

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

村田 和俊 印

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

(ヒト肺腺癌細胞A549における炭素線誘発遊走能増加と、増加した遊走能に対するROCK阻害剤Y-27632の抑制作用について)

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増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、アクト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。そこで、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。

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/ $\mu$ m, 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。最初に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。次に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。また、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増進させることが示唆された。

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。

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。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  $\mu$  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  $\mu$  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。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。

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。