

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790633

研究課題名（和文） 高凝固性マイクロパーティクルによる癌における血栓塞栓症発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） The analysis of high coagulant microparticles on venous thromboembolism complicated with ovarian cancer

研究代表者

伊藤 慎（ITO SHIN）

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・特別研究員

研究者番号：00460139

研究成果の概要（和文）：卵巣癌細胞から放出されるマイクロパーティクル（MPs）の放出量は、他の癌種と比較し有意に多く、高い血液凝固能を持つことを明らかにした。また、線維芽細胞に形質転換した MPs は 44 時間に渡り維持されることを明らかにした。これらの結果から、卵巣癌から放出された高い血液凝固能を持つ MPs が線維芽細胞に形質転換され、長期に渡り維持されることで、血栓塞栓症が引き起こされている事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the ovarian cancer cells secrete a larger number of microparticles (MPs) than any other types of cancer. The MPs with high coagulant activities merged to fibroblast cells and were maintained for a long time. We suggest that TF bearing MPs may play major roles in TF-VIIa activity of ovarian cancer tissues rather than activation of peripheral thrombosis. These suggest that high coagulant MPs from ovarian cancer cells result venous thrombosis on ovarian cancer patients

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：腫瘍検査学、マイクロパーティクル、卵巣癌、血栓塞栓症

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌患者で併発する血栓塞栓症

多くの癌患者が静脈血栓塞栓症を併発し、予後との関連も報告されているが、その発症メカニズムの詳細は未だ不明である。更に、抗癌剤治療開始後に血栓塞栓症のリスクが高まることも多く、癌治療において併発する血栓塞栓症の予防の必要性が重要視されている。

(2) 異所性血液凝固第 VII 因子の発見

血液凝固第 VII 因子（factor VII: fVII）はその受容体である組織因子（Tissue factor: TF）と結合し、外因性血液凝固の引き金となる凝固第 X 因子（factor X: fX）の

活性化を示す。申請者の所属する研究グループの小出詰らは、本来、肝細胞系の細胞でのみ発現している fVII が、癌細胞に異所的に発現していることを発見した。更に、申請者は mRNA レベルで異所性 fVII を発現している数種の細胞株について Western Blot を行い、異所性 fVII は癌細胞の培養液中に殆ど放出されていないが細胞膜表面上には TF/fVIIa 複合体が形成され、fX の活性化能を有することも見出している。

(3) 血液凝固活性を持つ MPs の発見

癌組織は血流不足による低酸素、低栄養などのストレス条件下に曝露されているが、このようなストレス環境下で癌細胞は直径約 1

μm 以下の自身の細胞膜断片であるマイクロパーティクル (Microparticles: MPs) の放出が増加することが知られている。申請者の研究グループの横田らは卵巣癌において、MPs が異所性 fVII 及び TF を含み、fX の活性化による外因性凝固活性を示す事を明らかにした。これらの発見は、癌細胞が自らの異所性 fVII と TF により TF/fVIIa 複合体を産生し、血液凝固活性のある MPs として放出させ、癌患者での血栓形成を惹起していることを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異所性 fVII 及び TF/fVIIa 複合体を内在する高凝固性 MPs (TF/fVIIa 陽性 MPs) が血栓塞栓症発症に関して重要な危険因子である可能性について明らかにすることである。これらのファクターの詳細を明らかにすることは、癌患者の中で血栓塞栓症に対して高リスク群に選択的に抗凝固治療を施すことが可能となるとともに、がん患者の予後改善につながる可能性がある。

この可能性を明確にするために、主に下記の項目について検討を行った。

(1) MPs が直径 1μm と非常に小さいものであることから、フローサイトメーター等を用いた解析及び Western blot による内容物の確認方法の確立。

(2) 他の癌種に対して血栓塞栓症のリスクが高いと言われている卵巣癌と他の癌種間での、MPs の放出量の比較。

(3) 卵巣癌が自身で異所性 fVII 及び TF を産生していることから、放出される MPs に TF/fVII 複合体が内在し血液凝固能を持つことの確認。

(4) 末梢において血栓塞栓症が起こることから、MPs が他の組織の細胞膜へ形質転換していることが示唆される。この事から、MPs の他の細胞 (内皮細胞、線維芽細胞...等) への形質転換の検討。

3. 研究の方法

(1) 各種癌細胞株の培養

実験に用いた細胞株は、Koizume ら (Cancer Res. 2006, Mol. Cancer Res. 2009) らの方法を元に培養を行った。細胞培養は、37 の CO₂ インキュベーターにて、10% FBS の培養液で培養を行い、各実験に用いた。

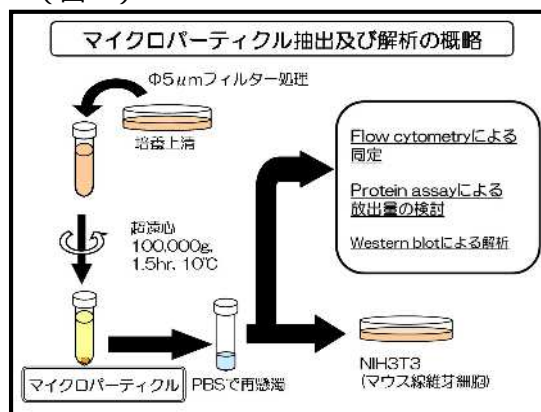
(2) MPs の抽出

マイクロパーティクルの抽出方法及び解析方法の概略については図に示す (図 1)

MPs の抽出には、37 の CO₂ インキュベーターの条件下にて、10 cm ディッシュに 2 × 10⁶ 個に播種した癌細胞を 10% FBS 培養液中でオーバーナイトカルチャーした後、無血清培養条件下にて 48 時間培養した後、培養液を回収し、100,000G、1.5 時

間、10 で超遠心を行い、沈殿したものを 200 μl の PBS にて再懸濁して各実験に用いた。MPs は、プロテインアッセイ、フローサイトメトリー及び Western blot にて解析を行った。

(図 1)



(3) フローサイトメトリー

超遠心により回収された物が MPs であるかどうかを確認するための手段の一つとして、上記で得た sample をフローサイトメトリー (ベックマンコールター) を用いて解析を行った。解析では、得られたデータの直径を直径 1μm のビーズと比較を行い、ビーズより小さく、かつ、PE 標識したアネキシン V に対して、陽性のものを MPs として同定を行った。

(4) Western blot

Whole cell lysate 及び MPs を用いて Western blot も行った。細胞及び MPs の解析のための Western blot では、抗 TF 抗体及び抗 fVII 抗体を用いた。また、MPs の指標として、TSG101 の発現が用いられることが多いことから、TSG101 を用いて MPs の放出を調べた。

(5) データ解析

個々の実験は、3 回以上行い、得られたデータは、student t-検定を用いて比較を行った。

4. 研究成果

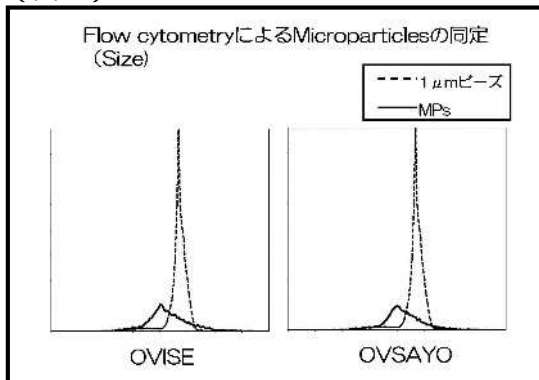
(1) MPs の検出方法の確立

培養から得られる培養液中には、MPs が含まれるが、MPs は直径が 1μm 以下と通常の光学顕微鏡下では確認が不可能である。これらのことから、通常は超遠心を行った後 MPs に関する解析を行う。

本研究では、48 時間、無血清条件下で培養を行った培養細胞の培養液を回収し、100,000g、1.5 時間、10 の条件で超遠心を行い、その沈殿を PBS で再懸濁したものをフローサイトメトリーにより解析を行った。卵巣癌細胞株 (OVISE, OVSAYO) に関して解析を行ったところ、直径 1μm のビーズより小さい直径のピークが得られた (図 2)。

これらのサンプルでは、FITC 標識したアネキシン V に対しても陽性であり、また PE 標識した抗 TF 抗体に対しても免疫陽性であったことから、MPs と強く示唆された。

(図 2)

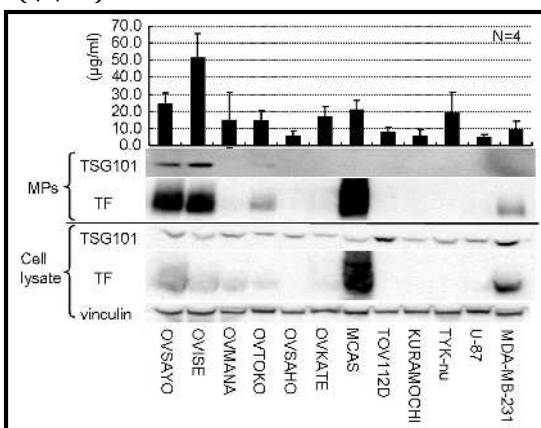


(2) 卵巣癌明細胞の MPs 放出量は顕著に多い

MPs を放出する癌として既知の細胞株であるヒト脳腫瘍細胞株 (U-87) 及びヒト乳癌細胞株 (MDA-MB-231) と各種卵巣癌との MPs の放出量について検討を行った (図 3) すべての細胞株に関して、細胞自身の MPs のマーカーとされる TSG101 の発現量が同一であるにもかかわらず、OVISE、OVSAYO の卵巣癌明細胞をはじめとする卵巣癌細胞株において TSG101 の多量な放出が見られた。この結果は、放出量の指標となる Protein assay でも一致した結果が得られた。

さらに、TSG101 及び MPs 中に含まれる血栓塞栓症の原因となる TF の含有に関しての Western blot 及び Protein assay に関して卵巣癌同士で検討を行った。

(図 3)



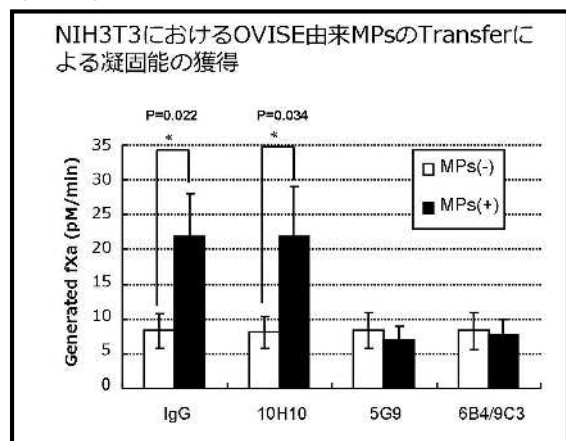
Protein assay では、明細胞癌の OVSAYO、OVISE において顕著に高い値を示した。さらに、この 2 つの細胞株は TSG101 の Western blot に関して先他の癌腫との比較と同様に細胞での発現量は他の卵巣癌と変らな

いにもかかわらず、顕著に高い放出量が見られた。また、MPs の TF の発現について検討したところ、細胞での発現の高い細胞において TF の発現が確認された。この Protein assay が高いことと TSG101 の検出量が高いことが一致すること及び、図 2 の直径が 1 μm 未満であることから、OVISE、OVSAYO の卵巣癌明細胞において顕著に MPs の放出量が多く、そこには多くの TF があることが示された。

(3) ターゲット細胞による血液凝固能の獲得

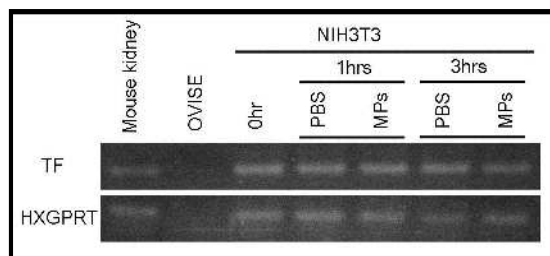
サル線維芽細胞株である NIH3T3 細胞に対して、OVISE から得た MPs を無血清条件下において添加し、NIH3T3 細胞での血液凝固能について検討を行った (図 4)。本来、血液凝固能を持たない NIH3T3 において、MPs 添加後には、血液凝固能が観察された。この血液凝固能は、TF の活性を抑制する抗 TF 抗体及び fX の活性を抑制する抗体により抑制されたことから、TF/fVIIa 複合体に依存したものであることを明らかにした。

(図 4)



更に、この形質転換に関して、本来、NIH3T3 細胞が持つ TF の発現が増加したものではないことを RT-PCR にて確認した (図 5) MPs 添加後、mRNA が発現していると考えられる 3 時間後においても NIH3T3 での TF の mRNA の発現上昇は観察されなかった。

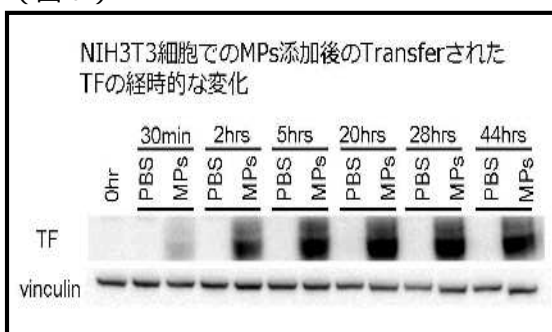
(図 5)



(4) 形質転換された MPs は長時間維持される

(3) までにおいて、NIH3T3 に対して卵巣癌細胞由来の MPs が顕著に多く、高凝固能を持ち、この血液凝固能が NIH3T3 に形質転換されることを明らかにした。これらの結果から卵巣癌から放出された MPs 由来であることが明確である TF を指標として、Western blot にて経時的な検討を行った。(図 6) 形質転換された TF は、MPs 添加後次第に多くなり、それは MPs 添加後 44 時間でもその量は維持されていた。この確認できる TF は細胞が新たに発現するものではなく、MPs 由来であることは、図 5 の RT-PCR の結果からも明らかである。このことから、MPs により形質転換されたタンパク質は長期に渡り維持されることが示唆された。

(図 6)



(5) 今後の展望

本研究では、

先の研究において各癌種間で外因性血液凝固経路において主要な因子である fVII の放出量を比較したところ、卵巣癌細胞において顕著に多く放出していることを明らかにしていることから、卵巣癌由来の MPs が自身の TF/fVIIa 複合体を含有し、それにより高凝固能を持ち、ターゲットの細胞に形質転換して血栓塞栓症を引き起こしている事が十分に示唆された。申請者は、ヌードマウスに卵巣癌細胞 (OVISe) 及びコントロール群として MPs を放出する既知の細胞株である MDA-MB-231 細胞を移植し、定着後に血中に含まれる TF/fVIIa 複合体の血液凝固能について調べたが、有意な差は見られなかった (Data not shown)。本研究の MPs 由来の TF/fVIIa 複合体が直接血栓塞栓症に関与するか否かについて検討を行うためには、MPs のターゲットの細胞の種類などを明確にすることが必要である。

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)

[学会発表](計 3件)

(1) 伊藤慎、小井詰史朗、中村圭靖、宮城

洋平 肝細胞癌で見られる TF 及び TFPI1 の特異的な発現 第 70 回日本癌学会, 2011, 名古屋

(2) 伊藤慎、小井詰史朗、高野康雄、宮城洋平

肝細胞癌で発現する異所性 TFPI1 による癌細胞での接着阻害 第 71 回日本癌学会, 2012, 札幌

(3) Shin Ito, Shiro Koizume, Yuji Sakuma, Roppei Yamada, Wolfram Ruf, Yasuo Takano, Yohei Miyagi. Aberrant expression of TFPI-1 associated with low procoagulant activity of liver cancer cells. AACR Annual Meeting, 2013, Washington, DC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 慎 (ITO SHIN)

研究者番号 : 00460139