

令和元年6月27日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19807

研究課題名(和文)重粒子線照射後におけるヒト癌細胞の浸潤、転移能についての研究

研究課題名(英文)The research of migration and invasion of cancer cells after heavy particle irradiation

研究代表者

村田 和俊(Murata, Kazutoshi)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：60644557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭素線照射はRhoシグナル経路のROCKを介して、A549における細胞遊走能や変化能を増大させている可能性がある。これらの結果は、炭素線照射後のNカドヘリンの増加、Eカドヘリンの減少、F-actin染色による癌細胞の間葉系へ形質転換が一つの原因となっている可能性が考えられた。しかし、浸潤能においては照射の影響とROCKの影響を確認することができなかった。またInVivo環境による肺転移モデルを完成させることはできたが、照射による転移能の変化とそれに対するROCK阻害剤の効果は未確認である。今後InVivo環境でROCK阻害剤が転移抑制を起こすのか、さらなる研究が必要と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療が癌細胞に刺激を与えて、浸潤する能力や転移する能力が増強する可能性について実験した。今回は炭素線によって細胞が移動しやすい間葉系という形に変化している可能性が考えられた。これらの変化はROCKと言われる蛋白質が伝えるシグナルによってコントロールされている可能性がある。次はマウスの脚に腫瘍を植えて肺に転移するモデルを作り、これを用いて本当に腫瘍が炭素線を当てると転移能が上がるか確認し、その減少にROCK阻害剤が有効か確認する。

研究成果の概要(英文)：Cell migration and conversion in A549 may be enhanced by carbon irradiation through ROCK and Rho signal pathway. And we find an increase in N Cadherin and a decrease in E Cadherin after carbon irradiation in cancer cells. Furthermore, it was confirmed that the cancer cells were transformed into the Epithelial-Mesenchymal Transition after carbon irradiation in F actin staining. However, we could not find the effects of irradiation and the effects of ROCK inhibitors in cell invasion. In addition, we were able to complete a lung metastasis model in InVivo. But, we did not confirm the effect of carbon irradiation and ROCK inhibitors on the metastatic potential. Further experiments are needed to determine whether ROCK inhibitors will suppress metastasis in the in vivo environment.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：Migration Motility Invasion Radiation Carbon ion N-Cadherin E-Cadherin

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一は悪性腫瘍である。高齢化が進む社会においてはその傾向は顕著になるものと考えられる。がん治療は手術、放射線治療、化学療法が三本柱であるが、合併症が多く、体力的に劣る高齢者にとっては侵襲の少ない放射線治療が第一選択になることも少なくない。当大学には2009年より炭素線を用いた重粒子線治療施設が稼働している。粒子線はブラッグピークと呼ばれる X 線には無い物理特性をもち、癌病巣への高度な線量集中性を可能にしているため、癌周囲の重要臓器への不必要な照射を避け、癌そのものへの投与線量を増加できるという利点がある。さらに炭素線を始めとする重粒子線は癌に対して X 線よりも優れた生物効果をもち、良好な治療成績が報告されている。(Daniela Schulz-Ertner, H. Tsujii JCO 25, no. 8, 2007)

従来より放射線による腫瘍の遊走能亢進作用、浸潤亢進作用、転移促進作用の可能性は指摘されており、実際に放射線治療後の経過において腫瘍がいびつな形態を呈し、周囲への浸潤傾向を示す、まるで放射線治療を契機に悪性度が増したような印象を受ける症例に遭遇することがある。培養細胞を用いた系では X 線照射により腫瘍細胞の遊走能や浸潤能が亢進する現象が報告されており、放射線治療後の再発や悪性転化の原因のひとつである可能性がある。しかし、炭素線照射による浸潤能亢進作用や転移促進作用に関する研究は十分にされていないのが現状である。我々は以前ヒト非小細胞肺癌細胞を用いて炭素線照射による腫瘍細胞の形態変化と遊走能の亢進を確認した。(図1)

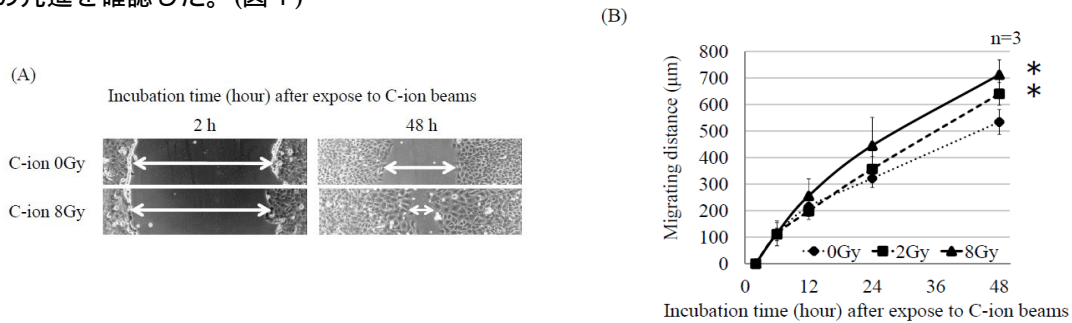


図1：ヒト非小細胞肺癌における炭素線照射後の遊走能亢進

さらに細胞骨格の形成に関わりのある Rho ファミリーの一員である ROCK の阻害剤である Y27632 で抑制することが可能であり(図2)、Western blot を用いて、ROCK の上流である RhoA の発現量の違いや、下流にあるリン酸化ミオシン軽鎖(p-MLC)の発現を確認すると、炭素線照射の影響によって p-MLC の発現が増強していることが確認され、ROCK 阻害剤である Y27632 を使用することで p-MLC の発現を抑制することができることを確認した(図3)。

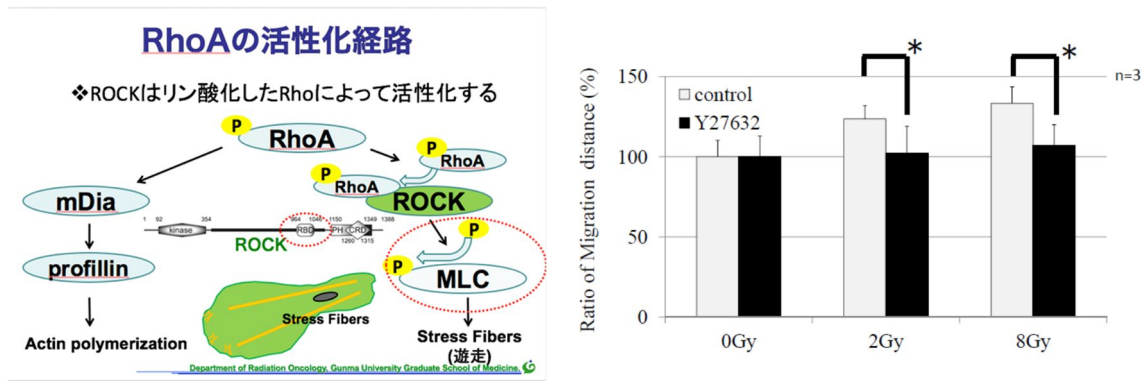


図2：Rho 活性化経路における ROCK の役割と ROCK 阻害剤による遊走能抑制

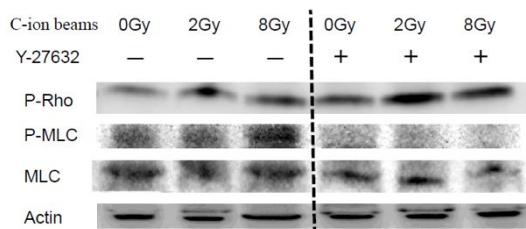


図3：炭素線照射後の p-MLC 変化

このことから ROCK 阻害剤は p-MLC を介したストレスファイバーの収縮を抑制することで細胞遊走を抑制した事が分かる。しかし、これらの報告はあくまで、2次元の In vitro 環境における遊走能について分析したものであり、生体内での腫瘍の転移能を知るためには、In vitro 環境における浸潤能の評価と in vivo 環境における転移能の評価が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、重粒子線治療による腫瘍細胞の遊走能亢進を抑制できる ROCK 阻害剤を使用して In vitro 環境での浸潤抑制効果、In vivo 環境での転移抑制効果を立証し、ROCK 阻害剤併用重粒子線治療における抗腫瘍効果と転移抑制効果を立証することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞はヒト肺腺癌細胞株 A549、マウスによる In vivo 環境では 4T1(マウス乳癌細胞)を用いた。照射には日本原子力機構高崎研究所の TIARA 加速器から得られる炭素線 (線エネルギー付与 108 keV/μm, 線量域 0~8 Gy) と群馬大学重粒子線医学研究センターの炭素線 (線エネルギー付与 50 keV/μm, 線量域 0~8 Gy) を用いた。遊走能の放射線照射による影響と ROCK との関連については、その特異的阻害薬である Y27632 を併用し、In vivo とで探索した。

方法

- ◆ 細胞株： ヒト肺腺癌細胞株 (A549) マウス乳癌細胞(4T1)
- ◆ X線照射(群馬大学)： FAXITRON RX-650, 100 kVp, 4.5 mA, 0~10 Gy
- ◆ 炭素線照射： TIARA, 18.3 MeV/amu, 108 keV/μm, 0~8Gy (日本原子力機構高崎研究所)
GHMC, 290 MeV/amu, 50 keV/μm, 0~8Gy
- ◆ ROCK阻害剤： Y-27632 30μMに希釈し細胞に24時間接触
- ◆ 実験： Boyden-Chamber assay (遊走能、変化能)
F actin assay(形態変化)
Invasion assay(浸潤能)
Western blots (遊走能関連タンパク)
- ◆ 統計解析： student's t-test ANOVA

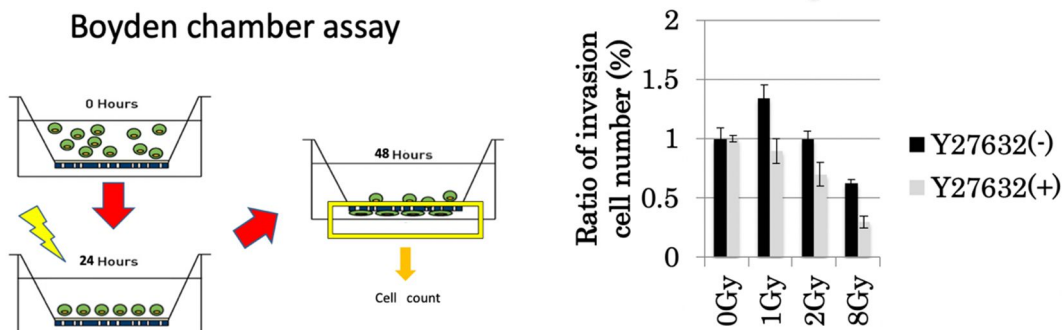
Department of Radiation Oncology, Gunma University Graduate School of Medicine, 

図：研究の材料と方法まとめ

4. 研究成果

(1) 炭素線照射による変形能・遊走能への影響

炭素線照射による遊走距離の変化を観察するために Boyden-chamber-assay を行った。炭素線 1 Gy を照射した細胞群では、非照射の細胞群と比較して、照射後 24 時間で小孔を通過した細胞数が優位に増加し炭素線が遊走能と細胞の変形能を増強する事が示唆された。一方で高線量を投与するとむしろ小孔を通過する細胞数は減少している。さらに重粒子を照射した細胞群において高線量を ROCK 阻害剤を併用すると照射した細胞群では小孔を通過した細胞数が優位に減少し、やはり ROCK 阻害剤が照射によって亢進した遊走能や変形能を抑制することが示唆された。

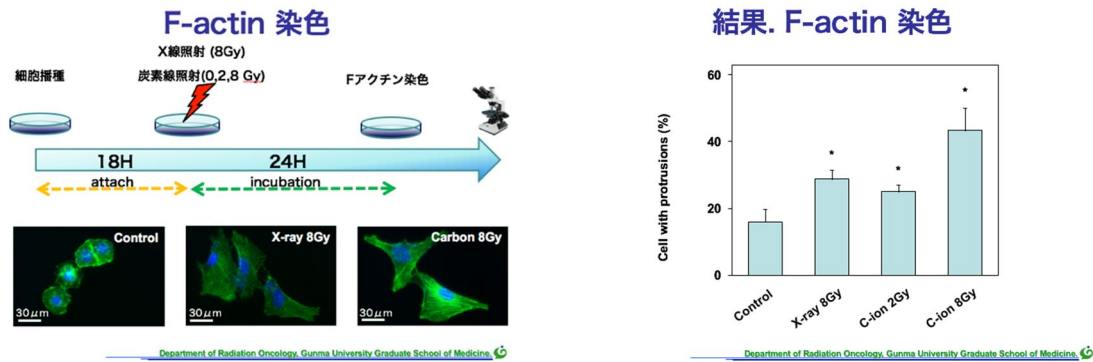


図：Boyden-chamber-assay

(横軸が照射線量、縦軸は小孔を通過した細胞数の割合を示す。炭素線照射後 24 時間における非照射群かつ ROCK 阻害剤非併用群を 1 とした比率で表示している。この実験では A549 が炭素線 1 Gy 照射群において、非照射群に比較して有意に小孔を通過した細胞数が増加した。しかし、2 Gy 以上の線量では細胞数の増加は認められずむしろ低下していた。照射群では ROCK 阻害剤によって小孔の通過細胞数はそれぞれ優位に減少しており、遊走能の低下が影響しているものと考えられる)

(2) 炭素線照射による細胞骨格の変化

細胞骨格への影響を観察するため、F アクチン染色を施行すると、炭素線非照射群と比較して炭素線(2 Gy または 8 Gy)を照射した細胞群では細胞遊走時に見られる細胞骨格変化の一つである突起形成の出現率が有意に高く、この結果から細胞形態学的にも炭素線照射が遊走能を亢進させることが示唆された。

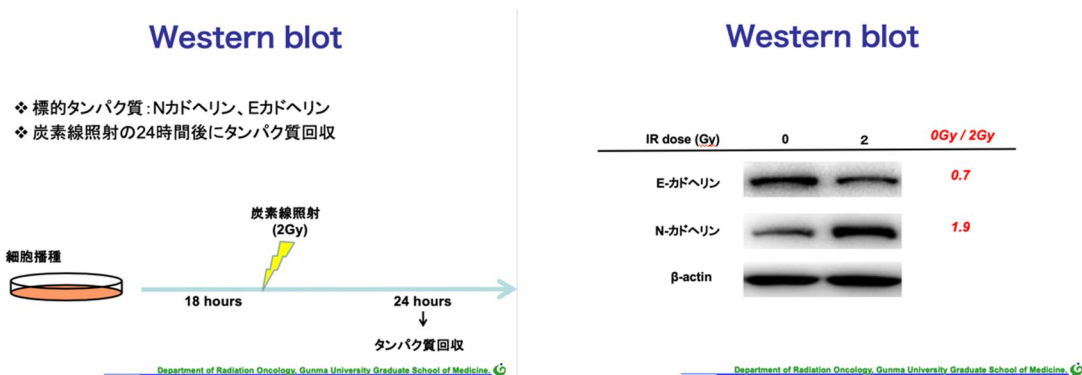


図：F アクチン染色

(横軸が照射後の時間経過、縦軸が生残率を示す。炭素線照射後24時間の吸光度を1とした比率で表示している。が非照射群、炭素線2 Gy照射群、炭素線8 Gy照射群の結果を示している。この実験ではA549が炭素線照射後から72時間以降において、非照射群に比較して有意に増殖能が低下した。そのため、増殖能による影響を最小にするため、遊走能に関する実験は炭素線照射から48時間以内の現象について検討した。)

ここで、細胞骨格の変化におけるカドヘリンという蛋白質に着目した。カドヘリンは細胞接着において機能する細胞間接着分子である。膜貫通領域に隣接する部位にはP120-カテニンが結合し、接着能の制御やRhoファミリーなどの低分子Gタンパク質の活性化などのシグナル分子として働く。C末端側にはβ-カテニンやγ-カテニンが結合し、さらにE-カテニンが結合してアクチン系細胞骨格へとつながる。β-カテニンはWntシグナル伝達系の腫瘍構成因子として知られ、核内の転写調節因子としても機能している。一般に上皮はE-カドヘリンを発現しているのに対して、間葉系細胞はN-カドヘリンを発現している。間葉系細胞は上皮細胞に比して、極性に乏しく高い遊走能をもつ。器官発生過程などで、E-カドヘリンを発現する上皮細胞からN-カドヘリンを発現する細胞群が出現し、細胞集団の分離、遊走が起こることがわかり、これをカドヘリンスイッチングと呼んでいる。

そこでA549における炭素線照射後の細胞骨格変化におけるEカドヘリンとNカドヘリンの変化をウェスタンブロットにより調べた。ウェスタンブロットでは炭素線照射2 Gy後におけるEカドヘリンとNカドヘリンの発現について観察した。A549においてEカドヘリンの発現は減少し、Nカドヘリンの発現は増加していた。これは炭素線によって細胞が間葉系に形質転換していることを支持する結果となった。

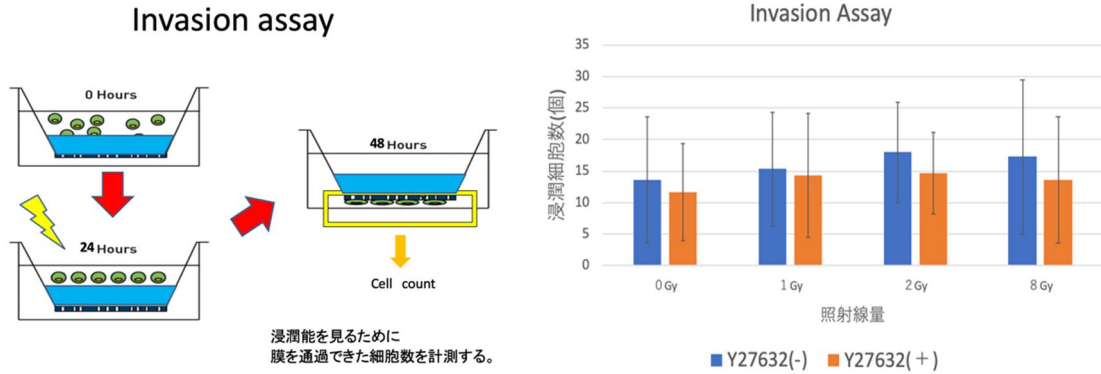


図：ウェスタンブロット

(EカドヘリンとNカドヘリン、それぞれにおける2 Gyのバンドの黒化度を0 Gyのバンドの黒化度で割り画像解析した。また、算出された値の未処置群を相対値1として評価した。Eカドヘリンは炭素線照射によって減少しNカドヘリンは炭素線照射によって増強されることが確認された。これらの結果は炭素線照射がA549の細胞間質を間葉系へ変換している可能性を示している。)

(3) 炭素線照射による浸潤能への影響

さらに炭素線照射による癌細胞の細胞間室内への浸潤能の変化を観察するために Boyden-chamber に Matrigel を装着した実験装置で Invasion-assay を行った。Invasion-assay では炭素線による明らかな浸潤能の亢進を認めなかった。また ROCK 阻害剤を用いてもその浸潤能に変化は見られなかった。しかし、今回の実験では浸潤した後に小孔を通過することができた細胞数の数が少なく、バラツキの大きなデータとなっている。さらに実験の条件を検討する必要があると考えられた。

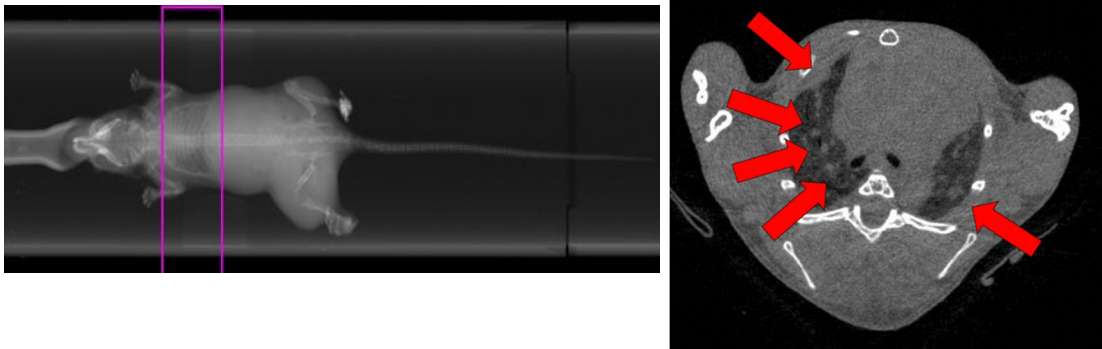


図：Invasion-assay

(横軸が照射線量、縦軸は小孔と Matrigel を通過した細胞数を示す。Matrigel を通過できる細胞数が少ないため環境に依存するのか、小孔と Matrigel を通過する細胞数にばらつきが大きいため、照射による浸潤能の変化や ROCK 阻害剤による明らかな浸潤能への影響は確認できなかった。)

(4) In vivo 環境における転移性肺腫瘍モデルの確立

In vivo 環境における転移性肺腫瘍モデル In vivo における動物実験用の CT を使用した転移評価モデルの確立を試みた。実験はマウス：BALB/cJ メス 6-8 週齢と移植細胞：4T1 (マウス乳がん細胞) を用いて、 1×10^6 cells/匹、下腿皮下に移植し、移植後 20 日以降、肺転移出現を確認することができた。今後は他の腫瘍株での転移形成能の評価と原病に対する放射線照射の有無による転移病巣の変化を確認し、In vitro で効果のあった ROCK 阻害剤の投与が転移抑制効果を認めるのか確認が必要である。



図：In vivo 環境における転移性肺腫瘍モデル

(マウス：BALB/cJ メス 6-8 週齢と移植細胞：4T1 (マウス乳がん細胞) を用いて、 1×10^6 cells/匹、下腿皮下に移植し、移植後 20 日以降、肺転移出現を確認することができた。CT 画像では両側の肺野に複数の転移性腫瘍を確認することができる。)

以上の結果より、炭素線照射は Rho シグナル経路の ROCK を介して、A549 における細胞遊走能と変化能を増大させている可能性がある。さらにこれは照射による細胞の間葉系への形質転換が原因の可能性が考えられた。しかし、浸潤能においては照射の影響と ROCK の影響を確認することができなかった。また InVivo 環境による肺転移モデルを完成させたため、マウスを用いて ROCK 阻害剤が転移抑制を起こすのか、今後のさらなる研究が必要とされる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Ohno T, Noda SE, Okonogi N, Murata K, Shibuya K, Kiyohara H, Tamaki T, Ando K, Oike T, Ohkubo Y, Wakatsuki M, Saitoh JI, Nakano T, In-room computed tomography- based

brachytherapy for uterine cervical cancer: results of a 5-year retrospective study, Journal of Radiation Research 2016. doi: 10.1093/jrr/rrw121

T. Oike, A Niimi, N. Okonogi, K. Murata, A. Matsumura, S. Noda, D. Kobayashi, M. Iwanaga, K. Tsuchida, T. Kanai, T. Ohno, A. Shibata & T. Nakano, Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy, Scientific Reports 2016 Mar 1;6:22275.

Tatsuya Ohno, Shin-ei Noda, Kazutoshi Murata, Yuya Yoshimoto, Noriyuki Okonogi, Ken Ando, Tomoaki Tamaki, Shingo Kato, Takashi Hirakawa, Tatsuya Kanuma, Takashi Minegishi, Takashi Nakano, and on behalf of the Working Group for Gynecologic CancerPhase I Study of Carbon Ion Radiotherapy and Image-Guided Brachytherapy for Locally Advanced Cervical Cancer, Cancers 10(9):338 September 2018 DOI:10.3390

〔学会発表〕(計 3 件)

1.子宮頸癌に対する 3D-IGBT 最適な小線源治療法の選択を目指して 難治症例へのアプローチ HBT の適応、シンポジウム(シンポジスト) 村田和俊、第 20 回小線源治療部会、つくば国際会議場、2018/06/22、国内

2.A retrospective study of shrinking field radiation therapy plus image-guided brachytherapy in stage I-II non-bulky cervical squamous cancer (≤4cm). 口演 Y. Yoshimoto, K. Murata, D. Kobayashi T. Matsui, S.E. Noda, T. Ohno, T. Nakano. FARO 2018 Bali Nusa Dua Convention Center 2018/9/6 海外

3.A retrospective study of Modified pervis field radiation therapy plus image-guided brachytherapy in stage I-II non-bulky cervical squamous cancer (≤4cm).口演 K. Murata, Y. Yoshimoto, D. Kobayashi,T. Matsui,S.E. Noda, T. Ohno, T. Nakano. IGSC2018 国立京都国際会館 2018/9/14 海外

〔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 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村田 和俊

ローマ字氏名：MURATA, Kazutoshi

所属研究機関名：群馬大学

部局名：重粒子医学推進機構

職名：助教

研究者番号(8桁): 60644557

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。