

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10113

研究課題名(和文) フィブリノーゲンによる癌の転移メカニズムの解明と新規癌治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the metastasis mechanism of cancer by the fibrinogen and application to new cancer treatment

研究代表者

若月 幸平 (Wakatsuki, Kohei)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：10405384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上部消化管がん(食道癌，胃癌)に対し，血漿フィブリノーゲン値と各臨床病理学的因子や予後の検討を行った．結果は，血漿フィブリノーゲン値(pFib)は胃癌，食道癌において進行度を反映していた．リンパ節転移と静脈侵襲にも相関を認めた．食道癌ではpFibとリンパ節再発に相関を認めた．pFib高値の症例は低値の症例と比べ有意に予後不良であった．pFibは胃癌，食道癌の独立した予後因子であった．上部消化管がんにおいて，pFibは癌の進行度を反映し，予後の予測に有用である可能性が示唆された．

研究成果の概要(英文)：For upper part gastrointestinal tract cancer (esophageal cancer, stomach cancer), we investigated the association between a plasma fibrinogen level and each clinicopathological factors and prognosis. As for the results, the plasma fibrinogen level (pFib) reflected a progress degree in stomach cancer and esophageal cancer. There was correlation between lymph node metastases and a venous invasion. There was association between pFib and lymphatic recurrence for esophageal cancer. The patients with high pFib significantly had a poorer prognosis than those with low pFib. pFib was an independent prognostic factor of stomach cancer and esophageal cancer. In upper part gastrointestinal tract cancer, we suggested that pFib reflected a cancer progression and was useful for predicting prognosis.

研究分野：消化器外科

キーワード：フィブリノーゲン 上部消化管がん 予後因子

1. 研究開始当初の背景

最近の癌治療の進歩はめざましく、新規抗癌剤や分子標的治療等により、多くの癌種において治療成績は向上している。胃癌や食道癌においても手術や化学療法等の進歩により治療成績は向上しているが、進行癌の予後はいまだ不良であり、更なる治療成績の向上のためには従来の概念にとらわれない新たな観点からの治療戦略の導入、確立が必須でありと考えた。

2. 研究の目的

フィブリノーゲンおよびその分解産物である D-ダイマーなどは悪性疾患で高値を示すことが知られており、血液凝固系の亢進は癌の進行を反映するものと報告されている。担癌患者におけるフィブリノーゲンの臨床病理学的意義の検討、フィブリノーゲンによる癌の浸潤・転移のメカニズムの解明、さらにはフィブリノーゲンをターゲットとした新規癌治療への応用が本研究の目的である。癌におけるフィブリノーゲンの臨床病理学的意義。フィブリノーゲンによる癌の浸潤・転移のメカニズムの解明。フィブリノーゲンの阻害による癌の制御および新規治療としての応用。以上が研究当初の目的であった。

3. 研究の方法

癌におけるフィブリノーゲンの臨床病理学的意義のさらなる検討。
フィブリノーゲンによる癌の浸潤・転移のメカニズムの解明。
癌細胞におけるフィブリノーゲン受容体の証明および受容体の阻害剤の同定。
フィブリノーゲンによる癌細胞内の非筋細胞ミオシン軽鎖(NMLC)のリン酸化の証明。
フィブリノーゲンによる癌細胞の仮足形成および遊走、浸潤の証明。
フィブリノーゲンの阻害による癌の制御および新規治療としての応用。

フィブリノーゲン投与による癌細胞内の NMLC のリン酸化、仮足形成、浸潤の誘導を確認する。癌細胞におけるフィブリノーゲン受容体の証明および受容体の阻害剤を同定し、さらにその阻害剤またはミオシン軽鎖リン酸化酵素阻害剤 (Y-27632, ML-7) を投与することにより、仮足形成、細胞運動および転移の抑制を検討する。
次にフィブリノーゲンノックアウトマウスと野生型マウスを用いて担癌マウスを作製し、それぞれのマウスにおける転移状況を比較検討する。また、同定したフィブリノーゲン受容体の阻害剤や Y-27632, ML-7 を投与することにより、原発巣および転移巣の状態を詳細に検討する。以上、フィブリノーゲンによる癌の浸潤・転移のメカニズムの解明およびフィブリノーゲンの阻害による癌の浸潤・転移の制御を *in vitro* および *in vivo* の実験

で検討する。

癌におけるフィブリノーゲンの臨床病理学的意義のさらなる検討

胃癌もしくは食道癌患者の血漿フィブリノーゲン値と癌組織中のフィブリノーゲンの発現状態の相関性を検討する。また、癌組織中のフィブリノーゲンの局在、血管やリンパ管との関係、さらには転移巣におけるフィブリノーゲンの状態を免疫組織染色にて詳細に検討することにより、フィブリノーゲンの臨床病理学的意義を追求する。

フィブリノーゲンによる癌の浸潤・転移のメカニズムの解明。

癌細胞におけるフィブリノーゲン受容体の証明

ヒトおよびマウスの癌細胞株を使用し実験を行う。フィブリノーゲン処理を行った癌細胞を、抗フィブリノーゲン抗体を用いて蛍光細胞免疫染色を行い、癌細胞膜上のフィブリノーゲンの結合を確認する。また、フィブリノーゲン処理を行った癌細胞とコントロールの癌細胞 (未処理) からタンパク質および m-RNA を抽出し、インテグリン (ICAM-1, 11b 3, v 3 など) や VE カドヘリンといった、フィブリノーゲン結合の候補となる受容体の発現をウェスタンブロットや PCR 法で確認し、その発現を検討する。また、癌細胞におけるフィブリノーゲン受容体を同定することにより、その阻害剤について検討する。

フィブリノーゲンによる癌細胞内の非筋細胞ミオシン軽鎖のリン酸化の証明

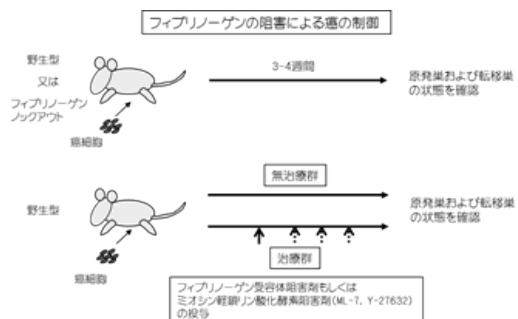
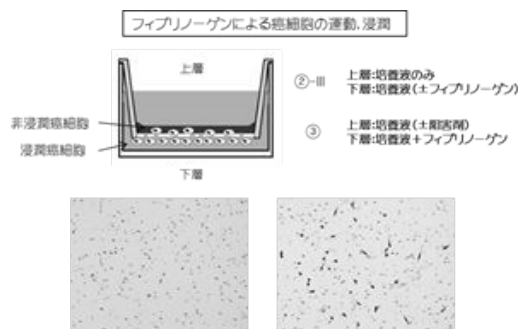
癌細胞にフィブリノーゲンを添加したのち、その細胞からタンパク質および m-RNA を抽出し、ウェスタンブロットや PCR 法を用いてミオシン軽鎖のリン酸化の状態を確認し、フィブリノーゲン無処置のコントロール細胞と比較する。その際、フィブリノーゲンの濃度や処理時間などの条件を変えて実験を行う。さらにはフィブリノーゲンで処理した癌細胞およびコントロール癌細胞をリン酸化ミオシン軽鎖の抗体を用いた蛍光細胞免疫染色を行い、その発現状態や細胞内での局在を調べる。

フィブリノーゲンによる癌細胞の仮足形成および運動、浸潤の証明

培養中の癌細胞にフィブリノーゲンを添加したのち、経時的に細胞形態の変化 (仮足の有無等) や細胞移動を顕微鏡で観察するとともに、フィブリノーゲン添加のないコントロール癌細胞との比較検討を行う。その際、フィブリノーゲンの濃度や処理時間などの条件を変えて実験を行う。また、マトリゲルマトリックスがコートされた細胞浸潤アッセイシステムを用いて、上層には細胞培養液のみ、下層には細胞培養液に加えてフィブリノーゲンを添加し、経時的に細胞浸潤の状態を観察する。さらにフィブリノーゲン添加のないコントロール細胞との比較を行う。その際、フィブリノーゲンの濃度や処理時間などの条件を変えて実験を行う。以上より *in vitro* 実

験において、癌細胞の仮足形成および運動、浸潤に対するフィブリノーゲンの関与を検証する。

癌細胞におけるフィブリノーゲンの阻害による癌の制御および新規治療としての応用
 フィブリノーゲンは止血にとって重要な物質であるが、癌細胞においては遊走、浸潤を促進させるものであると考えられる。フィブリノーゲン受容体の阻害剤もしくは非筋細胞ミオシンのリン酸化に關与する Rho キナーゼの阻害剤(Y-27632)やミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤(ML-7)を投与することにより、癌細胞におけるフィブリノーゲンのシグナルを阻害することができる。癌細胞にフィブリノーゲンとともにこれらの阻害剤を投与したのち細胞形態の変化を観察し、阻害剤を投与しないコントロール癌細胞の変化と比較する。また細胞浸潤アッセイでは上層への阻害剤の添加の有無により細胞浸潤の程度を比較する。阻害剤の濃度や処理時間を変えて実験を行ない、フィブリノーゲンを阻害することによる癌細胞浸潤の抑制を vitro で検証する。さらに、フィブリノーゲンノックアウトマウスと野生型マウスに数種類の癌細胞を皮下投与して担癌マウスを作製し、癌細胞投与 3-4 週間後に転移を形成させ、それぞれのマウスで原発巣および転移巣の状態を比較する。また、野生型マウスにおいて、阻害剤投与の有無で治療群・無治療群に分け、治療群では腫瘍が約 1cm に成長した時点で阻害剤の投与を開始し、数週間後に原発巣および転移巣の状態を 2 群間で比較する。1 回投与量、投与回数を変えて実験を行う。以上より、フィブリノーゲンの阻害による癌の浸潤・転移の制御を vivo で検証する。



4. 研究成果

上部消化管がん(食道癌,胃癌)に対し、血漿フィブリノーゲン値(pFib)と各臨床病理学的因子や予後の検討を行った。

結果は、
 pFib は胃癌,食道癌において進行度を反映していた。

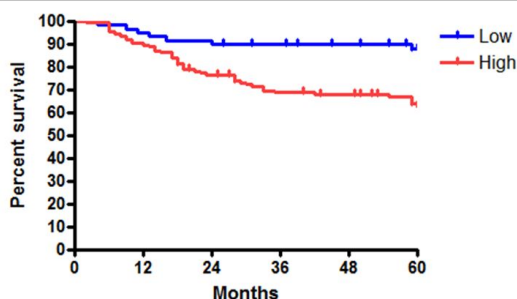
リンパ節転移と静脈侵襲にも相関を認めた。

食道癌では pFib とリンパ節再発に相関を認めた。pFib 高値の症例は低値の症例と比べ有意に予後不良であった。

pFib は胃癌,食道癌の独立した予後因子であった。上部消化管がんにおいて、pFib は癌の進行度を反映し、予後の予測に有用である可能性が示唆された。

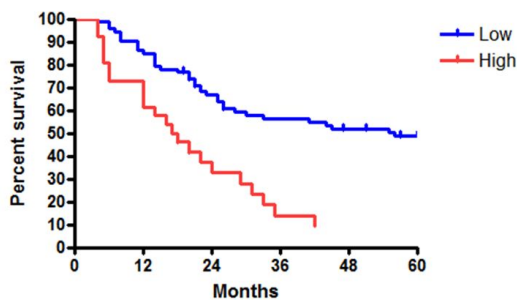
OS (胃癌)

P=0.002



OS (食道癌)

P<0.001



基礎研究は今後継続して行う予定である。

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 1 件)

Preoperative Plasma Fibrinogen is Associated with Lymph Node Metastasis and Predicts Prognosis in Resectable Esophageal Cancer.

Wakatsuki K, Matsumoto S, Migita K, Ito M, Kunishige T, Nakade H, Nakatani M, Kitano M, Sho M.

World J Surg. 2017 Aug;41(8):2068-2077.

doi: 10.1007/s00268-017-3991-x.

〔学会発表〕(計 2 件)

第 118 回 日本外科学会 (2018.4)

発表者: 若月幸平

演題名: 上部消化管がんにおける血漿フィブリノゲンの臨床病理学的意義

第 71 回 日本消化器外科学会 (2016.7)

発表者: 若月幸平

演題名: Clinicopathological significance of plasma fibrinogen for the patients with gastric cancer

〔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

若月 幸平 (WAKATSUKI, Kohei)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号: 10405384

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

松本 壮平 (MATSUMOTO, Sohei)

伊藤真廣 (ITO, Masahiro)

右田 和寛 (MIGITA, Kazuhiro)

中出 裕士 (NAKADE, Hiroshi)

國重 智裕 (KUNISHIGE, Tomohiro)