

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591859

研究課題名(和文)重粒子線におけるmiRNAの発現より新たな中皮腫治療法の可能性

研究課題名(英文)Possibilities of mesothelioma treatment through miRNA expressed by high LET heavy ion beams

研究代表者

劉 翠華 (LIU, CUIHUA)

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：00512427

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)：悪性中皮腫細胞を用いて、X線や炭素線照射後、miRNAを含むトータルRNAを抽出し、網羅的miRNAプロファイリング解析を行った結果、重粒子線を照射した中皮腫細胞についてmiRNAの発現がX線と異なることが明らかになった。同じ中皮腫細胞でも違う細胞株なら異なるmiRNAが発現することが判ってきた。また、高LET炭素イオン線で高発現されたmiRNA mimicを用いて、その細胞株にtransfectionすると、中皮腫細胞の増殖を有意に抑制することを明らかにした。miRNAは、中皮腫患者のテーラーメイド医療について非常に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma cells were irradiated with X-rays or high-LET carbon ion beams. Total RNA includes miRNA was extracted and miRNA profiling was analyzed. The results showed the miRNA profiling for mesothelioma cells irradiated by high-LET carbon ion and X-rays was different. Different mesothelioma cell lines have different miRNA profiling. Comparing X-rays, the miR-144-3p in MESO-1 cells was expressed higher irradiated by high-LET carbon ions. Using the miR-144-3p mimic that was transfected into MESO-1 cells, the propagation of cells was inhibited by the miR-144-3p significantly. Also, the miR-718 mimic can inhibit growing of MESO-4 cells. Those results showed using special miRNA, suggested that it might be very important for the tailor-made medical care of mesothelioma patients.

研究分野：放射線生物学

 キーワード：悪性中皮腫 高LET重粒子線 miRNAのプロファイリング miRNAの発現 miRNA-mimic miRNA-inhibitor  
細胞生存率 細胞増殖能

## 1. 研究開始当初の背景

近年注目を集めているアスベスト暴露歴や吸引が主な原因とされる悪性胸膜中皮腫とは、胸腔又は腹腔の内側を覆う膜に悪性がん細胞が形成される病気であり、潜伏期間が20～40年ほど長いとされている。また、全世界で年間1～1.5万人が新規に悪性胸膜中皮腫と診断されその数は年々増加傾向にあり、2020～2040年にピークに達すると推測されている。しかしながら、外科的手術、X線を用いた放射線治療及び各種抗ガン剤が試されているもののその有用性は低く、生存期間は6～12ヶ月と非常に短く極めて難治性の腫瘍であり、新たな治療戦略の確立が急務とされている。

放射線医学総合研究所の重粒子線がん治療装置(HIMAC)において治療に用いられている炭素線は、X線やガンマ線の様な電磁波放射線に比べ生物効果が高いことがこれまでに行われた多くの生物学的基礎研究より明らかになっている。

我々は、ヒト悪性中皮腫細胞によるX線及び重粒子線の放射線感受性について検討を行った。6種類のヒト中皮腫細胞にX線あるいは炭素線(13keV/μm、80keV/μm)を照射し、照射直後にコロニー法による生存率を指標として放射線の感受性を比較した結果、6種類の中皮腫細胞におけるD<sub>10</sub>値は、X線では3.02Gyから5.74Gy、炭素線(13keV/μm)で2.16Gyから4.08Gy、炭素線(80keV/μm)で0.97Gyから2.16Gyであった。これらの結果よりD<sub>10</sub>値で計算したRBEは、13keV/μm炭素線で1.20から1.62であったのに対し80keV/μmでは2.78から3.10となり、高LETの炭素線には強い感受性を示し、高いRBE値となることが示唆された。

miRNA(micro-RNA)とは、遺伝子発現を抑制する効果を持つ21～25塩基程度の一本鎖RNAで、すべての細胞プロセス(成長や発達、細胞分化、細胞死)に影響を与えていることが報告されている。哺乳動物のゲノムには3100種類もの特有のmiRNAがコードされており、細胞増殖や放射線感受性に関係するとされるmiRNAには、miRNA Let-7やmir-34miRNAなどが報告されているが(Chaudhry MA et al, DNA Cell Biol.; 29(9):553-61 2010、Kato M, et al Oncogene. Jun 25;28(25):2419-24, 2009)、悪性中皮腫細胞におけるmiRNA発現と放射線、特に重粒子線感受性を明らかにした報告は殆ど無い。前述の我々の研究から炭素線に対する中皮腫細胞の致死効果のRBEが

高い値を示すことが判ってきたが、そのメカニズムを中皮腫細胞におけるmiRNA発現プロファイルより明らかにする。

## 2. 研究の目的

非常に予後不良な難治性疾患である悪性胸膜中皮腫と診断される患者数が年々増加している。これまで放射線医学総合研究所では炭素線で様々な部位のガン治療が行われ、特定の部位のガンに対しては優れた治療成績が上がっている。

我々は、ヒト悪性中皮腫細胞によるX線及び重粒子線の放射線感受性について検討を行った結果、6種類の中皮腫細胞は高LETの炭素線に対して強い感受性を示し、高いRBE値となることが判った。miRNAは、すべての細胞プロセス(成長や発達、細胞分化、細胞死)に影響を与えていることが報告されている。

悪性中皮腫細胞におけるmiRNA発現と放射線、特に重粒子線感受性を明らかにした報告は殆ど無い。

本研究では、ヒト悪性中皮腫細胞を用いて重粒子線照射後のmiRNAのプロファイリングを解析し、X線と比較して、特異的に発現するmiRNAを明らかにする。また特異的なmiRNAによる中皮腫細胞の増殖への影響について明らかにする、miRNAを用いた悪性中皮腫の新しい治療法の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) miRNAのプロファイリングの解析:

X線や高LET重粒子線を悪性中皮腫細胞に照射後、細胞をsubcultureして、Exiqon社のRNA抽出kitを利用してmiRNAを含むトータルRNAを抽出した。抽出したRNAをmiRCURY LNA™ microRNA Arrayを用いてラベリングやハイブリダイゼーションしてから、スキャンし、網羅的なmicroRNA発現解析を行った。

### (2) miRNAの導入:

重粒子線に対して特異的なmiRNAの機能を解析するため、Lipofectamine® RNAiMAX Reagentを用いて、miRNA mimicおよびmiRNA inhibitorを中皮腫細胞内に導入した。

### (3) 特異的なmiRNAの機能を検証:

細胞増殖能はMTT法とコロニー形成法で行った。細胞周期の測定についてはPIで細胞染色してFACSで測定した。

染色体異常頻度の測定はM期細胞を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 重粒子線に対する悪性中皮腫細胞のmiRNAのプロファイリングの解析

悪性中皮腫細胞4種類を用いて、X線や高LETの炭素線照射後、網羅的なmicroRNA発現解析を行った。X線と比較し、Fold Changeが2倍以上あるいは0.5倍以下のmiRNAが確認された。

結果：重粒子線照射された中皮腫細胞について、miRNAの発現はX線と異なることが明らかになった。また同じ中皮腫細胞でも違う細胞株なら高LET炭素イオン線照射後、異なるmiRNAが発現することが判った。

##### (2) miRNAによる中皮腫細胞増殖への影響

放射線抵抗性であるMESO-1細胞について、高LET炭素イオン線照射後、miR-144-3pが高発現することが分かった。miR-144-3p mimicを用いてMESO-1細胞にtransfectionしてから72時間後、MTT法とコロニー形成法で細胞の増殖能を分析した。MTT法について72時間まで、コロニー形成法を二週間行った結果、miR-144-3pがMESO-1細胞の増殖を有意に抑制することが明らかになった(図1、図2)。

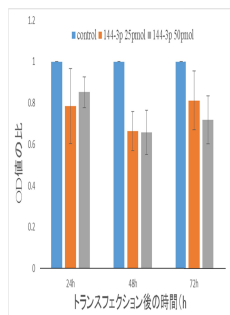


図1 .miR-144-3p 導入後 MTT 法によるMESO-1 細胞増殖能の変化。

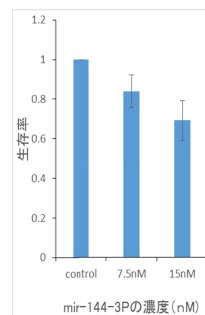


図2 .miR-144-3p 導入後コロニー法によるMESO-1 細胞生存率の影響。

以上の結果から、MESO-1細胞に人為的にmiR-144-3pを高発現させることで、MESO-1細胞の増殖を有効に抑制できることが示唆された。またmiR-144-3pを高発現させたMESO-1は細胞周期に殆ど影響がなく、染色体異常頻度にも影響がない事が判った。

また2Gy高LET炭素イオン線を照射しmiR-144-3pを高発現させた細胞にmiR-144-3p inhibitorを導入し、miR-144-3pの発現量を低下させると、同じ2Gy高LET炭素線を照射後miR-144-3p inhibitorを導入

しない細胞に比べて生存率が有意に増加したことが分かった(図3)。

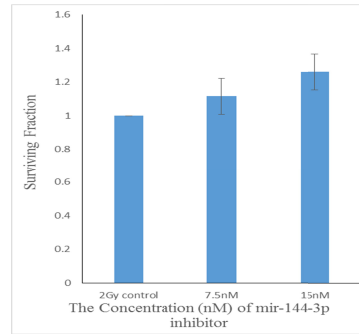


図3 .MESO-1細胞に発現したmiR-144-3pを低下させた後の、細胞生存率の変化

また放射線感受性である中皮腫細胞MESO-4では、X線と比べて、高LETの炭素イオン線照射した方が9種類のmiRNAがアップレギュレートされて、この中で変動の大きいmiRNA、miR-718 mimicを用いてMESO-4にtransfectionして高発現させたmiR-718は、MESO-4細胞の増殖を有意に抑制する事が判った(図3、図4)。

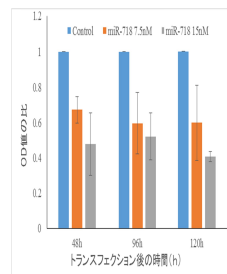


図3 .miR-718 導入後 MTT 法によるMESO-4細胞増殖能の変化。

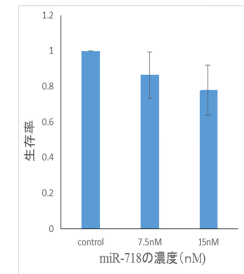


図4 .miR-718 導入後コロニー法によるMESO-4細胞の生存率の影響。

以上の事からmiRNAは中皮腫細胞の増殖を抑制する事が明らかになった。miRNA、中皮腫患者のテーラーメイド医療について非常に重要であることが示唆された。

#### 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)

Xue L, Furusawa Y, Okayasu R, Miura M, Cui X, Liu C, Hirayama R, Matsumoto Y, Yajima H, Yu D: The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. DNA Repair (Amst). 25:72-83,

2015.(査読有)

DOI:10.1016/j.dnarep.2014.11.004.

Autsavapromporn N, Plante I, Liu C, Konishi T, Usami N, Funayama T, Azzam EI, Murakami T, Suzuki M: Genetic changes in progeny of bystander human fibroblasts after microbeam irradiation with X-rays, protons or carbon ions: the relevance to cancer risk. *Int J Radiat Biol*. 91(1):62-70, 2015.(査読有) doi: 10.3109/09553002.2014.950715.

Wentao HU, Hailong PEI, He LI, Nan DING, Jinpeng HE, Jufang WANG, Yoshiya FURUSAWA, Ryoichi HIRAYAMA, Yoshitaka MATSUMOTO, Cuihua LIU, Yinghui LI, Tetsuya KAWATA, Guangming ZHOU: Effects of shielding on the induction of 53BP1 foci and micronuclei after Fe ion exposures. *J Radiat Res*. 55(1):10-6, 2014. (査読有) DOI:10.1093/jrr/rrt078.

Cuihua LIU, Tetsuya KAWATA, Guangming ZHOU, Yoshiya FURUSAWA, Ryuichi KOTA, Atsuhiko KUMABE, Shinya SUTANI, Junich FUKADA, Masayo MISHIMA, Naoyuki SHIGEMATSU, Kerry GEORGE and Francis CUCINOTTA Cucinotta: Comparison of the repair of potentially lethal damage after low- and high-LET radiation exposure, assessed from the kinetics and fidelity of chromosome rejoining in normal human fibroblasts. *J Radiat Res*. 54(6):989-997.2013. (査読有) DOI: 10.1093/jrr/rrt031. Mami WADA, Masao SUZUKI, Cuihua LIU, Yumiko KANEKO, Shigekazu FUKUDA, Koichi ANDO and Naruhiro MATSUFUJI: Modeling the biological response of normal human cells, including repair processes, to fractionated carbon beam irradiation. *J Radiat Res*, 54(5):798-807, 2013. (査読有) DOI:10.1093/jrr/rrt012

Nan Ding, Hailong Pei, Jinpeng He, Yoshiya Furusawa, Ryoichi Hirayama, Cuihua Liu, Yoshitaka Matsumoto, He Li, Wentao Hua, Yinghui Li, Jufang Wang, Tieshan Wang, Guangming Zhou: Simulated studies on the biological effects of space radiation on quiescent human fibroblasts. *Advances in Space Research*, 52, 1314-1319, 2013. (査読有) DOI:10.1016/j.asr.2013.06.030

Narongchai Autsavapromporn, Masao Suzuki, Ianik Plante, Cuihua Liu, Yukio Uchihori, Tom K Hei, Edouard Azzam, Takeshi

Murakami : Participation of Gap Junction Communication in Potentially Lethal Damage Repair and DNA Damage in Human Fibroblasts Exposed to Low- or High-LET Radiation. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis : A Section of Mutation Research*, 756, 1-2, 78-85, 2013. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.07.001. (査読有)

Cuihua Liu, Tetsuya Kawata, Yoshiya Furusawa, Guangming Zhou, Kohei Inoue, Ryuichi Okayasu: Chromosome aberrations in normal human fibroblasts analyzed in G0/G1 and G2/M phases after exposure in G0 to radiation with different linear energy transfer (LET) *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. A Section of Mutation Research*, 765, 1-2, 101-107, 2013. (査読有)

DOI:10.1016/j.mrgentox.2013.05.005.

#### [学会発表](計8件)

- 1 Liu cuihua, Narongchai Autsavapromporn, Akira Fujimori: High linear energy transfer sensitization of MPM cells by mitotic catastrophe pathway, 日本放射線影響学会第57回大会, かがしま県民交流センター, 鹿児島, 2014.10.02.
- 2 矢島浩彦, 劉翠華, 中島菜花子: DNA二本鎖切断の修復過程におけるDNA末端の削り込みと細胞応答 日本放射線影響学会第57回大会, 鹿児島, かがしま県民交流センター2014.10.02
- 3 劉翠華, 鶴岡千鶴, アッサワブロン ポーン ナロンチャイ, 金子由美子, 村上健: Dose, LET and Ion Species Dependence for PLDR in Normal Human Embryo Fibroblasts, 日本放射線影響学会第56回大会, ホテルクラウンパレス青森, 青森, 2013.10.18
- 4 劉翠華, 鈴木雅雄, アッサワブロン ポーン ナロンチャイ, Chew Ming Tsuey, 金子由美子, 村上健: 炭素イオンビームにおける中皮腫細胞致死メカニズムの解析, 日本放射線影響学会第55回大会, 東北大学川内北キャンパス, 仙台, 2012.09.06
- 5 川田哲也, 劉翠華, 古澤佳也, ジョージケリー, クシノッタフランク: X線および高LET粒子線によるPLDRの

メカニズムに関する染色体解析からの検討，第50回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会，カルチャーリゾート フェストーネ，宜野湾市，2012.06.2

- 6 Cuihua Liu, Tetsuya Kawata, Naoyuki Shigematsu, Kerry George, Francesca A Cucinotta: Comparison on the repair of potentially lethal damage between exposure to low- and high-LET radiations from Kinetics and fidelity of chromosome rejoining in normal human fibroblasts, Radiation Research Society 58th Annual Meeting, Rio Mar Resort Hotel, プエルトリコ, San Juan, 2012.10.03
- 7 CuiHua Liu, Tetsuya Kawata, Ryuichi Okayasu, Guangming Zhou, Yoshiya Furusawa: Comparison of chromosome aberrations in G0/G1 and G2/M cells in normal human fibroblasts irradiated at G0 phase with various LETs, The 10th International Symposium on chromosomal Aberrations, Sara Ibsen, Amalfi, Italia 2012.10.19
- 8 劉 翠華, 鈴木 雅雄: 炭素イオンにおける中皮腫細胞致死および細胞致死メカニズムについて，第71回日本癌学会学術総会，ロイトン札幌，札幌，2012.09.19

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

劉 翠華 (LIU CUIHUA)

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：00512427