

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710058
 研究課題名（和文） 放射線誘発乳がんに関連する遺伝子・マイクロRNAの三次元培養実験系での再構成
 研究課題名（英文） Molecular function of radiation-induced mammary carcinoma-related genes/microRNAs in three dimensional culture system
 研究代表者
 飯塚 大輔（IIZUKA DAISUKE）
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
 研究者番号：00455388

研究成果の概要（和文）：

本研究では、放射線誘発乳がんが発現異常が示唆されている因子に着目し、乳管構造形成異常を再構成できる三次元培養実験系を確立し、その因子の発現調節により形態異常が引き起こせるかどうか検討した。結果的に放射線誘発乳がんこれまでに見出された発現異常を示す因子は形態学的に有意な変化は観察されなかった。これら因子は少なくとも乳管構造形成には寄与していないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I focused on radiation-induced mammary carcinoma-related genes/microRNAs, and I analyzed whether these genes/microRNAs formed aberrant mammary ductal structure in three dimensional culture systems. The aberrant mammary ductal structure was not observed by introducing these microRNAs in MCF-10A cells, suggesting that these microRNAs have no function at least on the formation of mammary duct.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線 誘発乳がん、三次元培養、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

乳がんは日本における女性のがん罹患率で約16%を占め、現在は胃がんを越え、最も発症率の高いがんである。原爆被爆者の疫学調査により、放射線被ばくによるがん罹患において乳がん発症率が高いことが明らかにされている(Preston et al., *Radiat Res.*, 2007)。しかしながら放射線による乳がん発症の分子メカニズムについての情報はほと

んど明らかにされていない。

この放射線による乳がん発症メカニズムを明らかとするために、申請者はまずモデル動物(Sprague-Dawley ラット)を用いた放射線発がん実験をおこない、そこで発生した乳がん組織をマイクロアレイを用い、網羅的に解析した。ゲノムDNAのコピー数異常を網羅的に検出できるアレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization; 比較ゲノムハイブ

リダイゼーション)法を用いたところ、放射線誘発乳がんでは4番染色体トリソミー、がん抑制遺伝子 p15, p16 の欠損を含む複数箇所のゲノム異常が特徴的であると推測された(Iizuka et al., *Raidat Res.*, 2010)。

一方でゲノムの異常ではなく、noncoding RNAの一員であるマイクロRNA(miRNA)が発がんプロセスのなかで重要な役割を演じていることが近年明らかとなってきた。miRNAは二本鎖RNAの発現、または細胞への導入により誘導される配列特異的な遺伝子発現抑制機構であるRNAi(RNA interference)機能を有している。実際、KumarらはmiR-16ならびにlet-7成熟型miRNAの抑制が細胞の形質転換と腫瘍形成を促進すること、miRNA成熟に必要なタンパク質であるDicerを条件的に枯渇させるとK-Rasにより誘導される肺がんマウスモデルにおいて腫瘍の増殖を促進することを報告している(*Nat Genet.*, 2007)。

一般に、組織の腫瘍化のプロセスは多段階のステップを踏んでおり、各ステップで重要な因子は異なると考えられている。上述の遺伝子・miRNA発現異常はがん化のどのステップに決定的な因子なのか、または結果的にがん化した結果としての異常なのか明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では上述の点を明らかにするために、培養細胞を用いた実験系を用いる。特に乳腺の構造やがんの初期段階を構築できる乳腺上皮細胞三次元培養実験系を用いることが特色である。このことによりがんを引き起こされている異常を乳腺に再現することができ、乳管構造形成異常やがん化に寄与するかどうかを明らかとなる。

本研究ではMuthuswamyらの方法に従い、ヒト乳腺株化細胞MCF-10Aを用いる。この細胞株を細胞外マトリックスを豊富に含むMatrigelを用い、三次元培養すると乳管構造を形成すること、ErbB2と呼ばれるレセプターを発現させるとDCIS(Ductal Carcinoma In Situ)と呼ばれる前がん病変を形成させる事ができることが報告されている(*Nat Cell Biol.*, 2001)。

3. 研究の方法

本研究は放射線被ばくによる乳がん発症に関与が示唆されている遺伝子やmiRNAの発現異常により乳管形成異常ならびにがん化の初期過程を再現することができる実験系にて検討することを目的としている。

前述の通り、本研究ではMuthuswamyらの方法に従い、ヒト乳腺株化細胞MCF-10Aを用いる。DMEM/F12にウマ血清, insulin, cholera toxin, hydrocortisoneを添加したアッセイ用培地を作成し、8ウェルチェンバースライド(Nalgene)にMatrigelを添加、15分固化さ

せる。細胞を4% Matrigel, 10 ng/ml EGFを含む培地とともにチェンバースライドにまく。4日おきに5 ng/ml EGFを含む培地で置換する。培養開始後約10から20日で乳管構造を形成することが報告されている(図1)(*Nat Cell Biol.* 2001, Debnath et al, *Methods.* 2003)。

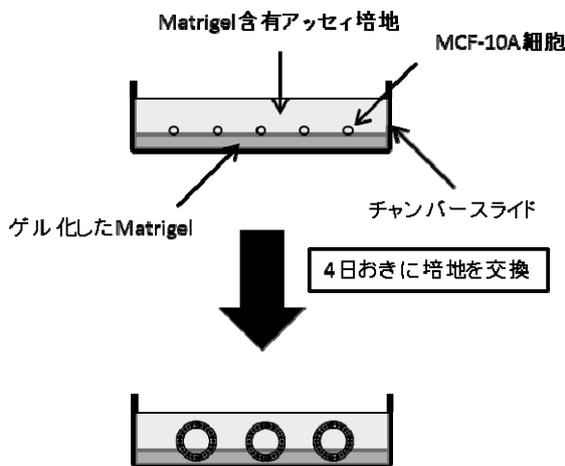


図1 三次元培養実験系の概要

この実験系で放射線被ばくにより細胞が示す変化を検討する。放射線照射はMCF-10A細胞を三次元培養して各4, 7, 11日で¹³⁷Cs線源(Gammacell 40 Exactor)にて4~10 Gyガンマ線を一度で照射する実験をあらかじめ行い、この細胞の三次元培養に与える影響を検討する。また、三次元培養開始直後の時点から¹³⁷Cs低線量率(数cGy/h)照射装置にて長期間低線量のガンマ線に暴露する実験を行い、形態学的な異常を捉える。

前述の三次元培養実験系に対し、遺伝子・miRNA導入を行う。遺伝子に関して、ヒト培養細胞より抽出したcDNAを用い、p16遺伝子のクローニングを行い、発現ベクター(pcDNA6.2 N/EmGFP, Invitrogen)に組み込む。一方、miRNAはラット放射線誘発乳がんにおいて有意に変化していた複数の成熟型miRNA配列を含むゲノム領域をクローニングし、前述の発現ベクターに組み込む。特にmiRNAはラット放射線誘発乳がんの特徴的な成熟型miScript mimicまたはmiScript inhibitor(Qiagen)を購入し、それらを細胞に導入し、三次元培養を行い、経時的に観察することにより、形態学的な変化を捉える。導入による乳管形成に与える影響はその構造変化を光学顕微鏡や各特異抗体を用いた蛍光免疫染色法にて捉える。並行して前年度から検討を行っているラット放射線誘発乳がんの特徴的なmiRNAの機能に関して、乳がん細胞株ならびに乳腺培養細胞株などを用い検討を行う。

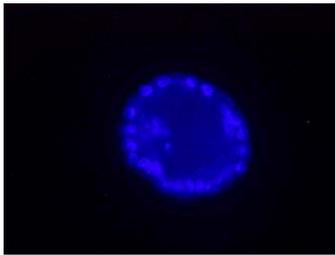
4. 研究成果

最初にMuthuswamyらの方法(*Nat Cell Biol.*

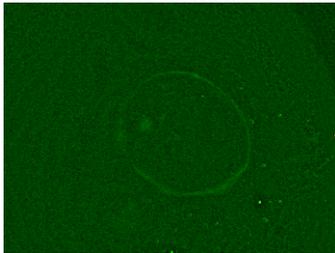
2001)に従い、ヒト乳腺株化細胞 MCF-10A を用いた三次元培養実験系を立ち上げた。また、三次元培養で得られた乳管構造の詳細な形態学的観察のための免疫染色法を確立した(図 2)。三次元培養での検討に先立ち、MCF-10A 細胞の基本的性質を把握するため、通常の二次元培養での放射線感受性をコロニー形成法にて検討した。次に三次元培養で MCF-10A 細胞が放射線被ばくにより示す変化を検討した。MCF-10A 細胞を三次元培養して4日目、7日目、11日目に ¹³⁷Cs 線源 (Gammacell 40 Exactor)にて 4~10 Gy ガンマ線を一度で照射する実験を行ったところ、コロニー形成法で生存率が 10%以下となるような被ばく線量でも、乳管構造を形成することが明らかとなった。また、低線量率ガンマ線を三次元培養実験中継続的に照射した実験を行ったが、有意な形態学的異常を見出すことはできなかった。

ラット放射線誘発乳がんにて特異的に発現量が増加した miRNA に関し、その成熟型 miRNA 配列を含むゲノム領域をクローニングし発現ベクター (pcDNA6.2 N/EmGFP, Invitrogen) に組み込み、来年度からの三次元培養で用い

DAPI



Laminin



merge

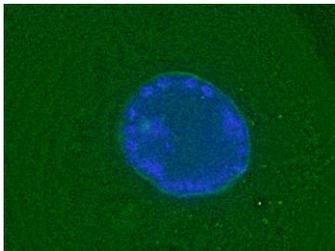


図2 三次元培養で形成された正常な乳管構造(上段:DAPI染色,中段:Laminin抗体を用いた免疫染色,下段:mergeした像)

る前段階として、ヒト乳がん細胞で検討した。そのうち miR-135b の発現調節では細胞増殖には影響はほとんど見られなかったが、17β-estradiol 添加による細胞増殖能亢進は miR-135b 発現抑制で観察されなくなったことから、エストロゲン受容体またはその経路に miR-135b が関与していることが示唆された。

次にヒト培養細胞より抽出した cDNA を用い、p16 遺伝子のクローニングを行い、発現ベクター (pcDNA6.2 N/EmGFP) に組み込んだ。確立した三次元培養をマイクロ RNA の発現調節をおこなったヒト乳腺株化細胞 MCF-10A 細胞においておこなったが、形態学的に有意な変化を見出すことはできなかった。以上のことから、当初推測していたラット放射線誘発乳がんにて特徴的なマイクロ RNA は乳管形成において有意な機能を有していないと推測された。一方で昨年度より行っているラット放射線誘発乳がんにて特徴的なマイクロ RNA の機能に関して、乳がん細胞株ならびに乳腺上皮細胞株を用い検討を行ったところ、乳がん細胞株において miR-194 の発現を阻害すると細胞増殖が抑制され、一方で乳腺上皮細胞株において発現を増加させると細胞増殖が亢進する傾向を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Iizuka D., Imaoka T., Takabatake T., Nishimura M., Kakinuma S., Nishimura Y., Shimada Y. DNA copy number aberrations and disruption of the p16Ink4a/Rb pathway in radiation-induced and spontaneous rat mammary carcinomas. *Radiation Research*, 査読有, 174(2), 2010, 206-15
2. Imaoka T, Nishimura M, Iizuka D., Daino K, Takabatake T, Okamoto M, Kakinuma S, Shimada Y. Radiation-induced mammary carcinogenesis in rodent models: what's different from chemical carcinogenesis? *Journal of Radiation Research*, 査読有, 50(4), 2009, 281-293

[学会発表] (計 4 件)

1. 飯塚大輔, 今岡達彦, 西村まゆみ, 河合秀彦, 鈴木 文男, 島田 義也, ラット放射線誘発乳がんにて特徴的なマイクロ RNA が乳がん細胞株に与える影響, 第 53 回日本放射線影響学会, 2010 年 10 月 20 日, 京都テルサ(京都市)
2. 飯塚大輔, 今岡達彦, 西村まゆみ, 高島貴志, 柿沼志津子, 河合秀彦, 鈴木文男,

- 島田義也，ラット放射線誘発乳がんにおけるマイクロ RNA 発現の網羅的解析，第 32 回日本分子生物学会，2009 年 12 月 11 日，パシフィコ横浜（横浜市）
3. 飯塚大輔，今岡達彦，西村まゆみ，高島貴志，柿沼志津子，河合秀彦，鈴木文男，島田義也，ラット乳がんにおける放射線被ばくに特徴的なマイクロ RNA の解析，第 52 回日本放射線影響学会，2009 年 11 月 12 日，南区民文化センター（広島市）
 4. 飯塚大輔，今岡達彦，西村まゆみ，高島貴志，柿沼志津子，河合秀彦，鈴木文男，島田義也，放射線誘発ラット乳がんにおける microRNA 解析，第 148 回日本獣医学会，2009 年 9 月 26 日，とりぎん文化会館（鳥取市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 大輔 (IIZUKA DAISUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00455388

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()