

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710071

研究課題名(和文)放射線誘発乳がんにおけるマイクロRNAの包括的理解

研究課題名(英文)Comprehensive study of the importance of miRNA on radiation-induced mammary carcinogenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では放射線誘発乳がん発生メカニズムにおけるマイクロRNA(miRNA)の重要性を多面的に解析した。ラット放射線誘発乳がんで見いだされたmiR-194が複数のヒト乳がん細胞株でその増殖能と関連性があることが明らかとなった。乳がん幹細胞はヒト乳がん細胞株を特殊な環境下で培養(mammosphere培養)することにより得られるが、その細胞ではmiR-22が増加しており、それはmammosphere形成能ばかりか放射線による生存率にも関与することが示唆された。また、放射線被ばくし、乳がんが出来た一部のラット血清中でmiR-194が増加していたが、有意差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I comprehensively analyzed the importance of microRNA(miRNA) on radiation-induced mammary carcinogenesis. The inhibition of miR-194 suppressed the cell growth rate in some human breast cancer cell lines. I obtained breast cancer stem cells under specific culture condition(mammosphere culture). In these cells, the upregulation of miR-22 was observed. The manipulation of miR-22 level changed not only the frequency of mammosphere formation but also the sensitivity to radiation exposure evaluated by colony formation assay. The upregulation of miR-194 in sera of rat radiation-induced mammary carcinoma model was observed in part but not significant.

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 マイクロRNA がん幹細胞

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、最も発生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生率が高いことが明らかにされている (Preston et al., *Radiat Res.*, 2007)が、放射線による乳がん発生メカニズムはほとんど明らかにされていない。現時点では、1) 原爆被爆者の乳がんにおける HER2 と C-MYC 遺伝子の増幅例は対象となる乳がん比べ、有意に増加していたこと (Miura et al., *Cancer*, 2008)、2) ホジキンリンパ腫を放射線治療した患者に発生した乳がんでは対象となる乳がん比べ異なる遺伝子発現プロファイルを示したこと (Broeks et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010)等の報告により、放射線被ばくで誘発される乳がんは自然発生乳がんとは異なる発生メカニズムを持つことが考えられる。昨今の医療分野における放射線利用の増大に加え、原子力発電や放射線の工業利用により、一般住民の放射線被ばくリスクは高まっている。また、放射線を用いたがんなどの疾患の早期発見やその治療により、これまであまり注目を集めてこなかった二次発がんといった副次的な面が脚光を浴びるようになった。今後より増大することも考えられる二次発がんの早期発見・早期治療において、放射線による乳がん発生メカニズムを明らかにすることは重要である。

この放射線被ばくによる乳がん発生メカニズムを明らかとするために、申請者らはモデル動物 (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のゲノム DNA のコピー数異常を網羅的に検討した。その結果、放射線誘発乳がんでは 1q12 領域の増幅、4 番染色体トリソミー、3q35q36、5q32そして 7q11 領域の欠損が観察され、これらの異常は通常の飼育下で発生する乳がん (自然発生) では観察されなかったこと、そして、全体のゲノム欠損数は自然発生に比べ、放射線誘発乳がんでは有意に多く引き起こされていたことを見出している (Iizuka et al., *Radiat 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) が乳がんを含む数多くのイベントに重要な役割を演じていることが近年明らかとなった。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。

ラット放射線誘発乳がんの特徴的な miRNA をとらえるために申請者はマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、自然発生の乳がんと比較して放射線誘発乳がんでは miR-135b、miR-192、miR-194 ならびに miR-211 が有意に高いことを見出している (Iizuka et al., *Radiat Res.*, 2013)。miR-192 ならびに miR-194 はがん抑制遺伝子 p53 の下流にあり (Braun et al., *Cancer Res.*, 2008)、放射線被ばくによる DNA 損傷に反応して増加する miRNA であると推測される。また miR-135b は胚性幹細胞において発現が上昇して分化に伴い、減少することから (Sarver et

al., *BMC Cancer*, 2009)、未分化な細胞が放射線誘発乳がんががん化していることが示唆される。今のところなぜこれらの miRNA の発現が高まるのかわからないが、放射線被ばくで乳がん発生率が高まる一つの要因であると推察される。

また、注目すべきは miRNA が血液などの体液中を安定的に循環していて、乳がんなどの疾患と血中での特定の miRNA 発現異常の相関が報告されている (Kosaka et al., *Cancer Sci.*, 2010)。

がん治療における miRNA の有用性についても多くの報告がある。たとえば miR-21 に対する inhibitor を乳がん細胞株 MCF-7 に導入すると in vitro ならびにマウス移植腫瘍モデルでアポトーシスによる細胞死の増加、細胞増殖の抑制が示されている (Si et al., *Oncogene*, 2007)。現在、miRNA 創薬の可能性を模索するベンチャー企業もいくつか出現していることから、がん治療において miRNA をターゲットとできる可能性は高い。

がん研究では近年、がん幹細胞に着目した研究が数多くみられ、通常のがん細胞と異なる放射線に対する感受性を示すことが報告されている。Karimi-Busheri らは MCF-7 中に存在するがん幹細胞が活性酸素種の生成低下を引き起こして DNA 一本鎖切断修復経路が活性化しており、結果的に有意に老化が実行されにくいことなどを示している (*Breast Cancer Res.* 2010)。今のところ乳がん幹細胞の放射線による miRNA 研究は行われていない。

2. 研究の目的

以上の事から miRNA が乳がんにおける発がん・診断・治療に大いにかかわっていることが推測されるため、これらを並行して進めていくことで、放射線誘発乳がんを miRNA の観点から包括的に理解することを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

前述の通り、本研究では Karimi-Busheri らの方法に従い、ヒト乳がん細胞 MCF-7、MDA-MB-231、T47D などを用いる。がん幹細胞は mammosphere と呼ばれる非接着の球状細胞集団に含まれていることが知られている。この mammosphere を形成させるために、低接着プレートで basic fibroblast growth factor、epithelial growth factor、insulin 含有血清 (-) 培地にて培養すると前述の非接着の球状の細胞塊が観察される。それを回収し、トリプシンで細胞を単離し、実験に用いる。最初に、mammosphere に含まれる細胞ががん幹細胞かどうか同定するために、CD24/CD44 細胞表面マーカーを用い、フローサイトメーターにて検討することで本実験系の有用性を確認する。

一方で血清からの miRNA の抽出は Kosaka らの方法に従う。採取した血液を遠心し、血清部分を分離する。そこから miRNeasy (Qiagen) を用い miRNA を分離する。血清中の miRNA は今のところ内部標準となる House Keeping 遺伝子のような miRNA は同定されていないため、分離する血清中に線虫由来の合成 miRNA を添加し、そ

れを内部標準とする方法が確立されている。

放射線誘発乳がんで発現変動が見られた miR-135b, miR-192, miR-194 ならびに miR-211 に関し、不死化したヒト乳腺上皮細胞株に比べ、ヒト乳がん細胞株において変化していた miR-192 ならびに miR-194 の機能解析を行う。具体的には miScript miRNA mimic または inhibitor (Qiagen)を用いる。これらは miR-192 の配列を模倣したもの (mimic) ならびにそれら配列と相補的な、機能を阻害するもの (inhibitor) であり、細胞に導入することで、miRNA 発現の調節を行うことができる。これらを導入した細胞での細胞増殖に与える影響を検討する。

次に、前述の実験系を用いて、がん幹細胞ならびに放射線被ばくにより乳がんを発症したラット血清における miRNA 発現を TaqMan microRNA assays (Life technologies)を用い、解析する。これらの結果と放射線誘発乳がん発現変動している miRNA との関連性を確認する。

がん幹細胞では放射線被ばくにより細胞が示す変化を検討する。¹³⁷Cs 線源 (Gammacell 40 Exactor)にて 線を照射する実験を行い、通常のがん細胞との放射線感受性の違いを検討する。特に細胞死をコロニー形成法 (増殖死を判定する実験) で検討する。

見出されたがん幹細胞特異的な miRNA のがん細胞での機能解析を行う。前述の合成 miRNA を細胞に導入し、mammosphere 形成能や放射線照射による細胞死に与える影響を検討する。

4. 研究成果

ラット放射線誘発乳がん発現変動が見られ、かつヒト乳腺上皮細胞株に比べ、ヒト乳がん細胞株において変化していた miR-192 ならびに miR-194 の細胞増殖等の機能解析を行ったところ、エストロゲン受容体陽性の MCF-7 に加え、T47D ヒト乳がん細胞株において miR-194 を抑制することにより、細胞増殖が阻害された (雑誌論文2にて報告済み)。一方で、エストロゲン受容体陰性 MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞株ではその効果が観察されなかったことから、エストロゲン受容体の状態が miR-194 の細胞増殖への作用において重要な役割を演じていることが示唆された。また、細胞増殖への miR-192 の効果は観察されなかった。

mammosphere 培養法で培養した非接着の球状細胞集団 (右図参照) を単離し、CD24 ならびに CD44 細胞表面マーカーを用いたフローサイトメーター解析を行った。その結果、通常の培養条件下の細胞群に比べ、mammosphere 構成細胞群では CD24⁺/CD44⁺を示す細胞の割合が多かった。これらの細胞から miRNA を抽出し、20 種類程度の miRNA の発現量を TaqMan microRNA Assays にて検討した結果、miR-22 が mammosphere に含まれる細胞に多く発現していることが明らかとなった。

また、この細胞は放射線被ばくに対し、抵抗性を示すと言われているが、様々な細胞株で検討した結果、細胞株やその状態により異なる応答性を示すことが示唆された。

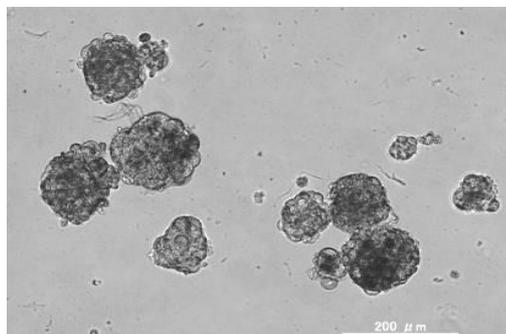


図 T47D 細胞を用いた mammosphere 培養の一例

miR-22 に関して乳がん細胞株でその発現量を調節したところ、mammosphere 形成効率に変化が見られたことから、幹細胞にとって重要な miRNA であることが示唆された。また、miR-22 は一部の乳がん細胞株において放射線感受性を修飾する効果があることが示唆された。

miR-22 は実際、乳がん細胞の stemness の維持に重要であることが明らかにされている (Song et al., *Cell*, 2013)。

放射線被ばくし乳がんが生じたラット血清から miRNA を抽出し、前述の TaqMan microRNA Assays を用いて、ラット放射線誘発乳がん発現変動を示した miR-135b, miR-192, miR-194 ならびに miR-211 の発現量を検討した。最初の検討では、miR-194 が放射線被ばくして乳がんができたラット血清に有意に多く含まれる結果が得られた。しかしながらその後、検討数を増やし、かつ、放射線被ばくし乳がんが出来た群 (放射線 (+)乳がん (+)) と放射線 (+)乳がん (-)、放射線 (-)乳がん (+)、放射線 (-)乳がん (-) の各群を比較検討したところ、放射線被ばくとの関連性は低いという結論に至った。

以上の結果から、放射線誘発ラット乳がん発現変化が見出された miRNA は血清中ではほとんど変化していないことが明らかとなった。また、同様に前述の miRNA は mammosphere 培養法で得られた細胞において、あまり大きな発現変化は示さず、むしろ miR-22 といったその他の miRNA の発現変動が観察された。ラット乳がんの解析では、miR-22 は正常組織に比べ自然発生ならびに放射線誘発乳がん有意に減少する miRNA として同定されているが、このことは乳がん組織には乳がん幹細胞はごく少数が存在し、それ以外のがん細胞では miR-22 は減少しているため、全体として乳がん組織では miR-22 が有意に減少している結果が得られたものと推察される。本研究で用いた mammosphere 培養により初めて miR-22 による放射線感受性や stemness の修飾作用が明らかとなったことからわかるように、今後さらに、乳がん細胞、乳がん幹細胞ならびに血清での miRNA 発現の差異に着目し、研究を進めていきたいと考えている。

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 4 件)

1. Daino K, Imaoka T, Morioka T, Tani S, lizuka D, Nishimura M, Shimada Y. Loss of the BRCA1-interacting helicase BRIP1 results in abnormal mammary acinar morphogenesis. PLoS One. 査読有, 8, 2013, e74013. doi: 10.1371/journal.pone.0074013.
2. lizuka D, Imaoka T, Nishimura M, Kawai H, Suzuki F, Shimada Y. Aberrant microRNA expression in radiation-induced rat mammary cancer: the potential role of miR-194 overexpression in cancer cell proliferation. Radiat Res. 査読有, 179, 2013, 151-9. doi: 10.1667/RR2927.1.
3. Imaoka T, Nishimura M, Daino K, Kokubo T, Doi K, lizuka D, Nishimura Y, Okutani T, Takabatake M, Kakinuma S, Shimada Y. Influence of age on the relative biological effectiveness of carbon ion radiation for induction of rat mammary carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 査読有, 85, 2013, 1134-40. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.08.035.
4. Imaoka T, Nishimura M, lizuka D, Nishimura Y, Ohmachi Y, Shimada Y. Pre- and postpubertal irradiation induces mammary cancers with distinct expression of hormone receptors, ErbB ligands, and developmental genes in rats. Mol Carcinog. 査読有, 50, 2011, 539-52. doi: 10.1002/mc.20746.

[学会発表] (計 7 件)

1. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 乳腺幹細胞における放射線影響検出系の構築と放射線・抗がん剤評価系への応用の可能性, 第 16 回癌治療増感研究シンポジウム, 2014 年 2 月 7 日, 奈良
2. 飯塚大輔, 桐山慧大, 河合秀彦, 泉俊輔, 鈴木文男, 神谷研二, 量的・質的变化に着目した放射線被ばくの尿中バイオマーカー探索, 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013 年 10 月 18 日, 青森
3. lizuka D, Kiriya K, Kawai H, Izumi S, Sasatani M, Kamiya K. Identification of urinary biomarker of radiation exposure using mass spectrometry. Radiation Research Society annual meeting 2013, 18 Sep 2013, New Orleans USA.
4. lizuka D, Yoshioka S, Kawai H, Kiriya K, Izumi S, Nishimura M, Shimada Y, Kamiya K, Suzuki F. Mouse urinary hepcidin-2 is a potential biomarker of radiation exposure. Asian Congress of Radiation Research 2013, 12 May 2013, Beijing, China.
5. 飯塚大輔, 桐山慧大, 河合秀彦, 泉俊輔, 鈴木文男, 神谷研二, 放射線被ばくの新規バイオマーカーの探索, 平成 25 年若手放射線生物学研究会勉強会, 2013 年 3 月 28 日, 岡山
6. 飯塚大輔, 河合秀彦, 鈴木文男, 血液中で

の放射線被ばく応答性マイクロ RNA 解析, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011 年 11 月 19 日, 神戸

7. 飯塚大輔, 河合秀彦, 吉岡進, 泉俊輔, 西村まゆみ, 島田義也, 鈴木文男, 放射線被ばくのバイオマーカー探索, 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 20 日, 大阪

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