

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10498

研究課題名(和文)血管肉腫に対する放射線治療基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on radiotherapy of angiosarcoma

研究代表者

中山 文明(Nakayama, Fumiaki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線規制科学研究部・グループリーダー

研究者番号：50277323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、活性を高めたFGF1変異体の放射線小腸障害に対する防護効果、並びにマウス血管肉腫細胞株ISOS-1の放射線感受性および転移能に対する影響を検討した。その結果、高いFGF1の活性は、放射線小腸障害に対する防護効果を高め、ISOS-1細胞の放射線感受性増加と転移能抑制を示した。また、ヒト血管由来血管肉腫細胞IO-HASとヒトリンパ管由来血管肉腫細胞株MO-LASの放射線感受性を比較検討し、両細胞に有意な差を認めなかった。以上、高いFGF1活性は、血管肉腫に対する放射線治療において、副作用予防に対して有効であるとともに、腫瘍の悪性化に対しても抑制的に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGF1シグナル経路の放射線障害治療における有用性を示すとともに、治療対象である血管肉腫に対する影響を初めて明らかにした。血管肉腫の悪性化を促進することなく、むしろ抑制的に働くこと示し、新たな治療標的の可能性を示唆した。また、由来の異なる血管肉腫の放射線感受性に関するデータも初めて提供された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the radioprotective effect of the strong mitogenic activity of FGF1 on the radiation-induced intestinal damage, and the radiosensitivity and metastatic capabilities of the murine tumorigenic endothelial cell line ISOS-1. As a result, strong FGF1 signaling exerted not only radioprotective effects in the intestine, but also the enhanced radiosensitivity of ISOS-1 cells and inhibitory effects on its metastatic capabilities. In addition, the comparative study on the radiosensitivity of human hemangiosarcoma cell line IO-HAS and human lymphangiosarcoma cell line MO-LAS was also performed. Both cell lines had almost the same radiosensitivity. These findings suggest that strong FGF1 signaling is useful for not only attenuating the adverse effects of radiotherapy against angiosarcoma, but also inhibiting the malignancy of angiosarcoma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：血管肉腫 放射線治療 防護剤 増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管肉腫は、年間発症率が 100 万人に 2~3 人という極めて稀で、5 年生存率が 10~20% とされる予後不良の悪性腫瘍である。放射線治療が集学的治療の一環として実施されているが、放射線療法は放射線障害という有害事象と、再発腫瘍の放射線抵抗性というリスクがあり、適切な放射線療法を実施するためには、信頼性にたるエビデンスの獲得が必要である。

(2) FGF をはじめとする増殖因子は、放射線防護剤としての潜在性を有し、放射線治療による有害事象の治療にも応用が期待されている。しかしながら、放射線治療の対象は悪性腫瘍であり、がん細胞自身が増殖因子の受容体を有して、増殖因子ががんの悪性化に関与している可能性も知られている。血管肉腫に関しても VEGF 受容体を高率に発現していることが知られ、分子標的薬の標的として期待されている。近年、VEGF 受容体を標的の一つとする pazopanib が本邦では承認され血管肉腫に使用できるようになった。一方、FGF は放射線防護剤としてだけでなく、腫瘍に対しては抗腫瘍及び悪性化の両面を制御する分子であり、その研究は放射線治療をより効果的に、より安全に実施する基盤を提供できる。

(3) 種々の放射線生物学的解析や分子レベルの病態解明にも細胞株の利用は欠かせないが、血管肉腫由来の腫瘍細胞株はほとんど存在しなかった。そこで、増澤らはヒト頭部血管肉腫細胞株として ISO-HAS 細胞を樹立し、マウス血管肉腫細胞株として ISOS-1 細胞の作製に成功した。また、いわゆる Angiosarcoma には、血管由来とされる血管肉腫とリンパ管由来とされるリンパ管肉腫が含まれるが、増澤らは頭部リンパ管肉腫細胞株 Mo-LAS 細胞も樹立にも成功した。従来は血管肉腫とリンパ管肉腫の正確な鑑別が困難だったため、放射線療法についても両腫瘍を区別せず実施されていたが、Mo-LAS 細胞を検討することで頭部リンパ管肉腫の放射線に対する反応性も明らかにできるようになった。

2. 研究の目的

血管肉腫の放射線感受性や放射線による転移への影響を明らかにする。また、血管肉腫に対する FGF の影響を明らかにし、放射線障害減少と血管肉腫の放射線感受性の関連を追及し、放射線治療と有害反応減少の両立を模索する。さらに、血管肉腫細胞株を利用して放射線影響に関する血管肉腫とリンパ管肉腫の違いも検討する。

3. 研究の方法

(1) 試薬準備

FGF1 変異体は、図に示すように作成した。FGF1 の安定性は変異数に比例して増加し、Q40P/S47I/H93G/K112N(4X) が最も構造的に安定であることが知られている。これらの変異体遺伝子を pDEST17 ベクターに組み込み、大腸菌内で産生させ、His タグで精製した。

	6	26	64	102	129	
FGF1		Q S		H	K	FGF1
1X		P S		H	K	Q40P
2X		P I		H	K	Q40P/S47I
3X		P I		G		Q40P/S47I/H93G
4X		P I		G	N	Q40P/S47I/H93G/K112N

Glutamine
Serine
Histidine
Lysine
Proline
Isoleucine
Glycine
Asparagine

(2) 細胞増殖評価

IL-3 依存性のマウス Pro-B 細胞株 BaF3 に FGFR1c 受容体を高発現させたトランスフェクタンと、マウス胎児線維芽細胞株 NIH3T3 の細胞増殖を WST-1 を用いて評価することで、各 FGF1 変異体の増殖活性を測定した。BaF3-FGFR1c は 42 時間、NIH3T3 は 24 時間、ヘパリン非存在下で FGF1 変異体とともに培養し、培養液に WST-1 を添加したのち OD450nm を測定した。

(3) 放射線防護効果の評価

BALB/c マウスを用いて、FGF1, 3X, 4X のマウス小腸に対する放射線防護効果を検討した。各 100 μ g FGF をヘパリンとともに照射 24 時間前に腹腔注射し、12Gy の線全身照射 24 時間後にマウス空腸を摘出し、小腸横断面のパラフィン組織切片を用いて TUNEL 染色を実施した。各小腸クリプトにおける TUNEL 陽性細胞数を数えることで、放射線誘導性アポトーシスの程度を評価した。次に、各 10 μ g FGF を生理食塩水(ヘパリンを含まない)に懸濁して照射 24 時間前に腹腔注射し、10Gy の線全身照射 3.5 日後にマウス空腸を摘出し、その横断面の HE 染色を作成した。各小腸全周のクリプト数を非照射のクリプト数で割ることでクリプト生存率を算出し、マウス小腸の放射線障害後の再生効果を評価した。

(4) 細胞浸潤能・遊走能評価

血管肉腫細胞株 ISOS-1 の浸潤能・遊走能はチャンパー法により評価した。浸潤能測定では、トランスウェルのインサートメンブレンをマトリゲルでコートし、遊走能測定はマトリゲルコー

トなしで実施した。インサートに ISOS-1 細胞と 100ng/ml の各 FGF、100nM FGFR 阻害剤(AZD4547)などを加えた DMEM を入れ、ウェルには 10%FCS 添加 DMEM を入れて 24 時間培養した。培養後、メンブレン裏面をディフ・クイック染色し、メンブレンを通過した細胞を顕微鏡下で写真撮影した。ImageJ を使って細胞数を算出し、インサートに加えた細胞数に対するパーセントを計算した。

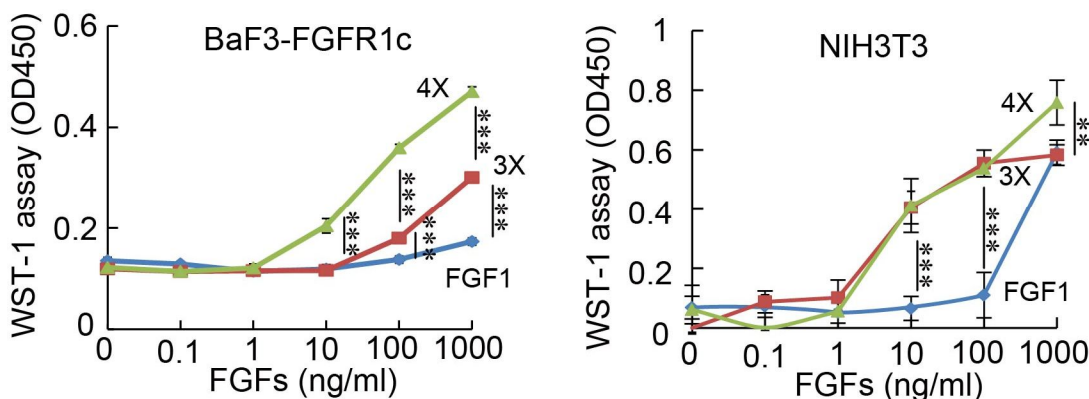
(5) High-Density Survival Assay

ISO-HAS 細胞並びに MO-LAS 細胞を X 線照射し、3 日間培養後トリプシンで細胞を剥離して細胞数を計測し、その 1/8 をさらに 5 日間継代培養した。培養後、それぞれの線量に対する生細胞数を算出し、非照射群細胞数に対する照射群細胞数パーセントを計算した。

4. 研究成果

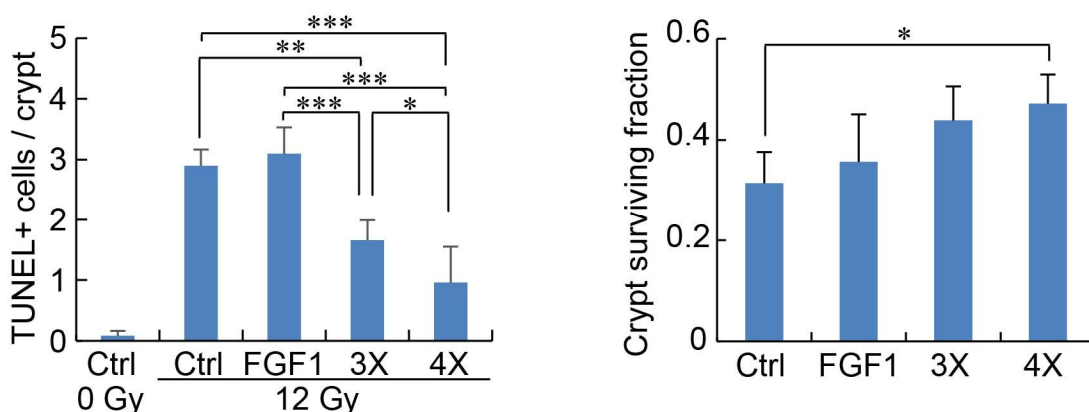
(1) FGF の活性

FGF1、3X(FGF1 変異体 Q40P/S47I/H93G)、4X(FGF1 変異体 Q40P/S47I/H93G/K112N)を、それぞれ BaF3-FGFR1c 細胞に添加培養したところ、FGF1<3X<4X の順に細胞増殖率の増加が認められた。同様の評価を NIH3T3 細胞で実施したところ、FGF1 に比べて 3X と 4X で有意な細胞増殖率の増加が認められた。また、4X は 1000ng/ml の高濃度でのみ 3X に有意に細胞増殖率の増加を認めた。NIH3T3 ではヘパラン硫酸プロテオグリカンが発現しているが、BaF3-FGFR1c では発現していない。ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、FGF に結合して FGF の安定性と FGFR への反応性を高めるため、この有無が両細胞の結果の相違に関与していると思われるが、FGF1<3X<4X の順に FGFR への反応性が強めていることが示された。



(2) FGF 活性と放射線障害防護効果

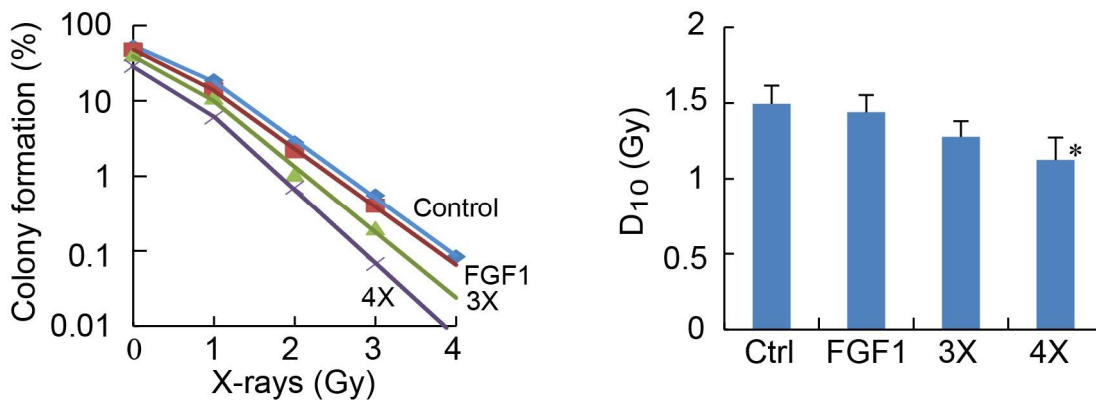
FGF1、3X、4X を BALB/c マウスに投与後 X 線照射することで、各 FGF のマウス小腸における抗アポトーシス能、並びに小腸再生能を評価した。FGF1 投与群では有意なアポトーシスの減少もクリプト生存率の増加も認められなかったが、4X では有意にアポトーシスの減少とクリプト生存率の増加を認めた。3X についても FGF1 と 4X の中間の数値を示し、アポトーシスはコントロールと比べて有意に減少した。すなわち、FGF1<3X<4X の順に放射線小腸防護効果を示した。



(3) FGF 活性と血管肉腫細胞の放射線感受性

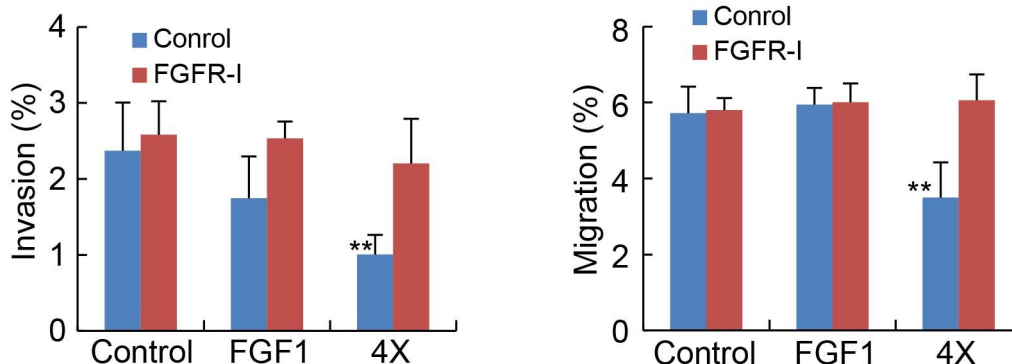
血管肉腫細胞株 ISOS-1 に X 線照射後、100 ng/ml の FGF1、3X、4X を加えて 6cm ディッシュで培養し、8 日後のコロニー数を数えた。その結果、FGF1 添加ではコロニー形成に変化を認めなかったが、3X と 4X ではコロニー形成の減少を認めた。すなわち、FGF1<3X<4X の順にコロニー数の減少を認め、FGF1 の活性が強まるに従い細胞増殖能の低下が示された。この結果から、D10(生存コロニー数が 10%に減少する線量)を算出したところ、FGF1<3X<4X の順に D10 の低下が認められた。したがって、FGF1 の活性が強まるに従い、血管肉腫細胞株 ISOS-1 の放射線感受性が増加

することが示された。



(4) FGF 活性と血管肉腫細胞の転移能

血管肉腫細胞株 ISOS-1 に FGF1, 4X を加えて、転移能の指標として浸潤能・遊走能を評価した。浸潤能に関しては、FGF1, 4X とともに低下傾向を示し、4X では有意に浸潤能の抑制を認めた。遊走能においては、FGF1 では変化を認めなかったが、4X では優位に遊走能の抑制が認められた。これらの抑制は、FGFR 阻害剤を添加することで回復したことから、FGFR を介した強いシグナルは、ISOS-1 細胞の転移能を抑制することが示された。

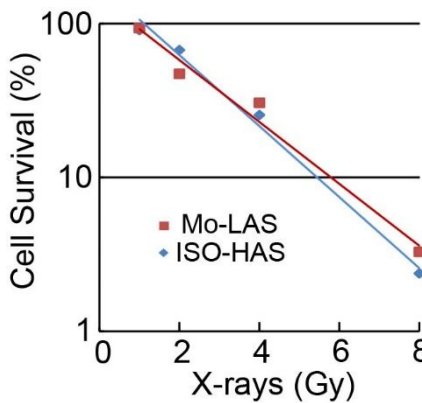


(5) リンパ管由来血管肉腫の放射線感受性

ISO-HAS 細胞と MO-LAS 細胞は、培養ディッシュでコロニーを形成できなかった。そこで、High-Density Survival Assay で X 線感受性を測定した。その結果生存曲線に差がみられず、D10 も ISO-HAS 細胞が 5.45、MO-LAS 細胞が 5.79 と同等であった。

(6) まとめ

高い活性の FGF1 は、放射線障害に対する防護効果を示した。しかも、この高活性 FGF1 は、血管肉腫細胞株の放射線感受性や転移能に悪影響を与えず、むしろ放射線感受性を増加させ、転移能も抑制した。したがって、高活性 FGF1 は血管肉腫に対する放射線治療の潜在的な副作用予防剤であるとともに、血管肉腫の抑制に関与する可能性が示唆された。一方、血管由来血管肉腫とリンパ管由来血管肉腫の放射線感受性に違いを認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura Taichi, Fujita Mayumi, Kawano Mitsuko, Imadome Kaori, Yasuda Takeshi, Nishihara Shoko, Imamura Toru, Masuzawa Mikio, Imai Takashi, Nakayama Fumiaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Strong radioprotective FGF1 signaling down-regulates proliferative and metastatic capabilities of the angiosarcoma cell line, ISOS-1, through the dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ctro.2017.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦太一、川野光子、藤田真由美、安田武嗣、西原祥子、増澤幹男、中山文明
2. 発表標題 高活性型FGF1-FGF受容体1シグナルは血管肉腫細胞の増殖・転移能を抑制する
3. 学会等名 日本放射線影響学会61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山文明、藤田真由美、三浦太一、川野光子、今留香織、安田武嗣、今村亨、増澤幹男、今井高志
2. 発表標題 FGF1シグナル分子による血管肉腫細胞株の増殖転移能抑制効果について
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦太一、川野光子、安田武嗣、中山文明
2. 発表標題 The inhibitory mechanism of proliferative capability of the angiosarcoma cell line, ISOS-1, through FGFR1 signaling
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
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
研究協力者	増澤 幹男 (Masuzawa Mikio)		
連携研究者	川野 光子 (Kawano Mitsuko) (90422203)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 障害治療研究部・研究員(任常) (82502)	
連携研究者	藤田 真由美 (Fujita Mayumi) (80580331)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 障害治療研究部・主任研究員(定常) (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------