

喉頭癌の化学発癌感受性と *EPHX1* 遺伝子、*CYP* 遺伝子、*GST* 遺伝子多型との関連

中井 茂*¹ 信原 健二*² 大西 弘剛*¹ 島田 剛敏*¹ 四ノ宮 隆*¹
栢野 香里*³ 上田 大*¹ 中野 宏*¹ 丁 剛*⁴ 久 育男*¹

要約

喉頭癌は、肺癌と組織学的に類似した発生母地を持ち、同様に喫煙習慣との関連が疫学的に認められている。肺癌では、煙草煙内に含まれる発癌物質、芳香族炭化水素（ベンゾピレンなど）に対する数種の代謝酵素活性と発癌感受性との関連が報告されており、喉頭癌についても同様の関連を認めるか検討を行った。関係する多数の代謝酵素のうち P450、GST、mEH に注目し、各々を code する遺伝子 *CYP1A1*、*GSTM1*、*GSTT1*、*EPHX1* (exon 3, exon 4) の遺伝子多型について検討した。*CYP1A1* 遺伝子 exon 7 の多型は *Ile/Ile* 型を多く認め、肺癌患者で多いとされる *Val/Val* 型は健常人で 4.5%、喉頭癌患者でも 4.8% と少数であった。*GST* 遺伝子 (*M1*、*T1*) 多型の分布は両群で違いを認めなかった。喉頭癌患者では、*EPHX1* 遺伝子の exon 3 の 2 対のアレルが *Tyr* から *His* に置換された酵素活性が最も低い変異型ホモを有意に多く認めたが (χ^2 検定 = 0.0025)、exon 4 の多型は分布に有意な差を認めなかった。*EPHX1* 遺伝子の exon 3 に変異が生じ *His* に置換されると mEH の酵素活性が低下することが知られており、*EPHX1* 遺伝子型が喉頭癌の発癌感受性を規定する一因である可能性が示された。

はじめに

頭頸部癌の約 30% を占める喉頭癌は、喫煙習慣との関連が報告されている。煙草煙中の発癌物質の代謝は、第一相の薬物代謝酵素である cytochrome P450 (P450) による活性化反応と、glutathione-S-transferase (GST) や microsomal epoxide hydrolase (mEH) に代表される phase II のさまざまな転写酵素による解毒反応により構成されており、この代謝のバランスが発癌感受性の個人差を規定していると推測されている。

煙草煙中に含まれるさまざまな発癌物質のうち、最も重要な一つとされるベンゾピレンなどの芳香族炭化水素は、体内に入ると P450 などの作用を受け、極めて発癌性の高いエポキシドとなる。エポキシドは、GST によるグルタチオン抱合や、mEH によりジヒドロジオール（グリコール）へ変化し、解毒排泄経路へ進み生体が防御される。これらの代謝酵素を code する遺伝子には遺伝的な多型の存在が知られており、その遺伝子型に応じて発現する酵素活性にも差があることが明らかにされてきた。

ヒトの P450 については現在までのところ 13 種のファミリーが同定されているが、これらのうちで *CYP1A*、*CYP2*、*CYP3* などの特定の P450 種が化学発癌物質の活性化代謝に関与している。*CYP1A1* は、人においては extrahepatic に発現しており、ベンゾピレン代謝において主に中間代謝体である 7,8-ジヒドロキシ-7,8-ジヒドロベンゾピレ

* 1 京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室
* 2 済生会滋賀県病院耳鼻咽喉科
* 3 洛和会丸太町病院耳鼻咽喉科
* 4 京都第二赤十字病院耳鼻咽喉科

ンからの代謝に関与している¹⁾。ヒト *CYP1A1* 遺伝子は、exon 7 codon462における point mutation (A→G : *Ile*→*Val*) が知られており、肺癌の研究では2対のアレルがともに *Val* に変化した *Val/Val* 型の頻度が健常人に比較して有意に多いと報告されている²⁾。*Val* 型の *CYP1A1* の方が *Ile* 型よりも高いベンゾピレン活性化能を持つことから、エポキシドの蓄積など代謝解毒機構のバランスに変化が生じ、肺癌発症の危険が増すのではないかと考えられている。

GSTは *a*、*μ*、*π*、*σ*、*θ* の5つのクラスが知られている。*μ* クラスのうち最も一般的に発現している酵素は *GSTM1* であるが、*GSTM1* 遺伝子の2対のアレルがともに欠失した多型の場合は、酵素の発現がまったく認められない。また、アレルの異型として *M1a*、*M1b* の存在が知られているが、酵素反応、酵素活性は極めて類似している。*GSTM1* は、ベンゾピレンをはじめとして、さまざまな発癌物質の解毒反応に関与しており、*GSTM1* の遺伝子多型が喉頭癌発症に関与している可能性がある。*GSTT1* は *θ* クラスでの代表的な酵素であるが、*GSTM1* と同様に遺伝子が欠失した多型の存在が知られており、発癌リスクに関与している可能性があると考えられている。

mEHをコードする *EPHX1* 遺伝子には2種類の多型が知られており、mEHの酵素活性を規定している。exon 3 codon113における point mutation (T→C : *Tyr*→*His*) を持つ場合mEHの酵素活性が低下し(約50%低下)、exon 4 codon139における point mutation (A→G : *His*→*Arg*) を持つ場合は逆にmEHの酵素活性が亢進し(約25%上昇)、ともに変異を持つ場合には酵素活性はほぼ正常型と同じであるとされている³⁾。この酵素活性の変化は、mEH蛋白の安定性の変化が理由と考えられている。mEHは、肝臓だけでなく上気道でも高頻度に発現しており、煙草煙による喉頭癌の発症に何らかの関与をしている可能性が推測される。

これらの遺伝的に規定される解毒代謝酵素の遺伝子型を検討することで、喉頭癌を発症する危険性の高いグループを明らかにできれば予防医学に応用できると考え、以下の検討を行った。

実験方法

対象は、ほぼ同様の喫煙歴を持つ喉頭癌患者62例、健常人44例とした。上記の代謝酵素をcodeする *CYP1A1*、*GSTM1*、*GSTT1*、*EPHX1* exon 3、*EPHX1* exon 4の遺伝子型を決定するため、末梢血からDNAを抽出しPCR-RFLP法、PCR法を用いて検討した。これらの結果から *CYP1A1*、*GSTM1*、*GSTT1*、*EPHX1* 遺伝子多型との組み合わせと喉頭癌発症の関連を検討した。

① *CYP1A1* 遺伝子多型

CYP1A1 exon 7 codon462における point mutation (A→G : *Ile*→*Val*) を検討するため、*CYP1A1* 遺伝子 codon462を含む領域をPCRにより増幅し、得られたPCR産物を制限酵素 *Psp1406I* にて処理した (PCR-RFLP法)。制限酵素で処理したPCR産物を電気泳動法で観察し、得られたbandのサイズから *CYP1A1* 遺伝子型を決定した。即ち、正常型ホモ (*Ile/Ile*型)、ヘテロ (*Ile/Val*型)、変異型ホモ (*Val/Val*型) に分類した。

② *GSTM1* *GSTT1* 遺伝子多型

GSTM1、*GSTT1* 遺伝子の欠失について、PCRを用いて検討した。PCR産物を電気泳動法で観察し、bandが得られないものを欠失型とした。内在性のコントロールとして、PCR反応時にアルブミン遺伝子をPCR法で同時に増幅した⁴⁾。

③ *EPHX1* 遺伝子多型

EPHX1 遺伝子 exon 3 codon 113における point mutation (T→C : *Tyr*→*His*)、exon 4 codon139における point mutation (A→G : *His*→*Arg*) について検討した。exon 3 codon113を含む領域をPCRにより増幅し、得られたPCR産物を制限酵素 *EcoRV* にて処理した。また、別反応で exon 4 codon139を含む領域をPCRにより増幅し、得られたPCR産物を制限酵素 *Afa I* にて処理した (PCR-RFLP法)。以上から exon 3について正常型ホモ (*Tyr/Tyr*型)、ヘテロ (*Tyr/His*型)、変異型ホモ (*His/His*型) に、exon 4に関しては正常型

ホモ (*His/His*型)、ヘテロ (*His/Arg*型)、変異型ホモ (*Arg/Arg*型) に分類した。

結果

① *CYP1A1* 遺伝子多型 (表1)

健常人 (44例) では *Ile/Ile* 型 56.9%、*Ile/Val* 型 38.6%、*Val/Val* 型 4.5%、喉頭癌 (62例) では *Ile/Ile* 型 53.3%、*Ile/Val* 型 41.9%、*Val/Val* 型 4.8% と両群の間に有意差を認めなかった。2対のアレルがともに *Val* に変異した型は、両群において極めて頻度が低かった。

② *GST* 遺伝子多型 (表2)

健常人 (44例) においては、少なくとも1つのアレルには正常な *GSTM1* 遺伝子を持つ *GSTM1* (+) は 47.7%、2つのアレルとも欠失した *GSTM1* (-) は 52.3% であった。喉頭癌 (55例) では *GSTM1* (+) は 54.5%、*GSTM1* (-) は

表1 *CYP1A1* 遺伝子多型の結果

	正常型ホモ <i>Ile/Ile</i>	ヘテロ <i>Ile/Val</i>	変異型ホモ <i>Val/Val</i>
健常人 (n=44)	25 (56.9%)	17 (38.6%)	2 (4.5%)
喉頭癌 (n=62)	33 (53.3%)	26 (41.9%)	3 (4.8%)

表2 *GST* 遺伝子多型の結果

	<i>GSTM1</i> (+)	<i>GSTM1</i> (-)
健常人 (n=44)	21 (47.7%)	23 (52.3%)
喉頭癌 (n=55)	30 (54.5%)	25 (45.5%)

	<i>GSTT1</i> (+)	<i>GSTT1</i> (-)
健常人 (n=44)	21 (47.7%)	23 (52.3%)
喉頭癌 (n=55)	32 (58.2%)	23 (41.8%)

表3 *EPHX1* 遺伝子多型の結果

exon 3 遺伝子多型	正常型ホモ <i>Try/Try</i>	ヘテロ <i>Try/His</i>	変異型ホモ <i>His/His</i>
健常人 (n=44)	16 (36.4%)	15 (34.1%)	13 (29.5%)
喉頭癌 (n=55)	18 (32.7%)	4 (7.3%)*	33 (60.0%)**

exon 4 遺伝子多型	正常型ホモ <i>His/His</i>	ヘテロ <i>His/Arg</i>	変異型ホモ <i>Arg/Arg</i>
健常人 (n=44)	33 (75.0%)	10 (22.7%)	1 (2.3%)
喉頭癌 (n=55)	32 (58.2%)	22 (40.0%)	1 (1.8%)

χ^2 検定 * p=0.0008, ** p=0.0025

45.5% であった。*GSTT1* 遺伝子の結果は健常人で *GSTT1* (+) は 47.7%、*GSTT1* (-) は 52.3%、喉頭癌では *GSTT1* (+) は 58.2%、*GSTT1* (-) 41.8% であった。*GSTM1* 遺伝子、*GSTT1* 遺伝子の欠失は両群で高頻度に認め、その頻度に有意差を認めなかった。また、*GSTM1* 遺伝子、*GSTT1* 遺伝子の多型を組み合わせで検討した結果でも両群間に有意な関係を認めなかった。

③ *EPHX1* 遺伝子多型 (表3)

exon 3 に関する多型の結果は、健常人 (44例) では3種の遺伝子型をほぼ均等に認めたが、ヘテロである *Tyr/His* 型は健常人で15例 (34.1%)、喉頭癌 (55例) では4例 (7.3%) と有意差を持って喉頭癌で少なく (χ^2 検定 = 0.0008)、変異型ホモの *His/His* 型は健常人で13例 (29.5%)、喉頭癌では33例 (60.0%) と喉頭癌で有意差を持って多く認めた (χ^2 検定 = 0.0025)。

exon 4 に関する多型の結果は、*His/His* 型の正常型ホモが両群とも多数を占め、次にヘテロの *His/Arg* 型を多く認めた。*Arg/Arg* 型の変異型ホモは健常人で2.3%、喉頭癌で1.8%と極めて少ない頻度であった。多型の頻度について両群間に有意差を認めなかった。

考察

CYP1A1 遺伝子多型は、両群とも正常型ホモの *Ile/Ile* 型が最も多く、次に *Ile/Val* 型を高頻度に認め、変異型ホモである *Val/Val* 型は明らかに低頻度であった。肺扁平上皮癌での研究では、*Val/Val* 型の *CYP1A1* 遺伝子多型を持つものが健常人の約2倍以上認め、統計的に有意差があったとの報告も見られる²⁾。また、川尻¹⁾ は、*Val/Val* 型の遺伝子多型を持つものは他の型を持つものより喫煙による肺癌発生の危険が高く、少ない生涯喫煙本数で発癌する傾向があると述べている。

今回の検討では喉頭癌グループでは *Val/Val* 型が4.8%、健常人では4.5%と差を認めなかった。また *Val/Val* 型を示した症例が少なく、生涯喫煙本数との関連は十分に行えなかった。喉頭癌の発症は肺癌との病理学的、疫学的類似性を考えると

ベンツピレンなどの芳香族炭化水素の代謝解毒の関与が大きいと考えられ、*Val/Val*型の頻度は低いものの今後さらに症例数を増やし検討を加える必要があると思われる。

*GST*遺伝子多型の結果は、従来の報告と同様に *GSTM1*、*GSTT1* 遺伝子とも健常人、喉頭癌に欠失型を約半数認め、有意な差はなかった。煙草煙中に含まれるベンツピレンは体内に吸収され、まず薬剤代謝第一相でP450などで活性化され、DNAの障害性が非常に高い中間代謝物質 diol epoxides に変化する。次に、薬剤代謝第二相の *GST* によりグルタチオン抱合体となって不活性化され、解毒排泄される。肺癌では、酵素活性の高いP450を code する酵素活性の高い *Val/Val* 型を持ち *GSTM1* 遺伝子を欠失した場合 diol epoxides の合成能が高く、排泄能が低いため喫煙に対して最も高い発癌リスクを持ち、*Ile/Val* 型を持ち *GSTM1* 遺伝子を欠失した場合も、*Ile/Ile* 型を持ち *GSTM1* 遺伝子を持つ場合と比較して発癌リスクが高いと報告されている^{2) 5) 6)}。今回の検討では *Val/Val* 型を示す症例が少なく、*GST* 遺伝子多型と組み合わせた十分な検討は行えなかったが、*GSTM1*、*GSTT1* 遺伝子多型と喉頭癌発症と直接の関連は認めず、*Ile/Ile* 型、*Ile/Val* 型と *GSTM1*、*GSTT1* 遺伝子多型と組み合わせた検討でも関連は認めなかった。

EPHX1 遺伝子多型の結果は以下であった。exon 3 に関する多型に関して検討すると、健常人と比較して喉頭癌では *Tyr/His* 型が少なく、酵素活性が最も低い変異型ホモである *His/His* 型が明らかに多くなっていることがわかった。exon 4 に関する多型では、mEH の活性が亢進している *Arg/Arg* 型の変異型ホモの頻度は両群とも極めて低く、単独では喉頭癌易発症性の指標とはならないと考えられた。exon 3 に *His/His* 型を持つ場合、発現する mEH の活性は最も低下していると考えられ、発癌物質の代謝経路の変化が生じ、排泄能の低下から発癌性の高いエポキシドの体内での蓄積が生じ喉頭癌発症に関与している可能性が示唆された。

健常人、喉頭癌について exon 3、exon 4 遺伝子多型の両方を考慮し発現する mEH の活性度別に分類してみると、喉頭癌が健常人と比較して低い

表4 mEH酵素活性別の頻度

	正常	fast	slow
健常人 (n=44)	12 (27.3%)	7 (15.9%)	25 (56.8%)
喉頭癌 (n=55)	11 (20.0%)	8 (14.5%)	36 (65.5%)

exon 3 正常型: wt3, exon 3 変異型: mt3

exon 4 正常型: wt4, exon 4 変異型: mt4

・正常: wt3/wt3+wt4/wt4, wt3/mt3+wt4/mt4

・fast: wt3/wt3+wt4/mt4, wt3/wt3+mt4/mt4, wt3/mt3+mt4/mt4

・slow: mt3/mt3+wt4/wt4, mt3/mt3+wt4/mt4, wt3/mt3+wt4/wt4

mEH 活性を表す遺伝子型を多く持つわけではなかった(表4)。Jourenkova-Mironovaら⁷⁾は、exon 3、exon 4 における遺伝子多型の結果では分布に差がなかったものの、遺伝子型から推測される酵素活性は喉頭癌で高い mEH 活性を持つものが多かったと報告している。一方、Smith⁸⁾らの肺癌での検討では、mEH の活性度と関連を認めなかったと報告している。このような遺伝子型による酵素活性の判断は、transcription、translation、post translation 各段階での問題を考えると推測でしかなく、不確定なものである。このことが上記の結果の相違に関与している可能性がある。今後、exon 3 に関する検討で得られた仮説をさらに検証するためには、発症母地である喉頭粘膜や喉頭癌部での mEH mRNA の発現の確認と、発現している mEH 蛋白の酵素活性を検出し判断する必要があると考えられた。

まとめ

- ① *CYP1A1*、*GSTM1*、*GSTT1* 遺伝子多型、*EPHX1* 遺伝子 exon 4 多型と喉頭癌発症には関連が見られなかった。
- ② *EPHX1* 遺伝子の exon 3 codon113 における point mutation (T→C: *Tyr*→*His*) により発癌物質の代謝解毒機構に変化が生じ、喫煙による喉頭癌発症の危険を高める可能性が示された。

[文献]

- 1) 川尻要. 喫煙とP450. 病理と臨床 14(1): 55-61, 1996
- 2) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class Glutathione S-transferase gene. Jpn. J. Cancer Res. 83: 866-870, 1992
- 3) Sims, P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. Nature 252: 326-328, 1974
- 4) Tiemersma EW, Omer RE, Bunschoten A, Veer P, Kok FJ, Idris Mo, Kadaru AMY, Fedail SS, Kampman E. Role of genetic polymorphism of Glutathione-S-Transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. Cancer Epidem Biomar 10: 785-791, 2001
- 5) Goto I, Yoneda S, Yamamoto M, Kawajiri K. prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Res. 56(16): 3725-3730, 1996
- 6) Kihara M, Kihara M, Noda K. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. Carcinogenesis 16(10): 2331-2336, 1995
- 7) Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancer. Cancer Res. 60: 534-536, 2000
- 8) Smith CAD, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. Lancet 350: 630-633, 1997

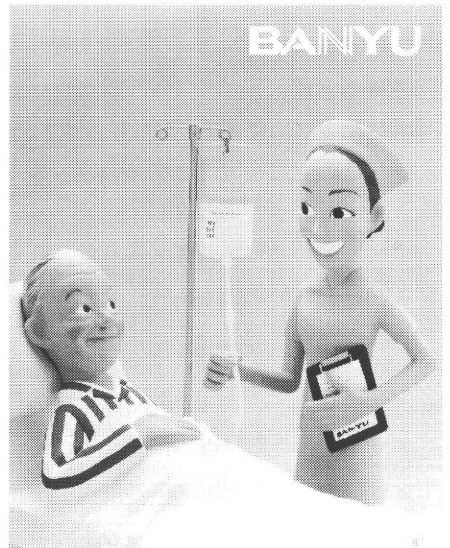
カルバペネム系抗生物質の キット製剤


カルバペネム系抗生物質製剤

チエナム [®]	(キット製剤)	IPM
	(点滴用)	
TIENAM [®]	日抗基・注射用イミベネム (略号:IPM/CS)	イミベネムの略号

指定医薬品・要指示医薬品：注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

[禁忌]、[効能・効果]、[用法・用量]、[使用上の注意] 等
詳細については、製品添付文書をご参照ください。



[資料請求先]
 **万有製薬株式会社**
 〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2-2-3
 ホームページ <http://www.banyu.co.jp/>
 ☎インターネットナンバー：1193(い・い・く・スリー)