

細胞に取り込まれるとA:T→C:Gトランスバージョン変異を引き起こし、また、2-OH-Aを持つDNAを大腸菌や哺乳動物細胞に導入するとA:T→G:Cトランジション変異やフレームシフト変異を引き起こす。このように変異原性の高い2-OH-dATPに対して哺乳動物のみが分解酵素系を持つことは、原核生物よりも2-OH-dATPが生じやすい環境が哺乳動物細胞に存在する可能性が示唆される。

ヒトの肺癌や肝細胞癌におけるp53遺伝子の変異のスペクトラムを解析するとG:C→T:Aトランスバージョンが4割を占めることから、8-oxoGの関与が示唆されているが、胃がんについてはこのような8-oxoGが関わる変異は非常に少ない。MTH1欠損マウスでの胃がんの増加の原因は、2-OH-dATPに由来する変異でp53遺伝子などの癌抑制遺伝子の失活や、がん遺伝子の活性化が生じている可能性が考えられ、今後さらなる解析を必要とする。

我々は、パーキンソン病患者の中脳黒質で8-oxoGが蓄積し、MTH1の発現も著しく亢進していることを世界で初めて明らかにした。8-oxoGはミトコンドリアに蓄積していると考えられ、ミトコンドリアでの酸素呼吸で供給されるエネルギーに大きく依存して機能を維持している神経細胞においては、このようなヌクレオチドの酸化がミトコンドリア機能障害の原因となっている可能性が示唆される。このことは、MTH1のミトコンドリア局在を変化させる遺伝子多型の存在からも強く示唆される。

#### E. 結論

老化に伴い発がんや神経変性疾患の発症率が上昇するのは、細胞内障害の慢性的な蓄積が原因と考えられる。我々は、このような老化に伴う疾患の原因の一つとしてヌクレオチドの酸化に注目して研究を進めて来た。我々の本研究から、dGTPやdATPの酸化体を特異的に分解排除する哺乳動物特有の酵素 (MTH1) が存在することが明らかになった。①MTH1遺伝子欠損マウスにおいて老化に伴う自然発がん頻度が上昇していること、②ヒトのパーキンソン病の中脳黒質で8-oxoGが蓄積し、MTH1の発現が亢進していることから、MTH1は老化に伴う酸化ヌクレオチドによる細胞障害を抑制的に制御している事が強く示唆される。

#### F. 引用文献

- 1) Furuichi, M., Yoshida, M., Oda, H., Tajiri, T., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T. and Sekiguchi, M. (1994). Genomic structure and chromosome location of the human *mutT* homologue gene *hMTH1* encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics* 24, 485-490.

- 2) Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M., and Takeshige, K. (1995). Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270, 14659-14665.
- 3) Yakushiji, H., Maraboeuf, F., Takahashi, M., Deng, Z.-S., Kawabata, S., Nakabeppu, Y., and Sekiguchi, M. (1997). Biochemical and physicochemical characterization of normal and variant forms of human MTH1 protein with antimutagenic activity. *Mutation Res.* 384(3), 181-194
- 4) Oda, H., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., and Sekiguchi, M. (1997). Regulation of Expression of the Human MTH1 Gene Encoding 8-Oxo-dGTPase: Alternative Splicing of Transcription Products. *J. Biol. Chem.* 272 (28), 17843-17850.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., Kitajima, S., Cai, Y., Oshiro, S., Yakushiji, Y., Nakabeppu, Y., Kuwano, M. and Sekiguchi, M. (1999). Metabolic Fate of Oxidized Guanine Ribonucleotides in Mammalian Cells. *Biochemistry.* 38 (12), 3610-3614.
- 2) Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. (1999). Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGG1* mRNAs. *Mol. Biol. Cell.* 10, (5), 1637-1652.
- 3) Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., and Kasai, H. (1999). The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.* 274 (26), 18201-18205
- 4) Oda, H., Taketomi, A., Maruyama, I., Itoh, R., Nishioka, K., Yakushiji, H., Suzuki, T., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y., (1999) Multi-forms of Human MTH1 Polypeptides Produced by Alternative Translation Initiation and Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acid Res.* 27, (22), 4335-4343.
- 5) Fujii, Y., Shimokawa, H., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (1999) Functional significance

of the conserved residues for the 23 residue module among MTH1 and MutT family proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 (53), 38251-38259

- 6) Shimura-Miura, H., Hattori, N., Kang, D., Miyako, K., Nakabeppu, Y. and Mizuno, Y. (1999) Increase of 8-oxo-dGTPase (*hMTH1*) in Mitochondria of Nigrostriatum of Parkinsonian Brain. *Ann. Neurol.*, 46(6), 920-924.
2. 学会発表
  - 1) Yusaku Nakabeppu  
Molecular Genetics and Structural Biology of Human MutT Homolog, MTH1. The First Fujihara International Seminar, 1999.
  - 2) Toshio Ohtsubo, Kenichi Nishioka, Yasuyuki Imaiso, Shigenori Iwai, Hisanobu Oda, Toshiyuki Fujiwara, and Yusaku Nakabeppu.  
Human MYH protein possesses a novel repair activity for 2-hydroxyadenine in DNA, The 2nd 3R (Replication, Recombination, Repair) Symposium, 1999.
  - 3) 中別府 雄作. 活性酸素によるゲノム傷害とその防御機構. 第25回日本医学会総会(シンポジウム), 1999.
  - 4) 中別府 雄作. 活性酸素によるDNA損傷. 平成11年度文部省特定領域研究「神経細胞死制御」ワークショップ. 1999.
  - 5) 中別府 雄作. 「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構: 発癌から神経変性疾患まで」. 平成11年度 変異・発癌抑制機構研究会. 1999.
  - 6) 大坪俊夫, 西岡憲一, 今磯泰幸, 富永洋平, 岩井成憲, 下川英俊, 中別府雄作. DNA中の2-ハイドロキシアデニンを除去するヒト修復酵素. 第72回日本生化学会(シンポジウム). 1999.
  - 7) 富永洋平, 平野世紀, 一戸晶元, 大坪俊夫, 中別府雄作. アデニンDNAグリコシラーゼをコードする哺乳動物MYH遺伝子の発現とその制御. 第22回日本分子生物学会(ワークショップ). 1999.
  - 8) 中別府雄作, 西岡憲一, 大坪俊夫, 土本大介, 富永洋平, 作見邦彦, 古市正人, 康東天, 岩井成憲, 藤原俊幸. ミトコンドリアにおける核酸の酸化とその修復機構. 第22回日本分子生物学会(ワークショップ). 1999.
  - 9) 酒井康成, 小田尚伸, 古市正人, 中別府雄作. ヒトMTH1蛋白質の細胞内局在とその制御. 第22回日本分子生物学会(ワークショップ). 1999.
  - 10) 藤川勝義, 紙谷浩之, 薬師寺浩之, 藤井喜充, 中別府雄作, 葛西宏. 2-hydroxy-dATP, 8-hydroxy-dATPのヒトMTH1蛋白質による分解. 第58回日本癌学会. 1999.
  - 11) 伊藤紀幸, 三島正規, 池上貴久, 山懸ゆり子, 中別府雄作, 白川昌宏. NMRによるhuman MTH1タンパク質の立体構造解析. 第22回日本分子生物学会. 1999.
  - 12) 葛西宏, 紙谷浩之, 平野雄, 中別府雄作. 活性酸素によるDNA損傷、変異誘発およびその防御. 第22回日本分子生物学会. 1999.
  - 13) 作見邦彦, 富永洋平, 古市正人, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作. *MTH1*, *OGG1*ダブルノックアウトマウスの作製とその解析. 第22回日本分子生物学会. 1999.
  - 14) 藤川勝義, 紙谷浩之, 薬師寺浩之, 藤井喜充, 中別府雄作, 葛西宏. ヒトMTH1による2-OH-dATPの分解. 第22回日本分子生物学会. 1999.
  - 15) Yusaku Nakabeppu. Structural Analysis of Human MTH1 revealed that Biological Significance of an Oxidized Form of Adenine, 2-Hydroxyadenine. Gordon Research Conference on Mutagenesis and Carcinogenesis, 2000.

## ウエルナー症候群を疑われた患者皮膚由来繊維芽細胞の不死化

二階堂 修 (金沢大学薬学部教授)

本研究室に分与された遺伝的早老症を特徴とするウエルナー (WS) 患者由来細胞 24 系のうち、WSKA102 細胞を継代培養したところ 3 回の試行のうち 2 回不死化細胞株を得た。不死化 WSKA102 細胞は早期に核型が不安定性を示し、p53 を欠失していた。WS の原因遺伝子 WRN の塩基配列を不死化細胞株で調べたところ、正常であった。

キーワード：ウエルナー症候群 (WS)、ヒト細胞、不死化、p53、染色体異常、

### A. 研究目的

ウエルナー症候群 (WS) は早期老化症状を特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患である。WS 患者由来細胞は、年齢を揃えた正常ヒト細胞に比べ集団倍加数が著しく低く、S 期の延長、染色体不安定性などの特徴を示すことが知られている (7)。ポジショナルクローニングの手法によって原因遺伝子 WRN がクローニングされた (1)。WRN は 35 個のエキソンから構成される全長 100kbp 以上の長大なゲノム構造が特徴である。日本人の WS 患者由来細胞に見出される突然変異は全体の 50% が突然変異部位 4 (第 25 イントロン) に、10% が突然変異部位 6 (第 9 エキソン) に、6% が変異部位 1 (第 33 エキソン) に見出される特徴がある (2)。WRN タンパクの機能については試験管内の系においてヘリカーゼ活性 (3) およびエキソヌクレアーゼ活性 (4) が報告されているが、細胞内における機能は依然不明である。

本研究室において WS 患者皮膚由来細胞 (WSKA102) を培養したところ、年齢を揃えた正常ヒト由来細胞の集団倍加数 (PDL) をはるかに越える結果が得られ、PDL が 600 を越えたので不死化したと判断した。これまでヒト由来細胞の自然的不死化の現象については先天的に p53 遺伝子に突然変異を持つ Li-Fraumeni 症候群細胞 (5) 以外の報告はないのが現状である。本研究では、WSKA102 細胞の遺伝子 WRN に突然変異が存在するか、もしも本細胞株が WRN に突然変異をもつ WS であるならば、その不死化に WRN の変異が関与しているかを明らかにすべく研究を行うこととした。

### B. 研究方式

#### 1. 継代培養法：

WS との診断のもとに提供された細胞 (WSKA102 細胞と命名) を皮膚より培養した。継代に当たって 106 個の細胞を植え込む方式で

行った。集団倍加数(Population Doubling Level: PDL)は増殖した細胞数を植え込み細胞数で除して求め、 $2n$ として表現した。細胞培養はウシ胎児血清を添加した DMEM を用いて  $37^{\circ}\text{C}$ で行った。

## 2. 継代各期における染色体数の解析:

不死化が明らかになった WSKA102 細胞の培養の各期で染色体数を調べた。指数関数的に増殖を示す細胞に 0.02%の濃度で colcemid を処理し、定法により染色体数を調べた。

## 3. 細胞の造腫瘍性の検討:

200PDL を越え不死化したと判定された WSKA102 細胞の 107 個をヌードマウス皮下に移植した後、週に 1 回観察しその大きさを計測した。

## 4. WRN 遺伝子の変異部位と発現量の検出:

WRN 遺伝子の変異部位の検出は MASA (Mutant allele specific amplification) 法 (2) を用いて行った。また、MASA 法で検出されなかった場合でも点突然変異の存在が疑われるため、WRN 遺伝子の cDNA の塩基配列を定法により決定した。WRN 遺伝子の mRNA 発現量の解析は半定量的 RT-PCR 法を用いて行い、 $\beta$ -actin の発現量を標準として PCR 反応がプラトーに達しない条件で定量化した。

5. western blotting による WRN、p53 タンパクおよび SV40 Large T 抗原の検出: WRN タンパクの検出にはエイジーン研究所の杉本博士より恵与された抗 WRN 抗体を用い、P53 タンパクの検出には Santa Cruz 社の抗 p53 抗体を用いて western blotting を行った。一方、抗 T 抗原抗体(Oncogene Science)で SV40 Large T 抗原の有無を検出した。

## 6. PCR による microsatellite 多型の検出:

D3S1261-F および D3S1261-R を primer として用い、各種継代期にある WSKA102 細胞の遺伝子多型を解析した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞の継代培養:

培養条件下で典型的な WS 細胞 4 種類は、これまでの報告通り年齢をそろえた正常ヒト細胞に比べて非常に低い増殖能を示した。一方、WS を疑われた WSKA102 細胞の増殖は 740 PDL に達している。

### 2. 染色体数解析:

不死化した WSKA102 細胞の PDL 2.9、6.9、32.1 の各継代期において染色体数の分布を調べたところ、継代の初期 (PDL 2.9) では正常ヒトと同様に 46 本の核型を示したが、PDL 6.9 では最頻値は 46 本にあるものの 4 倍体を示す細胞が増加する傾向にあった。さらに PDL 32.1 では最頻値が 50 本台に移動し、異数化が観察された。

### 3. ヌードマウス背部皮下移植による造腫瘍性の検討:

培養系において基質非依存性増殖能を獲得した不死化 WSKA102 細胞が、218PDL に達した時点で細胞をマウス皮下に移植した。2 週間観察したところ 3 匹中 2 匹に WSKA102 細胞に由来する腫瘍が観察された。

### 4. MASA 法による突然変異部位 1、4、6 の解析:

解析の結果、典型的な WS 細胞として用いた 4 種類の細胞のうち 3 種類までが最も頻度の高いとされている突然変異部位 4 の同型接合体であった。一方、WSKA102 細胞では、突然変異部位を同定

できなかった。

#### 5. 半定量的 RT-PCR による WRN 遺伝子発現量の定量化：

多くの突然変異遺伝子において、その発現量の低下が報告されているため、RT-PCR を用いて WRN 遺伝子 mRNA 量の定量化を試みた。発現量の低下が認められれば、WRN 遺伝子またはその発現調節領域に突然変異が存在することを示唆される。その結果、4. において突然変異が同定された WS 細胞については WRN 遺伝子 mRNA 量の明らかな低下が認められたが、WSKA102 細胞では、WRN の mRNA 量の低下は全く検出できなかった。

#### 6. WRN 遺伝子 cDNA の塩基配列の解析：

培養の初期及び不死化した WSKA102 細胞の cDNA の塩基配列を検討したところ、2592 と 3453 番目の塩基が何れも T→C に変異していた。しかし、この変異は正常ヒトに見られる多型であることが報告されているものであった。また、培養初期からこの多型は観察され、不死化した時点でも保存されていた。

#### 7. western blotting による各種タンパクの定量的検出：

WRN タンパクについては正常細胞において発現量の少ないことが知られている。エイジーン研究所より分与された鋭敏な抗 WRN モノクローナル抗体を用いて検討したところ、WSKA102 細胞株では正常ヒト細胞のそれと同程度の WRN タンパクが検出された。また p53 タンパクは不死化した WSKA102 細胞では欠損していたが、有限寿命を示した WSKA102 細胞株では p53 が検出された。一方、SV40 Large T 抗原は全ての WSKA102 細胞で検出されなかった。

#### D. 考 察

##### 1. WSKA102 細胞から不死化細胞の樹立・既樹立細胞株の混入やウイルス感染の可能性の検討：

3 回の独立した試行のうち 2 回にわたって WSKA102 細胞が不死化（無限増殖）したことが判明した。Li-Fraumeni 症候群由来細胞という例外があるものの、通常はヒト由来細胞は有限寿命を持ち、不死化しないことが我々を含めて様々な研究室で確認されている。

そこでまず SV40 ウイルスの感染の有無を疑い、Large T 抗原の検出を試みたが、不死化した WSKA102 細胞で SV40 ウイルス感染の証拠は検出されなかった。次に多くの実験に繁用されているヒト由来の HeLa S3 細胞の混入の可能性を考慮し、microsatellite 解析を行った。その結果、HeLa S3 細胞や有限寿命を示す正常ヒト由来 GUN-9F 細胞とは全く異なった泳動像が得られたので、この可能性も否定された。ちなみに、WRN の塩基配列解析から見出された多型は WSKA102 細胞の培養初期から不死化した時点に至るまで保存されていた。以上の結果から、WSKA102 細胞の不死化は既存の HeLa S3 細胞の混入や SV40 ウイルス感染によるものではないことが明らかになった。

##### 2. WRN cDNA の塩基配列の解析：

WSKA102 細胞の WRN 遺伝子には正常ヒトのそれと比較して、塩基配列の 2 カ所に変異が認められた。しかし変異はこれまでに報告されている遺伝的多型であることが判明した（6）。抗 WRN 抗体を用いた western blotting の結果、不死化した本細胞では WRN タンパクは正常に発現していることが明らかとなったので、本細胞が採取さ

れた供与者は WS 患者であったという可能性は否定された。

### 3. western blotting による p53 タンパクの解析：

前述のように WSKA102 細胞の長期培養 3 回の試行のうち、2 回で不死化細胞が樹立した。このことは本細胞には不死化などの変異の生じやすい性質が内在している可能性が指摘される。興味あることに Li-Fraumeni 症候群患者では p53 の片方の allele が変異しており、患者細胞の培養初期に p53 タンパクが欠失し、容易に不死化細胞が樹立されることが報告されている。本研究では、不死化した WSKA102 細胞では p53 タンパクが欠失し、有限寿命を示した細胞では p53 が検出された。また、RT-PCR 法により p53 mRNA 量を測定したところ、有限寿命を示した WSKA102 細胞の p53 mRNA 量は正常ヒト培養細胞のそれと差は認められなかった。以上のことから、WSKA102 細胞が Li-Fraumeni 患者由来である可能性は低いと考えられる。

### 4. WSKA102 細胞から不死化細胞の樹立・その過程に関する考察：

以上の結果から、WSKA102 細胞が不死化、造腫瘍性を獲得するに至った原因を特定することは難しい。WSKA102 細胞の培養初期に染色体不安定性が発現することにより、一部の細胞に p53 の欠失が生じ、それらの細胞が増殖上の優位を獲得して集団中に大勢を占め、ついには造腫瘍性を獲得するにいたったのではなからうか。いずれにしても、本研究において有限寿命を示した WSKA102 細胞における染色体不安定性の確認に加え、不死化細胞での Rb 遺伝子の発現、がん遺伝子発現、テロメア長の変動、テロメラーゼ活性

等に関する解析を行う必要があると考える。

### E. 結論

1. WSKA102 細胞の WRN 遺伝子には多型が観察されたものの、発現異常に関わる変異は見出されなかったことから、細胞供与者は WS ではないと判定された。

2. 従って、WSKA102 細胞の不死化は、突然変異 WRN によって招来される染色体不安定性 (7) に基づくものではない。

3. 不死化した WSKA102 細胞では培養の初期に染色体不安定性が観察され、p53 タンパクの欠失が生じた。造腫瘍性の獲得は不死化後に遅れて確認された。

4. 今後の課題として、有限寿命を示した WSKA102 細胞の核型解析を行って、染色体不安定性の有無を確認すること、p53 と同様に細胞の増殖制御に密接に関わっている Rb、がん遺伝子発現、テロメア等についても検討をする必要があると考える。さらに現在 WS 由来とされながら正常ヒト由来細胞の PDL をはるかに越える活発な増殖を示す複数の細胞が我々の研究室で培養されているので、これらに関しても同様な検討が必要であろう。

### F. 引用文献

- ① C.E. Yu, et al: Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, Vol. 272: 258-262. 1996.
- ② S. Takeda, et al: Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum. Mutat.*, Vol. 2: 112-117. 1993.

- ③ N. Suzuki, et al: DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25: 2973-2978. 1997.
- ④ S. Huang, et al: The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat. Genet.*, Vol. 20: 114-116. 1998.
- ⑤ J.W. Shay et al: Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cell Biol.*, Vol. 15: 425-32. 1995.
- ⑥ M.J. Moser, et al: WRN mutations in Werner syndrome. *Human Mutat.*, Vol. 13: 271-279. 1999.
- ⑦ D. Salk: In vitro growth studies of Werner syndrome cells: aberrant growth and chromosome behavior. *Basic Life Sci.*, Vol. 35: 419-426. 1985.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Y.N. Harada, N. Shiomi, M. Koike, M. Ikawa, M. Okabe, S. Hirota, Y. Kitamura, M. Kitagawa, T. Matsunaga, O. Nikaido, T. Shiomi, Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol. Cell Biol.*, 19: 2366-2372. 1999.
- ② H. Kobayashi, H. Morioka, K. Tobisawa, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaido, J.D. Stewart, E. Ohtsuka, Probing the interaction between a high-affinity single-chain Fv and a pyrimidine (6-4) pyrimidone photodimer by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, Vol. 38: 532-539. 1999.
- ③ M. Hada, G. Buchholz, T. Hashimoto, O. Nikaido, E. Wellman. Photoregulation of DNA photolyase in broom sorghum seedlings. *Photochem. Photobiol.*, Vol. 69: 681-685. 1999.
- ④ Y. Ishigaki, A. Takayama, S. Yamashita, O. Nikaido: Development and characterization of a DNA solar dosimeter. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, Vol. 50: 184-188. 1999.
- ⑤ T. Torizawa, K. Kato, H. Kobayashi, Y. Komatsu, H. Morioka, O. Nikaido, E. Ohtsuka, I. Shimada: Conformational multiplicity of the antibody combining site of a monoclonal antibody specific for a (6-4)photoproduct. *J. Mol. Biol.*, Vol. 290: 731-740. 1999.
- ⑥ N.U. Ahmed, M. Ueda, O. Nikaido, T. Osawa, M. Ichihashi. High level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after single dose of ultraviolet radiation. *Brit. J. Dermatol.*, Vol. 140: 226-231. 1999.
- ⑦ T. Torizawa, N. Yamamoto, T. Suzuki, K. Nobuoka, Y. Komatsu, H. Morioka, O. Nikaido, E. Ohtsuka, K. Kato, I. Shimada. DNA binding mode of the Fab fragment of a monoclonal antibody specific for cyclobutane pyrimidine dimer. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 28: 944-951. 2000.

## ヒトの老化と体細胞突然変異に関する研究

平井 裕子 (放射線影響研究所・放射線生物学部 主任研究員)

体細胞突然変異の蓄積が老化に伴う疾患の原因になっているか否かを明らかにするために、原爆被爆者の好中球 FcγレセプターIII (FcγRIII) 遺伝子座における突然変異体頻度(Mf)を測定した。その結果、Mfは加齢および癌発生率と統計的に有意な正の相関を示した。Mf が平均より10倍以上高い対象者では、調べた変異細胞の mRNA の発現異常より、変異細胞がクローナルに増殖したことが示唆された。

### A. 研究目的

老化は体細胞遺伝子の突然変異の蓄積により生じるという仮説が提唱されてきたが、ヒト体細胞突然変異が個体の老化と寿命の短縮の原因になっているという直接的証拠は得られていない。この仮説を検証するために、我々は原爆被爆者という固定集団について、血液細胞の突然変異と各種疾患発生との関係を長期にわたり調べてきた。これまでに、赤血球のグリコフォリン A (GPA) 遺伝子座突然変異体頻度 (Mf)、リンパ球のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座および T 細胞抗原レセプター (TCR) 遺伝子座の Mf と癌発生率の関係を解析し、Mf の上昇と共に癌発生率が増加することを明らかとした。この関係は、特に赤血球 GPA Mf で統計学的に有意な相関を示した。赤血球の末梢血中での半減期は約 120 日と短く、赤血球の Mf は、骨髓幹細胞に生じた異常を反映していると考えられる。この結果が、赤血球に特異的な現象であるか否かを検証するために、本年度、骨髓幹細胞における Mf を反映する測定法として、末梢血好中球(末梢血中での半減期 6~8 時間)FcγRIII 遺伝子座における Mf を、約 600 名の原爆被爆者について測定し、年齢や発癌との関係を解析した。また、好中球は、赤血球と

異なり、遺伝子レベルでの変異を解析することが可能である。Mf が平均より10倍以上高い9名の対象者の突然変異細胞の mRNA の発現異常を調べた。

### B. 研究方法

1. 好中球 FcγRIII 遺伝子座における Mf の測定: FcγRIII 遺伝子座には NA1 および NA2 の共優性対立遺伝子が存在する。NA1/2ヘテロの人の末梢血多形核白血球を抗 NA1 抗体と抗 CD16 抗体 (NA1、2 の共通部分を認識する) で二重染色後、フローサイトメーターを用いて NA1 抗原の発現を失った変異体好中球 (NA1<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) の頻度 (Mf) を求めた。
2. 統計解析: Mf と発癌リスクの相関関係を多変量解析 (Mf、性、年齢、被爆線量を変量とする) により推定した。
3. Mf と寿命: Mf を測定した人のうち、死亡した人について死亡時年齢と Mf の関係を多変量解析した。
4. 変異細胞の mRNA の検出: NA1 抗原を欠損した変異細胞をフローサイトメーターを用いて 1 細胞ずつソーティングし、RT-PCR 及び SSCP 法を行い、NA1 の cDNA の正



常な band が認められるか否かを調べた。  
倫理面への配慮:放射線影響研究所の人権擁護委員会の基準を遵守して研究を行っており、個人が特定されるような発表形式は禁止されている。全ての血液サンプルは、被爆の影響を調査する目的である事を説明の上、本人の承諾を得て採取した。

### C. 研究結果

FcyRIII の Mf は加齢と有意な相関を示した。Mf を測定した584名のうち癌の既往歴を持つ人は125名(21.5%)であった。発癌リスクは Mf の増加とともに統計的に有意に上昇した( $p < 0.04$ )が、被爆線量による影響は認めなかった。

死亡時年齢と Mf に、統計的有意差は認められなかった。死亡群と生存群に分けて Mf を比べたが有意な結果は得られなかった。

FcyRIII Mf が平均より10倍以上高い、9名の対象者の突然変異細胞を調べたところ、1名を除いて、調べた細胞(10-30細胞/人)すべてに FcyRIII mRNA の発現が観察されなかった。正常な Mf を示した8名の対象者の突然変異細胞では、異常な mRNA が確認できる変異細胞が必ず存在し(7-25%/人)、調べた突然変異細胞すべてにおいて mRNA が欠損しているということはなかった。

### D. 考察

体細胞突然変異体頻度は年齢とともに上昇するが、その蓄積が老化に直接関与しているか否かは明かではない。それを明らかにするためには、体細胞突然変異と老化に伴う疾患の発生や寿命との関係を調べる必要があると考える。

我々がこれまでに測定した Mf は、いずれも

加齢に伴ない有意に上昇することを報告している(1)。一昨年より、老化に伴う疾患の一つである癌の罹患リスクが血液細胞の Mf と相関があるか否かを解析している。その結果、赤血球 GPA Mf が癌のリスクと相関することを初めて示し、GPA 遺伝子は発癌に直接関係した遺伝子ではないが、個人の癌関連遺伝子の Mf を間接的に反映していることを示唆した。この現象が赤血球 GPA に特異的なことであるか否かを調べるために、リンパ球の Mf と発癌リスクの関係を解析したが、GPA Mf ほど有意な関係は認められなかった。その原因の一つとして、赤血球は末梢血での半減期が約 120 日と短く、測定している突然変異細胞が骨髓幹細胞に生じた異常を反映しており、突然変異頻度と突然変異細胞頻度が等しいと考えられるが、リンパ球は末梢血での半減期が 3-4 年と長く、リンパ球の突然変異細胞が末梢血でクローナルに増殖している場合があり、Mf が高いのは必ずしも突然変異の頻度が高いのではなく、突然変異細胞の頻度(割合)が高いだけで、突然変異の頻度としては正常の可能性もある。しかし、個々の対象者について、クローン性の増大を調べることは困難である。そこで、赤血球と同様、骨髓幹細胞に生じた突然変異を測定する方法を開発し、本年度 584 名について Mf を測定し、Mf は年齢および発癌リスクとともに統計的に有意に増加した。この結果は、骨髓幹細胞に生じた突然変異は、赤血球のみならず、発癌と関連することが示唆された。血液細胞の Mf の疫学的調査におけるバラツキの要因の一つとして、リンパ球では、クローン性の増殖が考えられており、突然変異頻度と突然変異細胞頻度の違うことが示されてきた。好中球の突然変異細胞の mRNA の解析結果からすると、骨髓幹細胞由来の細胞においても、ク

ローン性の増大が示唆され、バラツキの要因と  
考えられる結果であった。

体細胞突然変異の蓄積と老化の関係に、より  
明確な結論を得るためには、疾患や死亡年齢と

#### E. 結論

1. 好中球 FcγRIII 遺伝子座の Mf は加齢ととも  
に有意に増加した。
2. 好中球 FcγRIII 遺伝子座の Mf と癌の発生  
率は統計的に有意な正の相関を示した。
3. 好中球 FcγRIII 遺伝子座の Mf と死亡年齢  
には相関は認められなかった。
4. FcγRIII Mf が平均より10倍以上高い対象  
者では、調べた変異細胞すべてに mRNA  
が欠損しており、一つの変異幹細胞がクロ  
ーン性に増大したことが示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) Akiyama M, Kyoizumi S, Hirai Y, et al.:  
Mutation frequency in human blood cells  
increase with age. *Mutat. Res.* 338: 141-149,  
1995

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) BAN S, HIRAI Y, et al.: Radiosensitivity  
of BRCA1- or BRCA2-defective cultured  
human cancer cells. In 'Proceedings of The  
third Japan-France Workshop on Radiobiology,  
Imaging and environmental Sciences' (Ed. A.  
Syrota and S. Tanada), (ISBN 4-938987-08-  
2), pp18-24, NIRS, Chiba, 1999

##### 2. 学会発表

- 1) MIZUNO T, ASAKAWA J, KODAIRA M,  
HIRAI Y, et al.: Analysis of genes abnormally

Mf との関係について、長期にフォローアップし、  
解析することが必要である。

expressed in human papillary thyroid carcinomas  
by two-dimensional differential display. The 42<sup>nd</sup>  
Japan Thyroid Association, 1999, Nagoya

2) BAN S, HIRAI Y, et al.: Radiation sensitivity  
of BRCA1- and BRCA2-defective cultured human  
cancer cells. The 3<sup>rd</sup> Japan-France Workshop on  
Radiobiology, Imaging and Environmental Sciences,  
1999, Chiba

3) BAN S, HIRAI Y, et al.: BRCA1 and RAD51  
expression and radiation sensitivity of cultured  
human breast cancer cells. The 58<sup>th</sup> Annual  
Meeting of Japanese Cancer Association, 1999,  
Hiroshima

#### H. 知的所有権取得状況

なし

## 老化と DNA 修復機構並びに変異の蓄積に関する研究

若林敬二

(国立がんセンター研究所 がん予防研究部)

ノルハルマンは S9 mix 存在下でアニリンと反応させると両者の複合体であるアミノフェニルノルハルマン(APNH)が生成する。APNH の生成に関与する S9 mix 中の酵素は、microsome 画分に存在し、NADPH の存在が必須であること、及び SKF-525 によりその反応が抑制されることなどから Cytochrome P-450 であることが示唆された。一方、APNH を S9 mix の存在下で *S.typhimurium* YG1024 と反応させると、ノルハルマンとアニリンの共存下に認められた DNA 付加体と同一のパターンを示し、これら付加体は deoxyguanosine との付加体であることがわかった。

### A. 研究目的

タバコ煙や加熱食品中に存在するノルハルマン(9H-pyrido[3,4-b]indole)は S9 mix の存在下でアニリンと共存させるとサルモネラ菌に対して変異原性を示すようになる。この変異原性の発現は、ノルハルマンとアニリンが、S9 mix の存在下で反応して、複合体であるアミノフェニルノルハルマン(9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole, APNH)が生成し、これが DNA と付加体を形成することによると示唆されている。そこで、APNH 生成に関与する S9 mix 中の酵素及びその DNA 付加体の構造について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. ノルハルマンとアニリンの反応

ノルハルマン塩酸塩(4 mg)とアニリン塩酸塩(2 mg)をラット肝臓より調整した S9, 及びその microsome 画分、cytosol 画分と 37℃、20 分間、各々、反応させ APNH の生成の有無を HPLC により解析した。尚、SKF-525A は 1 及び 5 mM の濃度で反応液に添加した。

#### 2. APNH-deoxyribonucleotide 付加体の化学合成及び解析

NO<sub>2</sub>-APNH (4 μmol)を接触還元して NHOH-APNH に変換した後、等モルの無水酢酸を添加し、APNH の究極活性体である N-acetoxy-APNH を合成した。これと、3'-dAp, 3'-dTp, 3'-dGp, 3'-dCp を、各々、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)中で反応させた。生成し

た APNH-deoxyribonucleotide 付加体は、<sup>32</sup>P-ポストラベル法の改良標準法により解析した。

### C. 研究結果

#### 1. APNH の生成に関与する酵素

ノルハルマンとアニリンを S9, microsome 画分又は cytosol 画分と反応させ、APNH の生成について調べた。その結果、S9 及び microsome 画分を用いた場合に APNH の生成が認められた。また、この反応は S9 mix 中の補酵素である NADPH の非存在下では起こらないことから、APNH の生成には P-450 が関与していることが示唆された。次に、これを確かめるために、P-450 の阻害剤である SKF-525A を反応液に添加し、APNH の生成が抑制されるか否かについて検討した。その結果、ノルハルマンとアニリンからの APNH の生成が SKF-525A 添加により約 40%に抑制されることがわかった。これらのことから、ノルハルマンとアニリンは S9 mix 中の P-450 の働きにより結合して APNH を形成していることが推測された。

#### 2. APNH-deoxyribonucleotide 付加体の解析

APNH の究極活性体である N-acetoxy-APNH と 4 種の核酸 (3'-dAp, 3'-dTp, 3'-dGp, 3'-dCp) を反応させ、生成した

付加体を <sup>32</sup>P-ポストラベル法により解析した。その結果、N-acetoxy-APNH を 3'-dAp, 3'-dTp, 3'-dGp と反応させた場合には付加体の形成は認められなかった。一方、3'-dGp と反応させた場合には 3 個の付加体スポットが検出された。このとき得られた TLC パターンは、ノルハルマンとアニリンを S9 mix 存在下でサルモネラ菌と反応させた時に得られた TLC パターンと一致していた。このことから、APNH-DNA 付加体は、deoxyguanosine との付加体であることがわかった。

### D. 考察

ノルハルマンのアニリン共存下における変異原性の発現は、新規変異原物質である APNH の生成によることが既にわかっている。今回、この APNH の生成に関与する酵素及び APNH-DNA 付加体がどの塩基との付加体であるのかについて検討を行った。その結果、APNH の生成に関与する酵素は、microsome 画分に存在し、かつ NADPH の添加が必須であること、及び SKF-525 によりその反応が約 40%に抑制されることなどから S9 mix 中の Cytochrome P-450 であることが示唆された。しかし、P-450 のどの分子種がノルハルマンとアニリンの結合に関与しているのかについてはまだわかっていない。

APNH の究極活性体とデオキシリボヌクレオチド-3'-モノリン酸を反応させると、3'-dGp と反応させた場合にのみ3個のDNA付加体スポットが検出された。また、このDNA付加体パターンはS9 mix存在下にノルハルマンとアニリンをサルモネラ菌に反応させた時に認められたパターンと同一であった。このことから、ノルハルマンとアニリンの共存下に生成されるDNA付加体は、APNHとdeoxyguanosineとの付加体であることが示唆された。今後は、このAPNH-guanine付加体の構造について検討する予定である。

#### E. 結論

S9 mix中のCytochrome P-450の作用により、ノルハルマンとアニリンが反応して変異原物質であるAPNHが生成されることが示唆された。また、そのDNA付加体はdeoxyguanosineとの付加体であることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Quantification of the co-mutagenic  $\beta$ -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. Totsuka Y., Ushiyama H., Ishihara J., Sinha R., Goto S., Sugimura T. and Wakabayashi K., *Cancer Lett.*, **143**, 139-

143, 1999.

##### 2. 学会発表

新規変異原物質、aminophenylnorharman (A<sub>Ph</sub>NH)及びaminomethylphenylnorharman

(A<sub>Me</sub>PhNH)のF344ラットに対する急性毒性

戸塚ゆ加里、川森俊人、石原純子、杉村隆、若林敬二

第58回日本癌学会総会

ノルハルマンのco-mutagenesis原因物質、aminophenylnorharmanによるDNA付加体生成

戸塚ゆ加里、塩谷岳樹、石原純子、杉村隆、若林敬二

第28回日本環境変異原学会

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

19990202

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**Activation of telomerase is induced by a natural antigen in allergen-specific memory T lymphocytes in bronchial asthma.**

Haruta Y, Hiyama K, Ishioka S, Hozawa S, Maeda H, Yamakido M  
Biochem Biophys Res Commun 1999 Jun 16 ; 259(3) : 617-23

**Alternative splicing, but not allelic loss, of the FHIT gene increases with development of lung cancer.**

Sato H, Hiyama K, Ishioka S, Maeda H, Yamakido M  
Int J Oncol 1999 Jul ; 15(1) : 81-8

**Telomerase activity in the synovial tissues of chronic inflammatory and non-inflammatory rheumatic diseases.**

Yamanishi Y, Hiyama K, Ishioka S, Maeda H, Yamanaka T, Kurose Y, Yamakido M  
Int J Mol Med 1999 Nov ; 4(5) : 513-7

**テロメア・テロメラーゼ研究の進歩.**

山木戸道郎

テロメアテロメラーゼ. 山木戸道郎編著、pp.1-8、日本医学館、1999

**Analysis of 8-hydroxyguanine in rat kidney genomic DNA after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate.**

Nomoto M, Yamaguchi R, Kawamura M, Kohno K, Kasai H  
Carcinogenesis 1999 May ; 20(5) : 837-41

**Increased 8-hydroxyguanine in DNA and its repair activity in hamster and rat lung after intratracheal instillation of crocidolite asbestos.**

Yamaguchi R, Hirano T, Ootsuyama Y, Asami S, Tsurudome Y, Fukada S, Yamato H, Tsuda T, Tanaka I, Kasai H  
Jpn J Cancer Res 1999 May ; 90(5) : 505-9

**Deficient nucleotide excision repair increases base-pair substitutions but decreases TGGC frameshifts induced by methylglyoxal in Escherichia coli.**

Murata-Kamiya N, Kaji H, Kasai H  
Mutat Res 1999 Jun 7 ; 442(1) : 19-28

**The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein.**

Fujikawa K, Kamiya H, Yakushiji H, Fujii Y, Nakabeppu Y, Kasai H  
J Biol Chem 1999 Jun 25 ; 274(26) : 18201-5

**Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles.**

Tsurudome Y, Hirano T, Yamato H, Tanaka I, Sagai M, Hirano H, Nagata N, Itoh H, Kasai H  
Carcinogenesis 1999 Aug ; 20(8) : 1573-6

**Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs.**

Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y  
Mol Biol Cell 1999 May ; 10(5) : 1637-52

**Multi-forms of human MTH1 polypeptides produced by alternative translation initiation and single nucleotide polymorphism.**

Oda H, Taketomi A, Maruyama R, Itoh R, Nishioka K, Yakushiji H, Suzuki T, Sekiguchi M, Nakabeppu Y

Nucleic Acids Res 1999 Nov 15 ; 27(22) : 4335-43

**Functional significance of the conserved residues for the 23-residue module among MTH1 and MutT family proteins.**

Fujii Y, Shimokawa H, Sekiguchi M, Nakabeppu Y

J Biol Chem 1999 Dec 31 ; 274(53) : 38251-9

**Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells.**

Hayakawa H, Hofer A, Thelander L, Kitajima S, Cai Y, Oshiro S, Yakushiji H, Nakabeppu Y, Kuwano M, Sekiguchi M

Biochemistry 1999 Mar 23 ; 38(12) : 3610-4

**Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease.**

Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y, Mizuno Y

Ann Neurol 1999 Dec ; 46(6) : 920-4

**Conformational multiplicity of the antibody combining site of a monoclonal antibody specific for a (6-4) photoproduct.**

Torizawa T, Kato K, Kato J, Kobayashi H, Komatsu Y, Morioka H, Nikaido O, Ohtsuka E, Shimada I

J Mol Biol 1999 Jul 16 ; 290(3) : 731-40

**Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods.**

Totsuka Y, Ushiyama H, Ishihara J, Sinha R, Goto S, Sugimura T, Wakabayashi K

Cancer Lett 1999 Sep 1 ; 143(2) : 139-43



Y. Ishigaki, A. Takayama, S. Yamashita, O. Nikaido: Development and characterization of a DNA solar dosimeter. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, Vol. 50: 184-188. 1999.

Y.N. Harada, N. Shiomi, M. Koike, M. Ikawa, M. Okabe, S. Hirota, Y. Kitamura, M. Kitagawa, T. Matsunaga, O. Nikaido, T. Shiomi, Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol. Cell Biol.*, 19: 2366-2372. 1999.

H. Kobayashi, H. Morioka, K. Tobisawa, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaido, J.D. Stewart, E. Ohtsuka, Probing the interaction

BAN S, HIRAI Y, et al.: Radiosensitivity of BRCA1- or BRCA2-defective cultured human cancer cells. In 'Proceedings of The third Japan-France Workshop on Radiobiology, Imaging and environmental Sciences' (Ed. A. Syrota and S. Tanada), (ISBN 4-938987-08-2), pp18-24, NIRS, Chiba, 1999

Kamiya, H. and Kasai, H.  
Preparation of 8-hydroxy-dGTP and 2-hydroxy-dATP by a phosphate transfer reaction by nucleoside-diphosphate kinase. *Nucleosides & Nucleotides*, 18, 307-310, (1999)

Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Karino, N., Ueno, Y., Kaji, H., Matsuda, A. and Kasai, H.  
Formation of 5-formyl-2'-deoxycytidine from 5-methyl 2'-deoxycytidine in duplex DNA by fenton-type reactions and  $\gamma$ -irradiation. *Nucleic acid Res.* 27, 4385-4390 (1999)

Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y. and Kasai, H. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.*, 274 (26) 18201-18205 (1999)