

Table 2. Genes that fulfilled the criteria of $P < 0.05$ and > 2 -fold difference between spontaneous and radiation-induced rat mammary carcinomas in the microarray analysis

Gene symbol	Gene name	P value ^a	Log fold change (vs. normal) ^b	
			Spontaneous	Radiation
<i>Plg</i>	Plasminogen	0.02	4.0	0.8
<i>RT1-Ba</i>	RT1 class II, locus Ba	0.02	2.0	-0.6
<i>Igfals</i>	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	0.02	6.8	4.4
Rn.160502 ^c	EST	<0.01	1.6	-0.4
<i>Pgr</i>	Progesterone receptor	0.04	3.6	1.7
<i>Scamp1</i>	Secretory carrier membrane protein 1	<0.01	3.8	2
<i>LOC363320</i>	Similar to Discs large homolog 5 (Placenta and prostate DLG)	0.03	2.2	0.5
Rn.42977 ^c	EST	<0.01	3.2	1.5
<i>LOC306096</i>	Similar to Dachshund homolog 1 (Dach1)	<0.01	2.5	0.9
<i>LOC685462</i>	Similar to EMI domain containing 1	0.04	3.3	1.8
Rn.173547 ^c	EST	0.02	1.1	-0.4
<i>Spon2</i>	Spondin 2, extracellular matrix protein	0.02	1.7	0.3
<i>Eiih</i>	Hepatic protein EIIH	0.03	2.4	1
<i>Sytl2_predicted</i>	Synaptotagmin-like 2 (predicted)	<0.01	3.2	1.8
<i>Gpr37</i>	G protein-coupled receptor 37	<0.01	5.4	4
Rn.39113 ^c	EST	0.02	4.3	3.1
<i>Cd200</i>	Cd200 antigen	<0.01	2.7	1.6
<i>Scnn1a</i>	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	0.01	2.1	1
<i>RGDI308221_predicted</i>	Similar to TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain); vascular Rab-GAP/TBC-containing (predicted)	0.02	2.1	0.9
<i>Wnt4</i>	Wingless-related MMTV integration site 4	0.02	4.3	3.1
Rn.40510 ^c	EST	0.04	2.9	1.8
<i>RGDI562168_predicted</i>	Similar to retinoid binding protein 7 (predicted)	0.01	-1.7	-3.1
<i>Slpi</i>	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	0.03	0.1	-1.2
<i>Ptges</i>	Prostaglandin E synthase	0.03	-1.0	-2.2
<i>Scnn1g</i>	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma	<0.01	-0.3	-1.3
Rn.20273 ^c	EST	0.03	-3.1	-0.9
<i>C3</i>	Complement component 3	<0.01	-3.1	-1.0
<i>RT1-Aw2 ^e</i>	RT1 class Ib, locus Aw2	0.05	-1.7	0.3
<i>Hba-a1 ^e</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1	0.05	-1.3	0.3
<i>RT1-CE5</i>	RT1 class I, CE5	0.03	-1.1	0
Rn.33382 ^c	EST	0.05	-0.8	0.3
<i>Kit</i>	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	0.05	-1.1	-0.1
<i>RT1-CE16</i>	RT1 class I, CE16	0.02	-1.0	1.1

^a Intensity values of spontaneous and radiation-induced carcinomas were subjected to Welch's *t*-test.

^b Base-2 logarithm for the ratio of the average intensity value of carcinomas to that of normal tissues.

^c The Unigene ID is indicated for unidentified expressed sequence tags (ESTs) and genes without gene symbols.

Table 3. Genes that showed $P \geq 0.05$ but > 4-fold higher expression in radiation-induced rat mammary carcinomas than spontaneous carcinomas in the microarray analysis

Gene symbol	Gene name	P value ^a	Log fold change (vs. normal) ^b	
			Spontaneous	Radiation
Rn.133430 ^c	EST	0.27	-2.4	3.3
<i>Tnfsf11</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	0.28	0.1	5.7
Rn.177404 ^c	Transcribed locus, moderately similar to NP_620608.1 protein LOC207121	0.20	-0.9	2.7
Rn.47673 ^c	EST	0.38	0.5	4
<i>Fgf10</i>	Fibroblast growth factor 10	0.31	-1.3	1.9
<i>Agtr1a</i>	Angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)	0.08	0.1	3.1
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	0.43	0.2	3.1
<i>Lpo_predicted</i>	Lactoperoxidase (predicted)	0.35	-3.8	-0.9
<i>Pou3f3</i>	POU domain, class 3, transcription factor 3	0.21	-0.4	2.5
<i>LOC689064</i>	Beta-globin	0.18	-1.1	1.4
<i>RT1-Aw2</i>	RT1 class Ib, locus Aw2	0.05	-2.0	0.1
<i>RT1-Bb</i>	RT1 class II, locus Bb	0.11	-1.1	1
<i>RT1-Ba</i>	RT1 class II, locus Ba	0.06	-1.6	0.5
<i>S100a9</i>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	0.27	-0.8	1.2
<i>RGD1305645_predicted</i>	Similar to RIKEN cDNA 1500015O10 (predicted)	0.18	0.0	2.1
Rn.54456 ^c	Polymeric immunoglobulin receptor AATTAA-containing 3'UTR Group 1 mRNA sequence	0.26	-4.7	-2.7
<i>Tmem2_predicted</i>	Transmembrane protein 2 (predicted)	0.14	0.2	2.2
<i>Nhn1 or Flt4</i>	Conserved nuclear protein Nhn1 or Fms-related tyrosine kinase 4	0.11	2.2	4.2

^a Intensity values of spontaneous and radiation-induced carcinomas were subjected to Welch's *t*-test.

^b Base-2 logarithm for the ratio of the average intensity value of carcinomas to that of normal tissues.

^c The Unigene ID is indicated for unidentified expressed sequence tags (ESTs) and genes without gene symbols.

of those most down-regulated, respectively (Table 4).

Validation of microarray results by qPCR

From genes listed in Tables 2 and 3, which were specific to either spontaneous or radiation-induced carcinomas, we chose 10 probe sets for known genes of importance in regard to their biological functions. We also randomly selected 3 probe sets for unidentified expressed sequence tags (EST). Furthermore, 5 additional genes were selected from Table 4 that exhibited altered expression in all carcinomas as compared to normal tissue. Their expression was analyzed by qPCR for validation of microarray results. Microarray and qPCR results for the same set of tumors showed significant correlation for 16 of 18 genes (Table 5). To exclude the possibility that the above results held true only for this particular set of tumors, we analyzed additional tissue samples including one spontaneous and five radiation-induced mammary carcinomas and one normal tissue that were available

from the same experiment but not previously examined by microarrays. Together with these additional data, we observed that three spontaneous cancer-specific up-regulated genes (*Plg*, *Pgr* and *Wnt4*) still maintained their statistical significance, whereas the differences turned out to be non-significant for three other genes (EST Rn.160502, *Ptges* and EST Rn.20273; Table 5, *rightmost column*). Likewise, regarding five radiation-associated genes (*Tnfsf11*, *Fgf10*, *Agtr1a*, *Pou3f3* and *S100a9*), some radiation-induced carcinomas showed a larger value than the mean value of four spontaneous carcinomas (Fig. 2), in which the difference was more than three times larger than the standard deviation of four values of spontaneous carcinomas. Moreover, statistically significant difference was observed in the expression of *Tnfsf11* and *Agtr1a* between radiogenic and spontaneous carcinomas ($P < 0.05$, Table 5, *rightmost column*). Thus, qPCR analysis confirmed that eight genes were specifically up-regulated in either spontaneous or radiation-induced

Table 4. The top 15 genes, either up-regulated or down-regulated, in rat mammary carcinomas compared to normal mammary glands in the microarray analysis

Gene symbol	Gene name	P value ^a	Log fold change ^b
i) High expression in carcinomas			
<i>Mup5</i>	Major urinary protein 5	0.04	8.0
<i>Mcpt10</i>	Mast cell protease 10	0.02	6.2
<i>Igfals</i>	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	0.03	5.9
<i>Gp2</i>	Glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	<0.01	5.4
<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	0.03	5.4
<i>Cited1</i>	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	<0.01	4.9
<i>Gpr37</i>	G protein-coupled receptor 37	<0.01	4.8
<i>Pgf</i>	Placental growth factor	<0.01	4.7
<i>Areg</i>	Amphiregulin	<0.01	4.6
<i>Tcfap2b_predicted</i>	Transcription factor AP-2 beta (predicted)	<0.01	4.0
Rn.81000 ^c	EST	<0.01	3.9
<i>Mmp3</i>	Matrix metalloproteinase 3	0.02	3.9
<i>Col2a1</i>	Procollagen, type II, alpha 1	0.02	3.9
<i>Igf2</i>	Insulin-like growth factor 2	0.01	3.8
<i>Id4</i>	Inhibitor of DNA binding 4	<0.01	3.8
ii) Low expression in carcinomas			
<i>Ca3</i>	Carbonic anhydrase 3	0.02	-5.1
<i>Cd36</i>	Cd36 antigen	<0.01	-4.0
<i>Acs11</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	0.01	-3.6
<i>Angptl4</i>	Angiopoietin-like 4	<0.01	-3.6
<i>Thrsp</i>	Thyroid hormone responsive protein	0.02	-3.6
Rn.54456 ^c	Polymeric immunoglobulin receptor AATTAA-containing 3'UTR Group 1 mRNA sequence	<0.01	-3.2
<i>IgG-2a</i>	Gamma-2a immunoglobulin heavy chain	<0.01	-3.1
<i>LOC316122</i>	CGI-58-like protein	0.02	-3.1
<i>Slc34a2</i>	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	0.03	-3.0
Rn.17804 ^c	EST	<0.01	-2.7
<i>LOC287004</i>	Mg1	0.03	-2.6
<i>Igha_mapped</i>	Immunoglobulin heavy chain (alpha polypeptide) (mapped)	0.03	-2.4
<i>Tf</i>	Transferrin	0.04	-2.4
<i>Ndrgl</i>	N-myc downstream regulated gene 1	0.02	-2.4
Rn.19106 ^c	EST	0.02	-2.4

^a Intensity values of carcinoma and normal tissue were subjected to Welch's *t*-test.

^b Base-2 logarithm for the ratio of the average intensity value of carcinomas to that of normal tissues.

^c The Unigene ID is indicated for unidentified expressed sequence tags (ESTs) and genes without gene symbols.

Table 5. Quantitative PCR (qPCR) validation of differential gene expression identified by microarray analysis

Gene symbol	Gene name	Correlation <i>P</i> value ^a	Log fold ^b		Difference <i>P</i> value ^c
			Array	qPCR	
i) <i>P</i> < 0.05 between spontaneous and radiation in microarrays (Table 2)					
<i>Plg</i>	Plasminogen	<0.01	3.2	4.1	<0.01
Rn.160502 ^d	EST	<0.01	2.0	3.1	0.08
<i>Pgr</i>	Progesterone receptor	<0.01	1.7	1.5	<0.01
<i>Wnt4</i>	Wingless-related MMTV integration site 4	<0.01	1.1	0.7	0.03
<i>Ptges</i>	Prostaglandin E synthase	<0.01	1.2	1.3	0.42
Rn.20273 ^d	EST	<0.01	-2.3	-2.7	0.09
<i>Kit</i>	v-kit oncogene homolog	0.08	-1.0	-1.2	0.25
ii) <i>P</i> ≥ 0.05 between spontaneous and radiation in microarrays (Table 3)					
<i>Tnfsf11</i>	Tumor necrosis factor superfamily member 11	<0.01	-4.1	-6.9	0.03
<i>Fgf10</i>	Fibroblast growth factor 10	0.01	-3.2	-8.8	0.08
<i>Agtr1a</i>	Angiotensin II receptor type 1	<0.01	-2.8	-4.1	0.01
<i>Pou3f3</i>	POU domain class 3 transcription factor 3	<0.01	-2.9	-4.0	0.07
<i>S100a9</i>	S100 calcium binding protein A9	<0.01	-2.1	-2.0	0.15
Rn.177404 ^d	EST	0.07	-3.7	-1.1	0.07
iii) Common to all carcinomas (Table 4)					
<i>Gp2</i>	Glycoprotein 2	0.01	5.4	7.3	<0.01
<i>Areg</i>	Amphiregulin	<0.01	4.6	3.9	0.02
<i>Igf2</i>	Insulin-like growth factor 2	<0.01	3.8	5.8	0.02
<i>Ca3</i>	Carbonic anhydrase 3	0.02	-5.1	-8.2	<0.01
<i>RGD:727910</i>	Mg1	<0.01	-2.6	-4.2	<0.01

^a Expression values of each carcinoma, relative to the average expression in normal tissues, were transformed into base-2 logarithms and then compared between microarrays and qPCR.

^b Base-2 logarithm for the ratio of average expression in spontaneous carcinomas to that in radiation-induced ones for the top two categories (i and ii) or the ratio of average expression in carcinomas to that in normal mammary glands for the last category (iii).

^c qPCR values, relative to the average expression in normal tissues, were transformed into base-2 logarithms and compared between spontaneous and radiation-induced carcinomas (i and ii) or between carcinomas and normal mammary glands (iii) by Welch's *t*-test. The qPCR analysis incorporated additional samples that were not analyzed with microarrays.

^d The Unigene ID is indicated for unidentified expressed sequence tags (ESTs).

mammary carcinomas. The analysis also confirmed that the three genes (*Gp2*, *Areg* and *Igf2*) showed increased expression in both spontaneous and radiogenic carcinomas, whereas two genes (*Ca3* and *RGD:727910*) exhibited decreased expression (Table 5).

The expression of five possibly radiation-associated genes (*Tnfsf11*, *Fgf10*, *Agtr1a*, *Pou3f3* and *S100a9*) varied widely between nine radiation-induced carcinomas examined. Therefore, we searched for correlation of these gene expressions with some of parameters such as tumor weight and latency. The expression of *S100a9* showed a significant (*P*

< 0.05) inverse correlation with the latent period of radiation-induced tumors, whereas those of other genes did not (Fig. 3). No correlation was found between either of these five gene expressions and tumor weight (data not shown). Moreover, significant correlation existed between expression levels (log-transformed value relative to the average of those for normal tissues) of *Agtr1a* and *Tnfsf11* (*P* < 0.01) and between those of *Agtr1a* and *Fgf10* (*P* < 0.002) and the levels of *Tnfsf11* and *Fgf10* were indicative of correlation (*P* = 0.06); no correlation existed for other combinations (data not shown).

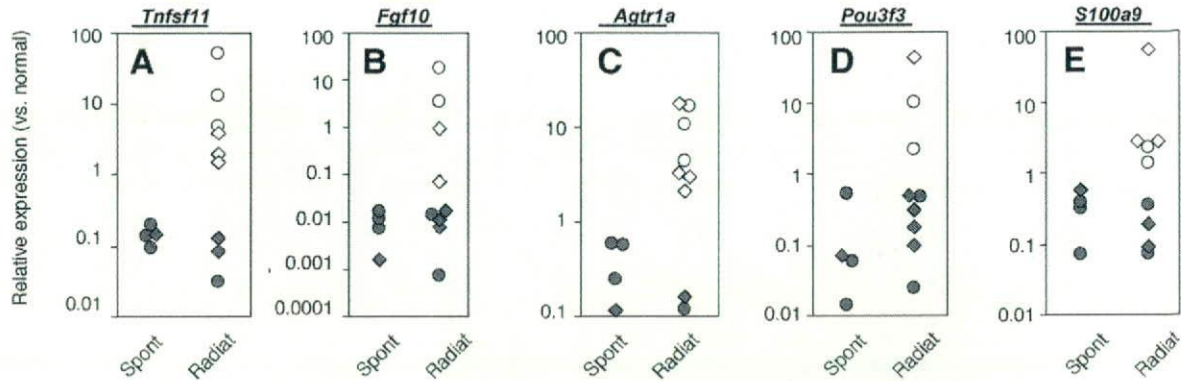


Fig. 2. Expression levels of five genes in each carcinoma as determined by quantitative PCR (qPCR). Four spontaneous (*Spont*) and nine radiation-induced (*Radiat*) carcinomas were analyzed for expression of *Tnfsf11*, *Fgf10*, *Agtr1a*, *Pou3f3* and *S100a9* (panels A–E, respectively), and data are indicated as relative expression values compared to the average of normal mammary glands. Circles indicate tumors that were used for the microarray analysis and diamonds indicate additional samples examined only by qPCR. Gray symbols represent tumors whose expression levels were within ± 3 standard deviations of spontaneous tumor levels; other tumors are represented by white symbols.

DISCUSSION

The present study was undertaken to clarify whether tumor gene expression correlates with tumor etiology (spontaneous development versus induction by ionizing radiation) in a rat mammary cancer model. We showed that three spontaneous mammary cancers could be distinguished from four radiation-induced cancers based on their global gene expression profiles. We then focused on 18 differentially expressed genes and confirmed by qPCR that eight of them were differentially expressed even after new tissue samples were added into the analysis. Thus, we show for the first time that radiation-induced rat mammary cancer is distinguishable from spontaneous one according to their gene expression.

It is not well understood why cancers of different etiological origin can be distinguished using gene expression profiles. In accordance with our data, rat mammary cancers induced by different chemical carcinogens have been successfully classified by their causative agents based on their gene expression profiles^{14,16}; however, the rationale for such classification has not been provided. In our study, gene expression profiles of spontaneous cancers were homogeneous, whereas radiation-induced cancers comprised a heterogeneous population. The following hypothesis, although speculative, might account for this observation: During the initiation step of spontaneous mammary tumor development, rare mutations must accumulate over time, which should only occur in long-lived, stem-like cells. Given that the target cell type is thus limited, the resulting cancers would resemble one another. In contrast, acute exposure to ionizing radiation may produce a large number of mutations in a cell in a short period; therefore, relatively short-lived partially differentiated cells could also be the origin of radiation-

induced mammary carcinoma. The various states of differentiation among these cells might reflect the heterogeneity of the resulting cancers. Actually, genes such as *Pgr*, *Wnt4* and *Plg* are involved in ductal branching,^{29,30} which is a relatively early step of the mammary gland development, and were specifically up-regulated in spontaneous cancers. In contrast, radiation-associated genes such as *Tnfsf11* and *Fgf10* encode secreted factors that are thought to direct alveolar morphogenesis,^{31,32} a rather later step of mammary gland differentiation. Furthermore, though the function of *Agtr1a* in the mammary gland is unknown, the correlation between the expression levels of *Tnfsf11*, *Fgf10* and *Agtr1a* suggests the link in their role in radiation-induced development of rat mammary carcinoma.

As gene expression profiles have previously been investigated for chemically-induced rat mammary carcinomas,^{14–16} comparison of our present result with these previous data inform us whether above genes are specific to spontaneous or radiation-induced tumors or are also expressed in chemically-induced cancers. In one of these previous studies,¹⁴ although the number of genes on the microarrays were small therein, two spontaneous tumor-specific (*Plg* and *Pgr*) and three radiation-specific (*Fgf10*, *Pou3f3* and *S100a9*) genes did not show high expression levels in chemically-induced carcinomas. This ascertains that high expressions of these genes are specific to spontaneous and radiogenic mammary cancers, respectively. *Agtr1a* were upregulated in most of chemically-induced carcinomas, indicating its possible relevance to exogenously (regardless of radiation- or chemically) induced, but not spontaneous, cancer development.

In addition, an inverse correlation existed between *S100a9* expression and tumor latency. This relationship suggests that *S100a9*-overexpressing cancer develops more rapidly than

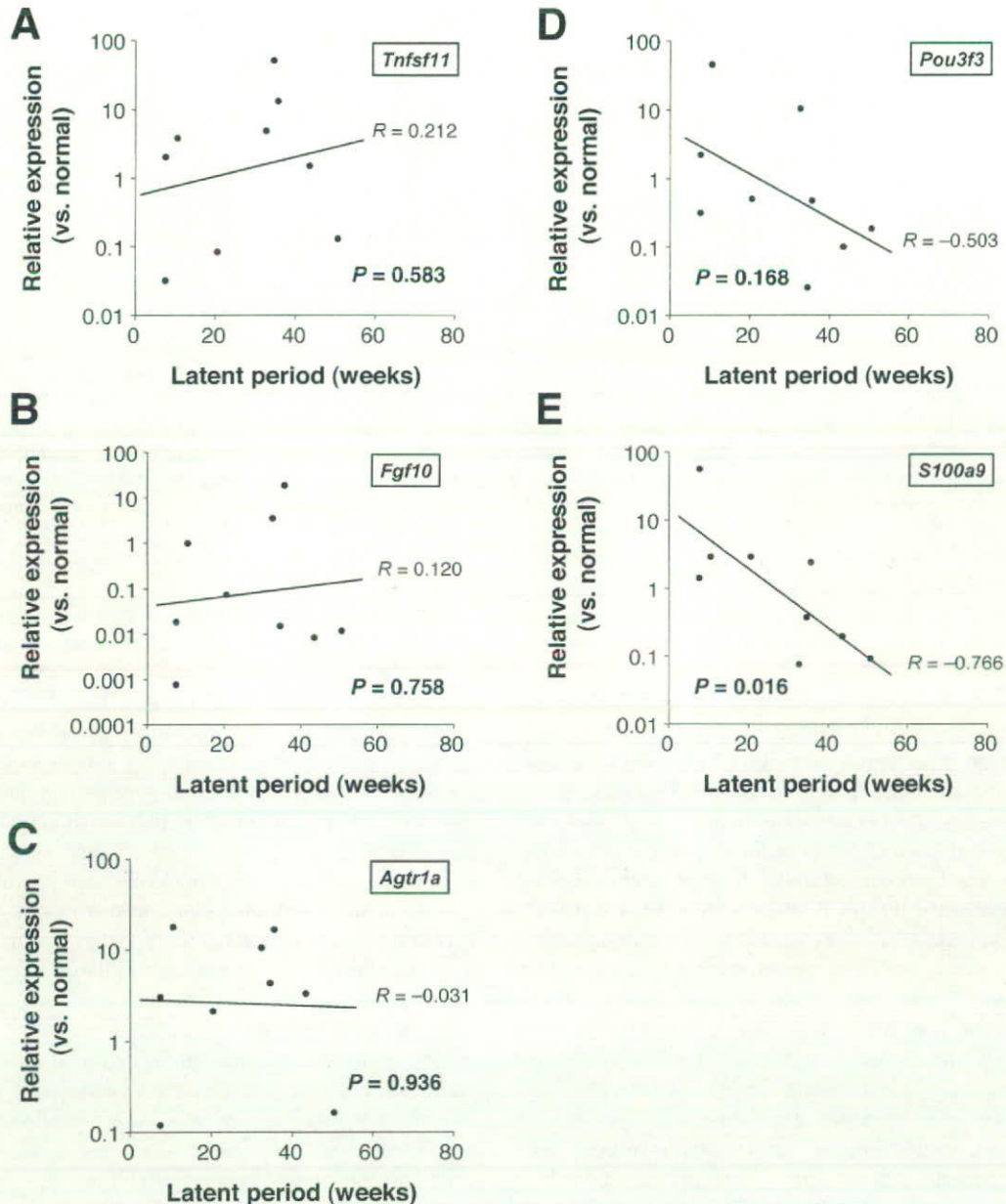


Fig. 3. Scatter plots showing the relationship between the latent period and expression of various genes for radiation-induced rat mammary carcinomas. The expression values of *Tnfsf11*, *Fgf10*, *Agtr1a*, *Pou3f3* and *S100a9* (panels A–E, respectively) in each tumor were determined by quantitative PCR and expressed as relative values compared to the average of four normal mammary glands. Each dot indicates one tumor sample. The least square method was applied to give linear approximation to the relationship between the latent period and logarithm-transformed expression values (lines). Pearson's correlation coefficient (R) and the P value for its significance are also indicated.

that without its overexpression, implying association between its expression and accelerated tumor progression. In fact, S100A9 immunopositivity has been reported to be a marker of poor differentiation in human breast cancers.³³⁾

We also found many changes in gene expression that were common to both types of carcinomas. Because rat mammary

cancers are mostly of ductal origin, the search for spontaneous or radiogenic cancer-specific gene expression may have neglected important genes for ductal elongation, which should be up-regulated in both spontaneous and radiogenic mammary cancers. Some of these genes, for example *Areg*, *Cited1* and *Mmp3*,^{34–36)} showed increased expression in all

examined tumors. We also found several genes that showed decreased expression in carcinomas. Most of these (*e.g.*, *Ca3*, *Cd36* and *Acs11*) were adipocyte-associated genes and may merely reflect the adipocyte-rich composition of normal mammary tissue. Nevertheless, a previous study has shown that the non-coding RNA *Mg1*, which is encoded by the *RGD:727910* locus, is associated with hormone-induced protection against mammary cancer development in rats.³⁷⁾ Our result is the first to show that this gene product is down-regulated in mammary carcinomas and supports the possibility that this non-coding RNA is a tumor suppressor.

In summary, our results indicate that spontaneous and radiogenic rat mammary cancers are distinguishable based on global and specific gene expression patterns, even though most gene expression changes were common to both cancers. The data indicate that spontaneous and radiogenic mammary cancer development involves distinct molecular and cellular mechanisms. When applied to human cancers, the distinction between radiogenic and spontaneous cancers will be helpful in assessing the risk of cancer from low doses of radiation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank E. Obara, Y. Amasaki, Y. Hatano, H. Moritake, H. Osada, M. Ootawara, S. Sasaki and other lab members for technical and secretarial assistance, and the Laboratory Animal Sciences Section for animal management. This research was supported in part by a Grant for Basic Science Research Projects from the Sumitomo Foundation (060611), the Third-Term Comprehensive Strategy for Cancer Control (19141201) and a Grant-In-Aid for Cancer Research (19S-1) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and a Grant-In-Aid for Scientific Research (C) from Japan Society for Promotion of Science (13470263).

REFERENCES

- Wakeford, R. (2004) The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene* **23**: 6404–6428.
- Brenner, D. J., Doll, R., Goodhead, D. T., Hall, E. J., Land, C. E., Little, J. B., Lubin, J. H., Preston, D. L., Preston, R. J., Puskin, J. S., Ron, E., Sachs, R. K., Samet, J. M., Setlow, R. B. and Zaider, M. (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 13761–13766.
- Neta, R. (2000) The promise of molecular epidemiology in defining the association between radiation and cancer. *Health Phys.* **79**: 77–84.
- Fugazzola, L., Pilotti, S., Pinchera, A., Vorontsova, T. V., Mondellini, P., Bongarzone, I., Greco, A., Astakhova, L., Butti, M. G., Demidchik, E. P. and *et al.* (1995) Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res.* **55**: 5617–5620.
- Taylor, J. A., Watson, M. A., Devereux, T. R., Michels, R. Y., Saccomanno, G. and Anderson, M. (1994) p53 mutation hotspot in radon-associated lung cancer. *Lancet* **343**: 86–87.
- Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Shiroishi, T., Clifton, K. H. and Wakana, S. (2000) Radiation-associated loss of heterozygosity at the *Znfn1a1* (*Ikaros*) locus on chromosome 11 in murine thymic lymphomas. *Radiat. Res.* **154**: 293–300.
- Ullrich, R. L. and Ponnaiya, B. (1998) Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**: 747–754.
- Little, J. B. (2000) Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**: 397–404.
- Iwamoto, K. S., Fujii, S., Kurata, A., Suzuki, M., Hayashi, T., Ohtsuki, Y., Okada, Y., Narita, M., Takahashi, M., Hosobe, S., Doishita, K., Manabe, T., Hata, S., Murakami, I., Itoyama, S., Akatsuka, S., Ohara, N., Iwasaki, K., Akabane, H., Fujihara, M., Seyama, T. and Mori, T. (1999) p53 mutations in tumor and non-tumor tissues of thorotrast recipients: a model for cellular selection during radiation carcinogenesis in the liver. *Carcinogenesis* **20**: 1283–1291.
- Nakamura, N. (2005) A hypothesis: radiation-related leukemia is mainly attributable to the small number of people who carry pre-existing clonally expanded preleukemic cells. *Radiat Res* **163**: 258–265.
- Ntzani, E. E. and Ioannidis, J. P. (2003) Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. *Lancet* **362**: 1439–1444.
- Bild, A. H., Yao, G., Chang, J. T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., Joshi, M. B., Harpole, D., Lancaster, J. M., Berchuck, A., Olson, J. A. Jr., Marks, J. R., Dressman, H. K., West, M. and Nevins, J. R. (2006) Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **439**: 353–357.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. and Lander, E. S. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531–537.
- Kuramoto, T., Morimura, K., Yamashita, S., Okochi, E., Watanabe, N., Ohta, T., Ohki, M., Fukushima, S., Sugimura, T. and Ushijima, T. (2002) Etiology-specific gene expression profiles in rat mammary carcinomas. *Cancer Res.* **62**: 3592–3597.
- Shan, L., He, M., Yu, M., Qiu, C., Lee, N. H., Liu, E. T. and Snyderwine, E. G. (2002) cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* **23**: 1561–1568.
- Shan, L., Yu, M. and Snyderwine, E. G. (2005) Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis* **26**: 503–509.
- Nandi, S., Guzman, R. C. and Yang, J. (1995) Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3650–3657.
- Medina, D. and Thompson, H. J. (2000) A comparison of the

- salient features of mouse, rat, and human mammary tumorigenesis. In *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*, (Eds.) Ip, M. M. and Asch, B. B., pp. 31–36. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
19. Ronckers, C. M., Erdmann, C. A. and Land, C. E. (2004) Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* **7**: 21–32.
 20. Land, C. E., Tokunaga, M., Koyama, K., Soda, M., Preston, D. L., Nishimori, I. and Tokuoka, S. (2003) Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950–1990. *Radiat. Res.* **160**: 707–717.
 21. Shellabarger, C. J., Cronkite, E. P., Bond, V. P. and Lippincott, S. W. (1957) The occurrence of mammary tumors in the rat after sublethal whole-body irradiation. *Radiat. Res.* **6**: 501–512.
 22. Haag, J. D., Brasic, G. M., Shepel, L. A., Newton, M. A., Grubbs, C. J., Lubet, R. A., Kelloff, G. J. and Gould, M. N. (1999) A comparative analysis of allelic imbalance events in chemically induced rat mammary, colon, and bladder tumors. *Mol. Carcinog.* **24**: 47–56.
 23. Kamiya, K., Higgins, P. D., Tanner, M. A., Gould, M. N. and Clifton, K. H. (1999) Kinetics of mammary clonogenic cells and rat mammary cancer induction by X-rays or fission neutrons. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **40 Suppl**: 128–137.
 24. Imaoka, T., Nishimura, M., Teramoto, A., Nishimura, Y., Ootawara, M., Osada, H., Kakinuma, S., Maekawa, A. and Shimada, Y. (2005) Cooperative induction of rat mammary cancer by radiation and 1-methyl-1-nitrosourea via the oncogenic pathways involving c-Myc activation and H-ras mutation. *Int. J. Cancer* **115**: 187–193.
 25. Imaoka, T., Nishimura, M., Kakinuma, S., Hatano, Y., Ohmachi, Y., Yoshinaga, S., Kawano, A., Maekawa, A. and Shimada, Y. (2007) High relative biologic effectiveness of carbon ion radiation on induction of rat mammary carcinoma and its lack of H-ras and Tp53 mutations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **69**: 194–203.
 26. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14863–14868.
 27. Kakinuma, S., Nishimura, M., Sasanuma, S., Mita, K., Suzuki, G., Katsura, Y., Sado, T. and Shimada, Y. (2002) Spectrum of Zfn1a1 (Ikaros) inactivation and its association with loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in susceptible B6C3F1 mice. *Radiat. Res.* **157**: 331–340.
 28. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* **25**: 402–408.
 29. Briskin, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Weinberg, R. A. (2000) Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev.* **14**: 650–654.
 30. Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A. and Bissell, M. J. (2001) The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* **128**: 3117–3131.
 31. Fata, J. E., Kong, Y. Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Khokha, R. and Penninger, J. M. (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**: 41–50.
 32. Palmieri, C., Roberts-Clark, D., Assadi-Sabet, A., Coope, R. C., O'Hare, M., Sunters, A., Hanby, A., Slade, M. J., Gomm, J. J., Lam, E. W. and Coombes, R. C. (2003) Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells. *J. Endocrinol.* **177**: 65–81.
 33. Arai, K., Teratani, T., Kuruto-Niwa, R., Yamada, T. and Nozawa, R. (2004) S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation. *Eur. J. Cancer* **40**: 1179–1187.
 34. Ciarloni, L., Mallepell, S. and Briskin, C. (2007) Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 5455–5460.
 35. Howlin, J., McBryan, J., Napoletano, S., Lambe, T., McArdle, E., Shioda, T. and Martin, F. (2006) CITED1 homozygous null mice display aberrant pubertal mammary ductal morphogenesis. *Oncogene* **25**: 1532–1542.
 36. Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J., Soloway, P., Itoharu, S. and Werb, Z. (2003) Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* **162**: 1123–1133.
 37. Ginger, M. R., Gonzalez-Rimbau, M. F., Gay, J. P. and Rosen, J. M. (2001) Persistent changes in gene expression induced by estrogen and progesterone in the rat mammary gland. *Mol. Endocrinol.* **15**: 1993–2009.

Received on December 20, 2007

Accepted on February 18, 2008

J-STAGE Advance Publication Date: April 16, 2008

発癌剤の複合曝露によって誘発される ラット乳癌の発現マイクロアレイ解析

今岡 達彦¹⁾・石川 顕一²⁾・山下 聡³⁾・西村 まゆみ¹⁾・飯塚 大輔¹⁾
柿沼 志津子¹⁾・牛島 俊和³⁾・今井 高志²⁾・島田 義也¹⁾

¹⁾放射線医学総合研究所・発達期被ばく影響研究グループ

²⁾放射線医学総合研究所・ゲノム診断研究グループ

³⁾国立がんセンター研究所・発がん研究部

要 旨

ヒトのがんリスクの多くは環境要因に由来すると考えられている。環境中の発がん要因は無数に存在するが、そのリスク評価および規制は個別の物質ごとに行われ、それらは互いに相加的に作用すると仮定されている。我々はラット乳腺腫瘍モデルを用いて、放射線とメチルニトロソ尿素 (MNU) の複合曝露実験を行った。7週齢 Sprague-Dawley 雌ラットにガンマ線 1 Gy、MNU 40mg/kg 腹腔内投与あるいは両者の複合処理を行い、50週齢まで飼育した。腫瘍の触知された個体より病巣を摘出し、病理検査で癌と診断されたものについて、腫瘍の残りから DNA および RNA を抽出し、制限酵素断片長にもとづく H-ras 遺伝子変異解析および Affymetrix 社マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、放射線、MNU、複合処理による誘発腫瘍の H-ras 変異陽性率はそれぞれ 0, 54, 78% であり、複合曝露による腫瘍の変異陽性率は他より有意に高かった。マイクロアレイの結果を変異の有無にしたがって誘発要因間で比較すると、複合曝露による腫瘍には各要因の単独曝露では見られない特徴的な遺伝子発現が存在した。リアルタイム RT-PCR による確認の結果、Sgk 遺伝子が複合曝露による H-ras 変異腫瘍で高い発現を示した。Sgk は乳癌細胞において抗アポトーシスシグナルに関わるキナーゼであることから、放射線と MNU が複合的にラットに曝露されると、Sgk の活性化を経て H-ras 変異を持つ腫瘍が

よく発症することが示唆された。

はじめに

人体は日常的に無数の発癌要因に曝露されており、電離放射線もそのひとつである。原爆被爆生存者や照射された患者の疫学研究から、放射線が乳癌のリスク・ファクターであることが示されている^{1,2)}。そのほかにもヒトの生活環境には、タバコ煙や食物中のニトロソ化合物およびヘテロサイクリックアミン類をはじめ、多数の遺伝毒性物質が存在し、現代世界ではこれら要因への複合曝露は不可避である。

発がん要因への複合曝露リスクをあつかった研究は多く、疫学研究によれば電離放射線と発がん物質の複合影響は、相乗作用や相加作用などの幅を示すことが知られる。たとえば Hodgkin リンパ腫治療のための胸部放射線照射による副次的な肺癌発生リスクは、DNA アルキル化剤を用いた治療によるリスクとは相加的であるが、喫煙習慣によるリスクとのあいだでは相乗的である^{3,4)}。同様の複合影響の幅は、動物実験や培養細胞実験でも確認されている。ところがこれらの複合影響の発現メカニズムについては、分子生物学的な観点からはほとんど明らかにされていない。

我々は過去にラット乳腺腫瘍誘発モデルを用いて、電離放射線およびメチルニトロソ尿素 (MNU) の複合発がん実験を行い、発生した乳癌の H-ras 遺伝子変異の解析を行った⁵⁾。その結果、放射線は、MNU と異なり単独では同変異

を持たない腫瘍しか発生させなかったが、複合曝露では同変異のある腫瘍の発生を促進した⁵⁾。この結果は、放射線とMNUの複合的な発癌作用が単純な相加的なメカニズムでは説明できないことを示している。本研究ではマイクロアレイによる腫瘍の遺伝子発現解析を実施し、複合曝露によってH-ras変異を持つ腫瘍の発生が促進されるメカニズムの解明を試みた。

材料と方法

動物実験：すべての実験は放医研動物実験委員会の承認の下、実験動物取扱安全衛生管理規程を遵守して実施した。Jcl:SD雌ラット（日本クレア）を購入し、以前の論文^{5,6)}と同様に処置を行った。すなわち7週齢時にガンマ線（1 Gy）を照射、MNU（40mg/kg）を腹腔内投与、あるいはそれらの複合処理を施した。9週齢より23.5%コーン油含有飼料を与え、50週齢まで観察した。腫瘍は触知腫瘍発症個体から採取し、ホルマリン固定後病理標本を作製、あるいは液体窒素で凍結し-80℃で保存した。

H-ras遺伝子変異解析：H-ras遺伝子第12～13コドンの突然変異は、PCR産物の制限酵素切断片長アッセイにより行った^{5,7)}。すなわち腫瘍のゲノムDNAよりH-ras遺伝子領域の一部をPCRにより増幅したのち、第12～13コドンの境界に存在する制限酵素MnlI認識部位に生じる突然変異を、切断片の電気泳動度によって検出した。

マイクロアレイ解析：放射線群（4検体）、MNU群（H-ras変異5検体および無変異4検体）およ

び複合群（H-ras変異5検体および無変異4検体）の癌を用い、基本的に以前の論文⁸⁾の方法で解析した。すなわち精製したトータルRNAを用いてT7（dT）₂₄プライマーにより二重鎖cDNAを合成した。次にこれを鋳型としてビオチン標識相補RNAを合成し、加水分解した。これをGeneChip Rat Genome 230 2.0（Affymetrix社、約3万遺伝子搭載）アレイにハイブリダイズさせ、Fluidics Station 450（Affymetrix社）を用いて洗浄および蛍光染色を行って、専用スキャナーで取り込んだ画像を専用ソフトウェアで解析した。アレイ上の各プローブのデータは平均蛍光強度が500となるようスケールリングし、以前の論文⁹⁾の方法で解析した。

定量RT-PCR：上記の精製RNAからcDNAを合成し、Mx3000PリアルタイムPCRシステム（ストラタジーン社）およびSYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ社）を用いた定量RT-PCRを行った。プライマー配列は省略。

結果

H-ras変異

放射線照射、MNU投与、あるいはそれらの複合処理を施したラットに発生した乳癌のH-ras遺伝子変異をPCR産物の制限酵素断片長に基づいて解析したところ、変異を有する腫瘍の割合は放射線群ではゼロであり、MNU群よりも複合群で有意に高かった（表1）。すなわち、放射線は単独ではH-ras変異を介する発癌経路を活性化しないが、MNUとの複合曝露においては同経路を活性化する作用を示した。

表1 ラット乳癌の発生率とH-ras変異

群	動物数	罹患動物数 (%)	H-ras 変異 (%) †
放射線	20	6 (30)	0/10 (0)
MNU	18	15 (83)	29/54 (54)
複合	21	18 (86)	62/79 (78)*

*、MNU群に比してP<0.005かつ放射線群に比してP<0.0001（Fisher正確確率検定）。

†、突然変異陽性の乳癌数/解析に用いた乳癌数。カッコ内は陽性率。

マイクロアレイ解析

放射線がMNUとの複合曝露においてH-ras変異を介する発癌経路を活性化するメカニズムを解析する目的で、放射線群の乳癌の遺伝子発現を、同変異を有するMNU群および複合群の乳癌との三者間で比較し、三者間で変動を示す遺伝子を一元配置分散分析によって抽出した。その結果、総計27,155遺伝子より $P < 0.001$ を示す75遺伝子を確認できたので、これらの遺伝子を用いた二次元クラスター解析を行った(図1A)。そのうちクラスターaに属する25遺伝子が複合群に特徴的な高発現を示し、放射線によるH-ras変異腫瘍の発生促進への関わりが示唆された。同様に、放射線群の乳癌の遺伝子発現を、同変異を有さないMNU群および複合群の乳癌との三者間で比較したところ、総計26,603遺伝子より $P < 0.001$ を示す135遺伝子を

確認できたので、これらの遺伝子を用いた二次元クラスター解析をおこなった(図1B)。そのうちクラスターbおよびcに属する52および53遺伝子が、複合群でそれぞれ低発現および高発現を示し、放射線によるH-ras非変異腫瘍の発生抑制への関与が示唆された。

リアルタイムRT-PCR

マイクロアレイ解析においては、調査する遺伝子数(p)が検体数(n)より大幅に大きいため偽陽性が発生するという、いわゆる「 $p \gg n$ 問題」が存在する。そのためいくつかの興味ある遺伝子について、マイクロアレイのデータが定量RT-PCRを用いた独立の実験でも再現できるかどうか確認を行った。また発現量の検体間のばらつきにより、今回の実験に用いた少数の検体において偶然に数値の突出している、普遍性

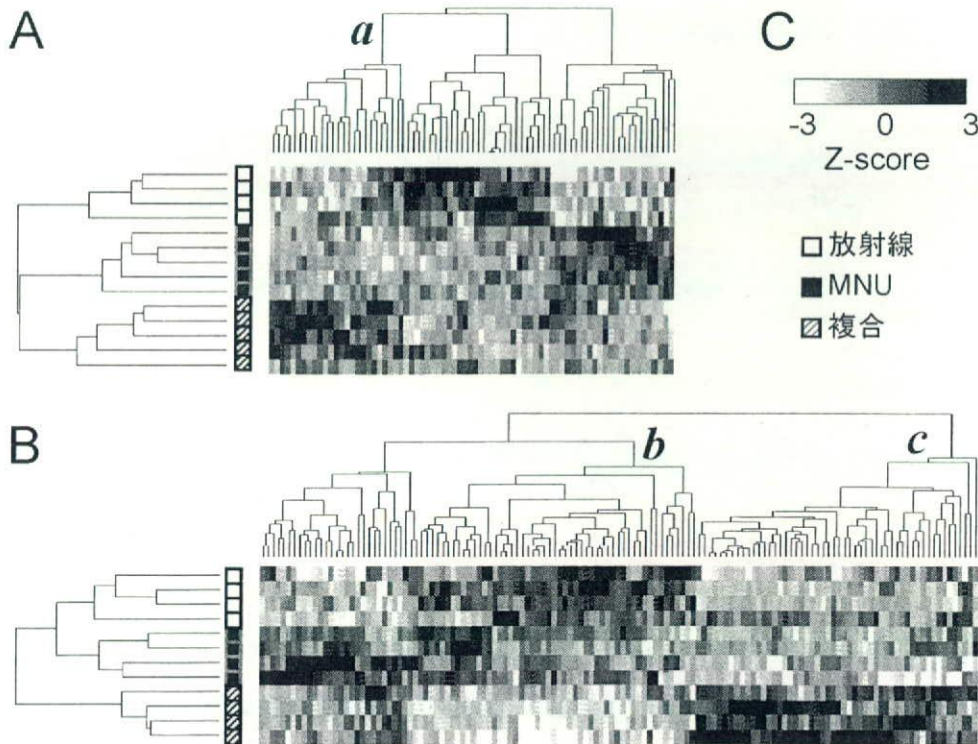


図1 ラット乳癌の遺伝子発現プロフィール解析。A. 放射線誘発腫瘍 ($n=4$) およびH-ras変異を有するMNUあるいは複合処理誘発腫瘍 (各 $n=5$) において、一元配置分散分析で $P < 0.001$ を示した75遺伝子の二次元クラスター解析。クラスターaは複合群で高発現を示す。B. 放射線誘発腫瘍 ($n=4$) およびH-ras変異を有さないMNUあるいは複合処理誘発腫瘍 (各 $n=4$) において、一元配置分散分析で $P < 0.001$ を示した135遺伝子の二次元クラスター解析の結果。クラスターbおよびcは複合群でそれぞれ低発現および高発現を示す。縦に各腫瘍、横に各遺伝子を示す。C. 遺伝子発現量の目盛りおよび凡例。

のない遺伝子発現変化を誤って抽出した可能性がある。そこで定量RT-PCRの際にはマイクロアレイ解析に用いた検体とは異なる検体を含めた。表2に示すように、解析した19遺伝子のうち13遺伝子でのみマイクロアレイと定量RT-PCRのデータ間の相関が有意であった ($P < 0.05$)。これら13遺伝子のうち、検体を追加した定量RT-PCRでも3つの群の間で有意な発現の差 ($P < 0.05$) を示したのは7遺伝子であった(図2)。そのうち *Sgk* および *Mmp11* の発現が、複合群において放射線群あるいはMNU群のいずれよりも有意に高かった(図2)。

表2 各遺伝子のマイクロアレイと定量的RT-PCR解析の相関

遺伝子	マイクロアレイとの相関	
	相関係数	P値
a) 複合誘発H-ras変異腫瘍で増加		
<i>Hipk2</i>	0.257	0.40
<i>Snf1lk</i>	0.263	0.38
<i>Sox4</i>	0.378	0.20
<i>Sgk</i>	0.900	0.000028
<i>Rn.161133</i>	0.345	0.25
<i>Rn.21549</i>	0.871	0.00010
b) 複合誘発H-ras非変異腫瘍で減少		
<i>Ka17</i>	0.152	0.66
<i>Tm4sf1</i>	0.685	0.020
<i>Adamts1</i>	0.728	0.011
<i>Rn.165929</i>	0.710	0.014
<i>Sc4mol</i>	0.156	0.65
<i>Dpysl3</i>	0.804	0.0029
c) 複合誘発H-ras非変異腫瘍で増加		
<i>Dio2</i>	0.958	0.0000034
<i>Porf1</i>	0.865	0.00058
<i>Ccl6</i>	0.798	0.0032
<i>Serping1</i>	0.698	0.017
<i>Mmp11</i>	0.711	0.014
<i>Plg</i>	0.846	0.0010
<i>Spp1</i>	0.635	0.036

考察

ラット乳腺腫瘍モデルにおいて、MNUに起因するH-ras遺伝子変異を有する腫瘍の発生は、放射線の複合曝露によって促進されることが我々により示されている⁵⁾。これは今回の結果からも支持された。そのメカニズムを解明するためマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行

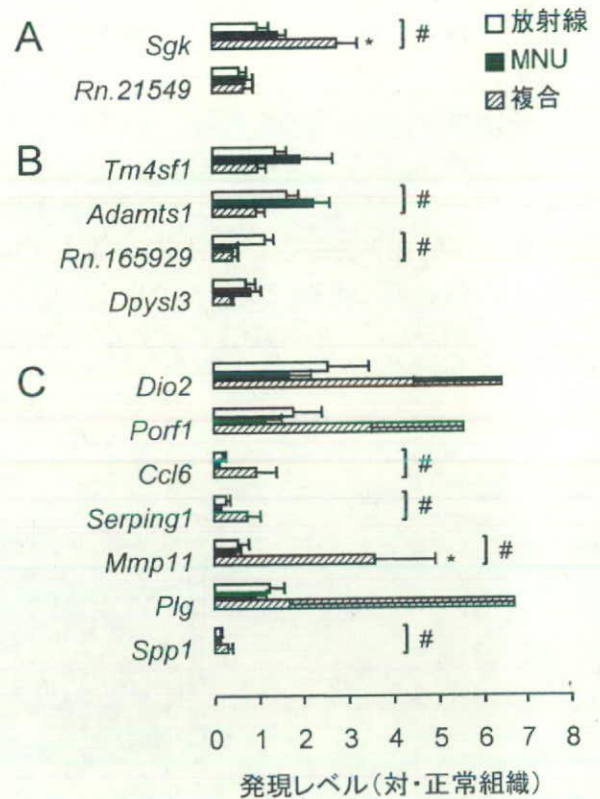


図2 放射線、MNUあるいはそれらの複合によって誘発されたラット乳癌における各遺伝子の定量RT-PCRによる発現解析。正常乳腺組織 ($n=4$) における発現を基準にした相対値を示す。A. H-ras変異を有する複合誘発腫瘍において発現増加の示唆された遺伝子。B. H-ras変異を有さない複合誘発腫瘍において発現低下の示唆された遺伝子。C. H-ras変異を有さない複合誘発腫瘍において発現増加の示唆された遺伝子。#, 放射線誘発腫瘍 ($n=8$)、MNU誘発腫瘍 ($n=5-10$)、複合誘発腫瘍 ($n=9-12$) 間でKruskal-Wallis検定により $P < 0.05$ 。*, Mann-WhitneyのU検定により放射線・複合間およびMNU・複合間でともに $P < 0.05$ 。平均値±SE。

ったところ、複数の遺伝子が複合曝露による誘発腫瘍において発現変動を示した。これらの遺伝子のうち19個について、定量的RT-PCRによって新たな検体を含めて発現解析を行った結果、7遺伝子についてマイクロアレイの結果が支持された。そのうち*Sgk*遺伝子が放射線誘発腫瘍およびMNU誘発*H-ras*変異腫瘍よりも複合誘発*H-ras*変異腫瘍において高い発現を示した。また*Mmp11*遺伝子は、複合誘発*H-ras*非変異腫瘍で高い発現を示した。これらの結果は、*Sgk*発現が複合曝露後の*H-ras*変異腫瘍の発生促進に関係すること、および*Mmp11*の発現が複合曝露後の*H-ras*非変異腫瘍の発生に関わることを示唆している。

*Sgk*遺伝子はserum glucocorticoid-regulated kinase (*Sgk*)をコードする遺伝子であるが、*Sgk*はヒト乳癌でも高発現して細胞内の抗アポトーシスシグナルを仲介するキナーゼであり¹⁰⁻¹²⁾、乳癌細胞の浸潤能への関与も示唆されている¹³⁾。したがって本遺伝子を高発現する複合誘発*H-ras*変異腫瘍においては、その発生過程で*Sgk*によるアポトーシス回避および浸潤能亢進が促進的な役割を果たしていることが示唆される。実際、*Ras*の下流に位置するMAPキナーゼは*Sgk*遺伝子の転写を活性化することが示されている¹⁴⁾。*Sgk*遺伝子の転写はPI3キナーゼによっても活性化されるが¹⁵⁾、放射線が微小環境の変化を通して乳癌細胞のPI3キナーゼ依存性浸潤能を亢進する事実¹⁶⁾は、放射線がPI3キナーゼの経路を介して*Sgk*の転写活性化も引き起こす可能性を示唆している。*Sgk*はMAPキナーゼのリン酸化作用により活性化されて細胞増殖の促進に関わることも知られており¹⁷⁻¹⁹⁾、*Sgk*の高発現はMAPキナーゼ経路の活性化した*H-ras*変異腫瘍において効果的に機能すると考えられる。これらのことから、複合曝露によって*H-ras*変異腫瘍の発生が促進されるメカニズムには*Sgk*が深く関わっていることが示唆される。

他方、複合曝露による*H-ras*非変異腫瘍で特徴的な発現増加の見られた*Mmp11*は、stromelysin 3とも呼ばれ、細胞外マトリクスの分解を介して乳癌の浸潤に寄与するメタロプロテアーゼである²⁰⁾。したがって同遺伝子の発現変動は乳癌発

症に関して促進的なものであり、複合曝露において*H-ras*非変異腫瘍の割合が減少することと一見矛盾するようである。これは、何らかの未知の理由により*H-ras*非変異腫瘍の発生しにくい状況下で、その状況を打開して発症してきた腫瘍を観察したために見られた現象かもしれない。

以上のように本研究では、ラット乳腺腫瘍の遺伝子発現解析を網羅的に行うことにより、放射線とMNUの複合曝露によって*H-ras*変異腫瘍の発生が促進されるメカニズムとして、*Sgk*遺伝子の関与を示唆することができた。このように発癌の分子メカニズムのレベルでは、複数の発癌要因の複合作用は、単純な相加作用では説明できないと考えられる。

謝 辞

波多野由希子、森竹浩之、岡部まゆみ、長田春美、太田原雅美、佐々木静枝、小原えり子、菅原由美子、水元富美子、平澤和子の各氏および放医研実験動物開発・管理課スタッフに感謝します。本研究は住友財団基礎科学研究助成(今岡)による援助、ならびに厚生労働省がん研究助成金(島田;分担)および同対がん総合戦略研究事業(今岡;分担)、日本化学工業協会LRI(柿沼)、文部科学省科学研究費補助金基盤A(島田;分担)および同C(柿沼)による部分的援助を受けました。

文 献

1. Ronckers CM, et al.: Radiation and breast cancer: a review of current evidence, *Breast Cancer Res* 7: 21-32, 2005.
2. Preston DL, et al.: Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998, *Radiat Res* 168: 1-64, 2007.
3. Travis LB, et al.: Lung cancer following chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease, *J Natl Cancer Inst* 94: 182-192, 2002.
4. Gilbert ES, et al.: Lung cancer after treatment for Hodgkin's disease: focus on radiation effects, *Radiat Res* 159: 161-173, 2003.

5. Imaoka T, et al.: Cooperative induction of rat mammary cancer by radiation and 1-methyl-1-nitrosourea via the oncogenic pathways involving c-Myc activation and H-ras mutation, *Int J Cancer* 115: 187-193, 2005.
6. Imaoka T, et al.: High relative biologic effectiveness of carbon ion radiation on induction of rat mammary carcinoma and its lack of H-ras and Tp53 mutations, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69: 194-203, 2007.
7. Roberts-Thomson SJ, et al.: Effect of dietary fat on codon 12 and 13 Ha-ras gene mutations in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced rat mammary gland tumors, *Mol Carcinog* 20: 348-354, 1997.
8. Kuramoto T, et al.: Etiology-specific gene expression profiles in rat mammary carcinomas, *Cancer Res.* 62: 3592-3597, 2002.
9. Ishikawa K, et al.: Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65: 234-245, 2006.
10. Zhang L, et al.: Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I (κ) B kinase, *Cancer Res* 65: 457-464, 2005.
11. Wu W, et al.: Glucocorticoid receptor activation signals through forkhead transcription factor 3a in breast cancer cells, *Mol Endocrinol* 20: 2304-2314, 2006.
12. Sahoo S, et al.: Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer, *Eur J Cancer* 41: 2754-2759, 2005.
13. Tangir J, et al.: SGK1, a potential regulator of c-fms related breast cancer aggressiveness, *Clin Exp Metastasis* 21: 477-483, 2004.
14. Mizuno H, et al.: The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors, *Genes Cells* 6: 261-268, 2001.
15. Tessier M, et al.: Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme, *J Cell Biochem* 98: 1391-1407, 2006.
16. Tsai KK, et al.: Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment, *Cancer Res* 65: 6734-6744, 2005.
17. Lee CT, et al.: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the MAPK/ERK signaling pathway that mediates memory formation in rats, *Eur J Neurosci* 23: 1311-1320, 2006.
18. Hayashi M, et al.: BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase, *J Biol Chem* 276: 8631-8634, 2001.
19. Meng F, et al.: IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway, *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C971-981, 2005.
20. Noel A, et al.: Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity, *Oncogene* 19: 1605-1612, 2000.

<特集 (重粒子線治療生物学の進展) : 総説>

重粒子線のラット乳がん誘発作用

¹放射線医学総合研究所 放射線防護研究センター 発達期被ばく影響研究グループ

²広島大学 原爆放射線医科学研究所 ゲノム応答研究分野

³国立がんセンター 研究所 発がん研究部

今岡達彦^{1*}、西村まゆみ¹、飯塚大輔^{1,2}、高島貴志¹、柿沼志津子¹、西村由希子¹、山下聡³、牛島俊和³、島田義也^{1*}

1. はじめに

重粒子線によるがん治療技術の進歩に伴い、患者の長期生存が可能となってきた。このこと自体は望ましいことである反面、今度は治療に伴う晩期障害、特に二次がんのリスク管理を考えていかなければならない。現在、重粒子線による二次がんのリスクに関する知見は、ヒトに関する情報も実験動物に関する情報も不足している。

2. 重粒子線による乳がんリスクに関する研究の現状

通常の低LET放射線については、我が国の原爆被爆生存者等を追跡した疫学調査が精力的に行われ、そのがんリスクが明らかになってきている(1,2)。放射線影響研究所による調査の最新の報告(2)によると、固形がんリスクが最も高い臓器のひとつが乳腺である。重粒子線のような高い線エネルギー付与 (LET) を有する放射線による乳がんの発生リスクについては、ヒトに関するデータはもとより存在しないが、動物実験による情報も限られている。ヒト乳がんの実験動物モデルとして汎用されるラットモデルについて、重粒子線や中性子線による発がんの生物効果比 (RBE) をまとめたものが表1であるが、いずれも 0.1 Gy 付近の低い線量において 5~10 という高い RBE を報告している(3-6)。特に重粒子線に関しては、University of California, Berkeley の BEVALAC からのネオンイオン線 (LET, 33 keV/μm) を用いた実験(3)で、放射線医学総合研究所

*〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

Tel : 043-206-4053 Fax : 043-206-4138 e-mail : t_imaoka@nirs.go.jp; y_shimad@nirs.go.jp

キーワード：重粒子線、放射線発がん、乳がん、乳腺、ラット

(放医研) の HIMAC に比較的近い LET での RBE が求められている (図 1 および表 1) ほか、Brookhaven National Laboratory の AGS からの鉄イオン線 (平均 LET, 155 keV/μm) を用いた実験の途中経過(4)も報告されている。

放医研の HIMAC において治療に用いられている 290 MeV/u 炭素イオン線についても、乳がん誘発に関する高い RBE が想定される。HIMAC を用いた発がん実験の報告はいくつか存在するが (7-10)、乳がんに関する情報はこれまでなかった。

3. ラットの系統による乳がん発生率の差異

我々は日本クレアより入手可能な 4 系統の雌ラット (ACI, F344, Wistar および Sprague-Dawley) を購入し、重粒子線による乳がん誘発の系統差を調べた。ガンマ線源には ^{137}Cs ガンマ線照射装置 (0.6 Gy/分)、重粒子線には放医研 HIMAC の 290 MeV/u 炭素イオン線の 6 cm 拡大ブラッグピーク (SOBP) ビームを約 1 Gy/分にて使用した。内径幅 5 cm の容器に覚醒下のラットを設置し、容器の中心が SOBP の中心に一致するように照射を行った。このときの推定 LET は 40~90 keV/μm である。8 週齢の動物を照射した後、毎週 1 回の触診のもとで 50 週齢まで飼育し、中途死亡例および 50 週齢の動物を解剖し、肉眼的に観察された腫瘍の病理標本を観察して、腺がんとして判定された腫瘍を解析に用いた。0.5, 1 あるいは 2 Gy の SOBP ビームを照射し、乳がん発生頻度を非照射群と比較したところ (図 1)、Sprague-Dawley ラットのみにおいて線量に依存した有意な発生率の増加が観察された(11)。このような系統依存性の存在は、ヒトにおいても重粒子線治療後の二次がんリスクに個人差が存在する可能性を示唆している。

4. 線量効果関係と RBE

詳細な線量効果関係と RBE を解析するため、発がん感受性の高かった Sprague-Dawley ラットを用いて、0.05 から 2 Gy の炭素イオン線 SOBP ビーム、あるいは 0.5 から 2 Gy のガンマ線を照射して、乳がん発生率および 1 匹あたりの腺がん数に関する線量効果関係を求めた。発生率に関しては、ガンマ線の線量効果関係は直線的であったが、炭素イオン線の線量効果関係は上に凸の曲線を描いた (図 2A) (11)。今回は関数の適合度を重視して平方根関数での近似を行い、炭素イオン線量 D (単位: Gy) の関数として RBE を求めたところ $\text{RBE} = 1.9 \times D^{-0.5}$ 、すなわち 1 Gy で 1.9 ± 0.1 、0.05 Gy で 8.4 ± 0.4 (推定量の平均 ± 標準誤差) という値となった(11)。また 1 匹あたりの腺がん数を指標とした場合は、炭素イオン線 0.05 Gy で有意な増加が認められ、0.1 Gy で減少し、0.2 Gy 以降再び増加するという特異な曲線を描いた (図 2B) (11)。これらの結果は、SOBP ビームに比較的高い発がん性があることを示唆するとともに、低線量リスク推定においては高線量での観察結果を単純な直線性仮定の下で外挿するだけでは不十分であることを示している。

また予備的な結果ではあるが、mono ビームの入射面直下 (LET 約 13 keV/μm) にラットを設置

して1 Gy を照射した実験では、同じ線量のガンマ線と同程度の発生率しか得られていない(未発表データ)。このことから、SOBP より入射面側で正常組織が被ばくした場合の発がんリスクは比較的低いと考え、実験を継続中である。

なお、炭素イオン線を照射されたラットでは、肺に乳がんの転移巣と考えられる病変が単一または複数観察されたが、ガンマ線照射群には見られなかった(11)。したがって、炭素イオン線によって誘発されたがんは、低LET放射線によって誘発されたがんよりも転移性が高い可能性がある。

5. 重粒子線誘発ラット乳がんの特徴

5-1. エストロゲン受容体

乳がんの発生には卵巣より分泌されるホルモンのひとつであるエストロゲンが重要な役割を示すが、多くのラット乳がんでもエストロゲン受容体(ER)が発現されている(12)。そこでガンマ線2 Gyあるいは炭素イオン線1 Gyによって誘発された乳がんにおけるER発現を免疫組織化学的に検証したところ、ガンマ線群で9例中9例、炭素イオン線群で18例中14例がER陽性を示し、両群に差は認められなかった(11)。これらの観察結果は、どちらの場合もエストロゲンが乳がんの発生に重要な役割を示すことを示唆している。

5-2. 遺伝子変異

発がん性化学物質で誘発されるラット乳がんにはH-ras遺伝子第12~13コドンの突然変異が観察されること(13)、放射線誘発ラット肺腫瘍でp53遺伝子の変異が観察されること(14)から、これらの遺伝子変異の探索を行った。H-ras遺伝子変異については26例、p53遺伝子変異については13例の炭素イオン線誘発乳がんを調べたが、変異は観察されなかった(11)。したがって、これらとは異なる遺伝子の異常を原因として腫瘍が発生していると考えられた。

5-3. 遺伝子発現プロフィール

我々は以前、自然発生したラット乳がんとガンマ線照射ラットに発生した乳がんを用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、教師なしクラスター解析において自然発生乳がんの発現プロフィールが単一クラスターを形成すること等から、自然発生乳がんがガンマ線誘発乳がんから遺伝子発現により区別できることを示している(15)。そこで同様の解析をガンマ線誘発乳がんと炭素イオン線誘発乳がんを対象に行ったが、どちらのプロフィールも単一のクラスターを形成することはなかった(未発表データ)。

6. おわりに

以上の新たな知見から、放医研 HIMAC の 290 MeV/u 炭素イオン線の発がん作用は、SOBP 内でラットの正常乳腺組織が被ばくした場合に強く、また高線量での観察結果を低線量リスクに直線性を仮定して外挿することはできない可能性がある。発がん率がラットの系統（遺伝的背景）に強く依存したことから、ヒトにおいても高発がん保因者への照射は注意すべきことが示唆される。誘発された腫瘍は光子線によって誘発される腫瘍と比較して、遺伝子変異、遺伝子発現など多くの点で類似していたが、炭素イオン線の誘発する腫瘍が高い転移性を示す可能性もある。

実験動物の発がんモデルを用いた治療用重粒子線の発がん研究は、蓄積の非常に少ない領域であり、発がん性の高低についても使用する実験モデルによって相当異なっている(7, 9, 16)。十分な情報を蓄積し、いかなる場合に発がんリスクが高くなるかを見極めることが、重粒子線治療における晩期障害を低減・回避するためには重要である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、重粒子線照射実験に関するご助言をいただきました放射線医学総合研究所の野島久美恵先生、実験動物の管理業務にご尽力いただいた同実験動物開発・管理課の各位に、心よりお礼申し上げます。本研究は、放医研「重粒子線がん治療装置等共同利用研究」の一部（14B239, 17B239, 20B239）として行われました。

参考文献

1. Preston, D. L., Shimizu, Y., Pierce, D. A., Suyama, A., and Mabuchi, K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res*, 160: 381-407, 2003.
2. Preston, D. L., Ron, E., Tokuoka, S., Funamoto, S., Nishi, N., Soda, M., Mabuchi, K., and Kodama, K. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res*, 168: 1-64, 2007.
3. Shellabarger, C. J., Baum, J. W., Holtzman, S., and Stone, J. P. Neon-20 ion- and X-ray-induced mammary carcinogenesis in female rats. *Ann N Y Acad Sci*, 459: 239-244, 1985.
4. Dicello, J. F., Christian, A., Cucinotta, F. A., Gridley, D. S., Kathirithamby, R., Mann, J., Markham, A. R., Moyers, M. F., Novak, G. R., Piantadosi, S., Ricart-Arbona, R., Simonson, D. M., Strandberg, J. D., Vazquez, M., Williams, J. R., Zhang, Y., Zhou, H., and Huso, D. In vivo mammary tumorigenesis in the Sprague-Dawley rat and microdosimetric correlates. *Phys Med Biol*, 49: 3817-3830, 2004.
5. Shellabarger, C. J., Chmelevsky, D., and Kellerer, A. M. Induction of mammary neoplasms in the Sprague-Dawley rat by 430keV neutrons and X-rays. *J Natl Cancer Inst*, 64: 821-833, 1980.
6. Broerse, J. J., van Bekkum, D. W., Zoetelief, J., and Zurcher, C. Relative biological effectiveness for

- neutron carcinogenesis in monkeys and rats. *Radiat Res*, 128: S128-135, 1991.
7. Ando, K., Koike, S., Oohira, C., Ogiu, T., and Yatagai, F. Tumor induction in mice locally irradiated with carbon ions: a retrospective analysis. *J Radiat Res (Tokyo)*, 46: 185-190, 2005.
 8. Kakinuma, S., Kubo, A., Amasaki, Y., Nojima, K., Monobe, M., Majima, H. J., Imaoka, T., Nishimura, M., and Shimada, Y. Loss of heterozygosity in heavy-ion-induced murine T-cell lymphomas. *Biol Sci Space*, 17: 187, 2003.
 9. Kakinuma, S., Kubo, A., Amasaki, Y., Nohima, K., Imaoka, T., Nishimura, M., and Shimada, Y. Effect of carbon ions on life span shortening and tumorigenesis in mice. *Biol Sci Space*, 18: 190, 2004.
 10. Nakadai, T., Nojima, K., Kobayashi, I., Sato, K., Yasuda, N., Mitani, H., and Hino, O. HZE radiation effects for hereditary renal carcinomas. *Biol Sci Space*, 18: 177-178, 2004.
 11. Imaoka, T., Nishimura, M., Kakinuma, S., Hatano, Y., Ohmachi, Y., Yoshinaga, S., Kawano, A., Maekawa, A., and Shimada, Y. High relative biologic effectiveness of carbon ion radiation on induction of rat mammary carcinoma and its lack of H-ras and Tp53 mutations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69: 194-203, 2007.
 12. Knott, K. K., McGinley, J. N., Lubet, R. A., Steele, V. E., and Thompson, H. J. Effect of the aromatase inhibitor vorozole on estrogen and progesterone receptor content of rat mammary carcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea. *Breast Cancer Res Treat*, 70: 171-183, 2001.
 13. Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, 306: 658-661, 1983.
 14. Yamada, Y. and Oghiso, Y. Mutations in Tp53 gene sequences from lung tumors in rats that inhaled plutonium dioxide. *Radiat Res*, 152: S107-109, 1999.
 15. Imaoka, T., Yamashita, S., Nishimura, M., Kakinuma, S., Ushijima, T., and Shimada, Y. Gene Expression Profiling Distinguishes Between Spontaneous and Radiation-induced Rat Mammary Carcinomas. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2008.
 16. Durante, M. and Cucinotta, F. A. Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat Rev Cancer*, 8: 465-472, 2008.

表1. 高LET放射線によるラット乳腺発がんの生物効果比 (RBE)

粒子	エネルギー	RBE	線量(Gy)	文献
Ne イオン	6.6 GeV	>5 *	0.02	(3)
Fe イオン	1 GeV	<10	0.05~0.16	(4)
中性子	430 keV	13	0.06	(5)
中性子	0.5 MeV	9-14	0.05~0.2	(6)

* 乳がんと乳腺良性腫瘍を区別せず、腫瘍の発生率をエンドポイントとした RBE。