

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861310

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍におけるTFの発現と過凝固状態についての研究

研究課題名(英文) The study of TF expression and hypercoagulability in the gynecologic malignant tumor

研究代表者

櫻井 学 (Sakurai, Manabu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30638979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：治療開始前の卵巣がんの約25%で静脈血栓塞栓症(VTE)が発生している。Tissue factor (TF)は外因系血液凝固の起点となっている。そこで、卵巣癌128名でTF発現とVTE発症の関連を研究した。治療開始前に全例でVTEのスクリーニングを行い、免疫染色でTFの発現強度を判定した。明細胞癌患者でのVTE発生率は34%で非明細胞癌より有意に高率であった。TF発現強度の上昇に伴い、明細胞癌の割合とVTE発生率が高くなった。また、多変量解析でTF発現強度およびDD高値がVTE発生の独立した有意なリスク因子だった。TF発現は卵巣癌でのVTE発生に関連し、明細胞癌で有意に高いことが判明した。

研究成果の概要(英文)： Venous Thromboembolism develops before the start of treatment in about 25% of patients with ovarian cancer. Tissue factor (TF), initiates extrinsic blood coagulation. We investigated the intensity of TF expression (ITFE) and VTE in 128 patients with epithelial ovarian cancer. Before starting treatment, all patients were ultrasonographically screened for VTE. The ITFE was graded based on immunostaining of surgical specimens. The prevalence of VTE was significantly higher in CCC (34%) than in non-CCC (17%,  $P=0.03$ ). As ITFE increased, the frequencies of CCC and VTE increased significantly ( $P<0.001$  and  $P=0.014$ , respectively). Multivariate analysis identified TF expression and pretreatment D-dimer level as significant independent risk factors for VTE development. Expression of TF is high in CCC significantly, and involved in the development of VTE.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：婦人科悪性腫瘍 静脈血栓塞栓症 Tissue factor(組織因子)

## 1. 研究開始当初の背景

がん患者においてはしばしば凝固と線溶の活性化がみられ、その半数、また、転移をもつがん患者の約90%で凝固異常を示すといわれている (coagulation disorders clinical oncology, 2007-1)。

過凝固状態により発生した静脈血栓塞栓症 (VTE) のスクリーニングに血清D-dimer (DD) が用いられている。DDは、フィブリンがプラスミンによって分解されることにより生成されるため、凝固亢進状態状態に対する線溶亢進の結果として高値を示す。VTEは手術や化学療法などによって発症リスクが上がるが、婦人科悪性腫瘍患者では治療開始前のVTEの発症が知られている。我々は、その発症率が卵巣癌で24.8% (82/330)、子宮体癌で11.8% (56/476)、子宮頸癌で5.8% (28/485)と、とくに卵巣癌で高率に発症していることや、治療開始前に発見されたVTEの97%は無症候性であるため、治療開始前にDDを用いてVTEのスクリーニングを行い、癌の治療開始前にVTEに対応することで周術期のVTE発症を予防する重要性について報告してきた。(T. Satoh, M. Sakurai et al: Br J Cancer 2007, T. Satoh, M. Sakurai et al: Br J Cancer 2008, T. Satoh, M. Sakurai et al: Thromb Res. 2013、データはup date)。日々の臨床において上記のような対応をすることで、筑波大学附属病院での2009年以降術後の症候性VTE発症率は0.4% (2/453名)となっているが、悪性腫瘍におけるVTE発生を基盤とした過凝固状態のメカニズムを明らかにし、新たな治療を確立することが重要であると考えた。

我々はVTE発症メカニズムを解明するため、以前に卵巣がん32名において免疫染色を用いて、外因系凝固カスケードの第 因子であるTFの発現(下記図)を調べた。そして、TFの発現が卵巣がんにおけるVTE発症の因子で、特に明細胞腺癌で過剰発現しVTEの進展に関わる

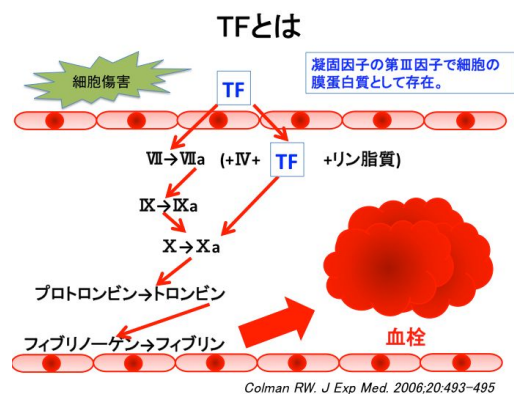
可能性があることを報告した(K. Uno et al Br J Cancer, 2007)。

これまでの報告で、TF はVTE 形成のほか、転移の範囲、腫瘍における血管新生にも関係するとされ、循環血中腫瘍細胞において組織因子がフィブリン層を形成することで、微小循環系の中で腫瘍細胞が捕獲されやすくなり血行性転移を誘発するとされている。

(Kasthuri RS et al: J ClinOncol. 2009)。

さらに、フィブリノーゲンが不足したマウスでは腫瘍の転移が減少する(Palumbo JSet al: Blood. 2000)、循環血中腫瘍細胞が集塊を形成することでNK 細胞からの干渉を減らすという報告もある(Palumbo JS et al: Blood. 2005)。さらに、Kakkar らのmeta-analyses では低分子量ヘパリン投与でがん患者の生存期間が延長した(Kakkar AK et al: Cancer control. 2005)とされ、悪性腫瘍における過凝固状態の制御が腫瘍の進展を抑制することが示唆されている。

そこで、本研究で婦人科悪性腫瘍におけるTFの発現を中心に、過凝固状態の解明と過凝固状態が腫瘍の進展に及ぼす影響を明らかにし、診断・治療など臨床へ応用したいと考える。



## 2. 研究の目的

TF発現とVTEとの関連を明らかにすることで婦人科悪性腫瘍における過凝固状態を解明すること。

### 3 . 研究の方法

#### 1) 対象

2004年11月から2010年12月までに当院で初回治療を行い、病理学的に卵巣癌と診断され、同意（包括同意）を得て試料を保管したものを対象とした。

対象患者は191名であるが、同意（包括同意）を得られなかった患者10名と研究に用いる腫瘍組織が採取された時点で抗がん剤に暴露されている術前化学療法を受けた患者53名の試料は、治療開始前のVTE発生の原因を評価するには不相当と判断し除外した。化学療法を行う前に開腹術ないし試験開腹が施行され、検体を得ることができた128名を対象とし、治療開始前VTEの有無にかかわらず、すべての患者で免疫組織学的にTF発現の評価を行った。臨床進行期は、FIGO（International Federation of Gynecology and Obstetrics）2014により決定し直した。

#### 2) 免疫染色方法および判定方法

免疫染色は我々のグループが2007年に報告した論文と同様の方法で行った。すなわち、手術により得られた試料は10%ホルマリンに固定し、パラフィンブロックとした。腫瘍組織を含むパラフィンブロックを選別し患者1人につき3カ所、厚さ3 $\mu$ mの切片を作成した。

キシレンで脱パラフィン化を行い、100%エタノールで再水和を行った。抗原賦活化のため、10mMのクエン酸緩衝液（pH6.0）を用いて500Wの電子レンジで5分間のマイクロウェーブ処理をしたあと、氷水で約20分間冷却した。内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため0.3%過酸化水素含有メタノール溶液にて室温で15分間ブロッキングした。免疫染色は酵素抗体法（免疫ペルオキシダーゼ法）を用いた。一次抗体にはtissue factor（TF）に対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体（希釈1:50, Cedarlane Laboratories,

Burlington, NC）を用いた。41 $^{\circ}$ Cで15時間インキュベートして、抗原抗体反応を行った後、ビオチン化二次抗体を用いたABC法で標識酵素を結合させDABで発色、ヘマトキシリンで核染色を行った。

免疫染色を実施する度、positiveとnegativeの両controlを設定した。positive controlには、TFが染色される臍帯を、negative controlには一次抗体として、TFに対する抗ヒトマウスモノクローナル抗体の代わりに正常マウス血清を反応させた切片を用いた。

TFの発現強度は、腫瘍細胞に占めるTF陽性細胞の割合と発現強度に基づいて、negative, weakly positive（<50% positive tumor cells）, moderately positive（50% positive tumor cells with weak intensity）, strongly positive（50% positive tumor cells with strong intensity）の4つに分類した。すべての免疫組織学的評価は、患者のすべての臨床病理学的情報は伏せた上で、2人の独立したオブザーバーによって行った。

#### 3) 血清D-Dimer値の測定と静脈血栓塞栓症のスクリーニング

治療開始前にすべての患者から抹消血を採取し、DD値を測定した。血液の採取は肘静脈から無傷針を用いて行った。測定はラテックス凝集比濁法で行った。

VTEの検索方法は、深部静脈血栓症（deep vein thrombosis: DVT）を検出するために、すべての患者で下肢静脈超音波検査を施行した。超音波検査には、3-7.5 MHzの変換器を備えているATL HDI5000システム（フィリップス Medical Systems, Bothell, WA, USA）を用いた。両側の腸骨静脈、大腿静脈、大伏在静脈、膝窩静脈、腓骨静脈、後脛骨静脈およびヒラメ筋静脈でDVTの有無を評価した。腸骨静脈と大腿静脈は仰臥位で、その他の静脈は直立座位で評価した。プローベによる用

手的圧迫法とカラードプラー法を用いて静脈の内腔を観察し、血栓の有無を探索した。骨盤内静脈の評価は、バルサルバ法による観察を行った。また、すべての患者は骨盤内腫瘍の広がりや腸骨静脈および下大静脈での血栓を把握するために CT (computed tomography) と MRI (magnetic resonance imaging) を用いた広範囲での画像的検索が行われた。

下肢静脈超音波検査で DVT が検出されたすべての患者は胸部造影 CT もしくは Tc-99 を用いた肺血流シンチグラフィによって、肺塞栓症の有無を調べた。

#### 4) 統計学的解析

カテゴリーデータは頻度と割合、連続データは平均値と標準偏差を用いて要約した。カテゴリーデータの解析には、Fisher の正確確率検定を用いた。連続データの 2 群間差は、student の t 検定、3 群以上の比較には分散分析を用いた。

VTE 発生の潜在的な危険因子の探索のために、年齢、body mass index、進行期、治療開始前 DD 値、組織型、TF の発現強度を単変量解析の変数とした。単変量解析で有意差を示した因子を対象に多変量解析を行った。強い相関を示す因子は、P 値が低いものを選び、多変量解析に用いた。

進行期毎の TF の発現強度および組織型と VTE 発生の関与を評価するため、TF の発現強度と進行期を含んだ多変量モデル (TF の発現強度と進行期の相互影響、組織型と進行期の相互影響) を追加した。

全ての解析は SAS version 9.4 software (SAS Institute, Cary, NC) を用いて解析し、 $P < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### 4. 研究成果

#### 1) 対象の特性

初回治療時の患者 (n=128) の平均年齢は

56.6 ± 11.3 歳、body mass index の平均値は 22.4 ± 3.4 kg/m<sup>2</sup>、治療開始前血清 D-Dimer 値の平均値は 4.2 ± 5.6 μg/mL であった。FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) 2014 分類による進行期は Ⅰ期 55 人、Ⅱ期 22 人、Ⅲ期 37 人、Ⅳ期 14 人で、組織型の内訳は、漿液性癌 42 人、明細胞癌 53 人、類内膜癌 15 人、粘液性癌 12 人、未分化癌 6 人であった。

#### 2) 腫瘍組織での Tissue Factor の発現

免疫染色は、初回治療として付属器摘出を含む開腹手術を受けた 126 名から得られた手術検体と術前化学療法の施行前に試験開腹が行われた 2 名の生検組織を用いて行った。

TF は 128 名中 71 名 (weakly positive 23 名、moderately positive 32 名、strongly positive 16 名)、55.5% で発現していた。TF の発現強度と年齢、body mass index、治療開始前血清 DD 値には相関が見られなかった。進行期別の発現は、Ⅰ期が 81.8%、Ⅱ期が 45.4%、Ⅲ期が 29.7%、Ⅳ期が 35.7% と進行癌で有意に TF の発現が低くなっていた ( $P < 0.001$ )。組織型別では、明細胞癌で 94.3% (50/53)、漿液性癌で 23.8% (10/42)、類内膜癌で 26.7% (4/15)、粘液性癌で 58.3% (7/12)、未分化癌で 0% (0/6) の発現だった。TF の発現頻度は、明細胞癌のほうが非明細胞癌よりも有意に高率で、かつ、発現強度が強かった ( $P < 0.001$ )。TF の発現強度が、negative から weakly、moderately、strongly へと強くなるに従って、治療開始前の静脈血栓塞栓症の発生率も 15.8%、17.4%、37.5%、37.5% と有意に上昇した ( $P = 0.0014$ )。

#### 3) 治療開始前静脈血栓塞栓症発生の危険因子

治療開始前の VTE は 31 名 (24.2%) に発生しており、DVT のみ 20 名、DVT および肺塞栓症 (pulmonary embolism: PE) 8 名、PE のみ

3名で96.8%が無症候性だった。治療開始前VTE発生の危険因子を探索するために、単変量解析を行ったところ、VTE発生患者の血清DD値は $7.4 \pm 6.4$   $\mu\text{g/ml}$ 、発生していない患者では $3.2 \pm 5.0$   $\mu\text{g/ml}$ とVTE発生患者で有意に高値だった ( $P < 0.001$ )。また、VTEは明細胞癌の34.0% (18/53)に発生しており非明細胞癌の17.3% (13/75)よりも有意に高率だった ( $P = 0.03$ )。さらに、TF陽性群では、31.0% (22/71)にVTEが発生しておりTF陰性群の15.8% (9/57)よりも有意に高率だった ( $P = 0.049$ )。TF発現強度に注目すると、moderately/strongly positive群の37.5% (18/48)に発生しており、negative/weakly positive群の16.3% (13/80)よりも有意に高率だった ( $P = 0.008$ )。

多変量解析は、治療開始前DD値とTFの発現強度 (negative/weakly positive群対moderately/strongly positive群)の2つの因子で行った。TF発現に関しては「TF陽性と陰性群」「TFの発現強度」で $P < 0.05$ であったが、よりP値が低い後者を選択した。また、「TFの発現強度」と「明細胞癌/非明細胞癌」のSpearman相関係数は0.66で、多重共線性があり、多変量解析モデルに明細胞癌とTFの発現強度を同時に用いることは統計学的に不適当であるためP値がより低い前者を選択した。多変量解析の結果、治療開始前VTE発生に関して、治療開始前DD値とTFの発現強度が、それぞれ独立した危険因子であることが示された ( $P < 0.0001$ 、 $P < 0.007$ )。

early stage ( / )とadvanced stage ( / )に分けて、明細胞癌とTFが治療開始前VTE発生の危険因子になっているかを調べたところ、early stageではTFのmoderately/strongly positive群の治療開始前VTE発生頻度は32.4% (12/37)で、negative/weakly positive群の17.5% (7/40)と比して統計学的には有意ではないものの、VTEの発生リスクは高まる傾向があった。

advanced stageでは、moderately/strongly positive群の治療開始前VTE発生頻度は54.5% (6/11)で、negative/weakly positive群の15.0% (6/40)と比してVTEの発生リスクが有意 ( $P = 0.021$ )に上昇した。また、early stageでは明細胞癌の治療前VTE発生頻度は30.2% (13/43)、非明細胞癌では17.6% (6/34)、advanced stageでは明細胞癌の治療開始前VTE発生頻度は50.0% (5/10)、非明細胞癌では17.1% (7/41)と双方で明細胞癌患者では高頻度に治療開始前VTEが発生している傾向が確認された。

#### 4) 結論

本研究では、(1)腫瘍でのTF発現は、治療開始前VTE発生に関して、独立した有意な危険因子で、advanced stageでより強く影響すること、(2)TFの発現強度が強くなるほど、治療開始前VTEの発生率が高くなること、(3)TFの発現率および発現強度は共に、非明細胞癌よりも明細胞癌でより高くなること、(4)明細胞癌では非明細胞癌よりも治療開始前VTEの発生率が高いことが確認できた。これにより、明細胞癌のTF産生能が、明細胞癌での治療開始前VTEの発生に関与していることが強く示唆された。

国立がん研究センターによると、本邦での卵巣癌の年間罹患患者数は2000年には7500人程度であったが、近年増加傾向で2016年の罹患数予測は10,000人を超えている。本邦での卵巣癌に占める明細胞癌の割合は1998年18.5%であったのに対し、2014年では24.8%と増加している。明細胞癌には子宮内膜症からの発生経路があり、明細胞癌の頻度が高くなった一因としてライフサイクルの変化による子宮内膜症患者の増加が指摘されている。子宮内膜症はエストロゲン依存性の疾患で、性成熟期女性において月経回数が多いと発症・悪化の頻度が増すが、妊娠、出産、授乳期間にエストロゲン活性が低くなると病

勢が改まる。本邦での晩婚化、これに伴う初産年齢の高齢化、出生数の低下などは子宮内膜症の罹患率をあげる要因であり、これに伴い、今後、明細胞癌の発生はさらに増加し、婦人科悪性腫瘍での治療開始前VTEの発生件数も増加することが懸念される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

施 恵子、櫻井 学、田坂 暢崇、志鎌あゆみ、中尾 砂理、越智 寛幸、水口 剛雄、佐藤 豊実: 再発を契機としてエドキサバン内服中に静脈血栓塞栓症が増悪した組織因子高発現な子宮体癌の1例、日本婦人科腫瘍学会雑誌, 36 巻, 2 号, 292-297 頁, 2018

Manabu Sakurai, Koji Matsumoto, Masahiko Goshō, Akiko Sakata, Yoshihiko Hosokawa, Yuri Tenjimbayashi, Takashi Katoh, Ayumi Shikama, Haruna Komiya, Hiroo Michikami, Nobutaka Tasaka, Azusa Akiyama-Abe, Sari Nakao, Hiroyuki Ochi, Mamiko Onuki, Takeo Minaguchi, Hiroyuki Yoshikawa, Toyomi Satoh: Expression of Tissue Factor in Epithelial Ovarian Carcinoma Is Involved in the Development of Venous Thromboembolism. *Int J Gynecol Cancer*, 27(1), 37-43, 2017 (IF :2.369) DOI: 10.1097/IGC.0000000000000848.

Manabu Sakurai, Toyomi Satoh, Koji Matsumoto, Hiroo Michikami, Yuko Nakamura, Sari Nakao, Hiroyuki Ochi, Mamiko Onuki, Takeo Minaguchi, Hiroyuki Yoshikawa: High Pretreatment Plasma D-dimer Levels Are Associated With Poor Prognosis in Patients With Ovarian Cancer Independently of Venous Thromboembolism and Tumor Extension. *Int J Gynecol Cancer*, 25(4),

593-598, 2015 (IF :2.369)  
DOI: 10.1097/IGC.0000000000000415.

〔学会発表〕(計 3 件)

第 185 回茨城産科婦人科学会

「再発を契機としてエドキサバン内服中に静脈血栓塞栓症が増悪した組織因子高発現な子宮体癌の1例」

施 恵子

2017 年 10 月 茨城

15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society  
High Pretreatment Plasma D-dimer Levels Are Associated With Poor Prognosis in Patients With Ovarian Cancer Independently of Venous Thromboembolism and Tumor Extension.

Manabu Sakurai

November, 2014 Melbourne

第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会

「卵巣癌における Tissue factor 発現と静脈血栓塞栓症の関連について」

櫻井 学

2014 年 4 月 東京

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 学 (SAKURAI, MANABU)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 30638979