

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20790872

研究課題名（和文）

放射線治療後にみられる再増殖腫瘍細胞の運動特性の解析

研究課題名（英文）

Cell motility of repopulated tumor cells after radiotherapy

研究代表者

堤 香織 (Tsutsumi Kaori)

北海道大学・大学院保健科学研究所・助教

研究者番号：80344505

研究成果の概要（和文）：

放射線治療は癌の非侵襲的治療法の一つとして重要で有効な治療方法の一つである。近年の著しい放射線治療技術の進歩は治療成績を大きく向上させた。しかし、これらの技術進歩にも関わらず、放射線治療後に発生する再増殖腫瘍細胞の制御は困難である。再増殖腫瘍細胞は、照射前の腫瘍と比較して悪性度が高く、患者の生命予後を悪化させる。しかし残念ながら、腫瘍の再増殖を引き起こす分子メカニズムは未だに解明されていない。そこで本研究では、再増殖腫瘍の性質を分子レベルで理解し制御することが放射線治療による寛解率を改善する上で重要な要素であると考え、再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株の細胞特性を解析した。IR 株はマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の発現量が親株と比較して高く、IR 株のゼラチナーゼ活性も親株と比較して高かった。また、ポイデンチャンバー法を用いてトランズウェルを通過する IR 株の細胞数を親株と比較した結果、IR 株は親株と比較して、I 型コラーゲンをコートしたウェルに対する浸潤能力が高かった。Wound healing assay の結果、IR 株は親株と比較して、高い運動能力を持つことがわかった。一方、両株の細胞増殖能力に大きな差はなく、EGF 受容体のチロシンキナーゼ活性や ERK の活性化もウェスタンブロット法による検討では大きな差異はみられなかった。しかし、IR 株の細胞接着能は親株と比較して大きく増加しており、インテグリン β 1、パキシン、FAK などの細胞基質間接着分子の接着斑への局在が増大していた。一方、これら接着分子の細胞内発現量は両株において変わらなかった。IR 株における運動能亢進は、細胞接着分子の局在の変化によるものである可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Radiotherapy is an important noninvasive treatment for many types of cancer. Recently, remarkable progress of technology of radiotherapy leads to an improvement of local control rate. However, the emergence of tolerant cells during or after radiotherapy remains problematic. The patients who relapsed by repopulated tumor have worse prognoses because of more malignant character of repopulated tumor compared with that of before irradiation. Unfortunately, the molecular mechanisms of cause for tumor repopulation remain unknown. To elucidate the molecular profile of repopulated tumor, present study analyzed the cellular properties of surviving tumor after X-ray irradiation by using IR cells which is the model cell line of repopulated tumor. The mRNA expression levels of matrix metalloproteinases (MMPs) were upregulated in IR cells compared with parental cells. IR cells possessed high gelatinase activities, and increased cell motility, and more invasiveness than parental cells on type-I collagen-coated well. However, phosphorylation of EGF receptor and ERK and cell growth were the same levels between parental cells and IR cells. On the other hand, IR cells adhered more tightly to collagen-coated dishes than parental cells. Consistently, integrin β 1, paxillin, and phosphorylated FAK, that were cell-substrate adhesion molecules, were strongly localized at focal adhesions in IR cells, as visualized by immunofluorescence. Whereas, the expression levels of these adhesion molecules

were not different between parental cells and IR cells. Increased invasion, migration, and adhesion in IR cells after irradiation might result from the differences of localization of focal adhesion molecules in the cells. These molecules may be important therapeutic targets for the control of repopulated tumors after radiotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：放射線治療、再増殖腫瘍細胞、マトリックスメタロプロテアーゼ、インテグリン

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は癌の非侵襲的治療法の一つとして非常に重要な治療方法の一つである。IMRT（強度変調放射線治療）や高精度3次元放射線治療に代表される近年の著しい放射線治療技術の進歩は、標的腫瘍への照射精度の向上を導き、これにより、より多くの線量を標的腫瘍へ照射することが可能となった。しかしながら、これらの技術進歩にも関わらず、今も尚大きな課題となっているのが再増殖腫瘍細胞の制御である。再増殖腫瘍細胞は、放射線照射後に一度縮小した腫瘍が再び増殖、出現してくる腫瘍細胞で、照射前の腫瘍と比較して浸潤能が増加し悪性度が高いため、再増殖腫瘍の出現は患者の生命予後を悪化させる。腫瘍の再増殖を引き起こす分子メカニズムは未だ解明されておらず、現段階では、再増殖腫瘍の出現そのものを抑制することは困難である。

腫瘍の放射線感受性に関する研究は、これまでも多く行われてきているが、その研究のほとんどは放射線照射後早期の細胞応答、若しくはシグナル伝達に関するものである。我々は再増殖腫瘍細胞の性格をより反映する実験系として、放射線照射後に分裂能・増殖能を有した細胞の観察が好ましいと考え、再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群IR株(以下、IR株)を利用して研究を遂行することを考えた。本研究に先立って我々はヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 株に 10Gy の X 線を照射し、14 日後に生き残った細胞を全て採取し、これを IR 株として樹立した。IR 株を用いた

実験では、IR 株は X 線を照射する前の親株と比較してシスプラチンに高感受性であり、IR 株をシスプラチンで処理することにより効率的にアポトーシスを誘導した。IR 株において観察されたシスプラチン感受性の向上は、近年注目を浴びている放射線治療と動注化学療法の併用による超選択的且つ効果的な腫瘍の治療結果とも一致するものであり、IR 株がモデル細胞としての性質を保持していることを確認することができた。

2. 研究の目的

本研究は、放射線治療後に出現する再増殖腫瘍細胞の制御を最終目標に掲げる。再増殖腫瘍細胞を制御することができれば放射線治療における寛解率の改善に大きく貢献できるものと期待される。本研究はその第一歩として、放射線治療後に出現する再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株の細胞特性を、腫瘍の悪性度の指標である、浸潤能、運動能、増殖能、接着能といった側面から分子レベルで解明することを試みる。また、再増殖腫瘍細胞の細胞特性を特徴づけるキー分子を探索するとともに、その制御方法を検討する。

3. 研究の方法

ヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 株並びに H1299 株に 10Gy の X 線を照射して生き残った細胞（再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群）IR 株の細胞特性を比較した。両株の発現遺伝子量の違いを網羅的に比較するためにマイクロ

アレイ法を利用した。マイクロアレイ法の結果によって注目した遺伝子については、リアルタイム RT-PCR と定量的 RT-PCR 法によって更に詳しく解析した。運動能の比較にはボイデンチャンバー法と Wound healing アッセイ法を用いた。また、細胞の運動の様子を CCD カメラ付き位相差顕微鏡により経時的に観察し親株との動きと比較した。運動能の違いは I 型コラーゲンをコートしたディッシュにおいても観察した。浸潤能の解析には、I 型コラーゲンをコートしたトランズウェルを使用した。その際、上層ウェルは 0.5% 血清を含む培地、下層ウェルは 10% 血清を含む培地で満たした。ゼラチナーゼ活性の比較にはゼラチンザイモグラム法を利用した。増殖能の比較には MTS 法を用い、上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼ活性や ERK の活性化についてウェスタンブロット法により観察した。細胞接着因子との関わりは細胞接着アッセイにより観察するとともに、リン酸化 FAK、FAK、インテグリン、パキシンの発現量をウェスタンブロット法によって比較した。細胞内局在の違いは免疫染色法により観察した。

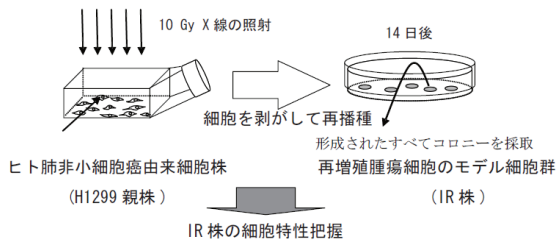


図 1 研究の概略図

4. 研究成果

再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株とその親株における発現 mRNA 量を比較した結果、マイクロアレイ法ではマトリックスメタロプロテアーゼ 1 の発現が IR 株で 4.4 倍増加していた。これに基づきマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子群の発現量をリアルタイム RT-PCR 法によってより詳細に解析したところ、マトリックスメタロプロテアーゼ 1、2、9 の mRNA レベルがそれぞれ親株と比較して 1.3 倍、1.8 倍、2.8 倍高かった。また、定量的 RT-PCR 法によってもこの結果を裏付けることができた。マトリックスメタロプロテアーゼ活性を調べる目的でゼラチンザイモグラムを行った結果、IR 株は親株と比較してゼラチン含有ゲルを溶解する能力が高く、高いゼラチナーゼ活性を持つことがわかった。また、IR 株の浸潤能を試験するために、I 型コラーゲンをコートしたウェルに細胞を播種し、16 時間後に下層に移動した細胞数を計測したところ、IR 株では親株と比較して

4.5 倍の細胞数が計測され、IR 株における浸潤能の増加がみられた。IR 株は同時にボイデンチャンバー法と Wound healing アッセイ法でより高い運動能を示した。特に I 型コラーゲンをコートしたディッシュ上での Wound healing アッセイでは、IR 株のより速い運動能が観察され、その動きは親株より 1.8 倍速かった。また、I 型コラーゲン上での細胞接着能は親株と比較して 1.5 倍高かった。親株と IR 株の運動能と細胞接着能の違いを分子レベルで解明するために、細胞接着関連分子の細胞内局在を免疫染色によって観察した。細胞-細胞間接着関連分子である β カテニンや Zo-1 の細胞内局在は親株と IR 株と大きな差は観察されず、同程度に細胞-細胞間に局在していた。一方、細胞-基質間接着関連分子である p-FAK、パキシリン、インテグリン β 1 の接着斑における局在は IR 株でより多く観察された (図 2)。接着斑における接着分子の数を定量化したところ、IR 株では有意のその数が多かった。また、IR 株においては、アクチンファイバーがより太く観察された。

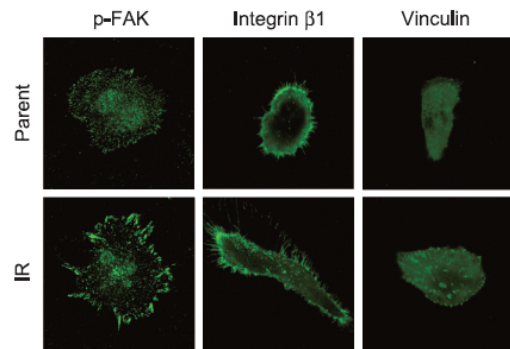


図 2 免疫染色による細胞-細胞間接着分子の局在の観察

また、これら細胞-基質間接着関連分子の細胞内発現量をウェスタンブロット法により観察したところ、両株に大きな差はみられなかった。細胞増殖能に関しては両株に違いがないことは既に以前の研究により確認済みであったが、あらためて EGF 受容体のチロシンキナーゼ活性や ERK の活性化についてウェスタンブロット法によって検討したが、両株に大きな差異は認められなかった (図 3)。

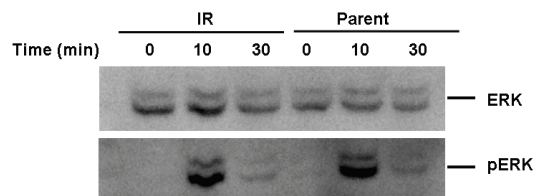


図 3 ウェスタンブロット法による活性化 ERK の観察

以上の結果、本研究により放射線治療後に出現する再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株

は、高い浸潤能と運動能、接着能を持つ細胞であることがわかった。浸潤能に関しては、マトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の mRNA レベルでの発現量増加と活性の上昇が起因すると考えられ、また運動能と接着能に関しては、細胞-基質間接着関連分子の細胞内局在の変化が大きく影響を及ぼしている可能性が示唆された。親株と IR 株における接着分子の細胞内局在の違いを決定づけている機構については更なる解析が必要であるが、このキー分子を特定することができれば、放射線治療後に発生する再増殖腫瘍細胞の制御が可能となるかもしれない。

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 1 件)

Tsutsumi K, Tsuda M, Yazawa N, Nakamura H, Ishihara S, Haga H, Yasuda M, Yamazaki R, Shirato H, Kawaguchi H, Nishioka T, Ohba Y: Increased motility and invasiveness in tumor cells that survive 10 Gy irradiation. Cell Struct Funct 34(2):89-96, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

Tsutsumi K, Tsuda M, Yazawa N, Nakamura H, Yasuda M, Yamazaki R, Shirato H, Kawaguchi H, Ohba Y, Nishioka T: Cell Motility And Invasion Of Surviving Tumor Cells After 10 Gy Irradiation. 51st ASTRO Annual Meeting, Chicago, USA, 2009.11 (査読有り)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 香織 (ツツミ カオリ)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

研究者番号: 80344505

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号: