

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591587

研究課題名（和文） 新規血管新生因子の大腸癌浸潤・転移への関与解明

研究課題名（英文） Function of New vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in colon cancer.

研究代表者

山口 明夫 (Yamaguchi Akio)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10174608

研究成果の概要(和文):大腸癌において血行性転移の対策が予後延長への鍵と考えられている。今回新規の血管内皮増殖因子としてクローニングされた EG-VEGF (Endocrine Glands-Derived-Vascular Endothelial Growth Factor) が血管新生ならびに大腸癌の浸潤能を亢進させること、また当科独自に作製した抗 EG-VEGF 抗体が血管新生ならびに浸潤能を抑制することを確認したことから、新規の大腸癌治療への可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文): To improve the prognosis of cancer patients, it is essential to inhibit the capacity of cancer cells for hematogenous metastasis as well as their proliferative capacity. EG-VEGF factor enhances the angiogenesis and cell invasion in colon cancer. EG-VEGF antibody that we established, inhibites the angiogenesis and cell invasion in colon cancer. EG-VEGF molecule-targeted therapy has the potential for improving survival rates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌, 血管新生因子, 浸潤, 転移

1. 研究開始当初の背景

現在も消化器癌の治療において予後を左右する最大の課題は、転移への対策であるといっても過言ではない。そのなかで特に大腸癌は血行性転移特に肝転移をきたし易いという特性を有し、この転移系の克服が生存率向上の鍵と考えられている。転移性大腸癌に対して腫瘍細胞の休眠状態 (tumor dormancy therapy) の戦略が期待され、その標的分子の一つとして血管新

生因子に期待が集まっている。特に VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) に対する抗体 Bevacizumab が化学療法との併用によって、進行、再発大腸癌の治療に有用であることが報告され、日本大腸癌治療ガイドラインの第一次治療として記載されている。

近年 Ferrara により正常の副腎、卵巣、精巣など内分泌系組織から新規の血管内皮増殖因子：EG-VEGF (Endocrine

Glands-Derived-Vascular Endothelial Growth Factor)がクローニングされた。この因子の構造的にはヘビ毒中の蛋白 VPRA と相同性を示し、低酸素状態でその発現が増強され、血管内皮細胞の増殖を促すが、VEGF との相同性はなく、システインの配列から既存の VEGF ファミリーとはまったく異なるものとされている。

2. 研究の目的

EG-VEGF 遺伝子に関する国内外の報告としては内分泌系の正常細胞に発現されていること以外、詳細な機能の報告はされていなかった。悪性腫瘍での発現を検討した報告もなかったが、私どもは世界に先駆けて、EG-VEGF mRNA の発現は大腸正常組織では認めないが、大腸癌原発巣では発現が認められ、また大腸癌の血行性転移に関与することを報告した。

以上から新規の血管内皮増殖因子 EG-VEGF の詳細な検討は、ヒト大腸癌症例を中心とした一般消化器癌における血管新生、細胞増殖、転移の機序を解明する上で意義は極めて大きいと考えられ、検討を行なうこととなった。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の培養

大腸癌細胞株：LoVo, SW620, HT29 を RPMI1640(10% heat-inactivated fetal calf serum に 0.1mM nonessential amino acids, 2mM glutamine, 1mM sodium pyruvate, 64mg/L penicillin と 100mg/L streptomycin が含まれる)を培養液として 37°C、5%CO₂ 下で培養を行った。

(2) 抗 EG-VEGF 抗体の作製

1. EG-VEGF 蛋白質発現ベクターの

作製・蛋白精製

EG-VEGF mRNA 発現大腸癌細胞株から Total RNA を抽出後、RT-PCR にて cDNA をクローニングし、得られた PCR 産物を蛋白発現ベクター pGEX2T(GE Health Care, USA) に挿入した。大腸菌にトランスフォーム後、1000ml の LB 溶液にて培養、蛋白を作製した。次いで Sonication 後に GST fusion 蛋白を抽出し、Thrombin 処理にて

EG-VEGF 蛋白のみ精製した。

2. RT-PCR analysis

Total RNA から Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase を用いて single strand cDNA を作製した。EG-VEGF 遺伝子のプライマーは次のように設定した。

EG-VEGF-AX:

ATGAGAGGTGCCACGCGAGTCTCAA.

EG-VEGF-BX:

CTAAAAATTGATGTTCTTCAAG.

PCR の設定は denaturation (94°C, 1 min), annealing (50°C, 1.5 min), extension (72°C, 2 min) として 30 サイクル施行した。

PCR 産物は 1.2% アガロースゲルに泳動して、PCR 産物は Gel extraction kit(QIAGEN, USA)にて抽出した。シーケンスをおこなって EG-VEGF 遺伝子であることを確認した。

3. マウスの免疫・脾細胞融合

マウス(Balb/C マウス)に対して精製した EG-VEGF 蛋白を 4 回免疫後、脾臓を摘出し、脾臓細胞と NS-1 細胞を融合した。HAT/HT 培地にてサブクローニングして当科独自の抗体の作製した。

(3) 抗 EG-VEGF 抗体による Tube formation の形成抑制について(In vitro)

EG-VEGF 遺伝子高発現型の大腸癌細胞株をシャーレ内で 2 日間培養後、培養液を Tubular Formation System(KURABO, Japan) のウエルに注入して、Tube formation 形成を検討した。また培養液と抗 EG-VEGF 抗体を 2 時間反応させて、前記と同様にウエルに注入して、Tube formation 形成についても検討した。

(4) 抗 EG-VEGF 抗体による細胞浸潤能の変化について(In vitro)

大腸癌細胞株を 70% confluent 状態にて(抗 EG-VEGF 抗体またはコントロール抗体、含状態)24 時間培養後、Matrigel invasion chamber (BD Biocoat)の上部ウエルに 5x10⁴ 個の各細胞を加え、下部ウエルには complete medium を入れた。12 時間 37°C、5%CO₂ 下で培養後、綿棒にて Matrigel 上面の細胞を除去した。次いでマトリゲル下部まで浸潤した細胞を methanol で固定し、Diff-Quick solution(Sysmex, Japan)にて染色した。光学顕微鏡下に浸潤細胞数をカウントした。

(5) Real-time PCR アレーによる遺伝子発現の検討

Total RNA を用いて、RT² Profiler PCR array system (Human Cancer Pathway Finder PCR array: Catalog No.PAHS-033A)(SA Bioscience, USA)にて遺伝子検索を行なった。

(6) 消化管(正常・癌)組織染色の検討

当科で大腸癌、胃癌、食道癌に対して切除術を施行した症例に対してホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製した。次いで原発巣ならびに隣接正常粘膜を含んだ組織を薄切後、作製した抗体を一次抗体として、ENVISION/HRP 法(DACO, Japan)にて発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 蛋白発現型ベクターへ EG-VEGF 遺伝子の挿入

Fig1 に大腸癌細胞株における EG-VEGFmRNA の発現結果を示した。大腸癌細胞株 3 種類に対して検討したところ、発現の強度に相違が認められるが、SW620,SW480 の細胞株において EG-VEGFmRNA の発現が認められた。そこで PCR 産物を蛋白発現ベクター pGEX2T(GE Health Care, USA) に挿入した。なおシーケンス結果から EG-VEGF 遺伝子であることを確認した。

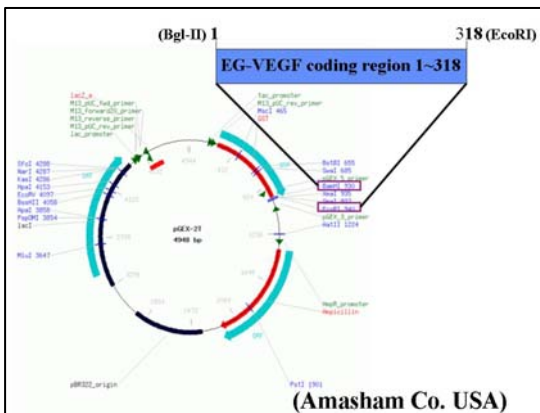


Fig1a

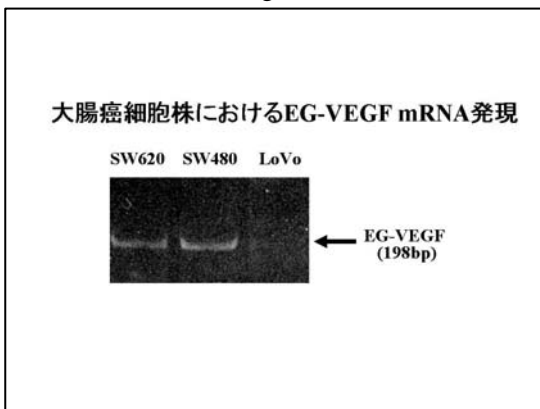


Fig1b

(2) ヒト抗 EG-VEGF 抗体の作製

ヒト EG-VEGF 蛋白を免疫したマウスより脾細胞を摘出後、骨髄腫細胞 NS-1 細胞と融合させてヒト抗 EG-VEGF 抗体を作製した。抗体は GST 蛋白を泳動したレーンではバンドは認められなかったが、EG-VEGF 蛋白質を泳動したレーンでは発現が認められた(Fig2)。

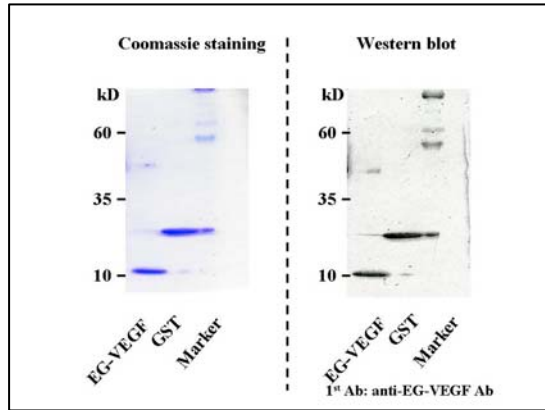


Fig2

(3) ヒト消化器正常組織における EG-VEGF 蛋白発現の検討

ヒト消化器正常組織に対して作製した抗 EG-VEGF モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法にて発現の検討を行なったところ、下部食道粘膜、胃粘膜、大腸粘膜において発現は認められなかった(Fig3)。

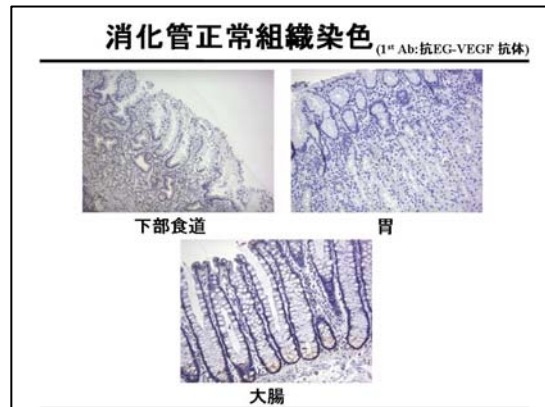


Fig3

(4) ヒト消化器癌組織(原発巣)における EG-VEGF 蛋白発現の検討

ヒト消化器癌組織に対して抗 EG-VEGF モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法にて発現の検討を行なったところ、下部食道癌、胃癌、大腸癌において発現が認められた(Fig4)。

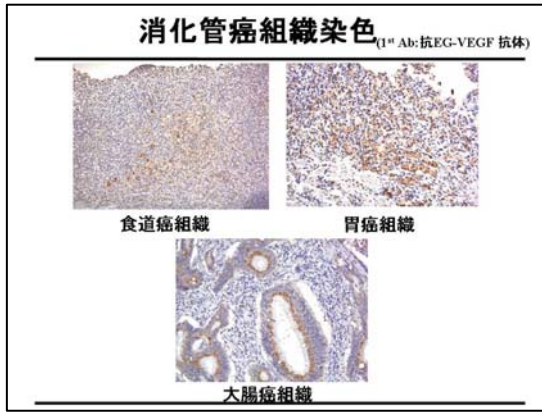


Fig4

(5)大腸癌の細胞株における抗 EG-VEGF 抗体による tube formation 抑制の検討

高 EG-VEGF mRNA 発現大腸癌細胞株:SW620 の培養液を tube formation system に用いて検討したところ、大腸癌細胞株の培養液の場合は tube formation の長さは $610 \mu\text{m}$ であったのに対して抗 EG-VEGF モノクローナル抗体を含んだ場合は $425 \mu\text{m}$ と有意に抑制された(Fig5)。

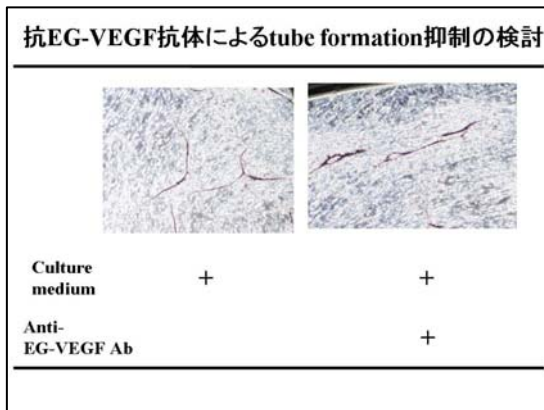


Fig5a

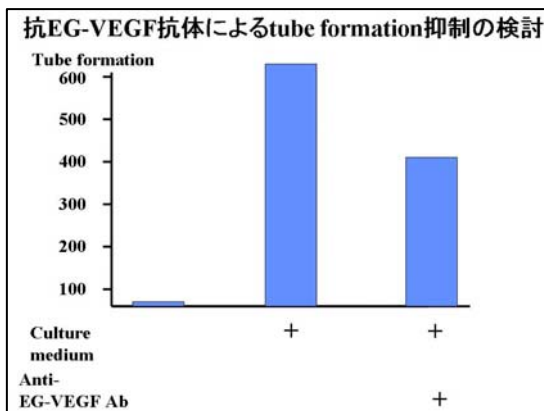


Fig5b

(6)大腸癌の細胞株における細胞浸潤能の検討

大腸癌の細胞株:HCT116 に EG-VEGF 蛋白にて刺激した場合の細胞浸潤能について検討したところ、浸潤細胞数は 53 個/視野であったのに対して、抗 EG-VEGF 抗体を含んだ場合は 16 個/視野と有意に抑制された(Fig6)。

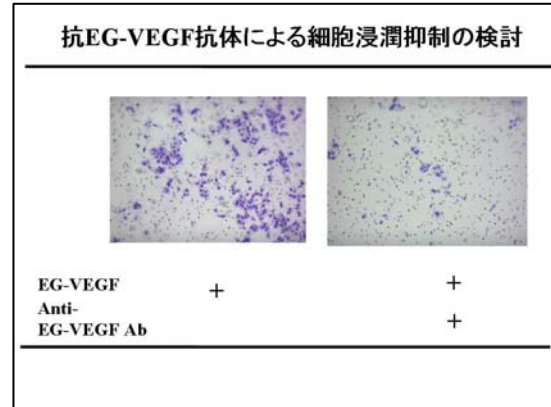


Fig6a

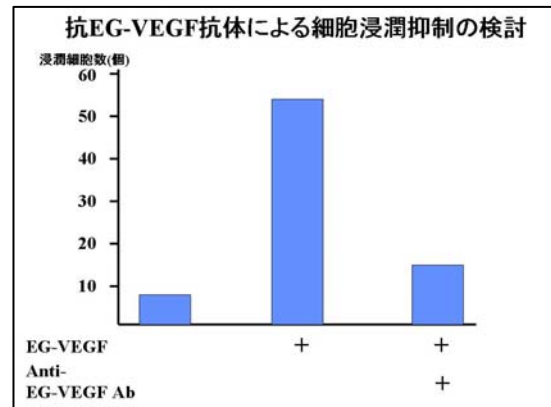


Fig6b

(7) Real-time PCR アレーによる遺伝子発現の検討(浸潤について)

大腸癌の細胞株:HCT116 に EG-VEGF 蛋白にて刺激した場合に浸潤能に関与する遺伝子変化(有意な増加または低下)としては MMP2、TIMP3 が考えられた。

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 4 件)

- ① Goi T, Honda K, Katayama K, Yamaguchi A.
The effectiveness of transverse coloplasty in

patients with ultra-lower rectal cancer. Int Surg. 95, 2010: 210-214. 査読有

- ② Sawai K, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Survivin-3B gene decreases the invasion-inhibitory effect of colon cancer cells with 5-fluorouracil. Oncol Res.18, 2010: 541-547. 査読有
- ③ Goi T, Kawasaki M, Inoue T, Fujioka M, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A Clinicopathological analysis of colorectal cancers in the elderly. Int Surg. 94, 2009: 189-195. 査読有
- ④ Goi T, Kawasaki M, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Clinicopathological analysis of invading muscularis propria (T2) cancers < or =20 mm in diameter. Int Surg. 93, 2008: 1-5. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 五井孝憲, 山口明夫他：大腸癌肝転移と血管新生増殖因子:EG-VEGF との関連性について. 第 65 回日本消化器外科学会総会：シンポジウム 2010 年 7 月 15 日 下関
- ② 五井孝憲, 山口明夫他：大腸癌において EG-VEGF(endocrine glands-derived-venous endothelial growth factor) 遺伝子は細胞増殖に関与する. 第 109 回日本外科学会定期学術集会：サージカルフォーラム 2009 年 4 月 2 日 福岡

[図書] (計 2 件)

- ① 五井孝憲, 山口明夫, 日本臨床、大腸癌(大腸癌の治療戦略：高齢者の StageI-III 大腸癌の治療)、2010、550-553.
- ② 五井孝憲, 山口明夫, 南江堂、消化器疾患最新治療 2009-2010(大腸ポリープ・ポリポーシス)、2009、226-229.

[産業財産権]

○出願/取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/GEKA1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 明夫 (Yamaguchi Akio)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10174608

(2)研究分担者

五井 孝憲 (Goi Takanori)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60225638

