

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740022

研究課題名(和文) 乳腺の放射線発がん過程におけるホメオボックス遺伝子のエピジェネティック異常

研究課題名(英文) Epigenetic dysregulation of homeobox genes in radiation-induced rat mammary carcinogenesis

研究代表者

臺野 和広 (Daino, Kazuhiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：90543299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織である。しかしながら、放射線で誘発された乳がんにおけるエピジェネティック異常に関する知見は未だ乏しい。本研究により、放射線による乳腺の発がんの初期過程には、ホメオボックス遺伝子のエピジェネティックな異常が関与している可能性が示唆された。また、放射線誘発乳がんにおいて変異が観察されるエピジェネティック調節遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The mammary gland is one of the most sensitive organs to radiation carcinogenesis. However, epigenetic dysregulation in radiation-induced breast cancer have yet to be well characterized. In this study, we obtained results suggesting the involvement of epigenetic dysregulation of homeobox genes in radiation-induced rat mammary carcinogenesis. In addition, we identified mutations in several epigenetic regulator genes in radiation-induced rat mammary carcinomas.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 乳がん エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

発がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異、欠失といったゲノム DNA の配列異常や、DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな異常の蓄積によって多段階的に進行する。乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織であるが、放射線で誘発された乳がんにおけるエピジェネティック異常に関する知見は、未だ非常に少ない。

申請者らは、これまでに放射線で誘発されたラット乳がんにおいてマイクロアレイを用いたゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行い、乳がんの 50% 以上において、高頻度に DNA メチル化異常を伴う新規がん関連遺伝子候補を複数見いだした。興味深いことに、候補遺伝子の大部分は、発生・分化に重要な役割を果たすことが知られているホメオボックスと呼ばれる転写因子をコードする遺伝子であった。

2. 研究の目的

本研究は、ホメオボックス遺伝子のエピジェネティックな異常と、それらを制御するポリコム/トリソラックス群タンパク質発現の異常が、放射線被ばくによる乳腺組織の多段階発がん過程のどのステップで引き起こされるか、さらには、発がんに結びつくメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 放射線 (ガンマ線、4 Gy) 照射 4、6 ヶ月後の雌ラット (Sprague-Dawley 系統と Copenhagen 系統の雑種第 1 代) から、乳腺組織を摘出し、乳腺組織のホルマウント標本作製した。その後、実体顕微鏡下で、乳管の拡張や腫大といった病変部位の検出を行った。病変の一部は、病理解析用にホルマリン固定し、残る病変より分子解析用のサンプルを抽出した。

(2) ホルマリン固定した病変、及び病変から抽出した DNA を用いて、バイサルファイトシークエンス、免疫組織学染色等を行い、候補ホメオボックス遺伝子の DNA メチル化および、発現異常、ポリコム/トリソラックス群タンパク質の発現異常が起こっているかどうかを検証した。

(3) ヒト乳がんにおいて遺伝子変異が報告されているエピジェネティック調節遺伝子について、対応するラットの遺伝子領域を回収するためのプローブの設計を行った。設計したプローブ、及び申請者らが収集している放射線誘発ラット乳がん検体から抽出した DNA を用いて、次世代シークエンス用のライブラリーを作成し、次世代シークエンサーを

用いた候補遺伝子の配列解析を行った。

また、マイクロアレイを用いて、ラット乳がんにおける遺伝子発現プロファイルの解析を行い、乳がんにおいて発現異常を示す遺伝子と、異常が予測されるシグナル経路の抽出を行った。

4. 研究成果

(1) 病変部位の検出を行った結果、照射 4 ヶ月後の乳腺では、50% (15/30 匹) のラットにおいて病変が検出された (図 1)。また、ラット 1 匹あたりの病変数は、0.8 (24/30 匹) であった。照射 6 ヶ月後の乳腺では、67% (8/12 匹) のラットにおいて病変が検出され、ラット 1 匹あたりの病変数は、1.3 (16/12 匹) と、病変数の増加が観察された。一方、非照射コントロール (6 ヶ月後) では、病変は検出されなかった (0/8 匹) ことから、放射線を照射したラットの乳腺において検出された病変は、放射線により誘発された病変であると考えられた。

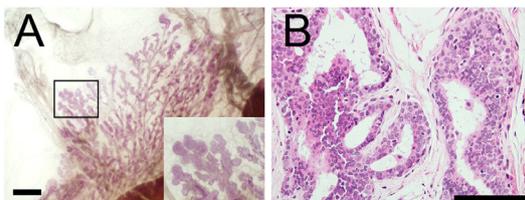


図 1 放射線で誘発されたラット乳腺の前がん病変。(A) 病変のホルマウント標本画像。乳管の拡張や腫大が観察される。右下に拡大像を示す。スケールバー、1 mm (B) 病変 (非浸潤性乳管がん) の病理組織画像。スケールバー、100 μ m

(2) 前がん病変における候補ホメオボックス遺伝子の DNA メチル化異常とその発現異常を検証した結果、プロモーター領域の DNA メチル化と発現量の低下を伴うホメオボックス遺伝子 1 種を見出した (図 2、未発表データ)。文献情報から、同遺伝子は、乳腺の発生・分化に機能し、ヒト乳がんにおいても DNA の高メチル化が観察されることが報告されていることが分かった。また、多くの前がん病変では、同遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化のパターンに均一性が見られたことから (図 2A)、前がん病変では、クローン増殖した細胞が均一な集団として存在していることを示唆していると考えられた。さらに、前がん病変において発現量上昇が観察されるポリコム群タンパク質 1 種を見出した (未発表データ)。

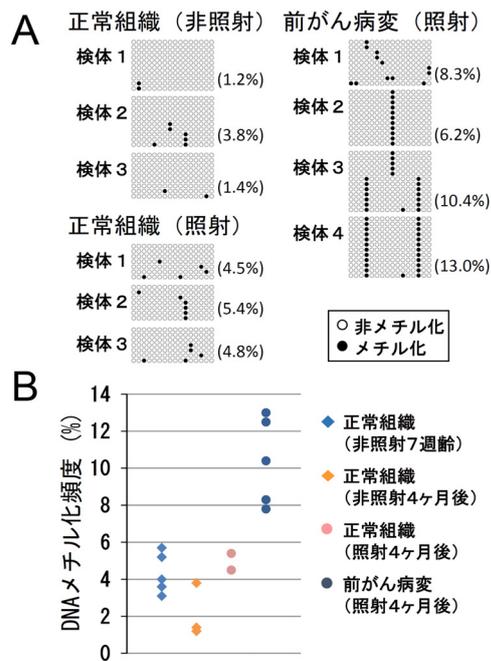


図2 放射線で誘発されたラット乳腺の前がん病変において DNA の高メチル化が観察される遺伝子。(A) 正常乳腺組織、前がん病変におけるホメオボックス遺伝子プロモーター領域のバイサルファイトシーケンス解析結果。(B) バイサルファイトシーケンス解析による DNA メチル化の頻度。前がん病変において、DNA メチル化頻度の上昇が観察される。

(3) 放射線誘発ラット乳がん検体において、次世代シーケンサーによるエピジェネティック調節遺伝子の変異解析を行った結果、ヒストン脱アセチル化、クロマチンリモデリングに機能するエピジェネティック調節遺伝子計4種において、アミノ酸変異を伴うと予測される遺伝子変異(がんにおける変異アリル頻度10%以上)を検出することに成功した(未発表データ)。また、がんにおける遺伝子変異の頻度は、10%程度であった。興味深いことに、これら遺伝子の一部は、放射線誘発ラット乳がんにおいてゲノムコピー数の減少が高頻度に観察される染色体領域に存在していることが分かった。

また、乳がんにおける遺伝子発現プロファイルの解析を行った結果、ヒト乳がんでは発現異常が報告されているがん関連遺伝子群の他、ポリコム群タンパク質によって発現が調節されていることが報告されている発生・分化に関わる遺伝子群に発現異常が引き起こされていることが示唆された。

これらの結果から、ポリコム群タンパク質の発現異常と、一部のホメオボックス遺伝子におけるDNAメチル化は、乳腺の放射線発がんの初期に観察される現象であることが分かった。また、乳腺の発生やがん化に関わるエピジェネティック調節遺伝子におけるゲノム変異が、エピジェネティックな変化を誘導することで、放射線による乳腺の発がんに関わっていることが示唆された。

本研究から、放射線による乳腺の発がんの初期過程には、ホメオボックス遺伝子のエピジェネティックな異常が関与している可能性が示唆された。また、放射線誘発乳がんの新規原因遺伝子として、遺伝子変異の観察されるエピジェネティック調節遺伝子を同定した。得られた結果は、放射線による発がん機構を明らかにするための有益な基礎的情報となり、より信頼性の高い発がんのリスク推定に役立つと考えられる。さらに、エピジェネティックな異常は、遺伝子の突然変異と異なり可逆的な変化であることから、新しいがんの治療法や予防法の開発への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kaye Showler, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Yukiko Nishimura, Takamitsu Morioka, Benjamin J. Blyth, Toshiaki Kokubo, Masaru Takabatake, Maki Fukuda, Hitomi Moriyama, Shizuko Kakinuma, Masahiro Fukushi, Yoshiya Shimada. Analysis of genes involved in the PI3K/Akt pathway in radiation- and MNU-induced rat mammary carcinomas. *J Radiat Res.* 58(2):183-194 (2017). DOI: 10.1093/jrr/rrw097

[学会発表] (計2件)

- ① 臺野 和広、高島 賢、西村 まゆみ、森岡 孝満、西村 由希子、今岡 達彦、森山 ひとみ、蒲池 雄大、柿沼 志津子、島田 義也、放射線誘発ラット乳がんにおけるエピジェネティック異常、第24回乳癌基礎研究会、いわき市、2015. 9
- ② 臺野 和広、西村 まゆみ、森岡 孝満、ショウラー 恵、今岡 達彦、高島 賢、細木 彩夏、島田 義也、放射線による乳腺の発がん過程におけるDNAメチル化異常、第37回日本分子生物学会年会、横浜市、2014. 11

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臺野 和広 (DAINO, Kazuhiro)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構放射線医学総合研究所・放射線影響研
究部・主任研究員
研究者番号：90543299

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし