

NIRS-M-94

放医研 図書室



8 0 1 9 9 3 0 1 9

放医研シンポジウムシリーズ No.24

放射線発がんとその制御 ー機構解明へのアプローチー

佐藤 弘 毅 編
荻生 俊 昭

放射線医学総合研究所

放医研シンポジウムシリーズ No.24

放射線発がんとその制御 ー機構解明へのアプローチー

佐藤 弘毅 編
荻生 俊昭

RADIATION CARCINOGENESIS AND ITS CONTROL
—APPROACHES TO MECHANISM ELUCIDATION—

Proceedings of the 24th NIRS Symposium
held at Chiba, December 3–4, 1992

Edited by
KOKI SATO and TOSHIAKI OGIU

November, 1993
National Institute of Radiological Sciences
Chiba, Japan

開会の挨拶

放射線発癌の問題は、100年にもわたって我々とかかわりあいをもって来た、いわば古くて新しいテーマです。最近では放射線防護にも関連して線量－反応関係の提示と解釈が求められますが、その際単に低線量放射線を直接用いた大規模な動物実験をするよりは、分子細胞レベルでの放射線発癌に特有なメカニズムと癌に到るまでの各段階を解析した方が早道ではないかという考えが強い様です。

癌が単細胞あるいは単クローン起源であることは多くのデータでかなり確かである様ですが、遺伝的に変った1コあるいは数コの細胞が細胞間相互作用の壁を乗り越えながら10年とか20年を経て、癌病巣を造るまでには、まだ隠された過程が多いことは誰でもが認めるところです。

このシンポジウムでは、疫学もふくめ放射線発癌に関し長年研究を進めて来た人々のデータから将来予見される重要課題を拾いあげ、他の分野において発癌研究を進めている人々の考え方や分子生物学者に係わる技術面での発見を参考としながら、最終的には癌の予防あるいは放射線防護の向上、発展につなげていこうというのが主催者側のねらいのようです。放射線は紫外線と比べると作用面での特異性が少ないので、研究面での困難さがあるかも知れませんが、突破口を見つける為には多くの人々との討論が必要なことはいうまでもありません。

本シンポジウムの成功をお祈りします。

平成4年12月3日
放射線医学総合研究所
所長 松平 寛通

目 次

開会の挨拶	松平寛通	v
座長一覧		viii
執筆者一覧		ix
 I 実験的発がん		
1 放射線による腫瘍発生における線量率の影響について	大津 裕司	3
2 ベータ線反復照射によるマウス皮膚発がんの閾値線量	大津山 彰	14
3 年齢依存性	佐々木俊作	21
4 遺伝性発がん	野村 大成	31
 II トランスジェニック動物		
1 トランスジェニック・マウスの腫瘍発生病理	井上 達	39
2 TL遺伝子導入マウス	小幡 裕一	49
 III ヒトにおける放射線発癌		
1 遺伝子再配列と放射線発癌	伊藤 敬	61
—BCR/ABLとRET癌遺伝子—		
2 甲状腺癌分化過程におけるp53	瀬山 敏雄	66
3 SCID-huマウスとそのヒト放射線生物学への応用	京泉 誠之	73
—骨髄モデルを用いたX線感受性の解析—		
 IV 細胞間相互作用		
1 がんの発生と細胞間相互作用	森 道夫	83
2 発癌における細胞外マトリックスの役割	坂倉 照好	90
3 胸腺微小環境における細胞間相互作用	広川 勝昱	96
 V 白血病発症機構		
1 放射線誘発胸腺リンパ腫の前リンパ腫細胞のクローナリティの分析とがん化の 初期過程の解析へのアプローチ	武藤 正弘	109
2 白血病におけるp53遺伝子の変異	杉本 耕一	118
3 急性前骨髄球性白血病	田代 聡	126
4 リンパ腫における <i>BCL-1</i> , <i>BCL-2</i> 遺伝子の役割	瀬戸 加大	132

VI 特別講演

原爆被爆者集団におけるガン発生調査	馬淵 清彦	145
-------------------------	-------	-----

VII 発がん制御

1 アンチセンスオリゴDNAを用いた癌遺伝子治療の開発	和気 徳夫	153
2 アスコルビン酸によるin vitro発癌の抑制	田内 広	157
3 レチノイド	橋本 祐一	164
4 茶カテキンの機能性と発がん抑制の可能性	原 征彦	170
5 アザチロシン	岡田 信子	177
6 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼすカロリー制限の効果	吉田 和子	186

第24回放医研シンポジウム

「放射線発がんとその制御－機構解明へのアプローチ」総評	佐渡 敏彦	192
編集後記	佐藤 弘毅	195
第24回放医研シンポジウム「放射線発がんとその制御」プログラム		196
第24回放医研シンポジウム実行委員会名簿		197

座長一覧

(担当セッション順)

I. 実験的発がん	二階堂 修	金沢大学
II. トランスジェニック動物	井川 洋二	東京医科歯科大学
III. ヒトにおける放射線発がん	秋山 實利	放射線影響研究所
IV. 細胞間相互作用	田ノ岡 宏	国立がんセンター研究所
V. 白血病発症機構	平井 久丸	東京大学
VI. 特別講演	佐々木正夫	京都大学
VII. 発がん制御	澤田 昭三	広島大学
	菅原 努	体質研究会
V. 白血病発症機構	鎌田 七男	広島大学

執筆者一覧（発表順，敬称略）

（所属は平成4年12月末現在）

大津 裕司	放射線医学総合研究所
大津山 彰	国立がんセンター研究所
佐々木俊作	放射線医学総合研究所
野村 大成	大阪大学
井上 達	横浜市立大学
小幡 裕一	愛知県がんセンター研究所
伊藤 敬	放射線影響研究所
瀬山 敏雄	放射線影響研究所
京泉 誠之	放射線影響研究所
森 道夫	札幌医科大学
坂倉 照好	理化学研究所
広川 勝昱	東京都老人総合研究所
武藤 正弘	放射線医学総合研究所
杉本 耕一	東京大学
田代 聡	広島大学
瀬戸 加大	愛知県がんセンター研究所
馬淵 清彦	放射線影響研究所
和気 徳夫	九州大学
田内 広	広島大学
橋本 祐一	東京大学
原 征彦	三井農林食品総合研究所
岡田 信子	国立がんセンター研究所
吉田 和子	放射線医学総合研究所

I 実験的発がん

- 1 放射線による腫瘍発生における線量率の影響について 大津 裕司 他
- 2 ベータ線反復照射によるマウス皮膚発がんの閾値線量 大津山 彰 他
- 3 年齢依存性 佐々木俊作
- 4 遺伝性発がん 野村 大成

1 放射線による腫瘍発生における 線量率の影響について

大津 裕司*／佐藤 文昭**／小林 森*／野田 攸子*／
古瀬 健*／白貝 彰宏*／福津久美子*／川島 直行*

Influence of dose-rate on tumorigenesis in mice irradiated with gamma-rays from cesium 137

Hiroshi Otsu, Fumiaki Sato*, Shigeru Kobayashi, Yuko Noda,
Takeshi Furuse, Akihiro Shiragai, Kumiko Fukutsu and Naoyuki Kawashima

*National Institute of Radiological Sciences
4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba, 263 Japan

**Hokkaido University
Sapporo-shi, Hokkaido, 060 Japan

Abstract

Among various types of neoplasms, thymic lymphomas developed most frequently (60-80 %) in C₅₇BL/6J mice of both sexes, continuously whole-body given a total dose of 20 or 39 Gy at a low dose-rate of 37.5 cGy/day, in an age-dependent manner, but without sex-dependency.

A certain level of sensitivity to the induction of thymic lymphoma was confirmed to exist from 28 through 200 days of age, and from then to decrease with increasing age.

The incidence of thymic lymphoma decreased from 81 to 23 or 4% with reduction of the dose-rate from 37.5 cGy/day to 8.4 or 2.9, respectively, with a total dose of 20 Gy; it decreased from 60% to 23% with reduction of the dose rate from 37.5 cGy/day to 8.4 with a total dose of 39 Gy.

Lung tumor and liver tumor showed higher incidence in mice exposed to a total dose of 20 Gy at a dose-rate of 8.4 cGy/day than in mice at the higher dose-rate of 37.5 cGy/day, and multiplicity in tumorigenesis was noticed in the lower dose-rate groups. The incidence of all the types of neoplasms, and of lung tumor and liver tumor separately, were used to calculate the dose dose-rate effectiveness factor (DDREF), which resulted in a range of 0.7 to 15.

A new study is currently in progress with the purpose of obtaining more precise dose dose-rate effectiveness factors.

放射線による腫瘍発生と線量との相関性については疫学的または実験的にも高線量率照射によったデータに基づく報告が多い。しかし、表 1¹⁻⁶⁾にあるように 1 日照射線量が 50cGy 以下の低い線量率の連続照射実験における腫瘍発生に関する研究も報告されている。一般に線量率を減少させるにつれ、腫瘍発生率も減少するとの実験的結果が得られている。この効果を線量・線量率効果係数(dose dose-rate effectiveness factor: DDREF)で表している。上記の線量率が 50cGy/日以下では長期連続照射によっても骨髓造血

表 1 これまでに行われた低線量率照射実験の線量率を各実験ごとに○で示した。●は本実験での線量率を示す。

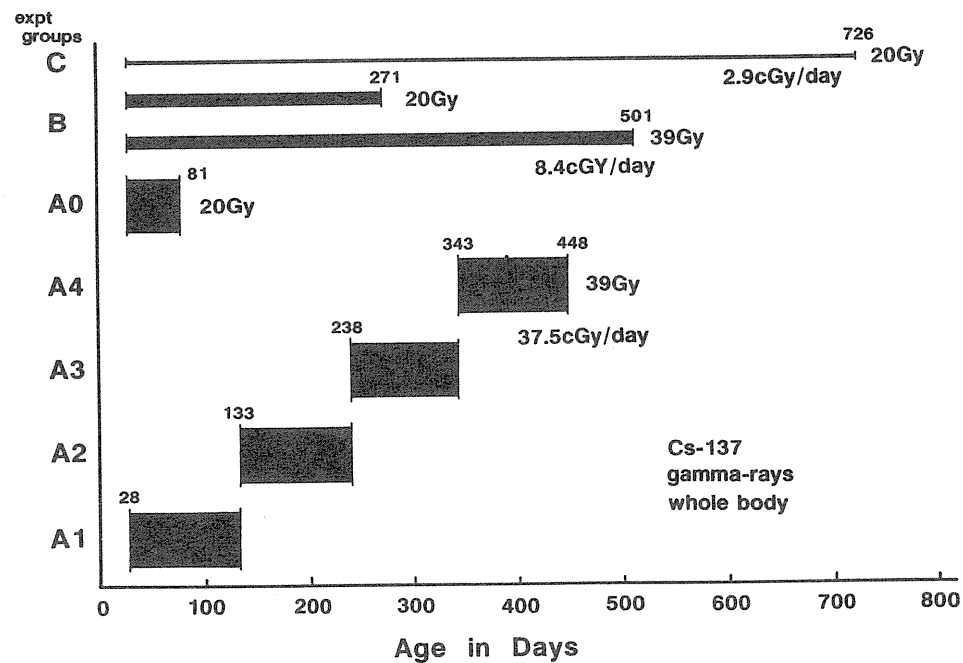
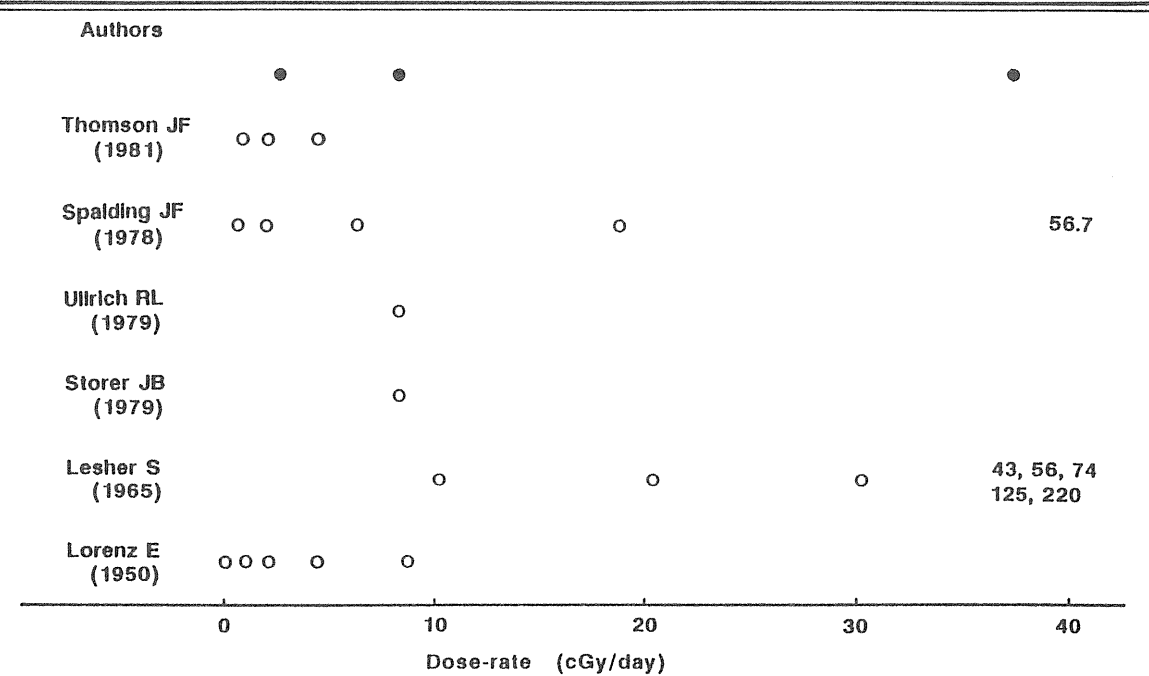


図 1 本実験での照射の線量率と照射開始日齢と照射期間とを図示した。

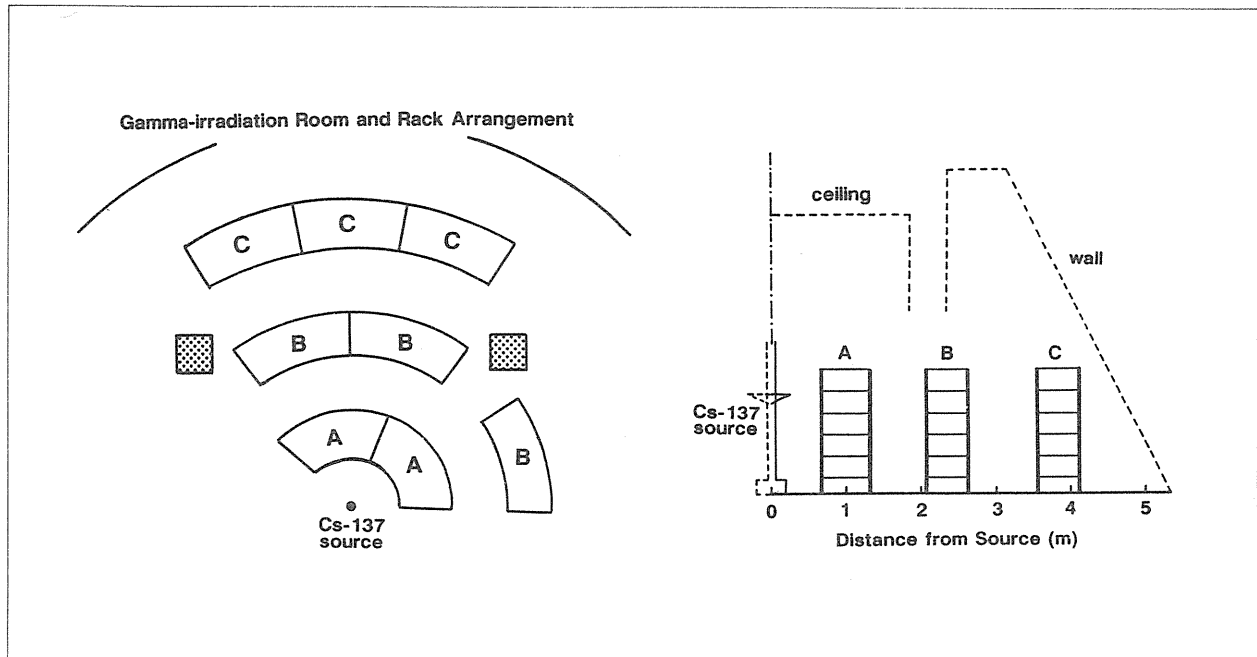


図2 本実験での照射線源と線量率との空間的相関を示した。この図は文献8の原図による。

組織や消化管上皮組織の幹細胞の増殖に大きな障害を与えることがなく、ほぼ正常の構造や機能が保持・維持されるとの恒常性が認められた⁷⁾。低線量率連続照射実験には大きく分けて二つの方法があり、一つは一生涯照射し続ける方法で、もう一つは蓄積線量を一定量に決めておく方法である。いずれの方法をとっても照射期間が長くなり、動物の腫瘍発生に対する感受性の時間的推移を考慮に入れることが必要になる。特に生涯照射実験においては無視できない大切な問題である。一方、前記ほどの低線量率連続照射のデータはヒトの場合には乏しく、DDREFについての一般化が出来ないかと考えられている。

これから、放医研でこれまでに行われてきた低線量率連続照射実験の概要を述べる。

低線量率としては表1の実験にある線量率の範囲内の3つの線量率37.5cGy/日:(A), 8.4cGy/日:(B), そして2.9cGy/日:(C)とを設定した(図1)。線源はセシウム137(0.374TBq)を用い、線源から照射ケージ棚を同心円状に一定距離を離すことにより前記3線量率を得た(図2)⁸⁾。動物は放医研生産のC57BL/6Jマウス雌雄を用いた。実験の目的は連続照射期間のマウスの日齢と腫瘍発生率の相関性(年齢依存性)とこの実験での雌雄性差についてと、同一の蓄積線量を異なる線量率で照射した場合の腫瘍発生率の相違、そして、高線量率(0.88Gy/分)照射群の腫瘍発生率との比較、すなわちDDREFの算出と3つに分かれている。

I. 連続照射期間のマウス日齢と腫瘍発生率の相関性

低線量率の連続照射実験では照射期間が長期になり、この期間内のマウスの腫瘍発生に対する感受性の変化が腫瘍発生に影響を及ぼすことが予想される。この実験では雌雄のマウスを28日齢から105日間照射して蓄積線量39Gy(AM1, AF1群)とし、以下線量・線量率は一定にして、照射開始日齢を105日づつ段階的にずらして各群をAM2, AF2, AM3, AF3群そして、最後の実験群は343日齢から照射を開始して、105日間照射したAM4, AF4群の計8実験群と雌雄無処置対照UMとUF群の2群の総計10群を生涯飼育した。その結果(図3, 4, 5), AM1, AF1群では照射終了直後から胸腺リンパ腫により死亡するマウスが現われ、

合計では雄のAM1群の60%、雌のAF1群の52%に達した。なお、これらの群では雌雄両群の25%に骨髓造血細胞の増殖不全があり頭蓋内出血または肺実質出血などの死因となる全身性の出血傾向が認められた。同様の所見は犬を用いた低線量率連続照射実験においても認められており⁹⁾、骨髓性白血病発症前にみられる病変として位置づけられている。次のAM2, AF2群では直後より次の100日間に胸腺リンパ腫で死亡するマウスが多く出現し、合計では両群とも60%に及んだ。そして、AM3, AF3群では両群40%と減少し、AM4, AF4群ではともに20%となった。この結果は28日齢から448日齢までの期間に γ 線による胸腺リンパ腫誘発に対する感受性が⁸⁾、200日齢以降には減弱する傾向を示していた¹⁰⁾。また、放射線の照射実験では雌に好発する傾向が認められているが^{3,11)}、この実験では性差は認められなかった。なお、骨髓造血系への傷害程度は照射開始時の日齢が遅くなるのに従って減少し、AM2, AF2群での出血死は10%となりAM3, AF3群, AM4, AF4群では2~3%と減少した¹²⁾。放射線照射による胸腺リンパ腫発生には骨髓の一部を遮蔽すると発生率の減少することから、骨髓組織の傷害程度の減少と胸腺リンパ腫発生の減少とに何らかの因果関係が示唆される¹³⁾。

II. 低線量率連続照射における線量率効果

この実験では蓄積線量を20Gyとし、線量率を37.5cGy/日から8.4cGy/日と2.9cGy/日に減少させた場合

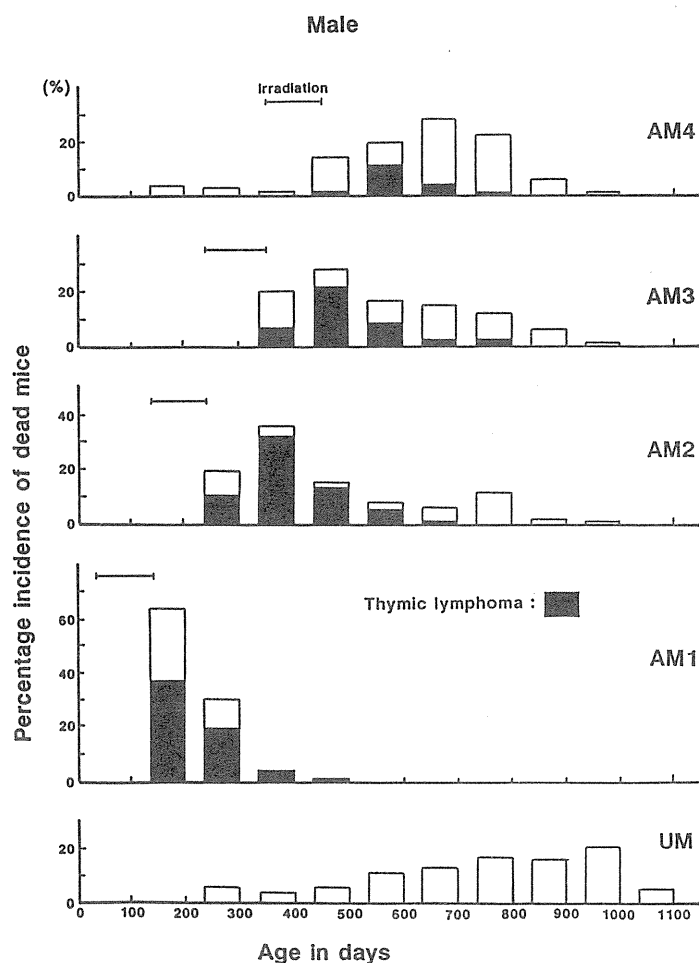


図3 胸腺リンパ腫により死亡した各実験群の雄マウスの出現頻度を100日間隔で図示した。なお各実験群の照射期間を—で示した。

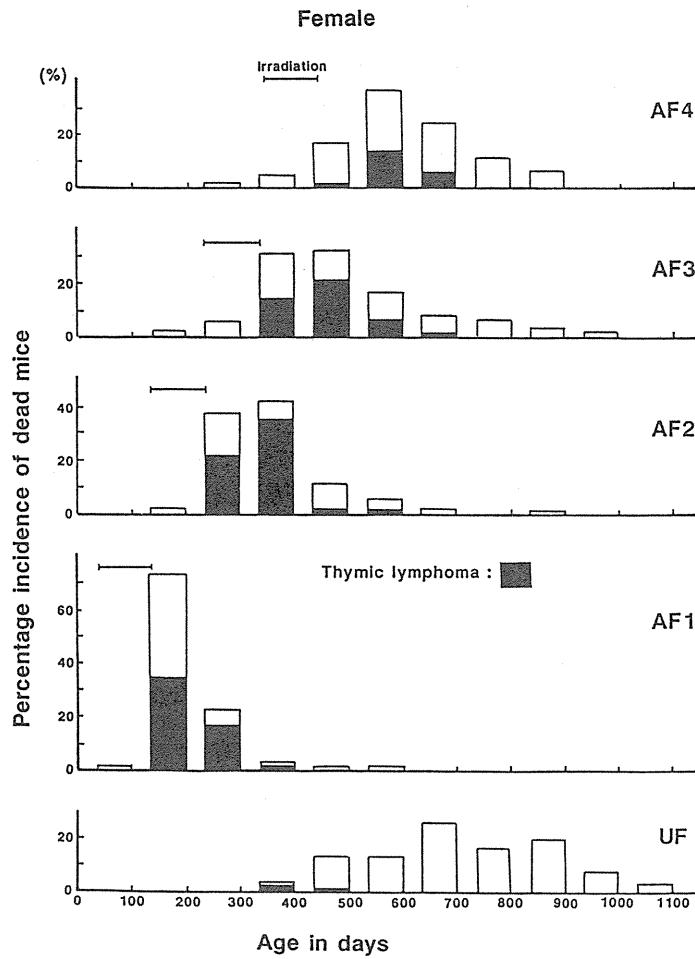


図4 胸腺リンパ腫により死亡した各実験群の雌マウスの出現頻度を100日間隔で図示した。なお各実験群の照射期間を—で示した。線量率37.5cGy/日、総線量39Gyは各実験群同じで、照射時日齢のみ28日齢から105日間隔でずれている。

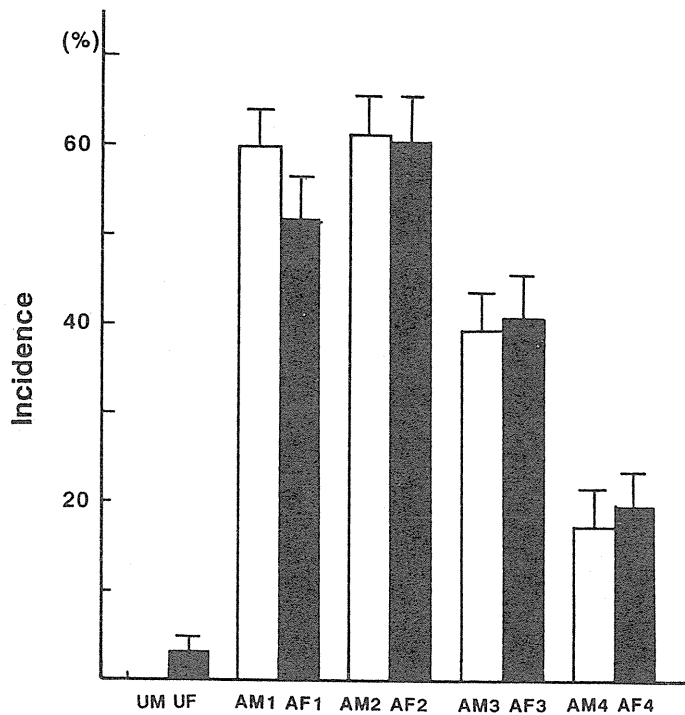


図5 図3, 4で経時的に示した雌雄各実験群で胸腺リンパ腫で死亡したマウスの頻度の総計である。

の腫瘍発生率をみると(図6),雄群では胸腺リンパ腫は80%(AM0群)の発生率が23%と4%と減少し,雌群でも86%の胸腺リンパ腫の発生が3%と減少し(ただし,雌群では8.4cGy/日の線量率照射実験は行われなかった),発生率および減少傾向に性差は認められなかった。さらに,蓄積線量を39Gyとして線量率を37.5 cGy/日から8.4cGy/日に減少させた場合では胸腺リンパ腫の発生は雄群では60%から23%へと減少し,雌群では同腫瘍発生率は53%から19%へと減少し,減少傾向に性差は認められなかった。

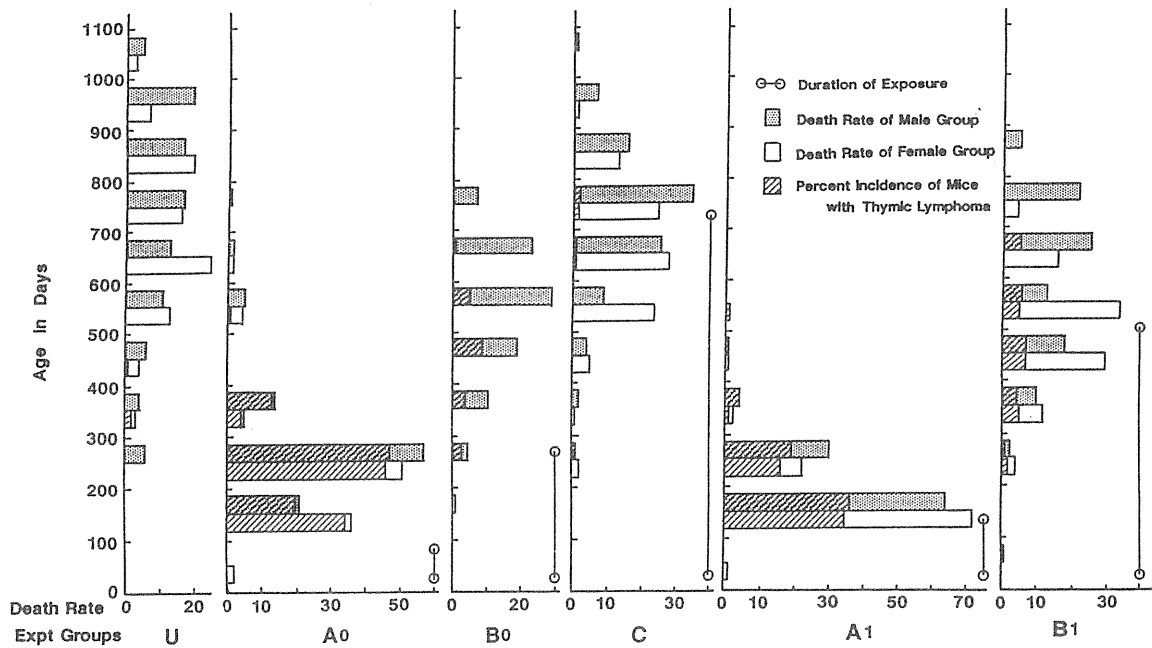


図6 低線量率連続群で線量・線量率効果を胸腺リンパ腫による死亡頻度で図示した。A0, B0, Cの3群は全線量20 Gyで, A1, B1の2群は全線量39Gyで, 各群線量率は異なる。

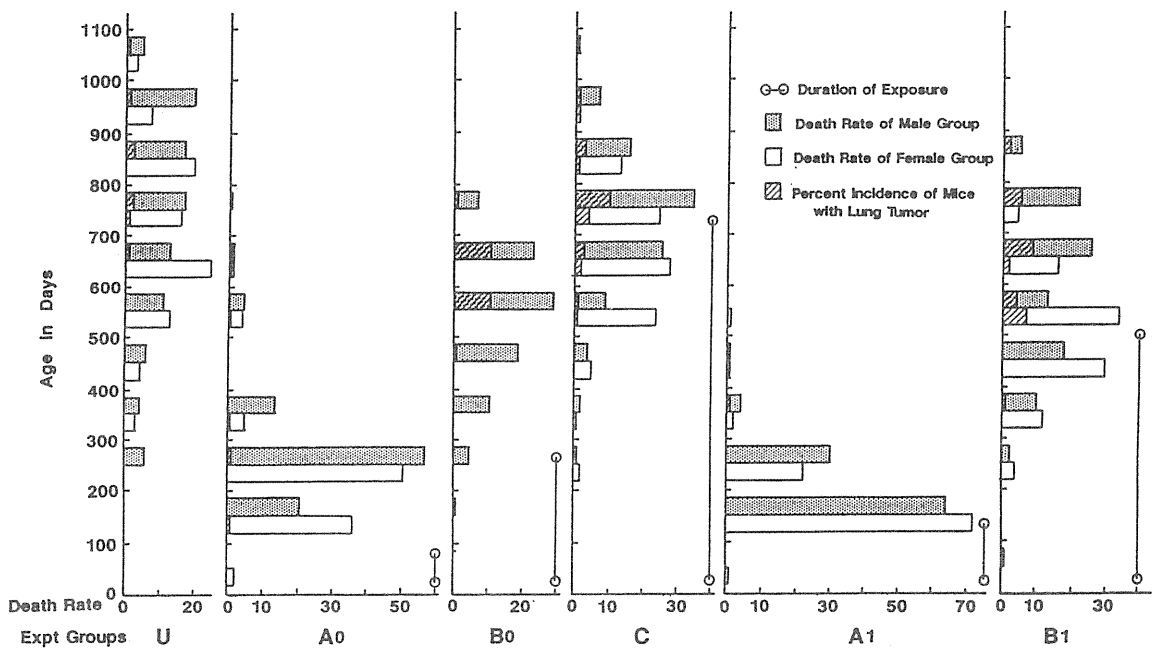


図7 各実験群で死亡したマウスで肺腫瘍が認められた頻度を図示した。

胸腺リンパ腫の発生率をこれらの線量率群で検索した範囲では線量率の減少と腫瘍発生率の減少とがほぼ平行して認められた。次に他の腫瘍発生率を検索すると異なった結果がみられた。肺腫瘍(図7)では蓄積線量が20Gy群,あるいは39Gy群であっても,37.5cGy/日の線量率の雄群(AM0とAM1群)では1~2%と低率であった。しかし,同じ蓄積線量20Gyであっても,線量率を8.4cGy/日(BM0群)と2.9cGy/日(CM群)へと減少させても,発生率は逆に24%と20%とAM0,AM1群より増加することが認められた。蓄積線量が39Gyでは線量率が8.4cGy/日(BM群)で20%と肺腫瘍は増加し,蓄積線量が異なっても同様の傾向を示し,かつ胸腺リンパ腫の発生とは頻度とその経時的分布において相違することが確かめられた。次に,肝腫瘍においても肺腫瘍と同じ傾向がみられた。

肺や肝腫瘍に次いでその他の種々の腫瘍が諸臓器に発生する傾向が線量率の低いBM0とBM1群に目立ち,さらに同群には1個体に2種類以上の腫瘍を持ったマウス数は図8にみるように27%と14%と他群より高い頻度を示している。

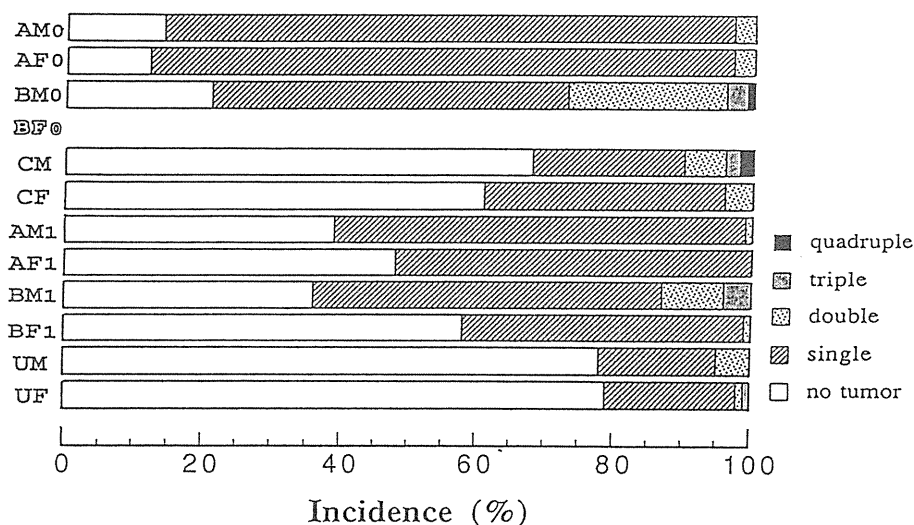


図8 AM0, AF0, BM0, CM, CF群は全線量20Gyで,AM1, AF1, BM1, BF1群は全線量39Gyである。なお,UM, UF群は無処置対照群である。各群における個体が持っていた腫瘍の種類数ごとの頻度を示してある。BM0とBM1群とに複数種の腫瘍が27%, 14%と他群より多く認められた。

III. 線量・線量率効果係数の算出

以上の実験群の腫瘍発生率を用いて,0.882Gy/分の高線量率1回全身照射群の0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7Gy群の7群よりの腫瘍発生率を用いて比較して非常に大まかであるがDDREFを試算した。実験は生涯飼育法によったので検索したマウス各々の寿命(観察期間)が異なるので,このことを考慮して人年法を用いて腫瘍発生率を表現した。なお,線量・腫瘍発生効果関係についての関係式(傾向線)はこの効果関係の直線近似域の値を用いて最小二乗法によって求めた。最初に各実験群における全腫瘍を対象とし,担腫瘍マウスの同関係式を以下に示す(図9)。

高線量率照射群の関係式(I)は $I = 3.11 + 0.95D$

37.5cGy線量率照射群(AM)の関係式(I)は $I = 3.1 + 1.4D$

8.4cGy線量率照射群(BM)の関係式(I)は $I = 3.1 + 0.53D$

2.9cGy線量率照射群(CM)の関係式 (I) は $I = 3.1 + 0.065D$

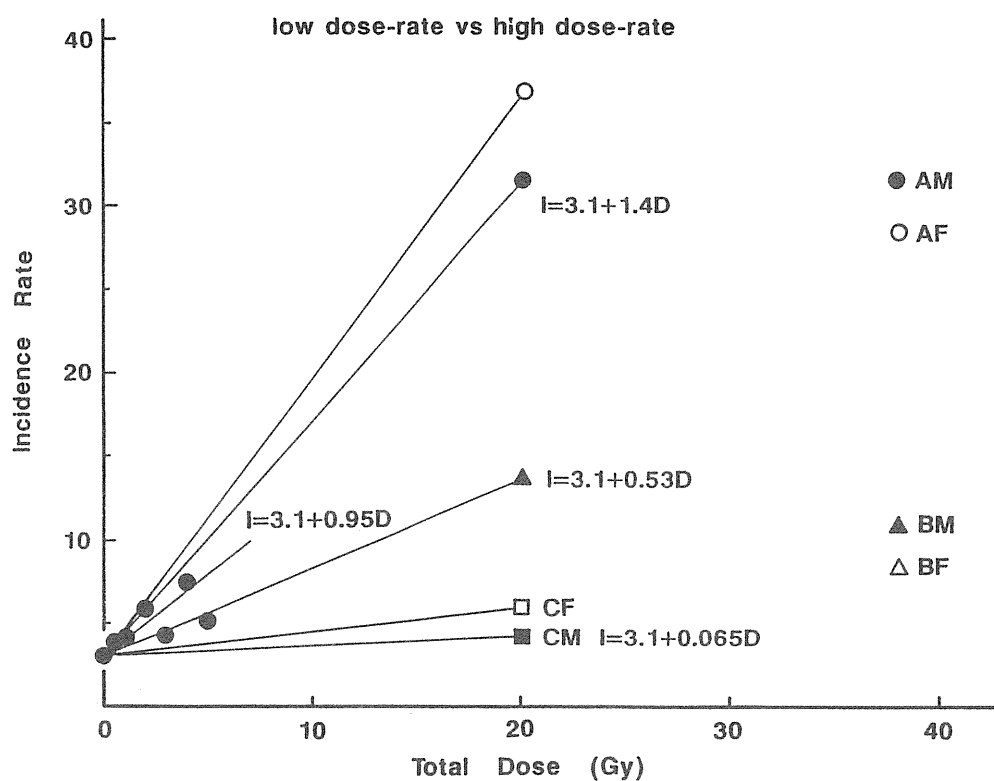


図 9 各実験群ごとに最小二乗法を用いて総ての腫瘍の種類を対象とした線量・腫瘍発生率の効果傾向直線を図示した。

表 2 線量・線量率効果係数を全腫瘍と肺および肝腫瘍についての値を示した。*は文献14からの引用である。

Neoplasia (organ)		aH	aL	DDREF	
Ovary *		1.2	0.18	6.7	
Lung *		0.12	0.043	2.8	
All Types	{	AM	0.95	1.4	0.7
		BM	0.95	0.53	1.8
		CM	0.95	0.065	14.6
		CF	0.95	0.15	6.3
Lung	{	BM	0.40	0.13	3.1
		CM	0.40	0.075	5.3
Liver	BM	0.91	0.19	4.8	
aH	Incidence Rate/Gy at High Dose-Rate			DDREF = $\frac{aH}{aL}$	
aL	Incidence Rate/Gy at Low Dose-Rate				

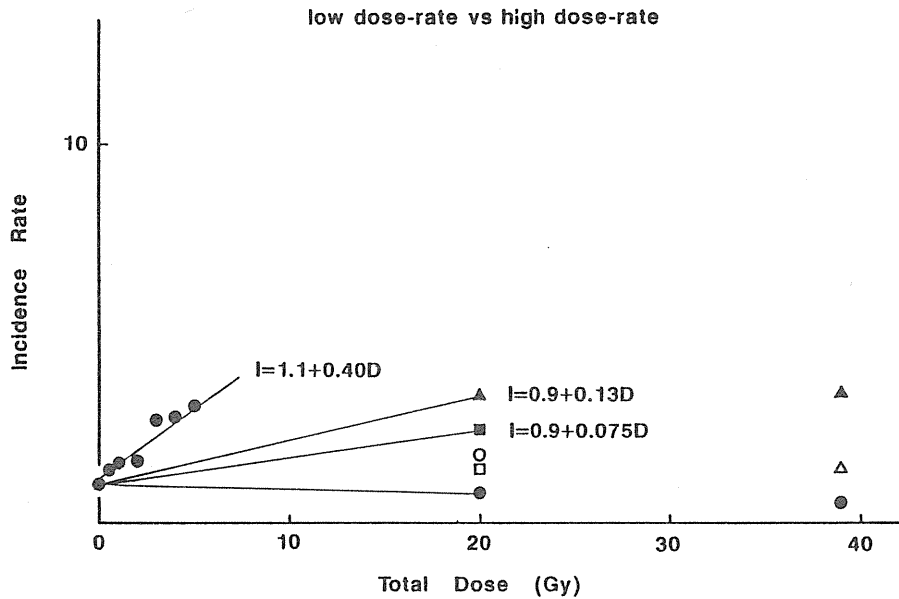


図10 各実験群ごとの肺腫瘍発生率と線量との効果関係の傾向直線を図示した。

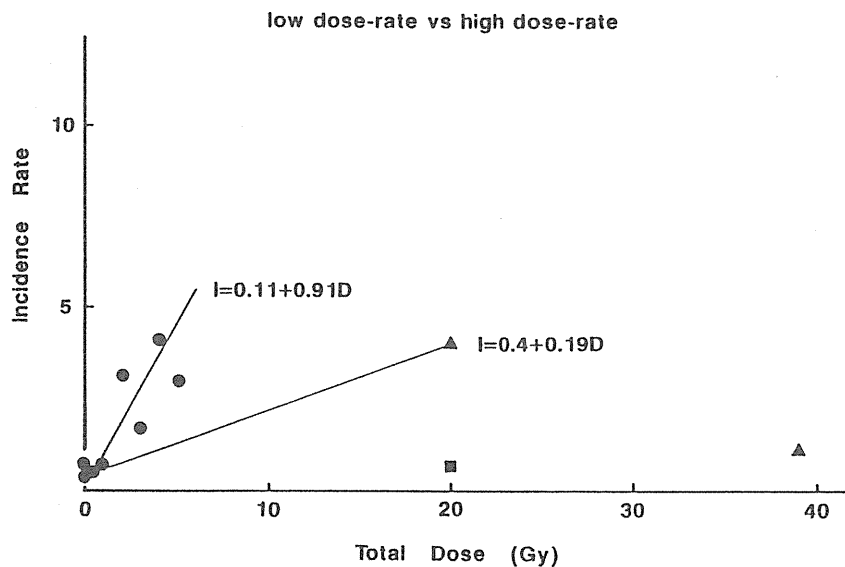


図11 同じく肝腫瘍発生率と線量との効果関係の傾向直線を図示した。

この関係式から一次項の係数の比をとってDDREFを算出した結果を表2に示した¹⁴⁾。以下同様に肺腫瘍(図10)、肝腫瘍(図11)についてもDDREFを求めた。このなかでAM群、すなわち、37.5cGy/日の線量率で蓄積線量が20Gyと39Gyと長期間照射した群のDDREFは0.7と高線量率照射群より1Gy当りの腫瘍発生率の高いことを示している。この原因としてはAM群では発生した腫瘍のうち胸腺リンパ腫の占める割合が多く、なお同腫瘍の高率な発生が認められた。一方、高線量率1回照射では7Gy群でも24%とAM群に比較して低率であることが起因していると考えられる。またCM群でのDDREFの大きいことは線量率の減少とともに腫瘍発生率が小さいことを示唆している。上記の実験では蓄積線量群の数が少ないのでDDREFの計算に必要な関連式を導き出すのに資料数が不足している。現在、上記実験での欠陥となった線量群数と照射期間のマウスの日齢と腫瘍誘発感受性の推移とを考慮して、標的腫瘍を骨髄性白血病とした

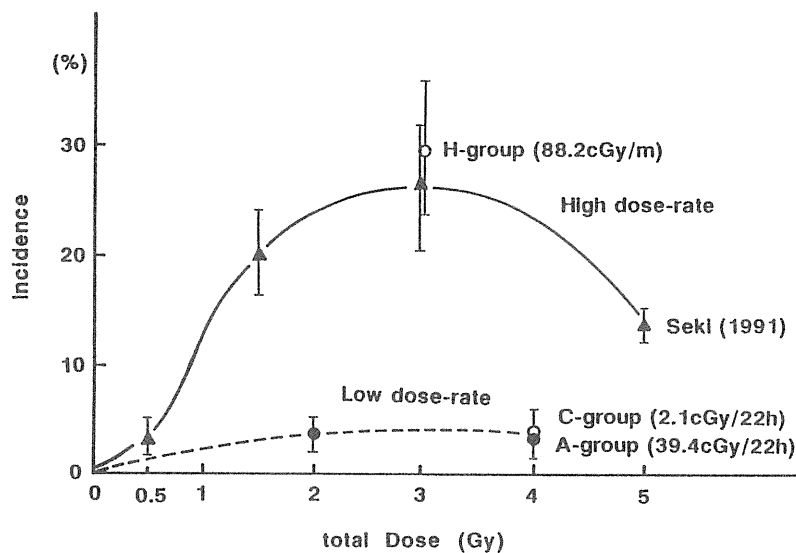


図12 文献15の結果である骨髄性白血病の線量効果曲線と、現在進行中の低線量率連続照射実験での途中結果を合わせて図示した。

DDREFを算出することを目的とした実験を行っている。なお、すでに高線量率の実験の基礎資料となる実験は関・吉田ら¹⁵⁾によって当所で行われているが、再試の意味を含んで低線量率照射実験の対照実験として高線量率照射実験も行っている。現在中間的な資料を示したのが図12である。

なお、この実験は科学技術庁の特別研究費により行われた。最後にこの実験補助を担当した鈴木、根本、高橋、篠原、尾崎の諸氏と、動物を供給された動植課の諸氏に感謝致します。

参考文献

- 1) Thomson, J. F., Williamson, F. S., Grahn, D. and Ainsworth, E. J. Life shortening in mice exposed to fission neutrons and gamma rays. 1. Single and short-term fractionated exposures. *Radiat. Res.* **86**: 559-572 (1981).
- 2) Spalding, J. F., Prime, J. R. and Tietjen, G. L. Late biological effects of ionizing radiation as influenced by dose, dose rate, age at exposure and genetic sensitivity to neoplastic transformation. p.3-11 in: *Late Biological Effects of Ionizing Radiation, Vol.2*, IAEA, Vienna (1978).
- 3) Ullrich, R. L. and Storer, J. B. Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. III. Dose-rate effects. *Radiat. Res.* **80**: 325-342 (1979).
- 4) Storer, J. B., Serrano, L. J., Darden, E. B., Jr., Jernigan, M. C., and Ullrich, R. L., Life shortening in RFM and BALB/c mice as a function of radiation quality, dose and dose rate. *Radiat. Res.* **78**: 122-161 (1979).
- 5) Leshner, S., Sacher, G. A., Grahn, D., Hamilton, K. and Sallese, A. Survival of mice under duration-of-life exposure to gamma rays. II. Pathologic effects. *Radiat. Res.* **24**: 239-277 (1965).
- 6) Lorenz, E. Some biologic effects of long continued irradiation. *Am. J. Roentgenol.* **63**: 176-185 (1950).
- 7) Lamerton, L. F. Cell proliferation under continuous irradiation. *Radiat. Res.* **27**: 119-138 (1966).
- 8) Shiragai, A., Sato, F., Kawashima, N., Kobayashi, S., Otsu, H., Seki, M. and Maruyama, T. Absorbed dose estimates in a prolonged cesium-137 gamma irradiation facility for mice. *J. Radiat. Res.* **21**: 118-125

(1980) .

- 9) Fritz, T. E., Norris, W. P., Tolle, D. V., Seed, T. M., Poole, C. M., Lombard, L. S. and Doyle, D. E. Relationship of dose rate and total dose to response of continuously irradiated beagles. p. 71-82 in : Late Biological Effects of Ionizing Radiation, Vol. 2, IAEA, Vienna(1978) .
- 10) Otsu, H., Kobayashi, S., Furuse, T., Noda, Y., Shiragai, A. and Sato, F. Age and sex dependence in tumorigenesis in mice by continuous low dose-rate gamma-ray whole-body irradiation. p. 211-216 in : International Conference on Radiation Effects and Protection, Proceedings, Mito(1992) .
- 11) Kaplan, H. S. and Brown, M. B. A quantitative dose-response study of lymphoid-tumor development in irradiated C₅₇ Black mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 13 : 185-208(1952) .
- 12) 大津, 小林, 佐藤, 古瀬, 野田, 川島, 白貝, 福津, 関。低線量率照射による発癌。p74-92, 発がん, 放射線を中心として。第14回放医研シンポジウム報文集, 1982。
- 13) Kaplan, H. S. and Brown, M. B. Protection against radiation-induced lymphoma development by shielding and partial-body irradiation of mice. *Cancer Res.* 12 : 441-444(1952) .
- 14) NCRP. Tumorigenesis in experimental laboratory animals. p.108-131 in : Influence of Dose and Its Distribution in Time on Dose-response Relationships for Low-LET Radiations, NCRP Report No.64 (1980) .
- 15) Seki, M., Yoshida, K., Nishimura, M. and Nemoto, K. Radiation-induced myeloid leukemia in C₃H/He mice and the effect of predonisolona acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.* 127 : 146-149(1991) .

2 ベータ線反復照射によるマウス 皮膚発がんの閾値線量

大津山 彰* / 田ノ岡 宏*

Threshold-like dose response of skin carcinogenesis by repeated beta irradiation in mice

Akira Ootsuyama/Hiroshi Tanooka

Radiobiology Division, National Cancer Center Research Institute
5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104 Japan

Abstract

Threshold-like response of radiation carcinogenesis was investigated using repeated irradiation of the mouse skin (female ICR, 7 weeks old) with beta rays (2.24 MeV) from a ^{90}Sr - ^{90}Y . The skin was irradiated 3 times a week until emergence of tumor or death of mice throughout the life span of the mice. Ten experimental groups with different doses (0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.5, 3.0, 3.5, 4.7, 8.0, 11.8 Gy per exposure) were examined. A 100% cumulative tumor incidence was obtained with 1.0 to 11.8 Gy per exposure. For doses 2.5 to 11.8 Gy groups, each group showed identical timing of tumor incidence in spite of wide differences of dose. Between 1.5 Gy and 2.5 Gy groups, but there occurred sudden delay of tumor emergence for about 200 days. Only two tumors were found in the 0.75 Gy group near the end of life span of the mice. No tumor was found in the 0.5 Gy group during the mouse life span as well as control unirradiated group. By plotting the time lengths required for 50% tumor incidence against beta dose given per exposure, the saturation effect was shown for doses between 2.5 to 11.8 Gy and a sharp increase of the 50% tumor time was shown for lower doses below 2.5 Gy per exposure. There seemed to exist a threshold-like dose response for tumor induction by repeated beta irradiation.

はじめに

放射線発がんにおける閾値あるいは閾値様反応存在の問題は、低線量放射線の反復被曝や連続被曝の発

*国立がんセンター研究所

がんリスク推定に重要な意義を持っている。多くの場合、発がん率はある線量まで自然発生のレベルあるいは低いまま推移し、そこから線量の上昇と共に増加をする。このような関係は、多重ヒットあるいはLQモデルと一致するとされているが、閾値モデルも考える必要がある。実際に、2.5GyまでのX線局所照射によって得られるマウスの肺腫瘍¹⁾、白血病²⁻⁵⁾、X線あるいは γ 線の全身照射で得られる固形腫瘍⁶⁾では、コントロールレベル以上に発がんの明瞭な増加を認めない線量域がある。また長崎の γ 線被曝者の白血病による死亡にみられる線量効果関係は、T65⁷⁾あるいはDS86⁸⁾の閾値モデルに一致させることができる。ただし、乳がんに関しては人⁹⁾や動物¹⁰⁾のデータから直線の線量効果関係が得られており、この場合ホルモンの影響などが加わるためと考えられている。

放射線発がんにおける閾値線量存在の可能性は、全身照射より局所照射において、高LETより低LET放射線において明瞭である。照射が長期にわたったり、分割されると発がん率は低下しマウスやラットの皮膚がん¹¹⁻¹³⁾、マウスの卵巣腫瘍¹⁴⁾、白血病^{5,15,16)}などでは発がん率の増加がみられなくなる線量域が出てくる。我々は、 β 線を用いてマウスの背部皮膚を1.0Gyから11.8Gyまでの線量で週3回反復照射することによって、100%の発がん率を得ている^{17,18,19)}。しかしそのがん発生時期は、1回当たりの照射線量がある線量以下に下がると突然遅延し、さらに1回当たり照射線量を下げると、マウスの寿命のうちにはついに発がんはみられなくなった。これらの結果は、反復照射による放射線発がんでは線量効果関係が直線的ではなく閾値が存在するタイプであることを示している。ここではこの実験結果を中心にして放射線発がんにおける閾値について考える。

1. ベータ線反復照射によるマウス皮膚発がん実験

閾値線量存在の有無を確かめる目的でつぎのような実験を行った。

1.1 方法

7週齢のICR雌マウスを用いた。マウスの背中の皮膚直径2cmの円形部位を⁹⁰Sr-⁹⁰Y(Dose rate 2.24 Gy/min.)から得られる β 線で週3回、反復照射を生涯にわたって行った。ベータ線を用いたのは全身的な放射線の影響を避けるためである。1回当たり照射線量は、0Gy、0.5Gy、0.75Gy、1.0Gy、1.5Gy、2.5Gy、3.0Gy、3.5Gy、4.7Gy、8.0Gy、11.8Gyを設定した。0Gy、0.75Gy、1.0Gy、3.0Gy、8.0Gy各群は31匹のマウスを用い、1.5Gy群は30匹、3.5Gy群は21匹、2.5Gy群は22匹、4.7Gy群は15匹、11.8Gy群は18匹、0.5Gy群は50匹を用いた。マウスに発がんを確認した日か、あるいは腫瘍なしで死亡した日を記録した。腫瘍は切除し組織学的検索を行った。積算発がん率はキャプラン-マイヤー法で計算した。

1.2 閾値様反応の検証

各線量群の照射開始後の時間に対する積算発がん率はFig.1aに示した。対象群と0.5Gy群の時間に対する生存率はFig.1bに示した。

2.5Gy~11.8Gyの各群では照射開始後約200日頃から発がんがみられ始め、500日前後には発がん率は100%に達した。1.5Gy群では約100日ほどの発がん時期の遅れを示したが、発がん率は100%に達した。1.0Gy群はさらに発がん時期の遅れを示したが、最終的に発がん率は100%に達した。0.75Gy群はマウスの寿命終盤付近(照射開始後789と819日目)でわずか2匹の腫瘍発生に止まった。2匹が発がんした時点で残り3匹のマウスがおり、照射をさらに165日続けたがその後残りのマウスがすべて死亡する間に発がんはみら

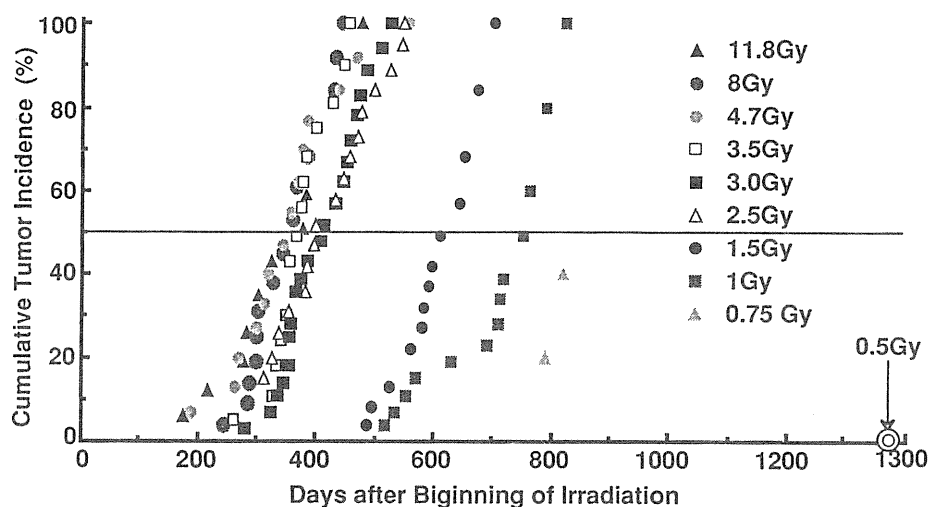


Fig.1a Cumulative tumor incidences in mice irradiated 3 times weekly with beta-rays.

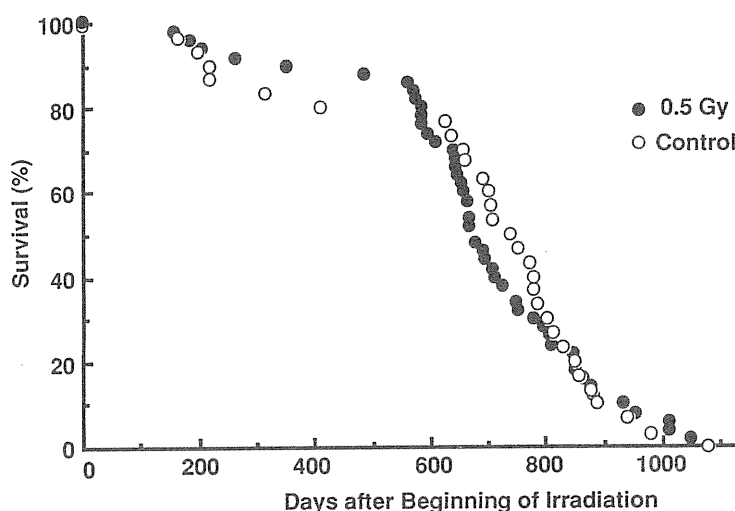


Fig.1b Survival of untreated mice and mice treated with 0.5 Gy per exposure.

れなかった。0.5Gy群では照射開始後1284日を経過した時点で実験群50匹中の最後の1匹が死亡したが、発がんは見られなかった。対象群には照射群にみられた種類の腫瘍の発生はみられなかった。この実験で82個の腫瘍が得られ、31個が扁平上皮がん、13個が基底細胞がん、38個が線維肉種、38個が骨肉腫であった。

1回当たりの照射線量と発がんまでの時間的経過の関係を明瞭にするために、50%発がん率に達する時間と1回当たりの照射線量の関係をFig.2に示した。50%発がん率に達する時間は2.5Gyから11.8Gyの照射線量の間でほとんど一定であり、この飽和線量効果は、1回照射線量がある程度以上の場合、発がん効果は総線量よりも照射回数によることを示している。1回照射線量が2.5Gy以下になると50%発がん率に達する時間は急速に増加し、線量効果関係は直線とはならず閾値様の反応として表現された。同様の閾値様線量以下での発がんの遅れは、反復UV照射の実験でもみられている²⁰⁾。また、50%発がん率に達するまでの総線量は、2.5Gy群で425Gy(170回照射)、1.5Gy群で414Gy(276回照射)そして1.0Gy群で327Gy(327回照射)となった。

この実験の特徴のひとつはマウスの体の1部だけを反復照射したことである。ブラム²¹⁾やエプスタイン

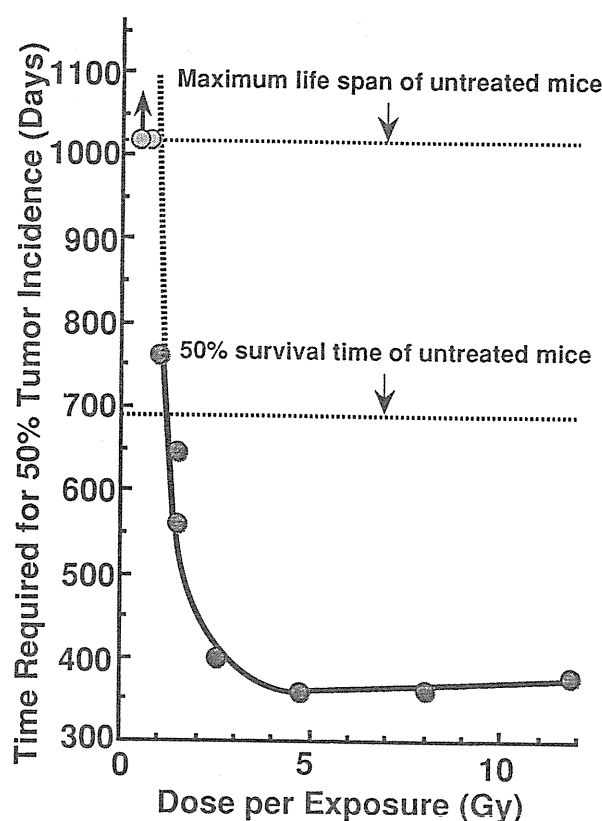


Fig.2 Period for 50% incidence plotted against radiation dose per exposure.

ン²²⁾の実験でもUVやソフトX線の反復照射で同様に高率のマウス皮膚がんが得られている。これらの方法では、放射線がマウスの生存率に影響を与えていない(Fig.1b)。さらに、リンパ球の分裂能、混合リンパ球反応、キラーT細胞活性とナチュラルキラー細胞活性を測った結果から、反復照射後のマウスの免疫機構に影響はみられなかった(佐渡らの協力による。未発表)。さらにもう一つの特徴はマウスの生涯を通して照射を行ったことである。このような照射条件の場合加齢の影響が問題となる。この実験の対照群マウスには寿命終り近くになっても自然発生がんは見られなかったが、照射群の実験終了間際に見られた発がんは加齢による可能性も存在する¹⁷⁾。

2. ベータ線反復照射の意義

我々はベータ線を用いたマウス皮膚発がんの実験に関して様々な条件での照射を試みた。しかし1回のみの照射では発がんは起こらなかった。ただし、ベータ線1回照射後皮膚組織におけるDNA修復を見る目的でUDS(DNA不定期合成)を測定すると、線量と共にUDSが増加する関係が得られベータ線照射後の表皮細胞に除去修復が起こっていることがわかった²³⁾。また、発がん性の潜在変化は照射後400日後でも残っていることを4NQO(4-nitroquinoline 1-oxide)加算実験で確認している²⁴⁾。ベータ線1回照射後に発がんに結び付くような変化が確かに起こっているらしいが、それだけで発がんは始まらない。そうすると反復して照射することが発がんの促進に重要だと考えられる。反復照射の効果には2つの相反する機構が含まれると考えられる。第一に低線量域ではより効率の良い修復が働くこと、第二は反復照射による発がんの促進である。効率の良い修復は発がん性DNA損傷を完全に直す誤りのない修復であるが、反復照射による発がん効果には誤りがち修復やプロモーション作用が関与するのではないかと考えられる。おそらく反復照射は発がんにおいて、発がん性損傷の誤りのない修復と誤りがち修復との微妙なバランスを作り出してい

るものと考えられる。

一方反復照射のプロモーション作用をみるために我々はDMBA+TPAの2段階発がんの手技にならない、ベータ線1回照射後TPAの反復塗布を行ったが発がんはみられず、DMBA1回塗布後ベータ線を反復照射したときも発がん率の上昇はみられなかった(Table 1)²⁵⁾。ただし、プロモーション効果の指標となるODC(ornithine decarboxylase)活性の上昇はベータ線照射後に見られている²⁶⁾。このODC活性を押さえる薬剤DFMO(α -difluoromethylornithine)を、ベータ線反復照射発がん実験中のマウスの飲料水に混ぜて与えたところ発がん時期の明瞭な遅れが観察され、ベータ線反復照射による発がんにはプロモーション効果が含まれていることが示された(Fig.3)²⁷⁾。

閾値様反応の存在に関して、化学発がん剤の長期反復投与による用量効果関係にも閾値が存在することがあきらかになっている。ヘッカーらはDMBA1回塗布後反復して与えたプロモータTPAや3TIの実験で、我々の実験で得られた線量効果関係に良く似た結果を得ている²⁸⁾。また、同様の結果はUV(254nm)の

Table 1 No. of skin tumor induced by single or combined treatment with beta-rays, DMBA and TPA.

Treatment	No. of mice	Day of first papillomas	No. of papillomas per mouse by day 210	No. of malignant skin tumors by day 600
Beta-rays, single (1800 rads)	20	-	0	
Beta-rays, single (2700 rads)	20	-	0	
Beta-rays, repeat (470 rads / treatment)	15	-	0	14
DMBA, single (100 μ g)	13	33	0.5	2
TPA, repeated (5 μ g / treatment)	13	255	0	0
Beta-rays, single (2400 rads) + TPA, repeated	20	165	0.1	0
DMBA, single + Beta-rays, repeated	13	-	0	4
DMBA, single + TPA, repeated	4	42	13.8	

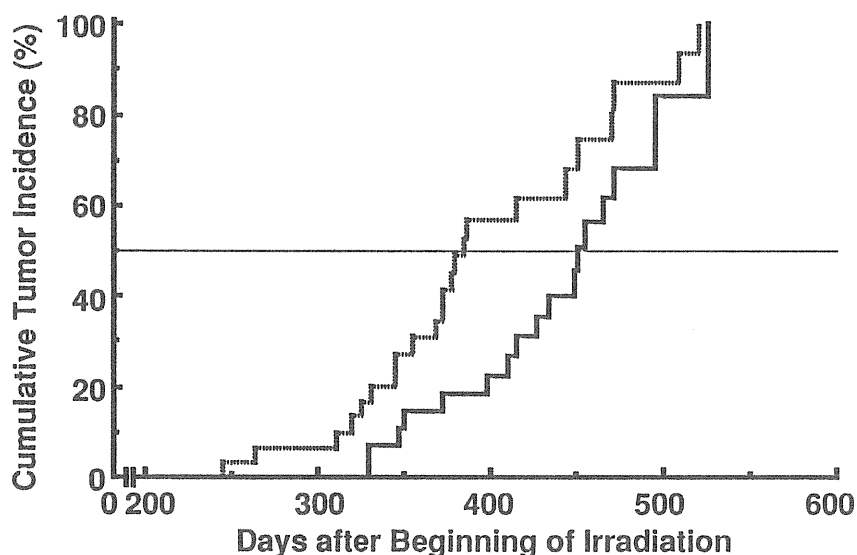


Fig.3 Effect of DFMO on tumor incidence. (|||||), beta-rays only(3.0Gy per exposure). (—), beta-rays plus 1% DFMO in drinking water.

反復照射でもみられている²⁰⁾。これらのことから発がんにおける閾値様反応の発現は発がん過程におけるプロモーション作用に共通のものである可能性が考えられる。反復被曝という被曝様式は放射線発がんに関値線量をよりはっきり表現させるものであろう。

おわりに

放射線の反復被曝によってマウスの発がんに関値様の線量効果関係が見出された。このことは低線量放射線による発がんリスクを推定する上で重要であると考ええる。

参考文献

- 1) R. L. Ullrich, M. C. Jernigan, and L. M. Adams, Induction of lung tumors in RFM mice after localized exposures to X rays and neutrons. *Radiat. Res.* **80**, 464-473 (1979)
- 2) A. C. Upton, The dose-response relation in radiation-induced cancer, *Cancer Res.* **21**, 717-729 (1961)
- 3) R. L. Ullrich and J. B. Storer, Influence of gamma-irradiation on the development of neoplastic disease in mice. I. Rectilinear tissue tumors. *Radiat. Res.* **80**, 303-316 (1979)
- 4) R. H. Mole, Radiation-induced acute myeloid leukemia in the mouse: Experimental observation in vivo with implications for hypotheses about the basis of carcinogenesis. *Leukemia Res.* **10**, 859-865 (1986)
- 5) J. R. Maisin, A. Wambersie, G. B. Gerber, G. Mattelin, M. Lambiet-Collier and J. Gueulette, The effect of fractionated gamma irradiation on life shortning and disease incidence in BALB/c mice. *Radiat. Res.* **94**, 359-373 (1983)
- 6) R. L. Ullrich and J. B. Storer, Influence of gamma-irradiation on the development of neoplastic disease in mice. II. Solid tumors. *Radiat. Res.* **80**, 317-324 (1979)
- 7) G. W. Beebe, H. Kato and C. E. Land, Studies of the mortality of A-bomb survivors. 6. Mortality and radiation dose, 1950-1974. *Radiat. Res.* **75**, 138-201 (1978)
- 8) Y. Shimizu, H. Kato and W. J. Schull, Studies of the mortality of A-bomb survivors 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat. Res.* **121**, 126-141 (1990)
- 9) R. E. Shore, Carcinogenic effects of radiation on the human breast. In radiation carcinogenesis (A. C. Upton, R. E. Albert, F. J. Burns and R. E. Shore, Eds.), pp.169-180. Elsevier, New York/Amsterdam/London, 1986)
- 10) C. J. Shellabarger, J. P. Stone and S. Holtzman, Experimental carcinogenesis in the breast. In radiation carcinogenesis (A. C. Upton, R. E. Albert, F. J. Burns and R. E. Shore, Eds.), pp.169-180. Elsevier, New York/Amsterdam/London, 1986)
- 11) E. V. Hulse and R. H. Mole, Skin tumor incidence in CBA mice given fractionated exposures to low energy beta particles. *Br. J. Cancer.* **23**, 452-463 (1969)
- 12) F. J. Burns and M. Vanderlaan, Split-dose recovery for radiation-induced tumors in rat skin. *Int. J. Radiat. Biol.* **32**, 135-144 (1977)
- 13) F. J. Burns, R. E. Albert, I. P. Sinclair and M. Vanderlaan, The effect of a 24-hour fractionation interval on the induction of rat skin tumors by electron radiation, *Radiat. Res.* **62**, 478-487 (1975)

- 14) R. L. Ullrich and J. B. Storer, Influence of gamma-irradiation on the development of neoplastic disease in mice. III. Dose rate effects. *Radiat. Res.* **80**, 325-342 (1979)
- 15) A. C. Upton, M. L. Randolph and J. W. Conklin, Late effects of fast neutrons and gamma rays in mice as influenced by the dose rate of irradiation: Induction of neoplasia. *Radiat. Res.* **41**, 467-491 (1970)
- 16) R. H. Mole and I. R. Major, Myeloid leukemia frequency after protracted exposure to ionizing radiation: Experimental confirmation of the flat dose-response found in ankylosing spondylitis after a single treatment course with X-rays. *Leukemia Res.* **7**, 295-300 (1983)
- 17) A. Ootsuyama and H. Tanooka, One hundred percent tumor induction in mouse skin after repeated beta irradiation in a limited dose range. *Radiat. Res.* **115**, 488-494 (1988)
- 18) A. Ootsuyama and H. Tanooka, Induction of osteosarcomas in mouse lumbar vertebrae by repeated external beta-irradiation. *Cancer Res.* **49**, 1562-1564 (1989)
- 19) A. Ootsuyama and H. Tanooka, Threshold-like dose of local beta irradiation repeated throughout the life span of mice for induction of skin and bone tumors. *Radiat. Res.* **125**, 98-101 (1991)
- 20) H. F. Blum, J. S. Kirby-Smith and H. G. Grady, Quantitative induction of tumors in mice with ultraviolet radiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **2**, 259-268 (1941)
- 21) H. F. Blum, Ultraviolet radiation and cancer. In *Radiation biology* (A. Hollaender, Ed.), Vol.2, pp.529-559. McGraw-Hill, New York, 1955.
- 22) J. H. Epstein, Examination of the carcinogenic and cocarcinogenic effects of grenz radiation. *Cancer Res.* **32**, 2625-2629 (1972)
- 23) A. Ootsuyama, H. Tanooka, Unscheduled DNA synthesis after β -irradiation of mouse skin in situ. *Mutat. Res.* **166**, 183-185 (1986)
- 24) H. Hoshino and H. Tanooka, Interval effect of beta-irradiation and subsequent 4-nitroquinoline 1-oxide painting on skin tumor induction in mice. *Cancer Res.* **35**, 3663-3666 (1975)
- 25) A. Ootsuyama and H. Tanooka, The tumor-initiating and -promoting effects of ionizing radiations in mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**, 1203-1206 (1987)
- 26) H. Fujiki, M. Mori and H. Tanooka, Delayed induction of ornithine decarboxylase in mouse skin after irradiation with beta-rays. *Cancer Lett.* **15**, 15-17 (1982)
- 27) A. Ootsuyama and H. Tanooka, Effect of inhibit or of tumor inhibition, α -difluoromethyl-ornithne, on tumor induction by repeated irradiation in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* in press.
- 28) E. Hecker, Threshold doses for teleocidin and enviromental promoters for mouse skin. Proceedings of the 15th International Cancer Congress (Hamburg), #16.21.01. (1990)

3 年齢依存性

佐々木 俊作*

Age-dependence of susceptibility

Shunsaku Sasaki

National Institute of Radiological Sciences
4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba, 260 Japan

Abstract

The present study was aimed to clarify age-dependence of susceptibility to induction of late effects of whole-body irradiation of γ -rays. Experimental data using female B6C3F₁ mice were made subject of analysis. In this experiment mice were irradiated at day 14 or 17 prenatal age or day 0, 7, 35, 105, 240 or 365 postnatal age with doses ranging from 0.95 to 5.7 Gy and were allowed to live out their entire life spans under a specific pathogen free condition.

The cumulative relative risk for mortality and fraction of excess mortality were estimated from increase in the age-specific mortalities. Among mice irradiated at day 0 with 0.95 Gy the fraction of excess mortality and cumulative relative risk were 0.38 and 1.61, respectively; whereas, shortening of the mean life span was 6.6%. Shape of dose-response relationship for the fraction of excess mortality was downward concave and that for the cumulative relative risk was upward concave. The cumulative relative risks in mice irradiated during neonatal or juvenile period were apparently higher than those irradiated during adulthood or prenatal period. Cumulative relative risks decreased more rapidly with increasing age when mice were irradiated during juvenile or young adult period than those after irradiation during neonatal or fetal period. Age-associated variation of the cumulative relative risk was little in mice irradiated during the middle-age adult period.

Using the cumulative relative risk for tumor development as a measure of tumorigenic

*放射線医学総合研究所

effect of radiation, dose-response relationships for induction of liver, pituitary, ovarian, lung and Harderian gland tumors after irradiation at various ages were compared each other. Results of analysis suggested that mice of neonatal and juvenile period are susceptible to tumorigenic effect and cell-killing effect of radiation.

はじめに

放射線による晩発影響の誘発に関する感受性の年齢依存性についての配慮は放射線防護の基準の中に現在のところまだ明確には含まれていない。しかしながら1990年のBEIR-V報告¹⁾は、特定の腫瘍についてのみではあるが、誘発に関する感受性の年齢差ならびに被曝後の時間の経過に伴う相対リスクの変動をも取り込んで解析している。その基礎となったのは疫学調査であるが、圧倒的に原爆被爆者の追跡調査²⁻³⁾が寄与している。その結果は若齢期は感受性が高いことを示している。頭部皮膚真菌感染症の治療に関連してX線照射を小児期に受けた人々についてのイスラエルにおける追跡調査⁴⁾は小児期は乳腺と甲状腺の腫瘍の誘発に関して著しく感受性が高いことを示している。小児癌の放射線治療後の二次癌の発生についての組織的な調査が実施されており⁵⁻⁶⁾貴重なデータを提供している。幼若期被曝後の相対リスクの時間的変動についての検討もなされているが⁷⁾明確な結論を出すためにはまだ追跡期間が短いようである。一方、実験動物による年齢依存性に関する研究は決して少ないものではなく、その要点は国連科学委員会報告⁸⁻⁹⁾の中にまとめられている。重要な内容を持つ優れた研究が行われていることは勿論であるが¹⁰⁻¹⁵⁾生涯リスクを線量反応関係として相互に比較できるような研究は非常に少ない。私達は新生児期ならびに胎生期に重点を置いて晩発影響誘発に関する感受性の年齢依存性の問題に取り組んできたが¹⁶⁻¹⁹⁾ここでは新たな方法による解析の結果について述べる。その方法は一口で言えば累積ハザード法であり²⁰⁾具体的には死亡率についての累積相対リスク、過剰死亡とその時間的変動、癌の発生に関する累積相対リスク、癌の過剰発生率について解析する。この解析法は生涯リスクを求めるためのものであり、関連する方法²¹⁻²³⁾を検討し参考にした。解析の対象としたデータは¹³⁷Csのγ線を照射したB6C3F₁雌マウスについての実験結果である。

1. 死亡率増加と過剰死亡に関する線量反応関係

Table 1に新生児期(出生当日)に照射されたマウスにおける累積相対リスク、過剰死亡分率ならびに平均寿命短縮率を線量別にまとめた。表中では過剰死亡分率は放射線誘発致死障害の広がりとして記してある。

Table 1 Cumulative relative risk, prevalence of radiation-induced lethal hazard and shortening of mean life span in female B6C3F₁ mice irradiated neonatally with γ-rays.

Dose, Gy	Cumulative relative risk	Prevalence of radiation-induced lethal hazard	Shortening of mean life span
0.95	1.61 (0.14)	0.380 (0.071)	0.066 (0.014)
1.90	2.262 (0.18)	0.558 (0.068)	0.124 (0.015)
2.85	3.88 (0.47)	0.742 (0.097)	0.195 (0.021)
3.80	7.04 (0.94)	0.858 (0.086)	0.263 (0.021)
5.70	47.1 (12.2)	0.979 (0.072)	0.480 (0.021)

Values in parentheses indicate standard errors

これはより正確な表現であるが用語として長すぎるのでここでは過剰死亡分率を用いる。例えば0.95Gyの γ 線を照射されたグループにおいては、平均寿命は6.6%短縮し過剰死亡分率は0.38であった。すなわちこのグループにおける死亡のうち38%は放射線被曝が原因であると推定された。累積相対リスクは1.61であった。線量5.7Gyの場合には累積相対リスク47.1、過剰死亡分率0.979に達し平均寿命短縮率は48%であった。累積相対リスクならびに過剰死亡分率はいずれも生涯リスクの尺度であり、前者は死亡率の増加を表し後者は放射線による死亡数の増加を表現する尺度である。

Fig. 1は3.8Gy照射後の過剰累積相対リスクを照射時の年齢に対してプロットしたものである。照射時年齢は胎生17日(出生の2日前)、出生後0、7、35、105、240ならびに365日であり、過剰累積相対リスク

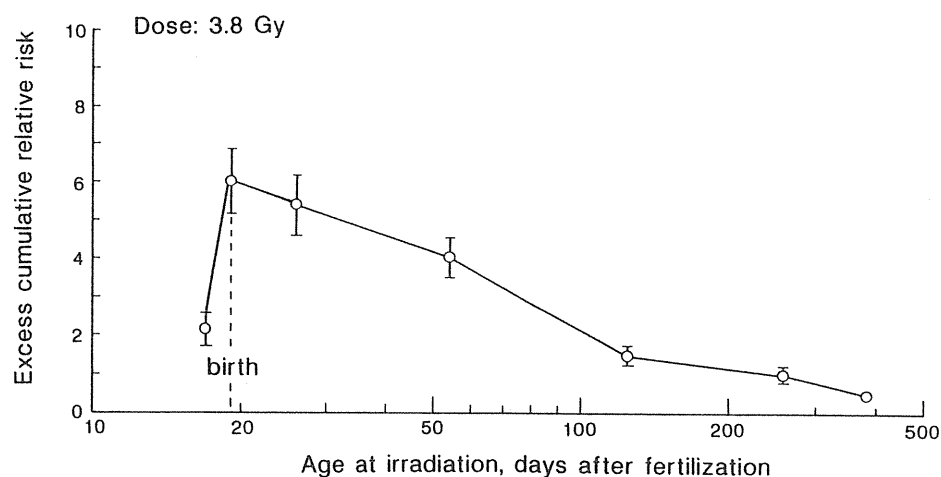


Fig. 1 Relationship between excess cumulative relative risk and the age at irradiation with 3.8 Gy γ -rays in female B6C3F₁ mice.

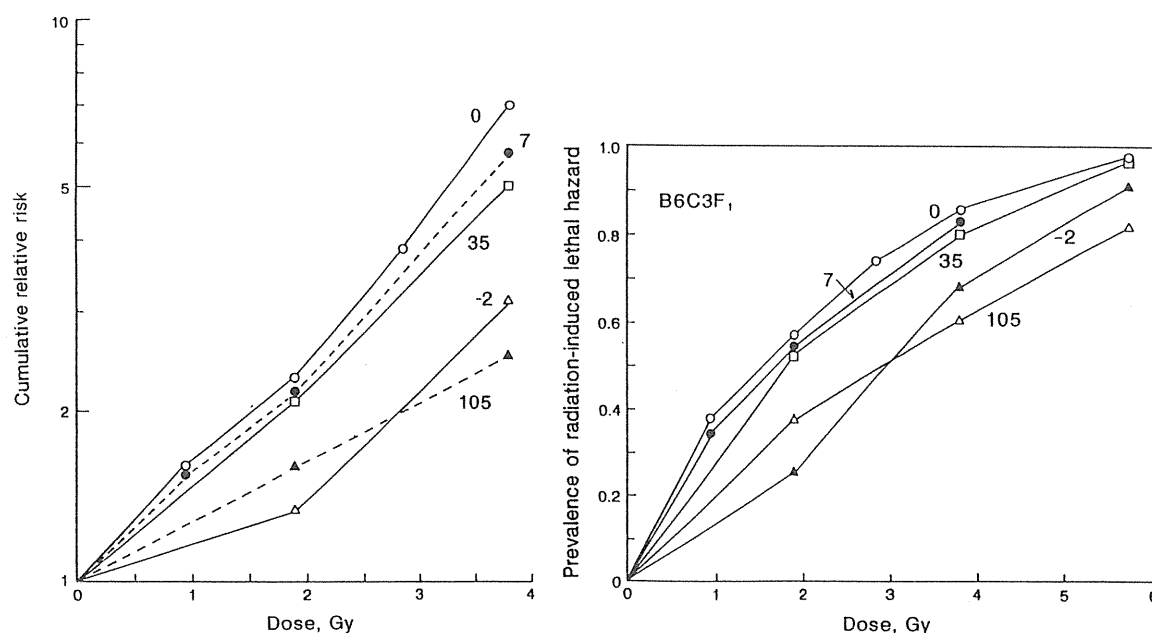


Fig. 2 Dose-response relationships for cumulative relative risk (left) and for prevalence of radiation-induced lethal hazard (right) in female B6C3F₁ mice irradiated at day 0, 7, 35, 105 or -2 (day 17 of the prenatal period).

はそれぞれ2.17, 6.04, 5.42, 4.06, 1.54, 1.06, 0.50である。この結果から新生児期ならびに幼若期の照射により大きな生涯リスクが生じること、成年期は感受性が一定ではなく加齢と共に低下すること、胎生後期の照射による影響は新生児期の場合より小さいことが明らかである。

感受性の年齢依存性は一つの線量による影響で比較することによつては正確に捉えることはできず、線量反応関係を互いに比較しなければならない。Fig. 2に累積相対リスクならびに過剰死亡分率に関する線量反応関係を示す。前者の縦軸は対数目盛である。累積相対リスクに関する線量反応関係のほとんどは片対数グラフにおいて直線に近いやや下に凸となる曲線である。胎生17日齢照射群のみは大きく曲っている。成年期ならびに胎生期は新生児期や幼若期より感受性が低いことが明らかである。胎生期照射の場合は線量が高くなると急に影響が大きくなるのが特徴である。過剰死亡分率に関する線量反応関係は多くの場合上に凸であり、胎生期照射の場合はシグモイドである。Table 2に線量反応関係とそのパラメーターをまとめた。累積相対リスクと過剰死亡分率は互いに関係のある尺度であり、線量反応関係も相互関連性がある。パラメーター推定値の誤差から明らかなように線量反応関係はこのモデルにかなり良く合う。胎生期照射の場合のみは線量の2乗の項の寄与が大きいが他は一次の項の寄与が大きい。Table 3に線量1 Gyと0.1 Gyにおける過剰累積相対リスクならびに過剰死亡百分率を示す。これらの数値のうち1 Gyについての推定値は信頼度が高いが、0.1 Gyについての数値はそうではなく、今後実験を低線量側に延ばすことにより正確に推定すべきものである。

Table 2 Parameters of dose-response relationship for prevalence of radiation-induced lethal hazard (α) and cumulative relative risk (ρ) in mice irradiated at day 0, 7, 35, 105 or -2

$$\alpha(X) = 1 - \exp(-b_1X - b_2X^2)$$

$$\rho(X) = \exp(b_1X + b_2X^2)$$

Parameter	Day 0	Day 7	Day 35	Day 105	Day -2
b_1	0.425	0.407	0.341	0.207	0.018
(se)	(0.033)	(0.036)	(0.008)	(0.023)	(0.003)
b_2	0.024	0.009	0.024	0.014	0.074
(se)	(0.012)	(0.005)	(0.002)	(0.004)	(0.001)

Table 3 Estimation of excess cumulative relative risk (ECRR) and prevalence of radiation-induced lethal hazard (PRLH) after irradiation with 1 or 0.1 Gy γ -rays at day 0, 7, 35, 105 or -2 of female B6C3F₁ mice

	Day 0	Day 7	Day 35	Day 105	Day -2
ECRR(1 Gy)	0.567	0.516	0.441	0.247	0.093
ECRR(0.1 Gy)	0.046	0.042	0.037	0.022	0.009
PRLH(1 Gy), %	36.2	34.1	30.6	19.8	8.3
PRLH(0.1 Gy), %	4.4	4.1	3.6	2.2	0.9

2. 累積相対リスクと累積過剰死亡数の時間的変動

Fig. 3に累積相対リスクの時間的変動を異なる照射時年齢のそれぞれについて相互に比較している。線量は3.8Gy, 照射時年齢は0, 105, 365日齢(上段), 0, 35, 240, -2日齢(下段)である。0日齢照射の場合を両方に入れたのは比較の基準とするためである。影響の尺度が累積相対リスクであるからそれぞれの曲線の右端の値が生涯リスクを意味する。累積相対リスクは年齢が進むにつれて低下して行くことは全てについて共通である。照射時年齢が異なると生涯リスクの大きさと致死的影響の発現の時間的分布が異なる。例えば0日齢照射と105日齢照射の場合を比較すると、生涯リスクは前者の方が大きく、致死的影響発現の持続期間は新生児期照射の場合の方がより長い。これは累積相対リスク低下が緩やかであることからいえる。35日齢の照射後の累積相対リスクは途中までは0日齢照射のそれを上回っている。これはその期間での致死的影響の発現がより大きいことを意味する。しかしその後逆転し、生涯リスクは新生児期照射の方が大きい。240日齢や365日齢の照射による生涯リスクは相対的に小さく、累積相対リスクの変動が小さい。

0日齢または胎生14日齢に0.95Gyの γ 線を照射したグループにおける過剰累積死亡数の時間的変動をFig. 4に示す。実験群により動物数が異なるので、過剰累積死亡数を初期数で除した数値、すなわち過剰累積ハザード、を縦軸にとってている。なお、類似の用語である過剰死亡分率は分母が初期数ではなく累積死亡数である。新生児期照射の場合は最終的過剰は統計学的に有意であり、致死的影響発現までの潜伏期が

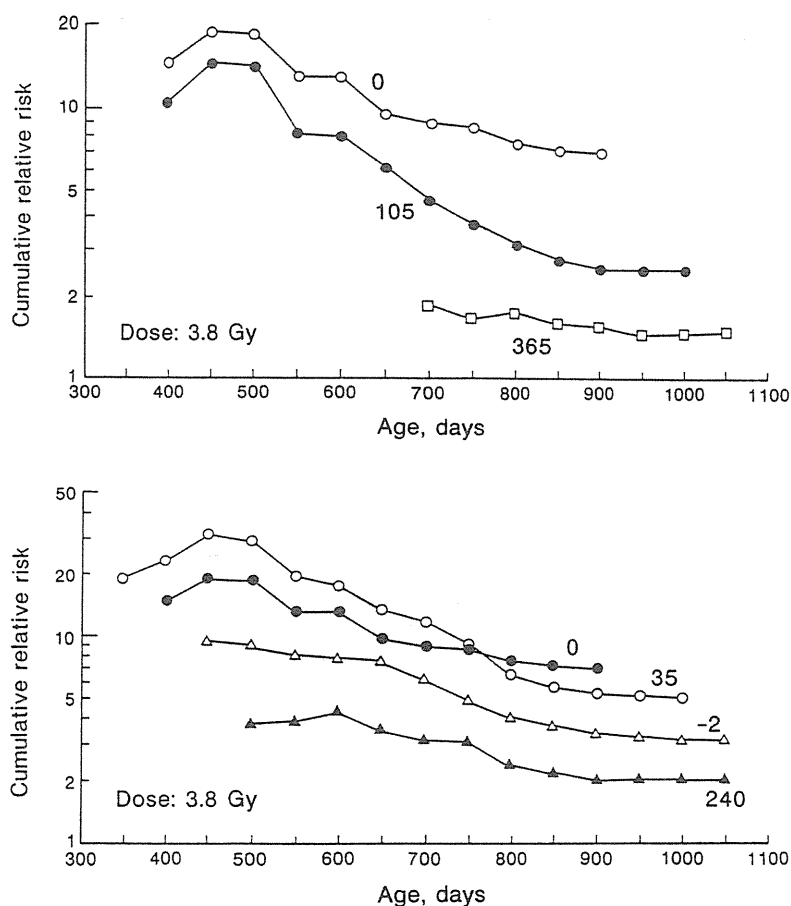


Fig. 3 Age-associated variations of cumulative relative risk after irradiation with 3.8 Gy γ -rays at day 0, 35, 105, 240, 365 or -2 (day 17 of the prenatal period) in female B6C3F₁ mice.

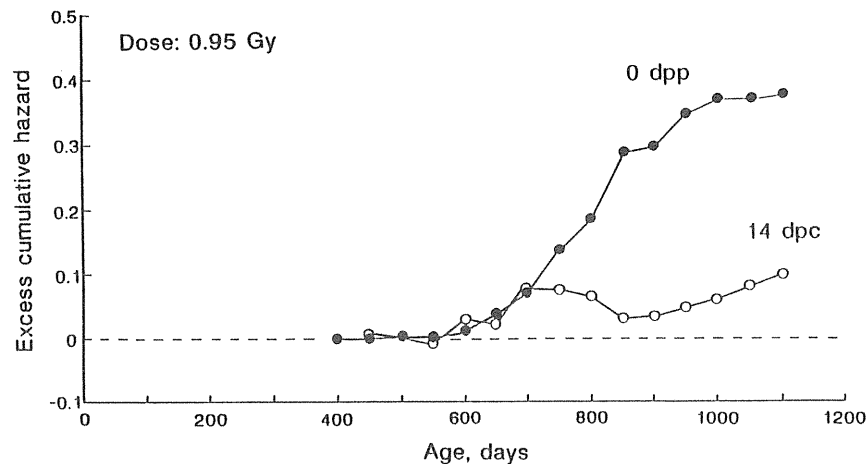


Fig. 4 Age-associated variation of excess cumulative hazard after irradiation with 0.95 Gy γ -rays at day 0 post-partum (0 dpp) or day 14 post-coitus (14 dpc) of female B6C3F₁ mice.

非常に長いことをこの結果は示している。一方、胎生14日齢に照射した場合には過剰は最後まで有意とはならなかった。胎生14日齢は胎児期の初期であるが、この時期は晩発影響誘発に関して感受性が低いことが示されたといえる。

3. 発癌に関する線量反応関係

発癌作用の尺度として累積相対リスクを用いた。死因競合の影響を受けない尺度であるからである。癌による死亡ではなく癌が発生するかどうかについての累積相対リスクである。Fig. 5に肝腫瘍、下垂体腫瘍、卵巢腫瘍ならびにハーダー氏腺腫瘍の誘発に関する線量反応関係をまとめた。Table 4にはこれらの腫瘍と肺腫瘍の誘発に関する線量反応関係のパラメーターと1 Gyにおける過剰累積相対リスクならびに1 Gyと0.1 Gyにおける過剰発生率の推定値をまとめた。ここでLは線量について一次、Qは二次を表し、Kは潜在的癌化細胞に対する致死効果を表す。モデルの選択には赤池の情報量基準を用いた。すなわち、理論的にこうであるはずであるというモデルではなく、経験的に良く合いそうなモデルを探すというやり方である。これらの結果から共通性のあることがらを探してみると次の通りである。(1)腫瘍誘発に関して感受性が高い時期は致死効果についても感受性が高いことを示唆する齢がいくつかある。35日齢の照射による卵巢腫瘍とハーダー氏腺腫瘍の誘発、新生児期や胎生後期の照射による肺腫瘍の誘発がこの例である。(2)誘発に関して低感受性な時期の線量反応関係においては線量の2乗の項の寄与が大きい。胎生17日齢の照射による肝腫瘍と卵巢腫瘍の誘発がこの例である。下垂体腫瘍の誘発に関する線量反応関係は胎生17日齢照射の場合がL、0日齢と7日齢のそれはLQ、35日齢と105日齢についてはQが当てはまるという事実はもう一つの例である。

新生児期や幼若期に照射すると過剰死亡分率や死亡率に関する累積相対リスクが大きいことを前半において示したが、この理由は多種類の腫瘍の誘発に関して感受性が高いことであるといえる。

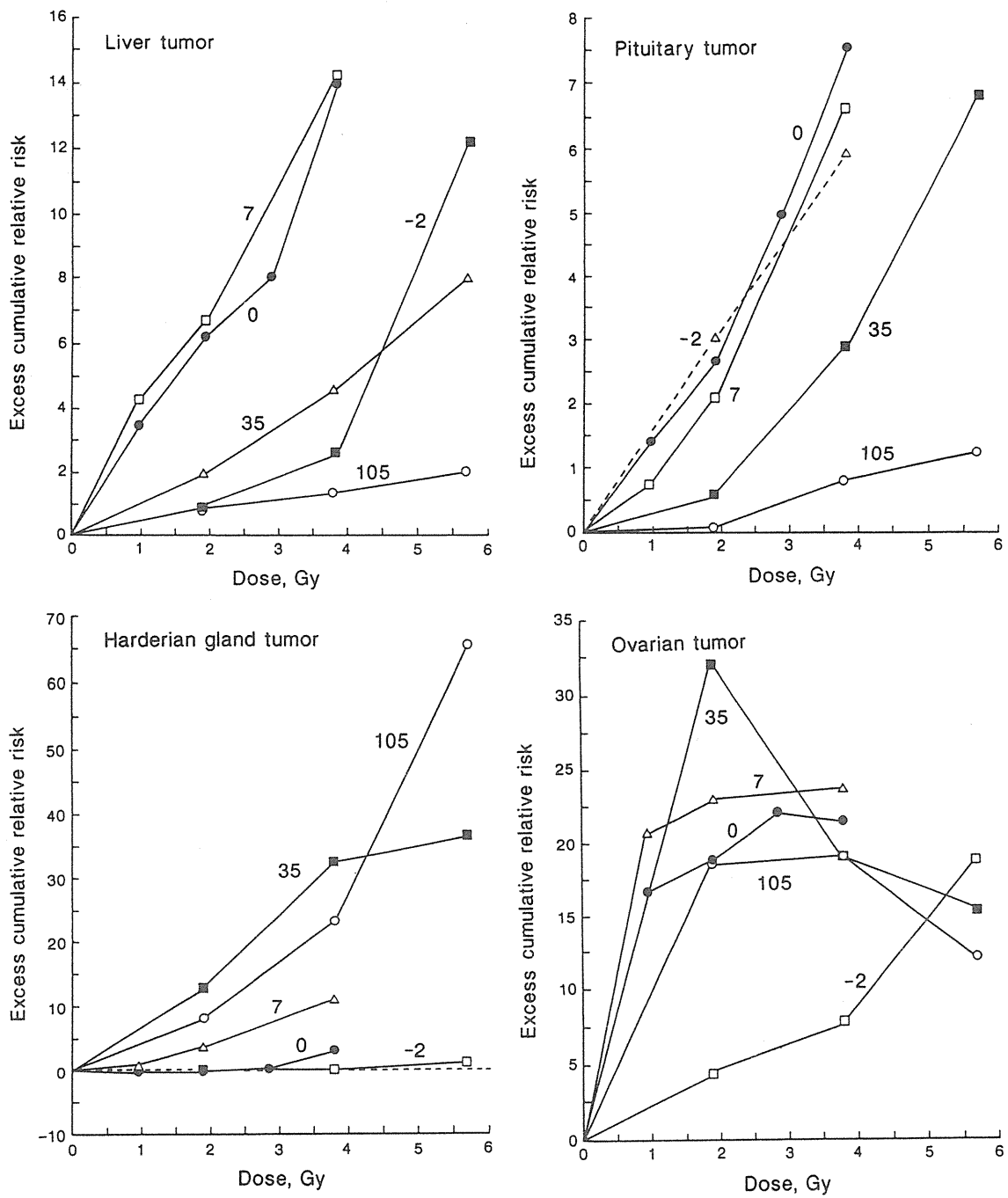


Fig. 5 Dose-response relationships for induction of liver, pituitary, ovarian and Harderian gland tumors by irradiation with γ -rays at day 0, 7, 35, 105 or -2 (day 17 of the prenatal period) of female B6C3F₁ mice.

Table 4 Dose-response relationship for induction of liver, pituitary, ovarian, Harderian gland and lung tumors by irradiation at day 0, 7, 35, 105 or -2 of female B6C3 F₁ mice

	Day 0	Day 7	Day 35	Day 105	Day -2
Liver tumors					
Model	L	L	LQ	L	Q
b ₁ , Gy ⁻¹	3.36	3.73	0.86	0.36	
b ₂ , Gy ⁻²			0.09		0.28
ECRR(1 Gy)*	3.36	3.73	0.95	0.36	0.28
EI(1 Gy)**,%	36.2	39.9	10.5	4.2	3.2
EI(0.1 Gy)**,%	4.4	4.8	1.1	0.5	0.04
Pituitary tumors					
Model	LQ	LQ	Q	Q	L
b ₁ , Gy ⁻¹	1.03	0.460			1.569
b ₂ , Gy ⁻²	0.25	0.339	0.208	0.040	
ECRR(1 Gy)*	1.28	0.799	0.208	0.040	1.569
EI(1 Gy)**,%	8.85	5.71	1.43	0.29	11.11
EI(0.1 Gy)**,%	0.84	0.40	0.02	0.003	1.23
Ovarian tumors					
Model	LK	LK	LK	LK	LQ
b ₁ , Gy ⁻¹	22.09	22.23	44.68	21.38	0.793
b ₂ , Gy ⁻²					0.425
D ₀ , Gy	2.72	2.39	1.88	2.53	
ECRR(1 Gy)*	15.29	19.24	26.25	14.40	1.218
EI(1 Gy)**,%	20.5	25.2	35.0	19.8	1.71
EI(0.1 Gy)**,%	3.2	4.2	6.3	3.1	0.13
Harderian gland tumors					
Model	Q	Q	QK	Q	Q
b ₂ , Gy ⁻²	0.115	0.784	7.560	1.907	0.033
D ₀ , Gy			3.03		
ECRR(1 Gy)*	0.115	0.784	5.435	1.907	0.033
EI(1 Gy)**,%	0.45	1.18	8.43	3.05	0.053
EI(0.1 Gy)**,%	0.003	0.014	0.135	0.034	0.001
Lung tumors					
Model	LK	L	L	L	LK
b ₁ , Gy ⁻¹	2.085	0.589	0.502	0.193	1.890
D ₀ , Gy	3.19				3.56
ECRR(1 Gy)*	1.552	0.589	0.502	0.193	1.427
EI(1 Gy)**,%	8.57	3.51	3.04	1.20	9.06
EI(0.1 Gy)**,%	1.37	0.40	0.34	0.13	1.22

*ECRR: excess cumulative relative risk

**EI: excess incidence

おわりに

ここに述べた解析によりこれまでに比べると放射線の晩発影響に関する感受性の年齢依存性をはるかに良く把握できるようになったと考えている。これは解析の方法論的検討を重ねたことによりもたらされた。この解析を行う中で欠落しているデータがあり早急に実験を追加して得るべきものがあることに気が付いた。その第一は新生児期や幼若期のより低線量照射による実験である。第二は中年成年期の照射による実験である。第三はより若い胎生期の照射による実験である。これらの実験は現在実施している。

晩発影響誘発に関する新生児期や幼若期の感受性の高さはやはり重要性がある。ヒトとマウスの出生時

の発生段階の違いを勘案すると、ヒトの胎生後期は晩発影響誘発に関して最も感受性の高い時期に入るのであろう。これらの時期の照射による腫瘍性ならびに非腫瘍性疾患の誘発に関する集中的かつ組織的研究を近い将来実施すべきであると考えている。

参考文献

- 1) Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations: Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. National Research Council, 1990.
- 2) Shimizu, Y., Kato, H. and Schull, W. J.: Life Span Study Report II, Part I Cancer Mortality in the years 1950-1985 based on the recently revised doses (DS86). RERF TR 5-88, 1988.
- 3) Yoshimoto, Y., Kato, H. and Schull, W. J.: Risk of cancer among children exposed in utero to A-bomb radiations, 1950-84. *Lancet*, 665-669, 1988.
- 4) Modan, B., Chetrut, A., Alfandary, E. and Katz, L.: Increased risk of breast cancer after low-dose irradiation. *Lancet*, 629-631, 1989.
- 5) Jones, P. H. M.: The late effects of cancer therapy in childhood. *Brit. J. Cancer*, 64, 1-2, 1991.
- 6) Meadows, A. T., Gallagher, J. A. and Bunin, G. R.: Late effects of early childhood cancer therapy. *Brit. J. Cancer*, 66, Suppl. 18, 92-95, 1992.
- 7) Little, M. P., Hawkins, M. M., Shore, R. E., Charles, M. W. and Hildreth, N. G.: Time variation in the risk of cancer following irradiation in childhood. *Radiat. Res.*, 126, 304-316, 1991.
- 8) United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation: Ionizing radiation: Sources and Biological Effects. Annex K, Radiation-induced life shortening. United Nations, New York, 1982.
- 9) United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation: Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation. Annex C, Biological effects of pre-natal irradiation. United Nations, New York, 1986.
- 10) Lindop, P. J. and Rotblat, J.: The age factor in the susceptibility of man and animals to radiation. *Brit. J. Radiol.*, 35, 23-31, 1962.
- 11) Upton, A. C., Odell, T. T. Jr. and Sniffen, E. P.: Influence of age at time of irradiation on induction of leukemia and ovarian tumors in RF mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, 769-772, 1960.
- 12) Upton, A. C., Conklin, J. W. and Popp, R. A.: Influence of age at irradiation on susceptibility to radiation-induced life-shortening. Radiation and Ageing (Eds., P. J. Lindop and G. A. Sacher), pp.337-344, Taylor & Francis, London, 1966.
- 13) Kohn, H. I. and Guttman, P. H.: Age at exposure and the late effects of x-rays. Survival and tumor incidence in CAF1 mice irradiated at 1 to 2 years of age. *Radiat. Res.* 18, 348-373, 1963.
- 14) Covelli, V., Di Mao, V., Bassani, B., Rebessi, S., Coppola, M. and Silini, G.: Influence of age on life shortening and tumor induction after X-ray and neutron irradiation. *Radiat. Res.*, 100, 348-364, 1984.
- 15) Benjamin, S. A., Saunders, W. J., Angleton, G. M. and Lee, A. C.: Radiation carcinogenesis in dogs irradiated during prenatal and postnatal development. *J. Radiat. Res.*, 34, 86-103, 1991.
- 16) Sasaki, S. and Kasuga, T.: Life-shortening and carcinogenesis in mice irradiated neonatally with X rays. *Radiat. Res.*, 88: 313-325, 1981.

- 17) Sasaki, S. and Kasuga, T.: Life shortening and carcinogenesis in mice irradiated at perinatal period with gamma rays. In "Life-Span Radiation Effects Studies in Animals", Ed. R. C. Thompson and J. A. Mahaffey, pp.357-367, National Technical Information Service, Springfield, 1986.
- 18) Sasaki, S.: Age-dependence of susceptibility to carcinogenesis by ionizing radiation in mice. *Radiat. Environ. Biophys.*, **30**, 205-207, 1991.
- 19) Sasaki, S.: Influence of the age of mice at exposure to radiation on life-shortening and carcinogenesis. *J. Radiat. Res.*, **32**, Suppl. 2, 73-85, 1991.
- 20) Sasaki, S.: Influence of age at radiation exposure on attributable risk in mice. Proceedings of International Congress on Radiation Effects and Protection, pp.223-228, Japan Atomic Energy Research Institute, 1992.
- 21) Prentice, R. L., Peterson, A. V. and Arek, P.: Dose-mortality relationships in RFM mice following ^{137}Cs -ray irradiation. *Radiat. Res.*, **90**, 57-76, 1982.
- 22) Preston, D. L., Kato, H., Kopecky, K. J. and Fujita, S.: Life Span Study Report 10, Part 1, Cancer Mortality among A-bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-1982. RERF TR 1-86, 1986.
- 23) Weeda, D. J. and Broerse, J. J.: Analysis of animal carcinogenesis data by various mathematical methods. *Radiat. Environ. Biophys.*, **30**, 249-252, 1991.

4 遺伝性発がん

野村 大成*

Radiation and Offspring Cancer

Taisei Nomura

Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University
2-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565

Abstract

Parental exposure to radiation could induce various kinds of tumors in the next generation. In ICR mice, a large and significant increase of adult types tumors was observed in the F_1 offspring after X-ray exposure at spermatozoa and spermatid stages, and less clear increase was observed after spermatogonial exposure. Mature oocytes were resistant up to 1 Gy, but very sensitive to tumor induction at higher doses. While there was no difference in the tumor incidence between acute and fractionated (0.36 Gy at 2 hr intervals) irradiation at postgonial stages, any kinds of tumors were not increased by the fractionated exposure of spermatogonia and mature oocytes, suggesting that only postmeiotic sperm are susceptible to protracted exposure to radiation at low dose rate. These radiation-induced germ-line mutations causing tumors showed dominant inheritance of tumor susceptibility.

Acute lymphocytic leukemia was not induced in the F_1 offspring of ICR and LT mice after spermatogonial exposure in contrast to a large increase of adult type cancers. However, 1.9-3.2 fold and 4.5-7.4 fold increases of leukemia incidence were observed in ICR and LT mice, when spermatozoa stage was treated with the X-ray doses of 0.36-5.04 Gy and 3.6-5.04 Gy, respectively, indicating the large difference in the sensitivity of developing germ cells to leukemia induction. In contrast to ICR and LT mice, N5 strain developed about 10 or 18 times higher incidence of leukemia in the offspring after spermatogonial or spermatozoa exposure to 5.04 Gy of X-rays, respectively, showing a marked difference in the

*大阪大学医学部放射線基礎医学

sensitivity to the leukemia induction by radiation among mouse strains. These differential sensitivities between germ cell stages and also between mouse strains reconcile in part the difference between two population studies in Hiroshima/Nagasaki and Sellafield.

1. はじめに

放射線や化学物質が、ヒトや動物に直接作用すると、がんを誘発する。また、妊娠初期なら奇形も誘発されることはよく知られている。しかし、これらの物質が親に作用した場合、子孫にがんや奇形が誘発されるかどうかは、殆ど研究されていなかった。放射線も化学物質も子孫に突然変異を誘発することは知られていたのだが、人類にとって最も重大な疾病であるがんや奇形については、「まさか」と思われたのと、膨大な数の動物を長期間飼育しなければならず、手をつける者がいなかったのだろう。しかし、研究はやってみないとわからぬものである。研究を始めて数年を待たず、父または母マウスに化学物質や放射線作用させると仔マウス (F_1) にがんや奇形が誘発されることが判明した^{1,2)}。さらに子孫にがんや奇形を造る生殖細胞の変異は次世代へと伝わってゆく。約25年前、未だ「がん遺伝子」という言葉が使われていなかった頃に始め、「遺伝物質(DNA)を介して、がんや奇形は子孫に伝わるのではないか?」という重大な実験結果をまとめた論文³⁾は、Japanese FindingあるいはOsaka Reportと呼ばれ、国際的に大きな反響を呼んだ。最近になり、ヒトでも同じことが起こっているのではないかと思われる疫学調査が報告され、再認識されるようになったのでヒトおよびマウスでの最新の情報をまとめた。

2. 親マウスの被曝によって仔にがんや奇形が発生

図1に示すように、雄ICRマウスにX線を高線量率(0.72Gy/min)で1回だけ作用させ、すぐに正常無処置の雌マウスと交配すると(精子に作用)、雄マウスへの作用量に比例して仔(F_1)マウスに肺、肝、卵巣、胃等に成人型のがんとリンパ性白血病が発生する。すぐに交配した場合や、少し間をおいて(2週間)交配した場合(精子細胞に作用)のみならず、何ヵ月もたってから交配した(精子をつくる元の細胞：精原細胞に作用)場合にも F_1 マウスにやはり成人型のがんが発生するが、その頻度は少し低く(約1/2)なる。即ち、精細胞への作用時期(stage)により、 F_1 マウスでの発がん率が異なる。奇形についても同じ結果が得られた。授精前に雌マウスに作用させた場合は、卵細胞は少量の放射線(1 Gyまで)には抵抗性を示し F_1 マウスにがんは殆ど発生しないが、大量の放射線に曝露されると F_1 マウスに高率にがんや奇形が発生した^{2,3)}。奇形については、1984年Lyon博士によりX線を用いて追試確認され、以後、種々の化学物質でも確認され、Paternal

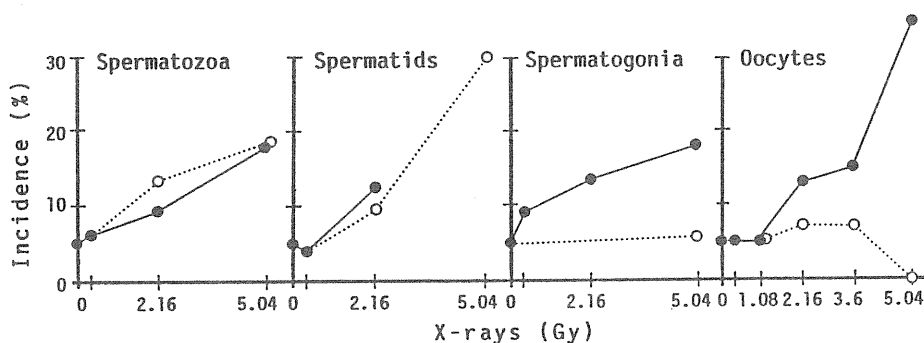


Fig.1 Incidence of tumors in F_1 offspring of ICR mice exposed to single (●) or fractionated (○: 0.36 Gy at 2hr interval) doses of X-rays.

Toxicology(父親由来の障害)という新しい学術分野が確立された⁴⁾。癌についても、1988年ソビエトの学者の報告⁵⁾を皮切りに本年度までに3編の報告⁶⁾がなされ、小規模ながら同様の結果が得られている。

3. 発がん・催奇形変異は遺伝する

親マウスへのX線照射により肺がんが発生したF₁マウスから生まれた孫(F₂)マウスには、やはり肺がんが高率に発生する。しかし、肺がんのないF₁マウスから生まれた孫マウスには肺がんは増加しない。従って、肺がんを発生させるような生殖細胞の変異は優性に遺伝する。即ち、遺伝物質(DNA)を介してがんは子孫に伝わってゆくことを明らかにした³⁾。これは、肺がんに限ったことでなく、ヒトのLi-Fraumeni症候群にみられるような種々のがんになり易さの遺伝であることがN5マウスを用いた膨大な家系解析より明らかになった(図2)。大阪大学微生物病研究所発癌遺伝子部門等との共同研究により、腫瘍からは、既知のがん遺伝子のみならず未知のがん遺伝子の活性化が検出されている⁷⁾。

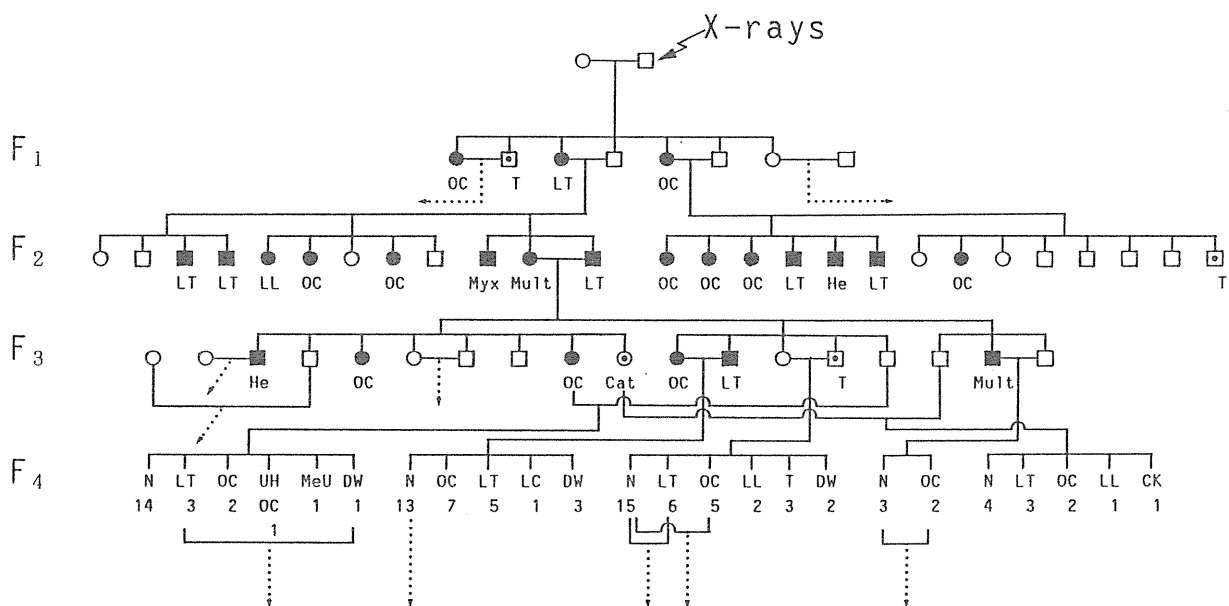


Fig.2 Inheritance of germ-line mutation causing tumors after parental exposure to X-rays-an example. OC, ovarian cystadenoma; LT, lung tumor; LL, lymphocytic leukemia; Myx, myxoma; Mult, multiple tumors; He, hepatoma; T, tail anomaly; Cat, cataract; N, normal; UH, uterine hemangioma; MeU, megaureter; DW, dwarf; LC, liver cyst; CK, cystic kidney.

4. マウス系統差

用いたマウス系統(ICR, LT, N5)によって子孫に発生するがんの種類もその頻度も異なることが判明した。特にリンパ性白血病は、ICRマウスでは、精子期照射によって、わずかに誘発されるが、精原細胞や卵細胞照射によってはF₁に誘発されなかった。LTマウスを用いた場合も精原細胞照射ではリンパ性白血病は誘発されなかったが、精子期照射(5 Gy)では、高率に誘発されている⁸⁾。しかし、ICR, LTマウスとは異なり、N5マウスでは、精原細胞期照射でも高率にF₁に白血病が誘発された^{8,9)}。従って、ヒトにおいても次世代でのがんのなりやすさに個人差、民族差があることが示唆される。

5. 微量放射線の長期間被曝の影響

雌マウス(卵細胞に作用)または、雄マウス(精原細胞に作用させた時)に少量ずつ繰り返してX線を照射した場合は(0.36Gy, 2時間間隔), F₁マウスの発がん率は減少する。しかし, 精子, 精子細胞(照射を受けてすぐに交配し子供をつくった時)に少量ずつ照射しても1回大量照射した場合と全く同じである⁹⁾。即ち精原細胞及び卵細胞に対するX線障害は修復されるが, 精子, 精子細胞に対する障害は修復されず1回大量被曝した場合と同じように高率にF₁マウスに成人型がんおよびリンパ性白血病が発生する。これは, 白血病の父親被曝説や遺伝性がんの父親由来説のうらづけとなる⁹⁾。

6. ヒトにおける調査

ヒトにおいては, 英国, Sellafield核燃料再処理工場従業員(男)の子供に白血病が通常の6~8倍の高いリスクで発生していることが, Gardnerらにより報告された¹⁰⁾。その結果が私のマウス実験結果とよく一致しており, 父親精子の放射線被曝に起因したものと報告されたため大問題になった。表1に要点をまとめた⁹⁾。まず, 被曝線量がヒトとマウスでは大幅に違っている。Gardnerらの報告は, 精原細胞に比べ精子が非常に感受性が強く, そのためF₁に白血病(主としてリンパ性)が高いリスクで発生する可能性を示してい

Table 1 Leukemia in the F₁ offspring after paternal exposure to radiation in man and mice (9)

	Dose (mSv)	Relative risk	Doubling dose (mSv)	Induced rate/mSv ($\times 10^6$)
Sellafield ⁶⁾				
All stages of spermatogenesis	≥ 100	6.24(1.5~25.8)	$\geq 9.5(2\sim 100)$	≤ 24
Post-gonia ^{a)}	≥ 10	7.17(1.7~30.5)	$\geq 0.8(0.3\sim 7)$	≤ 280
Hiroshima ⁴⁾				
Spermatogonia	435	1	—	0
Mouse				
ICR ¹⁻³⁾				
Spermatogonia	360~5040	1	—	0
Post-gonia	360~5040	1.9~3.2	950 ^{b)}	1.9 ^{b)}
LT ^{c)}				
Spermatogonia	3600	1	—	0
Spermatozoa	3600~5040	4.5~7.4	450	9.0
N5 ¹⁰⁾				
Spermatogonia	5040	9.6	300	6.9
Spermatozoa ^{d)}	5040	18.1	150	13.8

Doubling doses in mice and men were calculated as uniparental exposure⁹⁾, although for human, the “cases” mothers had a chance to be exposed to radionuclides in the house dust and through their husbands. Induced rate or leukemia per mSv in human study was calculated by the formula; (background incidence of leukemia relevant to Sellafield study, about 45×10^{-5})¹⁴⁾ \times (excess risk value)/(paternal dose, mSv).

a) Fathers' exposure during 6 months before conception indicates post-spermatogonial exposure for the most part, but includes spermatogonial exposure in part.

b) Average value at 2160 and 5040 mSv.

c) See legend to Fig. 2.

d) Preliminary results [2/27, 7.4% vs 1/244, 0.4% in controls]

る。これは、3つの系統のマウスでの実験結果と全く同じである。しかも、微量放射線の長期間被曝では、精子期被ばくでしかF₁に白血病は発生しないこともマウス実験の通りであった。しかし、最も高い感受性を示すN5マウスと比較しても、1 Sv当たりの誘発率は3~20倍も違う。被曝線量の不正確さ、F₁の生後被曝による相乗効果、標本数の少なさなどが問題を複雑にしている。一方、広島、長崎の被曝者のF₁には白血病は有意には増加していない。この原因として、被曝時期が、F₁での白血病発生に対し最も抵抗性を示す精原細胞期であったこと、ICR、LTに対するN5マウスのように、日英の民族差が存在する可能性、被曝後数年間のひどい生活・医療状態での白血病検出の精度(正確さ)の問題があげられる。いずれにしても、マウスに見られた如く、被曝者のF₁ががん年齢に至った時の成人型がんの慎重な調査が決め手になる。それまでは、かつて胎内被曝に関して行ったような^{9,10}根拠のない安全宣言は控えた方がよいだろう。これらの矛盾点をマウスの実験結果から説明した手記¹²⁾は“Of Mice and Men?”(生きとし生けるもの? : 1785年スコットランドの農民詩人Robert Burnsが人類の自然破壊を憂えて書いた詩の一節…表2)と名付けられ大きな反響を呼んでいる。

Table 2 Of mice and men-Robert Burns 1785

To a Mouse

I'm truly sorry Man's dominion
Has broken Nature's social union,
An' justifies th' ill opinion
Which makes thee startle
At me, thy poor, earth-born companion
An' fellow-mortal!
.....
The best laid schemes o' mice an' men
Gang aft a-gley.

Nov. 1785, Robert Burns

7. おわりに

文明の進歩とともに人類が地球上に造り出した種々の物質が我々子孫におよぼす影響について、人類を最も悩ますであろうがんを中心にマウスとヒトでの研究結果をまとめた。古来、マウスは、地球上で最も小さく最も弱い哺乳動物として、万物の霊長であるヒトと対比されてきた。果たして、この地球上で最も弱いものはマウスであろうか。我々は、有害物質にさらされる危険があれば、それを避けることができる。しかし、未だ生まれこぬ子孫は、自らを守ることができない。この世で最も弱いものは、実は子孫なのである。また、彼らを守るのは現在地球に住む我々に与えられた義務である。文明の進歩が人類の英知によるものなら、また、それに伴い生じるであろう障害を予知し、未然に防ぐのも人類の英知でなければならぬことを“Of Mice and Men?”は教えている。継世代発がんという新しい分野に光のさすことを願う。

参考文献

- 1) Nomura, T. Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment. *Cancer Res.*, 35: 264-266, 1975.

- 2) Nomura, T. Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction. In: Tumours of Early Life in Man and Animals. (Ed. Severi L.), pp.873-891, Perugia Univ. Press, Perugia, 1978.
- 3) Nomura, T. Role of DNA damage and repair in carcinogenesis. In: Environmental Mutagens and Carcinogens. (Eds. Sugimura, T., Kondo, S., and Takebe, H.), pp.223-230, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982.
- 4) Nomura, T. X-ray and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice. *Mutation Res.*, **198**: 309-320, 1988.
- 5) Vorobtsova, Z. E. and Kitaev, E. M. Urethane-induced lung adenomas in the first-generation progeny of irradiated male mice. *Carcinogenesis*, **9**: 1931-1934, 1988.
- 6) Takahashi, T., Watanabe, H., Dohi, K. and Ito, A. ²⁵²Cf relative biological effectiveness and inheritable effects of fission neutrons in mouse liver tumorigenesis. *Cancer Res.*, **52**: 1948-1953, 1992.
- 7) Ohuchi, Y., Kinuta, Y., Sasai, H., Miyoshi, J., Nomura, T. and Toyoshima, K. Oncogenic activation murine mos protein kinase by DNA rearrangement of it's N-terminal coding region. *Oncogene*, **7**: 331-338, 1992.
- 8) Nomura, T. Further studies on X-ray and chemically induced germ-line alterations causing tumors and malformations in mice. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis (Ed. Ramel, C.), pp.13-20, Alan R. Liss, New York, 1986.
- 9) Nomura, T. Paternal exposure to radiation and offspring cancer in mice: reanalysis and new evidences. *J. Radiat. Res.*, **32**: Suppl. 2, 64-72, 1991.
- 10) Gardner, M. J., Snee, M. P., Hall, A. J., Powell, C. A., Downes, S. and Terrell, J. D. Results of case-control study of leukemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *Br. Med. J.*, **300**: 423-429, 1990.
- 11) Nomura, T., Nakajima, H., Hatanaka, T., Kinuta, M. and Hongyo, T. Embryonic mutation as a possible cause of in utero carcinogenesis in mice revealed by postnatal treatment with 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, **50**: 2135-2138, 1990.
- 12) Nomura, T., Of mice and men? *Nature*, **345**: 671, 1990.

II トランスジェニック動物

1 トランスジェニック・マウスの腫瘍
発生病理 井上 達 他

2 TL遺伝子導入マウス 小幡 裕一 他

1 トランスジェニック・マウスの 腫瘍発生病理

井上 達*／平林 容子*

Effect of Radiation on Transgenic Mice Carrying a Variety of Oncogenes.

Tohru Inoue, M. D. & Yoko Hirabayashi, M. D.

Department of Pathology, Yokohama City University School of Medicine
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, 236 Japan

Abstract

We have been trying to see a rule of regulation in proliferation and differentiation of the hemopoietic stem cells, specifically at an *in vivo*-level of mice that had been transferred a variety of oncogenes into the stem cells. Among the various methods available for transgenes, transgenic mice used in the present purposes are, at this moment, the most efficient way to observe function of gene of interests in hemopoietic stem cells, to which genes are introduced rarely because of two reasons, i. e., their extremely lower frequency in the bone marrow, and their prominent quiescence in cellular kinetics. To use such transgenic mice, we also applied transplantation assay, in which mice, repopulated with bone marrow cells carrying the gene of interests, consisted the gene solely in the hemopoietic system. This system permitted to avoid a possible competitive risk between the leukemogenesis and the carcinogenesis in other organs.

In the present article, we introduced first the transplantation assay in which the recipient mice were repopulated with bone marrow cells carrying human c-myc gene; second kinetics of the hemopoietic stem cells in the myc-mice; furthermore, radiation effects on leukemogenesis of the h-c-myc marrow followed by discussion of the results. We also introduced our experimental model for the myelodysplastic syndrome, i. e., a multi-lineage abnormal growth of hemopoietic elements, appeared in the SV40-large T transgenic mice, for the future research studying a mechanism of radiation leukemogenesis.

*横浜市立大学

はじめに

発現ベクターに組み込んだ約 2 pl (500~1000copy) 程度の微量なDNA溶液を、位相差顕微鏡下で受精卵の前核に注入し、当該遺伝子の発現するトランスジェニック・マウス(「ト」マウス)をGordonたちがはじめて作製したのは1980年のことであり、いまから僅か10年余り前のことに過ぎない¹⁾。Gordonたちが最初に発現させたDNAは、特定の遺伝子の発現というより、技術上の開発の形を取っていたが、その後、4年ほどのintervalをおいて、その後は将に指数関数的に関連の文献数は数を増し、僅か8年ほどにして、ひとと

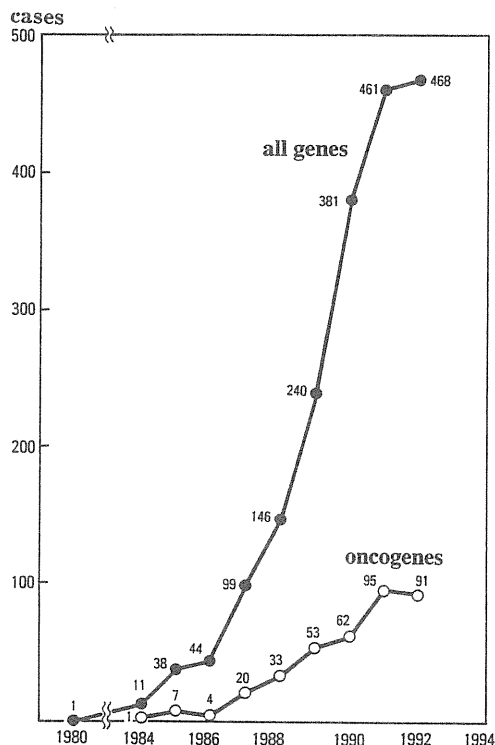


図1 「ト」マウスに関する文献数の推移

表1 実験的遺伝子発がん

腫瘍をつくる目的のために
挿入された遺伝子 (例)

がん遺伝子	
abl	plasmacytoma
bcl-2	no lymphoma
bcr/abl	leukemia/lymphoma

その他の遺伝子	
G.H.	pancreatic tumors
GnR.H.	neuronal tumors
IL-6	plasmocytoma

表2 遺伝子発現の支配要因

1. 発現調節体 (enhancer や promoter)
2. 構造遺伝子 (構造遺伝子のプロト型と変異型、イントロンの有無、選別遺伝子、切り出し部位、など)
3. 宿主遺伝子への挿入位置効果
4. 導入動物の宿主環境

りの組込実験がほぼ行われつくした観がある(図1)。図の下方のカーブが、所謂がん遺伝子関連のそれであり、これも同様で第1期を丁度過ぎようとしているところと思われる。

所謂がん遺伝子関連で、初めて作製された「ト」マウスは、SV40の初期遺伝子²⁾と、myc³⁾に関するもので、SV40についてはBrinster達²⁾が、また、mycのそれはStewartら³⁾がいずれも1984年に成功したものである。その後の記録の中から、実験的遺伝子発がんの例を幾つか列挙してみると、表1を通覧して明らかのように、bcl-2のようないわゆるがん遺伝子を導入しても腫瘍の発現の見られなかったケースもある一方、成長ホルモンやサイトカインのように、細胞増殖を促す遺伝子群では、しばしばautocrineの形をとったような腫瘍発現が観察されている。従って、*in vivo*における遺伝子発現のストラテジーの系統的な研究がなされるべきだが実態は極めて複雑である。「ト」マウスにおける遺伝子発現を支配する要因には表2に示すような4つのカテゴリーが指摘されている。第1は、どんなenhancer/promoterをつけて発現を促すかであり、次に構造遺伝子そのものの構築(周知の通りp53やrasなどではproto型と変異型とで発現態様が大きく異なる)、第3には宿主の遺伝子の何処に挿入されるか、positional effectに関する事柄が問題になる。最後の宿主因子と呼ばれる効果は、同じ遺伝子ながら入れるstrainなどによって遺伝子発現のbehaviorが違ってくる現象を以て知られている。

表3 Tマウス(SV40 large Tマウス)における種々の発現調節単位と発生腫瘍

SV40 earlyT	脈絡叢乳頭腫
albumin promoter	肝細胞癌
methallothionein	肝細胞癌
elastase I	脾臓房腫瘍
insulin I	膵島β細胞腫
αA-crystallin	眼球(レンズ)腫瘍

いまだし最初のpromoter/enhancerについて見てみよう。表3に腫瘍観察の目的で広く試みられてきた、一連のSV40 large Tの「ト」マウス(Tマウス)における腫瘍発生を列挙した。この表に見るように同じTマウスでも発現調節単位を変えることによって、右のような様々の異なった腫瘍の発生を見る。これに対して、発現単位が同じなら構造遺伝子は違っても発現部位は同じようになるかと言うと、“相性”(?)の問題もあるようで、免疫グロブリンのenhancerを、SV40の初期プロモーションと繋いだ同じ発現調節単位でも、構造遺伝子によって全く異なった組織に異なった腫瘍発生を見るといった結果であった⁴⁾。詳述する余裕はないが、intronの中にも発現に重要な部分があると報告されている⁵⁾。最後の宿主要因については、更に説明の困難なところが少なくない。フレンド・ウイルスのGp55遺伝子を導入した「ト」マウスは、DDDでは20%近くでフレンド白血病の名で知られる顕著な赤芽球症の発症を見るが、C57BL/6に入れると全く出てこない⁶⁾。これをDDDに掛け合わせてゆくと、F1で7%、F4でDDDのそれと同程度の頻度の赤芽球症が起こってくるという。

1. Mycマウス骨髄細胞における腫瘍発生—移植法アッセイ法—

こうした宿主要因を人為的に排除したり、あるいは意識的に取り入れて、比較実験を進めて行く一つの方法に骨髄移植による機能発現の観察法がある⁷⁾。どちらかと言えば応用範囲が造血器系に限られるきらいがあるが、比較的基礎的な用途に耐えるものである。当該の「ト」マウスから骨髄なり脾臓の細胞をとり、これを致死線量の放射線を照射したマウスに移植し、機能発現なりその結果としての腫瘍発生を観察するものである(図2)。この方法のメリット(表4)は、プロモータがあまり“効かず”、全身性に発癌性など当

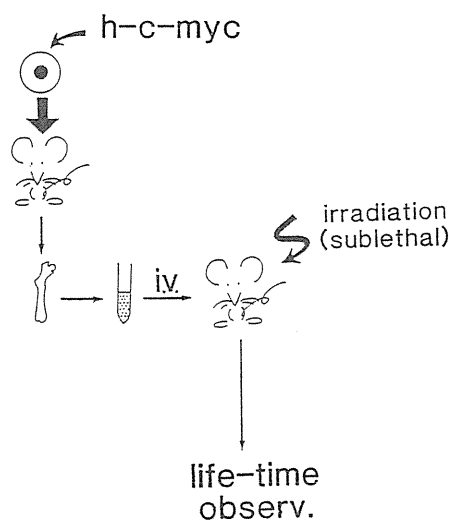


図2 骨髄移植アッセイ法

表4 骨髄移植アッセイ法のメリット

1. 骨髄・脾などの造血器のみ移植donor形質を持つ。
(Competitive riskの排除)
2. 実験的に宿主要因を変えることができる。
3. 少数のdonorから比較的多数の均一な実験群が得られる。

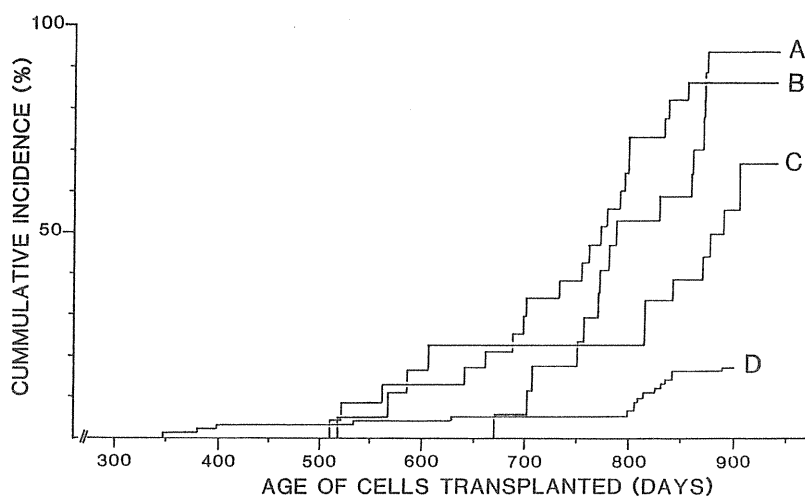


図3 *myc*マウス骨髓細胞の造血器腫瘍発生

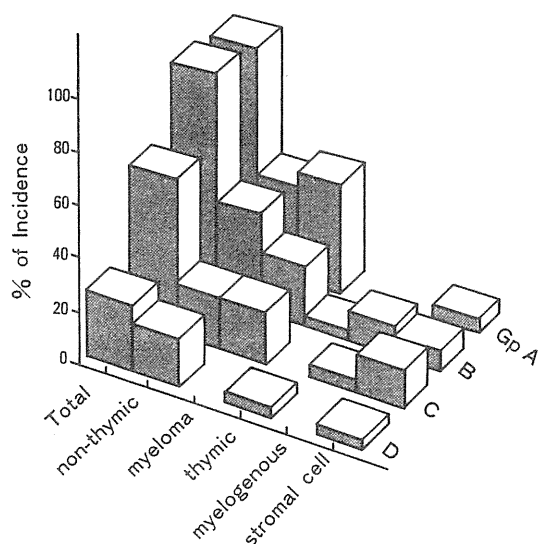


図4 *myc*マウス骨髓細胞由来造血器腫瘍の組織型別頻度

該遺伝子の高い機能発現が見られるような「ト」マウスの場合に、その骨髓系機能をcompetitive risk抜きで調べることができるので応用法によっては効果的にメリットを発揮するものであり、本稿における実験もほぼこれを用いて行っている。

かくして、*myc*マウスの移植系での発がん実験を開始した。この*myc*マウスでの導入遺伝子は、免疫グロブリンの重鎖のエンハンサー領域と、SV40のTATAboxを含む初期プロモータ領域、およびヒト*c-myc*の第2、および第3エクソンが接続されている⁴⁾。発生した腫瘍病変には、非胸腺リンパ腫、骨髓腫、胸腺リンパ腫、などと共に骨髓性白血病も見いだされた。挿入された遺伝子はヒトの*myc*であるが、発生したそれぞれの腫瘍で、ヒト*c-myc*のexpressionが観察されたので、このものの発現が腫瘍発生に結び付いたものと理解されている⁷⁾。尚、導入した*myc*は、再構成は調べたかぎりでは認められなかった。

異なった3群についての、腫瘍発生の生涯観察の結果を図3に示す。一番下層(D)の*myc*(-)の対照と較べて、他の*myc*(+)の3群の造血器腫瘍の発生頻度は明らかに高くなっている。図4の棒グラフはどんなタイプの腫瘍が観察されたかを各群毎に示している。骨髓の間質に由来する、Stromal cell tumorも観察されるが、これらにも挿入した*myc*の発現が見られるのでdonorの骨髓間質由来のものと理解される。

2. Mycマウス造血細胞の細胞動態

こうした腫瘍発生は、移植骨髄の血球系機能の変化と関係があるものと思われるので、mycの挿入された血球系でなにが起こっているのかを調べた。この「ト」マウスでは、接続されているenhancerゆえか、preB細胞プールの拡大が顕著である。しかし他の血球ではホメオステシスの様な機構が働いているのか、大腿骨当たりの幹細胞の数を含む様々の指標で調べた限りの骨髄、脾臓、胸腺のいずれでも、cell cycling position別の各々の分画の大きさに、myc(+)とmyc(-)の両群で目立った細胞動態の差異はみられなか

表5 mycマウスの造血幹細胞数

	myc (+)	myc (-)
Day 7	10.1±0.7	12.6±0.7
Day 9	12.5±0.4	10.3±0.6
Day13	7.4±1.0	6.2±0.6
Hind Legs (x 1000) ± S.E.		

表6 mycマウスにおける造血幹細胞のS期分画

killed on	c-myc	% cytotide (mean±S.E.)
day 9	no yes	11.4±3.4** 23.8±3.9**
day 13	no yes	8.8±2.6* 18.4±4.8*

Significance in % cytotide

** P < 0.02

* P < 0.05

った。Flow cytometric patternでも同様であった。表5は、造血幹細胞の数を比較したものである。ややlate-appearing colonyのそれが多いような傾向が窺われるが、有意差はない。際だった差異が認められたのは唯一点で、トリチウム・チミジンの取り込みによる自殺試験でS期分画の大きさを調べると、これは有意にmycマウスの方が大きくなっていた(表6)。幹細胞の数で差がないので、これはより分化したdiscendantの分画あたりで、negativeのフィードバックがかかっているとか、bcl-2の発現が低下していてアポトーシスの亢進が見られるとかがあるのかも知れないが、そうした詳細については未検討である。ともかくmycの易腫瘍発生性についての現状での考え方の大略は、分化の特定の部分に局限して増殖が亢進するこ

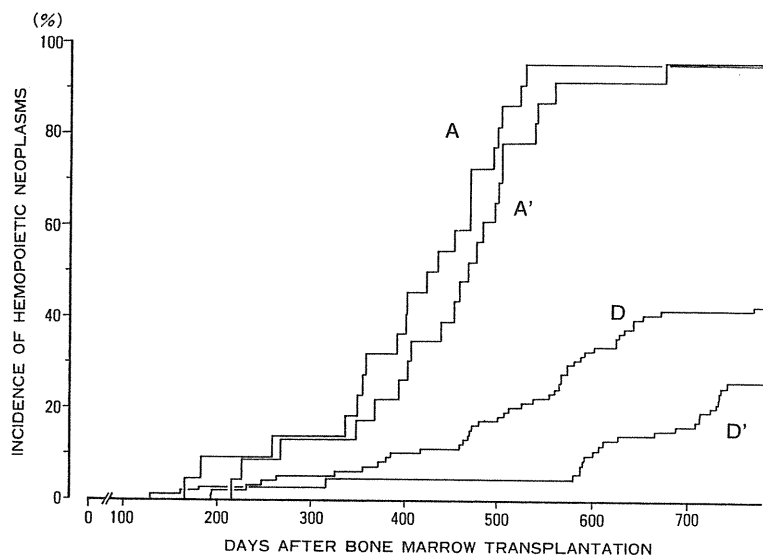


図5 mycマウスでの放射線がん

とによって生ずる，その部分でのpopulationの歪みとか淀みが腫瘍発生の母地となるというものである。

3. Mycマウス骨髓細胞における放射線発がん

以上見たような，mycマウスの骨髓移植系を用いて，このものに対する放射線の後照射の影響を見たものが次の実験である。実験のデザインは前項と同じで，これに骨髓再建の後2箇月目に2 Gyの後照射を行った。結果の代表的な例を図5に示した。A，A'はmyc(+)群，D，D'はmyc(-)群である。前の実験結果と

表7 mycマウスにおける放射線誘発腫瘍

GROUPS	D R(+) myc -	D' R(-)	A R(+) myc +	A' R(-)	B R(+) myc +	B' R(-)	C R(+) myc +	C' R(-)
No. of MICE	98	93	22	23	16	17	19	18
TOTAL No. of HEMOPOIETIC MALIGNANCIES	43	27	21	22	15	16	11	12
% of HEMOPOIETIC MALIGNANCIES	44	29	96	96	94	94	58	67
LYMPHOMA, THYMIC	8.2	4.3	13.6	4.3	6.3	0	5.3	0
LYMPHOMA, NON-THYMIC	26.5	20.4	54.5	43.5	25.0	41.2	26.3	22.2
MYELOMA	0	0	22.7	26.1	56.3	47.1	21.1	22.2
LEUKEMIA, MYELOGENOUS	1.0	0	4.5	13.0	0	0	5.3	5.6
STROMAL CELL TUMOR	8.2	4.3	0	8.7	6.3	5.9	0	16.7

表8 mycマウス骨髓細胞の移植アッセイによる腫瘍発生—照射群と非照射群との比較—

THE ONSET OF NEOPLASM			
GROUPS	myc	RADIATION (+) (R+)	RADIATION (-) (R-)
D(R+); D'(R-)	-	194	129
A(R+); A'(R-)	+	164	216
B(R+); B'(R-)	+	269	368
C(R+); C'(R-)	+	225	259
(DAYS AFTER MARROW TRANSFER)			
MEAN SURVIVAL TIME			
GROUPS	myc	RADIATION (+) (R+)	RADIATION (-) (R-)
D(R+); D'(R-)	-	507.8 ± 21.6	608.1 ± 35.7
A(R+); A'(R-)	+	403.7 ± 22.0	442.4 ± 22.9
B(R+); B'(R-)	+	440.3 ± 18.8	493.1 ± 16.5
C(R+); C'(R-)	+	567.2 ± 37.5	506.8 ± 41.4
DAYS ± S.E.			

同様、A'群はD'群より高かったが、これに照射した各群では、対照群(myc(-))のD群が非照射のD'群に較べて造血器系の腫瘍発生が早く、且つ頻度を増す方向に働いていたのに対して、myc(+)のA群とA'群との間では、照射と非照射の差が見られなかった。

他の群のそれと一括して表にしたものが表7である。C-C'群のように、非照射でもともと頻度の低かった群でも、照射群が非照射群より高くなるという現象は見られない。表8は、各群毎に、初発時期や、平均生存日数などを比較して作表したものであるが、myc群に照射による加算効果はないようであった。

4. 何故、放射線照射が、mycの腫瘍発生に対して加算的に働かなかったのか

何故、放射線照射が、mycの白血病発症に対して加算的に働かないのか、現在この疑問にたいする明快な解答はない。このmycマウスのラインのひとつでは、mycは第4染色体に組み込まれていることがわかっており、ここにマウスの抑制遺伝子があつて機能欠失の状態であるという考えがある⁸⁾。このことが、実際に放射線による加算効果が見られなかったことの説明になるかどうかはわからないが、放射線発がんの基本的なpathwayはこの系ですでに終了していて、放射線の照射が加算するものがないという考え方である。しかしこの考えにはいくつかの難点があり、そのひとつは、mycマウスの血液腫瘍の発症が必ずしも早

表9 放射線誘発腫瘍とがん遺伝子

Guerrero et al. (1984):		
K-ras;	activated	/radiation induced thymoma
Newcomb et al. (1988):		
K-and/or N-ras;	mutated	/thymic lymphoma
Shuin et al. (1986):		
myc;	greatly enhanced	/transformed cell lines
mos, abl, fos, ras;	enhanced	/transformed cell lines
sis, fms, src, myb;	not detectable	/transformed cell lines
Garte et al. (1990):		
myc;	amplified	/skin tumors

いとは言えないことである。

他方、放射線誘発腫瘍形成にとって、mycの発現は、重要なpathwayになっているらしいことが、少なからぬ人々によって報告されている。表9は、放射線誘発腫瘍でどんながん遺伝子に変化していたかを通覧したものである。これを見ると、mycに極度にエンハンスメントが見られる点を除くと、他の遺伝子の発現に際だったものはないといって差しつかえないようである。特にShuinらの放射線誘発の転換細胞系での結果⁹⁾を見ると、がん遺伝子の発現のなかで際だっていたのはmycのみである。しかも他の遺伝子群には極だった発現は見られない。Garte達は、このmycが、放射線誘発のskin tumorでの連続的なbiopsyでcopy数が次第に増加することを示している¹⁰⁾。これが放射線発がんのmajorな役割の一つとして良いか解からないが、今回用いた「ト」マウスのように初めからmycの過剰発現状態にあるマウスに放射線が加算的に働かないことも、あるいはこれによって説明が付くのかかもしれない。但し、必ずしもすべての放射線腫瘍発生病理がmycの亢進をmajorなpathwayとしているものでもないようであり、報告によっては、mycのover-expressionは多数の放射線誘発腫瘍の極く一部に限られている。むしろ逆に放射線傷害の修復とmycの関係なども関与しているに違いない。この辺りはまだ充分に討論できる段階にはないと言ふべきかもしれない。

5. Tマウスにおける多系統血球の異常増殖とその単系統性腫瘍への遷移

最後に、がん抑制遺伝子の関与していると思われるSV40のlarge T遺伝子導入マウス(Tマウス)での腫瘍発生病理について触れてみたい。前述のとおりTマウスは、歴史的には一番早く作られた「ト」マウスの一つである²⁾。このlarge Tは、Rb蛋白やp53にbindしてこれらの機能欠失状態を生じる。そして細胞の不死化や腫瘍発生もこれにあずかる結果であることが最近になって解かってきた^{11,12)}。従ってTマウスでは、細胞動態の変異などにも様々な変化が生じていると考えられ、これがこのマウスの系が改めて見直される所以でもある。併せて、Tマウスでの腫瘍発生の観察は、結果的には抑制遺伝子の失調状態での発がん性を見ることを意味している。事実そうした目で観察すると、Tマウスの病態には従来気づかれずにいた重要な問題点のあることが理解される。

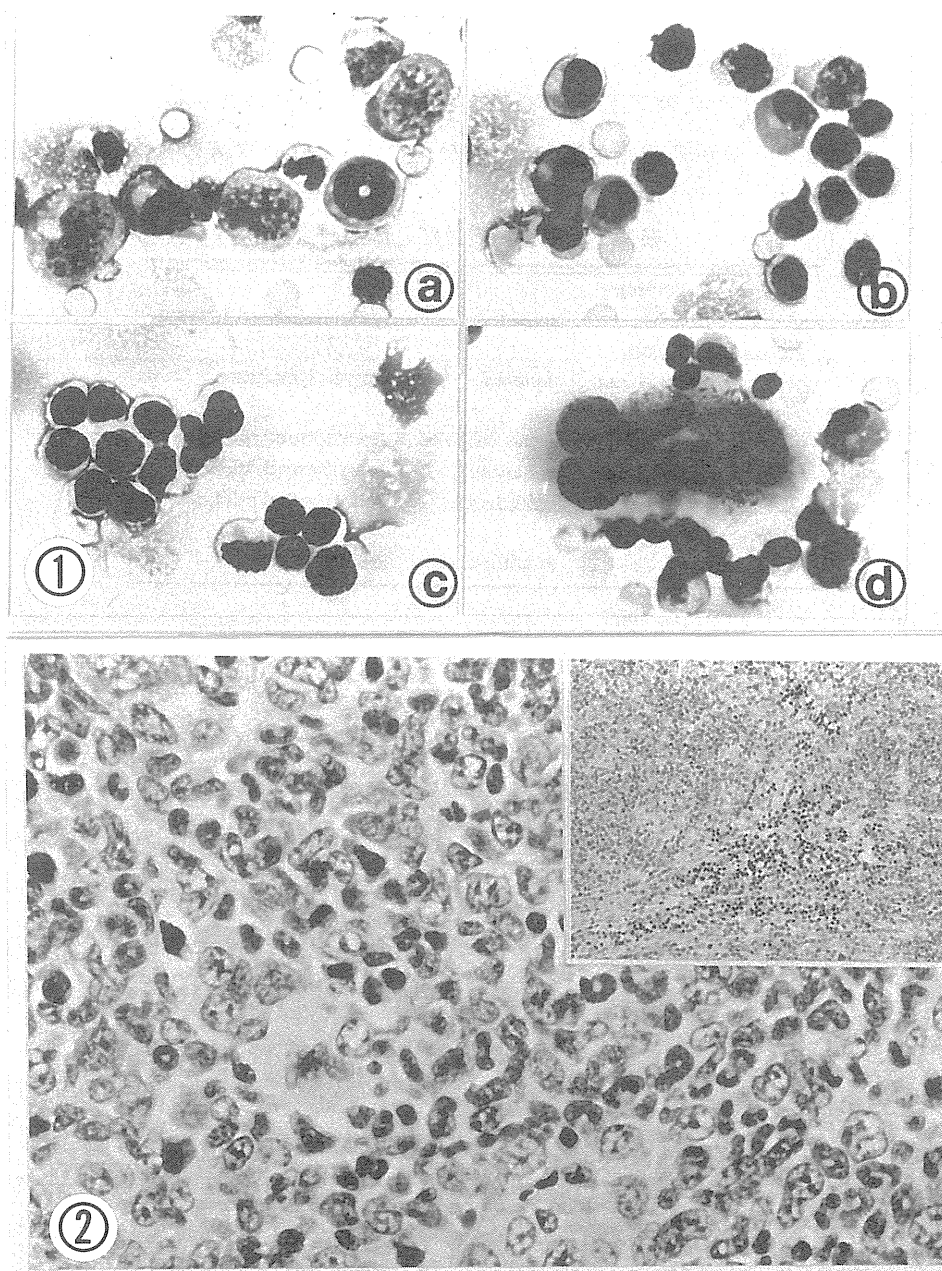


図6 Tマウスの腫大脾の塗抹標本像(上)とその組織像(下)

表10 MDS状態のTマウス血球のnude miceへの移植

Source	Splenomegaly		MDS-like hemopoiesis *		Neoplastic lesion		Phagocyte & debris **	
	no	yes	no	yes	no	yes	no	yes
Bone marrow	7	2	0	9	4	5	3	6
Spleen	8	1	0	9	7	2	3	6

* Tri-lineage abnormal hemopoiesis, regardless of hypersplenism, with atypical blood cells including dyserythrocytic and/or hypersegmented granulocytes.

** possible findings related to G.v.H.

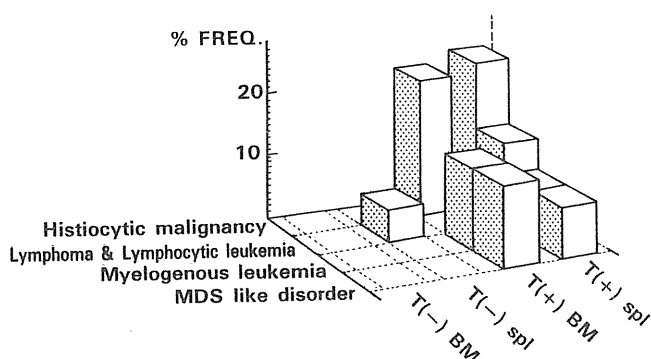


図7 移植アッセイによるTマウス造血器疾患の遷移

今回我々が用いたTマウス¹³⁾は、ヒトの骨髄異形成症候群(MDS=myelodysplastic syndrome)に酷似した病態を生じ、個々の血球細胞の秩序のない異常増殖亢進状態が骨髄や脾などで観察された。ヒトのMDSでもp53のmutationなどが指摘されているので、Tマウスでのこうした事象は、ヒトのそれとよく一致するといつてよからう。

ところでMDS状態は種々の血球系からなるmultilineageの異常造血状態であり、白血病のような“完全な”腫瘍化状態ではない。単系統の細胞の異常増殖する状態のいわば前段階にあるものと理解される。ではTマウスでは如何かという、このマウスではまるでマウスのお腹にラットの脾臓を取り込んだような6~7gに及ぶ巨脾が生ずる。脾のsmearは過分葉の顆粒球、dyserythropoieticな赤芽球が見られ、巨核球にも多分に異形成がある(図6上)。組織学的にも、図6(下)のような、血球の出鱈目な過増殖像が観察される。そしてこの状態で造血幹細胞が増加している事もなく、白血病性の脾コロニーを生ずることもなかった。Nude mouseへも生着しなかったが、4 Gy照射したところ、MDS状態が、少しtransferされた。しかもこの時、表10に見るように、血液系腫瘍が幾つか観察された。数次の試みの末、pre-onsetの時期の細胞を、ほぼ同系にあたるC57BLを照射して移植したところ、続々とsingle lineageの血液系の腫瘍の発症を見た。図7の棒グラフは、その発生腫瘍の内訳を示しており、single lineageの種々の造血器腫瘍への遷移が、Tマウス血球の移植群に有意に認められる^{13,14)}。

こういった実験系に放射線照射を加えると、single lineageのtrue neoplastic changeが早く発症するであろうか？我々はその答えは持っていない。寧ろ現在我々はSV40を介さず、直接p53遺伝子を欠失させた「p53欠失マウス」を用いた同様の共同実験を進めつつある。この系での放射線の加算効果の有無などの結

果もいずれ近い将来得られるものと考えている。

おわりに

我々は、造血幹細胞レベルへの種々の遺伝子導入とその発現を観察することを通じ、これを正常あるいは異常な幹細胞の増殖と分化を支配するルールを理解する助けにしたいと考えてきた。造血幹細胞への遺伝子導入法には幾つかの方法があるが、「ト」マウスを作製する方法は、用途が実験系に限られ、手間は懸かりつつも、*in vivo*での遺伝子機能の観察の目的に限ってみるならば、現状ではもっとも効果的な方法である。本稿で述べた「ト」マウスにおける腫瘍発生病理についても、造血幹細胞に特定の遺伝子発現を起こさせたとき、その細胞動態と腫瘍発生との関係にどんな変化が生ずるか興味をそそられて、これまでの実験を進めてきたものである。本稿で紹介した我々の実験に用いられた「ト」マウスは、すべて理研・分子腫瘍の相澤慎一博士とその共同研究者の方々により共同研究の為に恵与されたものである。最後にそのことをお断りし深謝するとともに、ご高配載いた井川先生をはじめ共同研究者の方々に篤くお礼を申し上げる次第である。

共同研究者(敬称略)：

理研・分子腫瘍

相澤慎一，須田容子，古田泰秀，井川洋二

横浜市大・医学部

佐々木秀樹，木内吉寛，谷口覚司，三井秀昭

参考文献

- 1) Gordon, J. W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7380-7384, 1980
- 2) Brinster, R. L. et al. *Cell* **37**: 367-379, 1984
- 3) Stewart, T. A. et al. *Cell* **38**: 627-637, 1984
- 4) Suda, Y. et al. *EMBO J* **6**: 4055-4065, 1987
- 5) Palmiter, R. D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 478-482, 1991
- 6) Ikawa, Y. et al. unpublished data.
- 7) Hirabayashi, Y. et al. *Exptl. Hematol.* **20**: 167-172, 1992
- 8) Oshimura, M. personal communication.
- 9) Shuin, T. et al. *Cancer Res.* **46**: 5302-5311, 1986
- 10) Garte, S. J. et al. *Cancer Res.* **50**: 3073-3077, 1990
- 11) Ludlow, J. W. et al. *Cell* **56**: 57-65, 1989
- 12) Zhu, J. et al. *J. Virol.* **65**: 6872-6880, 1991
- 13) Furuta, Y. et al. *Exptl. Hematol.* **21**: 806-815, 1993.
- 14) Inoue, T. et al. Leukemia, in press.

2 TL遺伝子導入マウス

小幡裕一*／森田明理**／笠井謙次***／松平康枝*／
長谷川ひとみ*／玉置広美*／高橋利忠*

TL TRANSGENIC MOUSE STRAINS

Obata, Y*., Morita, A**., Kasai, K***., Matsudaira, Y*.,
Hasegawa, H*., Tamaki, H*. and Takahashi, T*

*Lab. of Immunology, Aichi Cancer Center Research Institute,
1-1, Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya-shi, 464 Japan

**Dept. of Dermatology, School of Medicine, Nagoya City Univ.
1, kawasumi, Mizuho-ku, Nagoya-shi, 467 Japan

***Dept. of Pathology, School of Medicine, Nagoya Univ.
65, Tsurumai, Showa-ku, Nagoya-shi, 466 Japan

Abstract

TL antigens belong to the family of MHC class I, but unlike other class I antigens, the expression is restricted to normal thymocytes and T-cell lymphomas. Not all strains of mice express TL in the normal thymus, but such TL⁻ strains, e. g., B6 and C3H, express TL on T-cell lymphomas as a serological defined tumor-specific antigen.

To elucidate the function of the TL antigens, we have derived over a dozen of transgenic mice with TL and TL/H-2 chimeric genes. One strain, Tg.Tla^a-3-1, introduced with a TL gene (Tla^a-3), was found to have an abnormal thymic T cell population and to develop a high incidence of T-cell lymphomas. The expression of TL antigen in the transgenic mice is greatly increased and TL is expressed in wider range of T cells than in normal inbred mice. These quantitative and qualitative abnormalities in TL expression most likely cause the abnormal T cell differentiation. As a result of abnormal development of the thymus of these mice, TCR $\alpha\beta$ lineage of the T cell differentiation is disturbed and cells belonging to the TCR $\gamma\delta$ CD4⁻ CD8⁻ double negative (DN) lineage become preponderant. The $\gamma\delta$ DN cells migrate into peripheral lymphoid organs and constitute nearly 50% of peripheral T cells. Immune function of the transgenic mice is severely impaired, indicating that the $\gamma\delta$ cells are incapable of participating in these reactions. Molecular and serological analyses of T-cell lymphomas reveal that they belong to the $\gamma\delta$ lineage. Tg.Tla^a-3-1 mice should be useful in defining the role of TL in normal and abnormal T cell differentiation as well as in

*愛知県がんセンター研究所免疫学部／**名古屋市立大学医学部皮膚科学／***名古屋大学医学部病理学第1講座

the development of T-cell lymphomas, and further they should facilitate studies on the differentiation and function of $\gamma\delta$ T cells.

To delineate the mechanisms in which T cells recognize TL antigen as a tumor-specific antigen, we isolated T3^b-TL gene from B6 mice and constructed a chimeric gene in which T3^b-TL is driven by the promoter of H-2K^b. With the chimeric gene, two transgenic mouse strains, Tg. Con.3-1 and -2 have been derived in C3H background. Both strains express TL antigen in various tissues including skin. The skin graft of transgenic mice on C3H and (B6 X C3H)F₁ mice were rejected. In the mice which rejected the grafts, CD8⁺TCR $\alpha\beta$ cytotoxic T cells (CTL) against TL antigens were recognized. The recognition of TL by CTL did not require the antigen presentation by H-2 molecules. The results indicated that TL antigen in the skin becomes a transplantation antigen and behaves like a typical allogeneic MHC class I antigen. The facts that (B6 X C3H)F₁ mice rejected the skin expressing T3^b-TL antigen and induced CTL that killed TL⁺ lymphomas of B6 origin revealed that TL antigen encoded by T3^b-TL is recognized as non-self in B6 mice. Experiments are now extended to analyze immune responses to TL antigen expressed on autochthonous T cell lymphomas.

遺伝子導入マウスの作出と解析は、単離した遺伝子の個体レベルでの再構築実験であり、免疫学、発生学等の様々な分野で最も有力な研究方法の一つである。癌研究でも、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の作用機序、多段階発癌、さらに宿主因子等に関する貴重な知見が、遺伝子導入マウスの解析から得られている。私達も、発癌の機構並びに癌化に対する宿主の防御機構を解明することを目指し、マウスTL抗原をモデル系として研究を進めてきたが、さらに、TL遺伝子導入マウスの作出と解析へと研究を展開させてきた。

TL抗原は、放射線照射により誘発されたマウスTリンパ腫の細胞表面の検索の過程で同定された系であり、以下の興味深い特徴を持つ¹⁻³⁾。①TL抗原は、MHCクラス I 抗原群に属し他のMHCクラス I 分子と共通した遺伝子構造並びに蛋白構造を持つ。②TL抗原を正常胸腺で発現するTL⁺マウス(A, BALB/c等)と、発現しないTL⁻マウス(B6, C3H等)が存在する。③TL⁺マウスのT細胞分化の過程では、胸腺T細胞のみに発現する。④TL⁻マウスでもTL遺伝子を持っており、Tリンパ腫の発生に伴いTL抗原を発現する。TL抗原は、放射線照射直後の“前癌状態”の胸腺細胞で既に発現し、また佐渡、武藤(放医研)は、TL陽性になった胸腺細胞群の中から、Tリンパ腫が発生することを報告している⁴⁾。⑤TL⁺のTリンパ腫でTL⁻マウスを免疫すると、TL抗原に対する抗体が産生される。つまり、TL⁻マウスのTリンパ腫に発現するTL抗原は、宿主により腫瘍抗原として認識される。⑥TL抗体の存在下でTL抗原が細胞表面から消失する現象“Antigenic Modulation”が起き、TL陽性細胞が陰性に変化し、抗体の抗腫瘍効果は認められない⁵⁾。TL抗原系で、はじめて観察されたAntigenic Modulationは、腫瘍が宿主の免疫監視機構から逃れて発生増殖する、“Escape機構”の一つとして考えられている。以上のように、TL抗原は、T細胞の正常分化機構並びにTリンパ腫の発生機序の解明に迫り得る系であると同時に、宿主の免疫監視機構を明らかにできる系でもある。

遺伝子導入マウスの作出に先立ち、TL抗原の支配遺伝子並びにcDNAの単離と解析を行い、以下の点を明らかにしてきた⁶⁻⁹⁾。①TL遺伝子の5'側調節領域並びに細胞質内領域の構造が、他のMHCクラス I 抗原遺伝子と大きく異なっている。②マウスには複数のTL遺伝子が存在し、それらの複数遺伝子が同時に発現

している。例えば、A系マウスには少なくとも Tla^a-1 , Tla^a-2 , Tla^a-3 の3種のTL遺伝子が存在し、正常胸腺並びにTリンパ腫細胞に同時に発現する。③TL⁻マウスより単離したTL遺伝子、 $T3^b$ にも発現不可能の原因と考えられるような欠損などは存在しない。④正常胸腺における発現もリンパ腫における発現も転写レベルで制御されている。これらの知見を基に、TL遺伝子並びにMHCクラスI遺伝子の $H-2K^b$ 遺伝子との間で作成したキメラ遺伝子を導入したマウスを作出し、個体レベルでの機能並びに発現調節機構を解明すること、さらにTL抗原に対する宿主免疫応答の解析を試みた。

I. TL抗原のT細胞分化とTリンパ腫発生への関与

遺伝子導入マウスを用いて遺伝子の機能を検索する方法として、目的の遺伝子を大量に発現させ、もしくは本来とは異なる組織に発現させ、発現の発生・分化に及ぼす影響を検討する方法がある。私達が作出した遺伝子導入マウスのなかで、Aマウス由来の正常胸腺で発現可能なTL遺伝子、 Tla^a-3 を導入した1系統、Tg. Tla^a-3-1 が、大量のTL抗原を胸腺に発現し、胸腺の発育異常、T細胞分化の $\gamma\delta$ 経路への偏向、免疫応答能の低下、さらに $\gamma\delta$ Tリンパ腫を発症することを観察した^{10,11)}。

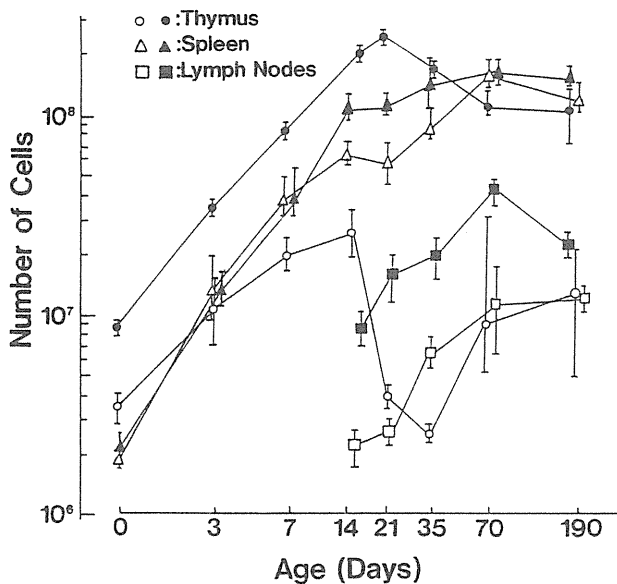


Fig.1 Change in cell number in thymus, spleen and lymph nodes during maturation. Open symbols are the results of transgenic mice and closed symbols are those of C3H/He mice. Thymus and lymph nodes of Tg. Tla^a-3-1 consistently contain fewer cells than those of age-matched C3H/He mice. The low cell number of newborn thymus, sudden disappearance of thymocytes between day 14 and day 21, and gradual increase in the number of thymocytes after day 35 are characteristic of the transgenic mice.

1. 胸腺の発育異常とT細胞分化の $\gamma\delta$ 経路への偏向

Tg. Tla^a-3-1 の胸腺の発育異常は、3段階を経て成立することが明らかとなった(Fig.1)。つまり、①本系マウスの胸腺は生後直後でコントロールに比べて既に小さく、胸腺の胎児期での正常な発育が行われていない。②14日齢までは、コントロールと同じ速度で成育するが、14日から21日の間で典型的な小型の胸腺リンパ球がほとんど消失し、胸腺にはコントロールの数%の細胞しか存在しない。③その後、分裂像に富んだ大型の細胞がゆっくり増殖する。

骨髄から移入した未熟T細胞は、胸腺内で選択を受け成熟する。T細胞の主流である $\alpha\beta$ T細胞レセプター(TCR)を有する細胞は、未熟な $CD4^-CD8^-$ Double Negative(DN)細胞から、 $CD4^+CD8^+$ Double Positive(DP)細胞期を経て、成熟した $CD4^+CD8^-$ もしくは $CD4^-CD8^+$ Single Positive(SP)細胞に分化する。一方、 $\gamma\delta$ TCRを持つ細胞は、DP細胞期を経る必要がなくDN細胞から直接分化する^{12,13)}。本系では、DP細胞群は0日齢より少なく、さらに14日から21日の細胞の消失でほとんど存在しなくなる。代わりにDN細胞群が拡大し、21日以降は大部分を占めるようになる(Fig.2)。DP細胞がほとんど存在しない本系の胸腺で

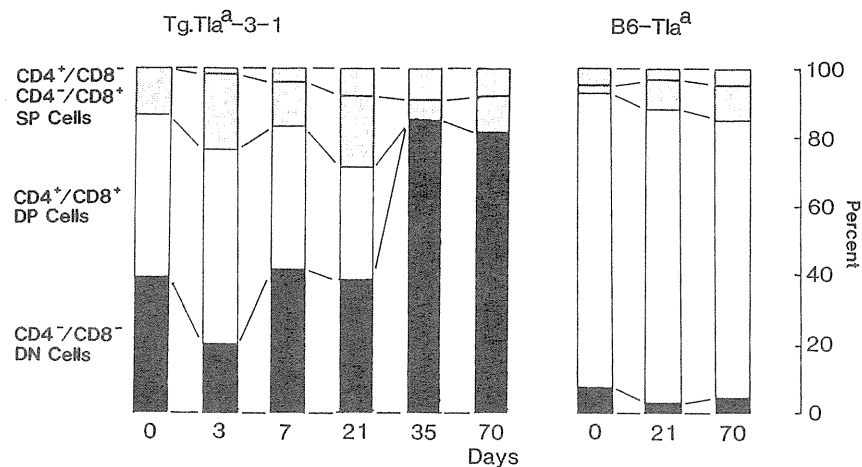


Fig.2 Surface antigenic profile of thymocytes. The thymus of Tg.Tla^a-3-1 at each age shows a distinct and abnormal representation of the three T cell subpopulations belonging to the different maturation stage, in parallel with the growth of the thymus. After day 35, DN cells become the major population, with 90% of thymocytes being DN and the remaining 10% CD8⁺ SP cells, while DP and CD4⁺ cells become undetectable.

は、 $\alpha\beta$ 経路に進めるT細胞はなく、 $\gamma\delta$ 経路のみが残存すると考えられる。実際、 $\gamma\delta$ TCRを発現するDN細胞が21日以降の胸腺では増加する傾向が観察される。このことは、Tg.Tla^a-3-1の胸腺では、 $\alpha\beta$ T細胞分化がDN細胞期で停止する、もしくはDP細胞期の細胞が急激に除去されてしまう可能性を示すものであった。

2. T細胞免疫応答能の低下

胸腺の分化異常は末梢リンパ組織にも影響を及ぼし、リンパ節で $\gamma\delta$ DN細胞が徐々に増加し、70日齢ではT細胞の約30%、190日齢では50%を占めるようになる。70日齢以降のTg.Tla^a-3-1マウスは、T細胞の免疫応答能が低下しており、羊赤血球に対する抗体産生能、アロ抗原に対する反応性、Con A刺激による増殖反応性がすべて低下している。また、単離した本系マウスのT細胞のCon A刺激による増殖反応性も低下していた。これらの結果より、 $\gamma\delta$ T細胞は一般的な免疫応答は担えないこと、また本系の $\alpha\beta$ T細胞の応答能も低下していることが示唆された。

3. $\gamma\delta$ Tリンパ腫の発症

8~15月齢の本系マウスの65%以上にCD4⁻CD8⁻の $\gamma\delta$ Tリンパ腫が発症することが観察された。このTリンパ腫発生には、T細胞分化異常に加えて、多段階の遺伝的変異が関与しており、*C-myc*の胸腺細胞における発現増幅、腫瘍における*pim-1*の発現増大、さらに内在性レトロウイルスの新たな染色体座への挿入も観察されている。さらに、本系マウスの免疫応答能の低下も、腫瘍の発生に関与しているものと思われる。

4. TL抗原の機能

Tg.Tla^a-3-1マウスは、遺伝子の起源であるAマウスの10倍以上のTL抗原を胸腺細胞に発現する。さら

T Cell Differentiation in Normal Thymus

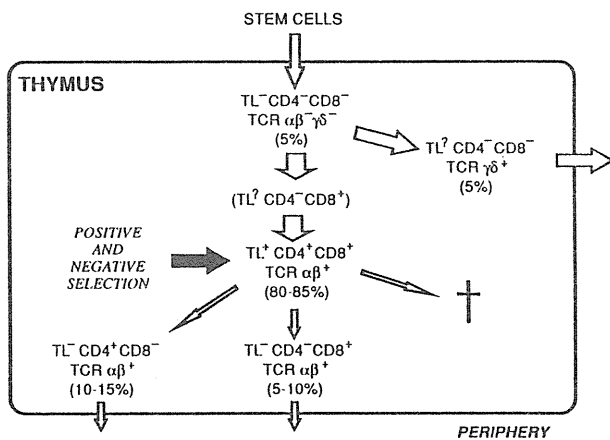


Fig.3 T cell development in normal thymus. TL antigen is expressed in DP cells but not in DN or SP cells in normal TL⁺ thymus.

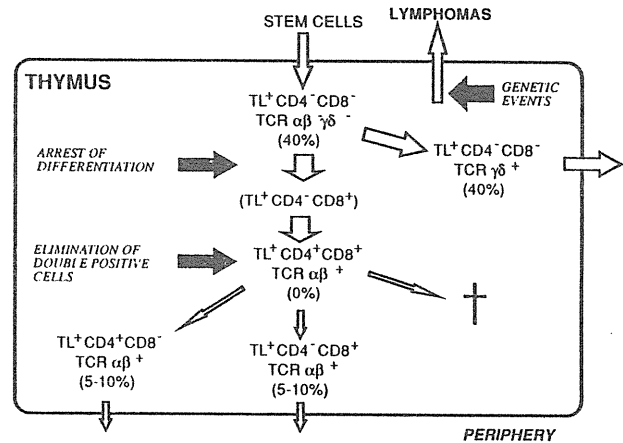
T Cell Differentiation in Tg. Tla^a-3-1 Thymus

Fig.4 Abnormal T cell development in Tg. Tla^a-3-1 thymus. TL antigen is expressed not only DP cells but also in DN and SP cells. This abnormal expression pattern as well as abnormally large quantity of the antigen most likely cause the abnormal differentiation of T cells; the abolishment of TCR αβ lineage of the T cell differentiation, leading to preponderance of cells belonging to the TCR γδ DN lineage.

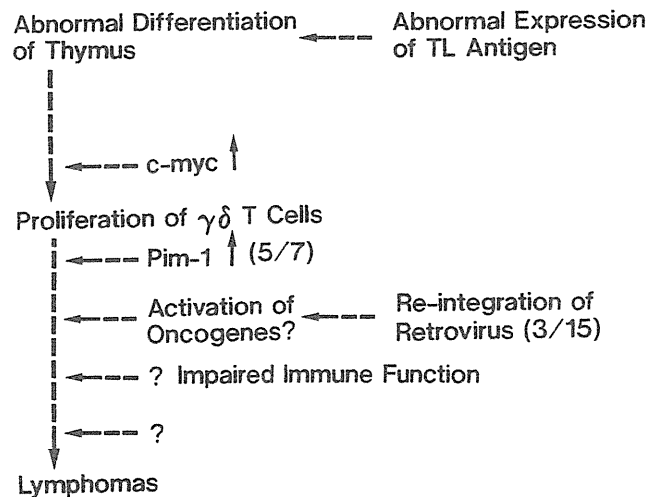


Fig.5 Genetic events involved in the development of γδ T-cell lymphomas in Tg. Tla^a-3-1 mice. The abnormal expression of TL antigen triggers abnormal T cell differentiation, consequently γδ T cells are expanded. These T cells become targets for malignant transformation by multi-step genetic events, such as elevated expression c-myc and pim-1 and activation of oncogenes by the reinsertion of MuLV. Impaired immune function of the transgenic may contribute to the transformation.

に、近交系マウスはTL抗原を胸腺のDP細胞のみに発現するが、本系マウスは、TL抗原を胸腺細胞のみならず末梢T細胞にも発現し、正常より広い組織分布を示す。このTL抗原の量的、質的な発現異常が、 $\alpha\beta$ T細胞の分化停止、もしくは除去を引き起こすと考えられる。前にも述べたように $\alpha\beta$ T細胞は、DP細胞期に選択を受け、個体にとって有害な並びに無用なTCRを持つ細胞は除かれ、有用なTCRを持つ細胞のみがSP細胞に分化する。そして胸腺T細胞のほとんどは除かれるべき細胞で、おびただしい数の細胞が胸腺内で死滅する¹⁴⁾。このことと、本系で観察された異常を併せて考えると、TL抗原は正常胸腺で選択され無用になった細胞の分化停止のシグナル、もしくは除去されるためのシグナルとして機能しているのではないかと推定される(Fig.3, 4)。

さらに、本系におけるTリンパ腫の発生は、T細胞分化異常の結果増殖した $\gamma\delta$ 細胞が、複数の遺伝的変異により癌化したものと考えられ、TL抗原の発現がリンパ腫発生の引き金となっていることを強く示唆するものであった(Fig.5)。

TL抗原の機能を完全に解明するためには、さらなる解析が必要と考えている。正常胸腺でTL抗原を発現していないマウスでは、代わりにどのMHCクラスI抗原が使用されているかを決定すること、またTL抗原に相当するヒトのMHCクラスI抗原を同定することも、今後に残された課題の一つである。

II. 腫瘍抗原としてのTL抗原

マウスTL抗原は、癌化に伴い発現する“Normal Self”蛋白が腫瘍抗原として認識される代表例として考えられてきた。しかし、TL抗原をモデルとしての、がんの免疫療法の基礎的研究は、一見手詰まりの状態であった。即ち、Antigenic Modulationの問題、さらにTL抗原がMHCクラスI抗原に属するにもかかわらず、移植拒絶抗原としての性格を示さず、TL抗原に対する細胞性免疫の誘導も不可能であるとされてきた。加えて、TL⁻マウスの胸腺細胞でもごく微量ではあるがTL抗原を発現するという報告¹⁵⁾、また小腸上皮細胞がTL抗原を発現しているという報告もなされ^{16,17)}、若干の混乱が生じていた¹⁸⁾。今回、腫瘍抗原としてのTL抗原をもう一度整理し、さらに免疫療法のモデル系へと発展させるために、遺伝子導入マウスを用い実験を試みた(Fig.6)¹⁹⁾。

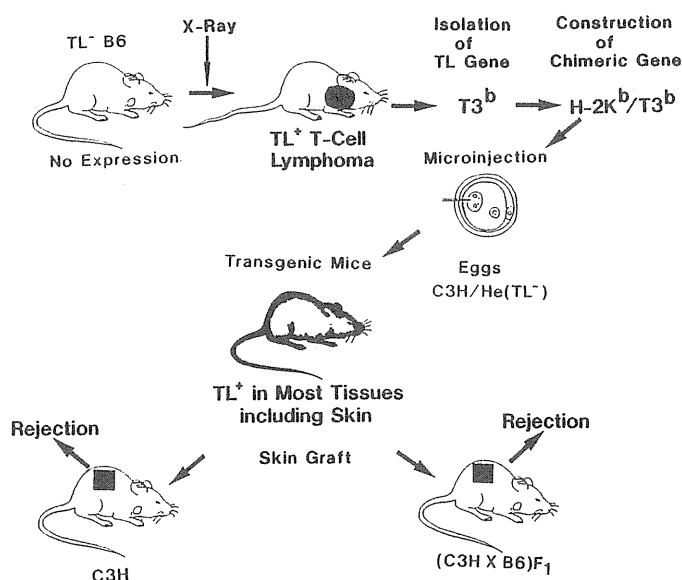


Fig.6 Experimental design to test whether TL antigen can be a transplantation antigen and whether the tumor-specific TL antigen of B6 mouse can be recognized as non-self by B6 mice.

1. 遺伝子導入マウスの作出

まず、腫瘍抗原として発現するB6マウス由来のTL遺伝子、T3^bの抗原決定領域、膜通過領域並びに細胞質内領域(Exon 2-6)をH-2K^bのプロモーター領域並びにリーダー配列(Exon 1)に結合したキメラ遺伝子を作成した。導入宿主にTL⁻のC3Hマウスを用い、このキメラ遺伝子を導入したマウスを2系統作出した。導入マウス、Tg.Con.3-1並びにTg.Con.3-2は、ハプロイドあたり各々23コピー、19コピーと非常に多くの導入遺伝子を持ち、皮膚を含めた種々の組織でTLmRNA及びTL抗原を強く発現する。Tg.Con.3-1はTg.Con.3-2の約2倍のmRNAを発現している。また、皮膚の免疫組織学的検索により、Epidermal Keratinocytes, Hair Follicles並びにDermal CellsがTL抗原を発現していることが観察された。

2. TL抗原の移植拒絶抗原性

遺伝子導入マウスの皮膚を用いて移植実験を行い、両系統ともC3Hマウスにより、1ヶ月以内に、しかも発現量の多いTg.Con.3-1の皮膚がより速やかに拒絶されることが観察された(Fig.7)。さらに、種々のコントロール実験を行い、TL抗原が他のMHCクラスI抗原と同じように、移植拒絶抗原になると結論された。

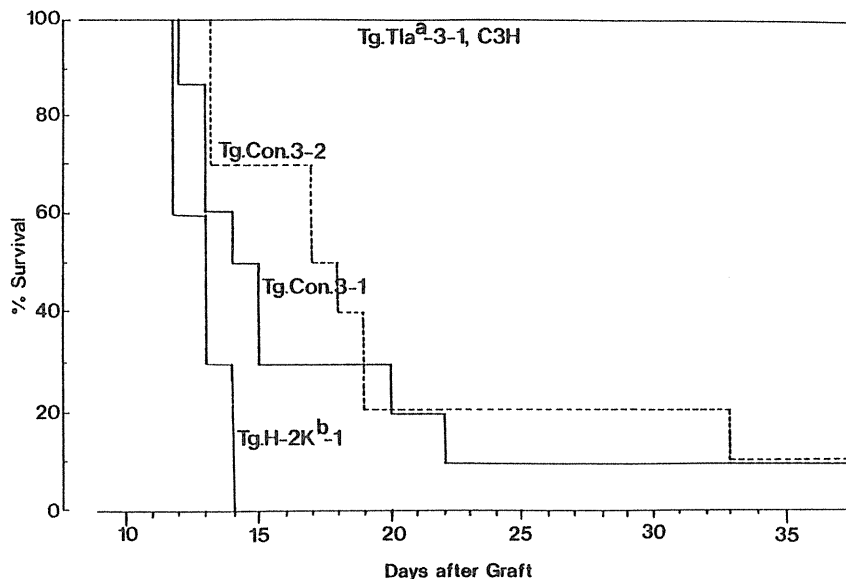


Fig.7 Skin grafts of transgenic mice on C3H/He mice. TL antigen expressed in skin becomes a transplantation antigen.

3. B6マウスによるTL抗原の認識

次に、B6マウスが自己のT3^b-TL抗原を認識できるかを検索するため、導入マウスの皮膚を(B6 X C3H) F₁マウスに移植した。発現量の多いTg.Con.3-1の皮膚は拒絶されたが、発現量の少ないTg.Con.3-2の皮膚は炎症(Crisis)を起こすが、拒絶されるには至らなかった。この差を明らかにするために、両系統の皮膚をF₁マウスに同時に移植した所、Tg.Con.3-1のみならずTg.Con.3-2の皮膚も拒絶されることが観察された(Fig.8)。以上のことは、T3^b-TL抗原はB6マウスによって非自己と認識され拒絶抗原になることを確認するものであった。また、拒絶を誘導するためには、一定量以上の抗原を必要とすることも明らかになった。

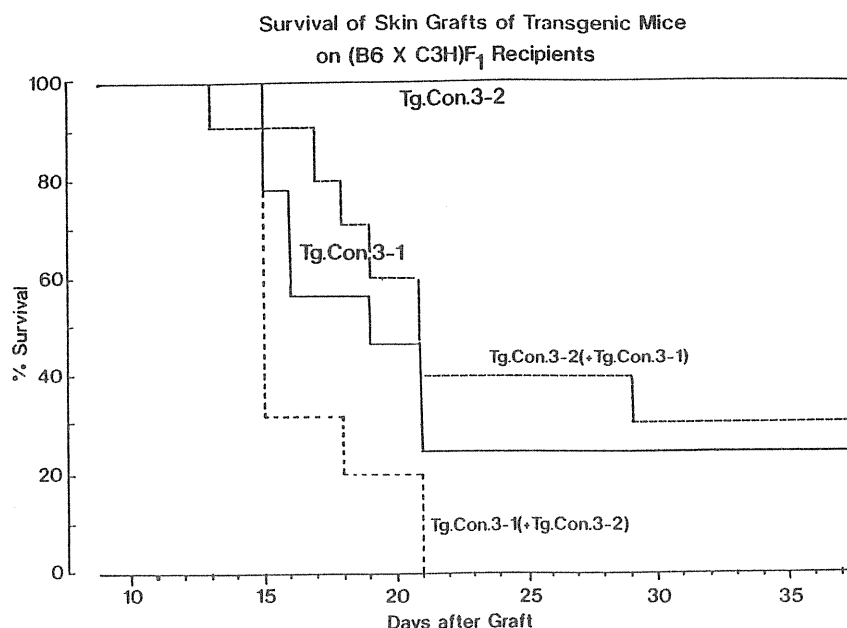


Fig.8 Skin grafts of transgenic mice on (B6 X C3H) F_1 mice. B6 mice recognize their own TL antigen as non-self. Thus, TL antigen expressed in T-cell lymphomas in TL $^-$ mice is indeed a tumor-specific antigen. However the recognition requires the amount of TL antigen above certain level.

4. TL抗原に対するキラーT細胞の誘導

Tg.Con.3-1もしくはTg.Con.3-2の移植皮膚片を拒絶したマウスの脾細胞をエフェクター細胞とし、TL $^+$ 及びTL $^-$ のConA Blast細胞を標的細胞として検索を行い、TL抗原に対するキラーT細胞が誘導されていることを確認した。このキラーT細胞は、CD4 $^-$ CD8 $^+$ CD3 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ TCR $\gamma\delta^-$ の表現型を持つ通常のキラーT細胞であった²⁰⁾。さらに、キラーT細胞の標的分子がTL抗原であることを確認する目的で、各種TL、H-2抗体を用いて阻害実験を行った。使用したすべてのTL抗体は細胞傷害活性を阻害したが、どのH-2抗体も阻害できなかった。この結果は、TL抗原がキラーT細胞の標的分子であることを確認するとともに、TL抗原が認識されるためには、H-2分子による抗原提示を必要としないことを示すものであった。TL抗原の認識にH-2拘束がないことは、C3Hマウス(H-2 k)で誘導されたキラーT細胞がH-2の全く異なるマウス由来のTL $^+$ リンパ腫に対しても活性を示すことから支持された。従って、通常のアロMHC抗原の認識と同じ機構で、TL抗原の認識が行われているものと考えられた。

本研究から、TL $^-$ マウスにおいてTリンパ腫に発現されるTL抗原は腫瘍抗原であるという事実を再確認し、さらに移植拒絶抗原になりうることを、またキラーT細胞も誘導されることが明らかにされた。今後、遺伝子導入マウスの皮膚移植により誘導されたキラーT細胞のIn Vivoでの抗腫瘍効果を検討するとともに、通常では極めてわずしか発現しない腫瘍抗原に対する、最も効果的な免疫方法の確立を試みたいと考えている。このような研究を遂行することにより、癌免疫療法および免疫予防の可能性を追求して行きたいと考えている。

III. おわりに

生体は巧妙にそのresource(遺伝子)を用い、細胞の増殖、発生・分化、免疫応答反応をはじめ各種反応を

行い、生命維持、種の保存を行っている。本稿で紹介したように、発癌とそれに対する宿主の免疫監視機構という極めて複雑な生体現象も、関与する遺伝子の導入マウス並びに相同組換えマウスを用いて再構築実験を行うことが、発癌のより深い理解とそれに対する治療方法の開発の近道なのではないかと思われる。

参考文献

- 1) Old, L. J. and Stockert, E.: Immunogenetics of cell surface antigens of mouse leukemia. *Annu. Rev. Genet.* 11: 127, 1977
- 2) 高橋利忠：実験動物腫瘍の腫瘍特異抗原，東市郎，高橋利忠編：移植免疫と腫瘍免疫，免疫科学7，岩波書店，pp.105-171，1984
- 3) Chen, Y. T., Obata, Y., Stockert, E., et al: Tla-region genes and their products. *Immunol. Res.* 6: 30, 1987
- 4) Muto, M., Kubo, E., Kamisaku, H., et al: Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* 144: 848, 1990
- 5) Boyse, E. A., Old, L. J. and Luell, S.: Antigenic properties of experimental leukemia. II immunological studies *in vivo* with C57BL/6 radiation-induced leukemias. *J. Nat. Cancer. Inst.* 31: 987, 1963
- 6) Obata, Y., Chen, Y. T., Stockert, E. et al: Structural analysis of TL gene of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5475, 1985
- 7) Chen, Y. T., Obata, Y., Stockert, E. et al: Thymus-leukemia (TL) antigens of the mouse. Analysis of TL mRNA and TL cDNA from TL⁺ and TL⁻ strains. *J. Exp. Med.* 162: 1134, 1985
- 8) Fisher, D. A., Hunt, III. S. W. and Hood, L.: Structure of a gene encoding a murine thymus leukemia antigen, and organization of *Tla* genes in the BALB/c mouse. *J. Exp. Med.* 162: 528, 1985
- 9) Obata, Y., Stockert, E., Chen, Y. T., et al: Influence of 5' flanking sequences on TL and H-2 expression in transfected L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3541, 1988
- 10) Hamasima, N., Takahashi, T., Taguchi, O., et al: Expression of TL, H-2, and chimeric H-2/TL genes in transgenic mice: abnormal thymic differentiation and T-cell lymphomas in a TL transgenic strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7995, 1989
- 11) Obata, Y., Taguchi, O., Matsudaira, Y., et al: Abnormal thymic development, impaired immune function and $\gamma\delta$ T cell lymphomas in a TL transgenic mouse strain. *J. Exp. Med.* 174: 351, 1991
- 12) Scollay, R., Wilson, A., D'Amico, A., et al: Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol. Rev.* 104: 81, 1988
- 13) Fowlkes, B. J. and Pardoll, D. M.: Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.* 44: 207, 1989
- 14) Von Boehmer, H., Kishi, H., Borgulya, P., et al: Control of T-cell development by the TCR $\alpha\beta$ for antigen. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54: 111, 1989
- 15) Michaelson, J., Boyse, E. A., Ciccia, L., et al: Biochemical genetics of TL antigens. *Immunogenetics* 24: 103, 1986
- 16) Hershberg, R., Eghtesady, P., Sydora, B., et al: Expression of thymus leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9727, 1990
- 17) Wu, M., Van Kaer, L., Itohara, S., et al: Highly restricted expression of the thymus leukemia antigens on

- intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 174: 213, 1991
- 18) Urban, J. L. and Schreiber, H.: Tumor antigens. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 617, 1992
 - 19) Morita, A., Takahashi, T., Nakayama, E., et al: TL antigen as a target of cytotoxic T cells. submitted.
 - 20) Shiku, H., Kisielow, P., Bean, M. A., et al: Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity *in vitro*. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J. Exp. Med.* 141: 227, 1975

III ヒトにおける放射線発癌

- 1 遺伝子再配列と放射線発癌－BCR/ABLと
RET癌遺伝子 伊藤 敬 他
- 2 甲状腺癌分化過程におけるp53
瀬山 敏雄 他
- 3 SCID－huマウスとそのヒト放射線
生物学への応用－骨髓モデルを用いた
X線感受性の解析－ 京泉 誠之 他

1 遺伝子再配列と放射線発癌 —BCR/ABLとRET癌遺伝子—

伊藤 敬*／瀬山 敏雄*／土肥 雪彦**／
中村 典*／秋山 實利*

Gene Rearrangement and Radiation Carcinogenesis
—BCR/ABL and RET oncogene—

Takashi Ito*, Toshio Seyama*, Kiyohiko Dohi**,
Nori Nakamura*, Mitoshi Akiyama*

*Department of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation
5-2, Hijiya Park, Minami-ku, Hiroshima, 732 Japan

**2nd Dept. of Surgery, Hiroshima University School of Medicine
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 Japan

Abstract

Epidemiological studies have shown increased incidence of leukemia and various solid tumors including thyroid cancer among A-bomb survivors. Moreover, recently developed molecular biological techniques have demonstrated the involvement of multiple-step changes of oncogenes and tumor suppressor genes in carcinogenesis. The development of leukemia and thyroid cancer is characterized by activation of the abl oncogene and ret oncogene, respectively, through their rearrangements. In order to clarify the relationship between these gene aberrations and radiation, the pro-myelogenous leukemia-derived cell line HL60 and the thyroid cancer-derived cell line 8505C, both of which have no rearrangement of the c-abl and ret genes, were irradiated in vitro with 100Gy of X-rays. RNA was then extracted from 10^8 cells of the respective cell lines and examined by the reverse transcription PCR method for rearrangements of abl and ret genes. Five kinds of positive bands were observed in the HL-60 cells irradiated with 100Gy of X-ray; the BCR/ABL sequence was observed in these bands by the direct sequencing method. Similarly, six positive bands were also observed in the 8505C cells irradiated with 100Gy; the bands are now being studied using the direct sequencing method to see whether they represent activated ret type rearrangements. In vitro X-irradiation activation of oncogenes found in radiation induced cancers imply that gene rearrangement by X-rays is involved in the development of malignant tumors. Furthermore, in an experiment to detect radiation effects in A-

*放射線影響研究所 放射線生物学部／**広島大学医学部 第2外科

bomb survivors, RNA was extracted from about 10^7 peripheral blood neutrophils obtained from 12 heavily exposed individuals and six controls, and the presence of cells having the BCR-ABL fusion gene was studied using the reverse transcription PCR method. Although the reverse transcription PCR method has the sensitivity to detect one Ph¹ positive K562 cell in 1×10^6 neutrophils, the Ph¹ gene could not be detected in the A-bomb survivors mentioned above. RNA was also extracted from the cancer tissues of 24 A-bomb exposed thyroid cancer cases and 21 nonexposed thyroid cancer cases, and rearrangement of ret oncogenes was studied by the reverse transcription PCR method. Activated ret oncogenes were observed in three of the 24 A-bomb exposed thyroid cancer cases, but none were observed in the 21 nonexposed cases. With regard to gene rearrangements A-bomb late effects could not be detected in the peripheral blood of A-bomb survivors. One reason is the low gene expression in the peripheral blood. New detection methods should therefore be considered in the future. Preliminary experiments have shown the presence of more activated ret oncogenes in A-bomb exposed thyroid cancer cases, suggesting the involvement of radiation-induced gene rearrangement in the development of thyroid cancer among A-bomb survivors.

要 旨

原爆被爆者で、発生頻度が上昇している白血病や甲状腺癌で特徴的に検出される遺伝子変化としてBCR/ABLやRET癌遺伝子が報告されている。これらの遺伝子が、放射線と関連しているか否かを明らかにするためin vitroで放射線による遺伝子再配列の誘発実験を行った。まず、これらの遺伝子再配列を持たない前骨髄性白血病由来の細胞株HL60及び、甲状腺癌由来の細胞株8505Cに、100Gy X線照射した。その後各々 10^8 個の細胞よりRNAを抽出し、逆転写PCR法によりABL及びRETの再配列が起こっているか否か検討した。X線100Gy照射したHL60細胞においては5種類の陽性バンドが得られ、直接塩基配列決定法によりBCR/ABL配列を含んでいることを確認した。同様にX線100Gy照射した8505C細胞においても2種類6個の陽性バンドが得られ、直接塩基配列決定法によりH4及びRET遺伝子配列を含んでいることを確認した。

放射線発癌と深くかかわりあいのある悪性腫瘍に特徴的な遺伝子が、X線照射で誘発されるという事実は、これらの悪性腫瘍発生には放射線による遺伝子再配列が関与していることを強く示唆している。

はじめに

原爆被爆者における疫学調査により白血病の他、甲状腺癌をはじめとする種々の固形腫瘍の発生頻度が被爆者では高いことが知られている。一方、近年の分子生物学的手法により、発癌には癌遺伝子、癌抑制遺伝子の多段階の遺伝子変化が関わっていることがわかってきているが、これらのうち白血病や甲状腺癌ではそれぞれABL遺伝子、RET遺伝子の再配列による活性化が特徴的にみられる^{1,2)}。ABL遺伝子が関与しているフィラデルフィア染色体は、慢性骨髄性白血病の90%以上に認められる染色体異常としてよく知られている³⁾。分子生物学的には、22q11に局在するBCR遺伝子と9q34に局在するABL遺伝子との間で起こった相互転座であることが解明されている¹⁾。又、RET遺伝子の活性化は、甲状腺に特徴的に見いだされ、分子生物学的には、10番染色体の長腕に存在するRET遺伝子とH4遺伝子のインバージョンであることが判っている⁴⁾。

放射線により染色体異常が誘発されることはよく知られているが^{5,6)}、特定の遺伝子、即ち、BCR-ABL遺伝子や活性化RET遺伝子が誘発されるかどうかは確認されていない。これらの遺伝子変化と放射線との関連を明らかにするため、in vitroでABL及びRETの再配列を持たない骨髄性白血病由来の細胞株HL60、甲状腺癌由来の細胞株8505Cを用い、100Gy X線照射し、これらの遺伝子の再配列が誘発できるか否か検討した。

実験材料及び方法

フィラデルフィア染色体陰性細胞として急性前骨髄性白血病より樹立されたHL60細胞を、RET遺伝子の再配列を持たない細胞として、甲状腺未分化癌より樹立された8505Cを用いた。これらの細胞株は、Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)より供与された。

対数増殖期HL-60細胞及び8505C細胞を用い、線量率2.8Gy/分、室温にて100Gy照射した。照射後、空気95% + CO₂ 5%、37℃中で48時間培養した。

HL-60細胞及び8505C細胞よりチオシアン酸グアニジン法にてRNA抽出し、その一部を用い、各々Fig.1の如くBCR-ABL融合遺伝子に設定したプライマーと、Fig.2の如く活性化RETに設定したプライマーにより、以下の様に逆転写PCRを行った。

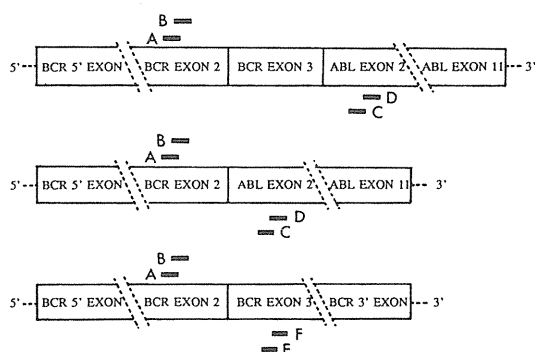


Fig.1 Two forms of chimeric BCR-ABL mRNA structures specific to CML and the location of the oligonucleotide primers. The arrowheads indicate the junction between the BCR and ABL genes.

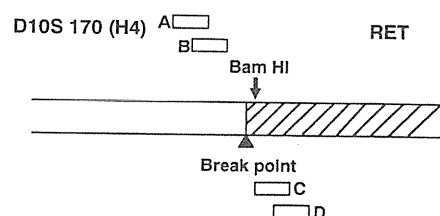


Fig.2 Activated form of RET oncogene rearrangement and the location of the oligonucleotide primers. The arrowheads indicate the junction between the H4 and RET genes.

まず3'プライマーDとMMLV逆転写酵素を用いcDNAを合成した後、5'プライマーAとTaqポリメラーゼを加え、PCR反応を35回行った。さらにその反応物を100倍希釈したば、その一部にプライマーB、C及びTaqポリメラーゼを加え、PCR反応をさらに35回行った。反応産物は、8%ポリアクリルアミドゲルにて泳動し確認した。陽性産物については、塩基配列をSangerのダイデオキシシン法にて検討した⁷⁾。即ち、2回目のPCR産物を100倍希釈し、その一部を用いて、プライマーB及びCを非対称とし、(1:50又は、50:1)、非対称PCRを行った。次に反応産物から、余分なプライマーと、未反応のヌクレオチドを除去した後、[γ -³²P] ATPでラベルしたプライマーを用いて常法に従い、塩基配列を決定した。

結 果

我々が用いた逆転写PCR法は10⁵–10⁶個の遺伝子再配列陰性細胞中、1個の陽性細胞を検出できる。この様に高感度な検出法を用い、フィラデルフィア染色体陰性の細胞株であるHL-60細胞10⁶個に100Gy照射

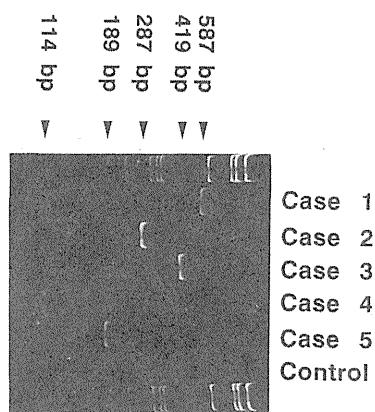


Fig.3 Inducibility of BCR-ABL fused genes. Total RNA was extracted from HL60 cells cultured for 48 hrs after X-irradiation. Five positive bands were identified among a total of 1×10^8 irradiated cells. Re-electrophoresis of the five bands together in the same gel demonstrated that these five positive bands all differed in size.

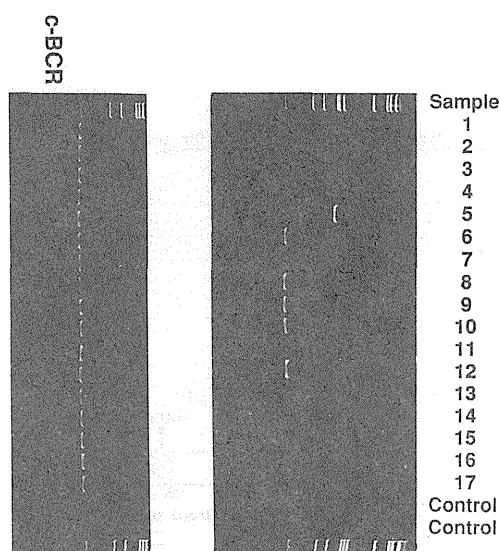


Fig.4 Inducibility of RET oncogene rearrangement total, DNA was extracted from 8505C cells cultured for 48 hrs after X-irradiation. 6 positive bands were identified among a total of 1×10^8 irradiated cells. Amplification of c-BCR is performed simultaneously to check the recovery of mRNA.

後、BCR-ABL融合遺伝子が誘発できるか否か検討したところ、41反応中5つで陽性所見を得た。Fig.3で示した如く、これらを同一ゲルで泳動し、比較すると、5つの陽性バンドは各々サイズが異なっていた。直接塩基配列決定法により、各々のバンドはBCR及びABL配列を含むことを確かめた。

同様にRETの再配列陰性の細胞株である8505C細胞 10^8 個を用い、100Gy照射後、RET再配列が誘発できるか否か検討したところ、17反応中6つの陽性バンドを得た(Fig.4)直接塩基配列決定法により、各々のバンドは、H4及びRET配列を含むことを確かめた。

考 察

CML症例の90%以上に検出されるBCR/ABL融合遺伝子や、甲状腺癌で特異的に再配列が認められる活性化RET遺伝子は、白血病や甲状腺癌の発症に有用な役割を果たしていると考えられている¹⁻³⁾。しかも、白血病や甲状腺癌の発症が原爆被爆者で上昇していることを考え合わせると、この様な遺伝子再配列が放射線により引き起こされることが推察されるが、これまでのところ証明されていない。今回逆転写PCR法を用いることにより、この様な白血病や甲状腺癌に特異的な遺伝子再配列が、放射線により誘発されることを明らかにした。これは、放射線誘発白血病の分子生物学的メカニズムの一端を証明するものである。さらに、実験的に誘発されたBCR/ABL融合遺伝子やRET遺伝子の再配列は、慢性骨髄性白血病や甲状腺

癌で、典型的に検出できる再配列に加え、他の非典型的な遺伝子再配列も含んでいた。

これらの所見は、実際に放射線に曝露された時には種々の遺伝子再配列を生じているが、特殊な型の遺伝子配列のみが、細胞増殖に有利となり、白血病や甲状腺癌発症に関与すると考えられる。

おわりに

放射線被爆と深くかかわり合いのある悪性腫瘍に特徴的な癌遺伝子が、実験的に放射線で誘発されることを示した。今後、被爆者に於ける放射線影響の試みとして、被爆者末梢血に於けるBCR-ABL遺伝子再配列や、被爆者甲状腺癌に於けるRET遺伝子の活性化を検索し、放射線発癌に於ける遺伝子再配列の関与をさらに明らかにしていきたい。

参考文献

- 1) de Klein, A., van Kessel, A. G., Grasveld, G. et al.: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, **300**, 765-767 (1982).
- 2) Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., et al.: PTC is a novel rearranged form of the ret Proto-Oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, **60**, 557-563 (1990)
- 3) Nowell, P. C., Hungerford, D. A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, **132**, 1497 (1960)
- 4) Pierotti, M. A., Santoro, M., Jenkins, R. B. et al.: Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogene sequence RET/PTC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1616-1620 (1992)
- 5) Holmberg, M., Jonasson J.: Preferential location of X-ray induced chromosome breakage in the R-rands of human chromosomes. *Hereditas*, **74**, 57-68 (1973)
- 6) Buckton, K. E.: Identification with G and R banding of the position of breakage points induced in human chromosomes by in vitro X-ray irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**, 475-488 (1976)
- 7) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977)

2 甲状腺癌分化過程におけるp53

瀬山敏雄*／伊藤 敬*／林 雄三**／
土肥雪彦***／秋山實利*

p53 in Differentiation of Thyroid Cancer

Toshio Seyama*, Takashi Ito*, Yuzo Hayashi**, Kiyohiko Dohi***, Mitoshi Akiyama*

*Department of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation
5-2, Hijiya Park, Minami-ku, Hiroshima, 732 Japan

**Department of Pathology, Hiroshima City Asa Hospital

***Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 Japan

Abstract

It has been considered histopathologically that undifferentiated thyroid carcinomas arise from well differentiated carcinomas, but the details of the mechanism are unknown. It is suspected that some genetic changes might be associated with the development.

It has become clear that multi-step genetic changes are involved in the development and progression of cancer and that these steps include genetic changes during which a recessive nature is acquired. p53 is a tumor suppressor gene with such a recessive nature and is inactivated in many carcinomas.

[Subjects and method] (1) DNA was extracted from 10 primary papillary adenocarcinomas and eight undifferentiated carcinomas of the thyroid, using three 5 μ m sliced paraffin segments, and then amplified by PCR. The products were analyzed for mutations in the p53 gene exons 5 to 8 by the direct sequencing method and for allelic deletion by the RFLP method. (2) In five human thyroid carcinomas, in which differentiated and undifferentiated tissues coexisted, DNA was extracted from each tissue and analyzed.

[Results] (1) Mutations in the p53 gene exons 5 to 8 and p53 gene deletions were not detected in the 10 papillary adenocarcinomas, while in undifferentiated cancer, mutations were detected in seven of eight cases and allelic deletions was detected in three of the five cases examined. (2) In each of the five cases which had both differentiated and undifferentiated tissues in the same tumor, p53 gene mutations were not detected in the differenti-

*放射線影響研究所・放射線生物学部／**広島市立安佐市民病院・病理部／***広島大学医学部・第2外科

ed tissues while mutations and gene deletions were detected in the undifferentiated sections.

[Discussion] The p53 gene was analyzed using paraffin-embedded tissues by the combined use of the direct sequencing and PCR methods and by the RFLP method. It was found that the progression of human thyroid carcinoma is closely related to the p53 genetic changes. Furthermore, the analysis of differentiated and undifferentiated tissues in the same tumor showed that human undifferentiated thyroid carcinomas develop from differentiated carcinomas.

要 旨

甲状腺癌進展に癌抑制遺伝子p53が関与するか否か明らかにするため甲状腺乳頭癌10症例、濾胞癌4症例、未分化癌8症例についてp53の遺伝子変化を検索した。乳頭癌と濾胞癌では、p53遺伝子エクソン5-8の点突然変異と多型性の消失を認めなかった。一方、未分化癌では8症例中7症例にp53遺伝子エクソン5-8に点突然変異を認め、情報の得られた5症例中3症例で多型性の消失を認めた。さらに同一腫瘍内における分化度の異なった部より別々にDNAを抽出し検索したところ、未分化な組織でのみp53の点突然変異を認めた。これらの結果は、甲状腺癌の進展における脱分化にp53が重要な役割を果たしていることを強く示唆する。

はじめに

正常な細胞から悪性腫瘍細胞が発生するには、長期間にわたる多段階の遺伝子変化を要し、その遺伝子変化の蓄積は癌の種類によって異なる¹⁾。この点で最もよく知られている悪性腫瘍は良性腫瘍から癌に進行する大腸癌であり、腫瘍発生の研究においてユニークなモデルを提供している。この発癌過程における遺伝子変化には、初期における癌遺伝子(Ki-ras)の活性化や、5q(FAP遺伝子)、17p13(p53遺伝子)、18p21(DCC遺伝子)などの特定染色体遺伝子座における癌抑制遺伝子の欠失または突然変異が含まれる²⁻⁶⁾。多段階発癌のモデルという観点から甲状腺癌も、ユニークなモデルとなり得る。なぜならば甲状腺未分化癌は、甲状腺乳頭癌や濾胞癌などの分化癌から発生すると考えられているからである⁷⁻⁹⁾。

甲状腺癌進展の初期に起こっている変化として、ras癌遺伝子の点突然変異が⁸⁾、甲状腺腫瘍、分化癌、未分化癌などで、検出されている^{10,11)}。又、甲状腺乳頭癌で活性化をうけているret癌遺伝子も未分化癌への進展を考える上では、初期の変化と言えるであろう^{12,13)}。

p53遺伝子の産物は、腫瘍ウイルスで形質転換した細胞で最初に発見された53kDの核に局在する蛋白質である¹⁴⁻¹⁶⁾。当初トランスフェクションの実験から、p53遺伝子は優性性格を持った癌遺伝子と報告された¹⁷⁻¹⁹⁾。しかし現在では、細胞形質転換能力を持つp53遺伝子はすべて突然変異体であり、野生型のp53は細胞の形質転換を抑制できることが判明している²⁰⁻²³⁾。

さらに野生型のp53を、p53非産生性の細胞に導入してやると、分化を誘導できることも判明してきている²⁴⁾。この様に細胞増殖と分化に関連した癌抑制遺伝子p53は、分化癌から未分化癌への悪性転化に関与していることが疑われる。今回我々は、甲状腺癌に於けるp53の変化を検索した。

実験材料及び方法

10症例の乳頭癌、4症例の濾胞癌、7症例の未分化癌と未分化癌より樹立された細胞株2株を用いて検

索した。これらの症例のうち、1症例の濾胞癌には非常に未分化な部が含まれ、又、4症例の未分化癌には、分化癌が共存していた。

ホルマリン固定・パラフィン包埋された標本より、5 μ mの厚さで、5枚の連続切片を薄切した。1枚目と5枚目はH. E. 染色し、残りの3枚をDNA抽出用とした。まず、顕微鏡下に組織像を確認し、正常部、分化癌、未分化癌に印をつけ、3枚の切片より各々の組織をメスを用いて、チューブに集めた。キシレンとエタノールで脱パラフィンした後、プロティネースKを用い、48時間消化した。フェノール・クロロフォルムにて抽出した後、エタノール沈澱した。細胞株のDNAも同様にプロティネースKを用い、消化し、フェノール・クロロフォルムにて抽出した。

抽出したDNAを用いp53遺伝子の塩基配列を決定した。まず各々のエクソンに設定したプライマーを用いエクソン5から8をPCR増幅した。その増幅産物を低融点アガロースで精製し、その一部を用い非対称PCRを行った。この産物を鋳型としてサンガーらの方法により塩基配列を決定した。

制限酵素断片長多型を用い、遺伝子欠失の有無を検索した。p53遺伝子内のDNA多型性部位、エクソン4のBst UI, イントロン6のMs pI, イントロン7のApaI部位を、PCRにより増幅し、各々の制限酵素で切断し、8%ポリアクリルアミドゲルにて検出した。

結 果

p53遺伝子の点突然変異及び遺伝子欠失は乳頭癌、濾胞癌は認められなかった。一方未分化癌では8症例

Table 1 Mutations of the *p53* Gene in Thyroid Carcinomas.

Histological type ^a	Mutations in <i>p53</i> gene ^b (positive/tested)	Allelic loss ^c (positive/informative)
Papillary adenocarcinoma (PAC)	0/10	0/4
Follicular adenocarcinoma (FAC)	0/4	0/1
Undifferentiated carcinoma	7/8	3/5

^aAfter microscopic identification, DNAs were extracted selectively from tumor tissues.

^bMutations of the *p53* gene, exons 5-8, determined by PCR-direct sequencing. All sequences were confirmed from forward and backward strands more than two times in order to exclude errors. All the positive cases showed base substitution mutations. In all cases, there was no mutation in the normal tissue. In the case of co-existing tumors, results from the main focus indicating the final diagnostic features are shown.

^cAllelic loss in the *p53* gene determined by PCR-RFLP at the BstUI site in exon 4, at the MspI site in intron 6, and at the ApaI site in intron 7 using tumor and normal tissues. Information was obtained from 8 cases using the BstUI site, from 1 case using the MspI site, and from 7 cases using the ApaI site. Using these three RFLP sites, 4 out of 10 cases of PAC, 1 out of 4 cases of FAC, and 5 out of 8 cases of undifferentiated carcinoma were informative.

Table 2 Mutations of the *p53* Gene in Individual Foci Coexisting in a Thyroid Carcinoma.

Case	Histology ^a	Codon	Nucleotide ^c	Amino acid	Allelic loss ^c
1	Normal	248	CGG	Arg	N.I.
	Follicular	248	CGG	Arg	N.I.
	Undifferentiated	248	CGG/CAG	Gln	N.I.
2	Normal	248	CGG	Arg	-
	Papillary	248	CGG	Arg	+
	Undifferentiated	248	CGG/GGG	Arg/Gly	+
3	Normal ^b	213	N.T.	N.T.	N.T.
	Papillary	213	CGA	Arg	-
	Undifferentiated	213	CGA/TGA	Arg/stop	-
4	Normal	248	CGG	Arg	-
	Papillary	248	CGG	Arg	-
	Undifferentiated	248	CAG	Gln	+
5	Normal	178	CAC	His	-
	Follicular	178	CAC	His	-
	Undifferentiated	178	GAC	Asp	+

^aDNA was extracted from each histological part separately and analyzed for *p53* mutations and allelic loss.

^bNormal tissue was not available for this case.

^cNucleotide substitution and allelic loss were determined as described in Table 1.

N.T.: not tested; N.I.: not informative.

中 7 症例に於てp53遺伝子の点突然変異を認め、情報の得られた 5 症例中 3 症例に於て遺伝子欠失を認めた。同一腫瘍内に分化度の違う組織が混在する症例に関しては、主病変の結果で示してある。(表 1)

同一腫瘍内で分化度の異なった組織像を呈する症例の詳細な結果を表 2 に示した。

症例 1 は最終的に濾胞癌と診断された症例で、その腫瘍内に非常に分化度の低い組織像を呈する部位を認めた。各々の部位より抽出したDNAを解析すると正常の甲状腺上皮及び高分化の濾胞癌よりは、点突然変異を認めなかったが、コドン248の第 2 塩基にG : CからA : Tへのトランジションを認めた。この症例では、正常部で 3 ヶ所の多型性部位が、ホモ接合性を示したため遺伝子欠失の情報は得られなかった。

症例 2 - 5 は最終的に未分化癌と診断された症例で、その腫瘍内に乳頭構造または濾胞構造の組織像を呈する分化した部位を認めた。これら 4 症例の未分化な組織ではすべて点突然変異を認めたが、分化した組織では認められなかった。症例 2 ではコドン248の第 1 塩基にC : GからG : Cへのトランスバージョン、症例 3 ではコドン213の第 1 塩基にC : GからT : Aへのトランジション、症例 4 ではコドン248の第 2 塩基にC : GからA : Tへのトランジション、症例 5 ではコドン178では第 1 塩基にC : GからG : Cへのトランスバージョンを認めた。

p53の遺伝子欠失は症例 2 では分化した組織と未分化な組織の両部位で検出された。症例 3 では情報は得られなかったが、症例 4, 5 では、未分化な組織でのみ遺伝子欠失を検出できた。上記解析の具体例を図 1 に示した。

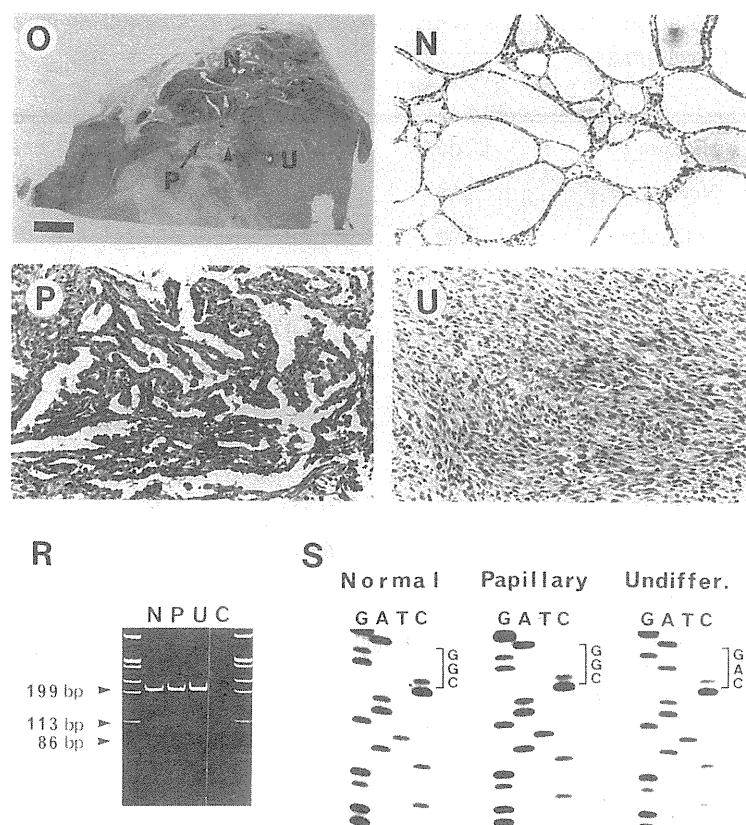


Fig.1 Histological findings and p53 gene analysis of undifferentiated carcinoma coexisting with papillary adenocarcinoma. Fig. 10 is an overview of the section, which contains normal thyroid tissue (N), papillary adenocarcinoma (P), and undifferentiated carcinoma (U). PCR-RFLP analysis of the p53 gene codon 72 (R), and PCR-direct sequencing (S) using extracted DNA from each part showed allelic deletion of the p53 gene and a G→A transition at the second base of codon 248 exclusively at the foci of the undifferentiated carcinoma. The arrowhead shows the PAC-undifferentiated carcinoma continuity. Scale bar; 0.5cm. Original magnification: $\times 100$ (N. P. U.).

考 察

今回の検索では、分化癌及び未分化癌に加え、同一患者に未分化癌と分化癌が共存する症例を用いて解析することによりp53の関与をより明瞭に示すことができた。図1に具体例を示した様に、同一患者に存在する正常甲状腺及び乳頭癌にはp53の点突然変異は認めていないが、未分化癌ではコドン248の第2塩基にG：GからA：Tへのトランジションを認め、さらにコドン72 BSTU1 siteでは未分化癌でのみヘテロ接合性の消失を認めている。これらの所見は、甲状腺腫瘍の進行における脱分化にp53突然変異がかかわりを持つことを強く示している。更に、p53突然変異のない分化型の癌の増殖が極めて遅いこと、またp53突然変異がある未分化癌の増殖が急速なことは、分化癌の増殖中に起きたp53突然変異が、増殖と分化の調節の逸脱を引き起こし未分化癌を発生させた可能性を示している。表2に示した様に、他の同一症例の解析も甲状腺癌の悪性転化にp53遺伝子の突然変異が関与していることを強く示唆している。

今後、このような詳細な検索を行うことにより、腫瘍の進展における遺伝子変化が更に明らかとなって行

くであろう。

おわりに

これらの結果は非被爆者に起きた甲状腺癌の研究によるものであるが、現在我々は、放射線誘発悪性腫瘍に認められる遺伝的変化の究明を試みている。電離放射線は塩基置換型突然変異よりも欠失型突然変異を引き起こしやすいという事実があるので、電離放射線が癌抑制遺伝子を標的とし癌を引き起こすと考え、p53遺伝子を初めとして他の癌抑制遺伝子の欠失を検出する技法を開発している。

参考文献

- 1) Pitot, H. C., Goldsworthy, T., Moran, S.: The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J. S. S. C. B.* **17**, 133-146 (1981)
- 2) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., et al.: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancer. *Nature*, **327**, 293-297 (1987)
- 3) Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**, 217-221 (1989)
- 4) Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56 (1990)
- 5) Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, **253**, 661-669 (1991)
- 6) Sidransky, D., Mikkelsen, T., Schwechheimer, K., et al.: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*, **355**, 846-847 (1992)
- 7) Rosai, J., Carcangiu, M. L.: Pathology of thyroid tumors: some recent and old questions. *Human Path.*, **15**, 1008-1012 (1984)
- 8) Carcangiu, M. L., Steeper, T., Zampi, G., et al.: Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *A. J. C. P.*, **83**, 135-158 (1985)
- 9) Wenkatesh, Y. S. S., Ordonez, N. G., Schultz, P. N.: Anaplastic carcinoma of the thyroid, A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* **66**, 321-330 (1990)
- 10) Lemoine, N. R., Mayall, E. S., Wyllie, F. S., et al.: High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*, **4**, 159-164 (1989)
- 11) Wright, P. A., Lemoine, N. R., Mayall, E. S., et al.: Papillary and follicular thyroid carcinomas show a different pattern of ras oncogene mutation. *Br. J. Cancer*, **60**, 576-577 (1989)
- 12) Bongarzone, I., Pierotti, M. A., Monzini, N., et al.: High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, **4**, 1457-1462 (1989)
- 13) Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., et al.: PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, **60**, 557-563 (1990)
- 14) Ito, T., Seyama, T., Mizuno, T., et al.: Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res.*, **52**, 1369-1371 (1992)
- 15) Lane, D. P., Crawford, L. V., et al.: T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cells.

Nature, **278**, 261-263 (1979)

- 16) Linzer, D. I. H., Levine, A. J.: Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52 (1979)
- 17) Jenkins, J. R., Rudge, K., Currie, G. A.: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, **312**, 651-651 (1984)
- 18) Eliyahu, D., Raz. A., Gruss, P., et al.: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, **312**, 646-649 (1984)
- 19) Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., et al.: Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, **312**, 649-651 (1984)
- 20) Hinds, P., Finlay, C., Levine, A. J.: Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* **63**, 739-746 (1989)
- 21) Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., et al.: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, **249**, 912-915 (1990)
- 22) Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., et al.: Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8763-8767 (1989)
- 23) Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, **57**, 1083-1093 (1989)
- 24) Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A., et al.: Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8982-8986 (1991)
- 25) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., et al.: p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53 (1991)
- 26) Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A.: the p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456 (1991)

3 SCID-huマウスとそのヒト放射線生物学への応用
—骨髄モデルを用いたX線感受性の解析—

京泉誠之**／秋山實利*／J. M. McCune**／並川玲子**

The SCID-hu mouse and its application to human radiation biology
—Analysis of sensitivity to X-irradiation using a bone marrow model—

Seishi Kyoizumi**, Mitoshi Akiyama*, J. M. McCune**, Reiko Namikawa**

*Department. Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation
5-2, Hijiyama Park, Minami-Ku Hiroshima, 732 Japan

**SyStemix Inc. 3400
West Bayshore Rd. Palo Alto, CA 94303, USA

Abstract

The radiobiological study of humans has been hampered by a lack of suitable in vivo experimental models. Of course, acute and chronic radiation effects in humans have been documented in the studies of atomic bomb (A-bomb) survivors and patients irradiated either by therapeutic intent or by accident. However, the information gained from these studies has been limited by the difficulties in estimating precise radiation doses and in obtaining biological samples for directly analyzing the processes of radiation-induced pathogenesis. With these issues in mind, we propose that the severe combined immunodeficient mouse-human chimera can be used as an in vivo experimental model for human radiation biology. We have developed techniques by which normal human bone marrow can be implanted into immunodeficient C.B-17 *scid/scid* (SCID) mice (S. Kyoizumi et al, *Blood* 79, 1704, 1992). We have report that this in vivo model can be used for the analysis of radiation damage to human bone marrow. After whole-body irradiation of the engrafted animals, human progenitor cells within the human marrow were destroyed in a dose-dependent manner ($D_0=0.7-1.0\text{Gy}$, $n=1.0$). Acute hematotoxicity was reduced when the radioprotective agent (WR-2721) was administered prior to irradiation. After low dose irradiation, the recovery of human progenitor activity was accelerated by treatment with human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). This small animal model may prove amenable for the risk

*放射線影響研究所放射線生物学部／**SyStemix Inc.

analysis of human radiation exposure as well as for the development of new modalities for the prevention and treatment of radiotoxic damage to the human hematopoietic system.

1 はじめに

人体組織に対する放射線の影響を解析するためにヒトを実験的に放射線照射することはできない。従って、放射線被曝事故や放射線療法によって得られた限られたデータにより、急性あるいは晩発影響が推定されている。しかし、正確な被曝線量を求めることが難しい場合や十分な生物材料を入手できないことも多く、その解析には大きな障害がある。もし、ヒトの正常組織を動物に移植できれば、放射線の影響を直接観察できるだろう。この点から、重症複合免疫不全(SCID)マウスは良い材料である。SCIDマウスは機能的なT, Bリンパ球を持たず、異種組織の移植効率はnu/nuマウスより良好であるため、様々のヒト正常あるいは癌組織・細胞の移植が行われている(SCID-huマウス)(総説として文献1参照)。本稿ではヒト胎児骨髄組織のSCIDマウスへの移植と、その造血機能に対するX線の影響を解析した研究例を紹介し、SCID-huマウスのヒト放射線生物学への応用について議論したい。また、ヒト放射線発癌研究への寄与の可能性についても考えてみたい。

2 SCID-huマウスとその骨髄モデル

ヒト組織細胞のSCIDマウスへの移植は、最初McCuneらが胎児リンパ節と胸腺を用い²⁾、Moiserらが末

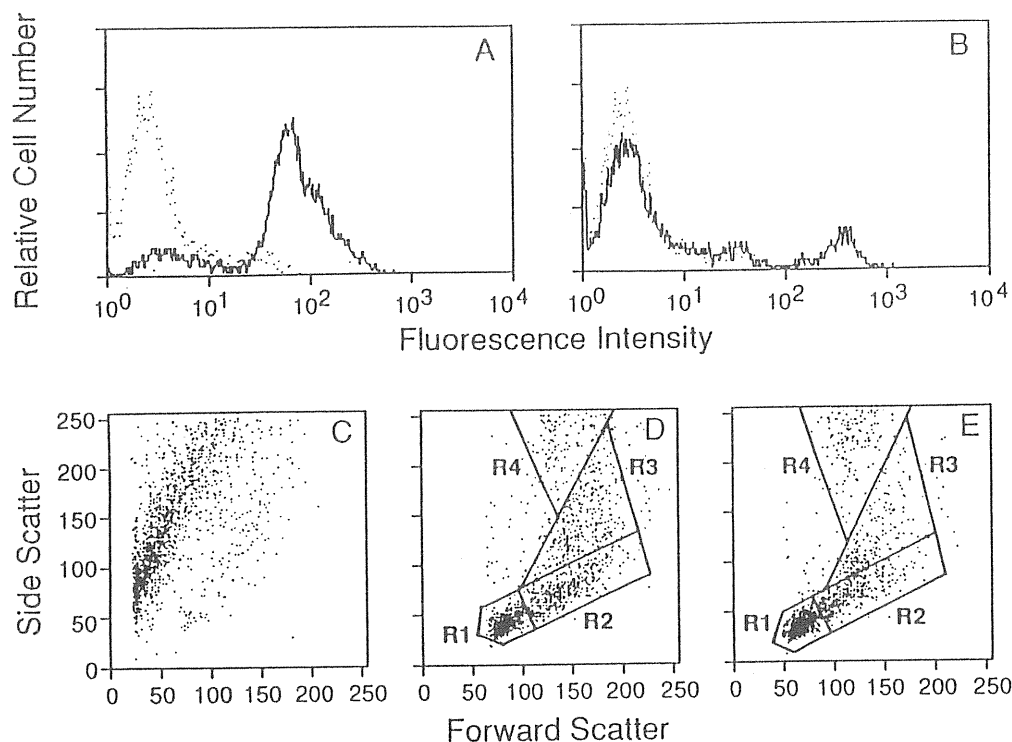


図1 SCID-huマウスより回収したヒト骨髄細胞のFACS解析(文献13より転載)

<上段>移植後8週目の骨組織断片を回収し、その骨髄細胞を(A)MEM43(CD59, pan-human antigen)抗体および(B)Ly5.1(pan-mouse WBC antigen)抗体により染色した。

<下段>移植後2週目(C), 8週目(D)および移植前(E)のヒト胎児骨髄のscatter profile RI: lymphoid, R2: blastoid, R3: immature myeloid, R4: mature myeloid

梢血リンパ球を用いて報告した³⁾。これらの移植系を使って、HIV^{4,5)}、自己免疫^{6,7)}、ヒト型モノクローナル抗体産生⁸⁾などの実験モデルが作成されてきた。ヒト骨髓のマウスへの移植については、Dickらのグループがbg/nu/xidのtriple mutantマウスを用いて試み⁹⁾、Reisnerらのグループが致死量放射線照射したBALB/cマウスを使って成功したと報じたが¹⁰⁾、その後これらの実験系を用いた続報はなく、再現性に問題があるようである。最近、Dickらは、放射線照射したSCIDマウスにヒト骨髓を静注すると同時に、ヒトエリスロポエチン(EPO)、Stem cell factor及びIL-3とGM-CSFの融合タンパク質を大量投与することにより、ヒトの造血機能を維持できると報告した¹¹⁾。しかし、このモデルは大量の造血因子を投与し続ける必要があり、現実的ではない。我々は、これらの実験系の問題点がヒト造血幹細胞機能を維持するための微小環境(ストローマ細胞etc.)がマウス由来である点に起因すると考えた。そこで、造血微小環境を含むと考えられる胎児肝¹²⁾あるいは骨髓組織¹³⁾そのものをSCIDマウスに移植することを試み、高い再現性でヒト造血機能を維持できる実験系を確立することに成功した。ここでは骨髓組織を用いた方法の概略を述べる。

ヒト胎児長管骨(胎齢18-22週)の断片(骨髓組織を含む)をSCIDマウスの皮下に移植した。移植後2-3週目では移植片内にはヒトの造血像はほとんど観察されないが、4-6週目から様々の分化段階のBリンパ球系、顆粒球系、および赤血球系の細胞群が観察された。これらの血液細胞がヒト由来であることはCD59(pan-human antigen)の発現により示された(Fig.1)。FACSのscatter profile(Fig.1)や分化抗原の分布(Table 1)は正常の胎児骨髓とよく似ている。正常胎児骨髓と異なる点は、赤血球系及び成熟顆粒球の割合が少ない点である。これはマウスのEPOやIL-3などの造血因子がヒトの幹細胞に作用しない、あるいは移植片内でのこれらの因子の産生が低いことが原因かもしれない。実際、ヒトEPOを投与するとヒト赤芽球の割合が上昇し(Fig.2)、G-CSFやIL-3の投与により成熟顆粒球の割合も多くなる¹⁴⁾。また、移植後5-6週目よりヒトCFU-GMおよびBFU-E活性が検出され、20週以上維持された(Fig.3)。これらのコロニーがヒト由来か否かはCD59の発現により確かめられた。以上のように、ヒト胎児骨を用いることにより、約半年間に渡ってヒト造血能がSCIDマウス中で維持され、その造血能をFACS及びコロニー形成法により定量化できることが分かった。そこで、この骨髓モデルを用いて放射線の影響を解析した。

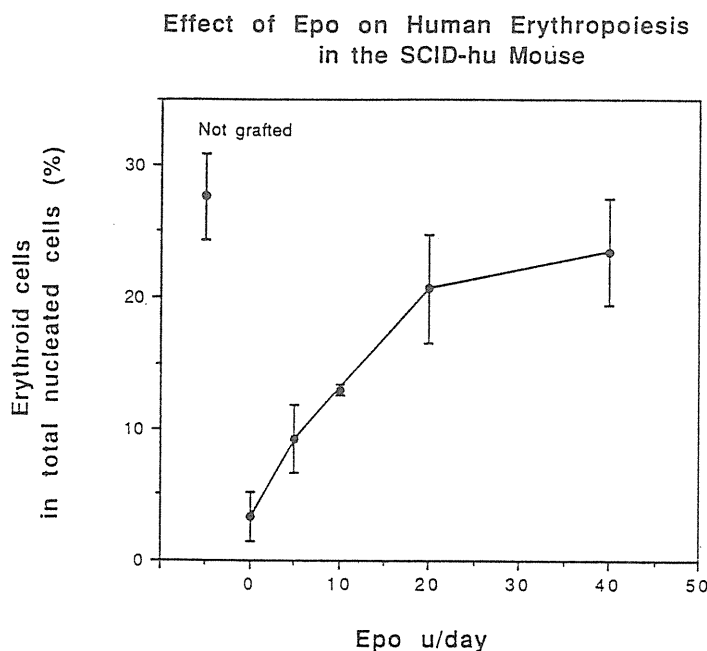


図2 移植ヒト骨髓の赤血球産生に対するヒトエリスロポエチンの効果(文献13より転載)

Table 1 Expression of Surface Markers on Hematopoietic Cells From Normal and Grafted BM Tissues

BM*	Region† (%)	Percentage of Positive Cells ± SD									
		CD10	CD19	IgM	IgD	Igκ	Igλ	CD15	CD34	MEM43	Ly5.1
Not grafted (n = 7)	R1 (40 ± 9)‡	76 ± 8	76 ± 6	19 ± 4	5 ± 1	6 ± 1	13 ± 2	1 ± 0	7 ± 1	—	—
	R2 (18 ± 2)	43 ± 7	48 ± 8	5 ± 3	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 2	7 ± 4	16 ± 2	—	—
	R3 (17 ± 4)	8 ± 3	7 ± 3	ND	ND	ND	ND	80 ± 3	2 ± 2	—	—
	R4 (25 ± 5)	17 ± 10	3 ± 2	ND	ND	ND	ND	90 ± 9	< 1	—	—
Grafted (n = 17)	R1 (49 ± 11)	82 ± 7	83 ± 7	20 ± 5	4 ± 2	7 ± 2	13 ± 3	1 ± 1	6 ± 3	86 ± 5	11 ± 5
	R2 (25 ± 6)	61 ± 10	66 ± 11	8 ± 6	3 ± 3	4 ± 3	6 ± 4	5 ± 3	9 ± 4	87 ± 12	9 ± 7
	R3 (15 ± 8)	7 ± 4	4 ± 2	ND	ND	ND	ND	57 ± 16	2 ± 2	78 ± 17	9 ± 13
	R4 (12 ± 7)	13 ± 7	4 ± 2	ND	ND	ND	ND	83 ± 15	< 1	94 ± 5	4 ± 2

ND, not determined owing to high nonspecific staining.

*Seventeen bone grafts from nine donors (17 to 22 gw) were analyzed 6 to 12 weeks after implantation. Normal fetal BM cells from seven donors (18 to 22 gw) were also analyzed as control.

†Shown in Fig 1

‡The percentage of cells in each cluster region in total hematopoietic cells (R1 + R2 + R3 + R4).

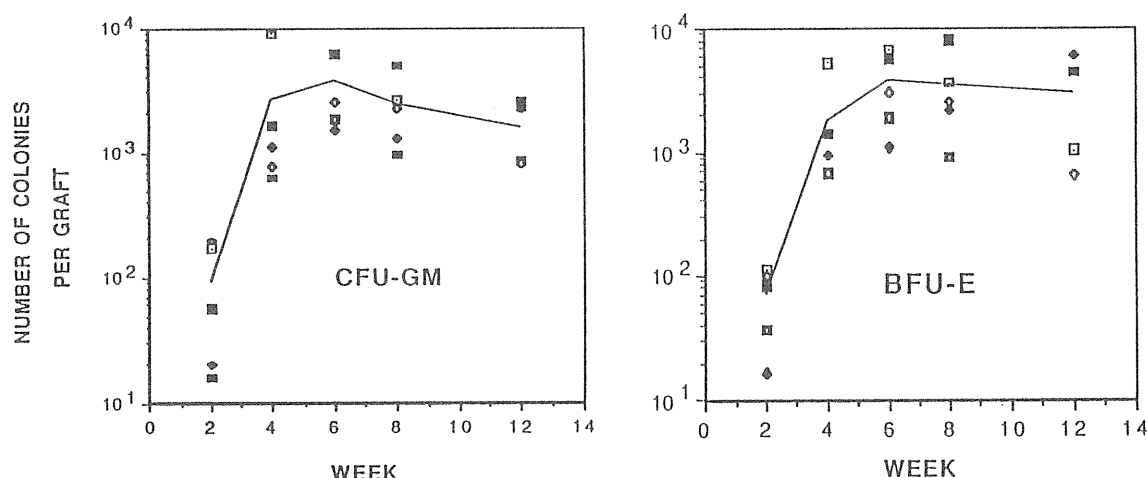


図3 移植ヒト骨髄のCFU-GM及びBFU-E活性(文献13より転載)

3 造血機能に対する放射線の影響

まず、ヒト骨髄を移植したSCID-huマウスを種々の線量のX線で全身照射し、移植片内のCFU-GMおよびBFU-Eの生存曲線を求めた(Fig.4)。これらの生存曲線にはShoulderが見られず($n=1.0$)、直線的であった。又、 D_0 値はそれぞれ1.0Gy及び0.7Gyとなり、マウス骨髄のCFU-SやCFU-Cの値とほぼ一致した。これらの点は、移植されたヒト胎児骨髄が、その放射線生物学的特徴を維持していることを示唆している。また、照射前に放射線防護剤、WR2721(ラジカルスカベンジャー)をSCID-huマウスに投与しておくと、ヒトCFUに対するX線の効果は減弱された。この減弱効果はマウスCFU-Sに対する効果とほぼ一致した。(防護剤存在下の D_0 値=約2.5Gy)。次にX線照射後の造血能の回復をCFU-C活性により調べた。1Gyの照射では80%(4/5)のdonorでほぼ4週間でCFU活性は回復したが、2.5Gy以上では、ほとんど回復は見られず、その後骨髄組織は繊維化した。結果として、移植骨髄の LD_{50} は約1.5Gyで、この値は放射線被曝事故な

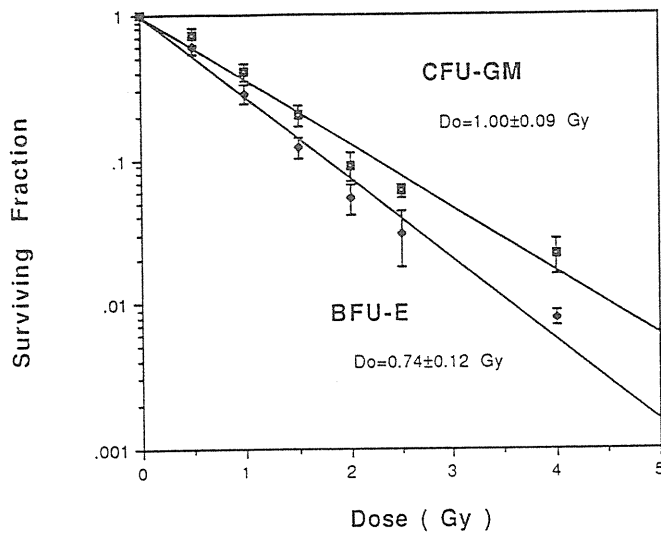


図4 移植ヒト骨髄のCFU活性に対するX線の影響

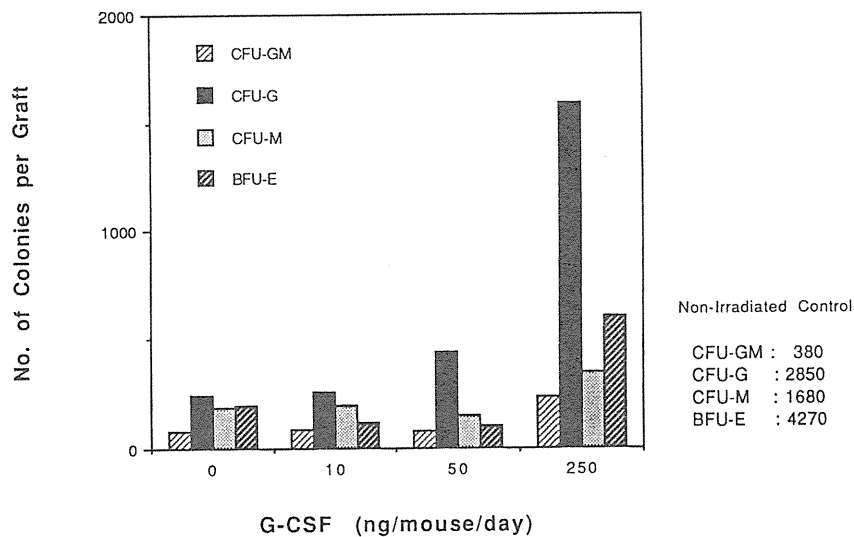


図5 X線照射(1 Gy)後2週目のCFU活性に対するG-CSFの効果

どの際に得られた値($LD_{50}=3-4\text{Gy}$)と比べてかなり低い。これは移植片内のself renewalなヒト多能性造血幹細胞の数が限られている(想定では10-100個程度)ために、2.5Gy以上ではそれらが完全に死滅したと考えられる。このように、1.0Gy以下の低線量照射の場合、移植片内のCFU活性は4-6週後にほぼ正常レベルに回復する。その際、ヒトG-CSFを照射後投与するとCFU-Gの回復は強く促進され(Fig.5), 移植片内の好中球の割合も著明に増加した。

以上の結果はこのSCID-huマウスが、ヒト骨髄に対する放射線リスクの解析とともに、防護剤のEfficacy解析や造血因子による放射線被曝者の治療などのモデルとなりうることを示唆している。また、このモデルを用いれば、放射線のヒト血液幹細胞遺伝子や染色体に対する影響を直接調べることができよう。我々は長年にわたって原爆被曝者の赤血球やリンパ球の体細胞突然変異に関する調査を行ってきた^{15,16,17,18}。その結果は、被曝者の造血幹細胞遺伝子には放射線で誘発された突然変異が現在でも残ってお

り、現在も突然変異血液細胞を産生し続けていることを強く示唆している。今後、このことをSCID-hu骨髓モデルを使って実証し、さらに分子レベルでその変異を解析していきたい。

4 ヒト放射線発癌の実験モデルとしてのSCID-huマウスの可能性

ヒトの放射線発癌の分子メカニズムを解析するためには、放射線で誘発されたヒト癌組織が必要である。しかし、放射線が原因で誘発されたとはっきり言えるヒトの癌組織を手に入れることは仲々難しい。例えば、原爆被爆者では種々の臓器の癌死亡率は有意に高いが、その相対危険率は高々2倍である。つまり、ある原爆被爆者の癌組織が得られとしても、それが放射線で誘発された癌と言える確率は50%である。このような点から集団間の統計的比較を行う分子疫学が必要となる。その意味でトロトラスト症患者の肝癌や被爆後10年前後で多発した原爆被爆者の白血病はよい対象と言えるが、分子生物学的解析が可能か否かは組織の保存状況によるところが大きい。

ヒト放射線発癌に関するもう一つのアプローチはSCIDマウスに移植したヒト正常組織に放射線発癌を誘導することであろう。もしそれが可能になれば発癌プロセスの追跡や線量依存性の検討が可能になり、その有用性は計り知れない。マウスにでさえ放射線で発癌を誘導するのは容易ではないのに、移植したヒト正常組織に癌を誘導することは不可能に近いかも知れないが、腫瘍プロモーターや放射線照射を工夫することにより可能になるのかも知れない。

5 おわりに

SCID-huマウスモデルを用いるとヒト組織に対する放射線の影響を直接in vivoで観察できることが示された。また、SCID-huマウスは種々の薬剤投与が可能であり、放射線の影響を修飾できる。このモデルを用いれば放射線や他の突然変異物質のヒト遺伝子や染色体への影響もin vivoで解析できるだろう。SCID-huマウスモデルをヒト放射線発癌に応用するためには多くの問題点を克服しなければならないが、得られたデータを基礎にしてその応用の可能性を探っていきたい。

謝 辞

貴重な意見をいただいた中村典先生(放影研)およびWR2721をご供与いただいた安藤興一先生(放医研)に紙面を借りて謝意を表します。

参考文献

- 1) 並川玲子, 京泉誠之, 金島秀人: 造血因子 3, 1, 1992
- 2) J. M. McCune, R. Namikawa, H. Kaneshima et al.: *Science*, **241**, 1632, 1988
- 3) D. E. Mosier, R. J. Gulizia, S. M. Baird et al.: *Nature*, **335**, 256, 1988
- 4) R. Namikawa, H. Kaneshima, M. Lieberman et al.: *Science*, **242**, 1684, 1988
- 5) D. E. Mosier, R. J. Gulizia, S. M. Baird et al.: *Science*, **251**, 791, 1991
- 6) M. A. Duchosal, P. J. McConahey, C. A. Robinson et al.: *J. Exp. Med.* **172**, 985, 1990
- 7) Y. Saeki, T. Mima, S. Sakoda et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6157, 1992
- 8) M. A. Duchosal, S. A. Eming, P. Fisher: *Nature*, **355**, 258, 1992
- 9) S. Kamel-Reid, J. E. Dick: *Science*, **242**, 1706, 1988

- 10) I. Lubin, Y. Faktorowich, T. Lapidot et al.: *Science*, **252**, 427, 1991
- 11) T. Lapidot, F. Pflumio, M. Doedens et al.: *Science*, **255**, 1137, 1992
- 12) R. Namikawa, K. N. Weilbaecker, H. Kaneshima et al.: *J. Exp. Med.* **172**, 1055, 1990
- 13) S. Kyoizumi, C. Baum, H. Kaneshima et al.: *Blood*, **79**, 1704, 1992
- 14) S. Kyoizumi, L. J. Murray, R. Namikawa: *Blood*, **81**, 1479, 1993
- 15) R. G. Langlois, W. L. Bigbee, S. Kyoizumi et al.: *Science*, **236**, 445, 1987
- 16) S. Kyoizumi, N. Nakamura, M. Hakoda et al.: *Cancer Res.* **49**, 581, 1989
- 17) M. Hakoda, Y. Hirai, H. Shimba et al.: *J. Exp. Med.* **169**, 1265, 1989
- 18) M. Akiyama, N. Nakamura, M. Hakoda et al.: *J. Radiat. Res. Supplement* **32**, 278, 1991

IV 細胞間相互作用

1 がんの発生と細胞間相互作用

森 道夫 他

2 発癌における細胞外マトリックスの役割

坂倉 照好

3 胸腺微小環境における細胞間相互作用

広川 勝昱 他

1 がんの発生と細胞間相互作用

森 道 夫*／榎 本 克 彦*

Roles of gap junctions and tight junctions in the development of liver cancer and metastatic tumors

Michio Mori*／Katsuhiko Enomoto*

Department of Pathology, Sapporo Medical College

*S. 1, W. 17, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

Abstract

Roles of the gap junctions and tight junctions in the development of liver cancer and the formation of metastatic tumors were studied.

The gap junction mediates communications between cells by allowing inorganic ions and other water-soluble small molecules to pass directly from the cytoplasm of one cell to the cytoplasm of another, thereby playing an essential role in maintaining tissue homeostasis.

Expression of gap junction proteins decreased progressively in association with the advance of the stages of hepatocarcinogenesis in rats. On the other hand, treatment of HuH-6 human hepatoblastoma cells with either retinoic acid or dibutyryl cAMP, or co-culture with BALB/c 3T3 cells suppressed the expression of AFP. Such treatment induced the expression of mRNA for gap junction proteins.

The tight junction functions as a barrier to ions and small molecules, which pass through the intercellular spaces thus the integrity of endothelial tight junctions could prevent the extravasation of metastatic tumor cells. Recently, we developed a new monoclonal antibody for a tight junction-associated protein. The new protein, 7H6, was expressed in accordance with the development of the integrity of endothelial tight junctions, and the migration of SST-2 rat mammary cancer cells through the RLE (rat lung endothelial) cell monolayer was markedly inhibited when 7H6 was expressed at the tight junction areas of RLE cells.

*札幌医科大学

はじめに

ヒトのがんの約90%は上皮性であるが³, 正常な上皮細胞は, 必ず隣接する同種の上皮細胞と細胞間結合装置で結合しており, バラバラな状態で存在することはない。細胞間結合装置の中でもgap junctionは, 細胞膜を貫くコネクシン蛋白から構成されており, gap junctionで結ばれた細胞間には, 直接イオンや小分子の交換が起こるというユニークな機能を持っている。即ちgap junctionは, 細胞膜貫通性のコネクシン蛋白が6個集合して形成する円筒(コネクソン)が³, 一定の部位に多数(1,000–1,500個)集合して, 規則的な格子様配列を作ったものである。これが1個のgap junction (gap junction plaque) に相当する。

それぞれのコネクソンの細胞外に露出した部分は, 隣接する細胞のコネクソンの細胞外ドメインと結合することによって, 2個の細胞間には, 内径約2 nmの多数のチャネルが形成される(図1)。

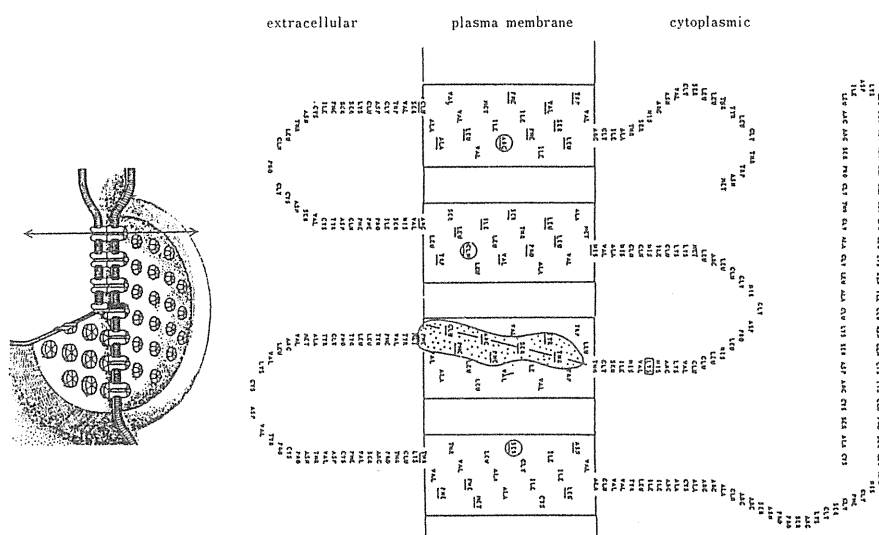


Fig.1 Schematic drawing of a gap junction plaque (left) and amino acid sequence of connexin 32 gap junction protein (right).

現在までのところ, このチャネルそのものには, 物質を能動的に輸送する機構は備えられていないと考えられるが, その内径から推定されるように, 分子量1,000以下の物質は, gap junctionを通過して隣の細胞に移行する。このことは, 分子量500以下の蛍光色素であるLucifer yellowをマイクロインジェクションすると, 隣接する細胞に色素が移行するdye transfer試験によって確かめられる。

肝細胞で調べると, gap junctionは肝細胞表面の約3%を占めている。1個の肝細胞は, 平均7個前後のgap junction plaqueを持っているから, 肝細胞は約1万本のチャネルによって, 周囲の肝細胞と交通している計算になる。

このチャネルを通して無機イオンが行き来するため, gap junctionで結合した細胞は電氣的に共役 (electric coupling)しており, またアミノ酸, ヌクレオチドも通過することから, これらの細胞は代謝的にも共役 (metabolic cooperation)している。このようにgap junctionで結合することによって, 臓器や組織などの細胞集団を構成する上皮細胞は, 臓器組織として共同作業を営み, 生体のホメオスタシスに従って統制のとれた代謝活動を行っている。

現在までgap junctionを通じて隣の細胞に伝えられることが示されている物質の中には, カルシウムやIP₃, cAMPなどの情報伝達のセカンドメッセンジャーが含まれており, gap junctionを介した細胞間コ

コミュニケーションは、細胞の情報伝達にも重要な働きをしていることが示唆されている。

生体のホメオスタシスから逸脱し、臓器組織から発生しながら臓器組織の統制に従わず、自律性に増殖するがん細胞で、gap junctionに変化が生じていることが予測され、それが注目されるのは、このような理由による。

1. 細胞増殖に伴うgap junctionの変化

肝細胞のgap junction構成蛋白は、コネクシン(以下CX)32と、CX26である。それぞれの細胞質ドメインに相当する合成ペプチドを用いて抗体を作製し、免疫組織学的に正常ラットの肝臓を検索すると、小葉を構成するすべての肝細胞は、CX32からなるgap junction plaqueを持ち、隣接する肝細胞と結合して肝細胞索を形成していることが分る。一方、CX26は、小葉周辺部の肝細胞にだけ見出され、小葉中心部の肝細胞には存在しない。このような状態の肝細胞はすべてG₀期にある。

2/3部分肝切除を行うと、残存肝を構成する肝細胞はすべて増殖を開始するが、それに伴って術後6時間目には、すでにgap junction plaqueの減少が起こる。肝細胞のDNA合成の極期には、CX32、CX26ともほとんど完全に消失する(図2)。肝細胞の増殖によって、失われた肝が補われると肝細胞は再びG₀期に復するが、それに伴ってgap junctionは数を増し、術後1週間ではほぼ正常の数に戻る。コネクシン蛋白の半減期は約2時間とされ、部分肝切除後にみられるgap junctionの消失は、Northern blotによるCX mRNAの減少の程度と一致することから、transcriptionのレベルで調節されているものと考えられる。

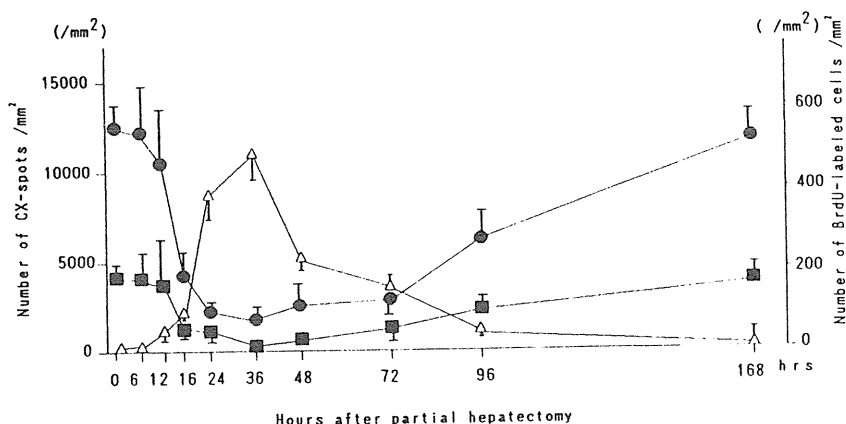


Fig.2 Sequential changes in the number of gap junctions (connexin 32●, connexin 26■) and BrdU labeled hepatocytes (△) in regenerating liver following partial hepatectomy.

2. 肝がん発生過程におけるgap junctionの変化

肝の化学発がんモデルとして広く使われているSolt and Farberの方法¹⁾で、Fischerラットに肝がんを誘導し、その発がん過程におけるgap junctionの変化を検索すると、CX32は、初期の前がん病変である増生巣hyperplastic focusですでに減少し、後期に現れる増生結節hyperplastic noduleではさらに減少して、肝がんhepatocellular carcinomaでさらに減少が著しくなる。

一方CX26は、肝がんではCX32と同様の著しい減少をみるものの、前がん病変では、むしろ周囲の非がん部の肝細胞より増加するものが認められるなど、CX32と異なる消長を示す(図3)。その理由は現在のと

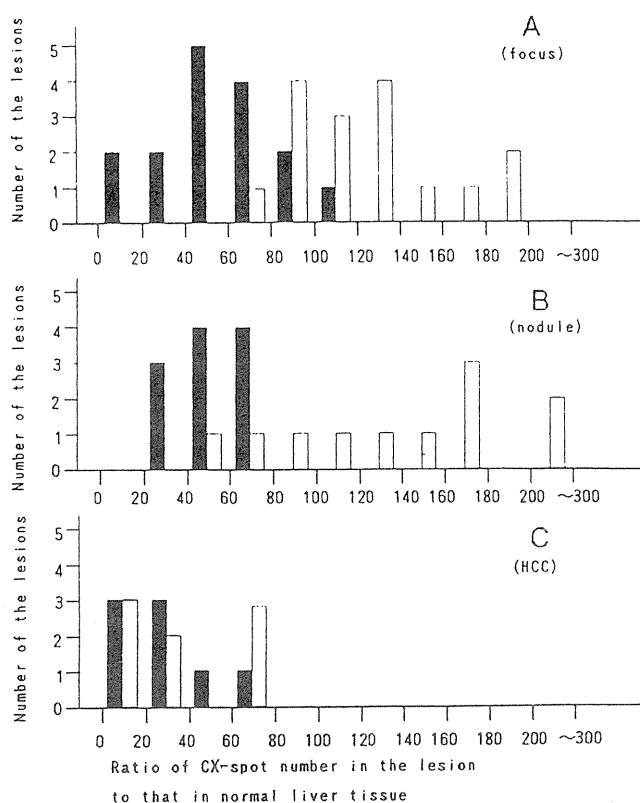


Fig.3 Relative distributions of hyperplastic foci (A), hyperplastic nodules (B) and hepatocellular carcinomas (C) in terms of the number of gap junctions (connexin 32■, connexin 26□).

ころ不明であるが³, mRNA量を比較しても, CX32と26は, 調べた限りのすべての肝がん, 結節で異なった発現を示し, 両者は異なった発現調節を受けていることが示唆される²⁾. CX32遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域には, トランスクリプションファクターHNF-1との結合部位が存在し, HNF-1は肝, 腸管, 腎にだけ発現されることから, CX32の臓器特異的な発現調節が, HNF-1によってなされている可能性が示されている³⁾. これに対してCX26遺伝子には, そのような結合部位は見出されていない。またCX43については, V-srcによるチロシンのリン酸化がgap junctionの消失と関係することが知られている⁴⁾のに対して, CX32では, チロシンリン酸化がむしろgap junctionの形成に関与する可能性が示唆されている⁵⁾.

いずれにせよ, がんの発生過程でgap junctionの減少が起こることは, 実験肝がんだけでなく, ヒトの肝がん⁶⁾, 乳がんでも認められている。Leeら⁷⁾は, subtractive hybridization法によって, 正常の乳腺上皮に発現され, 乳がん細胞でそれがみられない遺伝子の一つがCX26であることを明らかにした。gap junctionは, その遺伝子発現が抑制されることによって細胞機能に変化を生じ, それによってがん化が起こるという意味で, RBやDCCなどと異なるclass IIのがん抑制遺伝子に位置づけられている。がん細胞にCX遺伝子を導入し発現させると, 細胞増殖, 造腫瘍性, フォーカス形成能が低下することも報告されている⁸⁾. class IIのがん抑制遺伝子は, 薬物などによる誘導が可能であるが, 我々⁹⁾も, ヒトの肝芽腫細胞株HuH-6に, レチノイン酸, cAMPの添加, またはBALB 3T3細胞とcocultureすることによって, AFP産生の低下と共に, CX32 mRNAとCX32蛋白の発現が増加することを観察している。

3. tight junctionとがんの転移

次にtight junctionについて簡単に述べる。がんの転移と二次腫瘍形成は, がんの予後を決定する最も大きな因子であるが, 転移が成立するためには, がん細胞が転移臓器の血管内皮に付着し, 血管内皮をくぐ

り抜ける過程が必要である。血管内皮細胞はtight junctionによって結合しており、tight junctionは文字通り強固に血管腔をシールして、アルブミンなどの分子に対するbarrierとして機能しているから¹⁰⁾、血管内皮細胞のtight junction機能が、転移の成立に深く関与していることが予想されるが、この方面の研究は進んでいない。

その理由の一つは、tight junction機能を検索する適切な手段が充分に開発されていないことである。

最近我々は、ラット肝細胞の毛細胆管膜フラクションを抗原として、tight junctionと特異的に反応するモノクローナル抗体7H6の作製に成功した(図4)¹¹⁾。この抗体が認識する蛋白は155kDで、その分子量、抗原性などから、これまでに報告されているtight junction関連蛋白(ZO-1¹²⁾, ZO-2¹³⁾, cingulin¹⁴⁾のいずれとも異なることが確かめられた(図5)。

7H6蛋白は、非常にtightnessの高い上皮細胞のtight junctionには発現されているが、上皮に比べると電気抵抗、アルブミンに対するbarrier機能などがはるかに低い血管内皮細胞では、その中で最もtightである脳の血管内皮¹⁵⁾を除いて、発現されていない。



Fig.4 Immunoelectron microscopic localization of 7H6 in the bile canalilulus-rich fraction prepared from rat liver. $\times 50,000$

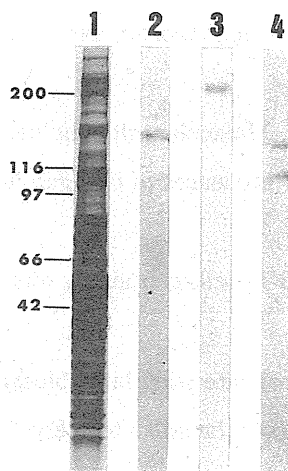


Fig.5 Immunoblot analysis of the whole liver homogenate using 7H6 (lane 2), anti-ZO-1 antibody (lane 3) and anti-cingulin antibody (lane 4).

このことから、7H6蛋白が³, tight junctionのbarrier機能の発達に伴って発現される可能性が示唆された。そこで、ラットの肺血管内皮細胞株RLEを用い、そのコンフルエント培養に、アルブミンなどに対するbarrier機能を高めることが知られているレチノイン酸、cAMP¹⁶⁾などを添加したところ、無添加対照群では全く認められない7H6蛋白が³, 細胞膜面に明らかに発現された。

このように7H6蛋白が発現されたRLE細胞では、ラット乳がん細胞SST-2などの内皮細胞下へのもぐり込みが³, 著しく抑制されるという結果を得ている。これに対して既存のZO-1, cingulin蛋白は、いずれの上皮、内皮のtight junctionにも常に発現されており、barrier機能と関係していない¹⁷⁾。またZO-2については、まだその実態が明らかにされていない。

以上の結果から、我々の見出した7H6蛋白は、血管内皮細胞のtight junction機能の強さの指標になる可能性が示唆された。内皮細胞のtight junctionの発達は、二次腫瘍の形成に抑制的に働く可能性があり、これらの仮説を確かめるための実験が進行中である。

ま と め

我々の手がけているgap junctionとtight junctionの研究を中心に、細胞間相互作用とがんの発生、転移の成立の関係について考察した。最近がんの浸潤との関係で注目されているadherens junction¹⁸⁾のように、細胞間結合装置は、がんの発生・進展と深く結びついている。特に細胞間結合装置の調節機構の研究は、がんの克服に向けて、ますます重要な課題となると思われ、その発展が期待される。

謝 辞

発表の機会を与えて下さった本シンポジウムの佐藤弘毅委員長はじめ関係の諸先生、座長の労をおとり下さった国立がんセンターの田ノ岡先生に心から感謝申し上げます。本研究は札幌医大病理学教室の多くの共同研究者によってなされたもので、その一部は科学技術庁、文部省の研究助成によってなされたものであります。

参考文献

- 1) Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**, 701-703 (1976)
- 2) Sakamoto, H., Oyamada, M., Enomoto, K. and Mori, M.: Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1210-1215 (1992)
- 3) Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicolson, B. and Willecke, K.: Molecular cloning of mouse connexins 26 and-32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur. J. Cell Biol.*, **58**, 81-89 (1992)
- 4) Crow, D. S., Kurata, W. E. and Lau, A. F.: Phosphorylation of connexin 43 in cells containing mutant src oncogenes. *Oncogene* **7**, 999-1003 (1992)
- 5) Traub, O., Look, J., Paul, D. and Willecke, K.: Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, **43**, 48-54 (1987)

- 6) Oyamada, M., Krutovskikh, V. A., Mesnil, M., Partensky, C., Berger, F. and Yamasaki, H.: Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: Increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43. *Mol. Carcinog.*, **3**, 273-278 (1990)
- 7) Lee, S. W., Tomasettom C. and Sager, R.: Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2825-2829 (1991)
- 8) Eghbali, B., Kessler, J. A., Reid, L. M., Roy, C. and Spray, D. C.: Involvement of gap junctions in tumorigenesis: Transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10701-10705 (1991)
- 9) 佐藤睦, 榎本克彦: ヒト肝芽腫細胞の分化形質誘導に関する研究。札幌医誌, 60, 173-182 (1991)
- 10) Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D.: Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circ. Res.*, **55**, 723-733 (1984)
- 11) Zhong, Y., Saitoh, T., Minase, T., Sawada, N., Enomoto, K. and Mori, M.: Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J. Cell Biol.*, **120**, 477-483 (1993)
- 12) Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. and Goodenough, D. A.: Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.*, **103**, 755-766 (1986)
- 13) Gumbiner, B., Lowenkopf, T. and Apatira, D.: Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3460-3464 (1991)
- 14) Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B. and Kendrick-Jones, J.: Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature*, **333**, 272-275 (1988)
- 15) Rutten, M. J., Hoover, R. L. and Karnovsky, M. J.: Electric resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. *Brain Res.*, **425**, 301-310 (1987)
- 16) Stelzner, T. J., Weil, J. V. and O'Brien, R. F.: Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J. Cell. Physiol.*, **139**, 157-166 (1989)
- 17) Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Goodenough, D. A. and Mooseker, M. S.: Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J. Cell Biol.*, **107**, 2401-2408 (1988)
- 18) 月田承一郎, 月田早智子, 永渕昭良, 米村重信: カドヘリンを介した細胞間接着の制御とシグナル伝達。日本癌学会総会記事, シンポジウム1-6, (1992)

2 発癌における細胞外マトリックスの役割

坂 倉 照 好*

Extracellular Matrix in Carcinogenesis

Teruyo Sakakura

Laboratory of Cell Biology, Tsukuba Life Science Center, RIKEN, 3-1-1
Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

Abstract

1) Epithelial-stromal interactions are important for organogenesis during embryonic development. In adult stage, the continuous interactions still persist. If particular change, such as embryonic change, occurs in the stroma, the epithelium responds the altered stroma and proliferates in the localized area. Mammary tumor development is stimulated by interaction with embryonic stroma, and intestinal metaplasia is induced by transplantation of embryonic intestinal stroma beneath the stomach mucosa.

2) One of the molecular mechanisms that mediate the interactions between these two tissues is an exchange of the informations through extracellular matrix substances. Tenascin, and extracellular matrix glycoprotein, is characterized by its onco-fetal type of distribution in the tissue. In mammary gland development, tenascin appears in the dense stroma surrounding the budding epithelium at embryonic stage and juvenile, and reappears during cancer development. The function of tenascin is not clear yet, but is supposed to function as a homeostatic factor in the repair of tissue perturbation.

1 はじめに

生体における殆どの臓器は上皮系細胞と間葉系細胞からなり、その相互作用は臓器の発生、発育過程で重要な役割を演じていることは周知である。例えば臓器の決定、形態形成、増殖、分化で臓器特異性は間質がその鍵を握っている場合が多い。癌になっても胸水、腹水、流血中等で遊離して存在する癌細胞以外

* 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター

は、間質と共存してある組織構築を作っている。両者はお互いに無視し得ないし、それどころかお互いの運命に干渉し合っている。我々はマウス乳腺の発生発育から発癌における過程で、上皮-間質相互作用の役割を検討してきた¹⁾。その中で間質の胎児化という問題が癌の発生と増殖、進展に密接に関係していることを明らかにした。本報告では、間質の胎児化の一つの指標として、細胞外マトリックス・テネインに焦点を当て、その組織内分布、発現などの動態から癌における細胞外マトリックスの動的機能について考察したい。

癌における間質の胎児化

癌化によって胎児性の形質を発現する例がある。肝細胞のAFP(alpha-fetoprotein)、腸上皮のCEA(carcino-embryonic antigen)は代表的な例で、いずれも癌の診断に利用されている。一方間質における変化は研究が少なく、臨床応用には至っていない。

2 胎児性間質による発癌の促進

発生過程において、間質は上皮の増殖と形態形成に重要で、間質無くしては上皮は増殖も形態形成もできない。成熟期になっても組織が安定した形態と機能を示すためには上皮と間質に安定した関係が成立していることが重要である。もしその関係が崩れ、乳腺間質に胎児化或いは異質な変化が起こると、上皮は反応して再び局所的な臓器発生を行なう²⁾。例えば成熟期マウス乳腺内に胎児顎下腺或いは乳腺間質を移植すると、これら胎児間質細胞と接触した部位の上皮は増殖し、顎下腺間質の場合には顎下腺様、乳腺間質の場合には乳腺様の形態形成を行なう。そしてこの増殖巣から高い頻度で癌が発生する。但しこの発癌は、乳癌ウイルス或いは化学発癌剤DMBAの投与など、乳癌誘発実験系マウスのみ認められ、それ以外では乳腺細胞の増殖と形態形成にとどまり癌化には至らず、明らかに発癌因子による癌発生過程を促進している(表1)。更に組織学的にはまだ癌化していない乳腺増殖巣を径1ミリの小片に切り、生後3週目に乳

表1 胎児の顎下腺或いは乳腺間質移植による乳癌発生の促進(10ヶ月観察)

		発生乳癌数 (1 乳腺当たりの乳癌)	
実験群	マウス数 (匹)	間質移植乳腺	非移植乳腺
C3H			
(乳癌ウイルス+)			
経産	37		69/370(0.19)
未産	52		38/520(0.07)
未産+間質移植	46	21/71(0.3)	30/389(0.07)
C3H			
(乳癌ウイルス-)			
経産	37		6/370(0.01)
未産	68		0/680(0)
未産+間質移植	50	0/77(0)	0/423(0)
BALB/c			
DMBA*	20		90/200(0.45)
間質移植+DMBA	12	51/24(2.1)	50/96 (0.52)
DMBA+間質移植	11	20/22(0.9)	38/72 (0.52)

* DMBA : 7,12-dimethylbenz (α) anthracene経口投与

腺実質を除去し脂肪組織のみにした別の個体の乳腺内に移植すると、10箇月以内にその半数近くから乳癌が発生し、対照として行なった正常乳腺細片の移植の場合の10倍以上高頻度である³⁾。このことは移植原片の中に既に癌化した細胞が含まれていたことを示している。

前癌或いは癌好発病変として考えられている胃の腸上皮化生に似た病変を、間質に手を加えることにより実験的に作ることが出来る。成熟マウス腺胃粘膜化に、16～17日胎児マウスより採取した小腸間質を移植すると、腺窩構造の乱れと杯細胞化を主とした胃粘膜の増殖によるポリープ状の隆起が形成される。PAS-Alucian Blue染色でムチンの産生、電顕によって刷子縁の形成が認められ、不完全型腸上皮化生様の変化である⁴⁾。この動物に化学発癌剤の投与を行なっても、ポリープ組織から胃癌を誘発することは出来なかったが、この実験結果は癌のみでなく上皮の化生変化の発生にも、間質が重要な役割を演じていることを示している。

我々の研究成果ではないが、マンチェスターのホルトラジウム研究所のSchor博士達は、乳癌患者と非担癌患者の皮下繊維芽細胞の示す性質の奇妙な差を研究している。通常、繊維芽細胞をコラーゲンゲルの上に蒔くと、いくつかの細胞はゲルの中に潜り込んでいく。その数は最初蒔かれた細胞密度に反比例し、多く蒔けば潜りにくくなる。ところが、乳癌患者の繊維芽細胞ではその相関が逆転し、多く蒔けば潜りやすくなる。前者の性質を正常型、後者を癌型とすると、胎児由来の細胞は最初癌型を示すが、培養系に移し経代が進めば正常型となる。このように繊維芽細胞がコラーゲンゲルの中を動くという性質について、生体内でも培養系でも胎児型から成人型への分化が行なわれるわけである。この性質は癌好発家系でしかも非担癌の人から採取した場合にも見られ、胎児形質が大人へ分化できない遺伝的な異常と考えられる。最近この研究グループはその分子機構の解析を始めており、胎児と癌患者の繊維芽細胞培養上清より、分子量70kDaのMSF(Migration stimulating factor)を見つけている。

3 発癌による間質の胎児化

癌組織の間質が正常組織の間質と形態的、機能的に異なった性質を示すという報告は多い。形態的な変化としては例えば、筋繊維芽細胞の増加と配列の乱れ、コラーゲン繊維の断裂が目立ち、機能的には、培養系で癌間質は強い増殖性を示す。一般に胎児細胞は培養してもよく増殖することが知られているので、癌間質のこの性質は胎児化と解釈することが出来る⁵⁾。

4 癌胎児性細胞外マトリックス

癌細胞が組織内で或る構築をとっている時、その間には通常基底膜を含む細胞外マトリックスが存在する。これにはコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、その他色々な分子が知られている。これら物質は、それぞれ上皮或いは間質細胞で作られ、相互に結合して多様な高次構造を形成する。上皮と間質両細胞間の情報伝達を媒介する分子として注目されている分野である。

癌における細胞外マトリックスは、特に転移のメカニズムでよく研究されている。例えばメラノーマ細胞の肺転移におけるフィブロネクチン、ラミニンの重要性とか、ヘパリンによる癌転移の制御などである。また最近、スプライシングによって発現が制御される癌胎児性ドメインがフィブロネクチンに存在することが明らかになっているし、それと似た発現様式を示す、別のマトリックス糖蛋白テネイシンが発見されている。

5 テネイシン

テネイシンにはニワトリ胚で筋、軟骨、骨形成に関係すると考えられるMyotendinous抗原を、別の研究グループがその特徴的な癌胎児性発現から改名したものである⁶⁾。既に別個に発見されていたニューロングリア接着物質であるサイトタクチン、J1、ヒト・グリオーマに特異的に発現しているマトリックス物質GMEM、羊赤血球凝集活性を持つヘキサブラキオンとは類似の物質である。分子量190~250kdaのサブユニットがN端でS-S結合により6量体を形成する。アミノ酸一次構造からEGF様モチーフ、フィブロネクチンIII型様モチーフ、フィブリノーゲン様配列を持ち、多機能ドメイン構造を示している。生物学的機能はまだ明らかにされていないが、報告では、細胞接着と離脱の調節に関わっているとの見方が多い。

a) マウス乳腺におけるテネイシン発現

マウスでは乳腺は胎生10日頃、表皮細胞の丈の高まりとして始まる。これら一層の細胞は移動して左右5対の乳腺原基を作り、14日頃から細胞増殖を行ない伸展、分枝しながら乳腺脂肪前駆組織に入る。15~20本位の分枝で静止し、性周期が始まるまで殆ど変化しない。生後4~5週には特徴的なendbudを形成し急速に増殖、伸展、分枝を繰り返し、脂肪叢全体に发育する。妊娠、泌乳で増殖、分化、退縮を繰り返し、乳癌好発系では前癌病変(HAN)、癌発生が見られ、末期には肺に転移するものが多い。この一連の乳腺発癌发育過程でテネイシンの発現は特徴的である。免疫組織化学では図1に示すように、増殖開始の胎児期、思春期のendbud、癌、肺転移二次腫瘍で上皮を囲む緻密間質に陽性となる。一方in situ hybridizationによるmRNAの発現は同じ部位の間質に認められるが、肺転移巣では癌細胞にもメッセージが認められる。

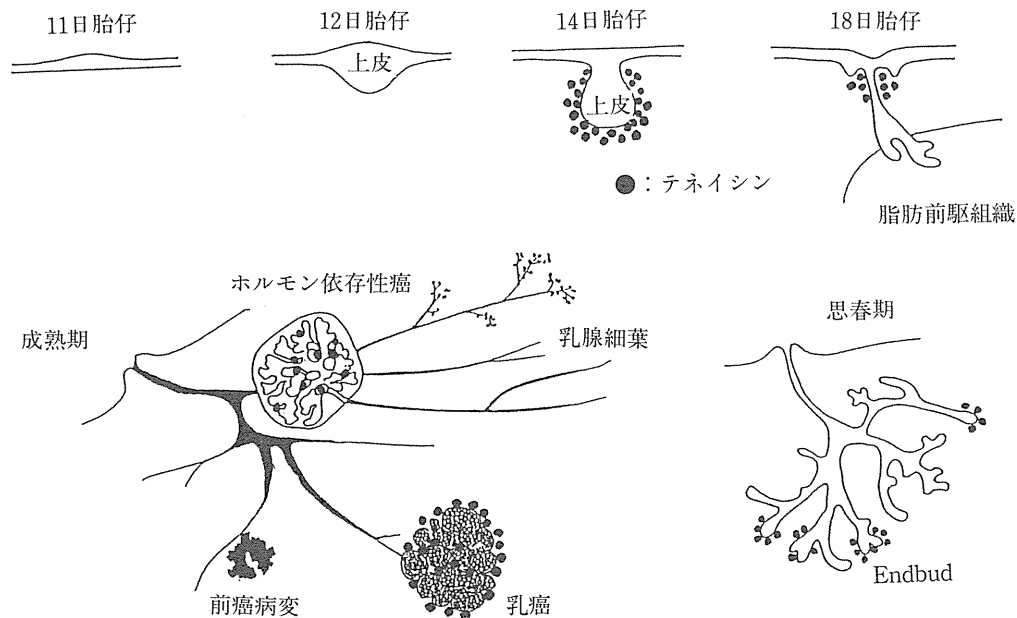


図1

b) ヒト乳癌におけるテネイシンの発現

色々なヒト乳腺腫瘍のテネイシン発現は表2に示されているように、良性腫瘍では陰性が多く、癌では陽性となるものが多い。癌でも浸潤性、非浸潤性で比較すると、浸潤性癌でテネイシンの発現が強く、悪

表2 ヒト乳癌におけるテネイシン発現

組織分類	病変数	テネイシン発現			
		—	+	++	
良性					
女性化乳房症	1 3	1 0	3	0	
線維腺腫	2 1	1 6	5	0	
乳腺症	1 2	1 1	1	0	
泌乳乳腺	2	2	0	0	
計	4 8	3 9	9	0	
悪性					
非浸潤性腺管癌	3 8	1 5	1 9	4	
浸潤性腺管癌					
硬癌	1 1 1	8	4 6	5 7	
非硬癌	5 2	9	4 0	3	
(粘液癌、髓様癌を含む)					
計	2 0 1	3 2	1 0 5	6 4	

性度との相関が認められる^{7,8)}。これらの場合テネイシンmRNAの発現はいずれも間質細胞に認められた。

c) 癌におけるテネイシン発現の誘導

生体組織では殆どの場合テネイシン産生は間質で行なわれると考えられている。マウス、ヒト乳癌でも原発巣ではテネイシンmRNAを発現しているのは間質である。しかし培養系では、多くの癌細胞がテネイシンを産生しているし⁹⁾、癌細胞が転移して別の組織で二次腫瘍を形成するときには、癌細胞自身がテネイシンを産生する(平岩他, 投稿中)。

次の実験成績はこのメカニズムを説明する一つの可能性を示してくれる。通常の培養条件ではテネイシンを産生しない癌細胞株A431或いはMCF7に胎児繊維芽細胞との共生培養によってテネイシン産生を誘導することが出来る。この場合、両細胞の接触による直接相互作用は必要でなく、胎児繊維芽細胞の産生する液性因子が重要な働きをしていることが分かっている。この因子の同定及び癌細胞のみでなく正常上皮との相互作用については現在我々の研究室で研究が進行中である。

このように生体内では癌細胞、間質細胞共に状況に応じてテネイシンを産生する。ヒト癌細胞A431をヌードマウスの皮下に注射して腫瘍を作らせ、ヒト或いはマウステネイシン特異抗体、ラミニン及びIV型コラーゲン抗体を用いて、癌細胞の作るテネイシンと間質細胞の作るテネイシンの分布を見ると前者は主に基底膜、後者は主に間質細胞間隙に沈着している。

6 おわりに

細胞外マトリックスは生体内に広く分布し、細胞間特に上皮-間質間相互作用の情報伝達を担う分子として重要性が考えられている。にも拘わらずその実態はなかなか解明されず、中には単なる糊状の詰め物に過ぎないという考え方すらある。事実、最近ES細胞を用いた相同組換えによって作製したテネイシン欠失マウスが正常に発育し、生後6ヶ月位まで特に異常が見つかっていない¹⁰⁾。生体機能の“Redundancy”を担う細胞外マトリックスという側面は今後重要な視点になると思われる。癌は自立性増殖と別の組織内

での2次腫瘍形成を大きな細胞生物学的特徴としている。いずれも個体発生過程には重要な現象で、従って癌胎児に共通の重要性を持つ細胞外マトリックスは、生体機能における安定性を産み出す柔軟性を担う物質としてその研究は新しい局面を迎えようとしている。

参考文献

- 1) T. Sakakura: New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *International Review of Cytology* **125**: 165-202, 1991
- 2) T. Sakakura, Y. Sakagami and Y. Nishizuka: Persistence of responsiveness of adult mouse mammary gland to induction by embryonic mesenchyme. *Development Biology* **72**: 201-210, 1979.
- 3) T. Sakakura, Y. Sakagami and Y. Nishizuka: Accelerated mammary cancer development by fetal salivary mesenchyma isografted to adult mouse mammary epithelium. *J. Nat. Cancer Inst.* **66**: 953-959, 1981.
- 4) Y. Sakagami, Y. Inaguma, T. Sakakura, and Y. Nishizuka: Intestine-like remodelling of adult mouse glandular stomach by implanting of fetal intestine mesenchyme, *Cancer Research* **44**: 5845-5849, 1984.
- 5) 坂倉照好: 癌における間質の胎児化。オンコロギア**21**: 57-66, 1988。
- 6) R. Chiquet-Ehrismann, E. J. Mackie, C. A. Pearson and T. Sakakura, T. Sakakura: Tenascin: An extracellular matrix protein involved in tissues interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47**: 131-139, 1986.
- 7) E. J. Mackie, R. Chiquet-Ehrismann, C. A. Pearson, Y. Inaguma, K. Taya, Y. Kwarada, and T. Sakakura.: Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4621-4625, 1987.
- 8) T. Sakakura, A. Ishihara, and R. Yatani.: Tenascin in mammary gland development: From embryogenesis to carcinogenesis. M. Lippman and R. Dickson (eds.) Kluwer Academic Publishers "REGULATORY MECHANISMS IN BREAST CANCER" 383-400, 1991.
- 9) H. Kawakatsu, R. Shiurba, M. Obara, H. Hiraiwa, M. Kusakabe and Sakakura, T.: Human carcinoma cells synthesise secrete tenascin in vitro.: *Jpn. J. Cancer Res.* **83**: 1073-1080, 1992.
- 10) Y. Saga, T. Yagi, Y. Ikawa, T. Sakakura, and S. Aizawa. Mice are normal without tenascin: Gene and development, **6**: 1821-1831, 1992.

3 胸腺微小環境における細胞間相互作用

広川 勝昱*／笠井 道之*／宇津山正典*／
倉島知恵理*／今野 愛子*

Cell interaction in the thymic microenvironment

K. Hirokawa, M. Kasai, M. Utsuyama, C. Kurashima and A. Konno

Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
35-2, Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo, 173 Japan

Abstract

The cell interaction in the thymic microenvironment is mediated either by soluble factors such as various cytokines or by direct cell to cell reaction, cognate reaction. The cognate reaction between T cell receptors of developing T cells and MHC molecule of thymic epithelial-stromal cells is the essential process for positive and negative selection of T cell repertoires, although its molecular mechanism is still not clearly understood. Various cytokines are known to be produced in the thymic microenvironment, either by epithelial cells or by non-epithelial stromal cells. Two new types of cytokines produced by thymic epithelial cells are reported in this presentation. One is proenzyme form of cathepsin L, which can promote proliferation of immature thymocytes in the presence of IL-1 and IL-7. Cathepsin L is a kind of lysozyme enzyme widely observed in many tissues, but the secretion of its proenzyme form is exclusively observed in embryonic and young thymus, but not in old thymus. The other factor can promote cell death of double positive (CD4⁺8⁺) thymocytes in vitro. The cell death caused by the factor is consistent with so-called "apoptosis", as typical DNA laddering is observed by PAGE analysis. This apoptosis inducing factor is produced by a thymic epithelial cell line (S103), established from adult thymus, but not from newborn thymus. These two types of factors showing opposite function appear to play an important role in the cell interaction in the thymic microenvironment; e. g., T cell development as well as age change of the thymus.

*東京都老人総合研究所, 免疫病理部門

I はじめに

胸腺微小環境がT細胞の分化にとって必須の場であることは今更言うまでもない。胸腺外でもT細胞の分化は起こり得るが¹⁾、その様なT細胞は表面形質も機能的にも胸腺内で分化したT細胞とは異なり、全く別の細胞集団と考えるべきであろう。胸腺微小環境のT細胞分化における役割は2つある。一つは液性因子、ホルモン、サイトカインなど因子を介した相互作用であり²⁾、もう一つは細胞膜の直接接触(Cognate Reaction)を介した相互作用である。この後者の働きはT細胞のレパートアの選択に関わる胸腺微小環境に特有の機能であり、単純な因子により置き換える事が出来ないものである。この胸腺微小環境には様々な細胞が存在し(表1)、リンパ球以外の細胞・組織はストローマと呼ばれているが、その骨格を形成し主要構成要素となるのは上皮性細胞である。胸腺上皮細胞の特徴はMHC(主要組織適合抗原複合体)のクラスIとII抗原をもち、上述の細胞の選択に深く関与する事である。胸腺リンパ球の分化は未熟なCD4⁻8⁻(DN)細胞→CD4⁺8⁺(DP)細胞→CD4⁺/CD8⁺(SP)という経路を経る。被膜下皮質のDN細胞から皮質中層のDP細胞へ分化する段階で激しく増殖し、無数のT細胞のレパートアが出来るが、その中で皮質環境にあるMHCと反応し得るT細胞受容体をもつレパートアのみが生き残り、あとは死滅の運命を辿る。すなわちポジティブセレクションである。このポジティブセレクションはT細胞のMHC拘束性獲得のプロセスであるが、胸腺微小環境におけるクラスIはCD8陽性T細胞、クラスIIはCD4陽性T細胞の選択と関連している。従って、遺伝子操作によりクラスI遺伝子を欠損したマウスでは、胸腺微小環境内にクラスIの発現がないので、CD8⁺のT細胞は発生してこない³⁾。同様にクラスII遺伝子の欠損するマウスではCD4⁺のT細胞は発生してこない⁴⁾。また、逆にタイプの異なるMHCをもつ胸腺上皮細胞を胸腺内に直接注入したあとのT細胞の分化をみると、その新しいMHCにポジティブに選択されたT細胞が末梢リンパ組織に出現する¹⁹⁾。更に自己に反応するT細胞を除くネガティブセレクションを示す実験としてはvon Boemerら⁵⁾のトランスジェニックマウスによる実験が有名である。すなわち、H-Y抗原(雄特異的組織抗原)を認識しH-2^bに拘束されたCD4⁺8⁺T細胞クローン(C57BL/6♀マウス抗C57BL/6♂マウス)からT細胞抗原受容体β鎖遺伝子(Vβ 8DJ)をクローニングし、C57BL/6マウスに導入したトランスジェニックマウスである。♀マウスでは移入したTCRβ鎖を発現するCD8⁺細胞が存在し、in vitroでH-Y/H-2^bと反応するが、H-Y抗原をもつ♂マウスで

Table 1 Cells composing the thymus

1. 構成細胞について	
a) 構築細胞	b) 遊走細胞
胸腺上皮細胞	T細胞
被膜下	B細胞
皮質内部	形質細胞
皮質血管周囲	肥満細胞
髄質	マクロファージ
ハッサル小体	樹状細胞
非上皮性のストローマ細胞	
ナーズ細胞	
特殊細胞	
筋様細胞	
粘液分泌細胞	
神経線維	
血管	

はH-Y/H-2^bと反応するCD8⁺T細胞が殆ど消失しており、胸腺内でH-Y抗原に反応するT細胞が除かれていることが示された。このネガティブセレクションのプロセスがどこで行なわれるか、その場所についてはまだ議論の多い処であるが、髄質に存在する骨髓由来のマクロファージ・樹状細胞が重要な役割を果たすという意見の方が多い⁶⁻⁸⁾。このような細胞選択がリンパ球側のTCRやCD4/8抗原と胸腺ストローマ側のMHC抗原や自己抗原との間のcognate reactionで行なわれると考えられているが、実際にどのような分子がどの分化段階で作用し、細胞が増殖分化或は死滅の方向へ向かわせられるのか、その詳細なプロセスはまだよく分かっていないのが現状である。そこで、ここでは細胞間相互作用の原点に立ちかえって、胸腺微小環境を再考し、皮質と髄質はどのように違うのか免疫組織学的見地から検討し、胸腺内におけるリンパ球とストローマの相互作用としてどのような事が起こっているのか、どのような因子が働き得るのか、最近の我々の知見を紹介してみたい。

II 皮質環境と髄質環境の違い

胸腺の皮質と髄質では存在するリンパ球の種類も機能も異なる。年齢によりその分布もかなり異なるが、皮質被膜下ではCD4⁻8⁻(DN)細胞、皮質内部ではCD4⁺8⁺(DP)細胞、髄質にはCD4⁺或はCD8⁺のシングルボ

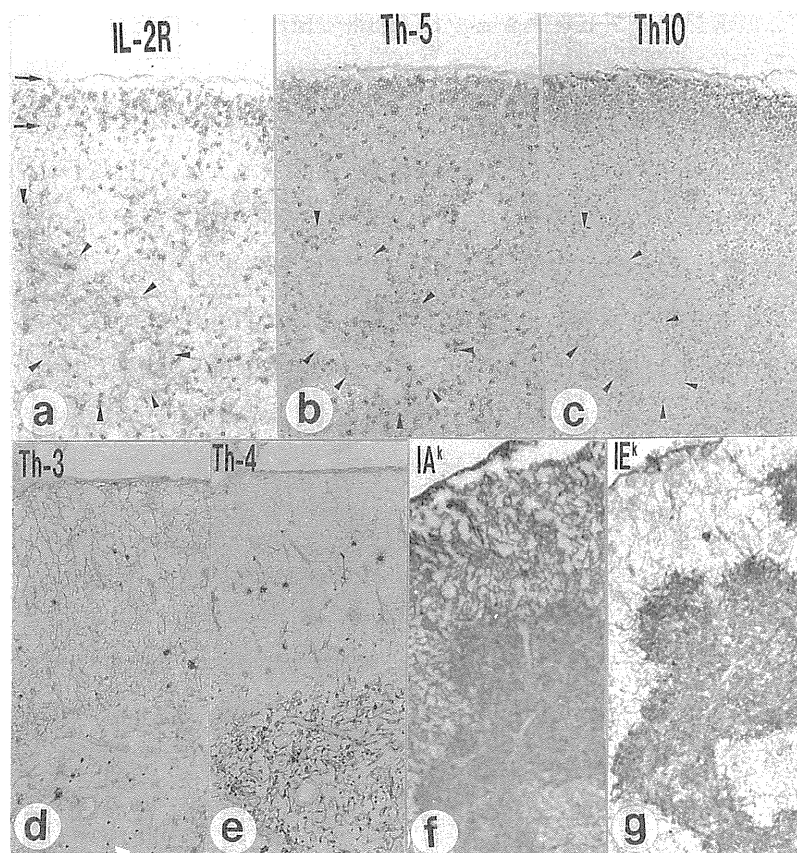


Fig.1 Immunohistology of mouse thymus.

C57BL/6マウス胸腺の免疫組織学的検索。新生仔胸腺のIL-2R α (a), Th-5(b)及びTh-10(c)による染色。Th-10はマウスのTopoisomerase-1に対する単クローン抗体で増殖期にある細胞の核と反応する。髄質部分の一部は矢印で囲んである。2重の矢印で示したところが被膜下の部分で、CD4⁻8⁻のリンパ球が層状に存在し、それらはIL-2R α とTH-5陽性であり、それらの殆どがTH10陽性で増殖期にある。(d-g)は胸腺微小環境の皮質と髄質の違いを示している。4週齢C57BL/6マウス胸腺のTh-3(d)とTh-4(e)による染色、4週齢C3Hマウス胸腺のクラスIIの抗IA(f)と抗IE(g)による染色。

ジティブ(SP)細胞がおもに存在する。被膜下のDNリンパ球は未熟T細胞のマーカーであるIL2R α (図1a) 及びTh5 (図1b)⁹⁾に強陽性である。分裂増殖期にある細胞を見てみると、DNリンパ球の殆どは分裂増殖期にあるが、皮質内部に入ると急減し、髄質に極めて少ない (図1c)。このリンパ球の分布に相応し、胸腺微小環境も皮質と髄質では全く異なる。ケラチンを染めると胸腺の基本的な骨格を形成する上皮細胞の網の目構造が見られ、そのパターンは皮質と髄質では明らかに異なる。皮質と髄質の違いは各々の上皮と特異的に反応する単クローン抗体Th-3とTh-4を使ってみるとより明らかになる¹⁰⁾。上皮細胞の分布のパターンは皮質では網の目状、髄質では疎な敷石状に細胞が分布する (図1d, e)。ラットの胸腺を発生学的に詳しく検討したCordierとHaumont¹¹⁾は皮質は外胚葉由来、髄質は内胚葉由来とした。Th-3とTh-4の各組織の反応性をみると、Th-4は外胚葉由来の皮膚表皮とも内胚葉由来の消化管上皮とも反応するが、Th-3と反応する組織は通常の成熟マウス組織では胸腺皮質以外には見られない。すなわち、胸腺の皮質上皮は上皮細胞には属するが、かなり特殊な細胞であるといえるかも知れない。胸腺上皮のもう一つの特徴はMHCクラスIとIIを発現していることである。MHCクラスII (図1f, g)で染めると皮質上皮の網の目構造が見られるが、髄質では陽性細胞は上皮細胞よりマクロファージ・樹状細胞が多いため、スメア状に見える。また、その発現の程度もIAとIE (図1f, g)では異なり、IAは皮質も髄質も同じ程度に発現されているが、IEは髄質に強く、皮質ではIAに較べずっと弱くなる。問題はこのような皮髄の違いが胸腺の免疫学的機能にどの様に反映しているか、その機能的側面を解析することである。我々は最近、胸腺上皮細胞株を使って、胸腺の皮質と髄質の機能的違いを示唆する結果を得たのでそれを次に紹介する。

III 胸腺上皮細胞株による抗原提示能力の皮質と髄質の違い

マウス胸腺から多数の胸腺上皮細胞株を樹立し、それらをTh-3陽性群と陰性群に分類し、前者を皮質上皮細胞株、後者を髄質上皮細胞群とした。次にOv-Albuminを抗原とするヘルパーT細胞のIL-2産生能を指標とし、これらの胸腺上皮細胞の抗原提示(APC)能を検索した。その結果、APC能は皮質型胸腺上皮細胞株にはなく、髄質型にのみ見られることがわかった¹²⁾ (表2)。この場合、2種類の細胞群の間で、MHCクラスII抗原の発現には差がない。MHCクラスIIにはインヴァリアント鎖が付随し、不必要な分子と結合しない様になっているが、細胞内で分解酵素の作用によりインヴァリアント鎖が処理されると、プロセスさ

Table 2 Medullary, but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells.

胸腺上皮細胞株	分類	抗原提示能力 (IL-2産生能:cpm)
1-4C18	皮質	178
1-2	皮質	95
1-2C1	皮質	427
1C8	皮質	158
1C9	皮質	134
1C6	髄質	47,902
1-3	髄質	20,902
2-3	髄質	19,026
3-10	髄質	22,709
1-2C2	髄質	18,792

れた抗原はMHCと結合し細胞表面に出て来るとされている。サイトゾール分画をとり、ウェスタンブロットで解析すると、インヴァリアント鎖は皮質髄質のどちらの細胞にも見られる。しかし、免疫細胞学的にその分布を見ると、皮質と髄質型の細胞で異なり、皮質型の上皮細胞ではインヴァリアント鎖が細胞表面にも存在するが髄質型では見られない。抗原のプロセスを必要としないペプチド抗原でも皮質上皮には抗原提示能がないので、恐らく細胞表面にあるインヴァリアント鎖がMHCによる抗原提示を阻害しているであろうと考えられる。実際にヒトの線維細胞にMHCクラスIIを発現させると抗原提示能を示すが、このときに細胞表面にインヴァリアント鎖が同時に出ると抗原提示能がなくなる²⁰⁾。このような現象は今の処、in vitroの結果であるが、in vivoの上皮にもこのような機能的な差があるとすれば、きわめて興味深い。胸腺環境はBlood-thymic-barrier (BTB)により周囲から隔絶されており、周囲にある様々の抗原に煩わされずに、T細胞の増殖分化が進行する様になっていると古い教科書には記されている。しかし、BTBは実はそれほど強固なものではなく、色々な分子が胸腺皮質内に入り得ることが最近分ってきた¹³⁾。そうだとすると、胸腺皮質内で簡単には免疫応答反応が起きないのは、抗原提示能を持った細胞が存在しないからであると考えた方が無理がない。胸腺皮質では未熟胸腺リンパ球の激しい分裂増殖が起こり、無数のレパートアが出来るが、そのときに外来の抗原が提示されるような環境であると、ポジティブセレクションがうまく行かなくなると想像される。胸腺髄質には外からの抗原は自由に入り得るし、またT細胞そのものも再循環してくることが知られている¹⁴⁾。髄質部分で起こるとされているネガティブセレクションと髄質上皮の抗原提示能の存在がどの様に関連しているかは、今の処不明である。しかし、何れにしても胸腺内におけるストローマと密接な相互作用の上に成り立っていることに間違いはない。

IV ストローマ・リンパ球間の相互作用

1 リンパ球の増殖によるストローマへの影響

a) 微小環境そのものの性質は恒常的なものではなく、個体発生上そこで増殖するリンパ球の産生する様々のシグナルにより変化する。その様な変化をSCIDマウスの胸腺で見ることが出来る。SCIDマウスの場合、幹細胞に欠陥がありT細胞の分化が起こらないが、胸腺微小環境にはT細胞を分化誘導する能力が充分保たれている。そこで、正常マウス胎仔肝の造血細胞を移入すると、Pre-T Cellsが胸腺内に移住し、そこで増殖分化が起こる。この様な実験系で正常の胸腺リンパ球の増殖が起こらない胸腺と正常に胸腺リンパ球の増殖が起きている胸腺の間でストローマにどの様な変化が起こるかを見ることが出来る。T細胞の増殖のないSCID胸腺の皮質上皮細胞はTh-3陽性の大型の円形細胞として認められるだけであるが、そこでT細胞の増殖が起きると細胞突起が蜘蛛足状に延び網の目構造を形成する上皮細胞に変化する(図2a/b)。T細胞の増殖のないSCID胸腺では髄質上皮細胞は巣状に散在するのみで、髄質形成に乏しいが(図2c)、そこでT細胞の増殖が起きるとその数が増え、明瞭な髄質形成が見られる様になる(図2d)。SCIDマウスの胸腺のクラスII(図2e)及びICAM-1(図2g)等の発現はconfluentで程度も低い¹⁵⁾が、胸腺リンパ球の増殖により皮質髄質の区別が明瞭になり発現程度も増強して来る(図2g, h)。

胸腺上皮細胞の培養株は既に多数樹立されているが、その多くは普通の状態ではクラスIIを発現しないものが多い¹²⁾。それらの細胞を γ インターフェロンで刺激するとその発現が見られるようになる。in vivoでは胸腺上皮は隣接する細胞と有機的なネットワークを形成し、また微小環境内に存在する多数のリンパ球・マクロファージなどから多くのシグナルを受けているために、自然状態でもクラスIIの発現をしている。2'-deoxyguanosineを含む培養液で胎仔胸腺を培養すると、リンパ球のない上皮細胞の塊からなる胸腺

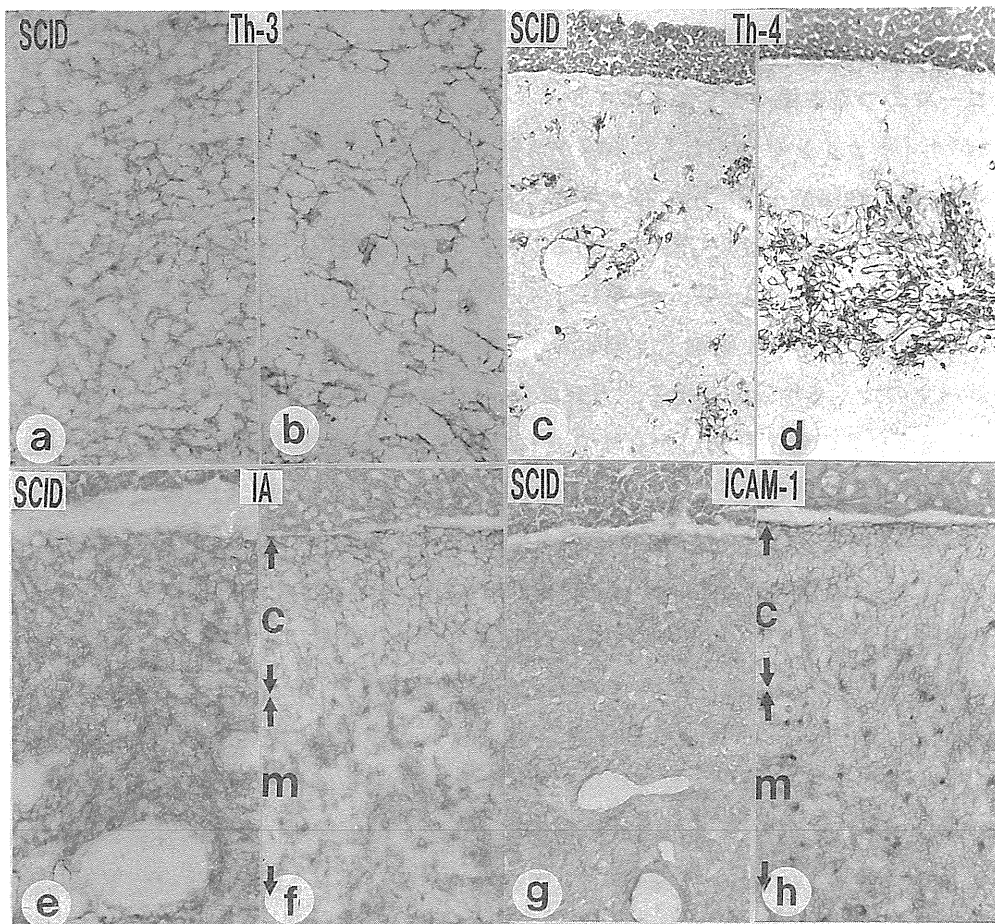


Fig.2 Immunohistology of thymus of SCID mice with or without reconstitution of fetal liver cells from BALB/C mice.

BALB/C胎仔肝造血細胞の移植により再生してきたSCID胸腺における微小環境の変化。(a, c, e, g)は未処置SCID胸腺。(b, d, f, h)が再生胸腺。(a, b)はTh-3で皮質の上皮細胞のネットワークを染色したもので、リンパ球の増殖により蜘蛛足状に延びる細胞突起がよく分かる(b)。(c, d)はTh-4で髄質上皮細胞を染色したもので、再生胸腺では髄質部が発達する(d)。(e, f)はMHCクラスII染色で、再生胸腺では皮質のネットワーク構造が発達し、髄質の発現が増強する(f)。(g, h)はICAM-1染色で、再生胸腺ではクラスIIと同様の変化が見られる(h)。

組織になる。この胸腺上皮細胞はTh-3及びTh-4との反応性を失うが、これにリンパ球の増殖が起きるとそれらの反応性は回復する。これらのいくつかの事実は上皮細胞を含めた胸腺微小環境そのものも、恒常的なものではなく、そこで増殖するリンパ球の産生する因子の影響を受けてその性質が変化することを示すものである。胸腺内におけるTリンパ球の増殖分化は個体発生とともに変化し、そして加齢変化をするが、同じ様に微小環境そのものも個体発生と共に変化し、加齢変化するのである。

2 ストローマからリンパ球への作用

T細胞を分化誘導するこの働きにこそ、胸腺の最も重要な役割が見られることになる。特にT細胞受容体(TCR)とストローマのもつMHCとの相互作用、或はその他の細胞接着分子を介した細胞間の直接の相互作用はT細胞のポジティブ或はネガティブセレクションに直接関わるものであるが、残念ながらその分子機

構はまだよく分かっていない。いま、我々の手中にあり、比較的解析し易いのは以下に述べるような胸腺微小環境で作られるいろいろな液性因子である。

a) ストローマのつくる様々のサイトカイン：

ストローマがサイトカインを作ること胸腺から樹立された多くの細胞株より¹⁵⁾、またPCR法により¹⁶⁾明らかにされてきた。胸腺微小環境内で存在することが分かっているサイトカインはIL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, M-C SF, MG-CSF等である。何れも細胞増殖因子といわれるものであるが、胸腺のみに見られるものはない。これらがどの時期に、どこで、どの様に作用するかはまだ議論の多いところであるが、ここでは我々の見つけた胸腺上皮細胞の作る新しい2つの因子について紹介する。

b) ストローマのつくる増殖促進因子、カテプシンLの前駆体(PCL)：

これはC57BL/6マウス新生仔胸腺から樹立された胸腺上皮細胞株(TEC1-4)の上清に存在するリンパ球増殖補因子として見いだされた¹⁵⁾。この補因子を精製した結果、分子量35kDaの因子(P35)がとれ、さらにそのN末のアミノ酸構造を調べた結果、カテプシンL前駆体ときわめて類似していることがわかった。そこでそのカテプシンLの前駆体に対する抗体を用いWestern Blotting法で調べた結果、P35がその抗体と反応し、胸腺及び胸腺上皮株TEC1-4の細胞抽出物にもP35と同じ物質が存在した。これらの事から、始めP35としたものはカテプシンLの前駆体(Proform of Cathepsin L: PCL)であることが明らかになった。胸腺上皮細胞の培養株の中にはIL-1, IL-3, IL-6, IL-7等をつくるものが既に報告されており、我々もIL-1を産生する細胞株を持っている。実際に培養株の樹立をしていると、サイトカインを産生する株が得られることは比較的少ないことであるが、この補因子PCLを産生する上皮細胞株は比較的容易に見られるものである。実際に、この抗体を用いて胸腺内におけるPCLの分布を調べたところ、胸腺被膜下と胸腺皮質内の血

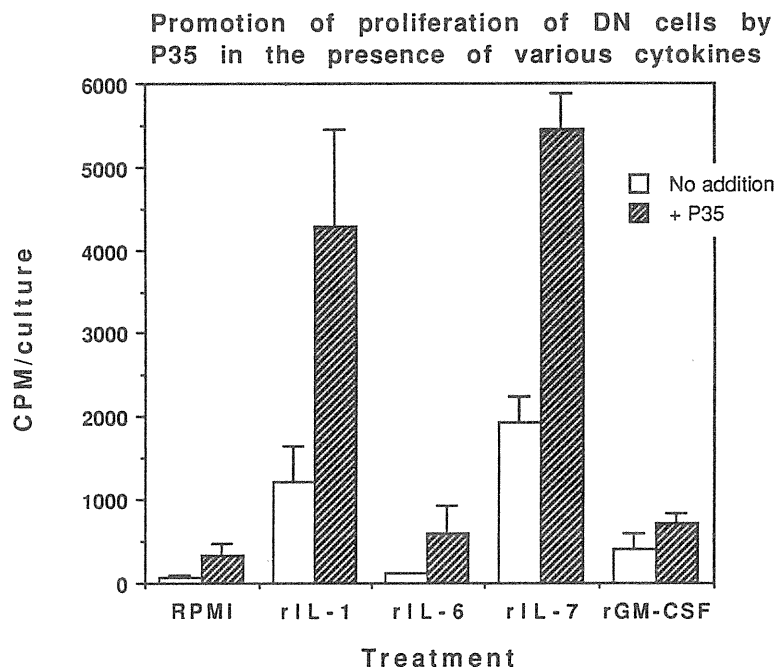


Fig.3 マウス胸腺上皮の産生する増殖補因子P35(PCL)とIL-1, IL-6, IL-7, GM-CSFとの共同作用。IL-1とIL-7による胸腺CD4⁺8⁻細胞の増殖がP35の付加により増強される。

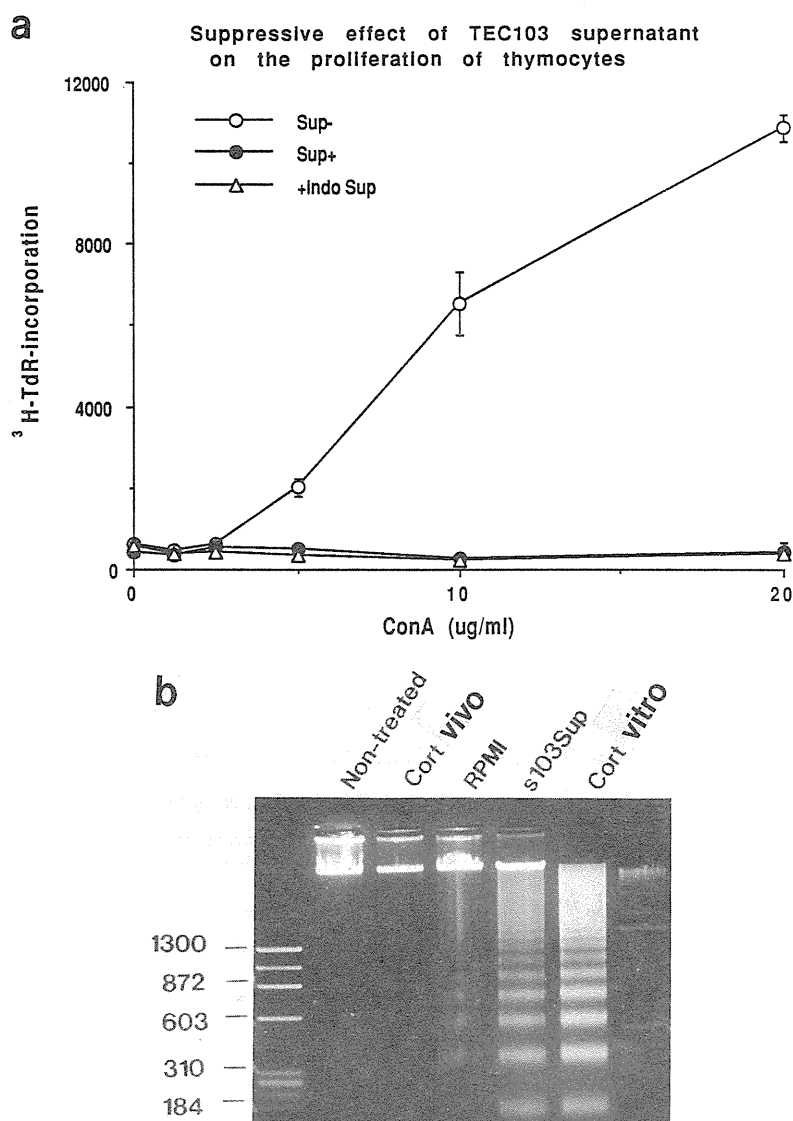


Fig.4 Apoptosis inducing factor produced by adult thymic epithelial cell line.
 (a) : S103 胸腺上皮細胞株の培養上清による胸腺リンパ球の増殖の抑制。Indomethasinの添加によっても、抑制効果は変わらないので、PGE2による抑制効果でないことは明白。
 (b) : S103胸腺上皮細胞株の培養上清に見られるアポトーシス促進因子。無処置 (Non-treated), in vivoの副腎皮質ホルモン投与例(cort-vivo)から胸腺リンパ球を調整し、DNAを抽出しても殆どラダーが見られない。無処置胸腺から調整したリンパ球をRPMI培養液のみ(RPMI), 培養上清(s103Sup)及び副腎皮質ホルモン(Cort-vitro)を加え、20時間後に見られるDNAのラダー形成。

管周囲の上皮細胞に存在することが分かった。P35或はPCLそれだけではリンパ球の増殖促進作用は殆どないが、胸腺内のCD4⁺8⁻(DN)細胞のIL-1, IL-7による増殖に際して補因子として働き3～5倍、その増殖を促進する(図3)。IL-1, IL-7共に胸腺内に存在する増殖因子であり、PCLはそれらの作用を増強するといえる。カテプシンLそのものはライソゾーム内のプロテアーゼとしていろいろな臓器に広く存在するが、プロテアーゼとしてのカテプシンLにはリンパ球に対する増殖促進作用は全くない。細胞外に分泌されproformの形で見つかるのは今の処胸腺だけであり、リンパ球の増殖に補因子として働くのは胸腺特有のことといえる。胸腺内におけるその局在(被膜下と血管周囲の胸腺上皮)から推察すると、胸腺内に移住し

てきた直後の未熟T細胞の増殖に関与しているものと考えられる¹⁷⁾。

c) ストローマのつくる細胞死促進因子

この因子も胸腺上皮細胞の培養株(TEC103)の上清に見つかったものである。PCLは新生仔胸腺からとられたが³, この細胞株TEC103は6週齢の若齢アダルトマウス胸腺から樹立されたものである(一般に、アダルト胸腺から上皮性細胞を樹立することは容易ではない)。始め、培養上清に上述の増殖促進因子があることを期待して、ConAによる胸腺リンパ球の増殖促進能力を見た。その結果、逆に増殖抑制があることがわかった¹⁸⁾(図4a)。この培養上清を胸腺リンパ球と混ぜ、20時間後にDNAの断裂状態をみると副腎皮質ホルモンと同じ程度にDNAのラダー形成が起きることが分かった(図4b)。現在この胸腺リンパ球のアポトーシスを起こす物質を精製しているところであるが、PGE₂, TGF β , TNF α の様な既存の細胞増殖抑制因子とは違うようである。胸腺上皮には上述の多数の増殖促進因子ばかりでなく、積極的に細胞死を誘導する物質を産生していることが分かってきたといってよい。リンパ球からのいろいろなシグナルを受けた胸腺上皮細胞が時と場合によって、増殖促進因子と細胞死誘導因子を使い分けるとすれば、胸腺内におけるT細胞レパートア選択のプロセスの一部が明らかになって来るかもしれない。

V おわりに

胸腺微小環境のT細胞分化における最も重要な役割はT細胞のレパートアの形成に関与していることである。そこでは分化しつつある未熟なT細胞の発現するT細胞受容体及びそれに関連した分子群と胸腺微小環境の発現するMHC及びそれに関連した分子群との間の直接相互作用(Cognate Reaction)が重要なステップであることに間違いはない。しかし残念ながら未だその詳しい分子機構はよく分かっていない。ここではその様なCognate Reactionを理解するための基礎知識として、胸腺内におけるリンパ球の分布と胸腺微小環境について、特に皮質と髄質の違い、および胸腺リンパ球とストローマの相互作用で我々の持っているデータを紹介してみた。

参考文献

- 1) Abo, T.: Extrathymic differentiation of T lymphocytes and its biological function. *Biomed. Res.* 131: 1, 1992.
- 2) 広川勝彦ら, 胸腺間質から産生されるサイトカインの多様性。臨床免疫, 24 : 697-712, 1992。
- 3) Zilstra, M. et al: β 2-microglobulin deficient mice lack CD4⁻8⁺ cytolytic T cells. *Nature* 344: 742-746, 1990.
- 4) Cosgrove D et al: The thymic compartment for positive selection of CD4⁺ T cells. *Int. Immunol.* 4: 707-710, 1992.
- 5) Von Boehmer, H., Teh, H. S. and Kisielow, P.: The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today* 10: 57, 1989.
- 6) Marrack, P. D. et al: The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell.* 53: 627, 1988.
- 7) Speiser, D. E., Schneider, R, Hengartner H, MacDonald HR and Zinkernagel RM: Clonal deletion of self-reactive T cells in irradiation bone marrow chimeras and neonatally tolerant mice. *J. Exp. Med.* 170: 595, 1989.

- 8) Mazda, O., Watanabe, Y., Gytoku, J. and Katsura, Y.: Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *J. Exp. Med.* **173**: 539-547, 1991.
- 9) Kurashima, C., Utsuyama, M., Kasai, M., Konno, A., Moriizumi, E. and Hirokawa, K.: Production of a monoclonal antibody strongly reacting with immature thymic lymphocytes and its immunohistological application. *Cell. Immunol.* **137**: 175-188, 1991.
- 10) Hirokawa, K., et al: Analysis of the thymic microenvironment by monoclonal antibodies with special reference to thymic nurse cells. *Thymus* **8**: 349-1986.
- 11) Cordier, A. C. and Haumont, S. M.: Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat.* **157**: 227, 1980.
- 12) Mizuochi, T., Kasai, M., Kokuho, T., Kakiuchi, T. and Hirokawa, K.: Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J. Exp. Med.* **175**: 1601-1605, 1992.
- 13) Nieuwenhuis, P., Stet, R.J.M., Wagenaar, J.P.A., Wubbena, A.S., Kampinga, J. and Karrenbeld, A.: The transcapsular route: a new way for (self)-antigens to by-pass the blood-thymus barrier? *Immunol. Today* **9**: 372, 1988.
- 14) Hirokawa, K., Utsuyama, M. and Sado, T.: Immunohistological analysis of immigration of thymocyte-precursors into the thymus: Evidence for immigration of peripheral T cells into the thymus medulla. *Cell. Immunol.* **119**: 160-170, 1989.
- 15) Kasai, M. and Hirokawa, K.: A novel co-factor produced by a thymic epithelial cell line: promotion of proliferation of immature thymic lymphocytes by the presence of IL-1 and various mitogens. *Cell. Immunol.* **132**: 1991.
- 16) Montgomery, R. A. and Dallman, M. J.: Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction. *J. Immunol.* **147**: 554, 1991.
- 17) Kasai, M., Shirasawa, T., Kitamura M., Ishido, K., Kominami, E., and Hirokawa, K.: Proenzyme form of cathepsin L produced by thymic epithelial cells promotes proliferation of immature thymocytes in the presence of IL-1, IL-7 and anti-CD3 antibody. *Cell. Immunol.* **150**: 124, 1993.
- 18) 今野愛子, 笠井道之, 久保幸穂, 宇津山正典, 倉島知恵理, 広川勝豊: 胸腺上皮細胞株が産生する胸腺細胞のアポトーシス促進因子について. 第22回日本免疫学会, 1992.
- 19) Vukmanovic, S., Granda, III A. G., Faas, S. J., Knowles, B. B. and Bevan, M. J.: Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* **359**: 729-732, 1992.
- 20) Roche, P. A., Teletski, C. L., Karp, D. R., Pinet, V., Bakke, O. and Long, E. O.: Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* **11**: 2841-2847, 1992.

V 白血病発症機構

- 1 放射線誘発胸線リンパ腫の前リンパ腫細胞のクローナリティの分析とがん化の初期過程の解析へのアプローチ 武藤 正弘
- 2 白血病におけるp53遺伝子の変異 杉本 耕一
- 3 急性前骨髄球性白血病 田代 聡 他
- 4 リンパ腫における*BCL-1*, *BCL-2*遺伝子の役割 瀬戸 加大

1 放射線誘発胸腺リンパ腫の前リンパ腫細胞のクローナリティの分析とがん化の初期過程の解析へのアプローチ

武藤 正弘*

Analysis of the Clonality of Prelymphoma Cells and Approach to the Study of Initial Events on Radiation-induced Lymphomagenesis

Masahiro Muto

Division of Physiology and Pathology, National Institute of Radiological Sciences,
4-9-1, Anagawa Inage-ku, Chiba, 260 Japan

Abstract

With a combined use of cell separation by cell sorter and intrathymic injection assay, we found that the main target cells for radiation-induced thymic lymphomagenesis are DN ($CD4^-CD8^-$), CD8SP ($CD4^-CD8^+$), and DP ($CD4^+CD8^+$) cycling immature, J11d⁺ thymocytes. After leukemogenic irradiation, the thymocytes expressing TL-2 antigen which is not expressed on normal thymocytes of the B10 mice occur from these immature cycling thymocytes, and the prelymphoma cells develop infrequently from these TL-2⁺ cells. To analyze the clonality of prelymphoma cells and to construct the experimental system for investigating the initial events of radiation-induced lymphomagenesis, limited numbers of TL-2⁺ thymocytes from individual irradiated mice (A-H) were injected into thy 1 congenic mice intrathymically, and DNA from the donor type T cell lymphomas was analyzed by Southern blot analysis and examined the DNA sequences of V-J junctional sites.

During the last decade, many oncogenes and tumor suppressor genes or translocations in neoplasia have been identified and the function of these genes have been investigated extensively. However, it is difficult to evaluate which alteration plays an important role in oncogenesis at the initiation, promotion or progression level. Since the rearranged TCR (T cell receptor) gene is a very useful indicator of clonal origin and the TCR rearrangement is a sequential process and unique to the progeny of each clone, one of the strategies for investigating the oncogenic processes is to analyze both the alteration of the genes or

*放射線医学総合研究所生理病理研究部

chromosomes from lymphomas derived from a single donor by intrathymic injection of limited number of prelymphoma cells and the patterns of TCR rearrangements of these lymphomas. The results of the rearrangement patterns of γ and β T cell receptor genes and the nucleotide sequences of the $V\gamma$ -J γ junctions suggest that after leukemogenic irradiation, multiple pre-neoplasia might occur from some of the TL-2⁺ cells and only a proportion of induced pre-neoplastic cells (prelymphoma cells) may convert to malignancy. Novel rearrangements of $V\gamma$ 4 with non- γ elements were observed in these lymphoma cells.

1. はじめに

白血病は、放射線により誘発される人間の腫瘍の中で、頻度の高いものの1つである。この白血病の動物モデルとしてのマウスの放射線誘発白血病は、古くから研究されているが、それがどのようにして発生してくるかは、まだよく解明されていない。

B10系やC57BLマウスを、1ヵ月齢から1.61Gy 4回8日ごとに照射(FX)すると、その個体の胸腺に高率(95%以上)に胸腺リンパ腫が生じる¹⁻²⁾。これらの実験系における発がんの分子レベルでの機構を解明するためには、腫瘍が発生する個体における細胞レベルでの知見が不可欠である³⁻⁹⁾。これまでにB10.Thy 1コンジェニックマウスを使用して放射線誘発胸腺リンパ腫の発生過程で、前がん細胞である前リンパ腫細胞が、照射後かなり早い時期(4-8日目)に胸腺内に生じ、照射後21-31日目には63%以上の個体の胸腺に検出されることを明らかにしてきた⁹⁾。ここで述べた前リンパ腫細胞は、胸腺環境下では増殖してやがてリンパ腫になるが、腹腔では増殖出来ない細胞として定義した。これに対して胸腺リンパ腫細胞は、胸腺や腹腔内いずれにおいても、自律性増殖を示す。

ここでは、セルソーターによる細胞分離と胸腺内移植法を使用して、前リンパ腫細胞を解析し、さらに照射個体の胸腺細胞中の前リンパ腫細胞の頻度を、限界希釈法を使用して分析した結果を述べる。またT細胞リセプターの種々のprobeを使用して、Southern法による遺伝子再配列の解析やVJ結合領域のDNA配列の分析を行なって、前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した。この実験系において、T細胞リセプターの遺伝子再配列の分析と種々のがん化にともなう変化とを比較することにより、発がん過程においてそれらの変化が生じた時期を推定する方法について述べる。

2 前リンパ腫細胞の特性

X線照射後、種々の時間後に胸腺細胞を調整し、抗TL-2抗体¹⁰⁾とJ11d抗体¹¹⁾で二重染色して、フローサイトメトリーで分析した(図1)。図1に示すように正常のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞は、J11d⁺TL-2⁻とJ11d⁻TL-2⁻細胞集団から構成されているが、X線照射後24日目や115日目のマウスの胸腺細胞では、J11d⁺TL-2⁻とJ11d⁻TL-2⁻細胞以外にJ11d⁺TL-2⁺細胞集団が出現していることが明らかになった¹⁰⁾。前リンパ腫細胞の表面抗原の特性を調べるために、照射後1ヵ月目のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞を抗TL-2とJ11d抗体で染色し、セルソーターでJ11d⁺TL-2⁺、J11d⁺TL-2⁻、J11d⁻TL-2⁻細胞重集団に分離した。これらの細胞(10³または10⁴)を、3.78Gy照射したB10.Thy 1.2マウスの胸腺内に移植し、移植後5-6ヵ月後に発生してきたリンパ腫について、抗Thy 1.1または抗Thy 1.2抗体で染色して分析し、供与者由来のT細胞リンパ腫の発生頻度を決定した。これらの結果から、前リンパ腫細胞はJ11d⁺TL-2⁺胸腺細胞の中に存在していることが明らかになった(Table 1)。同様に抗CD4抗体¹²⁾と抗CD8抗体により照射個体の胸腺を染

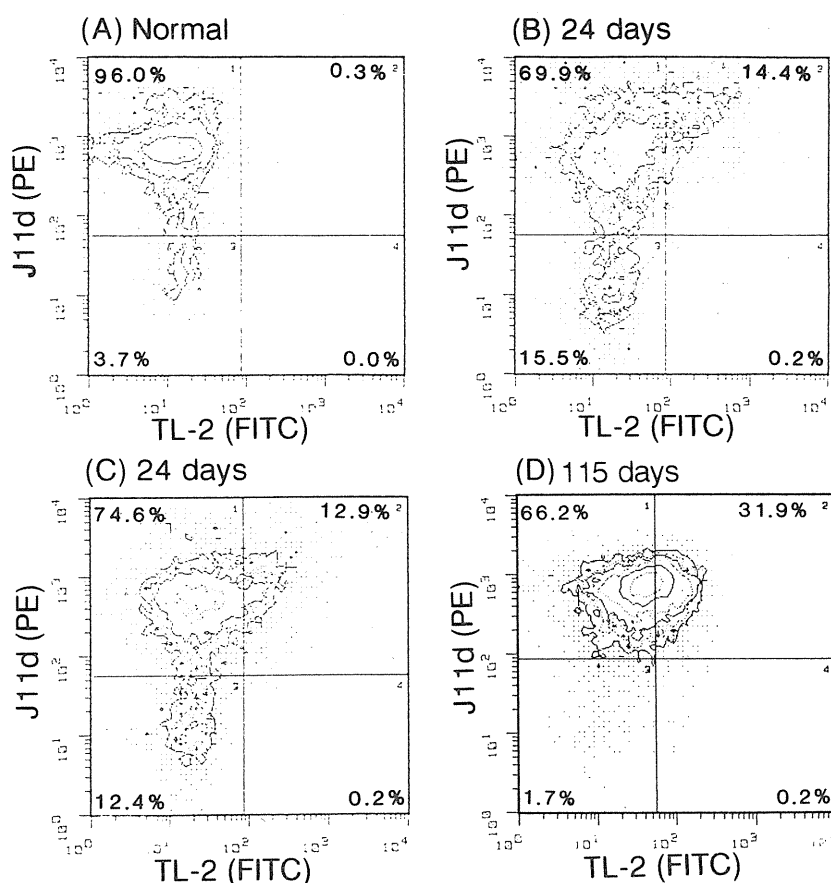


Fig.1 Analysis of J11d vs TL-2 expression on thymocytes at various times after split-dose irradiation. Thymocytes recovered from mice on day 24 (B, C) and day 115 (D) after split-dose irradiation and from normal mice (A) were stained with against the J11d marker and TL-2 antigen. The percentages of cells contained in populations 1 through 4 are shown. (from ref. 7).

Table 1 Incidence of donor type T cell lymphomas after intrathymic injection of thymocyte fractions with regard to the J11d marker and TL-2 antigen.

Sorted cells ^{a)}	Thymic lymphomas					
	Donor type			Host type		
	10 ⁴	10 ³	Total ^{b)}	10 ⁴	10 ³	Total ^{b)}
J11d ⁺ TL-2 ⁺	4/4	3/4	7/8 ^{c)}	0/4	0/4	0/8 ^{c)}
J11d ⁺ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8	0/4	1/4	1/8
J11d ⁻ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8

^{a)} Thymocytes were taken from 12 B10.Thy 1.1 mice 1 mo after split-dose irradiation and stained with mAb against J11d marker and TL-2 antigen. These stained cells were sorted into three fractions (J11d⁺TL-2⁺, J11d⁺TL-2⁻, J11d⁻TL-2⁻).

^{b)} These sorted cells (10⁴ or 10³ cells) were injected intrathymically into 3.78 Gy-irradiated B10.Thy 1.2 mice, after which the incidence of donor- or host-derived T cell lymphomas was determined.

^{c)} Number of T cell lymphoma-bearing mice/total number of mice tested. (from ref. 7)

Table 2 Incidence of donor type T cell lymphomas developed in the recipient thymuses.

Irradiated individual donor mice	No. of TL-2 ⁺ cells inoculated ^{a)}				Frequency of prelymphoma cells in TL-2 ⁺ cells
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
No. 1 (D1-D6)	0/4	2/4 (D5,D6)	4/4 ^{b)} (D1-D4)	ND	6.8 x 10 ⁻⁴
No. 2 (A1-A7)	ND ^{c)}	ND	3/4 (A5-A7)	4/4 (A1-A4)	1.4 x 10 ⁻⁴
No. 3 (B8-B10)	ND	ND	0/4	3/4 (B8-B10)	1.4 x 10 ⁻⁵
No. 4 (E7-E11)	ND	ND	3/4 (E10,E11)	4/4 (E7-E9)	1.4 x 10 ⁻⁴
No. 5 (F1-F4)	ND	ND	4/4 (F3,F4)	4/4 (F1,F2)	>6.8 x 10 ⁻⁴
No. 6 (G5-G10)	ND	ND	2/4 (G9,G10)	4/4 (G5-G8)	6.8 x 10 ⁻⁵
No. 7 (H11,H12)	ND	ND	0/4	2/4 (H11,H12)	6.8 x 10 ⁻⁶
No.8-No.14	ND	0/4	0/4	0/4	<6.8 x 10 ⁻⁷

a: Thymocytes were taken from individual B10.Thy 1.1 mice (No.1-No.14) 28 days after FX and stained with the anti TL-2 mAb. The TL-2⁺ cells (10²-10⁵) from individual mice were injected intrathymically into B10.Thy 1.2 mice.

b: Incidence of donor type T cell lymphomas was examined in a group of 4 recipient mice.

c: ND, not determined.

く、TL-2陽性細胞の中から頻度の低い確率で、何らかのがん化への変化が生じて前リンパ腫細胞になることを示している¹³⁻¹⁴⁾。

4. 前リンパ腫細胞のクローナリティ

次に発がんの機構を考える上で重要な点は、このようながん化のイニシエーションの生じる細胞は、1つの細胞から由来するのか、またはいくつかの細胞にがん化のイニシエーションが生じ、悪性化の段階でselectionが働いてsingle cloneとなるのかという点である。このために20個体について、個体別にTL-2陽性細胞を分離し、限界希釈したこれらの細胞を、宿主の胸腺に移植した。この内7個体からの細胞から供与者由来のT細胞リンパ腫が36例生じた。そこでこれらのリンパ腫からDNAを抽出分離し、DNAを種々の制限酵素で消化し、種々のT細胞リセプターのprobeを使用して、Southern法で解析した。DNAをEcoRIで消化した場合、 γ 遺伝子については多くのリンパ腫で、V γ 4J γ 1の16.7kbやV γ 2J γ 2の15.8kbの共通のバンドが認められたが、 β 遺伝子については、J β 1やJ β 2などのprobeを使用して解析すると異なったバンドが、それぞれの個体から由来するリンパ腫の中で見られた(図3)。クローナリティについて、さらに詳しく調べるために、照射後28日目の1個体のTL-2陽性細胞を10⁴または10³移植して、宿主の胸腺から発生し

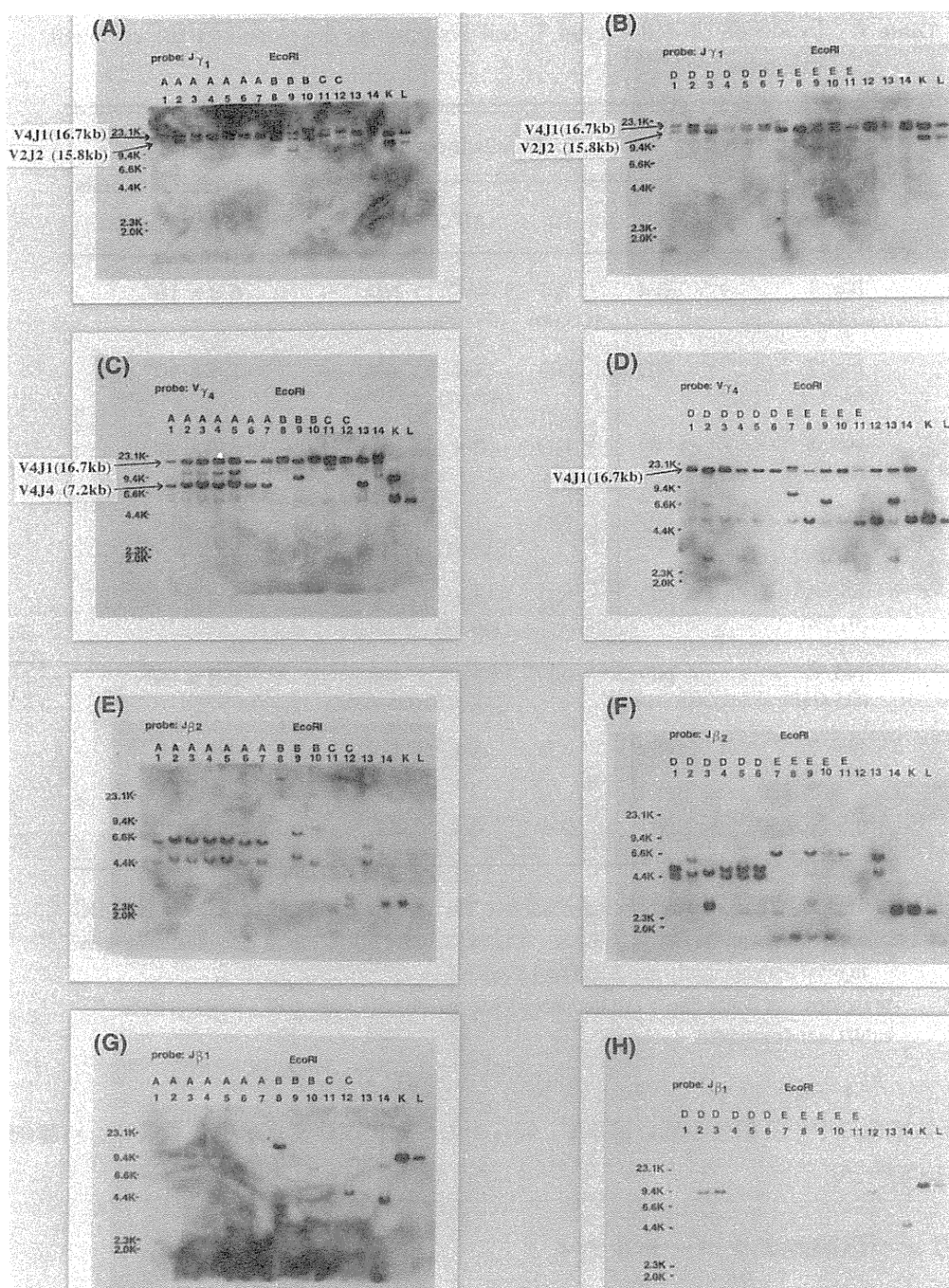


Fig.3 Southern blot analysis of TCR gene rearrangements.

The donor type T cell lymphoma DNAs were digested with EcoRI, subjected to electrophoresis, and hybridized with the germline DNA probes J γ 1 (A, B), V γ 4 (C, D), J β 2 (E, F), J β 1 (G, H). Lanes A1-A7, B8-B10, C11-C12, D1-D6, E7-E11 were DNAs of the donor-derived T cell lymphomas from individual A, B, C, D, E as shown in Table 2. Lane K; B10 kidney DNA, Lane L: B10 liver DNA. HindIII-cut λ DNA size markers are indicated in kb on the left.

てきたD1-D6の6例の供与者由来T細胞リンパ腫について、 γ 遺伝子再配列結合領域のDNAシーケンシングを行った。その結果、V γ 4J γ 1やV γ 2J γ 2の結合領域では、6例の内2例(D2, D3)の結合領域のDNA配列が³、他(D1, D4-D6)のDNA配列と異なっていた(図4)。 β 鎖については、D2, D3とD1, D4-D6が異なる

Nucleotide Sequences of V γ -J γ Coding Joints of DNA Clones isolated by PCR Amplification from Thymic lymphomas D1 to D6

	GLV4 GLJ1	CGGGATCCAATATATTCCTTGGAGGAAG-14bp-TACTACTGTTCCTACGGCTAAAGCAGCA CACTGTGATAGCTCAGGTTTTTC-68bp-TTCCAGTGATGAAAAGAACAGAATTCCG	RF	No of clones
D1		TT	+	3
D2		CCACTA	-	3
D3		GGAT	-	3
D4		TT	+	5
D5		TT	+	3
D6		TT	+	3

	GLV2 GLJ2	CGGGATCCAATAAATTACTTGAAGAAA-14bp-CTACTACTGTGCAGTCTGGATGAGCACAAC CACTGTGATAGCTCGGGCTT-61bp-TTCCAGTGATGAAAAGAACAGAATTCCG	RF	No of clones
D1		GAT	-	3
D2		T	-	3
D2		TATAGCG	-	1
D3		G	+	4
D3		GT	-	3
D4		GAT	-	3
D5		GAT	-	3
D6		GAT	-	3

Fig.4 Nucleotide sequences of the V-J junctions of the γ -genes from D1-D6 thymic lymphomas.

った遺伝子再配列バンドを示していた。 α 遺伝子については、それぞれのリンパ腫からRNAを抽出し、cDNAを合成して、ライブラリーを作り、 $C\alpha$ をprobeにしてクローニングを行い、DNA配列を決定した結果、それぞれのクローンは $V\alpha$ と $J\alpha$ の異なった組合せの配列をしていた。以上の結果は、照射後初期においてmultipleに前リンパ腫細胞が生じるが、それが胸腺環境下で増殖していく過程で、1つの前がん細胞が選ばれてそれが最終的にmalignant T cell cloneとなることが示された。

5. 発がん過程におけるがん抑制遺伝子の解析および転座の研究

これまでに数多くのがん関連遺伝子やがん抑制遺伝子が分離同定され、機能的研究や、がん化によるこれらの遺伝子変化の研究が多くなされて来ている。しかしながら、これらの変化が、がん化の初期に生じたものか、後期の悪性化の段階で生じたものかを同定するのは大変難しい問題である。これらの問題に挑戦する1つの方法は、前に示した1つの個体の前リンパ腫細胞から発生したdonor由来T細胞リンパ腫について、T細胞リセプターの遺伝子再配列のパターンと、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変化を比較解析することである。

1つの例として、前に述べたDという1個体のマウス由来のT細胞リセプターについては、図3と図4の結果から、D1およびD4-D6については、 γ と β T細胞リセプターの遺伝子再配列パターンが一致していたので、これらはsingle cell originであろうと推定される。この実験系のD1からD6について、p53遺伝子やras遺伝子の変化および染色体の変化を調べた時に、もしそのがん化による変化が共通にあれば、がん化の初期に生じたものと推定されるし、D1、D4-D6のリンパ腫で共通で、D2やD3では異なっていれば、その変化は γ や β のT細胞リセプター遺伝子再配列が生じた時期とかなり近い時期に生じた変化であると推定出来る。またD1-D6の間で、その変化がそれぞれ異なっていた場合は、がん化の後期で生じたものであると推定出来る。

(a)V γ 4遺伝子の転座の可能性

Table 2で示したDonor由来リンパ腫からDNAを抽出しEcoRIで消化後、Southern法で解析すると、例えばA群では、16.7kbのV γ 4J γ 1のバンドおよび7.4kbのV γ 4J γ 4のバンドが認められる(図3, C)が、それ以外にA2-A5, A7は10.5kbの説明のつかないバンドが認められた。これは1つの可能性として、V γ 4遺伝子が他の遺伝子に転座していることが考えられる。他の群でも、図5に示すようにV γ 4遺伝子の転座の可能性を示唆するバンドが検出された(図5)¹⁵⁾。今後はこれらの可能性を確認するためにFISH (fluorescence in situ hybridization)等の技術を使用して、転座が生じているかどうか検討していく予定である。

A	A2-A5, A7:	V γ 4X1 (EcoRI, 10.5kb)
B	B8, B10 :	V γ 4X2 (EcoRI, 21kb)
	B9 :	V γ 4X3 (EcoRI, 9kb)
C	C11 :	V γ 4X2 (EcoRI, 21kb)
E	E7 :	V γ 4X4 (EcoRI, 18.5kb)
		V γ 4X5 (EcoRI, 9.5kb)
	E9 :	V γ 4X6 (EcoRI, 6.8kb)

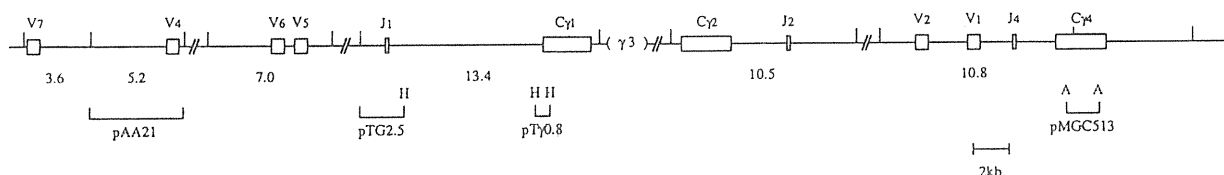


Fig.5 Novel Rearrangement of V γ 4 with Non- γ elements

(b)p53抑制遺伝子の解析

最近がんの発生・進展の過程が遺伝子レベルで解明されつつあり、細胞の増殖・がん化に対して、促進的に働くがん遺伝子と抑制的に働くがん抑制遺伝子の異常が複雑に重なりあって、がん細胞の性状を規定していることがわかってきた。特にp53がん抑制遺伝子は、細胞周期やがん化にともなう遺伝子不安定性とも関係していることが最近解明されつつあり、がん化に関係する遺伝子として、p53は最も重要な遺伝子の1つである。そこで今回は上記に述べた実験系で、p53の変異が生じているかどうか、Southern法による解析を行った結果、いくつかのT細胞リンパ腫においてp53の遺伝子再配列が見られた。さらに詳しい解析を行うために、p53の各エクソンについてPCR-SSCP法で現在解析を行っている。

謝 辞

ここに述べた研究は、久保あゐ子氏(放医研)、佐渡敏彦博士(放医研)、山岸秀夫博士(京大、理)、清水建之博士(京大、理)との共同研究である。胸腺リンパ腫に関する我々の研究は、動植物管理課の協力のもとに放医研で育成、生産されたB10.Thy 1コンジュニクマウスを使用して行ったものである。本稿執筆の機会に、関係者の方々に心から謝意を表したい。

[研究発表]

- 1) Kaplan, H. S., and Brown, M. B. A quantitative dose-response study lymphoid tumor development in irradiated C57 black mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **13**, 185-208, 1952.
- 2) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H., and Kubo, E. (1983) Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy 1 congenic donors. *Cancer Res.* **43**: 3822-3827.
- 3) Muto, M., Kubo, E., and Sado, T. Cellular events during radiation-induced thymic leukemogenesis in mice: Abnormal T cell differentiation in the thymus and defect of thymocyte precursors in the bone marrow after split-dose irradiation. *J. Immunol.* **134**, 2026-2031, 1985.
- 4) Defresne, M. P., Rongy, A. M., Greimers, R., and Boniver, J. (1986) Cellular aspects of radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice: Alterations to thymic microenvironment and lymphopoiesis. *Leukemia Res.* **10**: 783-789.
- 5) Boniver, J., Decleve, A., Lieberman, M., Honsik, C., Travis, M. and Kaplan, H. S. (1981) Marrow-thymus interactions during radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice. *Cancer Res.* **41**: 390-392.
- 6) Muto, M. Kubo, E. and Sado, T. (1987) Development of prelymphoma cells committed to thymic lymphomas during radiation-induced thymic lymphomagenesis in B10 mice. *Cancer Res.* **47**: 3469-3472.
- 7) Sado, T., Kamisaku, H. and Kubo, E. International Symposium on "Radiation Carcinogenesis in the Whole Body System" Tokyo, 1990, 12.
- 8) 武藤正弘, 佐渡敏彦(1986) 放射線誘発胸腺腫発生機序研究へのB10.Thy 1 congenicマウスの利用実験医学, Vol.4, No.1, 80-86
- 9) 武藤正弘, 久保えい子, 佐渡敏彦(1988) 放射線誘発胸腺リンパ腫の研究, 放射線科学, Vol.31, No.6, 178-186。
- 10) Muto, M. Kubo, E. Kamisaku H. and Sado, T.(1990) Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* **144**, 849-853.
- 11) Crispe, I. N. and Bevan, M. J. (1987) Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *J. Immunol.* **138**: 2013-2018.
- 12) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M., and Fitch, F. W. (1983). Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L₃T₄, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L₃T₄ to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.* **131**: 2445-2451.
- 13) Muto, M. Kubo, E. Sado, T. Yamagishi, H.(1991) Characterization of thymic prelymphoma cells that develop during radiation-induced lymphomagenesis in B10 Mice. *J. Radiat. Res., Supplement* **2**, 156-167.
- 14) Muto, M. Kubo, E. Sado, T. Shimizu, T. and Yamagishi, H.(1992) Characterization and clonality of prelymphoma cells of B10 mice treated with fractionated X-irradiation (FX). *Proc. Int. Conf. Radiat. Effects and Protection*, 1992, 198-205.
- 15) Kubo, E. Muto, M. Sado, T. Takeshita, S. Shimizu, T. and Yamagishi, H.(1992) Novel TCR gene rearrangements and expression in radiation-induced Thymic lymphomas. *J. Radiat. Res.*, **33**, 227-242.

2 白血病におけるp53遺伝子の変異

杉本 耕一*

Mutations of the p53 gene in human leukemia cells

Koichi Sugimoto, M. D.

The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Abstract

The p53 gene is currently thought to be a tumor suppressor gene, and its alterations have been suggested to be involved in the pathogenesis of several human malignancies. We studied 14 patients with acute leukemias for p53 gene alterations using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, and nucleotide sequencing. Two patients with acute lymphoblastic leukemia and one with Waldenström's macroglobulinemia had mutations in the conserved regions of the p53 coding sequence. Expression of the wild-type p53 mRNA was not detected in these three patients. The probable absence of normal p53 function in the three cases studied here suggests that alterations in the p53 gene may occasionally play a role in MDS. Nine human myeloid leukemia cell lines were also studied by the RT-PCR/SSCP analysis and eight cell lines were revealed to express no or only mutant p53 mRNA. Our results suggest that inactivation of the p53 gene is common feature in myeloid leukemia cell lines and may play an important role in the establishment of cell lines. Furthermore, we analyzed p53 gene mutations in 50 patients with various stages of MDS. Three patients with MDS (2 RAEB and 1 RAEB in T) had missense point mutations in the conserved regions of the p53 coding sequence and lacked the wild-type p53 mRNA expression. Though the incidence of the p53 gene mutations in MDS is low, inactivation of the p53 gene occurs in more advanced stages of MDS.

*東京大学医学部第3内科

1 はじめに

p53は、SV40でトランスフォームした細胞においてラージT抗原と免疫共沈する53kDのリン酸化核蛋白質として発見された。SV40によるトランスフォーメーションに必須のラージT抗原と相互作用すること、癌細胞では正常細胞に比べしばしば発現量が多いことから、p53は癌化に重要な役割を果たすことが予想された。実際、p53遺伝子を活性型H-ras遺伝子とともに初代培養ラット繊維芽細胞に導入すると、細胞の形態がトランスフォームすることから、p53遺伝子は癌遺伝子の一種と考えられた。しかしながら、その後の検討により腫瘍化を起こすのはアミノ酸置換を伴った変異型であることが判明し、野生型のp53は活性型ras遺伝子と変異型p53遺伝子によるトランスフォーメーションを抑制することが明らかにされた。野生型p53によるトランスフォーメーション抑制効果は、活性型rasとmycあるいは活性型rasとアデノウイルスE1Aの組み合わせに対しても認められ、これらの実験結果からp53遺伝子が癌抑制遺伝子として働く可能性が示唆された。

ヒトp53遺伝子が位置する17番染色体短腕は、大腸癌、肺小細胞癌、乳癌などでしばしば欠失することが報告されていたが、1989年には、大腸癌において、RFLP分析によりp53遺伝子が共通の欠失領域内に存在することが示された。さらに詳細に検討された2例で残った相同染色体上のp53遺伝子が点突然変異によって不活性化されていることが明らかにされた。これに続いて肺癌、乳癌、神経膠腫等においても、大規模な構造変化、欠失、点突然変異などにより相同染色体上の両方のp53遺伝子が不活性化されていることが報告されている。現在では、p53遺伝子はその正常機能が失われることが種々の腫瘍の発症に関与する代表的な癌抑制遺伝子と考えられている。

白血病の遺伝子変化として、これまでに急性白血病や骨髓異形成症候群(MDS)におけるras遺伝子の点突然変異による活性化、慢性骨髄性白血病(CML)のt(9;22)転座によるabl遺伝子の活性化などが報告された。このような癌遺伝子の活性化が白血病の発症過程で重要な役割を果たすことが明らかになりつつあるが、これだけで白血病の発症進展を十分に説明することはできない。近年のVogelsteinらの大腸癌の発生機構の研究から、発癌は多段階ステップで起こり、癌遺伝子の活性化のみならず、癌抑制遺伝子の不活性化が関与すると考えられる。白血病においても、これまでにAhujaらをはじめ複数のグループが、CMLの急性転化時におけるp53遺伝子の構造及び発現の変化を報告している。

我々は白血病におけるp53遺伝子の関与を調べる目的で、RT-PCR法により急性白血病、MDS患者の骨髓検体および白血病細胞株中のtotal RNAから目的とするp53 cDNA断片を増幅し、得られたDNA断片中の変異をSSCP法を用いて検討した。SSCP法は、cDNA断片を高温で変成させて1本鎖とした後、グリセロール添加または低温の中性ポリアクリルアミドゲル中で泳動させる方法である。1本鎖DNA断片は中性の非変成条件下では安定な立体構造をとって泳動されるが、断片中に変異が存在すると立体構造に影響を及ぼし、泳動度が変化するために、これを検出することが可能である。

2 急性白血病検体におけるp53遺伝子の変異

これまでの大腸癌、肺小細胞癌、乳癌などにおける検討から、p53 cDNAのコーディング配列中に突然変異の集積する4つの領域が存在することが明らかにされている。この4つの領域は種を越えてよく保存されていることから、p53の機能発現において重要であることが想定されている。SSCP法は400-500bpまでの大きさのDNA断片において有効に突然変異を検出できるため、この4つの領域をカバーする650bpの

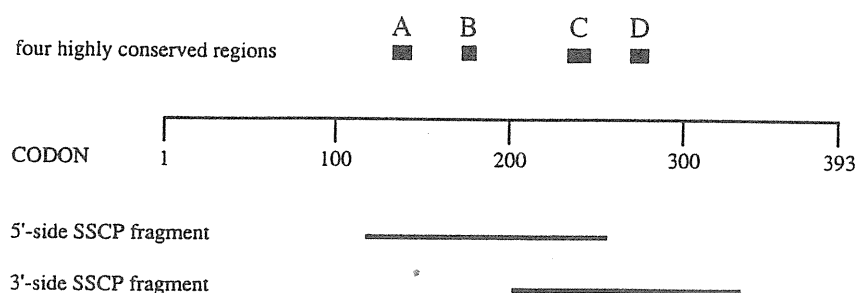


Fig.1 Strategies for amplification of p53 gene sequences.
 5'-and 3'-side p53 cDNA fragments are indicated by the black bars.
 Positions of the primers for PCR were designed to include four highly conserved regions in the p53 coding sequence indicated by the black rectangles marked A through D.

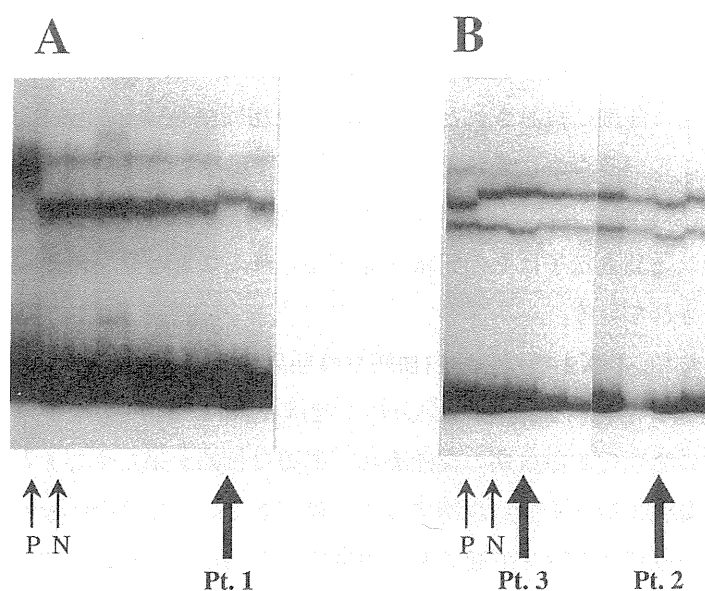


Fig.2 SSCP analysis of the 5'-and 3'-side p53 cDNA fragments.
 (A) 3'-side SSCP. The lane at the left end (P) shows positive control. The next lane (N) shows negative control. The arrow points to the aberrantly migrating fragments of patient 1.
 (B) 5'-side SSCP. The lanes (P) and (N) show positive and negative controls, respectively. The arrows point to the aberrantly migrating fragments of patients 3 and 2.

RT-PCR産物をsecond PCR反応で2つに分けて増幅し(図1の5'側および3'側p53 cDNA断片), SSCP解析により変異の有無を検討した。

14例の急性白血病検体(骨髄性6例, リンパ性8例)の5'側および3'側cDNA断片を室温で10% glycerolを含む非変性ゲル中で泳動して, SSCP解析を行った結果を図2に示す。3'側のSSCP解析では症例1において, 5'側のSSCP解析では症例2および3において正常コントロールとは異なる泳動像が得られ, これらの症例のp53 cDNA断片中に何らかの変異が存在することが予想された。また, これらのレーンでは正常な移動度を示す断片がみられないことから, この3症例の白血病細胞においては野生型 p53

Table 1 Patients with p53 Gene Mutations

Pt.	Diagnosis	Blast (%)	Karyotype	Mutation		
				Codon	Nucleotide	Amino acid
1.	Pre-B cell ALL	80	Normal	276	GCC→CCC	Ala→Pro
2.	null-cell ALL	99	[46, XY, 6q-, 17p-]	190	Deleted CCT	Deleted Pro
3.	Waldenström's macroglobulinemia	90	[46, XY, -1, -6, -16, 3p-]	239	Inserted a T	Asn→Stop

mRNAの発現が全くないか、または変異型p53 mRNAに比べてごくわずかであることが示唆された。健常者32例では、泳動度の変化はみられなかった。

症例1の3'側p53 cDNA断片の塩基配列を直接シーケンス法により決定すると塩基826番のグアニンがシトシンに変化しており、対応するコドン276番はアラニンからプロリンに変わることが予想された。症例2ではCCTの3塩基欠失のためにコドン190番のプロリンの欠失が予想された。症例3では塩基714番と715番の間にチミン塩基が挿入されてコドン239番に停止コドンが出現していた。これらの結果および病型、染色体所見について表1にまとめた。14例の急性白血病検体中、2例の急性リンパ性白血病と1例のWaldenströmマクログロブリン血症においてp53遺伝子の変異が示され、更に、これら3症例の白血病細胞において正常なp53 mRNAの発現がないことが示唆された。患者1および3の変異は、p53の機能発現上重要と考えられる変異集積領域内に存在し、患者2でもこの領域の近傍の進化上よく保存された部位に3塩基欠失があることから、これらの患者白血病細胞に発現しているp53蛋白質は正常機能を失っていることが予想された。患者2ではp53遺伝子の変異と共に染色体分析において17番染色体短腕の欠失が認められており、変異と欠失により両方のp53遺伝子が不活性化していると考えられた。

これまでにリンパ系悪性腫瘍、17番染色体短腕のモノソミーを伴う急性骨髄性白血病などにおいてもp53遺伝子の変異が報告されており、我々の得た結果と合わせて考えると、少なくとも一部の白血病ではp53遺伝子が関与すると考えられる。

3 骨髄性白血病細胞株におけるp53遺伝子の変異

検討した9種類の骨髄性白血病細胞株は、CMK(巨核球性)、ML-1(骨髄性)、THP-1(単球性)、U937(単球性)、UT-7(巨核球性)、TF-1(赤芽球性)、KG-1(骨髄性)、KY821(骨髄性)、PL-21(骨髄性)で、このうちCMK、UT-7、TF-1は、ヒトGM-CSF依存性の細胞株であった。これら9種類の骨髄性白血病細胞株において、検体の場合と同様にRT-PCR法で5'側および3'側p53 cDNA断片を増幅した。SSCP解析の前に2.5%アガロースゲル電気泳動によりDNA断片の増幅を確認したところ、CMKとML-1においては5'側と3'側のどちらのp53 cDNA断片も検出されなかった。プライマーを替えてPCR反応を行っても、この2種類の細胞株においてはDNA断片は増幅されず、p53遺伝子が全く発現していないことが予想された。この原因を調べるために、CMKとML-1においてp53のコーディング配列の全長を含むプローブを用いてサザンブロット解析を行った(図3)。その結果、EcoRI、BamHI、HindIIIのいずれで消化したレーンにおいても正常なバンドの消失と異常なバンドの出現がみられ、これら2種類の細胞株でp53遺伝子の再構成と正常な遺伝子座の消失が明らかにされた。

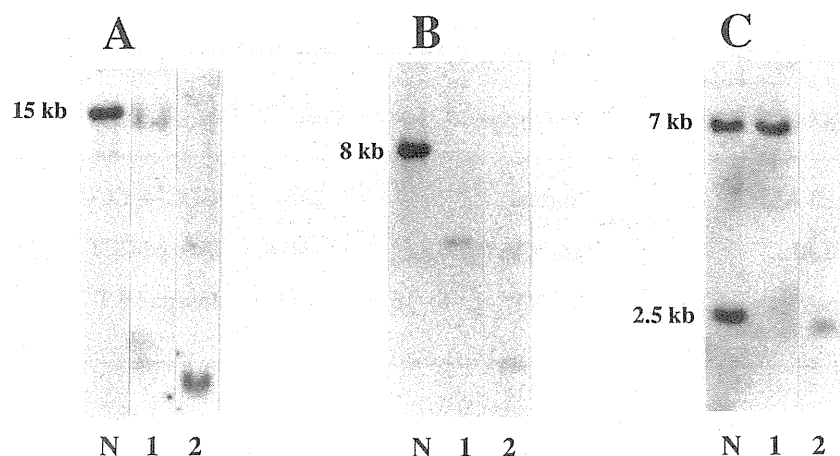


Fig.3 (A, B and C) Southern blots of *EcoRI*-, *BamHI*-, and *HindIII* digested DNA, respectively, hybridized with a p53 cDNA probe. In (A), (B), and (C), lanes: N, peripheral mononuclear cells of a volunteer (normal control); 1, CMK; 2, ML-1.

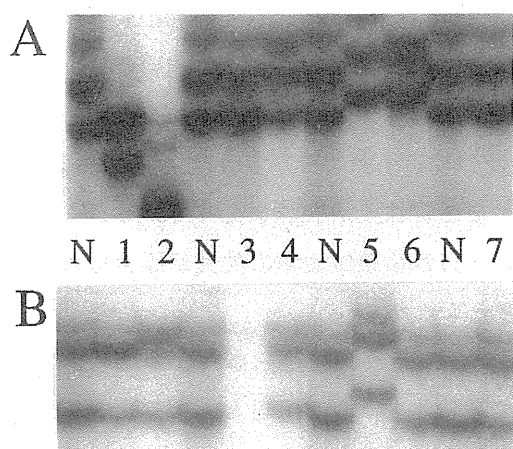


Fig.4 (A and B) SSCP analysis of 5'- and 3'- side p53 cDNA fragments, respectively. Lanes: N, normal control; 1, THP-1; 2, U937; 3, UT-7; 4, TF-1; 5, KG-1; 6, KY821; 7, PL-21.

Table 2 Alterations of p53 mRNA in Human Myeloid Leukemia Cell Lines

Cell Line	RT-PCR product		SSCP analysis of p53 cDNA		Alteration of p53 mRNA
	5'-side	3'-side	5'-side	3'-side	
CMK	Undetectable		Not examined		No expression of p53 mRNA
ML-1	Undetectable		Not examined		No expression of p53 mRNA
THP-1	Smaller size	Normal	Positive	Negative	Deleted 26 bases from the 1st letter of codon 174
U937	Smaller size	Normal	Positive	Negative	Deleted 46 bases from the 1st letter of codon 172
UT 7	Normal	Smaller size	Negative	Positive	Deleted 137 bases from the 3rd letter of codon 261
TF-1	Normal	Normal	Positive	Positive	Deleted a T at codon 251
KG-1	Normal	Normal	Positive	Positive	Inserted 5 bases (ATCTG) between codons 224 and 225
KY821	Normal	Normal	Positive	Negative	CGC (Arg) codon175 - CAC (His)
PL-21	Normal	Normal	Negative	Negative	None detected

p53 cDNA断片が増幅された7種類の細胞株においてSSCP解析を行った結果、5'側では、THP-1、U937、KG-1、KY821において、3'側では、UT-7、TF-1、KG-1において正常と異なる泳動像が得られた(図4)。5'側、3'側いずれのSSCP解析においてもp53 cDNA断片の泳動度に変化が見られたレーンでは、正常な泳動度を示すDNA断片は認められなかった。SSCP解析において変化の見られたp53 cDNA断片の塩基配列を直接シーケンス法により決定した結果を表2に示す。THP-1、U937、UT-7では、それぞれ、p53 mRNAに26, 46, 136塩基の欠失があり、他の3種類の細胞株では点突然変異、5塩基挿入、1塩基欠失が認められた。点突然変異はp53の機能発現上重要と考えられる進化上よく保存された領域に認められ、その他の変異は、いずれもフレームシフトを起こすことから、これら6種類の細胞株において発現しているp53蛋白質は正常な機能を持たないことが予想された。

U937、UT-7、KG-1に見られる欠失と挿入はエクソンの境界部分に起こっており、スプライシングの異常を示唆する。U937とKG-1の関連する領域のゲノムDNAの塩基配列を調べたところ、それぞれイントロン5および6の1番目の塩基がグアニンからアデニンに変化しており、スプライスドナー部位の点突然変異によって異常なスプライシングが起こったことが想定された(図5)。

以上の結果とこれまでに報告されているHL-60を合わせると、10種中9種類のヒト骨髄性白血病細胞株で正常なp53遺伝子の発現がないことになる。我々が調べた急性骨髄性白血病検体6例においてはp53遺伝子の変異は検出されず、Slingerlandらも急性骨髄性白血病5例中1例にのみ変異が見られたと報告している。Fenauxらの報告では、17番染色体短腕のモノソミーを伴う急性骨髄性白血病では10例中4例にp53遺伝子の変異が存在するものの、これを伴わない急性骨髄性白血病ではp53遺伝子の変異は36例中わずかに1例にのみ見られている。以上の結果から骨髄性白血病に関してはp53遺伝子変異はde novoの白血病細胞に比べて細胞株化したもので頻度が高いと考えられる。

ここで検討した細胞株はいずれも複雑な染色体異常を有していることからp53遺伝子の変化が遺伝子不安定性による付加的な異常である可能性も否定できないが、白血病細胞株にみられる高頻度のp53遺伝子

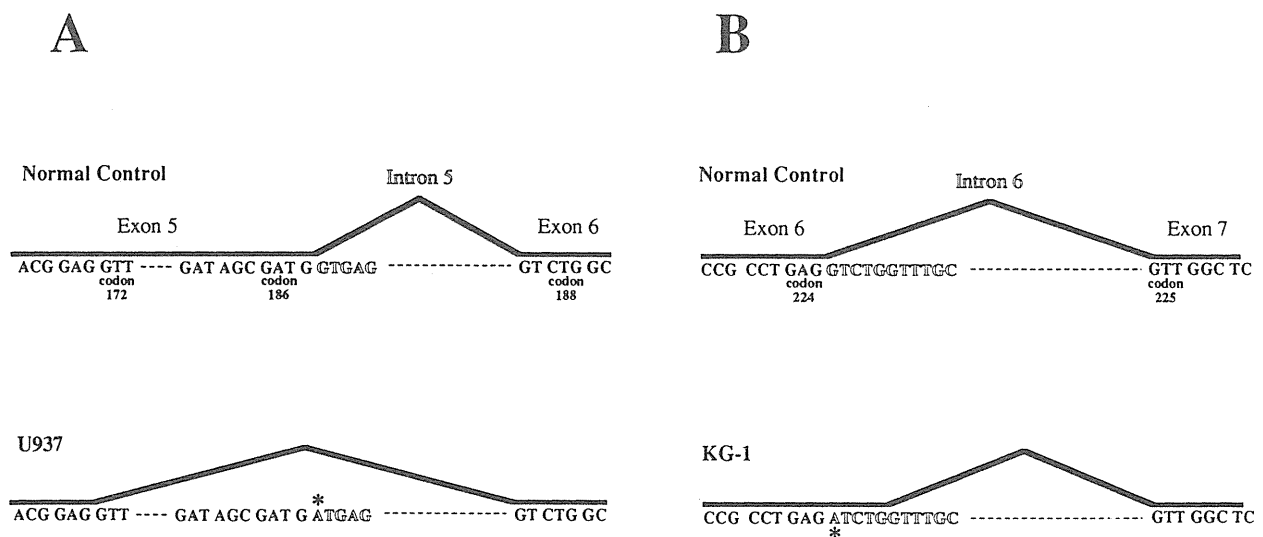


Fig.5 Schematic diagrams explain the mechanisms of the partial deletion in the p53 mRNA of U937 (A) and the 5-base insertion in the p53 mRNA of KG-1 (B). Intronic point mutations that convert G into A at the first base of intron 5 and 6 in the respective p53 genomic DNAs of U937 and KG-1 (shown by the star marks) cause abnormal splicing events.

の不活性化は、白血病検体と対照をなしており、白血病細胞株樹立においてp53遺伝子が重要な役割を果たすことが強く示唆される。

4 MDSにおけるp53遺伝子の変異

骨髓異形成症候群(MDS)は、骨髓造血不全と血球減少を特徴とするモノクローナルな疾患で、前白血病状態と考えられている。白血病への進展にp53遺伝子が関与するかを検討するために、50例のMDS検体(RA 13例, PARS 2例, CMMoL 7例, RAEB 13例, RAEB-T 9例, MDS由来の白血病 6例)についても同様のSSCP解析を行った。3'側p53cDNA断片のSSCP解析では陽性例は検出されなかったが、5'側では3症例において正常バンドと異なる泳動像が得られ、また、これらのレーンでは正常な移動度を示す断片は認められなかった。この3例およびMDS由来の白血病細胞株であるTF-1について病型、染色体所見、p53遺伝子変異を表3にまとめた。50例のMDS検体中、2例のRAEBと1例のRAEB-Tにおいてp53遺伝子の変異が示され、正常のp53 mRNAは検出されなかった。これら3症例の変異は、いずれもp53の機能発現上重要と考えられる変異集積領域またはその近傍の点突然変異であった。この結果からMDSにおけるp53遺伝子変異は比較的頻度が低いが、より進行したMDSにおいて認められる傾向があると考えられた。

p53に異常の見られた3例のMDSおよびTF-1では複雑な染色体異常が認められた。最近の知見によれば、正常なp53はゲノムに傷害がある場合に細胞周期を止める働きがあるとされ、p53が不活性化された腫瘍細胞ではゲノムの不安定性が増大して染色体の異常が蓄積すると想定されている。この観点からすると、これら4例のp53遺伝子変異は、染色体の不安定性の増大、更にはMDSから白血病への進展に関わっていることが予想される。

Table 3 MDS patients and cell line with mutations in the p53 gene

Pt.	Diagnosis	Karyotype	Mutation		
			Codon	Nucleotide	Amino acid
1.	RAEB	[47, XY, -5, -7, -12, -18, +22, 15p+, +4 mar]	175	CGC → CAC	Arg → His
2.	RAEB in T	[45, X, -Y, -18, 5q-, 9q-, +mar]	137	CTG → CCG	Leu → Pro
3.	RAEB	[49, XX, -17, -20, +8, +22, 5q-, +2 DM]	190	CCT → CTT	Pro → Leu
TF-1	Erythroleukemia from MDS	[54, X, -Y, +2p-, +3q-, +6, +15, +15, +19p+, +19p+, -21, -22, 10p+, 12p+, 14p+, +4 mar]	251	Deletion of T	frame shift

5 まとめ

p53遺伝子は、種々のヒト悪性腫瘍においての変異がみられる代表的な癌抑制遺伝子のひとつである。造血器悪性腫瘍においては、CMLの急性転化時のp53遺伝子の構造と発現の変化が報告された。

我々は、RT-PCR/SSCP法を用いて白血病におけるp53遺伝子の変異を検討した。RT-PCR/SSCP法ではp53遺伝子の変異の検出と同時に正常なp53mRNAの発現の評価が可能である。14例中3例のリンパ性白血病でp53遺伝子の変異と正常なp53mRNAの消失が明らかにされ、頻度はそれほど高くないものの一部の

白血病の発症においてはp53遺伝子が関与することが示された。

ヒトの骨髄性白血病細胞株においては9種中8種類で正常のp53 mRNAの発現が消失しており、p53遺伝子の不活性化の機序はサザンブロット解析で検出される大きな遺伝子再構成、点突然変異、イントロンの変異によるスプライシングの異常など様々であった。白血病検体での結果および他からの報告では急性骨髄性白血病におけるp53遺伝子変異の頻度はかなり低いと考えられ、細胞の株化におけるp53遺伝子の不活性化の重要性が示唆された。

MDSにおけるp53遺伝子の検討では、50例中4例と頻度は高くなかったが、進行した症例で変異が認められた。p53遺伝子に変異をもつものは、いずれも複雑な染色体異常を示したが、これにはp53遺伝子の不活性化によるゲノムの不安定化の機序が想定された。

共同研究者である豊島秀男、堺隆一、宮川清、萩原弘一、石川冬木、高久史麿、矢崎義雄、平井久丸の諸先生に深く感謝致します。

3 急性前骨髓球性白血病

田代 聡* / 鎌田 七男*

Acute Promyelocytic Leukemia

Satoshi Tashiro, Nanao Kamada

Department of Hematology, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 Japan

Abstract

Breakpoints of 15; 17 translocation in patients with acute promyelocytic leukemia (APL) have been identified within PML and retinoic acid receptor α (RAR α) genes on chromosome 15 and 17, respectively. In the APL cells, the PML-RAR α chimeric transcript was also detected, and the fusion transcript seems to play an important role in the leukemogenesis of APL.

The rearrangements of APL cells were analyzed by Southern blotting and PCR analyses using genomic DNA. The rearrangements of RAR α gene were observed in 6 patients out of 9 APL patients with 15; 17 translocation, and in 6 patients out of 8 patients without 15; 17 translocation. Of 13 APL patients, four were detected to have the rearrangement of genomic DNA. The rearrangements between the second intron of RAR α gene and *bcr1* region of PML gene were observed in 3 out of the 4 patients, and the rest was identified to have the rearrangement between the second intron of RAR α gene and *bcr3* region of PML gene. The nucleotide sequence around the breakpoints were analyzed. The breakpoints in PML gene were clustered in about 300bps region around the sixth exon of PML gene in the 3 patients with the breakpoints in *bcr1* region of PML gene. The Southern blotting analysis revealed that the PCR analysis in this study were able to detect most of the rearrangements in this region, which occurred in 30% of the patients with APL. By the sequence analysis, the breakpoints were identified to be clustered within 40bps region

*広島大学原爆放射能医学研究所血液学研究部門

upstream of the third exon of $RAR\alpha$ gene. The clustering of the breakpoints in $RAR\alpha$ and PML genes indicates that these region might be the hot spot of the gene recombination in some of the APL patients.

はじめに

FAB分類M3に相当する急性前骨髄球性白血病(Acute Promyelocytic Leukemia, APL)には15;17転座が見られ、疾患特異的染色体異常の代表的なものの一つとして知られている。最近、分子生物学的解析により15;17転座の切断点が17番染色体上ではレチノイン酸受容体 α 遺伝子にあることが明らかにされた。また、15番染色体上からはPML遺伝子がクローニングされた。15;17転座切断点の詳細な遺伝子解析により、DNA上での切断点とキメラ、遺伝子産物の多様性が明らかにされつつある。

1. APLと15;17転座

APLは急性骨髄性白血病(AML)の約15%を占め、血液形態学的には細胞質にアズール顆粒の豊富な前骨髄球レベルまでの分化を示す。臨床的には低フィブリノーゲン血症を認め、しばしば播種性血管内凝固異常症(DIC)を合併することが知られている。15;17転座は、1977年にAPLに特徴的な染色体異常として報告された。現在ではAPLの約70%以上に15;17転座が認められると言われている。当部門において染色体分析を施行したAML 448例中M3は41例(9.2%)であり、その65%に15;17転座を認めている。また15;17転座を持つ症例は全てM3であった。治療面では、レチノイン酸の一種であるall-trans retinoic acid (ATRA)が用いられ、白血病細胞の分化誘導により高率に完全寛解を得ることができるようになってきた¹⁾。

2. 15;17転座と遺伝子再構成

レチノイン酸受容体(RAR)はステロイド受容体に類似した構造を持ち、レチノイン酸が核内にあるRARを介して遺伝子発現の調節を行なっていることが知られている²⁾。レチノイン酸受容体のリガンドであるレチノイン酸は、細胞、特に骨髄系細胞の分化誘導、増殖の調節、脊椎動物の個体発生における形態形成に関与することが知られている。またレチノイン酸受容体は、DNAに結合する領域とレチノイン酸に結合する領域を持ち、それぞれ標的遺伝子の転写調節領域とレチノイン酸に結合して標的遺伝子の転写調節を行なっていると考えられている。最近、15;17転座の17番染色体上の切断点がレチノイン酸受容体遺伝子の一つであるRetinoic acid receptor α ($RAR\alpha$)遺伝子内、特に第2イントロン付近に集中していることが報告された^{3,4)}(Fig.1)。また、15番染色体上の切断点より得られた遺伝子はPML遺伝子と名付けられ、切断点の集中している3箇所に対して、それぞれ**bcr1**, **bcr2**, **bcr3**と名付けられた⁵⁾(Fig.1)。PML遺伝子の産物も $RAR\alpha$ 蛋白と同様にDNA結合部位を持っており、transcription factorの一種であると考えられている。APL細胞では、PML- $RAR\alpha$ キメラ遺伝子と変異型PML遺伝子が発現されていることが報告された⁶⁾。PML- $RAR\alpha$ キメラ遺伝子では、 $RAR\alpha$ 遺伝子の転写活性調節領域がPML遺伝子で置換されていることになる。このためキメラ蛋白は、レチノイン酸に対する反応性が修飾され、また正常の $RAR\alpha$ 蛋白と競合することにより、レチノイン酸の標的細胞に対する作用を阻害している可能性がある。レチノイン酸は骨髄系細胞を分化誘導するが、キメラ蛋白は骨髄系細胞を前骨髄球レベル以上への分化を阻害すると考えられる。このことがAPLの白血病化において重要であると考えられる。一方、変異型PML遺伝子では

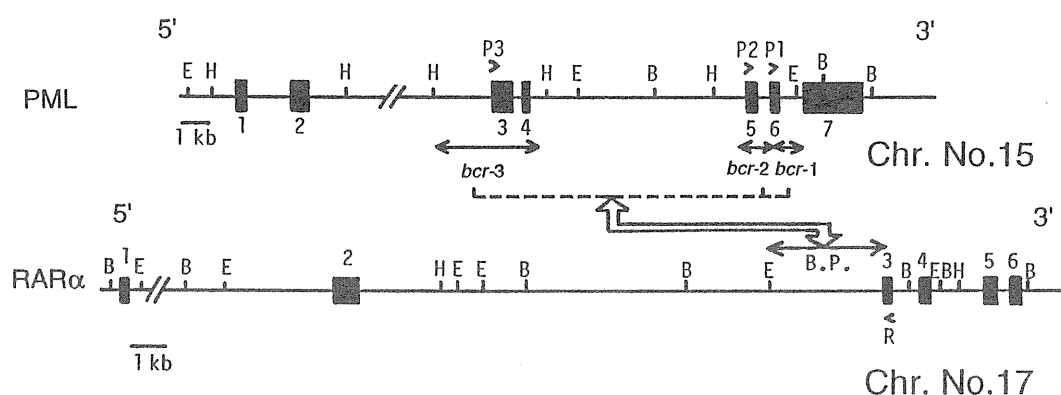


Fig.1 Breakpoints in PML and RAR α genes.

P1, P2, and P3 above the PML gene, and R beneath the RAR α gene indicate the location of 5' primers for *bcr* 1-RAR α , *bcr* 2-RAR α , and *bcr* 3-RAR α , and a common 3' primer in PCR reactions, respectively.

B. P. indicates the breakpoint region of the RAR α gene detected by PCR using genomic DNA. H; *Hind*III, E; *Eco*RI, and B; *Bam*HI

serine/threonine protein kinaseもしくはphosphataseの基質になると考えられる部位が欠失しているため、PML蛋白の活性に重大な影響を与えている可能性がある⁶⁾。特に変異型PML遺伝子しか発現していない症例も報告されており⁵⁾、15；17転座ではPML遺伝子の変化も白血病化の重要な要因になっていると考えられる。

3. APLの遺伝子診断

APLの遺伝子診断には現在主に2つの方法が考えられている。一つはサザンブロット法により染色体DNAの再構成を検出する方法であり、もう一つはRT-PCR法により再構成したDNAの遺伝子産物であるキメラmRNAを増幅して検出する方法である。サザンブロット法では、RAR α 遺伝子およびPML遺伝子の一部等がプローブとして用いられている。Pelicciらは、APL 26症例中24症例(92%)でRAR α 遺伝子再構成を、また19例(73%)でPML遺伝子の再構成を見だし、すべての症例でRAR α もしくはPML遺伝子の再構成を検出したとしている⁷⁾。Bergerらは、中国人のAPL25例中23例でRAR α 遺伝子再構成を見いだしている⁸⁾。これらの症例の中には15；17転座を持たない症例もあり、これらがmasked typeの転座であるのかあるいは現在の染色体分析の限界であるのかについては今後の課題であろう。

ノーザンブロット法によるmRNAの解析では、APL症例に異常なサイズのRAR α 遺伝子mRNA(キメラmRNA)が見いだされている⁶⁾。mRNAを鋳型にして作製したcDNAを増幅するRT-PCR法により微量のキメラmRNAを検出し、残存白血病細胞の検出に用いる試みも報告されている⁵⁾。しかし、RT-PCR法では1症例の白血病細胞から複数のキメラmRNAが検出されており⁵⁾、また遺伝子の増幅が非常に困難な症例もあり、方法論的に必ずしも満足するものとはなっていない。

当部門では、染色体分析を施行したAPL 13例を対象として、RAR α の第3セクソンをプローブとして用いたサザンブロット法とgenomic DNAを用いたPCR法で遺伝子再構成を検討した。15；17転座は13例中9例(69%)に認められた。サザンブロット法では13例中10例(77%)にRAR α 遺伝子の再構成を認めた(Table 1)。genomic DNAを用いたPCR法では、長いDNA断片の増幅をより効率的に行なうために、Ponceら⁹⁾の方法によりPCR反応を行なった。5'側プライマーはPML遺伝子のエクソン3、5、6のDNA塩基配

Table 1 Detection of 15;17 translocation by cytogenetic analyses, Southern blotting, and genomic PCR

No.	chromosomal translocation	RARA rearrangemetns			PCR using genomic DNA
		HindIII	EcoRI	BamHI	
1	+	G	R	R	bcr3
2	+	R	R	R	bcr1
3	-	G	R	ND	bcr1
4	-	R	R	R	bcr1
5	+	R	G	R	-
6	+	R	G	R	-
7	+	R	G	R	-
8	-	R	G	R	-
9	-	R	ND	G	-
10	+	R	G	G	-
11	+	G	G	G	-
12	+	G	G	G	-
13	+	G	G	G	-

+: positive

- : negative

ND: not done

G: germline

R: rearrangement

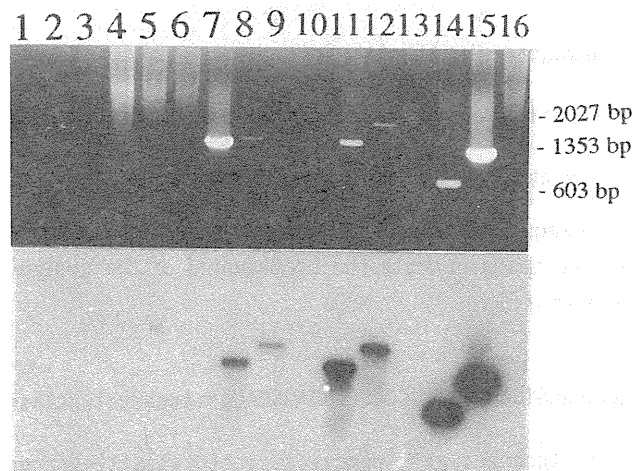


Fig. 2 Detection of 15;17 translocation by PCR with genomic DNA.

lane 1: blank, lane 2-4: Placenta, lane 5-7: patient 1, lane 8-10: patient 2, lane 11-13: patient 3, lane 14-16: patient 4. The results shown in lane 4, 7, 10, 13 and 16 were obtained from the PCR using P1 and R primers (for *bcr1*-RARA α); in lane 3, 6, 9, 12 and 15 from the PCR using P2 and R primers (for *bcr2*-RARA α); and in lane 2, 5, 8, 11 and 14 from the PCR using P3 and R primers (for *bcr3*-RARA α). PCR products were detected by ethidium bromide staining (upper panel). Then, the products were hybridized with the oligonucleotide M9 (lower panel).

列をもとにそれぞれ *bcr3*, *bcr2*, *bcr1* に対応するように, また 3'側プライマーは *RAR α* 遺伝子の第3エクソン内のDNA塩基配列をもとに作製した。これらのプライマーを使用することにより, 13例中4例で染色体転座点を含むDNA断片を増幅することに成功した (Table 1, Fig. 2)。4例中3例は *RAR α* 遺伝子第2イントロンと *PML* 遺伝子 *bcr1* での遺伝子再構成であり, 残り1例では *RAR α* 遺伝子第2イントロンと *PML* 遺伝子 *bcr3* に切断点があることが明らかとなった。これらの症例は全て *EcoRI* で消化したDNAを用いたサザンブロット法で再構成が確認されているので, *RAR α* 遺伝子側の切断点は *RAR α* 遺伝子第3エクソンの上流約3 kb内にあると考えられる。また, genomic DNAを用いたPCR法で陰性であった症例では全てこの領域での遺伝子再構成を認められないことから, 今回用いたプライマーにより, APLの約30%で認められるこの3 kb領域での遺伝子再構成の大部分を検出できると考えられた。genomic DNAを用いたPCR法は, 今後APLの診断のみならず残存白血病細胞の検出にも有用になると考えられる。

4. 染色体転座による遺伝子再構成部位

genomic DNAを用いた法により増幅したDNA断片の一部で遺伝子再構成部位付近のDNA塩基配列を検討した。現在のところ *PML* 遺伝子側の切断点は *bcr1* に切断点がある3例で確認でき, それぞれ第6エクソンの3'側に2例, 第6イントロンで1例であった。これら3例に関しては第6エクソン周囲の約300bps内に切断点が集中していた (Fig. 3)。また, *RAR α* 遺伝子側の切断点も現在までに3例で確認でき, 全て

```

ttctttgcacccctgccttgggtccctggccctgggattgtttgggtggaggagggcgag
tggtctgtggcagaatgggtggagggggagcggaagcagagggggcgggggagtggccg
gctttgaatactctgttgacccagtttctcttgcctccagcttatgtctcttccctccc
          ▼                ▼                ▼
tcctcttcaagcgtaactccttcttaactcgggggagaacggggccaggccccaggggc
aggagctttagaatcagggtgacccccaccctactccccaagcacagtcacggcacacata
caaatgtgatggtttatcattgtatctttgtggtttgaaggtgggggtcctaggagtcca

```

Fig.3 Nucleotide sequences around the breakpoints in the second intron of *RAR α* gene. Arrow heads indicate the breakpoints of the genomic DNA in the patients with APL.

```

          ▼                ▼
CAACAGCAACCAAGTGGCCAGTGGCGCCGGGAGGCAGgtagggagggtagggcagtg
gctgggtgctgctgcccgcaggtctgggcggtgcctcttctgtattttgccccatccaga
aagcccaaagccaacaggagtcccttattccactgaataagataggaaagttcacagtg
gcgtgggggtgagagtggacacagtttacctctcttttgccatattgaggtgtggggagctg
          ▼
acagctaaatgctcagttgtatgagtccttttccaaacactactgtgcctttgcacagggc
aggctctccacaagaagtttgttgctgatgcctagcactccagagagggttgggcata

```

Fig.4 Nucleotide sequences around the breakpoints in the *BCR1* region of *PML* gene. Capital and small letters were the nucleotide sequences of the sixth exon and the sixth intron of the *PML* gene, respectively. Arrow heads indicate the breakpoints of the genomic DNA in the patients with APL.

第3エクソンの上流約300bps付近の約40bpsの範囲に集中していた(Fig. 4)。このように一部の症例では両遺伝子ともに切断点が非常に狭い範囲に存在することは、この範囲がrecombinationのhot spotとなっていることを示唆している。現在のところ両遺伝子の切断点付近にはシグナル配列などの特異的なDNA塩基配列は認められないが、非常にGC richであることが判明した。15;17転座の染色体転座機構を解明するためには今後さらに多くの切断点の解析が必要である。

おわりに

APLでは、15;17転座により2つのtranscription factorであるRAR α 遺伝子とPML遺伝子のキメラ遺伝子が出来ることにより、それぞれの遺伝子の機能が修飾されることが白血病化に重要であること、また遺伝子診断としてはサザンブロット法、RT-PCR法とともにgenomic DNAを用いたPCR法も有用であることについて述べた。さらに一部の症例では切断点が非常に狭い範囲に集中しておりこの範囲がrecombinationのhot spotとなっている可能性について述べた。

参考文献

- 1) Warrell, R. P. et al: Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N. Engl. J. Med.* **324**: 1385, 1991
- 2) Giguere, V. et al: Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, **330**: 624, 1987
- 3) de The, H. et al: The t (15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature* **347**: 558, 1990
- 4) Borrow, J. et al: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17: *Science*, **249**: 1577, 1990
- 5) Pandolfi, P. P., et al: Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR α transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR α isoforms in acute promyelocytic leukemia. *EMBO. J.* **11**: 1397, 1992
- 6) Kakizuka, A. et al: Chromosomal translocation t (15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**: 663, 1991
- 7) Biondi, A. et al: RAR- α gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **77**: 1418, 1991
- 8) Chen, S. et al: Rearrangements in the second intron of the RARA gene are present in a large majority of patients with acute promyelocytic leukemia and are used as molecular marker for retinoic acid-induced leukemic cell differentiation. *Blood* **78**: 2696, 1991
- 9) Ponce, M. et al: PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* **20**: 623, 1992

4 リンパ腫における *BCL-1*, *BCL-2* 遺伝子の役割

瀬戸 加大*

BCL-1 and *BCL-2* genes in Lymphomagenesis

Masao Seto

Laboratory of Chemotherapy, Aichi Cancer Center Research Institute
1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya, 464, Japan

Abstract

t (14 ; 18)(q32 ; q21) chromosome translocation is frequently involved in follicular lymphoma and is suggested to play an important role for the genesis of this lymphoma. The reciprocal translocation has been found to make fusion gene between *BCL-2* gene at 18q21 and immunoglobulin (Ig) gene at 14q32. The fusion gene produces *BCL-2-Ig* fusion transcripts, but the coding region of the *BCL-2* remains intact. The *BCL-2* expression has been shown to be negative at the dark zone of germinal center from which the tumor cells originate. Since the translocation has been demonstrated to occur at the stage of pre B cell, it is likely to be expressed at the dark zone when *BCL-2* gene is activated by translocation. This inappropriate *BCL-2* expression causes cells to be resistant to programmed cell death (apoptosis) at the germinal center, leading the cells to survival. The resistance to cell death gives cells growth advantage leading to follicular lymphoma.

BCL-1 gene at chromosome 11q13 has been defined by the t (11 ; 14)(q13 ; q32) translocation although the transcriptional unit has long been unclear. We have shown that the *PRADI* gene at 11q13 encoding cyclin D1, is overexpressed in cell lines with t (11 ; 14)(q13 ; q32) and suggested that the *PRADI* gene is the candidate for the *BCL-1* gene. Since cells at mantle zone are in G0 stage of cell cycle, the activation of *PRADI* gene by juxtaposed Ig gene may cause inappropriate expression for the cells at G0 stage, leading to cell proliferation. This proliferative signal may cause a growth advantage for the cells at

*愛知県がんセンター研究所・化学療法部

mantle zone leading to mantle zone lymphoma. Thus, both *BCL-2* and *BCL-1* activations by chromosome translocation in common give rise to inappropriate expression of the genes for the cells at the specific stage of development.

I. はじめに

造血器腫瘍においては特定の病型に特定の染色体転座が高頻度に認められ、腫瘍化に深く関わっていることが示唆されている。初期の染色体転座の研究から、染色体転座は、*myc*や*abl*など、がんウイルスが保持しているがん遺伝子を活性化し、腫瘍化に導くと一元的に考えられた。その後の研究により、多くの例で、腫瘍原性が必ずしも明確でない遺伝子が関与していることが判明しつつある。本稿では、リンパ腫における*BCL-1*遺伝子及び*BCL-2*遺伝子の役割について述べる。転座関連遺伝子*BCL-2*は、転座機序、活性化機構などについて比較的良く解析が進んでいる。その真の意味での機能は不明であるが、最近、細胞死(Apoptosis; アポトーシス)に関与することが示されている。又、*BCL-1*は長く遺伝子本体が不明であったが、最近我々を含むいくつかの研究グループにより細胞回転に関与するcyclin D1であることが示唆された。これらの遺伝子は単独で腫瘍原性はなく、転座による活性化が特定の細胞集団に増殖に有利に働き、さらにいくつかの段階をへて腫瘍化にいたると考えられる。

II. *BCL-2*遺伝子について

1. 転座切断点からの*BCL-2*遺伝子クローニング

*BCL-2*遺伝子はB細胞性リンパ腫である濾胞性リンパ腫に高頻度に見いだされる転座染色体 t(14; 18)(q32; q21)の転座切断点領域より見いだされた遺伝子である。濾胞性リンパ腫はリンパ節一面に腫瘍性の濾胞(germinal center)を形成するきわめて特徴のあるリンパ腫であり、抗原刺激を受けて形成される2次濾胞由来の腫瘍であると考えられる。t(14; 18)(q32; q21)転座は濾胞性リンパ腫に高頻度に見いだされるため、濾胞性リンパ腫の腫瘍化機構に重要な役割を担っている事が推測された。t(14; 18)(q32; q21)転座はIgH遺伝子J断片(J_H)が関与しており、J_Hを用いて18q21のDNA断片がクローニングされ¹⁻³⁾、その後の解析により*BCL-2*遺伝子の転写産物が同定された⁴⁻⁶⁾。cDNAの塩基配列より*BCL-2*遺伝子は239アミノ酸よりなるポリペプチドをコードする事が明らかになり、その後、抗体により25kdの蛋白が確認されている⁴⁻⁷⁾。Hockenberyらは、*BCL-2*蛋白はmitochondria内膜に存在する事を示した⁷⁾。

2. 染色体転座及び*BCL-2*遺伝子活性化の分子機構

t(14; 18)(q32; q21)転座の結果、18q21上の*BCL-2*遺伝子と14q32上の免疫グロブリン(Ig)遺伝子が近接し融合遺伝子を形成する(図1)⁶⁾。この融合遺伝子は*BCL-2-Ig*キメラmRNAを産生する⁶⁾。この転座で重要な点は、*BCL-2*遺伝子上での転座切断点は蛋白翻訳領域以外で起こる為、*BCL-2*蛋白が転座により構造変化をきたさないことである。すなわち、*BCL-2*遺伝子の転写制御異常(deregulation)が重要であることが推測される。又、Ig遺伝子はJ_Hが関与していることより、転座時期は免疫グロブリン遺伝子再構成の最初の段階であるD_H-J_H結合の時に起きていることである。転座時期についてはder14及びder18上の切断点の解析から多くの場合はD_H-J_Hの時期に起きていることが示され、ほとんどの転座はB細胞分化段階上のPre B細胞の時期に起きるということが明らかになった⁸⁾。濾胞性リンパ腫は、surface Ig陽性のmature B細胞の腫瘍であり、転座により活性化された*BCL-2*遺伝子は、初期段階でのB細胞分化を阻止しないというこ

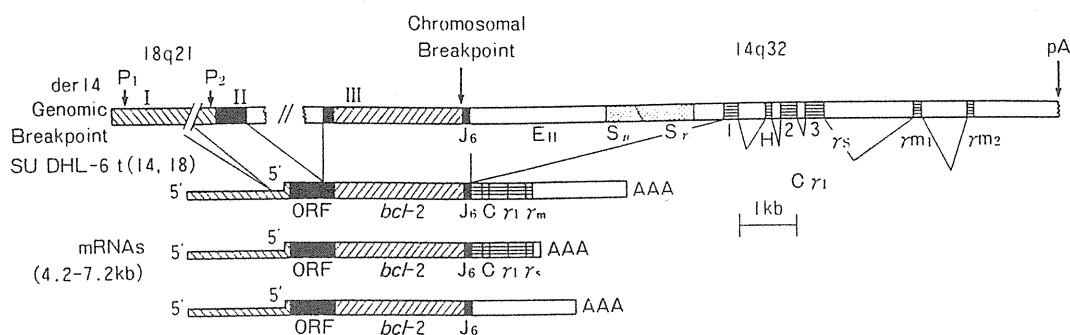


Fig.1 *BCL-2-Ig* fusion gene produces chimeric mRNAs.

P1, P2; promoter. I, II, III; *BCL-2* exon I, II, III. ORF; Open reading frame. AAA; poly (A). pA; poly (A) signal.

とを示唆する。一部で J_H と転座する例⁹⁾や $D_H-D_HJ_H$ 時期の例も知られているが¹⁰⁾, これらはいずれも2次濾胞を形成する以前の分化段階で転座が起きていると考えられる。

3. 活性化*BCL-2*遺伝子の細胞増殖, 腫瘍形成における役割

*BCL-2*遺伝子は既知のがん遺伝子とのホモロジーはなく, 腫瘍化にどのような役割を担っているかが検索された。Nunezらは¹¹⁾, EBウイルスで株化した正常B細胞株に活性化*BCL-2*遺伝子を導入し細胞増殖における影響を調べた所, 寒天内コロニー形成率がコントロールに比較し常に3-5倍認められた事を報告した。また, スードマウスにおける腫瘍形成試験では*BCL-2*単独では腫瘍を形成しなかったが, 前もって*myc*遺伝子が導入された正常B細胞株の腫瘍形成能を促進する事が示されている。すなわち, *BCL-2*の過剰発現は細胞に積極的に増殖シグナルを与えるのではなく, 腫瘍形成には他の遺伝子変化が必要であることが示唆され, 腫瘍形成に対しての*BCL-2*の役割は間接的であることが明らかになった。

4. *BCL-2*遺伝子とアポトーシス

これまで, *BCL-2*遺伝子の発見の過程と腫瘍化における役割について記載してきたが, 本遺伝子の生物学的役割については不明な事が多い。近年, その過剰発現がprogrammed cell death (apoptosis)と呼ばれる細胞死を制御する事が指摘され, いろいろな実験系において試されつつある^{7,12,13)}。アポトーシスとは形態学的には, 核の断片化, 細胞質の凝縮, 細胞膜表面からのmicrovilliの消失等が認められ, 染色体DNAのfragmentation (約180bpのoligomerの形成)を特徴とする細胞死である。これは個体発生途上で死ぬように運命付けられた細胞の死に方で, 生物が生体を維持するのに重要な役割を担っている生物現象である。免疫系細胞においては, T細胞分化にともなう胸腺内でのapoptosis及び, B細胞の2次濾胞内でのapoptosisに対する*BCL-2*遺伝子の役割についての検索が進められている。

5. 個体内での*BCL-2*発現様式とapoptosis

McDonnellらは活性化型*BCL-2-Ig*遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作製し, in vivoでの活性化型*BCL-2*遺伝子の作用を検索した¹⁴⁾。*BCL-2-Ig*トランスジェニックマウスはポリクローナルなB細胞系の過形成を示し, かつ, その脾細胞中の特にB細胞は試験管内で増殖因子なしで長期生存する事が明ら

かになった。正常リンパ節の2次濾胞は形態学上及び、免疫染色より図2aの様に4つのzoneに分けられている。Dark zone, Basal light zone, Apical light zone, そしてそれらを取りまくMantle zoneである¹⁵⁾。*BCL-2*の発現をみると、Dark zone, Basal light zoneの細胞は陰性で、Apical light zoneの一部の細胞が陽性になり、Mantle zoneは強陽性である¹⁶⁾。Dark zoneはKi-67抗原陽性で細胞分裂増殖の盛んな領域でsurface Igは陰性である。抗原刺激を受けた細胞群がDark zoneで分裂増殖しlight zoneに移行し、surface Igが陽性になり多くの細胞がapoptosisによる細胞死をおこす。このapoptosisの場であるlight zoneはfollicular dendritic cell (FDC)が密な場所であり、B細胞のapoptosisに対しての関与が推定されている。すなわち、抗原刺激を受けたB細胞がなんらかの機構で選択され、FDC上の抗原とinteractionした時に*BCL-2*抗原の発現が誘導され、細胞死をまぬがれ、plasmablastやmemory B細胞へと分化して行くと考えられている¹⁵⁾。

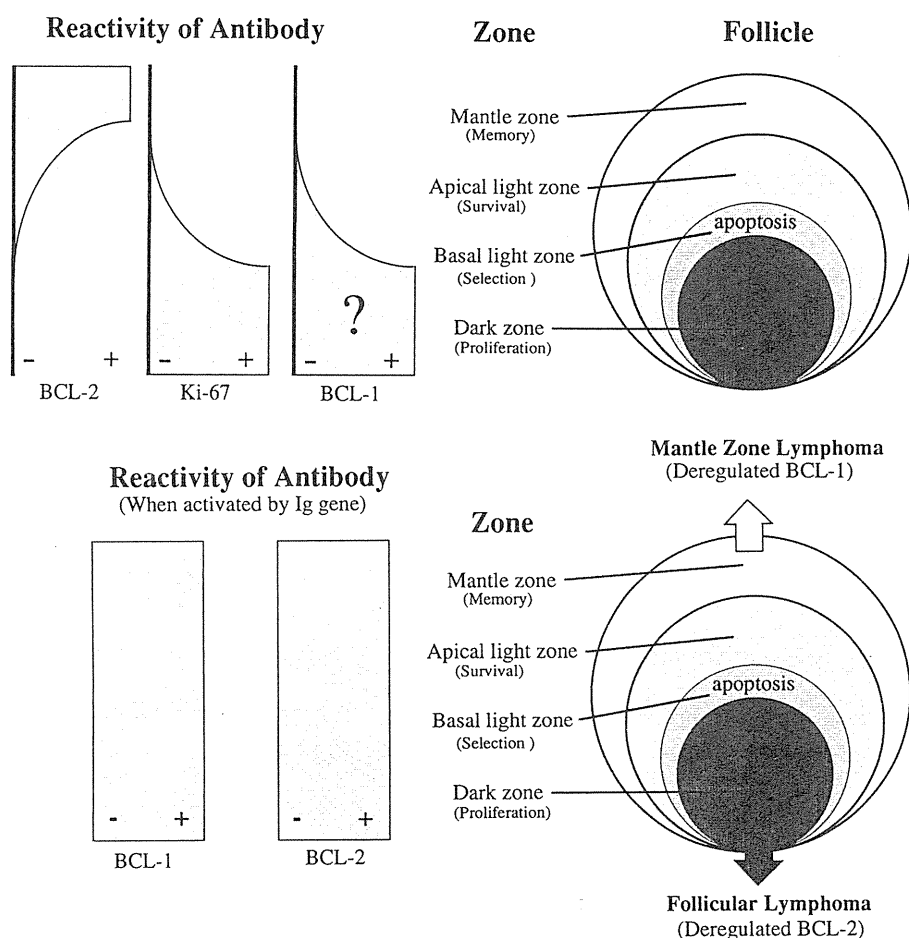


Fig.2 Scheme of secondary follicle. a) Reactivity of antibody is shown on the left. Predicted reactivity of BCL-1 antibody is also shown since a specific antibody useful for immunostaining is not yet available. b) When *BCL-1* or *BCL-2* gene is activated by Ig translocation, the expression of *BCL-1* or *BCL-2* gene is deregulated, resulting in deregulated expression of the gene is taking place where the genes are normally shut off.

6. *BCL-2*発現制御異常と濾胞性リンパ腫形成

正常2次濾胞ではDark zoneは*BCL-2*陰性であるが(図2a), これまで述べてきたように、転座により*BCL-2*はDark zoneの細胞分化段階以前の時期において活性化され発現されるであろうことが推測され

る。すなわち、転座を有する細胞はapoptosisによる選択以前にBCL-2が異常に発現され、apoptosisによる選択に抵抗し、腫瘍化につながると考えられる(図2b)。これは、BCL-2が積極的に増殖刺激を与えないにも関わらず、その制御異常が一定の細胞群(BCL-2の場合はリンパ濾胞の細胞群)に対し、死に抵抗するというgrowth advantageを与え、そのことが濾胞性リンパ腫を形成する上で重要な役割を果たしていると考えられる。

II. BCL-1遺伝子について

Tsujimotoら¹⁷⁾は、t(11;14)(q13;q32)転座型B細胞性腫瘍より、11q13に位置する転座切断点をクローニングし、この領域に存在すると推定された転座関連遺伝子を*BCL-1*遺伝子と命名した。この切断点領域は1984年に報告されたが、長くその遺伝子本体は解明されていなかった。1991年Arnoldら¹⁸⁾によって*PRADI*(parathyroid adenoma-1)遺伝子が11q13領域より発見され、*BCL-1*転座切断点領域の近傍に位置することが示され、長く解明されなかった*BCL-1*遺伝子本体である可能性が示唆された。我々は、*PRADI*遺伝子がt(11;14)(q13;q32)転座を有する細胞株で過剰発現(活性化)していることを見いだし、長く不明であった*BCL-1*遺伝子は*PRADI*そのものであることを示唆し報告した¹⁹⁾。最近明らかになった*BCL-1*遺伝子活性化のリンパ腫形成における役割について述べる。

1. *PRADI*遺伝子の単離

Arnoldら¹⁸⁾は、副甲状腺腫においてparathyroid hormone (PTH)遺伝子が再構成している症例を見だし、遺伝子ライブラリーを作成して再構成バンドの検討を行った。その結果、11p15に位置する*PTH*遺伝子の第一イントロンが11q13に位置する領域と結合していることを見いだした。その後、この11q13の切断点領域から再構成により活性化されている約4.5kbの転写産物が見いだされ*PRADI*(parathyroid adenoma-1)遺伝子と命名された²⁰⁾。その後彼らは²¹⁾、ヒト胎盤cDNAライブラリーから*PRAD1* cDNAをクローニングし、295のアミノ酸から成る蛋白翻訳領域を見いだした。ホモロジーサーチにより*PRAD1*は細胞回転に関与するcyclinとホモロジーを示す新しいタイプのcyclinをコードしていることが判明した。またこのmRNAはG2/MからG1期にピークを形成しcell cycle依存性に変化すること、in vitro translation産物はcdc2 protein kinaseと複合体を形成することが証明され、細胞回転に重要な役割を担っていることが示唆された。また、時期を同じくして、Xiongら²²⁾はヒト神経膠芽腫のcDNA libraryから細胞分裂に関与する遺伝子(CLN; cyclin遺伝子)群に異常を有する出芽酵母(budding yeast)を正常に復帰させる遺伝子を発見し、cyclin D1と命名した。cyclin D1遺伝子は、alternative polyadenylationにより同一の蛋白翻訳領域(open reading frame)を有する4.5kbと1.7kbのmRNAに転写され、34kDaの蛋白に翻訳されることが示された。塩基配列の比較よりcyclin D1と*PRAD1*は同一の遺伝子であることが判明した。さらに興味深いことに、Matsushimeら²³⁾は、CSF-1(colony stimulating factor 1)依存性マウスマクロファージ細胞株においてG1期にCSF-1により誘導されるcyclin様遺伝子(*CYL1*)を単離し、G1期からS期への移行に関与する遺伝子であることを示した。*CYL1*は蛋白レベルでcyclin D1と94%のホモロジーを有し、マウスにおけるヒトD-type cyclin相同遺伝子であることが明らかとなった。これらほぼ同時期の研究成果は、腫瘍化と細胞回転関連遺伝子というきわめて興味深い問題を我々に提示した。

2. t(11;14)(q13;q32)転座とB細胞性腫瘍

t(11;14)転座は、B細胞起源の慢性リンパ性白血病(CLL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)などに時に認められる染色体異常である^{24,25)}が³, 近年Mantle zone由来の細胞の腫瘍化と考えられるMantle zoneリンパ腫に強く相関し*BCL-1*転座が認められることが示された²⁶⁾。Mantle zoneリンパ腫, ILL or IDL(lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation), CC(centrocytic lymphoma)など, 少し概念的に異なる面もあるがほぼ同一の病型と考えられている。

3. *BCL-1* locusと*PRAD1*遺伝子

BCL-1 locusは、1984年にTsujiimotoら¹⁷⁾によってクローニングされた。t(11;14)転座を有するCLL症例において、転座によって免疫グロブリン遺伝子重鎖joining領域(*J_H*)と再構成している11q13のフラグメントとして単離され、この領域(後にMeekerらによりMTC: major translocation clusterと呼ばれている)にt(11;14)の切断点が集中していることが判明した²⁷⁾。しかし、転写産物が見出されずその後多くの研究者が*BCL-1*遺伝子を求めて遺伝子歩行を行った。その結果、Rabbittsら²⁸⁾によってMTCよりも36kb telomere側に多発性骨髄腫の切断点が、Meekerら²⁹⁾によって63kb telomere側にCLLの切断点が見出されたが、やはり転写産物は見つからなかった。1991年になって、Lammieら³⁰⁾は、パルスフィールドゲル電気泳動の結果から*PRAD1*遺伝子と*BCL-1* locusは250kb以内にあることを、Rosenbergら³¹⁾は130kb以内であることをそれぞれ報告した。そして1991年、Withersら³²⁾はMTCよりtelomere側へ120kb walkingした所ではじめて4.5kbと1.7kbの転写産物を見だし、遺伝子クローニングおよび、塩基配列を決定したところすでに報告されていた*PRAD1*遺伝子と同一であった。

4. t(11;14)転座と*PRAD1*遺伝子の活性化

Rosenbergら³¹⁾は、検索したCC症例7例全例で*PRAD1*遺伝子の過剰発現を認めその内3例でMTCプロンプで*BCL-1*再構成を認めたほか、*BCL-1*再構成を認めたCLL2例で*PRAD1*遺伝子の過剰発現を確認し、*BCL-1*再構成と*PRAD1*遺伝子の発現が相関していることを報告している。我々は、以下に述べる理由によりt(11;14)(q13;q32)転座の見られるB細胞株で*PRAD1*遺伝子が活性化されている可能性を考え、検索を進めた。まず第一に*PRAD1*遺伝子は副甲状腺腫において副甲状腺特異的な遺伝子である*PTH*遺伝子との再構成により活性化される転座関連遺伝子であることより、*PRAD1*遺伝子はB細胞特異的な遺伝子である免疫グロブリン遺伝子転座によっても活性化され得るということ。第二に*PRAD1*遺伝子と*BCL-1*転座切断点との距離は約120kbで、免疫グロブリン遺伝子により活性化され得る距離であること(筆者らは、t(14;18)(q32;q21)の活性化機構の検索にて転座した*BCL-2*遺伝子が約250kb以上も離れた所に位置する免疫グロブリン遺伝子によって活性化され得ることを報告している⁶⁾)。第三に*PRAD1*遺伝子は細胞の分裂増殖を制御するcyclin遺伝子であることなどである。

我々は¹⁹⁾, t(11;14)(q13;q32)を有するB細胞株5株を含む種々の造血器腫瘍株約20種類の*PRAD1*遺伝子の発現を検索したところ、t(11;14)(q13;q32)転座を有する細胞株においてのみ*PRAD1*遺伝子の過剰発現が見られることを報告し(図3), *PRAD1*遺伝子は*BCL-1*遺伝子そのものであることを示唆した。SP-49株においては、3.4kbの異常なサイズのmRNAを検出しており遺伝子ライブラリーおよびcDNAライブラリーを作成し解析したところ遺伝子レベルでの約1.8kbのinternal deletionによって、mRNAが一部欠失し、蛋白非翻訳領域のdestabilizing signal (AUUUA)が失われていることを見いだした。したがって、mRNAの半減期が延長し過剰な異常cyclinが産生される可能性も示唆される。このように、免疫グロブリン

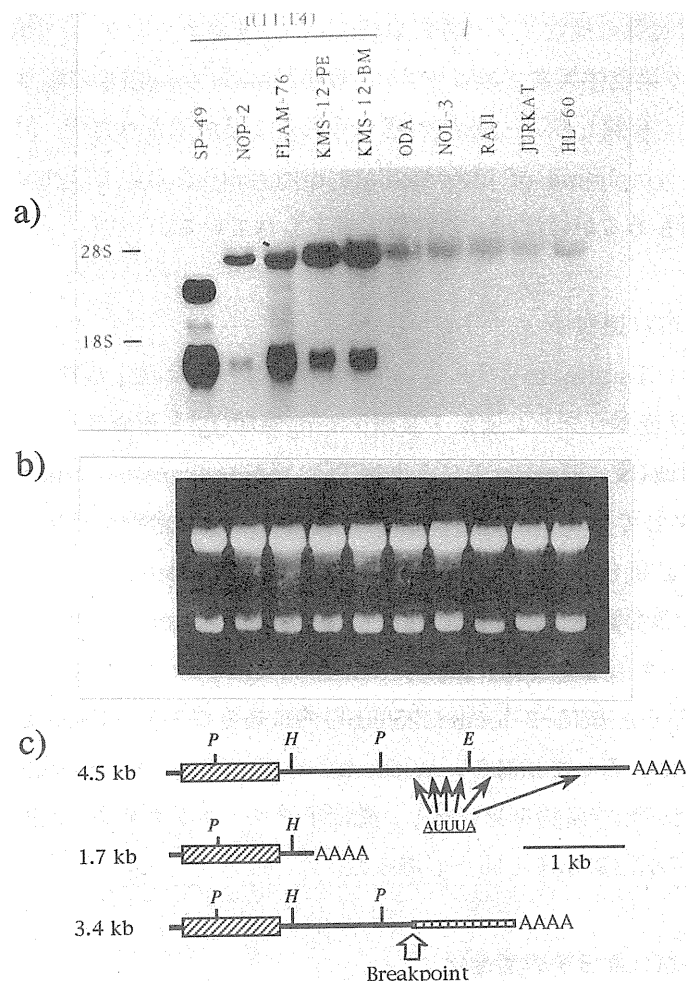


Fig.3 Overexpression of PRAD1 in t(11;14)(q13;q32) cells.
a) Northern blot analysis with PRAD1 probe. b) Ethidium bromide staining of the gel. c) Size of normal PRAD1 mRNA are 4.5 kb and 1.7 kb. Abberant sized mRNA of 3.4 kb in SP-49 is shown. "AUUUUA", destabilizing signal. Hatched box; open reading frame.

ン遺伝子のエンハンサー効果だけでなく転座に伴って起こるmRNAの質的量的変化も腫瘍化に関係しているものと我々は考えている。

5. BCL-1/PRAD1遺伝子活性化とマントル層リンパ腫形成

t(11;14)転座によりBCL-1/PRAD1活性化が引き起こされるが腫瘍化においてどのような役割を担っているのかについて考察すると、BCL-2遺伝子活性化が濾胞性リンパ腫に果たす役割と同様な共通する腫瘍化機構が認められる。すなわちBCL-1/PRAD1遺伝子の制御異常が腫瘍化に結びつくという共通性である。リンパ濾胞の最外層のマントル層はmemory Bやvirgin B細胞より形成される。これらの細胞はKi-67抗原の発現様式からも明らかなように細胞回転上はG0であるとされている。すなわち正常マントル層細胞はG0であることよりG1 cyclinであるBCL-1/PRAD1すなわちG1 cyclin D1はなんらかの機構でshut offされている(図2a)。本来G0であるべき細胞群に対し、転座により活性化されたBCL-1/PRAD1遺伝子は免疫グロブリン遺伝子の影響下にあるためshut offされず発現し続けることが推測される。すなわちBCL-1活性化は正常分化段階ではG0の細胞群に増殖シグナルを与えることになり、結果的にマントル層分化段

階で細胞に growth advantage を与えリンパ腫発症へとつながっていくと考えられる (図 2 b)。

III. おわりに

BCL-1 転座および *BCL-2* 転座は構造蛋白の変化を伴わない転座様式であり、その発現制御異常がある特定の分化段階における細胞群に growth advantage を引き起こし、さらに腫瘍化へとつながっていくことが示唆されているということについて述べてきた。*BCL-2* 遺伝子転座は単独でリンパ腫形成に働くかということについては否定的で、トランスジェニックマウスで示されたように他の遺伝子変化が必要とされることが示唆されている。また、近年、抗 *BCL-2* 抗体により濾胞性リンパ腫以外で *BCL-2* が多量に発現していることが報告されているが、例えばマントル層リンパ腫では *BCL-2* が正常分化段階の一過程として発現されているのであり、制御異常による発現とは腫瘍化における役割が異なることを指摘しておきたい。

染色体転座により活性化される遺伝子は腫瘍化に重要な役割を果たしていることはこれまで述べてきたが、もう一つの大切な側面は、特定の転座関連遺伝子の活性化が特定の分化段階の腫瘍を形成することである。すなわちこれら遺伝子の細胞の正常な分化段階における生物学的な役割をなんらかの形で反映している。転座関連遺伝子は細胞分化という意味においても重要な役割をはたしていることが推測され、きわめて重要な研究領域であると考えられる。

参考文献

- 1) Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P. et al: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around J_H on chromosome 14 and near a transcriptional control unit on 18. *Cell* 41: 899-906, 1985.
- 2) Cleary M. L. and Sklar, J.: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 7439-7443, 1985.
- 3) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. et al: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985.
- 4) Tsujimoto, Y. and Croce, C. M.: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 5214-5218, 1986.
- 5) Cleary, M. L., Smith, S. D. and Sklar, J.: Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47: 19-28, 1986.
- 6) Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D. et al: Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.* 7: 123-131, 1988.
- 7) Hockenberry, D., Nunez, G., Milliam, C. et al: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336, 1991.
- 8) Bakhshi, A., Wright, J. J., Graninger, W. et al: Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: Structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 2396-2400, 1987.
- 9) Osada, H., Seto, M., Ueda, R. et al: bcl-2 gene rearrangement analysis in Japanese B cell lymphoma: Novel bcl-2 recombination with immunoglobulin κ chain gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 711-715, 1989.

- 10) Seto, M., Osada, H., Ueda, R. et al: bcl-2 translocation in Japanese B cell lymphoma: Novel bcl-2 translocation with immunoglobulin heavy chain diversity segment. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 65-71, 1991.
- 11) Nunez, G., Seto, M., Serementis, S. et al: Growth and tumor-promoting effects of deregulated Bcl-2 in human B lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 4589-4593, 1989.
- 12) Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M.: bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and co-operates with c-myc to immortalize pre B cells. *Nature* **335**: 440-442, 1988.
- 13) Nunez, G., London, L., Hockenberry, D. et al: Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hematopoietic cell lines. *J. Immunol.* **144**: 3602-3610, 1990.
- 14) McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M. et al: bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**: 79-88, 1989.
- 15) Liu, Y-J., Johnson, G. D., Gordon, J., MacLennan, I. C. M.: Germinal centers in T-cell dependent antibody responses. *Immunol. Today* **13**: 17-21, 1992.
- 16) Korsmeyer, S. J., McDonnell, T. J., Nunez, G. et al: Bcl-2: B cell life, death and neoplasia. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **166**: 203-207, 1990.
- 17) Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L. et al: Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosomal translocation. *Science* **224**: 1403-1406, 1984.
- 18) Arnold, A., Kim, H. G., Gaz, R. D. et al: Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J. Clin. Invest.* **83**: 2034-2040, 1989.
- 19) Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S. et al: Gene rearrangement and overexpression of PRAD1/cyclin D1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene* **7**: 1401-1406, 1992.
- 20) Rosenberg, C. L., Kim, H. G., Shows, T. B. et al: Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in parathyroid tumors. *Oncogene* **6**: 449-453, 1991.
- 21) Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G. et al: A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* **350**: 512-515, 1991.
- 22) Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B., Beach, D.: Human D-type cyclin. *Cell* **65**: 691-699, 1991.
- 23) Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J.: Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**: 701-713, 1991.
- 24) Van Den Berghe, H., Parloir, C., David, G. et al: A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders. *Cancer* **44**: 188-195, 1979.
- 25) Dawald, G. W., Kyle, R. A., Hicks, G. A. et al: The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* **66**: 380-390, 1985.
- 26) Raffeled, M & Jaffe, E. S.: bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* **78**: 259-263, 1991.
- 27) Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J. et al: Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* **315**: 340-343, 1985.
- 28) Rabbitts, P. H., Douglas, J., Fisher, P. et al: Chromosome abnormalities at 11q13 in B cell tumours. *Oncogene* **3**: 99-103, 1988.

- 29) Meeker, T. C., Grimaldi, J. C., Rourke, R. et al: An additional breakpoint region in the *BCL-1* locus associated with the t(11;14)(q13;q32) translocation of B-lymphocytic malignancy. *Blood* 74: 1801-1806, 1989.
- 30) Lammie, G. A., Fantl, V., Smith, R. et al: D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to *BCL-1*. *Oncogene* 6: 439-444, 1991.
- 31) Rosenberg, C. L., Wong, E., Petty, E. et al: PRAD1, a candidate *BCL-1* oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9638-9642, 1991.
- 32) Withers, D. A., Harvey, R. C., Faust, J. B. et al: Characterization of a candidate *bcl-1* gene. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4846-4853, 1991.

VI 特別講演

原爆被爆者集団におけるガン発生調査

馬 淵 清 彦

特別講演

原爆被爆者集団におけるガン発生調査

馬 淵 清 彦*

Cancer Incidence in the Atomic Bomb Survivors

Kiyohiko Mabuchi

Radiation Effects Research Foundation

5-2, Hijiyamakoen, Minami-ku, Hiroshima-shi, 732 Japan

Abstract

This report presents comprehensive solid-cancer incidence data and risk estimates for A-bomb survivors in the extended Life Span Study cohort. Cancer cases occurring among members of the LSS cohort were identified as part of the Hiroshima and Nagasaki tumor registries standard registration process. Among 79,972 individuals, 8,613 first primary solid cancers were diagnosed between 1958 and 1987. A standard set of analyses was carried out for each of the organs and organ systems, using DS86 organ or kerma doses.

Consistent with prior LSS findings on mortality, a statistically significant excess risk for all solid cancers was demonstrated. Significant radiation associations were observed for cancers of the stomach, colon, lung, breast, ovary, urinary bladder and thyroid. For the first time, radiation has been associated with liver and non-melanoma skin cancer incidence in the LSS cohort. The present analysis also strengthened earlier findings, based on a smaller number of cases, of an effect of A-bomb radiation on salivary gland cancer. Analyses of solid tumors individually and in combination revealed no appreciable differences between Hiroshima and Nagasaki. The combined solid-tumor analysis demonstrated a two-fold greater relative risk for females than males and a trend for a decreasing relative risk with increasing age at exposure.

Previous LSS studies focused primarily on the association between cancer mortality and radiation exposure. Although these mortality studies are extremely valuable, the accuracy

*放射線影響研究所

of cancer diagnoses is limited, and death certificates do not provide adequate information on cancers with relatively high survival rates. Although incidence data also have their limitations, they can provide more complete data on cancers with lower mortality, on histologic type, and on time from exposure to cancer onset. Future analyses of atomic-bomb survivors should focus on both cancer mortality and incidence.

過去30年以上にわたり、ABCC・放射線影響研究所(放影研)は、原爆被爆者より成る固定集団コーホートを追跡調査してきた。寿命調査集団(Life Span Study-LSS)と呼ばれるこのコーホート集団は、約93,000人より成る被爆者と27,000人の非被爆者より構成され、放射線被爆に関連するリスク評価のための重要な情報源である。従来、LSSにおける放射線とガンとの関連については、死亡調査が焦点であった。死亡調査は貴重なものではあるが、死因の正確性について問題がある。更に、予後の良いガンについては有益な情報を与えないし、ガンの組織型や発症時期を知ることについても、その情報に制限がある。従って、被曝によるガンの全体像を知るには、死因と発生(罹患)のデータの両者が必須である。

ガン罹患データは、放射線被曝によるガンの影響をフルに評価するのに必要な情報を提供するが、種々の制限・問題があることも認識しておくことが重要である。全国にわたり、ルーチンに集められる死因データと異なり、ガン罹患データの収集には特別の調査が必要とされる。特に、大きな集団を対象として、長期間にわたる罹患データを完全に把握するには多大の努力を必要とし、把握が不完全な場合には、リスク評価のバイアスにもつながる可能性がある。LSSは、年齢や性といった人口構成や、その大きさ、追跡期間の長さ等から他に比類のない被曝集団であることから、このコーホートにおけるガン罹患は特に重要である。このため、放影研は地元医師会の協力を得て、広島と長崎における腫瘍登録の改善ならびにLSS集団におけるガン罹患データの収集とその改善のため努力を払った。

これまで、原爆被爆者集団における包括的なガン罹患データは発表されていない。1963年、LSS集団におけるガン罹患の予備的報告がされて以来、LSSの長崎集団における全ガン罹患データや、乳房、甲状腺、肺、胃、卵巣等の部位別ガン罹患データが発表されているが、これらは時期の違いのみならず、いずれも対象集団、症例発見や診断基準等がやや異なっている。本報告では、LSS-E85コーホート集団における全充実性腫瘍の罹患データを用いて、放射線被曝によるリスク評価について最初の包括的データを紹介する。

広島・長崎地域におけるガンについてデータを収集、管理し、原爆放射線被曝に関連したガンリスクの評価を行う目的で、population-basedの腫瘍登録が1957年に広島に、1958年には長崎に設立された。広島および長崎の腫瘍登録の特徴は、両地域の主要病院の医療記録の検索と腫瘍情報の抽出に基づく積極的なアプローチを用いていることである。さらに、両地域で行われている病理医を中心とした組織登録や、今までに行われた被曝者の数々の臨床的、病理学的プログラムの資料によって補足されている。登録されたデータの精度に関しては、広島および長崎の腫瘍登録における死亡診断書のみ(Death Certificate Only: DCO)の率は9%以下、死亡率/発生率(Mortality/Incidence: M/I)比は約50%、顕微鏡確認(Microscopic Verification: MV)率は70%以上であり、これは我国では最も優れたものであり、世界の数多くの登録の成績に匹敵するものとなっている。LSS集団に関する全腫瘍登録データについては、標準化した手順に基づき、高品質かつ均一化されたデータを目指して特別に留意しながら、集計、検討、処理を行った。さらに、LSS腫瘍発生率データの精度を評価するため、特別調査および監視プログラムも導入した。発生率データの質を検討するため、データ全体について、またリスク評価に利用される年齢、時間、放射線量群などの各

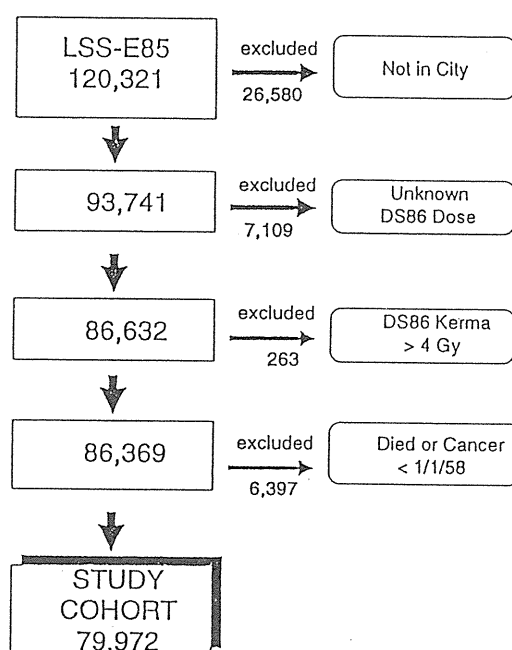


図 1

区分別に解析を行ったところ、各指標で表されるデータの質と放射線量との間に有意な関係は認められなかった。これらの理由から、腫瘍登録を基盤にした現行データが、原爆被爆者におけるガンリスクの評価に用いられることを裏付けするものである。

広島・長崎における腫瘍登録の登録業務の一環として、LSS-E85集団中に発生した癌症例は、コンピューター及び一部手作業によるリンケージにより探知される。今回のLSSガン罹患の解析の対象には、次の条件を満たすものとした：(1)被爆時に広島・長崎に居住していたこと(即ち、Not-in-Cityを除く)、(2)腫瘍登録が始まった1958年の時点で生存していたこと、(3)DS86カーマ線量が4 Gyより低いこと、さらに(4)1958年以前にガンが診断されていないこと。これにより、対象者は計79,972人、1,950,567人年となった(図1)。

対象となる充実性腫瘍としては、全悪性腫瘍と中枢神経系の良性及び性状不祥の腫瘍を含んだ。中枢神経系の良性・性状不祥の腫瘍を加えた理由は、これらの腫瘍は臨床的には悪性であることによる。さらに、把握が不十分ないし偏っている懸念から、in situ病変と潜在性ガンは除外した。これらの充実性腫瘍の内、一次腫瘍で、広島・長崎の腫瘍登録範囲と考えられる両県内に居住する人々におこったものを対象症例とした。今回の解析には、血液・造血管腫瘍は含めなかったが、これについては別に報告する。このような条件から、1958年から1987年の間に、合計8,613の一次性充実性腫瘍が診断された。

リスク評価に当たっては、各臓器および臓器系について、一連の標準化した解析を行い、癌の部位に応じて、DS86臓器線量またはカーマ線量を用いた。解析は、一般的な過剰相対リスク・モデル(バックグラウンド率 $\times 1 +$ 過剰相対リスク)に基づいて行った。部位別の解析では、下記のモデルをあてはめて行った：線量効果を含まないバックグラウンド・モデル、修飾効果を含まない線形線量反応モデル、修飾効果を含まない線形二次線量反応モデル、ならびに、効果修飾因子として、性、被爆時年齢、被爆後経過年数、到達年齢および都市の各共変量を含む一連の線形線量反応モデル。腫瘍登録は、対象地域内における癌のみを把握するものであることから、転出の影響についての統計的補正を行った。

主な腫瘍部位別の罹患者数、リスク推定値は表1に示す。図2には、部位別過剰相対リスクを示す。寿

表1 LSS集団における1958-87年充実性腫瘍-罹患者数とリスク

腫瘍部位	全症例数	ERR _{1Sv}	EAR per 10,000 PYSv
全部位	8,613	0.63 (0.52; 0.74)	29.7 (24.7; 34.8)
口腔・咽頭	132	0.29 (-0.09; 0.93)	0.23 (-0.08; 0.65)
全消化系	4,797	0.38 (0.25; 0.52)	10.4 (7.0; 14.0)
食道	185	0.28 (-0.21; 1.0)	0.30 (-0.23; 1.0)
胃	2,658	0.32 (0.16; 0.50)	4.8 (2.5; 7.4)
結腸	457	0.72 (0.29; 1.3)	1.8 (0.74; 3.0)
直腸	351	0.21 (-0.17; 0.75)	0.43 (-0.35; 1.4)
肝	585	0.49 (0.16; 0.92)	1.6 (0.54; 2.9)
胆のう等	295	0.12 (-0.27; 0.72)	0.18 (-0.44; 1.1)
膵	240	0.18 (-0.25; 0.82)	0.24 (-0.36; 1.1)
呼吸系	1,027	0.80 (0.50; 1.2)	4.4 (2.9; 6.1)
肺	872	0.95 (0.60; 1.4)	4.4 (2.9; 6.0)
皮膚(黒色腫以外)	168	1.0 (0.41; 1.9)	0.84 (0.40; 1.4)
乳房(女性)	529	1.6 (1.1; 2.2)	6.7 (4.9; 8.7)
子宮	724	-0.15 (-0.29; 0.10)	-1.1 (-2.1; 0.68)
卵巣	133	0.99 (0.12; 2.3)	1.1 (0.15; 2.3)
前立腺	140	0.29 (-0.21; 1.2)	0.61 (-0.46; 2.2)
泌尿器系	325	1.2 (0.62; 2.1)	2.1 (1.1; 3.2)
膀胱	210	1.0 (0.27; 2.1)	1.2 (0.34; 2.1)
腎・腎盂・尿管	101	0.71 (-0.11; 2.2)	0.29 (-0.50; 0.79)
神経系	125	0.26 (-0.23; 1.3)	0.19 (-0.17; 0.81)
甲状腺	225	1.15 (0.48; 2.1)	1.6 (0.76; 2.5)

命調査の死亡率に基づくこれまでの所見と一致して、全充実性腫瘍につき統計学的に有意な過剰リスクが観察された(1 Sv 当たり過剰相対リスク(ERR_{1Sv})=0.63; 10⁴人年 Sv(PYSv) 当たり過剰絶対リスク(EAR)=29.7)。胃癌(ERR_{1Sv}=0.32)、結腸癌(ERR_{1Sv}=0.72)、肺癌(ERR_{1Sv}=0.95)、女性乳癌(ERR_{1Sv}=1.59)、女性卵巣癌(ERR_{1Sv}=0.99)、膀胱癌(ERR_{1Sv}=1.02)および甲状腺癌(ERR_{1Sv}=1.15)について、放射線との有意な関連が認められた。20歳以下で被爆した者での、神経組織(脳を除く)腫瘍の増加が示唆された。寿命調査集団において、放射線と肝臓(ERR_{1Sv}=0.49)および黒色腫を除く皮膚癌(ERR_{1Sv}=1.0)の発生

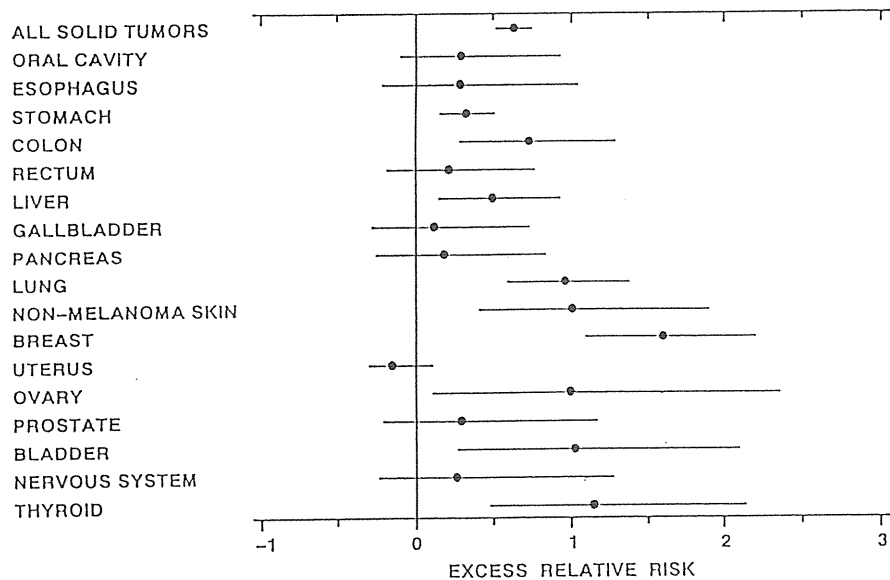


図2 部位別過剰相対リスク

率との関連が今回初めて認められた。今回の解析は、以前の少数例に基づく調査でみられた唾液腺腫瘍に対する原爆放射線の影響に関する所見を更に強化した。口腔・咽頭、食道、直腸、胆嚢、膵臓、咽頭、子宮頸部、子宮体、前立腺、腎臓および腎盂のガンについては放射線の有意な影響は認められなかった。

充実性腫瘍の部位別解析においても、また、全腫瘍をまとめた解析においても、広島・長崎間に差異は認められなかった($p > 0.5$)。全充実性腫瘍の解析では、女性の相対リスクが男性の2倍であること、また、被爆時年齢の増加とともに相対リスクが減少することが示された($p < 0.001$)。肺、全呼吸器系、泌尿器系癌の相対リスクは、男性よりも女性の方が高かった。唾液腺、全消化器系、胃、皮膚、乳および甲状腺ガンの過剰相対リスクは被爆時年齢の増加とともに減少した。全充実性腫瘍の過剰発生率は、到達年齢の増加に伴い、バックグラウンド発生率に比例して増加した。被爆時年齢を調整しない場合、ほとんどのガン部位について過剰相対リスクは到達年齢の増加とともに減少する傾向が示された。いくつかのガン(結腸、乳房、中枢神経系および腎臓)について、過剰相対リスクが到達年齢とともに変化するとしたモデルは、被爆時年齢の影響を含むモデルと少なくとも同程度の適合度を示した。絶対過剰リスク・モデルに基づく全充実性腫瘍の過剰発生率は、被爆後年数とともに増加した。全被爆時年齢についての平均相対リスクは被爆後年数とともに減少した。被爆時年齢群別に経時的動向を解析したところ、過剰相対リスクは被爆時若年群で時間の経過とともに減少し、高齢群では実質的には一定であることが示唆された。

当報告は、LSSにおけるガン罹患データについて、放射線影響が有意義に認められる、または示唆される部位、あるいは放射線影響がなさそうな部位を明らかにし、さらにこれらの部位についてどのようなデータが存在するのかを示す大まかな地図のようなものと考えられる。今回の結果は、将来さらに詳細な解析、例えば年齢、性、時間といった因子間の相互関係や、リスク評価に関するさまざまなモデルの検定につながるものと期待される。さらに、腫瘍登録では通常得られないデータ、例えば喫煙、食餌習慣、女性の出産歴といった、一般的なガンの疫学的リスク因子の情報を獲得し、さらにこれらと放射線との相互関係の研究に至ることが望まれる。放射線によるガンのリスクをより正しく評価し、種々の修飾因子や放射線以

外のリスク因子との関連を明らかにすることは、放射線発ガンの機構を理解するためには重要な手がかりになると考えられる。原爆被爆者集団における今後の疫学的調査では、ガンの死亡率のみでなく、ガン罹患率調査を中心として広範な手法を用いた研究に重点が置かれなければならない。

VII 発がん制御

- 1 アンチセンスオリゴDNAを用いた癌遺伝子治療の開発 和気 徳夫 他
- 2 アスコルビン酸によるin vitro発癌の抑制 田内 広 他
- 3 レチノイド 橋本 祐一
- 4 茶カテキンの機能性と発がん抑制の可能性 原 征彦
- 5 アザチロシン 岡田 信子
- 6 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼすカロリー制限の効果 吉田 和子 他

1 アンチセンスオリゴDNAを用いた 癌遺伝子治療の開発

和 気 徳 夫* / 村 上 章**

Genetic events associated with human endometrial carcinogenesis.

Norio Wake / Akira Murakami

*Medical Institute of Bioregulation Kyushu Univ.

4546, Aza Tsurumihara, Oaza Tsurumi, Beppu-shi, 874 Japan

**Dept. Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

Matsugazaki, Sakyo-Ku, Kyoto, Japan

Abstract

Progressive Accumulation of genetic changes is required for the carcinoma development. Several lines of evidences are able to disclose the putative sequence of genetic events associated with human endometrial and cervical carcinomas. Chromosomes 1 and 4 carried a putative tumor suppressor gene for endometrial carcinomas. K-ras gene mutations and allelic losses corresponding to the DCC gene sequences were detected frequently in this carcinoma. p53 gene mutations correlated with the appearance of aggressive behavior of endometrial carcinoma cells that had proceeded through a series of the 4 genetic alterations. Particular types of HPV were associated with human anogenital cancers. Coordinated expression of E6 and E7 contributed to the development and possibly also in the maintenance of malignancies. These evidences strongly implicate a key role of K-ras gene mutations in endometrial carcinomas and of HPV E6/E7 in cervical carcinomas, respectively.

The effects of phosphorothioate oligonucleotides complementary to K-ras codon 12 or HPV 16 E6/E7 transcriptional start site on the carcinoma cell lines were examined. Exposure of two carcinoma cells (HHUA and SiHa) to the oligomers greatly reduced cell numbers and ³H-thymidine uptake, respectively. This potent antiproliferative activity exhibited by the oligomers dose not associate with the nonspecific growth inhibitory effects.

癌は複数の遺伝子変異の集積の結果発生する。特定の悪性腫瘍では既に一連の遺伝子変異もほぼ明らかとされ、近い将来の遺伝子診断への応用も考慮されている。同時に遺伝子変異の癌化過程における役割を解析した結果から、変異遺伝子をターゲットとした遺伝子治療の有効性についてもさかんに論議されている。がん遺伝子或いはがん抑制遺伝子をターゲットとして遺伝子治療を考案する場合、ターゲット遺伝子は癌形質獲得のために重要な機能を有し、正常型遺伝子の導入或いは変異遺伝子発現の抑制により、細胞の表現形質が顕著に変化するものでなければならない。このため癌遺伝子治療開発のためには、癌化に関与する一連の遺伝子変化が十分に明らかとされていることが必要である。

我々は子宮内膜癌、子宮頸癌に焦点を絞り、遺伝子治療の開発を試みている。従来の研究から、ヒト1番染色体上の未クロニング遺伝子の変異が子宮内膜細胞の不死化(Yamada et al 1990)に、DCC遺伝子、K-ras遺伝子、4番染色体上の未クロニング遺伝子の変異が造腫瘍性の獲得に関与することが示唆されている(Imamura et al 1992)。p53遺伝子変異或いは同遺伝子部分を含む17pの欠失は進行癌症例にのみ観察されることから、癌のプログレッションに関連する変化と推測された(Honda et al 1993)。一方子宮頸癌の発生は、HPV16或いは18型等のE6/E7遺伝子領域の発現と深い関わりを有する。E6/E7遺伝子発現はヒト角化細胞の不死化を招来し、細胞側ゲノム中の複数の遺伝子変化が多重に集積することにより、子宮頸癌の発生を導くと推測されている。このような癌化に関連した遺伝子変化の中で、子宮内膜癌ではK-ras遺伝子を、子宮頸癌ではHPV16型E6/E7遺伝子をターゲットとし、これらの蛋白合成を阻害することにより、癌の治療が可能か否かの基礎的検討を行った。

標的遺伝子の発現を抑制する手段として、本研究ではアンチセンスオリゴDNA(ASと略す)を用いた。細胞内での安定性を得るため、種々のヌクレアーゼに耐性であるホスホロチオエート型に修飾し使用した。子宮内膜癌細胞株HHUAはK-ras遺伝子コドン12にGly-VALへの点突然変異を有する。このため点突然変異部を含む13塩基のASを作成し、HHUA細胞の培養液中に添加することでその増殖抑制効果を調べた。一方、HPV16型E6/E7領域を保存している子宮頸癌細胞としてSiHa株を用いた。ASはE6/E7遺伝子、それぞれの蛋白翻訳開始コドンを含む領域に相補的な15塩基として作成した。HHUA及びSiHa細胞をそれぞれ 1×10^5 個播種し、24時間培養後前者にはK-rasASを、後者にはHPV16型E6/E7に対するASを $20 \mu\text{M}$ の濃度で培養液中に添加した。対照群はAS無添加の場合として設定した。また既知のHPV遺伝子が検出されないC33a子宮頸癌細胞へHPV16型E6/E7ASを添加した場合を、ナンセンスDNA投与群としオリゴヌクレオチドによる非特異的細胞毒性の有無について検討した。

AS添加24時間後のHHUA及びSiHaの細胞数は、無添加群のそれと比較し共に約60%に減少した(図1～2)。しかしAS添加後48時間以降の細胞数は、両細胞共に無添加群と比較し有意差を認めなかった。ASの培養液中への添加は、 H^3 -チミジンの細胞内取り込みも有意に抑制した。AS投与後24時間の H^3 -チミジン取り込み率はHHUAで約20%、SiHaで23.7%に減少した。しかしASによる抑制効果は一時的なもので、48時間以降ではHHUA及びSiHa細胞共に、AS無添加群とほぼ同様の H^3 -チミジン取り込み率を示した。またAS添加24時間後の細胞形態は、両細胞共にASによると思われる変化を示した。多数の細胞で、平坦化及び培養液中への浮遊が観察された。一方ナンセンスDNAが投与されたC33a細胞では無添加群と比較しても経時的な細胞数の現象或いは H^3 -チミジンの細胞内取り込みの低下といった現象は全く観察されなかった(図3)。このためAS添加による一時的な細胞数の減少、或いは H^3 -チミジンの細胞内取り込みの抑制は、非特異的なオリゴヌクレオチドによる細胞毒性によるものではなく、ASに特異的な作用であることが示唆された。

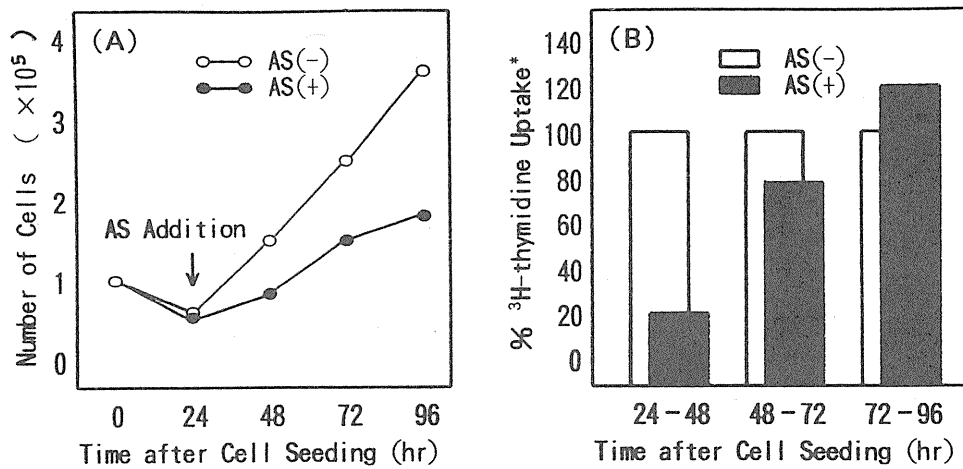


図1 Effect of Antisense DNA (HHUA)

(A) Number of Cells, (B) % ³H-thymidine Uptake

* % ³H-thymidine uptake was calculated by comparison with ³H-thymidine uptake in AS (-) control cultures.

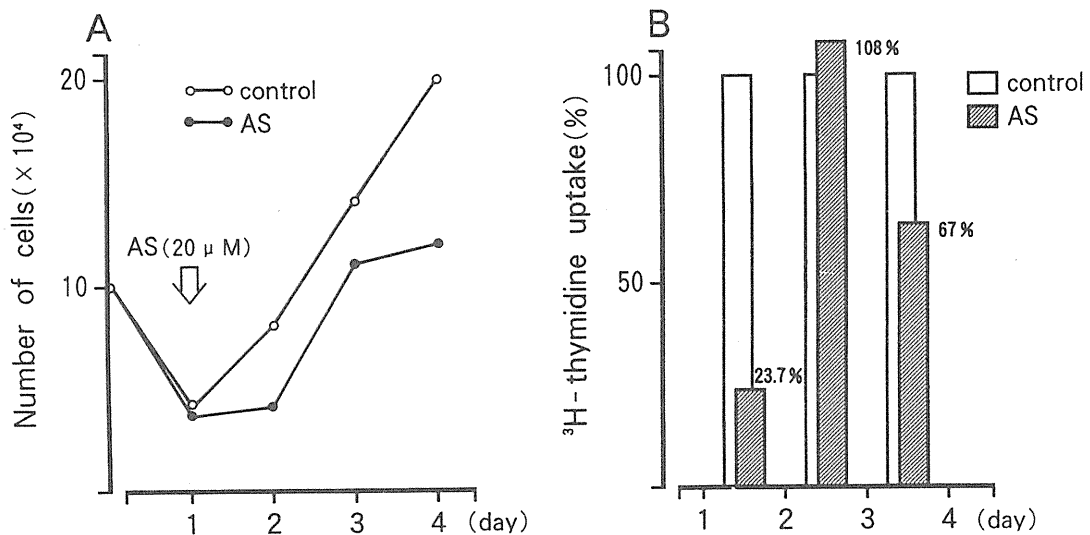


図2 SiHaに対するAS添加後の細胞数(A)および³H-thymidine uptake (B)の変化

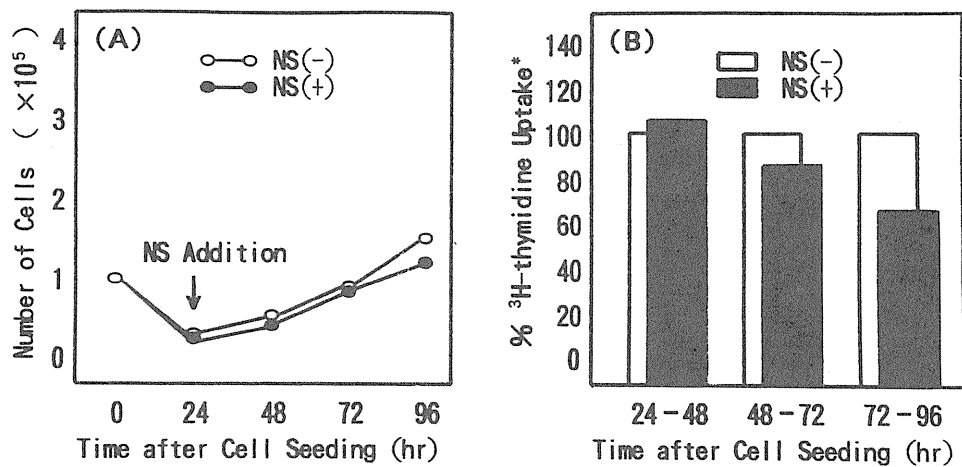


図3 Effect of Nonsense DNA (C33a)

(A) Number of Cells, (B) % ³H-thymidine Uptake

* % ³H-thymidine uptake was calculated by comparison with ³H-thymidine uptake in NS (-) control cultures.

以上の結果から、ASオリゴDNAはK-ras変異蛋白或いはHPV16型E6/E7蛋白の合成を特異的に阻害し、細胞増殖を抑制する効果のあることが示唆された。しかしASによる抑制効果は一時的なもので48時間以降に継続することはなかった。このため①長時間処理による細胞内ASの集積性の低下②ASオリゴDNAによるDNA-RNA複合体形成の不完全さ③K-ras変異蛋白或いはHPV16型E6/E7蛋白の発現を癌形質表現のために必要としないクローンの出現、等がASによる不十分な増殖抑制の原因として推測された。

ASの継続的な細胞内集積性の変化を解析する目的で、次にFITC結合型ASを作成し、AS添加後1時間の細胞内移行を蛍光顕微鏡で観察し、また経時的なAS取り込みの変化をFAC SCANを用いて検討した。その結果AS添加後1時間でほとんどの細胞にASは移行し、細胞内移行量は24時間以内に最大に達した。AS添加後48時間の細胞内集積性も24時間後のものとほぼ同様であったことから、新たに分裂した細胞にもASは容易に移行し、細胞内に十分量集積することが判明した。以上の結果は細胞内ASの集積性の低下が、ASによる不完全な細胞増殖抑制の原因となっていないことを示唆する。このため今後AS添加HHUA或いはSiHa細胞でのK-ras或いはE6/E7蛋白合成の抑制の有無、さらには効率よくDNA-RNA複合体形成に向かう修飾型ASの作成、等の検討が必要である。

参考文献

- 1) Imamura, T., Arima, T., Kato H., Miyamoto, S., Sasazuki, T. and Wake, N.: Chromosomal deletions and K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer* **51**, 47-52, 1992.
- 2) Yamada, H., Wake, N., Fujimoto, S., Barrett, J. C. and Oshimura, M.: Multiple chromosomes carrying tumor suppressor activity for a uterine endometrial carcinoma cell line identified by microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene* **5**, 1141-1147, 1990.
- 3) Honda, T., Kato, H., Imamura, T., Gima, T., Nishida, J., Sasaki, M., Hoshi, K., Sato, A. and Wake, N.: Involvement of p53 gene mutations in human endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer* **53**, 963-967, 1993.

2 アスコルビン酸による *in vitro* 発癌の抑制

田内 広／澤田 昭三*

Suppression of radiation-induced *in vitro* carcinogenesis by ascorbic acid

Hiroshi Tauchi and Shozo Sawada

Department of Radiation Biology, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology,
Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 Japan

Abstract

The effects of ascorbic acid on radiation-induced *in vitro* carcinogenesis have been reported using neoplastic transformation system of C3H 10T1/2 cells. In these reports, no suppressive effect on X-ray-induced transformation was observed with 6 weeks' administration of ascorbic acid (daily addition for 5 days per week) by Kennedy(1984), whereas apparent suppression was observed with daily addition for 7 days by Yasukawa *et al* (1989). We have tested the effects of ascorbic acid on ^{60}Co gamma-ray or ^{252}Cf fission neutron-induced transformation in Balb/c 3T3 cells. The transformation induced by both types of radiations was markedly suppressed when ascorbic acid was daily added to the medium during first 8 days of the post-irradiation period. If ascorbic acid was added for a total of 8 days but with a day's interruption in the middle, the suppression of transformation was decreased. These results suggest that continuous presence of ascorbic acid for a certain number of days is needed to suppress radiation-induced transformation. Since ascorbic acid also suppressed the promotion of radiation-induced transformation by TPA when both chemicals were added together into the medium, ascorbic acid might act on the promotion stage of transformation. Therefore, the effect of ascorbic acid on the distribution of protein kinase C activity was also investigated, and possible mechanisms of suppression of radiation-induced transformation by ascorbic acid will be discussed.

*広島大学原爆放射能医学研究所・障害基礎研究部門

1 はじめに

放射線発癌の抑制は、放射線防護の上からも重要である。in vitro放射線発癌系を用いた実験でも抑制効果を示す物質が検索され、C3H 10T1/2細胞のトランスフォーメーション系を中心に、プロテアーゼインヒビター¹⁻⁴⁾やビタミンA, C, Eおよびその誘導体⁵⁻⁹⁾で、X線や γ 線によるトランスフォーメーション抑制効果が報告されている。今回は、これらのうちアスコルビン酸(ビタミンC)を中心にそのin vitro放射線発癌抑制効果について、我々の実験データ¹⁰⁾をまじえて報告する。

アスコルビン酸は、それ自身が酸化されやすいために、いわゆる抗酸化作用を示し、食品の酸化防止剤としても利用されている。アスコルビン酸の生体内での役割とin vivo発癌抑制についてはいくつか総説があり^{11,12)}、これらによると、生体内では壊血病の防止をはじめとして、コラーゲンやカテコールアミンの生合成、ニトロソ化合物の生成抑制などに働いている。しかし、そのメカニズムについては、はっきりとわかっていないものが多い。また、アスコルビン酸のin vitro放射線発癌抑制効果についても同じC3H 10T1/2細胞系でありながら、効果があったというものと、なかったというものの2つの報告があり^{5,6)}、その抑制効果の作用機序も明らかになっていない。さらに、これまでのin vitro放射線発癌の抑制効果の研究は、X線や γ 線で行われ、中性子などのいわゆる高LET放射線での報告はなかった。我々はBalb/c 3T3細胞のトランスフォーメーション系を用いて中性子による細胞癌化に対する発癌プロモーターの効果を調べ、中性子による細胞癌化は γ 線ほど発癌プロモーターの影響を受けないことを報告している¹³⁾。そこで本稿では、アスコルビン酸がBalb/c 3T3細胞の γ 線や中性子による細胞癌化を抑えるかどうか、また、それらの効果に差があるかないかを明らかにすると共に、その作用機序についても若干の考察を加える。

2 Balb/c 3T3細胞のトランスフォーメーション実験系

Balb/c 3T3細胞を用いたin vitro放射線発癌実験系はLittle (1979)の報告¹⁴⁾をもとに我々が若干の変更を加えたもので、その概略はFig.1に示した。C3H 10T1/2細胞の系と比べるとトランスフォーメーションのdishあたりの細胞数をかなり多くできることが特徴で、dishあたり3000~7000生存細胞の範囲ではトラ

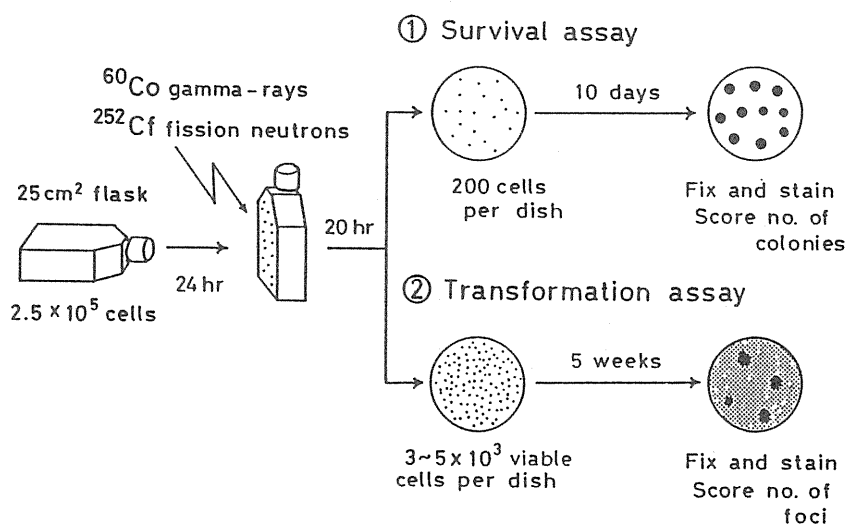


Fig.1 Balb/c 3T3 cell transformation system for the detection of radiation-induced *in vitro* carcinogenesis.

ンスフォーメーション頻度は細胞数の影響をあまり受けない¹⁴⁾。基本的には、対数増殖期の細胞に²⁵²Cf核分裂中性子または⁶⁰Co γ 線を照射した後、生体内と同じようにPLD repairを起こさせるために、20時間の培養後に細胞をトリプシン処理してはがし、60mm dishにまいて生存率およびトランスフォーメーション頻度を求めるというものである。トランスフォーメーションは週2回の培地交換を行いながら5週間培養し、出現したフォーカスの数より頻度を算出する。なお、アスコルビン酸を添加する場合は、酸化分解されやすいので、その都度新しい溶液を調整し、3 μ g/mlの最終濃度で培地に添加した。

3 中性子誘発トランスフォーメーションの抑制

放射線照射後の細胞を3 μ g/mlのアスコルビン酸で8日間処理することにより、 γ 線のみならず核分裂中性子によるトランスフォーメーションも顕著に抑制された。しかし、アスコルビン酸の抑制効果は発癌プロモーターの場合と同じく¹³⁾、 γ 線によるトランスフォーメーションの方がより大きかった。この抑制効果はアスコルビン酸処理を照射後4日目から行った場合でもはっきりと見られたが、処理途中で添加を1日中断するとその効果は非常に小さくなった(Fig.2)。このことはアスコルビン酸が抑制効果を示すためには、ある一定期間以上連続して存在することが必要であることを示唆する。実は、C3H 10T1/2細胞での相反する2つの報告は、アスコルビン酸の濃度は同じであるが、添加方法が大きく異なっていた。すなわち、効果がなかったというKennedy(1984)の報告⁶⁾では、アスコルビン酸処理を放射線照射直後から始めて、その後6週間続けてはいるが、それは週5日ずつの間隔で、5日毎に2日間の間断が入っていた。一方、Yasukaweら(1989)⁵⁾はアスコルビン酸処理を連続して1週間以上行っている。Balb/c 3T3細胞での我々の結果はこれに一つの説明を与える。つまり、アスコルビン酸が抑制効果を示すためには1週間以上の連続した処理期間が必要で、Kennedy(1984)の実験では、その連続した存在期間が足りなかったために、抑制効果が現れなかったものと考えられる。

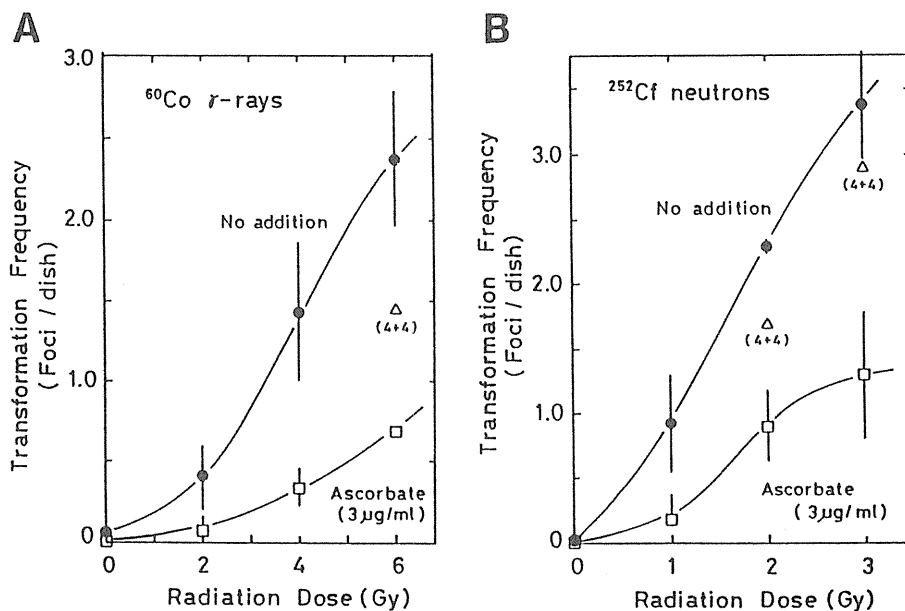


Fig.2 Effect of ascorbic acid on (A) gamma- and (B) fission neutron-induced transformation in Balb/c 3T3 cells. Ascorbic acid was added to the medium starting immediately after irradiation for 8 days. (Modified from ref. 10)

4 アスコルビン酸の作用点

放射線照射後のアスコルビン酸処理の開始時期とその抑制効果については、Yasukawaら(1989)が詳しい実験を行っている(Fig.3)。それによると、通常C3H 10T1/2細胞のトランスフォーメーション系で行う6週間の培養期間のうち、最後の6週目に1週間の処理を行ってもまだ抑制効果を示す。しかし、それ以後は効果はなくなる。これはトランスフォームしたphenotypeの増殖を抑えているというよりも、イニシエーションが起こった後のプロモーションの過程、すなわちトランスフォーマントの出現自体を抑えていると考えるべきであろう。Balb/c 3T3細胞の実験系でも細胞がコンプレントに達する照射後7日目からのアスコルビン酸処理でも、 γ 線によるトランスフォーメーションを顕著に抑制し、アスコルビン酸が細胞癌化の初期過程、すなわちイニシエーションに働いているのではないことを示唆している。また、トランスフォームした2つのクローンでその増殖に対するアスコルビン酸の影響を調べたが、アスコルビン酸はこれらには全く影響を与えなかった。

さらに、アスコルビン酸がプロモーション過程を抑えているということを示す実験結果も得ている(Fig. 4)。低線量の放射線を照射した細胞に、発癌プロモーターの一つ、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)と同時にアスコルビン酸を添加すると、TPAによる発癌プロモーション効果は顕著に抑制される。その一方で、アスコルビン酸処理を行った細胞をその後TPAで処理すると、アスコルビン酸の効果がまったく現れないばかりか、TPAによる発癌プロモーションが現れる。このことは、アスコルビン酸がin vitro放射線発癌のプロモーション段階にTPAの作用の逆方向に働いており、その効果はその後の状況によっては消失するものであることを示している。

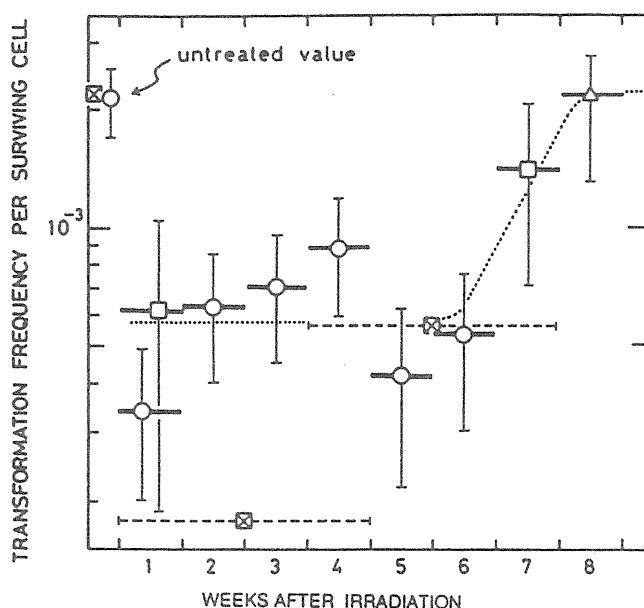


Fig.3 Susceptibility of transforming cells to ascorbic acid during the expression period after 3.72 Gy X-rays irradiation. Cells were treated with ascorbic acid ($5\mu\text{g/ml}$) for 1 week at various times during the 8-weeks assay period, as indicated by horizontal bars. (Yasukawa, M. *et al.*, 1989)

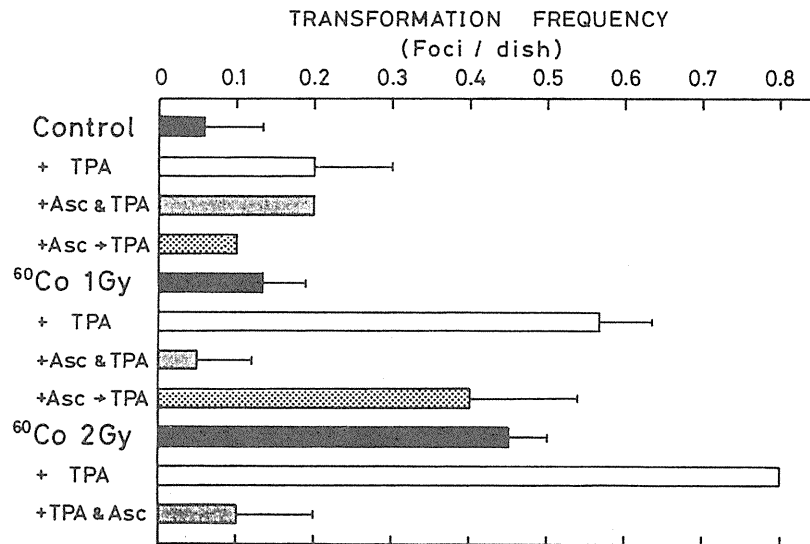


Fig.4 Effect of ascorbic acid (3 μ g/ml) and TPA (100ng/ml) on radiation-induced transformation in Balb/c 3T3 cells. TPA: Cells were treated with TPA from day 1 post-irradiation for 3 weeks. Asc & TPA: Both ascorbic acid and TPA were added to the medium from day 1 for 3 weeks at every medium change (ascorbic acid was added every day for the first 7 days). Asc \rightarrow TPA: Ascorbic acid treatment starting immediately after irradiation for 7 days \rightarrow TPA treatment from day 8 for 3 weeks. TPA & Asc: TPA was added to the medium at day 4, then both ascorbic acid and TPA were added from day 6 for 3 weeks (ascorbic acid was added every day for the first 7 days of the treatment). (Modified from ref. 10)

5 アスコルビン酸の作用機序

アスコルビン酸が抗酸化作用をもつことから、このことがin vitro放射線発癌のプロモーション抑制に働いていることも考えられる。事実、TPAによるin vitro発癌プロモーションはスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼのようなラジカル除去に働く物質でも抑えられることが知られている^{15,16)}。しかし、我々のBalb/c 3T3細胞の実験系では、同じく抗酸化作用を持つビタミンの一つであり、C3H 10T1/2細胞ではトランスフォーメーションの抑制が報告されている⁷⁾、 α -トコフェロール(ビタミンE)が全く抑制効果を示さないどころか、逆にトランスフォーメーション頻度を上昇させる傾向さえ示す(Fig.5)。アスコルビン酸が水溶性であるのに対し、 α -トコフェロールは脂溶性と、かなりの性質の違いはあるが、同じ抗酸化作用を持ちながらあまりにもその細胞癌化に対する効果が異なっていることを考えると、アスコルビン酸の放射線による細胞癌化のプロモーション抑制は単なる抗酸化作用だけとは考えにくい点がある。そこで、この点について我々は蛋白レベルでの解析を行ってみた。

6 アスコルビン酸によるプロテインキナーゼC活性の変化

アスコルビン酸がTPAによるプロモーションも顕著に抑えることがわかったので、TPAのレセプターであり、これによって活性化されるプロテインキナーゼC(PKC)に対するアスコルビン酸の影響について調べてみた。プロテインキナーゼCは、通常は細胞質画分に多く存在しているが、細胞にTPAを添加する

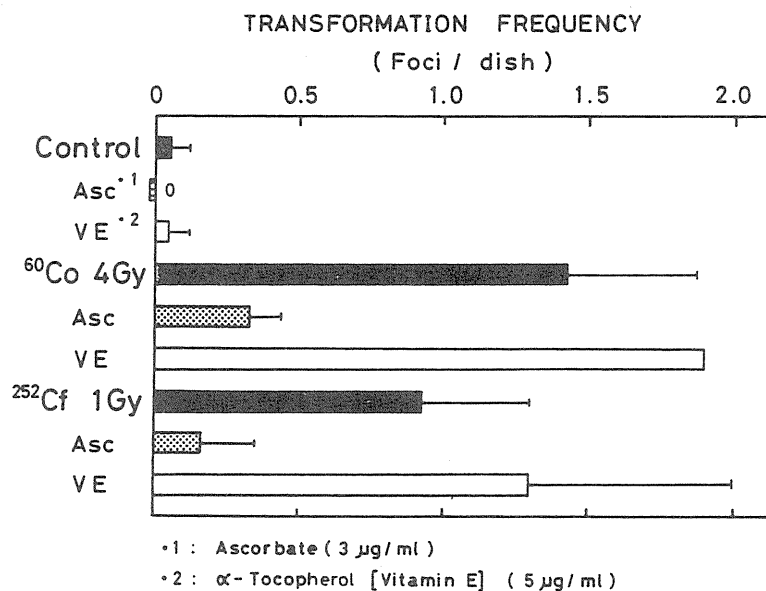


Fig.5 Effect of ascorbic acid (3 μ g/ml) or α -tocopherol (5 μ g/ml) on gamma-or fission neutron-induced transformation in Balb/c 3T3 cells. Ascorbic acid or α -tocopherol was added to the medium starting immediately after irradiation for 8 days (ascorbic acid) or for 3 weeks (α -tocopherol). (Tauchi, unpublished)

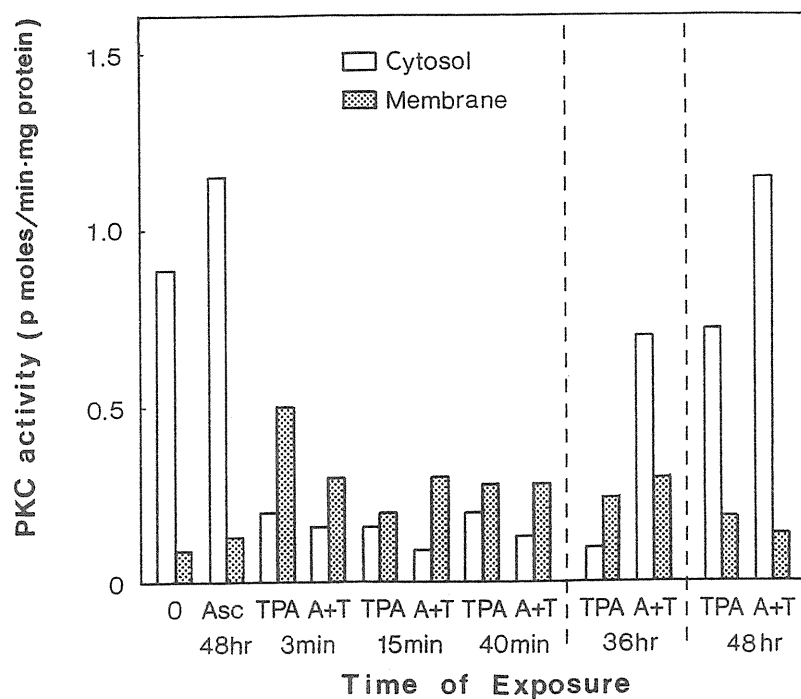


Fig.6 Time course for the changes in the distribution of PKC activity in the cytosol and membrane-associated forms. Confluent cultures of Balb/c 3T3 cells were exposed to ascorbic acid (3 μ g/ml) and TPA (100ng/ml). (Tauchi, unpublished)

と細胞膜に移行して活性化し、その後消失(ダウンレギュレーション)することが知られている¹⁷⁾。我々は、コンフレントに達したBalb/c 3T3細胞をTPAやアスコルビン酸で処理し、細胞内のPKCの活性や、TPAによるPKCの膜への移行とダウンレギュレーションに対してアスコルビン酸が何らかの影響を与えるかどうかを調べた。その結果、コンフレントの細胞を48時間アスコルビン酸で処理する(24時間毎に2回添加)と、細胞質画分のPKCの活性は通常より2割ほど上昇した。また、アスコルビン酸はTPAによるPKCの膜への移行と消失を抑えることはなかったが、TPA処理48時間後の細胞質画分のPKC活性の回復が、アスコルビン酸を添加すると若干早くなることがわかった(Fig.6)。最近、PKCをover expressさせた細胞で癌化が抑制されたとの報告もでており¹⁸⁾、アスコルビン酸による細胞質画分のPKCレベルの上昇が細胞癌化の抑制に作用している可能性がある。

以上、これまでの文献と我々のデータをもとにアスコルビン酸のin vitro発癌抑制効果について考察したが、結局のところそのメカニズムはよくわかっていないのが現状である。今後、アスコルビン酸とPKCとのかかわりが何らかの糸口となればと思っている次第である。

参考文献

- 1) Kennedy, A. R. & Little, J. B., 1976, *Nature*, **276**, 825-826.
- 2) Kennedy, A. R. & Little, J. B., 1981, *Cancer Res.*, **41**, 2103-2108.
- 3) Kennedy, A. R., 1982, *Carcinogenesis*, **3**, 1093-1095.
- 4) Kennedy, A. R., 1985, *Carcinogenesis*, **6**, 1441-1445.
- 5) Yasukawa, M. et al., 1989, *Radiat. Res.*, **120**, 456-467.
- 6) Kennedy, A. R., 1984, *Vitamins, Nutrition and Cancer* (ed. Prasad, K. N.), p.166-179.
- 7) Radner, B. & Kennedy, A. R., 1986, *Cancer Lett.*, **32**, 25-32.
- 8) Harisiadis, L. et al., 1978, *Nature*, **274**, 486-487.
- 9) Pung, A. et al., 1988, *Carcinogenesis*, **9**, 1533-1539.
- 10) Tauchi, H. & Sawada, S., 1993, *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**, 369-374.
- 11) ビタミンハンドブック2：水溶性ビタミン(日本ビタミン学会編), pp.171-191
- 12) Cameron, E. et al., 1979, *Cancer Res.* **39**, 663-661.
- 13) Tauchi, H. et al., 1992, *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 253-262.
- 14) Little, J. B., 1979, *Cancer Res.*, **39**, 1474-1480.
- 15) Borek, C. & Troll, W., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 1304-1307.
- 16) Kennedy, A. R. et al., 1984, *Carcinogenesis*, **5**, 1213-1218.
- 17) 千田和宏, 黒木登志夫, 1985, *組織培養*, **11**, 113-118.
- 18) Hei, T. K. et al., 1992, *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 378 (Abstract).

3 レチノイド

橋 本 祐 一*

Retinoids

Yuichi Hashimoto

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

Abstract

Retinoic acid and its bioesters, retinoids, are widely involved in the control of cell growth and differentiation. They also have been shown to be useful in the treatment and chemoprevention of several types of tumors. Retinoids elicit their biological activity by binding to their specific nuclear receptors, denoted as $RAR\alpha$, β and γ . RARs belong to the erbA-related steroid/thyroid nuclear receptor superfamily, and have been established to be transcription factors which are retinoid-dependent. The diversity of retinoidal actions can possibly be interpreted by the quite diversified nuclear coregulators (such as RXRs) which interact with RARs to modify their roles. Abnormality of RAR(s) in acute promyelocytic leukemia and some types of lung cancer suggests that RAR-genes can be regarded as putative tumor-suppressor genes. For the further elucidation of the molecular mechanism of retinoidal actions, development of novel retinoids/antagonists superior in their selectivity would be useful.

序論：レチノイドの定義と作用機構

ここでいうレチノイドとはレチノイン酸及びその同効化合物群の総称である。レチノイン酸は、ビタミンA(レチノール)の活性本体であり、レチノールから視覚において重要な役割を担うレチナールを経て代謝的に酸化されて生ずる(図1)。その生成は厳密な制御の下にあるはずだが、代謝・生成・分解等の制御の詳細な実態は不明である。レチノイン酸は腫瘍遺伝子c-erbAに関連するレチノイン酸レセプター

*東京大学分子細胞生物学研究所

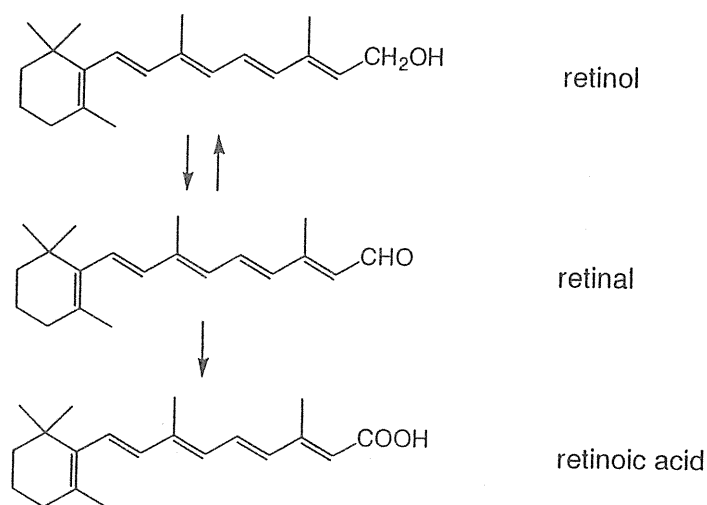
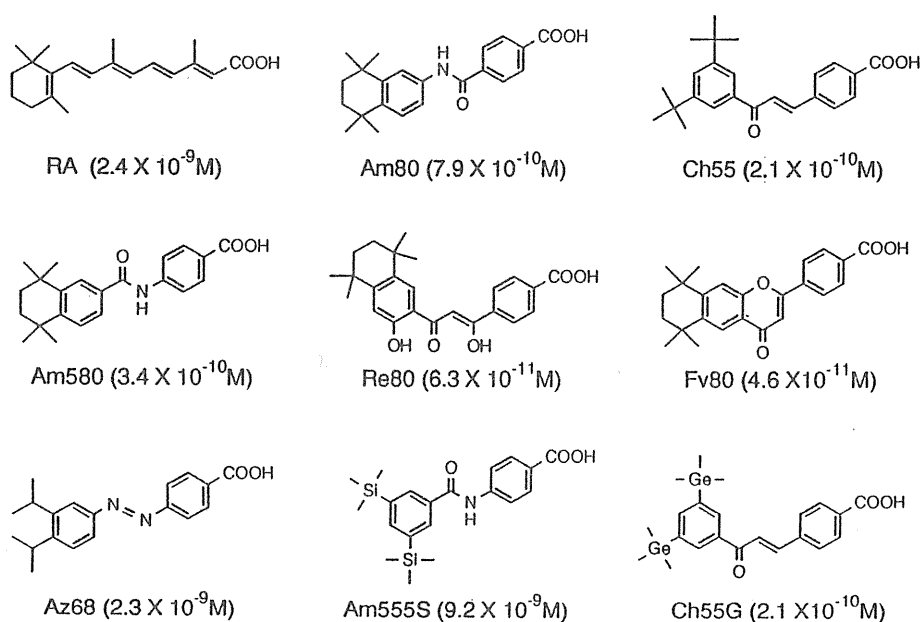


Fig.1 Structures of Retinol, Retinal, and Retinoic Acid.

Fig.2 Structures and ED_{50} Values for HL-60 Cell Differentiation Induction Assays of Some Typical Retinobenzoic Acids.

(retinoic acid receptor: RAR)に結合することによって多彩な生物作用を発揮するから、「レチノイドは RARに結合することによってレチノイン酸様の生物作用を示す化合物である」と定義できる。筆者らはレチノイン酸の示す多様な生物作用に注目し、医薬品化学的見地から多くのレチノ安息香酸と総称する合成レチノイドを創製してきた(図2)。これらはいずれも RARと結合してレチノイン酸と同等もしくはより強力な活性を示すものである。ヒトの RARにはそれぞれ異なる遺伝子にコードされる3種のサブタイプ(α , β , γ)が存在し、いずれもレチノイド依存的な特異的転写調節因子として機能する。RARは他のステロイドやチロキシンホルモン、活性型ビタミンD₃等のレセプターと機能的・構造的に類似したところが多くこれらのレセプターは所謂「核内レセプタースーパーファミリー」を形成している。全ての核内レセプターはいずれもその機能とアミノ酸配列相同性との両面から、N末からC末にかけてA~Fの6つの領域に分けて

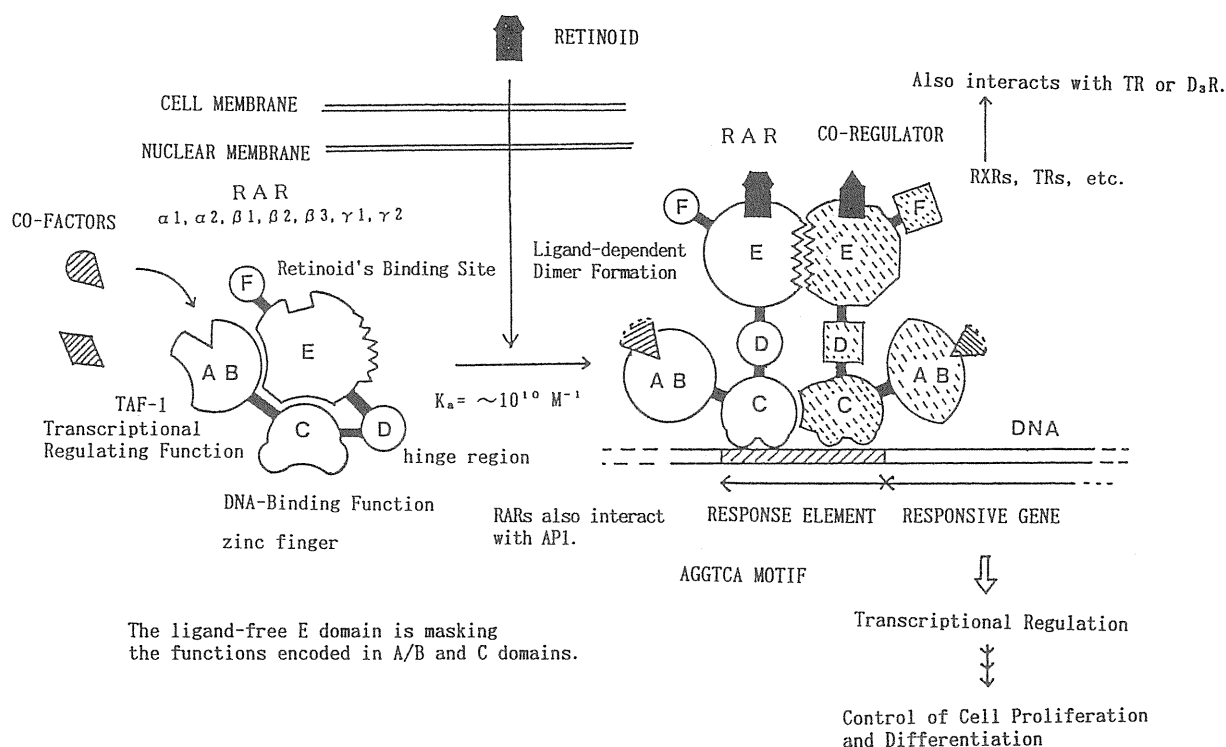


Fig.3 The Basic Molecular Mechanism of Transcriptional Regulation Initiated by Retinoids.

捉える事ができる(図3)。各領域はそれぞれ独立に機能し得るものでA/B領域には主たる転写調節機能がコードされ、C領域には2つのジンクフィンガー構造があり特異的遺伝子DNAへの結合機能がコードされる。D領域はヒンジ部であり、レセプター蛋白の核内局在性・核内移行性に関与する。E領域には種としてA/B領域やC領域の機能を隠蔽する機能がコードされている。このE領域の持つ隠蔽機能は、この領域へのリガンドの結合により解除される。E領域には、更にリガンド依存的な転写調節機能や、他の蛋白因子との結合部位もコードされている。F領域はC末にノードを形成し、おそらくレセプター蛋白全体の安定性に寄与していると考えられる。

レチノイン酸は脊椎動物の上皮組織の正常な増殖・分化に必須であり、骨形成・形態形成にも重要な働きを担い、その作用は他の合成レチノイドで代替え可能である。これらのレチノイドの作用の多く(おそらく基本的なもの全て)がRARとレチノイドとの結合によって開始される。レチノイドは細胞種あるいは細胞の成育環境特異的に多岐に亘る作用を示すが、この作用の多様性はRARの質的・分布的多様性に加えて、RARとヘテロ2量体を形成してその作用を修飾する因子(コレギュレーター)の多様性によるところが大きい。コレギュレーターとしては細胞種特異的に存在する多くのものが知られている。クローニングされているものは、RARと同じく核内レセプタースーパーファミリーのメンバーであるRXR(retinoid X receptor)やチロキシンホルモンレセプターなどである。RXRには α 、 β 、 γ の3種のサブタイプが存在し、9-シス-レチノイン酸をリガンドとする核内レセプターであるといわれている。従って、レチノイドの基本的な分子作用機構は模式的に図3の様を示すことができる。

レチノイドの作用機構やレチノ安息香酸については成書¹⁾及び総説²⁻⁸⁾を参照して頂ければ幸いである。

レチノイドと発癌

RAR遺伝子は後述する様に腫瘍抑制遺伝子であると考えると多くの事柄が都合よく説明できる^{5,9,10)}。この考えに立脚すればレチノイドは腫瘍抑制遺伝子RARが作用を発揮するための引き金であるから、レチノイドは腫瘍抑制化合物ということもできる。

レチノイドと癌との関連は古くから示唆されている。既に1925年に藤巻らによりビタミンA欠乏が胃癌をもたらすと報告されている¹¹⁾。その後、ビタミンAが化学発癌2段階実験¹²⁾や放射線発癌実験¹³⁾において、強力に癌発生を抑制することが示されている。通常ビタミンAとしてはレチノールパルミテート等が用いられたが、その活性本体はレチノイン酸であるはずで、ビタミンAの発癌抑制作用はレチノイン酸によるであろう。レチノイン酸以外の多くの合成レチノイドについても発癌抑制作用が報告されている。こうしたことから、レチノイドの癌化学予防薬としての開発に期待が込められているが現時点では実現していない。これは、レチノイドの持つ副作用と共に、レチノイドの生物作用が余りに多岐に亘り、その分子作用機構に未だ不明な点が多いことによる。レチノイドの発癌抑制作用は所謂発癌プロモーション過程の抑制によるが、発癌プロモーションの分子機構自体不明なところが多い。

フォルボールエステル等の発癌プロモーターとレチノイドとの生物作用における拮抗あるいはクロストーク(の一部)に関しては、転写調節因子AP-1(Fos/Jun)を標的としての解釈が可能かもしれない。近年流布している仮説では、フォルボールエステルはプロテインキナーゼCに結合してこれを活性化し、複数のリン酸化・脱リン酸化の経路を介して最終的にリン酸化型Junを脱リン酸化し、その結果AP-1の活性を上昇させるとされている。フォルボールエステル以外のタイプの発癌プロモーターによるAP-1活性の上昇も報告されている。そしてこの発癌プロモーターによるAP-1活性の上昇が発癌プロモーション機構(の一部)であるといわれている。もしAP-1活性の上昇が発癌プロモーションに関連するならば、AP-1活性を抑制する化合物は発癌プロモーターのアンタゴニストになり得る。RAR/レチノイド複合体は、発癌プロモーターとは逆に、AP-1活性を抑制することが報告されているので¹⁴⁻¹⁶⁾、この意味でレチノイドは発癌プロモーターのアンタゴニストであり、またRARは腫瘍抑制遺伝子であるといえる。RAR/レチノイド複合体によるAP-1活性の抑制機構としては、RAR/レチノイド複合体が直接にAP-1に結合する機構が提唱されている¹⁶⁾。

レチノイドと癌治療

レチノイドは癌の治療に有効である可能性を持つ。レチノイドは既に角化症等の皮膚病に特効薬として用いられているが、基底細胞癌、菌状息肉腫、頭部扁平上皮癌等において有効であるのと臨床報告が多数ある¹⁷⁾。

一方、白血病の領域においては1980年にBreitmanらによりレチノイン酸のヒト白血病細胞HL-60の成熟顆粒球への分化誘導作用が報告された¹⁸⁾。ここにおいて白血病や未分化型腫瘍の分化誘導療法という概念が確立し、大きな期待を込めての研究例が集積している。そして遂に1988年、Huangらにより、レチノイン酸が白血病の一種である急性前骨髄球性白血病(APL)の治療において完全寛解率90%以上という驚異的な効果を示すことが報告された¹⁹⁾。レチノイドのAPL治療における有効性はその後多くの追試により確認され、現在ではレチノイドがAPLに対して著効を奏することが広く認められている。

APLにレチノイドが非常に有効であることは、APL細胞におけるRAR α の異常と関連付けて説明され

る。APLでは第15染色体上のPMLと名付けられた遺伝子と、第17染色体上のRAR α 遺伝子との間で相補的な転座が見られ、その結果、RAR α のN末の一部がPMLの大部分で置き換わった異常融合蛋白(PML-RAR α)が生産される。この異常融合蛋白PML-RAR α の生産がAPL発症の原因と考えられている。PML-RAR α の機能としては、(1)これが異常なRAR α として働く可能性、(2)これがレチノイドやRAR-コレグジュレーターを枯渇する可能性、等も考えられる。しかし、PML-RAR α の細胞質局在性やこの異常融合蛋白がPMLもしくはRAR α とヘテロ2量体を形成する性質等から、PML-RAR α がRAR α もしくはPMLを細胞質に引き止めてその働きを阻害するdominant negative変異体として機能していると考ええると、APL発症と分化の関連やそれに対するレチノイドの有効性等、多くの現象が都合よく説明できる。このように考えると、RAR α 遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であるということができるとであろう。またある種の肺癌においてはRAR β の欠損が高頻度に認められ、このことは、RAR β 遺伝子も腫瘍抑制遺伝子であることを示唆する。APLとPML-RAR α について等のより詳細な議論については総説^{5,9,10)}を参照して頂きたい。

選択的レチノイド

レチノイドを真に有用な発癌抑制化合物・癌治療薬として開発するためには、レチノイドの分子作用機構をより詳細に把握する必要がある。レチノイド作用において中核をなすRARには3種のサブタイプがあり、その各々はそれぞれ固有の働きを担うと考える。従って、RAR-サブタイプ特異的なレチノイドの創製は各々のRAR-サブタイプの役割を解明すると共に、多様なレチノイドの生物作用を分離することにもつながり、レチノイドの基礎・応用研究にとって有力な手法となる。そのために、従来からRARサブタイプ特異的な新規合成レチノイドやそのアンタゴニスト、RAR/RXR特異的レチノイドの開発等を進めてきた。一例を上げると、図2に示したレチノ安息香酸の一つであるAm80はRAR α 及び β には強く結合するが、RAR γ には結合しないという特徴を持つ。Am80は従来のレチノイドに比較して格段に毒性が低く、かつ多くの検定系でレチノイン酸に勝る活性を示すレチノイドであるので、今後は是非とも開発して行きたいものの一つである。レチノイン酸結合蛋白としては、RARに加えて従来から知られていた細胞質内レチノイン酸結合蛋白(cellular retinoic acid binding protein: CRABP)が多くの細胞に存在する¹⁾。Am80の今一つの特徴は、これがCRABPに低親和性であるということである¹⁻⁷⁾。前節で、レチノイン酸がAPLに著効を示すことを述べたが、その寛解期間は長期に及ばないらしい。これはレチノイン酸によりAPL細胞でのCRABP生産が誘導され、その結果、投与したレチノイン酸がCRABPによって枯渇されてしまうのが原因の一つと聞いている。このような場合、Am80等の低CRABP親和性のレチノイドが有効ではないかと期待している。

おわりに

レチノイドの領域は年々拡大の一途を辿っている。無数の新規構造のレチノイドが創製され、幾多に及ぶ生物活性が報告されている。レチノイドを与えれば必ず何かの興味深い生物反応が観察できるといっても過言ではないほどである。その作用機構も、複数種のレセプターが確認され、更にそれらのレセプターの機能が多種の因子との組み合わせによって修飾されることも分かって、加速度的に複雑な議論が要求されるところとなっている。よりよく本質を把握するためにはより単純な系の組立が必要と考えるが、そのためにも、選択性の優れたレチノイドやそのアンタゴニストの開発が威力を発揮するはずで、特徴あるレチノイドの創製を目指している。

参考文献

- 1) 橋本祐一・首藤紘一編, 「レチノイド」, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1992.
- 2) 橋本祐一・首藤紘一編, 現代化学, No.223, p39(1989).
- 3) 橋本祐一, 科学, **61**: 379 (1991).
- 4) Y. Yashimoto, *Cell Struct. Funct.*, **16**: 113 (1991).
- 5) 橋本祐一, 実験医学, **9**: 1682 (1991).
- 6) 橋本祐一, Annual Review細胞生物学1991, 236(1991).
- 7) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Cell Biol. Rev.*, **25**: 209 (1991).
- 8) 橋本祐一, ファルマシア, **28**: 1096 (1992).
- 9) 橋本祐一, 首藤紘一, 癌と化学療法, **18**: 2203 (1991).
- 10) 橋本祐一, 医学のあゆみ, **161**: 67 (1992).
- 11) Y. Fujimaki, *J. Cancer Res.*, **10**: 469 (1926).
- 12) W. Bollag, *Experientia*, **29**: 90 (1971).
- 13) F. J. Burns et al., in "Skin-tumors: Experimental and Clinical Aspects", ed. C. J. Conti et al., pp293, Raven Press, New York, 1989.
- 14) R. Schuele et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**: 6092 (1991).
- 15) R. C. Nicholson et al., *EMBO J.*, **9**: 4443 (1990).
- 16) H. F. Y. Yen et al., *New Biol.*, **3**: 1206 (1991).
- 17) S. M. Lippman et al., *Cancer Treat. Rep.*, **71**: 793 (1987).
- 18) T. R. Breitman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**: 2936 (1980).
- 19) M. Huang et al., *Blood*, **72**: 567 (1988).

4 茶カテキンの機能性と発がん抑制の可能性

原 征彦*

Antioxidative and Radio-protective Activities of Tea Catechins

Yukihiko Hara

Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., Ltd.

Abstract

1. Tea catechins showed marked antioxidative activity in oils and lipids *in vitro*. In the Active Oxygen Method with lard, the addition of tea catechins suppressed the formation of peroxides at much lower concentrations than α -tocopherol or BHA. Moreover, tea catechins showed synergistic activities with α -tocopherol, vitamin C and organic acids. Tea catechins were also proved to suppress the peroxidation of the erythrocyte ghost *in vitro*.

2. On the assumption that tea catechins might scavenge the oxygen radicals in living systems, the influence of tea catechin on the γ -irradiated mice was observed over a period of two years. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCg), the major tea catechin, was fed after radiation. C57BL/6 strain of 3 week old female mice were divided into 10 groups of 30 mice. From the 5th week on, sets of two groups were irradiated with γ -ray of 0, 50, 100, 150 and 200cGy respectively, once a week for four weeks. Half of them were fed a 0.2% EGCg diet throughout the time. In the control groups, the incidence of lymphoma was radiation dose dependant. The incidence of lymphoma was significantly lower in the catechin fed 100cGy group. In other radiation groups, no differences of lymphomagenesis were observed between the catechin and control groups.

はじめに

茶カテキン類は強い渋みをもち、かつては茶タンニンと呼ばれた物質である。本邦緑茶乾物中に10～15%

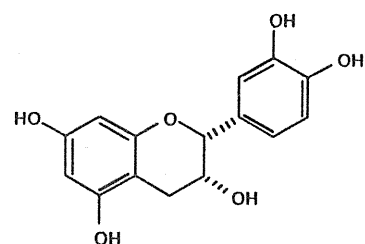
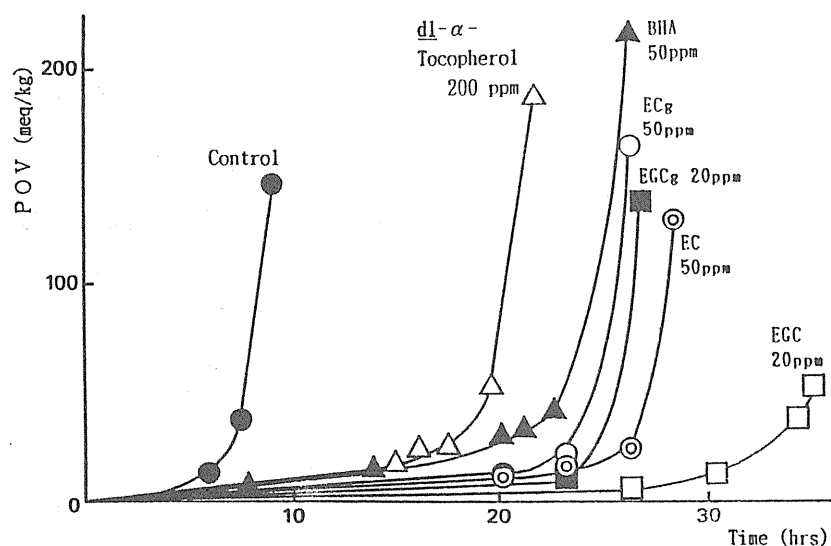
*三井農林(株)食品総合研究所

Table 1 Composition of crude catechin in green tea

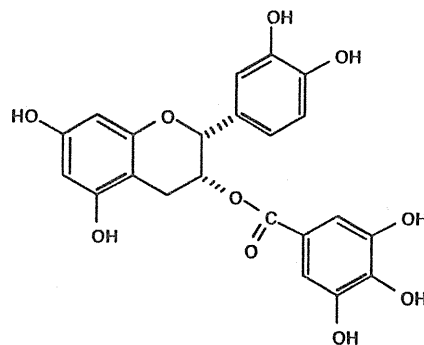
Catechins	Absolute %	Relative %
(+)-Gallocatechin (GC)	1.44	1.6
(-)-Epigallocatechin (EGC)	17.57	19.3
(-)-Epicatechin (EC)	5.81	6.4
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg)	53.90	59.1
(-)-Epicatechin gallate (ECg)	12.51/ /91.23	13.7/ /100

Table 2 Prophylactic functions of tea polyphenols

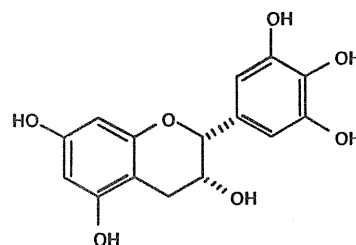
Functions
Anti-oxidative Action
Edible oils and fats, Natural colors
Oxygen radicals
Plasma lipids
Radioprotective Action
Anti-mutagenic Action
Spontaneous mutations in <i>Bacillus subtilis</i> NIG 1125
Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mice bone marrow
Anti-tumor Action
Suppression of the growth of implanted tumor cells
Suppression of tumorigenesis by inoculated carcinogen
Suppression of spontaneous breast cancer in mice
Enzyme Inhibitory Action
Angiotensin I converting enzyme
Amylase, Sucrase, Maltase
Glucosyltransferase of <i>Streptococcus mutans</i>
HIV-reverse transcriptase
Anti-hypercholesterolemic Action
Anti-hyperglycemic Action
Fat Reducing Action
Anti-hypertensive Action
Anti-ulcer Action
Anti-bacterial Action
Foodborne pathogenic bacteria
Phytopathogenic bacteria
Cariogenic bacteria
Bacterial exotoxin
Anti-viral Action
Tobacco mosaic, Influenza
Deodorant Action
Molluskcidal Action



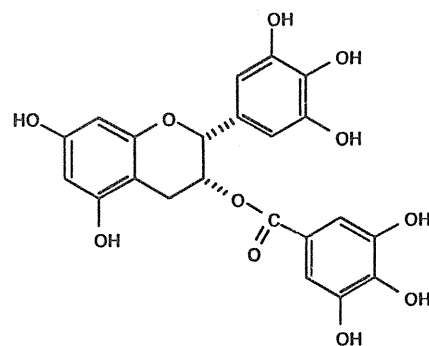
(-)-Epicatechin (EC)



(-)-Epicatechin gallate (ECg)



(-)-Epigallocatechin (EGC)



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg)

Fig.1 Structural formulae of tea catechins.

Fig.2 Antioxidative activities of tea catechins on the lard (AOM at 97.8°C).

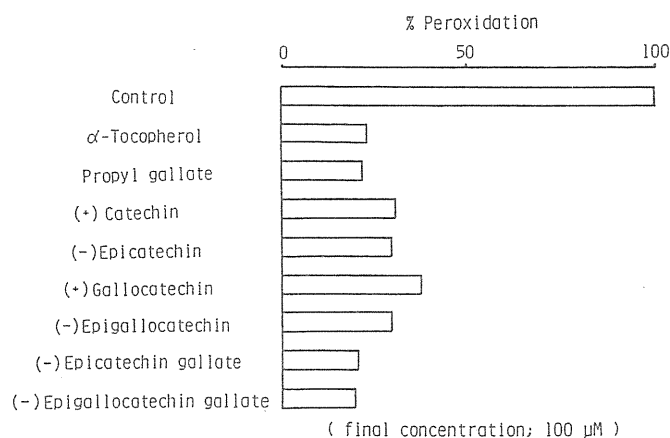


Fig.3 Antioxidative assay of tea catechins in erythrocyte ghost system.

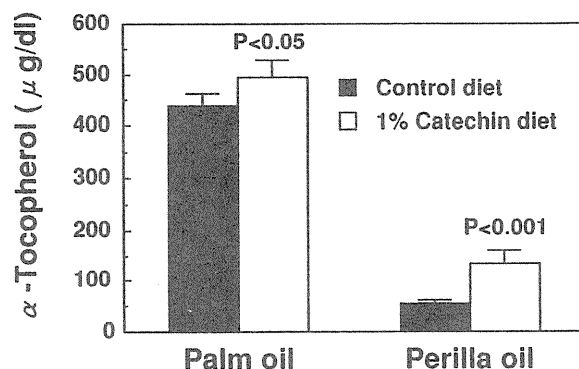


Fig.4 Effect of tea catechins on plasma α-tocopherol. Four weeks feeding on 30% oil diets (Rat).

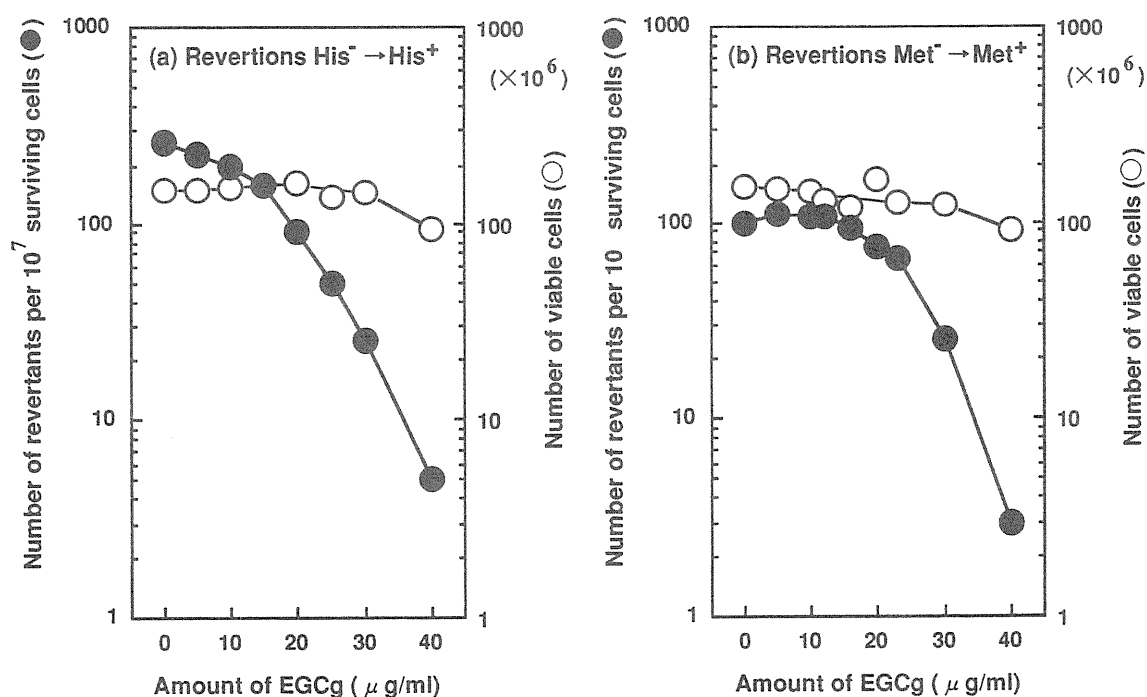


Fig.5 Effects of EGCg on the survival and mutability in *Bacillus subtilis* NIG 1125 (his met).

含まれ、喫茶時の風味を特徴づける茶の主成分である。茶カテキン類はフラバン-3-オール骨格をもち、分子内に複数のフェノール性水酸基をもつことから、茶ポリフェノール類とも呼ばれる。緑茶に含まれるカテキン類を抽出した画分(粗カテキン)に含まれる5種カテキンをTable 1に、それらの構造式をFig.1に示した。これらのうち、エピガロカテキンガレート(EGCg)は粗カテキンの半量を占め、茶にのみ大量にその存在が知られる特異な成分である。カテキン類は未酸化状態のまま(緑茶から)抽出されたものであり、*in vitro*において強力な還元性(抗酸化能)を呈するばかりでなく、*in vivo*においてはタンパク質や酵素に対する特異的で強い結合作用をも示すものと思われる。筆者らは緑茶から粗カテキン、さらには個々のカテキンを分離精製¹⁾、それらが示す生理活性をさまざまな系で調べてきた。それらの一覧をTable 2に示した。本報告ではこれらのうち、抗酸化作用、抗突然変異作用、抗腫瘍作用などに関する事項につき略述する。

1 油脂に対する酸化防止作用¹⁾

4種のカテキンをラードに添加し、AOM(Active Oxygen Method: 97.8°C)で経時的にPOV(Peroxide Value: meq/kg)を求めた。*dl*- α -トコフェロール200ppmおよびBHA50ppmを比較対照した。各試料の等重量濃度における抗酸化力の強さは、Fig.2に示したように、EGC>EGCg>EC>ECg>BHA>*dl*- α -トコフェロールの順であった。また、同じ系で粗カテキンとEGCgは抗酸化力がほぼ等しく、粗カテキン10ppmは*dl*- α -トコフェロール200ppmと同じ酸化曲線を与えた。さらに、EGCgはトコフェロール、アスコルビン酸、各種有機酸と相乗作用を示した。粗カテキンは植物性油脂、光酸化などに対しても効果を示した²⁾。

2 生体内脂質酸化防止作用

経口摂取された茶カテキンが、生体内脂質の過酸化を抑制する可能性について、奥田らは、ラット肝ミトコンドリアおよびミクロソーム画分を用いEGCgの抗酸化能を示し³⁾、大澤らはウサギ赤血球膜ゴースト系において、茶カテキンが α -トコフェロールより強い脂質過酸化抑制作用をもつことを示した⁴⁾(Fig.3)。佐野は、茶パウダーをラットに混餌投与し、肝臓、腎臓における脂質過酸化物生成抑制と、ラジカル捕捉活性上昇につき報告した⁵⁾。筆者らは、ラットに高脂肪食(30%)を1ヵ月間給餌し、血漿中の α -トコフェロール濃度に及ぼす茶カテキン(1%添加)の影響を調べた⁶⁾。その結果、不飽和脂肪酸の多いエゴマ油投与群ではパーム油群に比べ、トコフェロール濃度が著減したが、いずれの油種でもカテキン添加群では α -トコフェロール濃度の減少度合いが少なかった(Fig.4)。茶カテキンの経口摂取は脂質の過酸化による血漿中のトコフェロールの損耗を抑止する働きがあるといえよう。

3 微生物における抗突然変異作用

賀田らは自然界に存在するbio-antimutagenを探索すべく、枯草菌NIG1125株を用い、食品、生薬等を系統的に調査した。本株はDNA複製酵素IIIに温度感受性の変異をもち、成育可能な30°Cにおいてさえ、複製の誤りにより高頻度で突然変異を生じ、欠損していたヒスチジンおよびメチオニンの合成能を得るようになる。検索の結果、緑茶抽出液に強い突然変異抑制効果が見いだされた⁷⁾。緑茶熱湯抽出液を分画したところ、EGCgにのみ明瞭な効果がみられた。EGCgの抗突然変異試験の結果をFig.5に示した。下位らは茶カテキン類やタンニン酸が紫外線照射された大腸菌遺伝子の損傷の除去修復作用をもつことを報告している⁸⁾。

4 染色体異常抑制作用

さらに*in vivo*における作用をみるため、EGCgを経口投与し、薬物誘導によるマウス染色体異常に対する影響を調べた⁹⁾。ddY雄性マウスを24時間絶食させた後、EGCgを100, 200, 300, 400および500mg/kgを経口投与し、その24時間後、各群にMMC(mitomycin C)2 mg/kgを腹腔内投与した。MMC投与24時間後にマウスを屠殺、常法により大腿骨骨髓細胞より小核標本作製した。鏡検による結果をFig.6に示した。図から明らかなように、MMCの腹腔内投与により用量依存的に増加した多染性小核頻度は、EGCgを24時間前経口投与することにより、投与量に比例して減少した。伊藤らはアフラトキシンB₁腹腔内投与によるラットの大腿骨骨髓細胞の染色体異常を調べ、gapとbreakの発生頻度がAFB₁投与前に粗カテキンを予め経口投与することにより抑制されること、とくに24時間前の投与(450mg/kg)において最も顕著であると報告している¹⁰⁾。

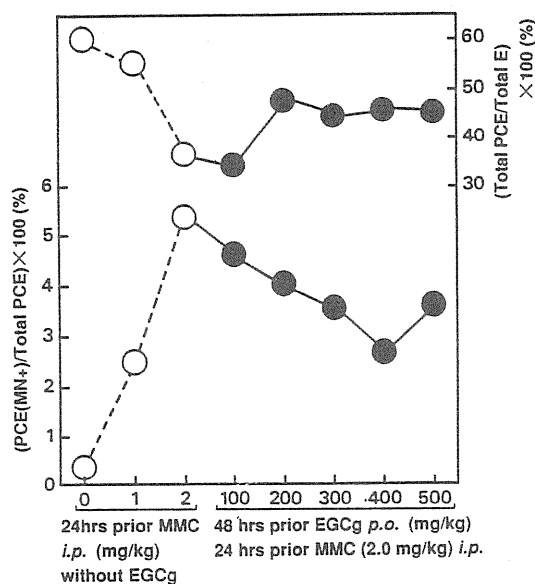


Fig.6 Suppression of MMC-induced micronuclei by EGCg.

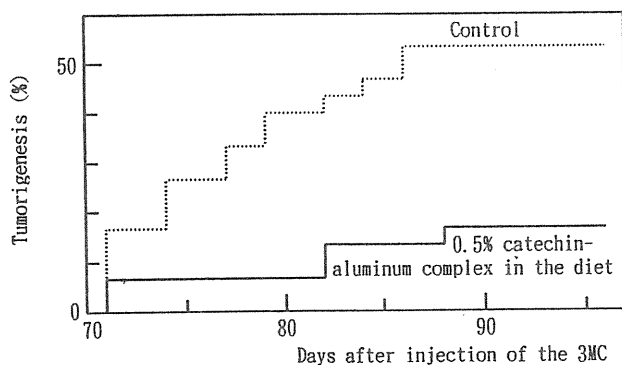


Fig.8 Effect on catechin-aluminum complex on the 3-methylcholanthrene (3MC) induced tumorigenesis.

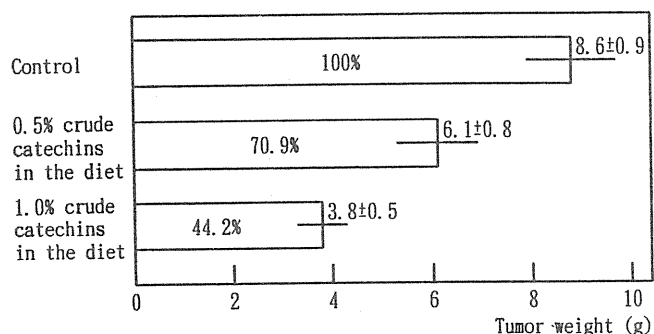


Fig.9 Effect of crude catechins on Sarcoma 180 bearing ddY mice.

After 9 months feeding on catechins, sarcoma cells were inoculated subcutaneously. Tumors were resected 19 days after the inoculation of tumor cells.

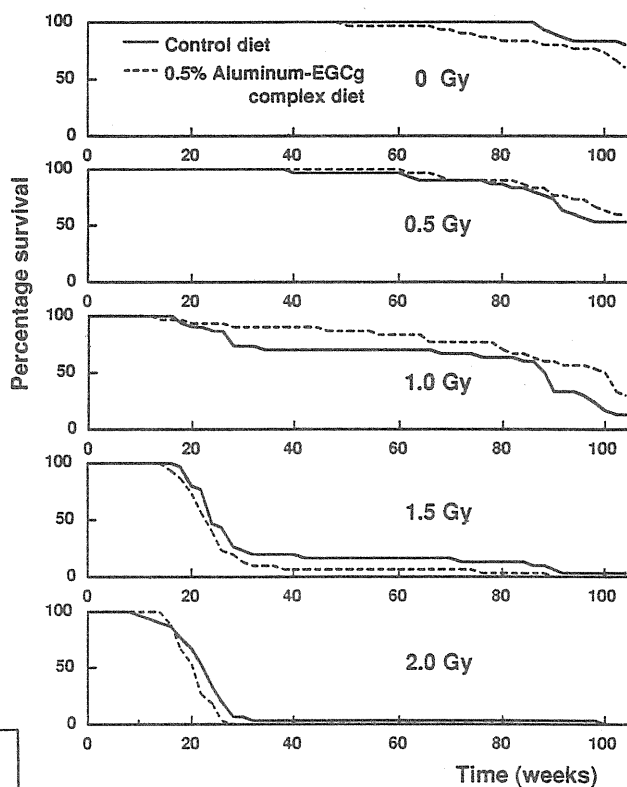


Fig.7 The influence of catechin on the survival of γ -irradiated mice.

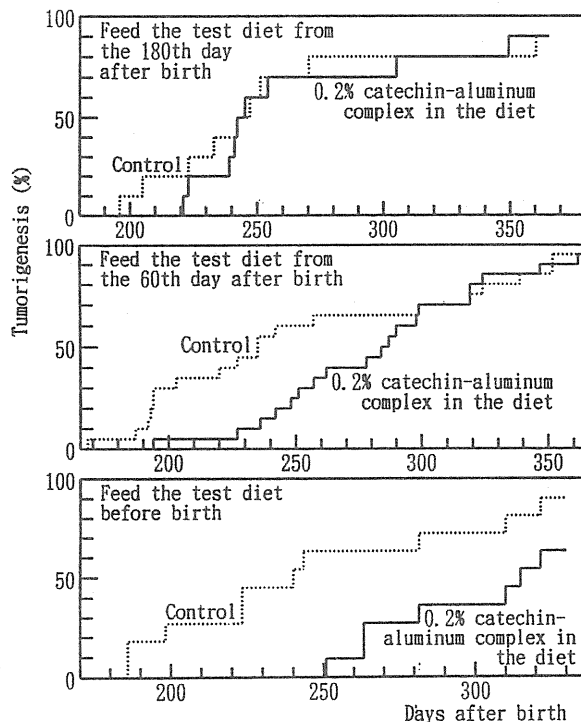


Fig.10 Inhibition of spontaneous mammary tumor incidence of C3H/HeN strain by catechin-aluminum complex fed in the diet.

5 放射線防護作用

茶カテキンは*in vitro*, *in vivo*で酸化や突然変異を抑制する作用をもつことが示された。そこでEGCgの長期給餌が γ 線誘発による胸腺リンパ腫発生に及ぼす影響を調べた¹¹⁾。C57BL/6系雌マウスを3週齢より通常の飼料ないしEGCg錯体0.5%混餌飼料で飼育した。EGCgは、その浸み軽減のため、活性水酸化アルミニウムゲルとの錯体とした。EGCgは胃中でアルミニウムゲルと分離することを別に確認した。放射線照射は、5週齢より開始し、 ^{137}Cs γ 線を毎週1回、計4回連続して行った。1回の照射線量を0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0Gyとする5実験群を茶カテキン有無で10群とし、各群30匹、合計300匹を実験に供した。各群の2年間に互る生存曲線を求めると共に、moribundの胸腺、脾臓を摘出鏡検した。Fig.7に示したように、生存率は通常飼料群および茶カテキン混餌群とも、照射線量に応じて著明に低下したが、 $4 \times 1.0\text{Gy}$ 照射群では、茶カテキン混餌群が通常飼料群に比べ、有意に高い生存曲線を示した。リンパ腫の誘発に関しては、その発生時期および頻度は照射線量に依存したが、 $4 \times 1.0\text{Gy}$ 照射条件下では、茶カテキン混餌群は、通常飼料群に比べ、リンパ腫発生の有意な低下を認めた。以上より、一定放射線量により誘発されるマウス胸腺リンパ腫の発生がEGCgの混餌投与により抑制されることを認めた。

6 抗腫瘍作用

茶カテキンの抗腫瘍作用につき、動物を用い、発がん剤、移植腫瘍、自然発生腫瘍などの系で調べた。第1に、3MC(3-methylcholanthrene)をマウス腰部皮下に移植し、粗カテキン錯体添加飼料で長期間飼育した。その結果、茶カテキン混餌投与群では普通食群に比べ、腫瘍形成に至る日数が遅延し(Fig.8)、発がん抑制に関わる茶カテキンの効果が知られた。第2に、移植腫瘍細胞の増殖抑制を調べた。まず、マウス腹腔内に腫瘍細胞を移植し、茶カテキンを様々な量、ルートで投与したが、延命を図ることはできなかった。そこで、腫瘍細胞ないし腫瘍切片を動物皮下に移植し、一方で茶カテキンを腹腔内ないし経口投与したところ、著明な腫瘍増殖抑制作用がみられた。1例を挙げる。マウスを3群に分け、対照群、粗カテキン混餌0.5%群、1.0%群とし飼育を続け、8ヵ月後に腫瘍細胞(Sarcoma 180)を皮下移植し、19日後に各群のマウスから腫瘍を摘出し、重量を調べた。Fig.9に示したように、粗カテキン1%添加群では対照群の半分以下であった。第3に、乳がん自然発生マウス(C3H/HeN, MMTV(+))における乳がん発生に及ぼす茶カテキン錯体の効果を調べた¹⁴⁾。Fig.10に示したように、茶カテキンを生後180日から給餌した群では対照群にくらべ乳がん発生時期に影響はなかったが、生後60日から給餌した群では発生日時が遅延し、出生前から母体に給餌し、離乳後も与え続けた群では乳がん発生までの日数がさらに延長した。

引用文献

- 1) 松崎妙子, 原征彦: 農化, **59**, 129(1985)
- 2) 原征彦: 「茶の科学」, 村松敬一郎編輯倉書店p.129(1991)
- 3) Okuda, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1625 (1983)
- 4) Osawa, T.: *Basic Life Sci.*, **39**, 131 (1986)
- 5) 佐野満昭: 製薬工場, **7**, 780(1987)
- 6) 未発表
- 7) Kada, T.: *Mutation Res.*, **150**, 127 (1985)

- 8) Shimoi, K.: *Mutation Res.*, **173**, 239 (1986)
- 9) 原征彦:「茶ポリフェノール類の生理活性に関する研究」東京大学博士論文, p.150(1990)
- 10) Ito, Y.: *Mutation Res.*, **222**, 253 (1989)
- 11) 原征彦:日本放射線影響学会第34回大会講演要旨集, p.143, 東京(1991)
- 12) 原征彦:日本癌学会第45回総会講演要旨集, No.1431, 札幌(1986)
- 13) 原征彦:栄食誌, **42**, 39(1989)
- 14) 原征彦:日本癌学会第47回総会講演要旨集, No.428, 東京(1988)

5 アザチロシン

岡田 信子*

Azatyrosine

Nobuko Okada

National Cancer Center Research Institute Biology Division
1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo, 104 Japan

Abstract

NIH3T3 cells transformed by transfection of activated c-Ha-*ras*, c-ki-*ras*, N-*ras*, c-*raf* or c-*erbB-2* was converted to apparently normal phenotype by the treatment with azatyrosine. The flat revertant cells maintained their normal phenotype without azatyrosine, although activated p21^{ras} was still expressed. This suggested that expression of some cellular gene(s) is induced by azatyrosine and results in suppression of *ras*-function. To identify which genes were specifically expressed in revertant cells, we screened a λ gt10 cDNA library prepared from revertant cells by differential hybridization with ³²P-labeled cDNAs from *ras*-transformed cells and revertant cells. The genes thus isolated were *ras* recision gene(*rrg*), collagen typeIII, *rhoB*, fibronectin, Ca-31 and genes containing the intracisternal A particle (IAP). We speculate that some of these genes, including *rrg*, act cooperatively to counteract *ras* function.

Azatyrosine also induced large and flat revertant cells from human tumor cells, PSN-1 cells which were established from pancreatic adenocarcinoma tissue and had several-fold amplification of activated c-ki-*ras* and 50-fold amplification of c-*myc* and HCT116 cells which were established from colon cancer and had activated c-ki-*ras*. Both revertant cells can not proliferate in soft agar, even though these cells expressed same amounts of activated p21^{ras} and c-*myc* as original tumor cells.

Azatyrosine also found to be effective for inhibition of chemical carcinogenesis *in vivo*.

*国立がんセンター研究所生物学部

A single painting of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene on the skin of transgenic mice harboring the human protooncogene c-Ha-*ras* induced papillomas at 100% incidence after 20 weeks. Application of azatyrosine to the skin at a dose of 2mg/mouse once every 3 days after initiation with 7,12-dimethylbenz [a] anthracene greatly reduced the percentage incidence, number per mouse, and size of papilloma. Injection of methylnitrosourea i.p. into transgenic mice induced papillomas in the forestomach after 12 weeks (2 to 12 papillomas/mouse) at 100% incidence. Administration of azatyrosine i.p. at a dose of 2mg/mouse once every 2 days for 12 weeks after initiation with methylnitrosourea completely prevented the formation of forestomach papillomas.

従来の制がん剤は、DNA合成、RNA合成、蛋白質合成を阻害することによって増殖速度の速い、従って感受性の強いがん細胞の増殖を阻害するものが多かった。しかしながら、正常細胞の中にも骨髄や腸管系の細胞などは、増殖速度が速い為にどうしてもがん細胞と共に損傷を受け、その結果、副作用を示す場合が多々あった。そこで我々は、副作用の弱い制がん剤を見つけるという目的で、数年前からがん細胞の増殖を特異的に阻害する物質の探索を始めたが、ちょうどその頃には、がん化の原因ががん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常によるものであるという見方が強まり、又同時に、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が発見され、細胞に対するそれらの影響が徐々に明らかになりつつあった。それらの中でも特に、*ras*がん遺伝子の異常は、肺癌、大腸癌、肺癌、悪性黒色腫など多くのヒトがんで見出されており、単離された活性化した*ras*がん遺伝子によって細胞ががん化することも証明されている。従って、活性化した*ras*がん遺伝子の作用を抑制する物質は、ヒトがんの多くのものに効果を示す可能性が考えられる。そこで我々の探索の為に、活性化した*ras*がん遺伝子でトランスフォームしたNIH3T3細胞の使用を試みた。更に対照として正常のNIH3T3細胞を使用し、トランスフォームした細胞と正常細胞に対する増殖の阻害の程度を比較し、トランスフォームした細胞に対してだけ特に強い阻害効果を示す物質の探索を試みた。

1 がん細胞の増殖を特異的に阻害する物質の探索

がん細胞の増殖を特異的に阻害する物質を探索する為に、がん細胞としては活性化したc-Ha-*ras* (61番目のアミノ酸が突然変異によってグルタミンからロイシンに変換している。)でトランスフォームしたNIH3T3細胞¹⁾を使用し、その対照の正常細胞としてはNIH3T3細胞を使用して種々の放線菌生産物質について探索を試みた。その結果、*Streptomyces Chibaensis*の生産しているチロシン類似体の抗生物質であるアザチロシン [L-β-(5-hydroxy-2-pyridyl)-alanine] (Fig.1)²⁾が500μg/mlの濃度で投与した時に、NIH3T3細胞にはほとんど影響を与えないにもかかわらず、トランスフォームした細胞の増殖を特異的に阻害すると同時に、85%以上という高頻度で扁平で大きな細胞を誘導することがわかった。これらの扁平な細胞はアザチロシン投与後6日目頃までは増殖しないが、6日目以降からは徐々に増殖しコンタクトインヒビ

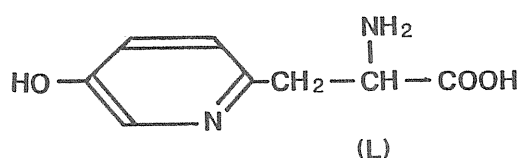


Fig.1 Azatyrosine

ションによって増殖は停止する。しかもそれらの扁平な細胞は培地中からアザチロシンを除いても元のトランスフォームした細胞に戻らないことから、恒常的に性質が変化したことが予測され、我々はこれらの細胞をリバータント細胞と名付けた。

2 リバータント細胞の性質³⁾

活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームした細胞から誘導されたリバータント細胞は、Fig.2 B, Cに示すように細胞の大きさに違いはあるが、いずれもコンタクトインヒビションによって増殖が停止する。更に軟寒天中でコロニーを形成しないことや、又、ヌードマウスへの移植実験からも腫瘍形成能が著しく低下していることが明らかになった。しかもリバータント細胞では活性化した*ras*蛋白質(p21)が元のトランスフォームした細胞と同量発現していたことから、活性化したp21による細胞のがん化を抑制するような遺伝子の発現がアザチロシンによって誘導されたことが示唆される。

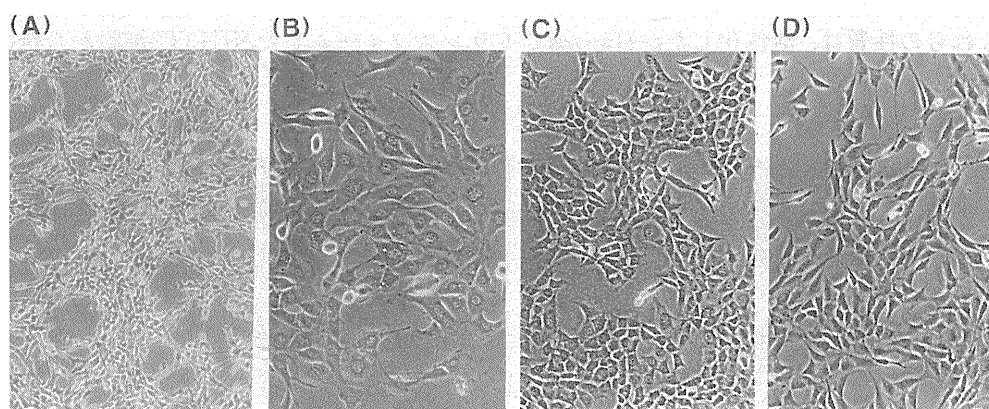


Fig.2 Morphology of revertant cells

- (A) 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞
- (B) アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞(clone 1)
- (C) アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞(clone 2)
- (D) NIH3T3細胞

3 種々のがん遺伝子によってトランスフォームした細胞に対するアザチロシンの効果

種々のがん遺伝子によってトランスフォームした細胞に対するアザチロシンの活性を知るために、活性化したc-ki-*ras*⁴⁾, N-*ras*⁵⁾, c-*raf*⁶⁾, c-*erbB-2*⁷⁾, *hst*^{8,9)}, 又は*ret*¹⁰⁾でトランスフォームしたNIH3T3細胞や*src*でトランスフォームした3Y1細胞¹¹⁾について調べた結果、c-ki-*ras*, N-*ras*, c-*raf*, 又はc-*erbB-2*でトランスフォームした細胞に対しては500 μ g/mlの濃度でアザチロシンを投与した時に、やはり特異的な増殖阻害と扁平なリバータント細胞誘導の効果が認められたが、*hst*, *ret*, 又は*src*でトランスフォームした細胞に対しては特異的な増殖阻害効果は示すもののリバータント細胞誘導の効果は認められなかった。以上のことは(2)で示唆された細胞のがん化を抑制する遺伝子は、c-*erbB-2*, *ras*, *raf*が関与する情報伝達機構の下流で作用していることを示唆している。

4 ヒトがんに対するアザチロシンの効果¹²⁾

以上で述べてきた細胞は線維芽細胞由来であり、ヒトがんのほとんどが上皮細胞由来であることから、更にヒトがん細胞に対するアザチロシンの効果を調べる必要がある。ヒト膵臓がんから株化されたPSN-1細胞^{13,14)}は活性化したc-ki-rasが数倍増幅し、c-mycは数十倍増幅している。更にがん抑制遺伝子p53も失活している¹⁵⁾非常に悪性の高い細胞である。又、ヒト大腸がんから株化されたHCT116細胞¹⁶⁾も活性化したc-ki-rasを持っていることが知られている。両細胞についてアザチロシンの効果を調べたところ、PSN-1細胞に対しては200 μ g/mlの濃度で投与した時に特異的な増殖阻害と扁平で大きい細胞の誘導が見られた(Fig.3B)。HCT116細胞に対しては550 μ g/mlの濃度で投与した時に同様の効果が認められた(Fig.3D)。両細胞から誘導されたリバータント細胞はいずれも軟寒天中でコロニーを形成しないにもかかわらず(Fig.4B, D), 活性化したp21が元のがん細胞と同量発現し、更にPSN-1細胞から誘導されたリバータント細胞ではc-mycも増幅して発現していた。又、培地中からアザチロシンを除いてもリバータント細胞の性質が保持されていた。これらの性質は、活性化したc-Ha-rasでトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリ

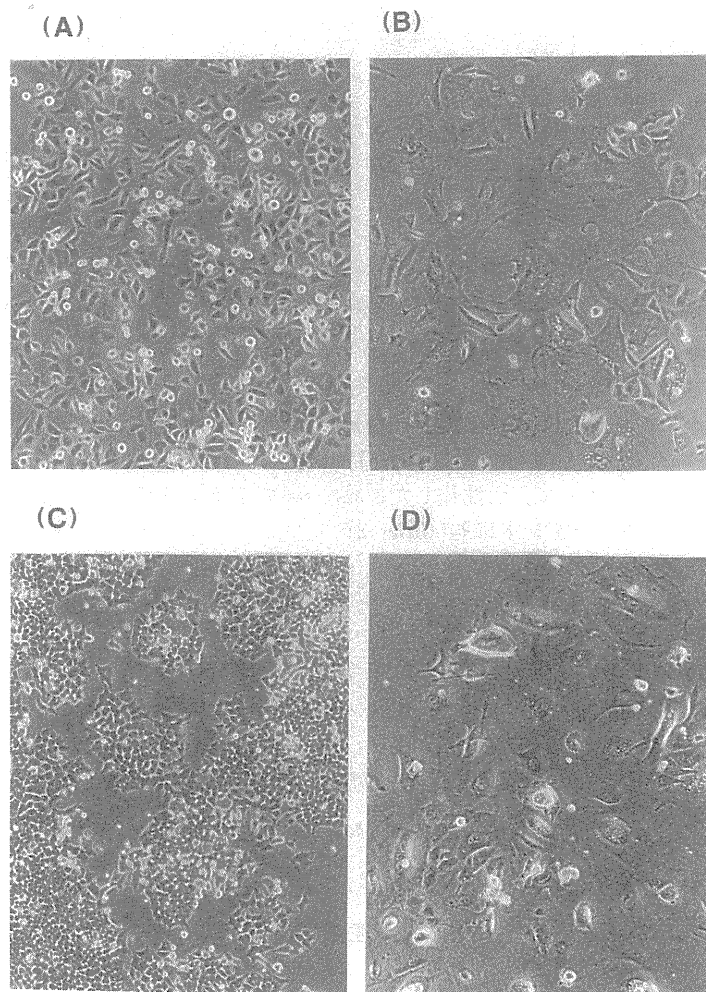


Fig.3 Morphology of revertant cells

(A) PSN-1細胞

(B) アザチロシンによって、PSN-1細胞から誘導されたリバータント細胞

(C) HCT116細胞

(D) アザチロシンによって、HCT116細胞から誘導されたリバータント細胞

リバータント細胞と似ており、従ってヒトがん細胞からのリバータント細胞でも活性化したp21や増幅したc-mycの作用を強力に抑制する遺伝子の発現が誘導されたことが示唆される。

5 リバータント細胞で特異的に発現している遺伝子の探索¹⁷⁾

リバータント細胞とトランスフォームした細胞との融合を試みたところ、得られた融合細胞がリバータント細胞の形質を示すことから、アザチロシンによって発現が誘導される遺伝子がdominantであることが示唆された¹⁸⁾。そこで、cDNA differentialハイブリダイゼーション法を使用してリバータント細胞で特異的に発現している遺伝子の探索を試みた。まず、活性化したc-Ha-rasでトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞のmRNAを基にλgt10cDNAライブラリーを調整した。次にリバータント細胞とトランスフォームした細胞のmRNAを鋳型にして標識cDNAを合成し、両者をプローブとして使用しハイブリダイゼーションを行った。トランスフォームした細胞から調整したプローブとはハイブリット形成をしないが、リバータント細胞からのプローブとはハイブリット形成をするリコンビナントファージDNAを選別した。その結果、約30,000個のリコンビナントファージから重複するものも含めて約300個の候補者を同定することができた。これらのうちから挿入DNAのサイズが2 kb以上のリコンビナントファージ30個について、ノーザンブロットによってリバータント細胞で特異的に発現が増加していることを確かめると同時に、塩基配列を決定したところ、以下の遺伝子であることがわかった。①rrg (ras recision gene)(Fig.5A, lane 3)¹⁹⁾, ②コラーゲンタイプIII(Fig. 6C, lane 3)²⁰⁾, rhoB (Fig. 6B, lane 3)²¹⁾, フィブロネクチン(Fig. 6D, lane 3)²²⁾, ③マウスのintracisternal A particle (IAP)を含む遺伝子(Fig. 6A,

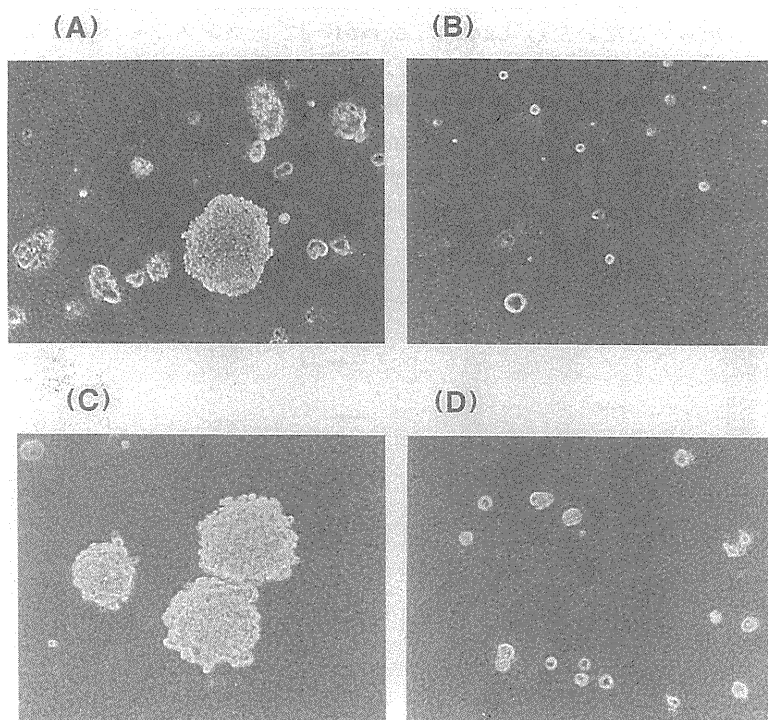


Fig.4 Colony formation in soft agar

(A) PSN-1細胞

(B) アザチロシンによって、PSN-1細胞から誘導されたリバータント細胞

(C) HCT116細胞

(D) アザチロシンによって、HCT116細胞から誘導されたリバータント細胞

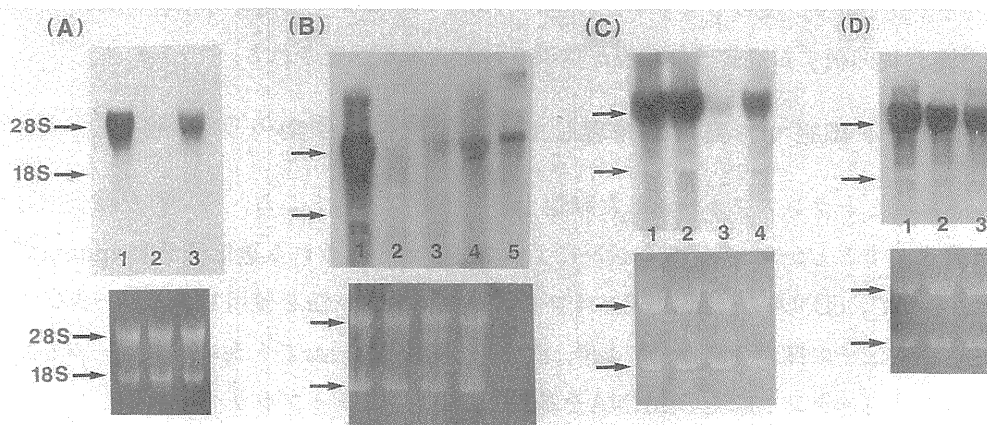


Fig.5 RNA blot hybridized with *rrg* cDNA

(A) Lane 1: NIH3T3細胞/Lane 2: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞/Lane 3: アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

(B) Lane 1: NIH3T3細胞/Lane 2: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞/Lane 3: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞にアザチロシンを処理した後2日目の細胞/Lane 4: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞にアザチロシンを処理した後6日目の細胞/Lane 5: アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

(注、リバータント細胞だけ1 μ gの全RNAを使用し、他の細胞は、8 μ gずつの全RNAを使用した。)

(C) Lane 1: NIH3T3細胞(我々の)/Lane 2: NIH3T3細胞(東京大学医科学研究所の山本雅博士からいただいた)/Lane 3: c-*erbB*-2でトランスフォームしたNIH3T3細胞(山本雅博士からいただいた)/Lane 4: アザチロシンによって、c-*erbB*-2でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

(D) Lane 1: NIH3T3細胞(我々の)/Lane 2: NIH3T3細胞(癌研究会癌研究所の野田亮博士からいただいた)/Lane 3: 5'-アザシチジンによって、v-*ki-ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

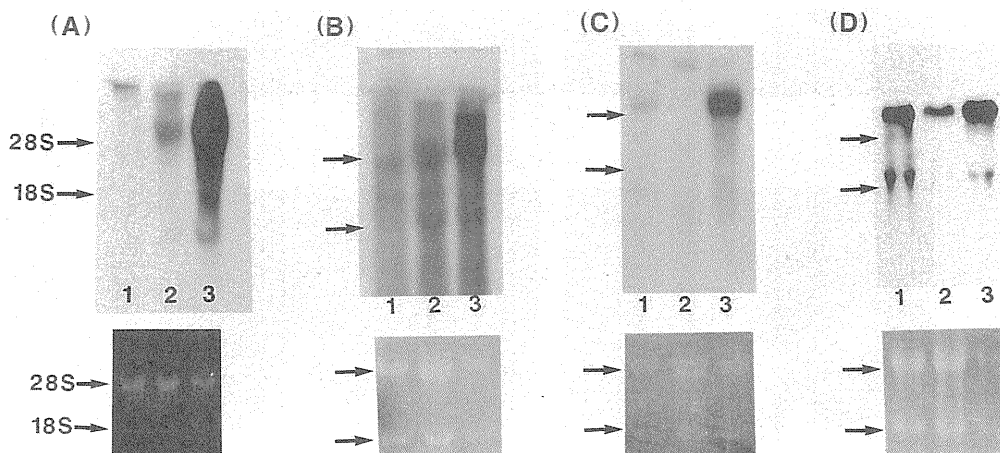


Fig.6 RNA blot hybridized with IAP, *rhoB*, collagen typeIII or fibronectin cDNA

(A) IAPを含む遺伝子

(B) *rhoB*

(C) コラーゲンタイプIII

(D) フィブロネクチン

Lane 1: NIH3T3細胞/Lane 2: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞/Lane 3: アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

lane 3)²³⁻²⁶, *rrg*はContenteらによって見出された遺伝子であり、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞にマウスのインターフェロン α と β を処理して誘導されてくるリバータント細胞²⁷⁾で発現している。*rrg*のアンチセンスDNAをリバータント細胞へ導入するとトランスフォームした細胞に変換することから、そのがん抑制効果が明らかにされている。又、*rrg*はKenyonらによってLysyl oxidaseと同一の遺伝子であることも示されたが²⁸⁾、どのような作用機作によってリバータント細胞の保持に關与しているのかは現在明らかではない。ノーザンブロットの結果から、*rrg*は、野田らによってv-ki-*ras*によってトランスフォームしたNIH3T3細胞から5'-アザシチジンによって誘導されたリバータント細胞²⁹⁾(Fig.5D, lane 3)や、c-*erbB*-2でトランスフォームした細胞からアザチロシンによって誘導されたリバータント細胞(Fig.5C, lane 4), 更にはNIH3T3細胞(Fig.5A, lane 1)でも多量の発現が見られることから細胞の正常化に必須の遺伝子であることが示唆されている。又、*rrg*はアザチロシン処理後すでに2日目(Fig.5B, lane 3)にはその発現が増加し、6日目(Fig.5B, lane 4)には更に増加が認められたことから、アザチロシンによって*rrg*の発現が誘導されたことが確認された。又、コラーゲンタイプIIIやフィブロネクチンは細胞の形態保持に必須な蛋白質であり、*rhoB*は細胞の分化に關与しているといわれている。IAPを含む遺伝子については30個の候補者のうち約3/4を占めているが、IAPを含む遺伝子がリバータント細胞の誘導や保持に關与しているかどうかは現在のところ明らかではない。しかしながら、アザチロシン処理後2日目にはその発現が増加していることから、*rrg*や*rhoB*、フィブロネクチンと同様のメカニズムによって発現が制御されていることが示唆される。現在、これら遺伝子の発現のメカニズムについても解析を進めている。次に残りの270個の候補者について、*rrg*と同様に正常細胞とリバータント細胞で発現が増加し、トランスフォームした細胞では減少している遺伝子を見直したところ、5個のリコンビナントファージを選別することができた。3個は*rrg*を含み、2個はCa結合蛋白質の一員であるCa-31を含んでいることがわかった³⁰⁾。ノーザンブロットの結果、0.6kb, 4.5kb, 6.0kbの3種類のmRNAを同定することができた(Fig.7 Lane 3)。一部塩基配列の決定を行ったところ、0.6kbのmRNAのcDNAは、後藤らがBalb/C3T3とマウスembryofibroblastsの間でcDNA differentialハイブリダイゼーションを行って、Balb/C3T3細胞にのみ特異的に発現している遺伝子として同定したpEL98³¹⁾と同一のものであることがわかった。しかしながら、我々のリバータント細胞でのみ発現が認められた4.5kbあるいは6.0kbのmRNA由来のcDNAは、pEL98と全く同一の領域を含みながら、スプライシングの違いによって生じたと予想される新たなアミノ酸をコードする

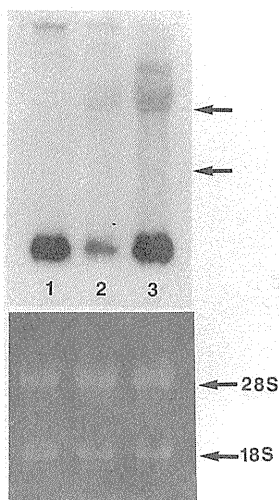


Fig.7 RNA blot hybridized with Ca-31 cDNA

Lane 1: NIH3T3細胞/Lane 2: 活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞/Lane 3: アザチロシンによって、活性化したc-Ha-*ras*でトランスフォームしたNIH3T3細胞から誘導されたリバータント細胞

領域を含むことが明らかになった。Ca結合蛋白質は細胞の増殖や分化に関与している遺伝子であり、従ってpEL98を含むCa-31がリバータント細胞の誘導に関与していることが示唆され、現在、トランスフェクション法によってCa-31のリバータント細胞誘導の活性を測定しているところである。

6 アザチロシンの*in vivo*における発がん抑制効果

果たして、アザチロシンが*in vivo*でがん細胞の増殖を抑えることができるかどうかは、アザチロシンが制がん剤として臨床応用できるかどうかを決定する重要な課題である。そこで、PSN-1細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍が直径0.5cmに成長した時からアザチロシンを連続的に静脈内に250mg/kg(マウスの体重)の濃度で注入し、腫瘍の増殖を阻害することができるかどうかを検討した。この制がん実験からはめざましい成果は得られなかったが、*in vivo*の系でもPSN-1細胞の増殖を阻害するためには200 μ g/mlの濃度のアザチロシンが必要であることから、それだけの濃度のアザチロシンが固形の腫瘍に保持されているかどうかという問題も残っている。そこで、次に*in vivo*の系でのアザチロシンの発がん阻止効果を検討した。正常のヒトのc-Ha-rasが導入されたトランスジェニックマウス³³⁾に、N-nitroso-N-methylurea(MNU)を50mg/kg(マウスの体重)の濃度で1回投与すると、約12週間後には前胃に十数個のパピローマが形成される。そこで、MNUを投与後翌日から1日おきにアザチロシンを2mg/マウスの濃度で腹腔内に投与し続けた時、パピローマの形成が抑えられるかどうかを観察したところ、アザチロシンを投与した場合には試験した12匹のマウスのすべてで全くパピローマが形成されていないことが顕微鏡下でも確かめられた³⁴⁾。又、7,12-dimethyl-benz[a]anthracene(DMBA)を1回腹腔内に投与すると前胃や肺にカルシノーマが生成するが、やはり、アザチロシンを投与することによってカルシノーマの形成も阻害することがわかった³⁵⁾。したがって、アザチロシンはパピローマのような良性腫瘍のみならず悪性の腫瘍の発生も阻止することがわかった。以上の発がん阻止実験はアザチロシンの臨床応用への可能性の第一歩ではあるが、本当に制がん剤としても利用できるかどうかは、今後の幾つもの*in vivo*での制がん実験などを繰り返し行うことが必須であると思われる。

参考文献

- 1) Sekiya, T., Fushimi, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4771-4775, 1984
- 2) Inouye, S., Shomura, T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 2669-2677, 1975
- 3) Shindo-Okada, N., Makabe, O. et al.: *Mol. Carcinog.*, **2**: 159-167, 1989
- 4) Taya, Y., Hosogai, K. et al.: *EMBO J.*, **3**: 2943-2946, 1984
- 5) Taparowsky, E., Shimizu, K. et al.: *Cell*, **34**: 581-586, 1983
- 6) Tahira, T., Ochiai, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **15**: 4809-4820, 1987
- 7) Semba, K., Kamata, N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6497-6501, 1985
- 8) Sakamoto, H., Mori, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3997-4001, 1986
- 9) Tahira, M., Yoshida, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2980-2984, 1987
- 10) Ishizaka, Y., Tahira, T. et al.: *Oncogene Research*, **3**: 193-197, 1988
- 11) Kawai, S.: *Virology*, **34**: 772-776, 1980
- 12) 岡田信子, 未発表データ。
- 13) Yamada, H., Yoshida, T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**: 167-173, 1986

- 14) Yamada, H., Sakamoto, H. et al.: *Jpn. Cancer Res. (Gann)*, **77**: 370-375, 1986
- 15) 関谷剛男, 未発表データ。
- 16) Brattain, M. G., Fine, W. D. et al.: *Cancer Res.*, **41**: 1751-1756, 1981
- 17) Krzyzosiak, W. J., Shindo-Okada, N. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4879-4883, 1992
- 18) 中島貴志子, 岡田信子, 未発表データ。
- 19) Contente, S., Keyon, K., et al.: *Science*, **249**: 796-798, 1990
- 20) Owens, R. J., Baralle, F. E.: *FEBS*. **204**: 318-322, 1986
- 21) Yeramian, P., Chardin, P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **15**: 1869, 1987
- 22) Noda, M., Ikawa, Y.: *Oncogenes and Cancer* (Aaronson, S. A., et al. eds), 261-267, 1987
- 23) Canaani, E., Drezzen, O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 7118-7122, 1983
- 24) Kuff, E. L., Feenstra, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1992-1996, 1983
- 25) Hawley, R. G., Shulman, M. J. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 2565-2572, 1984
- 26) Ymer, S., Tucher, W. Q. J. et al.: *Nature*, **317**: 255-258, 1985
- 27) Samid, D., Chang, E. S. et al: *J. Exp. Pathol.*, **2**: 211-222, 1985
- 28) Kenyon, K., Contente, S. et al.: *Science*, **253**: 802, 1991
- 29) Noda, M., Selinger, Z. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 5602-5606, 1983
- 30) 長野江理子, 石濱恵規, 篠原美由紀, 岡田信子, 未発表データ。
- 31) Goto, K., Endo, H. et al.: *J. Biochem.*, **103**: 48-53, 1988
- 32) Mihich, E., 未発表データ。
- 33) Saitoh, A., Kimura, M. et al.: *Oncogene*, **5**: 1195-1200, 1990
- 34) Izawa, M., Takayama, S. et al.: *Cancer Res.*, **52**: 1628-1630, 1992
- 35) 勝木元也, 未発表データ。

6 放射線誘発骨髄性白血病の発症に 及ぼすカロリー制限の効果

吉田和子*／根本久美恵*／井上 達***／佐渡敏彦**

The Effect of Calorie Restriction of Radiation-induced Myeloid leukemogenesis

Kazuko Yoshida, Kumie Nemoto, Tohru Inoue* and Toshihiko Sado

Division of Physiology and Pathology, National Institute of Radiological Sciences
4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, 263 Japan

*Department of Pathology, Yokohama City University Medical School,
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, 236 Japan

Abstract

The spontaneous incidence of myeloid leukemia was about 1% in C3H/He male mice, however it could be increased 23.3% after 3 Gy whole body radiation. Then, we examined whether or not the incidence of myeloid leukemia was decreased by calorie restriction. The diets were arranged so that the mice were from each experimental groups ingested similar amount of protein, lipid, vitamins and minerals. The mice of restricted A groups (RA) were fed of the same calorie (95Kcal) of control groups until radiation (10 weeks old). Then, they were controled to keep a body weight of 25-27gm using 60 to 95 Kcal diet. The other groups (RB) were restricted from 6 weeks old. The incidence of myeloid leukemia in radiation plus control diet groups was 21%, however, in calorie restricted groups it is significantly decreased compared with control diet group. The incidence in 3RA and 3RB group is 10.2 and 6.7% respectively.

Besides, the latent period of myeloid leukemia also is prolonged in the both calorie restricted groups compared to control diet group.

はじめに

発癌と食餌制限との関係については1940年代初頭より動物実験で乳がん、肺腫瘍、白血病、皮膚がん等が食餌制限により有意に減少することが報告されている¹⁻⁷⁾。しかしながら、放射線誘発腫瘍と食餌制限に関する研究はまだ数編の報告しかなく⁸⁻¹⁰⁾、骨髄性白血病の発症と食餌制限に関する報告はない。また、こ

*放射線医学総合研究所生理病理研究部／**放射線医学総合研究所科学研究官／***横浜市大医学部病理学教室

これらの報告の多くは極度の食餌制限を行っているため、比較的初期に死亡するマウスが多く、食餌制限の方法に問題があると思われる。そこで、マウスが正常に発育するに必要な程度のカロリーは与える条件で放射線誘発骨髄性白血病について実験を行った。

実験方法

放医研で生産されたC3H/He雄マウスを使用し、4種類の給餌方法で実験を行った(Table 1)。即ち、対照群としては、1つは従来の実験との比較の意味で、放医研で通常使用している飼料(船橋農場製繁殖用飼料:MB-1)を自由に摂取させる通常食群(N群)を置いた。この群のマウスは1週間に100から120Kcalの飼料を摂取する。この通常食群は制限食と飼料組成が異なるため正確なカロリー制限の対照群とするわけにはいかないので、制限食にたいするもう1つの対照群として、コントロール食群(C群)を置いた。この群のマウスは1週間に95Kcal(カロリー制限の実験を行う場合のコントロール食は一般的に通常食で飼育したマウスの100日から200日の間に摂取した平均カロリー数の80%制限がコントロール食群のカロリー数となる)摂取する。制限食群は6週より照射時、即ち10週齢までコントロール食で飼育し、その後60から95Kcalの飼料を用いて体重を25から27gmにコントロールするRA群と、6週から65Kcalの飼料で飼育し、その後体重が25ないし27gmに達した後体重の増減により60から95Kcalの飼料を用いて体重をコントロールするRB群の2種類の制限方法を行った。これらの実験群は更に10週齢で3Gy全身照射する群と非照射群を置

Table 1 EXPERIMENTAL CONDITIONS

EXP. GROUPS	DIET	Kcal / WEEK	RADIATION	NO. OF MICE
C N	CONVENTIONAL	100 ~ 120 Kcal	NO	111
3 N	CONVENTIONAL	100 ~ 120 Kcal	YES	112
C C	CONTROL	95 Kcal	NO	162
3 C	CONTROL	95 Kcal	YES	162
C R A	RESTRICTION A	95 Kcal (6~10 WEEK)	NO	127
3 R A	RESTRICTION A	60 ~ 95 Kcal	YES	127
C R B	RESTRICTION B	65 Kcal (6 WEEK~)	NO	69
3 R B	RESTRICTION B	60 ~ 95 Kcal	YES	75

The mice of restriction groups were controlled to keep a body weight of 25 to 27gm using diet of 60 ~ 95 Kcal.

Table 2 COMPOSITION OF DIET (GRAM/MOUSE/WEEK)

INGREDIENT	DIET 1 95KCAL	DIET 2 70KCAL	DIET 3 65KCAL	DIET 4 60KCAL
CONSTARCH	13.6	8.5	7.4	5.9
DEXTROSE	2.7	1.6	1.4	1.2
MILK CASEIN	6.3	6.0	6.0	6.3
CORN OIL	0.8	0.8	0.8	0.8
FIBER	1.4	1.3	1.3	1.4
ALPHA STARCH	0.3	0.3	0.3	0.3
VITAMIN MIXTURE	0.3	0.3	0.3	0.3
MINERAL MIXTURE	1.9	1.9	1.9	1.9

き合計8群となった。各実験群は6回から13回に分けて実験を開始した。したがって、現段階では最も早く開始されたグループは全てのマウスはすでに死亡しているが、最も遅く開始されたものは現在約750日を経過したところである。したがって、今回の報告は中間データーである。カロリー制限の実験に使用した飼料の成分はTable 2に示すように、何れの飼料を給餌しても1週間にマウス1匹当たり、蛋白、脂肪、ビタミン、ミネラルはほぼ同量摂取するように配合されており、炭水化物と糖でカロリーをコントロールするように作製した。制限食群即ちRAとRBの実験群のマウスは1週間に1回体重を測定し、体重が25から27gmになるように60から95Kcalの飼料を用いてコントロールした。マウスは原則的に終生飼育したが、貧血、脾腫等白血病の症状が出現したものは死亡寸前に屠殺し、血液学的検索を行うとともに病理組織学的検索を行った。他のマウスは死亡時に解剖し病理組織学的検索を行った。

結 果

6週より100週までの各制限食群について、マウス1匹が1週間に摂取した平均カロリー数はFig.1に示す様に照射の有無で差は認められない。照射時即ち10週までコントロール食を給餌し照射後より制限食に代えたRA群は60Kcalの飼料より給餌しはじめ20週齢までは70Kcal以下の摂取量となっているが、その後70Kcalから80Kcalの摂取量で変動し、100週齢までの平均摂取量はCRA, 3RA群とも約75Kcalであった。6週より制限食を給餌したRB群では約40週までの平均摂取量は65Kcalで、その後徐々に摂取量は増加し、50週を越えるとRA群と同様に摂取量は70Kcalから80Kcalの間を変動し、6週から100週までの平均摂取量は照射群、非照射群とも約72Kcalであった。

体重の変動は照射時までコントロール食を給餌していたRA群は、照射群、非照射群ともに同様な体重の変動パターンを示した(Fig.2)。照射時の体重は約30gmで、その後急激なカロリー制限を行った為に体重は急速に減少し15週齢で我々が理想的な体重と考えている25から27gmの範囲に入り100週までこの体重を維持した。一方、6週より65Kcalの制限食を給餌したRB群は、RA群と同様に照射群と非照射群との間で体重の変動パターンの差は認められず、6週より通常食から65Kcalの飼料に代えたため、体重はいったん減少したが8週より増加しはじめ、照射時の10週齢ではCRB, 3RBとも24gmであった。その後も体重は増

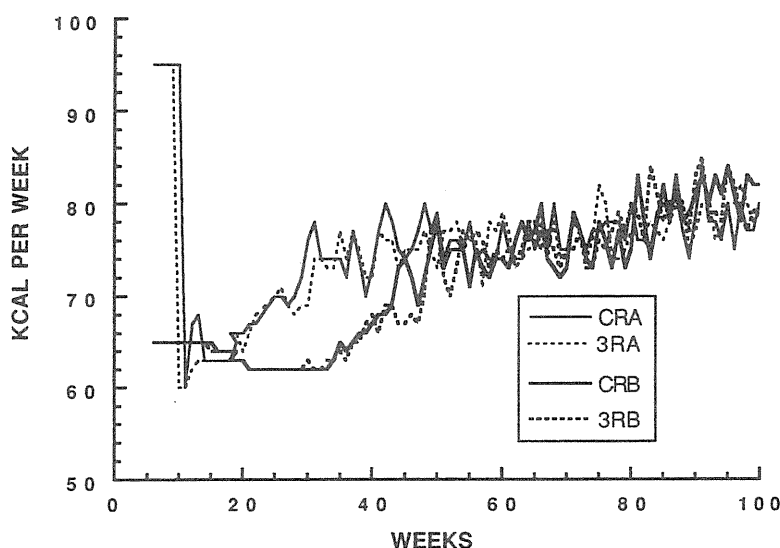


Fig.1 Caloric Intake

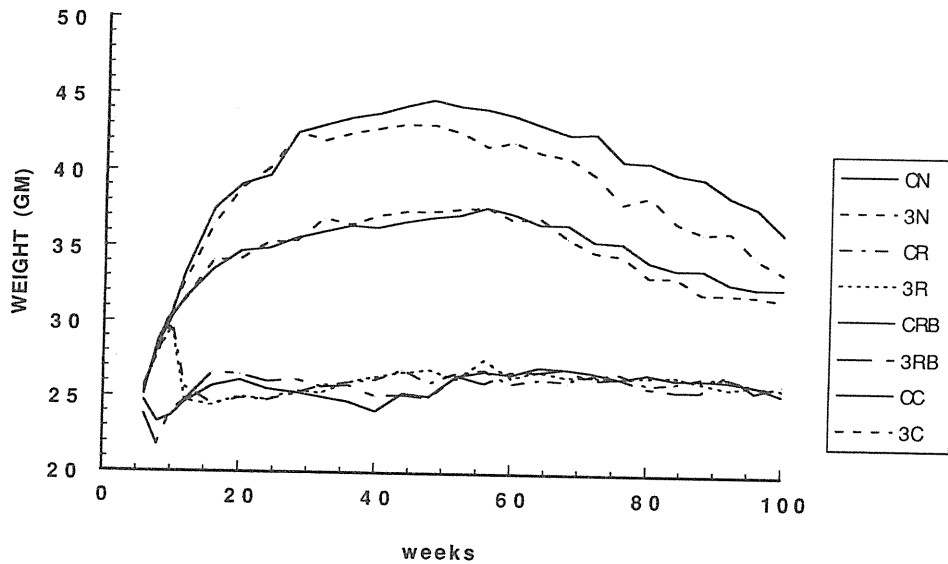


Fig.2 Body Weight

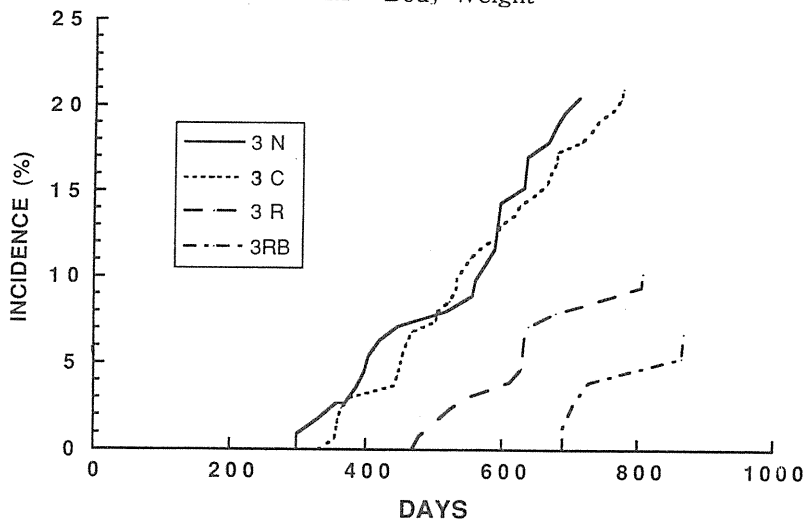


Fig.3 Cumulative Incidence of Myeloid Leukemia

加し続け12週で25gm, 14週で26gmとなりその後100週まで25から27gmの範囲を維持した。95Kcalのコントロール群は、照射、非照射群とも体重は20週まで増加し続け、その後36から37gmの体重を70週まで維持し、その後徐々に減少した。通常食群も照射時の10週齢では体重は約30gmで、その後も体重は増加し続け30週でプラトーに達した。その後は3 Gy照射群のマウスの体重のほうがやや軽い傾向が続くのが認められた。

骨髄性白血病の発症率についてはTable 3に示すように、非照射群では通常食、コントロール食とも発症率は3%以下であったが、制限食群では現在まで1例も骨髄性白血病の発症は認められていない。3 Gy照射群では通常食では20.5%、コントロール食では21%と、両者の間では差は認められなかった。照射まではコントロール食と同様の飼料を給餌、その後制限食に代えた3 RAでは10.2%と通常食、コントロール食の発症率の約半分となり、これらの群との間にX²テストで5%以下の危険率で骨髄性白血病の有意な減少が認められた。照射前の6週より制限食を給餌した3 RB群では更に発症率は減少し、6.7%となった。制限食群間すなわち、3 RBと3 RAでは有意差は認められないが、3 Nとの間では2%以下、3 Cとの間では1%以下の危険率でX²テストにより有意差が認められた。以上の結果をまとめてみると、通常食とコント

Table 3 MORTALITY AND INCIDENCE OF MYELOID LEUKEMIA

GROUPS	NO. OF MICE	NO. OF DEAD MICE	MORTALITY (%)	NO. OF LEUK. MICE	INCIDENCE OF LEUK.(%)
C N	111	99	89.2	2	1.8±1.3
3 N	112	107	95.5	23	20.5±3.0
C C	162	108	66.7	4	2.5±1.2
3 C	162	141	87.0	34	21.0±3.2
CRA	127	39	30.7	0	0
3RA	127	65	51.2	13	10.2±2.7
CRB	69	38	55.1	0	0
3RB	75	57	76.0	5	6.7±2.9

(INTERIM RESULTS)

ロール食との間では放射線誘発骨髄性白血病の発症率には差は認められないが、カロリー制限を行う事により発症率は有意に減少し、その効果は照射前より制限食を給餌した群でより強く現れる。実験は現在まだ経過観察中で死亡率は3 RA群で51%、3 RB群で76%であるので、まだこれらの群で白血病が発症する可能性は否定できない。しかしながら、我々の以前の実験データによると、骨髄性白血病は約300日から700日の間にほとんどが発症し¹¹⁾、760日以降にはほんのわずかしが発症していないので、今後、それほど多くのマウスが白血病を発症する可能性は少ないと考えられる。しかし、これはあくまでも通常食で飼育した場合であって、制限食の場合は寿命も延長することから発症時期が延長する可能性も否定できない。

3 Gy照射群間での骨髄性白血病のCumulative IncidenceをFig.3に示す。通常食群、コントロール食群ともに約300日齢より骨髄性白血病が発症しはじめ、その後急速に増加し、両者で発症パターンに大きな差は認められなかった。これに対して、照射後制限食を給餌した3 RA群では、最初の1例の発症は479日と通常食、コントロール食群より大きく遅延し、発症率の増加もやや緩慢である。6週より制限食を給餌した3 RB群では更に遅れて、690日で初めての発症が観察された。この群のマウスは、現在約80%が既に死亡していることから、今後このCumulative Incidenceのカーブがそれほど急上昇する事はないと推測される。以上の結果より、カロリー制限により骨髄性白血病の発症時期は有意に遅延すると考えられる。

まとめ

放射線誘発骨髄性白血病はマウスの食餌中のカロリー制限により有意に発症率を低下させることができる可能性のある結果が得られた。特に照射前よりのカロリー制限によりその効果はさらに顕著に現れるものと思われる。

カロリー制限により放射線誘発骨髄性白血病の発症率を減少させる機構を説明するには、未だ十分なデータは得られていない。しかしながら、我々の予備実験では、カロリー制限を行ったマウスの脾臓での造血幹細胞数が著しく減少している結果が得られていることから、照射前よりカロリー制限を行った群では、照射時の白血病発症における標的細胞である造血幹細胞の減少が反映している可能性が考えられる。しかしながら、照射時までコントロール食を給餌した群では、照射時の幹細胞数はコントロール食と同一であるため、照射時の標的細胞の数の減少だけでは説明できない。白血病の発症過程をイニシエーションとプロモーションに分けると、特に3 RA群ではカロリー制限の効果はプロモーションの過程に関与している可能性が高い。特に、照射後の造血幹細胞の回復動態の差や、Cell Cycleに入っている幹細胞の比率

や、活性酸素の問題等が考えられる。あるいはマウスの骨髄性白血病の発症に関連する遺伝子はまだ特定されていないが、その遺伝子発現等がカロリー制限により影響を受けている可能性も考えられる。カロリー制限により発癌率が減少するその機構については非常に興味のある問題であるが、今後の検討課題として残されている。

謝 辞

本研究に協力していただいた横浜市大・鈴木健一、放医研・西村まゆみ、朽木喜久代、佐々木恵子、堀越はる子、寺田南子の各位に感謝致します。カロリー制限の方法について色々ご助言いただいた、東京都老人病研究所、藤田美明博士に深謝いたします。この研究は科学技術庁特別研究「公衆被曝のリスク評価に関する生物学的研究」によって行われた。

参考文献

- 1) Visscher, M. B., Ball, Z. B., Barnes, R. H. and Sivertsen, I.: The influence of calorie restriction upon the incidence of spontaneous mammary carcinoma in mice. *Surgery*, **11**; 48-55, 1942.
- 2) White, F. R. and White, J. J.: Effect of a low lysine diet on mammary-tumor formation in strain C3H mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **5**; 41-42, 1944.
- 3) Larsen, C. D. and Hestone W. E.: Effects of cystine and calorie restriction on the incidence of spontaneous pulmonary tumors in strain A mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **6**; 31-40, 1945.
- 4) Saxton, J. A. Jr., Boon, M. C. and Furth, J.: Observations on the inhibition of development of spontaneous leukemia in mice by underfeeding. *Cancer Res.* **4**; 401-409, 1944.
- 5) Rusch, H. P., Kline B. E. and Baumann, C. A.: The influence of calorie restriction and of dietary fat on tumor formation with ultraviolet radiation. *Cancer Res.* **5**; 431-435, 1945.
- 6) Rusch, H. P., Johnson, R. O. and Kline, B. E.: The relationship of calorie intake of blood sugar to sarcogenesis in mice. *Cancer Res.* **5**; 705-712, 1945.
- 7) Boutwell, P. K., Brush, M. K. and Rusch, H. P.: The stimulating effect of dietary fat on carcinogenesis. *Cancer Res.* **9**; 741-746, 1949.
- 8) Gross, L. and Dreyfuss, Y.: Reduction in the incidence of radiation-induced tumors in rats after restriction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**; 7596-7598, 1984.
- 9) Gross, L. and Dreyfuss, Y.: Inhibition of the development of radiation-induced leukemia in mice by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**; 7028-7931, 1986.
- 10) Gross, L. and Dreyfuss, Y.: Prevention of spontaneous and radiation-induced tumor in rats by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**; 6795-6797, 1990.
- 11) Seki, M., Yoshida, K., Nishimura, M. and Nemoto, K.: Radiation-induced Myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Rad. Res.* **127**; 146-149, 1991.

第24回放医研シンポジウム

「放射線発がんとその制御－機構解明へのアプローチ」総評

佐渡 敏彦*

低線量放射線のヒトの健康に及ぼす影響のうち現在もっとも重視されているのは発がんリスクの増加の可能性である。その評価にあたっては、これまでは比較的高線量域で得られた各種のがん(腫瘍)の線量効果関係に関するデータを線形モデル、線形二次モデル、あるいは後者に細胞致死の線量効果関係を加味したモデル等を当てはめて解析し、それらの結果をもとに、がん全体としては、リスクが過小評価になることを避けるために、線形モデルに基づいたリスク推定が行われている。しかし、この方法を低レベル放射線、例えば10cGy以下、の線量範囲にまで当てはめてよいかどうかについては、必ずしも全ての研究者の合意が得られているわけではない。実際問題として、低レベル放射線による発がんリスクの増加は、もしあるとしても非常に小さいために、それを疫学的あるいは実験的に証明することは極めて困難で、この問題の解決にはこれまでとは違った新しいコンセプトあるいは方法論の導入が必要であることが多くの研究者によって認識されるようになってきた。

元来、放射線発がんの線量効果関係を正しく評価するためには、各々のがん(腫瘍)について、放射線によるがん発生のメカニズムが理解されていなければならない。しかし、これまでは主として技術的な制約のために、この問題に対しては極めて概念的なアプローチしかできていなかった。しかしながら、最近10数年間におけるバイオテクノロジーの進展は発がんのメカニズム研究に革命的な変化をもたらしつつある。

そういう意味で、今回の放医研シンポジウムで、放射線発がんの問題を広い視点で捉え、わが国が放射線発がんの分野で世界に誇ることでできる皮膚発がんの閾値線量、発がんの年齢依存性、遺伝性発がん等の動物実験あるいは原爆被爆者の疫学調査の結果のほか、トランスゼニックマウスや、scid-huマウス等の新しい発がんモデル実験系、発がんにおける細胞間相互作用及び微小環境の役割、ヒト及び実験動物のがんの分子生物学的研究、および発がんリスク軽減に関して現在わが国で進められている多くの研究成果が発表されたことは非常に有意義であった。それらの内容は、この報文集に詳しく述べられているので、ここでそれらの要約を繰り返す必要はないが、本シンポジウムで報告された放射線発がんには直接関係のない発表の多くは放射線発がんのメカニズムを考える上で非常に有用な情報を与えてくれるものであった。例えば、第1日目の午後に行われた発がんにおける細胞間相互作用に関するセッションで、広川によって発表された胸腺の微小環境に関する研究や森、坂倉のコネクシンあるいはテネイシン等の細胞間相互作用物質に関する研究は、細胞間相互作用における場の具体的内容について新しい視点を与えるものであった。発がん過程において重要な役割を果たすと考えられるこれらの細胞間相互作用物質の発現が放射線照射によってどのように修飾されるかは、放射線生物学者に課せられたこれからの重要な課題であろう。

第2日目の最初のセッションでは、分子生物学的手法を駆使した白血病の発症機構がその中心テーマであった。このセッションでは、マウスの放射線誘発胸腺リンパ腫(リンパ性白血病)の多段階発がんをT細胞レセプター(TCR)遺伝子の再配列をマーカーとして解析した武藤らの発表、ヒト白血病細胞におけるp53遺伝子の変異、急性前骨髄球性白血病発生における15:17転座とRARA(レチノイン酸受容体)遺伝子の役

* 放射線医学総合研究所科学研究官

割、およびヒトリンパ腫発生におけるBCL-1, BCL-2遺伝子の役割に関する杉本、田代、瀬戸らの発表等、発がん過程で起こる細胞事象とその機構に関して非常に興味ある発表と熱心な討論が続いた。このセッションでの発表と討論を通して、発がんのメカニズム研究におけるバイオテクノロジーの威力を改めて感じさせられた。

今回のシンポジウムの特別講演は、放影研の馬淵清彦疫学部長による「原爆被爆集団におけるがん発生率調査(1950-1987)」であったが、ここでは原爆被爆者の晩発障害の疫学調査の最も新しい解析結果と発がんリスクの問題が広範に論じられ、フロアーとの間で活発な討論が行われた。言うまでもなく、原爆被爆者のデータは、放射線の発がんリスクを評価するための基礎資料として、国際的に最も信頼度の高いものとされているもので、こういう機会にそのup-to-dateのデータのレビューが行われることは非常に意義がある。この機会に、私が提案したいことは、第1日目の最初のセッションで佐々木の発表のあとで松平所長が発言されたことにも関連するが、佐々木が自らの動物実験のデータに基づいてマウスの生涯過剰リスクを計算するのに用いたモデルを、原爆被爆者の疫学データに適用して、中間データからヒトの生涯リスクの評価を試みるとかあるいはマウスのデータを途中で区切って、そのデータからこのモデルを用いて生涯リスクを計算することを試みる等、いくつかの側面からこのモデルの有用性を検討してはどうかということである。

本シンポジウム最後のセッションは発がん制御に関するもので、その一つはアンチセンスオリゴDNAを利用して子宮癌細胞の増殖を抑制する試みであったが、これはいわばがんの遺伝子治療に関するものである。これに対して、他の5題は化学物質あるいは放射線による発がんを外的要因によって抑制する試みに関するもので、*in vitro*及び*in vivo*の実験系で、種々の外的因子(アスコルビン酸、レチノイド、茶カテキン、アザチロシン、カロリー制限等)によって発がんが低減できる可能性を示すものであった。それらの因子の中には、アスコルビン酸(ビタミンC)や茶の成分(茶カテキン)あるいはカロリー制限等、われわれの日常生活において比較的容易に実行できそうなものもあり、しかもそれらの発がん抑制効果は、それを線量効果関係の面から見ると、かなりの線量低減に相当するように思われた。したがって、これらの問題については、今後さらに実験結果の再現性を確認するとともに、発がん抑制のメカニズム解明へ向けて研究を進めて欲しい。

このセッションの最後に発表された放射線発がんにおけるカロリー制限の効果に関連して、フロアーから放射線発がんの実験をどのような給餌条件でやったらよいかという質問があった。この質問に関しては、通常のげっし類を使った発がん性試験についてScienceの1992年1月10日号の巻頭言に「食餌とヒト及びマウスのがん」と題する論説があるので参考のためにその要点を述べておきたい。コメンテーターは、まずad libの給餌条件のもとで飼育されたマウスは、カロリー制限条件のもとで飼育されたマウスに比して寿命が短く、がんの発生率も高いという古くから知られている実験事実を引用し、過剰の脂肪あるいは高カロリーは結果的にがんのプロモーターとして働くこと及びカロリー制限条件下で飼育されたげっし類では発がんプロモーターの効果が低下することを指摘している。そして、さらに続けて、このコメンテーターは近年げっし類の体重が増加し、がんの自然発生率も急速に高まっていることを指摘し、これらの理由から、合衆国政府が決めたad lib給餌条件下で飼育された近交系のげっし類での実験を基礎とする発がん性試験基準は考え直す必要があろうと結んでいる。動物実験の結果を如何にしてヒトへ外挿するかという古くて新しい難問に深い関わりを持つこのコメントは当然放射線発がん実験についてもあてはまることであろう。しかし、実際問題としては、発がん性試験にげっし類の使用を止めることは無理であろうと思われる。

る。最適給餌条件については、栄養学の専門家の意見も参考にしながら、今後真剣に検討する必要があるが、長年動物実験を経験してきた筆者の感じでは、少なくともマウスについては、体重から判断する限り、通常われわれが使用している飼料はかなり栄養過多のように見えることだけは確かである。

いずれにしても、発がんのメカニズム研究と発がんリスク低減の研究は、相互に密接に関連しあいながら、今後ますますその重要性を増していくであろうし、それらの研究の成果は低線量放射線のリスクについての公衆の理解を深める上でも非常に役立つと思われる。このような実り多いシンポジウムを立案、運営された第24回放医研シンポジウム実行委員会(委員長：佐藤弘毅障害基礎研究部長)、全国から参加して頂いた演者や座長及びフロアーの先生方、そしてシンポジウムの円滑な進行に協力された関係者の皆さんに心からの謝意を表して総評の結びとしたい。

編集後記

第24回放医研シンポジウム「放射線発がんとその制御」―機構解明へのアプローチは平成4年12月3日および4日に開催され、無事終了しました。

今回のシンポジウムについては、平成4年1月14日に松平所長から研究総合会議議長宛てに諮問が出され、3月24日に「放射線発がんとその防御」―機構からリスクまで―(仮題)で行うのが適当であるという答申があり、それを受けて4月7日に実行委員会が発足しました。その後、この委員会で基本構想、構成、内容、座長、演者等について詳細に検討し、7月9日にはプログラム案をまとめましたが、この過程でリスクまで含めると分野が広くなりすぎるので、今回は発癌機構と制御機構に焦点を絞った方が良いという結論に達し、題名および副題も上記のように改めました。座長および演者の依頼、講演順序の決定、予稿集とポスターの作成などに多くの方々の協力を得て開催にこぎつけました。ポスターは原田良信君の力作で、癌は複数の遺伝子の変化によって起こることを図示したものです。

当日は所長の挨拶に始まり、実験的発がん、トランスジェニック動物、ヒトにおける放射線発がん、細胞間相互作用、白血病発症機構と続き、それぞれの分野の第一人者をお招きして講演をして頂き、多くの点で啓発されました。また参加された方々も研究意欲が刺激されたことと思います。特別講演には、最近、大部の英文報告書をまとめられた放射線影響研究所の馬淵疫学部長をお招きして、「原爆被爆者集団におけるガン発生調査」と題してお話し頂きました。困難な疫学研究を鮮やかに解析し、また平易に解説して頂き、感銘を受けました。最終のセッションは「発がん制御」であり、各種のユニークな研究の説得力のある講演があり、癌の制御と予防に関して将来に希望を抱かせるものでした。最後に佐渡科学研究官による総括があり、本シンポジウムが有意義であったことが述べられました。

このシンポジウムの実施ならびに報文集の発行に関しましては、円滑な進行と討論の活性化をして頂いた座長の先生方、最新最先端の研究を発表して下さった演者の方々、実行委員の方々、企画課を始め管理部の方々、受付ならびに会場係をして下さった方々、その他関係の方々に心から感謝いたし、篤く御礼申し上げます。

佐藤 弘毅
荻生 俊昭

第24回放医研シンポジウムプログラム

「放射線発がんとその制御」——機構解明へのアプローチ——

主 催：放射線医学総合研究所

開 催 日：平成3年12月3日(木)・4日(金)

開催場所：放射線医学総合研究所 講堂

時 間	セッション・講演タイトル	演 者	座 長
第1日目	—12月3日(木)—		
9:45~10:00	開会の辞	松平寛通(放医研)	二階堂 修(金沢大)
10:00~10:30	I. 実験的発がん		
10:30~11:00	線量・線量率効果	大津裕司(放医研)	
11:00~11:30	しきい値	大津山 彰(国立がんセ)	
11:30~12:00	年齢依存性	佐々木俊作(放医研)	井川洋二(東京医歯大)
12:00~13:00	遺伝性発がん	野村大成(大阪大)	
	昼食		
	II. トランスジェニック動物		
13:00~13:30	癌遺伝子導入	井上 達(横浜市立大)	秋山實利(放影研)
13:30~14:00	TL遺伝子導入	小幡裕一(愛知がんセ)	
14:00~14:25	III. ヒトにおける放射線発がん		
14:25~14:50	一般的考察	伊藤 敬(放影研)	
14:50~15:15	甲状腺分化過程におけるp53	瀬山敏雄(放影研)	田ノ岡 宏(国立がんセ)
15:15~15:30	実験モデルの設定	京泉誠之(放影研)	
	コーヒーブレイク		
	IV. 細胞間相互作用		
15:30~16:05	肝癌の発生と細胞間相互作用	森 道夫(札幌医科大)	
16:05~16:40	発癌における細胞と間質の相互作用	坂倉照好(理研)	
16:40~17:15	胸腺の微小環境と発癌	広川 勝晃(都立老人研)	
17:30~19:00	懇親会		
第2日目	—12月4日(金)—		
10:00~10:30	V. 白血病発症機構		平井久丸(東京大)
10:30~11:00	胸腺リンパ腫	武藤正弘(放医研)	鎌田七男(広島大)
11:00~11:30	p53	杉本耕一(東京大)	
11:30~12:00	APL	田代 聡(広島大)	
12:00~13:00	bcl-2	瀬戸加大(愛知がんセ)	
13:00~14:00	昼食		佐々木正夫(京都大)
	VI. 固形がん発症機構		
14:00~14:30	VII. 発がん制御		
14:30~15:00	癌抑制遺伝子	和気徳夫(九州大)	
15:00~15:30	アスコルビン酸	田内 広(広島大)	澤田昭三(広島大)
15:30~15:45	レチノイド	橋本祐一(応微研)	
	コーヒーブレイク		
15:45~16:20	カテキン	原 征彦(三井農林研)	
16:20~16:55	アザチロシン	岡田信子(国立がんセ)	菅原 努(体質研)
16:55~17:30	カロリー	吉田和子(放医研)	
17:30~17:45	閉会の辞	佐渡敏彦(放医研)	

第24回放医研シンポジウム実行委員会委員一覧

委員長	佐藤 弘毅 (障害基礎研究部)
副委員長	荻生 俊昭 (生理病理研究部)
委員	石原 弘 (薬理化学研究部)
"	福士 育子 (生物研究部)
"	松田 洋一 (遺伝研究部)
"	早田 勇 (障害基礎研究部)
"	小木曾洋一 (内部被ばく研究部)
"	安藤 興一 (臨床研究部)
"	鈴木 元 (障害臨床研究部)
"	青木 一子 (養成訓練部)
"	西澤かな枝 (総括安全解析研究官付)
"	村上 正一 (管理部企画課)
事務局	管理部企画課

放医研シンポジウムシリーズ No.24

放射線発がんとその制御

——機構解明へのアプローチ

1993年11月15日発行

編 集 佐藤弘毅・荻生俊昭

編集協力 高橋 淳・佐藤博信

放射線医学総合研究所

〒263 千葉市稲毛区穴川4-9-1

電 話 043-251-2111