

16 - 8 ヒト放射線誘発がんの分子機構に関する研究

主任研究者 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 山下俊一

研究成果の要旨

本研究班の活動成果は、チェルノブイリ甲状腺がん組織バンクをに公募し許可譲渡を受けた小児甲状腺がん組織において BRAF 遺伝子異常について検索した結果、放射線被ばくとの関連性は否定され年齢とともに小児期から成人発症に向けてその頻度が増加することを明らかにした。え DNA 合成」により生成されることが証明された。「損傷乗り越え DNA 合成」に参与する REV1 が損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼ Polk、Polη 及び Polt と結合することを見いだした。また REV1 トランスジェニックマウスも作成した。NBS1 機能解析の結果からは、NBS1 が MRE11/RAD50 をリクルートすることにより相同組み換えに機能すること、ATM 非依存的に機能できることを照明した。アポトーシスを阻害する IAP 蛋白分子のひとつである Apollon の発現が口腔癌細胞で増加していることを明らかにした。原爆被爆者の長期追跡調査をおこない、リスク評価のために新しい線量体系 DS02 を採用し、推定線被曝量が 10% 増加することを明らかにした。また、一本鎖 DNA 切断の測定法を改良をおこなった。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
山下俊一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 附属原爆後障害医療研究施設 教授	放射線被ばくヒト集団における各種がん組織の収集管理 と分子疫学調査
神谷研二	広島大学 原爆放射線医科学研究所 教授	放射線誘発ゲノム損傷ならびに修復分子機構の解析
坂本修一	京都大学 放射線生物研究センター 助手	放射線誘発遺伝子損傷ならびに修復分子機構の解析
福本学	東北大学 加齢医学研究所 教授	放射線被ばくヒト集団の各種癌組織の分子病理学的検索
児玉和紀	財団法人 放射線影響研究所 部長	放射線被ばくヒト集団の線量評価に基づく癌発症リスク の評価
山田晃一	国立健康・栄養研究所 室長	放射線による突然変異をもたらす末端再結合及びバイパス DNA 複製の欠損細胞株の解析

総括研究報告

1 研究目的

放射線被ばくによる発がんリスクの上昇は、広島、長崎の原爆被爆者における膨大な疫学調査から明確である。本研究は、高齢化に伴う発がんリスクの上昇につい

て、原爆被爆者をはじめ種々の放射線被ばく患者においてがん発症分子機構を明らかにすることが目的である。被ばく者における長期微量被ばくの発がんその他の健康

障害についての詳細な検討や放射線誘発がんの分子機構の解明は殆どされていない。その為、本研究組織は、ヒトにおける長期微量放射線内部被ばくの健康影響について分子疫学的研究を推進し、放射線誘発がんの分子機構解明に焦点を絞って解析する。同時に瞬時大量外部被ばくである原爆被爆者のがん発生と比較検討することで新たな放射線リスクの評価を目指す。

2 研究成果

放射線被ばくヒト集団における各種癌組織の収集管理と分子疫学調査

チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺がんの原因を解析するために手術摘出された甲状腺がん組織の試料バンクを国際共同プロジェクト（チェルノブイリ組織バンク；NISCTB）から提供を受けた小児甲状腺がん組織を用いて行った。これまでに Ret/PTC 再配列遺伝子の頻度がチェルノブイリ小児甲状腺がん症例で多いことが報告されてきた。近年、BRAF 遺伝子変異が甲状腺乳頭癌で、30-50%の頻度でみられることが報告された。ウクライナ小児甲状腺癌 48 症例（15 歳以下で手術を受けた 15 症例と 15 歳以上で手術を受けた 33 症例）とコントロールとして日本人小児甲状腺癌 31 症例を用いて BRAF 遺伝子変異の原因と放射線被曝の影響の有無の検討を行った。BRAF 遺伝子変異は日本人小児 31 例中 1 例（3.2%）のみに認められ、ウクライナ人小児では認められなかった。ウクライナ人思春期・若年成人では 33 例中 8 例（24.2%）に BRAF 遺伝子変異が認められた。RET チロシンキナーゼの発現例はウクライナ人小児例で 15 例中 5 例（33.3%）、ウクライナ人思春期・若年成人例で 33 例中 12 例（36.4%）であった。BRAF 遺伝子変異と各 Ras 遺伝子変異が重複して存在した例はなく、BRAF 遺伝子変異と RET チロシンキナーゼ中等度発現が重複して認められた 1 例を除き BRAF 遺伝子変異と RET/PTC 遺伝子再配列の重複と考えられる例はなかった。成人甲状腺癌では BRAF 遺伝子変異は約 30-50%と高率に認められる。この検討では思春期・若年成人の約 24%に認められたものの、小児では 0-3%と極めて低頻度しか認められなかった。放射線非被曝群である日本人小児例とチェルノブイリ原発事故後の放射線被曝の影響を受けたウクライナ人小児例の間に BRAF 遺伝子変異の頻度差が認められなかったことから、BRAF 遺伝子変異の原因が放射線の影響ではないことが示された。この報告は成人甲状腺癌における高頻度の BRAF 遺伝子変異の存在に比べ、小児甲状腺癌の BRAF 遺伝子変異が低頻度しか存在しないことを明らかにした。

放射線誘発ゲノム損傷ならびに修復分子機構の解析

放射線誘発がんの遺伝子変異の解析から、突然変異が遺伝子変異の生成に重要であることが明らかとなった。最近の研究からこのような突然変異は、「損傷乗り越え DNA 合成」により生成されることが証明された。「損傷乗り越え DNA 合成」遺伝子 REV1 が放射線照射で誘導される。そこで、放射線誘発がんにおける REV1 の役割を解明するため研究を行った。1) ヒト REV1 タンパク質の機能解析: Rev1 タンパク質と相互作用をする蛋白質の検索として Rev1 と相互作用する蛋白質を Two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、Rev1 は、同じく Y ファミリーの損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼ Polk と結合することを見いだした。Rev1 と Polk の結合領域を同定する目的で、Rev1 の欠失変異蛋白質を作成し、Polk との結合を Two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、Polk は、Rev1 の C 末端から 100 アミノ酸残基(1150-1249)の領域に結合することが判明した。同様に、Polk の欠失変異蛋白質を作成し、Rev1 との結合を Two-hybrid 法を用いて解析した。Rev1 は、Polk の中央部 230-616 アミノ酸残基の領域に結合することが判明した。同様の Two-hybrid 法を用いて、Rev1 の C 末端と他の損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼである Polη 及び Polι との結合を検討した。両者とも Rev1 の同じ C 末端領域に結合することを明らかにした。Rev1 マウスの作製と突然変異の解析のため現在までに 7 系の独立した Rev1 トランスジェニックマウスを得た。これらマウスの各臓器より mRNA を取り出し、mRev1 トランスジーンを発現を RT-PCR 法で確認したところ、各臓器でのユビキタスな発現を認めた。また、蛋白質の発現を検討した結果、小腸では Zn で誘導可能な蛋白質の発現を認めた。一方、Rev1 トランスジェニックマウスの T 細胞を用いた放射線誘発の TCR 突然変異頻度は、対照群に比べ高い傾向を認めた。この結果は、REV1 タンパク質が脱塩基部位の損傷乗り越え DNA 合成に重要な機能を担い、点突然変異を生成する可能性が高いことを示している。今回の研究で Rev1 は、Polk、Polη 及び Polι と結合することが明らかとなった。Polk、Polη 及び Polι は、PCNA と結合することが報告されている。このことは、fidelity の高いポリメラーゼδ等が損傷塩基部位で DNA 合成出来ないとき、損傷乗り越え型のポリメラーゼと入れ替わり DNA 合成を継続するポリメラーゼスイッチ機構が存在する可能性を示唆している。

放射線誘発遺伝子損傷ならびに修復分子機構の解析
電離放射線の生物影響には DNA 二本鎖切断 (DSB) の関与

が大きいことが知られている。DSBを修復する機構として、相同組換え（HR）と非同末端結合（NHEJ）の2つの主な経路が存在する。高等真核生物では細胞周期のうち特に姉妹染色分体の存在するS/G2期においてHRがDSB修復に重要であることが判ってきた。電離放射線高感受性・高発癌性という症状から、ヒト遺伝性疾患ナイミーヘン染色体不安定症候群（NBS）に着目し原因遺伝子NBS1を同定した。NBS1がHRにおいて重要な機能を持つことを示しているが、NBS1が実際にHRに関与するメカニズムは放射線誘発がんの分子機構を考える上でも重要な未解明な問題である。そこで本研究では、HR修復におけるNBS1の機能ドメインの同定と、他の高発がん疾患因子との関連性の検討を行った。まず、NBS1及びそれをリン酸化するATMキナーゼのヒト細胞でのHR修復への関与を、HR測定カセットDR-GFPを用いて検討した。NBS細胞では放射線感受性とHR能が共に回復したが、AT細胞では放射線感受性が正常になっても相同組換え能は変化しなかった。DSBに対するHR修復については、NBS1は重要であるがATMは必ずしも必要ではないことが判った。HR修復に重要なNBS1の機能ドメインを同定するために、種々の変異型NBS1cDNAを作成し、そのHR修復能を測定した。NBS1は損傷部位周辺のクロマチンへMRE11/RAD50をリクルートすることによりHRに機能すること、ATM非依存的に機能できることが示唆された。

放射線被ばくヒト集団の各種癌組織の分子病理学的検索

口腔癌患者の治療法として、放射線療法が外科手術よりも有効であると考えられている。しかし、癌周囲組織が放射線治療により引き起こされる障害にどれだけ耐性があるかにより照射量が決定される。正常組織への障害をおさえ、なおかつ腫瘍に有効で、より少ない照射量の放射線治療法の確立を目的とした基礎研究を行った。口腔癌の治療前後でアポトーシスを阻害するIAP蛋白分子のひとつであるApollonの発現を免疫組織学的に検討した。その結果、放射線治療後にApollonたんぱく質の発現増加が認められ、5FUとCDDPの投与後には発現抑制が認められた。口腔癌細胞株SAS細胞をヌードマウスに移植し形成した腫瘍でも放射線照射後にApollonたんぱく質の発現増加を認めた。この結果は、腫瘍細胞のApollon発現を阻害することが口腔癌治療の有効手段となりえることを示唆している。

放射線被ばくヒト集団の線量評価に基づく癌発症リスクの評価

原爆放射線の健康影響を調べるために1950年から、固定

集団（93,000人の被爆者と27000人の非被爆者）を設定し死亡追跡調査を行っている。1)放射線発がんリスクに関する報告；調査集団における放射線被曝と死亡率に関しては、1950年から1997年までの47年間の追跡調査期間中9335人が固形癌で、31881人ががん以外の疾患で死亡している。がんによる死亡のうち、約440例(5%)の固形癌による死亡と250例(0.8%)のがん以外の疾患による死亡が、放射線被ばくに関連していると考えられた。2)新線量体系(DS02)導入に伴いリスク評価の変化に関する報告；原爆被爆者の線量推定法として従来のDS86からDS02に代わり、長崎・広島市ともに推定ガンマ線量が10%増加した。また、DS02では、原爆から放出された放射線の特性や、建物および地形による遮蔽の影響など、DS86に比べての多くの細かい部分が改善されている。3)放射線と他の要因との交互作用に関する報告；原爆被爆者の肺がんリスクに関する被曝と喫煙の同時効果について592症例で調査した。1日15本以下の喫煙者では、放射線と喫煙の影響に相加的關係を認めた。

放射線による突然変異をもたらす末端再結合及びバイパスDNA複製の欠損細胞株の解析

放射線は、遺伝子DNAに多様な損傷をもたらすが、一本鎖切断は、短時間で再結合される。二本鎖切断は、末端再結合、相同組換えにより修復を受ける。特定遺伝子の欠損細胞株が得やすいニワトリDT40細胞やNijmegen breakage症候群の細胞を用い放射線による突然変異生成のメカニズムを明らかにすることを目的とし実験を行った。その結果、一本鎖切断検出法として新たな高感度アッセイを導入し、一本鎖切断は15分～1時間で再結合することを確認した。放射線を照射された細胞は、DNA合成が低下するが、紫外線と異なり、最大50-60%の障害に留まる。それは、損傷が残存する状態でかなりの複製が進行することを意味し、バイパス複製の存在を予想させた。

3 倫理面への配慮

ヒト組織を用い遺伝子解析を行った場合は、全て番号を付して匿名化し、その研究計画は、先に所属機関の倫理委員会の承認を得ている。チェルノブイリ例は、国際組織であるInternational Cooperation to Establish Post Chernobyl NIS Thyroid Tissue, Nucleic Acid and Data Bank (NISCTB)へ申請のうえ受理され匿名化されたDNAサンプルの供与を受けている。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Starenki D, Yamashita S et al. Inhibition of Nuclear Factor-kappaB Cascade Potentiates the Effect of a Combination Treatment of Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan 1;89(1):410-418.
2. Pushkarev VM, Yamashita S et al. Molecular mechanisms of the Effects of Low Concentrations of Taxol in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Endocrinology.* 2004 Jul;145(7):3143-52.
3. Nakashima M, Yamashita S et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression. *J Pathol.* 2004 Apr;202(4):446-55.
4. Kumagai A, Yamashita S et al. Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Sep;89(9):4280-4.
5. Starenki DV, Yamashita S et al. Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 15;10(20):6821-9.
6. Sedliarou I, Yamashita S et al. The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol.* 2004 Dec;25(6):1729-35.
7. Hayashida N, Yamashita S et al. A rapid and simple detection method for the BRAF(T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 2004 Nov;14(11):910-5.
8. Kashiwabara, S., Kamiya, K., et al.: Tumor Induction by Azoxymethane (AOM) and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in F344 Rat Gastric Mucosa Featuring Intestinal Metaplasia Caused by X-irradiation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, in press.
9. Kubo, N., Kamiya, K., et al.: Protective Effects of a Water-soluble Extract from Cultured Medium of Ganoderma Lucidum (Rei-shi) Mycelia and Agaricus blazei Murill Against X-irradiation in B6C3F1 Mice: Increased Small Intestinal Crypt Survival and Prolongation of Average Time to Animal Death. *Int. J. Mol. Med.*, Mar;15(3):401-406, 2005.
10. Mochizuki, H., Kamiya, K., et al. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Jul 30; 320(3):656-63, 2004.
11. Liu D, Fukumoto M et al.: Allelotypic characteristics of Thorotrast-induced intrahepatic cholangiocarcinoma: comparison to non-Thorotrast-associated liver cancers. *Radiat Res*161: 235-43, 2004.
12. Furukawa M, Fukumoto M et al: Cytochrome P450 Gene expressions in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* 95(6): 520-9, 2004.
13. Moustafa MA, Fukumoto M et al: Comparative Analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expressions in peripheral blood leukocytes and in the liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 95(6): 530-6, 2004 .
14. Nakayama K, Fukumoto M et al: Allelic loss at 19q12 and Xq11-12 predict an adverse clinical outcome in patients with mucinous ovarian tumours of low malignant potential. *Br J Cancer* 90(6): 1204-10, 2004.
15. Nakajima A, Fukumoto M et al: Beneficial effect of cepharanthine on overcoming drug-resistance of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 24(3): 635-45, 2004.
16. Momoi H, W Fukumoto M et al: Primary Osteosarcoma of the Breast. *J Jpn Breast Cancer Soc* 11(4): 396-400, 2004.
17. Preston DL, Kodama K et al. Studies of mortality of Atomic Bomb Survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiation Res* 160:381-407,2003.
18. Prestone DL, Kodama K et al. Effect of recent Atomic Bomb survivor dosimetry changes on cancer mortality risk estimates. *Radiation Res.* 162: 377-389,2004.
19. Pierce DA, Kodama K et al. Joint effects of radiation and smoking on lung cancer risk among Atomic Bomb Survivors. *Radiation Res.* 159:511-520, 2003.
20. Y. Ishimi, K Yamada, et al. Levels of MCM4 phosphorylation and DNA synthesis in DNA replication block checkpoint control. *J. Struc. Biol.*, 146, 234-241, 2004.

日本語論文

1. 森田直子、山下俊一ら：旧ソ連邦居住者の体内被曝の検討 *広島医学*, 57:371-373, 2004
2. 浜田亜衣子、山下俊一ら：セミパラチンスク核実験場周辺住民における血液 mtDNA 異常 *広島医学* 57:382-385, 2004
3. 難波裕幸、山下俊一ら：甲状腺がん組織における BRAF 変異の解析 *広島医学* 57, 393-395, 2004

4. Dimitriy Starenki、山下俊一ら：NF- κ B 活性阻害による甲状腺癌放射線療法感受性増強効果 広島医学 57, 388-392, 2004
5. 神谷研二：広島大学 21 世紀 COE プログラム「放射線災害医療開発の先端的研究教育拠点・ゲノム障害科学に基づく学術基盤の確立と医療展開」の概要．長崎医学会雑誌，79 別冊，p.10-14, 2004.9
6. 増田雄司，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 を阻害する DNA 構造の解析．長崎医学会雑誌，79 別冊，p.139-141, 2004.9
7. 増田雄司，増田憲治，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1-REV7 複合体の生化学的解析．広島医学，57(4 Suppl.)，p.432-434, 2004.4
8. 井倉毅，白石貴博，神谷研二：DNA 損傷におけるヒストンアセチル化酵素複合体のダイナミクス．広島医学，57(4 Suppl.)，p.430-431, 2004.4
9. 福本 学，松本 康男：悪性腫瘍放射線治療後の二次癌：全国アンケート調査と症例解析．癌の臨床 50(13)：1081-4, 2004
10. 坂本 修一：DNA 損傷応答の分子機構と NBS1 の機能—染色体不安定疾患因子群が形成するネットワーク—放射線生物研究 39(4)：417-427, 2004