

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290055

研究課題名(和文)光子線と粒子線のがん転移への影響の比較

研究課題名(英文)Comparison of the effect to cancer metastasis between photon and particle beam

研究代表者

小泉 雅彦(koizumi, masahiko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90186594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：各種がん細胞(肺がん、乳がん、膵がん、前立腺がん)に対しX線、炭素イオン線、陽子線を段階的に照射し、がん転移に関わる細胞遊走能、浸潤能を比較検討した結果、低線量X線照射により、遊走・浸潤能が亢進した。一方、炭素イオン線照射された細胞は、線量依存的にこれらの能力が抑制された。陽子線は、低線量照射により、遊走・浸潤能共に亢進し、高線量照射により抑制されることが示された。分子生物学的な解析の結果、炭素イオン線照射では核膜タンパク質SUNの遺伝子発現が抑制されていたことに対し、X線照射では、SUNの発現が有意に亢進している結果を得た。本研究により、粒子線にがん転移抑制効果がある可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The cell migration and invasion capability were evaluated after X, carbon ion or proton beam irradiation on each cancer cell lines (lung, breast, pancreatic and prostate cancer). Low dose X-irradiation enhanced the cell migration and invasion. Carbon ion beam inhibited the capability dose dependently. Proton beam had unique character. Low dose proton irradiation enhanced the cell migration and invasion, on the other hand, high dose inhibited the metastatic potentials. The expression of nuclear membrane protein SUN was increased by X-irradiation. Carbon ion beam didn't have ability that increased the expression of SUN. We have demonstrated that particle therapy has inhibited the cancer metastatic potentials compared with photon therapy.

研究分野：放射線治療学

キーワード：がん転移 炭素イオン線 陽子線 遊走能 浸潤能 SUN CD44

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は3次元放射線治療(3D-CRT)、強度変調放射線治療(IMRT)や定位放射線治療(SRT)等により、腫瘍に局限した高線量の治療が可能となり、物理分野において体内標的体積(ITV)を縮小し、臨床的腫瘍体積(CTV)に近接した照射野設定を目指す研究が行われている。しかし、照射野をより縮小するための安全域設定について、生物学的根拠は乏しく経験則に基づいている状況であった。

2. 研究の目的

我々は、特に照射野辺縁部で想定される亜致死線量照射により、がんの浸潤・転移能と血管新生能が亢進する危険性を、細胞機能、タンパク発現量の変動で証明してきた。急速に発展しつつある粒子線にも着目し、X線、炭素イオン線、陽子線照射によるがん転移能への影響を比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

各種細胞株(肺がん:A549, EBC-1、乳がん:MDA-MB-231、膵がん:AsPC-1, Panc-1、血管内皮細胞:HUVEC, ECV304)にX線、炭素イオン線、陽子線を段階的に(0.5、2、10 GyE)照射し、それぞれに対応する実験を行った。

4. 研究成果

X線照射された細胞の遊走能、浸潤能は低線量で亢進したが、炭素イオン線照射では抑制されていた。陽子線を照射された細胞は、低線量でこれらの能力が亢進、高線量で抑制された(data not shown)。

次にヒト膵癌細胞 PANC-1 および AsPC-1 を用いて、X線照射を行うと、線量依存的に CD24<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> 細胞の割合が増加した。一方、炭素イオン線を照射された細胞では、CD24<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> 細胞の割合に変化はみられなかった (Fig. 1)。

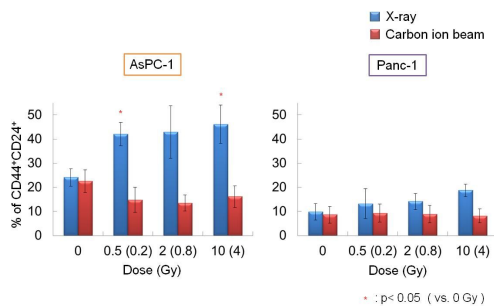


Fig. 1: X線、炭素イオン線が幹細胞マーカーに与える影響

次に、癌幹細胞と非癌幹細胞に分離し、それぞれの細胞に対して遊走能、浸潤能を検討した結果、非癌幹細胞はX線照射、炭素イオン線照射により線量依存的に遊走能、浸潤能が抑制された。一方、癌幹細胞では、X線照射された細胞の遊走能、浸潤能は抑制されず、炭素イオン線では線量依存的に抑制された (Fig. 2 A, B)。

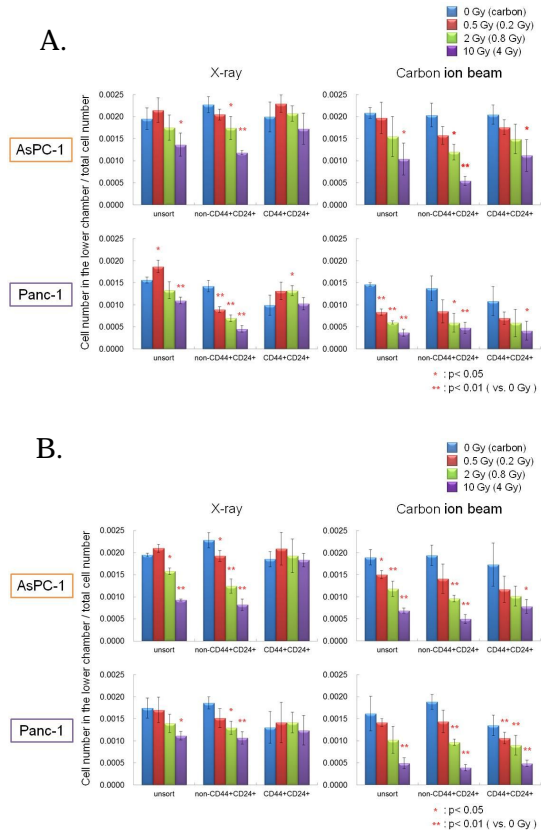


Fig. 2: 癌幹細胞と非癌幹細胞の (A) 遊走能 (B) 浸潤能に対する放射線の影響

この結果、炭素イオン線は細胞の性質に関係なく転移能を抑制することが示された。また、低線量のX線照射による転移能亢進の一因が、癌幹細胞などの細胞の性質や性状にある可能性が示された。

低分化型ヒト膵がん細胞株 AsPC-1 に 4MV X線 0.5、2、8 Gy を照射した。照射 24 時間、48 時間後に細胞の RNA を抽出し、定量 RT-PCR により CD44 total isoform、CD44s、CD44v6 (exon11)、CD44v9 (exon14)、CD44v10 (exon15) の mRNA の発現変化を評価した。また、照射 24 時間後に flow cytometry により CD44 total isoform の発現変化を評価した。CD44s をノックダウンし、細胞生存率を検討した。上皮間葉転換マーカーの発現を western blot により評価した。照射 24 時間、48 時間後において CD44

total isoform、CD44s は線量に比例して mRNA の増加する傾向がみられ、8Gy では 0Gy に対し有意な差が得られた (Fig. 3)。

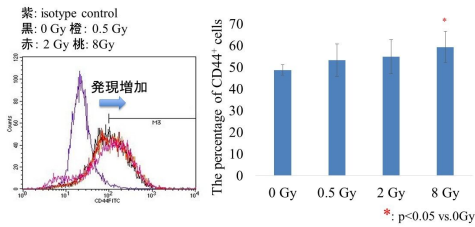


Fig. 3: X線照射によるCD44の発現

また、CD44v9、CD44v10 も有意な差は得られなかったが、線量に比例して mRNA の増加する傾向がみられた。一方、CD44v6 は X線照射 24 時間、48 時間後において線量に比例した mRNA の発現変化はみられず他と異なる傾向がみられた。また、flow cytometry より X線照射 24 時間後にタンパクレベルでも CD44 total isoform が線量に比例して増加する傾向がみられた (Fig. 4)。

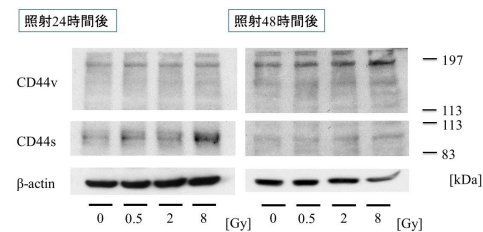


Fig. 4: X線照射によるCD44vおよびCD44sのタンパク発現変化

これらの結果よりCD44の発現はX線照射により亢進し、様々な isoform の中で特に CD44s が放射線抵抗性に寄与している可能性が示唆された。そこで CD44s をノックダウンし、細胞生存率を colony formation assay で検討すると、CD44s ノックダウン細胞の生存率は、control に比べて有意に低下した (Fig. 5)。

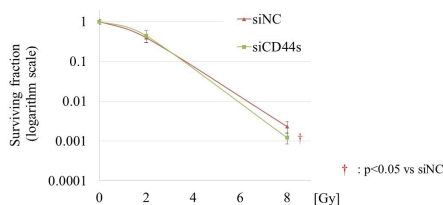


Fig. 5: CD44s ノックダウン細胞の放射線感受性

また、CD44s をノックダウンすると、細胞生存に関わる Erk のリン酸化、上皮間葉転換マーカーである Slug、Zeb 1 のタンパク発現が抑制された (Fig. 6)。

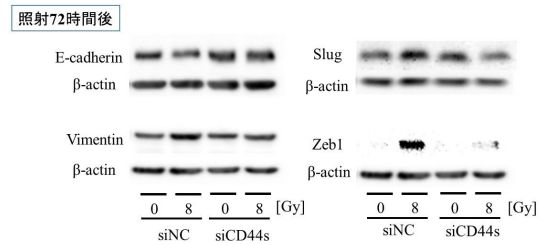


Fig. 6: CD44s ノックダウンによる上皮間葉転換マーカーのタンパク発現変化

これらの結果から、CD44s は、細胞の X線抵抗性に寄与する可能性が示された。

MDA-MB 231 が持つ SUN1 variant を調べる為に RT-PCR を行い、MDA-MB 231 細胞が持つ SUN1 variant の種類を同定した。同定した SUN1 variant を対象細胞に過剰発現させ遊走能・浸潤能に変化がみられるか検討した。対象に X線 (4MV) および炭素イオン線 (290MeV/u, 6cmSOBP) を照射した。細胞遊走能に関連する可能性のある SUN1 variant をノックダウンさせた細胞を用いて、X線照射後の遊走能を評価した。さらに variant 候補を絞り、その variant をノックダウンさせた細胞を用いて、炭素イオン線照射後の遊走能を検討した。

SUN1 には多くの variant が存在することが報告されている為、MDA-MB 231 がもつ SUN1 variant の mRNA level を RT-PCR で検討した。その結果、916 が最も多く、次点で 888、785 が多いという結果を得た (Fig. 7)。

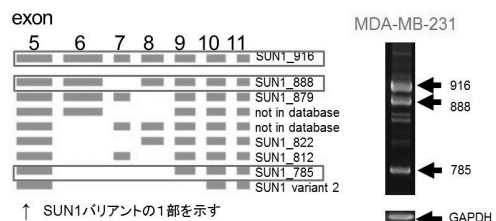


Fig. 7 ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 がもつ SUN1 variant の種類

次に、SUN1 variant を過剰発現させ、遊走能・浸潤能を検討した結果、785 および 888 を過剰発現させた細胞で有意に遊走能・浸潤能が亢進した (Fig. 8)。

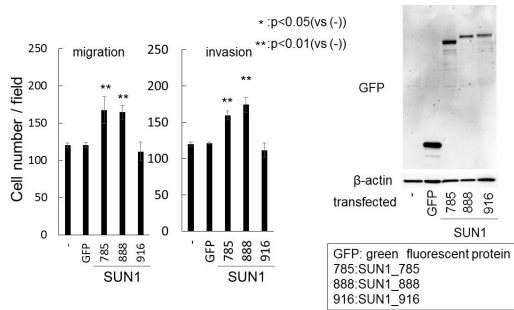


Fig. 8 SUN1 過剰発現による遊走能・浸潤能への影響

X線、炭素イオン線を照射した細胞に対し SUN1 variant の mRNA level を検討した結果、X線 0.5 Gy 照射された細胞は、48 時間後まで variant 888 の mRNA level が亢進した。一方で、炭素イオン線では、888 の mRNA level に亢進はみられなかった (Fig. 9)。

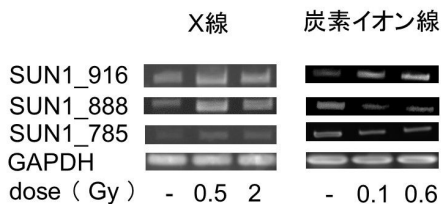


Fig. 9 X線・炭素イオン線照射 48 時間後の SUN1 variant mRNA level の比較

さらに、SUN1 variant 916 および 888 をノックダウンさせた細胞を用いて X線照射後の遊走能を検討したところ、888 をノックダウンした細胞の遊走能は放射線を照射されても亢進しないことが分かった (Fig. 10)。

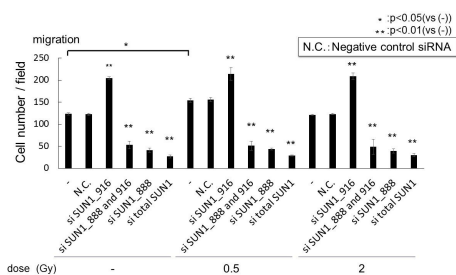


Fig. 10 SUN1 variant ノックダウン細胞の放射線照射後の遊走能の変化

そこで、SUN1 variant 888 をノックダウンした細胞を用いて、炭素イオン線を照射したところ、888 ノックダウンと negative control の間に有意な差はみられなかった (data not shown)。これらの結果から、核膜タンパク SUN が X線照射による細胞遊走・浸潤能の亢進に關与することが示唆された。また、炭素イオン線は、SUN の発現を抑制し、

細胞遊走・浸潤能を抑制するメカニズムが存在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 6 件)

Minami K, Liu S, Liu Y, Chen AB, Wan Q, Na S, Li B, Matsuura N, Koizumi M, Yin Y, Gan L, Xu A, Li J, Nakshatri H, Yokota H. Inhibitory Effects of Dopamine Receptor D1 Agonist on Mammary Tumor and Bone Metastasis. *Sci Rep.* 7:45686, 2017 doi: 10.1038/srep45686.

Inui S, Minami K, Ito E, Koizumi M, Sawa Y, Matsuura N. Irradiation strongly reduces tumorigenesis of human induced pluripotent stem cells. *J Radiat Res.* 3:1-9, 2017 doi: 10.1093/jrr/rrw124.

Minami K, Hamada Y, Kawaguchi N, Mori S, Nakatani K, Tsubouchi K, Hayashi N, Yamamoto H, Koizumi M. The combined effect of an anti-microtubule agent TZT-1027 and radiation on tumor angiogenesis. *Nano Biomedicine* 8(2), 83-90, 2016 doi: org/10.11344/nano.8.83

Chen AB, Minami K, Raposo JF, Matsuura N, Koizumi M, Yokota H, Ferreira HG. Transient modulation of calcium and parathyroid hormone stimulates bone formation. *Endocrine.* 54(1): 232-240, 2016 doi: 10.1007/s12020-016-1066-7

Minami K, Koizumi M, Hamada Y, Mori S, Kawaguchi N, Manabe M, Imaizumi H, Nakatani K, Matsuura N. The effect of carbon ion beam irradiation for hypoxia-mediated invasion of glioblastoma. *Nano Biomedicine* 6(1), 1-11, 2014 doi.org/10.11344/nano.6.1

Hamamura K, Minami K, Tanjung N, Wan Q, Koizumi M, Matsuura N, Na S,

Yokota H. Attenuation of malignant phenotypes of breast cancer cells through eIF2 $\alpha$ -mediated downregulation of Rac1 signaling. Int J Oncol. 44(6):1980-8. 2014 doi: 10.3892/ijco.2014.2366.

〔学会発表〕(計 8 件)

Tsubouchi K, Hayashi N, Minami K, Yamamoto H, Koizumi M. Investigation into the role of CD44 on pancreatic cancer cells after ionizing irradiation. The 5<sup>th</sup> International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, Osaka, Japan, March 11-12, 2017

坪内 健人、林 直紀、皆巳 和賢、山本 浩文、小泉 雅彦 膵癌細胞における放射線照射後の CD44 の働きに関する検討 日本放射線影響学会第 59 回大会 広島 2016 年 10 月 27 日

Minami K, Chen AB, Matsuura N, Koizumi M, Yokota H. Effects of Injecting Calcium or Calcium Chelator on Bone Mineral Density in Ovariectomized Mice ORS Annual Meeting, Florida, USA, Mar. 6, 2016

Yoshizaki K, Seo Y, Minami K, Tamari K, Takashina M, Isohashi F, Ogawa K and Koizumi M. The Sensitizing Effect of PARP Inhibitors with High-dose Irradiation in Colorectal Cancer Cell Lines. The 4th International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals 大阪 2016 年 2 月 27 日

Yoshizaki K, Seo Y, Minami K, Tamari K, Takashina M, Isohashi F, Ogawa K and Koizumi M. The Sensitizing Effect of PARP Inhibitors with High-dose Irradiation in Colorectal Cancer Cell Lines. 国際癌治療増感研究シンポジウム 奈良 2016 年 2 月 6 日

Kazumasa Minami, Kana Nakatani,

Hiromasa Imaizumi, Mika Okazaki, Katsutoshi Sato, Masahiko Koizumi Comparison of the effect X-ray, carbon ion beam and proton beam on metastatic potential. 鹿児島 2014 年 10 月 1 日 - 3 日

皆巳 和賢、今泉 大将、中谷 香菜、松本 孔貴、佐藤 克俊、松浦 成昭、小泉 雅彦 X 線・炭素イオン線のがん転移に与える影響 第 57 回 日本放射線影響学会 鹿児島 2014 年 10 月 2 日  
皆巳 和賢、吉岡 彩、今泉 大将、中谷 香奈、松本 孔貴、佐藤 克俊、松浦 成昭、小泉 雅彦 放射線照射の癌幹細胞の遊走・浸潤能への影響 第 43 回 放射線による制癌シンポジウム 京都 2014 年 7 月 11 日

〔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  
<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~rad-onc/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
小泉 雅彦 (KOIZUMI, Masahiko)  
大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90186594

(2)研究分担者

出水 祐介 (DEMIZU, Yusuke)  
神戸大学・医学系研究科・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・教授

研究者番号：70190402

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )