

平成25年度 放射線影響研究功績賞受賞業績の概要

放射線影響の病理学

東北大学加齢医学研究所
福本 学

はじめに

放射線の細胞影響として、急性障害としての細胞死と晩発影響としての発がんが挙げられる。古典的な考え方は、放射線の第一義的な標的は遺伝情報をコードしているDNAであり、放射線によってDNAに変異が起こっても修復されなければ、DNA複製を通して変異は固定される。その変異が細胞の生存に関わるならば細胞死が、生存に有利な変異ならばがん化が起こる、というものである(図1左)。我々は、トロトラスト被注入患者の病理検体を用いて、内部被ばくによる発がんの分子機構を解析した結果、古典的な単純明快なものではなく、標的臓器内で起こる複雑な生物応答の結果発がんに至ることを明らかにした。更に複雑なことに、トロトラスト誘発がんの解析は発がん過程ばかりでなく、がん化後も引き続いて起こった長期微量被ばくによる修飾が積み重なった結果をみていることである。その延長として、トロトラスト誘発がんは放射線耐性がん細胞であると考えに至った。そのため、放射線耐性がん細胞株の樹立とその耐性の分子機構の解明を行っている。2011年3月11日、東日本大震災の結果、東京電力福島第一原子力発電所(福島第一原発)の冷却系破損、炉心溶融そして放射性物質の環境中への飛散事故が起こった。そのため、福島第

一原発から半径20km圏内が警戒区域に設定され、入域が厳しく制限された。我々は、「福島原発被災動物の包括的線量評価事業」を立ち上げ、域内に残置され野生化した家畜を中心として内部被ばく資料アーカイブの構築と生物影響調査を行っている。全てが、わが国でしか成し遂げられない放射線影響研究である。

トロトラスト症肝悪性腫瘍

トロトラストは、自然 α 線源である二酸化トリウムのコロイド溶液で、第二次世界大戦中に傷痍軍人に血管造影剤として使用された。注入後、主に肝臓に沈着し、生物学的半減期は400年とされている。肝は生涯にわたって α 線被ばくを受けるため、投与されてから数十年して肝に悪性腫瘍が発生した。肝腫瘍として、通常の肝細胞癌ではなく、肝内胆管癌と血管肉腫の頻度が高いことが特徴的である。旧厚生省によって定期的に健診を受けて、解剖例は、パラフィンブロックと共に、沈着量や被ばく量など詳細なデータが揃っている。(http://www2.idac.tohoku.ac.jp/misc/thorotrast/)そのため、トロトラスト剖検例はヒトにおける高LET放射線内部被ばくによる発がん機構を解明するために不可欠な試料である。放射線発がんは従来考えられていたような、放射線によるDNAの

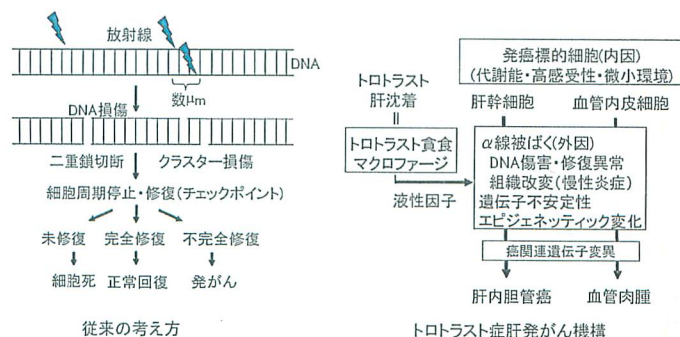


図1 放射線による発がん機構

傷害・修復異常による遺伝子変異の固定という単純な機構ではなく、被ばく組織の改変や炎症など、生体側の反応が発がんに関与していることを明らかにした(図1右)。トロトラストによる内部被ばくでは、トロトラストが臓器内で不均等に分布しており、 α 線の飛程が $80\mu\text{m}$ と短いため、 α 線に被ばくした細胞は飛程の外へ移動し、そこで発がんに必要なステップを重ねることによりがん化すること、発がんに至る細胞は、被ばくの標的細胞と言うよりも、組織内の幹細胞であること、トロトラストの肝からの排泄能が相対的に高いと肝内胆管癌、低いと血管肉腫のリスクが高いことも明らかにした(1)。

臨床的放射線耐性(Clinically relevant radioresistant, CRR)がん細胞の樹立と解析

放射線療法は、外科的手術や化学療法とは異なり、全身への影響が少ない上、腫瘍周囲の機能を温存することが可能である。大線量の放射線に被ばくすれば、どんな細胞でも死滅する。そのため標準的な放射線療法は分割照射による1クールが1日2Gy、5日/週総計60-80Gyからなっている。これは、1回照射では生き残る線量であり、正常細胞ががん細胞よりも放射線障害からの回復が起こりやすいという経験から割り出した照射量の長期被ばくということになる。標準的放射線療法であるX線2Gy/日の分割照射を30日以上続けても安定して増殖し続けるCRR細胞を樹立し、放射線誘発細胞死機構や耐性機構を解析している(図2 SAS-R耐性細胞)。がんが放射線療法に抵抗性の場合、耐性細胞が生き残ったのか、それとも耐性を獲得したのか。さらに、放射線治療後に再発した

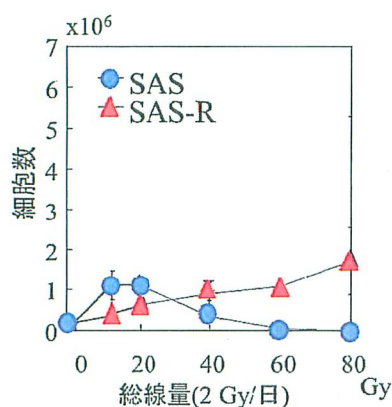


図2 CRR細胞の樹立

がんは果たして放射線耐性か、より悪性度が増加しているか。正常細胞がなぜがん細胞よりも回復しやすいのか。急性の細胞死と晩発性の発がんを直接結びつけるような研究は今までになされてきたであろうか。すなわち、死なない程度の慢性被ばくは急性被ばくに対する生物反応の単なる積み重ねであろうか。これらの疑問に答えを出すことによって、治療すべきがんが通常の放射線療法に有効か否か、再発するか否かが治療前に予測可能となる。そうすれば耐性細胞の出現を抑えたり、出現した耐性細胞を効率よく死滅させることも可能となる。さらに放射線療法によって誘発される二次癌の可能性も予測できる。放射線耐性細胞のモデルの樹立と中線量慢性被ばくの細胞影響解析は、今まで手つかずであり、放射線療法に伴う細胞の形質変化の解明につながる極めて挑戦的な研究であると考えた。従来、安定した放射線耐性細胞株の樹立は不可能であると考えられてきた。今までに解析の対象となった、所謂放射線耐性細胞は、ある一定の放射線を照射して生き残った細胞である。従って、これらの細胞集団の中には分裂を停止しただけの細胞など様々な細胞が含まれており、明らかに均一な集団ではない。また、比較している細胞同士のゲノム背景が同一ではないという大きな問題点もある。我々の目的は放射線療法に対する耐性と局所再発に関するマーカー、放射線療法の分子標的を探索することである。単純な実験系とするため、親細胞株からゲノム背景が同一である耐性細胞の樹立を行うことにした。細胞は大線量の放射線に被ばくすれば死滅してしまうため、CRR細胞の樹立を目標とした。試行錯誤の結果、培養がん細胞はX線0.5Gy/12時間の分割照射なら死なないことが分かってから、6年以上かけて照射量を漸増した結果、CRR細胞を複数の独立した細胞株から樹立することに成功した。ここで大きく二つの疑問が出てくる。ひとつは、元来、耐性細胞が親株内に存在し、照射によって耐性細胞が選択されるのか、獲得性に耐性となるのかである。もうひとつは、現在も毎日2Gyを耐性形質の維持線量として照射し続けているが、それによってゲノムがズタズタになってしまい、耐性と無関係な変化が加わるため、いくら解析しても耐性に関与した分子はみつからないのでは、という疑問である。前者に対しては、再現性をもってX線2Gyの30日間照射で親細胞株は死滅してしまうため、耐性は獲得性であることは明らかである。

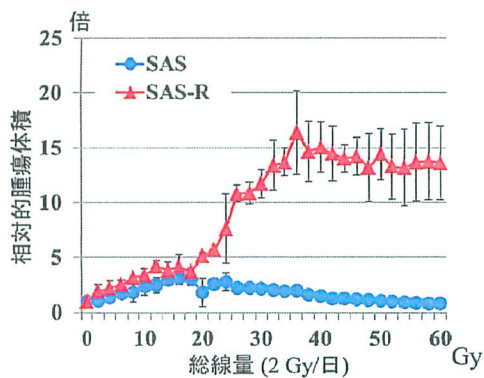


図3 CRR細胞由来腫瘍も放射線耐性

後者に対しては、CRR細胞は、DNA二本鎖修復の効率がよいこと、アレイCGHの結果、集団としては安定な核型であること、さらにある一定の細胞死が検出されることから維持照射によって一定の集団が選択維持されていると考えられる。CRR細胞をヌードマウス皮下に移植して形成された腫瘍も2 Gy、30日の照射に抵抗性なため、細胞の耐性形質が腫瘍の耐性に反映されていることを明らかにした(図3)。しかし共通して耐性細胞由来の腫瘍組織の方が血管密度が有意に高く、低酸素領域の方が耐性であることと矛盾することがわかった。血管新生阻害剤であるmTOR経路阻害剤で放射線耐性が消失することを明らかにした(2)。また、放射線による主な細胞死がアポトーシスではなく誘導オートファジーであることを明らかにした。抗癌剤であるドセタキセルと交叉耐性を示すが耐性に関わる機構はことなり、放射線耐性の維持におけるワールブルク効果の関与は複雑であるらしいことも明らかになってきた。

獲得放射線耐性 (Acquired radioresistant, ARR) がん細胞の解析

死なない程度、すなわち回復可能な線量(中線量)の長期分割放射線に対する細胞の反応は短期被ばくに対する反応の単なる積み重ねか、である。さらに中線量被ばくに対して正常細胞とがん細胞では反応が異なるのか、正常細胞がいつがん化に向かうのかである。培養細胞に中線量であるX線0.5 Gy/12時間の分割照射を31日間行ったところ、CRRほどではないがコロニーアッセイで明らかな放射線耐性を獲得し、これをARR形質と定義した。G1/S移行期の細胞周期制御に関与しているサイクリンD1タンパクの過剰発現がARRをもたら

していた。丹念に発現タンパクを解析したところ、AKTの持続的な活性化とその基質であるglycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)の持続的な不活性化によって、サイクリンD1の分解阻害が起こっていることを明らかにした。これらの事実は分割照射による放射線療法によって、がん細胞が1月以内に不可逆的に放射線耐性になり得ること、エピジェネティックな変化によって起こり得ること、ARR細胞は放射線療法とAKT/GSK3 β /cyclinD1経路を標的とした薬剤によって克服可能なことを示唆している。

東京電力福島第一原子力発電所に伴う被災動物の包括的線量評価

福島第一原発から半径10-20km圏内で、南東の川内村と北側の南相馬市のウシ臓器の採材が可能であった。Ge検出器で全ての試料でセシウム(Cs)-134、Cs-137のピークを認め、両者の放射能濃度は例外なく臓器によらずほぼ等しかった。末梢血と各臓器の放射性Cs濃度は相関しており、相関係数は臓器によって異なっていた。血中放射性Cs濃度を計測することによって各臓器別にCs濃度を推定できることになる。放射性Cs濃度は異なる部位の骨格筋間で有意差はなく、血中Csの21.3倍であった。心筋は横紋筋であるにも拘わらず骨格筋に比較して集積量は低かった。放射性セシウムは胎盤を通過して、臓器に関わりなく胎仔に母ウシの1.2倍高く集積すること、親仔では仔ウシに1.5倍高く集積することが明らかとなった。警戒区域内のブタ血中放射性セシウム濃度はウシの約1,000倍高かった。また、ウシにおいて銀-110mは全頭の肝に、短半減期のテルル-129mは腎特異的に検出されたが、ブタでは検出されなかった。集積する放射性物質の種類も量も種差が大きいことが明らかとなった。

おわりに

生物学的研究を考えてみると、我が国は欧米に引けを取らないところまで来ている。それどころか、iPS細胞のようにリードしている分野もある。しかし、主な投稿先雑誌が欧米にあり、日本人の英語のハンディは明らかである。そのような状況で我が国独自の成果を出し続ける方法はあるか、どうしたら続けられるかを考えた。手法は2通りである。ほんの少ししかない材料を地道に集めるか、一見不可能なことを根気でカバーするしか

い。世界で唯一の被ばく国である日本の研究者として、我々は放射線生物影響の研究の成果を常に世界に向けて発信し続けるべきである。トロトラスト症の病理試料は古くて劣化しており、PCRによるDNA増幅を安定して行なうコツを掴むまでに5年を要した。安定した形質としての放射線耐性細胞株の樹立は何故困難だったのだろうか。薬剤と異なる点は、放射線を持続的に照射しようと考えれば限りなく線量率を下げなければ細胞は死に絶えてしまうし、そのような低線量率では生物影響が現れにくい。しかし、ある程度の線量率で死なない程度の照射量では、照射時間は細胞周期のほんの瞬間に近い。すなわち、分割照射では死ぬべき細胞を殺しているだけのことで、内因性に耐性細胞や細胞周期の抵抗性であるS期にある細胞は生き残っていることになる。もし、線量率1 Gy/分のX線を2 Gy、1回/日照射すると、細胞周期が24時間の細胞ならば、 $60 \times 24 / 2 = 720$ 日間、毎日照射すれば細胞一個は細胞周期のどの期にあっても必ず被ばくしたことになる、感受性が細胞周期のみに依存しているならば、照射開始から720日目に細胞は全て死に絶えるはずであると概算した。山極・市川がタール癌を誘発するのに条件設定に5年、発がん法が確立してから、発がんに1年かかったのなら、もっと頑張れば良いではないか。地道に死ぬギリギリの線量を5年かければ耐性細胞が樹立できるだろうと思いついた。従来の研究は突然変異を導入し、放射線に対して死に易くなった細胞でどのような遺伝子に変異しているか、その遺伝子を補完することによって元の細胞と同程度の感受性に戻るかという手法は用いられていた。しかし、積極的に抵抗性を増加させる遺伝子の探索という手法は殆ど用いられてこなかった。CRRという概念を導入した結果、長期分割照射に対する細胞応答は短期照射の単なる積み重ねではなく、不可逆的な変化であるARRを伴う異なる反応であることを明らかにした。さらに本研究から、遺伝子変異によって感受性の増加した細胞は照射によって除かれるためにCRR細胞は集団として極めて安定であるという結論に至ったことは驚きとしか言いようがない。分割照射では各照射間にrepair、reoxygenation、repopulation、redistributionの4Rが誘導され、それらがどう寄与するかによって照射された細胞の運命が決まると

考えられている(3)。我々の研究から、もうひとつのR、resistanceを加える必要があることも明らかとなった。今後、放射線の急性影響である細胞死と晩発影響である発がんが結びつくはずである。これらの研究を通して私たちは、積極的に治療に関わる、治療放射線病理学を目指している。被災動物線量評価事業では、警戒区域内への入域許可を得るまでに行政との折衝に3ヶ月を要した。その間に短半減期の放射性核種は検出不可能となってしまった。さらに大変であったことは、突然起こった重大事故に立ち向かうために全く研究費がなく、あったのは膨大な借金と、今やらなければ何時できる、他に誰ができる、次世代に役立つこと、日本の科学力を世界に示さねばという熱意、そしてこの研究を立ち上げた仲間であった。

中線量以下の放射線は、被ばく直後ではなく、潜伏期間をおいてから生物影響が出現する不思議に満ちている。それだけに解析が難しく、結果が出るまでに時間もかかる。若い研究者が倦むことなく微速でも前進できる環境作りとモチベーションの醸成が必要であり、条件を整えることは我々の使命でもある。

参考文献

1. 福本 学.: 放射線病理学：トロトラスト症から、*病理と臨床* 29(7) :761-8, 2011.
2. Kuwahara Y et al.: Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors. *Cancer Med* DOI : 10.1002/cam4.185, 2014
3. Withers HR.: Biological basis of radiation therapy for cancer. *Lancet* 339(8786) :156-91, 1992.
4. Fukumoto M.: Radiation Pathology: from Thorotrast toward the Future though Radioresistance. *Pathol Int*, 2014. (accepted for publication) (全体をまとめた)

謝辞

本功績賞をいただくことができたのは、今までに目標を共有することができた多くの共同研究者と研究助成のお陰です。深謝致します。