

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08051

研究課題名(和文) 犬の悪性腫瘍由来マイクロパーティクルによる凝固活性化とDICの診断・治療への応用

研究課題名(英文) Coagulation activation by microparticles derived from malignant tumors and the diagnostic and therapeutic significance in disseminated intravascular coagulation in dogs

研究代表者

馬場 健司 (Baba, Kenji)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90452367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：犬の血管肉腫細胞、乳腺腫瘍細胞および悪性黒色腫細胞はマイクロパーティクルを放出し、組織因子依存性の凝固促進活性を有することが明らかとなった。悪性腫瘍に起因する播種性血管内凝固(DIC)では、血漿中の組織因子依存性凝固促進活性の上昇は認められなかったが、DICの診断および予後マーカーとしての有用性についてはさらなる検討が必要と考えられた。また、シンバスタチンは凝固促進活性を抑制しなかったが、様々な種類の犬の悪性腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

獣医領域では、マイクロパーティクルによる凝固活性化に関する研究は極めて乏しく、悪性腫瘍や播種性血管内凝固に罹患した犬における血漿中凝固促進活性を世界で初めて測定し評価したことは意義深いと考えられる。残念ながら犬の播種性血管内凝固の診断および治療における血漿中凝固促進活性の意義に関しては、本研究では明確な結論に至ることはできなかった。しかし、本研究が当該分野における今後の研究の礎になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that canine hemangiosarcoma cells, mammary tumor cells, and malignant melanoma cells released microparticles and exhibited tissue factor-dependent procoagulant activity. Tissue factor-dependent procoagulant activity in plasma was not increased in dogs with disseminated intravascular coagulation (DIC) caused by a malignant tumor. Further study is needed to elucidate the significance of tissue factor-dependent procoagulant activity for diagnosis and prognosis of DIC in dogs. Simvastatin significantly inhibited the cell proliferation of several types of canine tumor cells, although it could not inhibit the pro-coagulant activity in these cells.

研究分野：獣医内科学

キーワード：マイクロパーティクル 組織因子 播種性血管内凝固 DIC 犬 悪性腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍では、しばしば著しい凝固亢進による播種性血管内凝固（Disseminated Intravascular Coagulation; DIC）が引き起こされる。悪性腫瘍罹患犬における主な死因は、腫瘍の増悪によるものと DIC による多臓器不全および凝固障害であり、DIC は予後を大きく悪化させる要因となっている。しかし DIC と診断された時点では既に手遅れであることが多く、基礎疾患の除去以外の治療法も確立していない。そのため DIC の早期診断マーカーおよび新規治療法の確立が望まれている。本研究では、犬の悪性腫瘍における DIC の早期診断法および新規治療法の開発を目指し、その鍵となる因子として組織因子を含有するマイクロパーティクル（microparticle; MP）に着目した。MP とは細胞の活性化などの刺激によって放出される微小な細胞膜小片である。この MP の膜表面および内部にはその細胞由来の蛋白や核酸が含まれており、生理的および様々な病態下において凝固や炎症反応などを調節する因子として重要な役割を担っていると考えられている。特に腫瘍細胞では、外因系凝固経路の開始点である組織因子を発現していることが多く、組織因子含有 MP を多量に放出することによって過剰な凝固活性化を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

犬の悪性腫瘍由来組織因子含有 MP の凝固活性化能を明らかとし、組織因子依存性凝固促進活性（Tissue Factor-dependent Procoagulant Activity; TF-PCA）の DIC 診断マーカーとしての有用性を検討すること、および TF-PCA の抑制による DIC の新規治療法の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞株における組織因子の発現

犬の血管肉腫細胞株、乳腺腫瘍細胞株、悪性黒色腫細胞株およびリンパ腫細胞株における組織因子の発現をフローサイトメトリー法により解析した。

(2) 腫瘍細胞株における TF-PCA

上記細胞株における細胞表面および培養上清中の TF-PCA を測定した。TF-PCA は、既存の方法に従い、組織因子の活性を吸光度計により測定した。

(3) 組織因子含有 MP の定量

PerCP-eFluor 710 標識 Annexin-V および FITC 標識抗組織因子抗体を用いたフローサイトメトリーにより組織因子含有 MP の定量を試みた。

(4) 悪性腫瘍罹患犬における血漿中 TF-PCA および DIC 発症との関連性

悪性腫瘍罹患犬における血漿中 TF-PCA を測定し、DIC の発症との関連性を検討した。

(5) Rho kinase 阻害剤による TF-PCA 抑制効果

MP の放出には Rho/ROCK シグナル経路の活性化が関与していることが示唆されている。そこで、Rho kinase 阻害剤である Y-27632、ファスジルおよびシンバスタチンを犬の血管肉腫細胞株、乳腺腫瘍細胞株および悪性黒色腫細胞株にそれぞれ添加し、培養上清中の TF-PCA を測定することにより、治療薬としての可能性を検討した。

(6) シンバスタチンの抗腫瘍効果

上記 (5) において、シンバスタチンによる細胞傷害が認められたため、上記細胞株における細胞増殖抑制効果およびアポトーシスの誘導について検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞株における組織因子の発現

試験したうちの多くの血管肉腫細胞株、乳腺腫瘍細胞株および悪性黒色腫細胞株において組織因子の発現が認められた（図 1）。一方、いずれのリンパ腫細胞株においても組織因子の発現は認められなかった。

(2) 腫瘍細胞株における TF-PCA

組織因子を発現している腫瘍細胞株において、細胞表面および培養上清中の TF-PCA が検出された（図 2）。

(3) 組織因子含有 MP の定量

腫瘍細胞株の培養上清における MP は、Annexin-V 陽性の 0.5 μ m-0.9 μ m の粒子として検出されたが、MP 上の組織因子は検出されなかった。その原因として、検出に用いた抗ヒト組織因子抗体のイヌ組織因子に対す

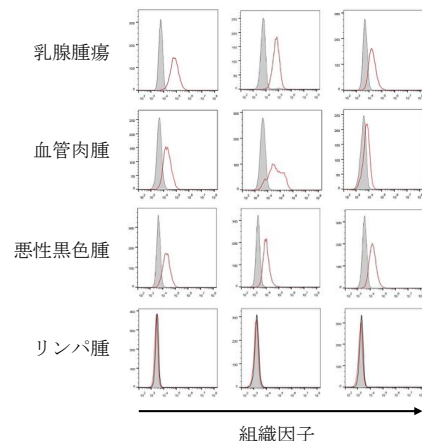


図1 犬の腫瘍細胞株における組織因子の発現

る検出感度不足が考えられた。さらに複数の抗ヒト組織因子抗体を用いて検出を試みたが、結果として犬の組織因子含有MPを十分な感度で定量することはできなかった。

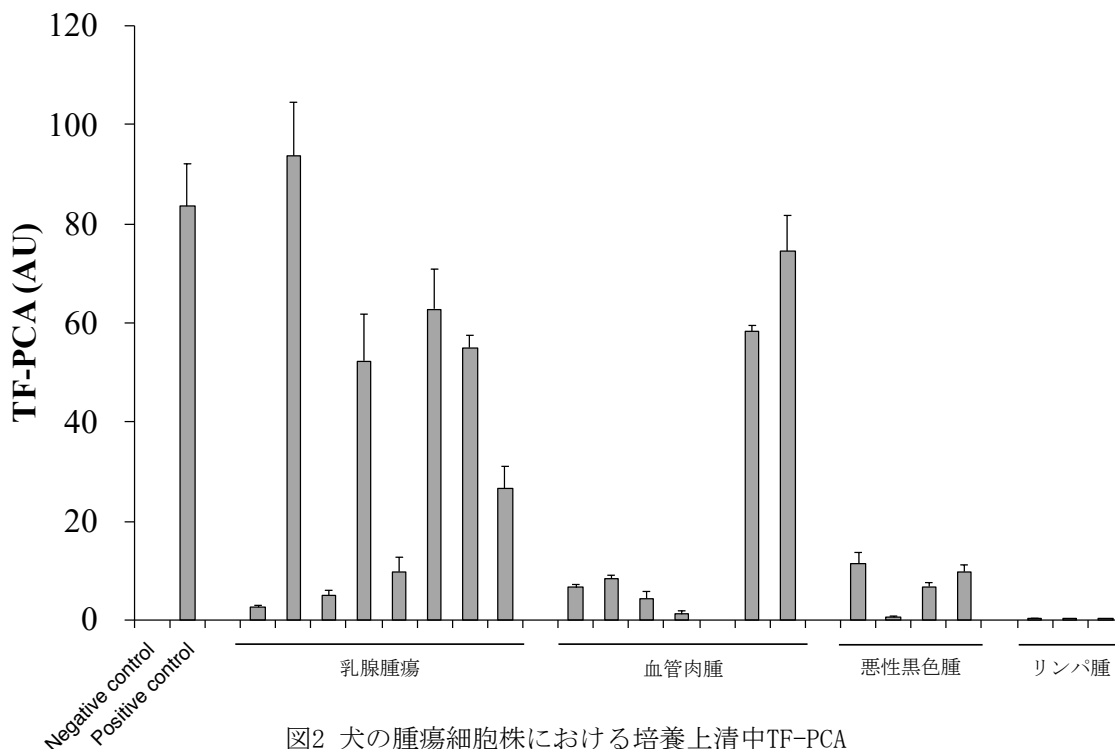


図2 犬の腫瘍細胞株における培養上清中TF-PCA

(4) 悪性腫瘍罹患犬における血漿中 TF-PCA および DIC 発症との関連性

血管肉腫、悪性黒色腫およびリンパ腫症例のいずれにおいても、健常犬と比較して血漿中 TF-PCA に有意差は認められなかった。また様々な悪性腫瘍罹患犬における血漿中 TF-PCA を、非 DIC 群、pre-DIC 群および DIC 群において比較した結果、非 DIC 群、pre-DIC 群および DIC 群の各群間において有意差は認められなかった。血漿中 TF-PCA が高値であった血管肉腫の 2 症例においては、手術による腫瘍切除後に血漿中 TF-PCA の明らかな低下が認められた (図 3)。

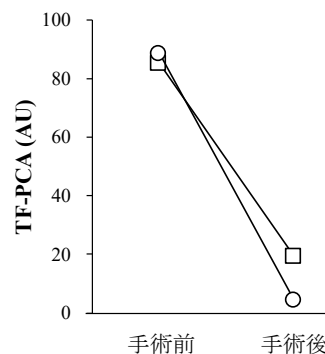


図3 血管肉腫の2症例における手術前後の血漿中TF-PCA

(5) Rho kinase 阻害剤による TF-PCA 抑制効果

Rho kinase 阻害剤である Y-27632、ファスジルおよびシンバスタチンを犬の血管肉腫細胞株、乳腺腫瘍細胞株および悪性黒色腫細胞株に添加した結果、いずれの薬剤と細胞株の組み合わせにおいても培養上清中の TF-PCA の低下は認められなかった。

(6) シンバスタチンの抗腫瘍効果

上記 (5) の実験における予想外の事象として、シンバスタチンを添加した多くの細胞株において強い細胞傷害が認められたため、その抗腫瘍効果について解析を行った。シンバスタチンは、犬の血管

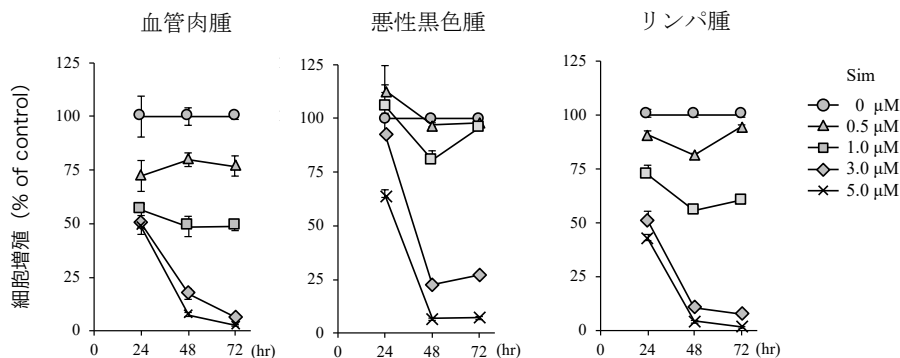


図4 犬の腫瘍細胞株におけるシンバスタチンの細胞増殖抑制効果

肉腫細胞株、悪性黒色腫細胞株およびリンパ腫細胞株に対して用量依存的に細胞増殖を抑制した (図 4)。シンバスタチンとともにメバロン酸経路の中間産物であるゲラニルゲラニルニリン

酸 (GGPP) およびファルネシル二リン酸 (FPP) を添加した場合には、細胞増殖抑制効果が認められなかった (図 5)。また、シンバスタチンの添加によって caspase-3 の活性化が認められ、GGPP および FPP の添加によってその活性化は抑制された (図 6)。以上の結果から、シンバスタチンは犬の様々な腫瘍細胞において、メバロンサン経路の抑制によって caspase-3 の活性化を介したアポトーシスを誘導することにより細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

本研究では、犬の血管肉腫細胞株、乳腺腫瘍細胞株および悪性黒色腫細胞株における組織因子の発現および MP の放出による凝固活性化能を明らかにした。しかし MP 上の組織因子を検出することができなかつたため、腫瘍細胞由来組織因子含有 MP の解析はできなかった。今後はこれらの腫瘍組織における組織因子の発現および血中の腫瘍細胞由来組織因子含有 MP の解析が望まれるが、そのためにはより親和性が高い犬の組織因子に対する抗体の作製が必要と考えられた。また、本研究では犬の悪性腫瘍を基礎疾患とする DIC において血漿中 TF-PCA の明らかな上昇は認められなかったが、研究デザインの最適化および測定系の改良により DIC の診断および予後マーカーとしての有用性を改めて検討する余地は十分にあると考えられた。腫瘍細胞における組織因子含有 MP の放出による凝固促進活性を抑制する効果を期待して検討された各種 Rho kinase 阻害剤は、犬の悪性腫瘍細胞株に対していずれも抑制効果を示さなかった。しかし、シンバスタチンは犬の様々な腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。医学領域においても様々なスタチン製剤は様々な悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を有することが知られているが、その作用機序は解明されていない。今後は、犬の悪性腫瘍に対するスタチン製剤の抗腫瘍効果について、作用機序の解明および臨床試験といったさらなる研究の進展が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 小林宏祐, 馬場健司, 上林聡之, 奥田優. イヌ腫瘍細胞株に対する Simvastatin の細胞傷害性の検討, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018
- ② 小林宏祐, 馬場健司, 下川孝子, 奥田優. イヌ血管肉腫細胞に対する Simvastatin の細胞傷害性ならびに凝固促進性マイクロパーティクルの産生に与える影響, 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017
- ③ 小林宏祐, 馬場健司, 下川孝子, 根本有希, 水野拓也, 奥田優. 凝固活性化マーカーとしての血漿 TF-PCA の有用性に関する検討, 第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2017

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。

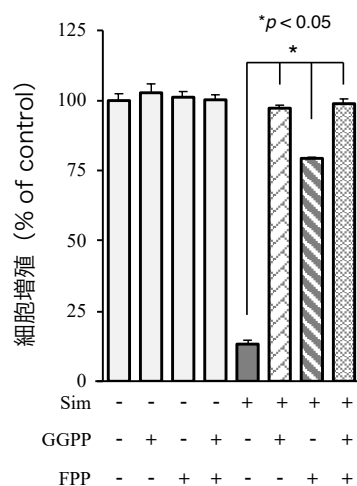


図5 シンバスタチン (Sim), GGPP およびFPPが細胞増殖に及ぼす影響

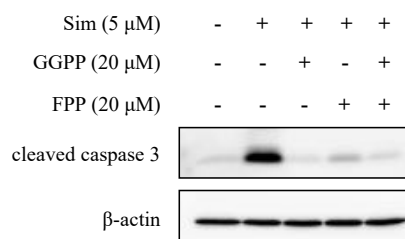


図6 シンバスタチン (Sim), GGPPおよびFPPがCaspase-3の活性化に及ぼす影響