

令和 3 年 10 月 5 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08633

研究課題名(和文)非ビタミンK依存性経口抗凝固薬(NOACs)の抗腫瘍作用に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Basic study on anti-tumor activity of non-vitamin K dependent oral anticoagulants (NOACs)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非ビタミンK依存性経口抗凝固薬(NOACs)は、脳血栓塞栓症や下肢深部静脈血栓症の予防薬として用いられている。本研究では、NOACsの抗腫瘍作用について解析した。大腸がん細胞Colon-26細胞を移植した担癌マウスに、抗トロンビン薬(ダビガトラン)と抗Xa薬(エドキサバン、リバロキサバン)を連日経口投与し、21日目のマウスから血液と腫瘍組織を採取し解析した。その結果、エドキサバンは投与量依存性に腫瘍細胞の増殖を抑制し、血中のIL-6やMMP-2濃度、腫瘍組織の細胞膜Xa因子受容体の発現、細胞分裂関連因子の発現を抑制した。また、エドキサバンは腫瘍細胞のアポトーシスを促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、癌患者数は増加の一途にあり、これまでにない新しい視点からの癌の発生や増殖・転移阻止の方策の確立が求められている。私はこれまでの血栓止血学の経験から、血液の流動性維持に重要な凝固制御系因子が癌細胞の増殖や転移を抑制する可能性を示してきた。そこで本研究では、癌細胞の増殖と転移に及ぼす経口抗凝固薬NOACsの影響とその作用機序を解析し、NOACsが癌細胞の増殖と転移を抑制することを示し、その作用機序の一端を明らかにすることができた。本研究で得られた成果は学術的にも重要であり、癌制御に向けた社会的意義は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-vitamin K-dependent oral anticoagulants (NOACs) are used as preventives for cerebral thromboembolism and deep vein thrombosis in the lower limbs. In this study, we analyzed the antitumor effects of NOACs. Anti-thrombin drug (dabigatran etexilate) and anti-Xa drug (edoxaban, rivaroxaban) are orally administered daily to tumor-bearing mice to which colon cancer cells Colon-26 cells have been transplanted, and blood and tumor tissue obtained from mice on day 21 were collected and analyzed. As a result, edoxaban dose-dependently suppressed the growth of tumor cells, the expression of IL-6 and MMP-2 in blood, the expression of cell membrane factor Xa receptor (PAR2) of tumor tissue, and the expression of cell division-related factors. Edoxaban also promoted apoptosis of cells of the tumor tissue.

研究分野：血栓止血学

キーワード：抗凝固薬 NOACs Xa因子阻害薬 Xa因子受容体 抗腫瘍作用 抗転移作用 大腸癌細胞 メラノーマ細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 血液循環の維持に重要な血液凝固制御系の一つプロテインC (PC) 制御系の因子である 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 (EPCR)、プロテインCインヒビター (PCI) などは抗凝固・抗炎症・細胞保護作用などを有し、各因子の先天性ヘテロ欠損症では高頻度に血栓塞栓症を発症する。また各因子のホモ接合体欠損症は胎児期の臓器形成異常や出生直後に致死的な播種性血管内凝固症候群 (DIC) や多臓器不全を起すなど、PC 制御系因子は生体諸臓器の機能維持に不可欠と考えられている。私達はこれまでに、PCI の発見とその病態生理的役割の解明、世界初のヒト TM の遺伝子クローニング、遺伝子組み換え TM (rTM) を用いた敗血症・白血病・各種固形癌・産科疾患などに起因する DIC に対する治療薬の創製、PC、PS、アンチトロンビンの先天性並びに後天性異常症の分子病態解析など、PC 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ってきた。

(2) 白血病、膵癌、肺癌などの悪性腫瘍患者では深部動静脈血栓症や脳塞栓症などを併発しやすく (トルソー症候群と呼ばれている)、また高頻度に DIC を発症する。この理由は、腫瘍細胞がムチンや炎症性サイトカイン、凝固惹起因子の組織因子 (tissue factor) を高発現することによる。また組織因子には、癌細胞の増殖と転移、腫瘍血管新生を促進する作用のあることが知られている。一方、血栓症を併発する癌患者に対して抗凝固療法を施行すると、癌患者の腫瘍が縮小することが報告されている。例えば、抗凝固薬の低分子ヘパリンは、*in vitro* 実験で血管新生を阻害し、担癌マウスでは腫瘍細胞のアポトーシスを誘導して抗腫瘍作用を示し、進行癌患者に対しては、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、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などである。さらに、血小板凝集阻害薬であるアスピリンは抗炎症作用を有し、大腸癌などの発生を予防することが知られている。また、私達はこれまでに遺伝子組み換え TM が担癌マウスにおける腫瘍細胞の増殖を抑制することを報告してきた。これらの基礎的及び臨床的研究成果は、凝固促進物質には腫瘍増大作用があり、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。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、日常診療で用いられている凝固阻害薬が実際に抗腫瘍作用を示すか否か検証し、その分子機序を明らかにすることを目的とした。すなわち、非弁膜症性心房細動患者や股関節置換手術後あるいは膝関節置換手術後の血栓塞栓症の発症予防に用いられている非ビタミン K 依存性経口抗凝固薬 non vitamin K oral anticoagulants (NOACs) {別名、直接経口抗凝固薬 direct oral anticoagulants (DOACs) とも呼ばれる} が腫瘍細胞移植マウスにおける腫瘍の増殖に及ぼす影響を検証し、NOACs に抗腫瘍作用が認められた場合にはその分子機序を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍細胞移植マウスにおける腫瘍増殖に及ぼす NOACs の影響

白色雄性 BALB/c マウス (6 週齢、各群 n=5) の下肢大腿部皮下に Colon-26 細胞を投与し、腫瘍細胞が生着後にマウスに経口ゾンデにて 100  $\mu$ l の生理食塩水 (対照群) または各種濃度の NOACs [抗トロンビン薬 (薬物 A) 及び抗 Xa 薬 (薬物 B、薬物 C)] を連日投与した。各週に体重と腫瘍サイズを測定し、21 日目のマウスから血液及び腫瘍組織を採取した。血清中の IL-6 と MMP-2 濃度は ELISA キットを用いて測定した。腫瘍組織はホルマリンで固定処理後、グルコース浸漬処理、包埋処理した後に薄切処理した組織片をスライド面に接着固定化した。組織片に対しては、Xa 因子受容体 (PAR-2) 抗体、血管新生関連因子 (VEGF-A, D、VEGFR-1, 3) 抗体、

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

癌遺伝子（Syk）抗体、転写活性調節因子（PPAR- $\gamma$ ）抗体で処理し、蛍光色素結合二次抗体で増幅処理して蛍光顕微鏡で観察した。また、組織中の PAR-2、転写因子 STAT3、細胞周期調節因子 CD1/CD2、細胞増殖マーカー Ki67、血管新生関連因子 VEGF-A、VEGFR-1 の発現量は各因子特異抗体を用いた Western blotting 解析を行って定量した。

#### (2) マウスにおける移植腫瘍細胞の臓器転移に及ぼす NOACs の影響

C57BL/A 雌性マウスに B16 メラノーマ細胞を尾静脈から注射し、同日から 2 週間にわたって毎日 1 回、経口ゾンデを用いて抗 Xa 薬（薬物 B）を投与し、週 1 回体重を測定した。15 日目にマウスからヘパリン採血すると共に、肺、腸管（結腸・空腸）、肝臓、卵巣、腸間膜リンパ節、脳（線条・海馬）を採取し、ホルマリン固定した。血液は血漿として凍結保存し、IL-6 と MMP-2 濃度について ELISA キットを用いて測定した。各臓器の組織片を HE 染色し、メラノーマ細胞中に存在するメラトニン前駆物質であるドーパ陽性細胞を光学顕微鏡で観察し、写真像を保存した。その後、解析ソフトを用いて、写真から無作為に 5 視野のドーパ陽性細胞数を計測して有意差検定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 腫瘍細胞移植マウスにおける腫瘍増殖に及ぼす NOACs の影響

マウスに投与した 3 種類の NOACs 投与量は患者の通常投与量を基準に換算して設定した。その結果、Colon-26 細胞移植（生理食塩水投与）群に比較して、いずれの薬物投与群でも体重変化に影響はみられなかった。Colon-26 細胞投与群の腫瘍サイズは 3 週間後には平均 1cm<sup>3</sup>に達したが、薬物 A 投与群では少し縮小し（有意差なし）、薬物 B 投与群では半分程度に有意（ $p < 0.05$ ）に抑制されていた。薬物 C 投与群でも有意に抑制されていたが、薬物 B 投与群ほどではなかった。薬物 B の効果について、その至適投与量を検討した結果、薬物 B の投与量依存性に腫瘍増殖抑制効果が認められた。

マウス血中の IL-6 濃度は無処置群に比較して Colon-26 細胞投与群では著しく増加していたが、薬物 B 投与群では有意に低下していた。なお、腫瘍サイズ抑制効果が弱かった薬物 A 投与群でも Colon-26 細胞投与群に比較して有意に低下していた。また、MMP-2 の血中濃度は、Colon-26 細胞投与群に比較して、薬物 B 投与群では無処置群の血中濃度と同程度に有意に低下していた。薬物 A 投与群及び薬物 C 投与群でも薬物 B 投与群よりは弱かったが、Colon-26 細胞投与群に比較して有意に低下していた。

次に腫瘍組織における PAR-2、STAT3、CyclinD1/D2、Ki67、VEGF-A、VEGFR-1 の発現量を Western blot 解析し、 $\beta$ -actin 蛋白の発現量を基準として各群間で比較検討した。その結果、PAR-2 発現量は無処置群の発現量に比較して、Colon-26 細胞投与群では有意に増加していたが、薬物 B 投与群では無処置群と同程度に低下していた。STAT3 発現量は無処置群の発現量に比較して、Colon-26 細胞投与群では有意に増加していたが、その増加が薬物 B 投与群では低下していた。CyclinD1/D2 発現量は無処置群に比較して、Colon-26 細胞投与群では著しく増加していたが、その増加が薬物 B 投与群では有意に低下していた。また、Ki67 発現量は無処置群の発現量に比較して、Colon-26 細胞投与群では著しく増加していたが、その増加が薬物 B 投与群では有意に低下していた。他方、VEGF-A 発現量は無処置群の発現量に比較して、Colon-26 細胞投与群では著しく増加していたが、薬物 B 投与群では Colon-26 細胞投与群との間に差は見られなかった。同様に VEGFR-1 の発現量も Colon-26 細胞投与群と薬物 B 投与群の間に差は見られなかった。

#### (2) マウスにおける移植腫瘍細胞の臓器転移に及ぼす NOACs の影響

C57BL/A 雌性マウスに尾静脈から B16 メラノーマ細胞を注入して 15 日目の体重には NOACs（薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

物 B) の経口投与の有無に関わらず違いは見られなかった。NOAC 投与 15 日目のマウスの肺、腸管 (結腸・空腸)、肝臓、卵巣、腸間膜リンパ節、脳 (線条・海馬) の各組織を光学顕微鏡鏡で観察し、組織細胞中に存在するドーパ陽性細胞数を計測し、各群間の有意差検定を行った。その結果、肺、肝臓、卵巣、空腸、結腸の組織細胞、腸間膜リンパ節細胞におけるドーパ陽性細胞数は、薬物非投与群に比較して薬物 B 投与群では有意に減少していた。

また、メラノーマ細胞を注入したマウスの 15 日目の血中の MMP-2 濃度と IL-6 濃度は薬物非投与群に比較して薬物 B 投与群では有意に減少していた。

(3) 以上の結果から、NOACs の一つ薬物 B は、マウスにおける大腸癌細胞 Colon-26 の増殖を投与量・投与期間依存性に抑制することが明らかになった。その分子機序は明らかではないが、可能性として、薬物 B がその受容体の活性化と遺伝子発現を抑制し、その結果、逐次、炎症性サイトカインの発現低下、転写因子の発現低下、細胞増殖関連因子の発現低下、細胞周期調節因子の発現低下を起す機序が考えられた。また、薬物 B はマウス移植メラノーマ細胞の臓器転移を抑制し、血中の MMP-2 と IL-6 濃度を低下させたことから、薬物 B は癌細胞移植マウスに生じる血管内皮細胞や各臓器組織細胞の炎症を抑制して腫瘍細胞の転移を抑制する機序が考えられたが詳細は明らかでない。今後、薬物 B による腫瘍細胞の増殖抑制と転移抑制の分子薬理的機序を詳細に解析したい。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Okamoto T, Akita N, Terasawa M, Hayashi T, Suzuki K. Rhamnan sulfate extracted from *Monostroma nitidum* attenuates blood coagulation and inflammation of vascular endothelial cells. *J Nat Med* 2019 Feb 22. doi: 10.1007/s11418-019-01289-5.
- ② Yoshida K, Akita N, Okamoto T, Asanuma K, Uchida A, Sudo A, Shimaoka M, Suzuki K, Hayashi T. Activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor, protease-activated receptor-1, sphingosine 1-phosphate receptor, and apolipoprotein E receptor 2. *Thromb Res* 163:30-40, 2018. doi: 10.1016/j.thromres.2018.01.001. Epub 2018 Jan 3.
- ③ 鈴木宏治. グリコカリックス. 特集ガイド: 徹底ガイド DIC のすべて 2019-20. 救急・集中治療 30 (臨時増刊号): 76-86, 2018. <https://www.sogo-igaku.co.jp/>
- ④ Okamoto T, Suzuki K. The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell-Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 27;18(11). pii: E2254. doi: 10.3390/ijms18112254.
- ⑤ Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Akita N, Hayashi T, Park EJ, Suzuki K, Shimaoka M. Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci Rep* 7:6134-6144. 2017. doi: 10.1038/s41598-017-06463-x.
- ⑥ Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Honda G, Suzuki K, Imai H, Shimaoka M. LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 473: 1005-1012, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.007. Epub 2016 Apr 4.
- ⑦ 鈴木宏治. トロンビンの機能モジュール. *日本血栓止血学会誌* 27: 563-574, 2016. <https://doi.org/10.2491/jjsth.27.563>
- ⑧ 鈴木宏治. グリコカリックス. *Coagulation & Inflammation* 2: 48-55, 2016.

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

<https://www.m-review.co.jp>

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 鈴木宏治. (特別講演) 海藻アオサに含まれる成分とその生理活性. 第 5 回日本薬膳学会学術集会、2019
- ② 鈴木宏治、西岡淳二. 炎症血管内皮細胞および単球/マクロファージの遺伝子発現に及ぼす乳酸菌発酵ヤマブシタケの効果. 第 16 回日本機能性食品医用学会総会、2018
- ③ 寺澤匡博、岡本貴行、秋田展幸、林 辰弥、鈴木宏治. 炎症性血管内皮障害に対する海藻アオサ(ヒトエグサ)由来ラムナン硫酸の効果. 第 16 回日本機能性食品医用学会総会、2018
- ④ 鈴木宏治、佐藤英介、西田圭吾、西岡淳二. 柑橘類「新姫」果実成分の生体機能に及ぼす効果の解析. 第 15 回日本機能性食品医用学会総会、2017
- ⑤ 鈴木宏治、平本恵一、西岡淳二. 乳酸菌発酵ハナビラタケの抗腫瘍作用に関する基礎的研究. 第 15 回日本機能性食品医用学会総会、2017
- ⑥ 鈴木宏治、秋田展幸、西岡淳二、林 辰弥. 海藻アオサ(ヒトエグサ)由来ラムナン硫酸の抗血栓・血管内皮保護作用. 第 14 回日本機能性食品医用学会総会、2016
- ⑦ 西岡淳二、平本恵一、鈴木宏治.  $\beta$  (1-3)グルカン含有茸ハナビラタケによる自然免疫の活性化. 第 14 回日本機能性食品医用学会総会、2016
- ⑧ 鈴木宏治、平本恵一、西岡淳二、柴田 勝. 生乳酸菌添加ハナビラタケの抗腫瘍作用の解析. 第 14 回日本機能性食品医用学会総会、2016
- ⑨ 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  $\beta$  (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
- ⑩ 鈴木宏治、平本恵一、西岡淳二、柴田 勝.  $\beta$  (-3)ルカン含有茸(ハナビラタケ)摂食マウスにみられる免疫能の活性化. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、2016
- ⑪ 鈴木宏治. 凝固カスケードをトロンビンから考察するー基礎と臨床のクロストークー Thrombin とは -Overview- 第 38 回日本血栓止血学会学術集会(招待講演)、2016
- ⑫ 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. 活性化プロテイン C による骨細胞分化への影響. 第 89 回日本生化学大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：平本 恵一、林 辰弥、岡本 貴行、西岡 淳二、秋田 展幸、寺澤 匡博

ローマ字氏名：HIRAMOTO Keiichi, HAYASHI Tatsuya, OKAMOTO Takayuki, NISHIOKA Junji, AKITA Nobuyuki, TERASAWA Masahiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。