

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08346

研究課題名（和文）異所発現性血液凝固第7因子の癌の静脈血栓塞栓症、悪性化への役割の解明

研究課題名（英文）Effect of ectopically synthesized coagulation factor VII on venous thromboembolism and malignancy

研究代表者

小井詰 史朗 (Koizume, Shiro)

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・副技幹・主任研究員

研究者番号：60416063

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）：本研究では、がん細胞が異所的に産生する血液凝固第7因子のがん関連血栓塞栓症発症への効果を検証することを目的とした。血栓塞栓症頻発がん種である膵臓癌や卵巣がんの細胞株に凝固第7因子（FVII）を異所的に発現させ、細胞外小胞分泌、細胞外小胞血液凝固活性等への効果を検討した。その結果、FVIIはいずれの活性も上昇させた。また卵巣がん組織におけるFVII発現レベルを外科切除されたがん組織を用いて免疫染色により解析し、患者予後情報との関連性を統計学的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん関連血栓塞栓症はがんの主要な合併症であり、がん患者死因のおよそ一割を占める。しかしながら現在その発症予測は困難である。本研究により異所発現性血液凝固第7因子（FVII）ががん細胞より放出される細胞外小胞の血液凝固活性を増強させることを明らかにした。さらにFVIIのがん血栓塞栓症発症への役割を明らかにし、それを指標に血栓塞栓症発症の予測が可能となれば、がんの予後改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined effect of ectopically synthesized coagulation factor VII on cancer-associated thromboembolism (CAT) and malignancy. Cancer cells derived from CAT-prone cancer-types were transfected with FVII. Effect of FVII expression on cell proliferation, secretion of extracellular vesicles (EVs), and blood coagulation activity of EVs were tested. We found that FVII enhances EVs shedding and coagulation activity. We further performed immunohistochemistry of FVII using tissue specimen surgically removed from ovarian cancer patients. Relationship between FVII level and prognosis of patients were statistically evaluated.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：血栓塞栓症 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年がん関連血栓塞栓症 (CAT) と関連した死亡例が増加しており、その重要性に関心が高まっている。これまで CAT の主要因として血液中の組織因子 (TF) の濃度増加が挙げられて来た。しかし、近年のより詳細な研究により卵巣癌や脳腫瘍など CAT 頻発癌腫においてその相関が疑問視されている (Claussen et al. *Thromb. Res.* 141, 39-48, 2016; Hisada and Mackman *Blood* 130, 1499-1506, 2017 等) ことなど CAT 発症と TF との関連は十分に理解されていない。一方で特定のがん (膵臓がん) においては TF 陽性細胞外小胞 (EVs) が CAT 発症の主要リスク因子であるとの報告もあることから (Hisada and Mackman *Blood*, 2017)、がん種依存的な CAT 発症メカニズムがあるかもしれない。また、これら研究報告のほとんどは国外からのものである。これまでに我々は肝臓にて合成され、TF と結合して外因性血液凝固過程の開始に携わる血液凝固第 7 因子 (fVII) が、がん細胞にて異所性に合成されること、TF-fVII 複合体陽性の細胞外小胞が分泌されることなどを明らかにしてきた。このことより腫瘍細胞由来 fVII が CAT 発症に寄与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

fVII は肝臓で合成され、血液中に分泌されるが、これまでに我々は卵巣がん (OVSAYO, OVISE 細胞等)、乳がん (MCF-7, YMB-1) 等の細胞が異所的に fVII を産生することを見出し、そのメカニズムも詳細に検討してきた。またこの fVII 発現は、がん組織が慢性的に暴露される低酸素環境により増強され得る。すなわち、がん細胞は血管の乏しいがん組織中において血流に依存せず TF-fVII 活性を獲得可能である。さらに TF は fVII との結合により MAP キナーゼカスケードなどの細胞内シグナル伝達経路を活性化してがん細胞の運動能、浸潤能、アポトーシス抑制能を促進することが知られている。ゆえに TF よりむしろそのリガンドである異所発現性 fVII が、がん患者における CAT 発生や他の悪性形質発現の規定因子となり予後不良性に寄与している可能性がある。本研究課題では異所 fVII のがん患者における CAT 発症、予後不良性への関与について検討する。CAT 発症の分子機構とがん悪性化との関連を新たな視点 (異所 fVII の効果) から明らかにし、治療標的化することで将来的ながんの予後改善に繋げることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

異所 fVII の効果を検証するために fVII 発現をゲノム編集 (CRISPR/CAS9 システム) による遺伝子破壊によりノックアウトさせた細胞株とその陰性コントロール細胞の樹立を試みた。実験には高頻度 CAT 発症がん由来で尚且つ fVII 発現性の細胞株 (卵巣明細胞腺癌由来の OVISE) を用いた。また、ウエスタン法により複数の膵臓がん細胞株において異所 fVII 発現を見出した。中でも AsPC-1 は TF, fVII 共に高発現であり、モデル細胞として好適と考えられた。樹立した細胞を用いて高速遠心法により細胞培養液から EVs を単離する。EVs は必要に応じてウエスタン法、フ

ローサイトメトリー、微小粒子解析装置 (NANOSIGHT LM-10, Malvern 社) 血液凝固 (クロッティング) アッセイにより TF, fVII 発現、凝固能、粒子サイズ等の EVs の性質の解析を計画した。また、実際のヒト腫瘍組織 (卵巣がん、膵臓がん) における TF, fVII の発現レベルと臨床パラメータとの相関性の免疫染色法による検討を計画した。検体は臨床情報が明らかな外科手術検体を既に作成済みであり、当院 (神奈川県立がんセンター) の神奈川県立臨床研究・情報機構、腫瘍組織センターに保管してある。

4. 研究成果

1. 異所発現 FVII ノックアウトがん細胞樹立の試み

異所発現性 FVII の CAT 発症への効果を検証するために FVII 遺伝子の発現を恒常的に抑制した細胞の作製法を検討した。これまで当研究室において異所性 FVII 遺伝子発現の抑制のため RNA 干渉法を試みたが、十分に発現レベルの低下した細胞の取得に至らなかった。当研究室では同様の方法で他の複数の遺伝子の発現を抑制した細胞の取得には成功しているため、異所発現性 FVII 遺伝子はその抑制細胞の取得が困難な遺伝子と考えられた。本研究計画では、卵巣明細胞がん細胞において異所性に発現している FVII の発現を他の手法、すなわちゲノム編集法を用いて遺伝子構造レベルで抑制した細胞の作製に取り組んだ。市販のキットを用いてゲノム編集 (CRISPR/Cas9) 処理を行い、卵巣がん細胞の FVII 遺伝子構造の破壊 (knock out: KO) を試みた。次にこの細胞プールについてクローンを単離し、増殖させた。これらの細胞についてウェスタン法により FVII の発現抑制を検討した。陰性コントロールゲノム編集細胞と比較したところ、ゲノム編集により FVII 発現は低下しているが完全に発現が抑制された細胞は得られなかった。またこれらの細胞を継続して培養すると FVII の発現は完全に回復した。得られた細胞クローンより DNA を抽出し塩基配列を解析したところゲノム編集反応が起こっているが不十分で、遺伝子発現を完全にブロックしえないものばかりであった。これらの結果からもあらためて FVII-KO 細胞の取得は困難と考えられた。今後異所性 FVII の抑制のためにヒト FVII 特異的な中和抗体の利用を検討する必要があると考えられる。そこで方針を転換し、FVII を強制発現させたがん細胞株を作成し、その性質を検討することとした。実験には実験動物への生着、増殖性に優れた卵巣明細胞がん細胞株 ES2 を用いた。

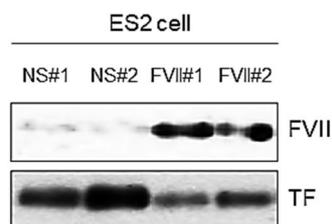


図1 ES2細胞由来EVsにおけるFVII とTFの発現のウェスタンブロット解析

2. FVII 強制発現細胞の樹立とその性質の解析

卵巣明細胞がん細胞の ES2 に FVII 発現プラスミドをトランスフェクションして安定に FVII を発現する細胞株 (FVII#1 and FVII#2) とそのコントロール細胞 (NS#1 and NS#2) (図1) を樹

立した。まず FVII の発現による細胞の増殖への影響を検討したが影響は見られなかった。これらの細胞について細胞培養液から EVs を単離した。EVs についてウエスタン法により FVII, TF の発現を確認した (図 1)。また NANOSIGHT により EVs 粒子径を、活性化凝固第 10 因子生成アッセイにより EVs の凝固活性を評価した (図 2)。その結果、ES2 細胞の EVs (図 2 A) は血液凝固能の高い TF-FVII 複合体陽性の EVs を放出することが分かった (図 2 B)。現在樹立した細胞株を用いて動物実験を行い、in vivo にてがん細胞より放出された TF-FVII 陽性 EVs が実際に血栓の形成を促進するか検討中である。

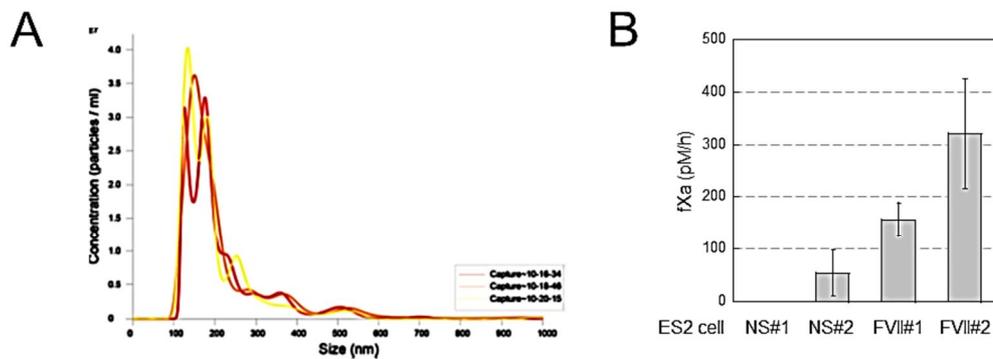


図 2 ES2細胞由来EVsとその凝固活性の検討 A: NanosightによるES2細胞由来EVsの粒子径解析 B: fXa generation assayによるEVsの凝固能の解析

3. 腫瘍細胞にて発現する FVII とがん患者予後との関連解析

我々は以前、TF と FVII は卵巣明細胞がん細胞にて高発現していることを報告している。今回、腫瘍細胞にて発現する FVII と卵巣

明細胞がん患者予後との関連を解析した。がん組織染色に先立ち、がん細胞株セルブロックを用いて複数抗体をテストし、最も優れた染色性を示す抗体を選択した。次に、神奈川県立がんセンターにて作成された卵巣がん組織マイクロアレイを用いて FVII の免疫染色を行い染色像について FVII 発現レベルを

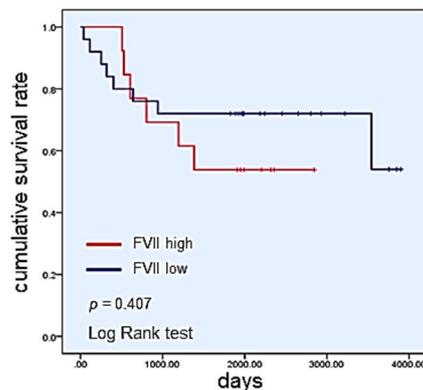


図 3 Kaplan-Meier法による卵巣明細胞がん患者生存率と腫瘍細胞におけるFVII発現レベルの関連解析

Image J ソフトウェアによる画像解析により数値化した。この FVII 発現レベルと患者 生存率との関連性を Kaplan-Meier 法により検討した。卵巣明細胞がん患者の生存率と FVII レベルの間に有意な相関性は見出されなかった (図 3)。今後他がん種についても検討予定である。

以上総じて今回の研究計画では異所発現性 FVII の CAT 発症における重要性を示すまでには至らなかったが、今後研究手法の再考により目標達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kouga T, Koizume S, Aoki S, Jimbo E, Yamagata T, Inoue K, Osaka H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Drug screening Pelizaeus-Merzbacher disease by quantifying the total levels and membrane localization of PLP1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	6. 最初と最後の頁 100474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2019.100474.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koizume S, Takahashi T, Yoshihara M, Nakamura Y, Ruf W, Takenaka K, Miyagi E, and Miyagi Y.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Cholesterol Starvation and Hypoxia Activate the FVII Gene via the SREBP1-GILZ Pathway in Ovarian Cancer Cells to Produce Procoagulant Microvesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thromb. Haemost.	6. 最初と最後の頁 1058-1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0039-1687876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Y, Koizume S, Nakamura Y, Yoshihara M, Takahashi T, Sato S, Myoba S, Ohtake N, Kato H, Yokose T, Miyagi E, Miyagi Y	4. 巻 45
2. 論文標題 Tissue factor pathway inhibitor-2 is specifically expressed in ovarian clear cell carcinoma tissues in the nucleus, cytoplasm and extracellular matrix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 1023-1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.7944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小井 詰 史朗、小林 智、高橋 朋子、森本 学、上野 誠、宮城 洋平
2. 発表標題 胆道癌における血栓塞栓症リスクと血液中の組織因子との関連解析
3. 学会等名 第2回 日本腫瘍循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 智、小井詰 史朗、上野 誠、宮城 洋平、森本 学
2. 発表標題 肺癌患者の血液中組織因子による血栓塞栓症発症予測
3. 学会等名 第2回 日本腫瘍循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小井詰 史朗、中村 圭靖、吉原光代、宮城 悦子、竹中 克也、宮城 洋平
2. 発表標題 HIF1 and SREBP1 collaborate to induce GILZ expression to produce procoagulant microvesicles in ovarian cancer cells
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中 克也、小森 由香子、中村 圭靖、小井詰 史朗、宮城 洋平
2. 発表標題 Cancer progression by an enzyme expression under serum starvation and hypoxia
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小井詰史朗、金山知彦、岡山明子、木村弥生、宮城洋平
2. 発表標題 低酸素、血清除去環境に暴露された卵巣癌細胞におけるCD69発現依存的タンパク質リン酸化の解析
3. 学会等名 第27回 日本癌転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小井詰史朗、中村圭靖、吉原光代、竹中克也、宮城洋平
2. 発表標題 Ectopic synthesis of CD69 is important for intra-peritoneal survival of ovarian clear cell carcinoma cells
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中克也、小森由香子、中村圭靖、小井詰史朗、宮城洋平
2. 発表標題 Expression of an ATP-grasp superfamily enzyme under hypoxia
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小井詰史朗、小林智、高橋朋子、森本学、上野誠、宮城洋平
2. 発表標題 膵臓癌における血栓塞栓症リスクと血液中の組織因子との関連解析
3. 学会等名 第1回 日本腫瘍循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小井詰史朗、太田幸秀、中村 圭靖、吉原光代佐藤慎哉、横瀬智之、宮城 悦子、竹中 克也、宮城 洋平
2. 発表標題 Hypoxia-driven CD69 synthesis enhances ovarian clear cell carcinoma cell survival via integrin-fibronectin interaction
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田幸秀、小井詰史朗、佐藤慎哉、中村圭靖、宮城悦子、宮城洋平
2. 発表標題 Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) is a novel immunohistochemical biomarker in ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小井詰史朗、宮城洋平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 腫瘍循環器学の現況と展望 クリニカルトピック・組織因子の機能調節メカニズム in BIO Clinica, 2019, vol 34, No. 10	

〔産業財産権〕

〔その他〕

神奈川県立がんセンター臨床研究所 http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮城 洋平 (Miyagi Yohei) (00254194)	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)・臨床研究所・所長 (82713)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河内 利賢 (Kawauchi Riken) (10328205)	日本大学・医学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関