

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710074

研究課題名(和文)放射線誘発乳がんの起源細胞と表現型・遺伝子型に関する研究

研究課題名(英文)Phenotypic and genotypic features of radiation-induced mammary cancer and insights into its cell of origin

研究代表者

今岡 達彦 (Imaoka, Tatsuhiko)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：40356134

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)：放射線が特定の分化段階の細胞から特に多くの乳がんを発生させるかどうかはわかっていない。無処理、線照射あるいは化学物質投与したラットに発生した乳がんを、5種の抗原の免疫組織化学及びマイクロアレイによる遺伝子発現データによってクラスタリングすると、乳がんは数個のクラスターに分割され、放射線誘発乳がんが早発を特徴とする特定クラスターに偏ることがわかった。過去にこのタイプが乳腺の前駆細胞を起源とすることが示唆されており、これが放射線誘発乳がんに特徴的な起源細胞であると推測される。

研究成果の概要(英文)：It is unclear whether radiation-induced breast cancer shows specific phenotypic and genotypic features and originates from cells at a specific differentiation stage. We evaluated the associations between genetic and phenotypic features of spontaneous, radiation-induced and chemically-induced rat mammary cancers. We revealed that clustering analyses of immunohistochemical and microarray-based gene expression profile data classified the cancers into several subtypes. Radiation-induced cancers were overrepresented in a specific subtype, which developed earlier than others. As this subtype has been reported to originate from a specific progenitor cell in humans and mice, the present results suggest that radiation-induced rat mammary cancer initiates in cells at a specific differentiation stage.

研究分野：複合新領域

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：生物影響 放射線発がん in vivo実験 起源細胞 乳がん 単回照射

#### 1. 研究開始当初の背景

放射線は線量に依存した頻度でがんを誘発することが知られる。乳腺は、放射線誘発がん感受性が高い組織である。研究代表者らは、放射線誘発ラット乳がんモデルを使用したこれまでの研究で、放射線が乳腺内の未分化細胞を標的として、独特の遺伝子変異および遺伝子発現変化を惹起して乳がんを発生させるといふこと、また、自然発生乳がんは終蕾以外の部位の細胞から別の遺伝子変化によって生じることを示唆してきた。近年、ヒト乳がんの遺伝子発現解析が進み、乳がんを数個のサブタイプ (luminal A, luminal B, ERBB2, basal-like, normal-like, claudin-low) に分類するようになった。また正常乳腺上皮組織の細胞分化ヒエラルヒーの解明が進み、各サブタイプの乳がんの起源細胞 (cell of origin of cancer) がヒエラルヒーのどこに位置するかについてもいくつか仮説が提唱されている。しかしながら、放射線誘発乳がんが特定の起源細胞を有するかどうかは、解明されていない。

#### 2. 研究の目的

放射線誘発ラット乳がんモデルにおいて、がんの起源細胞を推定し、腫瘍の遺伝子変化・表現型等の特徴との関連を研究する。具体的には、

(1) ラット乳がんのサブタイプを、免疫組織化学的マーカー、遺伝子発現プロファイル等を基に判定する方法を開発し、放射線誘発乳がんのサブタイプの特徴を明らかにする。

(2) ラット正常乳腺組織から細胞表面抗原、アノキス耐性等を用いて未分化細胞を濃縮する方法を開発し、移植実験によって放射線誘発乳がんの起源細胞を推定する。

#### 3. 研究の方法

動物実験は所属機関の動物実験委員会において承認された計画に従って実施した。

(1) ラット乳がんは、1~7週齢のラットに線あるいは重粒子線の照射、もしくは発がん物質の投与によって誘発したものと、無処理ラットに自然に発生したものを使用した。免疫組織化学は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、ペルオキシダーゼ染色によって検出した。遺伝子発現プロファイルはマイクロアレイによって解析した。

(2) ラット正常乳腺組織からの未分化細胞濃縮については、文献的検討の他、アノキス耐性による方法を検討した。濃縮した細胞あるいは未濃縮の細胞をトリプシン処理によって解離し、一定数を3週齢ラットの乳腺上皮廓清脂肪組織 (cleared fat pad) に移植し、3週後にコロニー形成を計測した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット乳がんサブタイプを免疫組織化学的に判定する方法については、ヒト乳がんの分類に有用な抗原としてエストロゲン受

容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、サイトケラチン 5 (CK5)、EGF 受容体 2 (ERBB2) 及び p63 を選び、ラット乳がんを染色して、陽性細胞率を手動で計測、あるいはバーチャルスライド化した標本画像上で自動的に算出した。これら抗原は多くまたは一部のラット乳がんにおいて発現しており、手動及び自動による陽性率は高い相関を示した。成体期あるいは小児期に線照射により誘発した乳がん計 42 個の陽性率データを用いてクラスター解析を行ったところ、数種類に分類された。放射線誘発乳がんが特定クラスターに偏っており、このクラスターに属する乳がんは他のクラスターに属するものより早く発生した。

(2) ラット乳がんサブタイプを遺伝子発現によって判定する方法については、まず、Tibshirani ら (2002) の報告しているマイクロアレイデータの分類アルゴリズムである prediction analysis of microarray 法により、Sorlie ら (2003) のヒト乳がん遺伝子発現データ及び研究代表者が過去の実験で入手したラット乳がんデータを用いて、サブタイプ判定法の予備的検証を行った。また、ヒト及びラットのマイクロアレイデータ間の組織的バイアスを除去することで分類結果が改善されることを確認した。さらに、クラスター化の統計学的有意性を検定する既報アルゴリズム 2 種 (sigclust 法及び pvclust 法) を実行する情報処理システムも整備した。免疫組織化学の陽性率データのある乳がん 24 個のマイクロアレイデータを新たに取得し、過去のデータと合わせた 84 個のデータから組織的バイアスを除去すると、クラスター化の有意性に基づいて数種類に分類された。サブタイプ既知のヒト乳がん等 337 個の公開アレイデータを元に、学習・分類アルゴリズムによってラット乳がんクラスターを特徴付けした。放射線誘発乳がんは特定クラスターに偏っており、このクラスターに属する乳がんは他より早発した。

(3) 細胞表面抗原を利用した未分化細胞濃縮については、本研究開始後に同趣旨の報告 (Sharma ら、2011) が公表されたため着手前に当該文献を検討した結果、予定していた手法ではラット乳腺未分化細胞は必ずしも濃縮できないと考えられたため、アノキス耐性による方法を主に検討することとした。アノキス耐性によって濃縮した未分化細胞の解析法を整備した。濃縮された細胞は、個体に移植しても再生能が低く、予定した移植実験に適さないことがわかった。

(4) 以上の結果を総合すると、放射線が誘発するラット乳がんは、特定の抗原の陽性率や遺伝子発現プロファイルによって特徴づけられる特定のサブタイプに偏ることがわかった。このサブタイプは、ヒト及びマウスで

は特定細胞系譜の前駆細胞を起源とすることが、過去に示唆されている。これらの知見を総合すると、放射線はこの前駆細胞を起源とする発がんを特によく誘発すると考えられる。

#### 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8件)

Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazutaka Doi, Shusuke Tani, Ken-ichi Ishikawa, Satoshi Yamashita, Toshikazu Ushijima, Takashi Imai, Yoshiya Shimada. Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer*, 査読有, 134(7), 1529-1538, 2014

DOI: 10.1002/ijc.28480

Tatsuhiko Imaoka, Tomomi Okutani, Daino Kazuhiro, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada. Overexpression of NOTCH-regulated ankyrin repeat protein is associated with breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res*, 査読有, 34(5), 2165-2171, 2014

Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Toshiaki Kokubo, Kazutaka Doi, Daisuke Iizuka, Yukiko Nishimura, Tomomi Okutani, Masaru Takabatake, Shizuko Kakinuma, Yoshiya Shimada: 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(4), 1134-1140, 2013

DOI:10.1016/j.ijrobp.2012.08.035

Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Hidehiko Kawai, Fumio Suzuki, Yoshiya Shimada: 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(2), 151-159, 2013

DOI:10.1667/RR2927.1

Tatsuhiko Imaoka, Hiromi Hisatune, Yoshimi Sakanishi, Yukiko Nishimura, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland. *J Endocrinol Invest*, 査読有 35(9), 828-834, 2012

DOI: 10.3275/8189

今岡 達彦、細木 彩夏、臺野 和広、高畠 賢、西村 まゆみ、島田 義也: 長期低線量率被ばく状況における乳がん誘発影響の蓄積性とその機構、*放射線生物研究*、査読有、47(3)、233-247、2012

DOI: 10.1002/mc.20746

今岡 達彦、臺野 和広、西村 まゆみ、飯塚 大輔、高畠 賢、島田 義也: 放射線誘発乳がん実験モデルとしての Sprague-Dawley ラット、*アニテックス*、査読無、23(5)、4-9、2011

##### [学会発表](計8件)

Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kenichi Ishikawa, Satoshi Yamashita, Toshikazu Ushijima, Takashi Imai, Yoshiya Shimada. Complex interactions between ionizing radiation and carcinogenic chemicals on rat mammary carcinogenesis. 第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月

今岡 達彦、西村 まゆみ、臺野 和広、細木 彩夏、高畠 賢、ショウラー 恵、飯塚 大輔、島田 義也、低線量率被ばくと高線量率被ばくが引き起こす生物影響に対する分子・細胞生物学的アプローチ: 個体における放射線発がんメカニズム研究からのアプローチ、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月

今岡 達彦、臺野 和広、西村 まゆみ、細木 彩夏、島田 義也: 長期の蓄積線量は発がん影響を表すか: 乳がんの例の考察、日本放射線影響学会第55回大会、仙台市、2012年9月

今岡 達彦、細木 彩夏、臺野 和広、高畠 賢、西村 まゆみ、島田 義也: 長期の被ばくによる乳がんリスクの蓄積機序に関する考察、京都大学原子炉実験所専門研究会「長期放射線被ばくによる生物学的影響研究の展望」、大阪府泉南郡、2012年8月

Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kenichi Ishikawa, Satoshi Yamashita, Yasushi Ohmachi, Hideyuki Suzuki, Kazuhiro Daino, Toshikazu Ushijima, Takashi Imai, Yoshiya Shimada: Combined exposure to multiple carcinogens enhances development of rat mammary cancers with

characteristic gene expression. The 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Barcelona, 2012年7月

今岡 達彦、臺野 和広、西村 まゆみ、島田 義也：乳腺の幹細胞と放射線発がん、日本放射線影響学会第54回大会、神戸市、2011年11月

Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Toshiaki Kokubo, Yukiko Nishimura, Tomomi Okutani, Masaru Takabatake, Shizuko Kakinuma, Takashi Takabatake, Yi Shang, Yoshiya Shimada: Mammary carcinogenesis after exposure of fetal, neonatal, juvenile and adult rats to gamma rays and carbon ions, 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, 2011年8月

今岡 達彦、臺野 和広、飯塚 大輔、小久保 年章、西村 由希子、奥谷 倫未、高畠 賢、柿沼 志津子、高畠 貴志、尚 奕、島田 義也：ガンマ線及び炭素イオン線によるラット乳がん誘発効果の被ばく時年齢依存性、京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪府泉南郡、2011年7月

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nirs.go.jp/information/event/report/2012/1022.shtml>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今岡 達彦 (IMAOKA, Tatsuhiko)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：40356134

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし