

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16533

研究課題名(和文) 膵癌に併発する血栓塞栓症発症に関わる液性因子の解明

研究課題名(英文) Soluble factors for thrombosis associated with pancreatic cancer

研究代表者

石垣 和祥 (Ishigaki, Kazunaga)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：60836287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血栓塞栓症は担癌患者でよく認められる合併症であり、癌患者の死因でも癌死に次いで多い。癌の中でも膵癌は最も血栓塞栓症を発症しやすい癌であり、本研究では膵癌患者の予後に深く関わる血栓塞栓症の発症機序を検討した。「肝転移が最大の血栓塞栓症発症のリスク要因」という結果を得ていたため、「肝転移によって大循環に入りやすくなった膵癌細胞が分泌する何らかの液性因子が、全身性の血栓塞栓症発症のリスクを高めているのではないか」と考えた。検討の結果、膵癌組織の進展はVEGFによって左右され、癌の進展に伴って放出される細胞外小胞が多量になると血管内皮細胞での付着と血栓形成を惹起することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は膵がんで合併することの多い血栓塞栓症の機序を解明するべく、膵癌組織から何かしらの液性因子が放出されることで血栓素因が形成されるのではないかと仮説のもとに検討を行った。種々の分子生物学的手法を用いて、最終的に可溶性のVCAM1という因子が膵癌組織から放出されそれが血栓形成に関与している可能性をみいだした。この結果から、例えば抗体などを用いてそのメカニズムに介入することで、上記のような膵癌に伴う血栓形成による病態の悪化を防ぐことが可能となるかもしれない。そうなれば予後の悪い膵癌の予後延長に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Thromboembolism is a common complication in cancer-bearing patients, and is the second leading cause of death in cancer patients. Among cancers, pancreatic cancer is prone to develop thromboembolism, and in this study, we investigated the pathogenic mechanism of thromboembolism, which is closely related to the prognosis of pancreatic cancer patients. Since it seemed that liver metastasis is the largest risk factor for the development of thromboembolism, some humoral factor secreted by pancreatic cancer cells were likely to cause systemic thromboembolism. As a result of the examination, it was suggested that the development of pancreatic cancer tissue is influenced by VEGF, and that a large amount of extracellular vesicles released from cancer tissues induces thromboembolisms at the vascular endothelial cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵がん

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一位は悪性腫瘍である。悪性腫瘍による死亡者数を臓器別にみると第一位は肺がんであるが、第二位から第五位までの4つの臓器は いずれも消化器系の癌であり、大腸癌、胃癌、膵癌、肝癌が占めている。このうち、胃癌、肝癌による死亡者数は減少傾向にあり、大腸癌、膵癌による死亡者数は増加傾向にある。特に膵癌は増加傾向が著しく、しかも早期癌で発見されることが少ないため、その主たる治療は抗がん剤を用いた化学療法であるが、現時点では、切除に至った患者を含めた全患者の5年生存率でも10%以下であり、罹患数と死亡者数がほぼ同数という極めて予後の悪い疾患である。

血栓塞栓症は担癌患者でよく認められる合併症であり、癌患者の死因でも癌死に次いで二番目に多いとされている。癌の中でも膵癌は最も血栓塞栓症を発症しやすい癌であり、自身の検討では、膵癌症例の12%で認められた (Ishigaki et al. Pancreas 2017)。血栓塞栓症は performance status (PS) の低下につながるだけでなく、化学療法の中止、あるいは生命予後に深刻な影響を及ぼすことが知られている。

本研究者が以前、血栓塞栓症を発症した膵癌症例475例の特徴を検討したところ、多変量解析の結果、肝転移の有無のみが極めて有意にその発症に相関することが見出された ($p = 0.01$, hazard ratio 2.15)。しかしながら、膵癌における血栓塞栓症の発症機序については、まだ不明確な点が多い。通常血液が触れる部位にはほとんど発現していない組織因子 (Tissue Factor; TF) が血管内皮細胞や血球系で発現増強すると、外因系を血管内で活性化し血栓症を引き起こすと考えられている。実際、膵癌での検討でも、組織因子高発現の癌を持つ患者さんでは血栓塞栓症のリスクが高いことも示されている (Khorana AA et al. Thromb Res. 2018)。しかし、癌部でのみ凝固系が活性化しているわけではないので、組織因子の膵癌組織での高発現だけが膵癌患者の血栓塞栓症のリスクを引き上げているとは考えにくく、他の因子の関与も強く疑われるが、その実態はまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、膵癌患者の予後延長のため、膵癌患者の予後に深く関わる血栓塞栓症の発症機序に迫るべく、基礎的な検討を行おうと発想した。特に、自身のこれまでの検討で、「肝転移が最大の血栓塞栓症発症のリスク要因」という結果を得ているため、「肝転移によって大循環に入りやすくなった膵癌細胞が分泌する何らかの液性因子が、全身性の血栓塞栓症発症のリスクを高めているのではないか」との問いを立てて、膵癌マウスモデルおよび臨床検体を用いて、検討していくこととした。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景のもと

- a) 膵癌細胞が分泌する液性因子による血管内皮細胞内で発現する凝固線溶因子の変化の検討
- b) それに基づく対処法の提唱

を主目的とし、血栓塞栓症発症の発症リスクの同定、および担癌患者の血栓塞栓症の発症予防法の開発をめざす。本研究者は、以前から、膵癌患者の予後の短縮につながる血栓塞栓症の発症機序について、主に臨床的な見地から検討を加えてきた (Ishigaki et al. Pancreas 2017)。この検討結果では、膵癌における血栓塞栓症発症のリスク因子は肝転移の有無であり、それを鑑みると、局所進行癌であれば肝臓を通る間に捕捉あるいは分解されうる 何らかの液性因子が癌細胞から分泌されて大循環に入ることがリスクになるのではないかと考えられる。膵癌の血栓塞栓症においてもがん組織から分泌される液性因子が遠隔組織での病態に関わっているのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株から分泌される液性因子による血管内皮細胞の表現型の変化の解析

各種膵癌細胞株から分泌される液性因子、とくに細胞外小胞について血管内皮細胞との相互作用の観点で検討を進める。ある種の特異的な細胞外小胞が血管内皮細胞の接着因子と相互作用しそこに結合することで凝固因子の活性化等を引き起こし血栓形成に結び付くのではないかとという視点で検討を行う。

(2) 膵癌発症モデルマウスでの血栓形成傾向について、病理組織学的な解析を行う。

(3) これらの結果に基づいて、介入法を検討し、モデルマウスでの確認を行う。

4. 研究成果

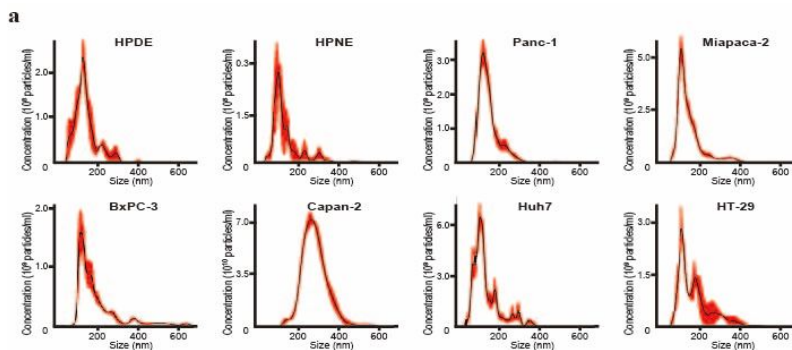
(1) 膵癌細胞株から分泌される液性因子による血管内皮細胞の表現型の変化の解析

膵癌細胞株から放出される細胞外小胞の単離

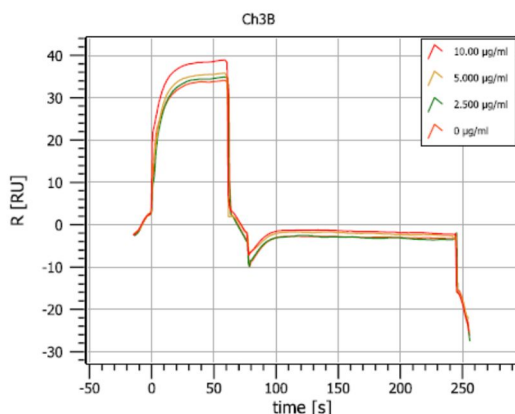
膵癌細胞株から放出される細胞外小胞について、限外濾過法を用いて、サイズや粒子数の確認を行った。その結果、さまざまな細胞株から放出される細胞外小胞には種々の特徴があるものの、概ね100nm前後の粒子が放出されていた。Capan-2については粒子数が多くかつサイズも大きいものが多かった(図1)。それぞれの特徴については現在も解析を続けているところであるが、

引き続きこれらの細胞外小胞が血管内皮細胞と相互作用をするか検討を行った。

右図: 様々な細胞株での細胞外小胞のサイズと粒子数の検証結果。



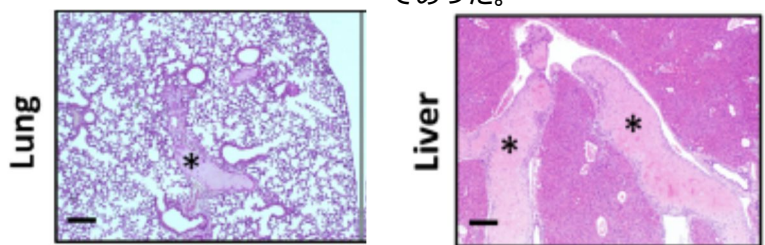
細胞外小胞と血管内皮細胞にある接着因子との相互作用の共鳴プラズモン法に依る検討
 これらの膵癌由来の細胞外小胞と血管内皮細胞とのあいだに相互作用がみられるかどうか、血管内皮細胞の表面に発現している接着因子のひとつと細胞外小胞との相互作用の強さを、共鳴プラズモン法で検討を行った。その結果、下記の図のように、一定の条件下において、弱いながらも結合が示された。この結果は、膵癌由来の液性因子としての細胞外小胞が血管内皮細胞に付着して何らかの機能を持っていることが示された。特に細胞外小胞には tissue factor も付随していることが示されているため、細胞外小胞の多寡によっては血管内皮細胞に凝固系を活性化させる因子が付着し血栓形成傾向が示される可能性が示唆される。



左図: 膵癌細胞株由来の細胞外小胞と血管内皮細胞表面に表出する接着因子との結合を、表面プラズモン法を用いて検討した。その結果、ランニングバッファーを PBST にした条件下において、弱いながらも結合することが示され、かつそれが濃度依存性をもつことが判明した。そのため細胞外小胞の量的な条件によっては多くの細胞外小胞が血管内皮細胞に付着する可能性が示唆された。

(2) 膵癌発症モデルマウスでの血栓形成傾向

膵がん自然発症モデルである、変異 Kras と TGFbetareceptor typell ノックアウトを膵癌上皮細胞に持つマウスを用いて、その死後の病理学的検査を行った。その結果、70%近いマウスで自然発生的な血栓形成があることが示された。肺動脈や肝静脈に血栓が下図のように認められ、臨床的に近いモデルであることが示唆された。しかも血栓塞栓形成は膵癌の進展に比例して認められ、膵癌組織から放出される液性因子が何らかの作用をしていることを強く示唆するものであった。



左図: 膵癌自然発生マウスモデルにおける塞栓形成を示す。肺動脈や肝静脈に血栓塞栓を認める。

液性因子の探索

さらにその原因を調べるため、血清からのサイトカインの検討を行った結果、血栓傾向を示す個体においては、sVCAM1の量が多いことが示された。VCAM1は深部静脈血栓症の発症リスクと相関することが他疾患で示されており、膵癌においても血栓塞栓傾向の良いマーカーになることが示唆された。いっぽうで、これが単なるマーカーかそれとも血栓塞栓形成の主因となっているのかについては、今後の検討が必要であるが、下記に示すように抗 VEGF 抗体を用いた介入法の検討も合わせて行うこととした。

(3) 抗 VEGF 抗体による膵癌モデルの寿命延長効果

ここまでの検討結果に基づいて、抗 VEGF 抗体を膵癌発症マウスモデルに投与したところ、腫瘍の進展が抑制され、かつ、血栓塞栓の形成傾向も抑えられることが判明した。これらの結果から、sVEGF が血栓形成の主因となっているかどうかは不明であるが、少なくとも腫瘍進展効果が sVEGF によって惹起され、それによって膵癌が進展し、その結果、血栓塞栓形成が促進されることが示唆された。抗 VEGF 抗体によって膵癌の進展が抑えられ、その結果 血栓塞栓の形成も抑えられていることが示唆される。

全体の結果をまとめて考えると、膵癌組織の進展は VEGF によって左右され、癌の進展に伴って放出される細胞外小胞が多量になると血管内皮細胞での付着と血栓形成を惹起することが示唆されるが、これらの詳細の解明は今後の課題となる。

少なくとも今後、血清中の sVEGF の多寡は膵癌の予後予測因子として用いることが出来る可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishigaki Kazunaga, Nakai Yousuke, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Suzuki Tatsunori, Nakamura Tomoka, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Saito Kei, Saito Tomotaka, Takahara Naminatsu, Hamada Tsuyoshi, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Tada Minoru, Isayama Hiroyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Endoscopic Ultrasound-Guided Tissue Acquisition by 22-Gauge Franseen and Standard Needles for Solid Pancreatic Lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut and Liver	6. 最初と最後の頁 817 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5009/gnl19171	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 Hakuta Ryunosuke, Nakai Yousuke, Hamada Tsuyoshi, Suzuki Yukari, Inokuma Akiyuki, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Nakamura Tomoka, Sato Tatsuya, Ishigaki Kazunaga, Saito Kei, Saito Tomotaka, Takahara Naminatsu, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Tada Minoru, Koike Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Regular Statin Use and Incidence of Postendoscopic Retrograde Cholangiopancreatography Pancreatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MCG.0000000000001312	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 Mizuno Suguru, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Kei, Sato Tatsuya, Takeda Tsuyoshi, Hakuta Ryunosuke, Saito Tomotaka, Takahara Naminatsu, Kogure Hirofumi, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Shikata Nahoko, Tagami Tomoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Diagnostic yield of the plasma free amino acid index for pancreatic cancer in patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 695 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2019.07.002	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 Sano Makoto, Takahashi Ryota, Ijichi Hideaki, Ishigaki Kazunaga, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Blocking VCAM-1 inhibits pancreatic tumour progression and cancer-associated thrombosis/thromboembolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 1713 ~ 1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-320608	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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