

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390320

研究課題名 (和文) 放射線によるがんの浸潤・転移・血管新生能への影響

研究課題名 (英文) Radiation Effect on Invasion, Metastatic and Angiogenesis Potential of Cancer

研究代表者

手島 昭樹 (TESHIMA TERUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40136049

研究成果の概要 (和文) : X 線と比較し、炭素イオン線を照射された腫瘍細胞株のがん転移に関わる浸潤・遊走能は、低線量で抑制されることを明らかにした。さらに、炭素イオン線が照射された細胞は、転移関連タンパク質である anillin の発現量が低下し、細胞の骨格に関わるタンパク質である Rho A の活性が減少していることを明らかにし、これらの分子が、がん転移抑制に関わる可能性が示唆された。また、微小管重合阻害薬 TZT-1027 を投与し、X 線照射を併用すると、各々単独に投与するより、がん転移に関わる血管新生能を抑制した。

研究成果の概要 (英文) : Carbon ion beams suppressed the potential of invasion and migration of tumor cell lines more significantly than X-ray. Furthermore, the expression of anillin and the activation of RhoA were decreased on these cells. Thus, carbon ion beams irradiation suppressed the invasion and migration of cancer cells via decreasing expression of anillin and inactivation of RhoA. The combination with an antimicrotubule agent TZT-1027 and X-ray irradiation showed synergistic effects of anti-angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：がん、転移浸潤、血管新生、X 線、炭素イオン線、腫瘍血管標的薬、タンパク質遺伝子

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は 3 次元放射線治療 (3D-CRT)、強度変調放射線治療 (IMRT) や定位放射線治療 (SRT) 等により、腫瘍に限局した高線量の治療が可能となり、物理分野において体内標的体積 (ITV) を縮小し、臨床的腫瘍体積 (CTV) に近接した照射野設定を目指す研究が行われている。しかし、

照射野をより縮小するための安全域設定について、生物的根拠は乏しく経験則に基づいている状況であった。我々は、特に照射野辺縁部で想定される亜致死線量照射により、がんの浸潤・転移能と血管新生能が亢進する危険性を、細胞機能、タンパク発現量の変動で証明してきた。

2. 研究の目的

浸潤・転移・血管新生のメカニズムを遺伝子、タンパクレベルで解明し、より臨床に近似させた条件での照射野の設定のための新たな生物学的指標を定量的に提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 照射野辺縁モデル細胞の機能評価

ヒト線維肉腫細胞株 (HT-1080) を用いた。4MV X 線 (0.25、0.5、2Gy) を照射し、浸潤能を Matrigel invasion assay、遊走能を Boyden chamber assay により評価した。さらに、Matrix Metalloprotease -2、-9 (MMP-2、-9) のタンパク発現量を Gelatin zymography により評価した。

(2) 種々のがん細胞の細胞機能および転移関連遺伝子・タンパク発現量分析

①肺腺癌における転移関連分子に対する放射線照射の影響：ヒト肺腺癌細胞株 (A549) を用いた。X 線 (0.5、2、10Gy)、炭素イオン線 (0.25、1、5Gy) 照射 24 時間後の anillin の mRNA 量を RT-PCR により評価し、細胞内局在を蛍光免疫染色で観察した。PI3K/Akt 経路の活性について放射線照射後の変化を Western blotting で評価した。

②神経膠芽腫における低酸素誘導性浸潤能に対する放射線の影響：ヒト神経膠芽腫細胞株 (T98G、A172) を用いた。正常酸素濃度下、低酸素濃度下の各細胞において、X 線 (0.5、2、8 Gy)、炭素イオン線 (0.25、1、4Gy) 照射 24 時間後に Matrigel invasion assay、Boyden chamber assay を行った。活性型 RhoA のタンパク発現量については Rho pull down assay により評価した。C3 を用いて Rho シグナルを阻害し、浸潤・遊走能を評価した。

③膀胱癌細胞の転移能および活性型 RhoA に対する放射線の影響：ヒト膀胱癌細胞株 (AsPC-1) を用いた。実験に使用する線量を、X 線 (2、4、6、8、10Gy)、炭素イオン線 (1、2、3、4、5Gy) 照射直後に Colony formation assay を行い、細胞生存率を評価した。X 線 (0.5、2、8 Gy)、炭素イオン線 (0.2、0.8、3.2Gy) 照射 24 時間後に Boyden chamber assay、Rho pull down assay を行った。

④乳癌細胞の転移能および integrin-linked kinase (ILK) 発現に対する放射線の影響：ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231) を用いた。X 線 (2、8Gy) を照射し、Colony formation assay を行った。亜致死線量 X 線

(2Gy) 照射 24 時間後に Matrigel invasion assay、Boyden chamber assay を行った。X 線 (2、8Gy) 照射 24 時間後に ILK のタンパク発現量および、Akt のリン酸化を Western blotting により評価した。

⑤血管新生に対する放射線の影響：血管内皮細胞の性質を持つヒト膀胱癌由来の細胞株 (ECV304) を用いた。X 線 (0.5、2、8Gy)、炭素イオン線 (0.25、1、4Gy) 照射 24 時間後に、運動能を Wound assay、接着能を Cell adhesion assay、管腔形成能を Matrigel tube formation assay により評価した。integrin 発現量を Flow Cytometry により評価した。

(3) 血管新生抑制剤 TZT-1027 との併用効果

ECV304 を用いた。投与する TZT-1027 の最適濃度を決定するため、増殖能・細胞毒性を WST assay により評価した。薬剤投与 12 時間後、X 線 (2、4Gy)、炭素イオン線 (1、2Gy) を照射した。照射 24 時間後に Matrigel invasion assay、Boyden chamber assay、Matrigel tube formation assay を行った。照射 12 時間後に薬剤を投与し、同様の実験を行った。

マウスの右足大腿部皮下にマウス骨肉腫細胞株 (LM8) を接種し、7 日後に X 線 (20Gy)、炭素イオン線 (10Gy) を照射した。TZT-1027 を照射直前または直後に尾静脈注射 (1 mg/kg) を行った。腫瘍体積を測定し、照射 3 週間後にホルマリン固定標本後、肺転移結節数により転移能を評価した。

4. 研究成果

(1) 照射野辺縁モデル細胞の機能評価

0.5、2Gy 照射により浸潤能は有意に亢進した (Fig. 1a)。また、遊走能も有意に亢進した (data not shown)。0.5、2Gy 照射により MMP-9 の発現量が増加した (Fig. 1b)。

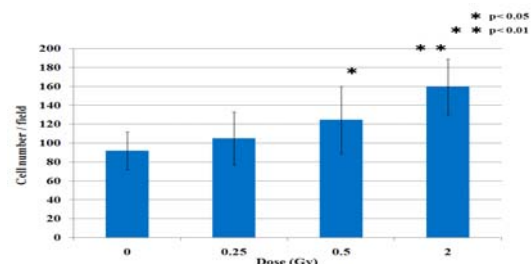


Fig. 1a HT-1080 の浸潤能

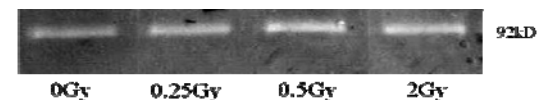


Fig. 1b HT-1080 の MMP-9 の発現量

(2) 種々のがん細胞の細胞機能および転移関連遺伝子・タンパク発現量分析

①肺腺癌における転移関連分子に対する放射線照射の影響: anillin の mRNA 発現は、炭素イオン線照射後のみ抑制する結果を得た (data not shown)。anillin のタンパク発現は、X 線 10Gy、炭素イオン線 5Gy 照射後に抑制された (Fig. 2a)。anillin の細胞内局在は X 線では活性化を示す核への集積が 2Gy 照射まで認められ、炭素イオン線では不活化を示す細胞質への拡散が 0.25Gy 照射において認められた (Fig. 2b)。Akt のリン酸化は、炭素イオン線照射 4 時間後から 24 時間後にかけて、いずれの線量においても抑制された。一方 X 線において、0.5Gy 照射 30 分後にリン酸化が亢進し、24 時間後まで高発現が持続した。10Gy 照射 24 時間後にやや抑制された。炭素イオン線、X 線照射後ともに、total Akt の発現量に変化はなかった (Fig. 2c, 2d)。

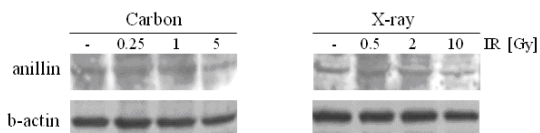


Fig. 2a A549 の anillin の発現量

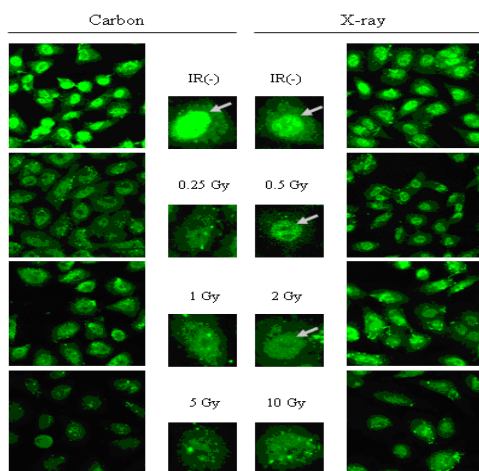


Fig. 2b A549 の anillin の細胞内局在

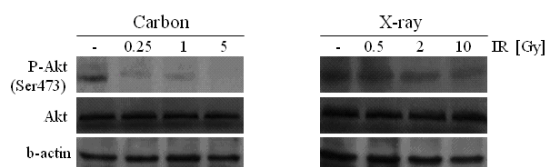


Fig. 2c A549 のリン酸化 Akt の発現量

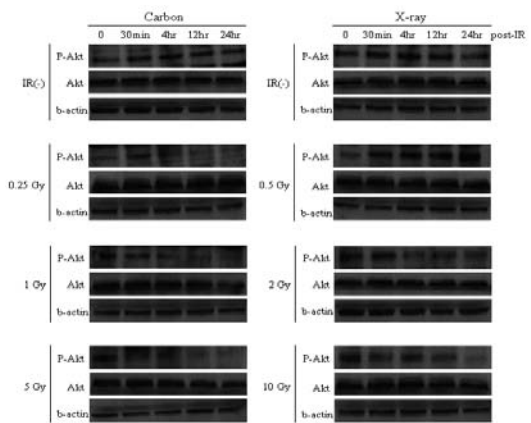


Fig. 2d A549 のリン酸化 Akt の発現量の経時的変化

②神経膠芽腫における低酸素誘導性浸潤能に対する放射線の影響: 低酸素濃度下で浸潤能は亢進した。低酸素濃度下での亢進に対し、炭素イオン線は抑制効果を示した (Fig. 2e)。遊走能も同様の傾向を示した (data not shown)。X 線 0.5Gy 照射により活性化型 RhoA の発現が増加した。炭素イオン線 1、4Gy 照射により減少した (Fig. 2f)。RhoA 活性化の阻害により浸潤能、遊走能が抑制された (data not shown)。

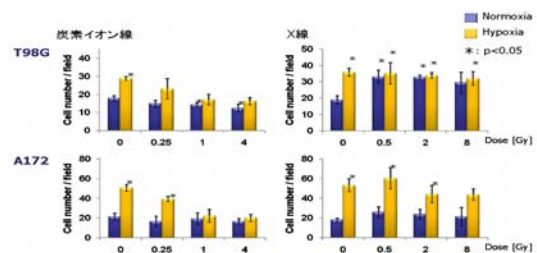


Fig. 2e T98G、A172 の浸潤能

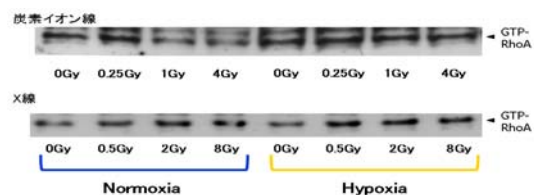


Fig. 2f T98G の活性化型 RhoA の発現量

③膵癌細胞の転移能および活性化型 RhoA に対する放射線の影響: 得られた生存率曲線より RBE を 2.5 とし炭素イオン線の線量を 0.2、0.8、3.2Gy と決定した (data not shown)。X 線 0.5Gy 照射で遊走能の亢進、2Gy 照射で抑制が見られたが、いずれも有意な変化でなかった。一方、8Gy 照射で有意に抑制され、炭素イオン線照射では線量依存的に抑制された (Fig. 2g)。X 線 0.5、2Gy 照射で活性化型 RhoA の発現

量増加が見られた。一方、8Gy 照射で発現量は低下した。炭素イオン線照射では線量依存的に発現量が低下した (Fig. 2h)。

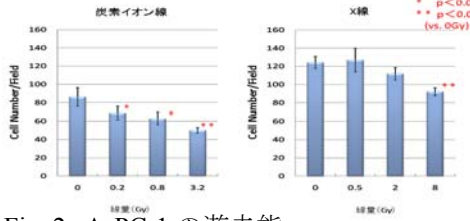


Fig. 2g AsPC-1 の遊走能

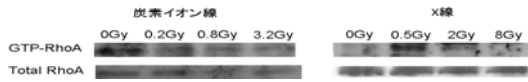


Fig. 2h AsPC-1 の活性化型 RhoA の発現量

④乳癌細胞の転移能および integrin-linked kinase (ILK) 発現に対する放射線の影響：2Gy 照射で 81.8%生存し、2Gy を亜致死線量と決定した (data not shown)。亜致死線量照射において、浸潤能に変化はみられなかったが (data not shown)、遊走能は有意に抑制した (Fig. 2i)。2Gy 照射において ILK 発現量および Akt のリン酸化が増加し、8Gy 照射において低下した (Fig. 2j、2k)。

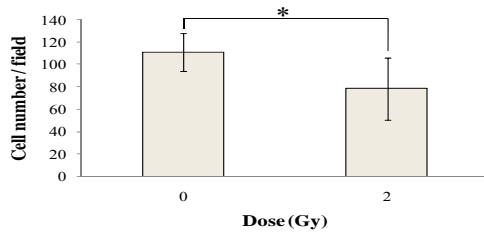


Fig. 2i MDA-MB-231 の遊走能

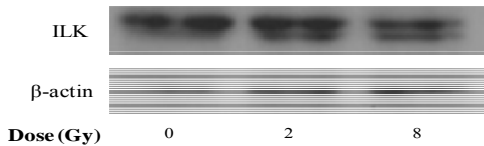


Fig. 2j MDA-MB-231 の ILK の発現量

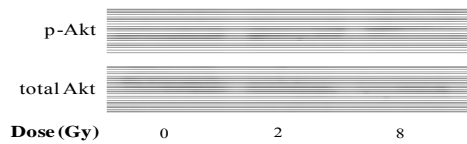


Fig. 2k MDA-MB-231 のリン酸化 Akt の発現量

⑤血管新生に対する放射線の影響：X 線照射では8Gy照射で運動能の抑制が見られ、炭素イオン線照射では線量依存的に抑制された (Fig. 2l)。接着能は、X 線・炭素イオン線照射において線量依存的に亢進した (Fig. 2m)。管腔形成能は、X 線照射

では8Gy照射で、炭素イオン線照射では1、4Gy照射で有意な抑制がみられた (Fig. 2n)。X線照射24時間後の integrin $\alpha 6$ の mRNA 発現量が線量依存的に増加した (data not shown)。X線では8Gy照射、炭素イオン線では4Gy照射で $\alpha 6$ のタンパク発現量が増加した (Fig. 2o)。ヘテロダイマーを形成する $\beta 1$ についても同様の結果を示した (data not shown)。

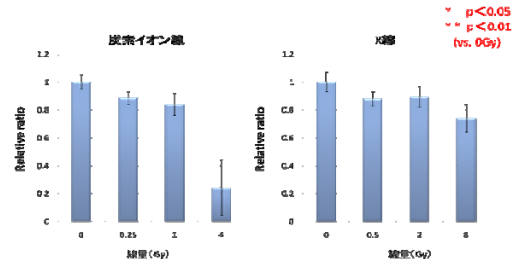


Fig. 2l ECV304 の運動能

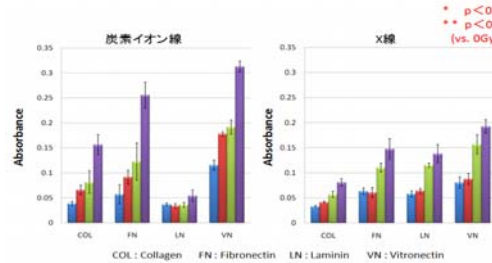


Fig. 2m ECV304 の接着能

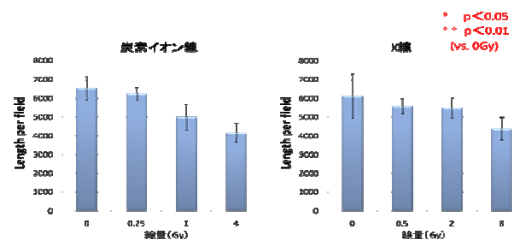


Fig. 2n ECV304 の管腔形成能

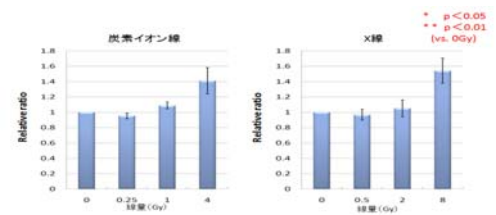


Fig. 2o ECV304 のインテグリン $\alpha 6$ の発現量

(3) 血管新生抑制剤 TZT-1027 との併用効果 *in vitro* において、TZT-1027 非投与群と比較して、薬剤 0.1 ng/mL 投与では、増殖能に有意差はなかったが、薬剤 0.2 ng/mL 投与では、有意に抑制された。よって、投与する TZT-1027 の濃度は 0.1、0.2 ng/mL と決定した (data not shown)。浸潤能と遊走能は、0.2 ng/mL 投与群において、共に

有意に抑制され、さらに X 線の併用により、線量依存的に抑制された。一方、0.1 ng/mL 投与では、共に有意な抑制がみられなかったが、X 線を併用すると有意に抑制され、管腔形成能も有意に抑制された。しかし、照射後に薬剤を投与しても相乗効果は得られなかった。炭素イオン線を用いた実験は、0.1 ng/mL を TZZ-1027 投与群として検討し、X 線と同様の結果を得た。また、薬剤を照射後に投与しても有意な抑制が得られた (Fig. 3a)。

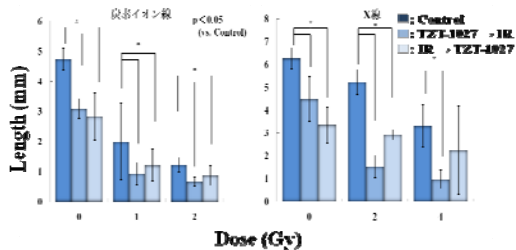


Fig. 3a ECV304 の管腔形成能

in vivo において、腫瘍体積の増殖は X 線単独照射群で有意に抑制され、併用により、さらに有意な抑制を示された。肺転移結節数においても併用により有意に減少した。炭素イオン線を用いた実験は、併用しても単独照射群と大きな腫瘍体積の違いは認めず、薬剤の投与タイミングによっても違いはなかった。肺転移結節数は、単独照射群で、有意な転移能抑制効果を認めた。一方、薬剤を併用しても照射単独群と比較して有意な差を認めなかったが、照射後に併用した群で転移能の抑制傾向がみられた (Fig. 3b, 3c)。

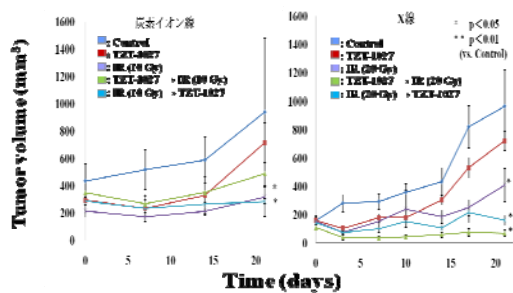


Fig. 3b 腫瘍体積の変化

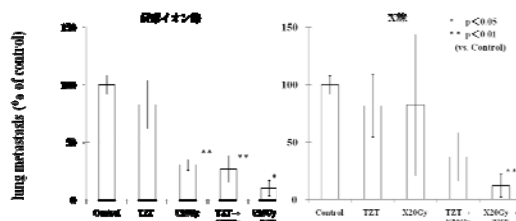


Fig. 3c 肺転移結節数

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 45 件)

①Nishikino M., Sato K., Teshima T. (他 7 名、9 番目) Application of laser produced plasma K α x-ray probe in radiation biology (査読有)
Rev. Sci. Instrum. 81:0261071-3, 2010

②Akino Y., Teshima T., Matsuura N. (他 5 名、2 番目、8 番目) Carbon-ion beam irradiation effectively suppresses carbon migration and invasion of human non-small lung cancer cells (査読有)
Int. J. Rad. Oncol. Bio. Phys. 75:475-481, 2009.

③尾方俊至、手島昭樹、松浦成昭 (他 2 名、2 番目、5 番目) 光子線と重粒子線によるがんの転移過程と血管新生に及ぼす影響 (査読無) 特集 (重粒子線治療生物学の進展): 総説放射線生物研究 44:199-207, 2009.

④Makino T., Matsuura N. (他 9 名、9 番目) Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. (査読有)
Ann Surg. Oncol. 16: 2058-2064, 2009.

⑤Ezumi K., Matsuura N. (他 13 名、13 番目) Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. (査読有)
Clin. Cancer Res. 14: 677-684, 2008.

⑥Tsujiimoto M., Matsuura N. (他 21 名、22 番目) One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. (査読有)
Clin Cancer Res. 13: 4807-4816, 2007.

[学会発表] (計 32 件)

①佐藤克俊、手島昭樹、他
レーザー励起単色 X 線マイクロビーム照射装置の開発と DNA 二本鎖切断の同定
レーザー励起 X 線源とその応用研究会、赤穂、2009 年 12 月 7 日

②佐藤克俊、手島昭樹、他
レーザープラズマ X 線を用いたマイクロビーム照射装置の開発とがん細胞における DNA 二本鎖切断の同定
第 52 回放射線影響学会、広島、2009 年 11 月 13 日

③佐藤克俊、手島昭樹、他
超短パルスレーザー駆動量子ビームによ

る DNA 二本鎖切断の誘発
第 293 回 日本医学放射線学会関西地方会、
大阪、2009 年 10 月 17 日

④手島昭樹、稲岡美穂、他
重粒子線照射によるがんの転移と血管新
生抑制機序の解明
平成 20 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表
会、千葉、2009 年 4 月 13 日

⑤尾方俊至、手島昭樹、他
光子線と重粒子線によるがんの転移過程
と血管新生に及ぼす影響
日本放射線影響学会 第 51 回大会 若手放
射線生物学研究会主催ワークショップ、
小倉、2008 年 11 月 21 日

⑥稲岡美穂、手島昭樹、他
肺癌細胞における転移能とその関連分子
に与える放射線照射の影響
第 289 回日本医学放射線学会関西地方会、
大阪、2008 年 6 月 28 日

⑦佐藤克俊、手島昭樹、他
繰り返し放射線照射を受け放射線抵抗性
を得たがん細胞における p53 発現の減衰と
Cellular Senescence の誘発
第 47 回日本医学放射線学会生物部学術大
会、高知、2008 年 6 月 21 日

⑧手島昭樹、秋野祐一、他
重粒子線照射によるがんの転移と血管新
生抑制機序の解明
平成 19 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表
会、千葉、2008 年 4 月 14 日

⑨Teshima T., Akino Y., et al.
Radiation therapy and Metastasis.
National Institute of Radiological Sciences
International Workshop
Particle Radiation Science
Chiba, 2008. 3.26

⑩秋野祐一、手島昭樹、他
神経膠芽腫細胞の浸潤能に対する炭素イ
オン線の影響
第 10 回癌治療増感研究シンポジウム、
奈良、2008 年 2 月 10 日

⑪佐藤克俊、手島昭樹、他
放射光のがん治療応用のための基礎研究。
Cancer Therapy Application with Synchrotron
Radiation.
平成 19 年度 SPring-8 メディカルバイオト
ライアルユース成果報告会、
たつの、2008 年 1 月 31 日

⑫Sato K., Teshima T., et al.
Development of the Laser Plasma X-ray
Microbeam Irradiation System and Biological
Effect of Short Pulse X-ray.
8th International Workshop on Microbeam
Probes of Cellular Radiation Response,
Chiba, 2007. 11.13

⑬Akino Y., Teshima T., et al.
Mechanism of metastasis and angiogenesis
inhibition by particle irradiation.
The 5th Japan-US Cancer Therapy Symposium,
Sendai, 2007. 9.8

⑭手島昭樹、秋野祐一、他
重粒子線照射によるがんの転移と血管新
生抑制機序の解明
平成 18 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表
会、千葉、2007 年 4 月 9 日

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称：放射線照射試料用シャーレ及び放射
線照射方法

発明者：錦野将元、佐藤克俊、河内哲哉、
余語覚文、手島昭樹、沼崎穂高、
西村博明、岡野泰彬、大島慎介
権利者：独立行政法人日本原子力研究開発
機構

種類：特願
番号：2009-220831
出願年月日：2009 年 9 月 25 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ
<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~rad-onc/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
手島 昭樹 (TESHIMA TERUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40136049

(2)研究分担者
松浦 成昭 (MATSUURA NARIAKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190402

(3)連携研究者
なし