Relation between Genotypic Polymorphisms of Drug Metabolizing Enzymes and Gastric Caner Susceptibility

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9489

金沢大学十全医学会雑誌　第109巻　第4･5合併号　300－310（2000）

薬剤代謝酵素の遺伝子多型と胃癌感受性についての研究

金沢大学医学部医学科病理学第一講座（主任：中西功夫教授）
鈴　木　潮　人

環境発癌物質の多くは，宿主の薬物代謝酵素によって癌原性を獲得したり失ったりする．これら代謝酵素には遺伝的に多型があることが知られており，その多型が個体の発癌感受性を左右する要因の一つになっていると考えられている．本研究では，チトクロムP450 1A1，チトクロムP450 2E1，グルタチオンS-トランスフェラーゼM1，N-アセチルトランスフェラーゼ2の遺伝的多型性が胃癌発生の感受性と関連があるかどうかを明らかにする目的で，胃癌患者146例と剖検対照例177例を対象として，PCR法，PCR制限酵素断片長多型分析法，アレル特異的PCR法を用いて各代謝酵素の遺伝子多型を決定し両群間で比較検討した．さらに，切除胃標本の*p53*遺伝子エクソン5-9の配列を直接シークエンス法によって決定し，*p53*遺伝子点突然変異と酵素多型の関連について検討した．対照群，患者群間でチトクロムP450 1A1遺伝子多型の頻度に差はみられなかったが，チトクロムP450 2E1では，野生型対立遺伝子ホモ接合体の割合が対照群に比べ胃癌患者群で有意に高かった．グルタチオンS-トランスフェラーゼM1遺伝子欠損型の頻度は，対照群に比し患者群において有意に高かった．N-アセチルトランスフェラーゼ2の野生型対立遺伝子ホモ接合体（迅速アセチル化型）の頻度は，対照症例に比し胃癌患者群で有意に低かった．検索しえた切除胃標本145例中35例（24.1%）に*p53*遺伝子の点突然変異を認めた．点突然変異の頻度は，チトクロムP450 2E1変異型対立遺伝子を有する胃癌患者群に比べ，野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する患者群において高い傾向にあった．これをさらに飲酒歴の有無で検討してみると，飲酒歴があり，しかも野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する胃癌患者群において，*p53*遺伝子点突然変異の発生頻度が有意に高かった．以上の結果から，チトクロムP450 2E1，グルタチオンS-トランスフェラーゼM1，N-アセチルトランスフェラーゼ2の遺伝的多型が胃癌発生の感受性に影響していることが示唆された．さらに，チトクロムP450 2E1野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する飲酒者は，胃癌の病理発生に重要な鍵をにぎる遺伝子である*p53*遺伝子に点突然変異を生じやすく，胃癌に対する感受性が高いことが示唆された．

Key words　gastric cancer, genetic susceptibility, metabolizing enzyme polymorphism, *p53* gene point mutation

発癌には環境化学物質が関与しており，特に食事，喫煙，飲酒等に由来する癌原物質が重要な因子と考えられている．これらの癌原物質はそれ自体では生物学的な活性を示さず，宿主内で代謝されることによって遺伝子障害性を発揮すると考えられている．一般に，薬物代謝第一相酵素は癌原物質を活性化し遺伝子障害性中間体を形成する作用を有しており，代表的なものとしてチトクロムP450酵素（cytochrome P450，CYP）が挙げられる．薬物代謝第二相酵素は活性化された物質を水溶性誘導体に結合させ，排泄を促進する酵素であり，グルタチオンS-トランスフェラーゼ（glutathione-S-transferase，GST）やN-アセチル転移酵素（N-acetyltransferase，NAT）が含まれる．これらの薬剤代謝酵素には複数の種類があり，しかも，それぞれに遺伝的多型があって個体間で酵素活性に差を生ずる．この酵素の多型性がヒト個体レベルの発癌感受性に影響を与えると考えられており[1]，最近，薬剤代謝酵素の遺伝的多型性と発癌感受性との関連が注目されている．

多種類存在するCYPのなかで，発癌との関連性がよく研究されているのはCYP1A1とCYP2E1である．CYP1A1は，ベンツピレン等のたばこの煙中に含まれる多環芳香族の代謝活性化反応を触媒し，化学発癌感受性に影響する重要な因子と考えられている[2]．CYP2E1は，癌原性ニトロサミンの代謝活性化に関与することが知られている酵素で[1)3)]，エタノール摂取により酵素の発現が影響を受ける[1)4)5)]．一方，GSTの一種であるGSTM1は生体外異物や活性化された発癌化学物質とグルタチオンとの抱合反応を触媒する酵素である[1)6)]．またNATの一種であるNAT2は，薬剤，発癌性アリルアミン化学物質のアセチル化を触媒し，基質の効果または毒性に影響している[7)]．これまでに，これらの酵素の遺伝子多型性と大腸癌，膀胱癌，肺癌等との発癌リスクとの関連性について多くの報告がなされている[8)-10)]．しかし，胃癌での研究は少なく，その結果は必ずしも一定していない．また，薬物代謝第一相酵素に属するCYP1A1，CYP2E1と薬物代謝第二相酵素に属するGSTM1，NAT2の4種の酵素の遺伝的多型を同時に解析し，胃癌感受性との関連を検討した研究はほとんどない．さらに，薬剤代謝酵素の多型が胃癌の病理発生にどのように関わっているのかを遺伝子レベルで解析した研究はみられない．

平成12年9月21日受付，平成12年10月27日受理

Abbreviations：CYP, cytochrome P450; DEAE, diethylaminoethyl; GST, glutathione-S-transferase; Ile, isoleucine; NAT, N-acetyltransferase; Val, valine

本研究では，まず，胃癌患者群と対照群における*CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *NAT2*の遺伝子多型を決定し，これら酵素の遺伝的多型性が胃癌の感受性におよぼす影響について検討した．もし，いずれかの酵素多型に胃癌発症との相関があれば，その酵素が発癌過程における胃の遺伝子異常の発生に関与している可能性がある．*p53*遺伝子点突然変異は胃癌において高頻度に認められる遺伝子異常であり，胃癌の病理発生において非常に重要な役割を果たしている[11)~15)]．そこで，胃癌組織における*p53*遺伝子配列を決定し，どの酵素多型が*p53*遺伝子点突然変異を誘導しやすいのか検討した．本研究は，薬剤代謝酵素多型が胃発癌の鍵となる遺伝子の突然変異に影響するかどうかを検討したはじめての研究である．

対象および方法

Ⅰ．対象

胃癌患者146例と対照症例177例を対象とした．胃癌患者としては，金沢大学がん研究所附属病院および小松市民総合病院で外科切除術を施行された症例を用いた．対照症例としては，金沢大学医学部医学科病理学第一講座にて行われた非胃癌剖検例を用いた．過去に酵素の遺伝子多型と発癌感受性とに相関があると報告されている大腸癌[8)]，膀胱癌[9)]，肺癌[10)]の剖検例は対照症例から除外した．

Ⅱ．方法

1．DNAの抽出

患者の胃癌組織と近傍の非癌部組織，対照剖検例の肝臓組織を採取後，直ちに凍結した．その後，DNA Extraction Kit (Stratagene, Cloning Systems, La Jolla, USA) の操作法に従ってDNAを抽出した．

2．PCR法

表1に，酵素の遺伝子多型の決定と*p53*遺伝子配列の決定のために使用したPCRプライマーの塩基配列，PCR産物の大きさを一覧にして示した．プライマーの合成は宝酒造（草津）に委託した．表2に，PCR反応の各反応温度とサイクル数を示した．

3．酵素の遺伝子多型の決定

1) *CYP1A1*

Hayashiら[16)]の方法を用いて*CYP1A1*遺伝子型を決定した．同一検体に対して共通順方向プライマー*CYP1A1*-イソロイシン (isoleucine, Ile) /バリン (valine, Val) -FとIle特異的逆方向プライマー (*CYP1A1*-Ile-R)，*CYP1A1*-Ile/Val-FとVal特異的逆方

Table 1. Oligonucleotide primers used for the analyses of the *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *NAT2* and *p53* genes

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Refarence
CYP1A1			
CYP1A1-Ile/Val-F	5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'	185	16)
CYP1A1-Ile-R	5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3'		
CYP1A1-Val-R	5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAC-3'		
CYP2E1			
Forward	5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCAG-3'	413	17)
Reverse	5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'		
GSTM1			
Forward	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	215	18)
Reverse	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'		
β-globin			
Forward	5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'	268	18)
Reverse	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'		
NAT2			
Forward	5'-TGACGGCAGGAATTACATTGTC-3'	559	18)
Reverse	5'-ACACAAGGGTTTATTTTGTTCC-3'		
p53			
Exon5/6 forward	5'-TCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG-3'	426	20)
Exon5/6 reverse	5'-AGAGACCCCAGTTGCAAACCAGAC-3'		
Exon7 forward-1	5'-TCTTGGGCCTGTGTTATCTCCTAG-3'	229	20)
Exon7 reverse-1	5'-TGGAAGAAATCGGTAAGAGGTGGG-3'		
Exon7 forward-2	5'-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA-3'	259	
Exon7 reverse-2	5'-GAAATCGGTAAGAGGTGGGC-3'		
Exon8/9 forward	5'-GACAGGTAGGACCTGATTTCCTTA-3'	413	20)
Exon8/9 reverse	5'-GAGTGTTAGACTGGAAACTTTCCA-3'		
Exon5 forward	5'-GTTTCTTTGCTGCCGTGTTCCA-3'	339	
Exon5 reverse	5'-ATCAGTGAGGAATCAGAGGCCT-3'		
Exon6 forward	5'-GCTGCTCAGATAGCGATGGTGA-3'	268	
Exon6 reverse	5'-GCCACTGACAACCACCCTTAAC-3'		
Exon8 forward	5'-GGACCTGATTTCCTTACTGCCTC-3'	240	
Exon8 reverse	5'-AGGCATAACTGCACCCTTGGTCT-3'		
Exon9 forward	5'-AGACCAAGGGTGCAGTTATGCCT-3'	238	
Exon9 reverse	5'-GGCAAATGCCCCAATTGCAGGTA-3'		

Table 2. Conditions for PCR

Gene	[Temperature (℃)/duration (sec)] Denaturation	Annealing	Extension	Cycle
CYP1A1	94/60	72/60	72/30	25
CYP2E1	95/60	55/60	72/60	30
GSTM1	94/60	55/60	72/60	40
NAT2	94/50	55/50	65/50	40
p53	94/35	60/60	72/60	30
Sequening	96/30	50/15	60/240	25

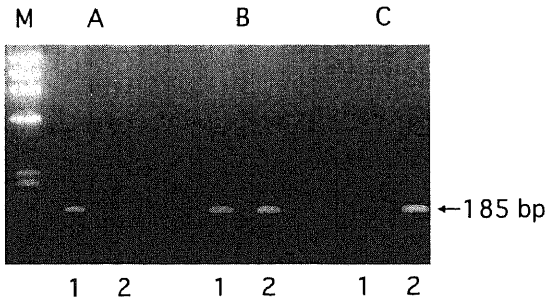

Fig. 1. Representative electrophoresis patterns of PCR products to identify CYP1A1 Ile-Val polymorphisms. A, Ile/Ile homozygote; B, Ile/Val heterozygote; C, Val/Val homozygote. PCR was performed with primers CYP1A1-Ile/Val F and CYP1A1-Ile-R in lane 1, and CYP1A1-Ile/Val F and CYP1A1-Val-R in lane 2. Lane M, DNA size marker (ϕ X174DNA digested with Hae III).

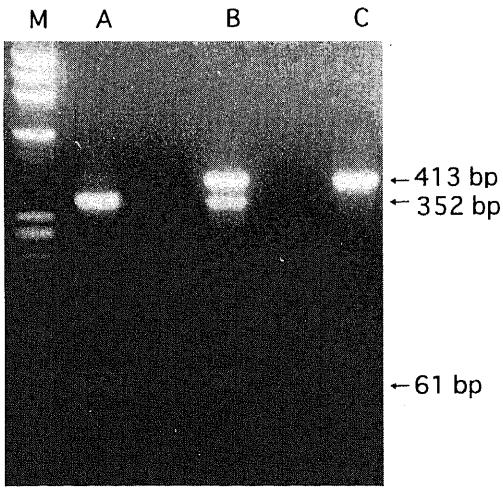

Fig. 2. Representative electrophoresis patterns of PCR-restriction fragment length polymorphism to identify CYP2E1 Rsa I polymorphisms. Lanes A, B and C indicate c1/c1 homozygote, c1/c2 heterozygote and c2/c2 homozygote, respectively. Lane M, DNA size marker (ϕ X174DNA digested with Hae III).

向プライマー (*CYP1A1*-Val-R) の2組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて*CYP1A1*遺伝子を増幅した．PCR反応には，抽出した染色体DNAのうち0.5 μ gを一回の反応の鋳型として用いた．反応液 (50 μ l) は，0.5 μ Mのプライマー1組，0.2mMの各デオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)，2.0単位のTaqポリメラーゼ (Amplitaq；Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)，10mMのTris-HCl (pH8.3)，50mM KCl, 0.01% (w/v) ゼラチン，1.5mM $MgCl_2$とし，サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を用いてPCR反応を行った．9 μ lのPCR産物を，臭化エチジウムを含む2%のアガロースゲルに定電圧100V下で電気泳動し，紫外線照射下でPCR産物を可視化した．*CYP1A1*-Ile-Rをプライマーとして用いたPCR反応で185 bpの産物が生じ，*CYP1A1*-Val-Rを用いた反応にはPCR産物を生じない個体は，野生型対立遺伝子ホモ接合体 (Ile/Ile型) 保有者と判定される．*CYP1A1*-Val-Rをプライマーとして用いた反応液にPCR産物が生じ，*CYP1A1*-Ile-Rを用いた反応液にはPCR産物を生じない個体は，変異型対立遺伝子ホモ接合体 (Val/Val型) 保有者と判定される．*CYP1A1*-Ile-R, *CYP1A1*-Val-Rをプライマーとして用いた反応液の両者にPCR産物が生じる個体は，ヘテロ接合体 (Ile/Val型) 保有者と判定される (図1)．

2) *CYP2E1*

Hayashiら[17]の方法を用いて*CYP2E1*遺伝子型を決定した．PCR反応液の組成はプライマーのほかは*CYP1A1*と同様とした．PCRを行った反応液全量を，2%のアガロースゲルで電気泳動し，413 bpの*CYP2E1*遺伝子PCR産物をジエチルアミノエチル (diethylaminoethyl, DEAE) 膜 (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) で回収した．このPCR産物400ngを10単位の*Rsa* I (*Afa* I) (宝酒造) で37℃ 3時間消化の後，臭化エチジウムを含む4.5%アガロースゲル (3%のアガロースと1.5%のNusieve GTGアガロース) (FMC Bioproducts, Rockland, USA) で電気泳動した．野生型対立遺伝子は増幅遺伝子内に*Rsa* I切断部位をもち，変異型対立遺伝子には*Rsa* I切断部位はない．したがって，352 bpと61 bpの2本のDNAバンドが認められる個体は野生型対立遺伝子ホモ接合体 (c1/c1型) 保有者，413 bpと352 bpと61 bpの3本のバンドが認められる個体はヘテロ接合体 (c1/c2) 保有者，413 bpのバンドのみが認められる個体は変異型対立遺伝子ホモ接合体 (c2/c2) と判定される (図2)．

3) *GSTM1*遺伝子の検出

*GSTM1*遺伝子の検出はOdaら[18]の方法にしたがった．2組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて*GSTM1*と*β-globin*を同時に増幅した．9 μ lのPCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動し，*β-globin*遺伝子 (268 bp) が増幅された検体において，*GSTM1*遺伝子由来の215 bpのPCR産物が認められた個体は*GSTM1*遺伝子保有者，認められなかった個体は*GSTM1*遺伝子欠損者と判定される (図3)．

4) *NAT2*遺伝子型の決定

Odaら[18]の方法を用いて*NAT2*遺伝子型を決定した．PCR反応には，抽出した染色体DNAのうち1.0 μ gを一回の反応の鋳型として用いた．100 μ lのPCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動し，559 bpのPCR産物をDEAE膜で回収した．このPCR産物400ngをともに10単位の*Bam*H I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) と*Asp* 718 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) で37℃ 3時間消化した後，10単位の*Taq* I (Boehringer Mannheim) を加え，

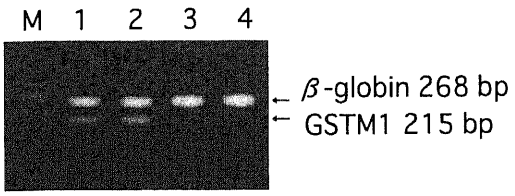

Fig. 3. Representative electrophoresis patterns of PCR products for GSTM1 in cancer patients. A positive case is shown in lane 1 (adjacent normal mucosa) and lane 2 (cancer tissue); a negative case is shown in lane 3 (adjacent normal mucosa) and lane 4 (cancer tissue). The β-globin gene was simultaneously amplified to verify sufficient extraction of DNA from tissue samples. Lane M, DNA size marker (φ X174DNA digested with Hae III).

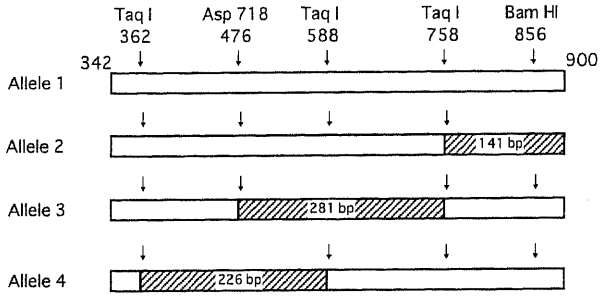

Fig. 4. Restriction enzyme sites of PCR products for four types of NAT2 alleles. Numbering is cited from [18]. Hatched boxes indicate the specific fragments for alleles 2, 3, and 4, which are generated by restriction enzyme digestion.

65℃でさらに3時間消化した．消化後のPCR産物を，4.5%アガロースゲル (3%のアガロースと1.5%のNusieve GTGアガロース) で電気泳動した．

現在までにヒトにおいて15以上の*NAT2*対立遺伝子が報告されているが，主要な対立遺伝子は1，2，3，4型の4種類であり[20]，それぞれの対立遺伝子は，*Bam*H I，*Asp* 718，*Taq* Iの切断部位の有無の組み合わせから判定できる[18][19] (図4，5)．すなわち，対立遺伝子2，3，4には，それぞれ，141 bp，281 bp，226 bpの特異的な切断断片がみられる．また，対立遺伝子1型2型ヘテロ接合体と対立遺伝子2型ホモ接合体保有者は，1型対立遺伝子由来の99 bp断片の有無によって区別できる．対立遺伝子1型ホモ接合体保有者は迅速アセチル化群に，対立遺伝子1型と他の対立遺伝子とのヘテロ接合体保有者は中間型アセチル化群に，1型以外の対立遺伝子保有者は遅延型アセチル化群に分類される[19]．

4．直接シークエンス法による*p53*遺伝子配列の決定

表2の条件下にPCR法を行って*p53*遺伝子のエクソン5-9を増幅し，2%のアガロースゲルで電気泳動の後，DEAE膜で回収した．これを鋳型として，ダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) を用いダイ・ターミネーター法にて反応を行った (表2)．解析にはABI PRISM 377 DNAシーケンサ (Perkin-Elmer Corporation) を用いた．全ての胃癌組織由来の染色体DNAを鋳型とし，順方向と逆方向のプライマー[20]を用いて両方向から塩基配列を決定した．胃癌組織において*p53*遺伝子点突然変異が疑われる症例では，対応する非癌部胃組織由来の染色体DNAの*p53*遺伝子配列も調べ，胃癌組織由来の塩基配列と比較し，変異の有無を決定した．

5．統計学的検討

標本数が5以下の場合はFisherの直接確率法を，6以上の場合はχ^2検定を用いた．危険率0.05未満を以て有意差ありとした．また統計学的に有意差のある危険因子については，そのオッズ比を計算した。

なお，胃癌の全症例と対照112例の*GSTM1*遺伝子多型と*NAT2*遺伝子多型については，すでに当教室のOdaら[18]によって報告されている．本実験では，*GSTM1*遺伝子多型と*NAT2*遺伝子多型に関しては，新たに加わった対照65例について検討した．

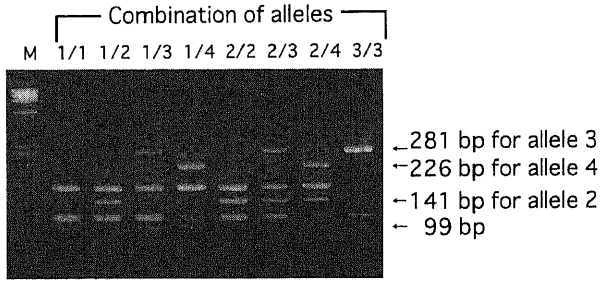

Fig. 5. Electrophoresis patterns of NAT2 genotypes identified by PCR-restriction fragment length polymorphism in this study. A homozygous combination of allele 2 can be differentiated from a heterozygous combination of alleles 1 and 2 by the absence of a 99-bp band generated with Taq I and BamH I. Lane M, DNA size marker (φ X174DNA digested with Hae III).

成　　績

I．臨床病理学的事項 (表3)

胃癌症例の年齢は30-84歳 (平均年齢62.3±11.2歳；男性97人，女性49人) であった．対照症例の死亡時年齢は20-93歳 (平均年齢66.6±15.8歳；男性120人，女性57人) であった．

1．組織型の分布

Laurenの分類[21]に従って胃癌146例を組織学的に腸型とびまん型に分類したところ，腸型は67人 (45.9%)，びまん型は79人 (54.1%) であった．

2．嗜好品と胃癌感受性の相関

1) 喫煙

対照群の145人，患者群の145人の喫煙歴の情報を得ることができた．対照群，患者群において喫煙者，非喫煙者の2群の分布に大きな差はみられなかった．また，各々の性別における喫煙者の割合についても対照と患者間で差はみられなかった．

2) 飲酒

対照群の147人，患者群の144人の飲酒歴の情報を得ることができた．飲酒歴を有する者の割合は対照群と患者群で有意差を認められなかった．性別と飲酒の有無についても，対照と患者間で有意な差はなかった．

Table 3. Summary of clinical findings in controls and patients

Factor	Control (%)	Patient (%)
Gender		
Male	120/177 (67.8)	97/146 (66.4)
Female	57/177 (32.2)	49/146 (33.6)
Age		
$\bar{X}\pm$SD	66.6±15.8*	62.3±11.2*
Range	20-93*	30-84*
Lauren's type		
Intestinal		67/146 (45.9)
Diffuse		79/146 (54.1)
Smoking status		
Smoker	52/145 (35.9)	60/145 (41.4)
Non-smoker	93/145 (64.1)	85/145 (58.6)
Drinking status		
Drinker	62/147 (42.2)	72/144 (50.0)
Non-drinker	85/147 (57.8)	72/144 (50.0)
Gender/driking status		
Men/drinker	56/147 (38.1)	64/144 (44.4)
Men/non-drinker	42/147 (28.6)	32/144 (22.2)
Women/drinker	6/147 (4.1)	8/144 (5.5)
Women/non-drinker	43/147 (29.3)	40/144 (27.8)

*Years

Table 4. Distribution of genotypes of the *CTP1A1*, *2E1*, *GSTM1* and *NAT2* in controls and patients

Factor	Control (%)	Patient (%)
CYP1A1 (Ile/Val)		
Ile/Ile	104/177 (58.8)	84/144 (58.3)
Ile/Val	65/177 (36.7)	51/144 (35.4)
Val/Val	8/177 (4.5)	9/144 (6.3)
CYP2E1		
c1/c1	112/177 (63.3)*	107/145 (73.8)*
c2 (c1/c2+c2/c2)	65/177 (36.7)*	38/145 (26.2)*
GSTM1		
GSTM1+	93/177 (52.5)*	58/145 (40.0)*
GSTM1−	84/177 (47.5)*	87/145 (60.0)*
NAT2		
Rapid	93/177 (52.5)*	58/145 (40.0)*
Intermediate	72/177 (40.7)	69/145 (47.6)
Slow	12/177 (6.8)	18/145 (12.4)

*$p<0.05$ between control and patient.

Ⅱ．薬剤代謝酵素遺伝子多型と胃癌感受性の相関 (表4)

1．*CYP1A1*

全対照剖検例 (177例) において，*CYP1A1*遺伝子が増幅された．胃癌患者では，146例中144例において遺伝子の増幅に成功した．Ile/Ile型，Ile/Val型，Val/Val型は対照群では104人 (58.8%)，65人 (36.7%)，8人 (4.5%) であり，患者群では84人 (58.3%)，51人 (35.4%)，9人 (6.3%) であった．対照群と患者群の間で各*CYP1A1*遺伝子多型の頻度に差はみられなかった．

2．*CYP2E1*

*CYP2E1*遺伝子は対照177例，患者145例において増幅され，その遺伝子型の判定ができた．c1/c1型の患者の割合 (107人，73.8%) は対照群 (112人，63.3%) に比べ有意に高く (オッズ比＝1.63)，逆に，変異型対立遺伝子c2を有する患者 (c1/c2型とc2/c2型) の割合 (38人，26.2%) は対照群 (65人，36.7%) に比較して有意に低かった ($p=0.04<0.05$)．

3．*GSTM1*

*β-globin*遺伝子が，177の全対照剖検例において増幅された．胃癌患者146例中，非癌部組織から抽出したDNAを用いたときには全例において*β-globin*遺伝子が増幅されたが，腫瘍組織から抽出したDNA を用いたときには，145例において遺伝子が増幅された．*GSTM1*の欠損型の頻度は，対照 (84人，47.5%) に比し癌患者 (87人，60.0%) において高かった ($p=0.03<0.05$)．オッズ比は1.68であった．

Table 5. Distribution of combined risk factors in controls and patients

Factor	Control (%)	Patient (%)
CYP1A1/smoking status		
Ile/Ile smoker	36/145 (24.8)	36/143 (25.2)
Ile/Ile non-smoker	52/145 (35.9)	47/143 (32.9)
Ile/Val smoker	13/145 (9.0)	21/143 (14.7)
Ile/Val non-smoker	37/145 (25.5)	30/143 (20.4)
Val/Val smoker	3/145 (2.1)	3/143 (2.1)
Val/Val non-smoker	4/145 (2.8)	6/143 (4.2)
CYP2E1/drinking status		
c1/c1 drinker	41/147 (27.9)	55/143 (38.5)
c1/c1 non-drinker	51/147 (34.7)	51/143 (35.7)
c2 drinker	21/147 (14.3)	17/143 (11.9)
c2 non-drinker	34/147 (23.1)	20/143 (14.0)
CYP1A1/GSTM1		
Ile/Ile *GSTM1*+	55/177 (31.1)	34/143 (23.8)
Ile/Ile *GSTM1*−	49/177 (27.7)	49/143 (34.3)
Ile/Val *GSTM1*+	34/177 (19.2)	19/143 (13.3)
Ile/Val *GSTM1*−	31/177 (17.5)	32/143 (22.4)
Val/Val *GSTM1*+	4/177 (2.3)	4/143 (2.8)
Val/Val *GSTM1*−	4/177 (2.3)	5/143 (3.5)
GSTM1/NAT2		
GSTM1+/rapid	47/177 (26.6)*	21/145 (14.5)*
GSTM1+/non-rapid	46/177 (26.0)	37/145 (25.5)
GSTM1−/rapid	46/177 (26.0)	37/145 (25.5)
GSTM1−/non-rapid	38/177 (21.5)*	50/145 (34.5)*

*$p<0.05$ between control and patient.

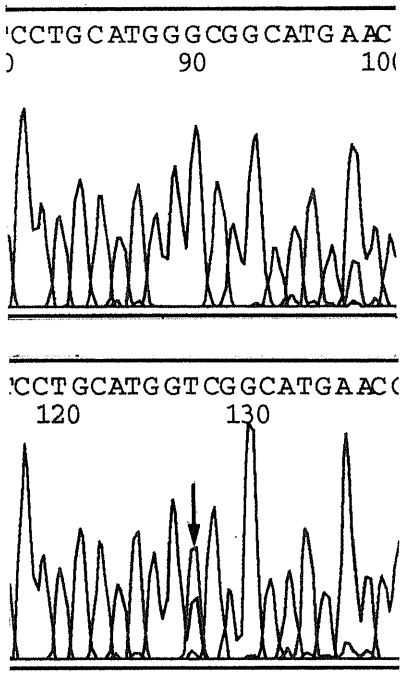

Fig. 6. Direct sequencing data of exon 7 of the *p53*. Top and bottom show the sequences using DNA isolated from adjacent normal mucosa and cancer tissue, respectively, in Case 1. An arrow indicates T peak of the mutant type.

4．*NAT2*

*NAT2*の対立遺伝子1型ホモ接合体保有者（迅速型）は対照症例（93/177人，52.5%）に比し，胃癌患者（58/145人，40.0%）において低かった（p=0.02<0.05：オッズ比＝0.60）．遅延型は対照例（12/177人，6.8%）に比較して患者（18/145人，12.4%）に多い傾向があったが，統計学的な有意差はみられなかった（p=0.08>0.05）．

なお，同一個体において，胃癌組織を用いて決定した代謝酵素の遺伝子型とその近傍の非癌部組織を用いて決定した代謝酵素の遺伝子型とはすべて一致した．すなわち，癌化による代謝酵素遺伝子型の変化はなかった．

Ⅲ．複数因子の組み合わせと胃癌感受性の相関（表5）

1．*CYP1A1*遺伝子多型と喫煙の有無の組み合わせ

*CYP1A1*遺伝子多型（Ile/Ile，Ile/Val，Val/Val）と喫煙の有無により6群に分類し検討したが，対照群と患者群間で頻度に差はみられなかった．

2．*CYP2E1*遺伝子多型と飲酒の組み合わせ

CYP2E1 c1/c1を有する飲酒者の割合は，対照群（41/147人，27.9%）に比し患者群（55/143人，38.5%）において高い傾向にあったが，統計学的には有意差はなかった（p=0.11>0.05）．

3．*CYP1A1*遺伝子多型と*GSTM1*遺伝子多型の組み合わせ

*CYP1A1*遺伝子型と*GSTM1*の遺伝子型により6群に分類し検討したが，患者群と対照群で遺伝子型の頻度に差はみられなかった．

Table 6. Point mutations of the *p53* gene in gastric cancer

Case No.	Exon	Affected codon	Nucleotide substitution	Amino acid change
1	7	244	GGC→GTC	Glycine→Valine
3	7	248	CGG→CAG	Arginine→Glutamine
5	7	236	TAC→TGC	Tyrosine→Cysteine
6	7	248	CGG→CAG	Arginine→Glutamine
9	7	245	GGC→AGC	Glycine→Serine
13	7	244	GGC→TGC	Glycine→Cysteine
21	8	270	TTT→CTT	Phenylalanine→Leucine
29	8	282	CGG→TGG	Arginine→Tryptophan
31	6	196	CGA→TGA	Arginine→Stop
36	5	173	GTG→CTG	Valine→Leucine
42	6	192	CAG→TAG	Glutamine→Stop
45	5	179	CAT→AAT	Histidine→Asparagine
50	8	282	CGG→TGG	Arginine→Tryptophan
53	8	273	CGT→CAT	Arginine→Histidine
65	5	141	TGC→TAC	Cysteine→Ttyrosine
70	8	273	CGT→TGT	Arginine→Cysteine
72	6	220	TAT→TCT	Tyrosine→Serine
73	6	213	CGA→TGA	Arginine→Stop
78	5	175	CGC→CAC	Arginine→Histidine
83	8	285	GAG→AAG	Glutamine→Lysine
90	6	193	CAT→CGT	Histidine→Arginine
101	5	141	TGC→TAC	Cysteine→Tyrosine
103	7	241	TCC→TGC	Serine→Cysteine
108	6	220	TAT→TGT	Tyrosine→Cysteine
110	6	220	TAT→TGT	Tyrosine→Cysteine
116	5	152	CCG→CCT	Proline→Proline
117	6	213	CGA→TGA	Arginine→Stop
120	5	145	CTG→CAG	Leucine→Glutamine
122	8	282	CGG→TGG	Arginine→Tryptophan
124	5	151	CCC→CGC	Proline→Arginine
128	5	156	CGC→CAC	Arginine→Histidine
	5	185	AGC→AGT	Serine→Serine
131	8	306	CGA→TGA	Arginine→Stop
134	7	245	GGC→AGC	Glycine→Serine
137	5	175	CGC→CAC	Arginine→Histidine
146	7	245	GGC→AGC	Glycine→Serine

4．*GSTM1*遺伝子多型と*NAT2*遺伝子多型の組み合わせ

*GSTM1*と*NAT2*の遺伝子型により4群（*GSTM1*陽性型/*NAT2*迅速型，*GSTM1*陽性型/*NAT2*非迅速型，*GSTM1*欠損型/*NAT2*迅速型，*GSTM1*欠損型/*NAT2*非迅速型）に分類し検討した．*GSTM1*陽性型/*NAT2*迅速型の個体の割合は，対照群（47/177人，26.6%）に比し胃癌群（21/145人，14.5%）において低かった（p<0.05）．逆に，*GSTM1*欠損型/*NAT2*非迅速型が胃癌患者の34.5%を占めており，対照群（21.5%）と比較して高率であった（p<0.05）．

Table 7. Incidence of *p53* gene point mutations with respect to risk factors of gastric cancer in patients

Factor	*p53* gene point mutation (%)
Lauren's type	
Intestinal	23/67 (34.3)*
Diffuse	12/79 (15.2)*
Subsite	
Cardia	6/19 (31.6)
Corpus and antrum	29/127 (22.8)
Smoking status	
Smoker	17/60 (28.3)
Non-smoker	18/85 (21.2)
Drinking status	
Drinker	24/72 (33.3)**
Non-Drinker	11/72 (15.3)**
CYP1A1	
Ile/Ile	25/84 (29.8)
Val+	10/60 (16.7)
CYP2E1	
c1/c1	29/107 (27.1)
c2+	6/38 (15.8)
GSTM1	
GSTM1+	14/58 (24.1)
GSTM1−	21/87 (24.1)
NAT2	
Rapid	16/58 (27.6)
Intermediate	14/69 (20.2)
Slow	5/18 (27.8)
CYP2E1 (c1/c1)/drinking status	
Drinker	21/55 (38.2)*
Non-drinker	8/52 (15.4)*
CYP2E1 (c1/c2 and c2/c2)/drinking status	
Drinker	3/17 (17.6)
Non-drinker	3/20 (15.0)
CYP1A1/GSTM1	
Ile/Ile+	9/34 (26.5)
Ile/Ile−	16/50 (32.0)
Ile/Val+	5/19 (26.3)
Ile/Val−	5/32 (15.6)
Val/Val+	0/4 (0.0)
Val/Val−	0/5 (0.0)

*p<0.01, **p<0.05 between two groups.

Ⅳ．胃癌組織における*p53*遺伝子点突然変異

胃癌患者146例中145例において*p53*遺伝子を増幅でき，点突然変異の有無について検索することができた．図6に直接シークエンスによる*p53*遺伝子突然変異の1例を示した．145例中35例（24.1%）において点突然変異がみられた（表6）．症例128では2カ所の変異がみられ，35症例で合計36個の*p53*遺伝子点突然変異が観察された．その内訳は，エクソン5の変異が11個，エクソン6が8個，エクソン7が9個，エクソン8が8個であった．エクソン9に変異はみられなかった．36個の変異の内訳はミスセンス変異が29個，ナンセンス変異が5個，サイレント変異が2個であった．症例128にみられた2個の遺伝子変異はサイレント変異1個とミスセンス変異1個であった．コドン別にみると，コドン220，245，282には3個，コドン141，175，213，244，248，273には2個の変異がみられた．

Ⅴ．胃癌患者における諸因子と*p53*遺伝子変異発生率の相関（表7）

1．組織型

びまん型胃癌（12/79人，15.2%）よりも腸型胃癌（23/67人，34.3%）に*p53*遺伝子突然変異が多く認められた（p=0.007<0.01）．

2．飲酒

非飲酒者群（11/72人，15.3%）に比較し，飲酒者群（24/72人，33.3%）では，変異を有する割合が高かった（p=0.012<0.05）．オッズ比は2.77であった．

3．*CYP2E1*と飲酒の組み合わせ

*CYP2E1*c1/c1を有する患者（107人）のうち，飲酒者群（21/55人，38.2%）は非飲酒者群（8/52人，15.4%）に比べ変異率が高かった（p=0.008<0.01）．オッズ比は3.40であった．一方，*CYP2E1*c2を有する患者（37人）のうち，飲酒者群（3/17人，17.6%）と非飲酒者群（3/20人，15.0%）では，変異率に差はみられなかった（p=0.83>0.05）．

4．*CYP1A1*と*CYP2E1*

*CYP1A1*Valを有する群（10/60人，16.7%）と比較して，*CYP1A1* Ile/Ile型の群（25/84人，29.8%）は変異率が高い傾向にあったが，統計学的な有意差はみられなかった（p=0.07>0.05）．*CYP2E1* c2を有する群（6/38人，15.8%）と比較して，*CYP2E1* c1/c1型の群（29/107人，27.1%）は変異率が高い傾向にあったが，統計学的な有意差はみられなかった（p=0.16>0.05）．

5．その他

GSTM1，*NAT2*，*CYP1A1*と*GSTM1*，*NAT2*と*GSTM1*，胃癌発生部位（噴門部と非噴門部），喫煙等と*p53*遺伝子点突然変異発生率には相関がみられなかった．

考　　察

本研究では，はじめに4種類の代謝酵素の遺伝子多型と胃癌感受性との関連について，胃癌患者群と剖検症例対照群とで比較検討した．このようなケース・コントロールスタディで最も注意しなければならないことは，対照症例群の構成に偏りがないことである．本研究に用いた対照症例群は，胃癌症例群に対して年令分布や性別，喫煙歴や飲酒歴などの点で差はなかった．また，これまでの報告でこれら酵素の遺伝子多型と発癌感受性とに相関があるとされている大腸癌[8]，膀胱癌[9]，肺癌[10]に罹患した症例を，本研究では対照症例群から除外した．さらに，

本研究の対照群における*CYP1A1*, *GSTM1*, *NAT2*の各々の遺伝子型の出現頻度は，これまでに報告されている日本人を対象としたケース・コントロールスタディにおける対照群の頻度と同様である[9)16)22)]．たとえば，Hayashiら[16)]の報告によれば，健常な日本人における*CYP1A1*のIle/Ile型，Ile/Val型，Val/Val型の頻度は各々58.2%，33.7%，8.1%であり，今回の対照群における*CYP1A1*遺伝子多型の頻度（各々，58.8%，36.7%，4.5%）とほとんど変わらない．したがって，本研究の対照症例群には偏りはないと考えられる．

CYP1A1は肺などの肝外組織で発現している酵素であり，タバコ煙中のベンツピレン等の代謝活性化反応を触媒し，化学発癌に影響を与える重要な因子の一つである．*CYP1A1*コドン462 (Ile) に変異体をもつVal型酵素はIle型に比して誘導されやすく，この遺伝子型を有する個体は発癌感受性が高いと考えられている．実際，Val型は肺癌[10)]や腎細胞癌[23)]の発生に関連があると報告されている．発癌因子は腸上皮化生性胃粘膜からも吸収され，胃内のCYP酵素によって活性化されると考えられているので[24)]，胃におけるCYP1A1酵素活性の強弱が胃癌の発生にも関与している可能性がある．しかし，本研究では，患者群と対照群で*CYP1A1*遺伝子多型の頻度に差はなかった．*CYP1A1*遺伝子多型は胃癌発生の感受性に影響していないと思われる．

CYP2E1は，肝臓のみならず胃をはじめ肝臓外組織でも発現される酵素であり[1)25)]，食物に含まれる多種の低分子性癌原物質の酸化過程において触媒として機能しており[26)]，その酵素活性は胃癌発症感受性に影響を与える可能性がある[27)]．*CYP2E1*遺伝子にはいくつかの種類の多型がみられるが，そのうちのひとつである5'非翻訳領域の*Rsa* I多型は，転写因子の結合に影響を与え，活性発現に個体差を生じさせるといわれている[1)17)]．そこで今回，この遺伝子多型と胃の発癌感受性との観点から，ケース・コントロールスタディを行ったところ，c1/c1型を有する胃癌患者の割合は対照群に比べ有意に高く，c2を有する患者（c1/c2あるいはc2/c2）の割合は対照群と比較して有意に低かった．これはc1/c1型を有する個体は胃癌のリスクが高く，c2を有する個体は胃癌のリスクが低いことを示唆している．過去に胃癌感受性と*CYP2E1*遺伝子多型との関連を検討した研究は少ない．胃良性疾患患者148人と胃癌患者84人を対象として*CYP2E1*多型を調べたKatoら[28)]の報告によると，c1/c1型を有する個体は胃良性疾患患者群で87人（58.8%），胃癌患者群で55人（65.5%）で，若干後者で頻度が高いが，統計学的有意差は認めていない．日系ブラジル人を対象としたごく最近の研究[27)]では，胃癌患者59人と非胃癌患者133人でc1/c1型を有する個体の頻度に差はないが，肉食習慣などの因子で補正すると胃癌患者においてc1/c1型を有する個体の頻度が高い傾向にあると報告している．本研究では，喫煙と飲酒歴以外の情報がないため単純に比較はできないが，*CYP2E1*遺伝子多型は個体の胃癌発生感受性に影響している可能性が高い。ただし，その影響力は食生活などの違いによって異なると思われる．なお，本研究と同様の結果は肺癌[29)]や食道癌[30)]でも報告されている．

本研究に記載した*GSTM1*と*NAT2*の遺伝子多型と胃癌罹患率との関係は，すでにOdaら[18)]が報告した通りであるが，今回対照数を増やして結果をより確実なものとした．すなわち，GSTM1酵素活性がない*GSTM1*遺伝子欠損型の個体は，胃癌発症の危険性がやや高く，*NAT2*迅速アセチル化型は非迅速アセチル化型に比べ，胃癌発症の危険性が低い．これらの結果は，GSTM1とNAT2がともに，活性化された発癌化学物質をより速くグルタチオン抱合やアセチル化して体外に排泄するという機能に起因していると思われる．*GSTM1*遺伝子多型と胃癌発症感受性については，Katohら[31)]やHaradaら[32)]が同様の報告をしているが，両者に関連はないとする報告[28)]もみられる．また，*NAT2*遺伝子多型と胃癌発生についても関係はないとする報告[33)]がある．これらの点に関しては，今後，多数のケース・コントロールスタディの積み重ねを要する．

いずれにしても，本研究では，*CYP2E1*, *GSTM1*, *NAT2*の遺伝的多型が個体の胃癌発生の感受性に影響している可能性が示唆された．そこで，次に，これらの多型が胃癌の病理発生にどのように関わっているのかを明らかにするため，胃癌で高率に認められる遺伝子異常のひとつである*p53*遺伝子の点突然変異[34)]に着目した．*p53*遺伝子は393個のアミノ酸からなる癌抑制遺伝子であり，遺伝子変異やヘテロ接合性の消失などによって*p53*蛋白の機能が消失することが胃癌の発生過程に重要であると認識されている[35)]からである．胃癌組織でみられる点突然変異の大部分はエクソン5～8に存在することが知られている[11)14)36)]．本研究では，エクソン5～9について点突然変異の有無を調べたところ，胃癌の24.1%に変異がみられた．研究者によって差があるが，胃癌における*p53*遺伝子点突然変異率はおよそ19.4%から37.5%と報告されており[11)～15)36)]，本研究の結果は過去の報告に矛盾しない．さらに，びまん型胃癌と比較して腸型胃癌では*p53*遺伝子変異率が高い傾向にある[11)36)]と報告されているが，本研究においても，びまん型（15.2%）に比して腸型（34.3%）に変異が多かった．

*p53*遺伝子点突然変異出現率は，*GSTM1*あるいは*NAT2*の遺伝的多型とは相関を認めなかったが，飲酒歴および*CYP2E1*の遺伝的多型と関連していた．飲酒者は非飲酒者に比べ，点突然変異率が高かった．また統計学的有意差はなかったが，*CYP2E1*野生型対立遺伝子ホモ接合体（c1/c1）を有する個体に*p53*遺伝子点突然変異率が高い傾向にあった．これに飲酒歴の有無を加え検討してみると，野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する胃癌患者のうち，飲酒歴がある群において*p53*変異の発生頻度が有意に高かった．一方，*CYP2E1* c2型遺伝子を持つ胃癌患者群では，*p53*変異率は飲酒の有無に影響されなかった．したがって，少なくとも*CYP2E1*野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する飲酒者は，胃癌の病理発生に重要な鍵をにぎる遺伝子である*p53*遺伝子に点突然変異を生じやすく，胃癌発症に対する感受性が高いことが示唆される．胃癌患者には*CYP2E1*野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する個体が多く，その中で飲酒者において*p53*変異率が高いために，飲酒者全体においても非飲酒者に比し*p53*変異率が高いのであろう．ヒトにおける*CYP2E1*の遺伝子多型と酵素活性の強弱の相関については，必ずしも明らかにはなっていないが，野生型対立遺伝子ホモ接合体（c1/c1）を有する個体はc2遺伝子を有する個体に比べ，CYP2E1酵素活性が高く[37)]，またアルコールによって誘導されやすいとの報告[4)]がある．CYP2E1によって活性化された種々の癌原性化学物質は，宿主のDNAと結合し遺伝子異常を誘発することが知られている[1)]．したがって，*CYP2E1*野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する個体では，c2遺伝子を有する個体に比べ，癌原化学物質の活性化力が強く，胃癌になりやすいのかも知れない．またそのような個体では，飲酒によりCYP2E1活

性がさらに上昇し，これによって活性化されたなんらかの癌原化学物質が*p53*遺伝子点突然変異を誘発しているのかもしれない．

一方，上述のごとく，個体における胃癌発症感受性の点から見ると，*CYP2E1*のほか，*GSTM1*，*NAT2*との関連性が示唆され，飲酒単独では関連が認められなかった．胃癌発生過程には*p53*遺伝子だけでなく，*K-ras*，*c-met*，*K-sam*，*c-erbB-2*，*bcl-2*，*Cyclin E*，*APC*，*DCC*などさまざまな遺伝子の異常が関与している[35]ので，個体の胃癌発症感受性を高める因子のすべてが*p53*遺伝子点突然変異を高めるとは限らないと考えられる．逆に，*p53*遺伝子点突然変異の発生を誘発しやすい因子すべてが個体の発癌感受性に影響するとは限らないと思われる．

結　論

薬剤代謝酵素の遺伝的多型性が胃癌の感受性におよぼす影響を明らかにする目的で，胃癌患者と剖検症例の*CYP1A1*，*CYP2E1*，*GSTM1*，*NAT2*遺伝子多型を決定し，さらに，胃癌組織における*p53*遺伝子点突然変異との関連について検討した結果，以下の結論を得た．

1．*CYP2E1*，*GSTM1*，*NAT2*の遺伝的多型が胃癌発生の感受性に影響していることが示唆された．

2．*CYP2E1*野生型対立遺伝子ホモ接合体を有する飲酒者は，胃癌の病理発生に関与する*p53*遺伝子に点突然変異を生じやすく，胃癌に対する感受性が高いことが示唆された．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師中西功夫教授に深甚なる謝意を表します．また本研究の遂行に直接御指導，御教授頂きました小田惠夫助教授に深く感謝致します．さらに，貴重な組織を供与して頂いた金沢大学がん研究所附属病院磨伊正義教授，源利成助教授，小松市民総合病院高橋一郎先生に深謝します．最後に多大な御協力と御援助を賜った金沢大学医学部病理学第一講座員各位ならびに技術員各位に厚く御礼申し上げます．

なお，本研究の一部はXXIII International Congress of the International Academy of Pathology (2000, Nagoya) において発表した．

文　献

1) Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. DNA Cell Biol 15: 273-280, 1996

2) Kawajiri K, Eguchi H, Nakachi K, Sekiya T, Yamamoto M. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. Cancer Res 56: 72-76, 1996

3) Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosoamines in human liver microsomes. Carcinogenesis 13: 1789-1794, 1992

4) Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodénez P, Joannet I, Hispard E, Bardou LG, Menez JF. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorozoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. Pharmacogenetics 5: 298-304, 1995

5) Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulaton and expression of the human CYP2E1 gene due to the Rsa I polymorphism in the 5'-flanking region. J Biochem 116:321-326, 1994

6) Srám RJ. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. Environ Health Perspect 106: 231-239, 1998

7) Vineis P, Caporaso N, Tannenbaum SR, Skipper PL, Glogowski J, Bartsch H, Coda M, Talaska G, Kadlubar F. Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts, and cigarette smoking. Cancer Res 50: 3002-3004, 1990

8) Kiss I, Sándor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzyme. Anticancer Res 20: 519-522, 2000

9) Katoh T, Nakano M, Yoshioka M, Inatomi H, Matsumoto T, Kawamoto T. Urothelial cancer risk in relation to genotypes of glutathione S-transferase (GST) M1, T1, P1 and N-acetyltransferase 2 (NAT2), and tobacco smoking. J Occup Health 41: 12-18, 1999

10) Nakachi K, Imai K, Hayashi S, 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

11) Hsieh LL, Hsieh JT, Wang LY, Fang CY, Chang SH, Chen TC. p53 mutations in gastric cancers from Taiwan. Cancer Lett 100: 107-113, 1996

12) Lim BHG, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK, Iacopetta BJ. p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. Int J Cancer 69: 200-204, 1996

13) Ricevuto E, Ficorella C, Fusco C, Cannita K, Tessitore A, Toniato E, Gabriele A, Frati L, Marchetti P, Gulino A, Martinotti S. Molecular diagnosis of p53 mutations in gastric carcinoma by touch preparation. Am J Pathol 148: 405-413, 1996

14) Poremba C, Yandell DW, Huang Q, Little JB, Mellin W, Schmid KW, Böcker W, Dockhorn-Dworniczak B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. Virchows Arch 426: 447-455, 1995

15) Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. Int J Cancer 54: 759-764, 1993

16) Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 IA1 gene. J Biochem 110: 407-411, 1991

17) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. J Biochem 110: 559-565, 1991

18) Oda Y, Kobayashi M, Ooi A, Muroishi Y, Nakanishi I. Genotypes of glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase 2 in Japanese patients with gastric cancer. Gastric Cancer 2: 158-164, 1999

19) Abe M, Suzuki T, Deguchi T. An improved method for genotyping of N-acetyltransferase polymorphism by polymerase chain reaction. Jpn J Hum Genet 38: 163-168, 1993

20) Kobayashi M, Kawashima A, Mai M, Ooi A. Analysis of chromozome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 149: 1575-1584, 1996

21) Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal -type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 64: 31-49, 1965

22) Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, Ikemura K, Kawamoto T. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. Int J Cancer 83: 606-609, 1999

23) Longuemaux S, Deloménie C, Gallou C, Méjean A, Vincent-Viry M, Bouvier R, Droz D, Krishnamoorthy R, Galteau MM, Junien C, Béroud C, Dupret JM. Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes. Cancer Res 59: 2903-2908, 1999

24) Tatemichi M, Nomura S, Ogura T, Sone H, Nagata H, Esumi H. Mutagenic activation of environmental carcinogens by microsomes of gastric mucosa with intestinal metaplasia. Cancer Res 59: 3893-3898, 1999

25) Kato S, Onda M, Matsukura N, Matsuda N, Tokunaga A, Matsushita H, Kitoh T, Kudoh H, Naito Z, Asano G, Shields PG. Genotype-phenotype relationships for cytochrome p450s (CYP) in gastric normal and tumor tissues. Proc Am Assoc Cancer Res 40: 244,1999

26) Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem Res Toxicol 4: 168-179, 1991

27) Nishimoto IN, Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Arai T, Hamada GS, Kowalski LP, Tsugane S. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9: 675-680, 2000

28) Kato S, Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Genetic polymorphisms of the cancer related gene and Helicobacter pylori infection in Japanese gastric cancer patients. an age and gender matched case-control study. Cancer 77: 1654-1661, 1996

29) Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannug A, Hogberg J, Sundberg MI. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. FEBS Lett 319: 207-211, 1993

30) Lin DX, Tang YM, Peng Q, Lu SX, Ambrosone CB, Kadlubar FF. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutatione S-transferases T1,P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7: 1013-1018, 1998

31) Katoh T, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N, Ookuma R, Bell DA. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. Carcinogenesis 17: 1855-1859, 1996

32) Harada S, Misawa S, Nakamura T, Tanaka N, Ueno E, Nozoe M. Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. Hum Genet 90: 62-64, 1992

33) Katoh T, Boissy R, Nagata N, Kitagawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T, Bell DA. Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. Int J Cancer 85: 46-49, 2000

34) Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. Semin Oncol 23: 307-315, 1996

35) Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. Cancer 75: 1410-1417, 1995

36) Tolbert D, Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, Voe GD, MacDonald J, Benedetti J, Stemmermann GN. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. Cancer Causes Control 10: 227-231, 1999

37) Marchand LL, Wilkinson GR, Wilkens LR. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8: 495-500, 1999

Relation between Genotypic Polymorphisms of Drug Metabolizing Enzymes and Gastric Cancer Susceptibility

Shioto Suzuki, First Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109,** 300 — 310 (2000)

Key words gastric cancer, genetic susceptibility, metabolizing enzyme polymorphism, *p53* gene point mutation

Abstract

Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes have recently been shown to affect the susceptibility to chemical carcinogenesis. In the present study, the genotypes of *cytochromes P450* (*CYP1A1* exon7 and *CYP2E1* transcription region), *glutathione-S-transferase (GST) M1* and *N-acetyltransferase (NAT) 2* were investigated by PCR, allele-specific PCR or restriction fragment length polymorphisms following PCR in 146 Japanese patients with gastric cancer and 177 autopsied patients without stomach, lung, urinary bladder, or colon cancer. In addition, *p53* gene point mutations of exons 5 through 9 in gastric cancer tissues were determined by direct sequencing to investigate which polymorphisms are closely related to the induction of genetic alterations. No significant difference in the *CYP1A1* genotypes was observed between the cancer and control groups. The frequencies of *CYP2E1* c1/c1 genotype and *GSTM1* null genotype were significantly higher in patients with gastric cancer than in control subjects. The frequency of patients with the homozygously wild genotype of *NAT2* (rapid acetylator) was significantly lower in the cancer group than in the control group. Point mutations in exons 5, 6, 7 or 8 of *p53* gene were detected in 35 of 145 (24.1%) cancer cases. *p53* gene point mutations were more frequently observed in gastric cancer patients with CYP2E1 c1/c1 genotype than in patients with c2 allele, although not significantly. However, the incidence of *p53* gene point mutations was significantly higher in gastric cancer patients with *CYP2E1* c1/c1 genotype and a history of alcohol-drinking than in those with *CYP2E1* c1/c1 genotype but without a drinking history. These findings suggest that individual susceptibility for gastric cancer is influenced by *CYP2E1, GSTM1* and *NAT2* genotypes. In particular, individuals with both *CYP2E1* c1/c1 genotype and a drinking history have an increased risk of gastric cancer with a high frequency of *p53* gene point mutations in the gastric mucosa.