

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23710075

研究課題名(和文) 乳腺サイクルにおけるDNA修復遺伝子の役割と放射線発がん機構の解明

研究課題名(英文) The roles of DNA repair genes during the mammary gland development and radiation-induced mammary tumorigenesis

研究代表者

臺野 和広 (DAINO, Kazuhiro)

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・研究員

研究者番号：90543299

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)：乳腺の発生・分化の過程においてDNA損傷応答に違いがあること、DNA修復遺伝子BRIP1が乳腺の発生・分化にも機能し、その機能低下が様々な細胞内シグナル伝達経路の異常を介して、DNA損傷応答と発生・分化両方の異常を引き起こすことを示す結果を得た。BRIP1遺伝子の発現量は、放射線で誘発されたラット乳癌において減少していることから、同遺伝子の機能低下は、放射線による乳腺の発がんにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we obtained results suggesting that the differences in DNA damage response in developing mammary glands, and the DNA repair gene BRIP1 has important roles in promoting normal acinar morphogenesis and loss of BRIP1 disrupts acinar formation possibly through the dysregulation of multiple cellular signaling pathways. Since the expression levels of BRIP1 gene are reduced in rat mammary tumors-induced by ionizing radiation, BRIP1 may play important roles in radiation-induced mammary tumorigenesis.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：乳腺 発生・分化 放射線 DNA損傷修復

1. 研究開始当初の背景

乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織である。これまで、乳がんのリスクが幼少期や思春期の被ばくで高いことや、妊娠・出産を経験することによりリスクが低下することが示唆されているが、それは乳腺が増殖・分化と脱分化・退縮のサイクルを繰り返すことができるユニークな器官であり、その過程で放射線に対する応答が大きく異なるためであると考えられる。しかしながら、それら放射線感受性の違いをもたらす分子基盤は依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究は、乳腺の発生・分化サイクルにおける DNA 修復遺伝子の発現変動と機能について、細胞及び、個体レベルの解析を行い、乳腺サイクルにおける DNA 損傷修復の役割と乳腺の発生・分化の異常という観点から、乳腺の放射線発がん機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幼若期 (3 週齢)、思春期 (7 週齢) 及び、経産 Sprague-Dawley (SD) 雌ラットにガンマ線 (5 Gy) を照射し、照射 1~48 時間後の乳腺組織における遺伝子の発現変化を、マイクロアレイ及び、免疫組織化学染色法により解析した。

(2) 候補遺伝子のうち、乳がんの原因遺伝子の一つである BRCA1 と相互作用する遺伝子 BRIP1 について、RNA 干渉法を用いた遺伝子操作により、同遺伝子の発現が抑制されたヒト正常様乳腺上皮細胞 (MCF-10A) の樹立を行った。

(3) BRIP1 遺伝子の発現が抑制された乳腺細胞を基底膜マトリクス存在下で 3 次元培養し、腺管様構造の形成過程の観察及び、腺管様構造サイズの測定、細胞増殖活性の指標である Ki-67 陽性細胞の染色を行った。

(4) 樹立した BRIP1 遺伝子発現抑制細胞における遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析し、発現量の変動が見られる遺伝子の抽出及び、パスウェイ解析を行った。

(5) 放射線で誘発されたラット乳癌 (12 検体) における BRIP1 遺伝子の発現量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 幼若期の乳腺組織では、思春期及び、経産した個体の乳腺に比べ、放射線照射後に発現量が変動する遺伝子 (DNA 修復遺伝子を含む) の総数が多いことが分かった。また、放射線照射後、幼若期、思春期、経産個体それぞれにおいて特徴的に発現量が変動する遺伝子 (DNA 修復遺伝子を含む) を複数同

定した。放射線照射後、既知の DNA 損傷応答遺伝子に加え、思春期の乳腺では発生・分化、経産後の乳腺では免疫に関わる遺伝子群の発現変動が起こることが分かった (未発表データ)。

(2) 候補遺伝子のうち、BRIP1 遺伝子に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを、ヒト正常様乳腺細胞 (MCF-10A) に感染、導入させることで、shRNA を安定に発現する細胞株を樹立した。その際、5 種類の shRNA 候補配列それぞれについて、少なくとも 10 種類以上の shRNA 導入細胞をクローニングし、ウェスタンブロット法を用いて BRIP1 の発現が最も抑制されている細胞株を選出した (図 1、レーン 5-7)。

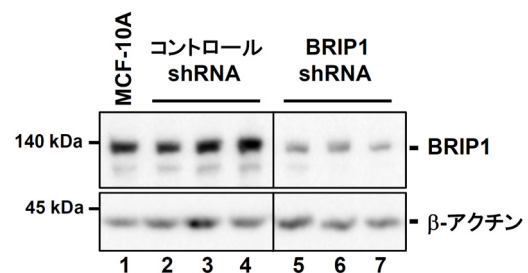


図 1 BRIP1 遺伝子発現抑制細胞の樹立

(3) 樹立した BRIP1 遺伝子発現抑制細胞を、基底膜マトリクス存在下で 3 次元培養すると、コントロール細胞に比べ、腺管構造のサイズの増大や、腺管構造の形態異常が観察された (図 2)。さらに、BRIP1 遺伝子発現抑制細胞では、浸潤性の細胞増殖や、内腔空間の不形成、細胞増殖活性の上昇といった癌の初期病変に観察されるような異常が引き起こされることが分かった (図 3)。

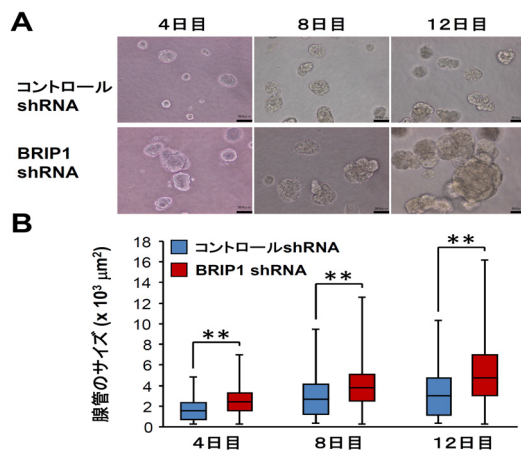


図 2 コントロール細胞及び、BRIP1 遺伝子発現抑制細胞の腺管様構造形成過程 (A) と腺管様構造サイズの変化 (B)

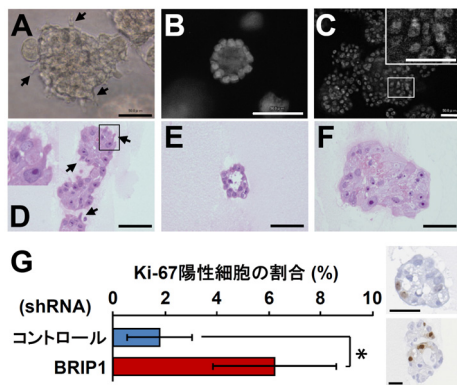


図3 コントロール細胞 (B、E) 及び、BRIP1 遺伝子発現抑制細胞 (A、C、D、F) の腺管様構造形成異常と増殖活性 (G)

(4) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、コントロール細胞に比べ、BRIP1 遺伝子の発現が抑制された細胞では、細胞接着、極性、増殖、発生に関わる複数の遺伝子の発現量が変動していることが分かった (図 4 A)。また、パスウェイ解析から、BRIP1 遺伝子の発現が抑制された細胞では、DNA 損傷応答 (Atm、p53 経路)、LPA、Myc、Wnt、PI3K/Akt といった、乳がんの発症に関連するシグナル伝達経路に異常があることが分かった (図 4 B 及び、C)。

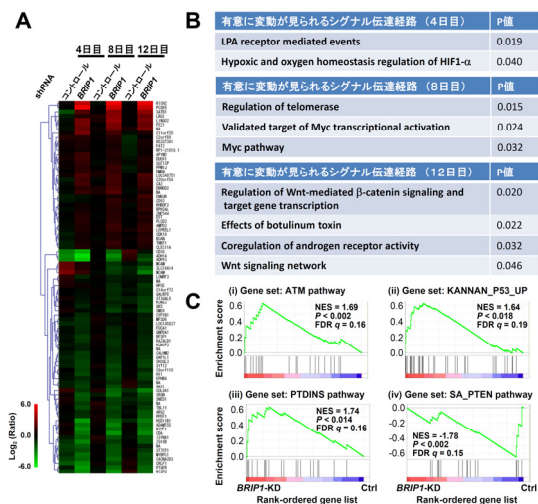


図4 BRIP1 発現抑制細胞において発現の変動する遺伝子 (A) とシグナル伝達経路 (B、C)

(5) 放射線で誘発されたラット乳癌における BRIP1 遺伝子の発現量を解析した結果、正常乳腺組織に比べ、同遺伝子の発現量が減少していることが分かった (図 5)。

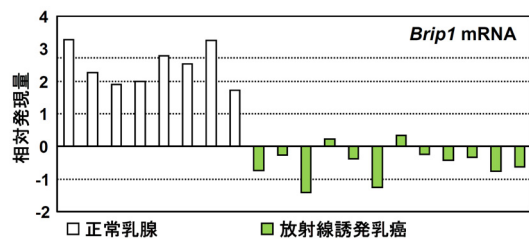


図5 放射線誘発ラット乳癌における BRIP1 遺伝子の発現減少

これらの結果は、乳腺の発生・分化の過程で機能する DNA 損傷応答機構に違いがあること、DNA 修復遺伝子 BRIP1 は、乳腺の発生・分化にも機能し、その機能異常が DNA 損傷応答と発生・分化両方の異常を引き起こすことで発がんに関与していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Takamitsu Morioka, Shusuke Tani, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, and Yoshiya Shimada. Loss of the BRCA1-interacting helicase BRIP1 results in abnormal mammary acinar morphogenesis. *PLoS ONE*. (査読有) 8(9):e74013 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0074013

[学会発表] (計 3 件)

- ① 臺野 和広、今岡 達彦、森岡 孝満、西村 まゆみ、島田 義也、BRCA1 と相互作用するヘリカーゼ BRIP1 の機能喪失は乳腺の腺管形成異常を引き起こす、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡市、2012. 12
- ② Kazuhiro Daino、Tatsuhiko Imaoka、Takamitsu Morioka、Mayumi Nishimura、Yoshiya Shimada. Loss of the BRCA1-interacting helicase BRIP1 results in abnormal mammary acinar morphogenesis. The 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Spain (Barcelona). 2012. 7
- ③ Kazuhiro DAINO、Tatsuhiko IMAOKA、Mayumi NISHIMURA、and Yoshiya SHIMADA. Involvement of BRCA1-interacting helicase BRIP1 during acinar morphogenesis of mammary epithelial cells in a three-dimensional basement membrane culture. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011. 12

[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)

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・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