

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460471

研究課題名(和文) 乳癌の浸潤転移に及ぼすFGF受容体とインテグリンのクロストーク

研究課題名(英文) Cross-talk between FGF receptor and integrin in breast cancer invasion and metastasis.

研究代表者

森 誠司 (Mori, Seiji)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：90467506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌の浸潤転移に重要である上皮間葉転換(EMT)に着目した。乳腺上皮細胞に形質転換増殖因子(TGF- β 1)をもちいてEMTを誘導したとき、FGF1を添加するとEMTは正と負の二方向性に制御されることを明らかにした。またTGF- β 1によりインテグリン α 3とFGF受容体の発現が上昇することが分かった。そこでインテグリン α 3の遺伝子発現を抑制するとこの現象はみられなかった。またインテグリンに結合できないFGF変異体ではTGF- β 1に誘導されるEMTを二方向性に制御することはできなかった。これよりFGF1とインテグリン α 3の直接の結合がEMTの制御には重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of α 3 induced by TGF- β 1 on TGF- β 1-induced EMT. We elucidated that FGF1 bi-directionally regulated EMT induced by TGF- β 1 in MCF10A mammary epithelial cells. TGF- β 1 markedly amplified integrin α 3 and FGFR1. We studied if the enhancing effect of FGF1 on TGF- β 1-induced EMT requires enhanced levels of both integrin α 3 expression and FGFR1. Knockdown of integrin α 3 suppressed the enhancement by FGF1 of TGF- β 1-induced EMT in MCF10A cells. Integrin-binding defective FGF1 mutant did not show bi-directional effect on TGF- β 1-induced EMT in MCF10A cells. These findings suggest that enhanced integrin α 3 expression in addition to enhanced FGFR1 expression is critical for FGF1 to regulate TGF- β 1-induced EMT in mammary epithelial cells.

研究分野：分子病理学

キーワード：インテグリン FGF FGFR 腫瘍

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、細胞は局所から逸脱し浸潤・転移といった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外基質との結合のみならず、シグナル伝達分子としても重要であり、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。

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、インテグリンとFGF受容体のクロストークは、FGFがFGF受容体のみならずインテグリンにも結合することでシグナルが伝達されるのではないかと考え、FGF1とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の立体構造データを用いてシミュレーション解析をおこなった。その結果FGF1がインテグリン $\alpha v \beta 3$ に直接結合することを見出した。このシミュレーション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 $\alpha v \beta 3$ の結合が細胞増殖・遊走に必要な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。癌の進展には血管が重要な役割をはたしている。また我々は*in vitro*、*in vivo*の解析から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)。これら一連の発見より、我々は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ている。

2. 研究の目的

非浸潤性乳管癌(DCIS)が管腔構造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。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」の三者の關係に着目し、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) 細胞が浸潤性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FGF1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。

(2) EMTにともない上皮系のマーカーであるEカドヘリンまた間葉系のマーカーであるNカドヘリンや平滑筋アクチンなどの発現量が変化することが知られている。これらEMTマーカーの発現量にFGF1とインテグリン $\alpha v \beta 3$ が及ぼす影響をタンパク質量またはmRNA量を指標に解析した。

(3) これまでに我々はインテグリンに結合できないFGF1の変異体FGF1-R50E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FGF1-R50Eをもちいて、MCF10A細胞のEMTにおけるFGF1とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用の意義を解析した。またTGF- $\beta 1$ によるインテグリンファミリー分子の発現量の変化も解析した。

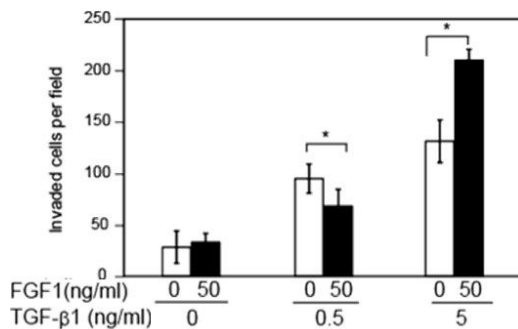
(4) MCF10A細胞を人口細胞外基質の上で培養すると乳腺構造を模倣した腺房構造を形成する。これをTGF- $\beta 1$ で刺激しEMTを誘導することで極性の乱れを見ることができ、このときのFGF1とインテグリンの役割について解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 正常乳腺上皮細胞株(MCF10A)にTGF- $\beta 1$ を用いEMTを誘導するときにFGF1を同時に添加した。TGF- $\beta 1$ の濃度が比較的高いとき(5 ng/ml)にFGF1を添加

すると細胞は紡錘状に変化した。一方で TGF- β 1 の濃度が比較的低いとき (0.5 ng/ml) に FGF1 を添加しても紡錘状の変化はみられなかった。また、同様な条件で MCF10A 細胞の浸潤能を解析したところ 5 ng/ml TGF- β 1 に対して FGF1 を添加すると細胞浸潤能は亢進した。一方で 0.5 ng/ml TGF- β 1 に対して FGF1 は浸潤の抑制性の効果を示した (図 1)。

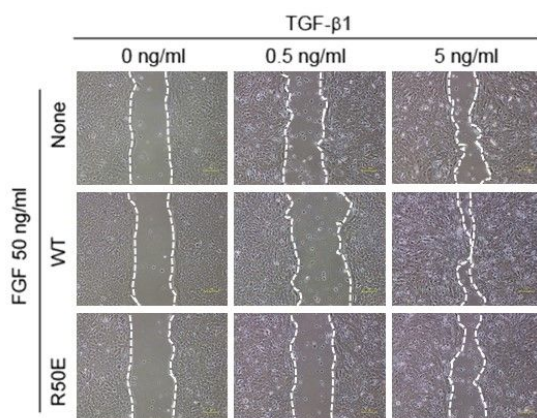
図 1



(2) EMT の進行にともない間葉系のマーカーである N カドヘリンの発現量が増加することが知られているが、この時の FGF1 の影響を解析した。5 ng/ml TGF- β 1 で誘導された N カドヘリンのタンパク質発現量は FGF1 により亢進されることが分かった。一方、0.5 ng/ml TGF- β 1 により誘導された N カドヘリンのタンパク質発現量は FGF1 により抑制されることが分かった。これらの結果から FGF1 は EMT に対して二方向性の作用を有することが分かった。

(3) インテグリンに結合できない FGF1 の変異体 FGF1-R50E を用いることで EMT におけるインテグリンの役割について解析した。いずれの濃度の TGF- β 1 によって誘導された EMT に対しても FGF1-R50E は N-カドヘリンの発現量に影響をあたえることはなかった。同様に TGF- β 1 によって誘導される細胞の遊走能に対しても FGF1-R50E は影響を与えることはなかった (図 2)。また TGF- β 1

図 2



によるインテグリンファミリー分子の発現量を解析したところインテグリン α v β 3 のみに発現量の亢進がみられた。これより FGF1 とインテグリン α v β 3 が結合することが EMT の 2 方向性の制御に重要であることが示唆された。

(4) MCF10A 細胞を人口細胞外基質の上で培養し腺房構造を形成させた後、TGF- β 1 で EMT を誘導した。5 ng/ml TGF- β 1 により乱れた細胞極性は FGF1 によりさらに亢進されることが分かった。一方、0.5 ng/ml TGF- β 1 により誘導された極性の乱れは FGF1 により抑制された。また FGF1-R50E は TGF- β 1 による極性の乱れに対して影響をあたえることはなかった。これより FGF1 とインテグリン α v β 3 が結合することが上皮細胞の極性制御にも重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Mori S, Hatori N, Kawaguchi N, Hamada Y, Shih TC, Wu CY, Lam KS, Matsuura N, Yamamoto H, Takada YK, Takada Y. The integrin-binding defective FGF2 mutants potently suppress FGF2 signaling and angiogenesis. *Biosci Rep*. 査読有 37(2), pii:BSR20170173, 2017; DOI: 10.1042/BSR20170173

Mori S, Kodaira M, Ito A, Okazaki M, Kawaguchi N, Hamada Y, Takada Y, Matsuura N. Enhanced expression of integrin α v β 3 induced by TGF- β 1 is required for the enhancing effect of fibroblast growth factor 1 (FGF1) in TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells. *PLoS One*. 査読有 10, e0137486. 2015; DOI: 10.1371/journal.pone.0137486

Mori S. and Takada Y.: FGF1 (fibroblast growth factor 1 (acidic)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 査読無 18(3): 164-168. 2014; DOI: 10.4267/2042/53482

Uchinaka A, Kawaguchi N, Mori S, Hamada Y, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N., Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -3 improves cardiac function in an ischemic cardiomyopathy model rat. *Tissue Eng Part A*. 査読有 Nov; 20 (21-22): 3073-84.2014; DOI:10.1089/ten.TEA.2013.0763

[学会発表](計 14 件)

羽鳥 暢晃、森 誠司、松浦 成昭、高田 義一、山本 浩文、Dominant-Negative FGF2 Mutants Suppress Angiogenesis. 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016 年 11 月

30～12月2日 横浜市パシフィコ横浜
羽鳥 暢晃、森 誠司、松浦 成昭、山本 浩
文、「FGF2 変異体は血管新生を抑制する」
第75回 日本癌学会学術総会 2016年10
月6～8日 横浜市パシフィコ横浜
岡崎 実佳、森 誠司、小平 萌、伊藤 彩
乃、高田 義一、松浦 成昭、山本 浩文、
「FGF1 とインテグリン $\alpha 3$ の結合はヒ
ト正常乳腺上皮細胞株において TGF- $\beta 1$
によって誘導される $\alpha 1$ -SMA の発現を抑制
する」第38回 日本分子生物学会年会
2015年12月1～4日 神戸市神戸国際会
議場
森誠司、小平萌、岡崎実佳、高田義一、松
浦成昭、「線維芽細胞増殖因子 (FGF) は
FGF 受容体とインテグリン $\alpha 3$ を介し
て上皮間葉転換を制御する」第24回 日
本がん転移学会学術集会 2015年7月23
日～24日 大阪
伊藤 彩乃、森誠司、佐々本 尚子、岡崎 実
佳、河口 直正、高田 義一、松浦 成昭、
「卵巣癌における線維芽細胞増殖因子と
インテグリンの相互作用が上皮間葉転換
に及ぼす影響」第37回 日本分子生物学
学会年会 2014年11月25～27日 横浜市
パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 誠司 (MORI, Seiji)
大阪大学大学院医学系研究科・招聘教授
研究者番号：90467506

(2) 研究分担者

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)
大阪大学大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：70190402

(3) 研究分担者

河口 直正 (KAWAGUCHI, Naomasa)
大阪大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70224748

(4) 研究分担者

濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke)
大阪大学大学院医学系研究科・特任准教
授
研究者番号：10362683

(5) 研究協力者

高田 義一 (TAKADA, Yoshikazu)
University of California Davis, 教授