

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16347

研究課題名(和文)大腸癌におけるProkineticin2因子の臨床応用に向けた検討

研究課題名(英文)Examination for a new clinical treatment of Prokineticin 2 factor in 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):大腸癌において血管新生因子は肝転移などに関わり予後に寄与する。今回、大腸癌原発巣で血管新生因子であるProkineticin2(PROK2) mRNAが発現し、腫瘍内での血管増生に関わることを見出した。抗PROK2抗体を用い原発巣で免疫染色を行うと、PROK2強発現症例では血行性転移、リンパ節転移が多く、生存率および再発率ともに不良であった。多変量解析でもPROK2は独立再発予測因子であった。さらに大腸癌細胞株にPROK2遺伝子を導入し、マウス脾臓に移植すると、肝転移が増大した。以上、PROK2の大腸癌における再発予測因子(バイオマーカー)や治療標的としての可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、大腸癌における全身化学療法は個別化治療として遺伝子型に応じた治療法が行われている。しかし術後再発予防としての補助化学療法については、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行われている現状があり、また化学療法の副作用が問題視される。今回の研究にてPROK2の新規治療薬としての可能性や、バイオマーカーとしての可能性を見出すことができたことは、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)につなげていくことが可能になると考える。

研究成果の概要(英文):Angiogenic factors are associated with prognosis in colorectal cancer. Before, we found that Prokineticin2 (PROK2) mRNA, an angiogenic factor, was expressed in colorectal cancer and was involved in angiogenesis of tumor. Immunostaining of colorectal cancer specimens treated with anti-PROK2 antibody revealed with strong expression. Also, we found the relationship with hematogenous metastases, lymph node metastases, survival rate and recurrence rate. PROK2 was also an independent predictor of recurrence in multivariate analysis. Furthermore, when the PROK2 gene was transfected into a colon cancer cell line and transplanted into the mouse spleen, liver metastasis was increased. From these results, we found that PROK2 has a potential as a recurrence predictor (biomarker) in colorectal cancer and as a therapeutic target.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 肝転移 Prokineticin2 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、一定の治療効果をあげているが、いまだに効果は十分とはいえず、新規治療法の開発が望まれている。また、大腸癌化学療法は個別化治療として遺伝子型に応じた治療法が行われている。しかし術後再発予防として補助化学療法については、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行われている現状がある。現在の治療で助けられない命に対する新規創薬や、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 molecular mass-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

#### (1)ヒト大腸癌における PROK2 mRNA 発現と臨床組織学的因子の関連

当科において大腸癌切除術を施行したヒト大腸癌患者の原発巣および正常粘膜より RNA を抽出し、cDNA を作製後、当科独自に作製した specific primer を用いた Real time PCR 法にて、PROK2 遺伝子発現について検討する。また臨床病理学的検討および予後、再発などについても検討を行う。さらに原発巣における変化についても検討を行う。

#### (2)切除標本における PROK2 蛋白の発現と臨床組織学的因子の関連

ヒト大腸癌患者より得られたホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、PROK2 モノクローナル抗体を一次抗体とした免疫化学組織染色を行い、組織分布、細胞内局在およびその発現程度を検索する。この PROK2 蛋白の発現量と臨床病理組織学的因子、予後との関係を検討し、PROK2 が消化器癌における浸潤、転移などにいかに関与しているかを明らかにする。

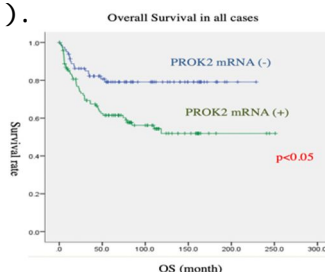
#### (3)PROK2 発現と肝転移の関連 (in vivo)

PROK2 mRNA 非発現大腸癌細胞株に Lipofectamine 法にて PROK2 遺伝子を導入する。同時にコントロールベクターを導入した PROK2 遺伝子非発現大腸癌細胞株も同様に作製し、それぞれの細胞をヌードマウスの脾臓に移植し、肝転移の状況进行评估する。PROK2 遺伝子非発現大腸癌細胞株への PROK2 遺伝子の導入および腫瘍における免疫組織学的染色については、以前に報告した論文の手法に準じて行う。(引用文献)

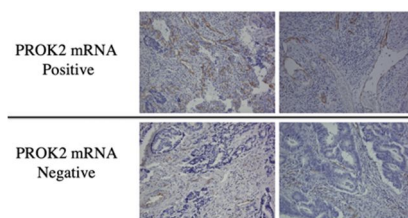
### 4. 研究成果

(1)大腸癌原発巣切除症例 199 例において、原発巣より mRNA を抽出し、PROK2 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行い、発現を検討した。117 例(58.8%)で PROK2 mRNA 発現が認められた。臨床学的因子と検討すると脈管侵襲や血行性転移と相関が認められ、発現症例では予後が有意に不良であった(図1:全生存率曲線。青線:PROK2 mRNA 陰性、緑線:陽性)。

また、原発巣において抗 CD31 抗体を用いて、脈管を染色すると PROK2 mRNA 発現症例で優位に脈管新生が起こっていた(図2: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)。

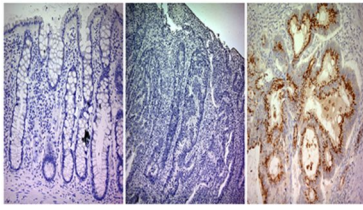


(図1:全生存率曲線。  
青線:PROK2 mRNA 陰性、緑線:陽性)



(図2: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)

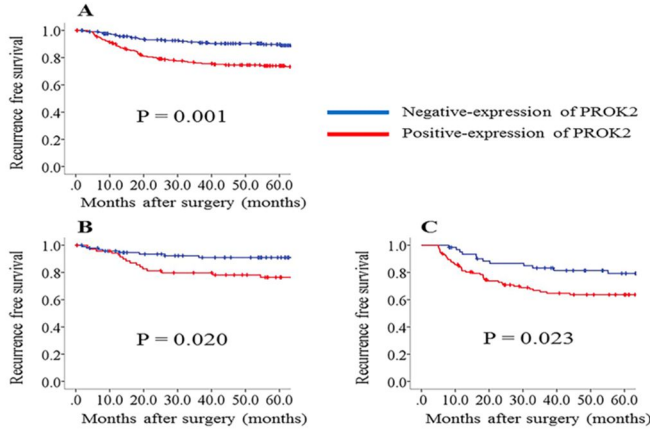
(2)抗 PROK2 抗体を用いて、大腸癌原発巣切除症例 310 例において原発巣で免疫組織学的染色を行なった(図3: 左:正常粘膜、中:PROK2 陰性例、右:PROK2 強発現例)。



Stage Grouping	PROK2 negative			PROK2 positive			P-value
	No of cases	Recurrence	%	No of cases	Recurrence	%	
All cases	214	19	8.9	222	54	24.3	0.001
I	55	0	0	38	1	2.6	0.226
II	97	8	8.2	71	15	21.1	0.016
III	70	15	21.4	113	38	33.6	0.022
II and III	160	19	11.9	184	53	28.8	0.001

(表1) 進行度別 PROK2 の発現

(図3: 左:正常粘膜、中:PROK2 陰性例、右:PROK2 強発現例)



(図4: 無再発依存曲線 A: 全症例 n=436、B: StageII n=168、C: StageIII n=176)

(3)原発巣で PROK2 強発現症例において、有意に血行性転移、リンパ節転移が起こりやすく、生存率および再発率ともに不良であった(図4: 無再発依存曲線 A: 全症例 n=436、B: StageII n=168、C: StageIII n=176)。

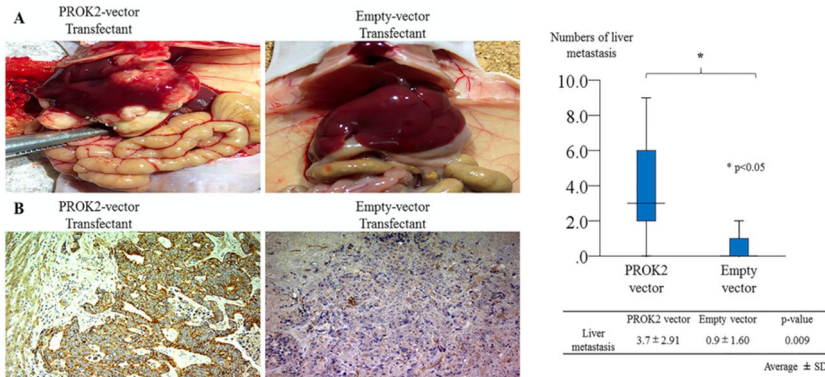
Factors	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
PROK2 (Positive vs Negative)	2.409	1.520-3.817	0.001	2.119	1.315-3.415	0.002
Gender (Male vs Female)	0.879	0.706-1.093	0.246			
Age (<65 vs ≥65 years)	0.816	0.658-1.012	0.064			
Tumor location (Colon vs Rectum)	0.896	0.664-1.208	0.471			
Tumor sidedness (Right vs Left)	1.138	0.727-1.779	0.572			
Histological type (WD/MD vs PD/Muc)	2.683	1.457-4.942	0.001	2.688	1.425-4.995	0.002
Serosal invasion (Positive vs Negative)	1.233	0.806-1.888	0.335			
Lymphatic invasion (Positive vs Negative)	1.566	1.015-2.414	0.043	1.009	0.638-1.597	0.969
Venous invasion (Positive vs Negative)	1.677	1.016-2.766	0.043	1.417	0.843-2.381	0.189
Lymph node metastasis (Positive vs Negative)	3.057	1.961-4.766	0.001	2.311	1.149-3.764	0.001

HR: hazard ratio, CI: confidence interval, WD: well differentiated, MD: moderately differentiated, PD: poorly differentiated, Muc: mucinous.

(4)多変量解析で PROK2 発現は独立再発予測因子であった(表2)。

(表2) 臨床病理学的因子と PROK2 因子における再発に関する多変量解析

(5)PROK2 遺伝子を低 PROK2 発現大腸癌細胞株に導入し、高 PROK2 発現大腸癌細胞株を作成し、マウス脾臓に移植したところ、高 PROK2 発現大腸癌細胞株において、Mock 細胞と比較して肝転移が有意に増大した(図5: A左:高 PROK2 発現細胞株における肝転移巣肉眼写真、A右: Mock 細胞 B: 肝転移巣の免疫組織学的染色結果)。



(図5: A左:高 PROK2 発現細胞株における肝転移巣肉眼写真、A右: Mock 細胞 B: 肝転移巣の免疫組織学的染色結果)

今回の検討にて、PROK2 は原発巣にて発現を認め、肝転移に強く関わる予後に関わる可能性が示唆された。

原発巣における PROK2 発現は、予後予測および再発予測因子としてのバイオマーカーとしての役割の可能性が見出された。また、肝転移に強く関連することから、過去の検討と併せて治療標的となりうる可能性があると考えられた。今後もさらに実験を進展させ、臨床応用につなげたい。

<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1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Yu, Goi Takanori, Kurebayashi Hidetaka, Morikawa Mitsuhiro, Hirono Yasuo, Katayama Kanji	4. 巻 9
2. 論文標題 Prokineticin 2 expression as a novel prognostic biomarker for human colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 30079-30091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呉林秀崇, 成瀬貴之, 西野拓磨, 藤本大裕, 森川充洋, 小練研司, 村上 真, 廣野靖夫, 片山寛次, 五井孝憲
2. 発表標題 Prokineticin2 の新規バイオマーカーとしての可能性-血清中PROK2高値は再発予測因子となる-
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 呉林秀崇, 成瀬貴之, 西野拓磨, 片山外大, 森川充洋, 小練研司, 玉木雅人, 村上 真, 廣野靖夫, 片山寛次, 五井孝憲
2. 発表標題 大腸癌においてProkineticin2 の再発予測因子としての役割について
3. 学会等名 第52回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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