

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K09797
研究課題名(和文) 凝固系をターゲットとした卵巢癌腹膜播種機序の解明と治療戦略に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on the mechanism of peritoneal dissemination of ovarian cancer and therapeutic strategies targeting the coagulation system

研究代表者

水本 泰成 (Mizumoto, Yasunari)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：00420331

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)：本研究では、卵巢癌腹膜播種の成立段階におけるフィブリン網、組織因子(TF)の関与が明らかとなった。フィブリン網にトラップされた卵巢癌細胞集塊に対し、初期段階での血管新生因子(VEGF-A)による補給血管の誘導が、重要であることが示唆された。これらは、卵巢がんの予後規定因子である腹膜播種の制御における、抗フィブリン療法、TF標的治療、血管新生阻害療法などの治療戦略の可能性を示唆する結果であり、今後のさらなる検証の礎となるものである。正常免疫マウスを用いた腹膜播種モデルにおける観察においてヒト臨床検体と同様の癌細胞集塊のフィブリン網による捕捉現象が再現されており、さらなる解析に有用なモデルである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなった卵巢癌腹膜播種の成立におけるフィブリン網、組織因子、血管新生因子の関与は、これまでの上皮間葉転換(EMT)仮説とは全く異なる機序であり、卵巢がんの予後不良因子である腹膜播種に対する、新たな治療戦略の開発への礎となりうるものである。早期発見の困難な卵巢高異形度漿液性癌における新規治療戦略に結実する可能性があり、社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the involvement of fibrin networks and tissue factor (TF) in the establishment of ovarian cancer peritoneal seeding was clarified. The induction of replenishment vessels by angiogenic factor (VEGF-A) in the early stage of ovarian cancer cell clusters trapped in the fibrin network was suggested to be important. These results suggest the potential of therapeutic strategies such as antifibrin therapy, TF-targeted therapy, and antiangiogenic therapy in controlling peritoneal dissemination, a prognostic factor in ovarian cancer, and provide a basis for further validation. Observations in a peritoneal seeding model using normal-immunized mice reproduced the trapping of cancer cell clusters by a fibrin network similar to that observed in human clinical specimens, providing a useful model for further analysis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巢癌腹膜播種 フィブリン網 組織因子 血管新生因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は早期より腹膜播種をきたす悪性腫瘍の一つであり、腹膜間質へ侵入する分子機構として、「腹膜上皮への接着とそれに引き続く上皮間葉転換が重要」とされている。今回これらの機序とは異なり、癌細胞集塊が自身の構造とそれが対峙する腹膜上皮の構造を保ったまま周囲に fibrin 網が誘導され、それを足場に血管新生を伴う宿主の間質組織が形成されている像を観察した。

2. 研究の目的

「癌細胞集塊は腹膜中皮に対峙した後、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癌細胞集塊の構造を保ったまま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、卵巣癌細胞株を用いた仮説を支持する分子の発現誘導因子の *in vitro* 解析、およびマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いた仮説の *in vivo* 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的とした。

3. 研究の方法

上記の腹膜播種転移の分子機構を解明して新規の治療戦略を構築する知見を得る、という目的を達成するために、下記に示す仮説 - に基づきその検証を目指した実験を遂行する。

<作業仮説>

中皮細胞に対峙した癌細胞集塊が、腹膜組織に炎症を誘導する。

炎症で fibrinogen が析出されて癌細胞集塊周囲に fibrin 網が形成される。

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する。

形成された間質内に血管が新生され、癌組織内に進展し、直接コンタクトをとる(腫瘍播種の成立)

以上の仮説に基づき、それに対応する以下の実験を病理組織、ヒト卵巣癌細胞株、マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて遂行する。

仮説 中皮細胞に対峙した癌細胞集塊が、腹膜組織に炎症を誘導する

1. 病理組織を用いた実験：卵巣癌腹膜播種病変の病理組織において腹膜に対峙している癌細胞集塊で、炎症誘導因子である IL-6, IL-8 や COX2 などの発現を免疫組織学的に検討する。一方で腹膜播種癌患者の腹水に含まれる炎症誘起物質のスクリーニングを行う。

2. ヒト卵巣癌細胞株を用いた実験：婦人科手術において採取された腹膜組織の一部をコラゲナーゼ存在下に振盪培養し、腹膜を裏打ちしている間質細胞群を分離する。一方でヒト卵巣癌細胞株を振盪培養して癌細胞集塊を形成し、これを腹膜由来間質細胞の単層培養系とさらに緩徐な条件下で振盪共培養してそれぞれに発現誘導される炎症誘導分子について ELISA 法、免疫細胞染色法、RT-PCR 法などを用いて解析する。

3. マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いた実験：

本申請者はヒト卵巣癌の high-grade の漿液性腺癌に類似した遺伝子変異(p53^{-/-}, Brca1^{-/-}, myc, 及び Akt)を導入し、ルシフェラーゼ活性と HA tag を組み込んだ BR5-Luc マウス卵巣癌細胞株(米国 Orsulic S.博士から供与)を用いて、既に同系マウスに対する腹膜播種モデル(写真右)を確立している。これは免疫機能が正常なマウスモデルであるため、癌細胞周囲の免疫細胞等微小環境の観察が可能である。このモデルマウスにおいて腹腔内に投与した癌細胞株および腹膜組織に惹起される炎症誘導性の遺伝子発現変化を Microarray でスクリーニングし、RT-PCR および免疫組織染色法で確認する。

仮説 炎症で fibrinogen が析出されて癌細胞集塊周囲に fibrin 網が形成される

1. 病理組織を用いた実験：腹膜播種病変の病理組織で、癌細胞集塊周囲における fibrin 形成誘導に関連する蛋白 Tissue factor や fibrinogen などの発現を免疫組織学的に検討する。一方で腹膜播種をきたした卵巣癌患者の腹水に含まれる凝固関連因子のスクリーニングを行う。

2. ヒト卵巣癌細胞株を用いた実験：仮説 -2 での共培養系もしくは腹膜由来間質細胞の単層培養系に癌細胞集塊を接着させた条件下に fibrin 形成誘導因子の発現変化を検討する。

3. マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いた実験：仮説 -3 で用いた Microarray データから発現変化する凝固関連性の遺伝子をピックアップし、RT-PCR および免疫組織染色法で確認する。また腹腔内に生体用 fibrin を混合投与(もしくは塗布)することで播種形成の変化を観察する。

仮説 癌細胞集塊が間質細胞の遊走を誘導して周囲に間質組織を形成する

1. 病理組織を用いた実験：腹膜播種部の癌細胞集塊を囲む間質組織での Cancer associated fibroblast (CAF) や免疫細胞、SDF-1/CXCL12 など間質細胞遊走因子の発現を検討する。

2. ヒト卵巣癌細胞株を用いた実験：卵巣癌細胞集塊存在下における腹膜由来間質細胞の間質細胞遊走因子の発現変化を RT-PCR で、また遊走能の変化を migration assay など解析する。

3. マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いた実験：リコンビナント SDF-1/CXCL12 を腹腔内投与し腹膜播種形成における影響を検討する。

仮説 形成された間質内の新生血管が癌組織内に進展する（腫瘍播種の成立）

1. 病理組織を用いた実験：腹膜播種病変の病理組織において、癌細胞集塊内側への血管網の形成や血管新生誘導因子の産生を CD34、VEGF-A や D2-40 の発現などで評価する。

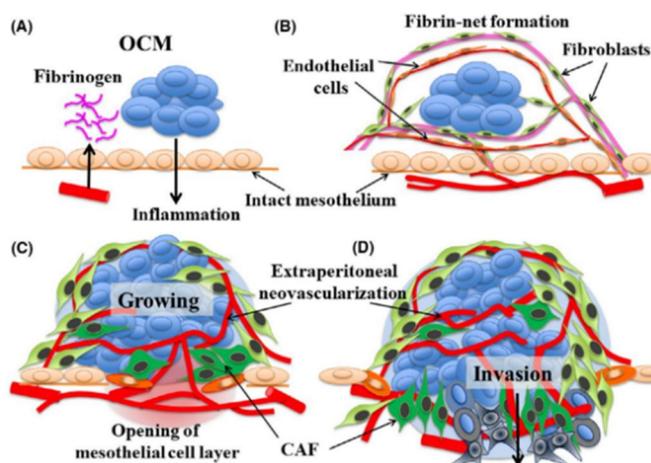
2. ヒト卵巣癌細胞株を用いた実験：卵巣癌細胞株集塊存在下、非存在下に腹膜由来間質細胞や癌細胞における血管・リンパ管誘導因子発現の変化を RT-PCR で確認する。また臍帯から臍帯血管内皮細胞を分離・培養し、同じく癌細胞集塊と腹膜由来間質細胞の共培養条件下で遊走能の変化を検討する。

3. マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いた実験：教室の鏡らが改良した臓器透明化による立体観察法 (Kagami et al. Sci Rep, 2017)を用いて、卵巣癌腹膜播種モデルの腹膜転移病巣において、血管内皮細胞を CD34 またはリンパ管内皮細胞を D2-40 で染色することで、脈管新生の過程を立体可視化する。

以上の実験の結果に基づき、上記の仮説の検証を評価し、必要であれば修正して腹膜播種転移の分子機構に基づいた新規の治療戦略の提案を検討する。

4. 研究成果

1) 卵巣癌細胞集塊は腹膜中皮を保持したままフィブリン網に捕捉され、新生血管を誘導する卵巣癌臨床検体の詳細な観察により、微細な腹膜播種は腹膜中皮層を保ったまま、接着することなく、網状構造に捕捉されている像が観察された。網状構造は免疫組織染色の結果、フィブリン網であることが観察され、フィブリン網を足場に血管内皮細胞が遊走することが観察された。がん細胞集塊および血管内皮細胞は血管新生因子(VEGF-A)を発現しており、これらが加速度的に血管を誘導することにより、癌細胞集塊の補給を行っていると考えられた。



2) フィブリン網の形成には癌制水中の組織因子 (Tissue Factor:TF) が関与する卵巣癌患者の腹水中には組織因子(TF)が高発現していることが示された。発育した卵巣癌腹膜播種を形成する癌関連線維芽細胞に TF の高発現が観察され、卵巣癌腹膜播種成立への関与が示された。

3) 正常免疫マウスにおける卵巣癌腹膜播種モデルの評価

腹膜播種機構の生体内での再現と解析を目的として作成されたマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて検討した。ヒト卵巣癌の高異形度漿液性癌を模倣する遺伝子変異を導入し、ルシフェラーゼと HA-Tag を組み込んだ BR5-Luc マウス由来のモデル細胞株を同系マウスの腹膜に移植した。2週間後にサンプリングを行い、顕微鏡下に観察したところ、臨床検体での観察同様、フィブリン網に捕捉された癌細胞集塊が観察された。腹膜播種の状態を生存マウスで観察可能であり、正常免疫を有するマウスモデルであるため、腹膜播種成立におけるフィブリン網 形成、TF の関与における免疫細胞や関連する微小環境の解析に有用である。

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 0件）

1. 著者名 Matsuoka Ayumi, Mizumoto Yasunari, Ono Masanori, Kagami Kyosuke, Obata Takeshi, Terakawa Junpei, Maida Yoshiko, Nakamura Mitsuhiro, Daikoku Takiko, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 110(8)
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 凝固系カスケードを利用した卵巣癌細胞集塊の腹膜播種戦略機序の解明
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	藤原 浩 (Fjiwara Hiroshi) (30252456)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	大黒 多希子 (Daikoku Takiko) (30767249)	金沢大学・疾患モデル総合研究センター・教授 (13301)	
研究分担者	松岡 歩 (Matsuoka Ayumi) (50579662)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

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