

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462047

研究課題名(和文)大腸癌におけるPROK1/EG-VEGF蛋白質発現と抗体療法の可能性の検討

研究課題名(英文) Simultaneous targeting of both angiogenic growth factors(VEGF/PROK1) in colorectal cancers

研究代表者

五井 孝憲 (Goi, Takanori)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：60225638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞においてPROK1因子とVEGF因子の2因子のいずれか単独の抗体療法よりも、両因子の抗体を同時に投与する方が血管新生能や腫瘍形成能を効果的に抑制することが高いことが見出された。PROK1因子とVEGF因子の両血管新生増殖因子を同時に治療のターゲットにすることの有用性が示され、大腸癌の新規治療法として期待されることを見出した。PROK1蛋白質とVEGF蛋白質の両血管新生増殖因子を発現している大腸癌では1因子の発現の時よりも予後不良であり、Cox比例ハザードモデルの多変量解析結果からもPROK1蛋白質とVEGF蛋白質が共に発現している場合に独立した予後因子となることも認められた。

研究成果の概要(英文)：When the culture fluid of colorectal cancer cell lines with high levels of VEGF/PROK1 expression was injected subcutaneously into mice. When both anti-PROK1 and anti-VEGF antibodies were present in the culture fluid, the length and size of the blood vessels were reduced compared with those seen in the fluid-only, anti-PROK1, and anti-VEGF controls. Also, tumor masses were produced in mice by subcutaneously embedding colorectal cancer cells with high levels VEGF/PROK1 expression. Simultaneous targeting of both angiogenic growth factors(VEGF/PROK1) may prove more useful in colorectal cancer. Also VEGF and PROK1 expression in 620 primary human colorectal cancer lesions was confirmed via immunohistochemical staining. The prognosis was poorer in colorectal cancers that expressed both PROK1 and VEGF relative to the cases that expressed only 1 protein, and the expression of both proteins was found to be an independent prognostic factor.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 血管新生 VEGF PROK1 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

欧米諸国、日本など世界的に大腸癌は悪性腫瘍の中で発生頻度が高い疾患である。初期の状態であれば予後は良好であるが、切除不能進行大腸癌症例では近年の抗がん剤や分子標的治療薬の進歩によって予後の延長は認められているものの、未だに満足できる状態ではない。大腸癌の転移形式としてはリンパ節転移、腹膜転移、血行性転移があるが、その中で大多数の症例は肝転移などの血行性転移によって生命の危機が生じてくる。すなわち予後向上には、血行性転移への対策が最も重要と考えられる。

血行性に対する機序としては、原発巣からの離脱、基底膜の融解、間質内の移動、脈管内への侵入、最終的に標的臓器での癌細胞の接着、侵入、増殖が考えられている。また近年では様々な癌の転移に関する分子生物学的な検討が行なわれ、多数の因子の関与が確認されている。特に大腸癌においては多数の分子標的治療薬が使用されており、血管新生増殖因子である VEGF に関連する分子を標的とした抗 VEGF 抗体や抗 VEGF receptor 抗体、細胞内シグナル伝達機構に関わる EGF のレセプターに対する抗 EGFR 抗体、さらに受容体型チロシンキナーゼを標的としたマルチキナーゼ阻害剤などが NCCN の大腸癌治療ガイドラインに列記されている(Ref.1)。

今回検討した Prokineticin 1(PROK1)因子は私どもの検討において、低 PROK1 発現型大腸癌細胞株において PROK1 遺伝子を導入すると周囲組織の血管新生や腫瘍増殖能、さらに血行性転移が高率に生じることや胃癌や小腸癌の stage の高い症例における PROK1 蛋白質の発現の増強が認められている。さらに他施設からも前立腺癌、neuroblastoma、膵癌などの悪性度との関連性も報告されている。

これまでに複数の血管新生増殖因子に対する効果についてはほとんど検討されていないことから今回大腸癌において血行性転移に重要であると考えられる血管新生増殖因子である VEGF と PROK1 の相互作用について検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

PROK1 因子は Ferrara により副腎、卵巣、精巣などの内分泌系の組織における血管内皮増殖因子として報告(Ref.2)され、その後大腸癌手術切除症例の原発巣において PROK1 mRNA 発現の陽性症例が陰性症例と比較して有意に予後が不良であること、また大腸癌細胞株において PROK1 遺伝子が血管新生ならびに肝転移に関与することが認められた(Ref.3)。また最近では大腸癌細胞株に対して抗 PROK1 抗体が血管新生を抑制すること、さらに PROK1 因子に対するレセプターを持っており、オートクライン機構から細胞浸潤能を亢進させることも認められている。その

他 Pancreatic duct cancer、Prostate cancer や neuroblastoma など多数の悪性腫瘍において進行度や転移との関連性の報告(Ref.4)があり、悪性腫瘍において PROK1 因子の意義は高いと考えられている。

これまで大腸癌において血行性転移に重要な因子である血管新生因子の単独の検討はあるが、2 種類同時の検討結果無いことから、今回大腸癌の血行性転移に単独に関連性の高い VEGF 因子と PROK1 因子を同時に検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株の培養

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

### (2) マウスの皮下における血管新生の検討 (抗 PROK1 Ab, 抗 VEGF Ab による抑制)

高 PROK1/VEGF 蛋白発現型大腸癌細胞株 (3 種)の培養液に抗 PROK1 Ab や抗 VEGF Ab を加え、Dorsal air sac method にて血管新生について検討した。

### (3) マウスの皮下腫瘍における抗 PROK1 Ab, 抗 VEGF Ab による抑制

高 PROK1/VEGF 蛋白発現型大腸癌細胞株に抗 PROK1 抗体や抗 VEGF 抗体を加え、マウスの皮下に移植して血管新生ならびに腫瘍形成能について比較検討を行った。

### (4) ヒト大腸癌症例における PROK1/VEGF 蛋白質発現の検討

当科で切除術を施行したヒト大腸癌症例 620 例を対象として、抗 PROK1 Ab を用いた免疫組織化学染色法にて発現と予後について検討を行った。さらに抗 VEGF Ab にて同様に染色を行い関連性について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1)大腸癌細胞株における PROK1 蛋白質、VEGF 蛋白質発現の発現

大腸癌細胞株(DLD-1,HCT116,LoVo)において VEGF 蛋白質と PROK1 蛋白質の発現が認められた(Fig1)。

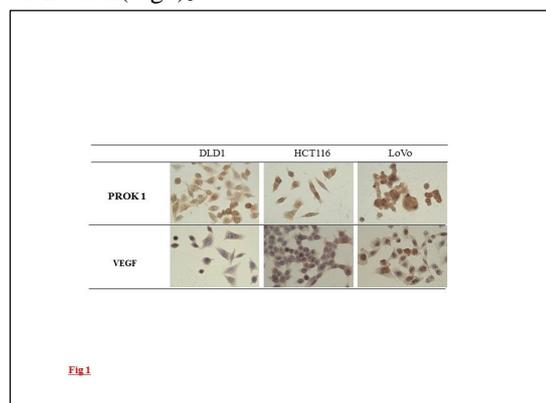
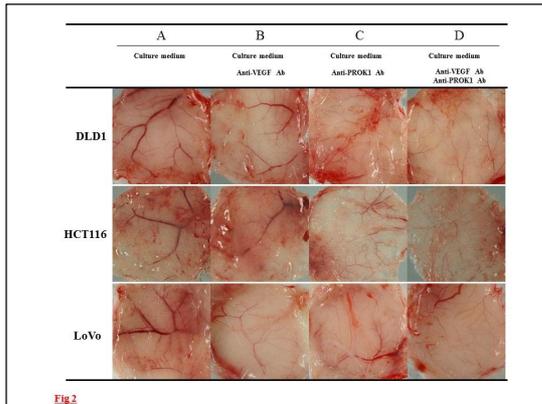


Fig 1

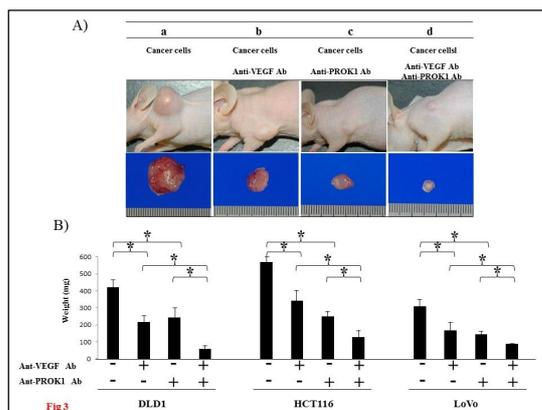
**(2) 大腸癌細胞株を培養した後の培養液に抗 PROK1 抗体、抗 VEGF 抗体の 2 種類を加えた場合の血管新生の検討**

高 VEGF/PROK1 発現型大腸癌細胞株を培養後の培養液によるマウス皮下の血管新生は抗 PROK1 抗体または抗 VEGF 抗体を単独で加えた場合よりも両方を同時に加えた場合に血管の伸長、太さが抑制された(Fig2)。



**(3) 大腸癌細胞株に抗 PROK1 抗体、抗 VEGF 抗体を 2 種類加えた場合の腫瘍形成抑制の検討**

マウスの皮下に高 VEGF/PROK1 発現型大腸癌細胞株を移植した腫瘍において、抗 PROK1 抗体または抗 VEGF 抗体を単独で加えた場合よりも両方を同時に加えた場合に腫瘍の形成ならびに腫瘍周囲の血管新生が抑制された(Fig3)。



**(4) ヒト大腸癌組織における VEGF 蛋白質の発現と PROK1 蛋白質の発現の関連性の検討**

ヒト大腸癌症例原発巣における VEGF 蛋白質発現は 620 例中 329 例(53.1%)、PROK1 蛋白質発現は 620 例中 223 例(36.0%)に認められ、PROK1 蛋白質と両方の発現が認められた症例は 620 例中 116 例 (18.7%)であった (Fig4)(Table1)。

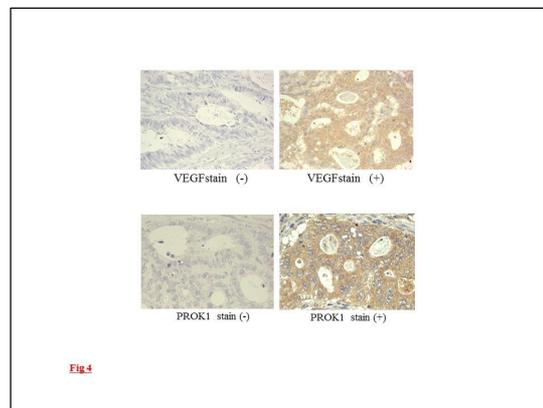


Table1: The correlation between VEGF and PROK 1 expression in colorectal cancers

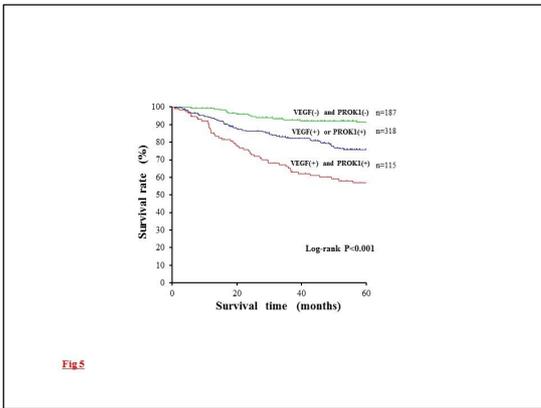
|        |   | VEGF       |            |
|--------|---|------------|------------|
|        |   | -          | +          |
| PROK 1 | - | 184(29.7%) | 213(34.4%) |
|        | + | 107(17.3%) | 116(18.7%) |

**(5) ヒト大腸癌組織における PROK1 蛋白質と VEGF 蛋白質の発現と臨床病理学的因子との検討**

深達度が高度の場合、脈管侵襲陽性、リンパ節転移陽性、肝転移を認める症例、血行性転移を認める症例、ならびに Stage の高い症例において、VEGF 蛋白質と PROK1 蛋白質が陰性であった症例や VEGF 蛋白質または PROK1 蛋白質の一方が陽性であった症例よりも VEGF 蛋白質と PROK1 蛋白質共に発現している症例が有意に多く認められた。

**(6) stage 別の大腸癌患者における PROK1 蛋白質と VEGF 蛋白質の発現と血行性転移再発率の関係**

再発や予後については VEGF 蛋白質と PROK1 蛋白質の発現が陰性であった症例よりも VEGF 蛋白質または PROK1 蛋白質の一方が陽性であった症例が再発ならびに予後も不良であり、さらに両方共に発現が認められた症例が最も再発ならびに予後が不良であった(Fig5)。



### (7)大腸癌患者における予後因子の検討

Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析を行ったところ、VEGF/PROK1 蛋白質発現、脈管侵襲、リンパ節転移、肝転移の因子が有意差を示した。また多変量解析を行ったところ、脈管侵襲、リンパ節転移、VEGF/PROK1 蛋白質発現が有意差を示した。また VEGF/PROK1 蛋白質発現における hazard ratio は 2.317 であった。VEGF 蛋白質と PROK1 蛋白質の発現は独立した予後因子であった(Table2)。

Table2. Pathological Findings and PROK1/VEGF as Prognostic Factor for Colorectal Cancer Patients

|  | Univariate analysis |              |         | Multivariate analysis |              |         |
|--|---------------------|--------------|---------|-----------------------|--------------|---------|
|  | Hazard Ratio        | 95% CI       | P-value | Hazard Ratio          | 95% CI       | P-value |
| Gender                                       | 0.735               | 0.520-1.041  | 0.083   |                       |              |         |
| Age  | 0.999               | 0.985-1.013  | 0.589   |                       |              |         |
| PROK1+VEGF                                   | 3.316               | 2.384-4.652  | 0.000   | 2.317                 | 1.618-3.317  | 0.000   |
| Histological type (Well+Mod* (Poor† / Muc‡)) | 2.188               | 1.669-2.816  | 0.000   | 2.091                 | 1.583-2.761  | 0.000   |
| Serosal invasion                             | 5.931               | 2.905-12.107 | 0.000   | 3.758                 | 1.666-8.479  | 0.001   |
| Lymphatic invasion                           | 3.057               | 1.556-6.008  | 0.001   | 1.181                 | 0.570-2.448  | 0.655   |
| Venous invasion                              | 1.736               | 1.209-2.493  | 0.003   | 0.973                 | 0.657-1.440  | 0.891   |
| Lymphnode metastasis                         | 3.193               | 2.221-4.592  | 0.000   | 1.686                 | 1.141-2.490  | 0.009   |
| Peritoneal metastasis                        | 5.001               | 2.754-9.080  | 0.000   | 1.097                 | 0.579-2.078  | 0.776   |
| Hematogenous Metastasis                      | 13.544              | 9.439-19.434 | 0.000   | 8.808                 | 5.883-13.189 | 0.000   |

\* Well, well differentiated adenocarcinoma; \* Mod, moderately differentiated adenocarcinoma; † Poor, poorly differentiated adenocarcinoma; ‡ Muc, mucinous adenocarcinoma.

**まとめ:** PROK1 蛋白質と VEGF 蛋白質の両血管新生増殖因子を発現している大腸癌ではいずれかの 1 因子の発現の時よりも予後不良であり独立した予後因子となることが認められた。また PROK1 因子と VEGF 因子の両血管新生増殖因子を同時に治療のターゲットとすることは有効であることが期待される。

### 参考文献

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. International Journal of Clinical Oncology 17, 2012:1-29.

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, 2001: 877-884.

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 Research 64, 2004: 1906-1910.

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Prokineticin 1 Expression in Gastrointestinal Tumors. Anticancer Research 33. 2013: 5311-5316.

### 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 3 件)

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. The prognosis was poorer in colorectal cancers that expressed both VEGF and PROK1 (No correlation coefficient between VEGF and PROK1. Oncotarget. 6(30), 2015:28790-28799. 査読有

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. The anti-tumor effect is enhanced by simultaneously targeting VEGF and PROK1 in colorectal cancer Oncotarget.6(8), 2015: 6053-6061. 査読有

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Anti-Prokineticin1 (PROK1) Monoclonal Antibody Suppresses Angiogenesis and Tumor Growth in Colorectal Cancer. Annals of surgical oncology 21, 2014: 665-671. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

五井孝憲, 山口明夫他: 大腸癌における Prokineticin1 因子の作用と新規治療への

可能性. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014,7,10-11

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

発明の名称:

(1) 抗 PROK1 抗体による大腸癌の治療

発明者: 山口明夫、五井孝憲、中澤俊之、呉林秀崇

平成 25 年 9 月 10 日申請,

特許願 2013-273139

(2) 抗 PROK1 抗体と抗 VEGF 抗体併用による大腸癌の治療:

発明者: 山口明夫、五井孝憲、中澤俊之、呉林秀崇

平成 25 年 9 月 10 日申請,

特許願 2013-273140

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

五井 孝憲 (Goi Takanori)

福井大学・医学部・准教授

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