

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16762

研究課題名(和文)凝固系カスケードを利用した卵巢癌細胞集塊の腹膜播種戦略機序の解明

研究課題名(英文) Novel strategy of ovarian cancer implantation, Preinvasive growth of fibrin anchored cells with neovascularization

研究代表者

松岡 歩 (Matsuoka, Ayumi)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：50579662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巢癌腹膜播種病変の病理組織の検討により、卵巢癌腹膜播種機構において、Tissue factorの強い発現を認め凝固系機構の関与による癌細胞のtrappingが起点であると考えられた。そしてそれに引き続く癌細胞周囲へ間質細胞の誘導と血管新生による腫瘍の成育による播種成立の可能性が示唆された。また、卵巢癌患者における腹水中と血液中の血漿でのTFの値をELISAを用いて検討すると、腹水中には血液中より優位にTF値が高いこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回腹膜転移部位の詳細な観察により、「Fibrin網による癌細胞集塊のtrap,それを足場に新生血管や間質組織を周りに構築し成育し、浸潤する」というこれまでと異なる観点での播種形成機構が考えられた。組織の再構築や修復で重要な凝固系機構が播種形成の初期から関与しており、Tissue factorをtargetとした癌微小環境の制御は卵巢癌腹膜播種の制御に対する治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified a different strategy for the peritoneal invasion of Ovarian cancer cells mass (OCM). As an early step, the OCM anchor in the extraperitoneal fibrin networks and induce the migration of CD34 positive and VEGFA positive endothelial cells, constructing extraperitoneal vascular networks. During the extraperitoneal growth of OCM, podoplanin positive and SMA positive CAF appears. In more advanced lesions, the boundary line of mesothelial cells disappears around the insertion areas of feeding vessels and extraperitoneal and intraperitoneal stroma are integrated, enabling the OCM to invade the host stroma, being associated with CAF. In addition, tissue factors are strongly detected around these peritoneal implantation sites and their levels in ascites were higher than that in blood. These findings demonstrate a novel strategy for peritoneal invasion of ovarian cancer and TF targeted intraperitoneal anti cancer treatment.

研究分野：Gynecologic Oncology

キーワード：Tissue factor 腹膜外血管新生 中皮細胞層 癌細胞集塊 卵巢癌腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性性器の悪性腫瘍のうち最も死亡率が高く、その要因は腹腔内播種性転移という、腹腔内全体に癌細胞が広がり微小な転移を形成する進展形式にある。臨床現場においては、腹膜播種による胸腹水貯留のため、呼吸苦や腹部膨満感を引き起こし患者の QOL を損ねているだけでなく、治療上でも腹膜播種の制御が困難であるため、最終的にはホメオスタシスが破綻し落命することが多い。腹膜播種形成の有無が患者の予後を左右するため、腹膜播種形成の分子機構の解明が治療方針や患者の予後を決める上で重要と考えられる。これまでは癌細胞自身が上皮間質転換を介して、腹膜の間質内に浸潤する機序が腹膜播種の主たる成立機構として報告されてきた。しかしながら、卵巣癌腹膜播種が成立する分子メカニズムなどは不明な点が多く残されており、有効な早期発見方法や播種の制御を目的とした治療法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

「癌細胞集塊は腹膜中皮に対峙した後、上皮間質転換を起こすことなく宿主の間質細胞に作用し、癌細胞集塊の周囲に腹膜組織と連続した間質組織を形成誘導することで腹膜間質への浸潤を完遂する」という作業仮説をあげてこれを検証する目的で本研究を計画した。具体的には臨床検体を用いた仮説を支持する分子の発現解析を遂行して卵巣癌の新しい腹腔内播種性転移の分子機構を解明し、新規の治療法開発につながる知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

当院で手術を施行した卵巣癌腹膜播種症例 20 例を対象とした。腹膜播種部分を cold knife で切除しゴム板に貼り付けて 10%NBF で固定し、2-3 mm 間隔で切開した後、切片をカセットに垂直に立てて入れ、paraffin 包埋処理し、ブロックは 3um 厚で薄切し染色に使用した。また手術の際に採取した腹水と術前の血液中の TF の値を ELISA を用いて検討した。

4. 研究成果

卵巣癌腹膜播種病変の病理組織を観察すると、卵巣癌細胞はバラバラになっておらず、集塊構造を保ったままで、腹膜中皮細胞層は 1 層保たれており、癌細胞は中皮細胞に接着することなく、腹水中に浮遊した状態であった。また癌細胞は赤血球を伴う網状構造に trap されているような像が観察された。腹膜間質には多数の拡張した血管や炎症細胞も観察された (A)。

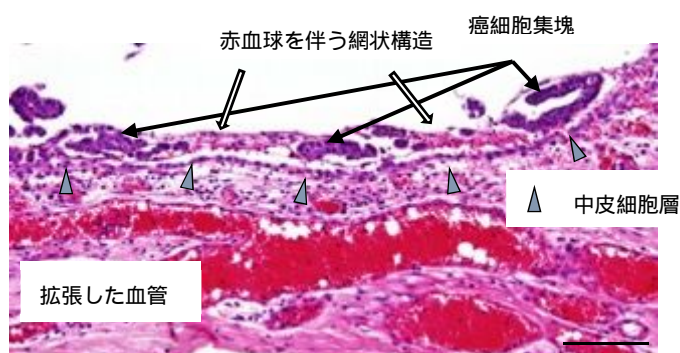
そこで網状構造を確認するため、炎症誘導因子や fibrin 形成誘導に関連する蛋白 Tissue factor などの発現を免疫組織学的に検討した結果、フィブリノゲンが陽性であり、フィブリン網が形成されていると考えられた。また癌細胞集塊周囲には Tissue factor が特に強く発現しており、腫瘍塊の trap に凝固機構が関与している可能性が示唆された (B)。

次に、癌細胞集塊が fibrin 網へ間質細胞遊走を誘導して、癌集塊の周囲に腹膜組織と連続した間質組織を形成し、形成された間質内に新生血管が進展する (腫瘍播種の成立) という仮説のもと、間質組織での Cancer associated fibroblast (CAF) の発現、血管新生誘導因子の産生を CD31、VEGF-A や D2-40 の発現等で評価したところ、間質内の繊維芽細胞と新生血管の存在を確認した (C,D)。

これらの組織学的所見から卵巣癌腹膜播種機構において、凝固系機構の関与による癌細胞の trapping, そして引き続く間質細胞の誘導と血管新生による腫瘍の growing による播種成立の可能性が示唆された。

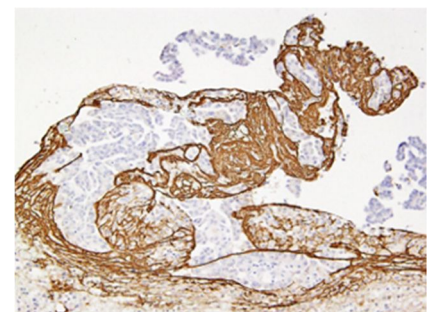
また、卵巣癌患者における腹水中と血液中の血漿での TF の値を ELISA を用いて検討すると、腹水中には血液中より優位に TF 値が高いことがわかった (E)。

A



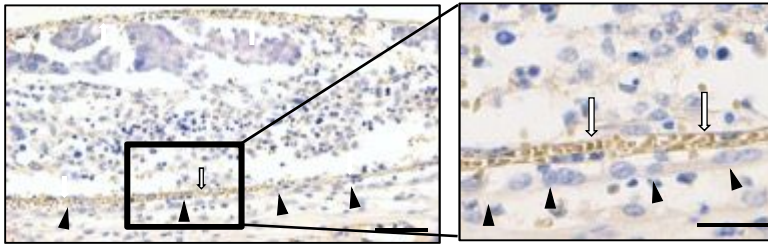
B

癌細胞周囲に Tissue factor が発現



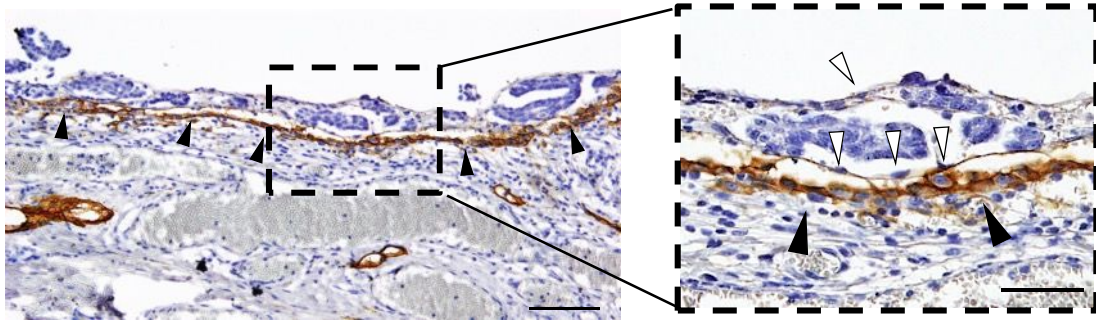
C

微小血管構造の構築 (CD31)

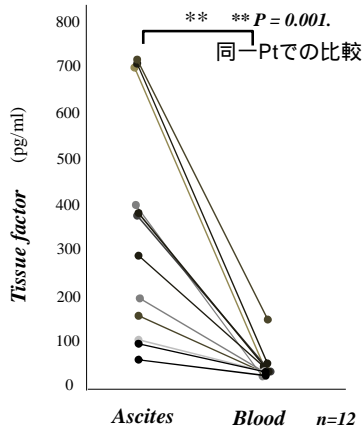


D

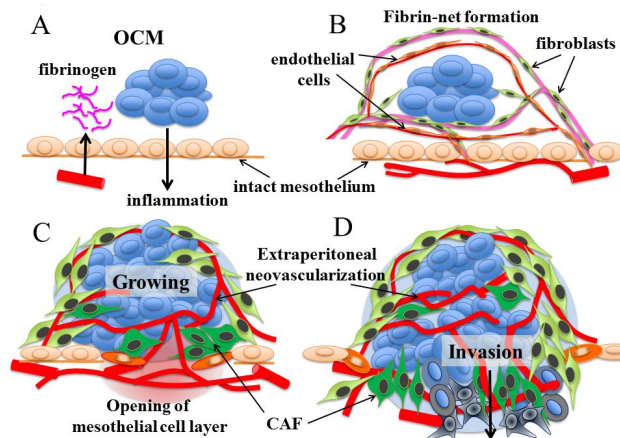
中皮細胞層と CAF の遊走 (D2-40)



E



F



これらの知見を新しい腫瘍播種機構として提案するとともに、その推察される誘導機序を下記の仮説として提示する(F)。

癌細胞が炎症誘導物質を産生し、腹膜組織に炎症を誘導する。(炎症誘導因子の発現)
 誘起された炎症により、透過性を亢進した毛細血管からフィブリノーゲンが析出されて癌細胞集塊周囲にフィブリン網を形成する。(フィブリンの証明、癌細胞のフィブリン形成誘導に関連する蛋白 Tissue Factor の発現)
 腹膜上皮層の構造を保ったまま癌細胞から分泌される間質細胞遊走因子によりフィブリン網に間質細胞が遊走し、癌集塊の周囲に腹膜組織と連続した間質組織を形成する。(Cancer associated fibroblast 等癌微小環境構成細胞の証明、ケモカイン SDF-1/CXCL12 の発現)同じく血管新生誘導因子の作用で癌細胞側に血管網も形成する。(VEGF、CD34 の発現)
 間質組織に新生された血管が、癌組織内に進展して直接コンタクトをとり腫瘍播種が成立する。(CD34、D2-40 の発現)

今回腹膜転移部位の詳細な観察により、「Fibrin 網による癌細胞集塊の trap,それを足場に新生血管や間質組織を周りに構築し成育, 血管誘導路を利用して浸潤する」というこれまでと異なる観点での播種形成機構が考えられた。組織の再構築や修復で重要な凝固系機構が播種形成の初期から関与しており、播種の制御に対する治療に結びつく可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayumi Matsuoka, Yasunari Mizumoto, Masanori Ono, Kyosuke Kagami, Takeshi Obata, Junpei Terakawa, Yoshiko Maida, Mitsuhiro Nakamura, Takiko Daikoku, Hiroshi Fujiwara	4. 巻 110
2. 論文標題 Novel strategy of ovarian cancer implantation: Pre invasive growth of fibrin anchored cells with neovascularization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2658-2666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14098	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡歩、水本泰成、小野政徳、鏡京介、小幡武司、寺川純平、 毎田佳子、中村充宏、大黒多希子、藤原浩
2. 発表標題 卵巢癌腹膜播種機構を再考察するー新しい播種形成機序の提言ー
3. 学会等名 第21回北陸GOG Open clinical conference
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 卵巢癌の検出方法及び卵巢癌治療剤藤	発明者 藤原浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-078850	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----