

原 著

# ヒト・チトクローム P450 II E1 の DNA 多型と 肺および消化器系の発癌感受性

東北大学抗酸菌病研究所内科・癌化学療法部門

植 松 史 行

## 要 旨

ヒトのチトクローム P450 II E1 (CYP2E) は、N-ニトロソジメチルアミン、ベンゼン、スチレン、四塩化炭素、エチル・カーバメートなど発癌物質の代謝的な活性化に関与している。したがって、P450 II E1 の遺伝子型や表現型のばらつきが、発癌感受性の個体差に影響している可能性がある。制限酵素 Dra I, Rsa I, Msp I および Taq I により、ヒト P450 II E1 遺伝子の制限酵素断片長多型(RFLP)が見いだされた。このうち Dra I による RFLP において、各個体は 2 種類のホモ接合(CC および DD) と 1 種類のヘテロ接合(CD)に分けられる。これらの 3 種類の遺伝子型の分布は、肺癌患者(n=74)と癌の既往歴のない対照(n=73)との間で、有意水準 5% で有意差を示した( $\chi^2=8.60$ , 自由度 2)。同様に、消化器系の癌患者(n=38)と対照(n=73)との間でも、各遺伝子型の分布に有意水準 5% で有意差がみられた( $\chi^2=7.48$ , 自由度 2)。これらのデータは、II E1 遺伝子の Dra I による RFLP が、肺および消化器系におけるヒトの発癌感受性と関連していることを示す。このとき原因は不明であるが、ヘテロ接合である CD の割合が、肺および消化器系の癌患者では、対照に比べて高い傾向がみられた。そこで、ヒト肝組織における II E1 の mRNA レベルでの発現を調べ、RFLP との関係を検索した。すると、有意差は認められないものの、CD の遺伝子型をもつ個体では、II E1 の mRNA レベルにおける発現が多い傾向があった。このことから、Msp I による RFLP が II E1 遺伝子の mRNA レベルにおける発現を通じて酵素活性レベルにおける発現と関連しており、それによって発癌感受性の個体差が生じている可能性が示唆される。P450 II E1 がヒトの発癌において果たす役割を明らかにするため、この RFLP と遺伝子発現との関連をさらに追究する必要がある。

抗研誌 44(2), 129-140, 1992.

## 序 論

近年の研究により、動物を用いた発癌実験の結果と同様に、ヒトでも環境中に含まれる発癌物質が癌の発症に関与している証拠が集まりつつある。それらの発癌物質の多くは、発癌性を示すためには、活性型の反応中間体に生体内で代謝・変換される必要がある。発癌物質のこのような活性化にかかわる主な経路は、チトクローム P450(P450)の酵素群によ

る酸化反応である。P450 は肝において多様な機能をもつ酸化酵素系を構成しており、きわめて多くの内因性および外因性の物質の代謝になっている<sup>1)</sup>。

また一方では、タバコを同じように永年喫いつづけても、肺癌になる人とならない人がいることなどから、さまざまな癌の発症において、環境的な要因のほかに、宿主側の因子の存在が指摘されている。その一つとして、発癌物質の代謝的活性化にかかわる酵素群の遺伝的な多型が考えられている。この多型

受理：平成 4 年 9 月 30 日

連絡先：〒 980 仙台市青葉区星陵町 4-1 東北大学抗酸菌病研究所内科学部門 植松 史行

略語：P450, チトクローム P450; RFLP, restriction fragment length polymorphism; PCR, polymerase chain reaction; AHH, aryl hydrocarbon hydroxylase

は個体間での酵素活性の差をもたらし、それにより、発癌物質が活性型の物質に変換されるとき、その産生能に個体差が生じる可能性がある<sup>2,3)</sup>。マウスを用いた実験では、癌原性芳香族炭化水素の活性化にかかわる aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) の誘導性に系統差があることが知られている<sup>4,5)</sup>。そしてさらに、この誘導性と3-メチルコラントレン(3-MC)投与による癌の発生率の間に、正の相関があることが示されている<sup>6)</sup>。

P450の一つである P450 II E1 (CYP2E)は、ヒトでは肝で構成的に発現されており、またエタノールなどによって誘導される。その他の臓器における発現は、まだ不明の点が多い。P450 II E1 によって酸化される物質には、N-ニトロソジメチルアミン、ベンゼン、スチレン、四塩化炭素、トリクロロメタン、ジクロロメタン、クロロメタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,2-ジクロロプロパン、二塩化エチレン、二臭化エチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、ビニル・カーバメート、エチル・カーバメート、トリクロロエチレンなど、多くの発癌物質や発癌性を示す可能性のある物質が含まれる<sup>7-13)</sup>。したがって、環境中のこれらの物質がヒトの発癌に現実に関与しているとすれば、P450 II E1 の遺伝子型や表現型の個体差が、標的臓器での発癌感受性に影響しているのではないかと考えられる。ヒトの肝における P450 II E1 の mRNA、蛋白質、および酵素活性レベルの発現は、どれも個体によるばらつきが大きいことが示されている<sup>9,10)</sup>。しかし、そのようなばらつきに対する遺伝的な要因の関与は明らかにされていない。

私は、P450 II E1 の DNA レベルでの多型である

制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) をマーカーとして、II E1 の遺伝子型とヒトの発癌感受性との関連を検証しようと試みた。正常人集団を対象とした検索で、制限エンドヌクレアーゼ Dra I<sup>14-16)</sup>、Rsa I<sup>14)</sup> および Msp I<sup>17)</sup> によって II E1 遺伝子の RFLP を見いだした。また Taq I による RFLP が既に報告されており<sup>18)</sup>、これを確認した。このうち Dra I、Rsa I および Taq I による RFLP の分布を、サザン・プロット分析<sup>19)</sup>あるいは PCR (polymerase chain reaction) 法<sup>20-22)</sup> により、癌患者群と対照群で調べ、相互に比較してその結果を検討した。さらに、ヒト肝から抽出した RNA を用いてノーザン・プロット分析を行い、サンプルごとに P450 II E1 の mRNA を定量した。そして mRNA 量と RFLP との関連を調べた。

## 対象と方法

### 使用した制限エンドヌクレアーゼ

RFLP の検索のために使用したエンドヌクレアーゼは、Alu I, Ban II, Dra I, EcoO 109I, Hae III, Hinf I, Mbo I, Msp I, Pst I, Pvu II (以上宝酒造), Ban I, BstN I, EcoN I, HinP I, Rsa I, Sty I および Taq I (以上 New England Biolab 社) である。

### 対象と年齢構成

RFLP の検索は、28 人の正常人を対象として行った。さらに 112 人の癌患者と 73 人の対照(男 50 人、女 23 人、 $\bar{x}=64.2$  歳、 $\sigma=13.7$  歳)において RFLP の分布を調べた。対照は、癌の既往歴がない集団の中

Table 1. Distribution of the genotypes of the Dra I polymorphism at P450 II E1 gene among various populations

Population	Genotype			Total
	CC	CD	DD	
	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	10(13.7)	21(28.8)	42(57.5)	73(100)
Lung cancer (A)	2(2.7)	34(45.9)	38(51.4)	74(100)
Squamous cell carcinoma	0	10	13	23
Small cell carcinoma	0	9	7	16
Large cell carcinoma	0	5	5	10
Adenocarcinoma	2	10	13	25
Cancers of the digestive system (B)	3(7.9)	21(55.3)	14(36.8)	38(100)
Total cancers (A+B)	5(4.5)	55(49.1)	52(46.4)	112(100)

Table 2. Distribution of the Dra I polymorphism at P450 II E1 gene among patients with cancers of the digestive system

Cancer site	Genotype			Total
	CC	CD	DD	
Total	3	21	14	38
Stomach	3	5	3	11
Esophagus	0	5	4	9
Colon and rectum	0	6	3	9
Liver	0	1	2	3
Pancreas	0	2	0	2
Gallbladder	0	1	1	2
Parotid gland	0	1	0	1
Bile duct	0	0	1	1

から選んだ。癌患者は、A群(肺癌患者74人;男66人,女8人, $\bar{x}=66.5$ 歳, $\sigma=8.8$ 歳)とB群(消化器系の癌患者38人;男28人,女10人, $\bar{x}=60.8$ 歳, $\sigma=14.6$ 歳)からなる(表1)。消化器系の癌患者には、胃癌11例,大腸癌9例,食道癌9例などが含まれる(表2)。

#### サザン・プロット分析

ヒトの末梢血(7-10 ml)を, EDTAを入れた試験

管内に採取し,これから白血球 DNA を抽出した。この DNA を1サンプル当たり  $10 \mu\text{g}$  とり, いずれか一種類の制限エンドヌクレアーゼ 20-40 U を加えて完全に消化した。こうして生じた DNA 断片を, 1% アガロース電気泳動によって分離し, ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell 社) にトランスファーした。ヒト P450 II E1 の cDNA である  $\lambda\text{hPD4}^{23)}$  (図1) を, ランダム・プライマー法により [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]-dCTP で標識し,  $68^\circ\text{C}$  で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗いの後, オートラジオグラフィによってバンドを検出した。バンドの大きさは, 制限酵素 Hind III によって消化した  $\lambda\text{DNA}$  をサンプルとともに泳動することにより決定した。

#### PCR 法 (Dra I による RFLP)

Dra I による RFLP の原因部位 (RFLP 部位) と推定される場所 (図1) を含む 950 bp の断片を増幅するため, 最終容量  $100 \mu\text{l}$  で反応を行った(図2)。反応溶液の組成は次のとおりである。白血球 DNA  $2 \mu\text{g}$ , 合成オリゴヌクレオチド・プライマー各  $100 \text{ pmol}$  (Primer 1:  $5'\text{-TGTCGTTTCCTTCCACACAGG-}3'$  および Primer 2:  $5'\text{-TCTGTTGTCAGGCTAGAGTG-}3'$ ), dNTP 各  $200 \mu\text{M}$ , KCl  $50 \text{ mM}$ , Tris-HCl (pH 8.3)  $10 \text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $1.5 \text{ mM}$ , ゼラチン  $0.01\%$ , AmpliTaq (Perkin-Elmer Cetus 社)  $2.5 \text{ U}$ , Perfect Match polymerase enhancer (Stratagene 社)  $1 \text{ U}$ 。Ampli Taq と Perfect

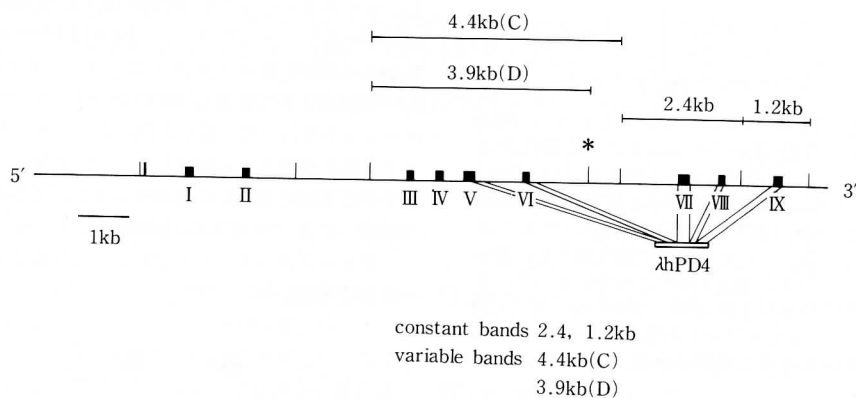


図1. ヒト P450 II E1 (CYP2E1) 遺伝子の Dra I による制限地図を示す。黒の長方形はエクソンを, その間の領域はイントロンを表す。縦線は Dra I による切断部位である。用いた cDNA プロブ  $\lambda\text{hPD4}$  は, 図の下方に示すように, ヒト P450 II E1 遺伝子エクソン部分の 3' 側,  $1.0 \text{ kb}$  の配列を含む。図の上方の 4 本の DNA 断片は, サザン・プロット分析で検出されたバンドに対応する。\*印は, 推定された RFLP 部位を示す。

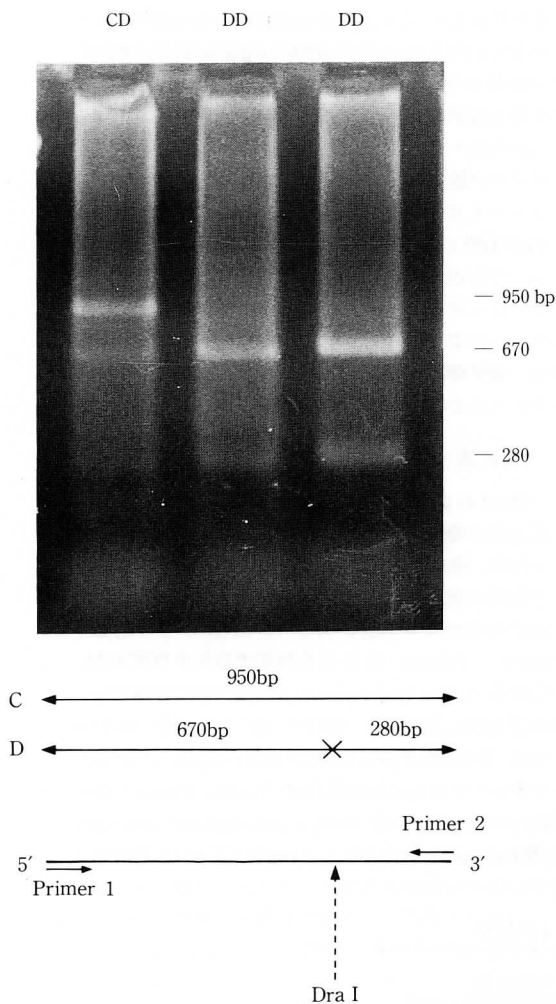


図2. PCR法によって検出したヒトP450 II E1遺伝子のDra IによるRFLPを示す。増幅されるDNA断片は、Dra IによるRFLP部位と推定された位置(図1の\*)を含む950 bpの配列である。これをDra Iで消化すると、遺伝子上のDra I部位の有無によって、各個体はDD(中および右のレーン)、CD(左のレーン)およびCCの3つの遺伝子型に類別される。

Matchを加える前に、反応溶液を94°Cに5分間置いて解離させ、60°Cで5分間アニーリングを行い、これらを加えてから72°Cで3分間イクステンションを施行した。その後、94°C 1分、60°C 2分、72°C 3分を1サイクルとして30回繰返し、最後のイクステ

ンションの段階は10分に延長した。

得られたPCR産物の10分の1量(10  $\mu$ l)に12 UのDra I(宝酒造)を加えて完全に消化した。これを2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムにより染色した。

#### PCR法(Msp IによるRFLP)

Msp IによるRFLPの原因部位と推定される場所(図3)を含む470 bpの断片を増幅するため、最終容量100  $\mu$ lで反応を行った(図4)。反応溶液の組成は、次のとおりである。白血球DNA 2  $\mu$ g、合成オリゴヌクレオチド各100 pmol (Primer 3: 5'-GTGCTGAACACTGGTACTCT-3') および Primer 4: 5'-CTGACTGGCCTGTTTGATG-3', dNTP各200  $\mu$ M, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, ゼラチン 0.01%, AmpliTaq 2.5 U。94°C 1分、60°C 2分、72°C 3分を1サイクルとして30サイクル行い、最後のイクステンションは10分間施行した。

ここで生じたPCR産物の10分の1量(10  $\mu$ l)に10 UのMsp I(宝酒造)を加え、完全に消化した。これを2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムにより染色した。

#### ノーザン・ブロット分析

剖検の際に得られたヒト肝(17検体)を材料とし、トータルRNAの抽出を行った<sup>24)</sup>。このRNAを、ホルムアルデヒドを含む1%アガロース上で電気泳動し、ニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell社)にトランスファーした<sup>25)</sup>。ヒトP450 II E1のcDNAである $\lambda$ hPD4をランダム・プライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTPで標識し、68°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗いの後、オートラジオグラフィによりバンドを検出した。さらにデンストメトリーによってRNAの定量を行った。同じサンプルを用いて $\beta$ -アクチンのcDNAをプローブとするノーザン・ブロットを行い、これにより各々の値を標準化した。

## 結 果

#### サザン・ブロット分析

Dra Iを用いた検索では<sup>14-16)</sup>、2.4 kbと1.2 kbの恒常的なバンドに加え、4.4 kb(C)または3.9 kb(D)のバンドからなる2対立遺伝子型のRFLPを検出した(図5)。公表されているヒトP450 II E1遺伝子

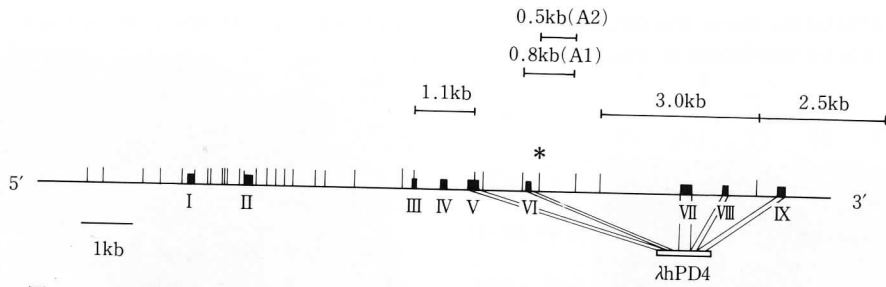


図3. ヒト P450 II E1 遺伝子の Msp I による制限地図を示す. 図の上方に示した 5 本の DNA 断片は, サザン・ハイブリダイゼーションで検出されたバンドに対応する.\*印は, 推定された RFLP 部位を示す.

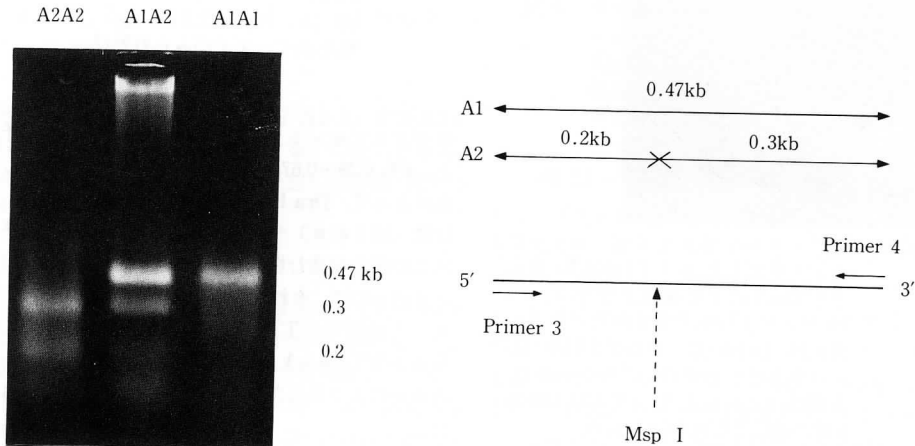


図4. PCR 法によって検出したヒト P450 II E1 遺伝子の Msp I による RFLP を示す. 増幅される DNA 断片は, Msp I による RFLP と推定された位置 (図3の\*)を含む 0.47 kb の配列である. これを Msp I で消化すると, Msp I 切断部位の有無により, 各個体は A1A1, A2A2, A1A2 の 3 種類の遺伝子型にわかる.

の塩基配列<sup>26)</sup>をもとに, Msp I による制限地図を作製し, これによって RFLP 部位をイントロン 6 と推定した (図1).

Rsa I では<sup>14)</sup>, 1.6 kb と 1.2 kb の恒常的なバンドのほか, 3.1 kb (A) または 2.5 kb (B) のバンドからなる 2 対立遺伝子型の RFLP を検出した (図6). その RFLP 部位は, イントロン 2 にあると推定される (図7).

また Msp I では<sup>17)</sup>, 3.0 kb, 2.5 kb および 1.1 kb の恒常的なバンドと, 0.8 kb(A1) または 0.5 kb(A2) のバンドからなる RFLP を検出した (図8). RFLP 部位はイントロン 6 にあると推定される (図3).

さらに Taq I では, 1.4 kb の恒常的に存在するバンドのほか, 3.0 kb (A) あるいは 1.3+1.7 kb (B) という多型を示すバンドがみられた (図9). これは, McBride らの報告<sup>18)</sup> とほぼ一致する. RFLP 部位はイントロン 7 と推定される (図10).

以上の 4 つの制限酵素を除く 13 種類の酵素では, RFLP は検出されなかった.

#### PCR 法 (Dra I と Msp I による RFLP)

制限エンドヌクレアーゼ Dra I により, 0.95 kb または 0.28+0.67 kb という 2 つの対立遺伝子からなる RFLP が検出された (図2). 0.95 kb のバンドは

DraI RFLP of the Human P450II E1 Gene  
Detected by Southern Blotting

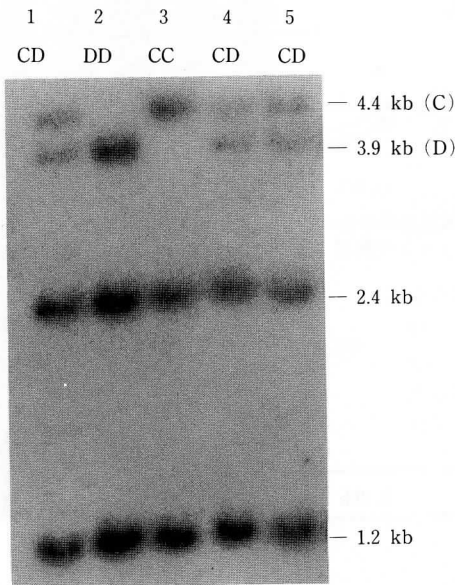


図5. サザン・ハイブリダイゼーションによって検出したヒト P450 II E1 遺伝子の Dra I による RFLP を示す。2.4 kb および 1.2 kb の恒常的なバンドのほかに、4.4 kb (C) および 3.9 kb (D) という多型を示すバンドがみられた。各個体はこれにより、CC, CD, DD の3種の遺伝子型にわけられる。

RsaI RFLP of the Human P450II E1 Gene Detected by Southern Blotting

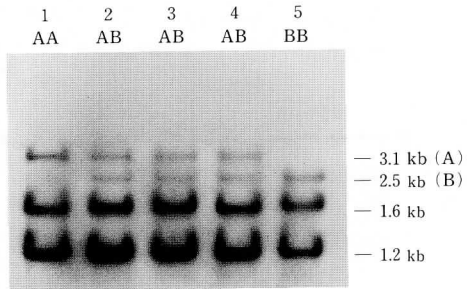


図6. サザン・ハイブリダイゼーションにより検出したヒト P450 II E1 遺伝子の Rsa I による RFLP を示す。1.6 kb, 1.2 kb の恒常的なバンドのほかに、3.1 kb (A) および 2.5 kb (B) という多型を示すバンドがみられた。

サザン・プロット分析で検出された対立遺伝子 C と、また  $0.28+0.67$  kb のバンドは D と一致した。これによって、Dra I による RFLP 部位が、予想した位置 (図1の\*) であることが確かめられた。さらにこの部位を含む塩基配列の決定をジデオキシ法により行った<sup>25)</sup>。それによって、この RFLP はイントロン上の配列が TTTAAA (Dra I の認識配列) であるか TTAAAA (Dra I の認識配列ではない) であるかにより生じたものであることが明らかになった。

Msp I では、0.47 kb または  $0.3+0.2$  kb という2つの対立遺伝子からなる RFLP が検出された<sup>17)</sup> (図4)。0.47 kb のバンドはサザン・ハイブリダイゼー

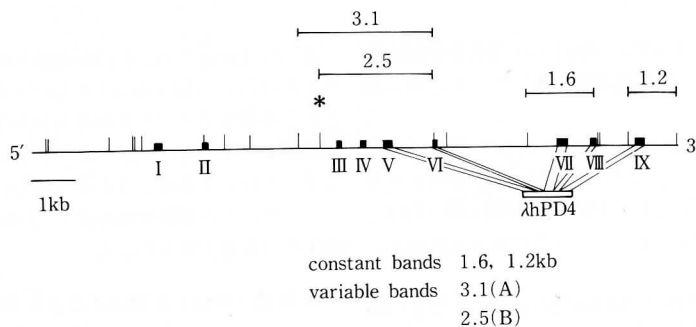


図7. ヒト P450 II E1 遺伝子の Rsa I による制限地図を示す。図の上方に示す4本の DNA 断片は、サザン・ハイブリダイゼーションで検出されたバンドと対応する。  
\*印は、推定上の RFLP 部位を示す。

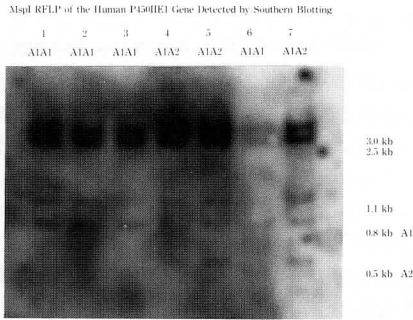


図8. サザン・ハイブリダイゼーションにより検出したヒト P450 II E1 遺伝子の Msp I による RFLP を示す。3.0 kb, 2.5 kb, 1.1 kb の恒常的なバンドのほか、0.8 kb (A1) および 0.5 kb (A2) の多型を示すバンドが検出された。

ジョンで検出された対立遺伝子 A1 と、また 0.3 + 0.2 kb のバンドは A2 と一致する。このことから、Msp I による RFLP 部位が、予想した位置 (図3の\*)にあることが確認された。

**RFLP と発癌感受性**

上述のように、サザン・プロット分析または PCR 法で Dra I による RFLP を検出でき、各個体は3種類の遺伝子型 (CC, CD, DD) に分けられる。それらの分布を、肺癌患者 (A 群; n=74), 消化器系の癌患者 (B 群; n=38), 対照 (n=73) について調べた (表1)。対照における3種類の遺伝子型の分布は、Hardy-Weinberg の平衡にはほぼ一致しており、遺伝子頻度は C が 0.28, D が 0.72 であった。肺癌患者に

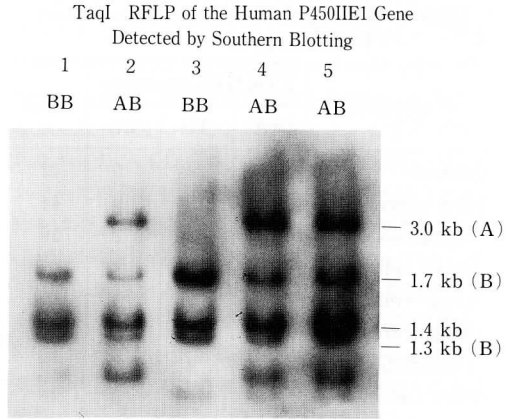


図9. サザン・ハイブリダイゼーションにより検出したヒト P450 II E1 遺伝子の Taq I による RFLP を示す。1.4 kb の恒常的なバンドのほか、3.0 kb (A) および 1.7 + 1.3 kb (B) の多型を示すバンドがみられた。

における遺伝子型の分布は、対照における分布と、有意水準 5% で有意差を示した ( $\chi^2=8.60$ , 自由度 2)。同様に、消化器系の癌患者における遺伝子型の分布と、対照における分布の間にも、有意水準 5% で有意差があった ( $\chi^2=7.48$ , 自由度 2)。ただし、胃癌、食道癌など個々の癌における分布と、対照における分布の間には、今のところ有意差は認められていない。これらのことは、Dra I による P450 II E1 遺伝子の多型が、肺および消化器系におけるヒトの発癌感受性に関与していることを強く示唆する。

他方、Rsa I および Taq I による多型においては、

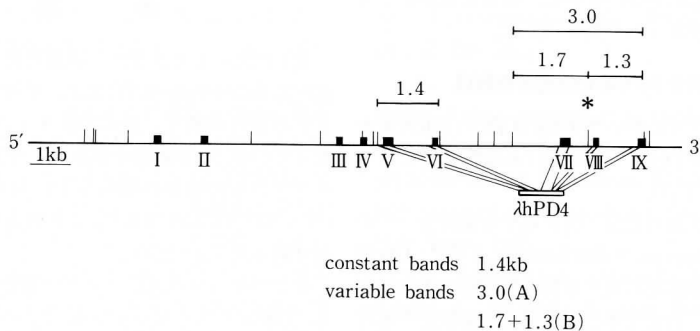


図10. ヒト P450 II E1 遺伝子の Taq I による制限地図を示す。図の上方に示した4本のバンドは、サザン・ハイブリダイゼーションで検出したバンドに対応する。\*印は、推定された RFLP 部位を表す。

Table 3. Rsa I polymorphism of the human P450 II E1 gene

Population	P450 II E1 genotype			Total
	AA	AB	BB	
Control	14	22	6	42
Lung cancer	16	19	9	44
Squamous cell	5	3	2	10
Small cell	3	4	2	9
Large cell	2	2	1	5
Adenocarcinoma	3	6	2	11
Unclassified	3	4	2	9
Other cancers	3	13	2	18
Total cancers	19	32	11	62

Table 4. Taq I polymorphism of the human P450 II E1 gene

Population	P450 II E1 genotype			Total
	AA	AB	BB	
Control	1	11	28	40
Lung cancer	3	10	22	35
Squamous cell	0	3	4	7
Small cell	1	2	7	10
Large cell	1	0	3	4
Adenocarcinoma	1	2	7	10
Unclassified	0	3	1	4
Other cancers	1	5	13	19
Total cancers	4	15	35	54

上の各群での遺伝子型の分布に、有意水準5%で有意差はみられなかった(表3, 表4).

**RFLP と RNA レベルでの遺伝子発現**

個々のサンプルにおいて P450 II E1 の mRNA を定量し、それを Dra I 多型における遺伝子型によって分類した(図 11).

ここでそれぞれの遺伝子型に属する個体を一つの群と考え、Wilcoxon の順位検定によって、CD 型に属する群と DD 型に属する群の母平均の差を検定した。すると、有意水準5%では、両側検定でも片側検定でも有意差なしとなった(Wilcoxon T=66, データ数 6, 10).

もし、DD 型の中の飛び離れたデータ(0.51)を棄

mRNA level of IIE1 in Human Liver Samples

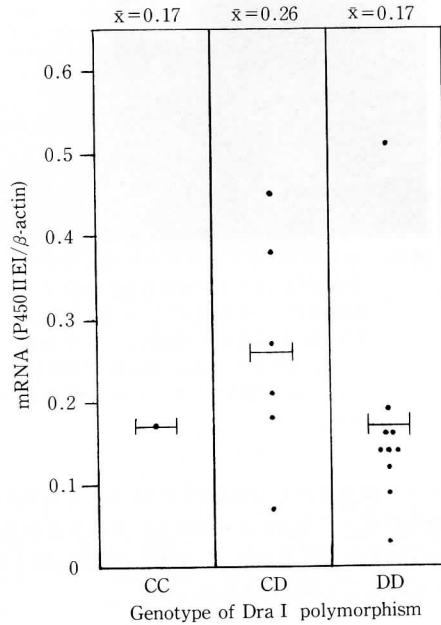


図 11. ノーザン・ブロット分析により定量したヒト肝における P450 II E1 の mRNA. 各々の値は  $\beta$ -アクチンのプローブにハイブリダイズする mRNA の量によって標準化した。

却してもよいとすれば、両群の母平均の差は、有意水準5%で、両側検定でも片側検定でも有意差ありとなる(Wilcoxon T=66, データ数 6, 9).

**考 察**

表1に見られるように、肺癌患者(A群)および消化器系の癌患者(B群)では、対照と比べて CD タイプの割合が高く、逆に DD タイプの割合が低くなっている。A, B 両群の癌患者を合計すると、CD タイプではそのほかの遺伝子型に対する相対危険度(オッズ比)は2.39であり、これは有意水準5%で有意であった( $\chi=2.59$ ).

そしてその一方、CC タイプの割合は、A, B 両群とも、対照より低くなっている。したがって、CあるいはDの対立遺伝子のどちらかがより高い発癌感受性に関係していると推定するのは、今のところ困難と思われる。遺伝子型の分布が癌患者と対照で、こ



のような違いを見せたことに関しては、さらに究明する必要があるだろう。

発癌感受性と P450 II E1 の RFLP との間に関連がみられた場合、その機序としては次のようなものが考えられるであろう。

1) Dra I による RFLP 部位を含む、イントロンにおける調節領域が、II E1 遺伝子上に存在するかもしれない。イントロンの果たす役割については多くの議論があるが、遺伝子の発現における働きに関しては、次のような報告がなされている。免疫グロブリン重鎖遺伝子および  $\beta$  グロビン遺伝子では、イントロン領域での古典的なエンハンサーが見いだされている<sup>27-29</sup>。また、ras 遺伝子のイントロンにおける 1 塩基対の置換が、mRNA レベルとトランスフォーメーション能を 10 倍に高めるという報告がある<sup>30</sup>。さらに、p53 遺伝子のイントロンにおいて、蛋白結合性の調節領域が認められている<sup>31</sup>。2) もう一つの可能性は、II E1 遺伝子の構造や発現に影響を与える別の変異が存在し、それと RFLP 部位との間に連鎖不平衡<sup>32,33</sup> が成立する場合である。これは、これらの 2 つの部位がきわめて近接しており、両者の間で組替えの起こる頻度が低下することによって生ずる現象である。1) および 2) の場合、II E1 の酵素活性を強めるような変異が存在すれば、発癌物質の代謝の活性化が促進されてその個体の発癌感受性が高まり、逆に酵素活性を弱めるような変異があれば、感受性が低くなることが予想される。さらに、3) II E1 遺伝子が、腫瘍の発生に関与する遺伝子、たとえば癌遺伝子、癌抑制遺伝子、他の P450 の構造や発現にあずかる遺伝子などと近接しており、それらの遺伝子と RFLP 部位との間に連鎖不平衡が存在する可能性もある。II E1 遺伝子と同じ染色体 10 にあり<sup>18,26</sup>、腫瘍の発生に関与する可能性のあるものとして、P450 II C (CYP2C)<sup>34</sup>、P450 XVII (CYP17)<sup>35</sup>、多発性内分泌腫瘍 2A 型 (MEN2A)<sup>36,37</sup> などの遺伝子がある。

実験動物において、AHH の誘導性と発癌の頻度との間に相関が示されることについて触れた<sup>4-6</sup>。P450 酵素の一つである P450 I A1 (CYP1A1) は AHH 活性をもつが、川尻らは、この遺伝子の RFLP における特定の対立遺伝子が、ヒトの肺癌、とくに扁平上皮癌に対する感受性と関連が深いことを報告している<sup>3</sup>。ただし、そのような関連の存在を否定する報告もある<sup>38</sup>。最近、この対立遺伝子と、高い AHH の誘導性が、家族内で共分離するという知見が示されている<sup>39</sup>。

P450 II E1 においても、このように RFLP によって示される遺伝子上の変化と、遺伝子発現との関連が明らかにされる可能性がある。今回 Dra I による RFLP と RNA 量の関係を検討したのは、そのような企ての一つということができよう。有意差は得られなかったが、CD 型の方が DD 型よりも高い RNA レベルでの発現を示す傾向がみられた。このことは、肺および消化器系の癌患者において、対照よりも CD 型の頻度が高く、DD 型の頻度が低かったというデータ (表 1) をよく説明する。この点に関して、さらに検討することが望ましい。また、この RFLP が、RNA だけでなく蛋白質や酵素活性のレベル<sup>40</sup> での遺伝子発現とどのように関連しているか知ることも重要であろう。それらを通じて、P450 II E1 がヒトの発癌において果たす役割が明らかになる可能性がある。さらにその成果を癌の予防や治療に応用することが期待される。

## 謝 辞

この研究を遂行するに当たっては、本宮雅吉先生、渡辺民朗先生、菊池英明先生をはじめ多くの方々への御指導・御援助を賜りました。血液の採取に関しては、内科学および臨床癌化学療法部門の方々から御協力を頂きました。ここに記して心から感謝の意を表します。

RNA の抽出に用いた組織は、本学倫理委員会の承認を経て、医学部附属病院病理部から供与されたものです。

## 文 献

- 1) Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* **40**, 243-288, 1989.
- 2) Nebert DW: Genes encoding drug-metabolizing enzymes: possible role in human disease. In: *Phenotypic variation in populations* (ed. Woodhead AD, Bender MA and Leonard RC), pp. 45-64, Plenum Press, New York, 1988.
- 3) Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N and Watanabe J: Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphism of the cytochrome P450 I A1 gene. *FEBS Lett.*

- 263, 131-133, 1990.
- 4) **Watanabe M, Watanabe K, Konno K and Sato H**: Genetic differences in the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and benzo[a]pyrene carcinogenesis in C3H/He and DBA/2 strains of mice. *Gann Jpn. J. Cancer Res.* **66**, 217-226, 1975.
- 5) **Kouri RE, McKinney CE, Slomiany DJ, Snodgrass DR, Wray NP and McLemore TL**: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res.* **42**, 5030-5037, 1987.
- 6) **Kouri RE and Nebert DW**: Genetic regulation of susceptibility to polycyclic hydrocarbon-induced tumors in the mouse. In: *Origins of human cancer* (ed. Hiatt MH, Watson JD and Winsten JA), pp. 811-835, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1977.
- 7) **Hong J and Yang CS**: The nature of microsomal N-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation. *Carcinogenesis* **6**, 1805-1809, 1985.
- 8) **Wrighton SA, Thomas PE, Ryan DE and Levin W**: Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P-450 HLj. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 292-297, 1987.
- 9) **Yoo J-S, Guengerich FP and Yang CS**: Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res.* **48**, 1499-1504, 1988.
- 10) **Wrighton SA, Thomas PE, Molowa DT, Haniu M, Shively JE, Maines SL, Watkins PB, Parker G, Mendes-Picon G, Levin W and Guzelian PS**: Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochemistry* **25**, 6731-6735, 1986.
- 11) **Bartsch H and Montesano R**: Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* **5**, 1381-1393, 1984.
- 12) **Guengerich FP and Shimada T**: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 391-407, 1991.
- 13) **Guengerich FP, Kim D-H and Iwasaki M**: Role of human cytochrome P-450IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 168-179, 1991.
- 14) **Uematsu F, Kikuchi H, Ohmachi T, Sagami I, Motomiya M, Kamataki T, Komori M and Watanabe M**: Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2803, 1991.
- 15) **Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, Abe T, Sagami I, Ohmachi T, Wakui A, Kanamaru R and Watanabe M**: Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 254-256, 1991.
- 16) **Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, Abe T, Ishioka C, Kanamaru R, Sagami I and Watanabe M**: Human cytochrome P450 IIE1 gene: Dra I polymorphism and susceptibility to cancer. *Tohoku J. Exp. Med.* in press.
- 17) **Uematsu F, Kikuchi H, Abe T, Motomiya M, Ohmachi T, Sagami I and Watanabe M**: MspI polymorphism of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5797, 1991.
- 18) **McBride OW, Umeno M, Gelboin HV and Gonzalez FJ**: A TaqI polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). *Nucleic Acids Res.* **15**, 10071, 1987.
- 19) **Southern EM**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517, 1975.
- 20) **Saiki RK, Schart S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N**: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354, 1985.
- 21) **Mullis KB and Faloona F**: Specific

- synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350, 1987.
- 22) **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA**: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-489, 1988.
- 23) **Komori M, Nishio K, Fujitani T, Ohi H, Kitada M, Mima S, Itahashi K and Kamataki T**: Isolation of a new human fetal liver cytochrome P450 cDNA clone: evidence for expression of a limited number of forms of cytochrome P450 in human fetal livers. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 219-225, 1989.
- 24) **Frazier ML, Mars W, Florine DL, Montagna RA and Saunders GF**: Efficient extraction of RNA from mammalian tissue. *Mol. Cell. Biochem.* **56**, 113-122, 1983.
- 25) **Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T**: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- 26) **Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV and Gonzalez FJ**: Human ethanol-inducible P450 II E1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* **27**, 9006-9013, 1988.
- 27) **Gillies SD, Morrison SL, Oi VT and Tonegawa S**: A tissue-specific cellular enhancer is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **33**, 717-728, 1983.
- 28) **Banerji J, Olson L and Schaffner W**: A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**, 729-740, 1983.
- 29) **Queen C and Baltimore D**: Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell* **33**, 741-748, 1983.
- 30) **Cohen JB and Levinson AD**: A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature* **334**, 119-124, 1988.
- 31) **Beenken SW, Karsenty G, Raycroft L and Lozano G**: An intron binding protein is required for transformation ability of p53. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4747-4752, 1991.
- 32) **Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, Weber PG, Boehm CD and Kazazian HH**: Nonuniform recombination within the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 1239-1258, 1984.
- 33) **Leitersdorf E, Chakravarti A and Hobbs HH**: Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 409-421, 1989.
- 34) **Okino ST, Quattrocchi LC, Pendurthi UR, McBride OW and Turkey RH**: Characterization of multiple human cytochrome P-450 1 cDNAs: the chromosomal localization of the gene and evidence for alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **262**, 16072-16079, 1987.
- 35) **Matteson KY, Picardo-Leonard J, Chung BC, Mohandas TK and Miller WL**: Assignment of the gene for adrenal P450c17 (steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20 lyase) to human chromosome 10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**, 789-791, 1986.
- 36) **Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AM, Gertner J, Greenberg CR, Gusella JF, Holden JJA and White BN**: Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* **328**, 528-530, 1987.
- 37) **Mathew CGP, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Caster C, Liou GI, Fong S-L, Bridges CDB, Haak H, Nieuwenhuijnen Kruseman AC, Schifter S, Hansen HH, Telenius H, Telenius-Berg M and Ponder BAJ**: A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome

10. Nature 328, 527-528, 1987.
- 38) **Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Brøgger A and Børresen AL**: Human CYP1A1 (cytochrome P<sub>1</sub>450) gene: lack of association between the Msp I restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1, 20-25, 1991.
- 39) **Petersen DD, Mckinney CE, Ikeya K, Smith HH, Bale AE, McBride OW and**

**Nebert DW**: Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *Am. J. Hum. Gen.* 48, 720-725, 1991.

- 40) **Peter R, Böcker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP and Yang CS**: Hydroxylation of chlorozoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450 II E1. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 566-573, 1990.

### DNA Polymorphism of Human Cytochrome P450 II E1 and Susceptibility to Cancer of the Lung and the Alimentary System

Fumiyuki UEMATSU

Department of Internal Medicine and Department of Cancer Chemotherapy and Prevention, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai

Human cytochrome P450 II E1 (CYP2E) is involved in the metabolic activation of procarcinogens such as N-nitrosodimethylamine, benzene, styrene, carbon tetrachloride and ethyl carbamate. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were detected in the human P450 II E1 gene for the restriction endonucleases Dra I, Rsa I, Msp I and Taq I. The distribution of the genotypes of the Dra I polymorphism among lung cancer patients (n=74) was different from that among controls (n=73) with statistical significance of  $p < 0.05$  ( $\chi^2 = 8.60$  with  $df = 2$ ). In addition, the distribution of the genotypes among patients with cancers of the alimentary system (n=38) was also different from that among controls (n=73) ( $\chi^2 = 7.48$  with  $df = 2$ ;  $p < 0.05$ ). Our data indicate an association between the Dra I polymorphism of the II E1 gene and susceptibility to cancers of the lung and the alimentary system. The expressions of the gene at RNA level tended to differ among the genotypes, though significant differences were not demonstrated. This might partially explain the association observed here. To elucidate the role that P450 II E1 might play in human carcinogenesis, the relation of the RFLP with the gene expression should be further investigated.

Key words: cytochrome P450 II E1, metabolic activation of procarcinogens, restriction fragment length polymorphism, susceptibility to cancer

Kokenshi 44(2), 129-140, 1992.