

機関番号：82713
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590455
 研究課題名（和文）「血液凝固第7因子産生がん」の概念確立と高凝固性マイクロパーティクルの解析
 研究課題名（英文）Coagulation factor VII producing tumors and their release of microparticles with coagulation initiating capacity
 研究代表者
 宮城 洋平（MIYAGI YOHEI）
 研究者番号：00254194

研究成果の概要（和文）：生理的には肝細胞特異的に産生される血液凝固第VII因子（fVII）が様々ながん細胞で異所性に産生され、かつ微小な細胞膜成分（マイクロパーティクル）に組み込まれて、血液凝固反応を惹起する能力の極めて高い物質として周囲の環境に放出されること、低酸素環境でこのマイクロパーティクルの放出が増加すること明らかにした。更に、低酸素条件における異所性fVII産生の特徴的な遺伝子発現誘導メカニズムの一端を明らかにした。厳しい環境にがん細胞が適応して生き延びるメカニズムの一つである可能性があり、がん治療の標的分子機構としても注目している。

研究成果の概要（英文）：Physiological expression of blood coagulation factor VII (fVII) is generally restricted to hepatocytes. In the present study, we found that breast cancer tumor cells produce fVII ectopically, and release fVII containing microparticles (MPs) with a high coagulation initiating capacity into the microenvironment, especially under hypoxic condition. In addition, we partly clarified a novel regulatory mechanism of gene expression under hypoxia combined with depleted nutrients, which could be a target for new cancer therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：

キーワード：TF, 組織因子, factor VII, 血液凝固第VII因子, 低酸素, 低血清, 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

1800年代の中頃、Trousseau ががん患者に血栓症が高率に合併することを報告して以来、長い研究の歴史の中で、がん患者血液で

の凝固能の亢進や血小板活性化マーカーの上昇が示され (Sallah S, et al. Clin Cancer Res 2004;10:7238-43 他)、一方、がん細胞自体では、外因系血液凝固の開始因子として知

られる組織因子 TF や plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I), cyclooxygenase-2 (COX-2) などの凝固活性物質の産生が証明されている (Nakasaki T, et al. Am J Haematol 2002;69:247-54. Boccaccio C, et al. Nature2005;434:396-400 他). また, 抗がん剤治療開始後に血栓塞栓症の発症率が高いことが知られ, 乳がんの場合では早期がんの 5-10%, 進行癌では約 20% に血栓塞栓症が合併すると報告されている (Kirwan CC, et al. Br J Cancer 2008;99:1000-6). 加えて, 外因系血液凝固経路の起点となる TF/血液凝固第 VII (fVII) 複合体の形成は, 血液凝固のみならず細胞内情報伝達経路を介して, がん細胞の増殖や細胞死回避, 運動/浸潤能の促進, 血管新生の亢進など多岐に及ぶ機能を有している (総説: Ruf W. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1545-50). 本研究の申請者らは 2006 年, 専ら肝細胞が特異的に産生するとされてきた fVII が, 様々なヒト培養がん細胞により異所性に産生されていること, がん細胞の浸潤・転移を促進することを報告した (Cancer Res. 66:9453-60, 2006). 一方, Mackman らは Stage IV の進行がん患者の血中に TF の活性を持つ膜小胞成分 (microparticle) が上昇していることを報告した (Thromb Res 2008;122:604-9). microparticle は主に活性化された血小板が産生する凝固活性化能を持つ膜成分断片 platelet-derived microparticle (PMP) として研究が進み, 最近では白血球や巨核球, 血管内皮細胞やがん細胞などからも microparticle が放出されることが示されている (Cauwenberghs S, et al. FEBS Lett 2006;580:5313-20 他).

2. 研究の目的

本研究では, fVII を異所性に産生するがんの

一群が存在することを臨床検体を用いて明らかにし, かつ, このような「異所性 fVII 産生がん」では, がん細胞から TF と fVII を併せ持つ, 血液凝固反応が「Ready to Go」の状態にある極めて凝固活性の高い microparticle が放出されること, 更に, その放出が抗がん剤暴露や低酸素状態などで亢進する可能性を培養細胞レベルで検証すること, 異所性の fVII の遺伝子発現メカニズムを解析して新規がん治療の標的分子機構となる可能性を探ること, を目的とする.

3. 研究の方法

(1) 外科切除乳がん組織での fVII 発現の解析.

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) された外科切除乳がん組織を解析する. 乳癌組織は術前化学療法が施行されていない浸潤性乳管癌とする. 薄切切片から RNA を抽出し, 定量的 RT-PCR 法で fVII, TF の mRNA 発現を定量する. 免疫染色により乳がん組織に於ける fVII の発現を検討する.

(2) 異所性 fVII 遺伝子発現メカニズムの解析とその制御.

肝細胞での fVII 産生に hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) が関与することが知られている. そこで異所性 fVII 産生を示す培養がん細胞に於ける fVII 遺伝子の発現に HNF-4 が関与するか否かを Western blot, 染色体免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) で検討する. 更に, fVII 遺伝子の転写開始点から上流 400 塩基の発現調節領域, およびその deletion mutant 等を含むレポーター遺伝子を作製して異所性発現の責任領域を明らかにする. また, 異所性発現に関与することが予想される転写関連因子を ChIP で解析する. 転写関連因子の解析から得られた知見に基づき, 生理的発現に影響することな

く異所性 fVII 遺伝子発現を制御する可能性についても検討する。

(3) 卵巣明細胞腺癌細胞／組織に於ける異所性第 VII 発現の解析と、低酸素条件下での fVII 発現誘導、及び、高凝固能 microparticle 分泌の解析。

がん細胞が日常的にさらされている細胞環境である低酸素環境下での fVII 遺伝子の発現を CoCl₂ 添加による疑似低酸素培養条件下で real-time PCR により検討する。また、fVII 遺伝子発現の増強と microparticle の分泌活性、及び分泌される microparticle の血液凝固誘導能を解析する。microparticle は超遠心で回収し、TF、fVII の発現を Flow Cytometry で確認する。microparticle の凝固能は活性化型第 X 因子 (Xa) 産生能や凝固時間で評価する。低酸素状態で fVII 遺伝子の発現誘導がかかる卵巣明細胞腺癌の外科切除組織に於ける異所性 fVII の発現を免疫染色で解析する。

(4) 低酸素環境下における異所性 fVII 遺伝子発現誘導のメカニズム解析。

卵巣明細胞腺癌細胞を用いて、fVII 遺伝子の転写開始点上流の hypoxia inducible factor (HIF) 結合領域の検索とレポーター遺伝子作製による責任部位の同定、関与する転写関連因子の解析を、前述の非低酸素環境下での実験と同様に進める。生体内で実際にがん組織が乏血状態に置かれた場合には、単なる低酸素と同時に様々な血液成分の欠乏が想定される。そこで、低酸素+無血清、の細胞環境下における fVII 遺伝子の発現誘導についても検討する。

4. 研究成果

(1) 外科切除乳がん組織での fVII 発現。
術前の neoadjuvant therapy が施行されていない浸潤性乳管癌 (硬癌、充実腺管癌、乳頭

腺管癌) の代表的組織型について、FFPE 薄切切片から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法で fVII、TF の mRNA 発現を定量したところ、充実腺管癌を中心に半数以上の乳癌組織で fVII 遺伝子の mRNA 発現を認めた (図 1a。硬癌、充実腺管癌、乳頭腺管癌、各 10 例の解析例。縦軸は 18S で normalize した fVII mRNA の量を示す。NBT, normal breast tissue-FFPE; NLT, normal liver tissue-FFPE; HCT, hepatectomy normal liver tissue-frozen.)。免疫染色では、乳癌細胞に加えて癌組織周囲に浸潤している macrophage と考えられる単核球にも fVII の陽性象が観察された (図 1b) 腫瘍細胞に異所性 fVII の発現がない場合でも、炎症細胞由来の fVII が癌細胞膜表面上の TF と会合して複合体を形成する可能性も示唆された。

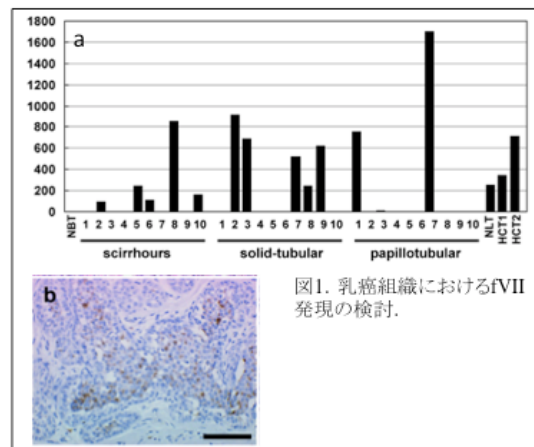


図1. 乳癌組織におけるfVII発現の検討。

(2) 異所性 fVII 遺伝子発現メカニズムの解析とその制御。

異所性 fVII 産生を示す培養がん細胞として、乳がん細胞 YMB-1, MDA-MB-453 細胞を用いて解析したところ、肝細胞で fVII 遺伝子の発現に関与する HNF-4 の発現は無く、プロモーター領域への結合も見られないことがわかった。プロモーター領域の塩基配列の解析から、USF/c-MYC, Erg-1/Sp-1, CREB の結合領域が存在することが解った。ChIPでの解析では c-MYC 以外のタンパク質が実

際に結合することを認めたが、肝細胞由来のがん細胞 HepG2 でも c-MYC の結合を認める以外は大きな差がなかった。

そこで、転写に關与する histone acetyltransferase (HAT) について ChIP 解析を行ったところ、HepG2 が PCAF, SRC-1 を主にリクルートしているのに対して、異所性発現を示す YMB-1 は p300 と CBP をリクルートしていることが明らかとなった。一方、初代培養肝細胞 hNHeps は上記 4 種類全ての HAT を結合させていた。生理的な肝細胞での fVII の発現を落とさずに異所性の発現のみを制御する方法として、p300 の抑制活性が知られているクルクミンを投与したところ、HepG2 での発現には影響せず YMB-1 の fVII 遺伝子発現を抑制できることが解った。

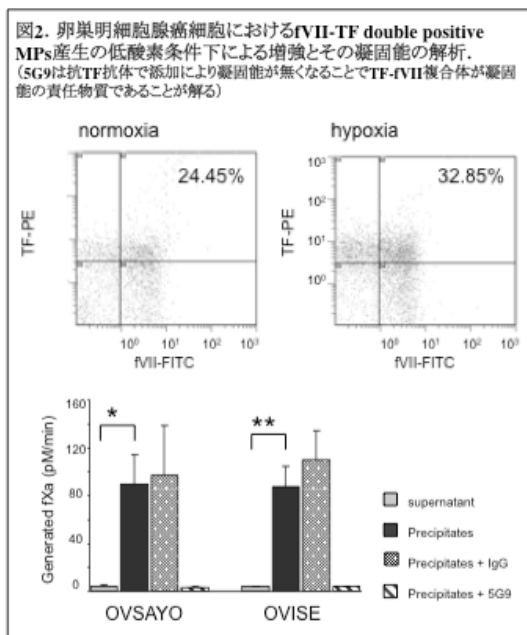
(3) 卵巣明細胞腺癌細胞における低酸素条件下での fVII 発現誘導と高凝固能 microparticle 分泌の解析。

CoCl₂ を 500μM の濃度で培地に添加する疑似低酸素環境下で、OVISE, OVSAYO の 2 種類の明細胞腺癌細胞で顕著な fVII と TF の発現誘導がかかること、これに伴い癌細胞の膜表面上での血液凝固能の更新も認められ

ることが解った。更に、1%酸素の実際の低酸素状態でも同様の現象が見られることを確認した。1%酸素酸素下で培養して回収した培養上清中の microparticle を flow cytometry で解析したところ、fVII, TF いずれも陽性で、かつ高い凝固能を示すことが解った (図 2)。

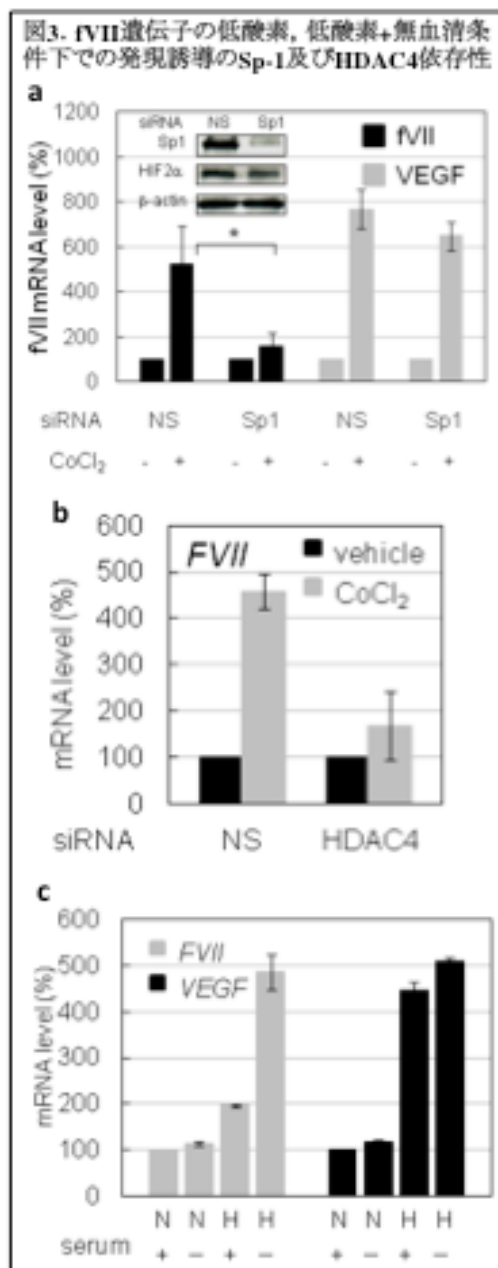
(4) 低酸素環境下における異所性 fVII 遺伝子発現誘導のメカニズム解析。

fVII 遺伝子の転写開始点上流の hypoxia inducible factor (HIF) 結合領域の検索の結果、転写開始点より約 1kb 上流に hypoxia responsive element を認めたが、卵巣明細胞腺癌細胞 OVSAYO を用いた ChIP では、低酸素下での同部への HIF-1α, HIF-2α の結合は見られなかった。レポーター遺伝子作製による解析では転写開始点の上流約 150 塩基が fVII 遺伝子の低酸素応答責任部位であること、この範囲には Sp-1 と HNF-4 の結合部位があるが、Sp-1 結合部位が誘導に必須であることが解った。更に、詳細な解析を加えて、OVSAYO 細胞に於ける低酸素下での fVII 遺伝子発現誘導には、HAT では無く histone deacetylase 4 (HDAC-4) のプロモーター領域へのリクルートが必要であること、低酸素に無血清の条件を加えると相乗的に誘導が活性化されることなどの特徴が明らかとなった (図 3. a: Sp-1 を siRNA でノックダウンすると低酸素条件下での fVII 遺伝子発現誘導は抑制される。一方、VEGF 遺伝子は全く影響されない。b: HDAC4 のノックダウンも同様である。c: 低酸素+無血清の条件下で fVII 遺伝子発現は相乗的に誘導される。VEGF 遺伝子では無血清による誘導の上乗せ効果はない)。



本研究全般を通じて、fVII を異所性に産生する癌の一群が存在すること、を培養ヒト癌細胞

胞，外科切除乳がん，卵巣がん検体で明らかにすることができた。更に，このような「異所性 fVII 産生がん細胞は，TF・fVII 複合体を含む，高い凝固活性を持つ microparticle を周囲の microenvironment に放出する可能性があることを示した。また，fVII 遺伝子の発現が低酸素環境，低酸素+低栄養環境で誘導されること，その調節機構の一端も明らかにした。血液凝固の惹起のみならず，浸潤，血管新生など様々な癌細胞の生物学的挙動に係わる TF・fVII 複合体の制御は，新規が



ん治療の標的分子ともなり得る。クルクミンで示したような，生理的 fVII 産生を阻害せず，詰まり出血傾向という副作用なしに，がん細胞における異所性発現のみを制御する薬の開発も重要であると考えらる。

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 3 件)

- ① Yokota N, Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Kikuchi K, Ruf W, Sakuma Y, Tsuchiya E, Miyagi Y. Self-production of tissue factor-coagulation factor VII complex by ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 101, 2023-2029, 2009.
- ② Koizume S, Yokota N, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Yoshida A, Kameda Y, Tsuchiya E, Ruf W, Miyagi Y. HNF-4 independent synthesis of coagulation factor VII in breast cancer cells and its inhibition by targeting selective histone acetyltransferases. *Mol Cancer Res*, 7(12):1928-1936, 2009.
- ③ Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y. HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acid Res*, 32(4):1457-1461, 2012.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Naho Yokota, Shiro Koizume, Yoshiyasu Nakamura, Yuji Sakuma, Mikiko-Asai Sato, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Eiju Tsuchiya, Yohei Miyagi. Release of TF/fVIIa Positive Highly-coagulating Microparticles from Ovarian Cancer Cells

- and Its Increase Under Hypoxia. 第 68 回日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 1 日, 横浜.
- ② Shiro Koizume, Naho Yokota, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yoshiyasu Nakamura, Akira Yoshida, Eiju Tsuchiya, Wolfram Ruf, and Yohei Miyagi. Curcumin Inhibits Ectopic Human Coagulation Factor VII Synthesis in Breast Cancer Cells by Targeting p300/CBP Activity. 第 68 回日本癌学会学術総会, 平成 21 年 10 月 3 日, 横浜.
- ③ Shiro Koizume and Yohei Miyagi. Hypoxic induction of coagulation factor VII (FVII) in ovarian cancer cells associated with activation of blood coagulation. The 7th annual Meeting for the Japanese Association for Cancer and Hypoxia Research. 第 7 回がんとハイポキシア研究会, 平成 21 年 12 月 5 日, 京都.
- ④ Shiro Koizume, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yoshiyasu Nakamura, Eiju Tsuchiya, Yohei Miyagi. Activation of *FVII* gene in ovarian cancer cells associated with HIF2alpha-Sp1 interaction and histone deacetylation. 第 69 回日本癌学会学術総会, 平成 22 年 9 月 23 日, リーガロイヤルホテル, 大阪.
- ⑤ Shiro Koizume, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yoshiyasu Nakamura, Eiju Tsuchiya, Wolfram Ruf, and Yohei Miyagi. The 102nd AACR Annual Meeting 2011, April 4, 2011, Orlando, FL
- ⑥ 小井詰史朗、宮城悦子、平原史樹、中村圭靖、高野康雄、宮城洋平. 卵巣明細胞がん細胞において HIF2 α / Sp1 / mTOR 相互作用は脱アセチル化依存性転写を誘導する. 第 70 回日本癌学会学

- 術総会, 平成 23 年 10 月 3 日, 名古屋
- ⑦ 最上多恵、横田奈朋、伊藤慎、吉原光代、中村圭靖、佐久間裕司、小井詰史朗、辻祥太郎、宮城悦子、平原史樹、宮城洋平. 卵巣明細胞腺癌で高発現する annexin A4 の機能解析. 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 4 日, 名古屋
- [図書] (計 1 件)

Shiro Koizume and Yohei Miyagi. Ectopic Synthesis of Coagulation Factor VII in Breast Cancer Cells: Mechanisms, Functional Correlates, and Potential for a New Therapeutic Target. *Breast Cancer – Current and Alternative Therapeutic Modalities*. Edited by: Esra Gunduz and Mehmet Gunduz. Chapter 10 (197-212). InTech, November 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 洋平 (MIYAGI YOHEI)

神奈川県立がんセンター臨床研究所・総括部長

研究者番号：00254194

(2) 研究分担者

小井詰 史朗 (KOIZUME SHIRO)

神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任研究員

研究者番号：60416063