

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15571

研究課題名（和文）正常組織の細胞を選択し放射線障害から防護するFGFの作用機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of function of FGF that selects normal tissue cells and protects them from radiation damage.

研究代表者

三浦 太一（Miura, Taichi）

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・研究員

研究者番号：30803209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は線維芽細胞増殖因子1（FGF1）の有する放射線障害に対する防護・治療効果に注目しており、特に開発した“改変型FGF1”は、腸管上皮細胞などの正常細胞を防護し、再生を促すが、その一方で一部の癌細胞の浸潤を抑制することが分かっている。本研究では、これらの改変型FGF1の作用機序の解明を目的とし解析を実施した。その結果、癌細胞において改変型FGF1は特定のシグナル経路を長期的に活性化し、結果的に浸潤を抑制することが分かった。これらの効果は野生型FGF1では確認できなかったことから、この効果は改変型FGF1特異的な効果であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、新しい防護剤としての“改変型FGF1”の作用機構の解明と、その医療応用における安全性の評価につながる事が考えられる。また、癌細胞と正常組織で異なる効果を発揮する改変型FGF1のような新規放射線障害治療薬・予防薬の探索や開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have been focusing on the protective and therapeutic effects of fibroblast growth factor 1 (FGF1) against radiation damage. Our modified FGF1 protects normal cells such as intestinal epithelial cells and promotes their regeneration, while inhibiting the invasion of some cancer cells. This study aimed to elucidate the mechanism of function of this modified form of FGF1. We found that in cancer cells, modified FGF1 activates specific signaling pathways for a prolonged period of time, resulting in suppression of invasion. These effects were not observed with wild-type FGF1, indicating that these effects are specific to modified FGF1.

研究分野：放射線防護

キーワード：FGF1 シグナル 放射線防護 癌細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹腔内腫瘍に対する放射線がん治療は、放射線感受性の高い腸管上皮組織が周囲に存在することから、放射線障害が起きやすいことが知られている。そのため、正常細胞を放射線障害から防護する医薬品の開発と研究が進められている。これらを放射線がん治療に応用するためには、がん細胞の増殖や転移を促進することはあってはならない。すなわち、正常細胞のみを放射線から防護し、がん細胞を防護しない、「正常細胞のみに選択性を有する防護・治療薬」でなければならない。

我々は、放射線障害に対する防護・治療候補薬として繊維芽細胞増殖因子(FGF)に注目してきた。FGFは多くのファミリーが存在し、そのうちFGF1(Nakayama et al. Exp Dermatol. 2009)、FGF2 (Ader et al. Oncogene. 2002)、FGF4(Takahama et al. Oncogene. 2001)、FGF7 (Khan et al. Radiat Res. 1997)、FGF12(Nakayama et al. Int J Radiat Oncol. 2013)、FGF20 (Alvarez et al. Clin Cancer Res. 2003)などが放射線防護効果を有していることが知られている。しかし、これらはいわゆる増殖因子なので、がんを悪化させることが危惧される。したがって、報告されている FGF 防護剤ががん細胞の悪性を促進せず、正常細胞特異的に防護するものでなければならないが、FGF1 には以下の通りその可能性がある。

これまでに我々は、4 か所のアミノ酸を置換して熱安定性と活性を格段に向上させた“改変型 FGF1”(図1)が腸管上皮での放射線障害に対する極めて高い防護効果有すること、また、腸管上皮の再生を促進することを世界に先駆けて解明した(Miura et al. CTR0. 2017)。一方で、改変型 FGF1 は一部の癌細胞の浸潤や転移を抑制することも初めて明らかにした(Miura et al. CTR0. 2017)。従って、この改変型 FGF1 は、正常組織の放射線障害を防護・治療しつつ、癌細胞の浸潤や転移も抑制できる革新的な薬剤になり得ることが期待できる。しかし、改変型 FGF1 が癌細胞の浸潤や転移を抑制する作用機構については不明であり、臨床応用を考量した場合、この作用機構を解明することは必須である。

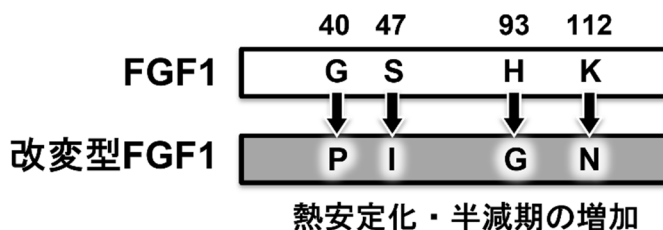


図1：改変型FGF1の構造

### 2. 研究の目的

本研究では、改変型 FGF1 の作用機序の解明を目的とする。特に、改変型 FGF1 が有する癌細胞の浸潤抑制効果の作用機序をシグナル経路の観点から明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 改変型 FGF1

改変型 FGF1 は以前の報告と同様の方法で作成した(Miura et al. CTR0. 2017)。変異は、QuikChange 部位特異的変異導入キットを用いて、ヒト FGF1 遺伝子に導入した。各遺伝子を、6xHis タグをコードする配列を含む N 末端融合ベクターである pDEST17 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に移し替え、pDEST17 発現コンストラクトを BL21 (DE3) pLysS 大腸菌に形質転換した後、Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen, Darmstadt, Germany) を使用してタンパク質発現を誘導した。ペレットを EDTA フリーカクテル (cOmplete ULTRA) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含む BugBuster Master Mix (Novagen) で溶解し、可溶抽出物を Ni Sepharose High Performance columns (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) を使用して精製した。

#### (2) 細胞培養

以前の報告では、改変型 FGF1 の癌細胞の浸潤や転移に対する影響を検討するために、癌細胞の中でも特に浸潤能・転移能が極めて高い血管肉腫細胞を使用し、改変型 FGF1 の血管肉腫細胞の浸潤・転移抑制効果を明らかにした(Miura et al. CTR0. 2017)。血管肉腫は血管内皮細胞由来の悪性腫瘍であり、早期発見が難しく、悪性度が極めて高く、また 5 年生存率が 10% 未満の難治性がんである。生存率が低い主な原因に、血管肉腫の浸潤能・転移能が極めて高いことが挙げられる。血管肉腫の治療には化学療法や放射線療法があるが、これらの治療法では血管肉腫の浸

潤・転移を抑制することはできず、血管肉腫の浸潤・転移を抑制し、かつ体への負担が少ない新規治療法が必要とされている。本研究では、以前の報告で用いたマウス血管肉腫細胞 (ISOS-1 細胞) を解析に用いた。また、その他のいくつかの癌細胞も実験に用いた。

### (3) 増殖能の検討および形態観察

1 × 10<sup>5</sup> 個の ISOS-1 細胞をはじめとした各種癌細胞を 3.5cm dish に播種し、48 時間培養を行った。播種してから 48 時間後に、PBS (コントロール)、100ng/ml 野生型 FGF1、100ng/ml 改変型 FGF1 を添加した。添加後は経時的に、顕微鏡下での細胞の形態の観察と、トリパンプルーと血球計算盤を用いた細胞数の計測を実施した。細胞の解離にはトリプシンを用いた。独立した同様の実験を 3 回実施した。

### (4) 浸潤能の検討

ISOS-1 細胞の浸潤能は、ポアサイズ 8 μm の 6.5mm フィルター (Corning, Horseheads, NY, USA) を含むトランスウェルチャンバーを用いて実施した。浸潤アッセイの前に、インサートの底 (フィルター部) に 75 μg のマトリゲル (BD Biosciences, Redwood City, MA, USA) をコートした。外因性ヘパリンの非存在下で、PBS (コントロール)、100ng/ml 野生型 FGF1、100ng/ml 改変型 FGF1 を含む DMEM 培地に懸濁した ISOS-1 細胞 5 × 10<sup>4</sup> 個 / ウェルでそれぞれのウェルに播き、24 時間培養を行った。フィルターを通過した細胞を Diff Quick (Sysmex, Kobe, Japan) で染色し、顕微鏡で写真撮影した。ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて浸潤細胞数を評価した。独立した同様の実験を 3 回実施した。

### (5) 阻害剤実験

FGF1 シグナルの下流にある各シグナル経路に対する阻害剤を改変型 FGF1 と併用して使用し、改変型 FGF1 の効果を打ち消す阻害剤を同定した。各阻害剤は改変型 FGF1、または野生型 FGF1 添加時に併用した。阻害剤の希釈に用いた Dimethyl sulfoxide (DMSO) を培地に添加した条件をコントロールとした。独立した同様の実験を 3 回実施した。

## 4. 研究成果

以前の報告と同様に ISOS-1 細胞に改変型 FGF1 を添加することで増殖能が有意に抑制されたが、野生型 FGF1 では同様の影響は確認できなかった。改変型 FGF1 添加後の細胞形態を経時的に観察したところ、ある異常を観察することができた。この異常は野生型 FGF1 では観察されなかったことから改変型 FGF1 特異的な影響であることが分かった。また、いくつかの正常細胞に改変型 FGF1 を添加してもこの異常は認められなかったことから、この異常は「どのように改変型 FGF1 が正常細胞と癌細胞で異なる影響を及ぼしているのか」の解決につながる重要な現象であると考えられた。

FGF1 シグナルを構成する下流のシグナル経路は、PKC、SRC、STAT3、SHC、ERK1/2、AKT 経路などがある。これらの各経路に対する阻害剤を用いて、改変型 FGF1 の添加に伴うある異常な現象がどの経路に依存するものか検討した。その結果、ある特定のシグナル経路を阻害したときのみ救済することができた。改変型 FGF1 の浸潤能に対する影響について検討したところ、改変型 FGF1 を ISOS-1 細胞に添加することで浸潤を有意に抑制することができるが、この特定の経路に対する阻害剤を併用すると ISOS-1 細胞の浸潤能はコントロールと比べて有意な差がでなくなった。以上より、改変型 FGF1 は特定の FGF1 シグナルの下流経路を活性化することで、ある異常を引き起こし、結果的に増殖や浸潤を抑制していることを初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Taichi Miura, Noriyuki Yuasa, Hayato Ota, Masato Habu, Mitsuko Kawano, Fumiaki Nakayama, Shoko Nishihara	4. 巻 518
2. 論文標題 Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 506-512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.082	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 Taichi Miura, Shoko Nishihara	4. 巻 31
2. 論文標題 The Functions of O-GlcNAc in Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E69-E75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.1954.2	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 Kawano Mitsuko, Miura Taichi, Fujita Mayumi, Koike Sachiko, Imadome Kaori, Ishikawa Atsuko, Yasuda Takeshi, Imamura Toru, Imai Takashi, Nakayama Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 The FGF1/CPP-C chimera protein protects against intestinal adverse effects of C-ion radiotherapy without exacerbating pancreatic carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ctro.2018.10.004	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19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 三浦太一、川野光子、高橋慶子、湯浅徳行、羽生正人、松崎祐二、今村亨、中山文明
2. 発表標題 High-sulfated hyaluronic acid exerts radioprotective and regeneration-promoting effects in the intestine
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦太一、川野光子、高橋慶子、湯浅徳行、羽生正人、松崎祐二、中山文明
2. 発表標題 高硫酸化ヒアルロン酸は放射線腸管障害の再生を促進する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川野 光子, 三浦 太一, 高橋 慶子, 中山 文明
2. 発表標題 がん治療における副作用の克服を目指す研
3. 学会等名 第17回研究助成発表会, 公益財団法人ひと・健康・未来研究財団
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 太一, 湯浅 徳行, 太田 隼人, 羽生 正人, 川野 光子, 中山 文明, 西原 祥子
2. 発表標題 bFGFおよびフィーダー細胞を必要としない高硫酸化ヒアルロン酸を用いたヒトiPS細胞の新規培養法の確立
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 三浦 太一, 川野 光子, 安田 武嗣, 高橋 慶子, 今村 亨, 今井 高志, 中山 文明
2. 発表標題 重粒子線による腸管障害を防ぐFGF1/CPP-Cキメラタンパク質のシグナル機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 太一, 川野 光子, 安田 武嗣, 高橋 慶子, 今村 亨, 今井 高志, 中山 文明
2. 発表標題 放射線照射に伴う障害から腸を保護するFGF1/CPP-Cキメラタンパク質のシグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

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 川野 光子、三浦 太一、石川 敦子、小池 幸子、今留 香織、藤田 真由美、今井 高志、中山 文明 中山 文明
2. 発表標題 細胞内移行型FGF1による重粒子線腸管障害防護機能について
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、川野 光子、三浦 太一、藤田 真由美、小池 幸子、今留 香織、石川 敦子、安田 武嗣、今村 亨、今井 高志
2. 発表標題 FGF1/CPP-Cキメラタンパクによる膵癌重粒子線治療の有害事象の予防について
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 太一、中山 文明、西原 祥子
2. 発表標題 The inhibition of FGF4 signaling by O-GlcNAc is required for the maintenance of the undifferentiated state of mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 第5回 国際組織工学・再生医療学会 世界会議2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 太一、中山 文明、西原 祥子
2. 発表標題 THE INHIBITORY MECHANISM OF THE FGF4 SIGNALING BY O-GLCNAc IN MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS TO MAINTAIN THE UNDIFFERENTIATED STATE
3. 学会等名 The International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------