

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

—調査・共同研究に対する助成—

2000年3月14日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 野村大成 
所属機関名 大阪大学医学部医学科
職名 教授 年齢 58 才
所在地 565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 (B4)
電話 06-6879-3811 (直通) 内線

1. 研究課題

中国河南林県における食道癌高発の原因究明と予防

2. 研究期間 自 1999年 4月 1日 ~ 至 2000年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 野村大成 (58才)
所属機関 大阪大学医学部医学科 職名 教授
中国側研究者氏名 唐勁天 (40才)
所属機関 中国中日友好病院 職名 放射腫瘍科・副部長

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ 中国河南林県における食道癌高発の原因究明と予防

研究代表者氏名 野村大成

所属 大阪大学大学院医学系研究科

役職 教授

要旨 中国河南林県は、世界でも最高率の食道癌発生率で知られている。同県における食道癌患者手術標本腫瘍部と同周辺正常組織の遺伝子変異を調査したところ、高率に*p53*癌抑制遺伝子の突然変異が検出された。周辺正常組織においても高率に*p53*遺伝子の突然変異が検出されたが、腫瘍部位の突然変異スペクトルはG-Aのtransitionが多く、環境癌原・変異原物質（ニトロサミン等）の関与も疑われる。

KEY WORDS Esophageal cancer, Genetic change, China, Henan-Linxian, High Susceptibility Area, *p53* mutation

研究報告

目的 食道癌の発病率は、アメリカで5.8~20.5/10万人、日本で20.7/10万人であるが、中国河南省林県の発病率は478.87/10万人と、世界で一番高い地域である。また年死亡率をとってみても、日本、アメリカは約5/10万人であるが、中国河南林県は303.37/10万人と極めて高い。ちなみに中国でも雲南省は1.41/10万人である。

一方、日本においても奈良県など食道癌高発地域があり、その原因究明が進んでいる。特に、食道癌と関連する癌抑制遺伝子(*p53*, *Rb*, *APC*, *MTS-1*)、や癌遺伝子(*c-myc*, *erb*, *EGFR*, *hst-1*, *int-2*, *cyclin D1*, *bcl-2*)などの遺伝子変異の追求がなされている。

中国における共同研究者である唐勁天博士は、大阪大学医学部大学院学生等として5年間、食道癌等悪性腫瘍の放射線治療法を学び、中国帰国後も中日友好病院にて食道癌等の治療を行っている。一方、大阪大学においては、悪性腫瘍の遺伝子診断、原因遺伝子の追求、治療などが高度に進んでおり、中日友好病院等では不可能な研究手段を用いることができる。同博士により、河南林県に発生した食道癌の疫学調査と病理標本の収集を行い、同県における食道癌の高発原因を遺伝子レベルで解明するのを目的とした。

本共同研究を行うことにより、中国河南林県における食道癌高発の原因物質、あるいは食道癌そのものの発生原因の解明がなされることが期待され、食道癌の予防、治療に結びつくものと考えられる。また、本共同研究を行うことにより、中国、日本の学術研究レベルの向上に大いに役立つものと考えられる。

方法 中国河南林県における食道癌病理標本の収集を行い、病理標本から、*p53* 癌抑制遺伝子、*K-ras*, *c-kit*, *catenin* 遺伝子について、大阪大学で行っている迅速高感度検出法 (Cold-SSCP) により、突然変異を検出し、そのスペクトロムを調べ、化学物質 (ニトロサミン他) に特有の突然変異があるかどうか調査した (1-4)。

また、大阪大学医学部で維持している、拒絶反応をなくした重度複合免疫不全マウス (SCID) にヒト正常食道組織を移植し、継代維持を行い、実験動物などで食道癌を特異的に誘発するとされているニトロサミン、例えば、*N-amyl-N-methylnitrosamine* を作用させ、ヒト正常食道に誘発される *p53*, *ras* 等の遺伝子変異を同定し、中国河南林県におけるものと同一かどうか調べた。

結果 中国河南林県地方における食道癌患者24症例より食道癌手術標本を入手できた (表1)。年齢は39-70才で、いずれも病理組織診断は扁平上皮癌であった。そのうち食道癌組織22例、周辺正常組織17例について、*p53*, *c-kit*, *β-catenin* および *K-ras* 遺伝子の突然変異を我々の開発した Cold-SSCP-direct sequence法にて解析した。食道癌患者腫瘍組織22例中10例に *p53*, *c-kit*, *β-catenin* および *K-ras* 遺伝子の突然変異が単独あるいは、重複して検出された。その中でも9例に *p53* 癌抑制遺伝子に18個の突然変異が検出されている。食道癌周辺正常組織17例中12例においても何らかの突然変異が検出され、そのうち9例に *p53* 遺伝子に10個の突然変異が検出されている。*c-kit* 遺伝子の突然変異は食道癌組織22例中2例 (症例1, 20) に、*β-catenin* の突然変異は2例 (症例1, 14) に、*K-ras*の突然変異も2例 (症例2, 20) に検出された。*p53* 癌抑制遺伝子の突然変異に比べてかなり低かった。

*p53*遺伝子については、食道癌病例のうち、*p53* 突然変異をもった癌組織6例中4例に周辺正常組織にも突然変異が検出されているが、同一の突然変異ではなかった。発癌以前に *p53* 遺伝子の変異は発生しているものと思われる。また、興味深いことに食道癌組織の18突然変異中、G-A Transitionが8つ、deletion (6, 16 bp) が2つあるのに対し、周辺正常部では10突然変異中G-A Transitionは1つ、deletionは存在しなかった。Guanine の O⁶部位の alkylation等が関与しているものと考えられる。

SCIDマウスに移植したヒト正常食道組織11片に対し、AMNを毎週作用させたところ、9片で *p53* 遺伝子に同様の突然変異が検出された。*K-ras* 遺伝子の突然変異は全く検出されなかった。

考察 食道癌の原因としてタバコ、アルコール類、熱いもの、真菌の感染、化学物質、細菌毒素、栄養の関連、不明の微量物質、動物実験では、アカラシマウスを用いた食物充満と停留による高発癌などがあると考えられているが、河南林県における極めて高い発病率は、*p53*癌抑制遺伝子の突然変異のパターンからニトロサミン系化学物質の関与が疑われる。

参考文献

1. Hongyo, T., Weghorst, C. M., et al. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucl. Acids Res.*, 21: 3637-3642, 1993.
2. Nomura, T., Nakajima, H., Hongyo, T., Taniguchi, E., Fukuda, K., Li Y. L., Kurooka, M., Sutoh, K., Hande, P. M., Kawaguchi, T., Ueda, M. and Takatera, H. Induction of cancer, actinic keratosis and specific *p53* mutations by ultraviolet light B in human skin maintained in SCID mice. *Cancer Res.*, 57: 2081-2084, 1997.
3. Hongyo, T., Kurooka, M., Taniguchi, E., Iuchi, K., Nakajima, Y., Aozasa, K. and Nomura, T. Frequent *p53* Mutations at Dipyrimidine Sites in Patients with Pyothorax-associated Lymphoma(PAL). *Cancer Res.*, 58: 1105-1107, 1998.
4. Hongyo, T., Li, T., Syaifudin, M., Baskar, R., Ikeda, H., Kanakura, Y., Aozasa, K. and Nomura, T. Specific *c-kit* Mutations in Sinonasal NK/T-Cell Lymphoma in China and Japan. *Cancer Res.*, 2000 (in press).

表1 河南林県地区における食道癌手術標本

症例	年齢	性別	病理診断	手術年時	病巣部位	術前治療	検査標本
1	65	男	扁平上皮癌	1997	上部	なし	腫瘍部 —
2	48	男	扁平上皮癌	1997	上部	放射線治療	腫瘍部 周辺組織
3	39	男	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部 —
4	61	女	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部 周辺組織
5	40	男	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部 周辺組織
6	70	女	扁平上皮癌	1998	中部	放射線治療	— 周辺組織
7	54	男	扁平上皮癌	1998	中部	なし	— 周辺組織
8	70	女	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部 周辺組織
9	50	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部 周辺組織
10	66	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 周辺組織
11	43	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部 周辺組織
12	60	男	扁平上皮癌	1999	上部	放射線治療	腫瘍部 周辺組織
13	62	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 周辺組織
14	60	女	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 周辺組織
15	51	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 周辺組織
16	67	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 周辺組織
17	53	女	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部 周辺組織
18	49	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部 —
19	57	女	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部 —
20	61	男	扁平上皮癌	1999	下部	化学療法	腫瘍部 周辺組織
21	63	男	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部 —
22	65	女	扁平上皮癌	1999	中部	放射線治療	腫瘍部 —
23	60	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部 周辺組織
24	54	男	扁平上皮癌	1999	—	—	腫瘍部 —

表2 河南林県地区における食道癌手術標本腫瘍組織における突然変異

症例	年齢	性別	突然変異	コドン	塩基変異	アミノ酸変異
1	65	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
			<i>β-catenin</i>	20	GCG-GCA	Ala-Ala
2	48	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CTA	Leu-Leu
				131	GGG-GAG	Gly-Glu
			K-ras (1)	22	CAG-CAA	Gln-Gln
3	39	M	none			
4	61	F	<i>p53</i> (5)	179	CCA-CTA	Pro-Leu
5	40	M	none			
8	70	F	<i>p53</i> (4)	107	TAC-TAT	Tyr-Tyr
9	50	M	none			
10	66	M	none			
11	43	M	<i>p53</i> (4)	102	ACC-ACT	Thr-Thr
				135	CAT-TAT	His-Tyr
			<i>p53</i> (5)		16bp deletion	
12	60	M	none			
13	62	M	none			
14	60	F	<i>p53</i> (4)	131	GGG-GAG	Gly-Glu
			<i>p53</i> (6)	196	CGA-TGA	Arg-stop
			<i>β-catenin</i>	57	GTG-ATG	Val-Met
15	51	M	none			
16	67	M	none			
17	53	F	none			
18	49	M	<i>p53</i> (7i)	242	CTG-CCG	Leu-Pro
19	57	F	none			
20	61	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CTA	Leu-Leu
				131	GGG-GAG	Gly-Glu
			<i>p53</i> (5)	152	CCG-CCA	Pro-Pro
			<i>p53</i> (6)	208	GAC-AAC	Asp-Asn
			<i>p53</i> (7i)	250	CCC-TCC	Pro-Ser
			K-ras (1)	18	GCC-ACC	Ala-Thr
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
21	63	M	<i>p53</i> (6)	208	GAC-AAC	Asp-Asn
			<i>p53</i> (7i)	248	CGG-TGG	Arg-Trp
22	65	F	none			
23	60	M	none			
24			<i>p53</i> (4)		6bp deletion	

(): エキソン

表3 河南林県地区における食道癌手術標本周辺正常組織における突然変異

症例	年齢	性別	突然変異	コドン	塩基変異	アミノ酸変異
2	48	M	<i>p53</i> (7i)	256	ACA-GCA	Thr-Ala
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
4	61	F	<i>p53</i> (5)	144	CAG-CGG	Gln-Arg
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
5	40	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
6	70	F	<i>p53</i> (5)	145	CTG-CTA	Leu-Leu
7	54	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CAG	Leu-Gln
8	70	F	<i>p53</i> (5)	141	TGC-TGT	Gys-Cys
			<i>p53</i> (7i)	256	ACA-GCA	Thr-Ala
			<i>β-catenin</i>	55	GAG-AAG	Glu-Lys
				14	ATG-ATA	Met-Ile
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
9	50	M	none			
10	66	M	none			
11	43	M	<i>p53</i> (4)	107	TAC-TAT	Tyr-Tyr
			<i>β-catenin</i>	40	ACT-ACC	Thr-Thr
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
12	60	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
13	62	M	<i>p53</i> (4)	58	TTG-TGG	Leu-Trp
14	60	F	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
15	51	M	none			
16	67	M	none			
17	53	F	<i>p53</i> (5)	144	CAG-CGG	Gln-Arg
20	61	M	none			
23	60	M	<i>p53</i> (7i)	268	CCT-TCT	Pro-Ser

(): エキソン