

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460793

研究課題名(和文) 低用量カドミウムによるエストロゲン受容体活性化を制御する特異的なmiRNAの特定

研究課題名(英文) To explore the specific miRNA involved in activation of estrogen receptor under low-dose cadmium exposure

研究代表者

崔 正国 (CUI, ZHENG-GUO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：90572115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カドミウムは内分泌攪乱物質として報告されている。低濃度カドミウム慢性中毒は症状の隠蔽性が高く、特に発がん性などの生体影響と分子メカニズムが不明である。本研究は低用量カドミウム曝露による乳癌の発がんを解析した。ヒト乳癌培養細胞株であるMCF-7細胞を1nM-1μMの塩化カドミウムにより長期間培養し、特異的な発現変化を示すマイクロRNA(miRNA)、エストロゲン受容体活性化、細胞死感受性などについて解析した。本研究により、低用量カドミウムによるMCF-7細胞のmiRNA発現変化及び乳癌の発がんに寄与する分子メカニズムの一部が解明されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cadmium is reported as an internal secretion disturbing material. Under chronic low dose exposure of cadmium, the symptom is highly concealed, and the molecular mechanism for carcinogenicity is still particularly unidentified. In the present study, specific micro RNA (miRNA) in carcinogenicity of low-dose cadmium on breast cancer was investigated. Human breast cancer cell line MCF-7 cells were cultured by 1nM-1μM cadmium chloride for a long period of time, and the changes in miRNA expression profiling, estrogen receptor activity, stress sensitivity of the cells were analyzed. Part of the miRNA contributing activation of estrogen receptor and subsequently carcinogenesis of the low-dose cadmium on breast cancer was elucidated. The molecular mechanism involved provides useful information in building an effective prevention, diagnosis and a therapeutic strategy.

研究分野：細胞生物学、公衆衛生学

キーワード：カドミウム miRNA エストロゲン受容体 内分泌かく乱物質 乳がん

1. 研究開始当初の背景

国連世界保健機関の報告によると、乳癌患者は世界的に増える傾向にある。国立癌研究センターは、乳癌が日本人女性の部位別癌年齢調整罹患率が第一位になっており、年間約4万人が発症し、1万人が死亡することと2012年に発表した。

乳癌発生率の増加には、内分泌かく乱物質によるエストロゲン受容体(ER)の刺激が重要な原因の一つと考えられている。ほとんどの乳癌は、ERによるシグナル伝達の異常と関連があり、ER依存性(ER⁺)乳癌細胞はその生存のためにエストラジオールなどのエストロゲンに依存する。乳癌細胞においてERは癌抑制遺伝子であるp53を抑制し、アポトーシス抑制タンパク質Bcl-2を過剰発現する。これらの知見は内分泌かく乱物質によりERが活性化され、下流のアポトーシス制御タンパク質の発現変化により、細胞死感受性が低下し、生体内の異常細胞を除去できなく、乳がん発がんに関与する可能性を示唆する。

内分泌かく乱物質は、生体内ホルモンの分泌と機能の制御を乱す外因性の物質であり、ホルモン受容体に結合することで活性化し、特定の遺伝子の発現に影響して発癌リスクを高める。内分泌かく乱作用の一番大きい問題点の一つとして、これまで有害性がないと認識されていた極めて低い濃度でその影響が認められ、U字あるいは逆U字方の用量-反応曲線を示すことが挙げられる。そこで、世界の環境科学者から特に注目されているのが“低用量仮説(low-dose hypothesis)”である。

内分泌かく乱物質には、農薬、工場廃液、一部の重金属などが含まれる。カドミウムは 10^{-11} Mの極微量で、ERの活性化を引き起こすことが報告されており、内分泌かく乱物質として位置づけられている。乳癌により死亡した患者と健常者を比較解析した疫学研究では、カドミウム曝露環境の職業従事者の乳癌発生リスクが健常者に比べて増加したと報告されている。しかし、その詳細な分子メカニズムにはまだ不明な点が多い。

そこで、カドミウムの内分泌かく乱作用と乳癌の関連は非常に注目されており、その研究は重要な課題となっている。

2. 研究の目的

マイクロRNA(miRNA)は、メッセンジャーRNA(mRNA)の安定性や翻訳を調節することにより、遺伝子発現を制御し、細胞の生理的、病理的な変化に重要な役割を果たす。

特に、発癌miRNAの発現増加、癌抑制miRNA(tumor suppressor microRNA)発現の減少と発癌リスクの相関に関して数多く報告されている。また、エキソソームに含まれて細胞外に分泌される分泌型miRNAは、健常者と癌の患者でそのプロファイリングが異なることで、癌のバイオマーカーとしてその研究が非常に注目を集めている。しかし、

カドミウム曝露による発癌とエピジェネティックな遺伝子発現機構への影響との関連に言及する報告は非常に少なく、miRNA発現変化およびそのシグナル伝達をカドミウムの生物影響、特に発癌に関連づける研究はほとんど行われていないのが現状である。

本研究はカドミウムの、特に低濃度曝露によるmiRNAの発現変化および遺伝子の発現変化を網羅的に解析し、ER異常活性化とシグナル伝達による発癌に関与すると考えられるアポトーシス抵抗性との関係について解析を進めた。

3. 研究の方法

低容量カドミウムの曝露のため、ヒト白血病細胞U937細胞とヒト乳癌細胞株MCF-7(ER⁺)を塩化カドミウム(CdCl₂)溶液、 10^{-12} から 10^{-6} MになるようにCdCl₂を添加して二週間培養した。U937細胞はアポトーシスの感受性が良く、カドミウムの曝露と中毒効果の指標として血球細胞が用いられることで、予備実験材料として使用した。

曝露した細胞を回収してRNAを抽出し、マイクロアレイ法とリアルタイムPCR法により、特異的な変化を示すmiRNAを解析した。低用量カドミウム処理により発現が大きく変動するmiRNAを中心にカドミウム発癌に関連するmiRNAの選択を検討した。Ingenuity Pathways Analysis(IPA) microRNA-mRNAのペアリングツールとmRNAのフィルタリングツールによるシグナルネットワークを解析した。また、細胞死関連タンパク質はウェスタンブロット法により検討した。

4. 研究成果

U937細胞に50 μ MのCdCl₂を12時間添加すると、細胞内の活性酸素生成、JNKの活性化、Mcl-1タンパク質の発現抑制及びNoxa、Bim、tBidなどアポトーシス促進作用を持つBH3-onlyタンパク質の発現増加、さらにはcaspase-3の活性化によりアポトーシスが顕著に誘導された。一方、1 μ MのCdCl₂前処理は、その後の50 μ M CdCl₂添加によるこれらの変化を減弱し、アポトーシスを有意に抑制した。さらに低容量CdCl₂処理によるアポトーシスの修飾に寄与するmiRNAの発現変化を調べた。低容量CdCl₂で前処理した細胞と、処理していない細胞および、それぞれに高濃度CdCl₂処理したものについて、マイクロアレイ法およびリアルタイムPCR法で、発現の変化を調べた。その結果、miR-643が、前処理しない細胞で高濃度処理をすると発現が増え、前処理下細胞で高濃度処理をすると発現が減少することを見いだした。また、tBidの遺伝子に標的配列を持つmiR-506が、細胞の前処理によるtBidの発現の減少にあわせて発現が増加することが示された。現在、それぞれのmiRNAが低容量カドミウムによるアポトーシスの修飾に関与する可能性を探るため、miR-643では過剰発現、miR-506では

機能を抑制した細胞をそれぞれ作成中である。

また、低用量カドミウム処理をした MCF-7 細胞を用いて、細胞の増殖、ストレス感受性などを検討した。特に、ER 経路の活性化、癌抑制遺伝子の発現変化に注目して解析を進めた。その結果、低容量カドミウム曝露は ER シグナル伝達系を顕著に活性化し、細胞のストレス感受性と細胞死感受性を低下させることが判明した。顕著な発現変化を示す miRNA 候補をリストアップし、ER 経路の活性化、細胞死感受性、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の発現との相関の確認をリアルタイム PCR とウェスタンブロット法などにより行った。そのデータを IPA、データベースと文献報告などにより解析し、変動遺伝子の相互関係及び生体応答ネットワークについて検討している。

将来的には、その成果を踏まえ miRNA とエピジェネティクスの遺伝子発現変化の観点から内分泌かく乱物質による肥満など他の健康リスクの分子メカニズム解明に向けて研究を進展する予定である。

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 5 件)

1. Cui ZG, Ogawa R, Tsuneyama K, Yan G, Tao L, Shimomura A, Inadera H. Insight into the molecular mechanism of heme oxygenase-1 induction by docosahexaenoic acid in U937 cells. *Chem Biol Interact*, 238:180-8, 2015
2. Doi N, Ogawa R, Cui ZG, Morii A, Watanabe A, Kanayama S, Yoneda Y, Kondo T. The acquired radioresistance in HeLa cells under conditions mimicking hypoxia was attenuated by a decreased expression of HIF subunit genes induced by RNA interference. *Exp Cell Res*, 333:249-60, 2015
3. Hamazaki K, Natori T, Kurihara S, Murata N, Cui ZG, Kigawa M, Morozumi R, Inadera H. Fish consumption and depressive symptoms in undergraduate students: A cross-sectional analysis. *Eur Psychiatry*, 30:983-7, 2015
4. Shakeel, S, Usmanghani K, Nawaz A, Ahmad Zakki S, Cui ZG, Abraham S, Ahmad Mir T. Evaluation of in vitro lipoyxygenase inhibition and antioxidant activity of polyherbal formulation entoban. *RADS JPPS* 3:82, 2015

5. Cui ZG, Piao JL, Kondo T, Ogawa R, Tsuneyama K, Zhao QL, Feril LB Jr, Inadera H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy. *Chem Biol Interact*, 22:46-53, 2014

[学会発表](計 10 件)

1. 崔正国, Shahbaz Ahmad Zakki, Sun Lu, Qianwen Feng, Yujie Jin, 稲寺秀邦. バイカリンによる温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズム. 第 87 回日本衛生学会学術総会; 2017 Mar 26-28; フェニックス・シーガイア・リゾート, 宮崎.
2. 崔正国, Shahbaz Ahmad Zakki, Sun Lu, Qianwen Feng, Yujie Jin, Qianwen Feng, 稲寺秀邦. ノニバミドによる温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズム. 第 16 回分子予防環境医学研究会; 2017 Feb 26-28; 熊本市国際交流会館, 熊本.
3. Cui ZG, Jin YJ, Sun L, Zakki SA, Feng QW, Inadera H. Withaferin A synergistically enhances apoptosis induced by hyperthermia, -implication for cancer therapy-. 8th National Annual Convention of the Philippine Society for Developmental Biology. 2016 Oct 22; Manila, Philippine.
4. Cui ZG, Jin YJ, Sun L, Zakki SA, Inadera H. The changes on the apoptosis sensitivity induced by low dose fenvalerate exposure. The 7th Philippine Society for Cell Biology Annual National and 1st International Convention and Scientific Meeting. 2016 Oct 20-21; Manila, Philippine.
5. 崔正国, 金玉潔, 稲寺秀邦. 低濃度フェンバレレート曝露によるアポトーシス感受性の変化とその分子メカニズム. 第 86 回日本衛生学会学術総会; 2016 May 11-13; 旭川市民文化会館, 旭川.
6. 崔正国, 稲寺秀邦. 「ドコサヘキサエン酸によるヘムオキシゲナーゼ 1 誘導の分子機構」. 第 15 回分子予防環境医学研究会大会. 2016 Jan 29-30; 自治医科大学地域医療情報研修センター, 下野市.
7. Cui ZG, Inadera H. Role of reactive oxygen species in the carcinogenesis induced by environmental pollutant. 17th International Conference on

Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants; 2015 Jun 13-15; Paris, France.

8. **崔正国**. 環境汚染物質による発癌機序の解明とその治療及び予防策の確立. 第85回日本衛生学会学術総会; 2015 Mar 26-28; 和歌山県民文化会館, 和歌山.
9. **Cui ZG**, Kondo T, **Inadera H**. Enhancement of hyperthermia-induced cancer cell killing by withaferin A -Implication for cancer therapy-. The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology The 31st Japanese Congress of Thermal Medicin; 2014 Sep 5-6, AOSSA, Fukui.
10. **崔正国**, 近藤隆, **稲寺秀邦**. ドコサヘキサエン酸によるヘムオキシゲナーゼ1の誘導とその分子メカニズムの検討. 第84回日本衛生学会学術総会; 2014 May 25-27; 岡山コンベンションセンター, 岡山.

〔図書〕(計 1 件)

1. **Ogawa R**, Morii A, Watanabe A, **Cui ZG**, Kondo T. (2016). Bioeffects of Ultrasound and Its Therapeutic Application. In: Muthupandian Ashokkumar Spriger. Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry, 1-26. Singapore: Springer.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔正国 (Cui, Zheng-Guo)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)
助教
研究者番号: 90572115

(2) 研究分担者

稲寺秀邦 (Inadera, Hidekuni)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)
教授
研究者番号: 10301144
小川良平 (Ogawa, Ryohei)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)
准教授
研究者番号: 60334736

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし