

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 6 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591966

研究課題名(和文)喫煙・飲酒による食道癌発癌における癌抑制遺伝子異常の機序解明と治療戦略の構築

研究課題名(英文)Molecular mechanism of esophageal carcinogenesis induced by cigarette smoking and alcohol drinking and its clinical application

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)・その他部局等・その他

研究者番号：30294937

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)：喫煙、飲酒による食道癌の発癌メカニズムを解明し治療戦略を構築することを目的とする。  
 1) 酸化的DNA損傷(8-OHdG)と修復酵素(OGG1)：8-OHdGの発現は喫煙と相関し癌部で高かった。正常上皮で認められた8-OHdGとOGG1の相関は、癌部では認めなかった。喫煙やDNA修復障害は酸化的DNA損傷を惹起し発癌に関与する。  
 2) LINE-1メチル化：食道粘膜のメチル化は、喫煙・飲酒量と逆相関を認め、癌部のメチル化は染色体不安定性と逆相関を認めた。ゲノムワイドな低メチル化に関連する染色体不安定性が、種々の癌関連遺伝子の異常を引き起こして食道癌の進行にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose is to clarify mechanism of esophageal carcinogenesis induced by cigarette smoking and alcohol drinking.

1) The expression of 8-OHdG (a marker of oxidative stress) and that of its repair enzyme, OGG1 were immunohistochemically evaluated in esophageal specimens. The expression of 8-OHdG was related to smoking index. The expressions of OGG-1 were related to 8-OHdG in normal mucosa, while this correlation was not observed in the cancer. Oxidative DNA damage, which is attributable to smoking as well as disturbances in DNA repair systems, appears to be closely related to esophageal carcinogenesis.  
 2) LINE-1 methylation levels of normal esophageal mucosa had the inverse correlation with both cigarette smoking and alcohol consumption. LINE-1 methylation of esophageal cancer had the inverse association with the chromosomal instability. The whole genome hypomethylation caused by chronic inflammation could initiate the esophageal carcinogenesis through chromosomal instability.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 喫煙 飲酒 癌抑制遺伝子 染色体不安定性 酸化的DNAs損傷 酸化ストレス メチル化

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、飲酒の関与は大きい。  
 2) 食道癌では食道内多発癌、頭頸部癌の合併を高頻度に認め、我々は UADT における多中心性発癌を支持してきた。さらに、食道癌発生に、喫煙、飲酒が相乗的に関連するとともに (Morita et al, Surgery 2002)、過度な喫煙、飲酒が UADT の多中心性発癌に関与していることをより明らかにしてきた (Morita et al, Int J Clin Oncol 2010)。  
 3) 食道癌において p53 タンパクの発現が喫煙、飲酒ともに関与していることを報告した (Saeki et al, Br J Cancer 2000)。  
 4) 一方、食道癌では p53 の transversion 変異の頻度が他癌より高いことより、食道癌の発癌に喫煙や酸化 DNA 損傷が関わっていることを支持した (Egashira et al, Cancer Sci 2007, Oki et al, Digestion 2009)。  
 5) 临床上、頭頸部・食道重複癌や、COPD、肝硬変等の併存症を有するハイリスク食道癌症例の治療は特に困難で、有効な治療戦略の確立が急務である。

2. 研究の目的

喫煙、飲酒による食道癌発癌・進展におけるメカニズムを遺伝子異常のみならず、エピジェネティックな観点から解明することを目的とする。とくに、酸化 DNA 損傷、ゲノムワイドなメチル化、染色体異常に着目し研究をすすめる。さらに、難治性食道癌のなかでもリスクの高い、頭頸部癌合併例や併存症を有するハイリスク症例に対する治療戦略を確立する。

1) 酸化 DNA 損傷と修復酵素  
 外的要因や体内で発生した酸化ストレスは DNA に作用して発癌を促す。8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) は酸化ストレスの指標で DNA の塩基配列にトランスポージョン変異を起こし発癌を誘発する。8-OHdG は 8-OHdG DNA glycosylase (OGG1) によって塩基除去修復される。そこで食道癌における酸化 DNA 損傷と修復酵素の関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

2) LINE-1 メチル化の意義  
 ゲノムワイドな DNA 低メチル化は染色体不安定性と関連し、腫瘍形成において重要な役割を担っている。長鎖散在反復配列 Long interspersed element 1 (LINE-1) のメチル化状態は、ゲノムワイドな DNA メチル化の状態を表すのに有用とされている。LINE-1 の低メチル化は予後不良因子として認められているが、食道扁平上皮癌における LINE-1 のメチル化レベルとがん抑制遺伝子の突然変異、染色体不安定性および臨床的意義との関係は不明のままである。

3) 食道癌進展におけるポドプラニン発現  
 ポドプラニンは膜貫通型糖タンパクで、扁平上皮癌や中枢神経系腫瘍で発現し、癌細胞の

浸潤亢進や転移促進が報告されている。その浸潤形態は上皮間葉移行 (EMT) 型と非 EMT 型とが存在し、議論の余地がある。

3. 研究の方法

1) 酸化 DNA 損傷と修復酵素  
 食道癌症例 97 例の切除標本にて 8-OHdG と OGG1 の免疫組織化学染色をおこなった。

2) LINE-1 メチル化の意義  
 食道扁平上皮癌にて手術を行った 105 例を対象とし、切除された腫瘍組織と正常の食道粘膜を使用してパイサルファイト処理後にパイロシークエンス法にて LINE-1 メチル化レベルを定量した。p53 の突然変異については、エクソン 2~10 において PCR ダイレクトシークエンス法にて検索した。染色体不安定性は、SNP-CGH 解析にて評価した。

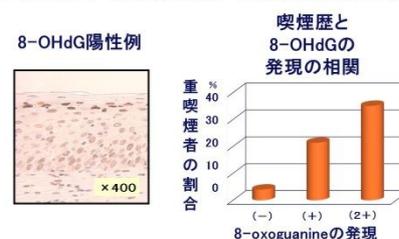
3) 食道癌進展におけるポドプラニン発現  
 ポドプラニン遺伝子を食道癌細胞株に導入し、浸潤能の変化と浸潤形態を観察した。また臨床検体でポドプラニン発現と上皮系と間葉系マーカー発現との関連を免疫組織学的染色にて評価した。

4. 研究成果

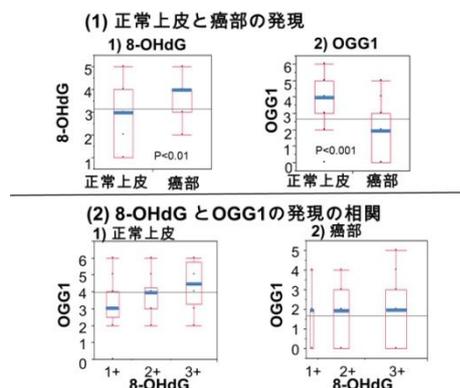
1) 酸化 DNA 損傷と修復酵素  
 食道正常上皮の 8-OHdG の発現レベルは喫煙指数が高いほど高かった (図 1)。8-OHdG の発現は正常部に比較して癌部で高い一方、OGG1 の発現は正常上皮に比較して癌部で低かった。正常上皮では 8-OHdG の発現が強いほど OGG1 の発現も高かったが、癌部ではこの関係は認めなかった (図 2)。以上より、喫煙や DNA 修復機構の障害は酸化 DNA 損傷をもたらす、食道癌の発癌や進展に関与している可能性が示唆された。

(Kubo et al. Dis Esophagus 2014)

【図1】食道上皮における8-OHdGの発現と喫煙歴



【図2】食道上皮、癌部における8-OHdGとOGG1の発現

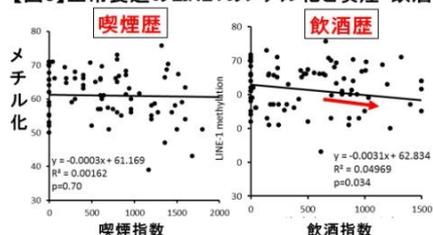


## 2) LINE-1 メチル化の意義

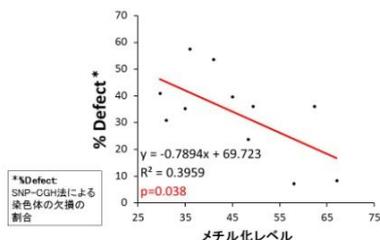
食道癌のメチル化レベルは、正常粘膜と比較して有意に低かった。食道粘膜のメチル化レベルは、喫煙・飲酒量と有意な逆相関の関係を認めた(図3)。低メチル化群においてリンパ節転移、脈管侵襲、p53 突然変異の頻度が有意に高く、また低メチル化群において有意に予後が不良であった。また食道癌における LINE-1 メチル化レベルは、ゲノムワイドなコピー数異常(染色体不安定性を反映)と有意な逆相関関係を認めた(図4)。以上より、喫煙・飲酒などにより惹起される慢性炎症に伴うゲノムワイドな低メチル化が染色体不安定性を引き起こし、食道扁平上皮の発癌に關与する可能性を示唆した。さらに、ゲノムワイドな低メチル化に關連する染色体不安定性が、種々の癌關連遺伝子の異常を引き起こして食道扁平上皮癌の進行にも關与する可能性が示唆された。

(Kawano et al. Ann Surg Oncol 2014)

【図3】正常食道のLINE1のメチル化と喫煙・飲酒



【図4】食道癌のメチル化レベルと染色体不安定性の關係

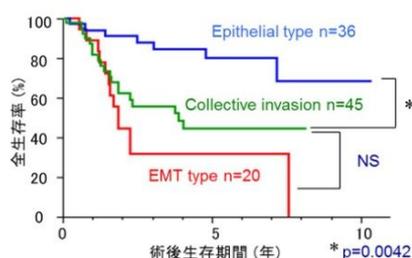


## 3) 食道癌進展におけるポドプラニン発現

ポドプラニン導入株では浸潤能の亢進と共に集塊形成の浸潤傾向が觀察され、非 EMT 型の浸潤形態であった。臨床検体でポドプラニン陽性例は非 EMT 型の浸潤像を呈し、脈管侵襲を高率に伴い予後不良であった(図5)。したがって、ポドプラニンは食道癌の非 EMT 型の浸潤形態へ寄与し、食道癌の予後規定因子であることが示された。

(Nakashima et al. Cancer Sci, 2013)

【図5】PodoplaninおよびEMTマーカーからみたタイプ別の予後



## 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29件)

1. Morita M, Toh Y, Saeki H, 他9名、うち9番目. Clinical significance of chemoradiotherapy and surgical resection for cT4 esophageal cancer. Anticancer Res. 査読有, Vol.32. 2012. pp.3275-3282
2. Takeji Y, Yamamoto M, Ito S, 他7名、うち6番目、7番目、8番目、9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. Saeki H, Toh Y, Morita M, 他10名、うち9番目. The treatment outcomes of synchronous and metachronous esophageal squamous cell carcinoma and head and neck cell carcinoma. Esophagus. 査読有, Vol.9. 2012. pp.158-164
4. Saeki H, Morita M, Harada N, 他7名、うち5番目、8番目、9番目. Esophageal replacement by colon interposition with microvascular surgery for patients with thoracic esophageal cancer: the utility of superdrainage. Dis Esophagus. 査読有, Vol.26. 2013. pp.50-56.
5. Morita M, Otsu H, Kawano H, 他11名、うち7番目、10番目. Advances in esophageal surgery in elderly patients with thoracic esophageal cancer. Anticancer Res. 査読有, Vol.33. 2013. pp.1641-1647.
6. Morita M, Kawano H, Otsu H, 他10名、うち5番目、8番目. Surgical resection for esophageal cancer synchronously or metachronously associated with head and neck cancer. Ann Surg Oncol. 査読有, Vol.20. 2013. pp.2434-2439.
7. Ikawa-Yoshida A, Ando K, Okai E, 他8名、うち4番目、10番目. Contribution of BubR1 to oxidative stress-induced aneuploidy in p53-deficient cells. Cancer Med. 査読有, Vol.2. 2013. pp.447-456.
8. Saeki H, Morita M, Tsuda Y, 他9名、うち10番目. Multimodal treatment strategy for clinical T3 thoracic esophageal cancer. Ann Surg Oncol. 査読有, Vol.20. 2013. pp.4267-4273.
9. Morita M, Otsu H, Kawano H, 他10名、うち6番目、9番目. Gender differences in the prognosis after esophagectomy for esophageal cancer. Surg Today. 査読有, Vol.44. 2014. pp.502-512.

10. Nakanoko T, Saeki H, Morita M, 他7名、うち6番目、8番目、9番目. Rad51 expression is a useful predictive factor for the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.21. 2014. pp.597-604.
11. Kubo N, Morita M, Nakashima Y, 他7名、うち6番目、7番目、8番目. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme. *Dis Esophagus*. 査読有, Vol.27. 2014. pp.285-293.
12. Ando K, Oki E, Zhao Y, 他8名、うち6番目、9番目. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. *Gastric Cancer*. 査読有, Vol.17. 2014. pp.255-622.
13. Ida S, Morita M, Hiyoshi Y, 他11名、うち7番目、8番目. Surgical resection of hypopharynx and cervical esophageal cancer with a history of esophagectomy for thoracic esophageal cancer. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.21. 2014. pp.1175-1181.
14. Morita M, Saeki H, Ito S, 他12名、うち11番目. Technical improvement of total pharyngo-laryngo-esophagectomy for esophageal cancer and head and neck cancer. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.21. 2014. pp.1671-1677.
15. Sawayama H, Ishimoto T, Watanabe M, 他10名、うち10番目、11番目. Small molecule agonists of PPAR- exert therapeutic effects in esophageal cancer. *Cancer Res*. 査読有, Vol.74. 2014. pp.575-585.
16. Murata A, Baba Y, Watanabe M, 他10名、うち10番目、11番目. IGF2 DMRO methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.21. 2014. pp.1166-1174.
17. Zhao Y, Ando K, Oki E, 他7名、うち7番目、9番目. Aberrations of BUBR1 and TP53 Gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer. *Anticancer Res*. 査読有, Vol.34. 2014. pp.5421-5427.
18. Zaitzu Y, Oki E, Ando K, 他7名、うち6番目、7番目. Loss of Heterozygosity of PTEN (Encoding Phosphate and Tensin Homolog) Associated with Elevated HER2 Expression Is an Adverse Prognostic Indicator in Gastric Cancer. *Oncology*. 査読有, Vol.88. 2014. pp.189-194.
19. Kawano H, Saeki H, Kitao H, 他9名、うち9番目、10番目. Chromosomal instability associated with global DNA hypomethylation is associated with the initiation and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.4. 2014. pp.696-702.
20. Hiyoshi Y, Morita M, Kawano H, 他10名、うち9番目、10番目. Clinical significance of surgical resection for the recurrence of esophageal cancer after radical esophagectomy. *Ann Surg Oncol*. 査読有, Vol.22. 2015. pp.240-246.
21. Yoshida R, Morita M, Shoji F, 他9名、うち9番目、10番目. Clinical Significance of SIP1 and E-cadherin in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 査読有(印刷中)
22. Morita M, Saeki H, Ito S, 他10名、うち9番目. Surgical strategies for esophageal cancer associated with head and neck cancer. *Surg Today*. 査読有, Vol.44. 2014. pp.1603-1609.
23. Minami K, Toh Y, Sugiyama M, 他2名、うち4番目. A symptomatic esophageal mucocele after esophageal bypass surgery. *Esophagus*. 査読有, Vol.9. 2012. pp.44-48.
24. Yoshida R, Morita M, Kumashiro R, 他9名、うち6番目、11番目. Staged operation for synchronous quintuple cancer in the oral cavity, hypopharynx, and esophagus. *Esophagus*. 査読有, Vol.9. 2012. pp.228-233.
25. 森田 勝、木村和恵、佐伯浩司、他3名、うち4番目. 80歳以上高齢者食道癌に対する手術成績と治療戦略. *手術*. 査読有, 第67巻1号、2013、pp.129-135.
26. 森田 勝、大津 甫、河野浩幸、他8名、うち7番目、8番目. 高齢者食道癌に対する外科的切除成績の変遷と意義. *消化器内科*. 査読有, 第56巻1号、2013、pp.33-39.
27. 森田 勝、佐伯浩司、伊藤修平、他14名、うち6番目. 食道癌に対する外科的切除1179例の治療成績の変遷. *臨牀と研究*. 査読有, 第90巻10号、2013、pp.1364-1370.
28. 森田 勝、佐伯浩司、伊藤修平、他17名、うち6番目. 食道癌克服にむけた術式の工夫. *臨牀と研究*. 査読有, 第90巻11号、2013、pp.1521-1528.
29. 森田 勝、佐伯浩司、伊藤修平、他19名、うち6番目、16番目. ハイリスク食道癌に対する手術適応の拡大. *臨牀と研究*. 査読有, 第90巻12号、2013、pp.1747-1754.

〔学会発表〕(計30件)

1. Saeki H, Neoadjuvant chemoradiotherapy for potentially resectable esophageal squamous cell carcinoma and the significance of Rad51 expression as a factor predictive of the treatment response. 2012 ASCO Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2012年6月1日-5日, Chicago, IL, USA
2. 河野 浩幸、食道扁平上皮癌におけるLINE-1メチル化の意義、第100回日本消化器病学会九州支部例会、2012年11月2日-3日、鹿児島
3. 森田 勝、ハイリスク進行食道癌に対する二期的手術による適応拡大、第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月12日-14日、千葉
4. 中ノ子 智徳、食道癌に対する術前放射線化学療法の治療予測因子としてのRad51発現意義、第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月12日-14日、千葉
5. 佐伯 浩司、SNP-CGH解析による消化管癌におけるゲノムワイド検索、第98回日本消化器病学会総会、2012年4月19日-21日、東京
6. 森田 勝、他臓器浸潤食道癌に対する集学的治療の成績胃切除後食道癌に対する血管吻合を付加した二期的結腸再建、第66回日本食道学会学術集会、2012年6月21日-22日、軽井沢
7. 佐伯 浩司、染色体ダイナミクスからみた食道癌発癌メカニズムの研究、第66回日本食道学会学術集会、2012年6月21日-22日、軽井沢
8. 森田 勝、切除可能進行食道癌に対する術前・術後治療の意義、第37回日本外科系連合学会学術集会、2012年6月28日-29日、福岡
9. 笠木 勇太、食道癌におけるRad51発現と術前化学放射線療法の治療効果に関する検討、第21回日本癌病態治療研究会、2012年7月6日-7日、群馬
10. 森田 勝、進行食道癌に対する術前および術後療法の変遷と意義、第67回日本消化器外科学会総会、2012年7月18日-20日、富山
11. 河野 浩幸、食道癌におけるDNA修復遺伝子FANCD1発現の意義、第67回日本消化器外科学会総会、2012年7月18日-20日、富山
12. 森田 勝、食道癌発生における喫煙・飲酒の関与と酸化的DNA損傷に関する研究、第20回日本消化器関連学会週間(JDDW2012)、2012年10月10日-13日、神戸
13. 森田 勝、頭頸部・食道重複癌に対する食道切除術の工夫と成績、第65回日本胸部外科学会定期学術集会、2012年10月17日-20日、福岡
14. 佐伯 浩司、がん発生におけるp53遺伝子座コピーニュートラル LOHの意義、第23回日本消化器癌発生学会総会、2012年11月15日-16日、徳島
15. 森田 勝、食道癌根治的放射線化学療法後のsalvage surgery食道癌に対するsalvage手術の臨床的意義、第74回日本臨床外科学会総会、2012年11月29日-12月1日、東京
16. 森田 勝、完全鏡視下を目指した食道切除・再建術、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日-13日、福岡
17. 日高 元、食道扁平上皮癌細胞と癌間質細胞における膜貫通型糖タンパクPodoplanin発現の意義、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日-13日、福岡
18. 河野 浩幸、食道癌におけるLINE-1メチル化の検討、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日-13日、福岡
19. 森田 勝、ハイリスク食道癌に対する二期手術の治療成績と鏡視下手術の導入、第67回日本食道学会学術集会、2013年6月13日-14日、大阪
20. 森田 勝、ハイリスク食道癌に対する外科的治療の工夫 チーム医療にもとづく周術期管理、第38回日本外科系連合学会学術集会、2013年6月6日-7日、東京
21. 森田 勝、ハイリスク食道癌に対する術後合併症予防の工夫と対処 二期手術の導入および難治性縫合不全に対する大胸筋弁被覆術、第67回日本消化器外科学会総会、2013年7月17日-19日、宮崎
22. 森田 勝、Barrett食道癌切除例の臨床病理学的検討、第21回日本消化器関連学会週間(JDDW2013)、2013年10月9日-12日、東京
23. 森田 勝、ハイリスク食道癌に対する二期手術への鏡視下手術の応用、第26回日本内視鏡外科学会総会、2013年11月28日-30日、福岡
24. Morita M, Reliable procedure for total pharyngo-laryngo-esophagectomy for esophageal cancer and head and neck cancer. 14th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2014年9月22日-24日, Vancouver, Canada
25. Morita M, Surgical resection for esophageal cancer associated with head and neck cancer. The 2014 Chang Gung Memorial Hospital Synchronous H&N + Esophageal Cancer Symposium, 2014年12月6日 台北
26. 森田 勝、食道癌サルベージ手術の成績とハイリスク症例に対する適応拡大、第68回日本食道学会、2014年7月3日-4日、東京
27. 森田 勝、咽・喉頭・食道全摘後の再建:鏡視下手術・血管吻合・分割手術の導入、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日-18日、郡山
28. 森田 勝、ハイリスク食道癌に対する二期

手術の導入および咽喉頭食道全摘への応用、第67回日本胸部外科学会、2014年9月30日-10月30日、福岡

29. 森田 勝、食道切除後に発生した異時性残存食道癌に対する外科的切除、第22回日本消化器関連学会 JDDW2014、2014年10月23日-26日、神戸
30. 森田 勝、癌多発のリスクファクターとしての喫煙、飲酒、家族歴の意義：食道癌および胃癌の比較、第25回日本消化器発生学会、2014年11月13日-14日、福岡

〔図書〕(計1件)

1. 森田 勝、他、食道疾患用語解説集【第2版】 日本食道学会編、金原出版、2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- 1) 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター <http://www.ia-nkcc.jp/>
- 2) 九州大学大学院 消化器・総合外科 <http://www.kyudai2geka.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 勝 (Morita, Masaru)  
国立病院機構九州がんセンター  
臨床研究センター 消化管外科部長  
研究者番号：30294937

### (2) 研究分担者

藤 也寸志 (Toh, Yasushi)  
国立病院機構九州がんセンター  
臨床研究センター 副院長  
研究者番号：20217459

坂口 善久 (Sakaguchi, Yoshihisa)  
国立病院機構九州医療センター  
臨床研究センター 消化器外科部長  
研究者番号：00215625

沖 英次 (Oki, Eiji)  
九州大学・医学(系)研究科(研究院)准教授  
研究者番号：70380392

佐伯 浩司 (Saeki, Hiroshi) 講師  
九州大学・大学病院  
研究者番号：80325448