

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590446

研究課題名(和文)腫瘍細胞におけるFGF受容体とインテグリンの新しいクロストークの理解

研究課題名(英文) A Novel Mechanism of Crosstalk between Fibroblast Growth Factor Receptor and Integrin α v β 3

研究代表者

森 誠司 (Mori, Seiji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90467506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに線維芽細胞増殖因子(FGF1)がその受容体(FGFR)と接着分子インテグリン α v β 3と結合し三量体を形成することを報告している。本研究ではこの3量体形成が血管内皮細胞の増殖や細胞遊走に重要であることを明らかにした。腫瘍が増殖するときに血管新生を伴うが、インテグリンに結合できないFGF1の変異体(FGF1-R50E)は腫瘍の増殖を抑制した。また過剰に加えたFGF1-R50Eは野生型のFGF1が誘導する血管新生に対してドミナントネガティブに作用した。これよりインテグリン α v β 3とFGF1の結合が腫瘍の血管新生に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Fibroblast growth factor 1 (FGF1) binds both FGF receptor and integrin α v β 3, and also reported that integrin binding defective FGF1 mutant (Arg 50 to Glu, R50E) is defective in a fibroblast cell proliferation and migration. In this study, we tested if the interaction between FGF1 and integrin α v β 3 is required for angiogenesis and tumor growth. Here we demonstrated that FGF1-R50E is defective in inducing endothelial cell migration and tube formation, and suppressed wild-type FGF1-induced signaling (dominant-negative effect) in vitro. FGF1-R50E suppressed growth of colon cancer cells which subcutaneously transplanted in nude mice. These findings suggest that FGFR and integrin α v β 3 crosstalk through direct integrin binding to FGF, and that R50E acts as an antagonist to FGFR. We proposed that FGF1-R50E has potential as an anti-angiogenesis and anti-cancer therapeutic.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：インテグリン FGF FGF受容体 血管新生

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は当初、線維芽細胞に対する増殖因子として同定されたが、正常細胞のみならず腫瘍細胞も FGF をパラクラインもしくはオートクラインで分泌していることが分かっており、腫瘍の増殖、遊走、浸潤と言った癌に特異的な作用を促進していると考えられている。

インテグリンは細胞接着に寄与するのみならず、細胞外基質をリガンドとしたレセプターとしても働いており細胞内にシグナルを伝達している。またインテグリンと増殖因子レセプターとの協調作用が示唆されており、増殖因子レセプターとインテグリンの間にある共通のシグナル経路いわゆるクロストークがあるとされている。そのシグナルは細胞内のいくつかのステップでリンクしていると考えられているが、その明確な機序は解明されていない。

そこで申請者らは細胞内シグナル伝達には FGF が FGF レセプターとインテグリンの双方に結合することが必要であるという仮説を立て、コンピューターシミュレーションを用い FGF1 が FGF レセプターのみならずインテグリンにも結合することを発見した。

このモデルに基づいた FGF1 への変異導入解析からインテグリンとの結合に必須のアミノ酸の一つが 50 番目のアルギニン (R50) であることをインビトロの実験系にて実証した。申請者らはこのアルギニンをグルタミン酸へと変異導入した組換え FGF1 (FGF1-R50E) を作成し、このインテグリン結合能欠損 FGF1-R50E が細胞増殖、DNA 合成、細胞遊走を阻害することを示した。すなわち FGF1 とインテグリンの結合は細胞の増殖、遊走といった細胞機能に必要であるということ を明らかにしている (Mori S. J. Biol. Chem. 2008)。これに引き続いて FGF1-R50E は野生型 FGF1 に比較しその効果の持続時間が短いこと、また FGF1-R50E がドミナントネガティブに作用することも明らかにしている (Yamaji S. PLoS One 2010)。これらの発見は増殖因子レセプターとインテグリンのクロストークは細胞内のみならず細胞膜表面上でもおきているという、画期的な概念を示唆することとなった。

2. 研究の目的

FGF1-R50E はインテグリンと FGF 受容体のシグナル伝達研究において重要なツールになるだけでなく、その細胞増殖抑制能から抗腫瘍効果も期待される。以下の二点を明らかにすることを目的とした。

(1) インテグリンと FGF レセプターのクロストークは細胞内のみならず細胞膜表面上でも起きているということを明確にするために、その分子メカニズムを解析することを目的とした。

(2) これまでに FGF1-R50E が線維芽細胞の増殖もしくは DNA 合成を促進しないこと、

またドミナントネガティブに作用することをインビトロにて証明している。対象をがん細胞と血管内皮細胞に広げ FGF1-R50E の抗腫瘍性、血管新生阻害効果について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株 DLD-1 に野生型 FGF1 (WT-FGF1) あるいは変異型 FGF1 (FGF1-R50E) を恒常的に発現させ、ヌードマウスに接種し腫瘍体積を継時的に解析した。

(2) FGF1-R50E が癌細胞株 (乳癌、大腸癌、胃癌等) および血管内皮細胞 HUVEC の運動能に与える影響を、トランスウェルを用いて解析した。上層には細胞を、下層には WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を加え、6 時間後に遊走した細胞数を計測した。

(3) FGF1-R50E が癌細胞株および HUVEC 細胞の浸潤能に与える影響を、基底膜再構成基質 (Matrigel) を固層化したトランスウェルを用いて解析した。上層に細胞を加え下層には WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を加え、24 時間後に浸潤した細胞数を計測した。

(4) FGF1-R50E が内皮細胞の管腔構造の形成に及ぼす影響を解析するために、HUVEC 細胞を Matrigel 上に播種し WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E の存在下で 24 時間培養し管腔形成数を計測した。

(5) Matrigel に WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を加えラット背部皮下に注射しゲル化させ 10 日後にゲルを摘出し、ゲル中に新生してきた血管を染色し血管数を計測した。

(6) ラットの動脈を 1 mm 幅のリング状にものを WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を含むコラーゲンゲル中で培養した。動脈リングより新生してくる血管を解析した。

(7) 癌細胞および血管内皮細胞を用い野生型 FGF1 あるいは FGF1-R50E が細胞内シグナルに与える影響を FAK、FGFR、ERK1/2、AKT などの因子の活性化を指標に解析した。

4. 研究成果

(1) WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を恒常的に発現する DLD-1 細胞はインビトロにおいては増殖能に大きな差は認められなかった。しかし、これらの細胞をヌードマウスに接種し腫瘍体積を継時的に解析した結果 FGF1-R50E では優位に腫瘍の増殖が抑えられていることが分かった。

(2) 上記結果より FGF1 は血管新生を介して間接的に腫瘍増殖を促進しているのではないかと仮説をたて、血管新生に着目し解析を進めた。まず FGF1-R50E が HUVEC 細胞の運動能に与える影響を、トランスウェルを用いて解析した。その結果 FGF1-R50E は HUVEC 細胞の運動能を促進することはなく、また過剰の FGF1-R50E は FGF1 によって誘導される細胞運動を抑制することが分かった (図 1)。

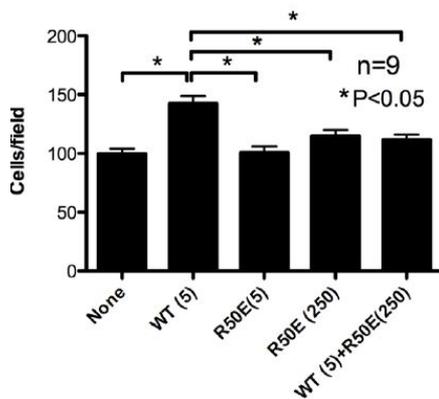


図 1

(3) FGF1-R50E が、Matrigel 上で形成される HUVEC 細胞の管腔構造に与える影響を解析したところ、FGF1-R50E は管腔形成を促進することはなかった。また過剰の FGF1-R50E は FGF1 によって誘導される HUVEC の管腔形成を抑制することが分かった。すなわち FGF1-R50E のドミナントネガティブな効果が観察された。

(4) Matrigel に WT-FGF1 あるいは FGF1-R50E を混和し、ラット背部皮下に注射し 10 日後にゲルを摘出した。ゲル中の新生血管数を計測した結果、FGF1-R50E はインビボにおいて血管新生を促すことはなかった。また過剰の FGF1-R50E は FGF1 によって誘導されるインビボにおける血管新生を抑制することが分かった。ここでも FGF1-R50E のドミナントネガティブな効果が観察された。(図 2)

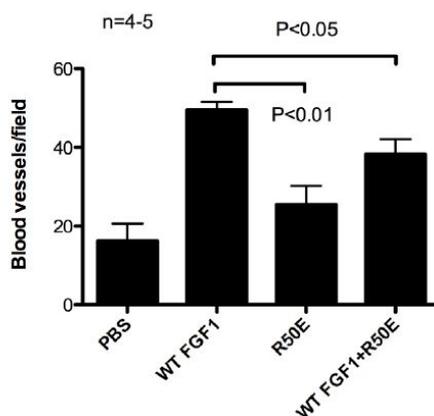


図 2

(5) ラットより採取した大動脈リングに対する血管新生作用を解析したところ FGF1-R50E は血管新生を促すことはなかった。ここでも過剰な FGF1-R50E により WT-FGF1 によって誘導される血管新生は抑制された。

(6) 血管内皮細胞を用い野生型 FGF1 ある

いは FGF1-R50E が細胞内シグナルに与える影響を ERK1/2 の活性化を指標に解析したところ、WT-FGF1 に比べて FGF1-R50E ではその持続時間が短いことが分かった。過剰な FGF1-R50E では WT-FGF1 に比べて ERK1/2 の活性化が早く起きるものの持続時間は短かった。FGF1 とインテグリンの結合が MAP キナーゼのシグナル強度の維持に必要であることがわかった。

これら一連の研究より、インテグリン α 3 と FGF1 の相互作用が腫瘍血管新生に深く関与していることが分かった。更なる解析を進めることで、FGF1-R50E による血管新生抑制作用が癌の進展抑制へ応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Mori S. and Takada Y.: Crosstalk between Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor and Integrin through Direct Integrin Binding to FGF and Resulting Integrin-FGF-FGFR Ternary Complex Formation. *Med. Sci.* 査読有 1, 20-36. 2013
DOI: 10.1371/journal.pone.0057927

Mori S., Tran V., Nishikawa K., Kaneda T., Hamada Y., Kawaguchi N., Fujita M., Takada YK., Matsuura N., Zhao M., Takada Y.: A dominant-negative FGF1 mutant (the R50E mutant) suppresses tumorigenesis and angiogenesis. *PLoS One.* 査読有 8, e57927. 2013
DOI: 10.1371/journal.pone.0057927.

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

Yokoyama Y., Mori S., Hamada Y., Kawaguchi N., Matsuura N.: Platelet-Derived Growth Factor Regulates Breast Cancer Progression via β -Catenin Expression. *Pathobiology.* 査読有 78, 253-260. 2011
DOI: 10.1159/000328061

[学会発表](計 6 件)

Mori S., Nishikawa K., Kodaira M., Ito A., Takada Y., Matsuura N.
The Direct Binding of Fibroblast Growth Factor-1 (FGF1) to Integrins is Required for Angiogenesis. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸市神戸国際会議場

Kodaira M., Mori S., Ito A., Okazaki M.

Takada Y, Matsuura N.
Bidirectional effect of Fibroblast growth factor 1 (FGF1) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) depends on interaction of integrin $\alpha v \beta 3$ and FGF1 in mammary epithelial cells. 第36回日本分~~子~~生物学学会年会、2013年12月3日~6日、神戸市神戸国際会議場

森誠司、河口直正、高田義一、松浦成昭
線維芽細胞増殖因子(FGF1)とインテグリン $v 3$ の結合は血管新生に必要である。第17回日本適応医学会学術集会、2013年6月28日~29日、さいたま市ソニックシティ

Mori S., Nishikawa K, Kaneda T, Kamei A, Kodaira M, Kodaira M, Ito A, Takada Y, Matsuura N.
FGF1 mutant, integrin binding defective, suppresses angiogenesis. The 7th International Symposium on Cancer Research and Therapy, 2012年11月09日~10日、東京都東京会館

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・助教
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・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・準教授
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・特任助教
研究者番号：10362683

(5) 研究協力者

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