

がんを予防するひとつのヒント：酸化了的 DNA 損傷と修復機構の話

平野 雄（管理栄養学科・教授）

はじめに

8-オキソグアニン（以下8-oxo-Gua）は、核 DNA およびミトコンドリア DNA 中のグアニンに、活性酸素が作用した結果生じる酸化損傷であり（図1）、これまでの研究により、がんや糖尿病などの疾病発症と密接に関わっていることが示されている。特に、ミトコンドリアは、酸素代謝の中心部位であるため、このような酸化了的 DNA 損傷を受けやすい。

一方、私たちの身体には、8-oxo-Gua に対する修復酵素 OGG1 が備わっていて、遺伝子の変異を未然に防いでくれている。つまり、私たちの遺伝子は、常に損傷と修復のせめぎ合いにあり、その力関係によって、遺伝子変異が生じ、時に、その遺伝子変異が、細胞を発がんなどの疾病へと導いてしまう。故に、これら遺伝子変異研究の知見を、実生活に反映させることは、疾病予防の観点から、極めて重要である。今回は、この発がんメカニズムにおける、8-oxo-Gua の役割を中心に述べ、如何にすれば、がんなどの疾病発症のリスクを低減できるかについてのヒントを考えていく。

遺伝子に損傷を与えるような外来性、内在性因子を検索し、その作用機序を解明することは、この分野の研究の第一歩として必要である。私たちの周囲には、様々な外来性因子（環境因子）が存在し、遺伝子変異のリスクを高めている。このような、環境中の遺伝子を変異させるような因子を、環境変異原と呼ぶ。一方、内在性因子には、遺伝子多型が挙げられ、DNA 修復機能にとって、極めて重要な役割を担っている。これら外来性および内在性因子は、がん、神経変性疾患、糖尿病などといった、日常的にしばしば遭遇する重篤な疾患の誘因となる。それ故、これら環境変異原、塩基損傷、および、DNA 修復機構の全体像を明らかにすることには、大きな意義がある。

活性酸素とは

環境中には、安定した酸素分子のみならず、ラジカルな酸素分子（スーパーオキシドラジカル、過酸化水素、一重項酸素、ヒドロキシラジカルなど）が存在しており、それらを総称して、活性酸素と呼んでいる。私たちの身体は、常に活性酸素の脅威に晒されている。身体を構成している、タンパク質、脂質、核酸などは、日常的に酸化され、傷つけられている。一方、これらの酸化障害に対して、私たちの身体には、対抗する酵素などの生体内物質が存在している（表1）。

表1 代表的な生体内活性酸素消去物質

SOD	Cys のチオールの化学的反応性により、活性酸素種 (O_2^- , H_2O_2 , $-OH$ 等) を還元的に消去。glutathione peroxidase (GPx) や glutathione S-transferase (GST) の補酵素として、 H_2O_2 や過酸化脂質などの解毒代謝を行なう。
-----	---

カタラーゼ	過酸化水素を、 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ の反応により、安全な酸素と水にする。
グルタチオン (GSH)	カタラーゼとは異なるメカニズムで、過酸化水素を、GSH を用いて消去する。
グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)	

筆者が、特に注目したのは、グルタチオンというトリペプチドである。グルタチオンには、還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) が存在し、これらの酸化還元反応を通して、活性酸素の消去に働く。このグルタチオンは、細胞質内のみならず、ミトコンドリア内にも存在しており、このミトコンドリア内 GSH が、肝線維化の進展に関わっていることを、筆者の研究チームが見いだした (図1)¹⁾。

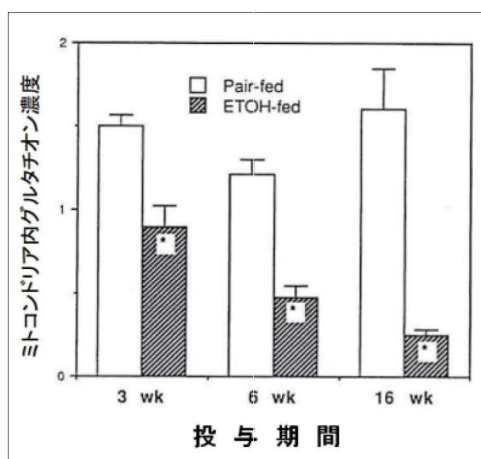


図1 強制的にエタノールを投与したラットのミトコンドリア内 GSH の変動¹⁾

酸化的 DNA 損傷とは

既に述べたように、活性酸素は、タンパク質、脂質、核酸に酸化的損傷を及ぼすが、特に、核酸である DNA の傷害は、遺伝子変異をもたらし、やがて、がんへと進展していくリスクを背負うことになる。現在、見つかっている酸化的 DNA 損傷には、2-OH-dATP、5-CHO-dUTP、5-OH-dCTP、8-OH-dATP などが知られているが、グアニンの8位の炭素に、ヒドロキシラジカルが作用した結果生じる、8-Hydroxy-Guanine (8-OH-Gua) が、最もよく知られている。8-OH-Gua は、生体内ではケト基で存在しているため、8-oxo-Guanine (8-oxo-Gua) とも呼ばれており、もっぱら、8-oxo-Gua が、一般的な名称として用いられている。8-oxo-Gua は、これまでに報告された様々な種類の酸化的 DNA 損傷の中で、最も多く生成すると考えられている (図2)。

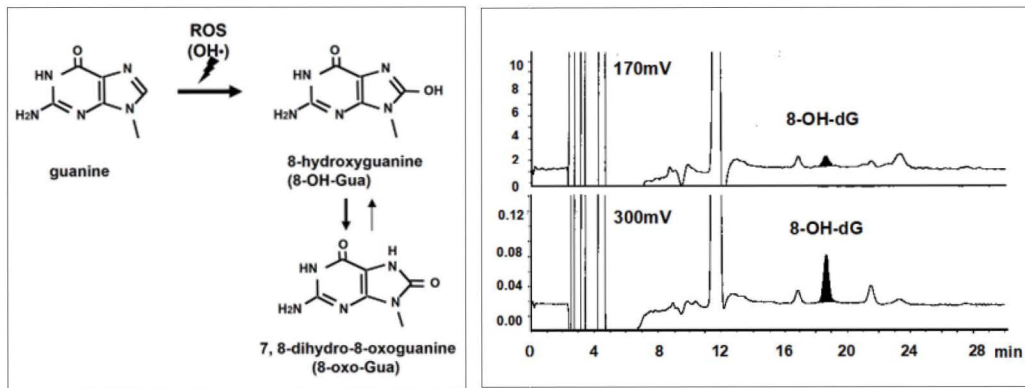


図2 8-oxo-Gua の構造 (左図) と HPLC による 8-oxo-Gua のピーク (右図)

8-oxo-Gua とその修復酵素 OGG1

酸素をエネルギー源として利用する生物の DNA 上には、8-oxo-Gua が絶えず生成している。その原因の多くは、電離放射線、化学物質、重金属、食物、そして微生物などの外来性因子である。8-oxo-Gua は、1984年にその存在が報告²⁾されて以来、その修復機構とともに精力的に研究されてきた。8-oxo-Gua は、GC → TA のトランスポージョン型の点突然変異を誘導することが知られており (図3)、そのため、老化³⁾やがんなどの疾患の発症、進展に重要な役割を演じていると考えられている。このような理由から、過去30数年の間に、数多くの重要な知見が得られている。

一方、このような酸化的 DNA 損傷を防ぐために、私たちの生体内には、8-oxo-Gua 修復酵素 OGG1 が備わっている。OGG1 は、細菌、酵母、哺乳動物、さらには植物にも広く存在しており、8-oxo-Gua 生成が生物にとって重要な酸化損傷であること、またこの修復酵素が、生物の生存に極めて重要であることなどが推測できる。Ogg1 ノックアウトマウスでは、GC → TA 突然変異率が上昇することも確認されている。

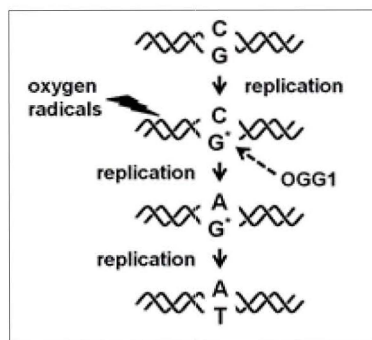


図3 GC → TA のトランスポージョン型の点突然変異の起こるプロセス

疾患に関連した OGG1 機能を理解するためには、遺伝子多型の研究が不可欠である。DNA 修復関連遺伝子の多型は、タンパク質の機能を変化させ、個々人の DNA 修復能に違いをもたらすと思われる。修復機能の低下や欠損は、遺伝子の不安定性や腫瘍原性をもたらすことになる。OGG1 においては、コドン326のアミノ酸置換 Ser326Cys (OGG1-

Ser326Cys) が、発がんリスクに関わる重要な遺伝的因子として挙げられていて、その機能低下も報告されている (表 2)。これらの事実は、生体内のヒト細胞でも、OGG1-Cys326 は OGG1-Ser326 よりも、8-oxo-Gua によって生じる突然変異を抑える能力が劣っている可能性を示唆している。実際、食道がん、肺がん、前立腺がんの 5 つの症例対照研究において、OGG1 における Ser326Cys アミノ酸置換を伴った症例では、有意な相関を持って、それらのがんの発症リスクが上昇していたことも報告されている。

表 2 ヒトがん細胞における OGG1 遺伝子多型 (OGG1-Ser326Cys)

Cancer	Number (cases / controls)	Allele frequency (cases / controls)	Nationality
Non-small cell lung cancer	105 / 105	0.20 / 0.22	Caucasian
Esophageal cancer	196 / 201	0.408 / 0.398	Chinese
Breast cancer	425 / 434	0.225 / 0.240	Danish
Colon cancer	125 / 247	0.544 / 0.524	Korean
Skin cancer (Basal cell carcinoma)	319 / 319	0.280 / 0.279	Danish
Lung cancer	2155 / 2163	0.192 / 0.202	Eastern European countries
Epithelial ovarian cancer	91 / 57	0.24 / 0.28	Canadian

8-oxo-Gua に起因する点突然変異誘発を防ぐために、哺乳動物などを含めた多くの生物が、3つの主要な酵素から構成された修復機構 (GO システムと呼ぶこともある) を有していて、8-oxo-Gua や他の酸化プリンによる変異原性を減じている。大腸菌の GO システムは、3つの酵素から構成され、それらは、8-oxoGTPase (MutT)、Adenine DNA glycosylase (MutY)、そして 8-oxo-Guanine DNA glycosylase (Fpg あるいは MutM) である。MutT は、ヌクレオチドプール中で酸化された dGTP を加水分解することで、DNA 中に取り込まれることを防いでいる。Fpg は、8-oxo-Gua : C の塩基ペアから、8-oxo-Gua を除去する。MutY は、A : 8-oxo-Gua のミスマッチ塩基ペアから、アデニンを除去する。ほとんどの哺乳動物は、MutT と MutY のホモログを有している。ヒトにおける MutT のホモログは MTH1 と呼ばれ、MutY のホモログは MYH (あるいは MUTYH) と呼ばれている。MYH と MTH1 は、OGG1 とも協調して、点突然変異の発生を未然に防いでいる (図 4)。この他に、アデニンあるいはグアニンと対合した 8-oxo-Gua を除去する OGG2 と呼ばれる酵素が、大腸菌や真核生物に存在することも示されている。

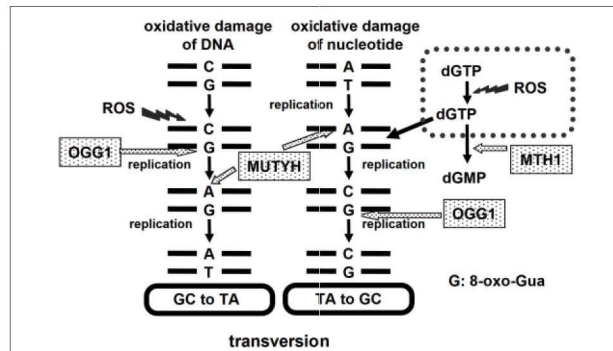


図4 MYH と MTH1は、OGG1とも協調して点突然変異の発生を未然に防いでいる。

飲酒・喫煙と8-oxo-Gua

筆者の研究チームは、飲酒における、8-oxo-Gua の生成量を測定し、その増加を確認した。20分間オートクレーブ処理し、ビタミン類を減じた飼料を、ラットに与えると、それだけで8-oxo-Gua 生成量が増加した (図5)⁴⁾。さらに、エタノールを、同時に摂取させると、肝臓において、修復活性の誘導が認められた (図6)。これらは、日常的な飲酒が、肝臓の遺伝子に変異をもたらす可能性を示しており、肝臓がんメカニズムのひとつとも考えられる⁵⁾。

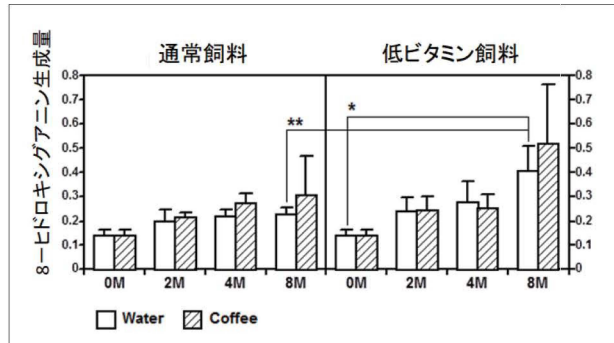


図5 20分間オートクレーブ処理した飼料を与えたラット肝臓8-oxo-Gua 生成量は増加した。同時にコーヒーを投与しても、変化は認められなかった⁴⁾。

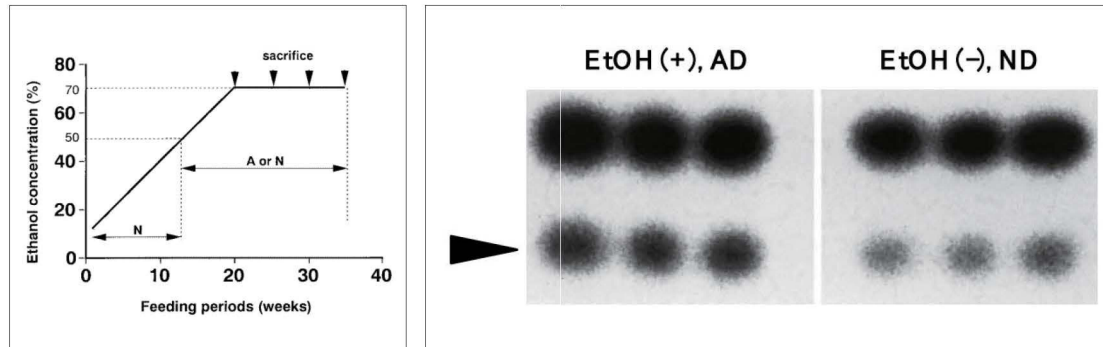


図6 ラットにオートクレーブ処理した飼料とエタノールを同時に投与する（左図）と、肝臓の 8-oxo-Gua 生成量が増加し（図5を参照）、修復活性が誘導されていた（右図）（A or AD：オートクレーブ処理した飼料、N or ND：未処理飼料）⁵⁾。

また、喫煙に関する研究も、筆者の研究チームは実施している。1日の喫煙本数が多くなるほど、白血球中の 8-oxo-Gua 生成量は増加し、8-oxo-Gua 修復活性も強まっていた⁶⁾。また、Brinkman index（1日の喫煙本数 × 喫煙年限）が高まるほど、8-oxo-Gua 生成量が高まっていた（図7）⁷⁾。

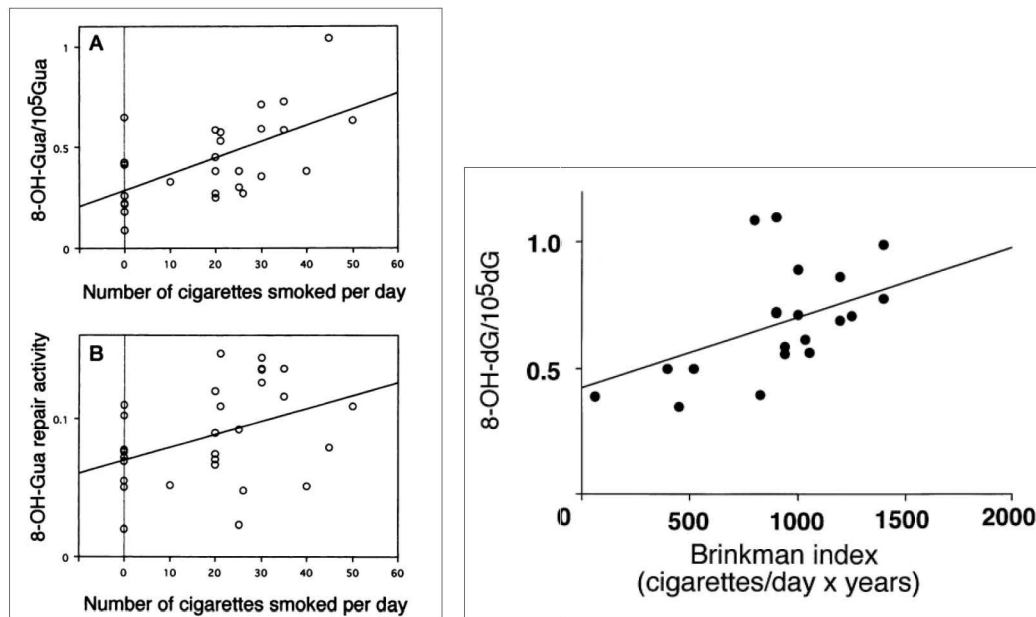


図7 喫煙習慣のあるヒトの白血球 DNA 中の 8-oxo-Gua 量と 8-oxo-Gua 修復活性（左図）⁶⁾、および、Brinkman index と 8-oxo-Gua 生成量との関連（右図）⁷⁾

重金属と 8-oxo-Gua

環境中の重金属類が与える DNA 修復機構への影響を研究することは、環境変異原の人体への影響を知る上で重要である。特に、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb)、六価クロム (Cr

VI)、およびマンガン (Mn) は、細胞毒性、変異原性、および腫瘍原性があることが知られ、かつ、私たちを取り囲む環境中に様々な形で存在している。筆者の研究チームは、重金属のうち、カドミウムと 8-oxo-Gua 修復機構との関連を、早い時期から研究してきた。1997年に、筆者らは、グルタチオン生合成を阻害したラットに、カドミウムを曝露すると、精巣の 8-oxo-Gua 修復活性が低下し、同時に精巣の遺伝子に、8-oxo-Gua 蓄積が高まるとい研究結果を報告した (図 8)⁸⁾。

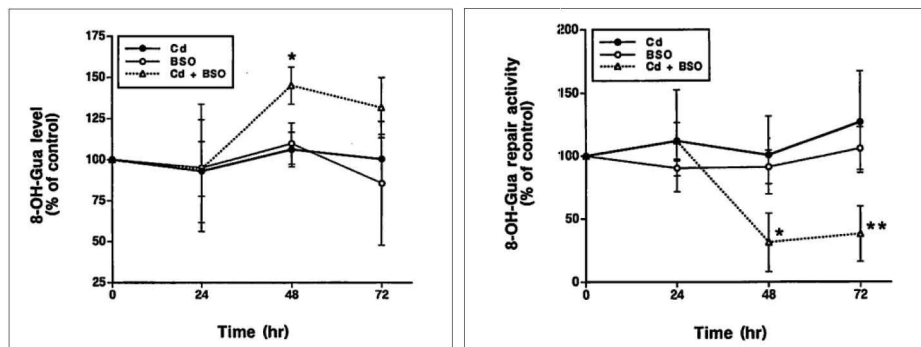


図 8 グルタチオン生合成を阻害したカドミウム曝露ラット精巣の 8-oxo-Gua 生成量 (左図) と 8-oxo-Gua 修復活性の変動 (右図)⁸⁾

一方、このような、カドミウムによる 8-oxo-Gua 修復機構の阻害作用のメカニズムの詳細は、現時点では、明らかではない。

ヒトに対して発がん性や催奇形性を有していることが知られているヒ素化合物も、OGG1 活性を阻害する。筆者の研究チームは、ヒ素化合物に曝露された培養ヒト細胞で、hOGG1 発現抑制、および、8-oxo-Gua 修復活性阻害が起こり、同時に 8-oxo-Gua 生成量が増加することを見出した。さらに、ヒ素化合物で処理したマウス培養細胞で、mOGG1 が切断されることも見出した (図 9)⁹⁾。

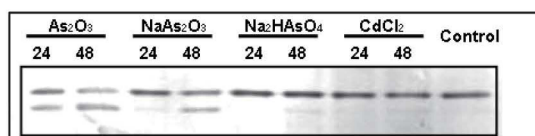


図 9 ヒ素化合物で処理したマウス培養細胞における mOGG1 の断片化。ヒ素化合物を曝露した場合にのみ、mOGG1 の明瞭な 2 本のバンドが認められた⁹⁾。

土壌中の重金属は、土壌生物にとっても脅威である。筆者の研究チームは、ミミズを用いて、カドミウムの影響を調べたところ、精巣組織に 8-oxo-Gua 生成量の増加を検出した (図 10)¹⁰⁾。生殖器の遺伝子に異常が起これば、その生物種の存続にも関わる。仮に、ミミズの数が増加すれば、それを捕食する、鳥類などの生物も減少する。さらには、私たち人類も、鳥類を食することができなくなり、大きな影響を受けることになる。そのような意味では、土壌中の重金属の、生物への影響を明らかにすることは、極めて重要であり、「沈黙の春」をもたらさないような努力をしなければならない。

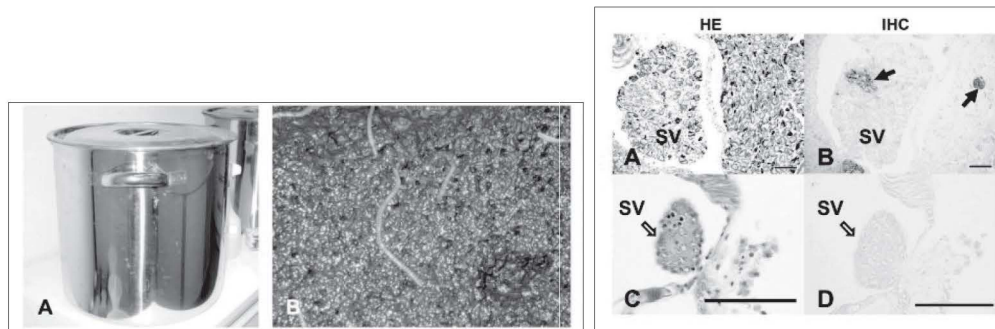


図10 ミミズの実験の様子（左図 A、B）とカドミウム曝露されたミミズ精巣組織の 8-oxo-Gua 蓄積量の免疫組織像（右図 A ~ D）¹⁰⁾

合成色素と OGG1

一部の合成色素には、発がん性があることが古くから知られていたが、特に、バターイエロー（メチルイエロー）と呼ばれるアゾ色素化合物には、強力な肝発がん性があることが知られている。このような合成色素による発がんのメカニズムは、DNA の構造に色素化合物の構造がはまり込むことによって生じる、所謂、インターカレーションによるものとされている。筆者の研究チームは、バターイエロー（物質名：3'-MeDAB）による発がん性が、単にインターカレーションによるものだけではなく、8-oxo-Gua の生成量をも高めることで、発がん性を示している可能性を示した。この場合も、OGG1 が切断されていた（図11）¹¹⁾。



図11 DAB (3'-MeDAB) 曝露による、OGG1 切断¹¹⁾

抗がん剤と8-oxo-Gua

抗がん剤の多くは、標的細胞の遺伝子に傷害を及ぼし、その細胞分裂を阻害することで効力を発揮する。そのメカニズムにも、8-oxo-Gua 生成が関わっていることが知られている。

etoposide は、1966年に合成された抗悪性腫瘍剤（抗がん剤）であり、肺小細胞がん、悪性リンパ腫、急性白血病などに使用される。筆者の研究チームは、この etoposide が、8-oxo-Gua 生成量を高めることを確認した。アポトーシスを誘導するカスパーゼの阻害剤である Z-VAD-FMK で処理した細胞に、etoposide を曝露させると、Z-VAD-FMK 無処理で

は、OGG1 が切断されるが、Z-VAD-FMK 処理では、切断されなかった (図12)¹²⁾。これは、etoposide が、アポトーシスを誘導することで、がん細胞の死滅を生じさせることが示され、その過程に、8-oxo-Gua 生成量の増加が重要な役割を演じていると考えられた。また、他の抗がん剤として、マイトマイシン C (MMC) について検討したが、やはり、mOGG1 の切断が確認された。MMC は、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、胃癌、結腸・直腸癌、肺癌などに用いられている。

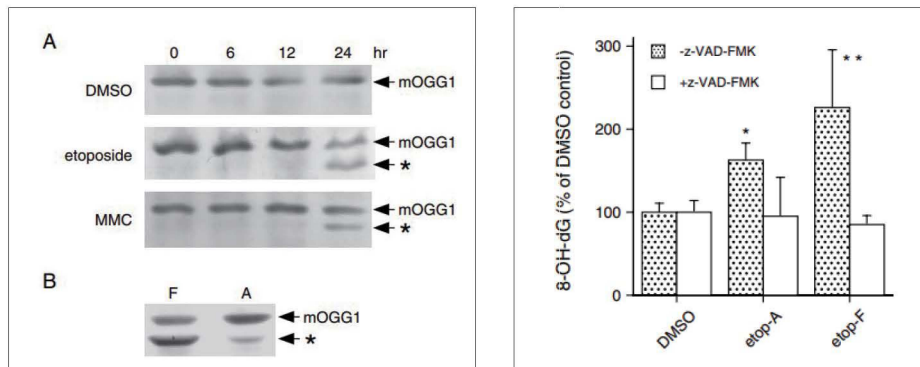


図12 etoposide および MMC 投与したマウス細胞では、mOGG1 が切断された (左図)。etoposide の 8-oxo-Gua 生成量増加作用は、アポトーシスを Z-VAD-FMK により阻害すると、消失した (右図)¹²⁾。

幹細胞と 8-oxo-Gua

マウス ES 細胞を、過酸化水素処理した場合の 8-oxo-Gua 生成量と OGG1 発現量を調べたところ、ES 細胞の分化が進むにつれて、OGG1 発現量は減少し、8-oxo-Gua 生成量が増加した (図13)¹³⁾。これは、未分化な細胞は、分化するにつれ、活性酸素による 8-oxo-Gua 生成に対して、修復能力が落ち、遺伝子異常が起こりやすくなることを示している。

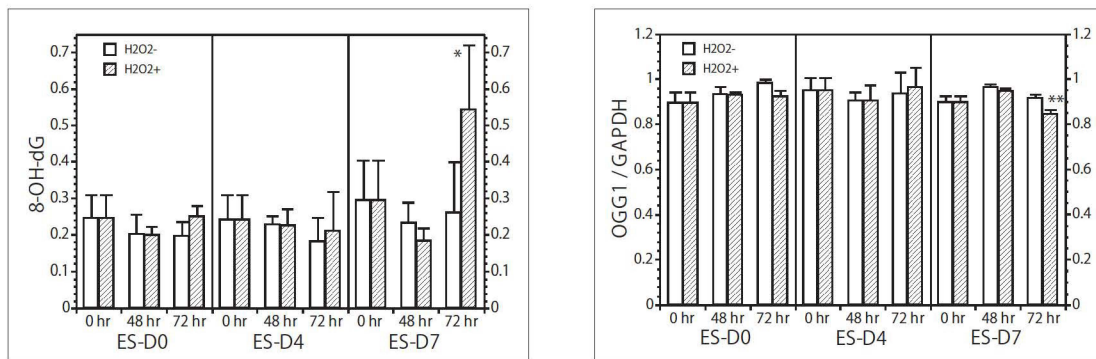


図13 過酸化水素曝露マウス ES 細胞における 8-oxo-Gua 生成量 (左図) と OGG1 発現量 (ES-D0：分化 0 日目、ES-D4：分化 4 日目、ES-D7：分化 7 日目) (右図)¹³⁾。

最後に

以上のように、発がん過程に、重要な役割を演じているとされる 8-oxo-Gua は、環境中の様々な因子（薬物、アルコール、重金属など）により、その生成量が増加することが明らかとなってきた。私たちの身の回りには、このような脅威が、数多く存在するのだが、言い換えれば、それらの脅威を知り、そこから身を守る行動を取れば、発がんのリスクも低減することが可能であることを意味している。

【文献】

- 1) Hirano, T., *et al.* Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcohol liver disease in rats. *Hepatology* 16, 1423-1427, 1992
- 2) Kasai, H., Tanooka, H., Nishimura, S. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* 75, 1037-1039, 1984
- 3) Hirano, T., *et al.* 8-Hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *J. Gerontol.* A51, B303-B307, 1996
- 4) Morii, H., *et al.* Effects of instant coffee consumption on oxidative DNA damages, DNA repair, and redox system in mouse liver. *J. Food Sci.* 74, H155-H161, 2009
- 5) Asami, S., *et al.* Increase in 8-hydroxyguanine and its repair activity in the esophagi of rats given long-term ethanol and nutrition-deficient diet. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 973-978, 2000
- 6) Asami, S., *et al.* Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.* 56, 2546-2549, 1996
- 7) Asami, S., *et al.* Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18, 1763-1766, 1997
- 8) Hirano, T., Yamaguchi, Y., and Kasai, H. Inhibition of 8-hydroxyguanine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depleted rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 9-14, 1997
- 9) Hirano, T., *et al.* Fragmentation of the DNA repair enzyme, OGG1, in mouse nonparenchymal liver cells by arsenic compounds. *Genes and Environment* 28, 62-67, 2006
- 10) Nakashima, T., *et al.* 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat. Res.* 654, 138-144, 2008
- 11) Hirano, T., *et al.* Detection of a smaller, 32 kDa mOGG1 in 3'-methyl-4-dimethylamino azobenzene-treated mouse liver. *Cancer Sci.* 95, 118-122, 2004
- 12) Hirano, T., *et al.* Detection of a mouse OGG1 fragment during caspase-dependent apoptosis: Oxidative DNA damage and apoptosis. *Cancer Sci.* 95, 634-638, 2004
- 13) Kuboyama, A., *et al.* 8-Hydroxyguanine levels and repair capacity during mouse embryonic stem cell differentiation. *Free Rad. Res.*, 45, 527-533, 2011