

16 - 11 気道食道領域がんのリスクとアルコール代謝酵素との関連性とその臨床評価に関する研究

主任研究者 国立がんセンター東病院 武 藤 学

研究成果の要旨

頭頸部・食道癌のリスクはアルコール代謝酵素の遺伝子多型と強く関連し、アルコールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドの蓄積が究極の原因である可能性を見いだした。とくに頭頸部と食道に癌や異型上皮が多発性に発生する Field cancerization 現象は、半世紀以上も飲酒と喫煙が原因と考えられてきたが、不活性型 ALDH2 遺伝子と低活性 ADH3 遺伝子によるアセトアルデヒドの蓄積が大きく関与することを明らかにした。Field cancerization 現象は内視鏡的ヨード染色により臨床的な観察が可能であるが、予後や治療法の選択さらには経過観察法において多くの課題を残している。本研究班では、多発癌予防および早期発見法を目指した「ヨード不染帯の程度と飲酒習慣そしてアルコール代謝体質からみた頭頸部および食道の多発がんのリスクと多発がん発生までの期間に関する多施設共同前向きコホート研究」を計画し開始予定である。また、アセトアルデヒドによる DNA 損傷が遺伝子多型によって異なるかを検討するため、高速クロマトグラフィータンデム質量分析器 (LC/MS/MS) による測定系を確立した。前研究班 (12-12) で集積したサンプルを用いて分析を開始している。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
武藤 学	国立がんセンター東病院 外来部 消化管科医長	アルコール代謝酵素の遺伝子多型と Field cancerization 現象の関連
横山 顕	独立行政法人国立病院機構 久里浜アルコール症センター 臨床研究部長	MCV とフラッシング質問紙に基づいた食道がんリスク評価
井垣弘康	国立がんセンター中央病院 特殊病棟 医員	アルコール代謝酵素の遺伝子多型と食道がんリスク評価
松田知成	京都大学 地球環境学堂 環境調和型産業論分野 助教授	アルデヒド DNA アダクト生成と発がんリスクの評価
志賀清人	東北大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師	アルコール代謝酵素の遺伝子多型に関連した特異的 p53 遺伝子変異
清水勇一	北海道大学病院 光学医療診療部 助手	食道に見られる多発ヨード不染帯の臨床的意義の解析

総括研究報告

1 研究目的

本研究は、がん研究助成金研究(12-12)「食道がん、頭頸部がんのリスクとアルコール代謝酵素の関連に関する研究」で得られた、アルコール代謝酵素の遺伝子多型と食道癌・頭頸部癌のリスクとその簡単なリスク評価法のさらなる臨床応用を目的としている。がん研究助成金研究(12-12)では、アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)ヘテロ欠損者は日本人の約4割に存在するが、ALDH2ヘテロ欠損者が食道癌・頭頸部癌のリスクであることが明らかにされた。簡易フラッシング質問紙法は、少量飲酒で皮膚が赤くなる現在または過去の体質(フラッシャー)をALDH2欠損と判定するが、これを用いると約90%の感度・特異度で判別し簡単にリスク評価が可能であることがわかった。またMCV高値が食道癌のリスクとなることも明らかにした。

このことをふまえ、本研究では1)ALDH2ヘテロ欠損と食道癌・頭頸部癌のリスクのメカニズムを明らかにし、アルコールに起因する発癌の予防法を探ること。2)簡易フラッシング質問紙法やMCVを用いたリスク評価で、コホート研究ならびにスクリーニング研究を実施し、具体的な臨床的予防法、早期発見法の開発などへの応用を探ることを目的とした。

2 研究成果

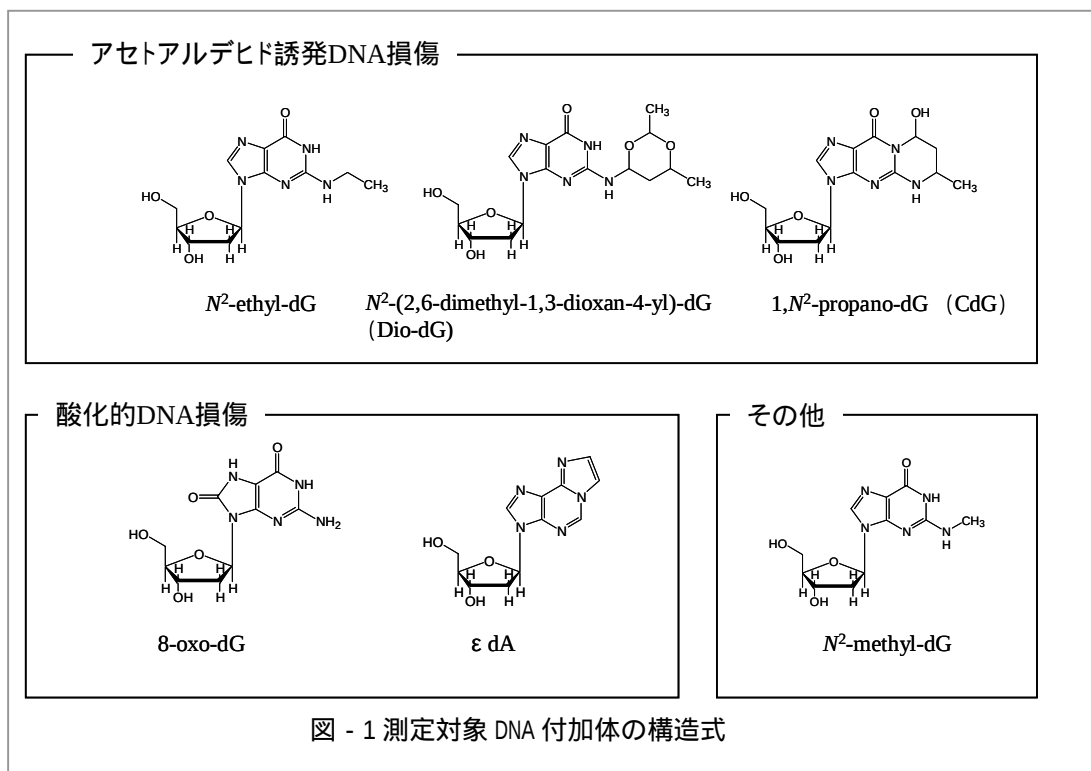
1)アセトアルデヒドによるDNA損傷の検討

アセトアルデヒドによるDNA損傷や突然変異は既存研究で知られている。食道がんのリスクがALDH2の遺伝子多型に関連していることから、アセトアルデヒドがDNAを損傷し、突然変異を介して発癌を誘発すると推定される。ALDH2遺伝子多型によって、アセトアルデヒド誘発DNA損傷(DNA付加体)の生成量に差が出るかどうかをヒトの食道サンプルを用いて検討するために、まず高速クロマトグラフィータンデム質量分析器(LC/MS/MS)を導入し、アセトアルデヒドが引き起こす様々なDNA損傷の分析方法について検討した。従来は外部標準法で分析していたが、本研究ではアセトアルデヒドDNA付加体の内部標準物質を合成し、より正確な分析を可能にした。

分析対象のDNA付加体の構造を図-1に示す。アセトアルデヒドが誘発するDNA損傷 N^2 -ethyl-dG、Dio-dG(ジアステレオマー2種類)、CdG(ジアステレオマー2種類)

および酸化的DNA損傷の8-oxo-dG、 ϵ dAを測定対象物質とした。また、ALDH2はアセトアルデヒドだけではなくホルムアルデヒドも分解するので、ホルムアルデヒドが誘発する N^2 -methyl-dGも測定した。LC/MS/MSを用いて測定を行う場合、安定同位体を内部標準とした同位体希釈法が最も正確な方法である。そこで、これらのDNA付加体のうち、8-oxo-dG、 N^2 -ethyl-dG、CdGについて、安定同位体を用いた内部標準物質を作成した。8-oxo-dG($U^{15}N_5$)およびdG($U^{15}N_5$)はニューヨーク州立大学の渋谷真也教授よりいただいた。 N^2 -ethyl-dG($U^{15}N_5$)、CdG₁($U^{15}N_5$)およびCdG₂($U^{15}N_5$)は、dG($U^{15}N_5$)を原料として、Wangらの方法(*Chem. Res. Toxicol.*, 13, 1149-1157, 2000)に従って合成した。

倫理審査委員会の承認を得て採取した検体のうち、15検体についてパイロット的に検討を行ったところ、Dioxan-dGはすべてのサンプルで検出されなかったが、その他の付加体は検出された。しかしながら、DNA付加体の量が予想以上に少なく、検出限界レベルでの定量となってしまった。今後、分析に供するDNA量を5倍(50 μ g)に増やし、LC/MS/MSへの打ち込み量もほぼ全量にすることを検討しており、現在よりも感度を10倍高め、正確な定量を行う予定である。今後、ALDH2遺伝子多型とDNA付加体の関連性についても分析をする予定である。



2) 頭頸部扁平上皮癌患者の ALDH2 遺伝子多型と LOH の関連

頭頸部扁平上皮癌の癌化の過程で高頻度に見られる 3p21, 9p21, 17p13(TP53) の 3 カ所の LOH(loss of heterozygosity)と ALDH2 遺伝子多型との関連性を検討したが、明らかな関連性は認められなかった。飲酒量を、多量飲酒(常飲者)、飲酒歴なし、機会飲酒に分けて検討したが、LOH の頻度の差は認められなかった。

3) アルコール依存症における異時性多発癌と中・下咽頭癌のリスク

アルコール依存症男性の食道ヨード染色で診断した癌の既往のない新規食道癌 144 例において、ALDH2 欠損者とフラッシング質問紙法で判定したフラッシャー(ALDH2 欠損者)の異時性多発癌のリスクはそれぞれ 5.0(95%信頼区間 1.69-14.85)と 3.7(95%信頼区間 1.53-8.85)であった。ALDH2 欠損者の4年の累積発生率は60%に達した。中・下咽頭癌のリスクは ALDH2 欠損者で 10.8(95%信頼区間 1.38-84.57)と高く、6年での累積発生率は60%に達した。

4) 食道癌 EMR 例における異時性多発癌と中・下咽頭癌のリスク評価

食道および頭頸部がん患者に対し、ヨード色素内視鏡

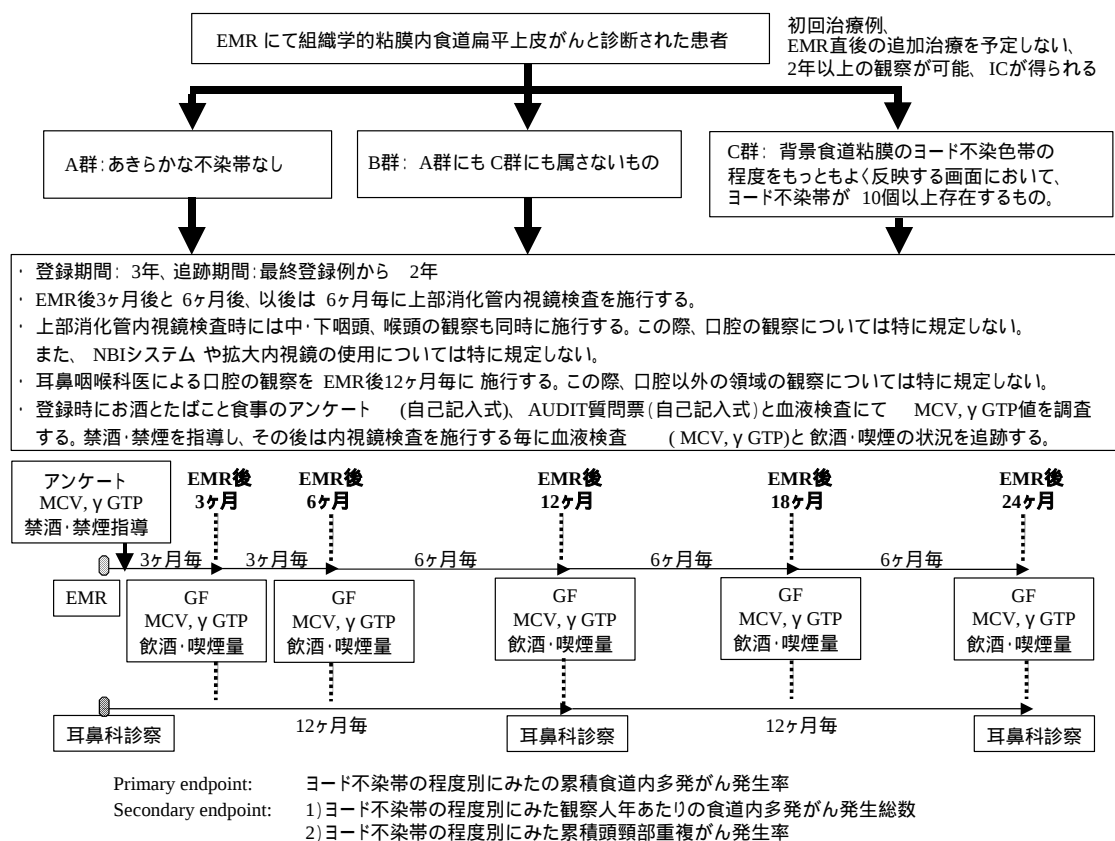
検査を行うと、大小不同の多発ヨード不染帯(multiple Lugol-voiding lesion; multiple LVL)をしばしば観察することができる。われわれは、頭頸部と食道の重複がん症例や食道内多発がん症例の背景食道粘膜には multiple LVL が高頻度に見られ、Field cancerization 現象には multiple LVL の発生が関連していることを明らかにした。

最近では、早期の食道がんの発見が増加し、内視鏡的粘膜切除術(EMR)により根治が得られる症例が増えてきた。一方、EMR の普及により食道の温存が可能となり長期生存が期待できるようになった反面、EMR 後の食道内多発がんや頭頸部がん発生が根治性の点から問題になっている。

本研究では、食道がん EMR 症例におけるヨード不染帯をバイオマーカーにした多発がん発生リスクと多発がん発生までの期間の検討を行うため、多施設共同前向きコホート研究を計画した。同時に簡易フラッシング質問紙法や MCV を用いたリスク評価を行い、飲酒との関連性も検討する。

本研究では食道ヨード色素内視鏡所見より各症例のヨード不染帯の程度を3分類(A群:明らかな不染帯なし、B群:A群にもB群にも属さない、C群:不染帯が10個以上存在する)するが、いずれの群に属しても、EMR 後3ヶ月後(±1ヶ月)、6ヶ月後(±1ヶ月)、以後は6ヶ月毎

(±2ヶ月)に上部消化管内視鏡検査を施行する。この際、食道ヨード色素内視鏡検査は必ず施行する。上部消化管内視鏡検査時には中・下咽頭、喉頭の観察も同時に行う。上部消化管内視鏡検査時には、血液検査(MCV, γGTP)も施行し、飲酒・喫煙の状況を追跡調査する。



本研究のPrimary Endpointはヨード不染帯の程度別にみた累積食道内多発がん発生率とし、EMR後の経過観察中の初発食道内多発がん発生をイベントとする。その累積発生率をA,B,C群ごとにカプランマイヤー法にて算出する。また、食道内多発がん発生に関与する因子の独立な影響を同定するため、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析をおこなう。A群とB群との差を検出力80%、有意水準5%で検出するために必要な標本数は、A・B・C群の累積発生率を1%、10%、30%、人数比を4:4:2、脱落率を10%と仮定すると、計292例となる。なお、この時、A群とC群との差の検出力は99%以上(有意水準5%)である。中止例・不適格例などを考慮して予定登録数を330人とした。試験開始後から3年間で目標症例数の集積をめざす。

本研究によりヨード不染帯の頻度をバイオマーカーとしてEMR後の食道内多発がんおよび頭頸部重複がん発生の高危険群が飲酒の程度と合わせて予測可能となれば、

多発がん発生の予防、早期発見、早期治療につながり、EMRの治療成績の向上に貢献すると期待される。

参加施設: 国立がんセンター中央病院、国立がんセンター東病院、国立久里浜病院、川崎病院、東北大学、国

立大阪病院、昭和大学、静岡県立がんセンター、熊本地域医療センター。

3. 倫理面への配慮

本研究で施行されるすべての試験は各施設の倫理審査委員会の承認を得て、文書により被験者本人より同意を取得した対象者のみに実施される。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Muto M., Takahashi M., Ohtsu A., Ebihara S., Yoshida S., Esumi H. Risk of multiple squamous cell carcinomas both in the esophagus and the head and neck region. Carcinogenesis. Published on line 2005 Feb 17.
2. Katada C., Muto M., Manabe T., Ohtsu A., Yoshida S. Local recurrence of squamous-cell carcinoma of the esophagus after EMR. Gastrointest Endosc. 61(2):219-225, 2005 Feb.
3. Muto M., Miyamoto S., Hosokawa A., Doi T., Ohtsu A., Yoshida S., Endo Y., Hosokawa K., Saito D., Shim C.S., Gossner L. Endoscopic mucosal resection in the stomach using the insulated-tip needle-knife. Endoscopy, 37(2): 178-82, 2005 Feb.
4. Machida H., Sano Y., Hamamoto Y., Muto M., Kozu T., Tajiri H., Yoshida S. Narrow-band imaging in the diagnosis of colorectal mucosal lesions: a pilot study. Endoscopy, 36(12): 1094-8, 2004. Dec.
5. Muto M., Nakane M., Katada C., Sano Y., Ohtsu A., Esumi H., Ebihara S., Yoshida S. Squamous cell carcinoma in situ at oropharyngeal and hypopharyngeal mucosal sites. Cancer, 101(6): 1375-81, 2004 Sep 15.
6. Muto M., Ohtsu A., Yoshida S. Treatment strategies for esophageal stricture before or after chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer. Digestive Endoscopy, 16 (Suppl.): S5-S8, 2004.
7. Narikiyo M., Tanabe C., Yamada Y., Igaki H., Tachimori Y., Kato H., Muto M., Montesano R., Sakamoto H., Nakajima Y., Sasaki H. Frequent and preferential infection of Treponema denticola, Streptococcus mitis, and Streptococcus anginosus in esophageal cancers. Cancer Sci, 95(7): 569-574, 2004 Jul.
8. Yamagishi, Y., Yokoyama, A., et al. Hepatocellular carcinoma in heavy drinkers with negative markers for viral hepatitis. Hepatology Research 28: 177-183, 2004.
9. Higuchi, S., Yokoyama, A., et al. Influence of genetic variations of ethanol-metabolizing enzymes on phenotypes of Alcohol-related disorders. Ann NY Acad Sci 1025: 472-480, 2004.
10. Igaki H., Tachimori Y, Kato H. Improved survival for patients with upper and/or middle mediastinal

lymph node metastasis of squamous cell carcinoma of the lower thoracic esophagus treated with 3-field dissection. Ann Surg 239: 483-490, 2004.

11. M. Yasui, N. Suzuki, H. Miller, T. Matsuda, S. Matsui, S. Shibutani, Translesion Synthesis past 2'-Deoxyxanthosine, a Nitric Oxide-derived DNA Adduct, by Mammalian DNA Polymerases, J. Mol. Biol., 344, 665-674, 2004
12. Shiga, K., et al. Allelic loss correlated with tissue specificity in head and neck squamous cell carcinomas and the clinical features of patients. Tohoku J. Exp.Med., 204: 163-172, 2004.

日本語論文

1. 武藤 学 . 咽頭・喉頭粘膜の拡大観察 - NBI system の有用性 - 消化管拡大内視鏡診断の実際 観察のコツと診断のポイント、23 - 31 金原出版株式会社 2004 .
2. 武藤 学、大津 敦、堅田 親利 . 食道癌の chemo-radiation 治療 腫瘍内視鏡学、32 - 38 医学書院 2004 .
3. 武藤 学、堅田 親利 . 早期癌に対する内視鏡的治療 (1) 内視鏡医による頭頸部領域の早期癌診断と治療 臨床消化器内科、19(10): 1327-1336、2004 .
4. 松田知成、DNA 付加体の分析方法 - LC/ESI/MS/MS はポストラベルを越えたか? 環境変異原研究、26, 199-201, 2004 .