

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461934

研究課題名(和文)放射線照射により浸潤が誘導されたがん細胞におけるメタボローム解析

研究課題名(英文)Metabolome analysis of invaded pancreatic cancer cell line, PANC-1, after irradiation

研究代表者

今井 高志 (Imai, Takashi)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘導浸潤がん細胞で活性化または抑制されている初期応答経路を包括的に解明することを目的とし、*in vitro*での浸潤細胞調製法を確立して、細胞マトリックスに浸潤した膵癌由来細胞のメタボローム解析を行った。その結果、浸潤細胞では通常培養細胞群と比較し、(1)解糖系や(2)アルギニン産生に関わる代謝経路、さらに、(3)抗酸化能に関わる代謝経路が重要であることを見出した。また、炭素線照射後の浸潤細胞でも同様の代謝特性を確認した。この研究により、炭素線照射後の浸潤抑制に有用な阻害剤の新しい候補を提案した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the metabolic pathways characterized in the invaded cancer cells, PANC-1, whose invasiveness is enhanced after the carbon-ion (C-ion) irradiation, and propose the new candidates reducing the C-ion enhanced invasiveness. Metabolome analysis using CF-TOFMS showed that several metabolites in the glycolytic pathway, the uric acid pathway synthesizing arginine, and the folate pathway producing glutathione were all increased in the invaded PANC-1 cells compared to those of whole-cultured PANC-1 cells. Such increases in the metabolite were also shown in the invaded cells after the C-ion irradiation. From the results, we next clarified the enzymes responsible for the synthesis of increased metabolites found in the invaded cells. This approach would be useful for identifying new inhibitors for the invasion of cancer cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：転移 浸潤 粒子線治療 メタボローム解析 代謝経路

## 1. 研究開始当初の背景

癌の治療効果を向上させるためには、転移抑制が重要な課題である。我々は、炭素線照射によって浸潤能が上昇する細胞株 (PANC-1 や SF126) を見だし、そのメカニズムを解析してきた。これまでに、放射線誘導浸潤能に関わる分子を同定し、それらの阻害剤によって浸潤が抑制されることを示してきたが、がん細胞は複数の経路を使って浸潤しているようであり、未だ放射線誘導浸潤能の完全抑制には至っていない。そこで本課題では、新しく代謝産物の包括的な分析を行うメタボローム解析を導入し、放射線誘導浸潤がん細胞で活性化または抑制されている初期応答経路を包括的に解明することを考えた。

細胞の浸潤能はコラーゲンなどのマトリゲルをコートしたトランスウェルを用いて行う。マトリゲルの上に播種した細胞のうち、マトリゲルを越えてトランスウェルの裏側に移動できた細胞を浸潤細胞というが、興味深いことに、マトリゲル上に細胞を播種しても全ての細胞が動くわけではなく、PANC-1 細胞では全体の約 0.3% の細胞のみが浸潤する。また、我々は別の実験で、マトリゲルを通過し浸潤した PANC-1 浸潤細胞は、PANC-1 細胞全体の集団と比較し、一酸化窒素 (NO) の産生量が高い事を見いだしており、浸潤細胞では特徴的な代謝経路が存在する可能性が考えられた。これらの背景から、本課題では、細胞全体の代謝経路と、実際に浸潤した細胞の代謝経路を区別して解析することを計画した。

## 2. 研究の目的

- (1) 浸潤細胞の調製方法を確立する。
- (2) 浸潤細胞で特徴的な代謝経路を明らかにし、炭素線誘導浸潤能で重要な代謝経路を調べる。
- (3) 浸潤に重要な代謝経路を阻害し、照射後の浸潤能を抑制する方法を提案する。

## 3. 研究の方法

### (1) 浸潤細胞の調整方法を確立する

トランスウェルの裏側に浸潤した PANC-1 細胞を複数の細胞剥離液を用いて回収、またはピペティングやスクレーパーで直接回収する方法を試みた。

### (2) 浸潤細胞で特徴的な代謝経路を明らかにし、炭素線誘導浸潤能で重要な代謝経路を調べる

通常培養 PANC-1 細胞及び、PANC-1 浸潤細胞それぞれの代謝産物量を CE-TOFMS を用いて包括的に測定・比較し、PANC-1 の浸潤細胞で特徴的に活性化または抑制されている代謝経路を調べた。また、非照射条件での PANC-1 浸潤細胞と、炭素線 2 Gy 照射後の浸潤細胞の代謝産物量を比較し、非照射浸潤細胞群及

び照射後の浸潤細胞群で違いがあるか調べた。

### (3) 浸潤に重要な代謝経路を阻害し、照射後の浸潤能を抑制する方法を提案する

浸潤細胞で特異的に産生量が増加する代謝産物から、その代謝産物量の変化に関わる酵素群を推定し、放射線誘導浸潤能の抑制に有効と考えられる阻害剤を提案した。

## 4. 研究成果

(1) マトリゲルを通過してトランスウェルの裏側に浸潤した PANC-1 細胞を回収するため、トリプシン-EDTA や Accutase による細胞剥離、また、ピペティングやスクレーパーを用い直接回収する方法を試みたが、中でも、Accutase (Innovative cell tech) で 30 分間室温処理する方法が最も死細胞が少なく、その後培養した際も通常培養細胞群と同じように growth することが確認できた。Accutase を用い穏やかに時間をかけて処理することで、浸潤細胞を高い生存率のまま回収する方法を確立した。

(2) 非照射の PANC-1 細胞及び、炭素線 2 Gy を照射した PANC-1 細胞を用い、炭素線照射 2 日目に浸潤アッセイを行った。アッセイ開始から 24 時間後に、それぞれのトランスウェルから浸潤細胞群を単離した。また、浸潤細胞とは別に、通常条件にて PANC-1 細胞を dish で培養し、通常培養細胞群とした。浸潤細胞群および通常培養細胞群からメタボローム解析用のサンプルを作成し、CF-TOFMS を用いて代謝産物を測定した。主成分分析より、非照射および炭素線照射ともに、浸潤細胞群の代謝プロファイリングは通常培養細胞群とは区別されることが明らかとなった。また、浸潤細胞群の代謝産物の定量値から、浸潤細胞では、解糖系の ATP 産生に関わる中間代謝物質である 3-phosphoglycerate (3PG) と phosphoenol-pyruvate (PEP) の産生量が増加していることを見いだした。このことから、浸潤細胞の代謝の特徴として、特に解糖系によるエネルギー代謝に傾斜していることが予想された。さらに、浸潤細胞の ATP の量は、通常培養細胞群に比べ有意に減少していたが、エネルギーチャージ率は低下を示すことから、ATP 産生の代謝は浸潤細胞群で活性化していることが示唆された。また、これら現象は、炭素線照射後の浸潤細胞でも同様の結果であることを明らかにした。

我々は別の実験で、PANC-1 浸潤細胞は、PANC-1 細胞全体の集団と比較し、NO の産生量が増加していること、また炭素線照射により NO を高産生する細胞の数が上昇し、浸潤細胞の数も増加することを見いだしていた。実際に、PANC-1 細胞を一酸化窒素合成阻害剤 (NOS) で処理すると炭素線誘導浸潤能が抑制されることから、NO は PANC-1 の浸潤で重要

な役割を担っており、また、炭素線照射後の浸潤能の上昇にも関与していることが予想されていた。今回、本研究のメタボローム解析により、炭素線照射を受けた PANC-1 細胞では、アルギニンの産生量が上昇していることを新たに見いだした。アルギニンは NO の基質であり、NO 産生において必須のアミノ酸である。PANC-1 の炭素線照射後の浸潤上昇には NO 産生が必須であり、このためにはアルギニン産生の亢進が重要である可能性が示唆された。

さらに、浸潤細胞は通常培養細胞群と比べ、酸化ストレスの指標である還元型グルタチオン (GSH) / 酸化型グルタチオン (GSSG) 比が有意に低下していることを見出した。また、この値は、炭素線照射を受けた浸潤細胞で、さらに低下していた。すなわち、非照射群、炭素線照射群ともに浸潤細胞では通常培養細胞群と比べ、より高い酸化ストレスがかかっていることが示唆された。興味深いことに、PANC-1 の浸潤細胞は非照射群、炭素線照射群ともに、通常培養細胞群と比べ、活性酸素の一種である過酸化水素に対し抵抗性であることが確認された。これらの結果から、浸潤細胞では高い酸化ストレスがかかっていると考えられるが、同時に高い抗酸化能力をもつため、酸化ストレス存在下でも生存できることが示唆された。

(3) 浸潤細胞で特異的に産生量が変化する代謝産物から、その代謝産物量の変化に関わる酵素群を推定した。解糖系の代謝産物である 3PG は ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) により産生され、PEP は ホスホピルビン酸ヒドラターゼ (Enolase) により産生される。しかし、PGK や Enolase の発現量は通常培養細胞群と浸潤細胞群では差がなかった。その為、PGK および Enolase は PANC-1 浸潤細胞で特異的に発現量が上昇しているのではなく、活性化されていると考えられた。

また、アルギニン産生に関わる代謝酵素も浸潤細胞では重要な役割を担っていることが予想されるが、アルギニンは尿素回路でアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) により産生される。そこで、通常培養細胞群及び浸潤細胞群における ASL の発現量を比較したところ、浸潤細胞群では ASL の遺伝子発現量が 1.4 倍に上昇することが明らかとなった。

さらに、抗酸化能に関わる代謝系路では、ROS を消去する過程で酸化型となった GSSG が、さらなる ROS を消去するため、還元型の GSH へ変換される必要がある。GSSG から GSH への変換には NADPH が必須であるが、実際に NADP から NADPH を産生する反応に関わる葉酸代謝経路の酵素 (ALDH1L2) の遺伝子発現量は、通常培養細胞群と比べ浸潤細胞で 1.7 倍上昇しており、反対に NADPH から NADP を産生する酵素 (DHFR) の発現量は 56% に減少していた。興味深いことに、この現象は PANC-1 の浸潤細胞のみならず SF126 の浸潤細胞でも同

様に確認された。

以上の結果より、PANC-1 の炭素線誘導浸潤能の抑制には、PGK, Enolase, ASL, ALDH1L2 酵素に対する阻害剤が有用である可能性が示唆された。

## 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 3 件)

Fujita M, Yamada S, Imai T. Irradiation induces diverse changes in invasive potential in cancer lines. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35:45-52. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.09.003. (査読有)

Fujita M, Imadome K, Shoji Y, Isozaki T, Endo S, Yamada S, Imai T. Carbon-ion irradiation suppresses migration and invasiveness of human pancreatic carcinoma cells MIAPaCa-2 via Rac1 and RhoA degradation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015; 93:173-80. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.009. (査読有)

Fujita M, Imadome K, Endo S, Shoji Y, Yamada S, Imai T. Nitric oxide increases the invasion of pancreatic cancer cells via activation of the PI3K-AKT and RhoA pathways after carbon ion irradiation. *FEBS Lett.* 2014; 588:3240-50. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.006. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

藤田真由美, 今留香織, 莊司好美, 今井高志: 一酸化窒素と RhoGTPases は放射線照射後の細胞浸潤能を調節する, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (神戸市) 2015-12-02

Mayumi Fujita, Takashi Imai: Role of Rac1 activity in invasiveness of human pancreatic cancer cell lines irradiated with carbon-ion beams, The 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Nagoya Congress Center (Nagoya), 2015-10-08

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi Shoji, Robert Cheng, Aparna H. Kesarwala, David A. Wink, Takashi Imai: Role of nitric oxide in invasiveness of tumor cells irradiated with carbon-ion beams, American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR) 2015, Philadelphia (USA), 2015-04-21

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi

Shoji, Takashi Imai: Effects of Irradiation on Cellular Invasiveness with Regard to Cancer Cell Heterogeneity, 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), Kyoto International Conference Center (Kyoto), 2015-05-26

今留香織, 藤田真由美, 荘司好美, 菅智, 今井高志:細胞の形態転換とマトリックスプロテアーゼの発現調節, 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜) 2014-11-27

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: Carbon-ion irradiation suppresses invasion of MIAPaCa-2 cells via GTP-bound Rac1 and RhoA degradation, The 73<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Pacifico Yokohama (Yokohama), 2014-09-26

Takashi Imai: Carbon-Ion Radiotherapy and Its use in Combination Treatments: From the Biological Point of View, Japanese Society of Medical Oncology, Fukuoka Convention Center(Fukuoka), 2014-07-19

藤田真由美, 今留香織, 荘司好美, 今井高志: ヒト膵癌由来細胞株 PANC-1 の炭素線照射による代謝変動の解析, 第1回がん代謝研究会、鶴岡メタボロームキャンパス レクチャーホール(鶴岡市)、2013-11-01

Takashi Imai, Mayumi Fujita, Katsutoshi Sato, Takashi Shimokawa; Molecular analysis of the different responses of cancer cell to radiation, The 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Pacifico Yokohama (Yokohama), 2013-10-05

Mayumi Fujita, Shigeru Yamada, Takashi Imai: Dose nitric oxide trigger radiation-enhanced invasiveness of PANC-1?, The 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Pacifico Yokohama (Yokohama), 2013-10-03

藤田真由美、今留香織、荘司好美、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、ホテルブエナビスタ(松本市) 2013-07-11

今留香織、藤田真由美、荘司好美、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、ホテルブエナビスタ(松本市) 2013-07

Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Yoshimi Shoji, Takashi Imai: Search of inhibitors effective in suppressing

the altered invasiveness of irradiated cancer cell line, HITSRS2013, Keiyo Bank Culture Plaza (Chiba-shi), 2013-05

〔その他〕

ホームページ等

<http://133.63.22.22/radgenomics/index.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 高志 (Imai, Takashi)

国立研究開発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

### (2) 連携研究者

石川 敦子 (Ishikawa, Atsuko)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任技術員

研究者番号 : 30443063