

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501306

研究課題名(和文) 低線量放射線被曝による生体微小環境内の発がん誘導機序

研究課題名(英文) Integrative genomic and proteomic analyses of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells

研究代表者

田部 陽子 (Tabe, Yoko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70306968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、低線量放射線がヒト生体内の微小環境の中で、前がん状態の細胞に対して発がんに関与する遺伝子発現やその調節機構にどのような影響を与えるのかを調べることを目的とした。研究の結果、低線量放射線ストレスによって前がん状態の細胞内では遺伝子の発現を抑制するmicroRNAを介した遺伝子発現コントロールが機能し、遺伝子とタンパク発現が変化すること、生体微小環境内に存在する間質細胞が、直接・間接的にこれらの前がん細胞内での低線量放射線による遺伝子・タンパク発現変化に関わっていること、が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Exposure to low-dose ionizing radiation (LDIR) can alter mammalian cell gene expression. We compared the cellular response of irradiated immortalized, EB virus;infected, B-cells (EBV-B) cultured alone with that of EBV-B cells co-cultured with bone marrow derived stromal cells (MSCs). The miRNAs let7a, miR-15b, miR-16, miR-21 and a lipid metabolic miRNA hub miR-23b were upregulated after LDIR exposure in the mono-cultured EBV-B cells, but were downregulated in EBV-B cells co-irradiated with MSCs. A lipid biosynthesis enzyme GPAM, the common target of these miRNAs, was downregulated at the level of protein and mRNA expression in the LDIR exposed mono-cultured EBV-B cells and upregulated MSCs co-cultured EBV-B cells, suggesting a putative novel miRNA regulatory mechanism in the genetic control of the LDIR-induced stress response. These findings illustrate that LDIR exposure and the cell's microenvironment can affect specific gene expression, resulting in altered protein expression.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：低線量放射線 微小環境 前がん細胞 microRNA プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

低線量放射線被曝が生体に与える影響の解明は、火急の社会的要請である。特に、低線量放射線が悪性腫瘍の発症にどのような影響を与えるかについて、詳細な検討と解明が求められているが、同分野の研究は立ち遅れており、不明な点が多い。すなわち、「しきい値（急性症状発症率が1%となる放射線量）」以下の低線量放射線被曝が癌・造血器腫瘍（以下がん）発症に及ぼす影響について、複数の仮説が提言されているのが現状である。これらの仮説は、「確立的影響にしきい値はなく、低線量被曝でも被曝量が多いほど確率的影響も増加する」とする「しきい値なし直線仮説」; Linear Non-Threshold (LNT) 仮説」国際放射線防護委員会 (ICRP) が採用「確率的影響はしきい値以下の低線量被曝では生じない」とする「しきい値あり仮説」 仏科学・医学アカデミー見解 LNT 仮説の直線性よりもさらにリスクが高い、とする仮説「低線量被曝は生体に有益な効果をもたらすとする「ホルミシス効果仮説」、等である。しかし、いずれの仮説も十分なエビデンスを提示することができていない。

低線量放射線被曝が生体に与える影響を明らかにするためには、まず、低線量放射線によって生じる細胞、分子レベルの変化を詳細に検討する必要がある。従来の研究において、低線量放射線によって生じる細胞内分子シグナルや細胞間の相互作用の変化、さらにその結果として生じる細胞生存、細胞死、増殖、等、腫瘍化に関連する細胞分子レベルの知見は非常に限られている。

たとえば、放射線による生体内分子シグナルの変化に関連して、放射線暴露下で増殖因子 TGF- β の機能が活性化されるとの報告がある。しかし、TGF- β は、生体内微小環境内で、腫瘍細胞の増殖を抑制・促進の両面で調整する因子であり、低線量放射線暴露によって TGF- β の機能が、発がん促進、抑制のいずれに作用するか、関連遺伝子、分子シグナルはどのように変化するのか、また、そもそも低線量放射線が間質系細胞の TGF- β 分泌能に有意な影響を与えるのか否かについて、詳細は明らかになっていない。また、最近では、宇宙での低線量放射線暴露後の細胞内での、heat shock protein (HSP) の発現亢進が報告されたが、HSP のクライアント蛋白への影響は明らかではない。

生体内微小環境は、低酸素や活性酸素や慢性炎症、低栄養等の様々なストレスに満ちているが、一方で、間質細胞をはじめとする微小環境を構成する細胞群が増殖因子やケモカイン、インテグリンを介して微小環境内の細胞の生存シグナルを活性化し、その生存を支えている。我々はこれまでの研究の中で、骨髓微小環境内でのがん細胞と間質細胞との直接的、間接的相互作用について検討を重ね、

特に、放射線暴露による機能活性化が指摘されている増殖因子 TGF- β やケモカイン CXCL12、インテグリンおよび脂質ラフト、さらに HSP 等が、発がんやがん進展に果たす役割を明らかにしてきた。

これまでの研究成果、知見より、我々は、低線量放射線が細胞生存シグナルの活性化や発がんに関与する可能性があると考えに至った。そこで、低線量放射線被曝による遺伝子および細胞内分子シグナルの変化と発がん、がん進展に関する検討と解明を目指して、本検討を実施することとした。

2. 研究の目的

本研究は、低線量放射線暴露によって前がん細胞および間質系幹細胞の遺伝子発現とその調節機構にもたらされる不安定性を明らかにし、同時に生体内微小環境の中での両者の相互作用のもとで、低線量放射線ストレスが与える生存シグナル活性化機構を明らかにすることを目的とする。

具体的には、前がん細胞が低線量放射線暴露によって直接的に受ける影響、微小環境内での低線量放射線被曝後の間質細胞との相互作用を介して受ける間接的影響、を明らかにするために、以下の項目を検討する。

- (1) 前がん細胞における低線量放射線被曝前後の遺伝子発現変化の網羅的解析によりジェネティックな変化の詳細を検討する。
- (2) 前がん細胞における低線量放射線被曝前後のタンパク発現変化を網羅的に解析し、ジェネティックな変化との関連性を検討する。
- (3) 低線量放射線照射後の microRNA (miRNA) の変化について検討する。また、miRNA 発現と遺伝子発現変化との関連性およびそのターゲットとなるタンパク発現について検討する。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト骨髓より分離した間質系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC)、EBV ウイルスによって形質転換した正常ヒト B 細胞 (EBV-B) に低線量放射線 (100 m Gy) を照射し、低線量放射線被曝後の細胞周期、アポトーシス比率の変化を検出する (フローサイトメトリー法)。さらに cDNA アレイ解析によって低線量放射線被曝前後のジェネティックな変化を網羅的に解析する。EBV-B 細胞を MSC と共培養し、間質細胞との相互作用下で生じる低線量放射線被曝の影響について、同様の検討を行う。

(2) (1) と同じ条件下で低線量放射線照射を行い、各条件下での MSC、EBV-B におけるタンパク発現変化を LC-MS/MS proteomics (iTRAQ) を用いて網羅的に検出する。

(3)低線量放射線照射後の microRNA(miRNA) の変化について放射線被曝による変動が報告されている let7a, miR-15b, miR-16, miR-21 および脂質代謝関連 miRNA の hub-miRNA である miR-23b をターゲットとして RT-PCR 法により検出し、これらの miRNA の標的遺伝子およびタンパク発現との関連について、(1)(2)で得られた網羅的データをを用いて解析する。(Figure 1)

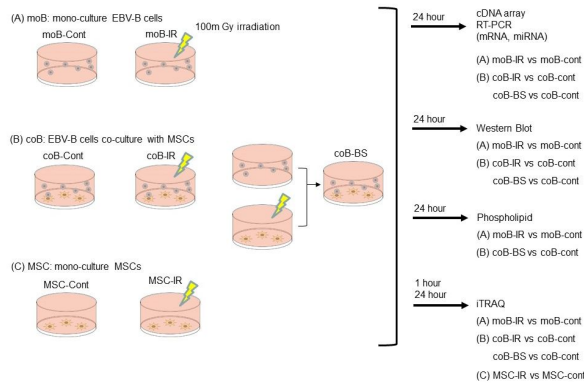


Figure 1. Two main groups of EBV-B cells under mono-culture and co-culture conditions were defined as moB (A) and coB (B), respectively. Each group has distinct control; moB-cont: mono-cultured EBV-B cells without irradiation, coB-cont: EBV-B cells co-cultured with MSCs without irradiation. The coB group contained two subgroups; coB-IR: directly irradiated EBV-B cells in co-culture condition, coB-BS: bystander EBV-B cells which co-cultured with pre-irradiated (100mGy) MSCs. (C) MSCs without or with 100mGy irradiation.

4. 研究成果

(1) 正常ヒト骨髄より分離した間質系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) とヒト不死化細胞 (HEV; EB ウィルス感染により増殖能を獲得したヒト B 細胞株) をそれぞれ単独および共培養し、100, 300, 1000 mGy の放射線を照射し、各線量の放射線が、これらの細胞の生存・増殖・アポトーシスに与える影響および遺伝子変化について検討を行った。その結果、単独培養 HEV は、1000mGy 照射 24-48 時間後に細胞死を伴う細胞増殖抑制と p21 遺伝子の発現上昇を示したが、100mGy (低線量放射線) 照射では、軽微な増殖抑制と細胞死比率の減少のみを認め、p21 遺伝子の変化は認めなかった。一方、単独培養 MSC では、100mGy 照射 24 時間後に細胞死誘導を認め、p21 遺伝子の発現上昇を観察した。また、100mGy 照射後の MSC において細胞接着に関与する複数の遺伝子の有意な発現上昇を認めた。非照射 HEV を 100mGy 暴露

後の MSC と共培養し、遺伝子発現の変化を調べたところ、細胞遊走、接着に関わる IL-8 遺伝子および抗アポトーシスに作用する Bcl-2 遺伝子の発現上昇が認められた。以上より、前がん細胞と間質系幹細胞の低線量放射線に対する感受性が異なり、両者の相互作用のもとで、低線量放射線ストレスが前がん細胞の生存シグナル活性化を促す可能性が示唆された。

(2)MSC と EBV-B 細胞を単独および共培養し、低線量放射線 (100mGy) を照射し、各線量の放射線が、これらの細胞のタンパク発現に与える影響について、LC-MS/MS proteomics (iTRAQ) を用いて網羅的に検出した。iTRAQ により MSC、EBV-B 細胞から 1,500 以上のタンパクの発現が検出された。MetaCore および KEGG ontology をもちいたパスウェイ解析の結果、100mGy 照射 24 時間後に、MSC では 32 タンパクの発現が上昇し、1 タンパクの発現が有意に低下し、focal adhesion pathway の活性化が検出された。単独培養 EBV-B 細胞では、47 種類のタンパク発現が有意に上昇し、そのうちの 40%はリボソーム関連タンパクであった。発現が低下した 19 タンパク中 6 タンパクがアポトーシス/老化関連タンパクであった。一方、MSC との共培養下の EBV-B 細胞では 34 タンパクの発現が低下したが、そのうちの 25 タンパク (74%) がリボソーム関連タンパクであり、単独 EBV-B 細胞とは明らかに異なる結果が得られた。これらの結果より、低線量放射線曝露後の前がん細胞では、いずれも放射線ストレスに反応した抗アポトーシス機構が作用することが示唆されたが、作用機序は、異なるものであることが示唆された。

(3)単独培養条件下の EBV-B 細胞では、低線量放射線照射 24 時間後に let7a, miR-15b, miR-16, miR-21 および脂質代謝関連 miRNA の hub-miRNA である miR-23b の上昇が認められた。一方、MSC 共培養下の EBV-B 細胞では低線量放射線照射によってこれらの miRNA 発現の低下が認められた。(Figure 2)

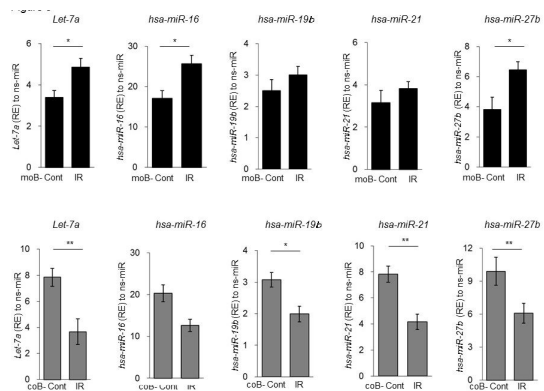


Figure 2. LDIR-modulated changes in let-7a, miR-16, miR-19b, miR-21, and miR-27b

expression in EBV-B pre-leukemic cells. EBV-B cells were cultured for 24 h after acute exposure to LDIR (100 mGy), without (moB-IR, upper panel) or with (coB-IR, lower panel) MSCs. qRT-PCR was used to evaluate let-7a, miR-16, miR-19b, miR-21, and miR-27b expression. *P < 0.05; **P < 0.01.

さらに、これらの miRNA の共通ターゲットである脂質合成酵素 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) の遺伝子(mRNA)およびタンパクレベルの発現変化が観察された(単独培養で低下、共培養で上昇) (Figure 3)

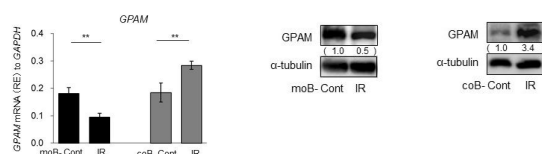


Figure 3. LDIR altered gene and protein expression in EBV-B cells. GPAM mRNA and protein expression levels were detected by qRT-PCR and western blot assay, respectively.

以上より、低線量放射線ストレスに対して miRNA を介した遺伝子発現コントロールが機能し、前がん細胞の遺伝子・タンパク発現を変化させること、生体微小環境は、直接・間接的に低線量放射線ストレス後の miRNA を介した遺伝子・タンパク発現変化に関与すること、が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol*. 2014;164:767-78. (査読有)
2. Tabe Y, Konopleva M. Role of Microenvironment in Resistance to Therapy in AML. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10:96-103. (査読有)
3. Tabe Y, Jin L, Konopleva M, Shikami M, Kimura S, Andreeff M, Raffeld M, Miida T. Class IA PI3K inhibition inhibits cell growth and proliferation in mantle cell lymphoma. *Acta Haematologica*. 2014;131:59-69. (査読有)
4. Tabe Y. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Juntendo Medical Journal*. 2014; 60:156-160. (査読有)
5. Tabe Y, Shi YX, Zeng Z, Jin L, Shikami

M, Hatanaka Y, Miida T, Hsu FJ, Andreeff M, Konopleva M. TGF- β Neutralizing Antibody 1D11 Enhances Cytarabine-Induced Apoptosis in AML Cells in the Bone Marrow Microenvironment. *PLoS One*. 2013 27;8:e62785. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Tabe Y, Hatanaka Y, Ruvolo P, Miida T, Kornblau S, Andreeff M, Konopleva M. Pro-survival effects of TGF- β 1 are associated with molecular signaling changes of ERK, FLI-1, and CD44 in AML cells. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, USA (12/6-9) 2014 (査読有)
2. Tabe Y, Harada M, Miyamae Y, Mogushi K, Kazuno S, Fujimura T, Matsushita H, Ueno T, Yokomizo T, Miida T, Samudio I, Andreeff M, Konopleva M. Bone marrow adipocyte-derived free fatty acids induce gene signature linking transcription with metabolic changes that contribute to survival of acute monocytic leukemia cells. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, USA (12/6-9) 2014 (査読有)
3. Tabe Y, Jin L, Hatanaka Y, Matsushita H, Kazuno S, Fujimura T, Ueno T, Sasai K, Iwabuchi K, Andreeff M, Konopleva M, Miida T: Integrative genomic and proteomic analysis of low-dose ionizing irradiation effects on bone marrow stromal microenvironment and on survival of pre-leukemic cells. 55th American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, USA (12/7-10) 2013(査読有)
4. Jin L, Konopleva M, Shikami M, Ikegami T, Kojima K, Andreeff M, Miida T, Tabe Y: Molecular Mechanisms of Pro-Survival and Differentiating Function of Bone Marrow-Derived Adipocytes On Acute Monoblastic Leukemia Cells. 54th American Society of Hematology Annual Meeting, Atlanta, USA (12/7-11) 2012(査読有)
5. Tabe Y, Jin L, Iwanami H, Kazuno S, Tsutomu Fujimura, Hiromichi Matsushita, TUeno, Miida T, Andreeff M, Konopleva M, Kimura S. Analysis of Dasatinib-Induced Molecular Mechanisms of Apoptosis in Hypoxia-Adopted CML Cells Utilizing Quantitative Proteomics Technology. 54th American Society of Hematology Annual Meeting, Atlanta, USA (12/7-11) 2012(査読有)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/laboryotaikaiseki/k4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田部 陽子 (TABE, Yoko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70306968

(2) 研究分担者

岩淵 和久 (IWABUCHI, Kazuhisa)

順天堂大学・看護学部・教授

研究者番号：10184897

笹井 啓資 (SASAI, Keisuke)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20225858