

放射線発がんの主経路は DNA 損傷を起源としない

渡邊正己

京都大学名誉教授
(放射線生物研究センター)

msm@rbnet.jp

1. はじめに

放射線による細胞がん化の第一標的は、DNA であると信じられてきた。確かに、網膜芽細胞腫 (RB) や家族性大腸ポリポーシス (FAP) などのように原因遺伝子が特定され、その遺伝子の突然変異が発がんの原因となることが明確なケースが多く知られている (*Knudson et al. 1971*)。それらの患者のがん発症は 10 万人に数名程度と極めて稀な事象である。しかし、実際には、ヒトの半数ががんに罹患する。*Armitage & Doll (1954)* は、ヒトの様々な組織の発がん頻度と年齢の関係を調べ、ヒトの年齢とがん死亡率の間には (がん死亡率 = $a \times \text{年齢}^n$) の関係が存在することを報告した。この発見は、米国国民の大腸がん死亡率と年齢の相関を調べた *Cairns* の研究 (*1975*) でも支持され、前出の関係式の n が 5 であると報告した。すなわち、ヒトのがん発生に 5 段階の独立事象が関係すると提案した。その仮説は、大腸がんは少なくとも 5 段階を進行し、その各段階に独立した遺伝子変異が関係するという“発がんの多段階突然変異モデル”によって裏打ちされることになった (*Fearon and Vogelstein 1990*)。この考え方は、非常に魅力的であるが、放射線による遺伝子の放射線突然変異率が遺伝子の違いに関わらずおよそ $10^{-5}/\text{Gy}$ 程度であることを考えると矛盾が生ずる。なぜなら、発がんに独立した 5 つの突然変異が必要とすると、発がん頻度は、単独遺伝子の突然変異変異率を 5 回掛け合わせた頻度、すなわち $(10^{-5}/\text{Gy})^5 = 10^{-25}/\text{Gy}$ ということになる。この頻度では、1 個の受精卵を出発点として分裂を繰り返し、およそ 6×10^{13} 個の細胞で出来ているヒトの体にはがんが生ずるはずがないという矛盾を説明せねばならない。

2. 放射線による細胞がん化は多段階突然変異説で説明できない

我々は、これまでシリアンハムスター (SHE) 細胞を用いた細胞がん化実験系を用いて放射線による細胞がん化誘導機構を追跡し、Gy あたりの細胞がん化頻度が平均的な体細胞突然変異頻度の 500~1,000 倍高いことを発見した (*Watanabe et al. 1980; 1984a; 1984b*)。さらに、放射線照射された細胞における突然変異と細胞がん化の出現動態を詳細に調べた。その結果、突然変異は、被ばく後、1~2 回の細胞分裂を経て固定・発現されるが、細胞がん化は、被ばく後、10 数回の細胞分裂な遅延的現象であり、突然変異の出現動態と全く違うことが判った (*Suzuki et al. 1989; Watanabe et al. 1990; 1991*)。これらのことは、細胞がん化が複数の突然変異の集積で生ずるという“多段階突然変異説” (*Fearon and Vogelstein 1990*) と矛盾するものであり、発がんは、突然変異を経由する

経路以外の発現頻度が極めて高い経路が存在することが強く示唆される。その後、ヒトの全遺伝子数がおよそ2万5千程度であることが明らかになった。そして、全遺伝子のおよそ10%が発がんに関係する遺伝子であるとされる。単独遺伝子の放射線突然変異率は、 $10^{-5}/\text{Gy}$ 程度であることを考えると、我々の研究結果から導いた放射線による細胞がん化率は、すべてのがん関連遺伝子が一度に変異を起こすという異常状況を想定して導かれる頻度よりも大きい。このことは、突然変異を経由する経路以外の発がん経路が存在するという我々の推測が正しいことを強く暗示する。

同じ時期に、ハーバード大学の Kennedy ら(1980)は、C3H10T1/2 細胞に X 線を照射した後、10 数回分裂させコンフルエントになった細胞を様々な希釈率でシャーレに植え込み直しフォーカスの出現頻度を求める実験をおこなった。もし、放射線照射後、突然変異と同じように固定・発現されるならば、希釈率に応じて生ずるフォーカス数が異なるはずである。しかし、結果は、希釈率に関係なくフォーカス出現率は同じであった。この結果をもとに、彼女は、放射線発がんの最も重要な原因は、照射時にすべての細胞に誘導される非遺伝的な変化であると指摘している。実にエレガントな実験で放射線発がんの最も重大な疑問を明らかにしたのであった。

このように、1980 年台に、我々を含む複数の研究グループは、放射線発がんが単純な遺伝子突然変異で生じているのではないことを指摘し、その原因を非遺伝的現象（エピジェネチック）と予想したが、その実体は明確にされないまま残されている (Sugahara and Watanabe, 1994)。そこで、我々は、およそ四半世紀にわたって、この矛盾を解決するために初代培養ヒト胎児(HE)細胞、マウス胎児(ME)細胞および SHE 細胞を用いて細胞がん化に関連する細胞内標的と発がんの経路を探索してきた。

3. 放射線発がんの引き金は長寿命ラジカル

そして、その研究成果から、我々は、放射線発がんの一次標的は、DNA そのものではないと強く信ずるようになった。その予想を確実にしたのは、ビタミン C による放射線の遺伝的効果軽減効果の研究成果である。これまで、遺伝的影響を含めて放射線の生物影響の主因は、生体を構成する細胞の 75~80%が水であるので、水の放射線分解で生じた OH あるいは H ラジカルが DNA を傷つけることであると考えられてきた。しかし、我々は、1990 年頃から報告されるようになった“細胞内の水の分布が均一でなく DNA 近傍はかなり疎水性である”とする報告を考慮して、これまでの常識的な考え方と違って、“OH ラジカルの様な活性ラジカルは直接 DNA を攻撃しないのではないか？”という疑問を持った。そのため、我々は、名古屋大学の宮崎らの協力を仰ぎ X 線照射された細胞内に生じたラジカルを直接観察する技術を開発し、細胞内に常温における半減期がおよそ 20 時間と長く活性の低い高分子ラジカル（長寿命ラジカル）が誘導されることを発見した (Miyazaki et al. 1991; Kumagai et al. 2003)。そして、この長寿命ラジカルの消長と突然変異と細胞がん化の誘導頻度が密接に連動したのである (Koyama et al. 1988)。ビタミン C やエピガロカテキンは、この長寿命ラジカルを効率良く捕捉するが OH や O_2 ラジカルを捕捉できない。一方、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、活性ラジカルを捕捉し DNA 損傷や細胞死を抑制する能力がある (Miyazaki et al. 1990; Watanabe et al. 1990)。さらに驚くべきことに、ビタミン C 処理による長寿命ラジカル捕捉効果と突然変異や細胞がん化頻度の軽減効果は、照射が終了して 20 分後や 20 時間後

でも観察される。この事実は、突然変異や細胞がん化の原因ラジカルが OH や O₂ ラジカルではないことを明確に示している。最近、このラジカルは、高分子タンパクのシステイン残基に生じたラジカルであることを明らかにした (Kumagai et al. 2003)。さらに、ビタミン C 処理は、放射線誘導遺伝的不安定性を抑制し、細胞寿命を延長させるので、これらの現象にも長寿命ラジカルが関与していると予想される (Kashino et al.; Roy et al. 2000; Tominaga et al. 2004)。

これらの結果を総合的に判断して、我々は、X 線照射によって細胞内に生じた短寿命の活性ラジカルは、遺伝物質 (DNA) を直接攻撃し細胞死や染色体構造異常を起こすが、長寿命の活性の低いラジカルは、遺伝物質 (DNA) を直接攻撃せず致死や染色体構造異常を起こさないが、細胞がん化を引き起こす主因となると予想したのである (Miyazaki et al. ; Watanabe et al. 1990, Koyama et al. 1998)。

4. 放射線発がんで見られる変化は染色体異数化

こうした我々の実験結果と推測が正しいとすると、現在、最も受け入れられている発がん機構説であり”DNA 損傷→染色体異常→突然変異→発がん”という経路で発がんが起きるとする”発がんの突然変異説”に疑問を投げ掛けるものとなる。

それでは、なにが放射線による発がんの原因であるだろうか？放射線で誘導したがん細胞の形質を調べると、マウス、ハムスターなど種を超えて共通して観察される形質として染色体の異数化があげられる (Suzuki et al. 1989; Watanabe et al. 1990)。マウス細胞では、倍数化も簡単に生じ無限増殖能の獲得に関与するが細胞がん化には関与しない。がん抑制遺伝子 p53 機能をノックアウトしたマウス細胞では異数化が起きるが、p53 機能が正常のマウス細胞では倍数化は起きるものの異数化の頻度は極めて少ない。この現象は、放射線発がんに限らず化学発がんや高密度培養でも、かつ、自然発がんの際にも共通して見られる。現時点では、p53 機能がどのような仕組みで異数化を抑制するかは明確ではないが、我々の得た結果からは、少なくとも細胞周期制御機能や細胞死誘導機能が関与しない経路が存在することが予想される。染色体異数化が生ずる経路としては、これまでにテロメア不安定化に伴う染色体融合-架橋-切断 (FBB) サイクルを介して生ずる経路と、四倍数化した後、異常細胞分裂を介して染色体が脱落して異数化する経路の存在が予想されてきた。しかし、我々の研究成果では、テロメア不安定化は、染色体構造異常の原因になるもの染色体異数化の原因となる可能性は少ないこと、三倍体化の経路と四倍体化の経路が明確に異なることを示しており、直接異数化を起こす第三の経路の存在を予想せねばならないことを示唆している。最近、我々は、異数化を起こした細胞では、異数化した染色体にコードされている遺伝子ばかりか、異数化していない染色体にコードされている遺伝子を含めて大幅な遺伝子発現攪乱が起きることを発見した (Nawata et al, 2011)。染色体のバランスの変化が細胞がん化の推進力となる。細胞老化は、細胞が不死化するのを抑制する最大の障壁であり、発がん抑制機構となる。

不思議なことであるが染色体異常と発がんの関係を直接調査した疫学調査で十分な研究は少ない。そこで敢えて二つの報告を引用して発がんに関連する染色体異常について考察してみる。その第一の研究は、Tonomura (1983)らが「Radiation-induced Chromosome in Men」に発表した日本人の自然染色体異常の年齢別発生頻度の結果である。そこに報告されている結果は、大方の予想と違って、全年齢で単純な相互組み替えのような安定

型染色体異常頻度よりも二動原体に代表される不安定型染色体異常頻度が高頻度に見られる。これは、これまでの放射線生物学の常識と大きく異なる結果であるが（１）中国の高い自然放射線地域の住民には、フラグメントを伴わない二動原体が主流であるという結果（Zhang et al. 1993）や（２）放射線による遅延型染色体異常はフラグメントのない二動原体染色体が主流であるという結果（Roy et al. 2000; Undarmaa et al. 2004）を矛盾なく結びつけるものである。遺伝的不安定性形質を獲得した細胞では、遺伝子の変異を誘導する性質が細胞内に誘導維持され、細胞分裂の度に不安定型染色体異常を生成し、それを持った細胞は死んでしまうものの、新たに染色体異常が誘導され続けるからであろう。我々の研究成果でも、放射線誘導型遺伝的不安定性を記憶する細胞内異常の一つが染色体末端に存在するテロメアあるいはサブテロメア構造であることが明らかである（Mukaida et al. 2007; Ojima et al. 2004; Urushibara et al. 2004; Toyokuni et al. 2009）。しかし、Tonomura ら（1983）の結果では、日本人が加齢とともに高頻度に蓄積する染色体異常は、ハイパーディプロイド(高二倍体)であり、構造異常にくらべ数十～数百倍に達する。一見矛盾するように思われるが、染色体異常が生じた直後の細胞分裂期では、染色体構造異常が観測できるものの、其の異常を持った細胞は死亡するので、生き残る

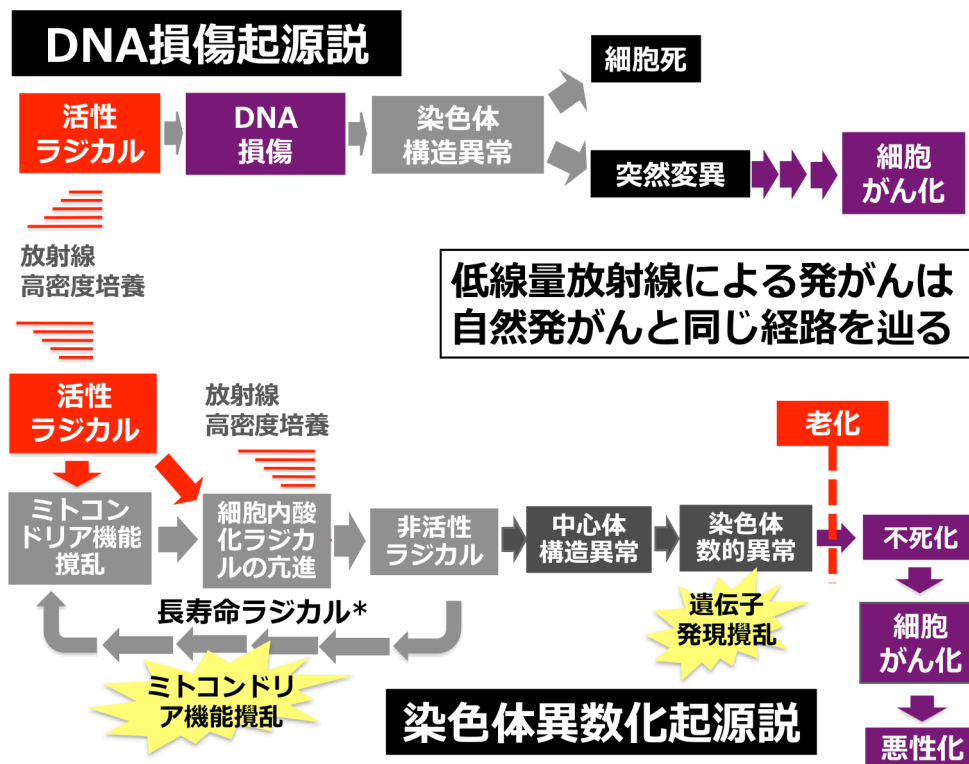


図 1 放射線発がんの DNA 損傷起源説と染色体異数化起源説。

細胞で発がんに関与する染色体異常は、致死に関与しない異数化であると考えらることでその矛盾は打ち消される。そして、日本人集団の加齢に伴う異数化出現頻度は、日本のがん罹患率の年齢依存性のデータとよく一致している。Tomomura ら(1983)の結果でも、染色体構造異常頻度は、年齢と共に上昇するものの、高二倍体染色体異常頻度に比べると比較にならないほど低頻度である。さらに、興味深いことに原爆被ばく者におけるがんの出現予想とほとんど同じパターンである。

このように研究室でおこなっている実験発がんの結果と日本人における染色体異常誘導と発がん罹患率に関する分子疫学研究の結果がよく一致するという事実の裏には、これらに共通した機構が関与しているからと予想できないだろうか？これらの結果を、我々は、自己の実験発がんの結果である「発がんの主因は染色体異数化である」という結論を基盤において、「放射線発がんは自然発がんと同じ経路を辿って生じている」そして「DNA 損傷-染色体構造異常を引き金とする発がん経路を経て生ずる発がんは、染色体異数化を起源とした経路を経て生ずる発がんにくらべ極めて稀な現象である」と予想し、図 1 に示すような作業仮説として取り入れ、その仮説の是非を検証している。

5. 染色体異数化はどのようにして生ずるのか？

もし、この仮説が正しいとしたら、なにが染色体の異数化を生じさせるのであろうか？我々の研究で細胞がん化頻度を上げる高密度培養や放射線被ばく処理は、一様に、細胞内酸化度を亢進する。この酸化度の亢進は、ミトコンドリア膜における電子保持能力の低下に伴い細胞質内へ放出される電子量が増すために細胞内活性酸素ラジカル量を増加させることによって生ずる。それに伴って中心体構造異常を経由して生ずる染色体異数化を経由する経路が存在する (Nakahata et al. 1998 ; Miyakoda et al. 2004 ; Ojima et al. 2004)。確かに放射線照射や高密度培養によって中心体構造異常が容易に誘導される。中心体が消失すると細胞は、分裂できず巨大細胞化して死滅する。中心体が増えそれぞれの中心体を極とした多極分裂が起きると、本来に二細胞に分割されるべき遺伝物質が二細胞以上に分配されるために遺伝情報の不足が起り細胞は生きんこることができない。しかし、多中心体となった細胞で、複数の中心体が二極に別れ、あたかも二極分裂のように核分裂を起こすと、一本の染色体のセントロメアに両極から複数の紡錘子が結合 (メカトリック結合) し引き合うことにより染色体分配時に力学的不安定が生じ、染色体分配が遅れる現象(取り残し染色体)が高頻度で起きる。この現象が染色体異数化を起こす有力な候補である。この経路で生じた染色体異数化細胞のうち染色体を獲得した細胞は、遺伝情報の不足は生じず生存できる。

この考え方は、7Gy の X 線を照射した CGL1 細胞のトランスフォーメーションが細胞内酸化度の亢進に引き続く細胞膜異常が原因であるとする Radpath と Gutierrez (2001) の結果、およびミトコンドリア電子伝達系で働く SDH の欠損細胞では、細胞内酸化度が亢進し染色体異数化の原因となるという Slane ら (2006) の結果によっても強く支持される。一般的に構造タンパクや酵素タンパクに限らずタンパクが一時的に構造異常を起こし機能不全を起こしても、その青写真である DNA が正常に保たれば、再度、正常なタンパク質を再構築することが出来るので、重要遺伝子に構造異常が起きた場合にくらべ細胞を致死に導かれる可能性は格段に低いのではないか？事実、我々の結果では、放射線照射や高密度培養による生理的ストレスは、細胞集団の細胞内活性酸素ラジカル量を

平常時の 4~5 倍に増加させるが、がん化してしまった細胞の細胞内酸化度は、高いまま維持されているケースはほとんどないことが判っている。一見矛盾するように思われるが、酸素酸化度が増加するとタンパク損傷が増加し染色体異数化頻度を上昇させ細胞をがん化させる切っ掛けになるが、がん化した細胞では高い酸化度を保つことは細胞の生存には有利ではなく酸化度を高く保つ必要性はないのだろう。あるいは、細胞内酸化度上昇に寄与するミトコンドリアを介したエネルギー産生を放棄し、解糖系が活性化されるためかもしれないが詳細は不明である。

ここに紹介した最近の低線量放射線に対する細胞のがん化応答反応に関する研究結果は、放射線による細胞がん化の経路として、従来、考えられていた DNA 損傷を起源とする経路のほか、セントロゾーム損傷を起源とする経路が存在し、後者が発がんの圧倒的主経路である可能性を示唆する。また、この経路は、通常ミトコンドリアにおけるエネルギー産生機構の一時的攪乱によって活性化される。従って、主経路を経て生ずる放射線発がんは、自然発がんと同じ機構で生み出されるものと推測できる。

参考文献

- Kennedy AR, Fox M, Murphy G, Little JB : *Proc Nat Acad Sci*. **77**: 7262-7266, 1980 .
- Fearon ER, Vogelstein B: *Cell* **61**: 759-767, 1990.
- Kashino G, Kodama S, Nakayama Y, Suzuki K, Fukase K, Goto M, Watanabe M: *Free Radic Biol Med*. **35**: 438-443, 2003.
- Koyama S, Kodama S, Suzuki K, Matsumoto T, Miyazaki T, Watanabe M: *Mutat Re*.**421**: 45-54, 1998.
- Knudson AG. Jr : *Proc Nat Acad Sci USA*. **68**: 820-823, 1971.
- Kumagai J, Masui K, Itagaki J, Shiotani M, Kodama S, Watanabe M, Miyazaki T: *Radiat Res*. **160**: 95-102, 2003.
- Miyakoda M, Nakahata K, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M: *Biochem Biophys Res Commun*. **266**: 377-381, 1999.
- Miyazaki T, Hayakawa Y, Suzuki K, Suzuki M, Watanabe M: *Radiat Res*. **124**: 66-72, 1990.
- Miyazaki T, Yoshimura T, Suzuki, Watanabe M: *Magnetic Resonance in Med*. **6**: 346-348, 1994.
- Mukaida N, Kodama S, Suzuki K, Oshimura M, Watanabe M: *Radiat Res*. **167**: 675-681, 2007.
- Nakahata K, Miyakoda M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M: *Int J Hyperthermia*. **18**: 332-343, 2002.
- Nawata H, Kashino G, Tano K, Daino K, Shimada Y, Kugoh H, Oshimura M, Watanabe M : *PLoS One*. **6**: e25319, 2011.
- Ojima M, Hamano H, Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M: *J Radiat Res (Tokyo)*. **45**: 1-13, 2004.
- Radpath JL and Gutierrez M : *Int J Radiat Biol*. **77**: 1081-1085, 2001.
- Roy K, Kodama S, Suzuki K, Fukase K, Watanabe M: *Radiat Res*. **154**: 659-666, 2000.
- Slane BG, Aykin-Burns N, Smith BJ, Kalen AL, Goswami PC, Domann FE, Spitz DR: *Cancer Res*. **66**: 7615-7620; 2006 .

- Sugahara T, Watanabe M: *Intern J Occupat Med Toxicol*. **3**: 129-136, 1994.
- Suzuki K, Watanabe M, Nikaido O: *Cancer Res*. **49**: 2134-2140, 1989.
- Tominaga H, Kodama S, Matsuda N, Suzuki K, Watanabe M: *J Radiat Res (Tokyo)*. **45**: 181-188, 2004.
- Tonomura A, Kishi K, Saito F: "*Radiation-Induced Chromosome In Man*", Alan R. Liss, Inc. 605-616, 1983, New York.
- Toyokuni H, Maruo A, Suzuki K, Watanabe M: *Radiat Res*. **171**: 198-203, 2009.
- Undarmaa B, Kodama S, Suzuki K, Niwa O, Watanabe M: *Biochem Biophys Res Commun*. **315**: 51-58, 2004.
- Urushibara A, Kodama S, Suzuki K, Desa MB, Suzuki F, Tsutsui T, Watanabe M: *Biochem Biophys Res Commun*. **313**: 1037-1043, 2004.
- Watanabe M, Kodama S, Suzuki K: *Cancer Res*. **50**: 760-765, 1990.
- Watanabe M, Suzuki M, Suzuki K, Hayakawa Y, Miyazaki T: *Radiat Res*. **124**: 73-78, 1990.
- Watanabe M, Suzuki K: *Mutat Res*. **249**: 71-80, 1991.
- Watanabe M, Suzuki N, Sawada S, Nikaido O: *Carcinogenesis*. **5**: 1293-1299, 1984b.
- Watanabe M, Horikawa M, Nikaido O: *Radiat Res*. **98**: 274-283, 1984a.
- Zhang W, Wang C, Chen D, Minamihisamatsu M, Morishima H, Yuan Y, Wei L, Sugahara T, Hayata I. *J Radiat Res (Tokyo)*. **44**: 69-74, 2003.