

放射線発がんの主経路は染色体異数化を起源とする

渡 邊 正 己*1

(2012年2月7日受理)

(2012年5月16日再受理)

Origin of Radiation Carcinogenesis is Chromosome Aneuploidy

Masami WATANABE*1

It has been believed that the first target of radiation carcinogenesis is DNA. However, this is not proved for radiation carcinogenesis yet. We discovered that frequency of aneuploid cell was closely related to that of radiation-induced cell transformation and natural cell transformation by high-density cultivation, but gene mutation was not. Cell with p53 gene becomes tetraploid, but does not get tumorigenicity. On the other hand, cells without p53 gene function become a triploid easily, and acquire tumorigenicity. Both radiation exposure and high-density cultivation elevated the level of intracellular oxidative radicals. These radicals induced centrosome destabilization and produced cells carrying extra centrosome, which promote merotelic attachment of chromosome by altering spindle geometry. Unresolved merotelic attachments can give rise to lagging chromosomes at anaphase. Aneuploidy was seen in high frequency in early process of cell transformation. These results strongly suggest that a main target of carcinogenesis by low dose radiation is not DNA, but is centrosome, which are the proteins to constitute chromosomal homeostasis maintenance mechanism. In addition, this route may be the same as that of natural carcinogenesis. These serial results support necessity of a review of a LNT hypothesis at a radioprotective point of view.

KEY WORDS: rediation carcinogenesis, mutation, non-targeted effects, genetical instability, long-lived radical, mitochondria, aneuploidy, centrosome.

I はじめに

放射線による細胞がん化の第一標的がDNAであることを示す証拠は多い。例えば、網膜芽細胞腫 (RB) や家族性大腸ポリポーシス (FAP) などは、原因遺伝子が特定されており、その遺伝子の突然変異が発がんの直接原因であることが明確である。しかし、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。ところが、ヒトは、その半数ががんになる。この事実は、ヒトのがんの多くがとても単独の遺伝子変異で生じているとは考えられないことを示唆する。一度に多くのがん

関連遺伝子が同時に変化するのだろうか？ 一方、ヒトゲノム解析プロジェクトの結果、ヒトの全遺伝子数は、意外に少なくおよそ25,000遺伝子であることがわかった。そのうち、約10%にあたるおよそ2,500遺伝子が細胞増殖や血管新生など何らかの意味でがん形質に関係する遺伝子であると予想されている。そして、一般的な遺伝子の放射線誘導突然変異率は、およそ 10^{-5} /Gy程度であることを考えると、細胞がん化 (3×10^{-2} /Gy) が起きるためには、2,500の関連遺伝子のすべてが同時に突然変異を起こさねばならないことになる。しかし、これまで、そうしたことが起きていることを示唆する結果はない。これらのことから放射線発がんは、突然変異を経る経路以外に発現頻度が極めて高い経路が存在すると考えるのが極めて自然である。ここでは、突然変異を経由しない発がん経路について解説する。

*1 京都大学放射線生物研究センター；京都市左京区吉田近衛町 (〒606-8501)
Radiation Biology Center, Kyoto University; Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.
E-mail: msm@orange.plala.or.jp

II 突然変異を経由しない発がん経路

それでは、突然変異を経由しない発がん経路とはどういったものであろうか？最近、発がん標的がDNAでない可能性が指摘されるようになってきた。例えば、マイクロビームで細胞一個の単位で照射を制御できる技術を使った研究で、被ばくした細胞自身でなく被ばくしていない細胞ががん化する、あるいは細胞質のみへの被ばくで細胞ががん化する現象があることが見つかっている¹⁻³⁾。いわゆる「バイスタンダー効果」である。また、被ばく後、生存した細胞が数十回分裂を繰り返して生まれた子孫細胞ががん化することも知られている。この現象は「遺伝的不安定性」と呼ばれる。どちらの現象も、がん化する細胞のDNAが直接被ばくすることは不要である。すなわち、放射線の標的がDNAである必要がなく、放射線の生物影響の代表的ドグマであった(DNA)標的説に対して「非標的説」と総称されている。DNAでなければ何が放射線発がんの標的であろうか？

III 放射線発がんの起源は染色体異数化

我々のこれまで40年近い研究成果は、放射線を照射して実験的にがん化させた細胞において、最初に見られる変化が染色体の異数化であることを明確に示している^{4,5)}。多くのがん細胞で観測される染色体構造異常は、がん化の初期にはほとんど観測されない。この現象は、マウス、ハムスターおよびラット胎児由来細胞に共通した現象である。さらに驚くことに、こうした染色体異数化は、放射線などの発がん要因で処理されたときに留まらず、培養時に高い密度を経験させるなど、培養条件を変えることで容易に生じ、その変化が細胞の無限増殖能の獲得とがん化に繋がることが判った。

IV ヒト細胞はなぜがん化しないのか？

一方、ヒト由来細胞をがん化させることは極めて難しく、私の研究歴に等しい40年以上も世界中でたくさんのがん研究者が繰り返し取り組んだにもかかわらず、成功例は数例を数えるに過ぎない^{6,7)}。そして、その成功例の追試に成功したという報告もない。けれども、ヒト胎児由来培養細胞も発がん処理をされると、他の実験動物の胎児由来細胞と同様に一連のがん化形質、すなわち、細胞分裂寿命の延長、悪性形態変化、染色体異数化、基質非依存性増殖能の獲得、遺伝的不安定性などを発現する。しかし、他の実験動物細胞と違ってヒト細胞は、容易に無限増殖能を獲得できず、試験管内でヒト胎児細胞

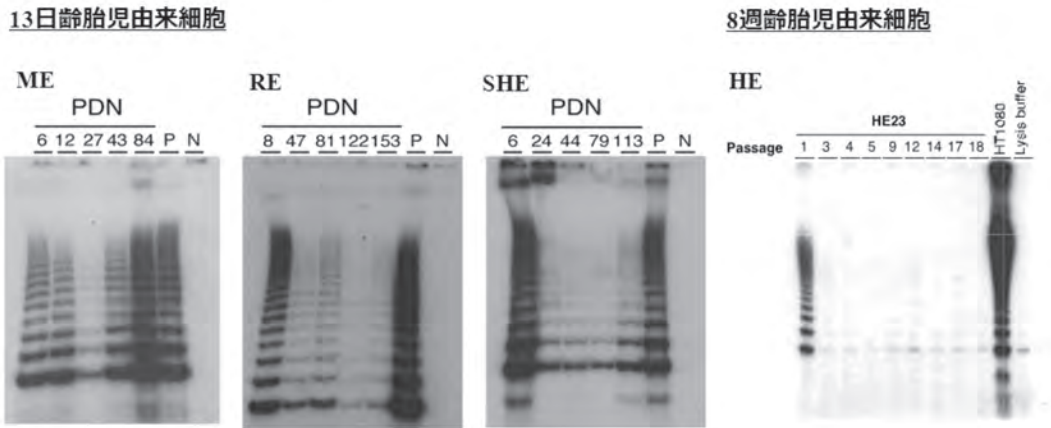
をがん化することはできていない。しかし、私達の二人に一人はがんに罹患する。このことは、他の動物細胞に比べて、ヒト細胞は無限増殖能を獲得(不死化)するために必要な変化が極めて起こりにくいことを示している。

細胞の試験管内寿命を決定する一つの仕組みとして、染色体末端に存在するテロメアの役割が良く知られている。ほ乳類のテロメアはTTAGGGの6塩基の単純繰り返し構造で染色体の末端に存在し、DNA複製毎に少しずつ短縮し、ある一定の長さを切ると遺伝情報をコードする遺伝子部分が機能なくなり細胞は老化し死亡するとされている。無限増殖能を持つ幹細胞やがん細胞は、短くなったテロメアを元に戻す合成酵素テロメラーゼが機能している。したがって、テロメラーゼ活性を復活させることで細胞を不死化できる。長い間、ヒト体細胞には、何らかの理由でこのテロメラーゼ活性がないと信じられてきたが、我々は、ヒト胎児由来細胞のテロメラーゼ活性を調べたところ、ビトロで培養を開始した時点では、他の動物由来体細胞と同様に強いテロメラーゼ活性を持っていることを発見した(第1図)⁸⁾。しかし、培養を開始し数回の細胞分裂のうちに劇的にテロメラーゼ活性を失う。マウスやハムスターおよびラット由来細胞は、継代が進むと一時的にテロメラーゼ活性の低下を起こすが、再び活性を取り戻し不死化しがん化の道を進むことができる^{8,9)}。この性質の違いがヒト細胞をビトロでがん化させることができない最大の原因であると考えられる。なぜならば、正常ヒト細胞をがん化するためにテロメラーゼ活性を一義的に制御しているテロメラーゼ触媒サブユニット(TERT)遺伝子の活性化が極めて有効であることが知られているからである。テロメラーゼ活性は幹細胞から前駆細胞にかけて特異的に発現されていることも良く知られており、我々の発見は、がん化が分化の制御異常から容易に生ずることを意味している。

そして、細胞の分裂回数を考えるとヒト細胞集団はテロメラーゼ活性を一斉に失っていることとなり、この現象に潜む遺伝子発現シャットオフ機構は、がん化機構を考える上でも、分化を考える上でも極めて貴重な現象である。

V 染色体異数化の標的は何か？

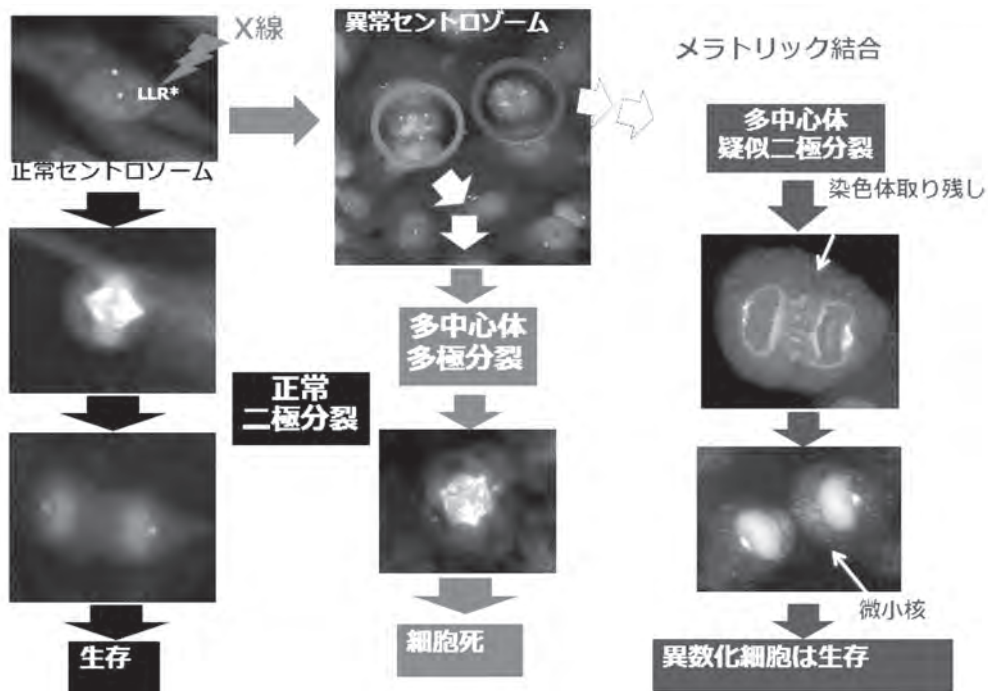
さて、III章では、がん化細胞に最初に普遍的に見られる変化が染色体の異数化であることを示した^{4,5)}。そうであれば、発がんに関係する標的は、染色体異数化を引き起こす細胞内構造であると推測できる。我々は、そ



第1図 様々な動物胎児由来初代培養細胞の培養に伴うテロメラーゼ活性の変動

の標的候補としてテロメア，サブテロメア，セントロメア，セントロゾーム（中心体）などに注目して検討したが，得られた結果から中心体とその第一候補と考えている。放射線照射や高密度培養は，中心体数の増減など様々な異常を誘導する。勿論，こうした異常を持った細胞の多くは細胞分裂がうまくゆかず死を迎えるであろう。しかし，我々の結果は，異常を持った細胞のうち，無視できない多くの細胞が生き残ることを示している。その生き残りの過程で，染色体の異数化が起きていると予想される。その経路を第2図に示す。

通常，中心体が増加した細胞が多極分裂を起こすと核分裂がうまくゆかず細胞は死を迎える。その場合，二個の娘細胞に受け渡されるべき染色体が，三個以上の細胞に分散されるので，全ての遺伝情報が個々の細胞に受け継がれる可能性は極めて低いからであろう。しかし，増えた中心体が二極に集まって疑似二極分裂を起こすと，複数の中心体が集合した極から複数の紡錘子が伸び動原体にメロテリック結合することがわかった。メロテリック結合部では，染色体分離時に力学的不均衡が生じ染色体不均等分離が生ずる。そのため，染色体の取り残しが



第2図 染色体異数化誘導経路

起きるが、引き続く細胞分裂時に一方の細胞に染色体が取り込まれることになる。染色体が異数化した細胞では遺伝子発現が大きく変化し、種々のがん形質を発現するようになる。現時点で、我々は、「中心体構造異常⇒染色体異数化⇒細胞がん化」が、放射線発がんの主経路であると結論している。

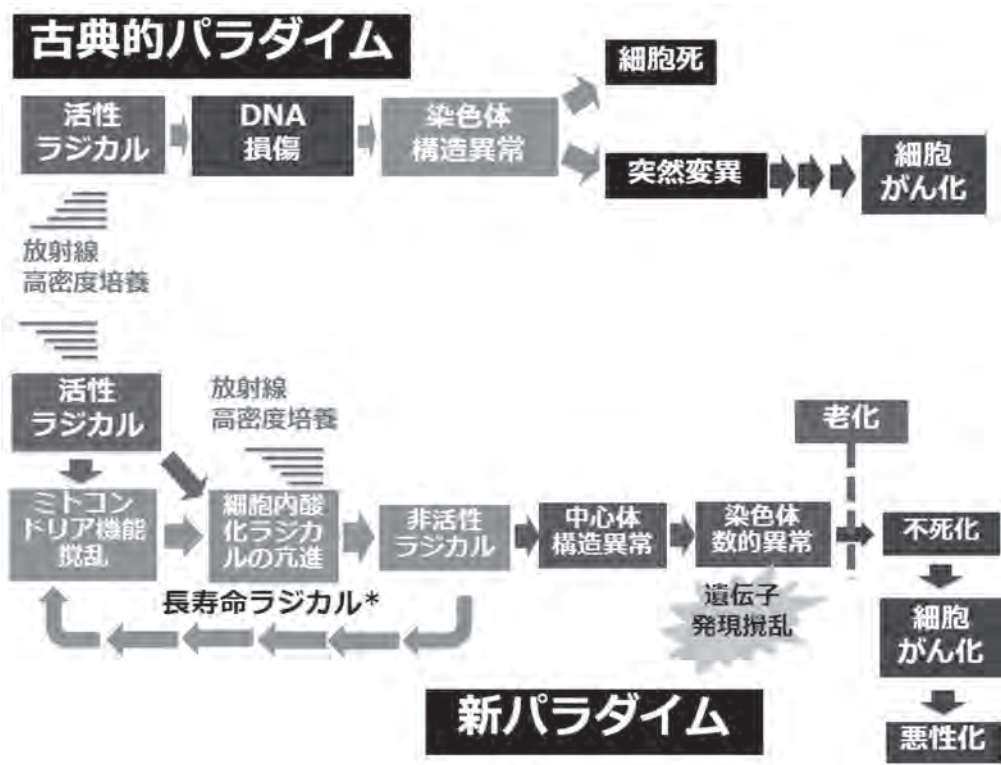
VI 染色体異数化の標的は何か？

染色体異数化はどのようにして細胞がん化を促進するのであろうか？我々は、マウスやヒトの胎児由来細胞から三倍体細胞と四倍体細胞を分離し、それぞれの細胞におけるがん形質発現を調べたが、四倍体細胞は無限増殖能を獲得するものの、基質非依存性増殖能や造腫瘍性を獲得していないことが判った。一方、三倍体細胞では、トリソミー化した染色体に限らず正常数のままである染色体にコードされた遺伝子でもその発現が異常になっていることが判った¹⁰⁾。それに伴い、細胞増殖能が亢進し、DNA 損傷性が増し、かつ、基質非依存性増殖能や造腫瘍性を獲得している。三倍体化が細胞がん化を誘導する仕組みはまだ明確ではないが、三倍体化が細胞がん化の原因であることは強く示唆される。

我々の成果を総合的に解釈すると、第3図下段に示す

経路を辿る可能性が大きい。まず、放射線は細胞内ミトコンドリア機能を攪乱させ、電子伝達系を不調とするため、電子伝達系から電子が漏れだし細胞内酸化ラジカル量を増加させる。我々は、このラジカルのうち発がんの主役は、常温で20時間以上の半減期を持つ長寿命ラジカルであると考えている。この長寿命ラジカルは、細胞内高分子タンパクに存在するスルフィニル残基に生じたものであり、ビタミンCやエピガロカテキンなどで効率よく捕捉される特徴を持つものである¹¹⁻¹³⁾。このことは、放射線による生体影響がOHラジカルやO₂⁻ラジカルなどの活性の高いラジカルであるとする既存の概念と根本的に異なる。活性の高いラジカルは、DMSOなどのラジカルスクベンジャーで捕捉されるが、活性ラジカルの常温細胞内における半減期が200ナノ秒以下と短いので、スクベンジャー効果は、放射線照射中に処理されたときに限られる。しかし、我々の最近の研究成果では、放射線処理後、20分を経た後からビタミンCを処理しても細胞がん化を完璧に抑制できることがわかった¹⁴⁾。放射線照射終了20分後に細胞内に存在しビタミンCで捕捉できるラジカル、すなわち長寿命ラジカルが発がんの原因ラジカルであると考えられる。

長寿命ラジカルは、細胞内の高分子をランダムに攻撃



第3図 放射線発がんのDNA損傷起源説と非DNA損傷起源説

するが、その標的の一つが中心体である。確かに、発がんが誘導される放射線を被ばくした細胞や高密度培養された細胞では、中心体の増加が観察される。ミトコンドリアから漏れ出る電子が細胞内酸化ラジカルを生じ、細胞内高分子を損傷するという反応は、通常の生理活動においても日常茶飯事に生じていることであるが、細胞には、そうしたラジカルを捕捉し無毒化する機構が備わっており、損傷生成と無毒化が絶妙にバランスをとっているものと思われる¹⁵⁾。ヒトの細胞は、他の実験動物の細胞に比べ細胞内酸化度を一定に保つ能力が格段に整っている。このことがヒトの細胞が発がん化しにくい理由の一つである可能性も大きい。放射線を被ばくした時は、そのバランスが一時的に壊れ発がん影響を顕在化させる。すなわち、放射線防護で問題とされるレベルの低線量放射線は、自然生理活動のバランスを壊す働きをしているに過ぎず、それ自体が発がんの原因損傷を作っているのではないだろう。言い換えれば、低線量放射線による発がんは自然発がんを押し上げているに過ぎない。バランスを壊す要因は、放射のような外来要因に限らず、通常の生理活動自身も含まれるであろう。したがって、発がんは避けることのできない現象でありその頻度も桁外れに大きくなる。加えて、生ずる原因損傷は非 DNA 損傷である。したがって、青写真である DNA が正常に保たれているので、中心体の機能異常で染色体の不均衡分配が一度生じたとしても、次の分裂時には、正常な中心体によって正常な分裂が行われるであろう。

VII おわりに

我々の結果は、放射線発がんの経路には DNA 損傷を起源とする経路以外に、DNA 損傷を起源としない経路が存在することを示している。そして、DNA 損傷を起源としない経路が圧倒的主経路である。したがって、国際放射線防護委員会が採用する「放射線発がんの原因は、DNA 損傷である」という大前提の上に成り立っている閾値無し直線モデル (LNT モデル) によって放射線の発がん危険度を推測することに科学的な妥当性はなくなった。また、放射線によって誘導される DNA 損傷を起源としない発がん経路で起きている現象は、自然発がん経路で起きている現象と区別することができない。自然発がんの頻度は、遺伝子の突然変異頻度に比べ、数百倍～千倍高いので、低線量域には、必然的に「生理学的閾値」が存在すると考えるのが最も実際に近いといえる。その意味で、放射線発がんリスクを推測するために、LNT モデルの利用は再考されるべきである。放射線発

がんの標的が DNA であると考えて放射線防護の本質を理解することはできず、安全な放射線防護技術の確立はできない。いま望まれるのは、低線量放射線の生体影響と自然発がんの仕組みの全容を明らかにし、科学的基盤に立った放射線防護概念を再構築することである。

参考文献

- 1) H. ZHOU, G. RANDERS-PEHRSON, C. A. WALDREN, D. VANNAIS, E. J. HALL and T. K. HEI; Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (5), 2099–2104 (2000).
- 2) S. G. SAWANT, G. RANDERS-PEHRSON, C. R. GEARD, D. J. BRENNER and E. J. HALL; The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells, *Radiat. Res.*, **155** (3) 397–401 (2001).
- 3) S. A. MITCHELL, G. RANDERS-PEHRSON, D. J. BRENNER and E. J. HALL; The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact, *Radiat. Res.*, **161** (4), 397–401 (2004).
- 4) K. SUZUKI, N. YASUDA, F. SUZUKI, O. NIKAIKO and M. WATANABE; Trisomy of chromosome 9q: specific chromosome change associated with tumorigenicity during the process of X-ray-induced neoplastic transformation in golden hamster embryo cells, *Int. J. Cancer*, **44** (6), 1057–1061 (1989).
- 5) M. WATANABE, K. SUZUKI and S. KODAMA; Karyotypic changes with neoplastic conversion in morphologically transformed golden hamster embryo cells induced by X-rays, *Cancer Res.*, **50** (3), 760–765 (1990).
- 6) T. KAKUNAGA; Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75** (3), 1334–1338 (1978).
- 7) M. NAMBA, K. NISHITANI, F. HYODOH, F. FUKUSHIMA and T. KIMOTO; Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma rays, *Int. J. Cancer*, **35** (2), 275–280 (1985).
- 8) Z. YANG, S. KODAMA, K. SUZUKI and M. WATANABE; Telomerase activity, telomere length, and chromosome aberrations in the extension of life span of human embryo cells induced by low-dose X-rays, *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **39** (1), 35–51 (1998).
- 9) S. KODAMA, I. MORI, K. ROY, Z. YANG, K. SUZUKI and M. WATANABE; Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryo cells,

- Radiat. Res.*, **155** (1 Pt 2): 254–262 (2001).
- 10) H. NAWATA, G. KASHINO, K. TANO, K. DAINO, Y. SHIMADA, H. KUGOH, M. OSHIMURA and M. WATANABE; Dysregulation of gene expression in the artificial human trisomy cells of chromosome 8 associated with transformed cell phenotypes, *PLoS One*, **6** (9), e25319 (2011).
- 11) J. KUMAGAI, K. MASUI, Y. ITAGAKI, M. SHIOTANI, S. KODAMA, M. WATANABE and T. MIYAZAKI; Long-lived mutagenic radicals induced in mammalian cells by ionizing radiation are mainly localized to proteins, *Radiat. Res.*, **160** (1), 95–102 (2003).
- 12) J. KUMAGAI, M. NAKAMA, T. MIYAZAKI, T. ISE, S. KODAMA and M. WATANABE; Scavenging of long-lived radicals by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate and simultaneous suppression of mutation in irradiated mammalian cells, *Radiat. Phys. Chem.*, **64**, 293–297 (2002).
- 13) T. MATSUMOTO, T. MIYAZAKI, Y. KOSUGI, T. KUMADA, S. KOYAMA, S. KODAMA and M. WATANABE; Reaction of long-lived radicals and vitamin C in gamma-irradiated mammalian cells and their model system at 259 K. Tunneling reaction in biological system, *Radiat. Phys. Chem.*, **49** (5), 547–551 (1997).
- 14) S. KOYAMA, S. KODAMA, K. SUZUKI, T. MATSUMOTO, T. MIYAZAKI and M. WATANABE; Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation, *Mutat. Res.*, **421** (1), 45–54 (1998).
- 15) H. YOSHII and M. WATANABE; Intervention of oxygen-control ability to radiation sensitivity, cell aging and cell transformation, *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **50** (2), 127–137 (2009).



渡邊 正己 (わたなべ まさみ)

昭和48年金沢大院薬学研究科修了。薬博。横浜市大医助教授，長崎大薬教授，京都大原子炉実験所教授を経て平成24年4月より放射線生物研究センター特任教授。京都大学名誉教授。現職42年間，放射線発がん機構の研究に従事し「DNA損傷を起源としない細胞がん化経路」が発がんの圧倒的主経路であるとする新説を提言。