

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791275

研究課題名(和文)炭素イオン線による悪性脳腫瘍の走行性とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Effects and molecular mechanisms of glioblastoma cell motility in carbon ion beam irradiation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト神経膠芽腫細胞株を用いてX線および炭素イオン線を単回照射し、照射後24時間における細胞の遊走性について評価した。その結果、いずれの細胞においてもX線および炭素イオン線は細胞の遊走性を亢進し、X線に比べて炭素イオン線を照射したほうがより細胞の遊走性を高めることが明らかとなった。この照射による遊走性の亢進はLinear energy transfer (LET) 非依存적であった。

また、MGMTの発現を抑制するとその細胞の遊走性は亢進されることから、ヒト神経膠芽腫細胞における遊走能にはO6-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)の発現が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between cell invasion and irradiation. Human glioblastoma (GBM) cell lines were irradiated with X-rays or carbon ion beams(C-ions). Not only X-rays but C-ions irradiation increased cell motility at 24 hours after irradiation. C-ions irradiated cells were more migrative than X-rays irradiated cells. Increase of cell migration by irradiation was linear energy transfer (LET)-independent manner.

Suppression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression increased migration of GBM cells. These results suggest that depletion of MGMT is associated with increased cell migration.

研究分野：放射線生物学

キーワード：遊走 脳腫瘍 炭素イオン線

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特にグリオーマ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極めて治療困難である。手術による脳腫瘍の摘出率向上や放射線治療の進歩により、局所制御は飛躍的に向上しているが、周囲の正常脳に浸潤した残存腫瘍からの再発は免れない。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月から炭素イオン線治療を開始した。従来の低LETであるX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)いまだ十分な効果が認められていない。放射線治療についての臨床的な検討が進むにつれて、その有効性をより確実に高めるための方策が求められてきている。

近年、放射線を照射した細胞の遊走能や浸潤能を評価した報告が数多く見られる。肝細胞がん、メラノーマ、肺腺がん、脳腫瘍由来細胞に放射線を照射することで、遊走能、浸潤能が亢進したという報告がある[Paquette B, et al. Br. J. Cancer, 2007; Lemay R, et al. Int. J. Radiat. Biol., 2011; Onoda JM, et al. Radiat. Res., 1994; Kiani MF, et al. Clin. Exp. Metastasis, 1997; Zhai GG, et al. J. Neuro Oncol., 2006]。一方で、肺がん細胞に2-10 GyのX線照射することにより浸潤能が線量依存的に減少し、10 Gy照射した場合には有意に抑制されたという報告もある[Cheng JC, et al. Oncogene, 2006]。高LET放射線を用いた研究では、炭素線照射により、脳腫瘍細胞、大腸がん細胞、肺扁平上皮癌細胞、骨肉腫細胞などの遊走能や浸潤能が線量依存的に抑制されることが報告されている[Takahashi Y, et al. Cancer res., 2003; Akino Y, et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2009; Goetze K, et al. Int. J. Radiat. Biol., 2007]。一方で、すい臓がん細胞を使った実験では炭素線照射により浸潤能が亢進する細胞株と抑制される細胞株があるという報告がある[Fujita M, et al. Cancer Sci., 2012]。著者らの研究においても、脳腫瘍において悪性度が高いグリオーマ細胞や肺上皮腺がん細胞の遊走能は炭素線照射により亢進することを報告している[Murata K, et al. J. Radiat. Res. 2013; Ishiuchi S, et al. The Fourth Takasaki Advanced Radiation Research Symposium, 2009]。このように、各放射線に対しても全く反対の応答性を示す結果が報告されており、特に炭素イオン線が細胞の走行性(遊走能および浸潤能)にど

のような生物学的効果をもたらすか十分に解明されていない。

当該申請者は、難治性腫瘍の治療法の確立を目指し、放射線(X線、粒子線)による脳腫瘍細胞・組織および肺がん細胞の放射線生物学的効果の特性および分子機構を解明する研究を続けてきた。これまでに、肺上皮腺がん細胞を用いた基礎研究の結果から、細胞が炭素線照射後0.53-0.71 mm/day遊走していること、グリオーマ細胞においてはX線では20 $\mu\text{m}/\text{h}$ 、炭素線では30 $\mu\text{m}/\text{h}$ 遊走していることを明らかにしてきた。がん治療後の再発・転移には、大きく分けて2つの種類がある。最初に発生したがんのすぐそばで起こる局所再発と別の臓器に発生する遠隔転移であり、このどちらも治療で取り残したがん細胞が再び増殖することで起こると考えられている。放射線治療後に起こる局所再発は照射野の設定や照射線量不足による可能性があると考えられるが、前述したような基礎研究の結果から、放射線照射によるがん細胞の運動能の亢進により治療中ががん細胞が照射野から外れてしまう可能性が示唆される。そこで、これまでの研究成果を発展させて、走行性に対する炭素イオン線の線質(LET依存性)および照射線量・回数(分割効果)との関係について調べ、その走行性の分子機構から分子標的を明らかにすることで、局所再発におけるメカニズムの理解を得ることが出来ると考えて、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は高度に浸潤性である難治性腫瘍の根治的治療を目指し、大きな期待が寄せられている炭素イオン線の生物学的効果、特に腫瘍細胞の走行性と、そのメカニズム解明から分子標的を明らかにすることである。本研究では、高い浸潤性と増殖性という特徴をもつ悪性脳腫瘍細胞について、炭素イオン線が腫瘍の走行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行った。

(1) 神経膠芽腫細胞の炭素イオン線による線質(LET依存性)の走行性に対する影響を明らかにする。

(2) 炭素イオン線による走行性に関与する分子機構について調べ、これら分子の発現変化(強制発現やノックダウン)や拮抗薬、阻害薬の効果について調べる。

3. 研究の方法

(1) 材料

O6-メチルグアニン DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)遺伝子発現の異なるヒト神経膠芽腫細胞4種(U87MG, U251, T98G, LN18)を用いた。細胞は10%ウシ胎児血清、ペニシリン100 IU/ml、ストレプトマイシン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するDMEM培地で5%CO₂存在下、37℃で培養した。

(2) 照射

X線は群馬大学における島津TAITAN-225S (200 kVp, 14.6 mA, 1.3 Gy/min)を用いた。炭素イオン線は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 13~70 keV/μm)および 60 mm SOBP ビーム (中心での平均 LET 50 keV/μm)を用いた。

(3) 殺細胞効果の解析 (コロニー形成法)

対数増殖期の細胞を回収し、25 cm² フラスコに播種し、20~24 時間後にX線もしくは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、10~14 日間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。求めた細胞生残率は Linear-quadratic (LQ) model を用いてフィットさせた生残率曲線から alpha 値および beta を値を算出し、細胞生残率を 10% に低下させる物理線量(D10)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。

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

(4) MGMT 遺伝子の改変

siMGMT は Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて添付マニュアルに従って T98G 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後の発現については、ウェスタンブロット法およびコロニー形成法にて確認した。

(5) 遊走能の解析

wound-healing 法

照射前日に 35 mm 培養ディッシュに細胞を播種し、照射後ただちにピペットチップの先で wound を作製した。照射 24 時間後に細胞を固定、ギムザ液にて染色した。顕微鏡下で wound の幅を観察・測定してそれぞれの結果について比較・解析を行った。

ポイデンチャンパー法

8.0 μm ポアサイズのインサートの入った 24well plate に細胞を播種し、X線もしくは炭素イオン線を照射した。照射 24 時間後に細胞を固定し、ギムザ液にて染色後、メンブレンの下面の細胞数を顕微鏡下でカウントした。

4. 研究成果

(1) 炭素イオン線による線質の走行性に対する影響についての解析

炭素イオン線による線質(LET 依存性)の走行性に対する影響を物理線量および生物線量の両方で評価するため、まず、それぞれの LET における各細胞の RBE 値を調べた。その結果、U251 細胞において、炭素イオン線は X 線に比べて約 1.5~4.0 倍、T98G 細胞においては、約 1.3~2.3 倍高い殺細胞効果を示した [表 1]。また、両細胞における RBE 値は LET 依存性を示した。

各細胞の遊走能について 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 時間において遊走能の亢進が認められた。炭素イオン線において誘発される遊走能の亢進は LET に非依存的であった。

次に各細胞の遊走能についてポイデンチャンパーを用いて解析し、X線と炭素イオン線で比較した結果、炭素イオン線それぞれの LET において誘発される遊走能の亢進は X 線に比べて当物理線量において U251 細胞では mono 70 keV/μm で 1.1~1.5 倍、mono 50 keV/μm で 1.2 倍、SOBP 中心で 1.0~1.5 倍高く、T98G 細胞については mono 70 keV/μm で 1.2~2.0 倍、mono 50 keV/μm で 1.1~1.9 倍、SOBP 中心で 1.0~3.0 倍高いことが明らかとなった。表 1 で示した RBE 値を用いて当生物線量にてそれぞれ比較した結果、U251 細胞では mono 70 keV/μm で 1.1~1.6 倍、mono 50 keV/μm では 1.0 倍、SOBP 中心で 1.2 倍高く、T98G 細胞については mono 70 keV/μm で 1.2~2.4 倍、mono 50 keV/μm で 1.1~2.6 倍、SOBP 中心で 1.6 倍高いことが明らかとなった。

[表 1] 炭素イオン線の各線質における RBE

	U251	T98G
mono13	1.54	1.27
mono40	2.52	1.74
mono50	2.65	2.00
mono70	4.04	2.25
SOBPcenter	2.55	1.51

(2) 炭素イオン線による走行性に関する分子機構についての解析

本研究で用いた神経膠芽腫細胞のうち、MGMT タンパクを多く発現している T98G 細胞について、siRNA を用いて MGMT 発現を抑制した (T98G-MGMT(-))。その結果、コントロール (T98G-MGMT(+)) 細胞に比べて T98G-MGMT(-)細胞の遊走能は高く、細胞の形態についても T98G-MGMT(-)細胞のほうが T98G-MGMT(+))細胞に比べて突起が延びている傾向にあった。このことから、ヒト神経膠芽腫細胞における遊走能には MGMT の発現が関与していることが明らかとなった。

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 9 件)

- Kubo N, Yoshida Y, et al. (11 人中 4 番目) Radiosensitizing effect of carboplatin and paclitaxel to carbon-ion beam irradiation in the non-small-cell lung cancer cell line H460. J Radiat Res. (2015) 56(2):229-238, 査読有 Yoshida Y, Nakano T. (2 人中 1 番目) Topics of radiation biology for cancer treatment. Igaku Butsuri (2014) 34(2):48-56, 査読有 Amornwichee N, Yoshida Y, et al. (13 人中

10 番目) Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. PLoS One. (2014) 22;9(12):e115121, 査読有
Kudo S, Yoshida Y, et al. (10 人中 8 番目) Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain. Exp Ther Med. (2014) 8(3):754-758, 査読有
Takahashi A, Yoshida Y, et al. (12 人中 5 番目) Nonhomologous end-joining repair plays a more important role than homologous recombination repair in defining radiosensitivity after exposure to high-LET radiation. Radiat Res. (2014) 182(3):338-344, 査読有
Murata K, Yoshida Y, et al. (11 人中 5 番目) Increase in cell motility by carbon ion irradiation via the Rho signaling pathway and its inhibition by the ROCK inhibitor Y-27632 in lung adenocarcinoma A549 cells. J Radiat Res. (2014) 55(4):658-664, 査読有
Imaeda M, Yoshida Y, et al. (9 人中 3 番目) Long-term pathological and immunohistochemical features in the liver after intraoperative whole-liver irradiation in rats. J Radiat Res. (2014) 55(4):665-673, 査読有
Shirai K, Yoshida Y, et al. (12 人中 6 番目) X irradiation changes dendritic spine morphology and density through reduction of cytoskeletal proteins in mature neurons. Radiat Res. (2013)179(6):630-6, 査読有
Suzuki Y, Yoshida Y, et al. (16 人中 5 番目) Three-dimensional and multienergy gamma-ray simultaneous imaging by using a Si/CdTe Compton camera. Radiology. (2013) 267(3):941-7, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

吉田由香里、重粒子線がん治療のための生物学的基礎研究、茨城大学 Quantum Medicine 研究会、2015 年 3 月 1 日、茨城県
Yoshida Y, et al. X-irradiation induces acute depolymerization of microfilaments and structural changes in neurites of cultured hippocampal neurons. 第 5 回国際放射線神経生物学学会大会、2015 年 2 月 21 日、群馬県
Yoshida Y, et al. LET dependence of cell survival parameters in normal human skin cells. PTCOG53, 2014 年 06 月 12 日, Shanghai, China
吉田由香里、他。重粒子線がん治療の至適分割照射法開発のための基礎研究 日本放射線影響学会第 57 回大会 2014 年 10 月 1-3 日、鹿児島県
吉田由香里、他。神経膠芽腫細胞に対す

る炭素線と temozolomide 併用に関する生物学的効果の検討、第 3 回国際放射線神経生物学学会大会、2013 年 1 月 25 日、沖縄県

吉田由香里、他。正常組織と腫瘍の炭素線分割照射効果の比較、第 47 回群馬放射線腫瘍研究会、2012 年 9 月 29 日、群馬県

吉田由香里、他。炭素イオン線における正常組織と腫瘍の分割照射効果の比較、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 6-8 日、宮城県

Yoshida Y. Biophysical quality assurance for treatment planning of carbon-ion therapy. KHIMA seminar on heavy-ion radiotherapy, 2012 年 8 月 17 日、Seoul, Korea

吉田由香里、他。炭素イオン線分割照射効果に関する正常組織と腫瘍の比較、生物部会学術大会、2012 年 6 月 30 日、沖縄県

Yoshida Y, et al. Biological gain of fractionated carbon-ion radiotherapy for tumor growth delay and crypt survival. PTCOG51, 2012 年 5 月 19 日, Seoul, Korea

〔図書〕(計 1 件)

(翻訳) 吉田由香里、他。エムプラン株式会社、臨床放射線生物学の基礎 原著 4 版、2013 年 3 月 15 日、375 ページ中 102 ~ 119 ページ、169 ~ 190 ページ、301 ~ 315 ページ担当)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

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：特許第 5613925 号
出願年月日：2011 年 12 月 1 日
取得年月日：2014 年 9 月 19 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