

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591481

研究課題名（和文） EG-VEGF splicing variant のクローニングと機能解析

研究課題名（英文） Cloning of a splicing variant of EG-VEGF in colorectal cancer.

研究代表者

五井 孝憲 (Takanori Goi)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60225638

研究成果の概要（和文）：大腸癌における予後規定因子は肝転移と言われており、この転移の機序には血管新生増殖因子が密接に関連すると言われている。今回研究の基礎となった EG-VEGF (endocrine glands-derived-venous endothelial growth factor) 遺伝子は Ferrara らが 2001 年に内分泌系細胞の新規血管内皮増殖因子としてクローニングしたものである。その翌年より私どもは大腸癌における EG-VEGF 遺伝子の関連性を検討し、実験/臨床系において血行性転移に重要な役割を示すことを報告してきた。今回はその研究中大腸癌において splicing variant の異なる Variant EG-VEGF 遺伝子が存在することを確認し、またその因子は血管新生の増殖に関わると共に癌細胞の浸潤能を亢進させる働きを有することが認められました。すなわち Variant EG-VEGF 遺伝子が癌細胞において浸潤・転移に関与を及ぼし、更なる研究から癌の新しいメカニズムを解明することが考えられます。

研究成果の概要（英文）：We identified a novel EG-VEGF gene with a splicing pattern different from that of the regular EG-VEGF gene. Comparison of both genes revealed that the variant EG-VEGF products had a structure lacking thirty-six base pair. Variant EG-VEGF protein increased cancer cell invasion. In addition, Variant EG-VEGF mRNA was found to be expressed in liver metastatic lesion, suggesting that it is an important gene for the function of hematogenous metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

近年大腸癌に対する化学療法は進歩して

いるものの、未だに根治には至っていない。
特に大腸癌では肝転移を中心とした血行性

転移を生じやすく、この克服が生存率を向上させるための最大の目標と考えられている。血行性転移の機序としては、原発巣の大腸癌細胞が基底膜を破り、毛細血管内に侵入した後、門脈などを通過して肝臓などの遠隔臓器に生着すると考えられており、これらのいくつものステップで血管新生増殖因子が重要な要素として働いている。本邦では 2007 年に VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) に対する抗体薬である Bevacizumab が化学療法と併用することが承認され、進行・再発大腸癌の予後を改善することから、日本大腸癌治療ガイドラインの第一次治療に記載されている (Ref. 1)。

今回検討の足がかりとなった報告は 2001 年に Ferrara (Ref. 2) が、正常の副腎、卵巣、精巣などの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) をクローニングしたことであり、その後私どもは大腸癌の血行性転移との関わりを報告してきた (Ref. 3, 4)。さらにその研究の際に大腸癌肝転移巣において、splicing variant の異なる EG-VEGF 遺伝子 (Variant EG-VEGF) が存在することを見出したことに始まった。これまで最も研究が進んでいる血管増殖新生因子：VEGF 遺伝子においても、Splicing pattern の異なる複数の遺伝子が報告され、増殖、リンパ管形成、血管新生など作用を有し、癌細胞の増殖、浸潤、転移の解明に大きく貢献している。すなわち Splicing pattern の異なる新規 Variant EG-VEGF 分子の研究は癌の新規機序の解明に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

EG-VEGF 遺伝子は内分泌系の正常細胞において血管新生増殖因子として同定された。私どもはこれまでに世界に先駆けて、EG-VEGF mRNA の発現が大腸正常組織では認めないにも関わらず、大腸癌原発巣では約 40% に発現が認められ、大腸癌血行性転移に関与することを報告してきた。今回、さらに大腸癌肝転移巣に splicing pattern の異なる Variant EG-VEGF 遺伝子の発現を確認したことより、大腸癌の転移に関わる因子である可能性が推測された。すなわちこの因子の解明について新しい転移の機序を見出す可能性があり、その意義は大きいと考え、検討を行なうこととした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の培養

大腸癌細胞株：HCT116, DLD-1 を RPMI1640 (10% heat-inactivated fetal bovine serum) を培養液として 37°C、5% CO₂ 下で培養を行った。

(2) Variant EG-VEGF mRNA の抽出

ヒト大腸癌肝転移症例の転移組織から Total RNA を抽出後、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase を用いて single strand cDNA を作製した。Variant EG-VEGF 遺伝子のプライマーは次のように設定した。

Variant EG-VEGF-AX:

(BamHI)-ATGAGAGGTGCCACGCGAGTCTCAA.

Variant EG-VEGF-BX:

(EcoRI)-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 35 サイクル施行した。

PCR 産物は 1.2% アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルに泳動して、PCR 産物は Gel extraction kit (QIAGEN, USA) にて抽出した。さらにシーケンスをおこなって遺伝子配列を確認した。

(3) Variant EG-VEGF 蛋白質発現ベクターの作製・蛋白精製

ヒト大腸癌肝転移組織から Total RNA を抽出後、cDNA を作製し、RT-PCR にてクローニングした Variant EG-VEGF mRNA (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 蛋白を抽出した。

(4) Variant EG-VEGF 蛋白による Tube formation の形成について (In vitro)

complete medium または complete medium に Variant EG-VEGF 蛋白を加えた培養液を Tubular Formation System (KURABO, Japan) のウエルに注入して、Tube formation の形成について検討した。

(5) 大腸癌の細胞株におけるレセプター発現

の検討

大腸癌細胞株を 1×10^4 個を BD Falcon Culture slides(BD Biosciences)の各ウェルに加えて 48hrs 培養後、細胞固定し、一次抗体に抗 PK-R1 抗体ならびに抗 PK-R2 抗体 Novus Biochemicals, Littleton, CO, USA).を用いて各レセプターの発現を検討した。

(5) Variant EG-VEGF 蛋白による細胞浸潤能の変化について(In vitro)

大腸癌細胞株を P60 プレート/70% confluent 状態にて(complete medium または complete medium に Variant EG-VEGF 蛋白を加えた)24 時間培養後、Biocoat Matrigel 6-well invasion chamber (BD Biosciences)の上部ウェルに 5×10^4 個の各細胞を加え、下部ウェルには complete medium を入れた。12 時間 37°C、5%CO₂ 下で培養後、綿棒で Matrigel 上面の細胞を除去した。次いで浸潤細胞を 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測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌肝転移巣における Variant EG-VEGF 遺伝子の発現(Fig1)

ヒト大腸癌肝転移症例の転移組織から RNA を抽出、cDNA 作製後、RT-PCR 法にて検討を行なったところ、EG-VEGF mRNA とは splicing pattern の異なる Variant EG-VEGF mRNA の発現が認められた。

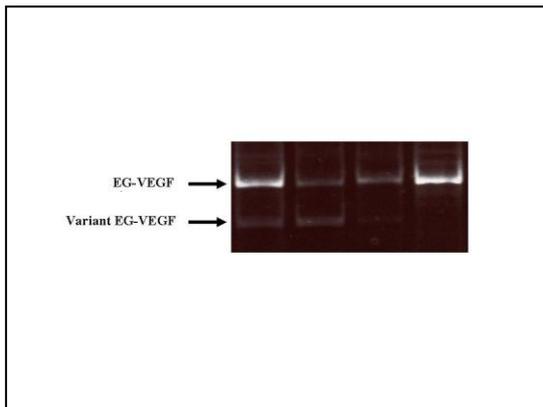


Fig1

(2) Variant EG-VEGF 遺伝子の配列(Fig2)

上記の RT-PCR 産物に対してシークエンスを行なった結果を Fig2 に示した。上段は

EG-VEGF mRNA で下段は Variant EG-VEGF mRNA。Variant EG-VEGF mRNA では 36bp が欠損していることが確認された。

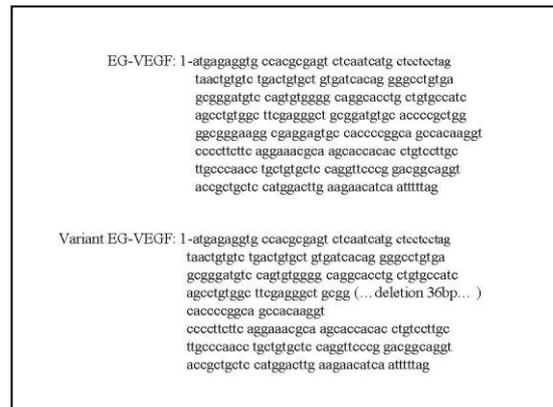


Fig2

(3) 蛋白発現型ベクターへ Variant EG-VEGF 遺伝子の挿入(Fig3)

Fig1 で認められた PCR 産物 : Variant EG-VEGF mRNA を gel extraction kit を用いて精製後、蛋白発現ベクター pGEX2T(GE Health Care, USA) に挿入した。さらに IPTG を加えて蛋白を作製した。

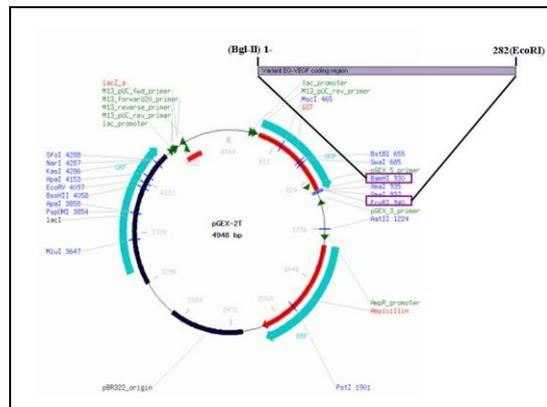


Fig3

(4) Variant EG-VEGF 蛋白質における tube formation の検討

Variant EG-VEGF 蛋白質を tube formation system に用いて検討したところ、コントロール群では tube formation の長さは 45 μm であったのに対して Variant EG-VEGF 蛋白質を加えた場合は 132 μm と伸張が生じた (Fig4,5)。

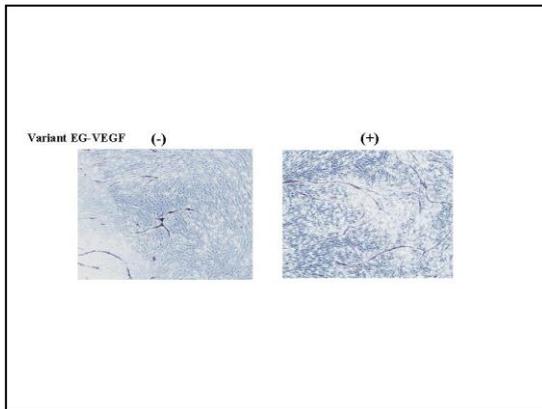


Fig4

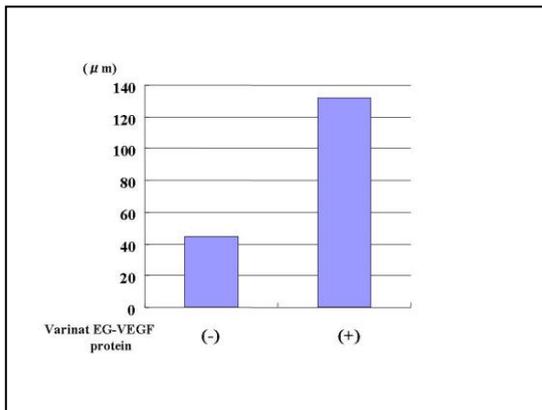


Fig5

(5)大腸癌の細胞株における細胞膜レセプター発現の検討(Fig6)

大腸癌細胞株：HCT116 と DLD-1 に対して EG-VEGF のレセプターである PK-R1 ならびに PK-R2 の発現を検討したところ、両方ともこの細胞株において発現が確認された。

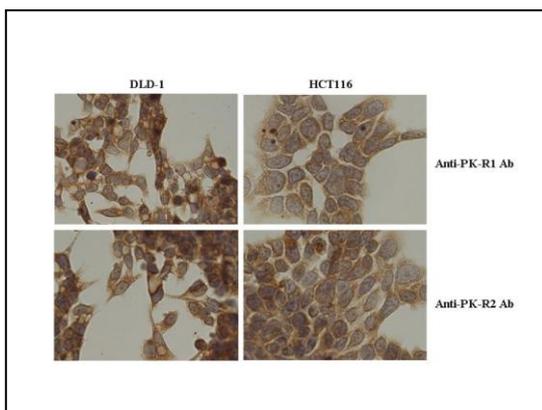


Fig6

(6) Variant EG-VEGF 蛋白質における細胞浸潤能の検討

大腸癌の細胞株:HCT116 に Variant EG-VEGF 蛋白質にて刺激を行い、細胞浸潤能について検討したところ、コントロール群では 13 個/視野であったのに対して、Variant EG-VEGF蛋白質を加えた場合は56個/視野と有意に細胞浸潤能が亢進した(Fig7,8)。

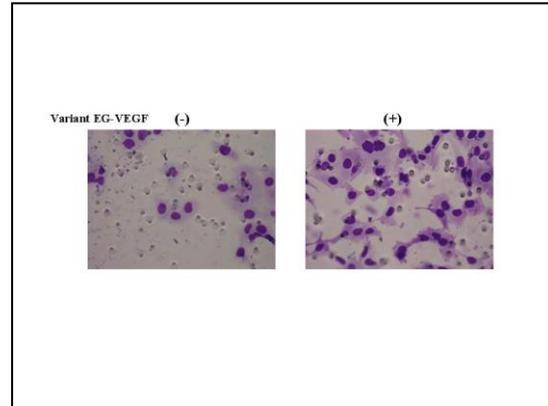


Fig7

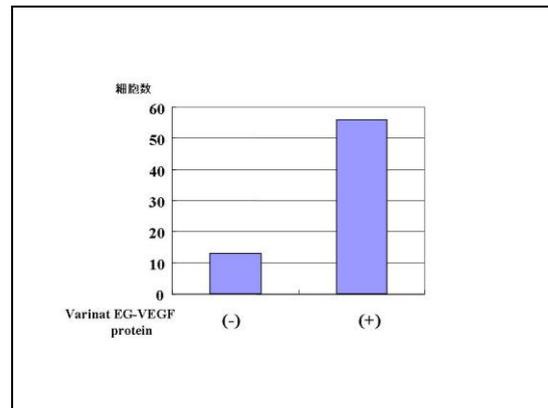


Fig8

参考文献

- 1) Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, Tanaka S, Ito Y, Ajioka Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum: Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2012;17:1-29. 2012.
- 2) LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, gurney A, Hillan KJ, Ferrara N (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877-884
- 3)Goi T, Fujioka M, Satoh Y, Tabata S, Koneri K, Nagano H, Hirono Y, Katayama K, Hirose K,

Yamaguchi A. 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.

4) Nagano H, Goi T, Koneri K, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in colorectal cancer. J Surg Oncol. 2007, 96:605-610

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 6 件)

* corresponding author

- ① Tabata S, *Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Katayama K, Yamaguchi A. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor strengthens cell invasion ability via prokineticin receptor 2 in colon cancer cell lines. Oncol Rep. 29, 2013:459-463. 査読有 DOI:10.3892/or.2012.2124
- ② Aso K, *Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. The expression of integrins is decreased in colon cancer cells treated with polysaccharide K. Int J Oncol. 42, 2013:1175-1180. 査読有 DOI:10.3892/ijo.2013.1832
- ③ Fujishima Y, *Goi T, Kimura Y, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. MUC2 protein expression status is useful in assessing the effects of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal dissemination of colon cancer. Int J Oncol. 40, 2012:960-964. 査読有 DOI:10.3892/ijo.2012.1334
- ④ Inoue T, *Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. RIN1-Ras-ERK pathway plays an important role in carcinogenesis in colon cancer cell line LoVo. Oncol Res. 19, 2011: 527-534. 査読有 DOI:10.3727/096504012X13340632812514

⑤ *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

⑥ 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 DOI:10.3727/096504010X12767359113848

[学会発表] (計 1 件)

- ① 五井孝憲, 山口明夫他：消化器癌における新規血管新生増殖因子：EG-VEGF(endocrine glands-derived-venous endothelial growth factor) の発現と臨床応用への可能性. 第 112 回日本外科学会定期学術集会：パネルディスカッション 2012 年 4 月 12 日

[図書] (計 2 件)

- ① 山口明夫, 五井孝憲. 大腸・肛門外科における現況と今後. 日本医師会雑誌 2011. 140: 677-1680.
- ② 五井孝憲, 山口明夫. 大腸癌(大腸癌の治療戦略: 高齢者の StageI-III 大腸癌の治療. 日本臨床 2010: 550-553.

[その他]

ホームページ等

<http://geka1.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山口 明夫 (Yamaguchi Akio)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：10174608