

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791031
 研究課題名（和文）凝固活性抑制下における癌転移関連蛋白の解析および転移抑制能の評価
 研究課題名（英文） Analysis of metastatic factors of under coagulation disturbance

研究代表者

浅沼 邦洋 (Kunihiro Asanuma)
 三重大学・医学部附属病院・診療等従事者
 研究者番号：20378285

研究成果の概要（和文）：

B16melanoma 細胞 (Wild) の肺転移は、血液凝固の抑制制度に従い減少した。凝固過抑制マウスでの高肺転移株 (Wa9) と野生型マウスでの高肺転移株 (Co9) の樹立に成功した。DNA array にて Wild、Wa9、Co9 の遺伝子発現の比較、解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Lung metastases was decreased depend on the inhibition of coagulation activity. Highly lung metastatic cell lines Wa9 and Co9 was successfully made using coagulation inhibited mice and wild mice, respectively. Analysis of expressed genes between Wild, Wa9 and Co9 by DNA array is currently in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：癌転移、血液凝固

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：B16 melanoma、肺転移、血液凝固、血液凝固抑制マウス、高肺転移株

1. 研究開始当初の背景

癌の原発巣の処理がほぼ克服されつつある今日、患者の死因において転移が占める割合は非常に高く、癌転移のコントロールが予後を規定するといっても過言ではない。多くの研究者が指摘しているように、癌細胞の転移と血液凝固における関連性は非常

に密接であり、癌細胞の組織因子の発現は、多種の癌細胞の悪性度の指標の一つとして知られてきた (Yamashita et al. J Surg Oncol. 2007, Kaido et al. Hepatogastroenterology. 2005, Nitori et al. Hepatogastroenterology. 2005)。組織因子をはじめとする外因系凝固経路の活性化は、最終的に細胞周囲にトロンビン、フ

ィブリンの産生へとつながる。血液凝固因子の癌転移に対する貢献は、主に血管壁への接着から血管外への脱出までの転移形成早期に集約され、トロンビン作用による癌細胞の接着、運動、浸潤能の亢進 (Nierodzik et al. J Clin Invest 1991, Asanuma K et al. Oncology. 2004, Nguyen et al. Oncogene 2005)、更にはフィブリンによる癌細胞の血管壁への持続的保持といったさまざまな面から支持されている (Palumbo et al. Blood. 2000)。そのため、抗血液凝固剤による凝固活性抑制、すなわちトロンビンおよびフィブリンの産生抑制は、癌細胞の血管外脱出を防ぐことで、癌細胞を血管内に留めることができる。起序は明らかでないが、循環系に入った癌細胞は 24-48 時間で 90%は死滅するといわれている (Glaves et al. Br J Cancer. 1983, Reid et al. Cancer Res. 1979)。そのため、抗凝固剤の癌転移抑制効果は、臓器で捕捉される癌細胞量の減少のみならず、血管内循環癌細胞量の減少につながると考えられ、in vivo による良好な結果が多数報告されている (Rossi et al. Journal of Thromb and Haemost, Mousa et al. Thromb Haemost 2006)。多くの抗凝固剤がすでに臨床上で使用されていることから、抗凝固剤による癌の転移抑制に対する応用は、非常に近い位置にいる。にもかかわらず、現在臨床応用されていないのは、癌研究の中での血液凝固の分野はマイナーであること、また抗凝固剤の直接的な殺癌細胞性がないこと、抗凝固剤使用による転移好発臓器通過後の癌細胞の全身への散布の可能性があることなどが根底にあるためだと思われる。現在、癌の転移抑制をターゲットにした抗凝固剤の臨床応用を目指した検討はいまだなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1. 抗凝固剤 (ワーファリン) を用いた凝固活性の抑制の評価を APTT (Activated Partial Thromboplastin Time), PT (Prothrombin Time) および INR (International Normalized Ratio) で行い、この凝固活性評価値と癌細胞の肺転移との相関を検討し、抗転移効果を目的とした抗凝固剤の臨床応用へ向けての凝固活性の参考値を決定する。凝固抑制マウスで肺転移をきたす高肺転移株 (Wa) を樹立し、コントロールマウスでの高肺転移株 (Co) および wild 株との発現

遺伝子の比較、検討をする。肺転移時に血液凝固にマスクされている遺伝子の発現を増強させ、スクリーニングし、肺転移に関連する新たな遺伝子の機能を検証、解明することにある。

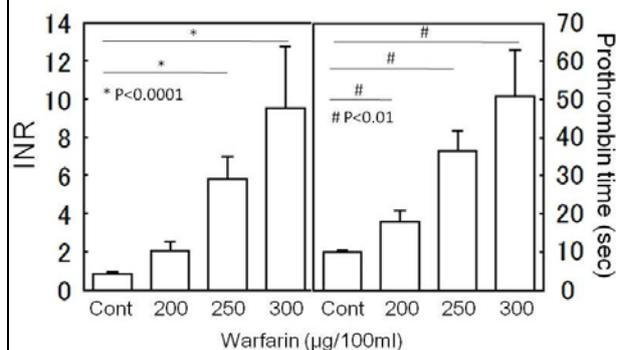
3. 研究の方法

①ワーファリンを水に溶解し、飲水ボトルにて 200 μ g/100 ml、250 μ g/100 ml、300 μ g/100 ml にて経口投与した。4 日後、マウス (C57BL6) から採取した血液の凝固活性 PT (Prothrombin Time) および INR (International Normalized Ratio) を測定した。次に、ワーファリンを上記のように 4 日間投与し、B16melanoma 細胞 (wild) を尾静脈投与した。2 週後、マウスより肺を摘出し、転移巣の数を評価した。

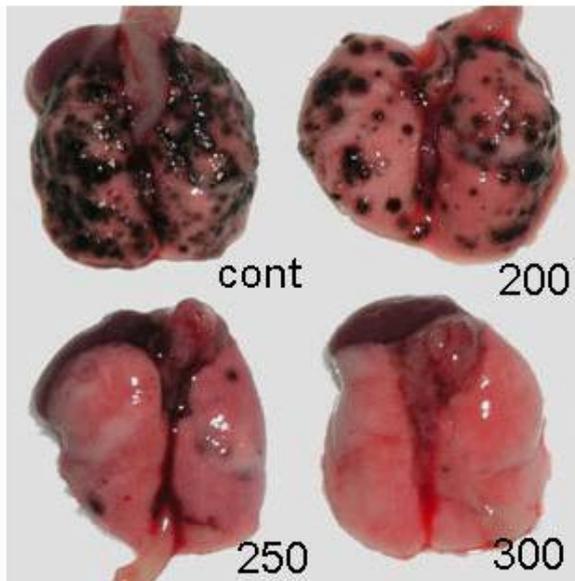
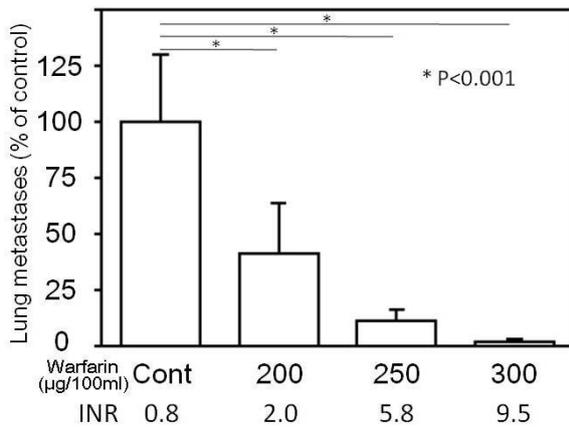
②同様に、高濃度ワーファリンを水に溶解し、飲水ボトルにて投与した。4 日後、マウス (C57BL6) から採取した血液の凝固活性を測定し、PT (Prothrombin Time) 活性が 1%以下 (INR は測定範囲外)であることを確認後、B16melanoma 細胞 (wild) を尾静脈投与した。3 週後マウスより転移形成のある肺を摘出し、肺転移巣より melanoma 細胞を分離、培養し、同作業を 9 回繰り返した。また、野生型マウスに wild を尾静脈投与し、3 週後肺転移巣を採取し、同様の作業を 9 回行った。

4. 研究成果

ワーファリン投与後 4 日目のマウスの血液凝固能は、PT (Prothrombin Time) および INR (International Normalized Ratio) で濃度依存性に延長した (INR: 0.85 at control, 2.04 at 200 μ g/100 ml, 5.81 at 250 μ g/100 ml and 9.52 at 300 μ g/100 ml)、(PT: 9.4 at control, 17.5 at 200 μ g/100 ml, 48 at 250 μ g/100 ml and 62.2 at 300 μ g/100 ml)。

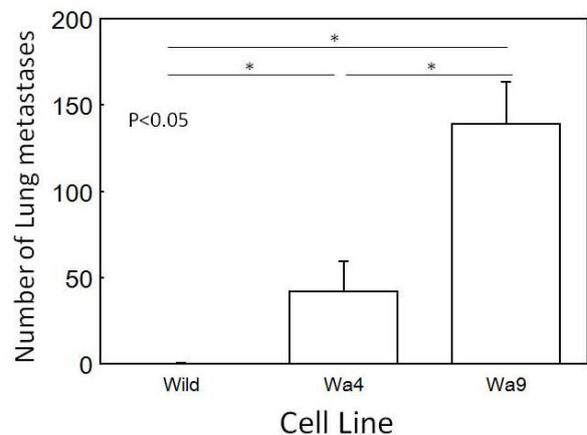


ワーファリンにより作成した凝固抑制マウスに対し、B16 melanoma 細胞を尾静脈注射したところ、血液凝固抑制制度依存的に肺転移が抑制された (-58.8% at 200 μ g/100ml, -89.3% at 250 μ g/100ml, -98.6% at 300 μ g/100ml vs. control)。以上の2つの結果から、INR 値の増大にしたがって肺転移が抑制されたと考えられた (-58.8% at INR 2, -89.3% at INR 6, -98.6% at INR 10 vs. control)。臨床での凝固抑制のコントロール値は INR2-3 台であり、INR2 以上にコントロールすることで、少なくとも 58.8%の肺転移を抑制することが期待できるという結果となった。



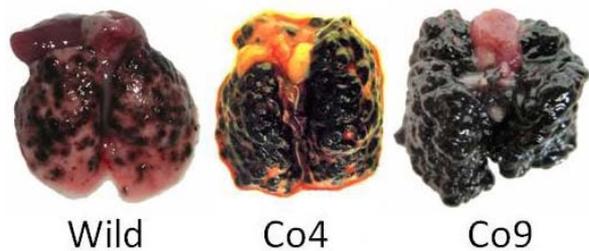
INR10 以上の血液凝固抑制下では、98%以上の肺転移を抑制されるという結果は、本実験系の肺転移には血液凝固因子がほぼ必須であると考えられる。確かに血管内癌細胞の肺血管の転移機構の解析には有用なモデルであるが、血液凝固反応の関与が大きすぎる可能性があり、血液凝固にマスク

されている肺転移に関連した因子の発現はマスクされている可能性がある。そこで、血液凝固のマスクされた因子の増幅を目的として、ワーファリンで血液凝固能を過度に抑制したマウスでの高肺転移株 (Wa9) を樹立した。まず、血液凝固抑制マウスに B16 を尾静脈注射し、3 週後に肺転移巣を採取、



腫瘍細胞を分離培養した。同作業を 9 回繰り返して、凝固過抑制マウスにおける高肺転移株 Wa9 を樹立した。また、wild マウスに対しても同作業を 9 回繰り返して、wild マウスに対する高肺転移株 (Co9) を作成した。

血液凝固にマスクされていると考えられる、肺血管に着床するための癌細胞固有の因子の発現は、Wa9 で高く、Co9 では低いことが予想される。その因子をスクリーニングするため、現在 Wa9、Co9、wild B16 cell の発現遺伝子を DNA array にて解析中である。



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)

[雑誌論文] (計3件)

① Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle puncture model. Seki S, Asanuma-Abe Y, Masuda K, Kawaguchi Y, Asanuma K, Muehleman C, Iwai A, Kimura T. *Arthritis Res Ther.* 11(6):R166, 2009. 査読有

② Spinal neurocutaneous melanosis without cutaneous nevi. Asanuma K, Kasai Y, Takegami K, Ito H, Yoshikawa T, Uchida A. *Spine* 1;33(2):E62-5, 2008. 査読有

③ Effect of osteogenic prote in-1 on the matrix metaboplism of bovine tendon cells. Yamada M, Akeda K, Asanuma K, Thonar EJ, An HS, Uchida A, Masuda K. *J Orthop Res.* 26(1):42-8, 2008. 査読有

[学会発表] (計3件)

① Thrombin 阻害薬 'argatroban' による関節炎の抑制効果の解析 浅沼邦洋、吉田格之進、吉川智朗、林辰弥、秋田展幸、岡本貴行、長谷川正裕、須藤啓広、鈴木宏治、内田淳正 第24回 日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月5-6日 横浜市

② The inhibition of coagulation activity by warfarin down-regulates lung metastasis. 55th Orthopedic Research society Kunihiro Asanuma, Nobuyuki Akita, Tatsuya Hayashi, Kakunoshin Yoshida, Takayuki Okamoto, Akihiko Matsumine, Koji Suzuki, Atsumasa Uchida February 22-25 2009 Las Vegas Las Vegas, Nevada USA

③ トロンビンの椎間板注入による椎間板変性モデル 浅沼邦洋、阿部由美子、Rajeawari Pichika, Carol Muehleman、角谷賢一朗、Haward An、内田淳正、舛田浩一 第23回 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅沼 邦洋 (Kunihiro Asanuma)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20378285

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：