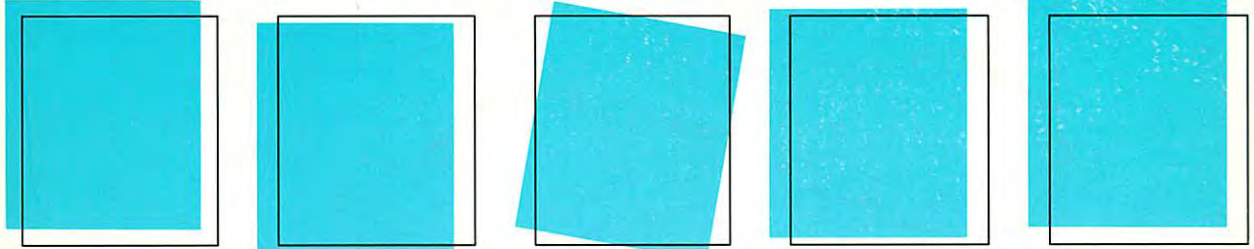


日本基礎老化学会

第18回シンポジウム要旨掲載



20

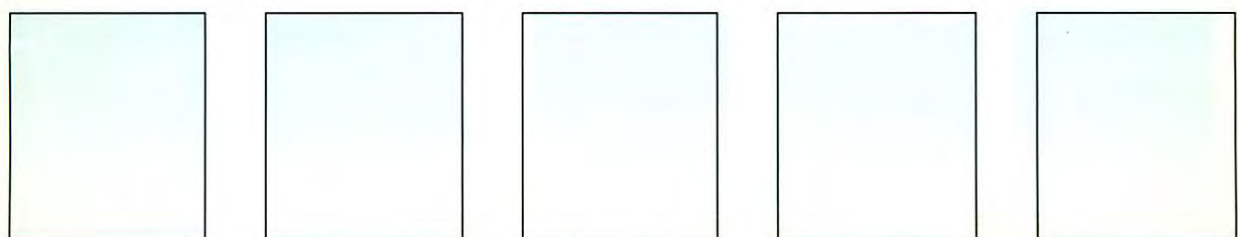
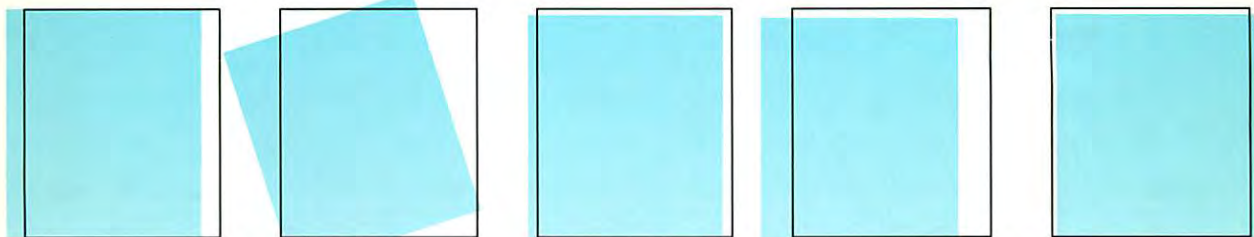
基礎老化研究

NO. 1

BIOMEDICAL

1996

GERONTOLOGY



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology

基礎老化研究第20巻第1号 1996年8月

老化と癌化の接点をDNAの変化から探る
(第18回日本基礎老化学会シンポジウム)

1. 老化とDNA

- 1) 老化と癌化の接点 小野哲也 1
- 2) ヒトにおける突然変異の増加 ~~秋山實利~~ 中村典 4
- 3) 細胞老化と癌化に伴うテロメアの変化 井出利憲 8

2. 癌化とDNA

- 1) 癌化に伴うミスマッチ修復の役割 堀井 明 11
- 2) 癌化とゲノム不安定性 丹羽太貫 13
- 3) 早老症Wernerにおける癌 石川雄一 14

3. 発症年齢とDNA

- トリプレット遺伝病の反復数と発症年齢 山田正夫 16

基礎老化学会サーキュラー補遺 19

基礎老化学会会員名簿 21

老化と癌化の接点

小野 哲也

(東北大・医・放射線基礎医学)

Aging and Cancer

Tetsuya Ono

Department of Radiation Research,
Tohoku University School of Medicine

はじめに

癌を含め成人病と呼ばれるさまざまな疾患は老化した個体に多発し、若い時期にはほとんどみられない(1)。しかもその発生頻度は年齢に伴って加速度的に増加する(図1)。従って成人病発生の重要な原因のひとつとして個体の生理的な老化に伴う何らかの変化があることは間違いない。それでは具体的に老化に伴うどのような変化が成人病発生につながるのか——この疑問を通して老化の原因がさぐれないか。

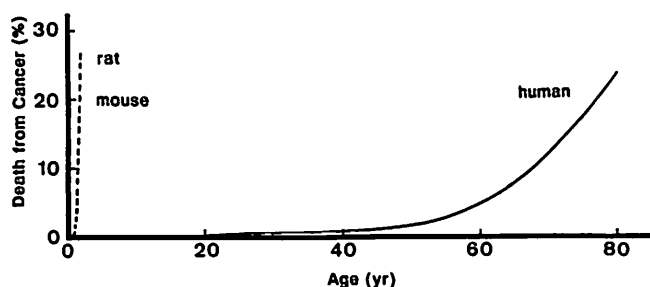


図1. 癌による死亡率の年齢変化。

ヒトでは50才を越えた頃から指数関数的に急速に増加する。他方マウスやラットでは2年令を越えた時に同じような現象が現れる。

老化に伴う変化として古くから知られているものに染色体異常をもった細胞の割合の増加がある。これはDNAに傷を作る放射線が動物の寿命を短縮するという現象と合わせ、遺伝子上の変異の蓄積が老化の原因であるとする体細胞突然変異説の有力な証拠とされている(2,3)。さらに近年の解析からDNAには生理的条件下でも日常的に傷が生じ、生体は修復酵素を用いてそれをたえず治しているという実態が分かっている(図2)。また今年に入り、早期に老人のいくつかの様相を呈する遺伝的早老症として有名なウェルナー症(Werner)の原因遺伝子が、DNA複製かあるいは修復に関与すると考えられているhelicase、Rec Q遺伝子に類似性を示すことが報告され(4)、DNAの

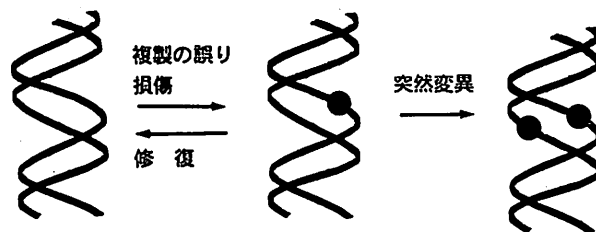


図2. DNAは複製時の誤りや損傷の修復時の誤りにより変異が生じ、その多くは突然変異として固定されると考えられる。

integrity保全のために必要な機構が老化現象にも密接に関係することが示唆されている。

他方、癌化の原因としては1つの正常細胞内の複数の遺伝子上で変異が蓄積することが重要であるとする多段階発癌説が多くの証拠を集めつつある(5)。従って老化に伴うDNA上の変異の蓄積がたまたま1つの細胞でいくつか重なって起こった時に癌細胞が生じるという図式ができる。また最近では癌化の原因としてテロメアの短縮化やDNA複製に伴って生ずるミスマッチの修復機構の異常などによって惹起されるゲノム全体の不安定性がより重要であるとする考えも出されている(6,7)。テロメアの変化は老化過程でもみられている。この考えに従えば老化はゲノム不安定性を誘発することになる(井出利憲氏の項参照)。

このように概説的にみると、DNA上の変異は老化が何故起こるか、さらに老化した個体に何故癌が多発するかをうまく説明できる。しかしその実体がどのようなものかについてはまだよく分かっていないのが現状である。

1. 老化に伴うDNAの変化

具体的に老化に伴って変化することが報じられているDNAの構造には表1のようなものがある(2)。これらについて個体の老化に伴う変化だけでなく、(a)複数の生物種で観察されているか、(b)寿命の短い生物では変化が早く寿命の長い生物では変化が遅くなっているか、(c)延命効果のある食事制限をすると変化が緩やかになるか、(d)寿命を短縮させる放射線照射により変化は加速されるか、(e)寿命の短くなった遺伝的変異体では変化が加速されるかについて、今までに検討された結果も示している(2)。ここからみると活性酸素によって生じるとされる8ヒドロキシグアニン、テロメアの短縮化、染色体異常、突然変異、DNAメチル化の変化などが有力な候補であると推測される。これ等の変化は癌化との関連性も示唆されている。

2. 突然変異は老化に伴って蓄積するか

DNA複製の忠実性(fidelity)がミスマッチ修復などにより非常に高く保たれるにしても、誤りは不可避

細胞機能に影響するか

であろうし、多くの環境要因や細胞内のラジカルがDNAに傷を作り、その一部が突然変異につながることも想像に難くない。従って個体の老化には突然変異の蓄積が必然のように思える。実際ヒトの赤血球やリンパ球では1年当たり1~5%程度の自然突然変異頻度の増加がみられている(秋山實利氏の項参照)。またマウスの脾でも増加がみられ、しかもその増加速度はヒ

トでの値の数10倍になっていて両者の寿命の違いを反映しているように見える(表2)。さらにマウスの肝、脳、皮膚について調べると肝では増加がみられるが脳と皮膚では増加率が低い。これは、突然変異の原因がDNA複製だけではなく、各組織のもつ防護能力にも依存していることを示唆している。

表1 さまざまな基準からみた老化に伴うDNAの変化の比較

基準	DNAの変化	一本鎖切断	異常塩基 (I-化合物)	8-OH グアニン	テロメアの短縮	ミトコンドリア DNAの欠失	染色体異常	突然変異	DNAメチル化の変化
老化に伴う増加		±	+	+	+	+	+	+	+
複数の生物種でみられる			+	±	+	+	+	+	+
種の老化速度に比例			-	±	-	-	±	±	+
放射線による増加		+		+			+	+	±
食事制限による減少			-	+				+	+
遺伝的変異体での変化							+		

+ ; Yes

- ; No

± ; 肯定と否定のデータ有

表2 ヒトとマウスにおける自然突然変異頻度の加齢に伴う1年当たりの増加率

Species	Cell/tissue	Gene	Spontaneous level in young adult	Increase per year (%)	Ref.
Human	T-cell	<i>HPRT</i>	7×10^{-6}	1-5	Cole & Skopek, 1994 (10)
		<i>TCR</i>	1.5×10^{-4}	2.1	Kyoizumi <i>et al.</i> , 1990 (11)
	lymphocyte	<i>HLA-A</i>	1.8×10^{-5}	4	Grist <i>et al.</i> , 1992 (12)
		<i>HLA-A2</i>	1×10^{-4}	4	Kushiro <i>et al.</i> , 1992 (13)
		<i>HLA-A24</i>	6.1×10^{-5}	5	ibid
erythrocyte	<i>GPA</i>	1×10^{-5}	1.7	Akiyama <i>et al.</i> , 1989 (14)	
Mouse	T-cell	<i>HPRT</i>	1×10^{-5}	24	Inamizu <i>et al.</i> , 1986 (15)
	fibroblast	<i>HPRT</i>	3×10^{-5}	0	Horn <i>et al.</i> , 1984 (16)
	intestin	<i>D1b-1</i>	1×10^{-4}	750	Tao <i>et al.</i> , 1993 (17)
		<i>lacI</i>	1×10^{-4}	0	ibid
	spleen	<i>lacI</i>	6.0×10^{-5}	100	Lee <i>et al.</i> , 1994 (18)
		<i>lacZ</i>	5.4×10^{-5}	90	Ono <i>et al.</i> , 1995 (19)
	liver	<i>lacZ</i>	6.1×10^{-5}	68	Ono <i>et al.</i> , unpublished
	brain	<i>lacZ</i>	6.6×10^{-5}	16	Ono <i>et al.</i> , unpublished
skin	<i>lacZ</i>	5.8×10^{-5}	20	Ono <i>et al.</i> , unpublished	

3. 癌年齢がマウスとヒトで大きく異なる理由

図1に示されるようにヒトでは50才から60才を超えてから癌の発生率が急増し、マウスやラットでは1.5年から2年で同じような現象がみられる。多段階発癌説でこれを説明しようとする(a) マウス・ラットでは1年当たりの変異の蓄積がヒトより数10倍高い、(b) マウス・ラットではより少ない数の遺伝子の変異で癌細胞ができ上がる、の2つの考えが成り立つ。しかし突然変異の蓄積速度を含めいくつかの老化に伴うDNAの変化はマウスで速く、ヒトで遅い。従って上記の考えに対しては(a)の方が正しいのではないかと推測される。

4. DNAの変異が老化に伴って蓄積する原因は何か

これについて最もpopularな考えは活性酸素説であろう(8)。細胞の代謝や外的要因によって生じた活性酸素がDNAに働き構造的変異を起こすとする考えであり、多くの状況証拠が見出されている。ただしこれを明確に証明する証拠はまだないのではないか。まして活性酸素だけが老化の原因かとなると誰でも答えに窮するのではないか。例えば抗酸化作用をもつSODとカタラーゼ遺伝子を導入して両者の活性を高めたショウジョウバエは寿命が長くなると報告されているが、その程度はわずかである(9)。まだまだ本質的なところは分かっていないというのが現状だろう。今後の課題として、DNA複製やDNA修復のfidelityの問題、ゲノム全体の安定性を維持するような機構があるのかどうか、DNAの変化が遺伝病の発症年齢を変えるanticipationというのとはどのようなメカニズムで生ずるのか、ウェルナーでみられる癌は早老症の見出される組織で特異的に多発するのか、個体レベルでは変異を持った細胞のeliminationが働くのかどうか、などが考えられる。本シンポジウムを通して何かの手がかりが得られることを期待している。

REFERENCES

1. B.N. Ames, *et al.* In: Molecular Biology of Aging: Gene Stability and Gene Expression, ed. R.S. Sohal *et al.*, Raven Press, New York, pp.137, 1995.
2. 小野哲也、生物の科学、遺伝、別冊 No.7, 135, 1995.
3. C.E. Finch, Longevity, Senescence, and the Genome, ed. C.E. Finch, The University of Chicago Press, Chicago and London, 1990.
4. C-E. Yu, *et al.*, Science, 272: 258, 1996.
5. B. Vogelstein and K.W. Kinzler, Trends Genet., 9: 138, 1993.
6. P. Modrich, Science, 266: 1959, 1994.
7. V.A. Zakian, Science, 270: 1601, 1995.
8. G.M. Martin, *et al.*, Nature Genet., 13: 25, 1996.
9. W.C. Orr and R.S. Sohal, Science, 263: 1128, 1994.
10. J. Cole and T.R. Skopek, Mutat. Res., 304: 33, 1994
11. S. Kyoizumi, *et al.*, J. Exp. Med., 171: 1981, 1990.
12. S.A. Grist, *et al.*, Mutat. Res., 266: 189, 1992.
13. J. Kushiro, *et al.*, RERF TR-3-91: 1, 1992.
14. M. Akiyama, *et al.*, Kankyo Henigen Kenkyu, 11: 47, 1989.
15. T. Inamizu, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 2488, 1986.
16. P.L. Horn, *et al.*, J. Cell. Physiol., 121: 309, 1984.
17. K.S. Tao, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10681, 1993.
18. A.T. Lee, FASEB J., 8: 545, 1994.
19. T. Ono, *et al.*, Mutat. Res., 338: 183, 1995.

原爆 1.5 gray → 年齢15迄の被曝率

ヒト老化における突然変異の増加

秋山實利、京泉誠之*、中村典*

Fred Hutchinson Cancer Research Center
Seattle, Washington, USA

*放射線影響研究所、広島

はじめに

癌は遺伝子の病気であることが近年の癌研究において明らかになってきた(1,2)。そして正常細胞が癌化するためには複数の遺伝子に突然変異が蓄積する必要があることも明らかになってきた(3,4)。従って、癌が加齢に伴う病気である以上、体細胞突然変異頻度も高齢者では上昇していることが予想される。然しながら、ヒトの体細胞遺伝子の生体内で生じた突然変異を効率よく、そして再現性よく定量的に測定する方法はこれまで非常に限られていたが、近年、細胞工学や免疫学の分野での技術進歩に伴い幾つかの遺伝子座に於ける突然変異頻度測定方法の開発がなされ、まれにしか存在しない突然変異細胞を迅速にしかも再現性よく検出することが可能になった。それらは赤血球のグリコフォリン A (GPA-M, N) (5-11)、Tリンパ球の HPRT(12-14)、Tリンパ球抗原受容体 α 、 β 鎖 (TCR α 、 β)(9,11,15-17)、HLA Class I 抗原(18) などの遺伝子について、血液細胞に生じた突然変異頻度を測定するものである。血液細胞は赤血球はいうまでもなくリンパ球あるいは骨髄系の細胞でも、その大半は、常に増殖と消滅を繰り返している。そのため細胞分裂に伴う DNA 複製のエラーが生じやすいと考えられる。実際、培養細胞の突然変異頻度はその分裂回数に比例することがよく知られている。また老化は細胞機能の低下或は細胞分裂の集積の歴史としても捉えることが出来るので、体内においても加齢と共にこれらの血液細胞の自然発生突然変異頻度も上昇すると考えられる。血液細胞は入手が容易で、多くの人々について調査するのに大変便利である。これまで、多くの人々を対象にして上記の遺伝子突然変異細胞頻度の調査を行った結果について報告すると共に、加齢による影響について考察してみたい。ところで、自然発生突然変異は(そう考えているだけかもしれないが)、厳密な意味で誘発突然変異と明確に区別することは困難である。ここでは健常人で明らかな環境変異原被曝の既往の無い人々における突然変異頻度を自然突然変異頻度として取り扱うことにする。

方法と対象

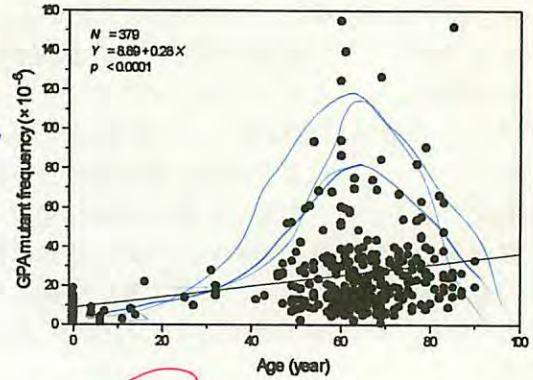
詳しくは文献を参考されたい(5-24)

結果と考察

赤血球 GPA 遺伝子に関する突然変異頻度を MN 式血液型ヘテロの 379 名の健常人(男性 127 名、女

性 202 名、臍帯血 50 名) について測定した。

赤血球 GPA 遺伝子欠失型



ゲノムレベル A

図1 赤血球 GPA 遺伝子欠失型 [(MO+NO)/2] 突然変異頻度と年齢との関係

図1に欠失型の平均突然変異頻度と年齢との関係を示した。対象者の年齢は0歳から90歳である。変異細胞と年齢との間に有意な相関が認められた。年齢10歳の増加で 2.8×10^{-6} の変異細胞の増加率である。しかし臍帯血の突然変異頻度は低く、また臍帯血から約40歳までは対象者間の変動も大変少ないようである。他方、40歳以上では変異細胞頻度も高くなるが、それ以上に個人間の値の変動が大変大きいことが認められる。更に注目すべきことは超高年齢者群では変異細胞はかえって低値を示すヒトが多く認められることである。突然変異頻度の男女別の解析では、回帰直線の傾きには有意な男女差はなかったが、全例の変異頻度の平均値は男性の方が女性より有意に高かった(25)。

リンパ球 HPRT 遺伝子の突然変異細胞頻度を21歳から85歳までの約130名の成人健常人(男性51名、女性80名)について調べた。その結果と年齢との関係を図2に示した。

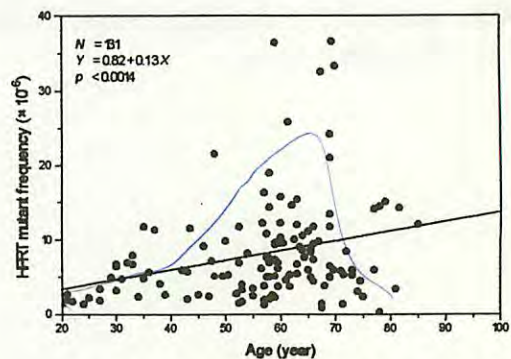


図2 T-リンパ球 hprt 遺伝子突然変異頻度と年齢との関係

この場合も赤血球 GPA 突然変異頻度と同様に、加齢により突然変異頻度は有意に増加した。年齢10歳の増加で 1.3×10^{-6} 個の変異細胞の増加率であった。若年群では変異細胞頻度が低く、中高年群で頻度が高くなるように思われた。また、中高年群で個人間の変異細胞頻度の変動が大きくなる点も GPA 突然

各 gene の mutation rate の相関?

高年齢者蓄積度が低い人は, induced damage

変異頻度とよく似ている。

リンパ球 TCR 遺伝子突然変異細胞頻度を男女あわせて約 360 名の健常者(男性 150 名、女性 187 名、臍帯血 21 名)について調査した結果と年齢との関係を図 3 に示した。年齢 10 歳の増加で 2×10^{-5} の変異細胞の増加の割合であった。この場合も、赤血球 GPA 突然変異頻度と同様に臍帯血から約 40 歳までは TCR 突然変異頻度に大きな変動は認められないが、40 歳以降変異細胞頻度の高い人(例えば 4×10^{-4} 以上)が多数認められるようになる。

HLA Class I 抗原の遺伝子自然突然変異頻度も上述遺伝子の場合と同様であり、いずれに於いても加齢に伴って有意に上昇することが明らかになった(19)。

この様な加齢に伴う突然変異頻度の変化の特徴は 40 歳以下の対象者と比較して 40 歳を過ぎた対象者では(40 歳を過ぎたあたりから)個人差が大変大きくなっていることと、高齢者の人々の中には 20 歳

丁細胞蓄積

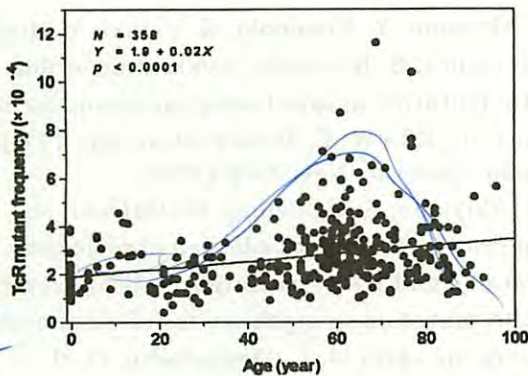


図 3 T-リンパ球抗原受容体遺伝子突然変異と年齢との関係

能の加齢による低下との関係である。今後明らかにされるべき問題であろう。

自然発生突然変異の発生メカニズムを考える場合、突然変異を誘発させる生体内に於ける生理的な状態の変化を考えなければならない。多くは不明であるが、例えば生体内で生じる酸素ラジカルによる DNA の障害が考えられる。個々人の消費する酸素量が加齢により増加するとは考えられないので、恐らく呼吸に伴って生じる酸素ラジカルの消去の効率が加齢に伴い低下するのではなかろうか。スーパーオキシドラジカルは、SOD 酵素で過酸化水素 (H_2O_2) に変換され、更にカタラーゼにより無害な H_2O と O_2 に分解される。従って、SOD とカタラーゼ又は両者の活性が年齢と共に不十分になる可能性について検討する必要がある。ショウジョウバエでは SOD とカタラーゼをトランスジェニックに過剰発現させると寿命が長くなるとされている(28)。我々も低カタラーゼマウスにおける TCR 突然変異細胞頻度が正常マウスに比べて有意に高いことを経験している。

80 歳以上の高齢者では変異体頻度は少し低いようであった。高齢者はあまり活動的でなく酸素消費量が低下していると考えられる。そして酸素ラジカルによる障害量が減少しているのかもしれない。体内の酸素ラジカルの量と酸素消費量との関係が明らかになれば、例えば、過激な運動をして酸素消費量の極めて多いスポーツ選手に於ける DNA 中の Oh^8Gua の定量などを行なうことにより突然変異頻度との関係が判れば、自然突然変異発生の機構の一端が明らかにされるかもしれない。

その他、医療用放射線被曝や医薬品の影響を考える必要がある。疾病率は加齢に伴い高くなる。縦断的な調査が必要であろう。

GPA や TCR 遺伝子突然変異では、この自然突然変異頻度は女性よりも男性の方が有意に高く、寿命の男女差を考えると興味ある性差である(25)。また喫煙者の方が非喫煙者の頻度よりも高いことが判った。一方、data は示さないが、慢性肝傷害を認める人々や悪性固形腫瘍の既往のある人々の中には高い突然変異頻度を示す人が多かった。このような所見は、人々の突然変異頻度と個体の寿命や健康状態との間に何らかの密接な関係があることを示唆しているのかもしれない。

ところで突然変異頻度のレベルであるが、TCR 遺伝子突然変異は、その頻度が 10^{-4} のオーダーであり、リンパ球 HPRT や赤血球 GPA 遺伝子突然変異頻度よりも約 10 倍高い。この理由としては、TCR 分子は、 α 鎖と β 鎖よりなっており、各々別々の遺伝子によりコードされているので、2 つの遺伝子のどちらに異常が起こっても突然変異になること、また体細胞組換えにより、不活性な TCR- α 或は β 遺伝子が homozygote になっても突然変異になる。これまでの結果によると、CD3 欠損変異体の半数以上

代の頻度と同じくらい低いレベルの突然変異頻度を示す人がかなりの数で認められことである(平均頻度も低下しているようである)。

加齢に伴い突然変異頻度が上昇するメカニズムとしては幾つかの事が考えられる。多くの変異細胞には半減期がある。変異体頻度が年齢と共に上昇しつづけるには、年毎に新しい変異細胞出現率が高くなるか、逆に変異細胞の排除速度が遅くなるか、又はその両方が考えられる。出現率と排除率が年齢によらず一定であれば、変異細胞頻度は一定の年齢(20 歳?) 以降はほぼプラトーになるはずである。しかし、間違いなく、原因は色々あるのが加齢に伴い変異細胞の出現率(単位時間当たり)は高くなっていると思われる。また変異細胞の排除の速度が低下する可能性も考えられる。例えば、免疫機能は高齢者で低下していることが良く知られており(26-27)、血液細胞の平均分裂回数が加齢に伴い減少すると考えられ、単位時間当たりの変異細胞出現率は同じでも、結果的には少しずつ変異リンパ球が蓄積していくように見えるのかもしれない。

もう一つ加齢に伴う変異細胞の上昇機序として検討する価値のあることは、細胞の DNA 障害の修復

は TCR- β 鎖の発現の無いものであり、TCR- α 鎖の発現の無いものは β 鎖異常の約 1/4 であった(15)。

β 遺伝子は第 7 染色体の末端部(7q35)に位置するが、 α 遺伝子は第 14 染色体の長腕中央よりも動原体よりである(14q13)従って、TCR- β 遺伝子の方が動原体からの距離が長いので体細胞組み換えによる不活性化を受ける可能性は高い。しかも最近、末梢血リンパ球の約 1/3 では α 遺伝子に allelic exclusion が正常に起こっていないことが報告されている(homo で存在)(29)。これも α 遺伝子の突然変異頻度が低かった原因の 1 つかもしれない。

リンパ球 HLA 遺伝子の突然変異頻度も 10^{-4} のオーダーである(18)。この理由は不明だが、TCR も HLA 遺伝子も免疫応答に関連した免疫グロブリン遺伝子ファミリーの遺伝子群に属するので、進化的に変異を生じやすい構造が内在するのかもしれない。

観察する遺伝子によって、頻度に約 10 倍の差がある。変異生成の機構に質的な違いがあるのかもしれない。自然突然変異が単純に DNA 複製時のポリメラーゼの間違いによるのであれば、遺伝子エクソンの大きさが 10 倍違う必要がある。実際はそのような違いはない。HPRT:650bp(coding sequence)、GPA:393bp、HLA-A:約 1Kbp、TCR- α :1.7Kbp、 $-\beta$:1.3Kbp である。将来、変異細胞の塩基レベルでの解析が行われれば、加齢にともない増加する突然変異には遺伝子によって各々固有の変化があるのか、その変化は同じでも遺伝子によって誤りの頻度が異なるのかが明らかにされるかもしれない。

おわりに

幾つかの代表的な遺伝子について体細胞突然変異頻度と加齢との関係を報告すると共に、突然変異誘発機序並びに突然変異体の体内蓄積機序について今後の課題を含めて考察した。

文献

- 1) J. M. Bishop, V. Varmus Function and origins of retroviral transforming genes, in: RNA Tumor Viruses, (Ed) R. Weise et al., 2nd ed. Suppl. pp. 249-356, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1985)
- 2) M. Barbacid Ras genes, Annu. Rev. Biochem., 56: 779-827 (1987)
- 3) H. C. Piot, T. Goldsworthy, S. Moran The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer, J. Supramol. Struct. Cell Biochem., 17: 133-146 (1981)
- 4) R. R. Fearon, B. Vogelstein A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 62: 759-767 (1990)
- 5) R. G. Langlois, W. L. Bigbee, R. H. Jensen Measurement of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes

at the glycophorine A locus, Hum. Gent. 74: 353-386 (1986)

6) R. G. Langlois, S. Kyoizumi, W. L. Bigbee, N. Nakamura, M. Bean, M. Akiyama, R. H. Jensen Evidence for increased somatic cell mutation at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors, Science, 236: 445-448 (1987)

7) S. Kyoizumi, N. Nakamura, M. Hakoda, A. A. Awa, M. A. Bean, R. H. Jensen, M. Akiyama, Detection of somatic mutation at the Glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow soter, Cancer Res., 49: 581-588 (1989)

8) S. Kyoizumi, N. Nakamura, H. Takebe, K. Tatsumi, J. German, M. Akiyama, Frequency of variant erythrocytes at the Glycophorin-A locus in two Bloom's syndrom patients, Mutat. Res., 214: 215-222 (1989)

9) M. Akiyama, Y. Kusunoki, S. Umeki, Y. Hirai, N. Nakamura, S. Kyoizumi, Evaluation of four somatic mutation assays biological dosimeter in humans. in:(Ed.) W. C. Dewev. et al. pp: 177-182. Academic Pres Inc. New York (1992)

10) M. Akiyama, S. Kyoizumi, M. Hakoda, N. Nakamura, A. A. Awa, Studies on chromosome abberations and HPRT mutation in lymphocytes and GPA mutation in erythrocytes of atomic bomb survivors, in: (Ed.) M. L. Mendelsohn, et al., Mutaion and Environment, pp: 69-80(1990)

11) M. Akiyama, S. Umeki, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, N. Nakamura, T. Mori, Y. Ishikawa, M. Yamada, K. Ohama, T.Kodama, K.Endo, J. B. Cologne, Somatic-cell mutations as a possible predictor of cancer risk, Health Phys. 68: 643-649 (1995)

12) M. Hakoda, M. Akiyama, S. Kyoizumi, K. Kobuke, A. A. Awa, M. Yamakido, Measurement of in vitro HGPRT-deficient cell frequency using a modified method for cloning human blood T-lymphocytes, Mutat. Res., 197:161-169 (1988)

13) M. Hakoda, M. Akiyama, S. Kyoizumi, A. A. Awa, M. Yamakido, M. Otake, Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors, Mutat. Res., 201: 39-48 (1988)

14) Y. Hirai, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, A. A. Awa, D. J. Pawel, N. Nakamura, M. Akiyama, Mutant frequency at HPRT locus in peripheral-blood T lymphocytes of atomic bomb survivors, Mutat. Res., 329: 183-196 (1995)

15) S. Kyoizumi, M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, K. Tanabe, S. Umeki, Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4+ Tcells, J. Exp. Med., 171: 1981-

1999 (1990)

16) S. Umeki, S. Kyoizumi, Y. Kusunoki, N. Nakamura, M. Sasaki, T. Mori, Y. Ishikawa, J. B. Cologne, M. Akiyama, Flow cytometric measurements of somatic mutations in Thorotrast Patients, Jpn. J. Cancer Res., 82: 1349-1353 (1991)

17) S. Kyoizumi, S. Umeki, M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, M. Sasaki, T. Mori, S. Fujita, J. B. Cologne. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people, Mutat. Res., 265: 173-180 (1992)

18) J. Kushiro, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, Y. Kodama, A. Wakisaka, A. Jeffreys, J. B. Cologne, N. Nakamura, M. Akiyama, Development of a flow-cytometric HLA-A locus mutation assay for human peripheral blood lymphocytes, Mutat. Res., 272: 17-29 (1992)

19) M. Akiyama, S. Kyoizumi, Y. Hirai, Y. Kusunoki, K. S. Iwamoto, N. Nakamura, Mutation frequency in human blood cells increases with age, Mutat. Res., 338: 141-149 (1995)

20) L. Henderson, H. Cole, J. Cole, S. E. James, M. H. L. Green, Detection of somatic mutation in man, evaluation of the microtiter cloning assay for T-lymphocytes, Mutagenesis, 1: 195-200 (1986)

21) J. Cole, C/ F. Arlett, M. H. L. Green, S. E. James, L. Henderson, H. Cole, M. Sala-Trepat, R. Benzi, M. L. Price, B. A. Briges, Measurement of mutant frequency to 6-thioguanine resistance in circulating T-lymphocytes for human population monitoring, in: (Ed.) G. Jolles, New Trends in Genetic Risk Assessment, Academic Press, New York, pp: 175-203 (1989)

22) A. A. Morley, K. J. Trainer, R. Seshadri, R. G. Ryall, Measurement of in vivo mutation in human lymphocytes, Nature (London) 302: 155-156 (1983)

23) R. J. Albertini, L. M. Sullivan, J. K. Berman, C. J. Green, J. A. Stewart, J. M. Silveria, J. P. O'Neill, Mutagenicity monitoring in humans by autoradiographic assay for mutant T-lymphocytes, Mutat. Res., 204: 481-492 (1988)

24) B.A. Finette, L. M. Sullivan, J. P. O'Neill, J. A. Nicklas, P. M. Vacek, R. J. Albertini, Determination of hprt mutant frequencies in T-Lymphocytes from a healthy pediatric population: statistical comparison between newborn, children and adult mutant frequencies. cloning efficiency

and age, Mutat. Res., 308: 223-231 (1994)

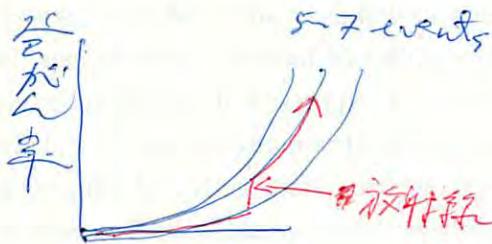
25) M. Akiyama, S. Kyoizumi, Y. Kusunoki, Y. Hirai, K. Tanabe, J. B. Cologne, Monitoring exposure to Atomic bomb radiation by somatic mutation, Environ. Health Perspectives, 104(suppl.): 493-496, 1996

26) M. Akiyama, O. L. Zhou, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, N. Kohno, S. Akiba, R. R. Delongchamp, Age and dose related alteration of in vitro mixed lymphocyte culture response of blood lymphocytes from A-bomb survivors, Radiat. Res., 117: 26-34 (1989)

27) K. Hirokawa, K. M. Utsuyama, M. Kasai, C. Kurashima, Aging and immunity, Acta Pathol. Jpn., 42: 537-548 (1992)

28) W. C. Orr, R. S. Sohal, Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster, Science, 263: 1128-1130 (1994)

29) P. Elisabetta, G. Casorati, P. dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, A. Lanzavecchia, Expression of two T cell receptor α chains: Dual Receptor T Cells, Science, 262: 422-424 (1993)



chromosome instability

染色体異常

proliferative cell division

細胞 turnover rate

420 年

5年 1 週向

1年 1 年向

細胞老化と 癌化に伴うテロメアの変化

井出 利憲
(広島大学医学部)

The telomeres of chromosome ends in human normal somatic cells shorten by about 50-100 nucleotides with each cell division. Telomere DNA shortening can be the counting mechanism responsible for signaling that senescence of normal somatic cells should occur after a finite number of cell division. Telomerase is an enzyme which elongates telomere DNA and prevents telomere shortening. In cultured cells, telomerase activity was absent in primary culture and in normal cell strains of mortal phenotype. It was present in most of *in vitro* established immortal cell lines and in all tumor-derived immortal cell lines. In human tissue, telomerase activity has been detected in germinal tissues such as ovaries and testis as well as in a large number of human cancer tissues. In contrast, it was not expressed at detectable levels in a variety of normal somatic tissues except for weak activity in blood stem cells and peripheral leukocytes and in epithelial stem cells. Telomerase expression is likely to be an essential event, though not sufficient by itself, for cell immortalization.

1960年代初頭、培養ヒト体細胞は分裂可能回数に限界があり、無限には増殖できないことが示された。胎児由来の正常線維芽細胞は50～60回分裂できるが、高齢者由来の細胞では分裂可能回数が減少している。このような現象は他の種類の体細胞でも見られた。由来臓器によって細胞が培養下で示す分裂可能回数が異なること、細胞供与者の年齢と、採取した細胞の分裂可能回数のあいだには逆相関関係があること、ある種の遺伝的早老症患者の細胞は、同年齢の健常者の細胞にくらべて分裂可能回数が少ないこと、各種哺乳類の個体の最大寿命と、細胞の分裂可能回数のあいだに相関関係があるこ

となど、多くの再現性あるデータから、体細胞の分裂回数は予め（おそらく発生過程のある時点で）プログラムされていること、体細胞に分裂寿命があることが個体の老化あるいは寿命と深い関係があることが提唱された。しかし、種々のヒト細胞に関して培養条件が最適であることが証明できない以上、分裂可能回数の限界は培養下のアーティファクトであるとの疑いを消すことは、長い間できなかった。

また、SV40のT抗原などによってトランスフォームした細胞が、正常細胞の分裂寿命の限界をこえて増殖を続ける（延命）こともよく知られていた。しかし、これらのトランスフォーム細胞もやがて増殖の限界に達し、死滅する。無限増殖可能な細胞になること（不死化あるいは株化という）はヒト細胞では極めてまれである。正常細胞の増殖限界（老化）をM1期（mortality 1 stage）、トランスフォーム細胞の増殖限界をM2期（mortality 2 stage）と呼ぶことが多い。

最近になってこれらの現象が分子レベルで理解できるようになった。DNA複製機構の持つ基本的な性質のために、直鎖状DNAの複製の度に、娘鎖の5'末端が短縮することは避けられない（末端複製問題）。実際、正常細胞を培養すると、継代とともに染色体末端にあるテロメアDNAが短縮することがわかった。体内の体細胞でも、テロメアDNAは胎児期の細胞で最も長く、誕生後には年齢と共に短縮する。遺伝的早老症(Progeria)患者の細胞は、正常の同年令者に比べてテロメアDNAが短く、分裂可能回数が少ないという。分裂を続ける結果、細胞機能を維持できなくなる限界までテロメアDNAが短縮すれば、細胞は死滅する。このことは、体細胞に分裂可能回数の絶対的な限界があることは、アーティファクトではないことを示している。テロメアDNA長の短縮は、細胞自身が今まで何回分裂したか、これから何回分裂できるかを計測する、時計機能をもっているものと考えられる。

テロメア 10 → 6 kb
若 老

しかし実は、テロメアDNA短縮の限界まで増殖を継続できるのはトランスフォーム細胞だけであり、正常体細胞はテロメアDNAが限界まで短縮する以前の段階で増殖できなくなる。いわゆる老化細胞（M1期）になったところでは、テロメアDNAはまだかなりの長さを持っている。正常細胞がM1期で増殖を停止する直接の原因は、増殖抑制遺伝子が構成的に働くためであることが解った。すなわち、M1期へ向かって増殖を続けると、次第にp21などの遺伝子の発現が昂進し、このためにサイクリン・CDKが活性化されず、Rbがリン酸化されず、DNA合成を開始できなくなると考えられる。ここで解決されていない問題は、分裂回数の増加に伴うp21などの発現昂進がどのような機構で起きているか、である。

SV40トランスフォーム細胞では、T抗原がRbやp53などの増殖抑制タンパク質（癌抑制遺伝子産物）と直接に結合して失活させるため、M1期を越えて増殖を継続できるものと考えられる。SV40トランスフォーム細胞のp21発現量は、T抗原によってp53が失活しているために絶対量としては低いが、分裂回数の増加とともに発現が昂進することは正常細胞と同様である。延命期のトランスフォーム細胞のT抗原を失活させると、p53の活性が復活し、p21の発現は老化期の正常細胞を上回るようになる。p21の発現昂進は、正常細胞でもトランスフォーム細胞でも分裂回数の増加とともにおきることなのである。そこには分裂回数の増加を数える機構があると思われ、現在テロメアDNAの長さがその時計（分裂時計）の役割を果たしているどうか重要な焦点になっている。

ところで、正常体細胞のM1期（細胞老化）は、ヒト個体の老化あるいは寿命に本当に関係があるのだろうか。ヒト個体が老化し寿命がきたとき、体細胞のテロメアDNAがM1期の限界まで短縮しているかどうかについては確認がない。線維芽細胞では100歳のヒトでもま

だ20回くらいの分裂可能回数を残している。体内細胞の全てについて調べられたわけではないが、広範囲にわたって組織細胞全体がM1期になるようなことはないのかも知れない。可能性があるとするれば、組織全体としてはM1期まで達していないとしても、局所的にはM1期に近づく細胞群があるかも知れないことである。体内の組織が小規模に傷害され、修復されることは日常的に起きることであろう。ある部分での傷害・再生が長い間に頻繁に起きれば、その部分の細胞はM1期に近づくことになる。その結果、局所的に組織の再生能力が低下し、機能維持ができなくなるかも知れない。例えば、損傷された血管内皮細胞が修復・再生を繰り返すことで、やがて局所的に修復が難しくなり、血管の老化につながるようなことはあってもおかしくない。

機能の変化としては、よいか

もう一つの可能性は、体細胞が分裂回数にしたがって機能遺伝子の発現を変化させることが、個体老化の進行に関わるかも知れないことである。血管内皮細胞の産生する昇圧物質のひとつであるエンドセリンは、高年齢のヒトほど産生量が高い。胎児由来の内皮細胞を培養したときにも、分裂回数が多くなると産生量が増加する。これは、エンドセリン産生をつかさどる機構のひとつが分裂時計に支配されていることを示唆する。線維芽細胞ではインターロイキン6の産生が分裂回数とともに大きく上昇する。生理活性物質の産生が細胞自身の分裂時計によって支配されているとすれば、当該臓器のみならず全身の機能に影響を与え、それが結果として加齢変化として現れる可能性がある。このような観点からの研究は始まったばかりで、断片的な知見でしかなく、総合的な知見は今後の研究を待たねばならない。

ところで、生殖巣では、テロメアDNAを延長するテロメラーゼという酵素が発現していて、分裂を繰り返しても生殖細胞のテロメアDNAが短縮しないことがわかった。生殖細胞は基本的に無限分裂寿命を有するものと考えられる。

トランスジメンション活性が低い (日本生化学会 1996.8.29)

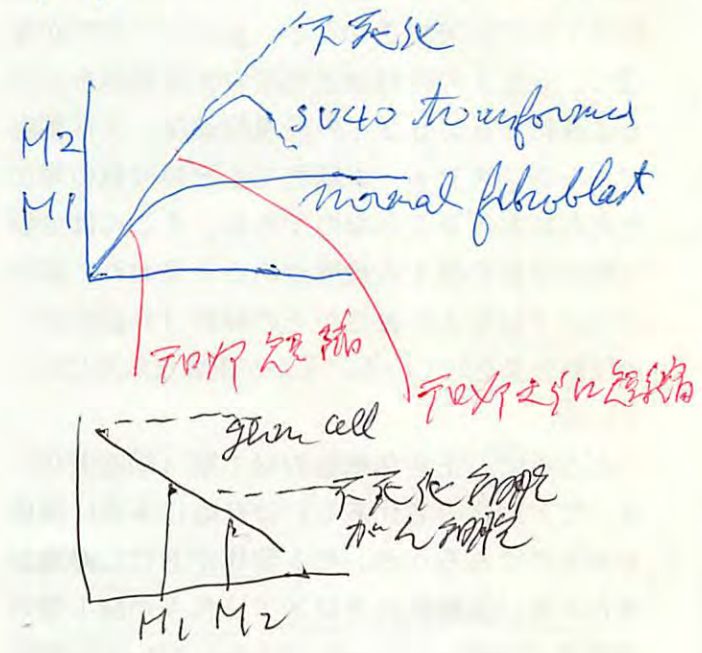
これは、子孫に至るまでテロメアDNAを一定に保つために必要なことである。また、生涯を通じて膨大な数の細胞を供給し続けると考えられる生理的再生系組織の幹細胞は、不死化細胞であるか、そうでなくても長い分裂寿命を持つことが期待されていた。実際、血球や上皮系組織の幹細胞には弱いながらテロメラーゼ活性があることがわかってきた。血球系細胞では、骨髄細胞だけでなく、末梢血の白血球にも弱い活性がある。しかしながら、血球のテロメラーゼ活性は年齢と共に低下することや、末梢血白血球のテロメアDNAは年齢と共に短縮することも報告されており、年齢の異なるヒト精子のテロメアDNAが一定の長さを保つこととは異なっている。

正常細胞が癌化する場合には、癌細胞らしい表現型を獲得することと、無限増殖能（不死化）を獲得することが必要であると考えられていた。しかし、臨床的な癌細胞が不死化しているかどうかについては明らかでなかった。培養正常細胞と正常体細胞組織の大部分にはテロメラーゼ活性がなく、培養不死化細胞の大部分にはテロメラーゼ活性があることがわかった。トランスフォーム細胞でも不死化していないものはテロメラーゼ活性がない。これらは細胞の不死化にとってテロメラーゼの発現は必須であるとの考えと矛盾しない。癌組織については、臨床的にはきわめて初期の癌を含めて、調べられた全癌組織の85%以上でテロメラーゼ活性陽性であった。他の癌マーカーの頻度が低いような初期癌でもテロメラーゼ活性は高頻度に検出された。すなわち、テロメラーゼ活性陽性になり、無限分裂寿命細胞（不死化細胞）になったものだけが臨床的な癌にまでなることができるのではないかと考えられる。さらに、一部の組織では、前癌病変部位でもテロメラーゼ活性陽性例がかなり見られる場合があり、癌の早期診断あるいは危険予測の新しいターゲットになりうる。癌組織のテロメアDNAは一般的に周辺の正常組織にくらべて短いことが多い。増殖調節機能が

変異した細胞がまず出現し、周囲の正常細胞より多くの分裂を繰り返す結果、テロメアDNAは正常組織にくらべて短縮し、そのなかからテロメラーゼが発現した細胞（不死化した癌細胞）があらわれ、やがて臨床的に検出できる癌組織を形成するのであろう。

正常細胞と癌細胞との融合細胞は、必ず有限分裂寿命になることは古くから知られていた。さらに、正常細胞由来の染色体をある種の不死化癌細胞に導入すると、テロメラーゼの発現が消失し、テロメアDNAが短縮し、癌細胞はやがて死に至ることが解った。正常体細胞にはテロメラーゼ活性を直接阻害する因子はなく、テロメラーゼの発現をおさえるレプレッサーを発現している可能性が考えられる。もし、テロメラーゼの働きを阻害する薬剤があれば、テロメラーゼを持たない正常体細胞には影響を与えることなく、癌細胞（と生殖細胞）のみを死滅させる画期的な制癌剤となる可能性があるため、注目を集めている。

がん化過程でのテロメラーゼ活性と球、エピゲネティックな変化? progressionの段階におけるのか?



DNA ミスマッチ修復異常と発癌

堀井 明

東北大学医学部病理学第一講座

DNA Mismatch Repair Error and Human Cancer

A. Horii

Department of Molecular Pathology
Tohoku University School of Medicine

癌が日本人の死亡原因の第一位になってから久しい。その間、多くの研究がなされているが、残念ながら現時点では、癌患者を救うには早期発見、早期治療にまさるものはない。早期発見するためには、癌化の根本的な異常の検出が必要である。現在、癌は遺伝子の病気である事が明らかとなっており、発癌は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が複数個蓄積することにより正常組織から前癌病変を経て多段階的に起こっている。従って、発癌に関与する遺伝子異常が発癌過程における最も根本的な異常である。遺伝子変異は日常的に起こっており、自然発生する遺伝子変異の頻度についてはいくつかの報告がある。Loeb が *hprt* 遺伝子を用いて算出したデータをもとにして計算すると、一回の細胞分裂の間にハプロイドゲノム当たり一塩基弱の遺伝子変異が起き、また、ヒトの一生のあいだには、 10^{15} の異常が生じることになる。高齢化社会を迎え、今後ますます癌患者は増えて行くものと思われる。

遺伝子異常には、点変異や、数塩基程度までの欠失や挿入などのような小さな変異から、染色体レベルでの大きな変化までさまざまなものがあるが、最近、遺伝子変異の頻度を高めるような遺伝子異常が存在することも明らかとなってきた。これは、DNA ミスマッチ修復 (MMR) 異常と呼ばれ、DNA 複製の際に生じた小さな変異 (点変異や、数塩基程度までの欠失や挿入など) を修復することができないものである。MMR の異常の有無は、マイクロサテライトマーカーを用いた PCR 法により癌組織においてのみ正常組織では見られない異常バンドが検出されることにより簡便に知ることができる (図 1 参照)。これは、図 2 に示すようなメカニズムにより、DNA 複製時のエラー (レプリケーションエラー) を修復できないために生じたものと考えられている。従って、仮に程度の差はあったとしても、どんな遺伝子でも変異の頻度が上昇する事が予想される。癌は遺伝子異常の蓄積によ

り発生するので、MMR の異常は図 3 で示すように発癌のリスクを高めることになる。DNA ミスマッチ修復は、図 4 で示したように複数の遺伝子産物 (ヒトでは hMSH2、hMLH1、PMS ファミリー、GTBP など) により構成された蛋白群により行なわれることが判明しており、この構成蛋白のいずれに異常があっても、(従って、それらをコードするどの遺伝子に異常があっても) マイクロサテライトマーカーを用いてレプリケーションエラー (RER) を調べることにより MMR に関与する遺伝子の異常の有無を知ることができる。この異常が先天的にある場合、遺伝性大腸癌の一つである HNPCC (遺伝性非腺腫症性大腸癌) の原因となる事が判明している。また、先天性の異常以外でも、後天性にも異常がおきることがあり、消化器癌を中心に大腸癌はじめ胃癌、膵癌、子宮体癌など種々の癌の発癌過程において重要な役割をはたしていることも明らかとなってきた。

MMR の異常がある場合、その下流の異常、すなわち発癌に関与する遺伝子異常のうち MMR の異常により生じやすいものが問題となる。この点については、RER(+)の大腸癌において TGF β レセプター II 型 (RII) 異常が高頻度に検出されたことが示唆的である。検出された異常はすべて RII の蛋白コード領域にある A の 10 回の繰り返しと GT の 3 回の繰り返しの部位に生じており、これらの繰り返し配列が遺伝子異常のターゲットとなり発癌に結び付いたものと考えられた。しかし、RII の異常は RER(+)の腫瘍のうち大腸癌や胃癌では高頻度に検出されたが、膵癌、子宮体癌、肺癌などでは検出されず、これらの臓器における RER(+)の腫瘍においては RII 以外の遺伝子が異常のターゲットとなっているものと考えられた。また、臓器により RER(+)の腫瘍の頻度に違いがあることも、RER(+)の下流に位置する遺伝子異常の違いにより説明されうるものと考えられる。

現在、癌の診断、治療の技術の向上により、全癌患者の 40% は 5 年生存するようになった。しかし、これらの癌患者をフォローアップすると、10% の癌患者は 10 年以内に第二癌に罹患することも判明した。従って、これからの癌患者の診療には第二癌に罹患しても早期に発見して、第二癌からも救うということが重要になってきている。RER の検討の結果、多くの多重癌患者の癌組織において RER(+)であることが判明し、DNA ミスマッチ修復異常は多重癌発症にも深く関与していることが明らかとなった。従って、RER を調べることにより多重癌発症のハイリスクグループを簡便に発見することができる可能性がある。ハイリスクと診断された場合、注意深く経過観察することにより、第二癌の早期発見も可能となり患者を救うことができる。しかし、すべての多重癌患者において高

頻度に RER(+)であるとは限らず、たとえば、食道癌と他の癌を合併した癌患者では RER(+)の頻度は低く、今後、どのような癌の組み合わせにおいて RER(+)の頻度が高いのかなど、まだ明らかにすべきことは多い。

71 80 78 32 22 28 26 11 10 70 3
T N T N T N T N T N T N T N T N T N



図1

一般大腸癌患者において検出された RER の例。患者 10, 11, 26, 22, 78, 80 においては腫瘍(T)で正常(N)ではみられない異常バンドが確認された。用いたマイクロサテライトマーカーは D2S123。

図2

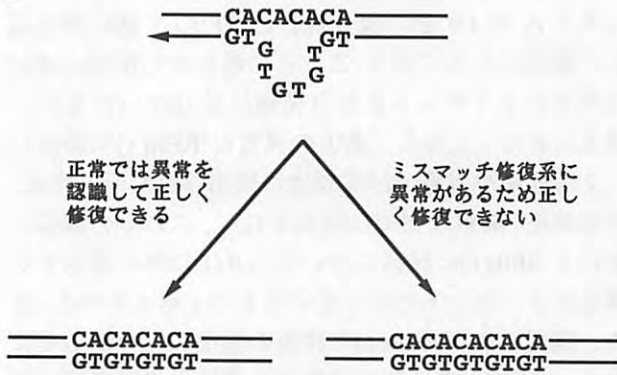


図3

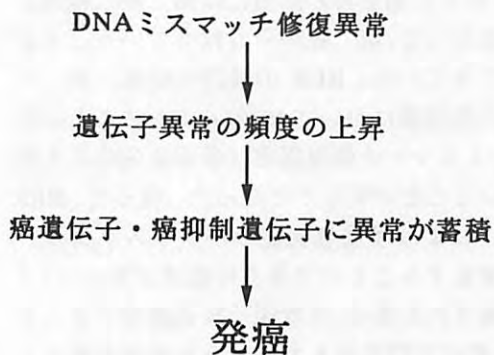
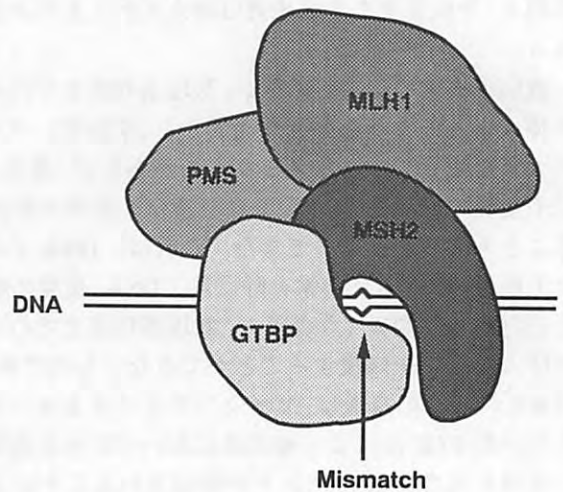


図4 Mismatch Repair Genes

Bacteria	Yeast	Human
Mut S	Msh2	MSH2 (Chromosome 2) GTBP (Chromosome 2)
Mut L	Mlh1 Pms1	MLH1 (Chromosome 3) PMS (Multiple genes)
Mut H		



1 Gy 200 / 3000 kb strand break

癌化と遺伝的不安定性

父親の analysis

広島大学原爆放射能医学研究所
丹羽太貫

子 200 10⁷ 位の
歩 200 10⁷ 位の
mutate

8kb のバンドとして検出できる。

C3H 雄マウスにγ線を照射して、正常 C57BL 雌マウスと交配した。交配は、照射の精子期、精細胞期、精原細胞期に対する影響をみるため、照射直後、照射 2~3 週後、照射 10~11 週後に行った。生まれた F1 マウスの DNA について、Pc-1 配列を用いた Southern 解析を行い、両親との比較により突然変異体を検出した。

非照射群における Pc-1 遺伝子座の自然突然変異頻度は大変高く 10% にも及ぶ。放射線照射群では、精細胞期が最も感受性が高く、精子期と精原細胞期は感受性が低い。精細胞期については、照射を受けた雄アレルの突然変異率に明らかな線量効果関係が見られ、1 Gy で 22%、2 Gy で 28%、さらに 3Gy で 28% であった。精子期と精原細胞期では、3 Gy の照射で突然変異頻度の上昇は、それぞれ 14% と 16% であった。興味深いことに、精子期における照射では照射を受けていない雌側のアレルの突然変異頻度も、雄側と同じレベルに上昇している。

Pc-1 遺伝子座の突然変異頻度の上昇は、1 Gy の線量で 10% にも及ぶ。この線量で期待し得る DNA 損傷の数では、この高い突然変異頻度を説明し得ない。さらに、雄の精子期の照射により、雌側アレルの突然変異頻度が上昇することは、Pc-1 遺伝子座の突然変異が遺伝的不安定性の誘導の結果間接的に生じたものであることを示している。

3. まとめ

従来突然変異の誘発は、DNA 損傷が直接これに関与すると考えられてきた。しかしながら、DNA 損傷が epigenetic な機構により遺伝的不安定性を誘導して、これが間接的に突然変異を誘発する可能性が明らかになってきた。このような遺伝的不安定性の誘導を考慮に入れなければ、ある種の放射線発がん等に見られる高いイニシエーションの頻度は説明し得ない。そして、悪性のがん細胞においては、genetic あるいは epigenetic な機構により、遺伝的不安定性が恒久的に誘発されており、その結果として常に生み出される突然変異細胞のなかでより悪性のものが宿主の微小環境で選択を受け、腫瘍の進展がおこる。遺伝的不安定性の分子機構について、今後の説明が待たれる。

参考文献

1. Kennedy, A.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7262-7266, 1980
2. Kamiya, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1332-1336, 1995
3. Nomura, T., Nature, 296, 575-577, 1982
4. Chang, W. & Littl, J.B., Mut. Res., 270, 191-199, 1992
5. Kadhim, M.A. et al., Nature, 355, 738-740, 1992

1. 放射線発がんの初期過程における遺伝的不安定性の役割

がん化の進展過程に遺伝的不安定性が重要な役割を果たしていることはよく知られている。悪性のがん細胞では、染色体の数の異常や構造異常が多く見られる。さらに遺伝子増幅は、悪性細胞の特徴をなしている。また、悪性のがん細胞においては点突然変異の頻度も上昇している場合がある。

遺伝的不安定性はがん化の初期過程においても重要な役割を持つことが明らかになりつつある。放射線発がんを例にとると、これまで放射線は DNA 損傷を誘発し、その結果として生じたがん関連遺伝子の突然変異ががん化をもたらすと考えられてきた。しかしながら放射線は、細胞に遺伝的不安定性を誘発し、2次的に生じた突然変異により、間接的にがん化に寄与する可能性が明らかになりつつある。

放射線照射した C3H10T1/2 細胞を培養し、その後段階希釈してさらに数週間培養を行うと、希釈の程度に関わらず最終的に得られるフォーカスの数は一定である¹⁾。フォーカスの出現頻度はたいへん高く、さらに照射後長期培養の後に生じる。ラットの乳がんについても、照射された乳腺幹細胞は 100 個に 1 個の割合でがん化する²⁾。さらに経世代発がんの研究では、照射した親マウスより生まれた F1 マウスにおいて、高い頻度で肺がんの発症する³⁾。ここでの発がん頻度の上昇は、1-2 Gy の線量で 10% に及ぶ。これらの高い頻度のがん化は、放射線が直接引き起こした突然変異によるものではあり得ず、照射された細胞に遺伝的不安定性が誘導され、その結果がん化がもたされたものと思われる。実際に培養細胞における hprt 遺伝子座の突然変異頻度は、放射線照射後長期間の培養の後にも上昇していることが示されている⁴⁾。さらに染色体突然変異は、照射後多くの細胞分裂を経た後も生じることが示されている⁵⁾。これらの遅延突然変異は、放射線が遺伝的不安定性を誘発する作用を持っていることを示している。

2. マウスミニサテライト配列における放射線誘発突然変異と遺伝的不安定性

われわれは、放射線誘発突然変異における遺伝的不安定性の不安定性的役割を明らかにする目的で、マウスのミニサテライト Pc-1 遺伝子座の生殖細胞突然変異について解析した。GGGACA の繰返しよりなるこの遺伝子座は C3H マウスで 3 kb の、C57BL で

ミニサテライト

成人型早老症Werner 症候群における癌
- とくに骨肉腫について

石川雄一
財癌研究所病理部

Y. Ishikawa
Department of Pathology,
The Cancer Institute

はじめに

早期老化症候群の一つであるWerner 症候群は、常染色体劣性遺伝病で、各種の老化兆候が若年から認められ、約49才で死亡し、重要な死因として動脈硬化や悪性腫瘍が挙げられている。本症は、欧米諸国に比べわが国で多いといわれているものの、まれな疾患であるため、本症に合併した悪性腫瘍のまとまった解析はほとんどなかった。発生する癌は、本症候群が老化症候群であることの結果として起こるものなのか、それとも老化とは直接関係のないものなのかは不明であった。本症候群の悪性腫瘍が老化の直接の結果であるなら、その種類（部位や組織型）は一般集団の高齢者の癌と同じ分布を示すであろう。もしそれが一般集団の分布と大きく異なるなら、本症候群は、老化症候群であると共に、癌症候群としても位置づけうるであろう。

そこで、現時点で可能な限り多数の日本人腫瘍症例のデータを収集して、本症候群に発生した癌の性質を調べた。また、とくに骨肉腫（OS）に着目して、その臨床病理学的特徴を対照群と比較した。

対象および方法

対象は、共同研究者である東京都立大塚病院医長の後藤真氏がこれまで収集してきた全ての日本人Werner 候群患者の症例報告約810例（1960-1994年の医学中央雑誌、Index Medicus等から抽出）である。これらの報告から、本人および家族中の本症患者に見られたすべての腫瘍を登録した。不確実なものうち、報告者に直接連絡がとれた場合は、私信による情報として追加した。また、後藤氏が直接診察した患者やその家族の腫瘍症例も加えた。「肝癌」などと記録されている場合は、安易に癌腫（carcinoma）と見なさず、cancerして登録した。年齢は、腫瘍発症時のものとし、それが不明の場合のみ報告にある年齢を記載した。OSについては、症例報告をした担当医と連絡をとり、レントゲン写真を含む臨床情報や病理プレパラートを収集した。

OSの特徴を比較するための対照群には、全国骨腫瘍患者登録（日本整形外科学会骨軟部腫瘍登録委員会、国立がんセンター、1980-1991年の1597例）、および癌研付属病院の症例（1979-1994年の148例）を適宜用いた。

結果

（1）Werner 症候群に発生した腫瘍の一般的特徴
総計156個の腫瘍（悪性腫瘍134、良性髄膜腫15、MDSなど5、神経膠腫2）の内訳は表1に示した。すなわち、Werner 症候群に発生した腫瘍には、以下のような顕著な特徴が見られた：① Werner 症候群の悪性腫瘍は、上皮性：非上皮性 = 1:1 で、一般より非上皮性腫瘍の頻度が約10倍高い、② 非上皮性腫瘍では、骨軟部腫瘍、黒色腫、白血病やMDSなどが多い、③ 上皮性腫瘍（癌腫）では、一般の高齢者で多い肺癌、消化器癌、前立腺癌が少なく、甲状腺癌が多い、④ 良性腫瘍では髄膜腫が多い。

（2）Werner 症候群に発生したOSの特徴

Werner 症候群に発生した9例は、男：女 = 2:7 = 1:3.5、平均年齢40（17-56）歳、発生部位は大腿骨2、脛骨2（いずれも遠位部）、腓骨2、橈骨1、膝蓋骨1、軟部（大腿）1であった。対照群（全国例）では、男：女 = 993:604 = 1:0.6、平均年齢24歳、大腿骨54%、脛骨23%、上腕骨9%、骨盤5%、腓骨5%、その他は1%以下であった。一般集団の脛骨発生OSは、大部分が近位部に発生するが、Werner 症候群の2例は、いずれも遠位部であるなど、詳細部位でも、典型例と異なっていた。組織像を確認できた骨発生6例の組織型では、osteoblastic: fibroblastic: chondroblastic = 2:1:3 と、non-osteoblastic OSが通常より多かった。すなわち、Werner 症候群のOSは、発生部位と組織型の点で、非典型的なOSであるといえよう。

考察

Werner 症候群に発生する腫瘍のスペクトルは、これまで知られていた癌多発症候群のいずれとも異なり、非常に特徴的である。骨軟部腫瘍が多いという点では、p53 癌抑制遺伝子の変異が高率に見つかることで注目を浴びている Li-Fraumeni 症候群とも似ている。p53 遺伝子産物は、DNA 複製に関係しており、helicaseとの相互作用もあることが判っている。一方、単離されたWerner 症候群の原因遺伝子は、Bloom 症候群の原因遺伝子と同じhelicaseであった。こうした状況から、近い将来に、染色体不安定性を示す症候群やWerner症候群などは「DNA複製異常症候群」として一括して理解される可能もある。

Werner 症候群で頻度の増加している腫瘍にのみ注目してきたが、老化症候群であるにも関わらず一般集団の高齢者に多い癌がほとんどないことも、忘れるべきではない。肺癌、大腸癌、前立腺癌はほとんど見られなかった。このことは、一般集団における肺癌や大腸癌で、microsatellite instability を示す腫瘍の頻度があまり高くないことと軌を一にしているのであろうか。

Werner 症候群に発生したOSは、① 女性に多い、② 年齢が高い、③ 部位が典型的でないものが多い、④ 組織型ではnon-osteoblastic OSが多い、という特徴が見られた。これらは、一般集団の“成人型”OS（30才以上の例）の特徴とほぼ一致している。ことから、Werner 症候群のOSは、“成人型”OSのモデルとなりうると考えられる。

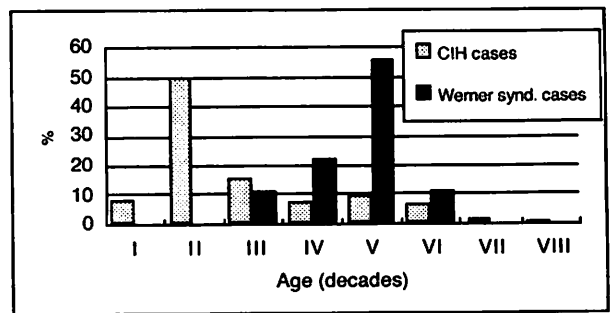
表1 Werner症候群に発生した腫瘍

非上皮性腫瘍 88			
軟部腫瘍 24			
MFH	6	横紋筋肉腫	1
平滑筋肉腫	5	滑膜肉腫	1
線維肉腫	4	骨肉腫	1
悪性神経鞘腫	3	単に肉腫	3
骨腫瘍 9			
骨肉腫	8	線維肉腫	1
悪性黒色腫 21			
鼻腔	5	足	13
食道	1	他	1
口唇	1		
髄膜腫 16			
多発	1	単発 (悪性1)	15
血液疾患 14			
白血病 (RAEB)	1	MDS	2
異型白血病	1	MDS+骨髓線維症	2
AML (FAB M1-5)	5	骨髓線維症	1
赤白血病 (M6)	1	形質細胞腫	1
脳腫瘍 3			
精上皮腫 1			
上皮性腫瘍 68			
甲状腺癌 26			
濾胞癌	12	未分化癌	3
乳頭癌	9	不明	2
胃癌 6			
肝がん 7			
肝細胞癌	3	肝内胆管癌	2
肝がんNOS	2		
胆嚢癌, 肝外胆管癌 2			
乳癌 6			
皮膚癌 4			
(黒色腫以外)			
その他 17			
鼻腔癌	3	肺癌	1
膀胱癌	3	膀胱癌	1
子宮がん	2	腎癌	1
卵巣癌	2	食道癌	1
喉頭癌	2	頸部扁平上皮癌	1

表2 骨肉腫の発生部位

部位	Werner症候群		対照 (全国症例)	
	n	%	n	%
大腿骨	2	22.2	858	53.7
脛骨	2	22.2	362	22.7
上腕骨			138	8.6
恥骨			76	4.8
腓骨	2	22.2	75	4.7
肋骨			11	0.7
椎骨			11	0.7
肩甲骨			8	0.5
橈骨	1	11.1	7	0.4
頭蓋骨			6	0.4
足の骨			5	0.3
膝蓋骨	1	11.1	4	0.3
尺骨			3	0.2
鎖骨			3	0.2
胸骨			2	0.1
骨外	1	11.1	-	-
多発性			16	1.0
	9		1597	

図1 Werner症候群と一般集団における骨肉腫の年齢分布 (パーセント)



参考文献

- Goto, M., Miller R. W., Ishikawa, Y., Sugano, H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5, 239-246, 1996.
- 石川雄一, 西田一典, 菅野晴夫, 北川知行, 川口智義, 町並陸生, Robert W. Miller, 後藤真. Werner症候群に発生した骨肉腫9例の病理学的検討. *日本整形外科学会雑誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.)* 70 (6), S1042, 1996.
- 西田一典, 石川雄一, 井下尚子, 北川知行, 川口智義, 町並陸生. 当院における成人型骨肉腫50例の検討. *日本整形外科学会雑誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.)* 70 (6), S1043, 1996.
- Ishikawa, Y., Tsukuma, H., Miller R. W. Low rates of Paget disease of bone and osteosarcoma in elderly Japanese. *Lancet* 347, 1559, 1996.

トリプレット遺伝病の反復数と発症年齢

山田 正夫

国立小児病院小児医療研究センター

はじめに

トリプレットリピートの伸張は、疾患責任遺伝子研究から明らかにされた新しいタイプの変異であり、注目を集めている。これまでに、主として神経に関連する9疾患で明らかにされた。我々のグループは、常染色体優性遺伝様式を示す神経変性疾患である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)について、遺伝子マッピングを進め、候補遺伝子アプローチによってトリプレットリピートの伸張を見出し、さらには責任遺伝子のゲノムとcDNA構造を決定し、産物を同定し、リピートの伸張過程を明らかにしてきた。本シンポジウムではトリプレットリピート伸張病の概要を説明し、他の関連領域、癌や老化との関わりについても考察したい。

1. ヒト疾患責任遺伝子研究の現状

DNA組換技術の進展によって、ヒトのような複雑なゲノムをもつ生物であっても遺伝子解析できるようになり、遺伝病や腫瘍などの疾患責任遺伝子が目覚ましい勢いで同定されている。変異を塩基配列レベルで明らかにし、診断に役立て、病態と病理を理解し、さらには遺伝子情報に基づいて治療法を模索する時代となった。遺伝病はもちろん、癌も体細胞レベルでの遺伝子損傷に基づくことが確立され、これらは遺伝子病として分類でき、現在約7000知られている。一方、ヒトゲノムには5万とも10万ともいわれる遺伝子が存在し、現在までに、約3000

個の機能が判った遺伝子が同定あるいはマップされ、この内約1000個の遺伝子が疾患と対応付けられている。ヒトゲノムの30億の塩基配列全てを決定しようとヒトゲノムプロジェクトが世界的規模で進行中であり、これは予想以上に早く進行し、またこのプロジェクトから得られた情報は最近の疾患責任遺伝子研究にも大いに役立っている。

2. DNA多型

多型(polymorphism)とは「同一の生物種、またはその集団で、異なる遺伝的性質が共存していること」と定義される。遺伝的性質の個人差とも言えるが、厳密には対立遺伝子間の差である。ヒトは2倍体生物で、性染色体を除き、父親と母親から受け継いだ2個の遺伝子を持つので、それぞれの遺伝子を対立遺伝子と呼ぶ。よく知られた例としてABO式血液型があり、A,B,AB,O型の4種類の表現型がある。この性質はメンデル式の遺伝によって決定されており、対立遺伝子としてはa,b,oの3種類あり、A型のヒトはaaあるいはaoの遺伝子型を持つ。実際、多型は血液型において最初に発見され、また血清蛋白質の電気泳動の差の多型も知られていた。

遺伝情報はDNA上にA,C,G,Tの4種類の塩基の並びによって記述されている。多型は遺伝的に決定されているのだから、当然DNAにも多型が存在するはずである。実際、ヒトゲノムDNAには約100塩基に1個の割合で多型が存在するほど変化に富むとされる。DNA多型は最初、制限酵素でゲノムDNAを切断し、適当なプローブを用いてサザンハイブリダイズすることによって検出され、RFLPと呼ばれていた。多くの場合、切断されるかされないかという2種類を区別するにすぎない。ヒトゲノム上には一定の塩基配列が縦列して繰返している部分があり、反復配列と呼ぶ。反復配列で繰返し数の違いがあれば多型となり、通常多種類存在する。長い塩基

疾患	遺伝子位置	反復配列	正常回数	患者回数	遺伝様式	親	mRNA (kb)	リピートの遺伝子内位置	遺伝子の機能
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 DRPLA	DRPLA 12p13.13	CAG	7-23	49-75	優性	父親	4.5	翻訳領域 ポリグルタミン	DRPLA protein 分子量増加
ハンチントン舞踏病 HD	HD 4p16.3	CAG	11-34	37-86	優性	父親	10	翻訳領域 ポリグルタミン	Huntingtin 分子量増加
脊髄小脳失調症I型 SCA1	SCA1 6p23	CAG	23-36	43-81	優性	父親	11	翻訳領域 ポリグルタミン	Ataxin-1 分子量増加
脊髄延髄筋萎縮症 SBMA	AR Xq11-12	CAG	17-26	40-52	優性		3.6	翻訳領域 ポリグルタミン	アンドロゲン 受容体
マチャド=ジョセフ病 MJD	MJD1 14q24-32	CAG	13-36	68-79	優性		1.8	翻訳領域 ポリグルタミン	
脆弱X症候群 FRAX	FRAXA Xq27.3	CGG	6-54	>130	劣性	母親	4.4	5'-非翻訳 メチル化促進	FMR-1 RNA結合蛋白
	FRAXE Xq28	GCC	6-25	>200	劣性			非翻訳 メチル化促進	
筋緊張性ジストロフィー DM	DM 19q13.3	CTG	5-27	>50	優性	両親	3.0-3.3	3'-非翻訳	蛋白キナーゼ
フリードライヒ失調症	FRDA 9q13-q21	GAA	7-22	200-900	劣性	両親	1.3	第1イントロン	

対を単位とする反復配列の多型はミニサテライトとか VNTR とか呼ばれ、サザンハイブリダイズ法で検出される。それに対して、CACACACACA と C と A とが交互に繰り返すように、2-5 塩基対を単位とする反復配列、マイクロサテライトはポリメラーゼ鎖反応(PCR)の普及によって容易に検出できるようになった。これらの DNA 多型は対立遺伝子を区別する目印として大変有効かつ便利なものであるから、ヒト遺伝子地図の作成や、疾患遺伝子のマッピングの際の基準点として利用されてきた。

3. 多型が、疾患原因と直接結びつく

多型は、進化の過程で集団中の個体に変異が生じ、その変異が集団内に維持されてきた結果である。それが進化の過程で生き残ってきた事実は、生存にとって有利でもなく不利でもないことを示しており、したがって多型として観察される塩基配列の変化自身が直接疾患を引き起こす原因となるとは考えにくい。今日、各種の疾患と DNA 多型マーカーとの相関が研究されている。多型は目印として使用されており、仮に相関が認められた場合でも、その疾患の責任遺伝子が目印とともに親から子供へと伝達されやすい(連鎖がある)ことを示し、すなわち物理的にも責任遺伝子と目印とがお互いに近接して存在することを示している。ところが最近、DNA 多型の成因となる変異が直接に疾患と関係しているような例が報告されてきた。あるタイプの Alzheimer 病と、ApoE 遺伝子の特定の多型(ϵ -4)との相関は大変興味深い結果であるが、多型を生じる塩基配列変化が ApoE 遺伝子自身の機能を変化させ、その結果疾患になり易くしているらしい。慢性的な飢餓と短命という動物やヒトの進化の歴史を考えると、長生きして初めて発症するような疾患になり易いという遺伝的性質や、糖尿病になりやすいという遺伝的性質が、これまでならほとんど淘汰の対象とならなかつたであろうと考えられ、多型の成因となる変異がこうした疾患の直接原因となることも理解できる。トリプレットリピートの伸張も、多型が直接疾患に関係するもう 1 つの例である。

4. トリプレットリピート伸張病

現在までに、表に示す 9 種類の疾患について明らかにされており、いずれも神経関連の疾患である。このらは伸張するリピートによって 4 群に分類できる。すなわち、表に記載した DRPLA から SBMA までの CAG が伸張するグループ、染色体に脆弱部を呈する CCG が伸張するグループ、それに CTG が伸張する筋緊張性ジストロフィーと GAA が伸張するフリードライヒ失調症である。これらの疾患に共通して、同一の家系でも世代を経る毎に若年発症し、また重篤化する現象(表現促進現象)が見られる。リピートの繰り返し数と発症年齢の解析から、伸張程度が著しいと若年発症することが示され、また父

親(疾患によって母親)から伸張リピートが伝達されると一層伸張することが示された。すなわち、表現促進現象は伸張リピートの一層の伸張によって分子病理学的に解明できた。

5. ゲノムの不安定性

正常人の対立遺伝子では繰返数は様々であり、すなわち高度な多型を示すが、それらは世代間でほとんど安定に伝達され、子供は親の一方の対立遺伝子と同数の繰返数を受け継ぐ。一方、疾患範囲の伸張した繰返数は不安定で、長いほど不安定性が増すと考えられる。(疾患によっては)父親から伝達された時に一層伸張するので、精子形成時にトリプレットリピートが不安定となって伸張し、卵子形成時には安定であるという仮説がある。一方、患者の体細胞毎に繰り返し数が若干違うことから、受精後のゲノムの不安定に基づくという考えもある。いずれにしても DNA 合成や修復との関係が示唆されているが、伸張リピートが一層伸張する分子機構は判っていない。

6. 伸張トリプレットリピートの形成

遺伝病の責任遺伝子の変異が判明したときに、変異を生じた染色体のマーカーを調べることにより(ハプロタイプ解析)、それがヒトの進化の過程で極めて稀に生じた変異に由来して集団内に潜在していたものか、あるいは比較的最近に突然変異を生じたものかを区別できる。伸張するトリプレットリピートは、進化の過程で段階を追って少しずつ伸張し、やがて正常範囲と疾患範囲の中間の数を持つリピートが形成され、その人は発症には至らないが、その子孫に疾患を生じさせる可能性が高く、疾患の予備軍になっていると推定されている。特に、DM と DRPLA ではともに、アフリカ人の一部を除いて世界中の患者が同一のハプロタイプを有しており、伸張傾向を開始した染色体は同一起源であったことが示されている(創始者染色体)。

このような著しく伸張するリピートは、現在までの研究ではヒトにしか認められていない。これは他の生物ではこのような現象が見出されていないだけかも知れないが、伸張リピートを持つトランスジェニックマウスでは一層伸張することはなかった。何かヒトの進化に特徴的なことであろうか。

文献

- 1) Nagafuchi S, et al: Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet* 6 : 14-18, 1994.
- 2) Nagafuchi S, et al: Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 8 : 177-182, 1996.