

## 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、ヒトの長期微量放射線内部被ばくの影響を研究し、チェルノブイリの放射線誘発成人甲状腺癌では、散発群に比べて TP53 遺伝子のコドン 72 多型 Arg/Arg の比が有意に低いことを明らかにした。トロトラスト症の解明のためマウス肝に  $\alpha$  線と  $\gamma$  線を照射し遺伝子発現を比較した。 $\alpha$  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。また、原爆被爆者集団の疫学調査では、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が示された。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 ssDNA 結合活性を持つ事、*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。また、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   | 分担研究課題                                     |
|---------------|--|
| 研究者名<br>神谷 研二 | 所属施設および職名<br>広島大学原爆放射線医科学研究所<br>教授         |
| 難波 裕幸         | 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科<br>附属原爆後障害医療研究施設<br>助教授   |
| 小林 純也         | 京都大学放射線生物研究センター<br>助手                      |
| 福本 学          | 東北大学加齢医学研究所 教授                             |
| 児玉 和紀         | 財団法人放射線影響研究所<br>主席研究員・部長                   |
| 山田 晃一         | 独立行政法人国立健康・栄養研究所<br>研究室長                   |
|               | 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            |
|               | 放射線誘発遺伝子損傷ならびに修復分子機構の解析                    |
|               | 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                  |
|               | 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               |
|               | 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影響や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)〕の設立・運営に関わり、また小児甲状腺癌サンプルの利用に関しても実験のためのプロトコールを申請し使用の許可を受けた。

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、死亡追跡調査を行っている。また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りがん罹患調査もおこなってきている。放射線健康影響評価において、調査集団が明確に定義されていることと同時に、個々人の被ばく線量が正確に推定されている集団は他に類がなく、寿命調査は放射線被ばくに伴う発がんリスク研究に関してこれまでに多くの情報を提供してきた。この寿命調査集団における放射線発がんに関し、男性乳癌、胃癌、及び皮膚癌に関する解析した。

### (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DNA修復遺伝子群(TP53, ATMとMDM2遺伝子)について遺伝子多型(SNPs)の比較検討をおこなった。

2) 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。

3) Pol  $\delta$ , PCNA, RFC, RPAなどのタンパク質を大腸菌で過剰発現し組み換えタンパク質を精製し、Pol  $\delta$ による試験管内DNA複製系を確立した。

4) 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。

5) 一本鎖切断の検出、及びDNA複製産物の解析にはアルカリ性蔗糖密度勾配遠心法を用いた

### (3) 動物実験

1) 遺伝子発現の制御が可能なメタロチオネインをプロモーターとした*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)法による8.5Gyの $\alpha$ 線と同量の $\gamma$ 線を照射した。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って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、被ばく時0歳から5歳までの幼児に数年後、甲状腺癌の激増が認められた。散発性の小児甲状腺癌は、世界的に極めて稀な疾患であり100万人に1人の割合で起こる。それがチェルノブイリではおよそ100倍の頻度で発症したことより、チェルノブイリ小児甲状腺癌は、放射線起因性の癌と考えられ、その遺伝子多型を解析した。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)のアミノ酸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。

このArg/Arg比低下の原因は、Arg/Proのヘテロ型が多いためである。散発性甲状腺癌症例および正常コントロール群に比較すると統計的に有意な差が認められた。しかし、放射線誘発小児甲状腺癌症例では、Arg/Arg比の増加はみられず、全体として放射線誘発甲状腺癌症例と散発性甲状腺癌症例の間に有意差はなかった。臨床病期とTP53遺伝子コドン72多型の関連性を検討したが、病期や転移などのパラメーターにおいて有意な差は見られなかった。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。

我々は、既に放射線照射によりマウス*Rev1*が誘導される事を確認している。従って、*Rev1*が放射線によるゲノム障害などで誘導されることで点突然変異の生成が蓄積されれば、やがて細胞は癌性突然変異を起こすと考えられる。これらの点をより明確にする為に、*Rev1*トランスジェニックマウス(*Rev1*マウス)を作製した。今回の実験で雌*Rev1*マウスは、MNU投与によるリンパ腫の誘発に高感受性を有することが示された。また、誘発した胸腺リンパ腫の表面マーカーの解析から*Rev1*マウスの胸腺

リンパ腫も野生型マウスと同様に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。即ち、*Rev1* の機能亢進による胸腺リンパ腫の誘発は、標的細胞を変えるものでは無いことが明らかとなった。

一方、REV1 タンパク質の生化学的解析から、1) REV1 タンパク質は ssDNA に強い親和性をもち、その親和性は見かけ上 ssDNA の長さに依存する、2) REV1 の dCMP 転移反応は ssDNA により阻害され、その阻害の程度も ssDNA の長さに依存して強くなる、ことが明らかとなった。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ることもわかった。この性質は他の DNA ポリメラーゼには観察されず、REV1 に特異的な性質である。この結果は、REV1 の最初のターゲットは、プライマー末端ではなく ssDNA である可能性を示唆している。「損傷乗り越え DNA 合成」機構の中心的役割を担う REV1 の役割は不明であるが、本研究で明らかとなった REV1 の生化学的活性は、その機構における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」機構における詳細な分子機構の解明には、試験管内 DNA 複製系の確立が不可欠であるが、今回 Pol  $\delta$  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。

今後、*Rev1* マウスを用いた病理学的解析と試験管内での生化学的解析を進め、Rev1 による「誤りがちな DNA 合成」機構の解明を行い、放射線誘発がんにおける役割を明らかにする。

### 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 DNA に二重鎖切断(Double-strand break: DSB) という、重篤な損傷を誘発することが知られている。細胞はこの様な DNA 損傷を直ちに検知し、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 の正確な修復を行う。従って、この様な DNA 損傷応答機構の異常は癌誘発の原因の一つだと考えられ、ヒト放射線誘発がんの分子機構を解明する上でも、DNA 損傷応答機構を明らかにすることは重要である。

電離放射線高感受性・高発がん性を示すナイミーヘン症候群の原因遺伝子 NBS1 が、細胞周期チェックポイントを制御する蛋白質リン酸化酵素である ATM と結合することにより、ATM の DSBs 部位へのリクルートメント、ATM 系路の活性化に関与することが最近報告された。そこで、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を行

った。解析の結果、DSB 損傷の発生に伴う細胞周期チェックポイントの活性化には次のような機構が考えられた。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、DSB 直近の H2AX をリン酸化する。次にリン酸化された 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。その結果、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

ロシアのプルトニウム製造工場で吸引したプルトニウム ( $\alpha$  線源) で肝悪性腫瘍が発生することからも、肝臓は、内部被ばくによる放射線誘発癌の標的器官の 1 つである。血管造影剤トトロ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ロラスト症では、トトロ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が明らかとなった。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  $\alpha$  線内部被ばく効果の研究を行った。

マウスの肝の Kupffer 細胞と血管内皮細胞のそれぞれにホウ素中性子捕獲法による  $\alpha$  線 (7.5Gy) と  $\gamma$  線を照射し、24 時間後の *in vivo* での放射線応答を検討した。オリゴヌクレオチドマイクロアレイによって、約 6,000 遺伝子の転写変化を解析した。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、 $\alpha$  線照射により発現変化する遺伝子の数は  $\gamma$  線照射よりも多かった。

放射線被ばくは肝傷害性であるため、肝毒性のある学物質投与後の肝における遺伝子発現 McMillian らの結果と比較した。その結果、Mtl と hemopexin 遺伝子の発現亢進と CYP 遺伝子群の発現低下が放射線特異的であった。

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。

### 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

#### 1) 男性乳がんリスク

放影研寿命調査対象集団の男性 45,880 人を対象とした。被ばく線量 2002 年線量推定方式 (DS02) を使用し、被ばく者と非被ばく者における乳がん罹患率は人年法を

用いて求めた。その結果、被ばく者において9例の、非被ばく者において3例の男性乳がんが認められ、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 当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有意な関連が認められた。しかし、罹患率が極端に低いためにリスク評価の95%信頼区間は広く、推定値はかなり不正確ではある。この報告は、寿命調査集団で放射線被ばくが男性乳がん罹患のリスクとなることに関する最初の報告である。

## 2) 生活習慣、被ばくと胃がん

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みるため、寿命調査集団の38,576人(男性14,885人、女性23,691人)を対象とする縦断的な調査がなされた。被ばく線量は、1986年線量推定方式(DS86)が使用された。解析の結果、放射線被ばく、男性、年齢、喫煙の程度、および喫煙期間が胃がんリスクの増加との間に有意な関連が認められた。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。

## 3) 放射線誘発皮膚がんと自然発生皮膚がんの組織学的特徴に関する報告

対象は寿命調査集団の93,700人である。被ばく線量は1986年線量推定方式(DS86)が使用された。罹患率は人年法で求め、放射線の影響はPoisson回帰モデルにより評価した。この観察期間内に、基底細胞がん106例、扁平上皮がん81例が認められた。放射線被ばくの影響は基底細胞がんのみならず、皮膚の表面積単位の過剰絶対リスクで表現すると、身体の太陽紫外線への露出度の高い部位と低い部位との間にリスクに差はなく、また放射線被ばくと紫外線の間には相加作用の存在が示唆された。

## 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前提として、放射線による遺伝子損傷の修復、及び傷害が在る状態で複製がどのように行われるかを、解明する必要がある。アルカリ性蔗糖密度勾配遠心法では10Gy X線照射30分後から1時間 pulse された複製産物は非常に幅広いピークであり、1-3時間の chase で bottom に沈降した。この高分子量側への「移行」はno-damageの場合の複製に匹敵する程、速い。色素性乾皮症ヴァリアント群細胞株で、この「移行」が遅れなかった結果から、DNA polymerase  $\eta$  の関与は疑問であり、又、caffeine によっ

ても阻害されなかったため、error-prone 系の損傷バイパスの関与についても否定的で、損傷バイパス複製というよりは、「損傷トレランス」に近い機序とも考えられた。一方、ニワトリ DT40 細胞に於いても、種々の破壊株を用いて、放射線照射後の複製産物の「移行」を観察した。その結果、 $\Delta$ RAD18 株では、X線に対する若干の感受性が検出された。従って、ニワトリ DT40 細胞では、放射線傷害後の「損傷トレランス」が機能している可能性がある。ヒト等で、放射線損傷に対して、なぜ損傷バイパス系、及び損傷トレランス系が機能しないかは不明である。

## 4 倫理面への配慮

ヒト組織を用いた遺伝子解析は、匿名化し、研究計画は、所属機関倫理委員会の承認を得た。チェルノブイリのサンプルは、申請によりNISCTBから供与を受けた。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。

## 研究成果の刊行発表

### 外国語論文

1. Hamada A, Mankovskaya S, Saenko V, Rogounovitch T, Mine M, Namba H, Nakashima M, Demidchik Y, Demidchik E, Yamashita S. Diagnostic usefulness of PCR profiling of the differentially expressed marker genes in thyroid papillary carcinomas. *Cancer Lett.* 224(2):289-301, 2005.
2. Podtcheko A, Namba H, Saenko V, Ohtsuru A, Starenki D, Meirmanov S, Polona I, Rogounovitch T, Yamashita S. Radiation-induced senescence-like terminal growth arrest in thyroid cells. *Thyroid.* 15(4):306-13, 2005.
3. Lantsov D, Meirmanov S, Nakashima M, Kondo H, Saenko V, Naruke Y, Namba H, Ito M, Abrosimov A, Lushnikov E, Sekine I, Yamashita Sh. Cyclin D1 overexpression in thyroid papillary microcarcinoma: its association with tumour size and aberrant beta-catenin expression. *Histopathology.* 47(3):248-56, 2005.
4. Morishita M, Ohtsuru A, Kumagai A, Namba H, Sato N, Hayashi T, Yamashita S. Vitamin D3 treatment for locally advanced thyroid cancer: a case report. *Endocr J.* 52(5):613-6, 2005.

5. Podtcheko A, Ohtsuru A, Namba H, Saenko V, Starenki D, Palona I, Sedliarou I, Rogounovitch T, Yamashita S. Inhibition of ABL Tyrosine Kinase Potentiates Radiation-Induced Terminal Growth Arrest in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Radiat Res.* 165(1):35-42, 2006.
6. Rogounovitch TI, Saenko VA, Ashizawa K, Sedliarou IA, Namba H, Abrosimov AY, Lushnikov EF, Roumiantsev PO, Konova MV, Petoukhova NS, Tchegotareva IV, Ivanov VK, Chekin SY, Bogdanova TI, Tronko MD, Tsyb AF, Thomas GA, Yamashita S. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncology Reports* in press.
7. Kashiwabara, S., Kashimoto, N., Uesaka, T., Wakabayashi, K., Kamiya, K., Watanabe, H. : 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.*, 24(2), 305-312, 2005.
8. Ohuchi, Y., Myojin, Y., Shimamoto, F., Kashimoto, N., Kamiya, K., Watanabe, H. : Decrease in size of azoxymethane induced colon carcinoma in F344 rats by 180-day fermented miso. *Oncology Reports*, 14(6), 1559-1564, 2005.
9. Chen B.P., Kobayashi J. et al. Cell cycle dependence of DNA-PK phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 280, 14709-14715, 2005.
10. Mukherjee B., Kobayaashi J. et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, in press.
11. Tsuchiya A, Fukumoto M, et al. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 37(3):323-36, 2005.
12. Lee I, Fukumoto M et al. Ethnic difference of *Helicobacter pylori* gastritis: Korean and Japanese gastritis is characterized by male- and antrum-predominant acute foveolitis in comparison with American gastritis. *World J Gastroenterol.* 11(1):94-8, 2005.
13. Ohtake Y, Fukumoto M et al. The involvement of polyamines as substrates of transglutaminase in zonal different hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Biol Pharm Bull.* 28(2):349-52, 2005.
14. Toda Y, Fukumoto M et al. Detection of ABCA7-positive cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Pathol Int* 55(10):639-43, 2005.
15. Wang L, Fukumoto M et al. Mechanisms of liver carcinogenesis by chronic exposure to alpha-particles from internally deposited Thorotrast. In *High Levels of Natural Radiation and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects (International Congress Series 1276)* (ed by Morishima et al.) (Excerpta Medica) pp192-4, 2005.
16. Fukumoto M et al. Mechanisms of liver carcinogenesis in patients injected with Thorotrast. *Health Effects of Incorporated Radionuclides GSF (Germany)*, pp239-242, 2005.
17. Fukumoto M et al. Analysis of carcinogenic mechanisms of liver cancers induced by chronic exposure to alpha-particles from internally deposited Thorotrast. *Radiat Measure.* in press.
18. Habibi Roudkenar M, Fukumoto M et al. Recombinant hybrid protein, Shiga-Toxin-GM-CSF, effectively induce apoptosis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, in press.
19. Fukumoto M et al. Ovarian epithelial tumors with low malignant potential (LMP): Are they precursors toward ovarian carcinoma? *Pathol Int*, in press
20. Sauvaget C, Lagarde F, Nagano J, Soda M, Koyama K, Kodama K: Lifestyle factors, radiation and gastric cancer in atomic-bomb survivors (Japan). *Cancer Causes and Control.* 16: 773-780, 2005.
21. 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.
22. K. Yamada, et al., Measurement of DNA synthesis and strand breaks using alkaline sucrose density gradient centrifugation. , *Reviews and Protocols in DT40 Research*, (ed. Beurstedde J-M.), Springer (Netherlands), in press.

日本語論文  
なし