

外因系血液凝固因子 Tissue Factor (TF) のがん浸潤における機構解明と 抗 TF 中和抗体を利用した治療法の開発

がん先端生命科学分野 47-86344 橋本侑季
指導教官 松村保広

【背景・目的】

1800年代に、仏の外科医 Trousseau は、臨床的に進行したがん患者の四肢に血栓症が起きやすいことを認識していた。最近の臨床研究においても、がん患者で血栓症が多発するという報告がなされている。そして、中でも膵臓がん、脳腫瘍、胃がんにおいて高頻度に発症することが報告されている。その血栓症を生じる原因の1つとして、がんの進展に伴う血液凝固の亢進が挙げられ、血液凝固因子とがんとの関連性が示唆されている。

私達の研究室では内因系血液凝固因子の開始因子 Factor XII が、腫瘍組織中における血管透過性の亢進に関与しているキニンを産生する開始因子であることを示し、内因系血液凝固因子が、がん組織の微小環境へ関与していることを明らかにした。

一方、外因系血液凝固因子の開始因子 Tissue Factor (TF) は、膵臓がん組織に TF が強く発現することや、TF 発現の強いがん患者の予後が悪いことが報告されている。また TF は膵臓がんの前がん病変と考えられている Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) 病変や、悪性化し膵臓がんへ進行することもある Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) にも発現を認めるという報告もある。しかしながら、がんの進行に関与する正確なメカニズムについてはまだ明らかとなっていない。

膵臓がんは5年生存率が非常に低く、予後の最も悪いがん種である。その原因の1つとして、膵臓がんは局所での浸潤能が高く、かつ遠隔転移を高率にきたすことが挙げられる。このような背景のもと、膵臓がんにおいて TF を介する浸潤・転移のメカニズムの存在を見出し、かつ TF 機能を抑制する方法を作製することは膵臓がんの治療につながる可能性がある。

本研究の目的は、第1に膵臓がんを発現している TF とそれを介するがん浸潤との関係性の有無を探り、そのメカニズムを明らかにすること、第2に TF の機能を抑制する中和抗体を作製し、TF をターゲットとする抗体治療への応用の可能性について検討することである。

【方法】

TF 発現量の高いヒト膵臓がん細胞株 BxPC3 に、TF に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現する Lentivirus と、non-target shRNA を発現する Lentivirus をそれぞれ感染させ、TF 発現量を抑制した BxPC3 TFshRNA と control 株としての BxPC3 mock を樹立した。また TF 機能を抑制する抗 TF 中和抗体を作製した。この TF 発現量の異なる2種類の細胞株と、作製した抗 TF 中和抗体を用いて *in vitro* において膵臓がん細胞の浸潤能を解析し、さらに浸潤における主要因子である MMP の発現量や酵素活性の解析を行った。

【結果】

In vitro において、matrigel invasion assay により浸潤能の評価を行い、TF とがん細胞の浸潤との関連性を調べた。その結果、BxPC3 TFshRNA の浸潤能は BxPC3 mock と比較して有意に抑制された (図 1)。これより、TF はがん細胞の浸潤能を亢進させる作用を持つことが示唆された。さらに、TF から誘導された因子が、浸潤に直接影響を与えている可能性を検討することにした。その際、膵臓がんの浸潤に対する主要因子として知られている MMP-9 に着目することにした。MMP-9 の発現量を BxPC3 TFshRNA と BxPC3 mock で比較して解析したところ、BxPC3 TFshRNA で MMP-9 発現量の有意な抑制が見られた (図 2)。これより、TF は MMP-9 の発現を誘導する働きを持つこと、その誘導された MMP-9 ががん細胞の浸潤に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

これらの知見から、将来の TF 抗体医薬の開発につながる為に、抗ヒト TF モノクローナル抗体 (TFmAb) を作製した。14 種の TFmAb クローンのうち、TF の機能を著明に抑制するクローンを見出した。そして、この TFmAb により TF 機能を抑制すると、浸潤能の抑制が見られ、さらに MMP-9 発現の抑制も観察された。これより、TF は浸潤に関与する主要因子である MMP-9 の発現を誘導することでがん細胞の浸潤を促進させていると考えられた。

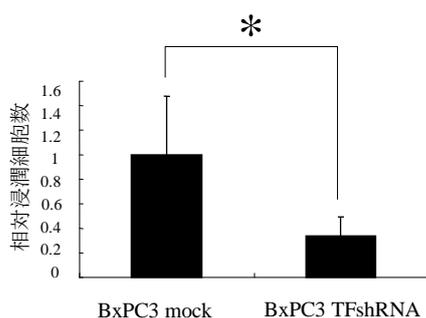


図1. BxPC3 mockとBxPC3 TFshRNAの浸潤能比較

TF発現を抑制したことによる浸潤への影響を matrigel invasion assayにより解析した。BxPC3 mockの浸潤能を基準とし、BxPC3 TFshRNAの浸潤能を比較した。

*; $p < 0.05$ (mean \pm SD; Student's *t*-test)、n=3

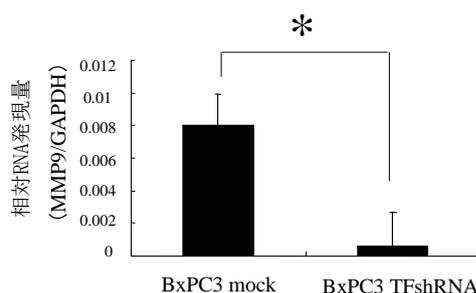


図2. BxPC3mock、BxPC3TFshRNAにおけるMMP-9の発現量比較

real time PCRにより BxPC3 mock、BxPC3 TFshRNA 細胞株でMMP-9の発現量をGAPDH との相対量により比較した。

*; $p < 0.05$ (mean \pm SD; Student's *t*-test)、n=3

【結論】

膵臓がん細胞株において TF は MMP-9 発現に関与することが示され、その MMP-9 が浸潤に関与している可能性が示された。

今後 *in vivo* 実験において、今回見出した TF 中和活性の強い TFmAb が実際のがん細胞の抗浸潤作用を示すかどうかを調べ、新しい抗体医薬としての可能性を検証していく予定である。

Yohei Saito, [Yuki Hashimoto](#), Jun-ichiro Kuroda, Masahiro Yasunaga, Yoshikatsu Koga, and Yasuhiro Matsumura.

Manuscript in preparation