

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310036

研究課題名（和文）染色体異数性を起源とした細胞がん化経路とその発生機構

研究課題名（英文）Cell transformation route and the developmental mechanics which assumed chromosomal aneuploidy an 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（和文）：

これまで、放射線細胞がん化経路は、DNA損傷が起源となり生ずる突然変異を介するものが主経路であると考えられていた。しかし、本研究の成果は、この定説を覆し、放射線発がん経路には、DNA損傷を起源とする経路とは別に、染色体異数化を起源とするものが存在し、それが放射線誘導細胞がん化の圧倒的主経路であることを明らかにした。これらの結果は、放射線による細胞がん化が、中心体構造異常に起因する染色体配分安定化機構の攪乱によって引き起こされることを強く示唆する。

研究成果の概要（英文）：

It has been believed that the first target of radiation carcinogenesis is DNA. However, this is not proved for radiation carcinogenesis yet. We discovered that frequency of aneuploid cell was closely related to that of radiation-induced cell transformation, but gene mutation was not. Aneuploidy was seen in high frequency in early process of cell transformation. These results strongly suggest that a main target of carcinogenesis by low dose radiation is not DNA, but is centrosome, which are the proteins to constitute chromosomal homeostasis maintenance mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：染色体異数化、中心体、細胞がん化、ミトコンドリア機能、自然発がん、メロテリック結合、長寿命ラジカル、微小核細胞融合法

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでシリアンハムスター (SHE)細胞を用いた細胞がん化実験系を用いて放射線による細胞がん化誘導機構を追跡し、Gyあたりの細胞がん化頻度が平均的な体細胞突然変異頻度の500~1,000倍高いことを発見した(Watanabe et al. 1980; 1984a; 1984b)。さらに、放射線照射された細胞における突然変異と細胞がん化の出現動態を詳細に調べた。その結果、突然変異は、被ばく後1~2回の細胞分裂を経て固定・発現されるが、細胞がん化は、被ばく後、10数回の細胞分裂を経てから現れる遅延的現象であり、突然変異の出現動態と全く違うことが判った(Suzuki et al. 1989; Watanabe et al. 1990; 1991)。これらの事実は、細胞がん化が複数の突然変異の集積で生ずるという“多段階突然変異説”(Fearon and Vogelstein 1990)と矛盾するものであり、発がん経路に突然変異を経由する経路以外の発現頻度が極めて高い経路が存在することを強く示唆する。その後、ヒトの全遺伝子数がおよそ2万5千程度であることが明らかになった。そして、全遺伝子のおよそ10%が発がんに関係する遺伝子であると想定されている。単独遺伝子の放射線突然変異率は、 $10^{-5}/\text{Gy}$ 程度であることを考えると、我々の研究結果から導いた放射線による細胞がん化率は、すべてのがん関連遺伝子が一度に変異を起こすという異常状況を想定して導かれる頻度よりも大きいことになる。このことは、突然変異を経由する経路以外の発がん経路が存在するという我々の推測が正しいことを強く暗示し、発がんの仕組みを理解するためにその全容を明らかにすることが望まれる。

2. 研究の目的

これまでに、我々を含めて多くの研究者によって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が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。

これまでに、我々の研究グループは、マウスあるいはシリアンハムスター胎児細胞を用いた研究によって放射線被ばくした細胞がが

ん化過程の早期に見られる変化は染色体の異数化であることを発見した。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発生する時期は、細胞がん化した後で、染色体が異数化する時期よりかなり遅れる。したがって、染色体数の変化が、放射線による細胞がん化の第一ステップであり、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、染色体数安定維持装置に関与するタンパクであり、それによる染色体分配の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た。特に、(1)染色体異数化が生ずる機構解明、(2)染色体異数化を引き起こす細胞内標的の特定、(3)染色体異数化がどのように細胞がん化に関与するかの探索の3項目に的を絞り研究をおこなった。

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おこなうことのできるマウス胎児由来(ME)および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胎児由来(HE)細胞を併用した。

本研究では、放射線照射による細胞分裂装置(染色体分配装置)の構造変化が染色体異数化を誘導する原因となるかを詳細に調査した。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としては、10を下らない成分が知られているが、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、セントロゾームに焦点を絞り、そ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。

4. 研究成果

4.1 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ところ、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。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て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。

4.2 放射線照射による異数化はセントロゾームの構造異常によって生ずる

これまでに、がん化細胞に最初に普遍的に見られる変化が染色体の異数化であることを示した。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し、セントロゾーム（中心体）に注目して検討したが、予想通り、放射線照射や高密度培養は、中心体数の増減、構造異常を誘導することがわかった。勿論、こうした異常を持った細胞の多くは細胞分裂がうまくゆかず死を迎える。しかし、異常を持った細胞のうち、無視できない多くの細胞が生き残り染色体の異数化を起していることと予想される。その経路を図1に示す。

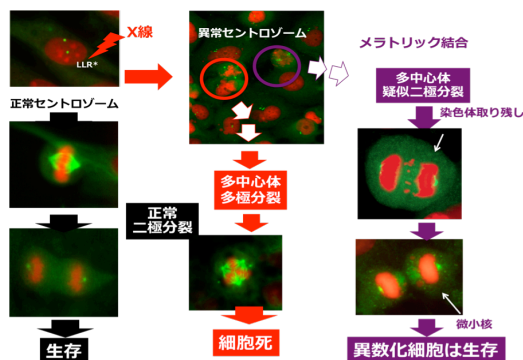


図1. メラトリック結合を介した染色体異数化の機構予想図

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ゆかず細胞は死を迎える（図1中央の経路）。その場合、二つの娘細胞に受け渡されるべき染色体が、三個以上の細胞に分散されるので、全ての遺伝情

報が個々の細胞に受け継がれる可能性は極めて低い。しかし、増えた中心体が二極に集まって疑似二極分裂を起こすと、複数の中心体が集合した極から複数の紡錘子が伸び動原体にメロテリック結合することがわかった（図1右の経路）。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ずる。そのため、染色体の取り残しが起き、引き続く細胞分裂時に一方の細胞に染色体が取り込まれる。

染色体が異数化した細胞では遺伝子発現が大きく変化し、種々のがん形質を発現するようになる。現時点で、我々は、「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た。

ここで観察するような中心体構造異常は、放射線照射時に限らず高密度培養など培養条件の変化でも容易に誘導される。その頻度は、遺伝子突然変異に比べて極端に大きい。このことは、放射線による発がんを自然発がんの経路を区別することを不可能西ており、言い換えれば、自然放射線レベルの低線量放射線による発がんは自然発がんの上乗せに過ぎないことを示唆する。

4.3 染色体異数化はどのようにして細胞がん化を促進するか？

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？我々は、マウスやヒトの胎児由来細胞から三倍体細胞と四倍体細胞を分離し、それぞれの細胞におけるがん形質発現を調べたが、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判った。一方、三倍体細胞では、トリソミー化した染色体に限らず正常数のままである染色体にコードされた遺伝子であっても、その遺伝子発現が異常になっていることが判った。それに伴い、細胞増殖能が亢進し、DNA損傷性が増し、かつ、基質非依存性増殖能や造腫瘍性を獲得している。三倍体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、三倍体化が細胞がん化の原因であることは強く示唆される。

我々の成果を総合的に解釈すると、図2下段に示す経路(新パラダイム)を迎える可能性が大きい。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。我々は、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持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、細胞内高分子タンパク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持つ。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であるとする既存の概念と根本的に異なる。長寿命ラジカルは、中心体を攻撃し中心体の構造および数的異常を引き起こし染色体異数化を生じさせる。

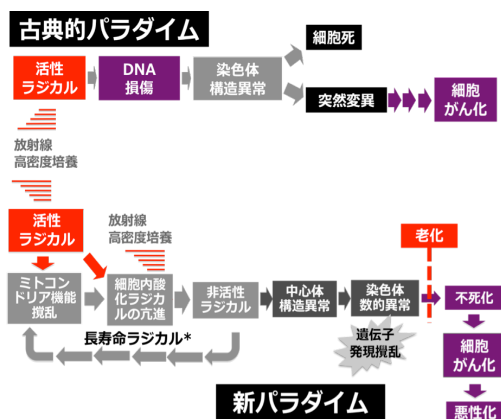


図 2 DNA 損傷を起源としない放射線発がんパラダイム

これらの結果を総合的に判断すると、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過ぎず、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。言い換えれば、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過ぎない。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。従って、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、生ずる原因損傷は非 DNA 損傷である。従って、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。

4.4 まとめ

我々の結果は、放射線発がんの経路には DNA 損傷を起源とする経路以外に、DNA 損

傷を起源としない経路が存在することを明確に示している。そして、今回、新しく発見した DNA 損傷を起源としない経路が圧倒的主経路である。このことは、発がんが DNA 損傷を起源とした突然変異の積み重ねで生ずるとするセントラルドグマを基盤とする仕組みで生ずるという、現在、主流の考え方に真っ向から反対するものである。この知見は、学術的に生命科学に新展開をもたらすものとして大いに期待できる。

5. 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 26 件)

1. 渡邊正己: 放射線発がんの主経路は染色体異数化を起源とする、保健物理、印刷中、2012 年。(査読付き)
2. 渡邊正己、菓子野元郎、熊谷純: 放射線誘導長寿命ラジカルが DNA 損傷を起源としない発がん経路の引き金、日本化学会学会誌、印刷中、2012 年。(査読付き)
3. 渡邊正己: 放射線生体影響を科学的に評価することが放射線防護の基盤-LNT 仮説を見直す必要がある、特集保健物理から対する放射線生物研究、ESI-NEWS, 29(1): 1-4, 2011 年。(査読無し)
4. Suzuki K, Yamaji H, Kobashigawa S, Kawauchi R, Shima K, Kodama S, Watanabe M: Epigenetic gene silencing is a novel mechanism involved in delayed manifestation of radiation-induced genomic instability in mammalian cells. *Radiat Res.* 175(4): 416-423, 2011. (査読付き)
5. Mori Y, Aki K, Kuge K, Tajima S, Yamanaka N, Kaji Y, Yamamoto N, Nagai R, Yoshii H, Fujii N, Watanabe M, Kinouchi T, Fujii N: UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of N(ε)-carboxymethyl lysine (CML) in keratin of skin. *J Chromatogr B.* 879(29): 3303-3309, 2011. (査読付き)
6. Nawata H, Kashino G, Tano K, Daino K, Shimada Y, Kugoh H, Oshimura M, Watanabe M: Dysregulation of gene expression in the artificial human trisomy cells of chromosome 8 associated with transformed cell phenotypes. *Pros ONE.* 6(9): e25319, 2011.

- (査読付き)
7. Okada T, Kashino G, Nishiura H, Tano K, Watanabe M.: Micronuclei formation induced by X-irradiation does not always result from DNA double-strand breaks. *J Radiat Res (Tokyo)*. 53(1): 93-100, 2012. (査読付き)
 8. Nishiura H, Kumagai J, Kashino G, Okada T, Tano K, Watanabe M. : The bystander effect is a novel mechanism of UVA-induced melanogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 88(2): 389-397, 2012. (査読付き)
 9. Masunaga S, Tano K, Nakamura J, Watanabe M., Kashino G, Takahashi A, Tanaka H, Suzuki M, Ohnishi K, Kinashi Y, Liu Y, Ohnishi T, Ono K. : Usefulness of hexamethylene tetramine as an adjuvant to radiation and cisplatin in the treatment of solid tumors: its independency of p53 status. *J Radiat Res (Tokyo)*. 51(1): 27-35, 2011. (査読付き)
 10. Kashino G, Liu Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Ono K, Tano K, Watanabe M. (2010) An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *J Radiat Res (Tokyo)*. 51(6): 733-470, 2010. (査読付き)
 11. Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. : Role of Ku80-dependent end-joining in delayed genomic instability in mammalian cells surviving ionizing radiation. *Mutat Res*. 683 (1-2): 29-34, 2010. (査読付き)
 12. Inoue E, Tano K, Yoshii H, Nakamura J, Tada S, Watanabe M., Seki M, Enomoto T : SOD1 Is essential for the viability of DT40 cells and nuclear SOD1 Functions as a guardian of genomic DNA. *J Nucleic Acids*. Aug 5; 2010. pii: 795946. (査読付き)
 13. Asagoshi K, Tano K, Chastain PD 2nd, Adachi N, Sonoda E, Kikuchi K, Koyama H, Nagata K, Kaufman DG, Takeda S, Wilson SH, Watanabe M., Swenberg JA, Nakamura J.: FEN1 functions in long patch base excision repair under conditions of oxidative stress in vertebrate cells. *Mol Cancer Res*. 8(2): 204-215, 2010. (査読付き)
 14. Kohzaki M, Nishihara K, Hirota K, Sonoda E, Yoshimura M, Ekino S, Butler JE, Watanabe M., Halazonetis TD, Takeda S: DNA polymerases nu and theta are required for efficient immunoglobulin V gene diversification in chicken. *J Cell Biol*. 189(7): 1117-1127, 2010. (査読付き)
 15. Masunaga SI, Tano K, Nakamura J, Watanabe M., Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K: Adverse effect of mild temperature hyperthermia combined with hexamethylenetetramine in the treatment of solid tumors: compared with its effect combined with tirapazamine. *Exp Ther Med*. 1: 169-174, 2010. (査読付き)
 16. Asagoshi K, Tano K, Chastain PD 2nd, Adachi N, Sonoda E, Kikuchi K, Inoue E, Tano K, Yoshii H, Nakamura J, Tada S, Watanabe M., Seki M, Enomoto T.: SOD1 Is essential for the viability of DT40 cells and nuclear SOD1 functions as a guardian of genomic DNA. *J Nucleic Acids*. Aug 5 pii: 795946, 2010. (査読付き)
 17. Masunaga S, Kono K, Nakamura J, Tano K, Yoshida H, Watanabe M., Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Ono K.: Usefulness of hexamethylenetetramine in combination with chemotherapy using free and pegylated liposomal doxorubicin in vivo, referring to the effect on quiescent cells. *Oncol Rep*. 21(5): 1307-1312, 2009. (査読付き)
 15. Masunaga S, Tano K, Watanabe M., Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K.: Evaluation of the potential of hexamethylenetetramine, compared with tirapazamine, as a combined agent with gamma-irradiation and cisplatin treatment *in vivo*. *Br J Radiol*. 82(977): 392-400, 2009. (査読付き)
 16. 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 (Tokyo)*. 50(3): 253-259, 2009. (査読付き)
 17. 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.* 74(1): 229-236, 2009. (査読付き)
18. Toyokuni H, Maruo A, Suzuki K, Watanabe M.: The contribution of radiation-induced large deletion of the genome to chromosomal instability. *Radiat Res.* 171(12): 198- 203, 2009. (査読付き)
19. Yoshii H, Watanabe M.: Intervention of oxygen-control ability to radiation sensitivity, cell aging and cell transformation. *J Radiat Res (Tokyo).* 50(2): 127-137, 2009. (査読付き)
20. 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(2): 151-160, 2009. (査読付き)
21. Pachkowski BF, Tano K, Afonin V, Elder RH, Takeda S, Watanabe M, Swenberg JA, Nakamura J.: Cells deficient in PARP-1 show an accelerated accumulation of DNA single strand breaks, but not AP sites, over the PARP-1-proficient cells exposed to MMS. *Mutat Res.* 671(1-2): 93- 99, 2009. (査読付き)
22. Suzuki K, Kashino G, Kodama S, Watanabe M.: Long-term persistence of X-ray-induced genomic instability in quiescent normal human diploid cells. *Mutat Res.* 671(1-2): 33-39, 2009. (査読付き)
23. 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.* 301(9): 631-646, 2009. (査読付き)

[学会発表] (計 36 件)

1. 渡邊正己、菓子野元郎、熊谷純、渡邊喜美子、田野恵三: 放射線発がんへのミトコンドリアの関与、ワークショップ『放射線生物学と活性酸素(酸化ストレス) —ミトコンドリアの役割—』、第 54 回日本放射線影響学会学術大会、平成 23 年 11 月 17~19 日、神戸。(招聘講演)
2. Watanabe M, Watanabe K, Kashino G, Nawata H, Tano K, Kumagai J.: The origin of radiation carcinogenesis is chromosomal aneuploid. *In a Symposium of European Radiation Research Society 2010.* Sep 5-9, 2010, Stockholm, Sweden. (Invited)
3. Watanabe M.: Biological effects of low dose radiation, A Symposium on “Urgent Symposium for The accidents in Fukushima Daiichi nuclear power plant”, *IUPAC International Congress of Analytical Sciences 2011.* May 22-26, 2011, Kyoto, Japan. (Invited)
4. Watanabe M, Watanabe K, Kashino G, Kumagai J, Tano K. Symposium on “Non-targeted effects-its mechanism and significance”, *14th International Congress of Radiation Research 2011.* Aug 28-Sep 1, 2011, Warszawa, Poland. (Invited)
- (他 32 件)

[その他]
なし。

ホームページ等
定年のため今後のホームページ公開については未定。

6. 研究組織
(1)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