

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791467

研究課題名(和文) ヒト癌細胞における放射線誘導性浸潤能の抑制に有効な阻害剤の探索及び関与因子の同定

研究課題名(英文) Search of inhibitors effective in suppressing the altered invasiveness of irradiated cancer cell lines

研究代表者

藤田 真由美 (Fujita, Mayumi)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・研究員

研究者番号：80580331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本課題により、炭素線照射はX線照射に比べ、大多数の癌細胞株において浸潤抑制効果が高いこと、しかし、まれにPANC-1やSF126のように浸潤能が上昇する細胞株が存在することが明らかとなった。また、阻害剤によるスクリーニングから、炭素線照射後のPANC-1の浸潤能の抑制にはNOSやPI3Kの阻害剤が有効である事を同定した。さらに、炭素線照射後に浸潤能が上昇するPANC-1とSF126では、照射後に培地中のNO₂-量が上昇する一方で、浸潤能が減少するMIAPaCa-2ではNO₂-量は減少することから、NOは複数の細胞株の照射後浸潤変化に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used 30 tumor cell lines and 1 normal embryonic lung fibroblast, and found that carbon-ion (C-ion) irradiation is effective in suppressing invasiveness of many cell lines. However, C-ion irradiation also enhanced the invasiveness of 2 cell lines, PANC-1 and SF126. Among 285 Anticancer Drugs, we found that nitric oxide synthase (NOS) inhibitors and phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) inhibitors were both effective in suppressing irradiated-PANC-1 invasion. Interestingly, most invading PANC-1 cells were nitric oxide (NO)-producing cells, and C-ion irradiation increased the NO-producing cell population, thereby enhancing invasion. Furthermore, NO₂- content was increased in irradiated PANC-1 or SF126, whereas those were decreased in irradiated MIAPaCa-2, whose invasiveness was suppressed by C-ion irradiation, suggested the roles of NO in the regulation of irradiation-altered invasiveness.

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：粒子線治療

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は侵襲のない局所療法であり、高齢化社会に移行しつつある日本では重要ながん治療法のひとつである。中でも、重粒子線はX線に比べ局所効果が高いという利点があり、その治療効果が期待されている。放医研では、1994年より重粒子線治療を開始しており、2010年の時点では5000人のがん患者が治療され、高い抗腫瘍効果が示されてきた。癌の治療効果をさらに向上させるため、今後は、放射線化学併用療法へ応用できる転移抑制剤の開発が期待されている。

基礎研究により、X線照射や γ 線照射は細胞の浸潤能を上昇させることがすでに多数の細胞株で報告されている。しかし、炭素線照射については、わずか5種類の細胞株における報告しかない。これまでに申請者らは、2つの細胞株

(MIAPaCa-2およびPanc-1,共にヒト膵臓癌由来細胞)を比較した実験で、X線および重粒子線照射後の浸潤能が変化する事、またその応答は細胞株間で異なるという予備的データを得ている。今後、さらに複数の細胞株を調べる事で、細胞株ごとの浸潤能変化に関わる関与分子を見いだす事ができ、個々の細胞株の特徴と比較することで、このタイプの細胞にはこの抑制剤が有効である等の予測が可能となると期待される。放射線照射後の浸潤能変化の予測とそれに対する有効な抑制剤の選択に役に立つものと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 36種のヒト癌細胞株を用い、X線や炭素線照射で浸潤能が上昇する細胞株を探索する。放射線照射による浸潤能の上昇は特定の細胞株でのみ見られる現象か、あるいは他の癌細胞株でも見られる現象であるのか明らかにする。
- (2) 36種の細胞株のうち、まずは浸潤能が最も顕著に誘導された細胞株を用い、照射後の浸潤能の抑制に有効な阻害剤を同定する。具体的には、文部科学省新学術領域研究・がん支援・化学療法基盤支援活動が提供する、標準阻害剤キット(含まれる阻害剤: 285種類)を利用する。また、効果が確認された阻害剤のターゲット分子から、照射後の浸潤能変化に関与する因子を明らかにする。
- (3) 関与が示唆された因子について、他の細胞株の浸潤能変化にも関与するか明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 放射線照射後に浸潤能が変化する細胞株を探索した。(課題1年目)

細胞は、以前、当研究室で、X線照射後の遺伝子発現プロファイリングに用いた細胞株36種(乳癌、子宮頸癌、肺癌、食道癌、大腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、神経膠肉腫、星状細胞腫、髓芽腫 由来細胞株)を用いた。X線及び炭素線照射後の浸潤能の変化を調

べた。浸潤アッセイ用プレートには、96well invasion assay (Cultrex BME Cell Invasion Assay, Trevigen), 及び、24 well invasion assay (Transwell permeable support, Costar)を用いた。また、X線は非照射または4 Gy, 炭素線照射は非照射または2 Gy (MONO, LET: 80Kev)を用いた。

(2) 放射線照射後の浸潤能の抑制に有効な阻害剤および関与因子を同定した。(2年目)

浸潤能が最も顕著に誘導された細胞株に対し、文部科学省新学術領域研究・がん支援・化学療法基盤支援活動が提供する阻害剤キット(含まれる阻害剤: 285種)を用い、浸潤能の抑制に有効な阻害剤をスクリーニングした。標準阻害剤キットは96ウェルプレート3枚からなるため、それに対応するように、浸潤アッセイにも96ウェルの浸潤アッセイプレート(Cultrex BME Cell Invasion Assay, Trevigen)3枚を用いた。具体的には、細胞を浸潤能が上昇する最適条件で照射し285種類の阻害剤でそれぞれ処理96ウェル浸潤アッセイプレートの各wellへ浸潤した細胞数を測定し、浸潤を抑制する阻害剤を同定した。また、阻害剤の標的分子より、照射後浸潤能変化に関与する因子を調べた。

(3) 照射後浸潤能への関与が示唆された因子について、他の細胞株の照射後浸潤能変化にも関与するか明らかにする。

(課題3年目)

照射後の浸潤能変化に関与が示唆された因子に焦点をあて、照射後に浸潤能が顕著に誘導または抑制された細胞株の浸潤能変化にも、その因子が関与するか、照射後の発現変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 放射線照射による浸潤能の上昇は特定の細胞株でのみ見られる現象か、あるいは他の癌細胞株でも見られる現象であるのか明らかにするため、36種類のヒト癌細胞株(乳癌、子宮頸癌、肺癌、食道癌、大腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、神経膠肉腫、星状細胞腫、髄芽腫 由来細胞株)及び1種の正常組織由来繊維芽細胞株を用い、X線や炭素線照射により浸潤能が変化する細胞株をスクリーニングした。X線(4 Gy)、及び、炭素線(2 Gy)照射後の細胞浸潤能変化について、96well 浸潤能アッセイプレートを用いて調べたところ、非照射群に対しX線照射後に25%以上の浸潤能の増加が認められたのは6細胞株(食道癌由来5種、膵癌由来1種)であり、反対に、25%以上の低下が確認されたのは7細胞株(脳腫瘍由来細胞株4種、子宮頸癌由来2種、肺癌由来1種)であった。また、炭素線照射後に上昇が認められたのは4細胞株(星状細胞腫由来1種、食道癌由来2種、子宮頸癌由来1種)であり、低下が確認されたのは11細胞株(脳腫瘍由来細胞株6種、食道癌由来2種、子宮頸癌由来1種、大腸癌由来2種)であっ

た。また、特に、元々の浸潤能が高い脳腫瘍由来細胞株では、炭素線照射後に顕著な浸潤能抑制効果が認められた。また、炭素線照射で浸潤能が2倍以上上昇する細胞株としては、PANC-1 以外に脳腫瘍由来細胞株 SF126 が同定された。これらの結果より、炭素線照射は大多数の癌細胞株において浸潤抑制効果が高いこと、また、まれに PANC-1 や SF126、Caski のように浸潤能が 1.5 倍以上上昇する細胞株が存在することが明らかとなった。

(2) 課題 1 年目の結果より、炭素線照射は大多数の細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、2 種類の細胞株 (PANC-1, SF126) においては浸潤を 2 倍以上誘導することが明らかとなった。そこで、課題 2 年目は炭素線照射後に浸潤能が上昇する PANC-1 および SF126 に着目し、照射後の浸潤能を抑制できる阻害剤について阻害剤キット (含まれる阻害剤: 285 種) を用いてスクリーニングを行った。まず、炭素線照射後に浸潤能が最も顕著に上昇する PANC-1 細胞を用い、炭素線照射後の浸潤能を 40% 以上抑制できる阻害剤をスクリーニングしたところ、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤及び PI3K 阻害剤が有効である事が明らかとなった。そこで、次に PANC-1 の浸潤における一酸化窒素の意義について調べた。PANC-1 を、一酸化窒素を産生している細胞を検出する試薬 (DAF-2DA) で染色したところ、全細胞中の一酸化窒素産生細胞の割合はわずか 4% であったのに対し、浸潤した細胞で

はその殆どの約 90% が一酸化窒素産生細胞であることが明らかとなった。また、PANC-1 浸潤細胞では、特に NOS1 の発現が顕著に高いことも確認された。このことから、一酸化窒素を産生する細胞群は PANC-1 の浸潤において重要な役割を担っている事が示唆された。また、全細胞中の一酸化窒素産生細胞の数は、炭素線照射により 4% から 18% (4.5 倍) に増加する事、これに対し、炭素線照射後に浸潤する細胞数も約 3.5 倍に増加し、その浸潤細胞の 84% は一酸化窒素を産生する細胞であった事から、炭素線照射後の一酸化窒素産生細胞数の増加が、炭素線照射後の浸潤細胞数の増加と関連している事が示唆された。

(3) 課題 2 年目の結果より、PANC-1 の炭素線照射後の浸潤能変化には一酸化窒素が重要な役割を担っている事が示唆された。一酸化窒素は他の細胞株の浸潤においても重要な役割を担っているのか、まずは炭素線照射後に浸潤能が 2 倍以上上昇する SF126 細胞を用いて調べたところ、PANC-1 の浸潤細胞と同様に SF126 の浸潤細胞においても NOS の発現量が全体の細胞に比べ顕著に高いことが確認された。また、炭素線照射後に浸潤能が上昇する PANC-1 細胞及び SF126 細胞では、照射後に培地中の NO₂ 量が上昇すること、一方で、炭素線照射により浸潤能が顕著に減少する MIA PaCa-2 細胞では、NO₂ 量は減少する事を見いだした。さらに、MIA PaCa-2 細胞では、炭素線照射により

一酸化窒素産生細胞の数も減少することを明らかにした。これらのことから、一酸化窒素は、複数の細胞株の浸潤において重要であり、照射後の浸潤能変化に關与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (2件)

Mayumi Fujita, Yoshimi Otsuka, Kaori Imadome, Satoshi Endo, Shigeru Yamada, Takashi Imai. Carbon-ion radiation enhances migration ability and invasiveness of the pancreatic cancer cell, PANC-1, in vitro. *Cancer Sci.* 2012, 103:677-683.

(doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02190.x.)

Mayumi Fujita, Yoshimi Otsuka, Shigeru Yamada, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai. X-ray irradiation and Rho-kinase inhibitor additively induce invasiveness of the cells of the pancreatic cancer line, MIAPaCa-2, which exhibits mesenchymal and amoeboid motility. *Cancer Sci.* 2011, 102:792-798.

(doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01852.x.)

[学会発表] (計 12 件)

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: Dose nitric oxide trigger radiation-enhanced invasiveness of PANC-1?, The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Yokohama-shi, 2013. 9

藤田真由美、今留香織、莊司好美、今井高志: 炭素線照射後のヒト膵癌由来細胞株 PANC-1 は NOS-NO-P13K-AKT パスウェイを介し浸潤能を変化させる、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、松本市、2013. 7

今留香織、**藤田真由美**、莊司好美、今井高志: 放射線照射が癌細胞株の浸潤能に及ぼす影響は線質と細胞株により異なる、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、松本市、2013. 7

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi Shoji, Takashi Imai: Search of inhibitors effective in suppressing the altered invasiveness of irradiated cancer cell line, HITSRS2013, Chiba-shi, 2013. 5

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi Shoji, Takashi Imai: Irradiation alters the invasive potential of PANC-1 cell line thorough NO and NOS-PI3K-AKT pathway activities in addition to the SerP activity, The 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, USA, 2013. 2

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: Irradiation alters the invasive potential of human pancreatic cancer cell lines thorough Rac1 and RhoA activities, The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Sapporo-shi, 2012. 9

藤田真由美、今留香織、遠藤悟史、莊司好美、山田滋、今井高志: 炭素

線照射後のヒト膵癌由来細胞株 MIAPaCa-2 及び PANC-1 の浸潤能変化とその機序、第 21 回日本がん転移学会 学術集会・総会、広島市、2012. 7

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi Shoji, Takashi Imai: The effects of irradiation on invasive potential of human pancreatic cancer cell lines, MIAPaCa-2 and PANC-1, The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research, Chiba-shi, 2012. 5

Kaori Imadome, **Mayumi Fujita**, Satoshi Endo, Shigeru Yamada, Takashi Imai. The effect of C-ion irradiation on metastatic potential of tumor cell lines, 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama-shi, 2011. 12

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: Carbon-ion irradiation diminishes invasion of human pancreatic cancer cell line, MIAPaCa-2, through by inhibition of Rac1 and Rho signaling, The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Nagoya-shi, 2011.10

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: The effects of irradiation on invasive potential of human pancreatic cancer cell line, MIAPaCa-2, 14th International Congress of Radiation Research (ICRR'2011), Warsaw, 2011.08

藤田真由美、山田滋、今井高志: 放射線照射後の膵癌由来細胞 MIAPaCa-2 の

浸潤能変化とその機序、第 20 回日本がん転移学会学術集会、浜松市、2011. 6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 真由美 (FUJITA, Mayumi)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・重
粒子医科学センター・研究員

研究者番号: 80580331

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし