

## 83. 食道・頭頸部領域の癌多発の分子機序の解明と克服

森田 勝

国立病院機構 九州がんセンター 消化器外科

Key words : 食道癌、多発癌、メチル化、喫煙、飲酒

### 緒言

食道癌、頭頸部癌はともに予後不良の癌である。その発生には、喫煙・飲酒等の環境因子が関与し、複数の癌が同時または異時性に重複することが多い<sup>1)</sup>。このような多中心性発癌に過度の喫煙・飲酒などが関わっていることを報告してきた<sup>2,3)</sup>が、その分子生物学的機序は不明である。一方、臨床面でも、これら多重癌の治療は侵襲が大きく非常に困難で、予防・診断・治療すべての面でより有効な包括的な戦略が望まれる<sup>4)</sup>。本研究はそれらの研究をもとに食道・頭頸部を共通の発癌機序を有する一領域 (UADT: upper aerodigestive tract) と考え、癌多発の分子生物学的機序を明らかにし、難治性の多発癌の克服に寄与することを目的とする。

ゲノム全体にわたる CpG ジヌクレオチド部位でのシトシン低メチル化は、ヒトの癌におけるエピジェネティックな異常として知られている。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 nuclear 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。さらに、メチル化低下は食道発癌に関わることを報告した<sup>5)</sup>。我々は、頭頸部・食道領域における喫煙・飲酒などの環境因子の暴露による扁平上皮癌の癌多発にゲノムワイドなメチル化低下が関与するか否かを検討した。

一方、食道癌は一般的に高齢者に多くみられるが、若年者にも散見される。若年者に発生する癌は特殊な遺伝的因子や過剰な環境因子への暴露が関与する可能性がある一方で、しばしば癌の多発傾向がある。しかし、食道癌においてはリスク因子や多発癌との関連は明らかでない。我々は、若年発症食道癌における環境因子の関与、癌多発の実態を明らかにすることを目的に検討を行った。

### 方法

#### 1. ゲノムワイドな DNA 低メチル化と多中心性発癌

術前無治療で手術を施行した食道扁平上皮癌 110 例を対象に、喫煙・飲酒歴と LINE-1 のメチル化との相関を検討した。さらに、食道全割標本をもとに食道内の癌多発を検討し LINE-1 のメチル化との相関を検討した。一方、食道癌 36 例のルゴール染色による内視鏡所見をもとに、癌多発を反映する多発ルゴール不染帯 (multiple lugol voiding lesion: MLVL “まだら食道”: 食道長 3 cm あたり淡染色または不染帯を 10 個以上認めるもの) と LINE-1 メチル化の関係も検討した。

LINE-1 メチル化解析: ゲノム DNA をバイサルファイト処理を行ったのち DNA メチル化レベルについては、バイサルファイトパイロシーケンス法で測定した。ヌクレオチド配列 GCT CGT GTA GTC AGT CG を解析した。このアッセイでは、LINE-1 position 318~331 の 3 カ所の CpG 部位におけるメチル化レベルを定量化した。各々の CpG 部位において、シトシンとチミンの合計に対するシトシンの量の割合 (%) を計算した。3 カ所の CpG 部位の平均を求め、これを全体としての LINE-1 メチル化レベルとして使用した<sup>5)</sup>。

## 2. 若年発症食道癌における癌多発に関する検討

食道切除術切除例 384 例を対象とし、全割切片を鏡検し、食道微小癌を含め、食道内癌多発を病理組織学的に検索した。頭頸部食道領域の癌多発および喫煙・飲酒の暴露を、若年発症症例（50 歳未満、24 名）を対照群（50 歳以上 360 名）に比較し比較検討した。

## 結 果

### 1. ゲノムワイドな DNA 低メチル化と多中心性発癌

#### 1) 食道扁平上皮癌部と非癌部の LINE-1 メチル化状態

食道扁平上皮癌症例の癌部における LINE-1 メチル化レベルは、非癌部に比べては有意に低値であった。

#### 2) 非癌部における LINE-1 メチル化レベルと喫煙歴と飲酒歴との関連

LINE-1 のメチル化レベルと喫煙指数 ( $P = 0.037$ ) およびアルコール摂取歴 ( $P = 0.0076$ ) とは有意な逆相関の関係であった (図 1)。

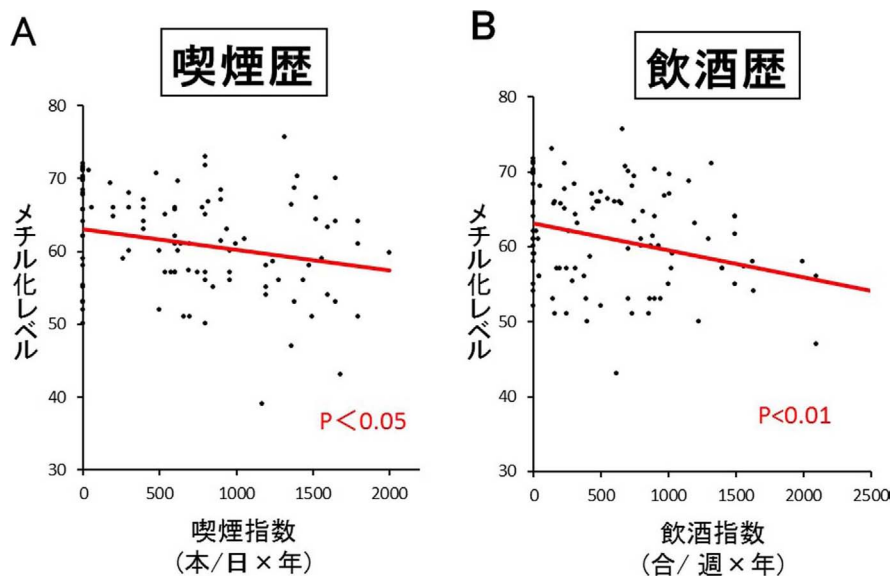


図 1. 非癌部における LINE-1 のメチル化と喫煙および飲酒

食道非癌部における LINE-1 のメチル化レベルは喫煙指数および飲酒指数と逆相関していた。

#### 3) 非癌部（背景粘膜）および癌部における LINE-1 のメチル化と癌多発との関係

非癌部における LINE-1 メチル化レベルはまだら食道 (MLVL) 症例で平均 53.7 % と非まだら食道 (non-MLVL) 症例 60.3 % に比べ有意に低値であったが ( $P = 0.016$ )、癌部のメチル化では有意差は認めなかった (図 2 A)。一方、組織学的な検索の結果においても、多発癌症例の非癌部における LINE-1 メチル化レベルは平均 53.5 % と多発癌症例 61.9 % に比べ有意に低値であった ( $P = 0.016$ 、図 2 B)。

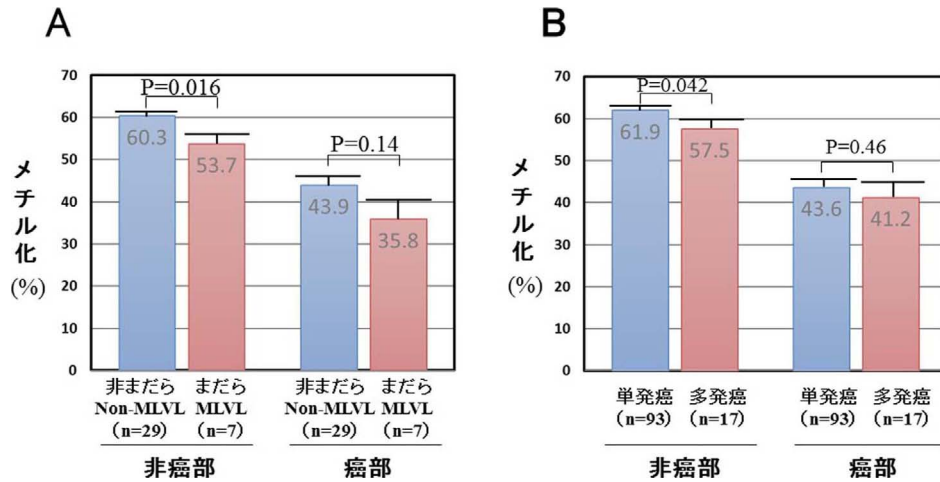


図2. 癌多発からみた食道癌および非癌部における LINE メチル化

A) ルゴール染色を用いた食道内視鏡所見による検討：癌多発を反映する“まだら食道”（multiple lugol voiding lesion: MLVL：食道長 3 cm あたり淡染色または不染帯を 10 個以上認めるもの）を呈する症例の非癌部においては、それ以外の症例（非まだら食道：non-MLVL）に対し、有意にメチル化レベルが低かった（ $P = 0.016$ ）。癌部では同様な傾向が認められたが有意差はなかった。

B) 食道全割切片の鏡検にもとづく検討：食道多発癌症例においては、単発癌に対し、有意に非癌部のメチル化レベルが低かった（ $P = 0.042$ ）。癌部では有意差はなかった。

P 値は対応のない t 検定に基づく。

## 2. 若年発症食道癌における癌多発に関する検討

食道癌の病期をはじめとした臨床因子は両群で差はなく、5 年生存率も若年者 50.1 %、高齢者 53.3 %（ $p = 0.78$ ）と有意差を認めなかった。若年群は頭頸部癌合併を 29 %に認め、対照群に比べ有意に多く、また食道内多発癌も若年群 33 %と対照群 13 %に対し有意の多かった（表 1）。さらに、若年発症の頭頸部癌合併例は、重喫煙者あるいは大酒家であり、7 例中 4 例に食道にも多発癌を認めた（表 2）<sup>6)</sup>。

表 1. 若年発症食道癌と食道・頭頸部領域の癌多発

因子	若年群 (N=24)	対照群 (N=360)	P value
食道多発癌	8 (33.3)	46 (12.8)	0.011
頭頸部癌合併	7 (29.2)	30 (8.3)	0.005
内訳	舌	5	
	口腔底	2	7
	上咽頭	0	0
	中咽頭	1	6
	下咽頭	4	12
喉頭	1	4	
食道多発癌 かつ 頭頸部癌合併	4 (16.7)	8 (2.2)	0.004

(%)

50 才未満の若年発症食道癌症例では対照群に対し、食道多発癌、頭頸部癌合併ともに有意に多かった。P 値は Fisher 検定に基づく。

表 2. 若年発症の頭頸部・食道重複癌症例における臨床的特徴

症例	年齢	性別	部位	pStage	喫煙(本/日)	飲酒量(単位)	食道多発癌
1	49	男	Mt	2	60	焼酎2合 (3.3)	あり
2	48	男	Mt	1	60	ビール1000ml (2)	あり
3	42	男	Mt	4a	なし	焼酎3合 ビール2本 (7)	あり
4	38	女	Lt	3	なし	焼酎2合 (3.3)	あり
5	47	男	Mt	3	20	多量(量不明)	—
6	46	男	Lt	3	3	焼酎3合 (5)	
7	46	男	Lt	1	30	焼酎5合 ビール3本 (11.3)	

若年発症の頭頸部癌合併例は、重喫煙者あるいは大酒家であった。  
また7例中4例に食道にも多発癌を認めた。

## 考 察

我々は食道癌症例において食道内多発癌、頭頸部癌の合併を高頻度に認め、さらに前癌病変も多発することより、多中心性発癌を支持してきた。また、食道癌の発癌に喫煙、飲酒が相乗的に関連することを報告した<sup>3)</sup>。食道癌症例の全割切片をもとに微小癌まで検索し、UADTの扁平上皮癌の数と喫煙・飲酒歴を検討した結果、UADTの癌の数が多いほど重喫煙者、大酒家の頻度が高く過度な喫煙・飲酒が多中心性発癌に関与していること明らかにしてきた<sup>2)</sup>。分子生物学的機序として癌抑制遺伝子 *p53* の異常は食道癌の発癌に重要な役割を果たしているが、我々は、*p53* 遺伝子異常が多中心性発癌および喫煙・飲酒による発癌過程で関与していることを支持した<sup>7)</sup>。さらに、食道の発癌に喫煙や酸化的DNA損傷やその修復異常が関わっていることを支持した<sup>8)</sup>。

食道癌においてゲノムワイドな低メチル化を来していることが明らかになったが、とくに非癌部におけるメチル化が喫煙歴・飲酒歴と逆相関を認めたことより、これらの因子への暴露がメチル化低下を惹起し食道発癌に関与していることが示唆された。さらに、内視鏡におけるMLVLによる多発病変、さらに食道全割標本における組織学的多発癌巣における検索においても、非癌部のメチル化低下が癌多発と関与することより、正常粘膜のメチル化低下が発癌のfieldを形成し、多発癌の発生過程に関与している可能性が示唆された。

さらに若年発生の食道癌症例では、UADTの多発癌症例の頻度が高く、これらの症例では特に過度の喫煙・飲酒への暴露が多かった。したがって、食道癌においては比較的頻度の低い若年発症には若年時からのこれらの環境因子への暴露がより強く、その結果として癌多発の傾向を生じる可能性が高いと考えられた<sup>6)</sup>。

今回、低メチル化、若年発症に着目し、UADTの癌多発について検討した。今後、さらに代謝酵素の遺伝子多型などによる発癌感受性と癌多発、酸化的DNA損傷とその修復系の異常なども検討し、「喫煙、飲酒→代謝酵素異常による感受性の増加→癌抑制遺伝子異常、エピジェネティックな変化→発癌および多発癌の発生」の仮説の検証をさらにすすめるとともに、癌の高危険群の予測、放射線や抗癌剤の効果予知などの臨床応用につなげたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は国立病院機構九州がんセンター消化管外科の河野浩幸、頭頸科の益田宗幸、九州大学大学院消化器・総合外科の佐伯浩司、沖英次である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念科学財団に深く感謝します。

## 文 献

- 1) Morita M, Saeki H, Ito S, Kimura Y, Yamashita N, Ando K, Hiyoshi Y, Tokunaga E, Oki E, Ikeda T, Yoshida S, Nakashima T and Maehara Y. Surgical strategies for esophageal cancer associated with head and neck cancer. *Surg Today* 2014; 44:1603-10. doi: 10.1007/s00595-013-0713-3
- 2) Morita M, Araki K, Saeki H, Sakaguchi Y, Baba H, Sugimachi K, Yano K, Sugio K and Yasumoto K. Risk factors for multicentric occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract-analysis with a serial

- histologic evaluation of the whole resected-esophagus including carcinoma. *J Surg Oncol* 2003; 83:216-21. doi: 10.1002/jso.10276
- 3) Morita M, Kumashiro R, Kubo N, Nakashima Y, Yoshida R, Yoshinaga K, Saeki H, Emi Y, Kakeji Y, Sakaguchi Y, Toh Y and Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *Int J Clin Oncol* 2010; 15:126-34. doi: 10.1007/s10147-010-0056-7
  - 4) Morita M, Kawano H, Otsu H, Kimura Y, Saeki H, Ando K, Ida S, Oki E, Ikeda T, Kusumoto T, Fukushima J, Nakashima T and Maehara Y. Surgical resection for esophageal cancer synchronously or metachronously associated with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol* 2013; 20:2434-9. doi: 10.1245/s10434-013-2875-z
  - 5) Kawano H, Saeki H, Kitao H, Tsuda Y, Otsu H, Ando K, Ito S, Egashira A, Oki E, Morita M, Oda Y and Maehara Y Chromosomal instability associated with global DNA hypomethylation is associated with the initiation and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014; 21 Suppl 4:S696-702. doi: 10.1245/s10434-014-3818-z
  - 6) Kasagi Y, Morita M, Otsu H, Kawano H, Ando K, Hiyoshi Y, Ito S, Miyamoto Y, Saeki H, Oki E and Maehara Y. Clinicopathological characteristics of esophageal squamous cell carcinoma in patients younger than 50 years. *Ann Surg Oncol* 2015, 22:311-5. doi: 10.1245/s10434-014-3856-6
  - 7) Egashira A, Morita M, Kakeji Y, Sadanaga N, Oki E, Honbo T, Ohta M and Maehara Y. p 53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma and their relevance to etiology and pathogenesis: results in Japan and comparisons with other countries. *Cancer Sci* 2007; 98:1152-6. doi: CAS524 [pii]10.1111/j.1349-7006.2007.00524.x
  - 8) Kubo N, Morita M, Nakashima Y, Kitao H, Egashira A, Saeki H, Oki E, Kakeji Y, Oda Y and Maehara Y. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme. *Dis Esophagus* 2014; 27:285-93. doi: 10.1111/dote.12107