

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390300

研究課題名(和文)放射線によるがん転移への影響

研究課題名(英文)The effects of radiation on cancer metastasis

研究代表者

手島 昭樹(Teshima, Teruki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・放射線治療科・主任部長(大阪大学名誉教授)

研究者番号：40136049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：がんの放射線治療で用いられている3種の放射線(X線、炭素イオン線、陽子線)が、がんの転移能に与える影響を比較検討した。X線と陽子線は細胞に低い線量照射されるとがんの転移に重要な役割をもつ遊走能および浸潤能が亢進することが分かった。一方、炭素イオン線は、細胞遊走能、浸潤能を抑制することが分かった。さらに、X線および陽子線を低線量照射された細胞は、接着斑の構成に重要なタンパクであるFAK(Focal adhesion kinase)のリン酸化が亢進すること、細胞骨格の制御に関連するRho familyの活性がX線照射で亢進することを確認した。炭素イオン線では、これらのタンパクは抑制された。

研究成果の概要(英文)：The effects of 3 types radiation (X-ray, carbon ion beam and proton beam) on cancer metastasis were investigated in this study. As the results, the cell migration and invasion capability were increased by low dose X-ray or proton beam irradiation. On the other hand, carbon ion beam decreased these metastatic potentials. Furthermore, the cells that low dose X-ray or proton beam was irradiated enhanced the expression of FAK (Focal adhesion kinase) which had important role to form desmosome and X-ray enhanced the expression of Rho family proteins which related to regulating cytoskeleton. In case of carbon ion beam, the expressions of these proteins in the cancer cells were suppressed. This study suggested that carbon ion beam might suppressed cancer metastasis.

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：放射線腫瘍学 放射線治療学 細胞動態解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年の放射線治療は、コンピュータや物理技術の進歩により、強度変調放射線治療、定位放射線治療など、腫瘍に局限した照射野設定と高線量化が可能となり、良好な局所制御が得られる様になった。更に、炭素イオン線や陽子線といった粒子線を用いた放射線治療により、今まで治療成績が不良であった腫瘍に対しても、良好な治療成績が得られている。しかし、外科療法と同様に局所療法である為、治療後におけるがんの浸潤や遠隔転移に関しては未だ明確な指標がない。また、亜致死線量の光子線照射により転移を促進する結果も報告されており、照射野辺縁のような低線量放射線が曝露される環境においては、放射線照射自体が転移の一因となっている可能性も考えられた。以上より、放射線治療が及ぼすがんの浸潤・転移のメカニズムへの影響を解明し、がんの転移を抑制することは必須の課題であった。

## 2. 研究の目的

放射線照射によるがん細胞の転移能の変化とその機序を解析し、遠隔転移の制御も考慮した、放射線治療法の確立に貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 放射線照射後における種々のがん細胞の細胞機能および転移関連遺伝子・タンパク発現量分析

各種がん細胞における放射線照射後の遊走・浸潤能の比較検討

肺がん細胞 (A549、EBC-1)、乳がん細胞 (MDA-MB-231)、膵がん細胞 (AsPC-1、PANC-1)、血管内皮細胞 (HUVEC、ECV304) に対し X 線、陽子線を 0.5、2、10 Gy、炭素イオン線を 0.5、2、10 GyE 照射し、24 時間後、細胞遊走能を boydenchamber assay で、浸潤能を Matrigel invasion assay にて評価した。

放射線照射における膵がん細胞の FAK および Cdc42 の発現変化の検討

膵がん細胞 AsPC-1 に X 線、陽子線、炭素イオン線を 0.5、2、10 GyE 照射し、24 時間後 western blotting にて total FAK および pFAK の発現変化を、pull down assay にて active Cdc42 の発現変化を検討した。

がん幹細胞と非がん幹細胞の分離および放射線感受性の比較

膵がん細胞 AsPC-1 および PANC-1 を非接着培養し、sphere を作成した。次に、幹細胞マーカー CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>細胞とそれ以外の細胞に分離した。膵がん細胞に放射線を照射し FACS にて残存するがん幹細胞の割合を比較検討した。

放射線照射によるがん幹細胞と非がん幹細胞の遊走能・浸潤能への影響

膵がん幹細胞および非がん幹細胞に X 線、炭素イオン線を 0.5、2、10 GyE 照射し、24 時間後遊走能を boydenchamber assay で、浸潤能を Matrigel invasion assay にて評価した。

## (2) 動物実験

肺がん細胞 A549 に陽子線を 0.5、2、10 Gy 照射後 3 日間培養し、対数増殖期に入った細胞を  $1.0 \times 10^6$  個、BALB/c nude マウス 4 週齢メスの右下腿部に皮下移植し、腫瘍増殖能の評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 放射線照射後における種々のがん細胞の細胞機能および転移関連遺伝子・タンパク発現量分析

各種がん細胞における放射線照射後の遊走・浸潤能の比較検討

各種がん細胞の放射線照射 24 時間後における遊走能および浸潤能の結果を以下に示す (Table 1a, 1b)。

非照射細胞の遊走細胞数を 1 とし、各線量照射 24 時間後の遊走細胞数を相対値で示した。肺がんおよび血管内皮細胞は、低線量 X 線または陽子線の照射により細胞遊走能が亢進する結果を得た。基本的に高浸潤性の性質を有する MDA-MB-231、高転移能を有する PANC-1 においては、X 線もしくは陽子線照射が誘発する細胞遊走能亢進は、亢進傾向にあるものの有意な変化はみられなかった。一方、炭素イオン線照射による遊走能の抑制が低線量照射から生じており、2 GyE 照射で全ての細胞で遊走能の抑制がみられた。

Table 1a: 照射 24 時間後の細胞遊走能の変化

X-Ray	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5Gy	1.24	1.42 *	1.18	1.32 *	1.17	1.46 *	1.55 *
2Gy	1.42 *	1.34	1.08	1.21	1.16	1.47	1.52
10Gy	0.72	0.68	0.89	0.83	0.92	0.97	0.98

Carbon	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5GyE	0.71 *	0.63 *	0.90	0.77 *	0.87	0.52 *	0.59 *
2GyE	0.32	0.21	0.46 *	0.41	0.55 *	0.04	0.21
10GyE	0.07	0.04	0.17	0.28	0.32	0.06	0.14

Proton	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00
0.5Gy	1.22	1.47 *	1.14	1.31 *	1.10	-	1.50 *
2Gy	1.41 *	1.32	1.06	1.13	1.02	-	1.51
10Gy	0.24	0.43	0.31 *	0.16	0.09 *	-	0.57

Non-IR: Non Irradiation

\*p < 0.05(v.s. Non-IR)

次に細胞浸潤能に関して、評価方法は遊走能と同じく、非照射細胞の浸潤細胞数を 1 とし、各線量照射 24 時間後の浸潤細胞数を相

対値で示した。X線低線量照射された肺がん並びに血管内皮細胞は浸潤能が亢進した。一方で、細胞遊走能が亢進した陽子線低線量照射による浸潤能への影響は有意差がみられなかった。本結果から、陽子線照射は、細胞の浸潤に関わる因子に影響がないことが示唆された。また、炭素イオン線照射された細胞の浸潤能の抑制は顕著であった。

Table 1b: 照射 24 時間後の細胞浸潤能の変化

X-Ray	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5Gy	1.16	1.54 *	1.15	1.34 *	1.12	1.42 *	1.56 *
2Gy	1.25	1.49	1.03	1.11	1.01	1.43	1.53
10Gy	0.82	0.94	0.76	1.04	0.78	0.97	0.91

Carbon	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5GyE	0.66 *	0.36 *	0.44 *	0.39 *	0.42 *	0.20 *	0.39 *
2GyE	0.53	0.18	0.32	0.23	0.31	0.12	0.25
10GyE	0.31	0.07	0.21	0.08	0.07	0.02	0.05

Proton	A549	EBC-1	MM231	AsPC-1	Panc-1	HUVEC	ECV304
Non-IR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00
0.5Gy	1.03	0.93	1.10	1.09	1.15	-	1.08
2Gy	0.97	1.02	0.99	1.13	1.04	-	1.02
10Gy	0.36 *	0.13 *	0.03 *	0.08 *	0.09 *	-	0.14 *

\*p < 0.05(v.s. Non-IR)

### 放射線照射における膵がん細胞の FAK および Cdc42 の発現変化の検討

X線、陽子線の低線量照射により細胞遊走能が有意に亢進した膵がん細胞 AsPC-1 を用いて、リン酸化 FAK および Rho family の 1 つである Cdc42 の活性を検討した。その結果、X線 0.5 Gy、陽子線 0.5 Gy 照射 24 時間後、リン酸化 FAK の発現量が亢進した。炭素イオン線照射の場合、0.5 GyE から線量依存的にリン酸化 FAK の発現が抑制された (Fig 1a)。

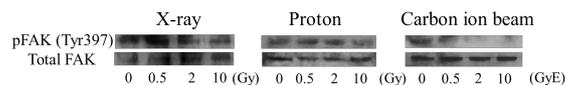


Fig 1a: 放射線照射 24 時間後のリン酸化 FAK の発現変化

さらに FAK の下流に存在する Rho family タンパクの 1 つである Cdc42 の活性型 Cdc42 の発現が X線 0.5 Gy 照射で亢進した。一方、リン酸化 FAK の発現が亢進した陽子線 0.5 Gy 照射では、活性型 Cdc42 の発現に変化はみられなかった (Fig 1b)。

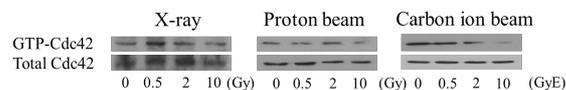


Fig 1b: 放射線照射 24 時間後の活性型 Cdc42 の発現変化

実験結果から、光子線と粒子線では細胞運動に関わるタンパクへの影響が異なることが示唆された。

### がん幹細胞と非がん幹細胞の分離および放射線感受性の比較

膵がん細胞 AsPC-1 および PANC-1 を用いて作成された sphere を CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>細胞 (がん幹細胞) とそれ以外の細胞 (非がん幹細胞) に分離した結果、AsPC-1 および PANC-1 においてそれぞれ 41.6%、16.0% のがん幹細胞様細胞を分離することができた (Fig 2a)。

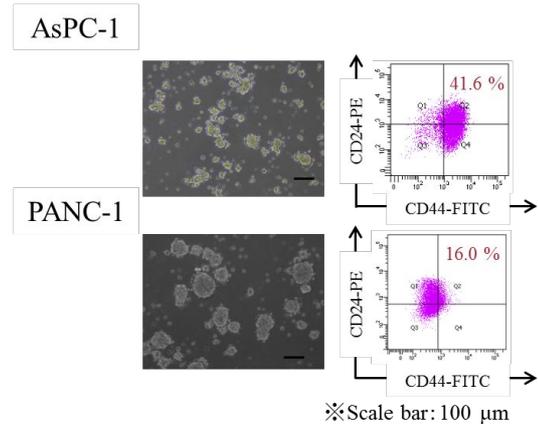


Fig 2a: FACS を用いたがん幹細胞の分離

次に膵がん細胞に X線を 0.5、2、10 Gy もしくは炭素イオン線を 0.2、0.8、4Gy 照射し、がん幹細胞マーカー発現細胞 (がん幹細胞) の割合を比較検討したところ、X線に比べ炭素イオン線で有意に抑制していることが示された (Fig 2b)。

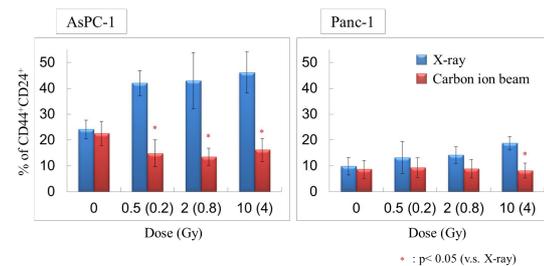


Fig 2b: 放射線照射後のがん幹細胞の割合

この研究の結果、炭素イオン線照射は放射線抵抗性であるがん幹細胞においても X線と比べ、殺細胞効果があることが示された。

### 放射線照射によるがん幹細胞と非がん幹細胞の遊走能・浸潤能への影響

細胞分離を行わない全細胞 (unsort)、分離した非がん幹細胞 (non-CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) およびがん幹細胞 (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) に X線を照射し、細胞遊走能を検討した。unsort 条件の細胞は 0.5 Gy の低線量照射により細胞の遊走能が亢進した。これは、先に示した遊走能の data と

一致する。しかし、細胞を分離し、がん幹細胞と非がん幹細胞の遊走を比較すると、非がん幹細胞の遊走能は、線量依存的に抑制され、がん幹細胞の遊走能は変化がみられないか、亢進傾向にあることが分かった (Fig 3a)。

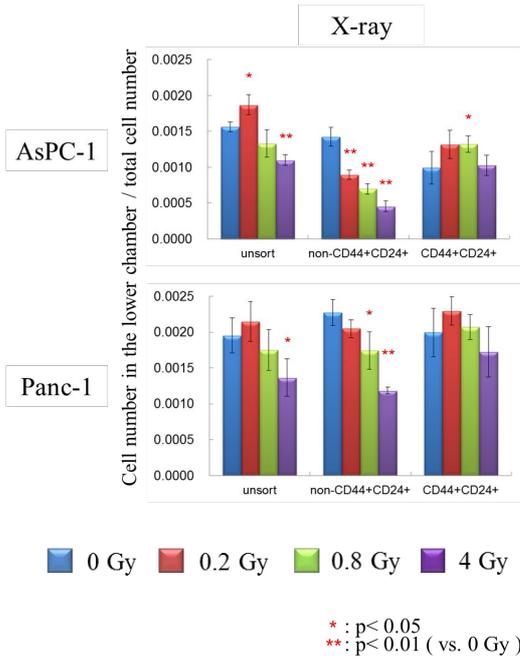


Fig 3a: がん幹細胞、非がん幹細胞の細胞遊走能に対する X 線の影響

同様の実験を炭素イオン線で行った場合、unsort 条件の細胞遊走能は、線量依存的に抑制され、これも先の成果と一致した。さらに、非がん幹細胞とがん幹細胞の遊走能も、線量依存的に抑制された (Fig 3b)。

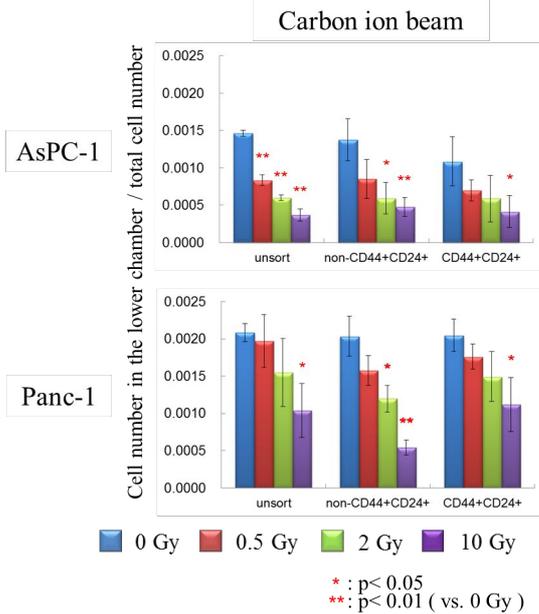


Fig 3b: がん幹細胞、非がん幹細胞の細胞遊走能に対する炭素イオン線の影響

次に浸潤能を遊走能と同様の細胞条件 (unsort, non-CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) で行った結果を以下に示す。

X 線照射の場合、遊走能の結果同様、非がん幹細胞 (non-CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) の浸潤能が線量依存的に抑制された。一方で、幹細胞 (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) の浸潤能は低線量照射域で亢進傾向がみられた (Fig 3c)。

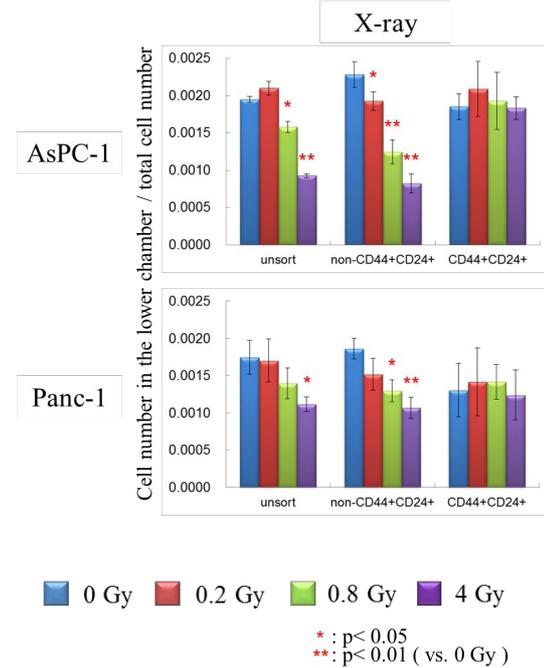


Fig 3c: がん幹細胞、非がん幹細胞の細胞浸潤能に対する X 線の影響

一方、炭素イオン線照射の場合、非がん幹細胞、がん幹細胞共に線量依存的に浸潤能は抑制される結果を得た (Fig 3d)。

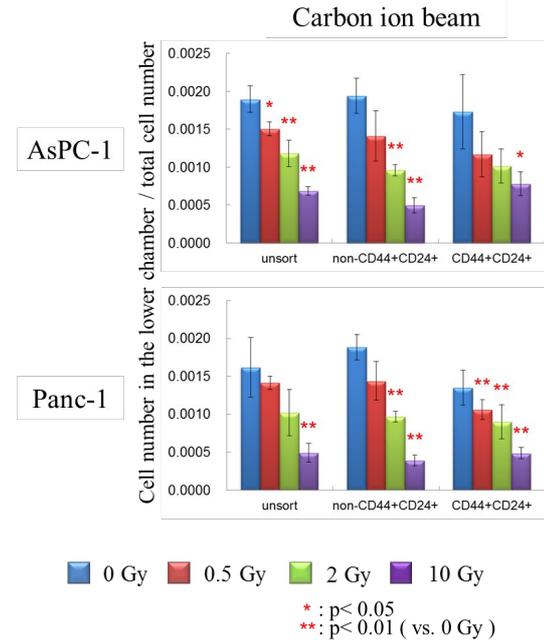


Fig 3d: がん幹細胞、非がん幹細胞の細胞浸

## 潤能に対する炭素イオン線の影響

これらの実験結果より、X線低線量照射により細胞の遊走能、浸潤能が亢進する一因にがん幹細胞の割合が影響する可能性が示唆された。

### (2) 動物実験

陽子線照射 35 日後まで観察した結果、2 Gy 照射された細胞を移植したマウスの腫瘍増殖能が非照射細胞移植マウス群と比べ、有意に亢進した。一方、10 Gy 照射細胞移植マウス群は腫瘍増殖が顕著に抑制された (Fig4)。

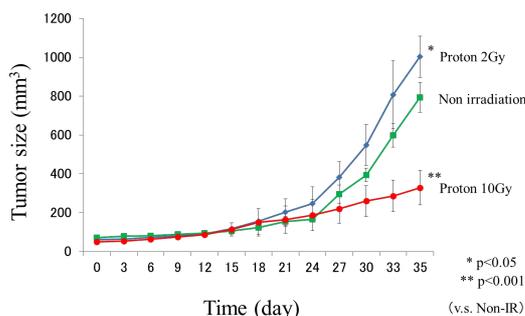


Fig 4: 陽子線照射の腫瘍増殖に対する影響

## 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 57 件)

Hamamura K., Minami K., Matsuura N. (他 5 名、2 番目 6 番目) Attenuation of malignant phenotypes of breast cancer cells through eIF2 $\alpha$ -mediated downregulation of Rac1 signaling. (査読有) *Int. J. Oncol.* 44(6):1980-8. 2014

Yokoyama Y., Matsuura N. (他 8 名、10 番目) Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. (査読有) *Cancer Sci.* 104(7): 889-95. 2013

Koizumi M., Teshima T. (他 7 名、8 番目) Administration of salubrinal enhances radiation-induced cell death of SW1353 Chondrosarcoma Cells. (査読有) *Anticancer Res.* 32 (9): 3667-3673, 2012

Ogata T., Teshima T., Matsuura N. (他 3 名、3 番目 6 番目) Anti-IL-6 receptor antibody does not ameliorate radiation pneumonia in mice. (査読有) *Exp. Ther. Med.* 4 (2): 273-276, 2012.

Yogo A., Teshima T. 他 11 名、9 番目) Measurement of DNA double-strand break yield in human cancer cells by high-current, short-duration bunches of laser-accelerated protons. (査読有) *Jpn. J. of Applied Physics* 50: 106404, 2011

### 〔学会発表〕(計 60 件)

Ueyama S., Teshima T. *et al.* Modeling the agility MLC for monte-carlo IMRT and VMAT calculations. AAPM 55th Annual Meeting, Indianapolis, USA, Aug., 2013.

Tsujii M., Teshima T. *et al.* Detectability of the position of the diaphragm in the exhale CBCT for patient positioning in respiratory gated stereotactic body radiotherapy. ASTRO 55th Annual Meeting, Atlanta, USA, Sept., 2013.

Yagi M., Teshima T. *et al.* Maximizing the availability of positron emitting nuclei for proton therapy verification using different beam irradiation sequences. AAPM 54<sup>th</sup> Annual Meeting, Charlotte USA, 2012.

Akino Y., Teshima T., *et al.* Cardenes HR., DesRosiers C. Impact of heterogeneity corrections in stereotactic radiation therapy treatment of the lung. ASTRO 54th Annual Meeting, Boston, USA, 2012.

### 〔図書〕(計 1 件)

手島昭樹、5. 放射線治療施設の運営・管理に関連する知識、放射線治療部門の運営、臨床放射線腫瘍学、編集 日本放射線腫瘍学会、日本放射線腫瘍学研究機構、p.183-188, 南江堂、東京 2012

### 〔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 なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

手島 昭樹 (TESHIMA TERUKI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府  
立成人病センター(研究所)・放射線治療科・  
主任部長(大阪大学名誉教授)

研究者番号：40136049

### (2)研究分担者

村上 昌雄 (MURAKAMI MASAO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号 50210018

出水 祐介 (DEMIZU YUSUKE)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50452496

松浦 成昭 (MATSUURA NARIAKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190402

皆巳 和賢 (MINAMI KAZUMASA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90634593

### (3)連携研究者 なし