

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34448

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08775

研究課題名(和文) 癌の浸潤転移における FGF 受容体とインテグリンのクロスシグナリング

研究課題名(英文) The cross-signaling of FGF receptor and integrin in cancer invasion and metastasis.

研究代表者

森 誠司 (Mori, Seiji)

森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90467506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：接着分子インテグリンとFGF受容体は、がんの進展に重要な役割をはたす。これまでFGFがFGF受容体のみならずインテグリンとも相互作用することを明らかにしている。本研究では、がんの浸潤転移における3者の協調作用に着目し解析を行った。FGFファミリー分子であるFGF2がインテグリンに依存し、癌細胞の遊走と浸潤を促進することを明らかにした。またインテグリンに結合能できない変異型FGF2は野生型のFGF2によって誘導されるシグナルを抑制した。さらにFGF2はTGF- β によって誘導されるEMTをインテグリン依存的に促進した。これよりFGF2とインテグリンの結合ががんの進展に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、増殖因子はそのレセプターのリガンドであり、細胞外基質はインテグリンのリガンドであるという既存の概念にとらわれず、増殖因子とインテグリンの相互作用という、新しいリガンドと受容体の関係を提示するものである。そして変異導入された増殖因子の抗腫瘍効果より、新規治療法の開発が期待される。FGFとインテグリンの間に存在する分子機構を詳細に解明することは、FGFとインテグリンの効果がとりわけ重要視されている癌の進展プロセス(浸潤・転移)の解明につながるものと考えられる。そして、このインテグリンと増殖因子レセプターのクロスシグナリングの解明が、今後、治療薬や診断法の開発に貢献するものと確信する。

研究成果の概要(英文)：Integrin and growth factor signaling is implicated in tumor progression. The effect of FGF family and integrin on tumor invasion and metastasis including epithelial-mesenchymal transition (EMT) have not been cleared yet. Previously, we have shown that FGF1 upregulates EMT depending on the binding FGF1 to integrin α 3. In this study, we focused the effect of FGF2 on tumor progression.

We found that FGF2 induced tumor cell migration and invasion but integrin-binding defective FGF2 mutant did not. Moreover, FGF2 mutant suppressed FGF signaling induced by wild-type FGF2. Furthermore, stimulation of FGF2 on mammary epithelial cells showed that the expression levels of EMT markers were upregulated by FGF2. Because FGF2 mutant did not show the effect, the binding of FGF2 and integrin α 3 is necessary for induction of EMT.

Our study suggests that interaction of integrin and FGF2 might be crucial for cancer progression, and FGF2 mutant has the potential to suppress cancer cell progression.

研究分野：分子病理学

キーワード：インテグリン 浸潤転移 FGFR FGF EMT

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常な組織が癌としての性質を獲得するとき、秩序だった構造に歪が生じ、さらに亢進すると細胞は浸潤能を獲得し癌細胞の振る舞いをみせる。非浸潤性乳管癌 (DCIS) は、癌化した細胞が乳管の上皮部分に限局して見つかる非浸潤性の癌病変であり、放置すれば浸潤癌となり転移する可能性がある。形態学的観察では癌である DCIS と良性である異型乳管過形成 (ADH) を判別することがときに困難なことがあり、DCIS と ADH を隔てる分子レベルでの報告も少ない。また DCIS の状態から逸脱して浸潤性を獲得する分子メカニズムも十分な知見がない。

接着分子インテグリンは細胞と細胞外基質との結合のみならず、シグナル伝達分子としてもはたらき、細胞極性、運動、増殖、分化、アポトーシスなど種々の機能に関与している。インテグリンからのシグナルは種々の増殖因子シグナルとクロストークし多くの細胞機能を制御していることが分かってきている。例えばインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ と EGF レセプター、あるいはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と IGF レセプターは協調して乳癌細胞の運動能に関与していることや、インテグリン $\alpha v \beta 3$ と VEGF レセプター、インテグリン $\alpha v \beta 3$ と FGF レセプターは協調して血管新生を促進することが知られている(総説: Turner N 2010, Legate KR 2009)。

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は発生過程の組織構築に重要な因子であり上皮組織と間葉系組織のコミュニケーションに重要な役割を持つ。また正常細胞のみならず癌細胞も FGF を傍分泌または自己分泌していることが分かっており、腫瘍の遊走、浸潤といった癌に特異的な作用を促進している(総説: Ivaska J 2010, Beeken A 2009)。しかしながら癌の浸潤、転移における、インテグリンと増殖因子 FGF の相互作用は十分には解明されていない。

我々はこれまでに構造データを用いシミュレーションにて FGF-1 がインテグリンに直接結合することを発見している。この結果に基づきインテグリンに結合できない変異体 FGF1 (FGF1-R50E) を作成し、*in vitro* において FGF1-R50E が細胞増殖や遊走に機能しないことを示した。これより FGF1 とインテグリンの結合が細胞増殖・遊走に必要であることを明らかにしている (Mori S. J.Biol.Chem 2008)。また *in vitro* において 3 者が複合体を形成すること、FGF1-R50E がドミナントネガティブに作用することも示している (Yamaji S. PLoS One 2010)。血管新生においても FGF1 とインテグリンの結合が重要な役割を担っていることを明らかにしている (Mori S. PLoS One 2013)。申請者らは上皮間葉転換の進行が FGF1 とインテグリンの結合により正に制御されることも明らかにしている (Mori S. PLoS One 2015)。これら一連の発見より、申請者らは FGF 受容体とインテグリンのクロストークが組織構築というダイナミクスにおいて重要な要素であり、またそのバランスの破綻が腫瘍化につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上皮由来の癌が基底膜を破壊し浸潤性の癌となる分子メカニズムは十分に分かっていない。接着分子インテグリンと基底膜との相互作用は細胞の極性維持に重要であり、この極性の破綻が癌の浸潤へとつながる。近年このインテグリンのシグナル伝達に増殖因子の作用が重要であることがわかってきている。これまでに我々は「インテグリン」と増殖因子「FGF」そして「FGF 受容体」の三者の係りに着目し、FGF が FGF 受容体のみならずインテグリンにも結合しシグナルを制御していることを見出している。本研究の目的は癌とりわけ乳癌においてインテグリン/増殖因子/増殖因子受容体の三者がどのようにがんの浸潤・転移に関与しているかを解明することとした。

3. 研究の方法

正常細胞が極性を失う過程における FGF/FGF 受容体/インテグリンの役割について解析をおこなった。

(1) 細胞が浸潤能を獲得するうえで上皮間葉転換 (EMT) による極性の消失が重要と考えられている。そこで TGF- $\beta 1$ を用い正常乳腺上皮細胞株 (MCF10A) に EMT を誘導し、このとき FGF2 とインテグリン $\alpha v \beta 3$ が EMT 関連タンパク質の発現に及ぼす影響をウェスタンブロッティングにて解析した。

(2) TGF- $\beta 1$ を用い MCF10A に EMT を誘導し、このとき FGF2 とインテグリン $\alpha v \beta 3$ が細胞形態に及ぼす影響、また細胞浸潤能に及ぼす影響を解析した。

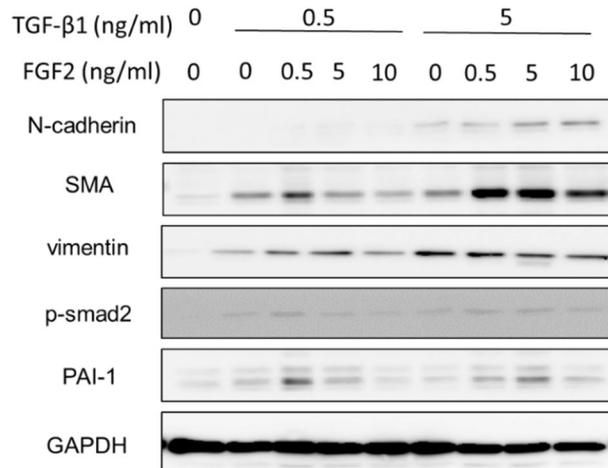
(3) これまでに我々はインテグリンに結合できない FGF2 の変異型を作成し、インテグリンと FGF の結合が線維芽細胞や内皮細胞の増殖や遊走に重要であることを明らかにしている。そこで変異型 FGF2 を用いて、MCF10A 細胞の EMT において FGF2 とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用が MCF10A 細胞の浸潤能に及ぼす影響を解析した。また TGF- $\beta 1$ によるインテグリンの発現変化も解析した。

(4) 乳癌細胞株を用い、FGF2 とインテグリンの相互作用がもたらす細胞の遊走能・浸潤能について解析した。

4. 研究成果

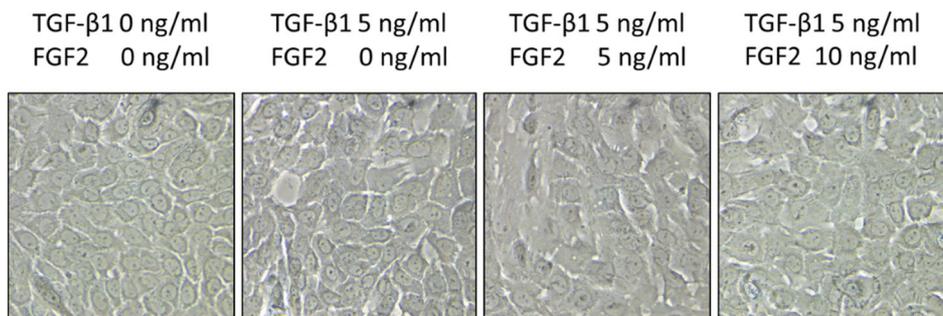
(1) FGF2 が TGF- β 1 によって誘導される EMT 関連タンパク質の発現に及ぼす影響を検討した。ヒト正常乳腺上皮細胞株 MCF10A をそれぞれ TGF- β 1、FGF2 で図に示す濃度で刺激を行い、EMT 関連タンパク質の発現変化をウェスタンブロット法により検討した。間葉系マーカーである N-cadherin、SMA、vimentin、PAI-1、TGF- β シグナル伝達物質であるリン酸化 smad2 は TGF- β 1 刺激で発現が増加し、TGF- β 1 と FGF2 との共刺激により発現の促進がみられた。FGF2 は EMT を促進することが示唆された (図 1)。

図 1



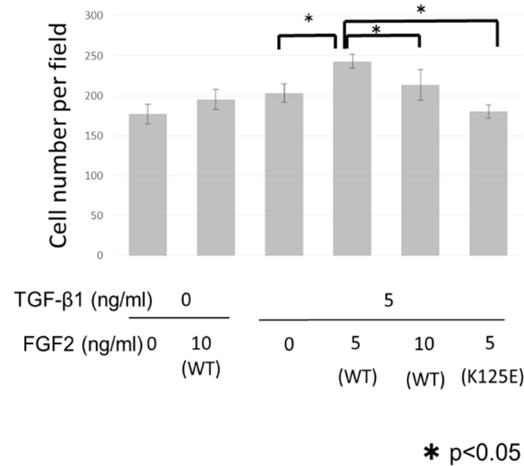
(2) TGF- β 1 と FGF2 を用いて MCF10A 細胞を 48 時間刺激し細胞形態の変化を観察した。MCF10A 細胞における EMT の形態変化の特徴として、細胞質の膨化が挙げられる。TGF- β 1 で誘導した EMT が FGF2 の刺激で促進された。一方で 10 ng/ml FGF2 の刺激で抑制されていることが観察された (図 2)。

図 2



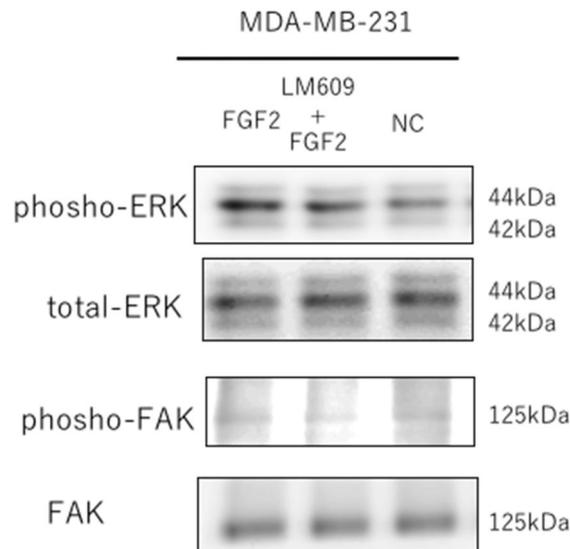
(3) MCF10A 細胞において、EMT の進行に伴う細胞浸潤能の変化を検討するために変異型 FGF2 を用いて浸潤能の解析を行った。FGF2 は単独でも浸潤能を促進する働きがあるため、何も刺激を与えていない場合と比べ、わずかに浸潤細胞数が多くみられた。TGF- β 1 単独での刺激時より、FGF2 と共に刺激した場合に有意に浸潤能は増大しており、さらに FGF2 濃度を上げると TGF- β 1 単独刺激に比べ浸潤能の変化はほとんど見られなかった (図 3)。これより、TGF- β 1 による浸潤能は FGF2 によって亢進することが分かった。また変異型 FGF2 では促進作用がみられなかったことより FGF2 とインテグリンの結合が浸潤能に重要であることがわかった。

図 3



(4) インテグリン $\alpha\beta 3$ と FGF2 の結合が乳癌細胞に及ぼす影響を解析するために、インテグリン $\alpha\beta 3$ の阻害抗体 (LM609) を用いた。インテグリン $\alpha\beta 3$ 阻害時の FGF2 の活性を検討するために MDA-MB-231 細胞を用いてウェスタンブロット法を行った。陰性コントロール (NC) に比べて、FGF2 単独の刺激においてリン酸化 ERK の発現がみられた。また、インテグリン、FGFR 経路の上流に存在するリン酸化 FAK の発現も認められた。しかし、LM609 にてインテグリン $\alpha\beta 3$ を特異的に阻害するとリン酸化 ERK、リン酸化 FAK の発現量は減少した (図 4)。

図 4



FGF ファミリー分子である FGF2 がインテグリンに依存し、癌細胞の遊走と浸潤を促進することを明らかにした。またインテグリンに結合できない変異型 FGF2 は野生型の FGF2 によって誘導されるシグナルを抑制した。さらに FGF2 は TGF- β によって誘導される EMT をインテグリン依存的に促進した。これらの結果より、線維芽細胞増殖因子 FGF2 はインテグリンと FGF レセプター両者への結合を介して癌の進展を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shishido A, Mori S, Yokoyama Y, Hamada Y, Minami K, Qian Y, Wang J, Hirose H, Wu X, Kawaguchi N, Nagumo S, Matsuura N, Yamamoto H.	4. 巻 4
2. 論文標題 Mesothelial cells facilitate cancer stem-like properties in spheroids of ovarian cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 2105-2114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6605.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchinaka A, Yoshida M, Tanaka K, Hamada Y, Mori S, Maeno Y, Miyagawa S, Sawa Y, Nagata K, Yamamoto H, Kawaguchi N.	4. 巻 156
2. 論文標題 Overexpression of collagen type III in injured myocardium prevents cardiac systolic dysfunction by changing the balance of collagen distribution.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Sug.	6. 最初と最後の頁 217-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtcvs.2018.01.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsubouchi K, Minami K, Hayashi N, Yokoyama Y, Mori S, Yamamoto H, Koizumi M,	4. 巻 58
2. 論文標題 The CD44 standard isoform contributes to radioresistance of pancreatic cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 816 ~ 826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrx033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minami K, Hamada Y, Kawaguchi N, Mori S, Manabe M, Nakatani K, Tsubouchi K, Hayashi N, Yamamoto H, Koizumi M,	4. 巻 E001
2. 論文標題 The changes in metastatic potential of radioresistant cancer cell line generated by frequent X-ray.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 OHEM	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchinaka A, Kawaguchi N, Ban T, Hamada Y, Mori S, Maeno Y, Sawa Y, Nagata K, Yamamoto H,	4. 巻 491
2. 論文標題 Evaluation of dermal wound healing activity of synthetic peptide SVVYGLR	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 714 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.07.124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minami K, Hamada Y, Kawaguchi N, Mori S, Yokoyama Y, Oki Y, Adachi T, Kondo R, Shishido A, Matsushita Y, Usuki T, Manabe M, Koizumi M, Ogawa K, and Yamamoto H	4. 巻 9
2. 論文標題 X-ray and Carbon Ion Beam Irradiation Inhibited Angiogenesis via Integrin Up-regulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nano Biomed	6. 最初と最後の頁 94 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤本 彩花、森 誠司、五島 碧、横山 雄起、松浦 成昭、高田 義一、山本 浩文
2. 発表標題 The effect of FGF2 and integrin on epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本 彩花、森 誠司、五島 碧、横山 雄起、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 FGF2とインテグリンの結合が乳腺上皮細胞のEMT進行に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 誠司
2. 発表標題 最近のがん遺伝子検査のトピックス
3. 学会等名 第59回日臨技近畿支部医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 誠司、松浦 成昭、高田 義一、山本 浩文
2. 発表標題 接着分子インテグリンと増殖因子の相互作用が癌進展において果たす役割
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島 碧、森 誠司、横山 雄起、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 FGF2とインテグリンの結合は乳癌の浸潤能を亢進させる
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 雄起、武田 和、北川 公望、森 誠司、水島 恒和、森 正樹、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 BET阻害剤はALDH1A1遺伝子のスーパーエンハンサーを標的として卵巣癌のALDH活性を抑制する
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 銭 雅敏、呉 しん、横山 雄起、田口 真衣、王 かき、廣瀬 遥香、森 誠司、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 E-cad-Fc コーティングによる癌幹細胞性質の増強
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴戸 明美、森 誠司、横山 雄起、濱田 吉之輔、皆巳 和賢、銭 雅敏、王 かき、廣瀬 遥香、呉 しん、河口 直正、南雲 サチ子、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 中皮細胞はスフェロイド中の卵巣癌細胞の幹細胞様形質を促進する
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島 碧、森 誠司、横山 雄起、松浦 成昭、山本 浩文
2. 発表標題 Interaction between FGF2 and integrin enhances invasion ability of breast cancer cells.
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽鳥 暢晃、森 誠司、高田義一、山本 浩文
2. 発表標題 FGF-2とインテグリン v 3の相互作用が血管新生に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究 分担者	河口 直正 (Kawaguchi Naomasa) (70224748)	森ノ宮医療大学・保健医療学研究科・教授 (34448)	変更：2019年4月1日
研究 分担者	濱田 吉之輔 (Hamada Yoshinosuke) (10362683)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (14401)	削除：2017年9月20日