

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09193

研究課題名(和文) 大腸癌における抗PROK1モノクローナル抗体による新規治療への検討

研究課題名(英文) Inhibitory effect of an anti-prokineticin-1 antibody on liver metastases in mice

研究代表者

五井 孝憲 (Goi, Takanori)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：60225638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウス(Nude GFP RJ マウス)を用いたヒト大腸癌移植・転移モデルで、抗prokineticin-1 (PROK1)抗体の投与によって、血行性(肝臓)転移の抑制が可能であることが認められた。またDNA arrayにて網羅的に解析を行い、重要なシグナル伝達系が明らかとなり、抗腫瘍効果の新しいメカニズムが判明した。以上より、今後更なる研究により創薬の開発が考えられ、ひいては新規治療法への発展の基盤を固めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は肝転移、血行性転移をきたしやすく、その克服が生存率の向上の最大の鍵と考えられている。近年では標的分子の一つとして血管新生増殖因子が注目され、実際に血管新生増殖因子：VEGF(venous endothelial growth factor)因子に対する抗体Bevacizumabが化学療法との併用によって、切除不能大腸癌の生存率向上に貢献している。しかし大腸癌の撲滅という点については、さらなる治療法の開発が待ち望まれている。PROK1遺伝子は、大腸癌細胞株を用いた実験系により、癌組織周囲の間質組織における血管新生の増殖から血行性転移への関わり認められ、新規治療への可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The prokineticin family of angiogenic factors has the potential of becoming target molecules. Among them, prokineticin-1 (PROK1) is involved in the promotion of angiogenesis, tumor growth, and liver metastases in colorectal cancer. We manufactured our own anti-PROK1 antibody and verified its effect in inhibiting liver metastases and prolonging survival. The method involved creating liver metastasis model mice using human colorectal cancer cell lines. These mice were divided into anti-PROK1 antibody administration and control groups. Mice were treated intraperitoneally with antibodies or phosphate-buffered saline (control) every 3 days. The number of liver metastatic lesions and survival time of each group were compared. The number of metastatic lesions decreased and survival time was significantly prolonged in the antibody-treated group. PROK1 antibody administration suppress liver metastasis suppression and prolonging the survival time of mice.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Prokineticin1 抗体 肝転移

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、日本を始め欧米を中心に発生頻度の高い悪性腫瘍である。早期の大腸癌の予後は比較的良好であるが、切除不能となった進行大腸癌の予後は、治癒には至らず現在もまだ満足のものではない。日本の厚生労働省の統計によると、大腸癌による死亡者数は増え続けており、2016年には5万人を超えている。

大腸癌には、リンパ節転移、腹膜転移、血行性転移などのさまざまな転移形式があるが、大多数の症例では、肝転移やその他の血行性転移のために生命を落としている現実がある。

近年その対策として分子標的治療薬が臨床応用され、そのなかで血管新生増殖因子を標的とする薬剤は重要と考えられ、大腸癌細胞の増殖、進展の抑制に関与している。私どもはこれまで焦点を当て研究してきた Prokineticin family も血管新生増殖因子の1つで、大きく Prokineticin-1 (PROK-1) と Prokineticin-2 (PROK-2) の2種類のタンパク質で構成されていることを発見した。特に PROK-1 は、副腎、卵巣、精巣の正常な内分泌組織で発現し、低酸素状態にて血管内皮細胞の増殖を促進することで見出され、既知の VEGF ファミリーとは異なる構成であることが判明しており、新規治療へのターゲットとなることが期待される。

## 2. 研究の目的

これまで、私どもの研究室では、in vitro および in vivo の実験系を通じて、腫瘍の成長、血管新生、および大腸癌への浸潤における PROK-1 の関与を報告してきた。本研究では、抗 PROK-1 抗体を大腸癌細胞株肝臓転移マウスモデルに用いて、大腸癌肝臓転移に対する新規治療法への足掛かりを見出す。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト大腸癌細胞株における PROK-1 発現の検討

ヒト結腸直腸癌細胞株 (HCT116、HT29、DLD-1) を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 培地を使用して、37℃、5%の CO<sub>2</sub> 下で3日間培養後、各細胞を OCT-compound で包埋した。次にミクロトームで 4 μm の切片を作成、一次抗体に抗 PROK-1 抗体を使用し、PROK-1 蛋白質の発現を検討した。

### (2) ヒト大腸癌細胞による肝転移マウスモデルと抗 PROK1 抗体による転移抑制の検討

ヒト大腸癌細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を雄 SHO マウスの脾臓被膜下に移植して、肝転移マウスモデルを構築した。抗体投与群と対照群(無抗体投与)は、大腸癌株毎に準備を行った (n = 5)。抗体投与群では、脾臓被膜下の腫瘍細胞注射の前日および注射後3日ごとに抗 PROK1 抗体 (500 μg) を腹腔内投与した。検討内容としては、肝臓の転移領域の数と各グループの生存期間を比較した。マウスが水または食物に手を伸ばすことができなくなったときに死亡と見なし、その状態に達してから4時間以内に安楽死させた。カプランマイヤー法を使用して生存曲線を作成し、ログランク検定を使用して p < 0.05 にて有意差を有りと決定した。

### (3) 肝転移細胞と脾臓細胞における遺伝子変化の検討

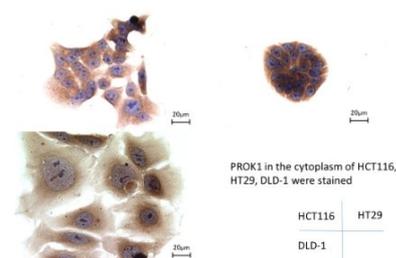
ISOSPIN Cell & Tissue RNA (Nippon Gene, Yoyama, Japan) を使用して、マウスの肝臓転移細胞と脾臓増殖細胞の Total RNA を抽出し、遺伝子の網羅的解析として Clarion SArray とヒト GeneChip (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト大腸癌細胞株において PROK-1 蛋白質の発現の検討

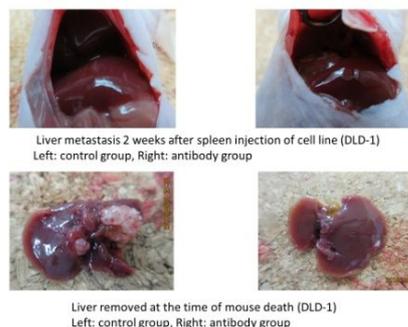
HCT116、HT29、および DLD-1 細胞株の全ての大腸癌細胞株において細胞質が抗 PROK-1 抗体で染色が認められた (Figure 1)。

Figure 1 Immunohistochemical staining of colorectal cancer cell lines



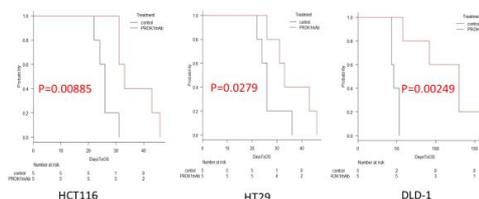
(2) 大腸癌細胞株肝転移モデルにおける抗 PROK-1 抗体による転移の抑制について  
 各大腸癌細胞株の脾臓被膜下への移植から 2 週間後、全てのマウスで肝転移が形成されていることが認められた (Figure 2)。肝臓を切除し、転移数を確認した。転移数の平均値は、HCT116(対照群: 75; 抗体群: 23); HT29(対照群: 93; 抗体群: 40); および DLD-1(対照群: 100; 抗体群: 10) (Figure 2C)であり、抗体投与群の方が対照群よりも有意に肝転移数が少ないことが認められた。

Figure2 Observation of liver metastasis



(3) 大腸癌細胞株肝転移モデルにおける抗 PROK-1 抗体による生存期間の延長について  
 各グループの生存曲線を示すと共に生存期間の中央値を比較した: HCT116(対照グループ: 33 日; 抗体グループ: 26 日;  $p = 0.00885$ ); HT29(対照群: 28 日; 抗体群: 46 日;  $p = 0.0279$ ); および DLD-1(対照群: 28 日; 抗体群: 13 日;  $p = 0.00249$ )であり、抗体投与群では非投与群と比較して生存期間が有意に延長された (Figure 3)。

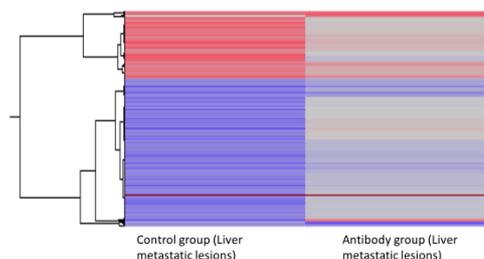
Figure3 Comparison of survival time



HCT116, HT29, and DLD-1 all showed a significant increase in survival time. The survival curve was created by the Kaplan-Meier method.

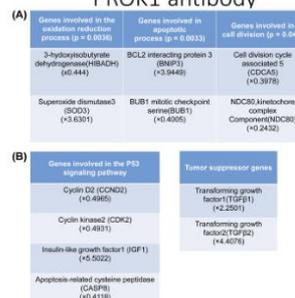
(4) 肝転移細胞と脾臓細胞における遺伝子変化の検討(Microarray)  
 Figure 4 は肝転移細胞と脾臓細胞における heat map の結果である。遺伝的变化が抑制されたことを示した (Figure 4)。具体的には 24,351 個の分析された遺伝子の 72.1% で変化認められた。また脾臓細胞と比較して肝転移細胞で大きく変化した遺伝子 (抗体投与により発現が 2 倍以上増加または減少した遺伝子) の機能を DAVID 機能アノテーションで解析したところ、還元、アポトーシス過程ならびに細胞分裂に関する遺伝子が有意に変化した (Figure 5A)。また腫瘍抑制遺伝子であるトランスフォーミング増殖因子- (TGF-) の発現が増加した (Figure 5B)。

Figure4 Microarray Heatmap



When microarray was performed on liver metastases at the time of mouse death, gene changes were suppressed in the antibody-administered group compared to the control group.

Figure5 Genes altered by administration of anti-PROK1 antibody



\*Analysis was performed by David functional annotation.

## 参考文献

1. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994;79:185-188.
2. Jemal A, Bray F, Cancer MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011;61:69-90.

3. Cancers facts and figures 2012. American Cancer Society, Atlanta 2012. <http://www.cancer.org/Research/Cancerfacts/index> Accessed: January 1,2012.
4. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for treatment of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 2012;17:1-29.
5. Nordlinger B, Van Cutsem E, Gruenberger T, et al. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: Recommendations from an expert panel. *Ann. Surg.* 2006;224:254-259.
6. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2009;20:985-992.
7. Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumor number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* 2009;96:1101-1113.
8. Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumor-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2007;9:3-14.
9. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti VEGF therapy for cancer. *Br. J. Cancer.* 2007;6:1788-1795.
10. Bose D, Meric-Bernstam F, Hofstetter W, Reardon DA, Flatherty KT, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor targeted therapy in the perioperative setting: implications for patient care. *Lancet Oncol.* 2010;11:373-382.
11. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, et al. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature.* 2001;412:877-884.
12. Goi T, Fujioka M, Yamaguchi A, et al. Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res.* 2004;64:1906-1910.
13. Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Anti-prokineticin 1 (PROK1) monoclonal antibody suppresses angiogenesis and tumor growth in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2014;21:665-671.
14. Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Prokineticin 1 expression in gastrointestinal tumors. *Anticancer Res.* 2013;33:5311-5315.
15. Nakazawa T, Goi T, Hirono Y, Yamaguchi A. Prokineticin 1 Protein Expression is a Useful New Prognostic Factor for Human Sporadic Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2015;22:1496-1503.
16. Japanese Society for Cancer of Colon and Rectum guidelines 2019 for the treatment of Colorectal Cancer.
17. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:2542-2550.
18. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *New Engl. J. Med.* 2007;357:2666-2676.
19. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase study. *J. Clin. Oncol.* 2008;26:2013-2019.
20. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* 2001;7:987-989.

21. Tabernero J, Van Cutsem E, Lakomy R, et al. Afibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *Eur. J. Cancer.* 2014;50:320-331.
22. Grothey A, Van Cutsem E, Soberero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicenter, randomised, placebo-controller, phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381:303-312.
23. Hanahan D, Folkman J, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
24. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9:239-252.
25. Nakazawa T, Goi T, Yasuo H, Yamaguchi A. Prokineticin 1 protein expression is a useful new prognostic factor for human sporadic colorectal cancer. *Oncology.* 2015;22:1496-1503.

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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗PROK1抗体の利用	発明者 五井 孝憲、河野 紘子、木村 洋平、 呉林 秀崇、中澤	権利者 国立大学法人福 井大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-020177	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	山口 明夫  (Yamaguchi Akio)  (10174608)	福井医療大学・保健医療学部・学長    (33404)	

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
---------	---------