

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23659603

研究課題名（和文） microRNA の放射線治療への応用に関する研究

研究課題名（英文） The study of application of microRNA to radiation therapy

研究代表者 全田 貞幹

(ZENDA SADAMOTO)

独立行政法人 国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員

研究者番号：30466198

研究成果の概要（和文）：microRNA は翻訳レベルでタンパク質の発現を制御している近年同定された細胞性の RNA である。その機能については未知な部分が多い。しかし、その中には細胞の放射線感受性に関わるものも報告されており、microRNA と放射線感受性との関係を詳細に分析すれば、放射線の生物学的影響について新しい知見が得られるのではないかとと思われる。本研究の結果から、幾つかの microRNA が放射線感受性に関わっていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

MicroRNA is the cellular RNA which was identified controlling expression of protein at a translation level in late years. There are many unknown parts about the function. However, some microRNAs about radiosensitivity of the cell are reported, and it is thought that new knowledge about the biological influence of the radiation may be provided if relations with microRNA and the radiosensitivity are analyzed in detail. It was thought that some microRNAs concerned radiosensitivity from the result of this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：microRNA

1. 研究開始当初の背景

microRNA (以下 miRNA とする) は翻訳レベルでタンパク質の発現を制御している近年同定された細胞性の RNA である。活性のある成熟 miRNA は真核生物で発現している 17~24 塩基の一本鎖 RNA で、翻訳やタ

ーゲットとなるメッセンジャーRNA の安定性に影響を与えることが知られている。それぞれの miRNA は複数の遺伝子を制御していると考えられており、ヒトの全ての遺伝子の 1/3 以上が miRNA 分子に制御されているかもしれないという予測がある。また、ある遺伝子の発現はそのタンパク質をコードして

いるメッセンジャーRNAの発現レベルよりも、その遺伝子を制御しているmiRNAのレベルに依存している可能性があるとの報告もある(Johnson SM et. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 120:635-47.)。miRNAは、短い一本鎖のRNA分子が特定のメッセンジャーRNAの転写産物をターゲットにしてタンパク質発現を妨げるといって、siRNAに似たメカニズムで作用する。しかしながら、miRNAは動植物のゲノムにコードされている内在性の分子であるという点でsiRNAと異なる。miRNAの機能については未知な部分が多いが、発生、細胞増殖、分化、細胞周期、疾患などに対し大きく関わっていると考えられている。また、miRNAのうちlet-7に関して、放射線感受性との関連性を論じた報告もあり、(Weidhaasら、Cancer Res(2007) 67(23):11111-11116)、細胞の放射線感受性とmiRNAの発現量とは何らかの関係があることが強く示唆されるため、これらの関係を更に詳細に分析すれば、放射線の生物学的影響について新しい知見が得られるのではないかとと思われる。

2. 研究の目的

miRNAは翻訳レベルでタンパク質の発現を制御している近年同定された細胞性のRNAである。その機能については未知な部分が多いが、発生、細胞増殖、分化、細胞周期、疾患などに対し大きく関わっていると考えられる。また、miRNAの中には細胞の放射線感受性に関わるものも報告されており、miRNAと放射線感受性との関係を詳細に分析すれば、放射線の生物学的影響について新しい知見が得られるのではないかとと思われる。

miRNAをがんの放射線治療における放射線増感剤として利用する場合、その性質から従来の方法より正常組織への毒性が低下できると期待される。本研究の目的は、miRNAの性質を活用することで従来より効果的な放射線治療を可能としその理論的背景を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 放射線高感受性群(HL60、MOLT-4等)の細胞群、及び放射線低感受性群(HeLa、A549等)の細胞群を液体培地上で培養後、それぞれの細胞群の対数増殖期に低線量(1Gy~5Gy)のγ線を照射後、一定期間37℃、5%CO₂下でインキュベートする。その上でそれぞれの細胞群の非照射群と照射群の生存曲線を作成しておく。また、それぞれにつき、細胞を1×10⁶個取り出し、照射前後の細胞抽出液からアンピオン社製のsmall RNA精製用キット(mirVana miRNA Isolation Kit及びflashPAGE System)を用いて、miRNAを抽出する。そして各miRNAの発現量についてリアルタイムPCR法を用いて比較する(Lao K et. Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Apr 28;343(1):85-9. Epub 2006 Feb 28.)。尚、マイクロアレイ法による検証は予備実験で既に施行済みである(Fig. 1, 2)。

(2) 各細胞群の放射線誘発アポトーシスの確認作業としては、アネキシンVを用いたフローサイトメトリー、TUNEL法を用いたフローサイトメトリー、電気泳動法によるDNAラダーの確認等により行なう。

(3) 次に、上記の実験結果から、放射線感受性に関する予想されるmiRNAに対する強制発現試薬(Pre-miR miRNA Precursor Molecule)と阻害薬(Anti-miR miRNA Inhibitor)の合成を業者に委託注文。これらはsiRNA用トランスフェクション試薬であるTransIT-TKOにより容易に細胞にトランスフェクションできる。24 well plate中で各細胞にトランスフェクションさせ、miRNAの発現(又は抑制)がピークを迎えた頃(大体トランスフェクション後約3日位)各細胞系列にγ線を照射。前記と同様に生存曲線の作成と各miRNAの発現量の比較、各細胞群の放射線誘発アポトーシスの確認等を行う。

4. 研究成果

(1) 放射線感受性の異なる細胞群を液体培地上で培養後、それぞれの細胞群に低線量の γ 線を照射後、一定期間インキュベートした。それぞれの細胞群の非照射群と照射群の生存曲線を作成。また、それぞれにつき、細胞を1,000,000個取り出し、照射前後の細胞抽出液からmiRNAを抽出した。そして、各miRNAの発現量についてリアルタイムPCR法を用いて比較したところ、放射線高感受性細胞群においては、 γ 線照射後 hsa-let-7g 遺伝子を始め8種のmiRNA遺伝子が照射前に比べて有意に発現量が増加し、また、hsa-miR-324-5p遺伝子を始め14種のmiRNA遺伝子が照射前に比べて有意に発現量が減少していた。

(2) 一方、放射線低感受性細胞群においては、 γ 線照射後 hsa-miR-155 遺伝子を始め10種のmiRNA遺伝子が照射前に比べて有意に発現量が増加し、また、hsa-miR-527 遺伝子のみが照射前に比べて有意に発現量が減少した。

(3) 以上の結果から、hsa-let-7g 遺伝子や hsa-miR-527 遺伝子は放射線感受性を増加させる miRNA と考えられ、その一方、hsa-miR-324-5p 遺伝子や hsa-miR-155 遺伝子は放射線感受性を低下させる miRNA と考えられる。

(4) 次に、上記放射線感受性に関与すると考えられるmiRNAに対する強制発現試薬を合成。siRNA用トランスフェクション試薬を用いてこれら試薬をHeLa細胞に24well plate中でトランスフェクションした。トランスフェクション72時間後に γ 線を照射し細胞群の放射線誘発アポトーシスの確認を行ったところ、残念ながら hsa-let-7g 遺伝子や hsa-miR-527 遺伝子を強制発現させた系、及び hsa-miR-324-5p 遺伝子や hsa-miR-155 遺伝子を強制発現させた系のいずれも放射線誘発アポトーシスの発現に有意な差は得られなかった。

(5) (3) 及び (4) の結果に矛盾が生じた原因については未だ解決されていない。しかし、今後、細胞レベルのみならず動物実験などを通してmiRNAと放射線感受性との関係についてより詳細に検討していきたい。

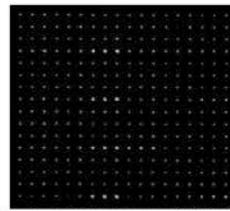


Fig.1 HeLa細胞における γ 線照射前後のマイクロアレイ解析

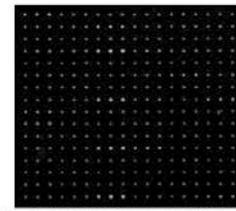


Fig.2 HeLa細胞における γ 線照射前後のマイクロアレイ解析

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1件)

Hojo H, Zenda S, Akimoto T, Kohno R, Kawashima M, Arahira S, Nishio T, Tahara M, Hayashi R, Sasai K.

Impact of early radiological response evaluation on radiotherapeutic outcomes in the patients with nasal cavity and paranasal sinus malignancies.

J Radiat Res. 2012 Sep;53(5):704-9.

doi: 10.1093/jrr/rrs021. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

① 全田貞幹, ワークショップ頭頸部癌治療—最新の知見—: 第36回日本外科系連合学会学術集会、浦安、2011年6月

② S Zenda: Proton Beam Therapy for Patients with Malignancies of The Nasal Cavity, Para-nasal Sinuses, and/or Involving The Skull Base: The Analysis of Late Toxicity, American Society for Radiation Oncology (ASTRO), Miami, Oct 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/ncce/rcio/research/ptd/szenda.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

全田 貞幹 (ZENDA SADAMOTO)
独立行政法人国立がん研究センター・
臨床開発センター・研究員
研究者番号：30466198

(2) 研究分担者

大村 素子 (OMURA MOTOKO)
横浜市立大学大学院・医学研究科・
客員准教授
研究者番号：70244506

原 孝光 (OMURA MOTOKO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70464542