

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 広島大学 原爆放射線医科学研究所 神谷 研二

研究成果の要旨

本研究の成果は、チェルノブイリ甲状腺がん組織バンクを利用し甲状腺癌の遺伝子解析を行い、BRAF 遺伝子異常は放射線被ばくとの関連はなく小児期から成人発症に向けてその頻度が増加すること、及び成人甲状腺癌では、散発群に比べて TP53 遺伝子多型に差があることを明らかにした。トロトラス症の研究では、 α 線照射により急性期たんぱく質遺伝子が発現亢進しており、炎症状態にあることが推察された。アポトーシスを阻害する IAP 蛋白分子である Apollon の発現が放射線治療後の口腔癌細胞で増加していた。原爆被爆者集団の疫学調査では、新線量体系 DS02 の推定 γ 線被爆量は 10%増加したことや、1) 男性乳がん発生の過剰相対リスクは 8 /1Sv、2) 皮膚がんへの放射線と紫外線の関与は相加的であることを明らかにした。一方、放射線誘発がん機構を解明する一助として、突然変異を生成する損傷乗り越え DNA 合成酵素 REV1 の機能解析をおこない、REV1 は Pol κ , Pol η , Pol ι と結合するのみならず ssDNA 結合活性を持つ事、及び *Rev1* transgenic マウスでは発がん感受性が亢進していることを明らかにした。一方、放射線損傷応答の研究では、ATM は DNA 損傷により NBS1 依存的にヒストン H2AX と複合体を形成し、ATM が活性化されることで DNA 損傷チェックポイントを活性化することが示唆された。また、放射線損傷への損傷トレランスの関与について検討した。

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
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
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癌組織の収集管理と分子疫学調査
難波 裕幸*	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 助教授	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
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
小林 純也*	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 主席研究員・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	独立行政法人国立健康・栄養研究所 研究室長	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

* 1：平成16年4月1日～平成16年12月14日

* 2：平成16年12月15日～平成18年3月31日

* 3：平成16年4月1日～平成17年3月31日

* 4：平成17年4月1日～平成18年12月15日

総合研究報告

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の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はたがひやその他の健康障害についての詳細な検討や放射線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 研究方法

(1) 研究試料とデータベース

1) 2000年に設立されたチェルノブイリ組織バンク [International Cooperation to Establish Post Chernobyl NIS Thyroid Tissue, Nucleic Acid and Data Bank (NISCTB)] の甲状腺癌サンプルを使用した。

2) 放射線影響研究所では、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(約93,000人の被爆者と約27,000人の対照群)からなる寿命調査集団を設定して、死亡追跡調査と、1958年から広島・長崎の地域がん登録とのレコードリンケージによるがん罹患調査を実施している。本研究はこの資料を用いて解析した。新しい線量体系DS02と1986年線量推定方式(DS86)を用いた。

(2) 分子生物学的解析

1) チェルノブイリ周辺の甲状腺癌発症者と非発症者のBRAF遺伝子の変異解析とDNA修復遺伝子群(TP53, ATMとMDM2遺伝子)の遺伝子多型(SNPs)を解析した。

2) 口腔癌のApo11on遺伝子の発現を解析した。

3) REV1の酵素活性をプラマー伸長法で測定し、ssDNAへの結合能をゲルシフト法で測定した。

4) Pol δ , PCNA, RFC, RPAなどの組み換えタンパク質を精製し、Pol δ による試験管内DNA複製系を再構成した。

5) ATM, H2AX, NBS1の動態解析は、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、各種抗体を用いた細胞の免疫染色法で行い、ノックダウン細胞はsiRNA法で作成した。

6) アルカリ性蔗糖密度勾配遠心法で一本鎖切断を解析。

(3) 動物実験

1) Rev1トランスジェニックマウスを作製しMNU投与による発がん実験を行った。誘発した胸腺リンパ腫のリンパ球表面抗原をFACSscanで解析した。

2) マウス肝臓にホウ素中性子捕獲(BNC)法により8.5Gyの α 線と同量の γ 線を照射し、24時間後に全RNAを抽出し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイにより発現遺伝子の変化を解析した。

3 研究成果

① 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

1986年に起こったチェルノブイリ原発事故では、幼児に甲状腺癌の激増が認められ、Ret/PTC再配列遺伝子の頻度が高いことが報告された。本研究では、NISCTBのサンプルを使用しまずBRAF遺伝子変異を解析した。この遺伝子変異は成人甲状腺乳頭癌の30-50%に見つかる。BRAF遺伝子変異は日本人小児31例中1例(3.2%)、ウクライナ人思春期・若年成人では33例中8例(24.2%)、ウクライナ小児では認められなかった。日本人小児例とウクライナ被曝地域の小児例の間にBRAF遺伝子変異の頻度差が認められなかったことから、BRAF遺伝子変異は、放射線によるものではないことが示された。また、BRAF遺伝子変異は、成人甲状腺癌での高頻度であるのに比べ、小児甲状腺癌では低頻度であることから、BRAF遺伝子変異に年齢依存性のあることが明らかとなった。

次に、DNA修復遺伝子群の遺伝子多型(SNPs)の解析を行った。TP53遺伝子では、コドン72の多型によりプロリン(Pro)かアルギニン(Arg)のどちらかがコードされる。今回の解析の結果、成人の放射線誘発甲状腺癌では、散発群に比べて有意にArg/Argの比が低いことが判明した。しかし、放射線誘発小児甲状腺癌症例では、Arg/Arg比の増加はみられなかった。またATM遺伝子のIVS22-77C/Tの解析では、T/T群が散発性群で有意に少ないという結果を得た。

② 放射線誘発ゲノム損傷ならびに修復分子機構の解析

高発がん性の色素性乾皮症バリエーション(XPV)の原因遺伝子が「損傷乗り越えDNA合成」をする特殊なDNA polymeraseである事が明らかにされ、「損傷乗り越えDNA合成」とがん化との関係が世界中で注目されている。本研究は、translesion DNA複製装置のうち「誤りがちなDNA合成」に関与するRev1の機能と放射線発がんとの関係を解明することを目的とした。

Rev1トランスジェニックマウス(Rev1マウス)を作製し、MNU投与による発がん感受性を検討した結果、リンパ腫の誘発に高感受性を有することが示された。誘発した胸腺リンパ腫の表面マーカーの解析から、さまざまな分化段階のT細胞が腫瘍化したことが明らかになった。一方、REV1タンパク質の生化学的解析から、1) Pol κ , Pol η 及びPol ι と結合する2) ssDNAに強い親和性を持つ、

3) REV1 の dCMP 転移反応は ssDNA により阻害されることを明らかにした。さらに、ssDNA に結合した REV1 はその ssDNA 上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされ、REV1 のターゲットは、プライマー末端ではなく ssDNA である可能性が示唆された。この性質は他の DNA ポリメラーゼには観察されず、REV1 に特異的であった。この結果は、「損傷乗り越え DNA 合成」機構の中心的役割を担う REV1 の新しい役割を示す最初の所見と考えられる。この様な「損傷乗り越え DNA 合成」機構の解明には、試験管内 DNA 複製系の確立が不可欠であるが、今回 Pol δ による試験管内 DNA 複製系の確立に成功した。この系を発展させ、将来的には REV1 による試験管内「損傷乗り越え DNA 合成」系の確立を目指す、その準備状況は世界最先端と言える。

③ 放射線誘発遺伝子損傷ならびに修復分子機構の解析

電離放射線はゲノムに二重鎖切断 (Double-strand break: DSB) という重篤な損傷を誘発する。細胞は DNA 損傷を検知し、細胞周期チェックポイント機構で細胞増殖を止めるとともに、損傷 DNA の修復を行う。このような DNA 損傷応答機構の異常は癌誘発の原因になり、その機構解明は重要である。本研究では、放射線誘導 DNA 損傷時の ATM の活性化におけるヒストン H2AX および NBS1 の役割について検討した。その結果、DSB が発生すると直ちに、Ku70/80 依存的に DNA-PK が DSB 部位にリクルートされて、DSB 直近の H2AX をリン酸化し、リン酸化された H2AX をターゲットとして NBS1 を介して ATM がリクルートされることが解った。この集積の結果、ATM が活性化し、SMC1, p53 をはじめとするチェックポイント関連タンパク質をリン酸化することにより、チェックポイント機構を活性化して、細胞増殖を停止すると考えられた。

④ 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

血管造影剤トトラストを注入された患者に発症した肝腫瘍の研究からトトラスト症では、トトラストが肝の貪食細胞内に沈着しており、Kupffer細胞が被ばくの標的細胞であることを明らかにした。本研究では、放射線誘発肝がんの分子機構を解明するために、in vivoにおける α 線内部被ばく効果の研究を行った。その結果、放射線応答遺伝子や抗アポトーシス、金属結合蛋白遺伝子の発現亢進が線質に関係なく観察されたが、 α 線照射により発現変化する遺伝子の数は γ 線照射よりも多かった。照射によって変化する遺伝子発現プロフィールは、放射線被ばくの標的細胞に関係なく、所謂、急性期たんぱく質をコードした遺伝子発現に特徴付けられるように炎症状態にあることが明らかとなった。以上から、炎症

を抑制することが放射線傷害の防止と軽減のために有用であることが示唆された。一方、口腔癌の放射線治療法を確立するため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。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。

⑤ 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

新線量体系 (DS02) 導入に伴い長崎・広島市ともに推定ガンマ線量が 10% 増加した。男性乳がんのリスク解析を放影研寿命調査対象集団の男性 45,880 人を対象に行い、被ばく者に 9 例、非被ばく者に 3 例の男性乳がんを認めた。粗罹患率はそれぞれ 1.8/10 万人年、0.5/10 万人年であった。1 Sv あたりの過剰相対リスクは 8 (95%CI: 0.8-48) であり、放射線被ばくと男性乳がん罹患の間には有意な関連を認めた。原爆放射線被ばくと喫煙、飲酒および食事等の生活習慣因子、ならびに胃がん罹患率との関係を寿命調査集団の 38,576 人 (男性 14,885 人、女性 23,691 人) を対象として解析した。その結果、到達年齢、性、出生年で層化し、広島・長崎、喫煙、学歴で調整した被ばく線量別の胃がん罹患率ならびに相対リスクは、1000mGy (1 Gy) 以上の比較的高線量被ばくにおいてのみ有意な放射線の影響が観察された。皮膚がんへの放射線と紫外線の関与を寿命調査集団の 93,700 人を対照に解析した。その結果、放射線被ばくと紫外線との間には相加作用の存在が示唆された。また、原爆被爆者の肺がん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。

⑥ 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

放射線による突然変異の生成メカニズムを解明する目的で、遺伝子損傷状態での複製がどの様に行われるかを解析した。その結果、ヒト細胞では、損傷バイパス複製よりは「損傷トレランス」に近い機序が想定された。

4 倫理面への配慮

ヒト組織を用い遺伝子解析は、匿名化し、研究計画は、所属機関倫理委員会の承認を得た。組換え DNA 実験は、当該機関の組換え DNA 実験安全管理規定に従って承認手続きを行い、機関承認実験として承認された。また、動物実験は、当該機関の動物実験倫理規定を遵守して行った。