

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591856

研究課題名(和文) FGF12の放射線防護効果に対する新規作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Research on new mechanism for radioprotective effect of FGF12

研究代表者

中山 文明(Nakayama, Fumiaki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー

研究者番号：50277323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではFGF12細胞内移行の放射線小腸障害に対する役割を検討した。FGF12を照射24時間前もしくは24時間後にBALB/cマウスに投与すると、放射線障害からの小腸の再生が促進された。そして、FGF12Bの放射線防護機能に関する2か所のドメインを明らかにした。このドメインはそれぞれ膜透過ペプチドドメインCPP-MとCPP-Cを含んでいたが、CPP-C単独では放射線防護効果を発揮できなかった。さらに、FGF12の細胞内移行は、p38活性化を抑制し、放射線誘導性アポトーシスを減少させた。以上、FGF12がFGFR非依存性に細胞内移行により小腸放射線防護効果を発揮する機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：FGF12 can be internalized into cells using two domains (CPP-M, CPP-C). This study aimed at clarifying the role of FGF12 internalization in protection against radiation-induced intestinal injury. Administration of FGF12 into BALB/c mice after radiation exposure was as effective as pretreatment in significantly promoting intestinal regeneration from radiation damage. Two domains, comprising amino acid residues 80-109 and 140-169 of FGF12B, were identified as being responsible for the radioprotective activity. Interestingly, these regions included the CPP-M and CPP-C domains, respectively; however, CPP-C by itself did not show an anti-apoptotic effect. In addition, internalized FGF12 suppressed the activation of p38 after irradiation, resulting in reduced radiation-induced apoptosis. These findings indicate that FGF12 can protect the intestine against radiation-induced injury through its internalization, independently of FGFRs.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線障害 防護剤 治療薬 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

(1) Fibroblast growth factor (FGF)は細胞増殖因子の一種であるが、放射線障害の予防・治療に有効であると考えられている。細胞の FGF に対する認識機構は、FGF 受容体 (FGFR)を介する経路と、FGF が直接細胞内に移行し、細胞内でシグナルを発生させる経路の2通りが考えられている。しかしながら、この FGFR を介したシグナル伝達経路は腫瘍の悪性化にも関与するなど、組織中の FGF 受容体発現の違いが、FGF の効果及び副作用の出現に大きな影響を与える可能性があり、防護剤としての FGF のがん放射線治療への応用の障害となっている。

(2) 一方、FGF12 は FGF 1 と構造的に類似しているが、FGFR に全く反応しない FGF である。しかしながら、我々は FGF12 が容易に細胞内に移行できることを見出し、細胞内移行の役割を担う2つの膜透過ペプチドドメイン(CPP-M, CPP-C)がことを同定した。しかしながら、FGF12 の放射線防護効果は未だ不明である。

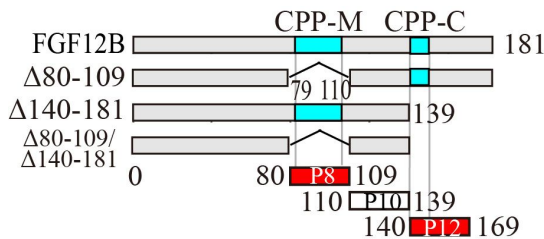
2. 研究の目的

FGF12 細胞内移行の放射線小腸障害に対する役割を検討し、FGF12 の FGFR に依存しない放射線防護効果のメカニズムを明らかにする。

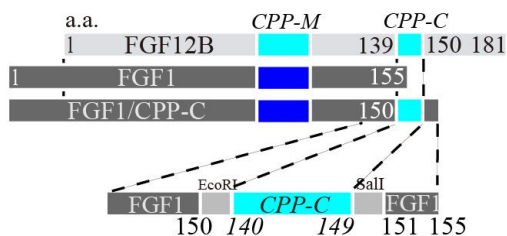
3. 研究の方法

(1) 試薬準備

FGF12B アミノ酸配列全長にわたって、13 種類の 30 アミノ酸からなるペプチドを合成した。FGF12 の欠損変異体蛋白質は、ペプチド配列に相当する 90 塩基を欠損させた遺伝子配列を、pET57 発現ベクターに組み込み、Nus タグとの融合蛋白質として大腸菌内で産生させ、His タグで精製した。



FGF1/CPP-C 融合蛋白質は、CPP-C を FGF1 の C 末端に挿入させた遺伝子を作成し、pDEST17 ベクター組み込み、大腸菌内で産生させ、His タグで精製した。



(2) ヘキスト核染色

ラット小腸細胞株 IEC6 に最終濃度 1 μg/ml のペプチドを 5 μg/ml ヘパリン入り培養液に添加し 24 時間培養した。20Gy X 線照射 24 時間後、1%グルタルアルデヒドで固定し、Hoechst 33258 で核染色し、核形態でアポトーシスを判定した。

(3) TUNEL アッセイ

In vivo のアポトーシスは、TUNEL アッセイで判定した。BALB/c マウスにペプチドを照射 24 時間前に腹腔内投与し、ガンマ線全身照射 24 時間後に小腸を摘出した。パラフィン包埋切片に対して TUNEL 染色を行い、クリプトにおける TUNEL 陽性細胞数を計測した。

(4) クリプトアッセイ

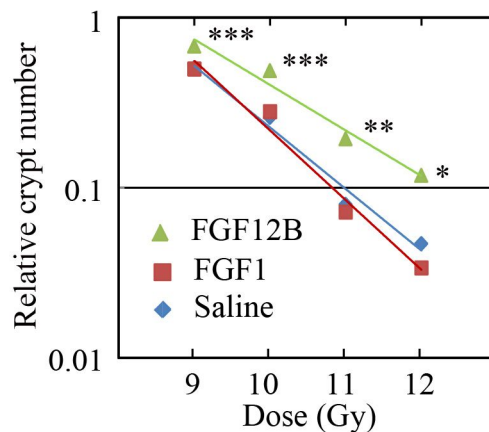
BALB/c マウスに FGF を照射 24 時間前に腹腔投与し、ガンマ線全身照射 3.5 日後に小腸を摘出した。HE 染色標本よりクリプト数を計測し、クリプト再生能として放射線防護効果を評価した。

(5) BrdU アッセイ

マウスサンプリング 2 時間前に BrdU ラベリング試薬を腹腔注射し、クリプトに BrdU を取り込ませる。パラフィン包埋切片を抗 BrdU 抗体で染色し、BrdU 陽性細胞数を計測する。

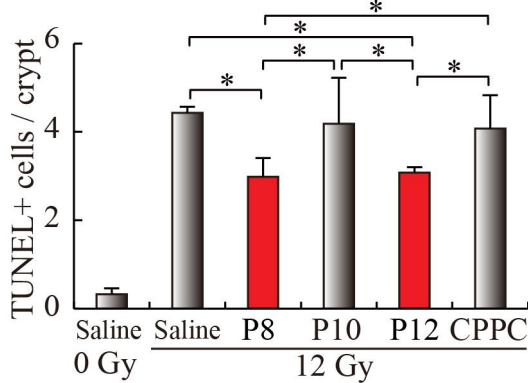
4. 研究成果

(1) 10 μg FGF12B を照射前 24 時間にマウスに投与し、9~12Gy ガンマ線全身照射を行うと、照射 3.5 日に生理食塩水投与群よりも有意にクリプト数が増加した。しかも、FGF12 を照射 24 時間後に投与しても、照射 24 時間前投与と同様に、クリプト再生能が増加した。FGF12 照射前投与では、BrdU 陽性細胞の増加、上皮分化マーカー(villin)陽性細胞増加も認められ、FGF12 はクリプト細胞の増殖、上皮の分化を促進することができた。

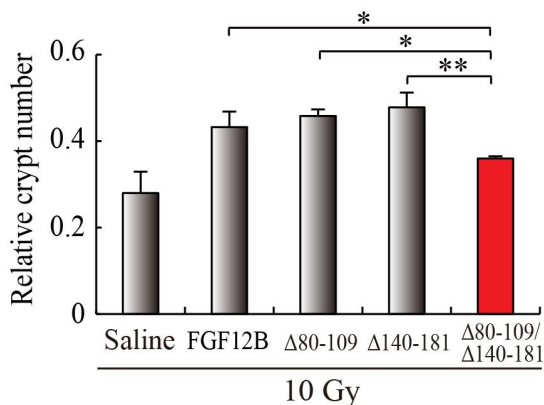


(2) FGF12B アミノ酸配列に基づき、各 30 残基からなるペプチドを FGF12B 全長にわたり合成し、IEC6 細胞を使ったアポトーシスを測定した。その結果、アミノ酸残基 80-109 位 (P8) と 140-169 位 (P12) に相当する 2 つのペ

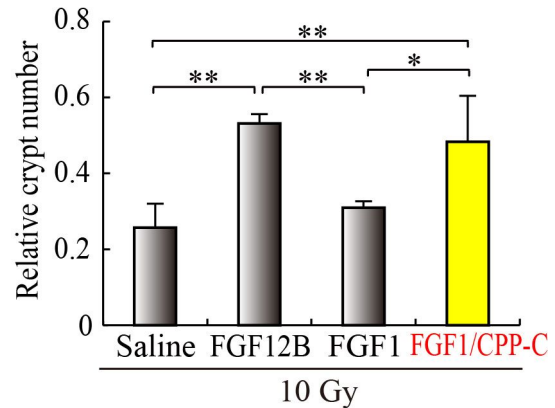
プチドでアポトーシスの有意な低下が認められた。そこで、これらのペプチド 22nmole をマウスに腹腔内投与し、TUNEL アッセイを行ったところ、アポトーシス数の有意な低下が認められた。しかも、このドメインはそれぞれ CPP-M と CPP-C を含んでいたが、CPP-C 配列単独のペプチドではアポトーシス数は減少しなかった。



(3) 各ドメイン及び両ドメインを欠損した FGF12B 変異体を作成してマウスに投与したところ、両ドメインを同時に欠損させた変異体を投与した時のみ放射線防護効果の減少が認められた。



(4) FGF1 は FGF12 と構造が類似している分子で CPP-M 類似ドメインを持っているが、CPP-C は欠損していた。そこで、CPP-C を FGF1 の C 末端に結合させた融合蛋白を作成した。その結果、FGF1/ CPP-C 融合蛋白質は、FGF1 よりも細胞内移行が促進され、放射線防護活性も増加した。しかしながら、FGF1/ CPP-C は FGFR による細胞増殖能が FGF1 よりもむしろ減少したことから、FGF1/ CPP-C の放射線防護効果の増加は FGFR シグナリングが必須ではなく、FGF1 の細胞内移行が重要であることが明らかになった。



(5) ヒト肥満細胞腫細胞株 HMC1 細胞に FGF12 を過剰発現させ、X 線照射したところ、アポトーシスの減少が認められ、細胞ライセートの抗体アレイによる解析で p38 活性化が抑制されているのが見出された。IEC6 細胞に対して p38 阻害剤を添加すると放射線誘導性アポトーシスが有意な低下したことから、FGF12 の細胞内移行は、p38 活性化を抑制し、放射線誘導性アポトーシスを減少させることが明らかになった。

(6)まとめ

FGF12 が FGFR 非依存性に細胞内移行することにより、放射線小腸障害に対する防護効果を発揮することが示された。さらに、照射後投与でもその効果が発揮されることから、FGF12 細胞内移行の放射線防護効果における有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakayama F, Umeda S, Yasuda Y, Fujita M, Asada M, Meineke V, Imamura T, Imai T, Cellular internalization of fibroblast growth factor-12 exerts radioprotective effects on intestinal radiation damage independently of FGFR Signaling. Int J Radiat Oncol Biol Phys 査読有 88, 2014, 377-384

〔学会発表〕(計4件)

中山文明、FGF12 の FGFR 非依存性な細胞内移行による小腸放射線障害防護効果、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

中山文明、FGF12 の細胞内移行による放射線防護効果について、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日、ホテルクラウンパレス青森(青森県・青森市)

中山文明、Enhanced cellular

internalization of FGF1/CPPC fusion protein promoted its radioprotective effect in the hair follicles., International Investigative Dermatology 2013、2013年5月8日、エジンバラ(英国)
中山文明、FGF1の細胞内移行促進による放射線障害小腸の再生効果について、第12回日本再生医療学会総会、2013年3月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：細胞膜透過性の線維芽細胞増殖因子の医療用途
発明者：中山文明、梅田禎子、安田武嗣、藤田真由美、今井高志
権利者：独立行政法人放射線医学総合研究所
種類：特許
番号：PCT/JP2013/080382
出願年月日：平成26年3月4日
国内外の別：国内、米国

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 文明 (NAKAYAMA, Fumiaki)
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー
研究者番号：50277323

(2) 連携研究者

今井 高志 (IMAI, Takashi)
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・プログラムリーダー
研究者番号：50183009

(3) 研究協力者

梅田 禎子 (UMEDA, Sachiko)