

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25年6月14日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591394

研究課題名（和文） 膵がん由来細胞株が示すX線と重粒子線による浸潤能増強／抑制機構の分子生物学的解析

研究課題名（英文） The effects of X-ray or C-ion beams irradiation on invasive potential of human pancreatic cancer cell lines.

研究代表者

今井 高志 (TAKASHI IMAI)

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・プログラムリーダー

研究者番号：50183009

研究成果の概要（和文）：膵がんでは、治療後の再発・転移の抑制が重要な課題となっている。本研究では、膵がん由来する MIAPaCa-2 と PANC-1 細胞の浸潤能は、X線によって共に誘導されるが、炭素線照射では、MIAPaCa-2 は抑制され、PANC-1 では誘導されることを見出した。放射線応答浸潤能の誘導には、細胞株特異的な細胞外マトリックス分解酵素の発現が必要であった。これらの酵素を阻害すると、細胞株は共に形態を変え、アメーバ様浸潤が観られた。浸潤能の抑制には、蛋白質分解酵素と Rho キナーゼの同時阻害が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer which is associated with a high metastatic potential is one of the most aggressive diseases with an extremely low 5-year survival rate. In the present *in vitro* study, we found that C-ion irradiation suppressed the invasive potential of MIAPaCa-2, but failed to reduce the invasiveness of PANC-1 cells. Invasiveness of these cells induced by irradiation involved the activation of cell-type specific proteases. However, the use of protease inhibitor alone resulted in the induction of a mesenchymal-amoeboid transition in these cell lines, whereby the cells could continue to invade cellular matrix through protease-independent mechanisms. Inhibition of both mesenchymal and amoeboid motility of the cells by combined administration of both inhibitors for the proteases and for Rho-kinase was required to suppress the irradiation-induced invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：①粒子線治療、②転移、③浸潤、④がんゲノム科学

1. 研究開始当初の背景

膵癌の発生頻度は近年増加傾向にあり、日本における臓器別の癌死亡率では5番目に多い(厚生労働省、2004)。抗がん剤や放射線に対する感受性が低いことが報告されており(Pipas *et al.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001, Safran *et al.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001)、切除後の5年生存率は約20%と低く、再発・転移が問題視されている(Lau *et al.* Hepato. Panc. Dis. Int. 2008, Maheshwari *et al.* Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. 2005)。

膵癌の放射線治療は、照射野に消化管が含まれるため、十分な線量を照射できないという問題点がある。その点、重粒子線はX線に比べ腫瘍に線量を集中でき、局所効果が高いという利点がある。放医研では、1994年より重粒子線治療を開始しており、2009年には5000人のがん患者が治療され、高い抗腫瘍効果が示されている。また、転移に関しても、重粒子線治療は局所効果が高くなるにつれて遠隔転移が減少することが直腸癌で示されている(Yamada *et al.* J. Clin. Oncol. 2005)。膵臓癌の臨床試験では、膵癌と癌が浸潤している可能性の高い膵周囲組織に重粒子線を集中させることが可能であり、高い抗腫瘍効果が示されている。このことから、放射線への感受性が低く、また、特に転移が問題視される膵癌において、重粒子線による治療効果が期待されており、膵癌における基礎データの取得が必要となっている。ヒト肉腫由来細胞株や、非小細胞肺癌由来細胞株を用いた基礎的研究では、X線照射は細胞の浸潤能を上昇させるが、重粒子線照射は細胞の浸潤能を低下させるとの報告がある(Ogata *et al.* Cancer Res. 2005, Akino *et al.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009)。膵癌に関しては、ガンマ線照射によりヒト膵癌由来の細胞株 Panc-1 の浸潤率が上昇するとの報告があるが(Qian *et al.* Clin. Cancer Res. 2002)、重粒子線照射に関する報告はない。

我々は重粒子線照射が膵癌に及ぼす影響を明らかにするために、ヒト膵癌由来の細胞株を用いた基礎的研究を進めている。これまでに、膵癌細胞株における重粒子線照射は、X線に対し相対的生物学的効果が1.83-2.46 (LET 80keV/ μm の条件)であることを報告している(Matsui *et al.* Am. J. Clin. Oncol. 2004)。現在は、X線及び重粒子線照射がヒト膵癌由来の細胞株2種(MIAPaCa-2, PANC-1)の浸潤能に及ぼす影響について研究を進めている。現時点で、X線照射では2種の細胞株の浸潤能が上昇

すること、一方で、重粒子線照射における浸潤能の変化は細胞株間で差があることを確認している。

2. 研究の目的

膵癌は抗がん剤や放射線に対する感受性が低く、再発・転移の抑制が重要な課題となっている。これまでの臨床研究によって重粒子線による治療効果が期待されているが、基礎研究データは不十分である。申請者らは、X線と重粒子線照射が膵癌由来細胞株の浸潤能に異なった効果を示す予備的データを得た。そこで本研究では、これらの放射線に各々特異的に応答したパスウェイ・分子は何か? また、この放射線照射後の浸潤率の変化は細胞株間で異なっていたが、この細胞株特異性はどのようなパスウェイ・分子によって決定されているか? を明らかにすることを目的とする。この成果は膵癌の分子プロファイリングに対応した放射線療法選択や併用化学療法提案の基礎データとなることが期待できる。

3. 研究の方法

(1)細胞株:ヒト膵癌に由来する細胞株 MIAPaCa-2 と PANC-1 は American Type Culture Collection より入手した。

(2)放射線照射:炭素線照射は放射線医学総合研究所の HIMAC (290 MeV/u, 80 keV/ μm) を用いた。X線照射は、島津社製 PANTAK HF-320S (200 kVp, 20 mA, 0.5 mm Al, 0.5mm Cu フィルター) を用いた。全ての照射は約 1 Gy/min で行った。線量は 0.5, 1, 2, 4 Gy を用いた。

(3)細胞浸潤アッセイ:コーニング社製トランスウエルチャンバー (6.5 mm フィルター、8 μm ポア) を用いた。照射 2 日後に 1 ウエル当たり $1-2 \times 10^5$ 個の細胞を用い 24 時間の浸潤細胞をカウントした。アッセイ時に脱水酸化酵素活性を利用して標識した生細胞を蛍光標識細胞分取装置を用いてカウントした。浸潤能は浸潤細胞数/全生細胞中数で表した。

(4)酵素活性測定・阻害剤:セリンプロテアーゼ活性はライフ研究所製セリンプロテアーゼザイモ電気泳動キットを用いて測定した。プラスミノゲン活性化酵素は American Diagnostica 社製比色分析キットを用いた。これらのアッセイでは、マトリックスプロテアーゼ-2 阻害剤 MMP2 inhibitor III (Calbiochem-Novabiochem)、セリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニン

(Calbiochem-Novabiochem)を用いて、酵素活性の消失を確認した。Rho キナーゼ阻害剤は Y27632 (Wako)を用いた。これらの酵素阻害剤による処理は、トランスウェルチャンバーを用いる細胞浸潤アッセイの6時間前からアッセイの間を通して実施した。

4. 研究成果

MIAPaCa-2 と PANC-1 細胞の浸潤能は、X線によって共に誘導されるが、炭素線照射では、MIAPaCa-2 では抑制され、PANC-1 では誘導されることを見出した。炭素線により浸潤能が誘導されるがん細胞株があることは初めての報告である。浸潤能に対する放射線応答の違いを生じるパスウェイ・分子について以下のことが明らかとなった。

- (1) MIAPaCa-2 と PANC-1 細胞は共に形態を変え、間葉性様浸潤とアメーバ様浸潤を行う。
- (2) MIAPaCa-2 では X 線照射によりマトロプロテナーゼ 2 の発現が誘導され、細胞外マトリックスの分解に使われる。
- (3) PANC-1 では炭素線照射によりプラスミノーゲン活性化酵素の発現が誘導され、細胞外マトリックスの分解に使われる。
- (4) MIAPaCa-2 と PANC-1 は共に上記プロテアーゼを阻害すると、アメーバ様浸潤の割合が増加する。
- (5) Rho キナーゼ阻害剤は、アメーバ様浸潤を抑制するが、単独処理では間葉性様浸潤が増加し、結果的に浸潤細胞数は増加する。

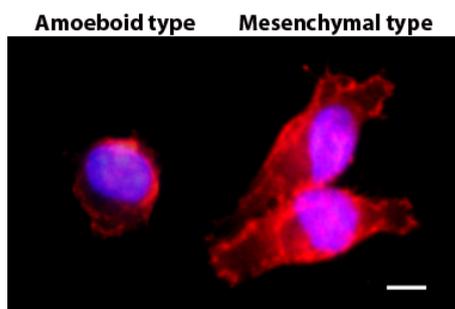


図1 MIAPaCa-2 細胞のアメーバ様形態と間葉性様形態の違い

- (6) それぞれの細胞に特異的なプロテアーゼと ROCK 阻害剤を同時併用すると、放射線誘導浸潤能は抑制される。しかし PANC-1 の炭素線誘導浸潤能は半分しか抑制されないため、他のシグナル経路が炭素線によって活性化された可能性がある。

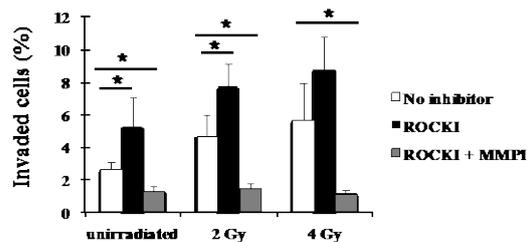


図2 MIAPaCa-2 細胞における X 線誘導浸潤能とそれに対するマトリックスメタロプロテナーゼ阻害剤(MMPI)と Rho キナーゼ阻害剤(ROCK1)の効果。

- (7) MIAPaCa-2 に炭素線照射した場合には、間葉性様浸潤やアメーバ様浸潤に重要なシグナル伝達系因子である small GTPase、Rac1 と RhoA、の活性が共に抑制される。

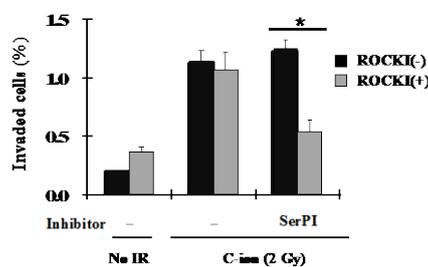


図3 PANC-1 細胞における炭素線誘導浸潤能とそれに対するセリンプロテアーゼ阻害剤(SerPI)と Rho キナーゼ阻害剤(ROCK1)の効果。

- (8) 2 種類のプロテアーゼの放射線による転写誘導には、DNA メチレーション状態の変化は伴っていない。

以上の結果から、放射線に反応した浸潤能の変化は、がん細胞によって異なる可能性が示唆された。また、ここで示した PANC-1 タイプの放射線応答をするがん細胞の浸潤は、細胞特異的なプロテアーゼと Rho キナーゼ阻害剤の併用により抑制できることを示した。

本研究は *in vitro* 解析であるので、治療への応用のためには、放射線応答浸潤性の異なるがん細胞を治療前に予測できる分子マーカーの同定と、放射線によって浸潤が誘導されるタイプのがんがどれくらいの割合で存在するか、隣がん症例を用いた研究が必要である。

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 2 件)

- (1) 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 Science, 103: 677-683, 2011, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02190.x, 2011 (査読有)
- (2) 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 exhibit mesenchymal and amoeboid motility, Cancer Science, 102: 792-798, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01852.x, 2011 (査読有)

〔学会発表〕 (計 9 件)

- (1) 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, Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, 2013 年 02 月 21 日～2013 年 02 月 25 日、Hyatt Regency Maui (ハワイ、米国)
- (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), 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、ロイトン札幌 (札幌市)
- (3) 今井高志: 放射線治療効果の予測をめざして、第 30 回 日本ヒト細胞学会学術集会 (招待講演)、2012 年 08 月 18 日～2012 年 08 月 19 日、梅田スカイビル (大阪市)
- (4) 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、2012 年 07 月 12 日～2012 年 07 月 13 日、オリエンタルホテル広島 (広島市)
- (5) 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, 2012 年 05 月 09 日～2012 年 05 月 11 日、幕張メッセ (千葉市)

- (6) 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, 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- (7) 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), 2011 年 9 月 1 日、The Palace of Culture and Science (Warsaw, POLAND)
- (8) 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、2011 年 6 月 30 日、アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県)
- (9) Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai: Invasive potential of pancreatic cell line, MIA Pa Ca-2, was affected by irradiation, 69th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, 2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪府)

〔その他〕

ホームページ等

独立行政法人 放射線医学総合研究所
<http://www.nirs.go.jp/index.shtml>

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 先端粒子線生物研究
プログラム

<http://www.nirs.go.jp/rd/structure/rccpt/rrg.shtml>

Advanced Radiation Biology Research
Program, NIRS
http://www.nirs.go.jp/ENG/research/charged_particle/img/fig3.jpg

RadGenomics 放射線医学総合研究所 先端
粒子線生物研究プログラム
<http://133.63.22.22/radgenomics/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 高志 (TAKASHI IMAI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子
医学科学センター・プログラムリーダー

研究者番号：50183009