

機関番号：82502

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20710049

研究課題名（和文） 新規遺伝子の機能解析による放射線特異的な乳癌誘発メカニズムの解明

研究課題名（英文） Functional analysis of novel genes related to the mechanism of radiation-induced mammary carcinogenesis

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 主任研究員

研究者番号：40356134

研究成果の概要（和文）：放射線誘発ラット乳癌において過剰発現している NRARP 遺伝子が、ヒト乳癌細胞において、おそらく細胞周期調節を介して、細胞増殖等の重要な役割を担っていることを示す証拠を初めて得た。NRARP は細胞内情報伝達を担う分子であり、重要な発生過程を調節すると推定されることから、放射線による乳癌の誘発メカニズムにも重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study suggests that the NRARP gene, which is overexpressed in radiation-induced rat mammary carcinoma, plays a crucial role in proliferation of human breast cancer cells, probably via regulation of the cell cycle. Since NRARP is important in intracellular signaling and regulation of developmental processes, it may be also relevant in the mechanism of radiation-induced mammary carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：放射線発がん、乳がん、遺伝子機能解析、siRNA/RNA 干渉、がん細胞株

1. 研究開始当初の背景

放射線発癌の機序として、古典的には DNA 損傷の誤修復による癌関連遺伝子の変異が想定されてきたが、近年では放射線が誘発するゲノム不安定性とバイスタンダー効果の関与に注目が集まっている。また特に低線量放射線リスクの観点から、自然の発癌と放射線発癌の機序の異同が問題にされ、内因性酸化ストレスと放射線ストレスの比較研究がなされている。これらは米国エネルギー省や欧州共同体のプロジェクトが先導的に進めており、上記のような発癌の比較的初期の事

象の理解はめざましく進んでいる。一方、発癌という現象の全体像はいまだ明らかでなく、我が国でも対がん 10 ヶ年総合戦略などで精力的に研究が進められているが、放射線発癌に注目した研究は少ない。

2. 研究の目的

ラット放射線誘発乳腺腫瘍モデルにおいて発現異常を示す新規遺伝子の機能を、乳癌細胞株を用いて in vitro で解析する。

3. 研究の方法

- (1) 乳がん細胞株および正常乳腺細胞株を入手し、12種類の新規遺伝子の発現状態を通常のRT-PCR法および定量的RT-PCR法により解析して、高発現している遺伝子を選択した。
- (2) siRNA トランスフェクション条件を検討し、これを用いてNRARP遺伝子のノックダウン実験を行い、細胞増殖の変化を調べた。
- (3) NRARP 遺伝子に関して、血管内皮細胞においてNOTCHおよびWNT情報伝達系を調節する役割が報告されたため、遺伝子ノックダウンに伴うこれらの情報伝達系の変化をRT-PCRアレイ法を用いて解析し、定量的RT-PCR法によって再現性を検討した。また、NOTCH経路を阻害するγセクレターゼ特異的阻害剤がNRARP遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。
- (4) ラット乳癌からの細胞株樹立を試みた。

4. 研究成果

- (1) SCD1, NRARP, GPR37の発現がラット乳がん、ヒト乳がんおよび細胞株において高発現していた(図1)。ラット乳がんにおいて発現減少を示す遺伝子で、細胞株でも低発現を示すものは、存在しなかった。

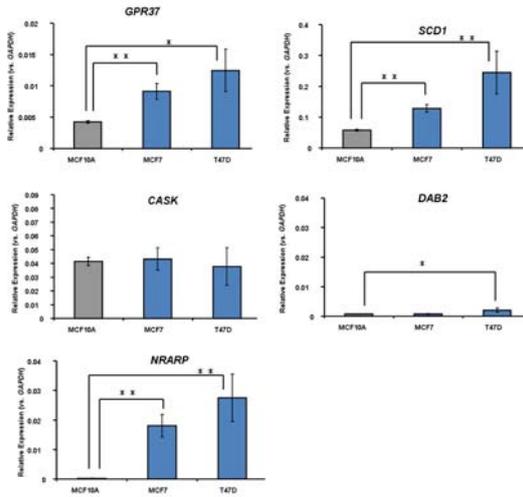


図1 細胞株での遺伝子発現

- (2) 上記3遺伝子の発現を乳がん細胞株においてsiRNAを導入したところ、SCD1およびNRARPの発現が低下し(図2)、細胞増殖が抑制された(図3)。
- (3) NRARP 遺伝子ノックダウンに伴い、細胞周期制御やNOTCHおよびWNT情報伝達系に関連する下流遺伝子(特にWNT情報伝達系の下流因子であるCCND1と、RBやその複数の相互作用因子)の発現が変化することを明らかにした。NOTCH経路を阻害するγセクレターゼ特異的阻害剤処理はNRARP遺伝子発現に影響を及ぼさな

った。

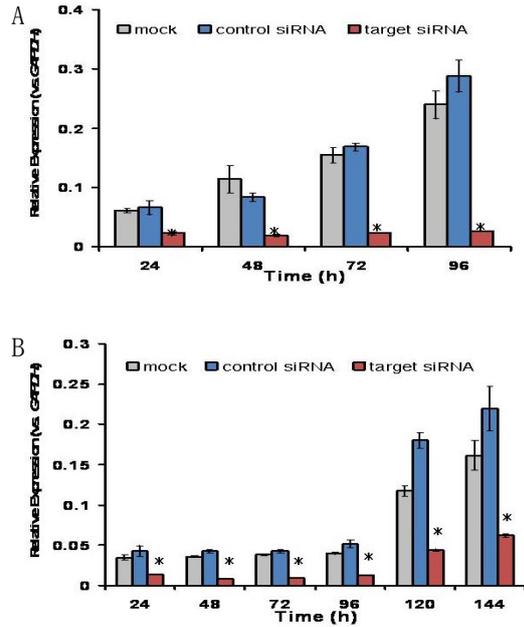


図2 siRNA導入後のSCD1 (A)およびNRARP (B)遺伝子発現

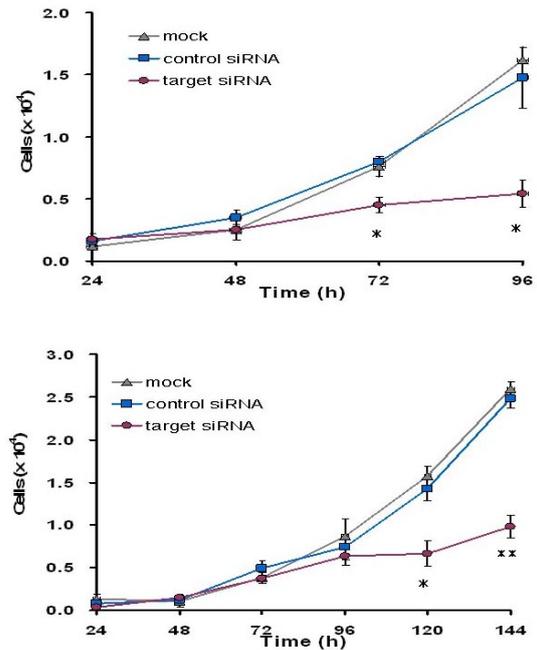


図3 SCD1 (上段)およびNRARP (下段) siRNA導入後の細胞数の変化

- (4) NRARP 遺伝子ノックダウンに伴い、細胞周期制御やNOTCHおよびWNT情報伝達系に関連する下流遺伝子(特にWNT情報伝達系の下流因子であるCCND1と、RBやその複数の相互作用因子)の発現が変化することを明らかにした。NOTCH経路を阻害するγセクレターゼ特異的阻害剤処理はNRARP遺伝子発現に影響を及ぼさな

- った。
- (5) ラット乳癌細胞の樹立に関しては、継代可能な細胞を複数得ることができ、凍結保存を行った。
 - (6) これらの実験結果から、乳癌細胞において NRARP 遺伝子が WNT 経路下流の CCND1 を介した細胞周期調節により細胞増殖等の重要な役割を担っていることが初めて解明された。NRARP は情報伝達を担う分子であり、重要な発生過程を調節する可能性が高いことから、放射線による乳癌の誘発メカニズムにも重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Yukiko Nishimura, Yasushi Ohmachi, Yoshiya Shimada: Pre- and Postpubertal Irradiation Induces Mammary Cancers with Distinct Expression of Hormone Receptors, ErbB Ligands and Developmental Genes in Rats. *Molecular Carcinogenesis* 50(7), 539-52, 2011、査読有
- (2) Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Takashi Takabatake, Mayumi Nishimura, Shizuko Kakinuma, Yukiko Nishimura, Yoshiya Shimada: DNA copy number aberrations and disruption of the p16Ink4a/Rb pathway in radiation-induced and spontaneous rat mammary carcinomas. *Radiation Research*, 174(2), 206-215, 2010、査読有
- (3) Nobuyuki Hamada, Tatsuhiko Imaoka, Shinichiro Masunaga, Toshiyuki Ogata, Ryuichi Okayasu, Akihisa Takahashi, Takamitsu Kato, Yasuhiko Kobayashi*, Takeo Ohnishi, Koji Ono, Yoshiya Shimada, Teruki Teshima: Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. *Journal of Radiation Research*, 51(4), 365-383, 2010、査読有
- (4) Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Kazuhiro Daino, Takashi Takabatake, Mieko Okamoto, Shizuko Kakinuma, Yoshiya Shimada: Radiation-Induced Mammary Carcinogenesis in Rodent Models: What's Different from Chemical Carcinogenesis? *Journal of Radiation Research*, 50(4), 281-293, 2009、査読有

〔学会発表〕(計25件)

- (1) 奥谷倫未、今岡達彦、臺野和広、飯塚大輔、西村まゆみ、野川宏幸、島田義也:

発生関連因子Notch-regulated ankyrin repeat protein (NRARP) のヒト乳がん細胞株における機能解析、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学学会合同、兵庫県神戸市、2010.12

- (2) 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の特徴的なマイクロRNAが乳がん細胞株に与える影響、日本放射線影響学会第53回大会、京都市、2010.10
- (3) Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Takashi Takabatake, Mayumi Nishimura, Shizuko Kakinuma, Yukiko Nishimura, Yoshiya Shimada: DNA copy number aberrations and disruption of the p16INK4a/Rb pathway in radiation-induced and spontaneous rat mammary carcinomas, The 20th International Symposium of Hiroshima Cancer Seminar in conjunction with Three Universities' Consortium, Hiroshima, 2010.10
- (4) 今岡達彦、坂西良彌、久恒裕美、西村由希子、西村まゆみ、島田義也: ラット乳腺において放射線発がん標的になりうる長寿命細胞の増殖性およびその制御、京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪府泉南郡、2010.09
- (5) 高島賢、臺野和広、今岡達彦、福士政広、島田義也: 放射線誘発乳癌におけるmTOR経路の解析、京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪府泉南郡、2010.09
- (6) Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Takashi Takabatake, Kazuhiro Daino, Shizuko Kakinuma, Tomomi Okutani, Masaru Takabatake, Yoshiya Shimada: DNA copy number changes in radiation-induced mammary carcinoma of (SD x COP) F1 hybrid rats, 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, オスロ、2010.06
- (7) Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Hidehiko Kawai, Fumio Suzuki, Yoshiya Shimada: Altered Expression of MicroRNAs in Radiation-induced Rat Mammary Carcinoma., Gordon Research Conference - Mammary Gland Biology, Lucca, 2010.06
- (8) Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Yukiko Nishimura, Yasushi Ohmachi, Daisuke Iizuka, Kazuhiro Daino, Yoshiya Shimada: Pre- and Postpubertal Exposure to Ionizing Radiation Induces Mammary Cancers with Distinct Expression of ErbB Ligand Genes and Hormone Receptors in Rats, Gordon Research Conference for Mammary Gland Biology, Lucca, 2010.06

- (9) Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: Screening of candidate genes regulated by DNA methylation during mammary acinar morphogenesis in vitro, Gordon Research Conferences for Mammary Gland Biology, Lucca, 2010.06
- (10) Tomomi Okutani, Tatsuhiko Imaoka, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Hiroyuki Nogawa, Yoshiya Shimada: Functional Analysis of Novel Mammary Cancer-Related Genes, Keystone Symposia Integration of Developmental Signaling Pathways, Victoria, British Columbia, 2010.03
- (11) Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mieko Okamoto, Yukiko Nishimura, Tomomi Okutani, Yoshiya Shimada: Effect of age at the time of radiation exposure on rodent mammary tumorigenesis, KIDS workshop 2009 in NIRS - IAEA NIRS Joint Workshop & NIRS Symposium on Radiation Protection for Children, Chiba, 2009.12
- (12) Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Takashi Takabatake, Mayumi Nishimura, Shizuko Kakinuma, Hidehiko Kawai*, Fumio Suzuki, Yoshiya Shimada: Altered expression of microRNAs in radiation-induced rat mammary carcinoma, KIDS workshop 2009 in NIRS - IAEA NIRS Joint Workshop & NIRS Symposium on Radiation Protection for Children, Chiba, 2009.12
- (13) Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Takashi Takabatake, Yoshiya Shimada: DNA copy number changes in radiation-induced mammary carcinomas in (SDxCOP) F1 rats, KIDS workshop 2009 in NIRS - IAEA NIRS Joint Workshop & NIRS Symposium on Radiation Protection for Children, Chiba, 2009.12
- (14) Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: Epigenetic gene regulation during mammary gland morphogenesis, KIDS workshop 2009 in NIRS - IAEA NIRS Joint Workshop & NIRS Symposium on Radiation Protection for Children, Chiba, 2009.12
- (15) 奥谷倫未, 今岡達彦, 飯塚大輔, 野川宏幸, 島田義也: 新規乳がん関連遺伝子のヒト乳がん細胞株における機能解析, 第32回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2009.12
- (16) 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年会, 横浜, 2009.12
- (17) 西村まゆみ, 今岡達彦, 高島貴志, 飯塚大輔, 臺野和広, 柿沼志津子, 島田義也: ラット放射線誘発乳がんにおけるLOHとDNAコピー数の解析, 放射線影響学会第52回大会, 広島市, 2009.11
- (18) 今岡達彦, 西村まゆみ, 飯塚大輔, 臺野和広, 西村由希子, 奥谷倫未, 柿沼志津子, 島田義也: 放射線発がんの被ばく時年齢依存性: 実験動物乳がんモデルを中心に, 日本放射線影響学会第52回大会, 広島, 2009.11
- (19) 奥谷倫未, 今岡達彦, 飯塚大輔, 野川宏幸, 島田義也: 新規乳がん関連遺伝子のヒト乳がん細胞株における機能解析, 平成21年度京都大学原子炉実験所専門研究会, 大阪府泉南郡, 2009.10
- (20) 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, 鳥取市, 2009.09
- (21) Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Kazuhiro Daino, Shizuko Kakinuma, Yoshiya Shimada: Influence of co-exposure to gamma-rays on the manifestation of MNU- or PhIP-induced mutations in rat mammary carcinomas, 2nd Asian Congress of Radiation Research, Seoul, 2009.05
- (22) 今岡達彦, 西村まゆみ, 飯塚大輔, 柿沼志津子, 島田義也: 重粒子線のラット乳がん誘発作用, 日本放射線影響学会第51回大会, 北九州, 2008.11
- (23) 今岡達彦, 西村まゆみ, 島田義也: 電離放射線およびメチルニトロソ尿素によるラット乳がん誘発作用の年齢依存性およびそのメカニズム, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10
- (24) 今岡達彦, 西村まゆみ, 波多野由希子, 飯塚大輔, 柿沼志津子, 島田義也: 電離放射線およびメチルニトロソ尿素によるラット乳がん誘発作用の年齢依存性およびそのメカニズム, 平成20年度京都大学原子炉実験所専門研究会, 大阪府泉南郡, 2008.09
- (25) 飯塚大輔, 今岡達彦, 高島貴志, 西村まゆみ, 柿沼志津子, 波多野由希子, 島田義也: 放射線誘発ラット乳がんにおけるゲノムコピー数異常の網羅的解析, 平成20年度京都大学原子炉実験所

専門研究会、大阪府泉南郡、2008.09

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 主任研究員

研究者番号：40356134

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし