

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460396

研究課題名(和文) プロテインC凝固制御系因子による腫瘍制御に関する分子病態学的研究

研究課題名(英文) Molecular pathological studies on the effect of anticoagulant protein C pathway on the regulation of tumorigenesis

研究代表者

鈴木 宏治 (Suzuki, Koji)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70077808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテインC(PC)凝固制御系を抑制するヒトPCIの遺伝子導入(TG)マウスを用いて、接種したB16メラノーマ細胞の増殖と転移に及ぼす抗凝固因子の影響を解析した。その結果、PCI-TGマウスでは野生型マウスに比較して、B16細胞の増殖と肺転移は有意に促進されており、腫瘍組織でのフィブリン沈着も著しく増加していた。このPCI-TGマウスにみられるB16腫瘍細胞の増殖・転移促進作用は、抗ヒトPCI抗体、抗凝固因子の活性化PC(APC)及び遺伝子組み換えトロンボモジュリン(rTM)の投与で著しく抑制された。この結果から、PC凝固制御系因子は腫瘍の増殖・転移を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein C inhibitor (PCI), a member of the serine protease inhibitors, physiologically inhibits an anticoagulant serine protease, activated protein C (APC) and thrombin-thrombomodulin (TM) complex. In this study, we studied the effects of host PCI on growth and metastasis of B16 melanoma (B16) cells by comparing between wild-type mice and mice transgenic for human PCI gene (hPCI-TG). B16 cells growth and metastatic nodules of B16 cells in the lungs were developed in hPCI-TG mice, and fibrin deposition in the lung in hPCI-TG mice was increased more than in wild-type mice. The invasive behavior of B16 cells observed in hPCI-TG mice was reduced by anti-human PCI IgG, APC, or soluble TM administration. Present studies suggest that PCI stimulates tumor cell growth and metastasis via its procoagulant properties, and anticoagulant proteins regulate PCI-dependent tumor cell growth and metastasis.

研究分野：血栓止血学

 キーワード：プロテインC凝固制御系 抗凝固因子 腫瘍促進作用 プロテインCインヒビター 抗腫瘍作用 活性化
 プロテインC トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

白血病、膵癌、肺癌などの悪性腫瘍患者では深部静脈血栓症や脳血栓症などを併発しやすく、また高頻度に致死的な播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC) を発症する。この原因は、腫瘍細胞が血液凝固惹起因子の組織因子 (tissue factor: TF) を高発現し、凝固反応を活性化するためであり、また TF には、癌細胞の増殖・転移・血管新生を促進する作用もある (*J Cell Biol* 1998)。一方、抗凝固療法により、担癌患者の腫瘍が縮小することが報告されている。低分子ヘパリンは、*in vitro* で血管新生を阻害し、担癌動物ではアポトーシスを誘導して抗腫瘍作用を示し (*Cancer Res* 2000)、進行癌患者に対して、抗凝固薬を用いない治療と比較して、有意に癌患者の生存性を高めることが報告されている (*J Thromb Haemost* 2007)。また、ヘパリンはインテグリン依存性の細胞接着を抑制して癌転移を抑制するとの報告もある (*PNAS* 2001)。さらに、抗炎症性血小板阻害薬のアスピリンは消化器癌などの発生を予防することが認められている (*Lancet* 2011)。これらの事実は、血液凝固促進物質には腫瘍増大作用が、逆に凝固阻害物質には腫瘍抑制作用があることを示唆している。

他方、血液循環の維持に重要なプロテイン C(PC)凝固制御系因子の PC、トロンボモジュリン(TM)、プロテイン S(PS)、血管内皮 PC 受容体 (endothelial PC receptor: EPCR) などは抗凝固・抗炎症・細胞保護作用などを有し、これらの因子の先天性ヘテロ欠損症では高頻度に血栓症を発症し、ホモ欠損症は胎児期の臓器異常や出生直後に DIC や多臓器不全をきたし致死する。

一方、私達は PC 凝固制御系因子の阻害因子として PC インヒビター (PCI) を発見し、PCI の生化学的・分子生物学的研究を行うと共に、ヒト PCI 遺伝子導入 (hPCI-TG) マウ

スを作製してその病態生理学的研究を行い、PCI が PC 凝固制御系の過度の働きを制御して生体諸臓器の機能維持や修復に重要な役割を果たすことを示してきた。また、hPCI-TG マウスの体内は炎症亢進状態にあり、正常マウスと比較して接種腫瘍細胞が著しく増殖することを示してきた。これまで私達は、PC 凝固制御系因子 (PC、PS、TM、EPCR、PCI など) に関する様々な分子医学的研究を行うと共に、世界で最初に TM の遺伝子クローニングを行い、遺伝子組み換え TM (rTM) を敗血症・白血病・各種固形癌などに起因する DIC の治療薬として創製してきた。

こうした背景の下、本研究では、PC凝固制御系因子の腫瘍制御に関する分子病態学的解析を行い、今後の腫瘍克服に向けた基盤研究としたい。

2. 研究の目的

本研究は、ヘパリンなどの抗凝固物質が抗腫瘍作用を示すことに着目し、ヘパリン類似構造を有する (1-3) グルカンの生体防御機能に及ぼす影響、血液流動性維持や生体諸臓器の機能維持に重要な血中の抗凝固因子である PC を中心とする PC 凝固制御系因子の癌細胞の増殖と転移に及ぼす影響などを解析し、得られた成果に基づき、腫瘍の制御に関する新しい診断・治療・予防法の探索と開発に向けた基盤的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

ヘパリンとその類似糖鎖化合物の (1-3) グルカンがヒト抹消血白血球における凝固関連因子である TF、TM、EPCR などの遺伝子発現に及ぼす影響は主に各因子の mRNA の発現動態として PCR 法を用いて測定した。また、細胞機能に及ぼす種々の PC 凝固制御系因子の作用は、それらの因子の生物活性を測定すると共に、各因子特異抗体を用いた ELISA に

よって発現タンパク量を測定して検討した。各因子の抗腫瘍作用は、大腸がんやメラノーマ細胞などの腫瘍細胞を接種した hPCI-TG マウスを用いて作製した担癌モデル動物などを用いて検討した。

4. 研究成果 (平成25年度)

初年度はヘパリン類似の糖鎖化合物の凝固関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響及びPCIの腫瘍肝細胞における発現動態の解析を中心に研究を行った。

1) ヘパリン類似の糖鎖化合物の凝固関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響の解析：ヘパリン類似の糖鎖化合物のである (1-3)グルカンがヒト白血球における凝固関連因子のTF、TM、EPCRなどの遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。その結果、真菌壁由来の(1-3)グルカンは白血球を活性化して形態変化を誘導した。また、(1-3)グルカンは白血球における凝固惹起因子のTF遺伝子の発現を高め、このTFは凝固促進活性を示した。

2) PCIの肝細胞における発現動態の解析：PC凝固制御系の重要な抑制因子であるヒトPCIの肝細胞における発現動態を解析したところ、感染時の細胞傷害物質である lipopolysaccharide (LPS) は肝細胞におけるPCI産生を高めたが、感染時に血中に増加するINF-、IL-1、IL-6などのサイトカイン及びトロンピンはPCIの産生を抑制した。
(平成26年度)

当該年度は、血液流動性の恒常性に関わるPC凝固制御系因子のうち、PS活性を制御するC4b結合蛋白質 (C4BP) の感染時における肝細胞での発現変化、PCIの病態生理機能の解析、ならびに血管内皮細胞の機能調節に関わる細胞間ギャップ結合 (Gap Junction: GJ) の構成分子である Connexin32 (Cx32) の機能に及ぼす活性化プロテインC (APC) とTMの影響を解析した。

1) 感染時の肝細胞でのPSとC4BPの発現動態の解析：感染時に血中に増加するLPSは肝細胞におけるPSの産生を抑制し、C4BPの発現を促進した。また、LPS刺激で産生されるIL-6が肝細胞におけるPSとC4BPの発現量を増加させた。以上の結果から、感染時には血中のPS-C4BP複合体濃度が増加してPS活性が低下し、血液凝固亢進状態が惹起されることが示唆された。

2) PCIの病態生理機能の解析：hPCI-TGマウスを用いて、マウス生体内のPCIがトロンビン誘発性の血管透過性亢進を抑制することを認めた。この作用機序として精製カリクレインを用いて、PCIが血漿カリクレインを阻害することを示した。

3) Cx32の発現と血管内皮細胞の機能に及ぼすAPCとTMの影響の解析：APCとTMが有する血管内皮細胞保護作用を解明するため、内皮細胞機能を調節するGJ蛋白質のCx32の発現に及ぼすAPCとTMの影響を解析した。その結果、APCとTMは内皮細胞におけるCx32のmRNAと蛋白の発現量には影響を与えなかったが、蛍光低分子物質の細胞間移動を指標にしたギャップ結合 (GJ) の機能を有意に亢進した。この結果は、APCやTMはCx32以外の分子によるGJを介する細胞間相互作用が関与する可能性を示している。

(平成27年度)

最終年度ではこれまでの研究成果を検証すると共に、ヘパリン類似の糖鎖化合物(1-3)グルカンがヒト白血球の形態と機能に及ぼす影響、及び腫瘍細胞の増殖と転移に及ぼすPCIや凝固制御因子 (APC及びrTM) の影響について解析を行った。

1) (1-3)グルカンがヒト白血球に及ぼす影響：真菌壁由来の(1-3)グルカンが白血球における凝固関連因子であるTF、TMや炎症性サイトカインのTNF-などの遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。その結果、(1-3)グルカンはヒト末梢血白血球のマクロファージへ

の分化を促進すると共に、白血球/マクロファージにおけるTF やTNF- の遺伝子発現を高め、TMの遺伝子発現を抑制することを認めた。

2) PCIの腫瘍細胞の増殖・転移に及ぼす影響の解析：腫瘍細胞の増殖・転移に及ぼすPCIの影響を検討するため、hPCI-TGマウスと正常マウスにおけるB16メラノーマ(黒色腫)細胞の増殖と転移に及ぼす影響を比較したところ、メラノーマ細胞から産生されるPCIは癌細胞の増殖を抑制し、また、hPCI-TGマウスの体内で産生されるPCIはメラノーマ細胞の転移を促進することを認めた。

3) hPCI-TGマウスを用いた腫瘍細胞の増殖と転移に及ぼすAPC及びrTMの影響の解析：これまでの研究で、hPCI-TGマウスに接種したB16メラノーマ(黒色腫)細胞はPCI依存性に増殖し、転移すること、また、腫瘍組織でのフィブリン沈着も著しく増加していることを示してきた。そこで、この担癌マウスを用いてメラノーマ腫瘍細胞の増殖と転移に及ぼす抗凝固物質のAPC及びrTMの影響を解析した。その結果、抗PCI抗体の投与でみられる影響と同様に、APCとrTMはその抗凝固活性依存性に腫瘍の増殖と転移を抑制した。これらの結果から、担癌動物における腫瘍細胞の増殖と転移は抗凝固物質によって抑制される可能性が示唆された。

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12件)

1. Rao TP, Okamoto T, Akita N, Hayashi T, KatoYasuda N, Suzuki K. Amla (*Embllica officialis Gaertn.*) extract inhibits lipopolysaccharide-induced procoagulant and pro-inflammatory factors in cultured vascular endothelial cells. *Br. J Nutr* 2013; 110: 2201-2206.
2. Okamoto T, Akita N, Kawamoto E, Hayashi T, Suzuki K, Shimaoka M. Endothelial connexin32 enhances angiogenesis by positively regulating tube formation and cell migration. *Exp Cell Res* 2014; 321: 133-141.
3. Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokoichi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Anesth* 2014; 28: 26-33.
4. Okamoto T, Akita N, Hayashi T, Shimaoka M, Suzuki K. Endothelial connexin 32 regulates tissue factor expression induced by inflammatory stimulation and direct cell-cell interaction with activated cells. *Atherosclerosis* 2014; 236: 430-437.
5. Okamoto T, Akita N, Nagai M, Hayashi T, Suzuki K. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate modulates endothelial function and suppresses leukocyte adhesion. *J Nat Med* 2014; 68: 144-153.
6. Iwashita Y, Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Yamada Y, Sawada H, Mitani Y, Imai H, Suzuki K, Maruyama K. Thrombomodulin protects against ventilator-induced lung injury in rats. *J Intensive Care* 2014; 2: 57-66.
7. Hayashi T, Suzuki K. Changes of expression of the protein C pathway components in LPS-induced endotoxemia -Implication for sepsis- (review) *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets* 2015; 15: Jan 7
8. Akita N, Okamoto T, Asanuma K, Yoshida

K, Nishioka J, Shimaoka M, Suzuki K, Hayashi T. Host protein C inhibitor inhibits tumor growth, but promotes tumor metastasis, which is correlated with hypercoagulability. *Thromb Res* 2015; 135: 1203-1208.

9. Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Honda G, Suzuki K, Ima H, Shimaoka M. LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 473: 1005-1012.
10. 鈴木宏治: 血栓症の分子病態と臨床検査. 臨床検査. 2014 ; 58 : 940-948.
11. 秋田展幸、鈴木宏治、林 辰弥. アンチトロンビンの構造と機能. 日本血栓止血学会雑誌 2014 ; 25 : 23-32.
12. 鈴木宏治. 血栓症の分子病態と臨床検査. 臨床検査 2014 ; 58 : 940-948.

[学会発表](計 10 件)

1. 秋田展幸、岡本貴行、西岡淳二 鈴木宏治、林 辰弥. 宿主プロテイン C インヒビターは癌細胞の増殖を抑制し転移を促進する. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日. 山形国際ホテル.
2. 岡本貴行、秋田展幸、林 辰弥、島岡 要、鈴木宏治. 血管内皮細胞間ギャップ結合が血管新生に及ぼす影響の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 2014 年 5 月 29-31 日. 大阪国際交流センター.
3. 秋田展幸、坂上由希子、西岡淳二、鈴木宏治、林 辰弥. 青切みかん含有成分の血液凝固系および肝細胞におけるプロテイン C インヒビター産生に及ぼす影響. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 2014 年 5 月 29-31 日. 大阪国際交流センター.
4. 林 辰弥、坂田知可、秋田展幸、西岡淳

二、鈴木宏治. エンドトキシンや各種サイトカインの肝細胞におけるプロテイン C インヒビター産生に及ぼす影響. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 2014 年 5 月 29-31 日. 大阪国際交流センター.

5. 秋田展幸、吉田格之進、岡本貴行、浅沼邦洋、西岡淳二、鈴木宏治、林 辰弥. 活性化プロテイン C は EPCR、PAR-1 および apoE レセプター-2 を介して破骨細胞分化を抑制する. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会. 2015 年 5 月 22 - 23 日. 甲府市総合市民会館.
6. 岡本貴行、川本英嗣、秋田展幸、林 辰弥、鈴木宏治、島岡 要. 円正寺における血管内皮細胞の硬さの解析. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会. 2015 年 5 月 22 - 23 日. 甲府市総合市民会館.
7. 西岡淳二、中山浩伸、安達禎之、柴田 勝、鈴木宏治. 抹消血単球のマクロファージへの分化に及ぼす (1-3) グルカンの影響. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会. 2015 年 5 月 22 - 23 日. 甲府市総合市民会館.
8. 西岡淳二、中山浩伸、安達禎之、柴田 勝、鈴木宏治. 血管内皮細胞の機能に及ぼす (1-3) グルカンの影響. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 16 - 18 日. 奈良春日野国際フォーラム.
9. 鈴木宏治、平本恵一、西岡淳二、柴田 勝. (1-3) グルカン含有茸(ハナビラタケ)摂食マウスに見られる自然免疫能の活性化. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 16 - 18 日. 奈良春日野国際フォーラム.
10. 鈴木宏治. シンポジウム: 凝固カスケードをトロンビンから考察する - 基礎と臨床のクロストーク - Thrombin とは -Overview-. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会. 2016 年 6 月 16 - 18 日. 奈良春日野国際フォーラム.

〔図書〕(計 7 件)

1. 共著：鈴木宏治：血液凝固と抗凝固薬の作用点。脳卒中予防のための心房細動管理マニュアル（奥村 謙 編）医薬ジャーナル社、東京、2013：109-120.
2. 共著：鈴木宏治：凝固系の制御機構：血栓形成と血液凝固・線溶 治療に生かせる基礎医学（浦野哲盟、後藤信哉 編）メディカルサイエンス・インターナショナル社、東京、2013；99-105.
3. 編著：鈴木宏治：血小板の異常：図説 分子病態学 改定 5 版（一瀬白帝、鈴木宏治 編）中外医学社、東京、2014；194-200.
4. 編著：鈴木宏治：Von Willebrand 病、血栓性血小板減少性紫斑病：図説 分子病態学 改定 5 版（一瀬白帝、鈴木宏治 編）中外医学社、東京、2014；201-204.
5. 編著：鈴木宏治：血液凝固制御系の異常：図説 分子病態学 改定 5 版（一瀬白帝、鈴木宏治 編）中外医学社、東京、2014；212-220.
6. 共著：鈴木宏治：遺伝子操作と遺伝子治療：医療人の基礎知識（鈴鹿医療科学大学 編）三重大学出版会、津市、2014；22-25.
7. 共著：鈴木宏治：血栓症の分子病態：止血・血栓ハンドブック（鈴木重統、後藤信哉、松野一彦 編）西村書店、新潟、2015；30-39.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木宏治（SUZUKI, Koji）
鈴鹿医療科大学・薬学部・教授
研究者番号：70077808

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

林 辰弥（HAYASHI, Tatsuya）
三重県立看護大学・看護学部・教授
研究者番号：00242959

岡本貴行（OKAMOTO, Takayuki）
三重大学・医学（系）研究科・助教
研究者番号：30378286