

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791166

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍細胞の高浸潤・増殖能に対する X 線と粒子線の影響とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms and effects of X-ray and particle beam for invasiveness in glioblastoma cell

研究代表者

吉田 由香里（YOSHIDA YUKARI）

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：90431717

研究成果の概要（和文）：ヒト神経膠芽腫細胞株を用いて X 線もしくは炭素線を単回照射し、照射後 24 時間における細胞の遊走性について評価した結果、X 線および炭素イオン線は神経膠芽腫細胞の遊走性を亢進することが明らかとなった。この照射による遊走性の亢進にはグルタミン酸および cadherin が関与していること、またグルタミン酸受容体拮抗薬は放射線治療において有用な遊走阻害剤となる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Human glioblastoma cell lines were irradiated with X-rays or carbon ion beams. Not only X-rays but carbon ion beams increased cell motility at 24 hours after irradiation. Blockage of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptor suppressed migration in glioblastoma cells. Expression of E- and N-cadherin proteins was changed by irradiation and glutamate receptor antagonist. These results suggest that glutamate and cadherin might play a role in facilitation of glioblastoma cell motility by irradiation. And also, glutamate receptor antagonist may be useful inhibitor for cell migration in radiation therapy of glioblastoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：遊走、重粒子線、悪性脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は、現在行われている集学的治療法（手術＋X線＋抗がん剤）で生存率が10%以下という、非常に予後不良な疾患である。近年、新規抗がん剤・テモダールが最も予後が良く、標準的治療法として急速に普及しつ

つあるものの、予後を劇的に改善するほどの効果は無く、早急に新たな治療法の確立が求められている。群馬大学では、従来の放射線に抵抗性の難治性腫瘍の治療法確立のため、2010年3月から重粒子線（炭素イオン線）治療を開始した。低LET放射線のX線のような

従来の放射線に対して非常に抵抗性である悪性脳腫瘍は、高LETである炭素イオン線の高い殺細胞効果に大きな期待が寄せられている。しかしながら、現在までに報告された臨床研究においては、悪性脳腫瘍に対する粒子線治療は線量増加により照射範囲内は制御される可能性があるものの、その外側に早期に再発してしまい（言い換えると、腫瘍局所に対する制御効果は十分であるが、腫瘍が照射野外に広がるため外側に再発する）、いまだ十分な効果を期待するに至っていない。放射線治療についての臨床的な検討が進むにつれて、改めてその有効性をより確実なものとし、また、より高めるための方策が求められてきている。この現状を克服するためには、腫瘍細胞・組織の放射線にたいする生物学的効果をしっかりと明らかにすることが急務と考えられる。

当該研究代表者らによって行われた実験によれば、X線や多種類の粒子線（炭素イオン線、ネオンイオン線、アルゴンイオン線）を用いて腫瘍細胞に対して単回照射を行うと、放射線の照射が、逆に、腫瘍細胞の遊走性を亢進させるという現象が確認されている [Ishuchi, S, Yoshida Y, *et al.* The Fourth Takasaki Advanced Radiation Research Symposium, 140, 2009]。また、文献的には低線量の放射線（X線で 1~3 Gy）がラットの腫瘍細胞の遊走と浸潤を亢進すること [Wild-Bode-C, *et al.* Cancer Research 61, 2744-2750, 2001]、マウスLM8 osteosarcoma細胞では、X線を照射した細胞では腹腔内接種した腫瘍細胞の肺転移が促進され、炭素イオン線を照射した細胞では肺転移が減じると報告されている [Ogata T, *et al.* Cancer Research 65, 133-120, 2005]。しかしながら、X線や粒子線が細胞の遊走性にどのような生物学的効果をもたらすか詳細に解析した報告は見当たらないのが実情である。

本研究は、悪性脳腫瘍の根治的治療法の確立を目指すべく、照射により残存する腫瘍細胞の遊走性の影響について解析し、そのメカニズムについて解明することである。本研究課題で提案した研究により、X線および粒子線照射による腫瘍細胞における遊走性の変化およびその分子機構について明らかになり、このことが放射線治療の改良や化学療法の開発に有効となる成果が期待できると検討した経緯のもと、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍は高い増殖性と遊走性という特徴を持っており、脳内を浸潤性に広がるため治療が困難である。本研究では、放射線治療が腫瘍の遊走性にどのような生物学的効

果をもたらすのかを詳細に調べるために次の項目を目的として実験をおこなった。

- (1) X線および炭素イオン線の神経膠芽腫細胞に対する殺細胞効果を明らかにする。
- (2) 神経膠芽腫細胞のX線および炭素イオン線照射による遊走性の変化について定性的・定量的に評価する。
- (3) 神経膠芽腫細胞の生存維持に重要であり放射線治療の予後因子となり得るとされている分子の発現について免疫組織化学的に解析し、腫瘍細胞の遊走性との関与について検討する。
- (4) 照射と薬剤との併用による遊走性の変化について調べる。

3. 研究の方法

(1) 材料

ヒト神経膠芽腫細胞 (U87MG, CGNH-PM, U251) を用いた。細胞は 10%ウシ胎児血清、ペニシリン 100IU/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を含有する MEM 培地中で 5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

(2) 照射

X線は群馬大学における島津 TAITAN-225 (200 kVp, 14.6 mA) を用いた。炭素イオン線は放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置 HIMAC および群馬大学の重粒子線治療施設における炭素線 290 MeV/n、mono ビーム (LET 70 KeV/µm) を用いた。

(3) コロニー形成法による殺細胞効果の解析

対数増殖期の細胞を回収し、25cm² フラスコに播種した。24 時間後に 1~7 Gy の X 線および 0.5~5 Gy の炭素イオン線を照射した。照射した細胞は再びインキュベータに戻し、10 日間 (U87MG) もしくは 14 日間 (CGNH-PM, U251) コロニーを形成させた。形成したコロニーをエタノールで固定後、ギムザ溶液で染色した。50 個以上の細胞集団を 1 つのコロニーとしてカウントし、細胞生残率を求めた。細胞生残率を 10% に低下させる物理線量 (D10 線量) を X 線と炭素イオン線それぞれについて求め、以下の式により相対的生物学的効果比 (RBE: Relative Biological Effectiveness) を求めた。

$$RBE = D10 (X \text{ 線}) / D10 (\text{炭素イオン線})$$

Temozolomide および α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体拮抗薬 (GYKI52466) は照射 1 時間前に接触を開始し、照射後も接触させたまま培養した。

(4) 遊走能の解析

Wound-healing 法を用いて照射後 24 時間における細胞の遊走能の変化について評価した。解析は、照射 24 時間後に細胞を固定後ギムザ溶液で染色し、Wound の幅を測定してそれぞれを比較した。また、4%パラホルムアルデヒドで固定した標本について免疫染色

(E-cadherin, N-cadherin) を行い、それぞれの蛍光強度を比較した。

(5) *in vivo* 実験による解析

① 殺細胞効果の解析

ヌードマウスの後肢にヒト神経膠芽腫細胞を皮下移植した。腫瘍が 7~8 mm に成長したマウスの後肢に対して、X線もしくは炭素イオン線を照射した。照射後は継時的に腫瘍の3辺を計測し、推定腫瘍体積(V)を $V = L \times W \times H \times 3.14/6$ (L: 長径 mm, W: 短径 mm, H: 高さ mm) として算出し、体積が5倍になるまでに必要な日数を指標として腫瘍増殖遅延時間を求め、各処置における殺細胞効果について判定した。

② 遊走・浸潤能の解析

ヌードマウスの脳内にヒト神経膠芽腫細胞を移植して脳腫瘍モデルマウスを作製した。生着後、全脳照射し、照射10日後と1ヶ月後の脳について組織学的に解析を行なった。

(6) グルタミン酸濃度の測定

L-グルタミン酸をL-グルタミン酸オキシダーゼで酸化させることで発生する過酸化水素水を比色定量することで、培地中のグルタミン酸濃度を測定した。

4. 研究成果

ヒト神経膠芽腫細胞株 (U87, CGNH-PM, U251) を用いてX線もしくは炭素イオン線を照射しコロニー形成法にてRBEを調べた。その結果、炭素イオン線のX線に対するRBEは2.4 (U87MG)、2.0 (CGNH-PM)、2.4 (U251)であった。このことから神経膠芽腫細胞において炭素イオン線はX線に比べて高い殺細胞効果を示すことが明らかとなった。神経膠芽腫の治療において有効である temozolomide をX線と併用した結果、CGNH-PM細胞において相乗的な殺細胞効果が認められた。炭素イオン線との併用においては、CGNH-PM細胞において相加的な殺細胞効果が認められた。

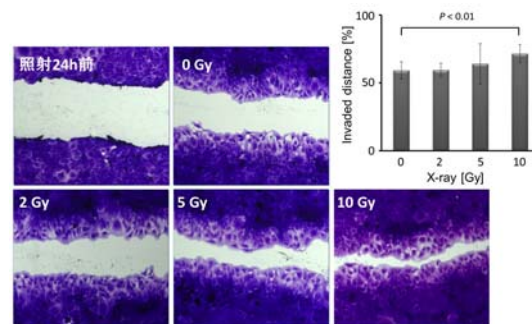
各細胞の遊走能を wound-healing assay 法により解析した結果、X線および炭素イオン線照射後 24 時間において照射線量依存的に遊走能の亢進が認められた [図1]。照射により亢進した遊走能の変化についてX線と炭素イオン線とを比較した結果、当物理線量において炭素イオン線のほうがX線に比べて約1.4倍高いことが明らかとなった。ここで認められた照射による遊走能の亢進は temozolomide では有意な抑制効果は認められなかった。

X線照射後 24 時間以内に細胞培養液中に放出されたグルタミン酸量を測定した結果、照射線量依存的に増加していた [図2]。これまでに我々はAMPA型グルタミン酸受容体が神経膠芽腫細胞の浸潤増殖に関与していることを報告してきた [Ishuchi S, Yoshida Y *et al.* (12人中3番目) *Nature Medicine* 8,

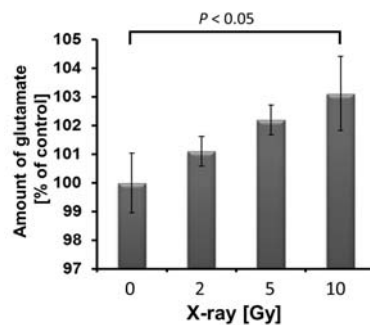
971-978, 2002]。そこで、照射前1時間GYKI52466を接触させた結果、照射による遊走性の亢進は有意に抑制された [図3]。

X線照射後の細胞について細胞接着因子の発現を調べた結果、照射によりE-cadherin発現の低下およびN-cadherin発現の上昇が認められた。一方で、GYKI52466を投与した細胞における両cadherinの発現は、コントロールと比べて有意な違いは認められなかった。炭素イオン線照射後の細胞については解析中である。

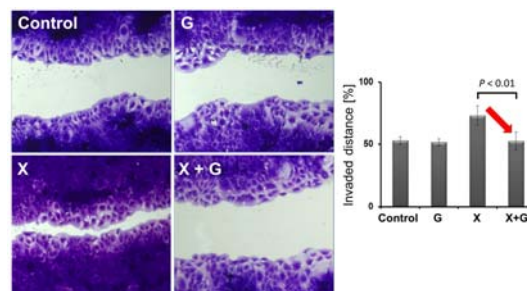
以上の結果から、神経膠芽腫細胞の照射による遊走性の亢進にはグルタミン酸およびcadherinが関与していること、またグルタミン酸受容体拮抗薬は放射線治療において有用な遊走阻害剤となる可能性があることが示唆された。



[図1] X線照射によるCGNH-PM細胞の遊走能の変化



[図2] X線照射による培地中のグルタミン酸量の変化



[図3] AMPA型グルタミン酸受容体拮抗薬によるCGNH-PM細胞の遊走能の変化

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4件)

- ① Musha A, Yoshida Y, *et al.* (9人中2番目) Synergistic effect of heat shock protein 90 inhibitor, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and X-rays, but not carbon-ion beams, on lethality in human oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of Radiation Research* 2012; *in press*, 査読有
- ② Yoshida Y, Suzuki Y, *et al.* (10人中1番目) Evaluation of the relative biological effectiveness of carbon ion beams in the cerebellum using the rat organotypic slice culture system. *Journal of Radiation Research* 2012;53:87-92, 査読有
- ③ Ohno T, Yoshida Y, *et al.* (12人中8番目) Carbon Ion Radiotherapy at the Gunma University Heavy Ion Medical Center: New Facility Set-up. *Cancers* 2011;3:4046-4060, 査読有
- ④ Saleem W, Yoshida Y, *et al.* (7人中4番目) Reduction of nitric oxide level enhances the radiosensitivity of hypoxic non-small cell lung cancer. *Cancer Science* 2011;102:2150-2156, 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 吉田由香里、神経膠芽腫に対する炭素線と Temozolomide 併用の基礎的検討、第14回癌治療増感研究シンポジウム、2012年2月10日、奈良県
- ② 吉田由香里、炭素線照射による脳の生物学的反応における組織学的評価、第2回国際放射線神経生物学学会大会、2011年12月3日、群馬県
- ③ 吉田由香里、神経膠芽腫におけるX線照射により誘発された遊走能の分子機構の解明、第2回国際放射線神経生物学学会大会、2011年12月3日、群馬県
- ④ 吉田由香里、神経膠芽腫におけるX線誘導遊走能の分子機構、日本放射線影響学会第54回大会、2011年11月19日、兵庫県
- ⑤ 吉田由香里、ヒト神経膠芽腫細胞における炭素線照射とテモゾロミドの併用による生物学的効果の検討、第6回高崎量子応用研究シンポジウム、2011年10月13日、群馬県
- ⑥ 吉田由香里、AMPA型グルタミン酸受容体

を標的とした神経膠芽腫細胞の遊走能抑制効果の検討、第17回癌治療増感研究会、2011年6月24日、宮城県

- ⑦ 吉田由香里、神経膠芽腫細胞における炭素線と抗がん剤併用に関する生物学的効果の検討、放射線神経生物学研究集会、2011年1月29日、群馬県
- ⑧ 吉田由香里、Biological Effects of Carbon Ions on Glioblastoma Cell Lines、高崎量子応用研究シンポジウム、2010年10月15日、群馬県
- ⑨ 吉田由香里、Biological effect of high linear energy transfer charged particle and X-ray on human brain cancers、Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG) 49、2010年5月21日、群馬県
- ⑩ 吉田由香里、重粒子線と化学療法の併用における脳正常組織及び神経膠芽腫の放射線感受性の検討、HIMAC 共同利用成果発表会、2010年4月19日、千葉県

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ①名称: 多目的ファントム及びその使用方法
発明者: 吉田由香里、他
権利者: 群馬大学
種類: 特許
番号: 特開 2011-239830
出願年月日: 2011年12月1日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 由香里 (YOSHIDA YUKARI)
群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教
研究者番号: 90431717

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: