for synchronous double cancers of the esophagus and head-and-neck. *Dis Esophagus*. 査読有, Vol. 23(1), 2010, pp. 59-63.
22. Zhao Y, Oki E, Ando K, 他3名、うち4番目、5番目. The impact of a high-frequency microsatellite instability phenotype on the tumor location-related genetic difference in colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 査読有, Vol. 196, 2010, pp. 133-139.
23. Uchiyama H, Morita M, Toh Y, 他4名、うち5番目. Superdrainage of the ileocolic vein to the internal jugular vein interposed by an inferior mesenteric vein graft in replacing the esophagus with the right hemicolon. *Surg Today*. 査読有, Vol. 40, 2010, pp. 578-582.
24. Morita M, Masuda T, Okada S, 他7名、うち4番目、5番目、8番目、9番目. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal cancer: Factors associated with clinical response and postoperative complications. *Anticancer Res*. 査読有, Vol. 29(7), 2009, pp. 2555-2556.
25. Oki E, Zhao Y, Yoshida R, 他5名、うち6番目、7番目. The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. *Digestion*. 査読有, Vol. 79(1), 2009, pp. 33-39.
26. Sadanaga N, Morita M, Masuda T, 他6名、うち7番目. Clinical features of primary small cell carcinoma of the thoracic esophagus: a retrospective analysis of 12 surgically resected cases. *Esophagus*. 査読有, Vol. 6, 2009, pp. 161-165.
27. Saeki H, Ishimura H, Higashi H, 他10名、うち11番目、12番目. Postoperative management using intensive patient-controlled epidural analgesia and early rehabilitation after an esophagectomy. *Surgery Today*. 査読有, Vol. 6, 2009, pp. 476-480.
28. 森田 勝, 吉田 倫太郎, 吉永 敬士, 他5名、うち5番目、6番目、7番目. 食道癌発生における喫煙・飲酒の関与とp53遺伝子異常に関する研究. *The GI Forefront*, 査読有, Vol. 23(1), 2009, pp. 111-113.
29. 森田 勝, 吉田 倫太郎, 吉永 敬士, 他5名、うち5番目、6番目、7番目. 喫煙・飲酒による食道癌の発生とp53遺伝子異常. *消化器科*, 査読無, 第49巻6号, 2009, pp. 475-483.
30. 森田 勝, 佐伯 浩司, 掛地 吉弘, 他3名. 咽頭・喉頭・食道全摘後の高位頸部吻合におけるmicrosurgeryによる血管吻合の応用. *手術*, 査読有, 第63巻4号, 2009, pp. 467-473.
31. 森田 勝, 吉田 倫太郎, 吉永 敬士, 他4名、うち4番目、5番目、6番目. 食道癌に対する治療法選択基準. *外科治療*, 査読無

、第101巻5号、2009、pp. 547-557.

32. 森田 勝、前原 喜彦、食道癌の外科的治療の変遷と集学的治療、医学のあゆみ、査読無、第230巻10号、2009、pp. 899-905.

[学会発表] (計 13 件)

1. 佐伯浩司、Loss of heterozygosity with out copy number change in esophageal squamous cell carcinogenesis. 第70回日本癌治療学会学術集会、2011年10月3日-5日、名古屋
2. 久保信英、食道癌発生における酸化DNA損傷とその修復酵素に関する研究、第66回日本消化器外科学会総会、2011年7月13日-15日、名古屋
3. 森田 勝、優秀演題 食道癌切除後の合併症・在院死の発生要因およびハイリスク症例への二期的手術の妥当性、第63回日本胸部外科学会定期学術集会、2009年10月24-27日、大阪
4. Morita M, Two-stage operation for high-risk patients with esophageal cancer. 12th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2010年9月2-5日, Kagoshima, Japan.
5. Morita M, Clinical significance of definitive chemoradiotherapy and salvage surgery for squamous cell carcinoma of the esophagus. 2010 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2010年6日-8日, Chicago, USA.
6. 江頭明典、食道癌におけるp53機能異常とその臨床的意義、第64回日本食道学会学術集会2010年8月31日-9月1日、久留米
7. 江頭明典、食道癌におけるp53異常に注目した発癌分子機構の解析、第21回日本消化器癌発生学会総会、2010年11月18日-19日、軽井沢
8. Kubo N, The oxidative DNA stress and expression of oxidative DNA damage repair enzyme in esophageal cancer. 12th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2010年9月2-5日, Kagoshima, Japan.
9. 森田 勝、食道癌の予防 食道癌発生における喫煙・飲酒の関与とp53遺伝子異常に関する研究、第95回日本消化器病学会総会、2009年5月7-9日、札幌
10. 久保 信英、食道癌における酸化損傷および修復酵素の発現に関する研究、第109回日本外科学会定期学術集会、2009年4月2-4日、福岡

11. 久保 信英、食道癌におけるp53遺伝子変異、LOH、タンパク発現異常の相互関係および臨床的意義、第64回日本消化器外科学会総会、2009年7月16-18日、大阪

12. 佐伯 浩司、p53 gene abnormalities in squamous cell carcinoma of the esophagus、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1-3日、横浜

13. 久保 信英、食道癌における酸化DNA損傷修復酵素の発現について、第20回日本消化器癌発生学会総会、2009年11月26-27日、広島

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyudai2geka.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 勝 (MORITA MASARU)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究センター・統括診療部・消化器外科医長

研究者番号：30294937

(2) 研究分担者

掛地 吉弘 (KAKEJI YOSHIHIRO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80284488

江見 泰徳 (EMI YASUNORI)

九州大学・大学病院・特任准教授

研究者番号：40516019

吉永 敬士 (YOSHINAGA KEISHI)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90507790

大賀 丈史 (OHGA TAKEFUMI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60335958

江頭 明典 (EGASHIRA AKINORI)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00419524

佐伯 浩司 (SAEKI HIROSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80325448