

癌と化学療法

VOL.42(2015)

株式会社 癌と化学療法社

Printed in Japan © 禁無断転載・複写複製

発がんの主経路はDNA損傷を起源としない

渡邊 正己*

[*Jpn J Cancer Chemother* 42(13): 2409-2413, December, 2015]

The Main Target of Carcinogenesis Is Not DNA: Masami Watanabe (Radiation Biology Center, Kyoto University)

Summary

The first target of radiation carcinogenesis is thought to be DNA. However, this has not been demonstrated for radiation carcinogenesis. We found that the frequency of aneuploid cells was closely related to that of radiation-induced cell transformation and natural cell transformation by high-density cultivation, but the frequency of gene mutations was not. Cells containing a functional p53 gene become tetraploid, but do not exhibit tumorigenicity. In contrast, cells without a functional p53 gene readily become triploid and acquire tumorigenicity. Both radiation exposure and high-density cultivation elevated the level of intracellular oxidative radicals. One of these radicals, such as long-lived radical, induced centrosome destabilization and produced cells carrying extra centrosomes, which together promote merotelic attachment of the chromosome by altering spindle geometry. Unresolved merotelic attachments can give rise to lagging chromosomes during anaphase. Aneuploidy was observed at high frequency in the early stages of cell transformation. These results strongly suggest that the main target in carcinogenesis induced by low-dose radiation is not DNA, but is rather the centrosomes, which are proteins involved in the chromosomal homeostasis maintenance mechanism. In addition, the route of radiation carcinogenesis may be the same as that of natural carcinogenesis. **Key words:** Radiation carcinogenesis, Mutation, Long-lived radical, Aneuploid, Centrosome, **Corresponding author:** Masami Watanabe, Radiation Biology Center, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

要旨 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。たとえば、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に示されている。しかし、それらの患者のがん発症頻度は10万人に数名程度と極めてまれな事象である。ところが、ヒトの半数はがんになる。突然変異頻度と発がん頻度が桁違いに違うという事実からだけでも、大部分の細胞がん化が単独の遺伝子変異で生じている可能性は極めて少ないことを示唆する。それどころか、現在、発がん機構としていちばん信じられている「発がんは複数の突然変異が積み重なって進行する」という「多段階発がん機構」では説明できない。一度に複数のがん関連遺伝子が同時に変化するのだろうか。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。そのうちの約10%、数にしておよそ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発現に関係する遺伝子であると予想されている。そして、1 Gy放射線の被曝で誘導される一般的な遺伝子の突然変異率は、およそ 10^{-5} 程度であるのに反し、細胞がん化頻度は 3×10^{-2} と桁違いに大きく、1 Gyの放射線はがんに関連する2,500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。ここでは放射線発がん機構に関して、私が40年余りの研究で得た成果から導き出した「突然変異を経由しない発がん経路」の実体について解説する。

I. 突然変異を経由しない発がん経路

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。たとえば、マイクロビー

ムで細胞1個の単位で照射領域を制御できる技術を使った研究で、被曝した細胞自身でなく被曝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曝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、被曝後、生存した

* 京都大学・放射線生物研究センター

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、発がんする細胞自体はまったく放射線を浴びていない。どちらの現象も、がん化する細胞のDNAが直接被曝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(DNA)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。

II. 放射線発がんの起源は染色体異数化

われわれのこれまでの研究成果は、放射線を照射して実験的にがん化させた細胞において、最初にみられる変化はマウス、ハムスターおよびラット胎児由来細胞において染色体の異数化であることを明確に示している^{4,5)}。不思議なことに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、放射線に被曝した時にとどまらず培養時に高い密度にするなど、細胞の培養環境を変えることや化学物質処理などでも容易に生じ、その変化が細胞の無限増殖能の獲得とがん化に直接的につながる事がわかった。

III. ヒト細胞はなぜがん化しないのか

一方、マウス、ハムスターおよびラットなどの実験動物の胎児由来細胞と異なり、ヒト胎児由来細胞は放射線照射をはじめ、様々な発がん処理をしてもがん化させることは極めて難しい。過去、半世紀を越えて、世界中の多くのがん研究者が繰り返し取り組んだ研究課題にもかかわらず、成功例は数例を数えるにすぎない^{6,7)}。そして、その成功例の追試に他の研究グループが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されると、他の実験動物の胎児由来細胞と同様に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一連のがん化形質を発現する。しかし、唯一、ヒト細胞だけは容易に無限増殖能を獲得できずがん化まで至ることはない。それでありながら、ヒトの2人に1人はがんに罹患する。このことは他の動物細胞に比べて、ヒト細胞には無限増殖能を獲得(不死化)するために必要な変化が起こりにくいような仕組みが備わっていることを示している。もちろん、突然変異はヒト胎児由来細胞であっても他の実験動物由来の胎児細胞とまったく同じ頻度および動態で誘導される。このことも発がんが単純な突然変異によっ

て生じているのではないことを強く示唆する。

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よく知られている。哺乳類のテロメアは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複製ごとに少しずつ短縮し、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しなくなり、細胞は老化し死亡するとされている。無限増殖能をも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、胎児から分離した直後のヒト由来細胞のテロメラーゼ活性を調べたところ、試験管内で培養を開始した時点では、他の動物の胎児由来細胞と同様に強いテロメラーゼ活性をもっていることを発見した⁸⁾。しかし、ヒト胎児由来細胞は培養を開始し、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、培養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、ほどなく細胞は不死化しがん化の道をたどる^{8,9)}。この性質の違いがヒト細胞を試験管内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よく知られており、われわれの発見はがん化が分化の制御異常から容易に生じることを意味している。

そしてヒト胎児由来細胞は、採取後2~3回の細胞分裂という極めて早い時期にテロメラーゼ活性を一斉になくしていることとなり、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。

IV. 染色体異数化の標的は何か

前項では、がん化細胞に最初に普遍的にみ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。われわれは、その標的候補として染色体の安定化にかかわるテロメア、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がその第一候補と考えている。

マウス細胞でもヒト細胞でも放射線照射されたり高密

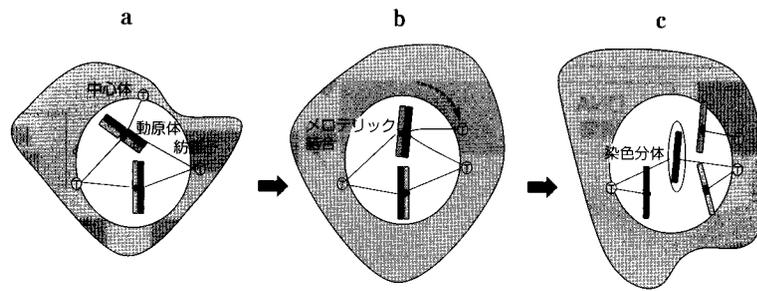


図1 三倍体細胞が生成する機構予想図

何らかの理由で3個以上の中心体をもつ細胞(多中心体細胞)ができると一つの染色体の動原体に3本以上の紡錘子が結合する(a)。この結合をメロテリック結合と呼ぶ。その細胞が多極分裂すると分裂が完成せず細胞は死亡する。しかし、中心体が移動し複数の染色体が一極に集まると(b)、一つの染色体の動原体に2本の紡錘子が結合したまま残ることがある(c)。その場合、その染色体は通常の核分裂ができず赤道板近辺に取り残され、続いて起きる細胞分裂時にどちらかの細胞に取り込まれることになる。染色体自身は無傷なので、その染色体を取り込んだ細胞はトリソミー化して生存しつづける可能性が高い。染色体が少なくなった細胞は遺伝情報の欠損が起きて死亡する。

度培養されたりすると、中心体数の増減や中心体構造の変化など様々な異常が極めて高い頻度(%レベル)で誘導される。もちろん、こうした異常をもった細胞の多くは細胞分裂がうまくいかず死を迎えるであろう。しかし、われわれは中心体の異常をもった細胞は予想外に多くが生き残ると予想している。その生き残りの過程で、染色体の異数化が誘起されているようである。

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いかず細胞は死を迎える。この場合、本来2個の娘細胞に受け渡されるべき染色体が、3個以上の細胞に分配されることになるので、それぞれの細胞が引き継ぐ遺伝情報は絶対的に不足することは明らかである。しかし、中心体がいくつもの断片(?)に分解した細胞であっても分解した中心体が二極に集まって機能として、あたかも2個の中心体のように振る舞って核分裂(いわゆる疑似二極分裂)を起こすと、複数の中心体が集合してできた疑似極から複数の紡錘子が伸び、動原体に結合(メロテリック結合)することが報告されている¹⁰⁾。図1にその概念を表したが、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じることが多い。そのため、染色体の取り残しが起きるが、引き続き細胞分裂時に一方の細胞に染色体が取り込まれ、染色体の異数化が完成することとなる。染色体自身は無傷であり、細胞分裂を終えてしまった細胞では次の細胞分裂時まで正常の中心体が再生されるので、異数化を起こすことが細胞に対して致死的には働かない。前項に説明したように、染色体が異数化した細胞では遺伝子発現動態が大きく変化し、種々のがん形質を発現するようになる。現時点で、われわれは「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。

V. 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。われわれは、培養したマウス胎児由来細胞から三倍体細胞と四倍体細胞を分離し、それぞれの細胞群におけるがん形質発現を調べてみた。その結果、三倍体細胞は無限増殖能を獲得し完全に造腫瘍性を獲得しているが、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わかった。三倍体細胞では、遺伝子の発現量が数十倍以上変化していることがわかった。

そこで、マウス細胞にライブラリー化したヒト染色体を微小核細胞融合法によって正常ヒト胎児細胞に正常染色体を1本取り込ませ、人工的にトリソミー化細胞を作り、遺伝子発現の状況を調べてみた。これまでに、1番、6番、7番および8番染色体でトリソミー化細胞の作製に成功したが、1番染色体のトリソミー化は基質非依存性増殖能の亢進、7番染色体のトリソミー化で突然変異感受性の亢進、8番染色体のトリソミー化で様々ながん形質の発現と造腫瘍性を獲得することがわかった。8番染色体のトリソミー化細胞は、ヌードマウスにある程度の大きさ(直径1cm以上)の腫瘍を作ることができたが、無限増殖能を獲得することはできず、最終的ながん化には成功していない。無限増殖能を獲得する染色体のトリソミー化を伴うことが発がんが完了するかどうかの重要なキー現象であると予想する。また、どの染色体が三倍体化するかによって発現するがん形質の組み合わせが異なることは興味深い。

このように染色体を人工的にトリソミー化すると、トリソミー化した染色体に限らず、トリソミー化した細胞のなかで正常数を保っている染色体にコードされた遺伝

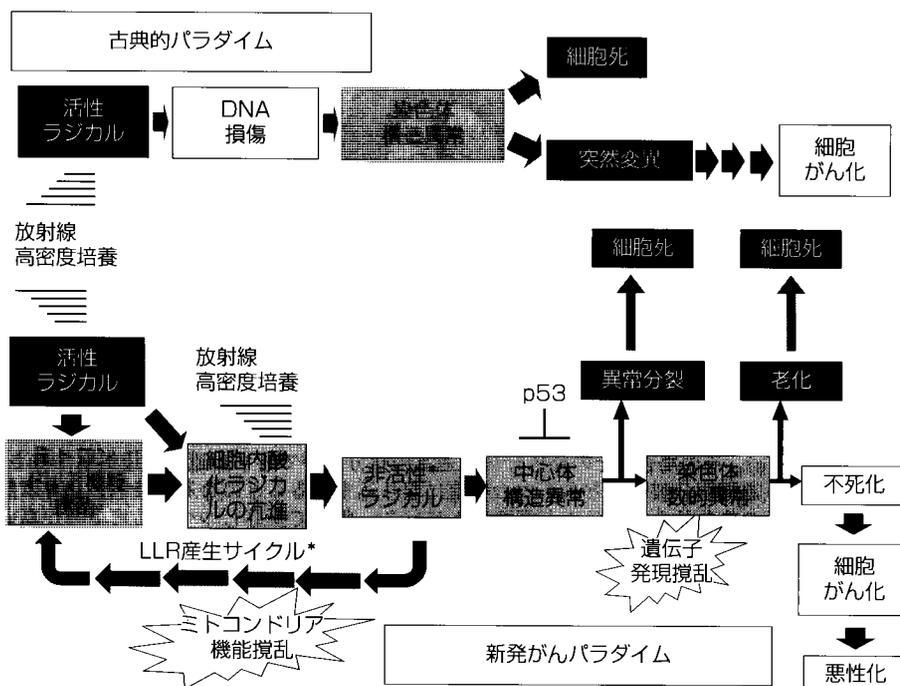


図2 DNA損傷を起源としない発がん機構の予想図

*:長寿命ラジカル (LLR)

子さえも、その発現が10倍以上増えていることがわかった¹¹⁾。トリソミー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、トリソミー化に伴う遺伝子発現の攪乱が細胞がん化の直接の原因であることは間違いない。

われわれの成果を総合的に解釈すると、図2の下段に示す経路をたどる可能性が大きい。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。われわれは、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も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、細胞内高分子蛋白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もつものである¹²⁻¹⁴⁾。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によるという予想と根本的に異なる。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時に限られる。しかし、われわれの最近の研究成果では、放射線照射後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¹⁵⁾。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

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曝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で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¹⁶⁾。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。放射線を被曝した時は、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すぎず、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。いい換えれば、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すぎない。バランスを壊す要因は、放射線以外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、生じる原因損傷は非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。

このように、われわれの結果は発がんの経路には

DNA 損傷を起源とする経路以外に DNA 損傷を起源とする経路が存在し、それが圧倒的主経路であると解釈することによって矛盾なく理解できる。

文 献

- 1) Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, *et al*: Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(5): 2099-2104, 2000.
- 2) Sawant SG, Randers-Pehrson G, Geard CR, *et al*: The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T 1/2 cells *in vitro* can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat Res* **155**(3): 397-401, 2001.
- 3) Mitchell SA, Randers-Pehrson G, Brenner DJ, *et al*: The bystander response in C3H 10T 1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact. *Radiat Res* **161**(4): 397-401, 2004.
- 4) Suzuki K, Yasuda N, Suzuki F, *et al*: 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) Watanabe M, Suzuki K and Kodama S: Karyotypic changes with neoplastic conversion in morphologically transformed golden hamster embryo cells induced by X-rays. *Cancer Res* **50**(3): 760-765, 1990.
- 6) Kakunaga T: Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**(3): 1334-1338, 1978.
- 7) Namba M, Nishitani K, Hyodoh F, *et al*: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma rays. *Int J Cancer* **35**(2): 275-280, 1985.
- 8) Yang Z, Kodama S, Suzuki K, *et al*: Telomerase activity, telomere length, and chromosome aberrations in the tension of life span of human embryo cells induced low-dose X-rays. *J Radiat Res* **39**(1): 35-51, 1998.
- 9) Kodama S, Mori I, Roy K, *et al*: Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryo cells. *Radiat Res* **155**(1 Pt 2): 254-262, 2001.
- 10) Ganem NJ, Godinho SA and Pellman D: A mechanical linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**(7252): 278-282, 2009.
- 11) Nawata H, Kashino G, Tano K, *et al*: Dysregulation of gene expression in the artificial human trisomy cells (trisomy 8) associated with transformed cell phenotypes. *PLoS One* **6**(9): e25319, 2011.
- 12) Kumagai J, Masui K, Itagaki Y, *et al*: Long-lived mutagenic radicals induced in mammalian cells by ionizing radiation are mainly localized to proteins. *Radiat Res* **160**(1): 95-102, 2003.
- 13) Kumagai J, Nakama M, Miyazaki T, *et al*: Scavenging of long-lived radicals by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate and simultaneous suppression of mutation in irradiated mammalian cells. *Radiat Phys Chem* **64**(4): 293-297, 2002.
- 14) Matsumoto T, Miyazaki T, Kosugi Y, *et al*: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in γ -irradiated mammalian cells and their model system at 259 K. Tunneling reaction in biological system. *Radiat Phys Chem* **49**(5): 547-551, 1997.
- 15) Koyama S, Kodama S, Suzuki K, *et al*: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. *Mutat Res* **421**(1): 45-54, 1998.
- 16) Yoshii H and Watanabe M: Intervention of oxygen-control ability to radiation sensitivity, cell aging and cell transformation. *J Radiat Res* **50**(2): 127-137, 2009.