

病態生理 Vol. 5 No. 10 (1986 : 10) 別刷

発癌モデルとしての遺伝子突然変異

Heritable alterations causing cancer

野村大成

Taisei Nomura

永井書店

■ 特集 / 癌の分子生物学 ■

発癌モデルとしての遺伝子突然変異

Heritable alterations causing cancer

野村大成
Taisei Nomura

はじめに

「癌の分子生物学」というはやかな課題についての執筆を依頼され、いささかとまどっている。というのも、私は従来より「個体まるごとの研究でしかがんの本質はつけない」と主張してきたからである。この機会に、私の行ってきた泥臭い研究の中から、与えられた分担課題「発がんモデルとしての遺伝子突然変異」に関する資料をまとめ、個体レベルの研究の難しさと、個体でなければわからない発がんモデルの利点を示したい。より簡易なシステムを求めつつ走っている分子生物学者の方々に、「おや、これでいいのかな」とでも思っていただければ、光栄である。

がんは突然変異で起こるか？

放射線や化学物質により突然変異が誘発されることはよくわかっている。哺乳動物においても、Russellらが数百万匹のマウスを用いて、毛色や骨格の変異あるいは白内障を指標にして、劣性および優性の遺伝子突然変異が放射線や発がん物質などにより誘発されることを証明している^{1)~4)}。しかし、がんについては、手がつけられなかった。それは、「まさか」と思われたのと、膨大な数の動物を長期間飼育せねばならず、実験手技上不可能に近いとみなされたためであろう。しかし、実験はやってみなければわからぬものである。まず最初に、がんが、突然変異に

より誘発されることを示した証拠をお見せしよう。

方法と原理⁵⁾

雄または、雌のマウスに、X線あるいは化学変異原を作用させた後に、一定の間隔をおいて、正常マウスと交配した。照射あるいは注射してすぐ交配すると精子期または卵細胞の成熟期が作用を受けたことになり、雄マウスへの作用後、交配までの間隔が長くなるほど、精子細胞期、精原細胞期の被曝ということになる(図1)。

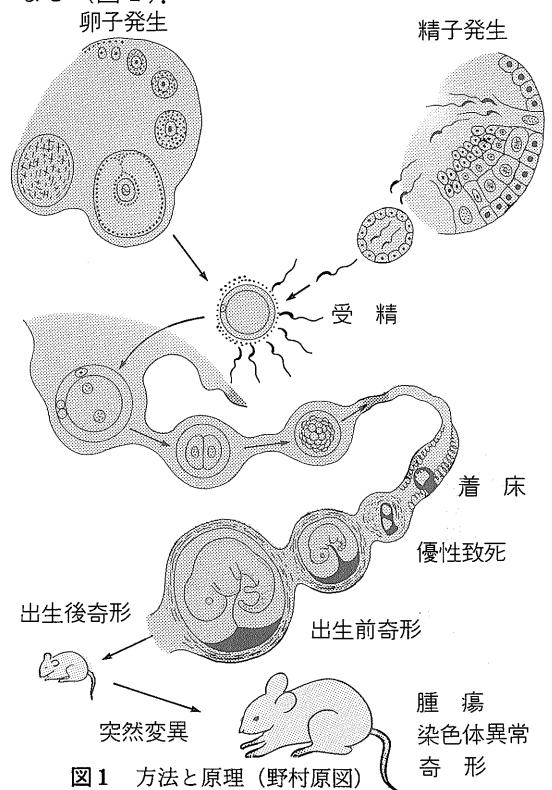


図1 方法と原理 (野村原図)

これら放射線または化学変異原の作用を受けた生殖細胞に由来する次代の仔について、優性致死、奇形、がん、染色体異常等が発生するかどうかを調べた。そのうち、がんについてまとめてみる。

F₁での腫瘍発生^{5)~8)}

雄 ICR マウスの成熟精子期(交配の1~7日前)、精子細胞期(交配の15~21日前)および精原細胞期(交配の64日以上前)に X 線を照射し、非照射の雌マウスと交配した。F₁を生後8カ月で屠殺し、腫瘍を検出した。その結果を図2に示した。誘発された腫瘍の約90%は肺腫瘍であり、他に卵巣腫瘍、リンパ性白血病などが発生している。F₁での腫瘍発生率は、図2のように成熟精子期、および精子細胞期に照射した場合は、直線的に増加し、504radでは約30%の高値を示した。精原細胞期に照射した場合も、F₁での肺腫瘍発生率は線量とともに上昇したが、発生率は減数分裂終了後の精細胞(精子および精子細胞)の約1/2である。

卵細胞に関しては、排卵よりさかのぼること4週間以上たって正常雄と交配しても子供はできない。そこで排卵前1~7日の雌 ICR マウスに X 線を照射した。F₁での腫瘍発生率は図2に示したように108 radまで非照射の場合と差がなかったが、200 radを越えると急激に、腫瘍発生率は上昇した。卵細胞はすべて低線量の X 線に抵抗性を示すのかというと、そうでもない。もっと若い卵細胞(排卵前8~28日)に照射すると、極めて高頻度に F₁に腫瘍が誘発される。化学物質でも同じことで、ウレタン(ethyl carbamate)を雄、または、雌 ICR マウスに

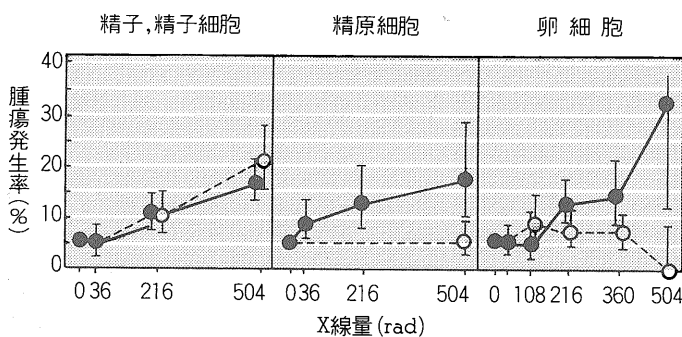


図2 精子期および精子細胞期(1~21日前)、精原細胞期(64~80日前)、及び成熟卵(排卵1~7日前)に、X線を急及び分割照射した時のF₁での腫瘍発生。実線は急照射(72 rad/min)、破線は分割照射(36 radを2時間間隔)を示す^{5)~9)}。

注射した場合にも F₁に有意に高率に腫瘍が誘発された⁵⁾⁷⁾⁸⁾。

生殖細胞の傷の修復^{5)~7)}

図2をよくながめてみると、精原細胞と成熟卵は何となく X 線に対し抵抗性を示しているように思える。そこで、X 線を少量ずつ分割して照射してみた。すなわち 36 rad 照射して、2時間やすみ、また 36 rad 照射することを繰り返した。その結果は、図2の破線に示した通りである。1回照射の場合の実線と比較してほしい。精子期、精子細胞期では、分割照射しても1回照射の場合と腫瘍発生率に差はない。しかし、精原細胞と成熟卵に分割照射した場合は、F₁には腫瘍は誘発されなかった。すなわち精原細胞、および成熟卵は、少量の傷なら治してしまう。

表1 マウスでの放射線誘発腫瘍突然変異と通常の突然変異の比較^{5)~10)}

| | 腫瘍 | 突然変異 ⁺ |
|---------|------|-------------------|
| 感受性 | | |
| 精子と精子細胞 | ++++ | ++++ |
| 精原細胞 | ++ | ++ |
| 卵細胞 | ++++ | +++ |
| 分割効果 | | |
| 精子と精子細胞 | - | - |
| 精原細胞 | + | + |
| 卵細胞 | + | + |

⁺特定座位および優性骨格突然変異^{1)~3)}

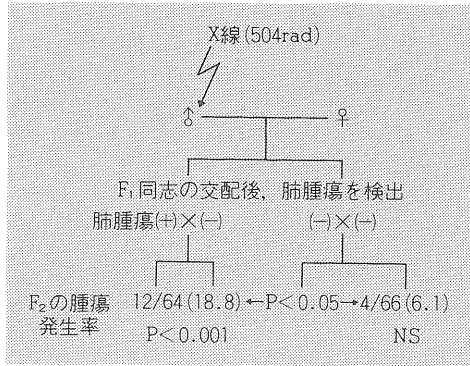
劣性突然変異の放射線誘発に関しては、Russellらによる膨大な資料がある¹⁾²⁾。また、Ehlingによる優性遺伝の特性を示す骨格異常突然変異の研究もある³⁾。これら通常のマウス突然変異とここで述べた

「F₁で腫瘍を発生する原因」の放射線による起こり方を比較してみる。表1に示す通り生殖細胞の時期による感受性の差や、F₁での腫瘍発生頻度に及ぼす分割効果の有無をみても「F₁で腫瘍を発生する原因」と突然変異は、極めて似ていることがわかる。

以上の結果は、F₁に腫瘍の発生をもたらした生殖細胞の変化は、突然変異そのものであることを強く示唆している。では、どのようにそれを証明したらよいだろうか。

肺腫瘍好発の特性は遺伝する⁵⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾

まず、精子細胞期に X 線 504 rad を1回照射



非照射群の腫瘍発生率 26/543(4.7)

図3 X線により、生殖細胞に誘発されたF₁に肺腫瘍をつくる変異の遺伝性⁶⁷⁾.

表2 X線, 4NQO, およびウレタンにより、次世代に誘発された肺腫瘍の遺伝性⁷⁾

| 親(F ₁)の性質 | 次世代(F ₂)での肺腫瘍発生率(%) | | |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|------------|
| | X線 | 4NQO | Urethane |
| +×- | 15/76(19.76) ⁺ | 7/28(25.0) ⁺⁺ | 4/19(21.2) |
| -×- | 4/69(5.8) | 5/103(4.9) | 9/113(8.2) |

⁺P<0.05 ⁺⁺P<0.01

し、正常雌と交配し、F₁を作成する。F₁には当然ながら高率に腫瘍が発生する。F₁を屠殺する前に、無作為に雄、雌を交配し、前もってF₂を作っておく。F₂作成後、その親であるF₁を解剖し肺腫瘍をもつかどうかを調べた。F₂をも解剖してみると、親(F₁)のいずれかが肺腫瘍を持っている場合のみ、F₂に肺腫瘍が有意に高率に誘発された(図3)。

X線のかわりにウレタンや4NQO(4-nitroquinoline 1-oxide)を用いた時も同じ結果になった(表2)。また、F₂雄を正常なマウスと交配し、F₃を観察した場合も、F₂が肺腫瘍を持っている場合のみ、有意に高率に(22.7%)肺腫瘍が発生した。以上の結果から、次世代に肺腫瘍をつくる変異は、約40%の浸透率で優性に遺伝していることがわかった。しかも、自然発生腫瘍では、このような遺伝性はみとめられない。すなわち、X線あるいは化学変異原により、新たに造られた変異である。

以上の事実は、各国で追試がなされているが、私達はすでに、LT, N5という別の系統のマウスを使って、また、別の腫瘍(白血病等)でも、同一の結果を得ており、一般的な事実としてみとめられるようになってきた。

発がんモデルとしての遺伝子突然変異

これは、生殖細胞に起こった遺伝性の変異である。従って全身の細胞が同じ変異をもっている。その細胞より発生した腫瘍も同じである。ここでは、がん突然変異を用いたいくつかの応用例を示し、発がん研究への考察を加えてみたい。

がん突然変異の性格

生殖細胞の遺伝性変異の大きさを知るために、まず転座と腫瘍の関係を調べたのが図4である。X線504radを精子細胞期に1回照射し、F₁での腫瘍とF₁の精細胞での転座を調べた。一般の予想に反し、転座をもったF₁と転座をもたないF₁で、腫瘍発生率はまったく差がなかった⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾。現在骨髓細胞を用いCQバンド法で解析を行っているが、変異マウスにも腫瘍細胞にも特異的な染色体異常はみつかっていない¹⁰⁾。X線だけでなくウレタンも、生殖細胞に作用させるとF₁に腫瘍が同じように誘発されるが、ウレタンではF₁に転座はまったく誘発されない⁵⁾¹⁰⁾。このことは、ショウジョウバエを使って遺伝学的にも証明済みである¹¹⁾。従って、がん突然変異は、染色体変異のレベルでなく、遺伝子突然変異(もちろん小さな deletion を否定するものではない)、あるいはそれに近いものであろう。

これら変異マウスの系統化をすすめている。また、誘発腫瘍のほとんどは可移植性である¹⁰⁾。従って正常マウス、変異マウス、腫瘍組織、すべてがそろっており、今後、がんの分子生物学的研究に貴重な材料を提供するものと考えられる。

突然変異だけでがんになるか¹²⁾

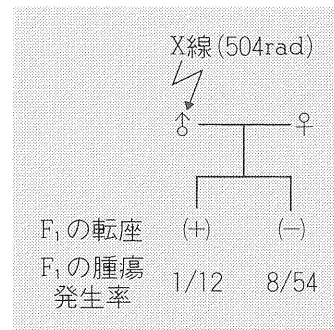


図4 転座と腫瘍の相関

精子細胞期に504radを急照射し、F₁での転座と腫瘍を検出したもの⁶⁷⁾。

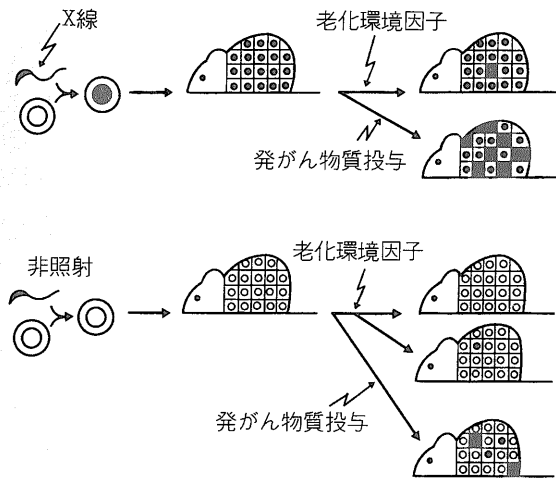


図5 がん突然変異モデル

●は、腫瘍突然変異をおこした細胞。■は腫瘍細胞。○は、正常細胞を示す¹²⁾。

もし、突然変異だけでがんになるのであれば、変異マウスのすべての細胞が同じ変化をもっているのだから、全身、がんだらけになるはずである。しかし、肺でみてみると、せいぜい1~2個の腫瘍ができるだけで、非常に弱い造腫瘍効果しかもたない。しかも、浸透率も40%位しかない。浸透率は、マウスが年をとるとともに上昇することから考えて、突然変異だけでは、がん化せず、生後、種々の環境因子や老化等が加わって初めてがん化するものと思われる。この仮説を図5に模式化して示した。もし、この考えが正しければ、がん突然変異の起こったマウスに、生後、発がん物質、または、プロモーターといわれている物質を作用させれば、肺はがんだらけになるはずである。事実、ウレタン(0.45 mg/g・体重)を生後21日目に皮下注射してみると、正常(がん突然変異を誘発していない)マウスでは、平均約3個であるのに、生殖細胞にX線照射した場合は、F₁に平均約18個(多いものでは50個近く)も腫瘍をもったマウスがあらわれた。さらに面白いことに、胎生15日目の雄の生殖細胞にX線を作用させてもF₁にはがん突然変異は誘発されない。このF₁にウレタンを注射しても肺腫瘍は殆ど出現しない。すなわち、がん突然変異そのものは、非常に弱い効果しかもたないが、これなしでは、発がん物質を投与しても、がんは、発生しにくいことを示している。

がん突然変異はがん化の必要条件だが十分条件ではない。もし、がん化に、イニシエーションやプロ

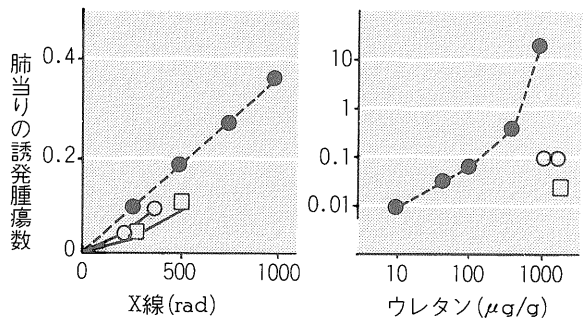


図6 X線およびウレタンによるマウス肺腫瘍の誘発——生殖細胞作用と体細胞作用の比較——⁹⁾

- ：幼若ICRマウスへの直接作用。X線に関してはYuhasの資料を引用⁹⁾。
- , □：雄(○)又は雌(□)ICRマウスにX線またはウレタンを作用させた後、正常ICRマウスと交配した時のF₁での腫瘍発生率。

モーションというものがあるとすれば、本モデルで初めて両ステップを分離研究できるものであって、同一個体(細胞)に二種の因子を作用させて、これがイニシエーター、あれがプロモーターなどというのは論外である。

発がん物質は一体何に作用しているのか⁹⁾

図6を見てほしい。X線とウレタンを生殖細胞を介して、あるいは、直接にマウスに作用させた時の肺腫瘍の誘発頻度を比較してある。X線の場合は、両者に大差がないのに反し、ウレタンの場合、体細胞に直接作用すると生殖細胞を介した場合(がん突然変異)の数百倍の頻度で肺腫瘍が発生する。X線は、生殖細胞にも、肺の体細胞にもまったく同じ変異を造っているのに対し、通常、我々が発がん実験を行う時と同じように、ウレタンをマウスに注射すると、その99%以上は、遺伝子突然変異以外の作用を及ぼしていることがよくわかる。化学発がん物質等は、既存の、あるいは、人工的に造られた発がん性の変異を発現させる事を本来の仕事としていると考えるのが妥当である。

おわりに

がん突然変異という特異なモデルを用い、話をすすめていくと、がん化における遺伝子突然変異の役割は、欠くことのできない基本的なものであるが、通常の化学発がん研究では、その発現の過程の方が、数百倍の重みを持っていることがわかる。最近の担

がん動物(ヒトも含めて)からの oncogene の検出、古くは、細菌を用いた発がん物質の変異原性の研究は、象の尾をいじくりまわしている様に思えて仕方がない。異常なまでの発がん遺伝子研究への集中は、太平洋戦争前の日本人の思想によく似ている。といって、何も遺伝子突然変異の研究が不必要だといっているのではない。その重要性は前節に述べたとお

りである。

がんにならない細菌や、がん化過程を殆ど終えている培養細胞を使ってがんの分子レベルの研究をなさっている方々の何人かでも個体レベルの研究の面白さにも目を向けて下さればと思う次第である。

稿を終えるにあたり、長野久美子、村上佳子、木田誠子嬢、中島裕夫君の協力を感謝する。

文 献

- 1) Russell, W. L., Russell, L. B. and Kelly, E. M.: Radiation Dose Rate and Mutation Frequency. *Science*, **128**: 1546-1550, 1958.
- 2) Russell, W. L.: Mutation Frequencies in Female Mice and the Estimation of Genetic Hazards of Radiation in Women. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **74**: 3523-3527, 1977.
- 3) Ehling, U. H.: Dominant Mutations Affecting the Skeleton in Offspring of X-irradiated Male Mice. *Genetics*, **54**: 1381-1389, 1966.
- 4) Ehling, U. H. et al.: Dominant Catatact Mutations and Specificlocus Mutations in Mice Induced by Radiation or Ethylnitrosourea. *Mutat. Res.*, **92**: 181-192, 1982.
- 5) Nomura, T.: Changed Urethan and Radiation Response of the Mouse Germ Cell to Tumor Induction. In: L. Severi(ed.), *Tumors of Early Life in Man and Animals*. PP.873-891. Perugia Univ. Press, Perugia, 1978.
- 6) Nomura, T.: Role of DNA Damage and Repair in Carcinogenesis. In: T. Sugimura, S. Kondo and H. Takebe(eds.), *Environmental Mutagens and Carcinogens*. pp.223-230. Alan R Liss, New York, 1982.
- 7) Nomura, T.: Parental Exposure to X Ray and Chemicals Induces Heritable Tumors and Anomalies in Mice. *Nature*, **296**: 575-577, 1982.
- 8) Nomura, T.: Transmission of Tumors and Malformations to the Next Generation of Mice Subsequent to Urethan Treatment. *Cancer Res.*, **35**: 264-266, 1975.
- 9) Nomura, T.: Quantitative Studies on Mutagenesis, Teratogenesis, and Carcinogenesis in Mice. In *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*(Ed. Y. Tazima et al.), pp. 153-160, *Eny. Mutat. Soc. Jpn.*, Mishima, 1984.
- 10) Nomura, T.: Further Studies on X-ray and Chemically Induced Germline Alterations Causing Tumors and Malformations in Mice. In: C. Ramel et al., *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals*. pp.13-20, Alan R. Liss, Inc., 1986.
- 11) Nomura, T.: Potent Mutagenicity of Urethan(ethyl carbamate) Gas in *Drosophila Melanogaster*. *Cancer Res.*, **39**: 4224-4227, 1979.
- 12) Nomura, T.: X-Ray-Induced Germ-line Mutation Leading to Tumors: Its Manifestation in Mice Given Urethane Postnatally. *Mutat. Res.*, **121**: 59-65, 1983.