

腫瘍血管透過性亢進における外因系血液凝固開始因子

Tissue Factor の病態生理的な役割

学籍番号 47-106326

2012年3月31日 修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 佐藤隆太

指導教員 松村保広 教授

キーワード TF VEGF DDS 腫瘍血管透過性

【背景・目的】

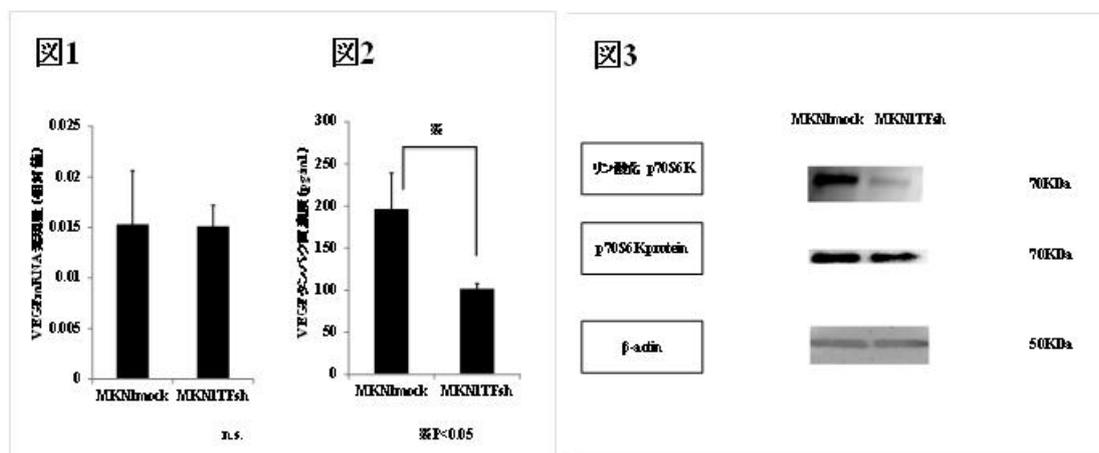
19世紀に、仏の外科医 Trousseau は、臨床的に進行したがん患者の四肢に血栓症が起きやすいことを報告している。現在の臨床研究においても、がん患者と血栓症との関連性を示唆している報告は多い。中でも膵臓がん、脳腫瘍、胃がんの患者において高頻度に発症していることが知られている。こうしたがん患者での血栓症を生じる原因の1つとして、がんの進展に伴う血液凝固の亢進が挙げられ、血液凝固因子とがんとの関連性が示唆されてきた。血液凝固は組織損傷の有無で外因系と内因系の経路に分かれており、我々の研究室では内因系血液凝固因子の開始因子 FactorXII が、腫瘍組織中における血管透過性亢進に関与するブラディキニンを産生することを示し、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、外因系血液凝固開始因子 TF に関しては血管新生、血管透過性に機能する Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)との関連性が広く報告されている。しかしながら、腫瘍血管における VEGF を介する TF の詳細な役割についてはまだ明らかとされていない。特に DDS 製剤の効果の要因である腫瘍血管透過性との関係性については不明な点が多い。そこで、本研究では VEGF を介する TF の腫瘍血管透過性への関与について検討した。

【方法】

TF 発現量の高いヒト胃がん細胞株 MKN1 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 MKN1 TFsh 株とコントロール株としての MKN1mock を樹立した。*In vitro* ではこの TF 発現量の異なる2種類の細胞株を用いて VEGF との関係性を RNA レベル及びタンパク質レベルで解析した。さらに、細胞 Lysate のウェスタンブロッティングによって VEGF 発現に関与する因子の探索を行った。また、TF により誘導された VEGF が血管内皮細胞に影響するかどうかを遊走能で評価した。*In vivo* では、マウス皮下腫瘍モデルにおける血管新生数を CD31 の免疫染色によって評価した。また、腫瘍における薬剤集積量と単位血管あたりの漏出量をアルブミン、DDS 製剤、低分子抗がん剤について評価した。

【結果、考察】

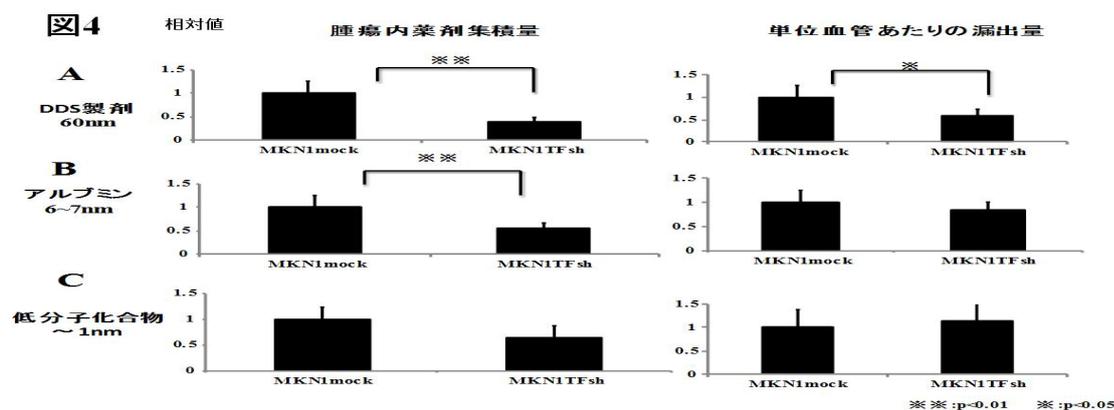
1)TF と VEGF の関係 *In vitro* において TF と腫瘍血管新生、血管透過性因子 VEGF との関連性を調べた。MKN1mock 株、MKN1TFsh 株の VEGF mRNA の発現量に有意な差は見られなかった(図1)。一方、VEGF タンパク質量においては、MKN1TFsh で VEGF タンパク質の発現量に有意な抑制が見られた。(図2) このかい離は TF が VEGF の翻訳の段階に関与していると考え、翻訳促進因子である p70S6K に注目した。p70S6K は VEGF の翻訳促進に働くことが報告されており、MKN1TFsh 株で p70S6K のリン酸化の減少が認められたことから、TF は VEGF タンパク質の翻訳を促進することが示唆された(図3)。



2)血管内皮細胞の遊走への影響 MKN1mock 株の培養上清と MKN1TFsh 株の培養上清は VEGF 産生量に差があったので、血管内皮細胞の遊走に影響するかを検討した。その結果、MKN1TFsh 株の培養上清は MKN1mock 株の培養上清と比較して血管内皮細胞の遊走が抑制された。このことから TF によって誘導された VEGF が血管内皮の遊走を亢進したことを示唆した。

3)血管新生数への影響 MKN1TFsh 株で MKN1mock 株と比較して腫瘍の血管新生数の有意な減少が認められた。このことから TF は血管新生を促進することが示唆された。得られた血管新生数を単位血管あたりの薬剤漏出量を算出するために用いた。

4)DDS 製剤、アルブミン、低分子抗がん剤の腫瘍集積量、単位血管あたりの漏出量 粒子径 60nm の DDS 製剤は MKN1TFsh 株で MKN1mock 株と比較して腫瘍における DDS 製剤の腫瘍集積量の減少が認められた。また、単位血管あたりにおける漏出量も減少が認められた。これより DDS 製剤において、TF の多寡は腫瘍血管の透過性を亢進することが示唆された (図 4-A)。粒子径 6~7nm アルブミンにおいては MKN1TFsh 株皮下腫瘍内での集積量は減少が認められた。しかし、単位血管あたりでの漏出量は TF の多寡で有意な差は認められなかった。アルブミンの集積量の増加は TF を介する血管新生数の増加が主な要因と考えられる。(図 4-B)。一方、粒子径が 1nm 以下の低分子抗がん剤は TF の多寡による腫瘍の薬剤集積量及び、単位血管あたりの漏出量はいずれも有意な差は認められなかった (図 4-C)。



【結論】

TF は p70S6K のリン酸化を介して VEGF タンパク質の翻訳に関与し、TF によって誘導された VEGF は血管新生、腫瘍内高分子集積量増加の一因となることが示唆された。TF の多寡は血中滞留性が高く、EPR 効果の受けやすい粒子径 60nm の DDS 製剤においては腫瘍血管透過性亢進に影響を受けやすいことが示唆された。