

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16535

研究課題名（和文）プロテインC制御系の制御・調節を標的とした新しい癌の診断法および治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new diagnostic and therapeutic methods targeting the control and regulation of the protein C system in cancer

研究代表者

秋田 展幸（Akita, Nobuyuki）

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・准教授

研究者番号：70597327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：癌組織内でプロテインC凝固制御系の存在を明らかにする目的で研究を行った。癌組織におけるプロテインC凝固制御系に関わる因子であるトロンボモジュリンの存在を明らかにするため、培養マウス血管内皮細胞におけるトロンボモジュリンの発現について、トロンビン依存性のプロテインC活性化能を指標として検討した結果、プロテインCの活性化が認められたことから、トロンボモジュリンが存在していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近では転移癌における組織因子発現、癌幹細胞でのプロテインC受容体の発現がそれぞれ増殖や転移を促進することが報告され、癌の発生や進行を制御する新しい機構として注目を集めている。我々もプロテインCインヒビターが細胞の癌化と癌細胞の増殖・転移を抑制することを示してきた。これまでの研究で明らかにされていない重要な課題が、癌組織内での血液凝固系・制御系反応に関わる分子実態とその病態生理機能であり、本研究は世界ではじめてその課題に取り組む先駆的な研究である。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to elucidate the presence of the protein C coagulation control system within cancer tissues. To clarify the presence of factor thrombomodulin, which is involved in the protein C coagulation control system within cancer tissues, we investigated the expression of thrombomodulin in cultured mouse vascular endothelial cells using the activation ability of thrombin-dependent protein C as an indicator. As a result, the activation of protein C was observed, suggesting the presence of thrombomodulin.

研究分野：血栓止血学

キーワード：プロテインC トロンボモジュリン トロンビン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命維持に不可欠な経路で、傷害部位からの過剰な出血を制御する血液凝固系は、組織因子により開始される外因系凝固系と第 XIIa 因子などから開始される内因系凝固系に分けられ、外因系凝固系および内因系凝固系は共に、基本的にはプロテアーゼによるプロテアーゼ前駆体因子や蛋白性補助因子の逐次的活性化反応であり、第 IX 因子の第 IXa 因子への活性化以降は共通経路をたどる。一方で、正常な血管内には過剰な凝固形成を阻止して血液の流動性を維持するための複数の機構が存在し、これらの機構により、傷害部位以外での血液凝固反応は制御されている。この血液凝固制御反応は主に血管内皮細胞上で進行するものであり、その作用機序は、プロテアーゼ凝固因子を阻害するプロテアーゼインヒビターによる制御系、及び第 Va 因子や第 VIIIa 因子などの凝固促進性の蛋白補助因子を失活化するプロテアーゼによる制御系 (プロテイン C 凝固制御系) からなる。これらの制御系のうち、プロテイン C 凝固制御系では、血液凝固系で過剰に生成したトロンビンが血管内皮細胞上のトロンボモジュリンと複合体を形成し、生成したトロンビン-トロンボモジュリン複合体は、プロテイン C を活性化し、生成した活性化プロテイン C はプロテイン S を補酵素として、凝固補酵素タンパク質である第 Va 因子および第 VIIIa 因子を分解失活化することにより、過剰な血栓形成を制御している。血管内皮プロテイン C 受容体は、トロンビン-トロンボモジュリン複合体によるプロテイン C の活性化を促進することが知られている。プロテイン C 凝固制御系に関わる因子はいずれも先天性血栓性素因と考えられ、それらの量的・質的異常により、血栓症を発症すると考えられる。一方で、活性化プロテイン C はその受容体であるプロテイン C 受容体を介して血管内皮細胞保護作用や抗炎症作用を発現する (図 1)。

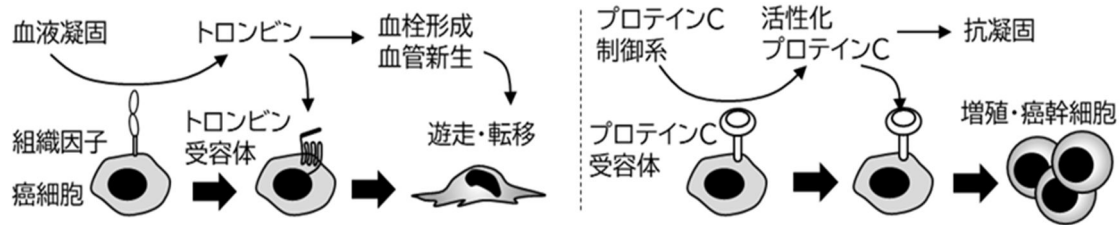


図1. 癌細胞が発現する血液凝固系・制御系因子とその役割

近年、癌細胞自身が血液凝固関連因子を発現し、癌組織内の血液凝固状態を調節することで癌にとって有利な環境を形成する可能性が指摘されている。とりわけ、プロテイン C 受容体が発現する癌細胞集団は増殖能が高く、癌幹細胞機能を有することが注目されている。我々は、これまで活性型プロテイン C の生理的阻害因子であるプロテイン C インヒビターが細胞の癌化、癌細胞の増殖・転移などを抑制することを明らかにし、癌組織においてプロテイン C 凝固制御系が癌の生物学的特性に対して有利に働く可能性を示唆してきた。古くから、癌の発生、増殖・転移は生体の血液凝固系とその制御系の影響を受けることが知られており、特に血液凝固反応によるフィブリンの沈着や血小板の活性化は循環血液中の癌細胞に足場を提供し、転移に有利な細胞接着環境を形成すると考えられている。このことは、臨床的にも、経験的に抗凝固療法を実施している患者では転移が少ないことが知られていることとも矛盾せず、このほか、癌の増殖と血液凝固系の関連では、図 2 に示す通り癌細胞自身が、血液凝固開始因子である組織因子を発現し、血液凝固反応で生成されるトロンビンが癌細胞上のトロンビン受容体を介して癌細胞の遊走や血管新生を誘導することが報告されている一方で、一部の癌細胞はプロテイン C 受容体を発現しており、癌細胞の増殖や癌幹細胞としての機能維持に重要であることが示されていることから、血液凝固を抑制するプロテイン C 凝固制御系もまた、癌の発生と増殖に関わると考えられることから、癌細胞は相反する血液凝固状態を巧妙に活用していると考えられる。

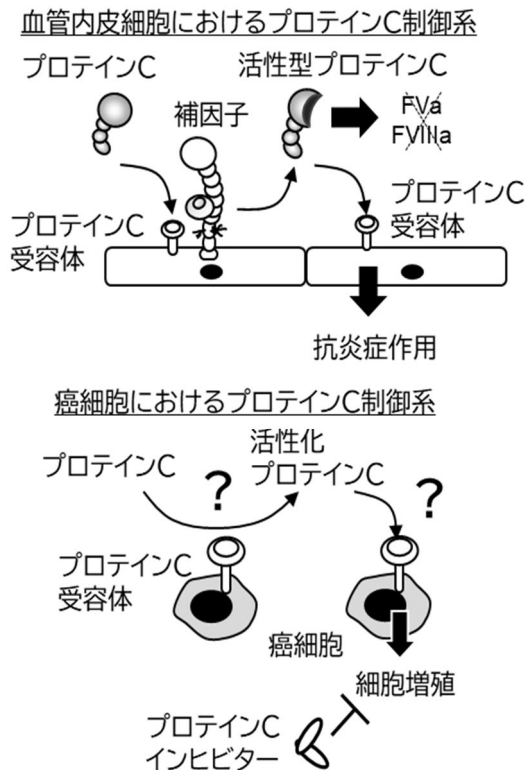


図2. 血管内皮細胞におけるプロテインC制御系と本研究課題の問い

2．研究の目的

プロテイン C 凝固制御系は、生体内における凝固の行き過ぎによる過剰な血栓形成を制御する系であり、癌においては活性化プロテイン C がプロテイン C 受容体を介して細胞増殖を促すと予測されるが、癌の増殖における活性化プロテイン C を含むプロテイン C 凝固制御系の役割はいまだ明らかではない。本研究では、図 2 に示すように、癌組織内でプロテイン C 凝固制御系の存在を明らかにし、活性化プロテイン C-プロテイン C 受容体経路が癌の増殖や転移を促進することを証明することである。そのために、マウス骨肉腫細胞株の Dunn 細胞を用いて、マウス担癌モデルを作成して癌組織内におけるプロテイン C 凝固制御系に関わる因子の存在を明らかにすることを目的とする。

3．研究の方法

プロテイン C 受容体は広範な細胞種で発現しており、特に血管内皮細胞や上皮細胞、胎盤などで高発現する。ヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞はマウス Fat pad に播種するとプロテイン C 受容体を高発現する細胞集団が現れる。そこでマウス骨肉腫細胞株の Dunn 細胞を C3H マウスの背部皮下に移植して担癌モデルを作成した。癌組織におけるプロテイン C 凝固制御系に関わる因子であるトロンボモジュリンの発現については、抗マウストロンボモジュリン抗体を用いた免疫組織染色法により検討を行った。続いて、培養マウス血管内皮細胞におけるトロンボモジュリン発現について、同様に免疫染色法を用いて検討を行うと同時に、in vitro で培養マウス血管内皮細胞におけるトロンボモジュリンの発現について、トロンピン依存性のプロテイン C 活性化能を指標として検討を行った。

4．研究成果

Dunn 細胞を C3H マウスの背部皮下に移植することで担癌モデルを作成することができた。癌組織におけるプロテイン C 凝固制御系に関わる因子であるトロンボモジュリンの発現について抗マウストロンボモジュリン抗体を用いた免疫組織染色法で検討を行った結果、その発現は検出できなかった。続いて、培養マウス血管内皮細胞におけるトロンボモジュリン発現について、同様に免疫染色法を用いて検討を行ったが、発現は認められなかった。そこで、培養マウス血管内皮細胞におけるトロンボモジュリンの発現について、トロンピン依存性のプロテイン C 活性化能を指標として検討した結果、プロテイン C の活性化が認められたことから、使用した抗トロンボモジュリン抗体が免疫染色による癌組織におけるトロンボモジュリン発現の検出には適していなかった可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akita N, Yoshida K, Okamoto T, Asanuma K, Suzuki K, Hayashi
2. 発表標題 Various receptors are related with the APC-induced suppression of osteoclast differentiation.
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Haemostasis 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T
2. 発表標題 Mechanism of HGF-induced decreased expression of protein C inhibitor in HepG2 cells.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuyuki Akita, Takayuki Okamoto, Junji Nishioka, Koji Suzuki, Tatsuya Hayashi
2. 発表標題 Mechanism of hepatocyte growth factor induced decreased expression of protein C inhibitor in HepG2 cells.
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Haemostasis 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------