

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

半世紀以上も前から、飲酒は頭頸部および食道における発癌の危険因子とされてきたが、これらの癌の予防・早期発見に関する研究が積極的に行われたことはない。アルコール関連発癌では体内のアセトアルデヒド(AA)蓄積が発癌のリスクと考えられるため、AAの生体への影響をDNAアダクト測定にて検討すると、AAが誘発するDNA損傷のうちN2-ethyl-dG、CdG1、CdG2のレベルは、いずれもアルデヒド脱水素酵素(ALDH)2型のヘテロ欠損者(ALDH2*1/2*2型)において正常者(ALDH2*1/2*1型)よりも有意に高いことを明らかにした。臨床的には、食道癌は内視鏡的治療(EMR)で根治ができる症例がふえている反面、発癌母地である臓器そのものが温存されるため経過中に多重癌の発生が起き患者のQOLや予後を左右する。アルコール多飲が頭頸部および食道の多重癌のリスクであることも明らかにしたが、禁酒や飲酒継続後の多重癌発生の変化については不明である。そこで、食道癌EMR後の多重癌の発生の危険因子と禁酒の効果を科学的に検討するために多施設共同のコホート研究を平成17年9月より開始した。

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 大学院地球環境学堂 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

研究報告

1 研究目的

半世紀以上も前から、飲酒は頭頸部および食道における発癌の危険因子とされてきた。しかしながら、これらの癌の予防・早期発見に関する研究が積極的に行われたことはない。頭頸部および食道は、咀嚼・呼吸・嚥下・発声など人間が生活する上で必要な重要な機能を担っており、ひとたびこの領域に癌が発生すればそれらの機能を損なうことが多い。また、頭頸部癌や食道癌は早期発見が困難でかつ予後不良ないわゆる難治癌であるため、予防・早期発見ができれば患者の予後およびQOLの向上につながることを期待される。

これまでの研究のなかで、アルコールに関連した発癌には、アルコール自体ではなくアルコール代謝酵素の遺伝子多型が頭頸部癌と食道癌のリスクに大きく関与することを明らかにしてきた。すなわち飲酒における体質の違いが大きく発癌リスクに関わることが分かったのである。本研究では、これまで明らかにされてきたアルコール関連発癌の究極のメカニズムを明らかにし、頭頸部および食道における癌の予防そして早期発見に貢献することを目的とし、以下の検討を行った。

- 1) 飲酒によるアセトアルデヒドを介した発癌のメカニズムが示唆されているが、アルデヒド脱水素酵素2型 (ALDH2) の遺伝子多型別のアセトアルデヒドによるDNA損傷のレベルを検討する
- 2) アルコール依存症患者では、1970年代にはALDH2欠損者が2%しか見られず、1990年代以降13%に増加している。食道癌リスクの高いALDH2欠損者の飲酒は社会時代的な影響を受ける。この現象が都市部、非都市部に関わらず全国的な現象なのかどうかを検証する最初の試みとして、ALDH2欠損を判別する簡易フラッシング質問紙法を用いて、都市部と非都市部の食道癌リスクを比較した。

食道癌は内視鏡的治療 (EMR) で根治ができる症例がふえている反面、発癌母地である臓器そのものが温存されるため経過中に多重癌の発生が起き患者のQOLや予後を左右する。EMRを行った食道早期癌症例を対象に、食道背景粘膜にみられるヨード不染帯をバイオマーカーとして、頭頸部と食道に発生する多重癌の危険因子と飲酒との関連性そして多重癌発生までの期間を、多施設共同コホート研究として検討する

2 研究方法

- 1) 国立病院機構久里浜アルコール症センターにおいて、倫理委員会の承認と患者のインフォームドコンセントを得てアルコール依存症患者で非癌患者44名から血液を採取した。血液から、QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてDNAを精製した。DNA20 μ gを乾燥させ、15 μ lのバッファー (200mMクエン酸ナトリウム、100mM CaCl₂) に溶解し、micrococcal nuclease (22.5 units)、spleen phosphodiesterase (0.075 units) および内部標準 ([U-15N5]-N₂-Et-dG および [U-15N5]-S-Me-OH-PdG) を添加し 37°Cで3時間インキュベートした。その後、3ユニットのアルカリフォスファターゼを含む 0.5 M Tris HCl (pH 8.5) を 10 μ l、20 mM ZnSO₄ を 5 μ l、そして 67 μ l の水を加え、37°Cでさらに3時間インキュベートした。メタノールで不要なタンパク質を沈澱させた後、遠心濃縮器で乾燥させ、100 μ lの水に再溶解し、試料とした。次に、LC/MS/MSを用いて、アセトアルデヒドが誘発するDNA付加体の定量を行った。
- 2) 食道癌のリスクを飲酒喫煙食習慣とALDH2遺伝子多型を高感度に識別できる簡易フラッシング質問紙法から評価して、大分県の農村地帯の検診受診者1100例 (男性475例、女性625例) と厚生労働省癌助成金研究12-12で施行した食道癌症例対照研究の対照である東京都心の検診受信者1141例 (男性701例、女性440例) とを比較した。
- 3) 食道癌EMRにおける経過観察中の多発癌・重複癌の発生時期と頻度がアルコールに対する体質と背景食道粘膜のヨード不染の程度がどのように関与するかをみる前向き多施設共同前向きコホート試験を開始した。主エンドポイントは、「ヨード不染帯の程度別にみた累積食道内多発癌発生率」、副次的エンドポイントは、「ヨード不染帯の程度別にみた観察年あたりの食道内多発癌発生総数」と「ヨード不染帯の程度別にみた累積頭頸部重複癌発生率」とした。対象症例は、食道癌初回EMR例で、登録時に背景食道粘膜に見られるヨード不染帯の程度を、「ヨード不染帯なし」「大小不同ヨード多発不染帯」「その中間」の3群において登録する。アルコール代謝酵素の遺伝子型はフラッシング簡易質問紙法にて代用判定する。全対象例に禁酒・禁煙指導を行った後に6ヶ月ごとの内視鏡による経過観察と飲

酒・喫煙の状況確認ならびに採血による MCV と γ GTP 測定を行う。中止例・不適格例などを考慮した予定登録数 330 人を、試験開始後から 3 年間で集積する。

3 研究成果

- 1) 19 人の ALDH2 正常型 (ALDH2*1/2*1) および 25 人の欠損型 (ALDH2*1/2*2) の採血時年齢、飲酒量、喫煙量には有意な差はなかった (表 1)。DNA 付加体の測定の結果、ALDH2*1/2*1 型の集団と、ALDH2*1/2*2 型の集団で有意な差が認められ、DNA 付加体の平均レベルは、ALDH2*1/2*2 型の方が有意に高かった。(図 1)

表 1 Genotype, age, and drinking and smoking habits of 44 Japanese alcoholics.

ALDH2 genotype	n	Age (Years)	Ethanol (g/day)	Duration of Drinking (years)	Cigarettes (no./day)
2*1/2*1	19	52 ± 11	130 ± 54	26 ± 13	22 ± 13
2*1/2*2	25	51 ± 11	105 ± 59	24 ± 12	24 ± 15

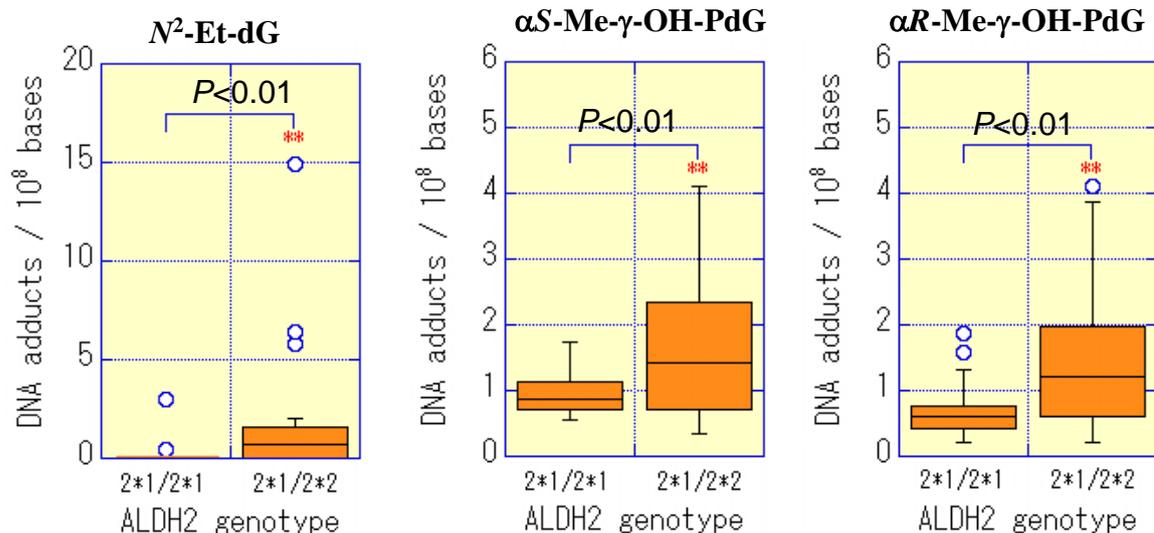


図 1 アルコール依存症患者の血液 DNA 中の DNA 付加体解析結果

- 2) 都心群を基準にして年齢補正した。フラッシュヤー (現在または過去に赤くなる体質あり) は感度・特異度とも約 90%で ALDH2 欠損者と推測され、その頻度に差がなく、両群で ALDH2 遺伝子型の分布はほぼ同等と考えられた。男性は農村では都心より多く飲酒し、強い酒をより好む傾向があり、フラッシュヤー男性は両群とも同程度に飲酒していた。一方、飲酒習慣の少ない女性では、農村ではさらに飲酒者が少なく、フラッシュヤーによる飲酒抑制効果がしっかりとみられた。農村では都心より男女とも緑黄色野菜と果物の摂取習慣が少なく (リスク上昇)、喫煙習慣も少ない (リスク低下) という傾向があった。飲

酒、喫煙、食習慣とフラッシングの有無を用いて、都市部の食道癌症例対照研究から推測した食道癌リスクの分布を計算すると、農村でややリスクの高いひとが多い傾向がみられた。

- 3) 平成17年7月に国立癌センターの倫理審査委員会での承認が得られ、平成17年9月より上記多施設共同前向きコホート試験を開始した。データセンターは、外部機関である(株)メディカルリサーチサポートに依頼しコホート期間中の管理を一括して行うことにした。参加施設は11施設(国立癌センター中央病院、国立癌センター東病院、北海道大学病院、東北大学病院、国立病院機構久里浜アルコール症センター、川崎市立川崎病院、昭和大学病院、北里大学病院、大阪医療センター、静岡県立癌センター、熊本地域医療センター)で、各施設の倫理審査委員会の承認が順次進み、平成17年3月現在で23例の症例が登録されている。

4 倫理面への配慮

本研究で実施する試験に関わるすべての研究者はヘルシンキ宣言に従って本試験を実施し、被験者の人権保護に努める。インフォームドコンセントは、各参加施設の倫理審査委員会の承認を得た試験の同意説明文書を被験者本人に渡し、試験の内容を口頭で詳しく説明したうえで、被験者本人より同意への署名を取得する。登録は患者のカルテ番号、登録番号とイニシャル、生年月日を用いて行われるが、個人情報外部に漏洩しないよう厳重に管理する。遺伝子解析に関しては、文部科学省、厚生労働省、経済産業省合同による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Muto M., et al. Endoscopic mucosal resection in the stomach using the insulated-tip needle-knife. *Endoscopy*, 37(2): 178-82, 2005
2. Katada C., Muto M., et al. Local recurrence of squamous-cell carcinoma of the esophagus after EMR. *Gastrointest Endosc.* 61(2):219-225, 2005
3. Muto M., et al. Risk of multiple squamous cell carcinomas both in the esophagus and the head and neck region. *Carcinogenesis.* 26(5):1008-1012, 2005
4. Yano T., Muto M., et al. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failures after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Gastrointest Endosc.* 62(1):31-36, 2005
5. Sano Y., Muto M., et al. OPTICAL/DIGITAL CHROMOENDOSCOPY DURING COLONOSCOPY USING NARROW-BAND IMAGING SYSTEM. *Digestive Endoscopy* 17 (Supple.):S43-S48, 2005
6. Muto M., et al. Narrow band imaging combined with magnified endoscopy for the cancer at the head and neck region. *Dig Endoscopy* 17 (Supple.):S23-S24, 2005
7. Muto M., et al. Narrowband imaging: A new diagnostic approach to visualize angiogenesis in the superficial neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* *Clin Gastroenterol and Hepatol* 3:S16-20, 2005
8. Yokoyama A., Muto M., et al. Mean Corpuscular Volume, Alcohol Flushing, and the Predicted Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus in Cancer-Free Japanese Men. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(10): 1877-1883, Oct. 2005
9. Yokoyama A., et al., Esophageal melanosis, an endoscopic finding associated with squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract, and inactive aldehyde dehydrogenase-2 in alcoholic Japanese men. *J Gastroenterol* 40: 676-684. 2005
10. Homann N, Yokoyama A., et al., Mechanisms in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1317- 1320. 2005
11. Yokoyama A., et al., Mean corpuscular volume, alcohol flushing, and the predicted risk of squamous cell carcinoma of the esophagus in cancer-free Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1877-1883. 2005
12. Yokoyama M, Yokoyama A., et al. Hangover susceptibility in relation to aldehyde dehydrogenase-2 genotype, alcohol flushing, and mean corpuscular volume in Japanese workers. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1165-1171. 2005
13. Yokoyama A., et al. Esophageal squamous cell carcinoma and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese females. *Alcohol Clin Exp Res* 30: 491-500. 2005

14. Igaki H, et al. Surgery for clinical T3 carcinomas of the upper thoracic oesophagus and the need for new strategies. *British Journal of Surgery* 92:1235-1240, 2005.
15. Hosokawa A, Igaki H, et al. Small cell carcinoma of the esophagus. Analysis of 14 cases and literature review. *Hepato-Gastroenterology* 52:1738-1741, 2005.
16. Shimizu Y., et al. Histologic results of EMR for esophageal lesions diagnosed as high-grade intraepithelial squamous neoplasia by endoscopic biopsy. *Gastrointestinal Endoscopy*. Jan; 63 (1):16-21. 2006
- 日本語論文
1. 武藤 学. 中下咽頭表在癌の診断 EMRのコツと落とし穴 [1] 上部消化管, 178-179 中山書房 2005
2. 武藤 学. <トピックス>中・下咽頭表在癌勉強会表在癌の内視鏡診断と治療. 専門医通信, 84(8): 16-17 日本耳鼻咽喉科学会 2005
3. 武藤 学, 他. 表在性の中・下咽頭癌の拡大内視鏡診断 NBIも含めて. 胃と腸, 40(9):1255-1268 医学書院 2005
4. 佐野 寧, 武藤 学, 他. 特集:内視鏡ハイテク機器・先端技術 内視鏡診断:その他の特殊観察法. NBI. 消化器内視鏡, 17(6):750-758 2005
5. 武藤 学. 特集:消化管腫瘍の内視鏡的診断と治療 一最新の動向を探る<消化管腫瘍の疫学>中・下咽頭癌と食道癌のリスクファクターと早期発見のポイント. 内科, 96(4): 625-629 南江堂 2005
6. 武藤 学. 特集:消化管がんのEMR治療 中・下咽頭癌. クリニカ, 32(5)別冊: 256-260 トプコ 2005
7. 武藤 学. 中・下咽頭表在癌のリスクと診断. 頭頸部癌, 31(3): 438-443 日本頭頸部癌学会 2005
8. 堅田親利, 武藤 学. 咽頭観察の基本とコツ. 消化器内視鏡, 17(10): 1505-10 東京医学社 2005
9. 武藤 学. 中・下咽頭表在癌の診断と治療 一中・下咽頭表在癌のハイリスク群とその診断— Endoscopic diagnosis and treatment for superficial cancer in the oropharynx and hypopharynx. 耳鼻と臨床, 51(Suppl. 1): S61-6 OTOLOGIA FUKUOKA 2005
10. 黒澤きよ子, 武藤 学, 他. ネブライザー-デニューダ方式のガスサンプラーの開発 Development of a Gas-Sampler Based on the Nebulizer-Denuder Method. 分析化学, 54(12): 1175-1182 日本分析化学会 2005
11. 武藤 学. 内視鏡の新しい展開 一照明光の特性と内視鏡, NBI(Narrow Band Imaging) (2) 咽頭・食道の癌とNBI. 臨床消化器内科, 21(1): 39-46 日本メディカルセンター 2006
12. 井垣弘康, 他. Barrett食道癌治療の最前線 消化器病セミナー99 食道癌治療の最前線 幕内博康, 編. 東京. 235-243. (株)へるす出版 2005
13. 井垣弘康, 他. 下咽頭・頸部食道癌根治手術—遊離空腸移植による食道再建術— 出月康夫, 監修. 大阪. 最新外科手術手技 No.201-23. 大日本住友製薬株式会社 2005