

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18591467  
 研究課題名（和文）喫煙、飲酒による食道・頭頸部の多発癌発生機序の解明と二次癌の予防  
 研究課題名（英文）Mechanism of multicentric carcinogenesis and prevention of the second cancer in the upper aerodigestive induced by cigarette smoking and alcohol drinking.  
 研究代表者  
 森田 勝（MORITA MASARU）  
 九州大学・大学病院・講師  
 研究者番号：30294937

**研究成果の概要：**食道癌の発生には喫煙・飲酒の関与が大きい。本研究にて、食道癌では癌抑制遺伝子 *p53* の変異頻度が高く、中でもタバコ煙中のベンツピレンがもたらすトランスバージョン変異が多いことが明らかとなった。さらに癌抑制遺伝子 FHIT の低下が飲酒による食道多発癌の発生と関与していることが示唆された。一方、動物実験にてアルデヒド脱水素酵素の異常とアルデヒドの蓄積がアルコールによる発癌に関与していることが示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,400,000	0	2,400,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学、消化器外科学、食道外科学

キーワード：食道癌、喫煙、飲酒、*p53*、FHIT、アルデヒド、酸化的 DNA 損傷

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 喫煙・飲酒と発癌

喫煙、飲酒は、さまざまな臓器の癌の発生に関与しているが、とくに、肺、気管支、頭頸部、食道等の上部気道・消化管（Upper aerodigestive tract: UADT）の発癌における関与は大きい。しかし、喫煙・飲酒による発癌のメカニズムは未だ不明な点が多い。

## (2) UADT における癌の多発

食道癌では食道内の癌多発、頭頸部癌の合併を高頻度に認める。我々は、組織学的検討にて、食道内癌多発は頭頸部癌の合併と密接に

関与し（Kuwano, Morita, *J Surg Oncol* 1991）、さらに食道癌の多発症例では前癌病変の多発も高頻度に伴っている（Morita *Cancer* 1994）ことより、UADT における多中心性発癌を支持してきた。また、食道癌の発生に、喫煙、飲酒が相乗的な作用をもつばかりでなく（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明らかにしてきた（Morita, *Int J Cancer* 1994, 1998, *J Surg Oncol* 2003）。

(3) 標的遺伝子としての癌抑制遺伝子の可能性

様々な組織の発癌において、p53 癌抑制遺伝子の異常が関与していることが報告されている。さらに、p53 遺伝子はタバコ煙に含まれる発癌物質に誘導される DNA 付加体の標的遺伝子のひとつであり、この付加体による p53 遺伝子突然変異により、細胞の DNA 修復機能などが喪失して多段階の遺伝子変異が誘導され、癌が発生すると考えられている。

#### (4)代謝酵素の遺伝子多型と発癌

元来、タバコやアルコールは体内でいわゆる解毒酵素で代謝される過程でより強い発癌物質が生じる。しかし、この酵素の遺伝子に個人差（遺伝子多型）があるため酵素の発現にも個人差がある。したがって、同量の喫煙、飲酒でも発癌の頻度に個人差がある。アルデヒド脱水素酵素-2(ALDH2)不活型は大酒家食道・頭頸部癌の発生因子であり、さらに、この遺伝子多型は UADT の癌の多発に関与している可能性が報告されている。一方、我々は、食道上皮における ALDH-2 の発現を免疫組織化学染色により検討し、アルコール暴露と発現が密接関係し、不活型は局所の発現が低下しているためアルデヒドの蓄積が食道におこる可能性があることを報告した (Morital, *Front Biosci* 2005)。

## 2. 研究の目的

喫煙、飲酒による食道癌の発生の分子生物学的メカニズムを解明する。

- (1)p53, FHIT 等の癌抑制遺伝子異常の標的遺伝子としての意義を明らかにする。
- (2)代謝酵素の発現異常の発癌における意義を明らかにする。
- (3)酸化的 DNA 損傷の食道癌発癌の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 食道癌発癌における抑制遺伝子、細胞周期関連遺伝子の異常の関与

#### 食道癌発癌における p53 遺伝子異常

消化管癌 354 例(食道癌 85 例、胃癌 112 例、大腸癌 157 例)のゲノムを抽出し、全例をダイレクトシーケンスで p53 の遺伝子変異を検索し、同時に遺伝子座の LOH 解析を行った。さらにミスマッチ修復能を検索するため 5 つのマイクロサテライトマーカーにて MSI 解析を行った。

#### 食道癌における FHIT 発現

55 例の食道扁平上皮癌を対象として、fragile histidine triad (FHIT) 発現の飲酒、喫煙、および癌多発との関連について免疫組織化学的に検討した。

細胞周期調節タンパク p14, p16 のメチル化および発現

細胞周期調節タンパク p14, p16 は癌抑制遺伝子としての性質を有し、メチル化等によるこれらの発現低下は癌化、癌の進展に関与している可能性がある。さらに、喫煙等の環境因子の標的遺伝子である可能性がある。今回、38 症例の食道扁平上皮癌症例でメチル化を検討すると共に、18 症例により発現を検討した。

## (2)アルデヒド脱水素酵素異常と発癌に関する基礎実験

### アルデヒド皮下投与による扁平上皮癌の発生に関する動物実験

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 2 活性がない ALDH2 不活性型のヒトでは、飲酒により食道癌も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。野生型マウス (*Aldh2*<sup>+/+</sup>) および *Aldh2* ノックアウトマウス (*Aldh2*<sup>-/-</sup>) に、アセトアルデヒド 100mg/kg 体重 (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)。

### アルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトの呼吸器系組織におけるアセトアルデヒド感受性

野生型マウス (*Aldh2*<sup>+/+</sup>) および *Aldh2* ノックアウトマウス (*Aldh2*<sup>-/-</sup>) にアセトアルデヒド吸入曝露実験を行い、2 週間曝露後呼吸器系組織における HE 染色による病理組織学的検討を行った。

## (3)食道癌発生、進展における酸化的 DNA 損傷の検討

様々な環境因子、内因性要因に起因する酸化的 DNA 損傷は遺伝子変異を誘発し発癌の原因とな 8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxoG) は、酸化損傷の指標であるが、8-oxoG DNA glycosylase (OGG1) により塩基除去修復される。食道癌 98 例にて、OGG1 と 8-oxoG の免疫組織化学染色を行った。

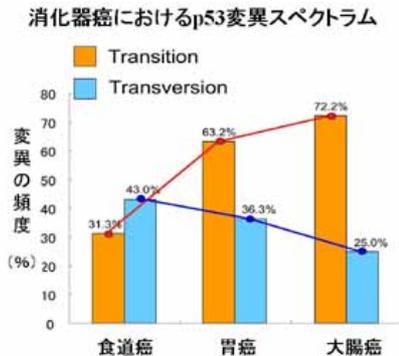
## 4. 研究成果

(1) 食道癌発癌における抑制遺伝子、細胞周期関連遺伝子の異常の関与

#### 食道癌発癌における p53 遺伝子異常

p53 遺伝子変異: 食道癌 43 例 (51.8%)、胃癌 18 例 (16.0%)、大腸癌 36 例 (22.9%) に認められた。変異スペクトラム: トランスポージョンの比率は、食道、胃、大腸でそれぞれ 43.0%, 36.3%, 25.0% と下部消化管に近づくにつれて減少し、反対にトランジションの比率はそれぞれ 31.3%, 63.2%, 72.2% と下部消化管に近づくにつれ上昇した。MSI 解析: MSI の頻度は食道癌 10.2%、胃癌 20.1%、大腸癌 21.6% であった。MSI を来した症例では p53 トランジション変異が多い傾向にあった。

これらの結果より、食道癌では p53 の LOH と p53 トランスポージョン変異の頻度が高く、タバコ中のベンツピレンなどの DNA 損傷が発癌に関わっていると考えられた。一方、大腸癌ではトランスポージョンの頻度が高く、DNA ミスマッチ修復機構の破綻が p53 などの癌抑制遺伝子の変異にも関わっている可能性がある (Egashira,

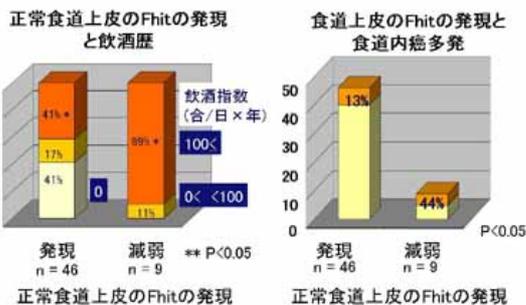


Cancer Sci 2007, Oki, Digestion 2009)。

### 食道癌における FHIT 発現

食道粘膜における FHIT 発現症例の飲酒量は発現減弱症例に比較して有意に少なかった。また、食道内多発癌の頻度は各々 44%, 13% であり、食道粘膜 FHIT 発現症例において有意に高頻度であった。以上より、FHIT 発現の消失がアルコール関連の食道癌の発生および発癌形態としての多中心性発癌に関与していることが示された (Morita, Anticancer Res 2006)。

### 細胞周期調節タンパク p14, p16 のメチル



### 化および発現

p14 の発現低下例は進行した症例が有意に多く、メチル化と相関していた。一方、p16 に関してはこれらの相関を認めなかった。したがって、食道癌において p14 のメチル化はその発現低下に重要で、さらに食道癌の浸潤、転移に関与している可能性が示唆された。(Ito, Morita, Anticancer Res 2007)

### (2) アルデヒド脱水素酵素異常と発癌に関する基礎実験

#### アルデヒド皮下投与による扁平上皮癌の発生に関する動物実験

アセトアルデヒド投与群 5 匹中 1 匹に背部表皮の表面を表皮に沿って進展する扁平上皮癌を認め、このマウスは 11 ヶ月以降は全身に皮膚に病変を認め、測定不能となり、394 日後に死亡した。この腫瘍細胞は p53 発現陽性と判定した。また、シーケンス法により判定したマウス p53 遺伝子点突然変異では、コドン 346 に A から G への transition 変異を認め、p53 タンパクはグルタミン酸からグリシンへの変異していた。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 (第 79 回日本産業衛生学会)。

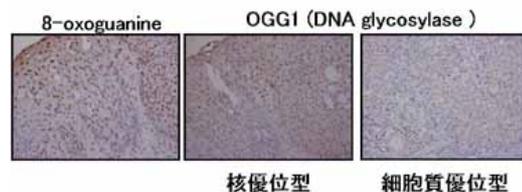
### アルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトの呼吸器系組織におけるアセトアルデヒド感受性

AA 曝露により野生型マウスに比べ *Alch2* 欠損マウスで、鼻部における呼吸上皮のびらんや鼻部の上皮出血や鼻腔内出血を発症する傾向を認めた。ALDH2 不活性型の人においても AA 曝露によって呼吸器系組織の病変を発症しやすいことが考えられる。

### (3) 食道癌発生、進展における酸化的 DNA 損傷の検討

8-oxoG 陽性率は進行癌ほど高値であった。一方、OGG1 は核染色型と細胞質染色型が存在し、進行癌ほど細胞質型が多かった。この結果より、食道癌の進展と酸化損傷の蓄積との関連が示唆された。一方、核内の OGG1 が 8-oxoG の塩基除去修復に重要であると考え、8-oxoG と OGG1 の局在の不一致が塩基除去修復の障害につながる可能性が示唆された。(第 109 回日本外科学会定期学術集会)

### 食道癌における 8-oxoguanine, OGG1 の発現



## 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21件)

1. Oki E, Zhao Y, Yoshida R, Egashira A, Ohgaki K, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. **Digestion** 79 Suppl 1:33-39, 2009. 査読有
2. Morita M, Masuda T, Okada S, Yoshinaga K, Saeki H, Tokunaga E, Endo K, Emi Y, Takeji Y, Maehara Y. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal cancer: Factors associated with clinical response and postoperative complications. **Anticancer Res** 2009. 印刷中 査読有
3. Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Takeji Y, Ichiki Y, Sugio K, Yasumoto K, Maehara Y. Acute Lung Injury following an Esophagectomy for Esophageal Cancer: With special Reference to the Clinical Factors and Cytokine Levels of Peripheral Blood and Pleural Drainage Fluid. **Dis Esophagus** 21:30-36, 2008. 査読有
4. Koga T, Morita M, Nishida K, Oki E, Takeji Y, Maehara Y. Successful treatment of tracheomediastinal fistula after tracheal injury obtained during esophagectomy using pectoralis major muscle: a case report. **Esophagus** 5:41-44, 2008. 査読有
5. Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Takeji Y, Yamanaka T, Maehara Y. Advances in esophageal cancer surgery in Japan: An analysis of 1000 consecutive patients treated at a single institute. **Surgery** 143: 499-508, 2008. 査読有
6. Morita M, Egashira A, Yoshida R, Ikeda K, Ohgaki K, Sibahara K, Oki E, Sadanaga N, Takeji Y, Maehara Y. Esophagectomy in patients 80 years of age and older with carcinoma of the thoracic esophagus. **J Gastroenterol** 43:345-351, 2008. 査読有
7. Oyama T, Sugio K, Isse T, Matsumoto A, Nose N, Uramoto H, Nozoe T, Morita M, Kagawa N, Osaki T, Muto M, Yasumoto K, Kawamoto T. Expression of Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer. **Front Biosci** 13:5787-5793, 2008. 査読有
8. Matsumoto A, Kawamoto T, Mutoh F, Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Nakayama KI, Ichiba M. Effects of 5-week ethanol feeding on the liver of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice. **Pharmacogenet Genom** 18:847-852, 2008. 査読有
9. Kunugita N, Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, Kinaga T, Kawamoto T. Increased frequencies of micronucleated reticulocytes and T-cell receptor mutation in Aldh2 knockout mice exposed to acetaldehyde. **J Toxicol Sci** 33:31-36, 2008. 査読有
10. Ishida M, Morita M, Saeki H, Ohga T, Sadanaga N, Watanabe M, Takeji Y, Maehara Y. Expression of p53 and p21 and clinical response for hyperthermochemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. **Anticancer Res** 27:3501-3506, 2007. 査読有
11. Ito S, Ohga T, Saeki H, Watanabe M, Takeji Y, Morita M, Yamada T, Maehara Y. Promoter hypermethylation and quantitative expression analysis of *CDKN2A* (*p14<sup>ARF</sup>* and *p16<sup>INK4a</sup>*) gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 27:3345-3354, 2007. 査読有
12. Oki E, Takeji Y, Baba H, Nishida K, Koga T, Tokunaga E, Egashira A, Ikeda K, Yoshida R, Yamamoto M, Morita M, Maehara Y. Clinical significance of cytokeratin positive cells in bone marrow of gastric cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol** 133: 995-1000, 2007. 査読有
13. Oki E, Morita M, Takeji Y, Ikebe M, Sadanaga N, Egashira A, Nishida K, Koga T, Ohata M, Honbo T, Yamamoto M, Baba H, Maehara Y. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. **Dis Esophagus** 20:301-304, 2007. 査読有
14. Egashira A, Morita M, Takeji Y, Sadanaga N, Oki E, Honbo T, Ohta M, Maehara Y. p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma and their relevance to etiology and pathogenesis: results in Japan and comparisons with other countries. **Cancer Sci** 98:1152-1156, 2007. 査読有
15. Oyama T, Isse T, Ogawa M, Muto M, Uchiyama I, Kawamoto T. Susceptibility to inhalation toxicity of acetaldehyde in Aldh2 knockout mice. **Front Biosci** 12:1927-1934, 2007. 査読有
16. Oyama T, Sugio K, Uramoto H, Kawamoto T, Kagawa N, Nadaf S, Carbone D, Yasumoto K. Cytochrome P450 expression (CYP) in

- non-small cell lung cancer. **Front Biosci** 12:2299-2308,2007. 査読有
17. Oyama T, Sugio K, Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Isse T, Nozoe T, Kagawa N, Yasumoto K, Kawamoto T. Increased cytochrome P450 and aryl hydrocarbon receptor in bronchial epithelium of heavy smokers with non-small cell lung carcinoma carries a poor prognosis. **Front Biosci** 12:4497-4503,2007. 査読有
  18. Oyama T, Kim YD, Isse T, Pham TTP, Ogawa M, Yamaguchi T, Kinaga T, Yashima Y, Kim H, Kawamoto T. A pilot study on subacute ethanol treatment of Aldh2 KO mice. **J Toxicol Sci** 32:421-428,2007. 査読有
  19. Morita M, Oyama T, Nakata S, Ono K, Sugaya M, Uramoto H, Yoshimatsu T, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K. Expression of FHIT in esophageal epithelium and carcinoma: Reference to drinking, smoking and multicentric carcinogenesis. **Anticancer Res** 26: 2243-2248,2006. 査読有
  20. Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hananagiri T, Morita M, Yasumoto K. The methylation status and protein expression of CDH1, p16INK4A, and fragile histidine triad in non-small cell lung carcinoma. **Cancer** 106: 2190-2199,2006. 査読有
  21. Oki E, Takeji Y, Baba H, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Yamamoto M, Ikebe M, Maehara Y. Impact of loss of heterozygosity of encoding phosphatase and tensin homolog on the prognosis of gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 21:814-818, 2006. 査読有

[学会発表](計13件)

1. 2008 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium (January 25-27,2008.Orlando,USA)  
The spectrum of mutation and the frequency of allelic deletion of the p53 gene in gastrointestinal cancer: The difference between the upper and lower digestive tract  
Oki E, Takeji Y, Ohgaki K, Shibahara K, Imamura I, Sadanaga N, Morita M, Maehara Y.
2. 第94回日本消化器病学会総会 (平成20年5月8-10日、福岡)  
消化器癌におけるp53変異解析とマイクロサテライト不安定性解析の診断的意義  
沖英次, 掛地吉弘, 趙岩, 吉田倫太郎, 岡田敏子, 増田隆伸, 大垣吉平, 今村一郎, 芝原幸太郎, 定永倫明, 森田勝, 前原喜彦
3. 第62回日本食道学会学術集会 (平成20年6月21-22日、東京)  
食道癌におけるp53蛋白発現とp53遺伝子解析の意義  
沖英次, 森田勝, 安藤幸滋, 杉山雅彦, 増田隆伸, 吉田倫太郎, 今村一郎, 大垣吉平, 芝原幸太郎, 定永倫明, 掛地吉弘, 前原喜彦
4. The 43rd Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (June 1-5,2007.Chicago,USA)  
Recent advance of surgical treatment for esophageal cancer in Japan: An experience of 1000 cases that underwent esophagectomy in a single institute  
Morita M, Okada S, Masuda T, Ikeda K, Yoshida R, Honbo T, Ohta M, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Takeji Y, Maehara Y.
5. 第61回日本食道学会学術集会 (平成19年6月21-22日、横浜)  
食道癌におけるp53異常の意義 遺伝子変異スペクトラムの解析と他臓器癌との比較  
沖英次, 森田勝, 江頭明典, 岡田敏子, 増田隆伸, 池田圭介, 吉田倫太郎, 太田光彦, 本坊拓也, 定永倫明, 掛地吉弘, 前原喜彦
6. 第62回日本消化器外科学会定期学術総会 (平成19年7月18-20日、東京)  
p53遺伝子変異スペクトラムからみた消化管癌における治療戦略  
沖英次, 掛地吉弘, 森田勝, 吉田倫太郎, 池田圭介, 太田光彦, 本坊拓也, 江頭明典, 定永倫明, 前原喜彦
7. 第66回日本癌学会学術総会 (平成19年10月3-5日、横浜)  
The difference p53 abnormalities between cancer of the upper and lower digestive tract  
Oki E, Takeji Y, Ohgaki K, Shiotani S, Imamura I, Shibahara K, Yoshida R, Egashira A, Sadanaga N, Morita M, Maehara Y.
8. 第80回日本産業衛生学会 (平成19年4月25-27日、大阪)  
アルデヒド脱水素酵素2ノックアウトの呼吸器系組織におけるアセトアルデヒド感受性  
小山倫浩, 一瀬豊日, PHAM Thi Thu Phuong, 小川真規, 山口哲右, 木長健, 八嶋康典, 尾崎真一, 松本明子, 市場正良, 櫻田尚樹, 川本俊弘

9. 16th World Congress of the International Association of Surgeons and Gastroenterologists (and Oncologists)  
(May 25-27, 2006. Madrid, Spain)  
Risk Factors for Esophageal Cancer and the Multiple Occurrence of Carcinoma in the Upper Aerodigestive Tract  
Morita M, Maehara Y.
10. 第106回日本外科学会定期学術集会  
(平成18年3月29-31日、東京)  
食道癌の発生における突然変異の蓄積とDNA修復異常に関する研究  
江頭明典、池田圭介、吉田倫太郎、小嶋綾、西田康二郎、古賀聡、徳永えり子、沖英次、織田信弥、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦
11. 第61回日本消化器外科学会定期学術総会  
(平成18年7月13-15日、横浜)  
食道癌におけるp53遺伝子変異及びタンパク質発現異常に関する分子機構  
江頭明典、森田勝、池田圭介、吉田倫太郎、小嶋綾、西田康二郎、古賀聡、徳永えり子、沖英次、掛地吉弘、前原喜彦
12. 第65回日本癌学会学術集会  
(平成18年9月28-30日、横浜)  
食道癌におけるp53異常に注目した発癌分子機構の解析  
江頭明典、森田勝、池田圭介、吉田倫太郎、太田光彦、本坊拓也、沖英次、織田信弥、掛地吉弘、前原喜彦
13. 第79回日本産業衛生学会総会  
(平成18年5月9-12日、仙台)  
アセトアルデヒド皮下投与によるAlch2ノックアウトマウス表皮病変のp53異常  
小山倫浩、一瀬豊日、山口哲右、小川真規、木長健、村上朋絵、奈良井理恵、松本明子、市場正良、八嶋康典、尾崎真一、櫻田尚樹、村山留美子、内山巖雄、川本俊弘

〔図書〕(計3件)

1. 森田勝、定永倫明、前原喜彦  
有効な症例「どんながんに有効なのか」  
食道の腫瘍、日本ハイパーサーミア学会  
編 **ハイパーサーミアがん温熱療法ガイドブック** p54-57, 2008. 査読無
2. 森田勝、定永倫明、掛地吉弘、前原喜彦  
胃管による食道再建術  
**Digestive Surgery Now No. 2 食道・胃外科標準手術**(上西紀夫編)  
メジカルビュー社、東京、p26-43, 2008.  
査読無
3. 森田勝、安藤幸滋、杉山雅彦、岡田敏子、増田隆伸、吉田倫太郎、今村一郎、大垣吉平、塩谷聡子、芝原幸太郎、沖英次、定永倫明、掛地吉弘、前原喜彦  
食道癌に対するsalvage手術の治療成績と妥当性 術前治療別にみた合併症と予後の比較検討 **癌の臨床** 53:  
611-617, 2007. 査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 勝 (MORITA MASARU)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：30294937

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：