

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K17608  
研究課題名(和文)大腸癌におけるPROK2の新規治療標的因子やバイオマーカーとしての臨床応用の検討

研究課題名(英文)Examination of PROK2 as a new therapeutic target factor and biomarker for colorectal cancer

研究代表者  
呉林 秀崇(Kurebayashi, Hidetaka)  
福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：10794589  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでにPROK2が大腸癌の血行性転移に強く関わる因子であることを報告してきている。今回、PROK2の受容体であるPK-R2に対する抗体(抗PK-R2抗体)のマウスにおける検討では、腫瘍増生抑制効果があり、さらに肝転移抑制効果も認められた。さらに、リキッドバイオプシーを用いた血中PROK2発現の検討では、14.5%の陽性率であり、血中PROK2陽性例では有意に無再発生存率が不良であり、多変量解析でも血中PROK2陽性は独立再発予測因子であった。これらの検討より、大腸癌においてPROK2は新規治療標的因子および新規再発予測バイオマーカーとなりえる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、大腸癌におけるPROK2をターゲットした抗PK-R2抗体療法の腫瘍増生抑制効果を示すことができ、新規分子標的治療薬としての可能性を示すことができた。更に肝転移抑制効果の結果から、この抗PK-R2抗体療法が肝転移抑制に有用な可能性が示唆され、現在術後補助化学療法での有効な分子標的薬は無いため、新規治療法の確立に寄与しうると考える。また大腸癌の再発予測因子があきらかになることは治療戦略の上で、非常に重要であり、今回の成果よりPROK2は治療薬と連動した有効なバイオマーカーに発展しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that PROK2 is a factor strongly involved in hematogenous metastasis of colorectal cancer. In the examination of an antibody against PK-R2, which is a receptor for PROK2 (anti-PK-R2 antibody), it was found to have an effect of suppressing tumor growth and also an effect of suppressing liver metastasis. Furthermore, in the examination of blood PROK2 expression using liquid biopsy, 14.5% were positive. The recurrence-free survival rate was significantly poor in blood PROK2-positive cases, and blood PROK2-positive was an independent recurrence predictor in multivariate analysis. Based on these studies, PROK2 can be a novel therapeutic target factor and a novel recurrence prediction biomarker in colorectal cancer.

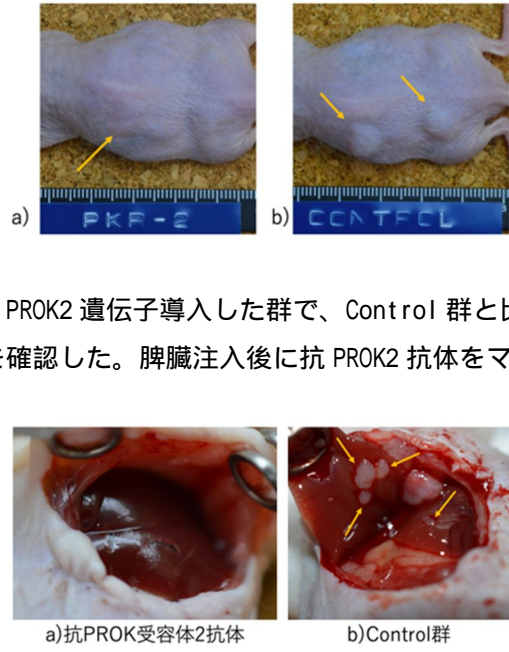
研究分野：大腸癌、消化器外科

キーワード：prokineticin 大腸癌 血管新生因子 分子標的薬

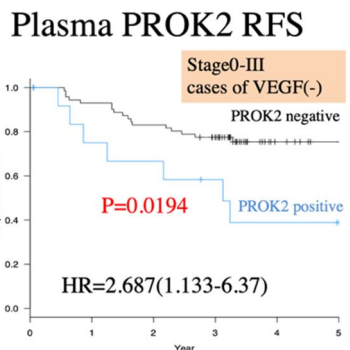
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：大腸癌患者は罹患率ならびに死亡者数ともにいまだに増加傾向であり、その対策が必要である。大腸癌治療で予後に関与する最大の課題は「転移」であり、特に肝転移(血行性転移)の克服が生存率向上につながる。肝転移を含んだ血行性転移については、血管新生因子が関与するとされ、これまでに種々の血管新生因子に対する分子標的薬が開発されており、一定の治療効果をあげている。しかし、いまだに効果は十分とは言えず、新規治療法の開発が必要である。また現時点で再発予測としての明確なバイオマーカーは存在しておらず、進行度に応じて一律に化学療法が行われている現状がある。予後予測および転移、再発予測因子としての新規バイオマーカーを解明することで、予後の改善や症例に応じた個別化治療(不要な化学療法の導入回避や、再発高リスク群や予後不良群の pick up)が望まれている。
2. 研究の目的：Prokineticin2(PROK2)は別名 Bv8(Bombina variegata molecularmass-8kD)とも呼ばれ、キバラスズガエル(Bombina variegata)の皮膚分泌物から単離された小タンパク質である。PROK2 は脈管内皮増殖因子として、腫瘍の成長および生存に重要な役割を有すると考えられている。私たちはこの PROK2 に着目し、大腸癌細胞株において PROK2 mRNA が発現していることを発見した。また、PROK2 因子が大腸癌細胞株において血管新生因子として関わり、腫瘍形成に関与する事を、世界に先駆けて報告している(引用文献)。加えて siRNA を用いた実験では、PROK2 mRNA 発現抑制により、脈管新生および腫瘍形成が抑制することも明らかにした。また私たちは、PROK2 の受容体の1つである PROK-Receptor2(PK-R2)が、ヒト大腸癌症例にて発現していることを確認している。大腸癌原発巣での PK-R2 蛋白の発現が、大腸癌の予後因子であることを報告している(引用文献)。これらのことより、PROK2 は大腸癌において重要な血管新生因子であると考えられ、予後予測因子や、新規治療ターゲットになる可能性がある。大腸癌における PROK2 因子を検討した報告は他に無く、今回の実験により、ヒト大腸癌(症例)に対して、基礎的な研究を行うことで、バイオマーカーとしての役割や新規治療法につなげていくことが研究の目的である。
3. 研究の方法
  - 抗 PROK2 抗体の腫瘍抑制効果および肝転移抑制効果の検討 高 PROK2 遺伝子発現型大腸癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍を生着させる。抗 PROK2 抗体を腹腔内投与し、腫瘍増殖について検討する。PROK2 遺伝子を導入した大腸癌細胞株を用いて脾臓注入し、抗 PROK2 抗体を腹腔内投与し、肝転移の出現の有無を検討する。
  - リキッドバイオプシーとしての PROK2 の可能性 ヒト大腸癌患者 300 例より得られた血清を用いて、血中 PROK2 濃度を測定し、臨床組織学的因子との関連について検討を行う。また同時に VEGF 濃度を測定し、PROK2 との関係性についても検討を行う。
  - PROK2 の作用機序の解明 細胞増殖、tubular formation assay を行い、PROK2 の新規の役割についての検討、大腸癌での作用について検討する。
4. 研究成果

HCT116、HT29 細胞に PROK2 遺伝子を導入後マウス皮下に移植し、PROK2 抗体を腹腔内投与したところ、腫瘍抑制はあるものの、有意差は認めなかった。そのため PROK2 の受容体である抗 PK-R2 抗体を用いて抗腫瘍効果を検討した。colo320 をマウス皮下に移植し、抗 PK-R2 抗体を投与したところ、腫瘍の抑制効果が得られた（右図:a) PKR2 抗体投与、b)control）。さらに、PROK2 遺伝子を導入した大腸癌細胞株(HCT116、HT29)を用いて脾臓注入し、PROK2 遺伝子導入した群で、Control 群と比較し、有意に肝転移は増加していることを確認した。脾臓注入後に抗 PROK2 抗体をマウス腹腔内に投与し、2 週間後に試験開腹を行なったが、皮下腫瘍同様に肝転移抑制効果は認めなかった。実験 1 に準じて抗 PK-R2 抗体を用いて行なったところ、抗 PK-R2 抗体投与により肝転移の抑制効果を認めた（右図）。これらのことにより、PK-R2 を介した経路をブロックすることで腫瘍増生および肝転移が抑制されることが示唆され、これまでの大腸癌臨床症例での PROK2 や PK-R2 の発現と予後との関連の結果を裏付ける結果となった。また抗 PK-R2 抗体は大腸癌の腫瘍増生抑制および肝転移抑制目的の治療薬となりうると考えられた。



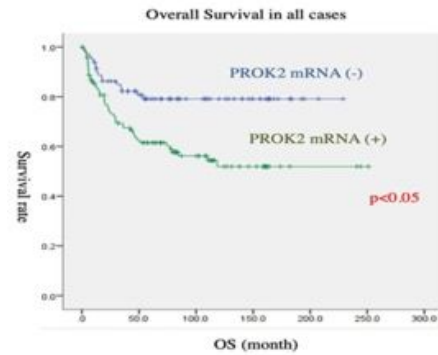
リキッドバイオプシーを用いた PROK2 の役割の検討ではヒト大腸癌患者 131 例において、血中 PROK2 濃度を測定し、臨床組織学的因子との関連について検討を行なっている。PROK2 の陽性率は 14.5%であった。同時に VEGF 濃度を測定し、PROK 発現と相関がないことを確認している。VEGF 陽性症例および Stage IV(他の因子が予後に関わっている可能性が高いと判断)を除外した 85 例で検討を行うと、血中 PROK2 陽性例で無再発生存期間および全生存期間が有意に不良であった（左下図:無再発生存曲線、青:血中



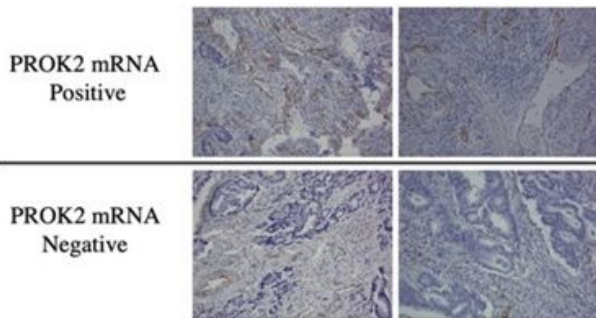
PROK2 陽性、黒：陰性）。多変量解析においても 血中 PROK2 陽性が独立再発予測因子(血行性転移との関連を示唆)であった（右下表）。

|  | Univariate analysis |                    |               | Multivariate analysis |                    |               |
|--|---------------------|--------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------|
|  | HR                  | 95%CI              | p-value       | HR                    | 95%CI              | p-value       |
| Age(over 65 or under 65)                 | 2.107               | 0.9196-4.829       | 0.0781        |                       |                    |               |
| Gender                                   | 1.172               | 0.5069-2.713       | 0.7107        |                       |                    |               |
| <b>PROK2</b>                             | <b>2.687</b>        | <b>1.133-6.370</b> | <b>0.0248</b> | <b>2.588</b>          | <b>1.091-6.137</b> | <b>0.0309</b> |
| Histological type (well+mod+pap/por+muc) | 1.96                | 0.2645-14.52       | 0.5103        |                       |                    |               |
| serosal invasion                         | 2.602               | 1.215-5.573        | 0.0138        | 2.541                 | 1.187-5.439        | 0.0163        |
| venous invasion                          | 1.483               | 0.6203-3.543       | 0.3757        |                       |                    |               |
| lymphatic invasion                       | 5.214               | 0.7011-38.71       | 0.1067        |                       |                    |               |
| lymphnode metastasis                     | 1.56                | 0.7316-3.328       | 0.2496        |                       |                    |               |

大腸癌細胞株において PROK 受容体の発現を確認し、PROK2 タンパクを用いて、cell proliferation の検討を行ったが、細胞増殖と PROK2 タンパクとの関連は認めることができなかった。しかしながら、PROK2 遺伝子発現したヒト大腸癌症例において予後不良であり(右図:全生存率曲線.青線:PROK2 mRNA 陰性, 緑線:陽性)。さらに根治切除可能症例に

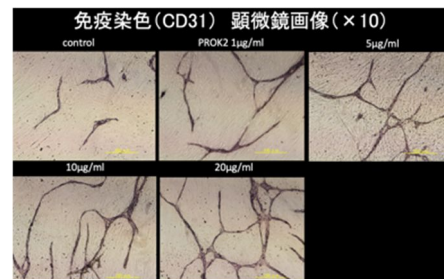


| PROK2mRNA      | hematogenous metastasis | recurrence % | $\chi^2$ test |
|----------------|-------------------------|--------------|---------------|
| positive<br>84 | 13                      | 15.47        | P=0.032       |
| negative<br>70 | 3                       | 4.28         |               |



に tube-formation assay では、PROK2 タンパク投与によりヒト臍帯血管内皮細胞の有意な伸長(右図)が認められた

おいては血行性転移再発が多い結果であった(左表)。原発巣での免疫組織学的染色では、腫瘍周囲の間質細胞での有意な血管増生が認められた。(左図:大腸癌切除標本における抗 CD31 抗体による免疫組織学的染色)。さら



上記実験結果より、大腸癌において PROK2 因子は血管新生因子として作用し、予後(肝転移)に關与していることが示唆された。

#### <引用文献>

Prokineticin 2 (PROK2) is an important factor for angiogenesis in colorectal cancer. Hidetaka Kurebayashi, Takanori Goi, Akio Yamaguchi et al. *Oncotarget*. 2015; 6(28) : 26242-51.

Expression of prokineticin-receptor2(PK-R2) is a new prognostic factor in human colorectal cancer. Takanori Goi Hidetaka Kurebayashi, Akio Yamaguchi et al. *Oncotarget*. 2015;6(31):31758-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|