



Title	放射線照射後の細胞内カルシウム濃度の違いによるがん細胞浸潤能の検討
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/90977
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和4年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	むらかみ ともや 村上 智哉	学部 学科	医学部保健学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	おがわ だいき 小川 大貴	学部 学科	医学部保健学科	学年	3 年
	なかやま かずとし 中山 和駿		医学部保健学科		3 年
					年
アドバイザー教員 氏名	皆巳和賢	所属	医学系研究科保健学専攻 生体物理工学講座		
研究課題名	放射線照射後の細胞内カルシウム濃度の違いによるがん細胞浸潤能の検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				
【背景】 がん細胞に対して、低線量で光子線が照射した場合、生き残ると放射線抵抗性を獲得するだけでなく、がん転移に関係する細胞遊走能ならびに浸潤能が亢進することが報告されている [1-3]。しかし、十分な照射が行われた細胞の場合、生き残っていたとしても細胞遊走能ならびに浸潤能を亢進させることはないとされている。一方、小胞体ストレスにさらされた細胞では、eIF2α/Rac1 のシグナル経路が活性化され、細胞浸潤能が亢進することが先行研究より分かっている [4]。以上より、放射線照射後の細胞浸潤能に対して、小胞体ストレスの程度が関わっている可能性を考えた。 【目的】 放射線照射によって小胞体にストレスが発生すると、カルシウムイオンの放出が生じて、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。今回は、このカルシウムイオンに応答して発現が亢進するタンパク質に着目した。1 つ目は calmodulin、2 つ目は Fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) である。前者は Rac1 を介して浸潤能を亢進し [4]、後者は Irisin の産生を介して EMT を抑制し浸潤能を抑制することで知られている [5]。この 2 つのタンパク質の発現変化と照射線量の関係を調べ、その関係が、がん浸潤能と相関するか否かを明らかにすることが目的である。 【方法】 Calmodulin と FNDC5 の 2 つのタンパク質の発現変化と照射線量の関係性を調べ、がん浸潤能と相関するかどうかを調べるために以下の実験を行った。 ①放射線照射後のタンパク発現解析 γ線を 0.5, 1, 2, 8 Gy と段階的に照射し、24 時間後に細胞のライセートを回収した。そのライセートを用いてウェスタンブロット法により、calmodulin と FNDC5 の発現を検討した。					

②細胞浸潤能の解析

γ線を 0.5, 2, 8 Gy と段階的に照射し、24 時間後に生き残った細胞に対して、マトリゲルを用いた浸潤アッセイを行った。アッセイの 24 時間後に浸潤細胞をホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色液で細胞を染色し、顕微鏡で浸潤細胞数を観察することで細胞浸潤能の評価を行った。

③細胞内カルシウム濃度の測定

γ線を 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy と段階的に照射し、照射 3, 6, 24 時間後の細胞内カルシウム濃度を、カルシウムイオン測定キットを用いて計測をおこなった。

【準備するもの】

使用細胞

- ・ MIA-Pa-Ca-2 由来：ヒト膵臓腺癌

細胞の継代

- ・ Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose
- ・ PBS, pH 7.4
- ・ Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red

ウエスタンブロット法

- ・ 電気泳動
PVDF, 泳動 buffer (Glycine, Tris, SDS) , Turbine buffer (Glycine, Tris, Methanol)
転写装置 (Trans-blot SD Semi Dry Transfer cell; BIO-RAD) , 電源, 水槽, 電極, ろ紙
- ・ タンパク質量の測定
ライセートサンプル, 検量線作成用 BSA 溶液, BCA 溶液 (A 液, B 液) (Pierce BCA Protein Assay kit; Thermo Fisher, Prod #23227) , 96well plate
- ・ ゲル
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8%w/v), 1.5M Tris-HCl; pH8.8 (lower) pH6.8 (Upper), 10%(w/v) SDS, 10%(w/v) ammonium persulfate (APS), TEMED
- ・ 一次抗体
Calmodulin : Rb monoclonal (Cell Signaling Technology, MA, U.S.)
FNDC5 : Rb monoclonal (Cell Signaling Technology)
Beta Actin: Ms monoclonal (Abcam, Cambridge, U.K.)
- ・ 二次抗体
Calmodulin : Goat pAb to Rb IgG (Abcam)
FNDC5 : Goat pAb to Rb IgG (Abcam)
Beta Actin: Goat pAb to Ms IgG (Abcam)
- ・ 蛍光体
Peroxide Solution, Luminol Enhancer Solution (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo scientific)

浸潤アッセイ法

- ・ マトリゲル, グリセリン, 0.1%BSA 溶液, 24 well plate, 10%FBS DMEM, chemotaxicell [8 μm]
ヘマトキシリン・エオジン染色液

カルシウム濃度測定

・細胞内カルシウムイオン測定キット Fluo 4 (Dojindo)

【結果・考察】

①放射線照射後のタンパク発現解析

ウエスタンブロット法の結果を以下の図 1 に示す。

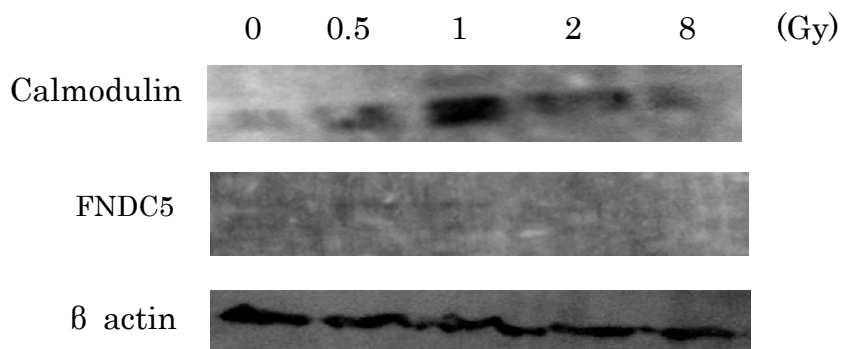


図 1: ウエスタンブロットの結果

図 1 より、Calmodulin の量が 1 Gy にかけて増加し、それ以降は低下していることが分かった。

また、FNDC5 の量は正確に測定することが出来なかった。原因としては、PVDF の乾燥や抗体の過多、ブロッキング液が不適切などによってバックグラウンド上昇が考えられ、乾燥の防止、抗体の量およびブロッキング液を変えるなど様々な手段で追試を行ったが、最終的に正確な結果を得ることができなかった。

②細胞浸潤能の解析

浸潤アッセイ法の結果を以下に示す。

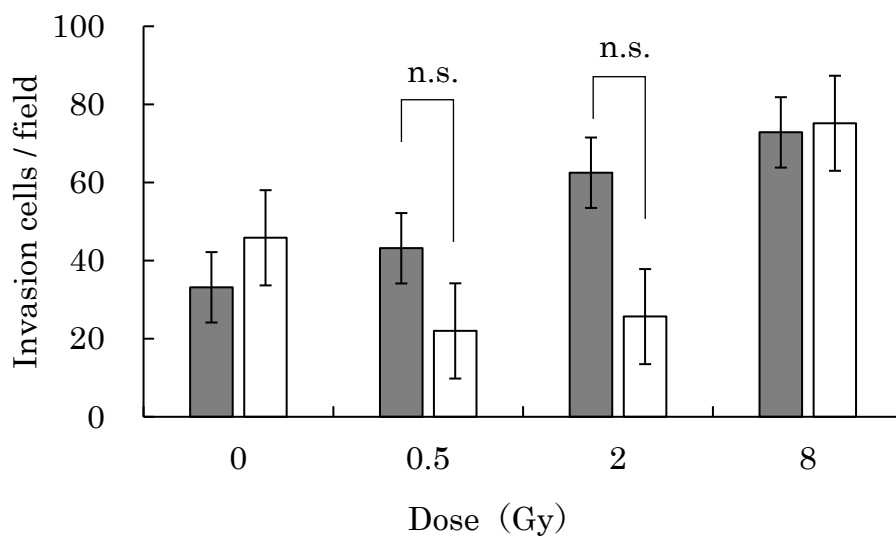


図 2: 浸潤した細胞と照射線量の関係性を示したグラフ

左側がコントロール、右側がイリシン付加 (n.s.は有意差なしを示す)

図 2 より 0 Gy, 8 Gy では差がみられなかったが、0.5 Gy、2 Gy においてはコントロールの方が、イリシン負荷に比べて浸潤能が増加していることが分かった。このことから、低線量の放射線治療においては、イリシンを付加することによって術後の転移を比較的抑えることができる。ただし、コントロールとイリシン付加細胞では検定上の有意差はなく傾向がみられたにとどまる。また、全体的に照射線量が増加するにつれて、浸潤能が増加しているが、先行研究では浸潤能は 8 Gy には低下していることが示されている。これに関しては一回目の計測において、初めての観測のために、カウントの誤差、適切な拭き取りができていなかった等が原因であると考えられる。二回目の計測に関しては先行研究同様浸潤能の低下がみられた。

③細胞内カルシウム濃度の測定

細胞カルシウム濃度の測定に関しては結果を得ることができなかった。理由としては、カルシウム濃度の変化は一瞬で起きるということにあると考えられる。神経細胞に刺激を与えた場合、カルシウム濃度の変化は約 4 秒間に起きるとされている[6]。放射線に関しても電磁波の一種であり、このような条件を満たしていると考えられる。そのため、今回の実験手順のように 3 時間後など時間を空けてしまうと、濃度変化は既に終わってしまっており結果を観測できなくなってしまう。正確な実験結果を得るためには、放射線を当てた後から変化するまでをリアルタイムで追跡できるような手法が必要になってくると考えられる。

【まとめ・展望】

ウエスタンブロット法の関係から低線量を照射すると Calmodulin は増加し、高線量では低下することが分かった。また、浸潤アッセイ法の結果からは Irisin を負荷することによって浸潤を抑えることができることが分かった。FNDC5 の生成する Irisin が浸潤能を低下させることが考えられる。FNDC5 は筋肉内に存在しており[7]、サルコペニアのように筋肉量が低下している場合、もしくは、肥満・2 型糖尿病に関しては FNDC5 の発現量が低下するとされていることから[7]、そのような疾患を持っていた場合、放射線治療を行ったとき、他の人に比べて浸潤しやすい、もしくは転移しやすい可能性が考えられる。一方で、筋肉量が十分である患者であれば、比較的浸潤を抑えることが見込まれる。また、FNDC5 の量が線量につれて増加すると仮定するならば、寡分割照射で治療を行う方が浸潤を防ぐことができると考えられる。しかしながら、カルシウム濃度の測定に関しては実験結果を得ることができなかったため、カルシウム濃度と癌細胞の浸潤能の関係性を解明することはできなかった。また線量を増加させるにつれて、FNDC5 が増加しているという確実な実験結果をえることもできなかった。今後の課題としては、細胞内のカルシウム濃度をリアルタイムイメージングする手段の検討、ウエスタンブロット法において FNDC5 をより鮮明に映す手段の解明が挙げられる。

【参考文献】

1. Ogata T, Teshima T, Kagawa K, et al. Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. Cancer Res. 65(1):113-20, 2005.
2. Minami K, Koizumi M, Hamada Y, et al. The effect of carbon ion beam irradiation for hypoxia mediated invasion of glioblastoma. Nano biomedicine 6(1):1-11, 2014
3. Imaizumi H, Sato K, Nishihara A, et al. X-ray-enhanced cancer cell migration requires the

- linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex. *Cancer Science* 109(4):1158-1165, 2018.
4. Hamamura K, Minami K, Tanjung N et al. Attenuation of malignant phenotypes of breast cancer cells through eIF2 α -mediated downregulation of Rac1 signaling. *International journal of oncology* 44(6) 1980-1988, 2014
 5. Liu J, Song N, Huang Y, et al. Irisin inhibits pancreatic cancer cell growth via the AMPK-mTOR pathway. *Sci Rep.* 8(1):15247, 2018.
 6. 中村健. (2003). 神経細胞内局所的カルシウム濃度変化のリアルタイムイメージング法. *日本薬理学雑誌*, 121(5), 357-364.
 7. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 98(4): 769-78, 2013.