

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861071

研究課題名(和文) 重粒子線照射後におけるヒト癌細胞の遊走、浸潤、転移能についての研究

研究課題名(英文) 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

研究代表者

村田 和俊 (Murata, Kazutoshi)

群馬大学・重粒子医学推進機構・助教

研究者番号：60644557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺腺癌細胞株であるA549を用い、遊走能の炭素線照射による影響とROCKの関連について、その特異的阻害薬であるY27632を併用しインビトロ環境で探索した。ヒト肺腺癌細胞株であるA549を用い、炭素線照射後に遊走能が増強することを認めた。炭素線照射はRhoシグナル経路のROCKを介してA549における細胞遊走能を増大させ、そのRhoシグナル経路にあるROCKを阻害することで、遊走能の増大を抑制しることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the effect of carbon ion (C-ion) irradiation on cell motility through the Rho signaling pathway in the human lung adenocarcinoma cell line A549. At 48 h after irradiation, the wound-healing assay demonstrated that migration was significantly greater in cells irradiated with C-ion than in unirradiated cells. Similarly, F-actin staining showed that the formation of protrusions was significantly increased in cells irradiated with C-ion compared with unirradiated cells. Western-blot analysis showed that C-ion irradiation increased P-MLC2 expression compared with in unirradiated controls. Exposure to a non-toxic concentration of Y-27632, a specific inhibitor of ROCK, reduced the expression of P-MLC2 after C-ion irradiation, resulting in a significant reduction in migration. These data suggest that C-ion irradiation increases cell motility in A549 cells via the Rho signaling pathway and that ROCK inhibition reduces that effect.

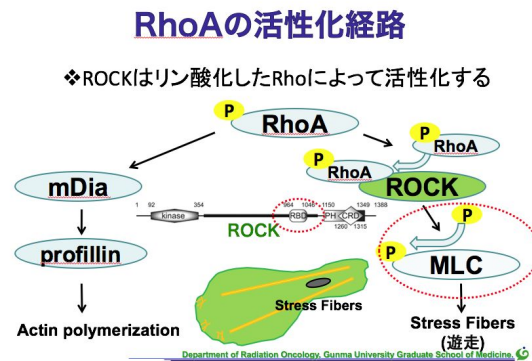
研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：ヒト肺腺癌細胞 炭素線照射 遊走能 Rho ROCK

### 1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌に対する放射線治療の治療成績はまだ十分とはいえない。炭素線治療は癌病巣への高度な線量集中性と癌に対する優れた生物効果を合わせ持っていることから、非小細胞肺癌に対して局所制御率の向上が期待されている。しかし、炭素線治療は早期非小細胞肺癌に対する優れた局所制御を示す一方で、依然、照射野辺縁再発が20%程度見られると報告されている。培養細胞を用いた系ではX線照射により腫瘍細胞の遊走能が亢進する現象が報告されており、炭素線治療後に癌細胞の遊走能が増強することによって腫瘍細胞が照射範囲外へ移動することが照射野辺縁再発の原因となる可能性が示唆されている。

しかし、炭素線による遊走能に対する影響やその発生メカニズムの分析については、十分に行われていないのが現状である。また、遊走シグナル伝達経路の一つである Rho において、Rho-associated coiled coil-forming protein kinase (ROCK)は、ミオシン軽鎖のリン酸化を調節することによって、アクチンミオシンの収縮性を増加させて、ストレスファイバーや細胞突起を形成して遊走能をコントロールしている。



図：Rho 活性化経路における ROCK の役割

### 2. 研究の目的

本研究ではヒト肺腺癌細胞株を用いて、癌細胞の遊走能におよぼす炭素線の影響およびそのメカニズムについて ROCK との関連を含め検討した。

### 3. 研究の方法

細胞はヒト肺腺癌細胞株 A549 を用いた。照射には日本原子力機構高崎研究所の TIARA 加速器から得られる炭素線（線エネルギー付与 108 keV/μm，線量域 0~8 Gy）を用いた。遊走能の放射線照射による影響と ROCK との関連については、その特異的阻害薬である Y27632 を併用し、in vitro にて探索した。

## 方法

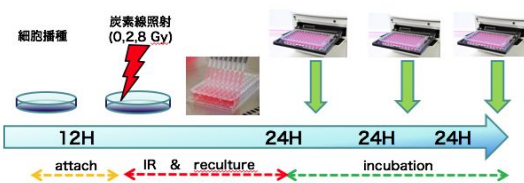
- ◆細胞株： ヒト肺腺癌細胞株 (A549)
- ◆X線照射(群馬大学)： FAXITRON RX-650, 100 kVp, 4.5 mA, 0-10 Gy
- ◆炭素線照射(日本原子力機構高崎研究所)： TIARA, 18.3 MeV/amu, 108 keV/μm, 0-8Gy
- ◆ROCK阻害剤： Y-27632 30 μMに希釈し細胞に48時間接触
- ◆実験： Clonogenic assay (生残率)  
WST-1 assay(細胞増殖率)  
Wound healing assay(遊走能)  
Western blots (遊走能関連タンパク)
- ◆統計解析： student's t-test ANOVA  
Department of Radiation Oncology, Gunma University Graduate School of Medicine

図：研究の材料と方法まとめ

### 4. 研究成果

(1) 炭素線照射による細胞増殖能への影響  
炭素線照射による細胞増殖能への影響を確認するため、WST-1 アッセイを行った。この実験では A549 が炭素線照射後から 72 時間以降において、非照射群に比較して有意に増殖能が低下した。そのため、増殖能による影響を最小にするため、遊走能に関する実験は炭素線照射から 48 時間以内の現象について検討した。

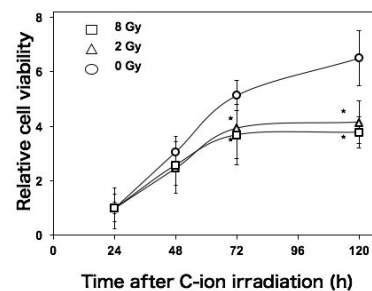
### WST-1 cell Proliferation Assay



WST-1は細胞のミトコンドリア脱水素酵素の活性を見る。WST-1の代謝物であるホルマザン色素の生成増加は代謝活性のある細胞の数と直線的な相関を示す。

Department of Radiation Oncology, Gunma University Graduate School of Medicine

### 結果.WST-1 cell Proliferation Assay



Department of Radiation Oncology, Gunma University Graduate School of Medicine

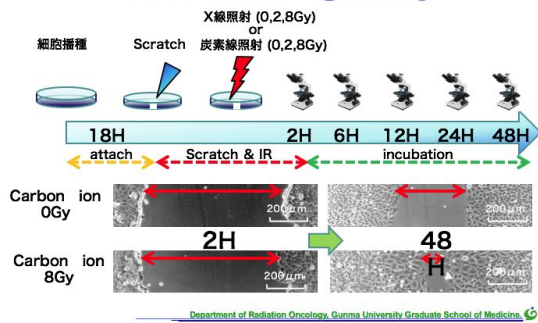
図：WST-1 アッセイ

(横軸が照射後の時間経過、縦軸が生残率を示す。炭素線照射後 24 時間の吸光度を 1 とした比率で表示している。が非照射群、が炭素線 2 Gy 照射群、炭素線 8Gy 照射群の結果を示している。この実験では A549 が炭素線照射後から 72 時間以降において、非照射群に比較して有意に増殖能が低下した。そのため、増殖能による影響を最小にするため、遊走能に関する実験は炭素線照射から 48 時間以内の現象について検討した。)

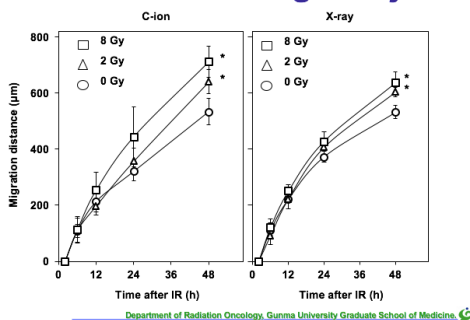
## (2) 炭素線照射による遊走能への影響

炭素線照射による遊走距離の変化を観察するために wound-healing-assay を行った。炭素線(2 Gy または 8 Gy)を照射した細胞群では、非照射の細胞群と比較して、照射後 48 時間の遊走距離が有意に長く、さらに高線量を照射した細胞群では遊走距離が長くなっており、炭素線が遊走能を増強することが示唆された。

### Wound healing assay



### 結果. Wound healing assay

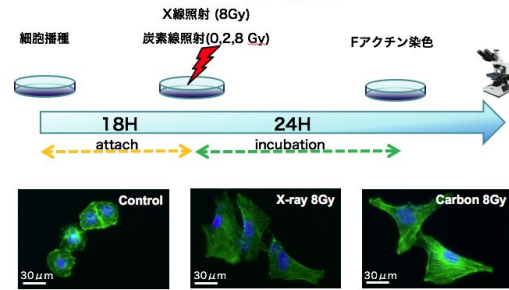


図：wound-healing アッセイ

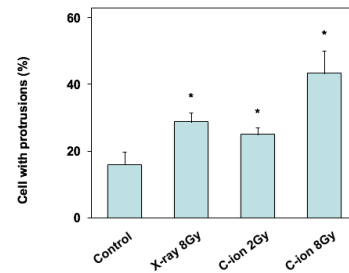
(横軸が照射後の時間経過、縦軸が遊走距離を示す。炭素線照射後 2 時間の wound 幅を基準としてその後の細胞の移動距離を遊走距離としている。炭素線(2 Gy または 8 Gy)を照射した細胞群では、非照射の細胞群と比較して、照射後 48 時間の遊走距離が有意に長く、さらに高線量を照射した細胞群では遊走距離が長くなっており、炭素線が遊走能を増強することが示唆された。参考として X 線でも同様の実験を行いました。2 Gy または 8 Gy を照射した細胞群では、非照射の細胞群と比較して、照射後 48 時間の遊走距離が有意に長く、さらに高線量を照射した細胞群では遊走距離が長くなっており、炭素線が遊走能を増強することが示唆された。)

細胞骨格への影響を観察するため、F アクチン染色を施行すると、炭素線非照射群と比較して炭素線(2 Gy または 8 Gy)を照射した細胞群では細胞遊走時に見られる細胞骨格変化の一つである突起形成の出現率が有意に高く、この結果から細胞形態学的にも炭素線照射が遊走能を亢進させることが示唆された。

### F-actin 染色



### 結果. F-actin 染色



図：F アクチン染色

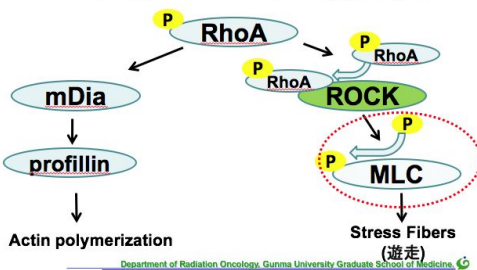
(横軸が照射後の時間経過、縦軸が生残率を示す。炭素線照射後 24 時間の吸光度を 1 とした比率で表示している。が非照射群、炭素線 2 Gy 照射群、炭素線 8Gy 照射群の結果を示している。この実験では A549 が炭素線照射後から 72 時間以降において、非照射群と比較して有意に増殖能が低下した。そのため、増殖能による影響を最小にするため、遊走能に関する実験は炭素線照射から 48 時間以内の現象について検討した。)

## (3) 炭素線照射後の遊走能亢進における Rho シグナル伝達経路の関与

次に A549 における炭素線照射後の細胞遊走能の増大に対する Rho シグナル伝達経路の関与をウェスタンブロットにより調べた。ウェスタンブロットでは炭素線照射後におけるミオシン軽鎖(MLC2)とリン酸化したミオシン軽鎖(P-MLC2-S19)について観察した。MLC2 の総量は炭素線照射の有無によって変化しなかったが、P-MLC2-S19 は、炭素線 8 Gy 照射群で、非照射群と比較して発現が増加することが確認された。このリン酸化 MLC2 は照射後 24 時間まで時間依存性に増加した。

## Rhoファミリーの活性化経路

❖ROCKはリン酸化したRhoAによって活性化する

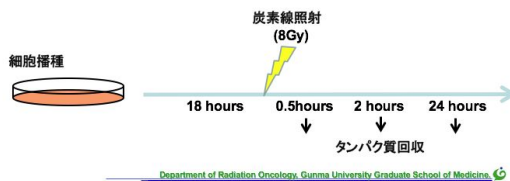


図：Rho ファミリーの活性化経路

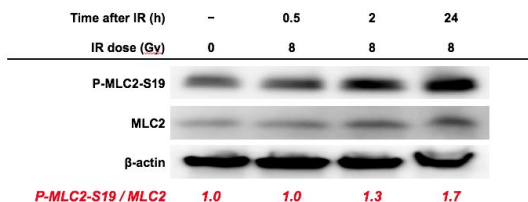
(Rho ファミリーの活性化経路は図に示すように、活性化型 RhoA がコイルドコイルドメインの C 末端側の Rho 結合領域に結合することで ROCK の立体構造が変化し活性化する。活性化した ROCK が MLC をリン酸化してアクチンミオシンのストレスファイバーの収縮などを促す最終的な変化であるミオシンのリン酸化を確認する事にする。)

## Western blot

- ❖ 標的タンパク質：MLC、P-MLC
- ❖ 炭素線照射の0.5, 2, 24時間後にタンパク質回収



## 結果.Western blot



図：ウェスタンブロット

(リン酸化ミオシン軽鎖のバンドを MLC2 のバンドの黒化度で割り、画像解析した。また、算出された値の未処置群を相対値 1 として評価した。MLC2 の総量は炭素線照射の有無によって変化しなかったが、P-MLC2-S19 は、炭素線 8 Gy 照射群で、非照射群と比較して発現が増加することが確認された。このリン酸化 MLC2 は照射後 24 時間まで時間依存性に増加した。これらの結果は、Rho シグナル伝達経路の活性化が、炭素線照射を受けた A549 における細胞遊走能の増加に寄与する可能性を示している。そこで我々は、ROCK の特異的阻害剤である Y-27632 を使用して、ROCK の阻害が炭素線照射による細胞遊走能の増加を抑制するかどうか調べた。)

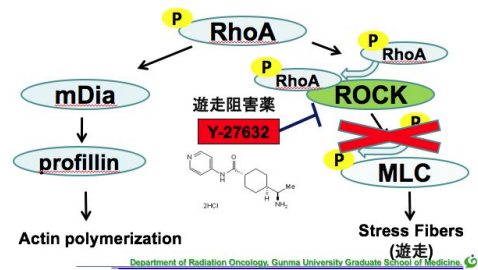
## (4) 炭素線照射後の遊走能亢進における ROCK 阻害剤の効果

上記(3)の結果から、Rho シグナル伝達経路の活性化が、炭素線照射を受けた A549

における細胞遊走能の増加に寄与する可能性を示している。そこで我々は、ROCK の特異的阻害剤である Y-27632 を使用して、ROCK の阻害が炭素線照射による細胞遊走能の増加を抑制するかどうか調べた。

## ROCK阻害剤の遊走抑制メカニズム

❖Y-27632はROCKの活動を特異的に抑制する

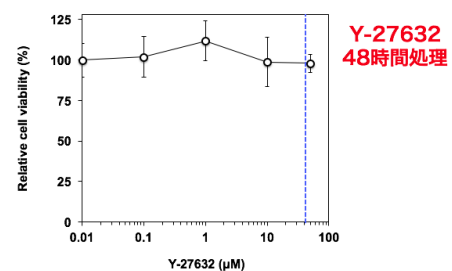


図：ROCK 阻害剤の遊走抑制機序

(Rock は RhoA によって調整され、リン酸化によって活性化する。この下流にはミオシン軽鎖があり、ミオシンはリン酸化によって migration を引き起こす。Y-27632 はこの ROCK を特異的に阻害し、ミオシンのリン酸化を阻害する。)

まず、WST-1 アッセイを用いて A549 に対する Y-27632 の非毒性濃度を求めた。WST-1 アッセイでは、薬剤投与後 48 時間において Y-27632 の濃度が 0.01~100  $\mu\text{M}$  の範囲では、暴露された細胞の生存率に有意な影響がないことを確認した。これらの結果から、ROCK の阻害試験に Y-27632 を細胞生存率に影響を及ぼさない濃度である 30  $\mu\text{M}$  で用いた。

## 結果.Y-27632細胞毒性試験



図：Y27632 併用 WST-1 アッセイ

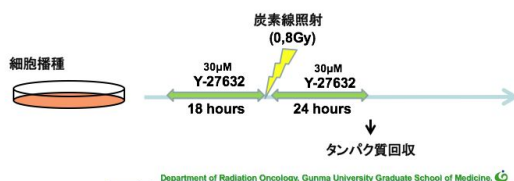
(縦軸は薬剤処理開始後 48 時間における細胞生存率を示している。コントロールとして Y27632 未処理群の吸光度を 100%としている WST-1 アッセイを用いて A549 に対する Y-27632 の非毒性濃度を求めた。WST-1 アッセイでは、薬剤投与後 48 時間において Y-27632 の濃度が 0.01~50  $\mu\text{M}$  の範囲では、暴露された細胞の生存率に有意な影響がないことを確認した。これらの結果から、ROCK の阻害試験に Y-27632 を細胞生存率に影響を及ぼさない濃度である 30  $\mu\text{M}$  で用いた。)

Y-27632 添加培地での A549 細胞への炭素線照射実験におけるウェスタンブロット分析では、P-MLC2-S19 の発現が照射の有無にかかわらず全サンプルにおいて減少した。この際、Y-27632 は炭素線 8 Gy の照射により

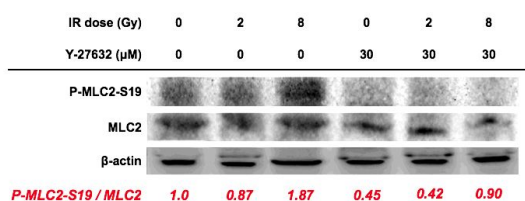
亢進した P-MLC2-S19 の発現レベルを非照射群と同様のレベルにまで減少させた。

### Y-27632併用 Western blot

- ❖ 標的タンパク質: MLC、P-MLC
- ❖ 炭素線照射の24時間後にタンパク質回収



### 結果.Y-27632併用 Western blot



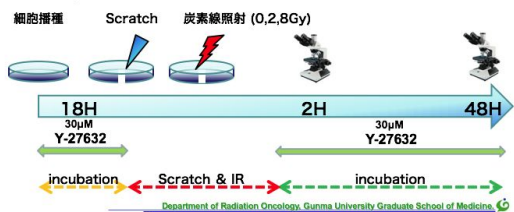
### 図: Y27632 併用ウェスタンブロット

(リン酸化ミオシン軽鎖のバンドを MLC2 のバンドの黒化度で割り、画像解析した。また、算出された値の未処置群を相対値 1 として評価した。P-MLC2-S19 の発現が照射の有無にかかわらず全サンプルにおいて減少した。この際、Y-27632 は炭素線 8 Gy の照射により亢進した P-MLC2-S19 の発現レベルを非照射群と同様のレベルにまで減少させた。)

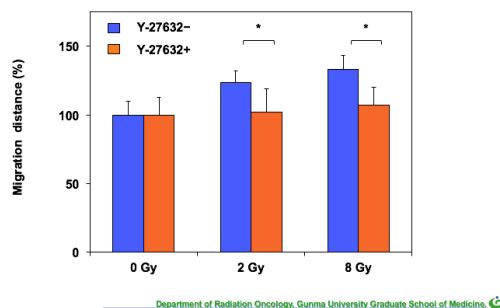
さらに、wound-healing-assay では炭素線照射(2 Gy または 8 Gy)で亢進した遊走距離を Y-27632 が有意に減少させた。

### Y-27632併用 Wound healing assay

- ❖ ROCK阻害剤 Y-27632を添加
- ❖ 炭素線照射後48時間でWST-1assayとWound healing assayを施行した。



### 結果.Y-27632併用 Wound healing assay



### 図: Y27632 併用 wound-healing アッセイ

(縦軸は薬剤処理開始後 48 時間における細胞生存率を示している。コントロールとして Y27632 未処理群の吸光度を 100%としている WST-1 アッセイを用いて A549 に対する Y-27632 の非毒性濃度を求めた。WST-1 アッセイでは、薬剤投与後 48 時間において Y-27632 の濃度が 0.01~50 µM の範囲では、暴露された細胞の生存率に有意な影響がないことを確認した。これらの結果から、ROCK の阻害試験に Y-27632 を細胞生存率に影響を及ぼさない濃度である 30µM で用いた。)

以上の結果より、炭素線照射は Rho シグナル経路の ROCK を介して A549 における細胞遊走能を増大させ、その ROCK を阻害することで、遊走能の増大を抑制す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 1 件)

Kazutoshi Murata · Shin-Ei Noda · Takahiro Oike · Akihisa Takahashi · Yukari Yoshida · Yoshiyuki Suzuki · Tatsuya Ohno · Tomoo Funayama · Yasuhiko Kobayashi · Takeo Takahashi · Takashi Nakano  
 “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,” Journal of Radiation Research 03/2014 査読有り DOI: 10.1093/jrr/rru002

[学会発表](計 3 件)

Increase in cell motility by carbon ion irradiation via the Rho signaling pathway and its inhibition by the ROCK inhibitor Y-27632, Kazutoshi Murata, Shinei Noda, Takahiro Oike, Akihisa Takahashi, Yukari Yoshida, Yoshiyuki Suzuki, Tatsuya Ohno, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Takeo Takahashi, Takashi Nakano, ICRR2015、国立京都国際会館(京都府京都市)、ポスター、審査有、Excellent Poster Award 獲得、2015/05/25

肺腺癌細胞における炭素線誘発遊走能増加と遊走能に対する ROCK 阻害剤の抑制作用について

村田 和俊, 野田 真永, 尾池 貴洋, 高橋 昭久, 吉田 由香里, 鈴木 義行, 大野 達也, 舟山知夫, 小林 泰彦, 高橋 健夫, 中野 隆史 第 52 回癌治療学会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) ポスター、審査有、2014/8/28

Increase in cell motility by C-ion irradiation and its inhibition by the ROCK inhibitor in lung adenocarcinoma cells, Kazutoshi MURATA, Shin-ei NODA, Takahiro OIKE, Akihisa TAKAHASHI, Yukari YOSHIDA, Yoshiyuki SUZUKI, Tatsuya OHNO, Tomoo FUNAYAMA, Yasuhiko KOBAYASHI, Takeo TAKAHASHI, Takashi NAKANO, 53rd Ann Meeting of Particle Therapy Co-operative Group (PTCOG53), Shanghai, China、口演、審査有、2014/6/8-14

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 和俊 (MURATA, Kazutoshi)  
群馬大学・重粒子医学推進機構・助教  
研究者番号：60644557