

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：萌芽研究
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19651020
 研究課題名（和文）タンパク損傷を起源とする放射線発がん経路
 研究課題名（英文）Route of radiation carcinogenesis which assume protein lesion origin
 研究代表者
 渡邊正己（WATANABE MASAMI）
 京都大学・原子炉実験所・教授
 研究者番号：20111768

研究成果の概要：

放射線は、様々な染色体異常を誘導するが、細胞がん化と密接に関連する異常は、染色体異数化であることが判った。染色体異数化は、放射線によって直接誘導されるのではなく、ミトコンドリアにおける電子伝達経路の恒常性崩壊が原因となって発生した酸化ラジカルが原因となっていると予想される。これらの結果は、発がん経路に DNA 損傷を起源としない経路が存在し、その経路が発がんの主経路であることを強く示唆している。

交付額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	0	1,300,000
総 計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、細胞がん化、中心体構造異常、染色体異数化

1. 研究開始当初の背景

がんは、多段階の形質変化が積み重なって起きることが臨床的な観察から古くから知られていた。そして、段階的に進む形質変化のそれぞれに密接に関係する遺伝子が存在し、その遺伝子に突然変異が起きることが発がんの第一歩でありアクセルであると考えられてきた。この考え方は、“発がんの多段階突然変異説”として、現在、最も有力な発がん機構に関する仮説である。しかし、依然としてこの仮説は実証されておらず発がんの全容を見渡すという視点でみると何らかの矛盾を伴っていることが多い。

我々は、1980 年代に、“発がんの突然変異説”の実体を明らかにする目的で、X 線を照射したゴールデン・シリアン・ハムスター(SHE)細胞を二群に分け、一方で細胞悪性形態変化(malignant morphological change)を指標にして細胞がん化頻度を求め、他方で 6 チオグアニン抵抗性の獲得を指標に HGPRT 遺伝子座における体細胞突然変異頻度を調べる研究を実施した。当時、我々

は、細胞がん化が突然変異によって生ずるなら両者の誘導パターンは類似したものになると予想していたが、その期待は裏切られ突然変異は、1.5Gy 以下の線量では殆ど誘導されないが、細胞がん化は、効率的に誘導されるなど細胞がん化と突然変異誘導パターンが全く異なることが判った。1.5Gy 以下の線量域における細胞がん化の誘導頻度は平均 $3 \times 10^{-3}/\text{Gy}$ で、変異の誘導頻度の $10^{-5}/\text{Gy}$ に比べて同じ線量域の突然変異頻度に比べて 300 倍以上高い。一方、2Gy 以上の線量域になると突然変異頻度は、線量に比例して指数関数的に増加するようになるが、細胞がん化頻度はプラトーに達した。“発がんの多段階突然変異説”が正しいとすれば、細胞のがん化頻度は、一段階ごとの突然変異率を掛け合わせた値になるはずで、我々の実験結果のように細胞がん化頻度が単独の突然変異頻度より 300～800 倍も大きい値をとることはあり得ない。この矛盾は、多くの研究者によって繰り返し報告されてきたが、このように発がん機構の基盤を揺る

がそのような矛盾であっても現在まで満足いく説明はなされていなかった。

2. 研究の目的

放射線による細胞がん化の第一標的が DNA でないことを支持する状況証拠は多く蓄積されてきた。いまや細胞がん化の起源になる第一標的の本体を解明し、「DNA 損傷→突然変異→細胞がん化」という経路以外の細胞がん化経路の存在を明らかにすることが重要な問題となる。

前出のシリアンハムスター胎児細胞を用いた実験では、放射線で悪性形態変化を起こしたコロニー由来の細胞で共通して見られる変化は染色体の異数化であった。そして、染色体の異数化は、放射線細胞がん化時に限らず、高密度培養によるがん化の際にも、また、化学物質による細胞がん化の際にも共通してみられる。加えて、この異数化の発現時期に合わせて、軟寒天中でのコロニー形成能およびヌードマウスへの可移植性を獲得した。そのため、我々は、染色体の異数化を起こす変化が細胞がん化過程で鍵になると予想している。勿論、これまで、染色体の異数化と構造異常を多発するのは、がん細胞が遺伝的に不安定であることの現れでありがん細胞の特性であるとされてきた。しかし、我々の観察によると、細胞がん化過程において染色体構造異常が多発する様になる時期は、細胞ががん化した後で、染色体異数化の時期よりかなり遅れて見られる現象であり、染色体数の維持機構の不調が、放射線による細胞がん化の第一ステップである可能性が高い。加えて、放射線照射や高密度培養は、テロメア、セントロゾームなどの染色体の安定維持機構の不安定化を引き起こすことも明らかである。これら一連の状況証拠は、細胞がん化（ひいては個体における発がん）の第一次標的は、染色体数を安定維持装置に關与するタンパクであり、それによる染色体分配異常ががん化の第一歩であることを強く示唆している。

以上のような状況下にあつて、本研究は、放射線発がんが、“DNA 損傷→突然変異→細胞がん化”とする古典的な経路（突然変異説）ではなく、“タンパク損傷→染色体異数化→細胞がん化”とする経路が主経路であるとする我々の仮説の是非を検証することを目的として計画した。具体的には、放射線発がんの第一標的として、染色体分配装置の安定化に關係するタンパク質成分のうち、テロメア、セントロゾームおよびセントロメアの3種に的を絞り、それらの構造および機能異常が細胞がん化の直接の原因であるかどうかを2年間で明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

本研究には、放射線による細胞がん化、突然変異、および染色体解析を定量的に行うことのできるシリアンハムスター胎児由来（SHE）細胞を主として利用した。しかし、結果のヒトへの応用を念頭においてヒト由来培養（HE）細胞を併用した。細胞周期や細胞分裂を制御する因子（p53、ATM、MAD2、BUB1 など）の欠損が染色体異数化に大きく影響することも十分考えられるが、本研究の段階では、個々の遺伝子の欠損と発がんの關係には踏み込まない。

（1）放射線照射によって誘導されるがん化につながる遺伝的变化が染色体の異数化であるかどうかを再確認する

本研究では、放射線照射後、悪性形態変換頻度を判定するコロニー形成までの時期のどの時期に染色体の数的異常が現れてくるかを詳細に検討する。過去の研究では、放射線照射後、悪性形態変化を起こしたコロニーから細胞を分離し、さらに数回の培養を経てから染色体標本作製し、ギムザバンド法で処理した染色体サンプルを用いて核型分析および染色体構造異常を観測していた。この方法だと放射線被ばく後、すでに、少なくとも15回以上の細胞分裂を経ていることになる。この方法でも、染色体の異数化が観察される前に構造異常が観察されることはなかったので、染色体の異数化が細胞がん化の第一ステップであると予想したが直接的な証拠となっていない。そのため、本研究では、照射後、細胞が数回分裂した時期にコロニーの半分の細胞を採取し染色体標本作るとともに、残る細胞をコロニー形成させ悪性形態変化（細胞がん化頻度）の判定に用いる。これによって、放射線被ばく後どの時期で染色体の異数化が起きるかを詳細に調べられる。その際、染色体標本は、マルチカラーフィッシュ法で染色し、染色体数とともに染色体構造異常を鋭敏に観察し、放射線による細胞がん化の第一ステップで染色体異数化が起きるといふこれまでの結果を再現する。

（2）放射線照射による細胞分裂装置（染色体分配装置）の構造変化を視覚的に観察する

構造および機能異常が生ずることによって染色体の異数化の原因となりうる細胞内成分は、10を下らない数が知られているが、我々のこれまでの基礎的な研究結果を考慮して、本研究では、テロメア構造、セントロメア構造（セントロメアおよびキネトコア）およびセントロゾームおよびマイクロチューブルなど分裂装置に焦点を絞った。これらの構造異常が、染色体の分配異常に直接つながるか否かをそれぞれに対する特異的抗体

による免疫染色を行って詳細に調べた。

(3) タンパク損傷が細胞内のホメオスタシスを攪乱するかどうかを追跡する

我々は、放射線の第一標的をタンパク質と想定しているが、放射線による攻撃のされ易さは、細胞内のどのタンパクも同程度だと考えられる。しかし、ミトコンドリアや細胞膜などが標的となって構造と機能が損傷すると、細胞内における電子分布状態に変化を生じ、酸化還元状態や情報伝達に乱れを生じ細胞内のホメオスタシスが攪乱することが予想される。その攪乱状態が新たに多量のラジカルを誘導し雪雪崩的に新たなタンパク損傷を高密度に生ずることも十分に予想される。そこで、放射線被ばくに伴う細胞内酸化状況の変動を詳細に調べ、その変動と細胞分裂装置の構造異常誘導の関連性、染色体異数化および細胞がん化との関連性を検討した。

(4) 二動原体染色体の運命を追跡する

これまでの予備的な研究結果では、放射線被ばくによるテロメアの不安定化は、テロメア融合の原因となり二動原体形成の原因となると予想している。一般的には、二動原体は、再切断し BFB (break-fusion-bridge) サイクルを介して新しい染色体異常を生み出す元となると予想されているが、その予想が正しいかどうかを検証した。具体的には、照射後の数回分裂時期の分裂細胞の核染色を行い異常分裂像を詳細に観察した。

4. 研究成果

(1) 放射線照射によって誘導されるがん化につながる遺伝的変化は染色体の異数化である

マルチカラーFISH法を用いて、がん化した細胞における染色体異常を調べた。その結果、自然がん化細胞も放射線誘導がん化細胞のいずれも、染色体に異数化が共通してみられ、両者で質的な差は見られなかった(図1)。細胞がん化形質は、その発現のために、放射線被ばく後、少なくとも十数回の細胞分裂が必要な典型的な遅延的影響である。染色体の数的異常も同様に被ばく後十数回を経たから出現する遅延的変化であることが判った。放射線照射は、染色体異数化の出現時期を早める効果があることが判った。

(2) 放射線照射は、テロメアおよび中心体など染色体安定性維持装置に構造的異常を誘導する

染色体安定性維持装置であるテロメア、サブテロメアおよびセントロゾームの構造変化を調べた。その結果、放射線被ばくは、いずれの構造も不安定化することが判った(図2および3)。

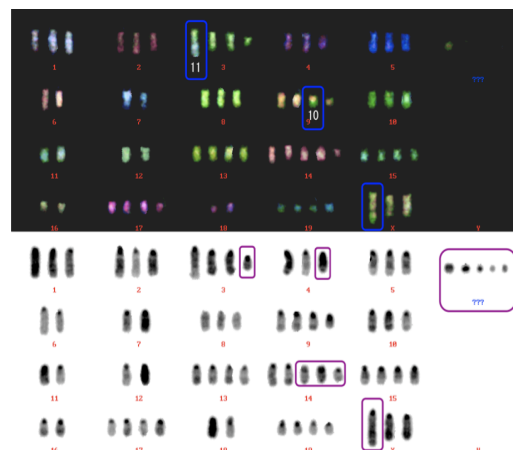
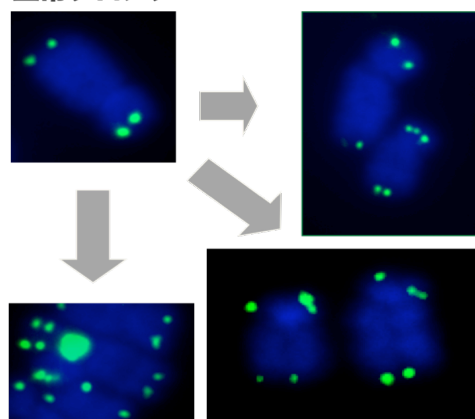


図1 がん化したマウス胎児由来細胞に見られる染色体異常のマルチカラーFISH法による解析。

テロメアおよびサブテロメアの構造異常は、放射線被ばく直後に染色体構造異常の原因となり転座や二動原体染色体を誘導するが、染色体数の変化の原因とはなりにくいことが判った。染色体構造異常は、照射後1～2回の細胞分裂で消失する。一方、染色体の数的異常の出現は、放射線被ばく直後には、ほとんど見られないが、細胞がん化が顕在化してくる時期と同じ、放射線被ばく後、十数回の細胞分裂を経た時期に一致する遅延的現象であることが判った。

正常テロメア



構造異常テロメア

図2 放射線によるテロメア構造異常。

(3) 放射線はミトコンドリア機能を攪乱させる

我々は、放射線の第一標的をタンパク質と想定し、特にミトコンドリアにや細胞膜などが標的となって構造と機能が損傷すると、細

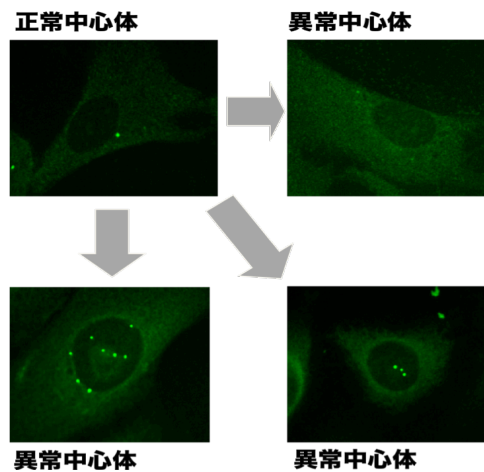


図3 放射線による中心体構造異常。

胞内における電子分布状態に変化を生じ、酸化還元状態や情報伝達に乱れを生じ細胞内のホメオスタシスが攪乱することを予想した。本研究では、放射線照射後、細胞内ミトコンドリア機能の変化を追跡したが、放射線は、ミトコンドリアにおける電子伝達系の不調を誘導し、電子漏洩が起こり一連の過酸化ラジカルを誘導し細胞内酸化度が高まることがわかった。それらのラジカルのうちビタミンC処理で捕捉され、細胞がん化を抑制に繋がるラジカルは、常温で20時間以上の寿命を持つ長寿命ラジカルであることが判った。この長寿命ラジカルが、細胞がん化の直接の原因を誘導するものと考えられる。

(4) 二動原体染色体の運命を追跡する

放射線は、テロメア構造の不安定化を誘導する(図3)。そして、その不安定性は、被ばく後、長期間にわたって維持され二動原体誘導原因となるが、染色体数の変化と連動しない。恐らく、二動原体は、再切断しBFB(break-fusion-bridge)サイクルを介して新しい染色体構造異常を生み出す元となると予想される。

5. 結論

本研究の結果を総合的に解析すると、図4に示すように、放射線による細胞がん化経路に、DNA損傷を起源としない経路が存在しそれが主経路であることが明らかとなった。その主役は、中心体の機能崩壊による染色体の異数化であり、その直接の誘因は、放射線の直接ヒットではなく、放射線被ばくによって誘導されたミトコンドリアにおける電子伝達系の不調である。

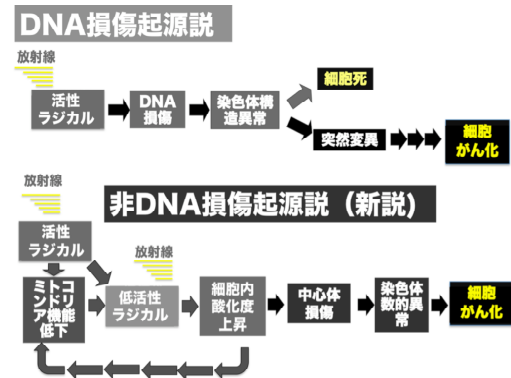


図4 DNA損傷を起源としない細胞がん化経路の予想図。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 66 件)

1. Ariyoshi K, Suzuki K, Goto M, Oshimura M, Ishizaki K, Watanabe M, Kodama S: Introduction of a normal human chromosome 8 corrects abnormal phenotypes of Werner syndrome cells immortalized by expressing an hTERT gene. *J. Radiat. Res.*, in press, 2009.
2. Masunaga S, Tano K, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Nakamura J: Evaluation of the potential of hexamethylenetetramine as a combined agent with gamma-ray irradiation and cisplatin treatment *in vivo*, compared with tirapazamine. *British J Radiol* Jan 19 2009. [Epub ahead of print]
3. Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki S, Kinashi Y, Liu Yong, Masunaga S, Watanabe M, Ono K: Induction of DNA double-strand breaks and cellular migration through bystander effects in cells irradiated with the slit-type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron. *Intern J Radiat Oncol Biol Phys* in press, 2009.
4. Masunaga S, Kono K, Nakamura J, Tano K, Yoshida Y, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, and Ono K: Usefulness of hexamethylenetetramine in combination with chemotherapy using free and pegylated liposomal doxorubicin *in vivo*, referring to the effect on quiescent cells. *Oncology Report* 21: 1307-1312, 2009.
5. Toyokuni H, Maruo A, Suzuki K, Watanabe M: The contribution of radiation-induced large deletion of the genome to chromosomal instability. *Radiat Res* 171: 198-203, 2009.
6. Yoshii H, Watanabe M: Intervention of

- oxygen-control ability to radiation sensitivity, cell aging and cell transformation. *J Radiat Res (Tokyo)* **50**: 127-137, 2009.
7. Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, Watanabe M: Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J Radiat Res(Tokyo)* **50**: 151-160, 2009.
 8. Hori M, Suzuki K, Udono MU, Yamauchi M, Mine M, Watanabe M, Kondo S, Hozumi Y. : Establishment of ponasterone A-inducible the wild-type p53 protein-expressing clones from HSC-1 cells, cell growth suppression by p53 expression and the suppression mechanism. *Arch Dermatol Res* Nov 14, 2008. [Epub ahead of print]
 9. Hamamoto T, Suzuki K, Yamauchi M, Kodama S, Sasaki H, Watanabe M: p53 status-dependent sensitization of human tumour cells to hyperthermia by plant flavonol. *Int J Hyperthermia* **24** : 415-425, 2008.
 10. Yamauchi M, Oka Y, Yamamoto M, Niimura K, Uchida M, Kodama S, Watanabe M, Sekine I, Yamashita S, Suzuki K: Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)* **7** : 405-417, 2008.
 11. Harada T, Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Watanabe M: Different involvement of radical species in irradiated and bystander cells. *Int J Radiat Biol* **84** : 809-814, 2008.
 12. Takada S, Inoue E, Tano K, Yoshii H, Abe T, Yoshimura A, Akita M, Tada S, Watanabe M, Seki M, Enomoto T: Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2. *Biochem Biophys Res Commun* **379** : 233-238, 2008.
- 他 53 編

〔学会発表〕（計 136 件）

1. Watanabe M: Is there a non-targeted route in radiation carcinogenesis? Is There a Non-targeted Route in Radiation Carcinogenesis Process? -Candidate Playing an Important Role. In an International Symposium of Kyoto University RRI, Dec 18, 2008, Kumatori, Japan. (Invited)
2. Yoshi H, Watanabe M: Mitochondria and cell transformation, In an International Symposium on "The participation of the energy metabolic system in radiation carcinogenesis process", The 51th Annual Meeting of Japanese Radiation Research Society, Nov 19-21, 2008, Kokura. (Invited)
3. Kumagai J, Miura K, Kashino, Watanabe M:

Mutagenic slow releasing long-lived radicals are produced from dysfunctional mitochondria. In an International Symposium on "The participation of the energy metabolic system in radiation carcinogenesis process", The 51th Annual Meeting of Japanese Radiation Research Society, Nov 19-21, 2008, (Invited)

4. Watanabe M, Yoshii H, Watanabe K: The main route of radiation-induced carcinogenesis is the same as that of natural carcinogenesis. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Sep 21-24, 2008, Boston, USA.
5. Watanabe M: Plenary Lecture I, The main route of radiation carcinogenesis-The first target of radiation-induced carcinogenesis is not DNA, International Symposium of Korea University Brain Korea 21 Program for Biomedical Sciences, January 23, 2007, Seoul. (Invited)
6. Watanabe M, Yoshii H, Watanabe K, Suzuki K, Kodama S, Kumagai J: Main route of radiation-carcinogenesis is DNA damage- independent pathway. 13th International Congress of Radiation Research, July 8-12, 2007, San Francisco. (Invited)
7. Watanabe M: Target of radiation carcinogenesis is protein, The First International Symposium on the Establishment of a New Discipline“ Medical Care for Hibakusha”, January 31-February 1, 2008, Nagasaki. (Invited)

（他 129 回）

〔図書〕（計 2 件）

1. 渡辺正己：突然変異は放射線発がんの主因ではない、モデルが拓く放射線防護研究の新たな展開－第一回放射線防護研究センターシンポジウム、根井充編、p64-70、2007、放射線医学総合研究所。
2. 渡辺正己：放射線発がんの主たる標的はDNAではない可能性が高い、ESI-NEWS、25(5): 176 – 181、2007。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/rb-rri/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 正己(WATANABE MASAMI)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号:20111768