

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590499

研究課題名(和文) 肝癌が腫瘍血管での血液凝固を阻止し血流を維持するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms to keep blood vessels patent in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

宮城 洋平 (Miyagi, Yohei)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・総括部長

研究者番号：00254194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝がん細胞は血液凝固第VII因子(fVII)と組織因子(tissue factor: TF)を同時に産生する。本研究では、肝がん細胞が、生理的には血管内皮細胞が産生する凝固抑制因子:tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-1を異所性に産生し、この環境下でも血液凝固のTF-fVII経路が活性化されないことを見出した。少なくとも肝がん細胞には、「がん組織が血液凝固反応を積極的に回避し、血管の疎通性を確保するメカニズム」が存在して、これが、有用ながん治療の新規分子標的となる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) cells produce both blood coagulation factor-VII (fVII) and tissue factor (TF). We clarified in the present study that under such circumstances, HCC cells do not elicit TF-fVIIa blood coagulation pathway because of ectopic tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-1 production. At least in HCC cells, there exist a mechanism to keep patency of tumor vessels, that could be a good target for novel anticancer therapy.

研究分野：分子腫瘍学・病理学

キーワード：凝固第VII因子 組織因子 凝固 肝がん TFPI TF fVII

1. 研究開始当初の背景

血管が破綻した際に血液を凝固させ止血する外因系血液凝固カスケードは、血液中に存在する fVII と血管内皮を取り巻く細胞の膜表面に発現している TF が複合体を形成し活性化型セリンプロテアーゼとなることで引き金が引かれ、凝固第 X 因子を部分分解して活性化型 Xa に変換、最終的にフィブリノーゲンをフィブリンに変換し血液を凝固させる。1800 年代の中頃、Trousseau が癌患者に血栓症が高率に合併することを最初に報告して以来、様々な研究が進められ、癌患者の血液凝固能亢進が科学的に示され (Sallah S, et al. Clin Cancer Res 2004;10:7238-43 他), 癌細胞自体が TF そのものや, plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I), cyclooxygenase-2 (COX-2) などの凝固活性化能を有する物質を産生することが証明されている (Boccaccio C, et al. Nature 2005;434:396-400 他)。加えて、癌細胞では TF/fVII 複合体が形成されることで細胞内情報伝達経路が活性化され、細胞の増殖や細胞死の回避、運動/浸潤能の促進、また、VEGF の発現誘導を介する血管新生など、多岐に及ぶ機能が発揮されることが示されている (総説: Ruf W. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1545-50)。

一方、申請者らは、生理的には専ら肝細胞が産生する fVII が、様々なヒト培養癌細胞で異所性に産生され血液凝固反応を惹起すること、低酸素状態で fVII 発現が誘導される癌細胞があること、fVII 産生癌細胞が TF/fVII 複合体を含む膜小胞成分 (microparticle) を分泌すること、を報告している (Cancer Res 66:9453-60, 2006, Br J Cancer 101:2023-2029, 2009, Mol Cancer Res 7(12):1928-36, 2009)。この一連の研究の過程で、肝細胞を発生母地とする肝癌細胞が、TF と同時に大量の fVII を産生するにもかかわらず fX を活性化しない、つまり、血液凝固を惹起しないという逆説的な現象に遭遇し、肝癌細胞が TF/fVII 複合体機能を抑制する TFPI を同時に産生していることを極最近明らかにした (第 70 回日本癌学会総会, 2011 年 10 月, 名古屋)。肝癌は門脈系と肝動脈系の 2 重支配を受ける極めて血管に富んだ腫瘍で、その発生初期の段階から VEGF を始めとする proangiogenic factor を産生して血管新生を誘導すること、VEGF 発現が肝癌の悪性度と相関し予後不良因子であること、などが報告されている (総説: Yang ZF & Poon RT. Anat. Record 291:721-34, 2008)。

TFPI 発現に関する国内外の研究では、それぞれ数種類の培養乳癌、大腸癌、膵癌細胞株で、TFPI の産生のみを報告した論文が散見される (Sierko E, et al. Thromb Haemost 103:198-204, 2010 他)。肝芽腫細胞株 HepG2 が TF は産生せず TFPI を産生することが知られており、TFPI の研究に使われてきたが

「肝癌」をテーマとした研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、TFPI 産生能の獲得が極めて血管に富む腫瘍として知られる肝癌の初期発生、成長・進展過程において果たす役割を明らかにするために、特に「血液凝固の回避による腫瘍血管疎通性の維持」という観点から、臨床検体の病理組織学的解析や分子病理学的アプローチでの解析を進める。得られた研究成果をもとに、TF-fVII 経路を抑制することで、腫瘍血管を特異的、効率的に閉塞させる新規治療法の開発に繋げる研究に展開したい。

3. 研究の方法

ホルマリン固定パラフィン包埋された外科切除肝癌組織で免疫染色により TFPI, TF の肝がん細胞に於ける発現動態 (発現の有無、強弱と局在部位) を明らかにし、分化度などの病理組織診断との関連、予後などを主とする臨床病理学的情報との関連を解析する。凍結組織を用いた mRNA レベル、タンパク質レベルでの発現検討を行い免疫染色結果の信頼性を確認する。

先行研究で TFPI-1 発現を shRNA で knockdown すると、細胞増殖に全く影響されず、ヌードマウス皮下での造腫瘍能が顕著に阻害されることが解っている。そこで、ドキシサイクリンで TFPI-1 shRNA の発現を誘導可能な Tet-ON system を利用して、ヌードマウス皮下腫瘍を最大径 1cm 程度まで成長させた時点で、飲み水へのドキシサイクリン添加を開始し、腫瘍の成長の変化を観察、適宜、腫瘍を摘出する。摘出した腫瘍では、TFPI 発現がノックダウンされていることを免疫染色、Western blot で確認すると共に、TFPI の発現が消失したことによる変化を、negative control と比較しながら病理組織学的、分子病理学的に解析する。

4. 研究成果

組織アレイを使った免疫組織学的解析では、TFPI-1 の発現は、形態学的には細胞質にびまん性に染色されるパターンと、細胞膜を縁取る様な発現パターンの 2 つの発現様式を示していた。年齢、性別、腫瘍サイズ、組織型、病期、肝硬変の有無、全生存期間など臨床病理学的因子との相関は認められなかった。発現パターンと臨床病理学的因子の相関もなかった。一方、発現メカニズム解析の一環として、アンドロゲン受容体 (AR), 及びその co-activator として知られる SRC-1, SRC-3 の発現に付いて解析したところ、統計学的な有意差を持って、TFPI-1 との間で発現に相関を認めることができた。Lupu C らは、血管内皮細胞における TFPI-1 の発現が androgen dependent TFPI regulating protein (ADTRP) を介してアンドロゲン依存的に誘導されることを報告している (Blood

118: 4463-71). 本研究では免疫染色に使える ADTRP の良い抗体が入手できず、肝がん細胞での TFPI-1 発現における ADTRP の関与は今後の課題である。

腫瘍最大径が 10mm となった時点でドキシサイクリンの投与を開始し shRNA の発現を誘導して、TFPI-1 タンパクの産生を抑制した肝がん細胞の免疫不全マウス xenograft では、コントロール(non-specific shRNA の発現を、肝がん細胞で同様に誘導した群)との間で、その腫瘍の成長に顕著な差が見られなかった。ところが、腫瘍最大径が 20mm に達した時点でマウスを sacrifice し、摘出した腫瘍を解析したところ、TFPI-1 発現抑制群では、明らかに腫瘍壊死の出現領域が広く、また、microvessel density が低下していた。TFPI-1 発現抑制により惹起された TF-fVII 経路の血液凝固反応が、腫瘍血管の血栓塞栓を引き起こして壊死が生じたものと推測される。また、microvessel density の低下が見られ、血管新生が阻害されている可能性もある。TF-fVII 以外の凝固因子や血管新生に関わる血管内皮などは、全て、腫瘍細胞ではなく宿主のマウス由来であることも勘案して今後の研究を進めていく必要がある。

肝がん細胞における異所性 TFPI-1 発現の分子メカニズムについては十分に迫ることができなかったが、「がん組織が血液凝固を回避して血管の疎通性を積極的に確保するメカニズム」が存在し、これが、がんの増殖、進展などの生物学的特徴に関わり、また、逆に有用ながん治療の分子標的となる可能性を示すことができた。TFPI-1 抗体や fVII inhibitor 等による新規肝がん治療法の開発を検討している。

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 4 件)

1. Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y. HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acid Res* 40(12):5389-5401, 2012.
2. Arakawa N, Miyagi E, Nomura A, Morita E, Ino Y, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H. Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Proteome Res* 12(10):4340-50, 2013. doi: 10.1021/pr400282j.
3. Koizume S, Miyagi Y. Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII pathway: Possible

therapeutic targets. *World J Clin Oncol* 5(5):908-920, 2014. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.908.

4. Koizume S, Ito S, Nakamura Y, Yoshihara M, Furuya M, Yamada R, Miyagi E, Hirahara F, Takano Y, Miyagi Y. Lipid starvation and hypoxia synergistically activate ICAM1 and multiple genes in an Sp1-dependent manner to promote the growth of ovarian cancer. *Mol Cancer*14(1):77, 2015.

[学会発表](計 6 件)

1. Shiro Koizume, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yasuo Takano, Wolfram Ruf, Yohei Miyagi. HIF2 /Sp1/mTOR interaction mediates a deacetylation-dependent FVII gene activation under serum deprived condition in ovarian cancer cells. 米国癌学会年会 2012, シカゴ.
2. 小井詰史朗, 宮城悦子, 平原史樹, 吉原光代, 高野康雄, 宮城洋平. HIF/Sp1/mTOR 相互作用による ICAM1 発現は虚血性環境における卵巣がん細胞生存を促進する. 第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 21 日、札幌.
3. 伊藤慎, 小井詰史朗, 高野康雄, 宮城洋平. 肝細胞癌で発見する異所性 TFPI1 による癌細胞での接着阻害. 第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 21 日、札幌.
4. Shin Ito, Shiro Koizume, Yuji Sakuma, Roppei Yamada, Wolfram Ruf, Yasuo Takano, Yohei Miyagi. Aberrant expression of TFPI-1 associated with low procoagulant activity of liver cancer cells. 米国癌学会年会 2013, ワシントン DC.
5. 伊藤慎, 小井詰史朗, 吉原光代, 中村圭靖, 宮城悦子, 平原史樹, 高野康雄, 宮城洋平. 卵巣癌細胞により分泌される組織因子含有マイクロパーティクルの性質. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日、横浜.
6. 小井詰史朗. 伊藤慎. 吉原光代. 中村圭靖. 宮城悦子. 平原史樹. 高野康雄. 宮城洋平. 相乗的 ICAM1 発現誘導の阻害は明細胞卵巣腫瘍の増殖を抑制する. 第 72 回日本癌学会学術総会. 平成 25 年 10 月 3 日. 横浜.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等
特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮城 洋平 (MIYAGI YOHEI)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・総
括部長
研究者番号：00254194

(2)研究分担者

小井詰史朗 (KOIZUME SHIRO)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任
研究員
研究者番号：60416063