

学 位 論 文

口腔癌患者における薬物代謝酵素遺伝子多型と
発癌感受性に関する研究

学位申請者 谷 本 圭 司

広島大学歯学部口腔外科学第一講座
(主任：岡本哲治教授)

1998年

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第一講座高田和彰前教授、並びに岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに際し、終始御助言、御校閲を頂いた本学口腔生化学講座、加藤幸夫教授、並びに本学口腔外科学第二講座、石川武憲教授に心からお礼申し上げます。尚、本研究を進めるに際し、多大の御配慮、御指導を賜りました本学口腔外科学第一講座、吉賀浩二助教授、市川健司博士及び埼玉県立がんセンター研究所生化学部、林慎一博士、同疫学部、中地敬博士に深謝致します。さらに、終始多大なる御支援を頂きました、本学口腔外科学第一講座の諸先生方に感謝致します。

最後に、常に私を支えてくれた両親に感謝致します。

目次

第1章 緒言	1
第2章 薬物代謝酵素遺伝子多型分布	3
第1節 概要	3
第2節 対象並びに方法	4
1) 対象	
2) 末梢血からの DNA 調製	
3) 遺伝子多型解析法	
(1) <i>CYP1A1</i> 遺伝子多型	
i) <i>Ile/Val</i> 多型	
ii) <i>MspI</i> 多型	
(2) <i>GSTM1</i> 遺伝子欠損多型	
4) 統計学的検定	
第3節 結果	7
1) 対象群の分布	
2) <i>CYP1A1</i> 遺伝子多型分布	
i) <i>Ile/Val</i> 多型分布	
ii) <i>MspI</i> 多型分布	
3) <i>GSTM1</i> 遺伝子欠損多型分布	
4) <i>CYP1A1</i> 遺伝子多型と <i>GSTM1</i> 遺伝子欠損多型	
第4節 考察	10
第3章 薬物代謝酵素遺伝子多型と発癌感受性	13
第1節 概要	13

第2節	方法	13
	1) 質問事項	
	2) Index の算出法	
	3) 統計学的検定	
第3節	結果	15
	1) <i>CYP1A1</i> Ile/Val 多型の各遺伝子型における 喫煙量と飲酒量の検討	
	2) <i>CYP1A1</i> MspI 多型の各遺伝子型における 喫煙量と飲酒量の検討	
	3) <i>CYP1A1</i> 各遺伝子型における喫煙量におよぼす <i>GSTM1</i> 遺伝子欠損多型の影響	
	4) 生涯喫煙量別の遺伝子多型分布	
第4節	考察	17
第4章	口腔扁平上皮癌の原発部位別遺伝子多型分布	19
	第1節 概要	19
	第2節 対象	19
	第3節 結果	20
	第4節 考察	21
第5章	総括	23
参考文献		24
図表		32

第1章 緒言

チトクローム P-450 は、肝、肺および皮膚など様々な臓器に存在し、多くの外来物質の代謝やステロイドなどの内在性物質の合成や分解に関与するとともに、化学発癌物質を反応性の高い中間代謝産物へと変換する過程、すなわち代謝的活性化にも重要な役割を果たしている¹⁻⁶⁾。これまで、タバコ煙中の主たる発癌物質であるベンツピレンなどの芳香族炭化水素系化学発癌物質は、体内で分子多様性を示すチトクローム P-450、中でも P-450 1A1 (CYP1A1) と呼ばれる分子種の触媒する酸素添加反応により水酸化やエポキシ化を受け、種々の反応産物を形成することが明らかとなっている。そして、それらの多くは抱合化酵素であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) の中で、活性化されたベンツピレンの排泄に強く関与すると考えられる GSTM1 分子種による抱合化を経て、体外へ排泄される解毒化の方向に向かうが、一部は 7, 8-ジオール-9, 10-エポキシドのような反応性の高い中間代謝産物へと変換され、DNA に結合することによって癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化を引き起こし、発癌性を示すと考えられている (図 1) ^{1, 2, 7)}。

近年、ヒト *CYP1A1* 遺伝子に点突然変異による多型が存在し、その分布が健常人と肺癌患者、とりわけ扁平上皮癌患者との間で有意な差のあることが明らかにされた⁸⁻¹⁰⁾。また、肺癌患者には *GSTM1* 遺伝子を欠損している個体の比率が高いことも報告されている^{11, 12)}。これらの結果は、各個体の所有する薬物代謝酵素の遺伝子型が喫煙をはじめとする化学物質による癌発生リスクを決定し得る可能性を示している。

一方、口腔は上部消化管や気道の一部として多くの化学物質に曝されており、肺癌、喉頭癌および食道癌などと同様に、喫煙は口腔癌発生の危険因子の一つとして考えられている¹³⁻¹⁸⁾。しかし、これまで口腔癌発生に関して、薬物代謝酵素遺伝子多型などの個体側の感受性因子の関与について

検討した研究はほとんどなく、その詳細は明らかにされていない。

本研究では、口腔癌の大半を占める扁平上皮癌発生における薬物代謝酵素遺伝子多型の役割を明らかにするべく、口腔癌患者における *CYP1A1* と *GSTM1* 遺伝子多型分布を調べ、個体側の感受性因子の関わりについて検討した。さらに、その実際の影響について、対象患者の喫煙習慣を調査し、喫煙量と薬物代謝酵素遺伝子多型との関係を解析した。

第2章 薬物代謝酵素遺伝子多型分布

第1節 概要

ヒト *CYP1A1* 遺伝子は7個のエクソンからなり、512個のアミノ酸をコードしている。現在、同遺伝子には少なくとも2カ所の多型、すなわち、第7エクソンに存在し、アデニンからグアニンへの置換により、基質結合部位近傍で462番目のアミノ酸が、イソロイシンからバリンへ置換される多型 (*Ile/Val* 多型) および *CYP1A1* 遺伝子の3' 下流のポリ (A) 付加シグナルからおよそ250塩基下流のチミンからシトシンへの置換により、制限酵素 *MspI* の切断部位が生じる多型 (*MspI* 多型) の存在が明らかになっている¹⁹⁻²¹⁾。また、*GSTM1* 遺伝子²²⁾ については、第1番染色体上に存在する同遺伝子を相同的に欠損している個体が存在することが知られ、*GSTM1* 活性欠損の約98%は同遺伝子の欠損により説明できると報告されている²³⁾。

そこで、口腔扁平上皮癌患者を対象として、*CYP1A1* 遺伝子多型と *GSTM1* 遺伝子欠損多型分布の解析を行い、口腔癌発生との関わりについて検討した。さらに、発癌過程において、発癌物質の活性化に関与する *CYP1A1* と排泄に関与する *GSTM1* それぞれの機能のバランスが重要と考えられるため、*CYP1A1* と *GSTM1* 遺伝子多型両者の関係を総合して解析し、両者の役割についても検討を加えた。

第2節 対象並びに方法

1) 対象

1990年1月から1995年12月までの6年間に広島大学歯学部附属病院第1口腔外科を受診し、扁平上皮癌と診断された口腔癌患者100名を患者群として、また、患者群と年齢、性別を対応させて無作為に選んだ非癌患者100名を対照群として、本研究を行った。

2) 末梢血からのDNA調製

末梢血からのDNA調製は、Gustafsonらの方法²⁴⁾に従って行った(図2)。すなわち、EDTA(Ethylenediamine tetraacetic acid)-2Na含有の真空採血管(テルモ, 東京)にて末梢血7mlを採取, 遠心法にて白血球層を分離後, 0.6容量のTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA)に浮遊させ, 0.5% SDS, 500 μ g/ml Pronase E, 50 μ g/ml RNase A(以上Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)を加えて37°C, 2時間反応させた後, 飽和フェノール(GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA), さらにフェノールとクロロホルム(和光純薬, 大阪)を等量混和したフェノール/クロロホルムを用いてDNAを抽出した。回収したDNAは紫外線吸光度(OD₂₆₀)を用いて定量した後, 10mM TE緩衝液にて0.1 μ g/ μ lに調製し, 以下の研究に用いた。

3) 遺伝子多型解析法

CYP1A1遺伝子およびGSTM1遺伝子の多型判定は, 末梢血由来DNAを鋳型としてPolymerase Chain Reaction(PCR)法を用いて以下の方法で行った。

(1) *CYP1A1* 遺伝子多型

i) *Ile/Val* 多型

CYP1A1 遺伝子 *Ile/Val* 多型の判定は、Hayashi らの方法^{20, 21)} に準じて行った。すなわち、PCR においてプライマーの 3' 末端のミスマッチが許容されにくい事を利用して、3' 末端に変異点を設定した 20 塩基のプライマー 1A1A (5' - GAA GTG TAT CGG TGA GAC CA - 3') と 1A1G (5' - GAA GTG TAT CGG TGA GAC CG - 3') をそれぞれ、他方向のプライマー C53 (5' - GTA GAC AGA GTC TAG GCC TCA - 3') と組み合わせて PCR を行い、その反応産物の有無にて多型を判定した (図 3)。PCR は DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus Instrument Co.Ltd., Branchburg, NJ, USA) を用い、10mM Tris-HCl (pH8.0) , 50mM KCl , 1mM MgCl₂ , 鋳型 DNA 1 μg , Primer 1 (1A1A あるいは 1A1G) 0.4 μg , Primer 2 (C53) 0.4 μg , 200 μM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) , AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer Co.Ltd.) 2.5U を含む反応液 50 μl 中で、変性反応 95°C , アニール反応 65°C , 伸長反応 72°C , 各 1 分を 1 サイクルとして計 30 サイクルの DNA の増幅を行った。反応終了後、反応液 10 μl の 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色にて約 200bp の PCR 産物を検出した。

ii) *MspI* 多型

CYP1A1 遺伝子 *MspI* 多型の判定は、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法^{20, 21)} を用いて行った。すなわち、チミン (*m1*) からシトシン (*m2*) への置換により CCT GGG が CCC GGG へと変化し、制限酵素 *MspI* の切断部位が生じるため、その部位を含む領域を増幅する様に設計したプライマー C47 (5' - CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT - 3') と C44 (5' - TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT - 3') を用いて PCR を行い、反

応産物が *MspI* にて切断されるか否かにより判定した (図 4)。PCR を前述の *Ile/Val* 多型と同条件で行った後, PCR 反応液 30 μ l を 10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 50mM NaCl 中で *MspI* (宝酒造, 東京) 24units と 37°C, 2 時間反応させた後, 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い, 340bp および 200bp, 140bp の産物を検出した。

(2) *GSTM1* 遺伝子欠損多型

GSTM1 遺伝子欠損の検出は, Comstock らの方法²⁵⁾に従い, 第 5 エクソンを増幅するように設計した 2 種類のプライマー GST5 (5' - GAA GGT GGC CTC CTC CTT GG - 3') と GST6 (5' - AAT TCT GGA TTG TAG CAG AT - 3') を用いて PCR を行い, 産物の有無にて遺伝子欠損の有無を判定した (図 5)。PCR の反応条件は変性反応 95°C, アニール反応 60°C, 伸長反応 72°C, 各 1 分を 1 サイクルとして, 計 30 サイクルの DNA の増幅後, 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い, 165bp の PCR 産物を検出した。

4) 統計学的検定

有意差の検定には Fisher の直接確率法を用いた。

また, 変異型遺伝子を保有する個体の, 野生型遺伝子を保有する個体に対する相対危険度を以下の式を用いて算出した。

$$\text{相対危険度} = \frac{\text{変異型遺伝子を保有する癌患者数}}{\text{変異型遺伝子を保有する対照群の個体数}} \div \frac{\text{野生型遺伝子を保有する癌患者数}}{\text{野生型遺伝子を保有する対照群の個体数}}$$

第3節 結果

1) 対象群の分布

対象とした口腔扁平上皮癌患者 100 名の内訳は、43 歳から 83 歳までの男性 60 名、女性 40 名で、初診時の平均年齢は 59.5 歳であった。また、患者群と年齢、性別を対応させて無作為に選んだ対照群 100 名の平均年齢は 62.5 歳であった。

2) *CYP1A1* 遺伝子多型分布

i) *Ile/Val* 多型分布

CYP1A1 遺伝子 *Ile/Val* 多型の判定例を示す (図 6)。検体 1 は相同遺伝子のいずれもがイソロイシン型を示す *Ile/Ile* の野生型、検体 2 はいずれの組み合わせでも反応産物が認められる *Ile/Val* のヘテロ変異型、検体 3 は *Val/Val* のホモ変異型と判定した。

解析の結果、口腔癌患者 100 名中 60 名が *Ile/Ile* 型、32 名が *Ile/Val* 型、8 名が *Val/Val* 型の遺伝子を保有していた。対照群のそれぞれ 72 名、22 名、6 名と比較すると、*Ile/Ile* 型の個体はやや少なく、*Ile/Val* 型と *Val/Val* 型の個体は逆に多い傾向が認められた。*Ile/Ile* 型を 1 とした時の変異型を有する個体の相対危険度はそれぞれ *Ile/Val* 型が 1.7、*Val/Val* 型が 1.6 であったが、両者の分布に有意な差は認められなかった (表 1)。

ii) *MspI* 多型分布

CYP1A1 遺伝子 *MspI* 多型の判定例を示す (図 7)。検体 A には 340bp の反応産物が検出されていることから、相同遺伝子のいずれもが *MspI* で切断されない *m1/m1* の野生型、検体 B には切断されない 340bp の産物と

MspI で切断された 200bp と 140bp の産物が混在することから *m1/m2* のヘテロ変異型、また、検体 C は切断される *m2/m2* のホモ変異型と判定した。

解析の結果、口腔癌患者 100 名中 32 名が *m1/m1* 型、53 名が *m1/m2* 型、15 名が *m2/m2* 型の遺伝子を保有していた。対照群のそれぞれ 60 名、32 名、8 名と比較して変異型を保有する個体が有意に高頻度で分布していた。*m1/m1* 型を 1 としたときの相対危険度はそれぞれ、*m1/m2* 型が 3.1、*m2/m2* 型が 3.5 と高い値を示した（表 2）。

3) *GSTM1* 遺伝子欠損多型分布

GSTM1 遺伝子欠損の判定例を示す（図 8）。検体 1, 3, 5 には産物が認められることから *GSTM1* (+) 型、一方、検体 2, 4 には認められないことから *GSTM1* (-) 型と判定した。

解析の結果、口腔癌患者 100 名中 57 名は *GSTM1* (+) 型、43 名は *GSTM1* (-) 型であり、対照群の 60 名、40 名とほぼ同数であった（表 3）。

4) *CYP1A1* 遺伝子多型と *GSTM1* 遺伝子欠損多型

CYP1A1 と *GSTM1* 遺伝子多型両者の関係を総合して解析した結果、*CYP1A1* の *Ile/Val* 多型における *Val/Val* 型を保有する個体の頻度は、口腔癌患者群の *GSTM1* (-) 型では 13.9% であり、対照群の 7.5% と比較して高かった。また、患者群における *GSTM1* (-) 型と (+) 型との間で *Val/Val* 型を保有する個体の頻度を比較すると、(+) 型より (-) 型で高かったが、対照群では *GSTM1* 遺伝子欠損の有無によって *Val/Val* 型の占める割合に差がなかった（図 9）。

一方、*MspI* 多型においては *m2/m2* 型を保有する個体の頻度が、口腔癌患者群の *GSTM1* (-) 型では 20.9% であり、(+) 型の 10.5% あるいは対

照群の 7.5% と比較して有意に高かった。また、*m1/m2* と *m2/m2* をあわせた変異型の頻度は、患者群の *GSTM1* (−) 型では 81.4% であり、対照群の (−) 型の 42.5% と比較すると約 2 倍で、患者群の (+) 型の 57.9% に比べても有意に高かった。*GSTM1* 欠損で *MspI* 多型の *m1/m1* 型を 1 としたときの変異型 *m1/m2* 型と *m2/m2* 型を保有する個体の相対危険度はそれぞれ 5.3, 8.6 で、*GSTM1* 欠損多型単独では相関が認められなかったものの、*CYP1A1* 遺伝子多型と総合して検討すると、*GSTM1* 遺伝子を欠損し、*m1/m2*, あるいは *m2/m2* の変異型遺伝子を有する個体が口腔癌患者群には有意に多く存在していることが明らかとなった (図 10)。

第4節 考察

チトクローム P450 は、活性中心にヘムを有し、薬物代謝の第一段階である酸素添加反応を触媒する酵素の総称であり、現在 100 以上の分子種の存在が報告されている^{4,5)}。これらのうち CYP1A1 は、芳香族炭化水素系化学発癌物質の一種である 3-メチルコラントレンを投与したラット肝のミクロソームに誘導される分子種として同定された蛋白と相同性を示す分子種で、ヒトにおいても、肝をはじめ多くの臓器や組織に存在する事が知られている^{3,5)}。

また、GST は、一群の分子種からなる多機能酵素で、ヒトを含む多くの動物の肝、腎、肺など様々な臓器に分布し、種々の解毒機構に関与している。現在、ヒト GST は可溶性画分に存在する α , μ , π , θ と膜結合性の microsomal GST の 5 つの分子種からなる GST ファミリーを形成しており、その中で μ クラスに属する GSTM1 は、CYP1A1 などにより活性化された親電子性化学発癌物質を求核性の還元型グルタチオンと抱合させ、解毒する反応を触媒すると考えられている²⁶⁻²⁸⁾。

本研究では、口腔癌の大半を占める扁平上皮癌患者において、芳香族炭化水素系化学発癌物質の代謝的活性化に関与する CYP1A1 と排泄に関与する GSTM1 遺伝子多型分布を調べ、口腔癌患者には m2/m2 など CYP1A1 遺伝子の変異型を保有する個体が有意に多いこと、さらに、GSTM1 遺伝子の欠損型においては、その関係が一層顕著であることを明らかにし、これらの遺伝子型を保有する個体が、口腔癌発生に関しての高感受性集団に属している可能性を示した。これまでも、種々の臓器の癌患者における CYP1A1 遺伝子多型分布が調査されており、肺癌⁸⁻¹⁰⁾、食道癌²⁹⁾ などでは癌患者群と対照群との間でその分布に有意差があり、胃癌、大腸癌、乳癌³⁰⁾、膀胱癌³¹⁾ では明らかな差がないことが報告されている。一方、日本人を対象とした研究では肺癌患者には CYP1A1 遺伝子の変異型を保有する個体が

多いと報告されているが、ノルウェー人³²⁾やフィンランド人³³⁾を対象とした研究では、変異型が日本人の約 1/10 しか見出されていない。さらに、肺癌の組織型によっても *CYP1A1* 遺伝子多型の分布は異なると報告されている^{8, 21, 30)}。また、*GSTM1* 遺伝子欠損の分布にも同様な報告があることから³⁴⁻³⁷⁾、これら薬物代謝酵素遺伝子多型の分布と発癌との関係には、人種差、臓器や組織型による差などが存在し³⁸⁾、発癌過程において、これらの遺伝子多型の関与する程度は、病変の背景因子により大きな差がある可能性が考えられる。

最近、Kiyohara ら³⁹⁾は様々な遺伝子型を有する健常人の白血球を用いてベンツピレン代謝反応の酵素活性を測定し、*CYP1A1* の *Val/Val* 型を保有する個体の活性が他の遺伝子型の約 2 倍と有意に高く、*m2/m2* 型では基質による酵素活性の誘導が顕著であることを報告しており、Landi ら⁴⁰⁾や Crofts ら⁴¹⁾も同様の報告を行っている。さらに、Jaiswal ら⁴²⁾は *MspI* 多型が *CYP1A1* 遺伝子の転写速度に影響を与えることにより酵素活性を左右する可能性を述べている。これらの報告はいずれも、*CYP1A1* 遺伝子の *Ile/Val* 多型は酵素蛋白の基質結合部位近傍に位置することから基質親和性に影響を与え、また *MspI* 多型は *CYP1A1* 遺伝子の 3' 下流のポリ (A) 付加シグナルからおよそ 250 塩基下流のチミンからシトシンへの置換による多型であるため転写調節に関与して、それぞれ酵素活性を変化させることにより、化学発癌物質の代謝的活性化の効率に影響を与えるものと推測している。これに対して、Zhang ら⁴³⁾は、遺伝子組換え型 *CYP1A1-Ile*⁶² と *-Val*⁶² 蛋白を用いて酵素学的検討を行い、エトキシレゾルフィンの代謝において *Val* 型の *Vmax* 値は有意に高いが、ベンツピレンの代謝においては両者の *Vmax* 値に差がなかったと報告している。このように、*CYP1A1* 遺伝子多型の機能的意義が酵素活性のレベルで明らかにされつつあるものの、一致した見解は現在までのところ得られていない。また、*CYP1A1* の誘導は、外来のダイオキシンやベンツピレンなどの誘導物質が細胞質に存在する Aryl

hydrocarbon receptor (Ahr) と Ahr nuclear translocator (Arnt) とのヘテロダイマーに結合後、核内へ移行し、*CYP1A1* 遺伝子の 5' 領域の数カ所に存在する Xenobiotic Responsive Element (XRE) に結合し転写を促進することにより生じると考えられている^{44, 45)}。しかし、3' 側に存在する *MspI* 多型がどのような役割を果たしているのかについては、現在までのところ明らかにされていない。

このように遺伝子多型の意義については不明な点が多く残されているものの、*CYP1A1* 遺伝子の変異型を保有している個体や、*GSTM1* 遺伝子を欠損している個体では、活性化された化学発癌物質が明らかに高頻度に DNA に結合していること⁴⁶⁻⁴⁹⁾、また、Kawajiri ら⁵⁰⁾ は、肺癌患者において *CYP1A1* 遺伝子の変異型遺伝子を保有する個体は、野生型遺伝子を保有する個体と比較して、*p53* 癌抑制遺伝子に点突然変異が起こる危険性が 4~5 倍高くなることを報告しており、*CYP1A1* や *GSTM1* 遺伝子の変異型を保有することが実際に発癌に結びつく可能性を示唆している。これらの報告および著者の結果から、*GSTM1* を欠損し *CYP1A1* の Val/Val 型や *m2* 型の変異型遺伝子を保有する個体では、ベンツピレンに代表される芳香族炭化水素系化学発癌物質が体内に取り込まれた際に、高い活性化能と排泄に關与する酵素の欠損により、反応性の高い中間代謝産物を蓄積させて、高頻度に DNA 損傷が生じる可能性が考えられ、口腔癌発生において特定の化学発癌物質に対して高感受性であることを示唆しているものと考えられた。

第3章 薬物代謝酵素遺伝子多型と発癌感受性

第1節 概要

CYP1A1 や *GSTM1* の遺伝子型が、ヒト口腔癌発生にどのように関与しているのかを明らかにするため、口腔癌発生の危険因子の一つである喫煙と遺伝子多型の関連性について検討した。また同様に、口腔癌発生の危険因子とされる飲酒との関連性についても検討した。

第2節 方法

1) 質問事項

喫煙習慣や飲酒習慣などの生活事項に関する質問表を用意して患者との面接調査を行った(表4)。喫煙、飲酒はその蓄積が口腔癌発生の要因と考えられるため、それぞれの摂取量の変化を考慮に入れて、過去の喫煙や飲酒状況を10年ごとに算出して、以下の解析に用いた。

2) Index の算出法

各 Index は以下の式にて算出した^{51, 52)}。

Smoking Index = 一日あたりの平均喫煙本数 × 喫煙年数

Drinking Index = 一日あたりの平均飲酒量* × 飲酒年数

*一日あたりの平均飲酒量はエタノール換算量(約1合 ≒ 1)

3) 統計学的検定

有意差の検定には Student's t-test を用いた。

第3節 結果

1) *CYP1A1* *Ile/Val* 多型の各遺伝子型における喫煙量と飲酒量の検討

口腔癌患者における *CYP1A1* *Ile/Val* 多型の各遺伝子型別の Smoking Index と Drinking Index を算出した結果、平均 Smoking Index は *Ile/Ile* 型を保有する個体では 516.9、*Ile/Val* 型では 534.2、*Val/Val* 型では 388.8 であり、他の遺伝子型と比較して *Val/Val* 型を保有する個体では低い値を示す傾向が認められた（図 1 1）。しかし、各遺伝子型における平均 Drinking Index には差を認めなかった（図 1 2）。

2) *CYP1A1* *MspI* 多型の各遺伝子型における喫煙量と飲酒量の検討

CYP1A1 *MspI* 多型の各遺伝子型別の平均 Smoking Index は、*m1/m1* 型を保有する個体では 677.8、*m1/m2* 型では 478.0、*m2/m2* 型では 276.4 であり、*m2/m2* 型を保有する個体では、*m1/m1* 型の個体と比較して有意に低い値を示した（図 1 3）。しかし、各遺伝子型における平均 Drinking Index には有意な差は認めなかった（図 1 4）。

3) *CYP1A1* 各遺伝子型における喫煙量におよぼす *GSTM1* 遺伝子欠損多型の影響

平均 Smoking Index を *GSTM1* (+) 型と (-) 型に分けて解析を行った。その結果、全体では *GSTM1* (+) 型より (-) 型の個体の方がより Smoking Index が低い傾向を示した。その中で、*GSTM1* (-) 型で *Val/Val* 型を保有する個体は 313.3 で *Ile/Ile* 型の 556.7 より低い値を示した（図 1 5）。また、*CYP1A1* の *MspI* 多型でも同様に、*GSTM1* (-) 型で *m2/m2* 型を保

有する個体は 228.9 で *m1/m1* 型の 759.8 や *GSTM1* (+) 型で *m1/m1* 型の 648.0 に比べて有意に低い値を示した (図 16)。

4) 生涯喫煙量別の遺伝子多型分布

発病までの生涯喫煙量を 300 未満, 300 以上 1000 未満, 1000 以上の 3 群に分けて口腔扁平上皮癌患者の多型分布を検討した結果, およそ 1 日 40 本の喫煙を 25 年間継続したことに相当する Index 1000 以上の大量喫煙者群には *Val/Val* 型や *m2/m2* 型を保有する個体は認められなかった。一方, *GSTM1* (-) 型の集団では Index が 300 未満の少量喫煙者群に変異型である *Val/Val* 型や *m2/m2* 型を保有する個体がそれぞれ 21.1%, 36.8% であり, *GSTM1* (+) 型の集団のそれ (*Val/Val* 型 0% で, *m2/m2* 型 2.0%) より高頻度で存在していた。特に, *MspI* 多型では中等度から少量の喫煙者に *m1/m2* や *m2/m2* の変異型を保有する個体の占める割合が高く, *GSTM1* (-) 型の集団の少量喫煙者群では実に 94.7% の個体に変異型遺伝子を保有していた (図 17, 18)。

第4節 考察

口腔癌の発癌高感受性と考えられる *CYP1A1* の変異型遺伝子や *GSTM1* 遺伝子欠損が、ヒト口腔癌発生にどのように関与しているのかを明らかにするために、口腔癌の危険因子として知られている喫煙や飲酒と遺伝子多型の関係を検討した。その結果、*CYP1A1* の *Val/Val* 型や *m2/m2* 型を保有する個体で、特に *GSTM1* を欠損する個体は、他の遺伝子型のそれより少ない喫煙量で発癌に至ることが明らかとなった。また、発癌までの生涯喫煙量別にこれらの遺伝子多型分布を検討した結果、喫煙量の多い群には感受性の高い遺伝子型を保有する個体は観察されなかったのに対し、比較的喫煙量の少ない群にはそれらの遺伝子型を保有する個体がより多く分布していた。しかし、口腔癌発生において危険因子の一つと考えられる飲酒（アルコール）と *CYP1A1* 遺伝子多型分布との間には相関が認められなかった。これは、アルコール代謝においては *CYP1A1* や *GSTM1* の関与が低いと考えられた。

Kellermann ら⁵³⁾ は、健常人や他の癌患者と比較して、肺癌患者では *CYP1A1* の触媒する AHH (Aryl hydrocarbon hydroxylase) の高い誘導活性を示す個体の割合が有意に高いことを示し、AHH 活性の誘導能が高い個体はより少ない喫煙量で発癌に至る可能性が高いと述べている。また、Nakachi ら^{54,55)} は、肺癌患者の *CYP1A1* 遺伝子多型と生涯喫煙本数の関係を調査して、*CYP1A1* の *Val/Val* 型や *m2/m2* 型を保有する患者の平均生涯喫煙本数は *Ile/Ile* 型や *m1/m1* 型を保有する患者のそれより有意に少ないこと、また、喫煙本数の少ない集団ほど *Val/Val* 型や *m2/m2* 型を保有する患者の割合が増えることを報告しており、本研究の結果は、それらの報告とよく一致していた。

一方、アルコールの代謝には、1) アルコール脱水素酵素 (ADH) 系、2) ミクロソームエタノール酸化酵素 (CYP2E1) 系、3) カタラーゼ系の

3つの経路が知られ、これらの経路により産生されたアセトアルデヒドはいずれもアルデヒド脱水素酵素（ALDH）によって代謝される⁵⁶⁾。ADH、CYP2E1 および ALDH 遺伝子にも多型が存在し、肝疾患やアルコール中毒との関連性を示唆する報告^{57,58)}が多くみられることから、飲酒習慣についても、口腔癌患者における ADH、CYP2E1 および ALDH 遺伝子多型分布と関連している可能性も考えられる。

以上より、芳香族炭化水素系の化学発癌物質を体内に蓄積させると予想される GSTM1 遺伝子欠損型で CYP1A1 の変異型遺伝子を保有する個体は、ヒト口腔癌発生までの喫煙量が野生型遺伝子を保有する個体より少なく、喫煙などによる特定の化学発癌物質による口腔癌発生に高感受性であると考えられた。また、これらの遺伝子型によって規定される感受性の発癌への影響は、体内に取り込まれる化学発癌物質の量が比較的少ない範囲で大きく、絶対量の増加に伴い減少していくものと考えられた。

第4章 口腔扁平上皮癌の原発部位別遺伝子多型分布

第1節 概要

口腔は複雑な解剖学的構造を有し、また多彩な機能を営んでいることから、口腔癌の発生部位により、その病因や機構には様々な特徴があると考えられる。また、過去の動物実験や臨床的経験から、口腔内の部位により外来の化学物質に対する感受性に差のある可能性も想像される。しかし、これまでに行われた口腔癌の疫学調査には、原発部位別に病因の特徴を検討し、明らかにした報告はほとんどない。そこで、本研究において、口腔癌発生の高感受性であることが示された、*CYP1A1* 遺伝子多型の変異型を指標として、その発生部位別に薬物代謝酵素遺伝子多型分布と発病までの喫煙量の関わりについて検討し、その特徴を明らかにした。

第2節 対象

口腔扁平上皮癌患者 100 名をその原発部位により、上歯肉癌、下歯肉癌、頬粘膜癌、舌癌、口底癌の 5 つに分類し、薬物代謝酵素遺伝子多型分布と発病までの喫煙量の関わりについて検討を行った。

第3節 結果

1) 口腔扁平上皮癌原発部位の分布

対象とした口腔扁平上皮癌患者 100 名をその原発部位別に分類すると、下歯肉癌 30 名、舌癌 29 名、口底癌 21 名、頬粘膜癌 11 名、上歯肉癌 9 名であった。

2) 原発部位別の喫煙量

平均 Smoking Index を原発部位別に検討した結果、Index は下歯肉癌 367.8、舌癌 375.9、上歯肉癌 365.8、頬粘膜癌 520.9 であったのに対し、口底癌では 839.3 と他の約 2 倍の高値を示した（図 19）。

3) 各原発部位における遺伝子多型分布

CYP1A1 の *Ile/Val* 多型の分布は、*Val/Val* 型を保有する個体が上歯肉癌患者に多かったものの、対照群と比較して、それぞれの部位で有意な差は認めなかった（表 5）。

一方、*CYP1A1* の *MspI* 多型の分布は、頬粘膜癌の *m2/m2* 型（54.5%）、下歯肉癌、舌癌、上歯肉癌の *m1/m2* 型（それぞれ 56.7%、55.2%、66.7%）を保有する個体の頻度が対照群と比較して有意に高く、上歯肉癌の *m2/m2* 型（22.2%）を保有する個体の頻度にも高い傾向が認められた。それぞれの *m1/m1* 型を 1 とした時の *m2/m2* 型を保有する個体の相対危険度は下歯肉癌 2.3、舌癌 3.3、頬粘膜癌 45.0、上歯肉癌 15.0 であり、口底癌以外はそれぞれ非常に高かった（表 6）。

第4節 考察

宿主と接触した化学発癌物質の多くは体内に取り込まれた後、様々な修飾を受けてDNAと結合し、発癌性を示すと考えられている。これまでに、それらの発癌性には種差、性差の他、臓器や組織特異性^{59, 60)}があることが知られている。その原因として、発癌物質との接触を容易にする解剖学的形態^{61, 62)}や発癌物質の活性化に關与する薬物代謝酵素の量的、質的違いなどが考えられている。Ullrichら⁶³⁾は、食餌中の様々な化学物質と接触する小腸粘膜では、薬物代謝酵素活性が主に幽門部に近い粘膜で高く、下部から盲腸へ向かうに従い活性は低くなることを報告しており、同一臓器における薬物代謝酵素活性の分布差も、発癌に様々な影響を与えていると考えられる。これまでに、口腔内の部位別の発癌感受性について検討した報告はないが、化学発癌物質の粘膜浸透性が口腔粘膜の部位により異なるという報告⁶⁴⁾もみられ、これらも含めて様々な因子が感受性の規定に關与することが想像される。また、口腔癌の病因に關して、これまで数多くの報告が見られるが、口腔の持つ複雑な形態や生理的機能を考慮して、その特徴に言及した報告は少ない。

本研究においては、口腔扁平上皮癌患者を、その原発部位により下歯肉癌、上歯肉癌、舌癌、口底癌、頬粘膜癌の5つに分類し、発病までの生涯喫煙量を算出した。その結果、ほとんどの部位で同程度の喫煙量であったが、口底癌患者では他の部位と比較して約2倍と多かった。一方、原発部位により *CYP1A1* 遺伝子多型の分布には顕著な差がみられ、頬粘膜癌や上歯肉癌患者に高感受性と考えられる変異型遺伝子を保有する個体が多く、逆に喫煙量の多い口底癌患者には変異型遺伝子を保有する個体をほとんど認めず、その分布は対照群と類似していた。従って、頬粘膜や上歯肉の発癌には、*CYP1A1* や *GSTM1* 遺伝子多型に起因する発癌感受性が強く關与し、実際、喫煙を例にとると、口底などと比較して少ない喫煙量で発癌に至る

と考えられた。一方、従来より男性に好発し、喫煙との関連が強いと考えられている口底癌¹⁷⁾では、逆にこれらの感受性の関与が弱いという傾向が認められた。この結果は、口底癌の発生には、タバコ煙中に含まれるニトロソ化合物など、他の酵素によって代謝される化学発癌物質の関与や口腔内でのタバコ煙の拡散経路あるいは唾液に覆われる口底粘膜での発癌物質の吸収性などの影響が、*CYP1A1* や *GSTM1* 遺伝子多型の影響を上回って現れているものと想像された。

Autrup ら⁶⁵⁾は、ヒト口腔粘膜の各部位の細胞を初代培養し、ベンツピレンの代謝的活性化能とその代謝産物の DNA 結合量を検討し、その平均結合量は頬粘膜がもっとも多いことを報告している。この報告は、ベンツピレンなどの芳香族炭化水素系化学発癌物質が、口腔粘膜で局所的に代謝的活性化されていることを示すと共に、その活性化能には部位による差が存在し、頬粘膜は特定の化学発癌物質によって DNA 損傷を受けやすい高感受性部位であることを示唆している。

以上より、口腔発癌において、タバコ煙中に含まれるベンツピレンなどの芳香族炭化水素系化学発癌物質に対する感受性の関与のには口腔内部位により差異が存在し、その差は化学発癌物質の活性化に関与する薬物代謝酵素遺伝子多型に起因する活性化能により左右され、特に頬粘膜癌ではその感受性因子の関与が大きく、特定の化学発癌物質による DNA 損傷を受けやすい高感受性部位であると考えられた。今後、口腔癌発生機構を解明する上で、口腔内部位別にこのような感受性因子を考慮に入れる必要性が示された。

第5章 総括

本研究では、口腔扁平上皮癌患者 100 名を対象に、薬物代謝酵素遺伝子 *CYP1A1* および *GSTM1* 多型の分布を調べ、非癌患者 100 名との比較検討を行った。また、癌患者から喫煙習慣や飲酒習慣を聴取して、遺伝子多型との関連性について検討した。さらに、口腔癌患者をその原発部位で分類し、原発部位別の遺伝子多型分布を調べ、口腔癌発生におけるこれらの遺伝子多型の役割について検討した。その結果、以下の知見を得た。

1. 口腔癌患者群には *GSTM1* 欠損で *CYP1A1 MspI* 多型の変異型を保有する個体の割合が対照群と比較して有意に多く含まれていた。また、*CYP1A1 Ile/Val* 多型の *Val* 変異型を保有する個体も多い傾向を認めた。従って、これらの遺伝子型を保有する個体は口腔癌発生の高感受性集団に属する可能性が示された。

2. *CYP1A1* 変異型遺伝子を保有する個体や *GSTM1* を欠損する個体は、野生型の個体と比較して、少ない喫煙量で口腔癌発生に至ることが示された。

3. 頬粘膜癌や上歯肉癌患者では、変異型遺伝子を保有する個体が有意に多く、薬物代謝酵素遺伝子多型に由来する発癌感受性は部位により差異のある可能性が考えられた。

これらの結果は、薬物代謝酵素の遺伝子多型によって生じる発癌物質の活性化と排泄のバランスが口腔癌の発癌感受性に強く関与している可能性を示唆しており、*CYP1A1* および *GSTM1* 遺伝子などの薬物代謝酵素遺伝子多型を指標にした高感受性集団の同定は、口腔癌の一次、二次予防に極めて有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 加藤隆一, 鎌滝哲也 : 薬物代謝の比較生化学. 清至書院, 第一版, 1983.
- 2) 武森重樹, 小南思郎 : チトクロムP-450. 東京大学出版会, 第二版, 1993.
- 3) Ichikawa, T., Hayashi, S-I., Noshiro, M., Takada, K., and Okuda, K. : Purification and characterization of cytochrome P-450 induced by benz(a)anthracene in mouse skin microsomes. *Cancer Res.*, **49**, 806-809, 1989.
- 4) Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estbrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., and Waxman, D.J. : The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, **10**, 1-14, 1991.
- 5) Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. : P450 and human cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1325-1335, 1991.
- 6) Chabot, G.G., Massaad, L., Toussaint, C., Albin, N., Parrise, O., Ribrag, V., Janot, F., and Gouyette, A. : Comparison of the principal drug-metabolizing enzyme systems in human tumors and corresponding peritumoral tissues: importance for sensitivity and/or resistance to anticancer drugs. *Cytochrome P450. 8th International Conference*, 217-222, 1994.
- 7) 渡辺民朗 : 癌原性化学物質の代謝とチトクロームP450. *代謝*, **19**, 1757-1768, 1982.
- 8) Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N., and Watanabe, J. : Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett.*, **263**, 131-133, 1990.
- 9) Kawajiri, K., Watanabe, J., and Hayashi, S-I. Genetic polymorphism of P450 and human cancer. *Cytochrome P450. 8th International Conference*, 155-162, 1994.

- 10) Cascorbi, I., Brockmoller, J., and Roots, I. : A C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res.*, **56**, 4965-4969, 1996.
- 11) Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., and Vainio, H. : The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*, **14**, 1479-1481, 1993.
- 12) Nakajima, T., Elovaara, E., Anttila, S., Hirvonen, A., Camus, A.M., Hayes, J.D., Ketterer, B., and Vainio, H. : Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: Risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis*, **16**, 707-711, 1995.
- 13) Franceschi, S., Talamini, R., Barra, S., Baron, A.E., Negri, E., Bidoli, E., Serraino, D., and Vecchia, C.L. : Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.*, **50**, 6502-6507, 1990.
- 14) Field, J.K., Spandidos, D.A., Malliri, A., Gosney, J.R., Yiagnisis, M., and Stell, P.M. : Elevated P53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of head and neck. *Br. J. Cancer*, **64**, 573-577, 1991.
- 15) Macfarlane, G.J., Zheng, T., Marshall, J.R., Boffetta, P., Niu, S., Brasure, J., Merletti, F., and Boyle, P. : Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer : A pooled analysis of three case-control studies. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, **31B**, 181-187, 1995.
- 16) Takezaki, T., Hirose, K., Inoue, M., Hamajima, N., Kuroishi, T., Nakamura, S., Koshikawa, T., Matsuura, H., and Tajima, K. : Tobacco, alcohol and dietary factors associated with the risk of oral cancer among Japanese. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 555-562, 1996.
- 17) 山家誠, 藤内祝, 上田実, 大野良之, 田川哲哉 : 口腔癌の症例対照研究 第一報 : 喫煙・飲酒・食習慣との関連. *日口外誌* **42**, 42-50, 1996.

- 18) 津田洋幸 : たばこと発がん. *からだの科学*. **183**, 34-37
- 19) Kawajiri, K., Watanabe, J., Gotoh, O., Tagashira, Y., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. : Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 219-225, 1986.
- 20) Hayashi, S-I., Watanabe, J., Nakachi, K., and Kawajiri, K. : Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. : *J. Biochem.*, **110**, 407-411, 1991.
- 21) Hayashi, S-I., Watanabe, J., and Kawajiri, K. : High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450 1A1 and mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 866-870, 1992.
- 22) Board, P.G. : Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am. J. Hum. Genet.*, **33**, 36-43, 1981.
- 23) Brockmoller, J., Gross, D., Kerb, R., Drakoulis, N. and Roots, I. : Correlation between trans-stilbene oxide-glutathione conjugation activity and the deletion mutation in the glutathione S-transferase class mu gene detected by polymerase chain reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 647-650, 1992.
- 24) Gustafson, S., Proper, J.A., Bowie, E.J.W., and Sommer, S.S. : Parameter affecting the yield of DNA from human blood. *Anal. Biochem.*, **165**, 294-299, 1987.
- 25) Comstock, K.E., Sanderson, B.J.S., Clafin, G., and Henner, W.D. : GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3670, 1990.
- 26) 佐藤清美 : グルタチオンS-トランスフェラーゼ. *代謝*, **23**, 1069-1077, 1986.
- 27) Zhong, S., Spurr, N.K., Hayes, J.D., and Wolf, C.R. : Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class mu glutathione S-transferase, GSTM4. *Biochem. J.*, **291**, 41-50, 1993.

- 28) Bongers, V., Snow, G.B., and Braakhuis, B.J.M. : The role of glutathione S-transferases in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, **31B**, 349-354, 1995.
- 29) Nimura, Y., Yokoyama, S., Fujimori, M., Aoki, T., Adachi, W., Nasu, T., He, M., Ping, Y.M., and Iida, F. : Genotyping of the CYP1A1 and GSTM1 genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking. *Cancer*, **80**, 852-857, 1997.
- 30) 林 慎一, 川尻 要 : P450遺伝子の多型と発癌感受性. 代謝, **28**, 11-19, 1991.
- 31) Brockmoller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., and Roots, I. : Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.*, **56**, 3915-3925, 1996.
- 32) Tefre, T., Ryberg, D., Haugen, A., Nebert, D.W., Skaug, V., Brogger, A., and Borresen, A.L. : Human CYP1A1 (cytochrome P450) gene: Lack of association between the *MspI* restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics*, **1**, 20-25, 1991.
- 33) Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., Anttila, S., and Vainio, H. : Point-mutational *MspI* and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: Lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1**, 485-489, 1992.
- 34) Zhong, S., Wyllie, A.H., Barnes, D., Wolf, C.R., and Spurr, N.K. : Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, **14**, 1821-1824, 1993.
- 35) Mera, N., Ohmori, S., Itahashi, K., Kikuchi, M., Igarashi, T., Rikihisa, T., and Kitada, M. : Immunochemical evidence for the occurrence of mu class glutathione S-transferase in human fetal livers. *J. Biochem.*, **116**, 315-320, 1994.

- 36) Lin, H.J., Probst-Hensch, N.M., Ingles, S.A., Han, C.Y., Lin, B.K., Lee, D.B., Frankl, H.D., Lee, E.R., Longnecker, M.P., and Haile, R.W. : Glutathione transferase (*GSTM1*) null genotype, smoking, and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Res.*, **55**, 1224-1226, 1995.
- 37) Katoh, T., Nagata, N., Kuroda, Y., Itoh, H., Kawahara, A., Kuroki, N., Ookuma, R., and Bell, D.A. : Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) and T1 (*GSTT1*) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, **17**, 1855-1859, 1996.
- 38) Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A., and Pelkonen, O. : Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene*, **159**, 113-121, 1995.
- 39) Kiyohara, C., Hirohata, T., and Inutsuka, S. : The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of CYP1A1 gene. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 18-24, 1996.
- 40) Landi, M.T., Bertazzi, P.A., Shields, P.G., Clark, G., Lucier, G.W., Garte, S.J., Cosma, G., and Caporaso, N.E. : Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics*, **4**, 242-246, 1994.
- 41) Crofts, F., Taioli, E., Trachman, J., Cosma, G.N., Currie, D., Toniolo, P., and Garte, S.J. : Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis*, **15**, 2961-2963, 1994.
- 42) Jaiswal, A.K., Gonzales, F.J., and Nebert, D.W. : Human *P1-450* gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo(a)pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4503-4520, 1985.
- 43) Zhang, Z.Y., Fasco, M.J., Huang, L., Guengerich, F.P., and Kaminsky, L.S. : Characterization of purified human recombinant cytochrome P450 1A1-Ile⁴⁶² and -Val⁴⁶²: Assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.*, **56**, 3926-3933, 1996.

- 44) Kubota, M., Sogawa, K., Kaizu, Y., Sawaya, T., Watanabe, J., Kawajiri, K., Gotoh, O., and Fujii-Kuriyama, Y. : Xenobiotic responsive element in the 5'-upstream region of the human P-450c gene. *J. Biochem.*, **110**, 232-236, 1991.
- 45) 十川和博 : チトクロームP-450 1A1 遺伝子の転写調節機構. *実験医学*, **11**, 949-953, 1993.
- 46) Shields, P.G., Sugimura, H., Caporaso, N.E., Petruzzelli, S.F., Bowman, E.D., Trump, B.F., Weston, A., and Harris, C.C. : Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and the CYP1A1 restriction fragment length polymorphism. *Environ. Health. Perspec.*, **98**, 191-194, 1992.
- 47) Shields, P.G., Bowman, E.D., Harrington, A.M., Doan, V.T., and Weston, A. : Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res.*, **53**, 3486-92, 1993.
- 48) Hemminki, K., Dickey, C., Karlsson, S., Bell, D., Hsu, Y., Tsai, W.Y., A.Mooney, L.V., Savela, K., and P.Perera, F. : Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, **18**, 345-350, 1997.
- 49) Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D.H., Harries, L.W., Wolf, C.R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P., and Haugen, A. : Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, **18**, 1285-1289, 1997.
- 50) Kawajiri, K., Eguchi, H., Nakachi, K., Sekiya, T., and Yamamoto, M. : Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.*, **56**, 72-76, 1996.
- 51) Brinkman, G.L., and Coates, E.O. : The prevalence of chronic bronchitis in an industrial population. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **86**, 47-54, 1962.
- 52) 宮原裕, 佐藤武男 : 頭頸部悪性腫瘍の発癌要因 (第3報) —喫煙, 飲酒の影響に関する臨床的検討—. *日耳鼻* **84**, 233-238, 1981.

- 53) Kellermann, G., Shaw, C.R., and Luyten-Kellermann, M. : Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **289**, 934-937, 1973.
- 54) Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S-H., Watanabe, J., and Kawajiri, K. : Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.*, **51**, 5177-5180, 1991.
- 55) Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S-H., and Kawajiri, K. : Polymorphisms of the *CYP1A1* and *Glutathione S-Transferase* genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.*, **53**, 2994-2999, 1993.
- 56) 高瀬修二郎 : アルコールの代謝 酸化系酵素. 肝胆膵, **32**, 631-637, 1996.
- 57) Iwahashi, K., Nakamura, K., Suwaki, H., Matsuo, Y., and Ichikawa, Y. : Relationship between genetic polymorphism of CYP2E1 and ALDH2, and possible susceptibility to alcoholism. *Alcohol & Alcoholism*, **29**, 639-642, 1994.
- 58) Mizoi, Y., Yamamoto, K., Ueno, Y., Fukunaga, T., and Harada, S. : Involvement of genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism. *Alcohol & Alcoholism*, **29**, 707-710, 1994.
- 59) Tanaka, T., Kojima, T., Hara, A., Sawada, H., and Mori, H. : Chemoprevention of oral carcinogenesis by DL-alpha-difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor: dose-dependent reduction in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced tongue neoplasms in rats. *Cancer Res.* **53**, 772-776, 1993.
- 60) Boffa, L.C., and Bolognesi, C. : In vitro DNA and nuclear proteins alkylation by 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat. Res.*, **173**, 157-162, 1986.
- 61) Chang, K.W., Lin, S.C., Koos, S., Pather, K., and Solt, D. : p53 and Ha-ras mutations in chemically induced hamster buccal pouch carcinomas. : *Carcinogenesis*, **17**, 595-600, 1996.

- 62) Fujino, H., Chino, T., and Imai, T. : Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**, 907-918, 1965.
- 63) Ullrich, V., and Weber, P. : A direct test for monooxygenase activity of intact small intestine using surface reflectance fluorimetry. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 3309-3315, 1974.
- 64) Squier, C.A. : Penetration of nicotine and nitrosornicotine across porcine oral mucosa. *J. Appl. Toxicol.*, **6**, 123-128, 1986.
- 65) Autrup, H., Seremet, T., Arenholt, D., Dragsted, L., and Jepsen, A. : Metabolism of benzo(a)pyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells. *Carcinogenesis*, **6**, 1761-1765, 1985.

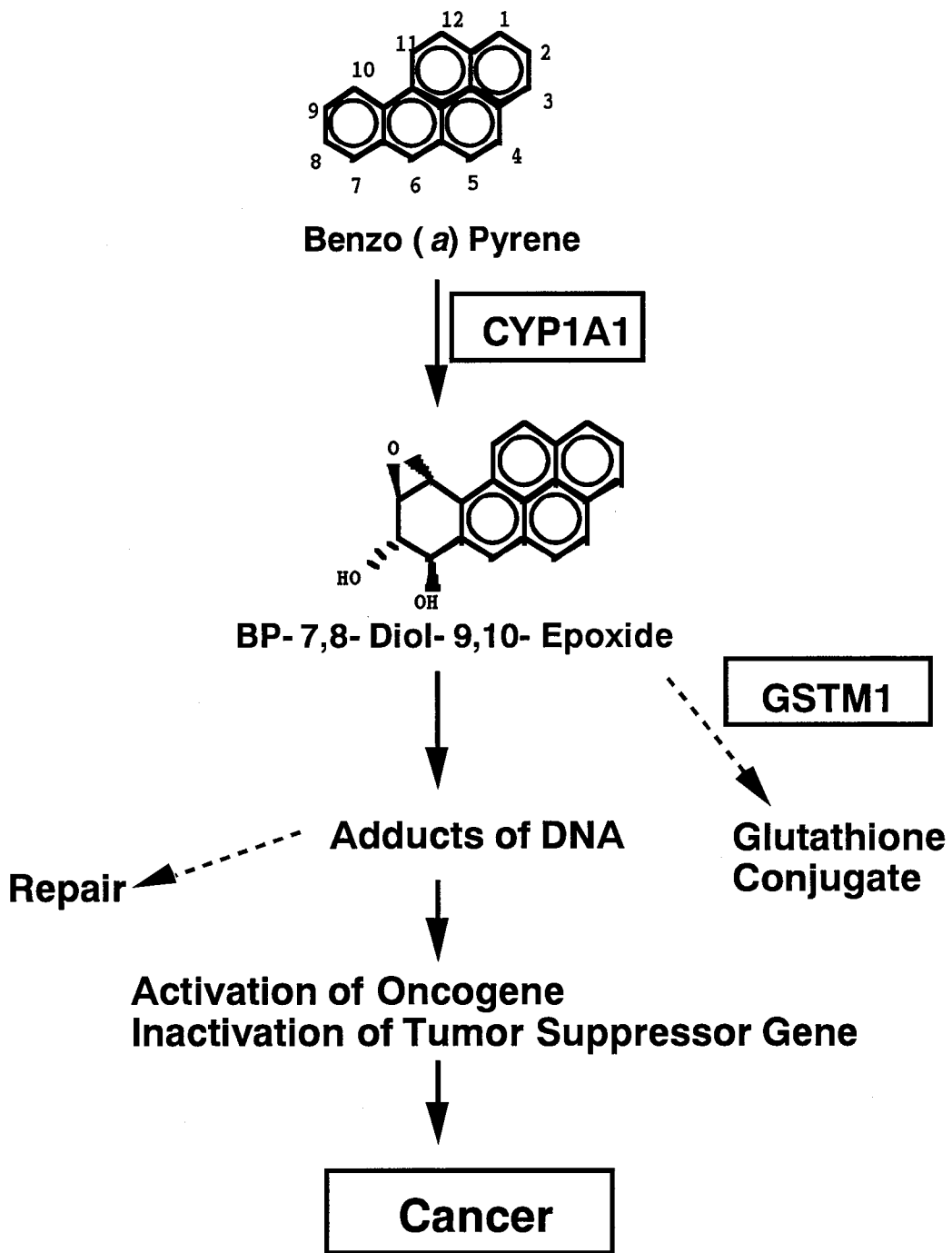


図1 化学発癌物質の解毒および代謝的活性化経路と癌化

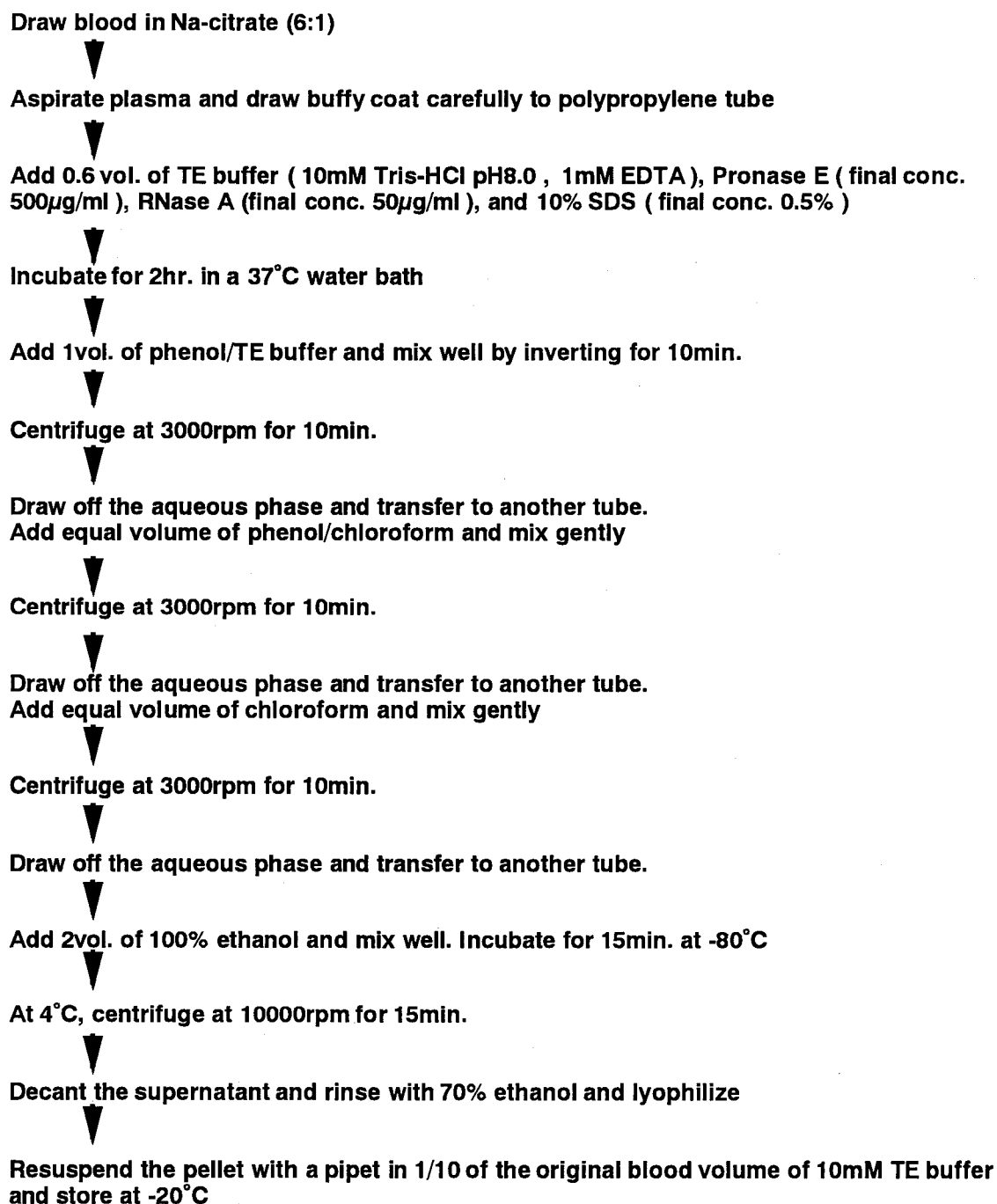


図2 末梢白血球からのDNA調製法

(Gustafson S., et al (1987) *Anal. Biochem.* 165, 294-299)

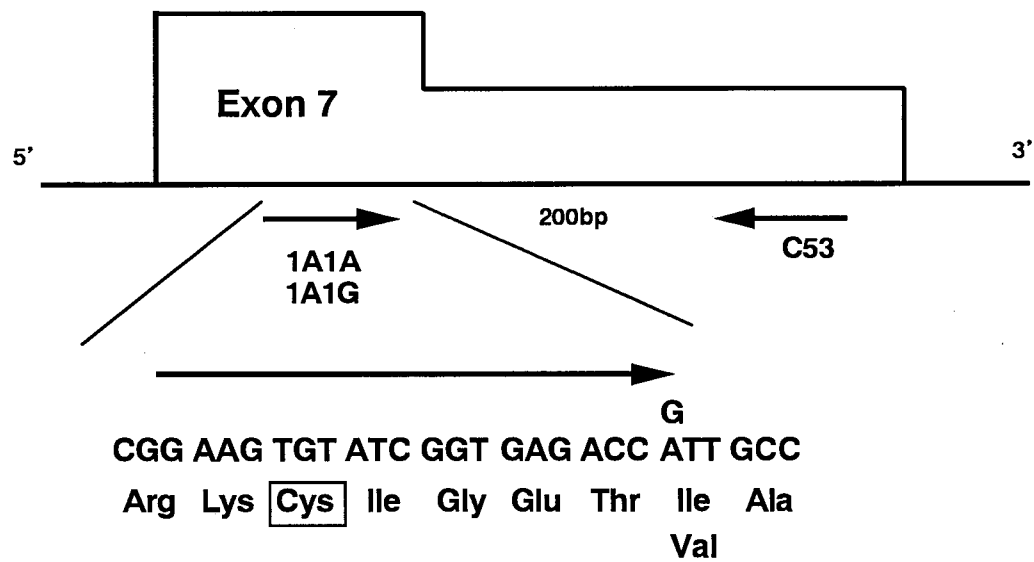


図3 *CYP1A1* 遺伝子のエクソン7内 *Ile/Val* 多型の構造

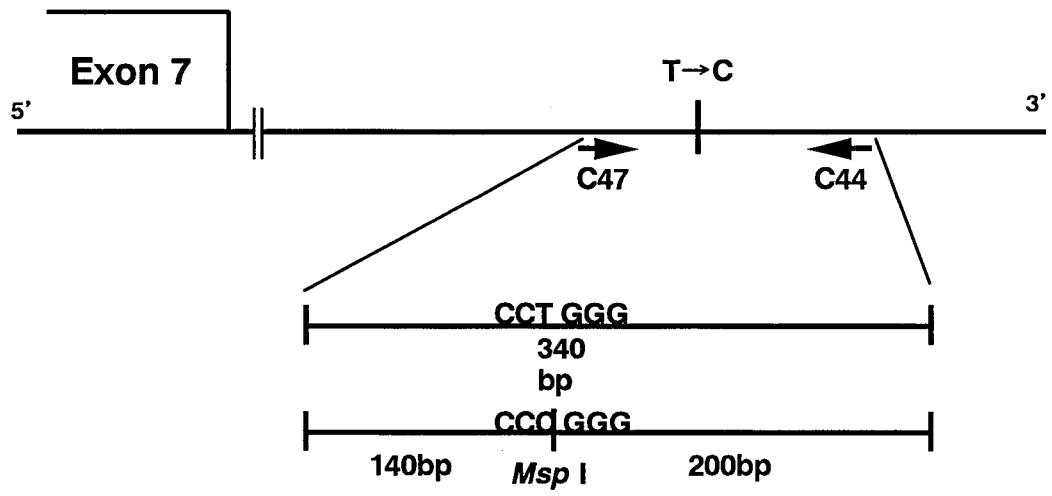


図4 *CYP1A1* 遺伝子の3'下流 *MspI*多型の構造

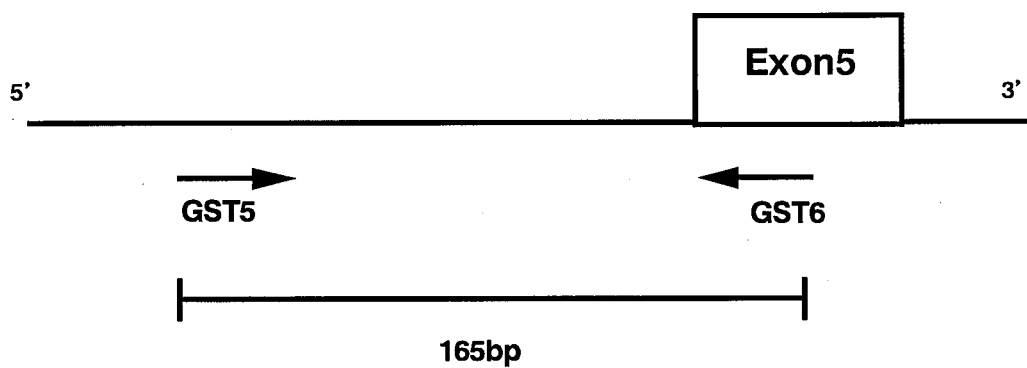


図5 PCR法による *GSTM1* 遺伝子欠損の検出法



図6 PCR法によるCYP1A1 *Ile/Val*多型の判定例

検体1: *Ile/Ile* 遺伝子型, 検体2: *Ile/Val* 遺伝子型,
 検体3: *Val/Val* 遺伝子型, レーンM: molecular weight marker
 各検体

左レーン: プライマー 1A1AとC53 の組み合わせによるPCR 産物
 右レーン: プライマー 1A1GとC53 の組み合わせによるPCR 産物

CYP 1A1	Ile/Ile 型	Ile/Val 型	Val/Val 型	Total
Patient No.(%)	60 (60.0)	32 (32.0)	8 (8.0)	100
Odds Ratios	1.0	1.7	1.6	
Control No.(%)	72 (72.0)	22 (22.0)	6 (6.0)	100

表1 CYP1A1 Ile/Val 多型分布

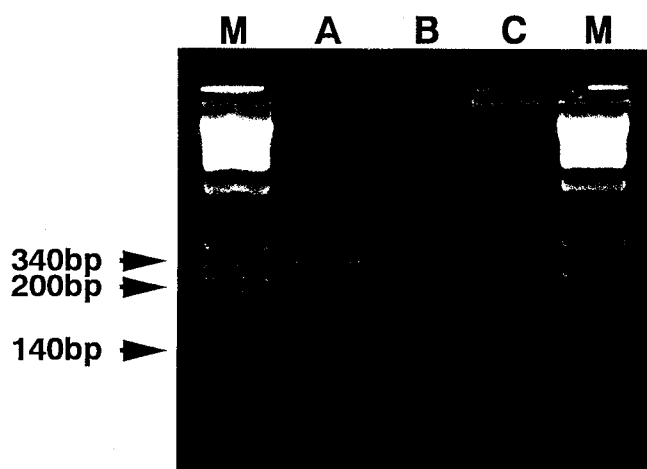


図7 PCR-RFLP法による *CYP1A1* 遺伝子 *MspI*多型の判定例

レーンA: *m1/m1* 遺伝子型, レーンB: *m1/m2* 遺伝子型,
 レーンC: *m2/m2* 遺伝子型, レーンM: molecular weight marker

<i>CYP 1A1</i>	<i>m1/m1</i> 型	<i>m1/m2</i> 型	<i>m2/m2</i> 型	Total
Patient No.(%)	32 (32.0)	53 (53.0)*	15 (15.0)**	100
Odds Ratios	1.0	3.1	3.5	
Control No.(%)	60 (60.0)	32 (32.0)*	8 (8.0)**	100

* P < 0.005, ** P < 0.1

表 2 *CYP1A1* 遺伝子 *MspI* 多型分布

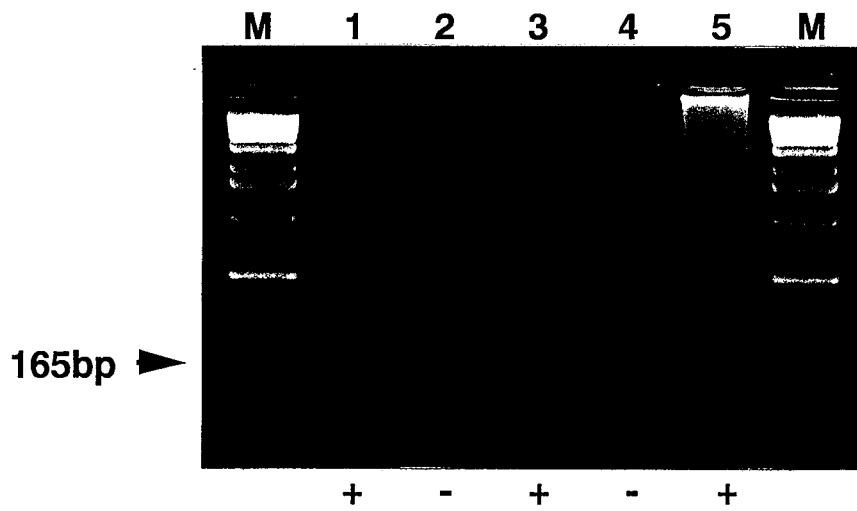


図 8 PCR法による *GSTM1* 遺伝子欠損の判定例

レーン1,3,5: *GSTM1*(+)型, レーン2,4: *GSTM1*(-)型,
 レーンM: molecular weight marker

<i>GSTM1</i>	(+)型	(-)型	Total
Patient No.(%)	57 (57.0)	43 (43.0)	100
Odds Ratio	1.0	1.1	
Control No.(%)	60 (60.0)	40 (40.0)	100

表3 *GSTM1* 遺伝子欠損の分布

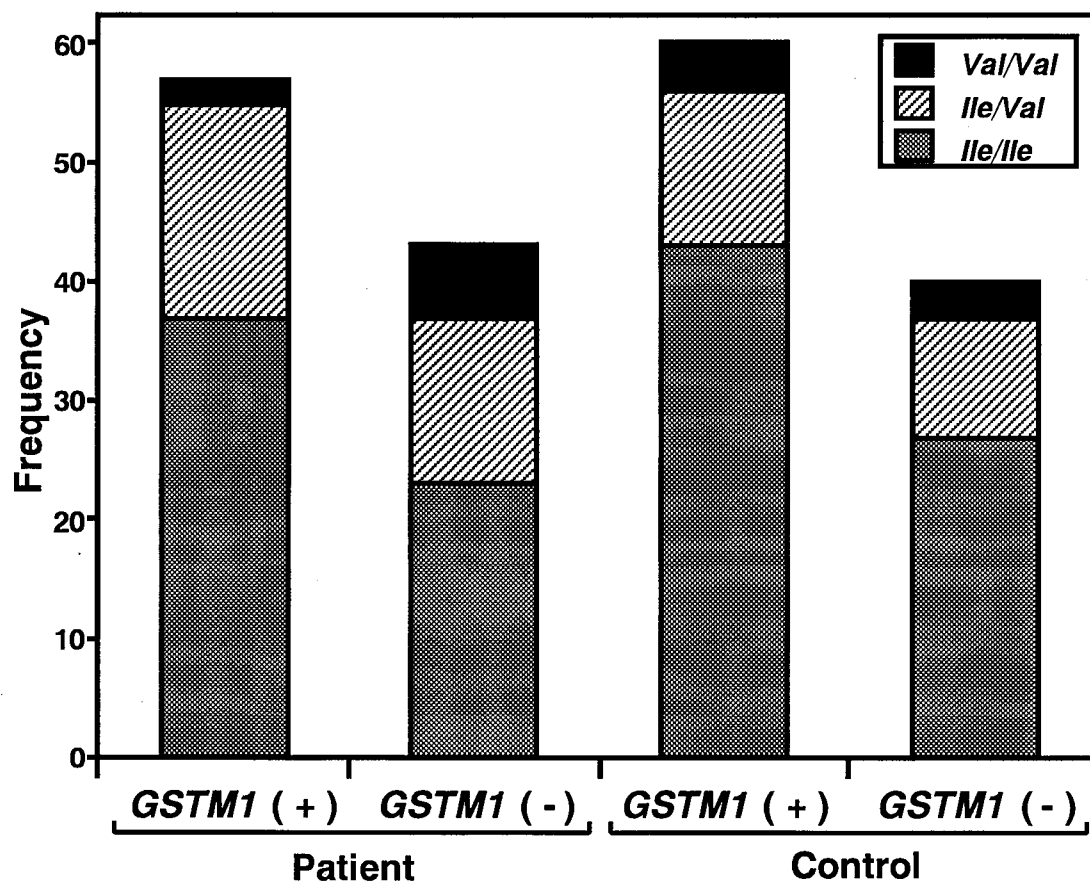


图9 *GSTM1* (+/-) · *CYP1A1* Ile/Val 多型分布

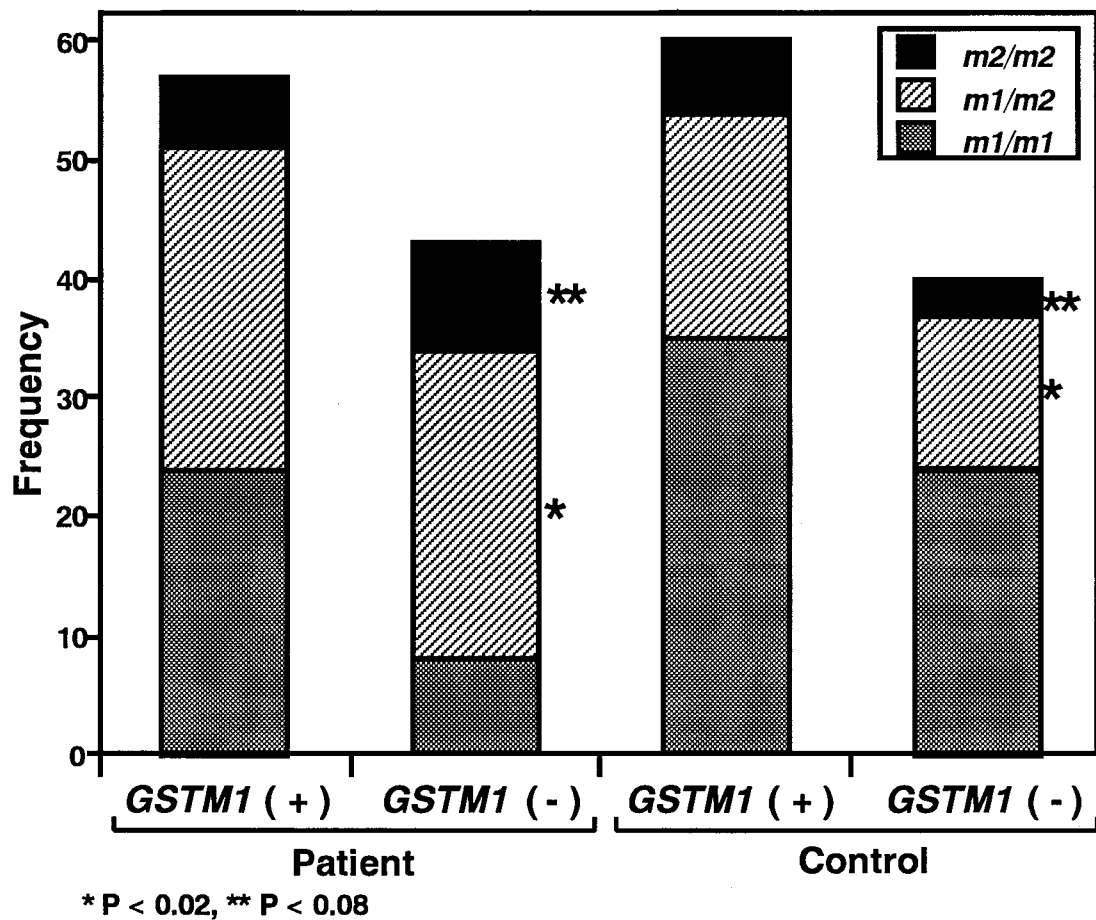


图 10 *GSTM1* (+/-) · *CYP1A1* *MspI* 多型分布

(3) 喫煙について

1) タバコを吸いますか。

- 1, 吸ったことがない
- 2, 現在タバコをやめている
- 3, 吸っている

上記の1)の2あるいは3に○をつけた人は、下記の2)から5)の質問に答えて下さい。

2) 吸い始めた年齢はいくつですか。

()才から

3) 現在一日に平均何本吸っていますか(禁煙している人は吸っていたときの本数を記入して下さい)。

()本/日

4) 過去の喫煙本数について、各年代別に記入して下さい(現在40才代の方は<ア>、<イ>について、現在50才以降の方はア)以降それぞれ記入して下さい)。

<ア> 20才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

<イ> 30才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

<ウ> 40才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

<エ> 50才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

<オ> 60才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

<カ> 70才代は1日平均何本吸っていましたか・・・()本/日

5) 現在も含めて、これまでに1年以上禁煙したことがある人は、何才から何才までかを記入して下さい。2回以上の禁煙についても記入して下さい。

・()才から()才まで

・()才から()才まで

・()才から()才まで

(4) 飲酒について

1) お酒を飲みますか。

- 1, ほとんど飲まない
- 2, 以前は飲んでしたが、今は飲まない
- 3, たまに飲む(月に1~3回程度)
- 4, 週に1~3回
- 5, 週に4~6回
- 6, 毎日飲む

上記の1)の2から6に○をつけた人は、次頁の2)から5)の質問に答えて下さい。

2) お酒を飲み始めたのは何才からですか。

()才から

3) 現在、平均どのくらいの量を飲みますか。毎日飲まない人も飲むときの1日の量について記入して下さい(現在禁酒中の方は飲んでいたときの量を記入して下さい)。

(飲むとき)1日につき

・日本酒・・・()合

・ビール 大・中・小びん(よく飲むサイズに○)・・・()本

大・中・小缶(よく飲むサイズに○)・・・()缶

・ウイスキー ストレート・・・()杯

水割りダブル・・・()杯

水割りシングル・・・()杯

・焼酎 ストレート・・・()合・杯

サワー、酎ハイ、お湯割り・・・()杯

・ワイン・・・グラス()杯

・それ以外・・・()を()杯

4) 過去の飲酒量について、各年代別に記入して下さい(現在40才代の方は<ア>、<イ>について、現在50才以降の方はア)以降それぞれ記入して下さい)。

<ア> 20才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

<イ> 30才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

<ウ> 40才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

<エ> 50才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

<オ> 60才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

<カ> 70才代は飲んでいましたか。

- 1, 当時は飲まなかった
- 2, 当時はたまに
- 3, 当時は毎日飲んだ

飲むときの量は

5) 現在も含めて、これまでに1年以上禁酒したことがある人は、何才から何才までかを記入して下さい。2回以上の禁酒についても記入して下さい。

・()才から()才まで

・()才から()才まで

★ご協力ありがとうございました。

表4 喫煙・飲酒習慣に関する質問表

(第一口腔外科受診患者の生活習慣調査質問表から抜粋)

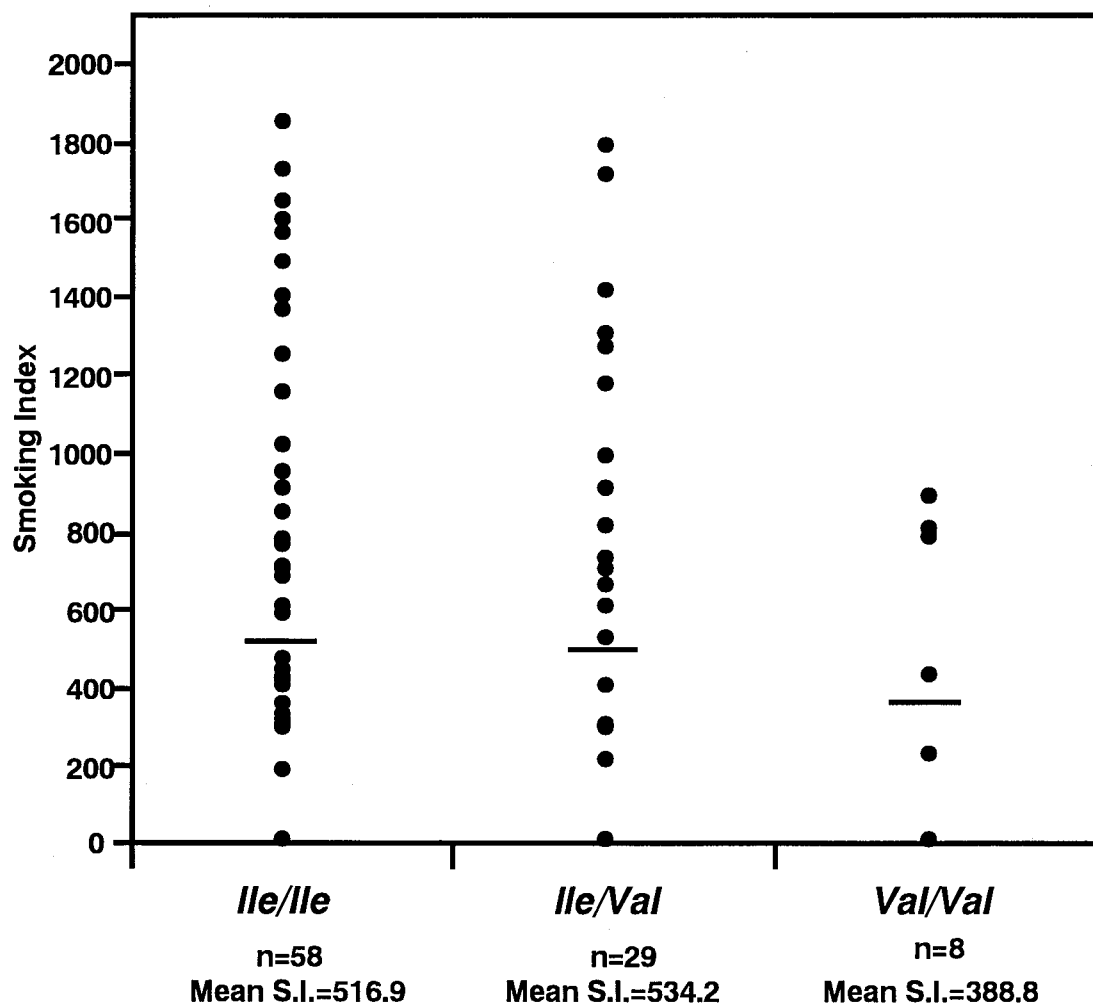


図 1 1 口腔癌患者における *CYP1A1* Ile/Val 多型の各遺伝子型別生涯喫煙量

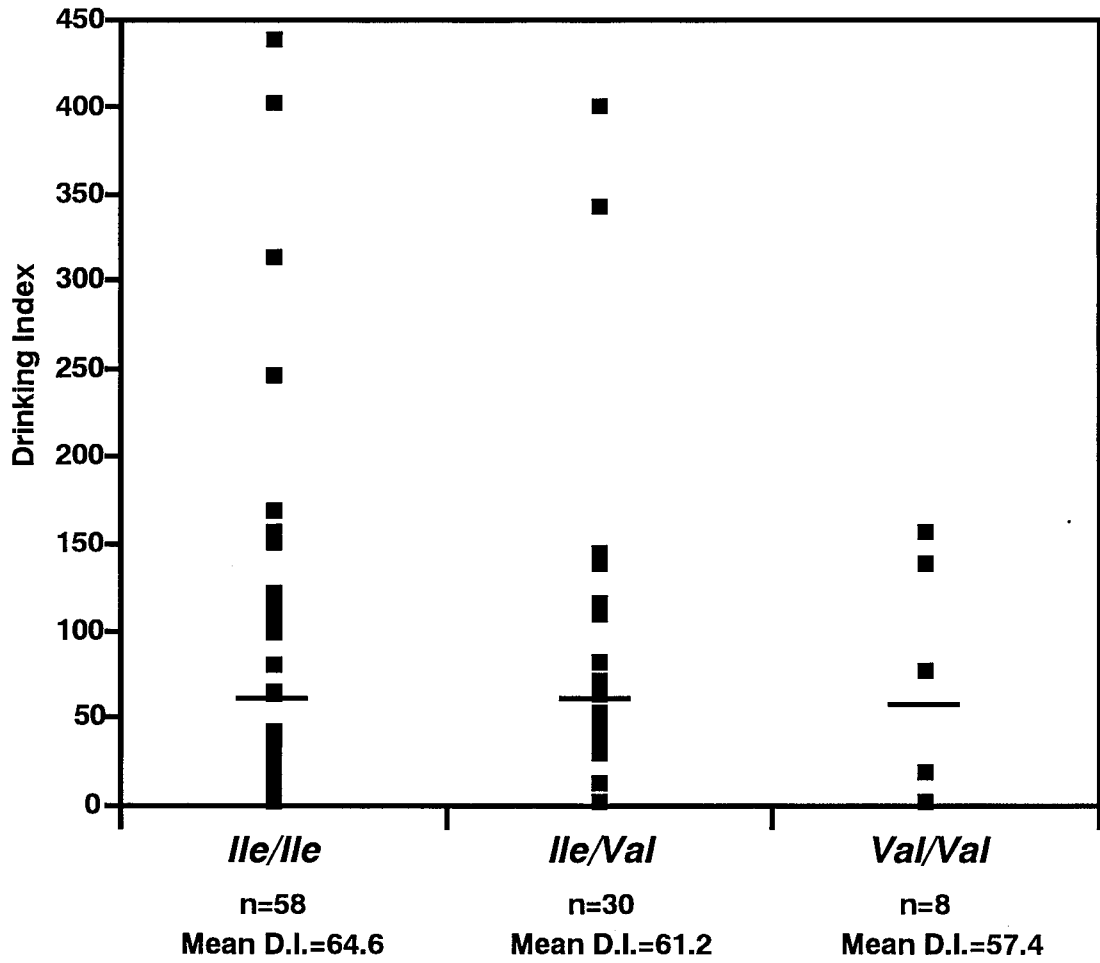
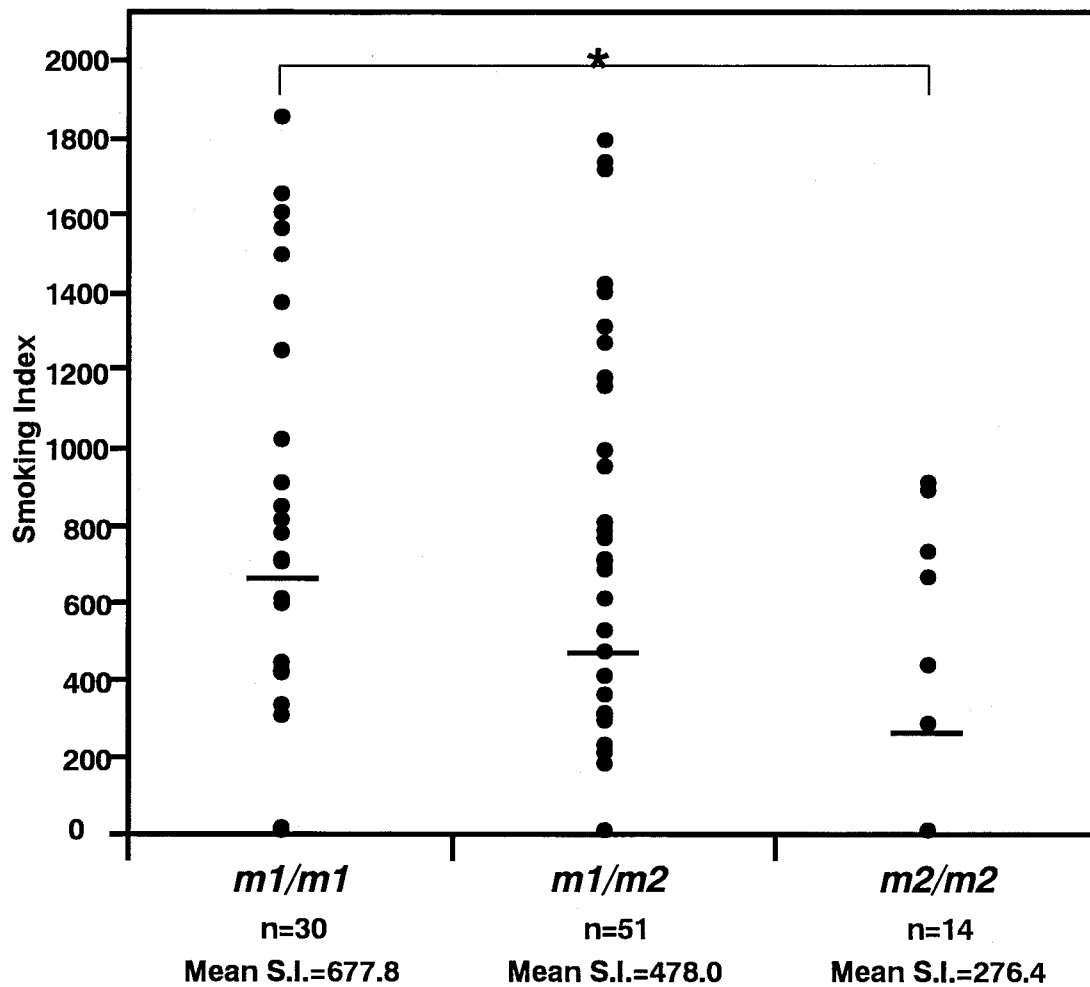


図 1 2 口腔癌患者における *CYP1A1* *Ile/Val* 多型の各遺伝子型別生涯飲酒量



* P < 0.02

図 1 3 口腔癌患者における *CYP1A1 MspI* 多型の各遺伝子型別生涯喫煙量

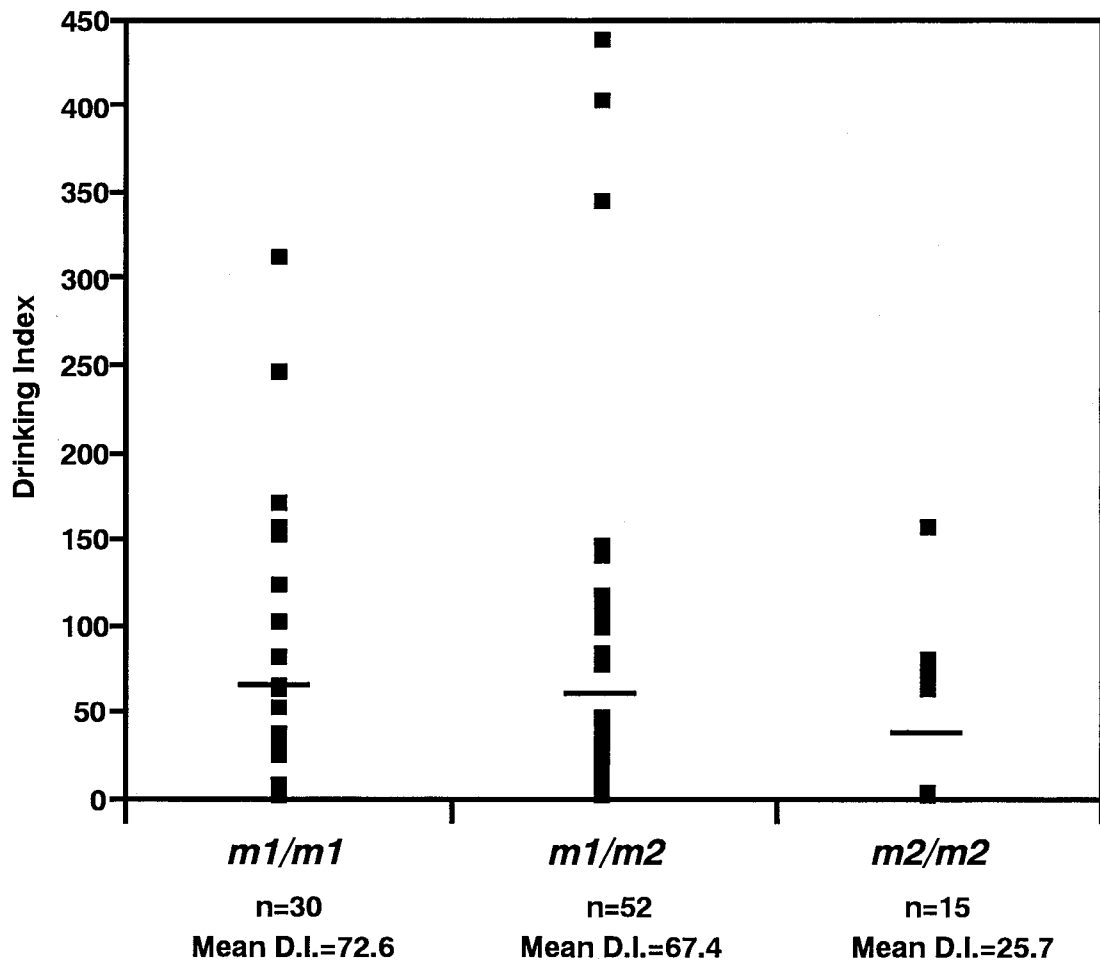


図 1 4 口腔癌患者における *CYP1A1* Ile/Val 多型の各遺伝子型別生涯飲酒量

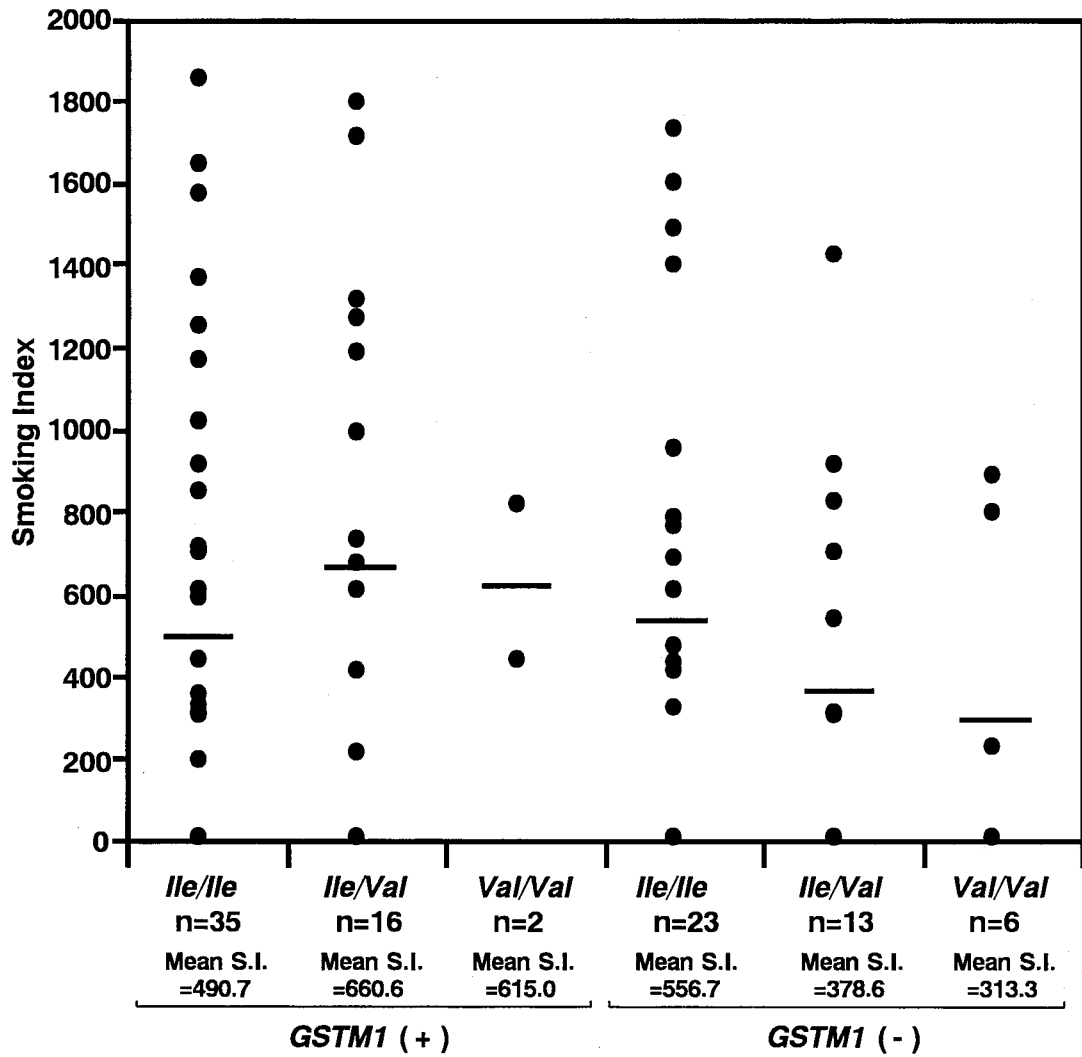


図 1 5 口腔癌患者における *GSTM1* (+/-)・*CYP1A1* *Ile/Val* 多型の各遺伝子型別の生涯喫煙量

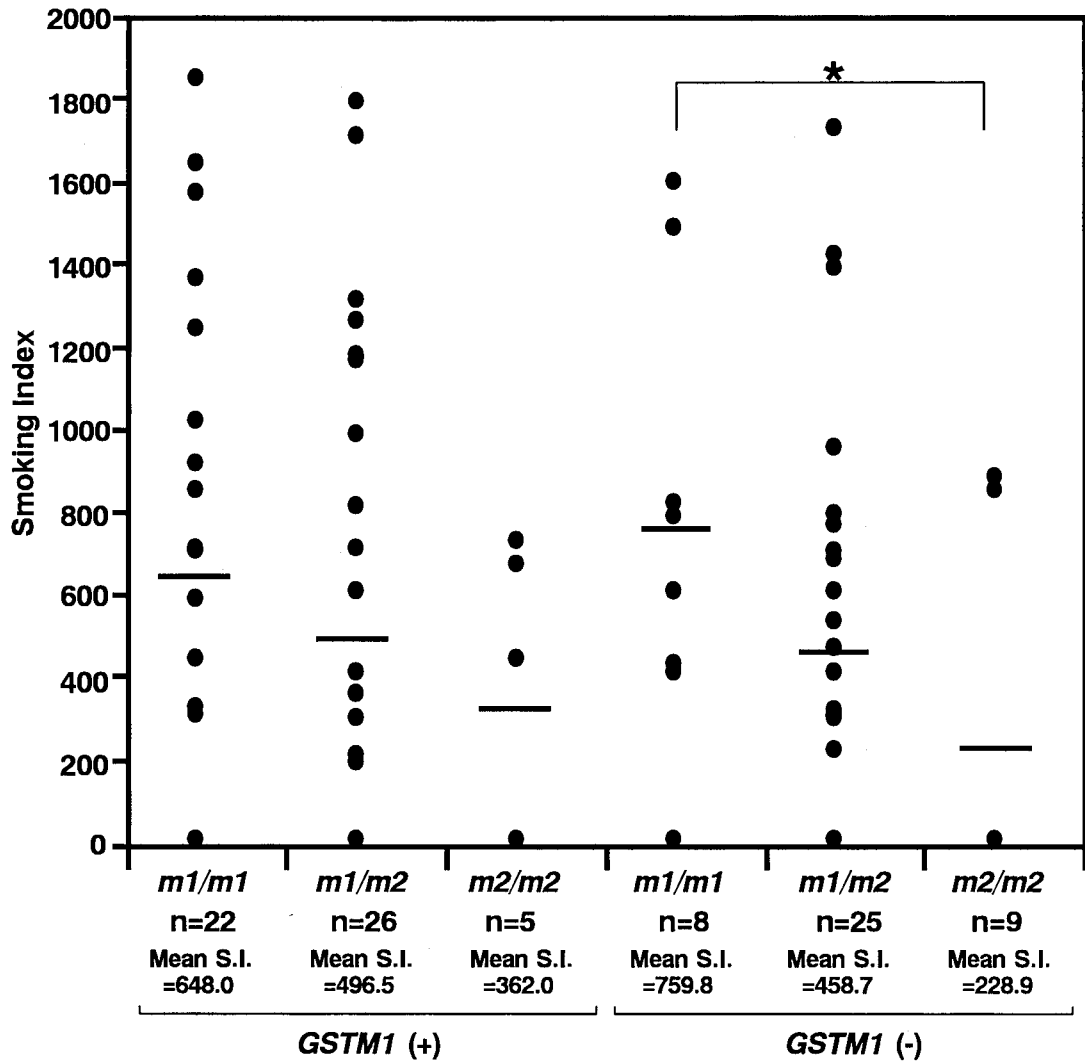


図 1 6 口腔癌患者における *GSTM1* (+/-)・*CYP1A1 MspI* 多型の各遺伝子型別の生涯喫煙量

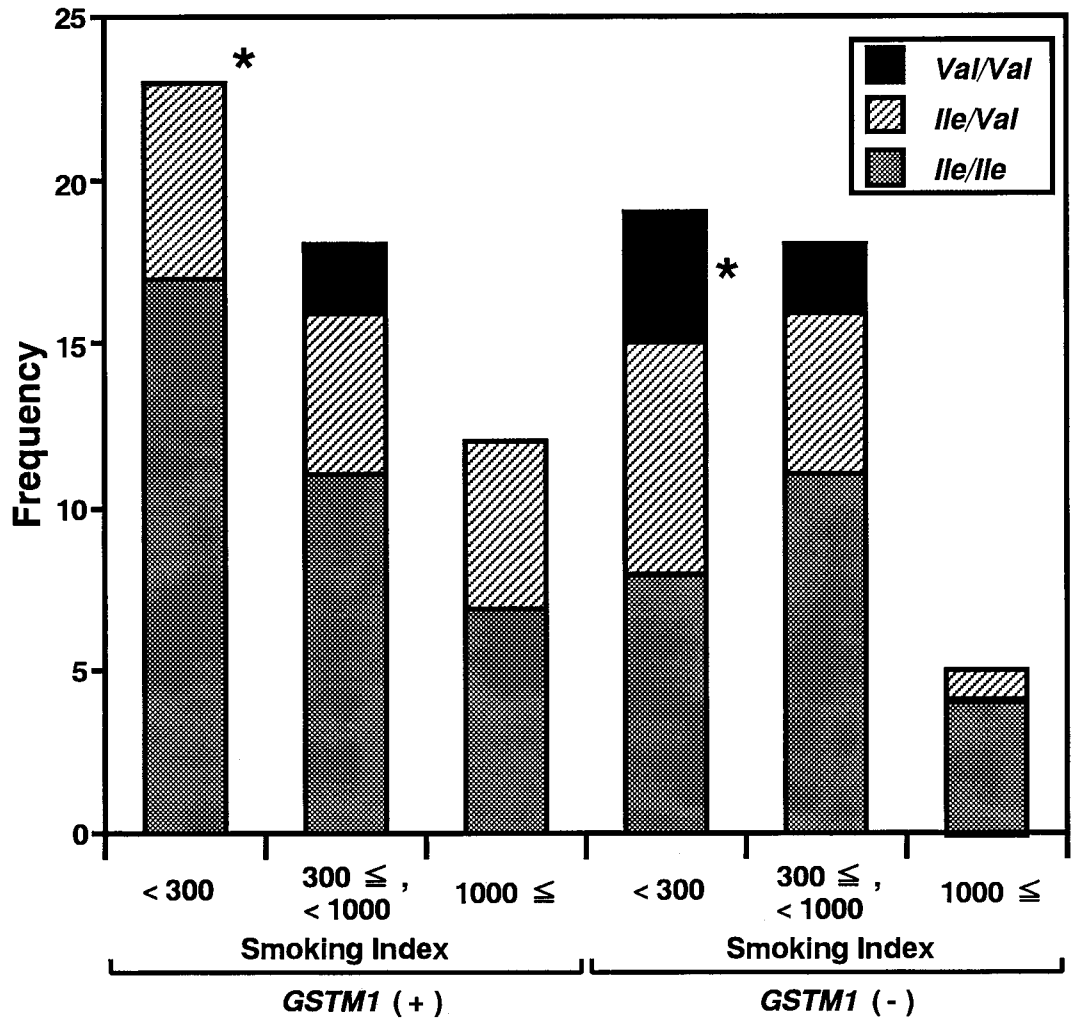


図 1 7 口腔癌患者における生涯喫煙量別の
GSTM1 (+/-)・*CYP1A1* *Ile/Val* 多型分布

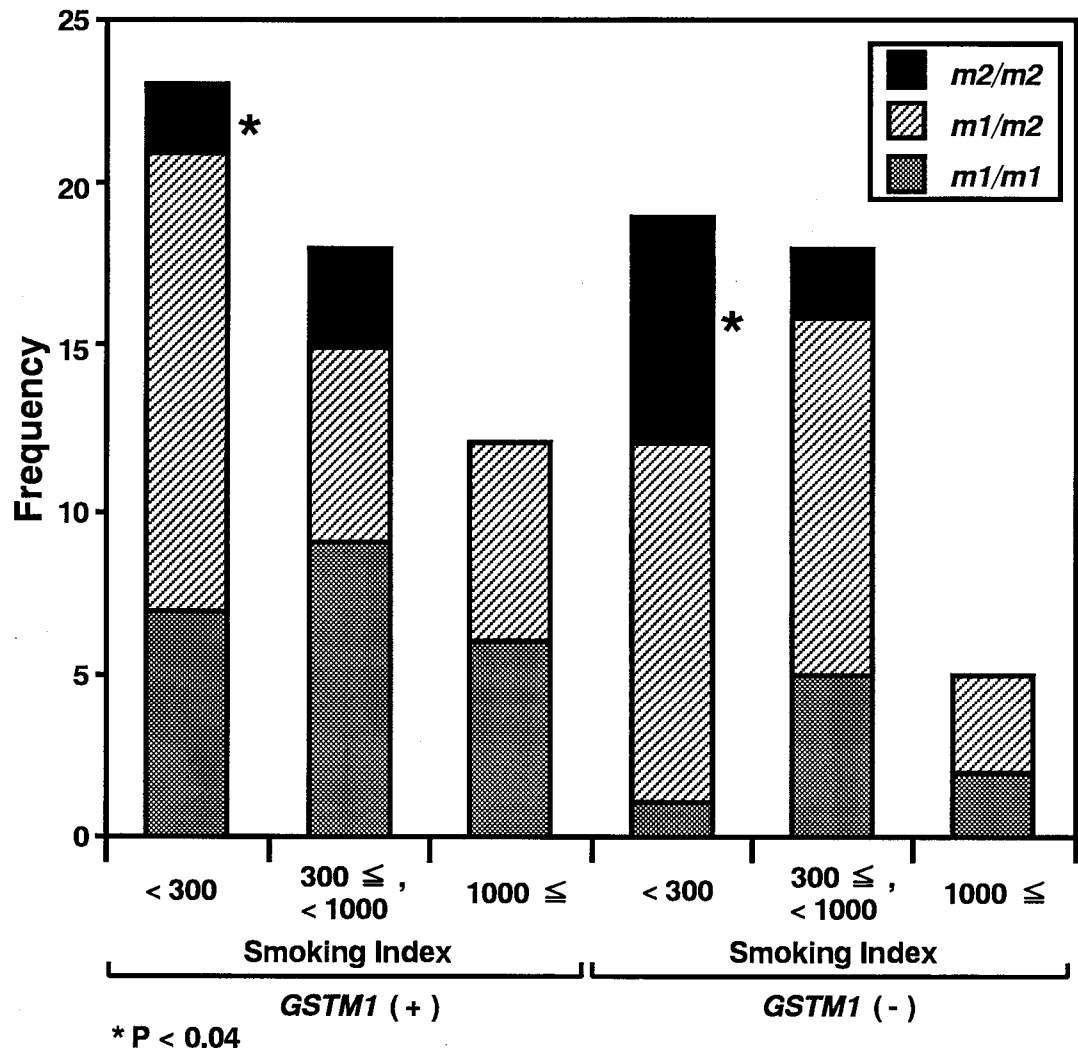


図 1 8 口腔癌患者における生涯喫煙量別の
GSTM1 (+/-)・CYP1A1 MspI 多型分布

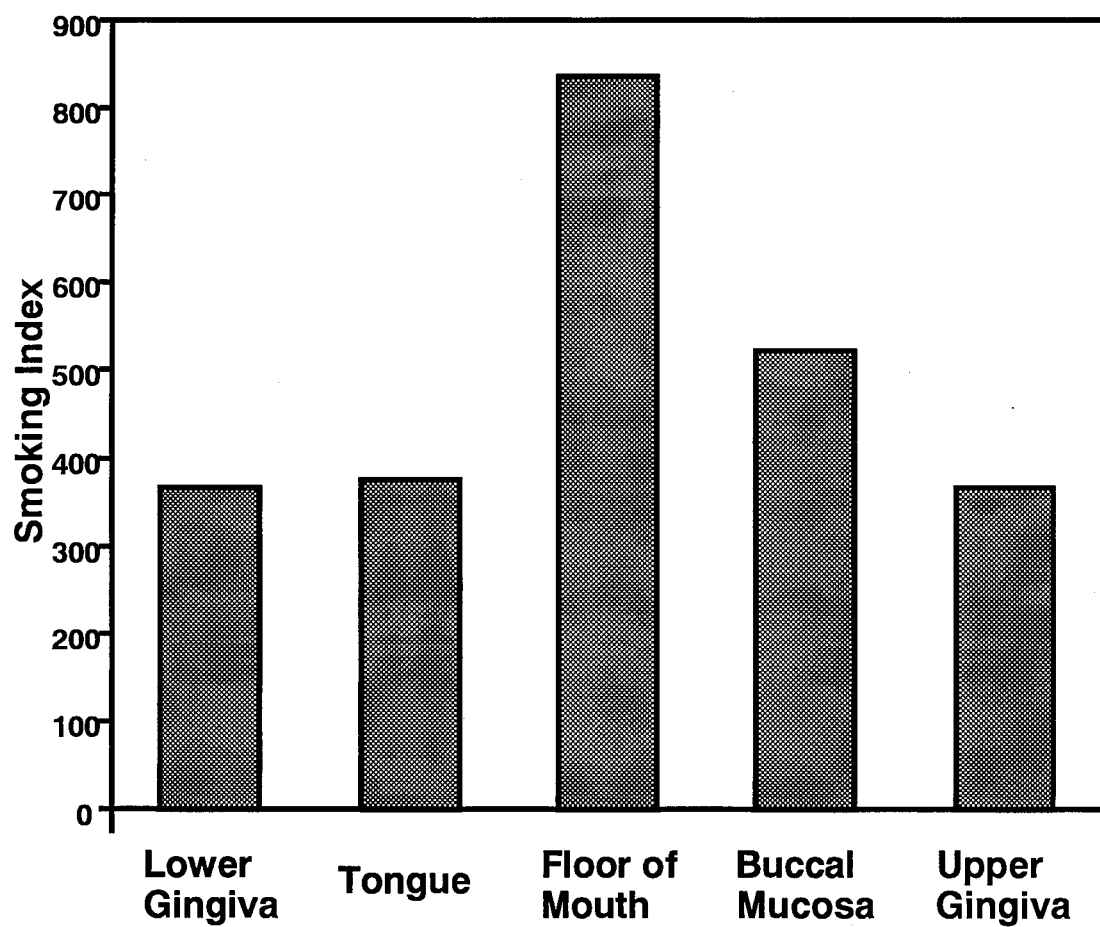


図 1 9 口腔癌原発部位別の平均生涯喫煙量

	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Val/Val</i>	Total
Lower Gingiva	21 (70.0)	6 (20.0)	3 (10.0)	30
Odds Ratios	1.0	0.9	1.7	
Tongue	19 (65.5)	9 (31.0)	1 (3.5)	29
Odds Ratios	1.0	1.6	0.6	
Floor of Mouth	12 (57.1)	8 (38.1)	1 (4.8)	21
Odds Ratios	1.0	2.2	1.0	
Buccal Mucosa	4 (36.4)	6 (54.5)	1 (9.1)	11
Odds Ratios	1.0	4.9	3.0	
Upper Gingiva	4 (44.5)	3 (33.3)	2 (22.2)	9
Odds Ratios	1.0	2.5	6.0	
Control	72 (72.0)	22 (22.0)	6 (6.0)	100

表5 口腔癌原発部位別の *CYP1A1 Ile/Val* 多型分布

	<i>m1/m1</i>	<i>m1/m2</i>	<i>m2/m2</i>	Total
Lower Gingiva	10 (33.3)	<u>17 (56.7)</u> *	3 (10.0)	30
Odds Ratios	1.0	3.2	2.3	
Tongue	9 (31.0)	<u>16 (55.2)</u> **	4 (13.8)	29
Odds Ratios	1.0	3.3	3.3	
Floor of Mouth	11 (52.4)	10 (47.6)	0 (0.0)	21
Odds Ratios	1.0	1.7	-	
Buccal Mucosa	1 (9.1)	4 (36.4)	<u>6 (54.5)</u> ****	11
Odds Ratios	1.0	7.5	45.0	
Upper Gingiva	1 (11.1)	<u>6 (66.7)</u> ***	2 (22.2)	9
Odds Ratios	1.0	11.3	15.0	
Control	60 (60.0)	<u>32 (32.0)</u> *	<u>8 (8.0)</u> *	100

* P < 0.02, ** P < 0.03, *** P < 0.05, **** P < 0.005

表6 口腔癌原発部位別の *CYP1A1 MspI* 多型分布