

学位論文 (博士)

High serum proteinase-3 levels predict poor progression-free survival and lower efficacy of bevacizumab in metastatic colorectal cancer

(転移性大腸癌における血清 proteinase-3 高値は無増悪生存期間不良と bevacizumab の有効性低下を予測する)

氏名 古谷 圭

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和6年5月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	5
3. 方法	8
4. 結果	15
5. 考察	20
6. 結語	24
7. 謝辞	25
8. 参考文献	26

1. 要旨

背景：転移性大腸癌 (mCRC) 患者の予後を改善するには、予後や化学療法の感受性を予測するバイオマーカー探索が必要である。本研究は、mCRC における予後および化学療法、特に bevacizumab 療法に対する感受性の予測因子としての血清 proteinase-3 (PRTN3) の臨床的意義を解析することを目的とした。

方法：単施設、後方視的研究である。当院で治療した mCRC 患者 79 例と TCGA データベースの大腸癌患者 353 例を登録した。術前の血清 PRTN3 値は酵素結合免疫吸着法を用いて測定した。血清 PRTN3 値による臨床病理学的特徴及び予後を評価した。

切除標本の腫瘍細胞および間質細胞における PRTN3 の発現を免疫組織学的に評価した。PRTN3 値が血管新生及び bevacizumab 感受性に及ぼす影響は tube 形成アッセイを用いて評価した。

結果：血清 PRTN3 値は、mCRC 患者における無増悪生存期間 (PFS) の独立した予後不良因子であった (ハザード比、2.082 ; 95%信頼区間、1.118-3.647 ; P=0.010) 。同様に、TCGA データベースによる予後解析では、PRTN3 が発現している患者では発現していない患者よりも全生存期間が短く、特にステージ IV の患者において顕著であった。切除標本の免疫組織化学的解析から、間質の好中球が PRTN3 を発現しており、その発現レベルは血清 PRTN3 値と有意に相関していた。興味深いことに、血清 PRTN3 高値群では一次化学

療法の効果が有意に不良であった。抗血管新生阻害剤である bevacizumab による治療を受けた患者において、血清 PRTN3 高値は PFS 不良と有意に関連していた（ハザード比、3.027 ; 95%信頼区間、1.175-7.793 ; P=0.0161）。tube 形成アッセイにより、PRTN3 は血管新生を顕著に増強し、同時に bevacizumab 治療による血管新生阻害作用を減弱させることが明らかになった。

結語：血清 PRTN3 値は、mCRC 患者における一次化学療法、特に bevacizumab 療法の PFS の新規予測バイオマーカーとなりうる。

2. 研究の背景

大腸癌（CRC）は世界で3番目に多い癌であり、全癌症例の約10%を占め、癌関連死因の第2位である。2040年までに予測されるCRCの統計では、罹患率と死亡率が著しく上昇する傾向にある。その危険因子には、肥満、喫煙、過度の飲酒などの不健康な生活習慣が含まれ、生存率を向上させるためには、適時の診断、適切な治療、定期的な経過観察が必要である [1]。CRCの治療は、進行度に基づいて行われる。転移性CRC（mCRC）に対する標準治療は、化学療法、免疫療法、手術を含む集学的アプローチである [2-4]。さらに、mCRCの生存率を改善するためには、化学療法の治療効果を高める必要がある。Bevacizumab（Bev）などの抗血管内皮増殖因子（VEGF）モノクローナル抗体（mAbs）と細胞傷害性薬剤の併用による相加効果または相乗効果により、化学療法に対する抵抗性が克服されることが示されている [5]。このメカニズムに関する第一の仮説は、血管内皮に対する抗VEGF mAbsのプロアポトーシス効果を強める細胞毒性剤の直接的な抗血管作用である [6]。もう一つの仮説は、抗VEGF mAbsによる腫瘍血管の正常化によって、細胞毒性薬剤や抗体の取り込みが増加するというものである [5, 7]。抗VEGF mAbs、特にBevは、現在mCRCに対する標準治療である [2]。化学療法にBevを併用すると、化学療法にプラセボを併用した場合よりもPFSが有意に延長し（PFS中央値：9.4カ月 対 8.0カ月）、奏効率は約40%であった [8]。Bev療法に関連するグレード3/4の有害事象の全発生率

は 16%であった。これらの有害事象には、高血圧、蛋白尿、消化管穿孔、脳卒中が含まれる [8]。Bev 療法が有効でない患者もいることを考えると、化学療法感受性を予測するバイオマーカーを用いて化学療法レジメンの効果を最適化するというアプローチもある。しかし、臨床において化学療法の選択を決定するバイオマーカー（例えば、RAS 遺伝子変異、UGT1A1 多型など）はごくわずかしか同定されていない [2, 9]。さらに、これらのバイオマーカーの中には侵襲的な測定を必要とするものもある。さらに、Bev 療法に対する反応性の予測バイオマーカーを探索するための広範な研究が行われているにもかかわらず、Bev 療法に関連する臨床的および生物学的因子は同定されていない [10]。したがって、現在利用可能なバイオマーカーよりも予測性が高く、侵襲性の低いバイオマーカーを探索する必要がある [11-14]。

我々は以前、包括的プロテオミクス解析によって CRC の予後バイオマーカーを探索した [15-17]。Protainase-3 (PRTN3) は好中球由来およびセリンプロテアーゼファミリーに属し、アズロフィル顆粒内に貯蔵されている [18]。PRTN3 は、好中球の分化や増殖、炎症、血管炎 [19, 20] に関与しており、またマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を通じて腫瘍細胞や内皮細胞の浸潤にも関与している [21, 22]。さらに、腫瘍組織における PRTN3 の発現は、いくつかの癌腫において予後不良と関連している [23-25]。しかしながら、血清 PRTN3 値と CRC との関係はまだ不明である。そ

ここで本研究では、mCRC における化学感受性および予後の予測因子としての血清 PRTN3 の臨床的意義を解析することを目的とした。

3. 方法

研究デザインと患者

本研究は、単一施設の後方視的観察研究である。2008年1月から2019年12月までに、当院で治療したmCRC患者から79例の治療前血清検体を採取し、使用するまで-80℃で保存した。化学療法前に手術を受けた48例のうち、48例の原発性腫瘍と5例の転移性肝腫瘍が手術により採取された。フローサイトメトリー分析用の末梢全血検体は、上記79例とは別のmCRC患者12人から採取した(図1)。治療効果を評価するために2-3ヵ月ごとにコンピュータ断層撮影を行った。化学療法の有効性は、根治切除を行わなかった患者では1次化学療法中の残存する標的病変を調べることによって評価し、根治切除を行った患者ではRECIST(ver1.1)に従って術前化学療法中に有効性を評価した。

本研究は、山口大学医学部附属病院倫理委員会の承認(H20-102、H23-135、H28-074)を受け、ヘルシンキ宣言に従って実施された。

血清および腫瘍組織の包括的プロテオミクス解析

mCRC患者24名の治療前血清および腫瘍組織溶解液中のタンパク質レベルの包括的解析は、SOMAscan(Soma Logic, Boulder, CO)を用いて、製造元のプロトコール(Soma Logic)に従って行った[15, 16]。要約すると、凍結CRCサンプル中の総タンパク質は、Qiagen Tissue Lyser(Qiagen

Scientific、東京、日本) を用いて、Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific、神奈川、日本) を添加することにより定量した。サンプルは Soma Logic に送られ、SOMAscan アッセイを用いて分析された。SOMAscan の測定値は相対蛍光単位で表示される。

The Cancer Genome Atlas データベースを用いた PRTN3 遺伝子発現と mCRC 予後との関係の解析

353 人の CRC 患者の転写情報および対応する臨床情報を The Cancer Genome Atlas (TCGA) [26] から入手した。生存曲線解析は、PRTN3 発現群と非発現群について行った。

血清 PRTN3 濃度の測定

血清 PRTN3 濃度は、ヒト PRTN3 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) キット (ab226902; Abcam, 東京, 日本) を用い、製造元の指示に従って測定した。洗浄後、各ウェルに TMB 展開液 100 μ l を加え、10 分間インキュベートした。停止液 100 μ l を加えた後、波長 450 nm で吸光度を測定した。吸光度は EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。ストックスタンダードについて標準曲線を作成した。このアッセイの感度は 150 pg/ml であった。スタンダード、コントロール、サンプルはすべて二重測定した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学 (IHC) は、厚さ $4\mu\text{m}$ のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて行った。切片をキシレンおよびアルコールで脱パラフィンし、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (Agilent Technologies、東京、日本) を用いて pH=6.0、 95°C で 20 分間抗体活性化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキング溶液 (S2023; Agilent Technologies) で 5 分間ブロッキングし、続いて非特異的反応を室温 (24°C) で 10 分間ブロッキングし (X0909; Agilent Technologies)、ウサギ抗ヒト PRTN3 抗体 (EPR6277, Abcam; 希釈度 1:200) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。

洗浄後、切片を適切な二次抗体 (K4003 ; Agilent Technologies ; 原液) と室温 (24°C) で 30 分間インキュベートした。DAB (Agilent Technologies) を製造元のプロトコールに従って使用し、切片と 3 分間反応させた。ヘマトキシリンで造影染色を行い、脱水後にサンプルを密封した。画像はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE、大阪、日本) を用いて得た。組織サンプルにおける PRTN3 の発現は、患者の転帰について盲検化された病理専門医と治験責任医師によって評価された。腫瘍細胞に焦点を当て、PRTN3 発現の半定量的評価は、複合発現スコア (CES) を用いて行った [27]。

$\text{CES} = 4 \times (\text{強度スコア} - 1) + \text{頻度スコア}$ 。強度スコア： 0 (陰性)、1 (弱陽性)、2 (中等度陽性)、3 (強陽性)。頻度スコアは以下の通り： 1 (5~

24%)、2 (25~49%)、3 (50~74%)、4 (75~100%)。

間質細胞における PRTN3 発現の解析のために、各スライド上の陽性細胞が最も多い 5 つの領域を 400 倍の高倍率視野下で撮影し、陽性間質細胞数を計測した。

免疫蛍光染色

4 μ m 厚の FFPE 切片を用いて免疫蛍光を行った。脱パラフィン後、抗原活性化 (pH 6.0、95°C、20 分) し、非特異的反応をブロックした。切片を抗ヒト PRTN3 抗体 (IHC と同じ希釈率)、抗 CD3 抗体 (17A2、Thermo Fisher Scientific、希釈率 1:100)、抗 CD68 抗体 (PG-M1、Abcam、希釈率 1:400)、抗 CD66b 抗体 (G10F5、Novus Biologicals、Centennial、CO、希釈率 1:200) と 4°C で一晩インキュベートした。その後、切片を二次抗体混合液 (抗マウス Alexa Fluor 488; Thermo Fisher Scientific; 希釈度 1:1000、抗ウサギ Alexa Fluor 555; Thermo Fisher Scientific; 希釈度 1:1000) と室温で 40 分間インキュベートした。その後、核対比染色のために DAPI で染色した。画像は All-in-one 蛍光顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE) を用いて得た。

フローサイトメトリー

新鮮末梢血 (100 μ l) を EDTA-抗凝固チューブに採取し、抗 PRTN3 抗体 (PR3G-2、Abcam; 原液) および抗 CD66b 抗体 (G10F5、BioLegend、San Diego、CA

;原液) を用いて、製造元のプロトコールに従い、室温、暗所で 30 分間反応させた。赤血球を溶解液 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で暗所、室温 (24°C) で 10 分間溶解し、1500rpm で 10 分間遠心した。その後、細胞を PBS で洗浄した。最後に、細胞を 500 μ l の cell FIX (BD Biosciences ; 希釈度 1 : 10) に再懸濁した。フローサイトメトリーデータは、NovoCyte フローサイトメーター (ACEA Biosciences, San Diego, CA) と NovoExpress ソフトウェア (version1.3.0, ACEA Biosciences) を用いて取得し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

Tube 形成アッセイ

Tube 形成アッセイは血管新生および、特定の細胞株や VEGF などの因子が血管新生に及ぼす影響を評価するため用いられている [28] 。内皮チューブ形成キット (Cell Biolabs, San Diego, USA) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Takara、東京、日本) 2.5×10^4 個と培地 150 μ L を 1 ウェルに添加した。PRTN3 と Bev の併用添加は、PRTN3 の血管新生能を評価し、PRTN3 が Bev 療法の抗血管新生作用を克服できるかどうかを確認するために行った。PRTN3 濃度は血清カットオフ値 (21.6ng/ml) を含むように 10 倍間隔で設定され、Bev 濃度は 1 つだけ設定された。簡単に説明すると、PRTN3 (RPB434Hu02、Cloud Clone Corp.、米国) を最終濃度 0、1、10、100、1000ng/mL となるようにそれぞれ添加し、Bev

(中外製薬、東京、日本) を最終濃度 0 または 2.5mg/mL となるように各ウェルに添加した。37°C、5% CO₂ で 2 時間培養後、蛍光顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE 社製) を用いて分枝数と面積を評価した。

統計解析

血清 PRTN3 のカットオフ値は、時間依存の受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を用いて決定した。Mann-Whitney U 検定を用いて、CES、IHC による間質中の PRTN3 陽性細胞数と血清中 PRTN3 陽性細胞数の相対値、フローサイトメトリーによる PRTN 陽性細胞数と CD66b 陽性細胞数の相対値、Tube 形成アッセイにおける Bev の有無による分枝数と面積の相対値などの群間差を検討した。チューブ形成の群間差は、Kruskal-Wallis 検定、Steel-Dwass 検定を用いて推定した。カテゴリ変数はカイ二乗検定を用いて比較した。全生存期間 (OS) は、初診日から死亡日までとした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、log-rank 検定を用いて比較した。Cox の比例ハザードモデルを用いてハザード比 (HR) を推定し、単変量解析および多変量解析を行った。予後を評価するための単変量解析に含まれる変数は以下の通りであった：PRTN3 値、年齢、性別、WBC 値、好中球数、腫瘍マーカー値、TNM ステージ、根治切除の有無である。さらに、多変量解析に選択された変数は、単変量解析の p 値が 0.10 未満のものを使用した。初回化学療法における無増悪生存期間 (PFS) は、初回化学療法実施日から進行または死亡日までの

間隔と定義した。統計解析はすべて JMP Pro16 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

4. 結果

mCRC 予後予測マーカーとしての PRTN3 の同定

タンパク質包括的プロテオミクス解析をmCRC患者24名の血清および組織検体で施行し、予後良好群（OS \geq 3年）と予後不良群（OS $<$ 2年）はそれぞれ9例と11例であった。Fisher比によってランク付けされた予後予測候補タンパク質を補足表1に示す。Myeloperoxidaseは血清中の予後予測候補蛋白の1位であったが、すでにCRCの予後と関連することが報告されていた[29]。mCRCに対する新規の役割を見出すことは困難と推定されたため、今回の候補タンパク質から除外された。血清中の2番目の候補蛋白であるPRTN3の発現は、予後不良群で予後良好群より有意に高かった（ $P<0.001$ ）。それより下位の他の候補蛋白はmCRC患者の予後マーカーとして知られていたため、解析から除外した[30-32]。さらに、PRTN3も組織サンプル中の上位10タンパク質の1つであった。

図2は、TCGAデータベース解析における腫瘍組織中のPRTN3発現とCRC予後との関係を示している。すべての病期のCRC患者において、発現群では非発現群に比べてOSが有意に不良であった（ $P=0.0017$ ）（図2a）。ステージI-IIIではOSに有意差はなかったが、ステージIVではOSに有意差があった（ $P=0.0328$ 、図2b-e）。これらの結果は、PRTN3がmCRCの予後と関連している可能性を示唆している。そこで、我々はPRTN3をmCRCの予後予測マーカーとして注目した。

血清 PRTN3 高値： mCRC における予後不良指標

治療前の mCRC 患者 79 名の血清 PRTN3 値を ELISA 法で測定した。高発現群 (21.6ng/ml 以上) は 45 人、低発現群 (21.6ng/ml 未満) は 34 人であった。腫瘍マーカー、TNM 分類、組織型、化学療法の内容や外科的処置を含む治療介入に関して、群間に有意差はなかった (表 1)。PRTN3 は好中球関連蛋白質であるが、好中球数には両群間に差はなかった。さらに、PFS は PRTN3 高発現群で低発現群より有意に不良であった (HR、2.173; 95%CI、1.269-3.723 ; P=0.037、図 3a)。血清 PRTN3 高発現 (HR、2.082 ; 95%CI、1.188-3.647 ; P=0.010) は、多変量解析によると、予後不良の独立した危険因子であった (表 2)。生存曲線解析では OS に有意な群間差は認められなかったが、高発現群では低発現群に比べて 2 年生存率が有意に不良であった (50.4% vs 78.7% ; HR、3.095 ; 95%CI、1.331-7.197 ; P=0.009、図 3b)。多変量解析では、高血清 PRTN3 発現 (HR、4.531 ; 95%CI、1.569-13.085 ; P=0.005)、N 因子 (HR、1.572 ; 95%CI、1.056-2.339 ; P=0.026)、および根治的切除の有無 (HR、0.133 ; 95%CI、0.046-0.383 ; P<0.001) は、不良な 2 年生存の独立した危険因子であった (表 3)。これらの所見から、血清 PRTN3 値の高値は PFS 不良と関連し、それが mCRC 患者の 2 年生存率不良と関連している可能性が示された。

血清 PRTN3 値は好中球における間質 PRTN3 発現と相関する

IHC 解析の結果を図 4 に示す。原発性腫瘍では PRTN3 が癌細胞と間質細胞の両方で発現していることを示した。血清 PRTN3 値は、癌細胞における PRTN3 発現の程度とは相関しなかった (図 4b)。一方、間質中の PRTN3 陽性細胞数は、血清 PRTN3 高値群の方が血清 PRTN3 低値群よりも有意に多かった ($P=0.0051$ 、図 4c、d)。同様の結果が転移性腫瘍(肝)でも観察された ($P=0.035$ 、図 4e、f)。間質中の PRTN3 陽性細胞数による解析では、OS は高値群と低値群で有意差はなかった。しかしながら、間質中の PRTN3 陽性細胞数が多いことは PFS 不良と関連していた (HR, 2.020; 95%CI, 0.962-4.243; $P=0.063$ 、補足図 1)。PRTN3 の発現に関しては、そのほとんどが好中球 (CD66b) に発現し、リンパ球 (CD3) やマクロファージ (CD68) にはほとんど発現しなかった (図 5)。

末梢血好中球からの PRTN3 発現は血清レベルと相関しない

末梢血細胞のフローサイトメトリー解析を図 6 に示す。図 6a は、生細胞の CD66b/PRTN3 染色とゲーティングの代表図を示している。ほぼすべての PRTN3 陽性細胞が CD66b を発現していた (図 6b)。一方、PRTN3 は CD66b 陽性細胞の中央値 30.6% (9.81-51.1%) に発現していた (図 6c)。これらの結果から、PRTN3 は一部の好中球にのみ発現していることが示唆される。しかしながら、PRTN3 陽性好中球の数と血清 PRTN3 値との間には有意な相関は

認められなかった (図 6d) 。フローサイトメトリー解析の対象となった 12 人の患者のうち、8 人は化学療法を受けていた (補足表 2) 。このコホートは小規模であるが、血清 PRTN3 値が高い群では低い群に比べて PFS が有意に不良であった ($P=0.043$ 、図 6e) 。

血清 PRTN3 値と化学療法効果(特に bevacizumab サブグループ)との関連

血清 PRTN3 値と化学療法感受性との関連に関しては、血清 PRTN3 値が高い患者では低い患者よりも化学療法の有効性が低かった (表 4) 。さらに、Bev の使用によるサブグループ解析では、化学療法の有効性は Bev の使用に係なく有意に異なることが示された (表 4) 。一方で、PFS は、Bev サブグループにおいてのみ、血清 PRTN3 高値群と低値群で有意差を認めた (HR、3.027 ; 95%CI、1.175-7.793 ; $P=0.0161$ 、図 7) 。Bev サブグループでは RAS 変異の頻度が高く ($P<0.001$) 、CA19-9 発現レベルが高い ($P=0.008$) ことが観察されたが、これらの因子は Bev 投与群および Bev 非投与群で PFS と有意に関連しなかった ($P=0.8638$ および $P=0.1234$) (補足表 3 および補足図 2) 。

PRTN3 は Tube 形成を促進する

PRTN3 が血管新生を促進し、PRTN3 が Bev 抵抗性に関与しているという仮説を支持するために、tube 形成アッセイを施行した。PRTN3 投与は濃度依存

的に tube 形成を促進した。一方、Bev はチューブ形成を阻害したが、PRTN3 の投与によりこの阻害効果は消失した (図 8)。

5. 考察

本研究は、mCRC 患者における血清 PRTN3 値の重要性を初めて報告したものである。我々は、血清 PRTN3 高値が、PFS 増悪（図 3、表 2）および化学療法、特に Bev 化学療法に対する反応性不良と関連することを見出した（図 7、表 4）。さらに、Tube 形成アッセイにより、PRTN3 発現と Bev に対する感受性の関係が確認された（図 8）。これらの結果は、PRTN3 が mCRC 患者の Bev 療法に対する反応を反映することにより、PFS の予測バイオマーカーとなりうることを支持するものである。このことは、宿主因子や腫瘍血管新生に影響する様々な因子の一部起因している可能性がある。本研究の TCGA データベース解析では、PRTN3 の発現状態によってステージ IV 患者のみの予後が異なることが示された（図 2）。ステージ I-III の CRC 患者の詳細な情報は TCGA データベースから得られなかったが、この結果は、ステージ IV の CRC 患者には化学療法、特に Bev が投与されたことに起因する可能性がある。これは血清 PRTN3 値が Bev 治療の反応性と関連するという我々の仮説を支持するものである。TCGA データベースの様々な癌種を解析した結果、胃癌において PRTN3 発現群では全生存期間が短縮していた（補足図 3）。この結果は、同様の機序を持つ抗 VEGF 受容体抗体 Ramucirumab の効果を予測する上でも有効であると考えている。我々の研究は主に mCRC に焦点を当てているが、これらの予備的知見は、血管新生と化学療法反応における PRTN3 の役割が、ステージ I-III の CRC 患者、他の癌種、および血管新生を標的

とする他の薬剤にも及ぶ可能性を示唆している。しかし、この仮説を検証するためにはさらなる研究が必要である。

我々は、PRTN3 が mCRC 患者の末梢血好中球および間質好中球に発現していることを見出した (図 4-6)。PRTN3 は、血管新生と腫瘍浸潤に関与する matrix metalloproteinases (MMP)-2 の活性化を促進する [21, 22]。さらに、PRTN3 は IL-32 によって活性化され、プロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) シグナルを誘導する [33, 34]。IL-32-PRTN3-PAR2 軸の下流経路の一つは Ras-Raf 経路であり、血管新生に関与している [33, 35, 36]。VEGF とその受容体シグナル伝達の下流にある Ras-Raf 経路は腫瘍の血管新生に関与しており、この経路を標的とした治療法は mCRC の治療によく用いられている [5, 37]。Schiffmann らは、間質に CD177 陽性好中球が多いことが、mCRC に対する Bev 化学療法に対する反応性の低さと関連し、予後不良につながることを報告している [38]。これらの報告は、PRTN3 が腫瘍血管新生の重要な制御因子であり、したがって Bev 反応性の予測バイオマーカーとなりうるという我々の所見を支持するものである。

我々の研究では、血清 PRTN3 値は間質中の PRTN3 陽性細胞数と有意に関連しており、PRTN3 陽性細胞のほとんどが好中球であった (図 4, 5)。したがって、PRTN3 は間質の好中球機能に関与している可能性があると考えられた。腫瘍関連好中球が腫瘍の血管新生に関与していることを考慮すると [39]、好中球関連血管新生と Bev 感受性との間に存在する関係の可能性は、

今後調査されるべきである。

現在、Bev を使用した化学療法は mCRC の標準治療である。しかし、Bev に対する耐性が治療奏効の大きな障害となっている [10]。したがって、Bev に対する反応性を予測するバイオマーカーと、Bev に対する耐性を克服するための新しい戦略が必要である。本研究では、PRTN3 が Bev の治療効果に影響を及ぼす可能性があることを見出した (表 4、図 7 および 8)。血清 PRTN3 値は、Bev 治療の有効性を予測する上で有益であり、それに応じて最適な化学療法レジメンの選択を容易にする可能性がある。PRTN3 値は、MMP を介して血管新生を促進することが報告されており [21, 22]、PRTN3 による血管新生が Bev による血管新生抑制効果を上回り、化学療法抵抗性をもたらす可能性があるため、化学療法反応性の独立した予測因子となりうる。加えて、我々のサブグループ解析では、血清 PRTN3 高値の患者では Bev 治療の有効性は観察されなかった。一方で、血清 PRTN3 低値の患者では、Bev を投与した患者は Bev を投与していない患者に比べて生存期間が改善する傾向を示した (補足図 4)。

サンプルサイズが小さいことがサブグループ解析の結果に影響を及ぼしているが、これらの所見は、血清 PRTN3 値が Bev 投与の決定に影響を及ぼす可能性を示唆している。とはいえ、臨床試験やより大規模な患者コホートによるさらなる検証が必要であるため、これらの結果を慎重に解釈することの重要性を強調する。さらに、たとえ VEGF が阻害されたとしても、PRTN3

によって刺激される他の経路の活性化が、化学療法に対する抵抗性をもたらすかもしれない。我々の Tube 形成アッセイの結果はこの仮説を支持するものである。PRTN3 はセリンプロテアーゼファミリーの一員であり、その阻害は急性肺損傷など様々な状況で有望視されており、PAR2 のアンタゴニストは変形性関節症との関連で研究されている [40, 41]。PRTN3 とそのバイオマーカーの同定は、治療の最適化を可能にするかもしれない。さらに、セリンプロテアーゼ阻害剤や PAR2 拮抗剤などの PRTN3 拮抗剤は、Bev に対する抵抗性を克服するのに役立つかもしれない。これらの可能性のある治療法を研究するためには、今後の研究が必要である。

この研究にはいくつかの限界がある。後方視的で単一施設でのデザインであること、サンプルサイズが小さいこと、また研究期間中に化学療法が進歩したことである。これらの限界は、本研究で得られた知見の一般化に影響を及ぼす可能性がある。CRC 細胞株と好中球を用いた PRTN3 の腫瘍血管新生に対する作用の根底にある分子的・細胞的機序の解析、および PRTN3 と間質好中球との関係の解析をさらに進め、我々の結果を確認する必要がある。

6. 結語

血清 PRTN3 値は、mCRC 患者における一次化学療法での PFS の新規予測バイオマーカーとなりうる。加えて、血清 PRTN3 値は Bev 療法の有効性を予測しうる。

7. 謝辞

本研究にご協力いただいた山口大学医学部附属病院の患者およびスタッフの方々に感謝する。

8. 参考文献

1. World Health Organization. Colorectal cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>. Accessed 13 Dec 2023.
2. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: A JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol* 2018;29:44-70. doi:10.1093/annonc/mdx738
3. Margonis GA, Vauthey JN. Precision surgery for colorectal liver metastases: Current knowledge and future perspectives. *Ann Gastroenterol Surg* 2022;6:606-615. doi:10.1002/ags3.12591
4. Ogawa H, Yajima T, Sohda M, Shirabe K, Saeki H. Role of surgical resection and its alternative local therapy for pulmonary metastasis of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 2021;5:747-753. doi:10.1002/ags3.12472
5. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell* 2019;176:1248-1264. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021
6. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A

- et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 2006;108:4109-4117. doi:10.1182/blood-2006-01-023127
7. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62. doi:10.1126/science.1104819
8. Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol* 2023;41:3663-3669. doi:10.1200/JCO.22.02760.
9. Lin PS, Semrad TJ. Molecular testing for the treatment of advanced colorectal cancer: An overview. *Methods Mol Biol* 2018;1765:281-297. doi:10.1007/978-1-4939-7765-9_18
10. Huang M, Lin Y, Wang C, Deng L, Chen M, Assaraf YG et al. New insights into antiangiogenic therapy resistance in cancer: Mechanisms and therapeutic aspects. *Drug Resist Updat* 2022;64:100849. doi:10.1016/j.drug.2022.100849
11. Kitahara M, Hazama S, Tsunedomi R, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y et al. Prediction of the efficacy of immunotherapy by

measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. *Cancer Sci* 2016;107:1825-1829. doi:10.1111/cas.13085

12. Hazama S, Tamada K, Yamaguchi Y, Kawakami Y, Nagano H. Current status of immunotherapy against gastrointestinal cancers and its biomarkers: Perspective for precision immunotherapy. *Ann Gastroenterol Surg* 2018;2:289-303. doi:10.1002/ags3.12180

13. Kono K. Advances in cancer immunotherapy for gastroenterological malignancy. *Ann Gastroenterol Surg* 2018;2:244-245. doi:10.1002/ags3.12184

14. Kijima T, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, Takenouchi H, Kanekiyo S et al. MicroRNA-6826 and -6875 in plasma are valuable non invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2017;37:23-30. doi:10.3892/or.2016.5267

15. Nakashima-Nakasuga C, Hazama S, Suzuki N, Nakagami Y, Xu M, Yoshida S et al. Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2020;25:1308-1317. doi:10.1007/s10147-020-01673-2

16. Yamada K, Hazama S, Suzuki N, Xu M, Nakagami Y, Fujiwara N et al. Siglec-7 is a predictive biomarker for the efficacy of cancer

vaccination against metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett* 2021;21:10. doi:10.3892/ol.2020.12271

17. Chidimatsu H, Tsunedomi R, Nakagami Y, Xu M, Nakajima M, Nakashima-Nakasuga C et al. Serum CCL7 is a novel prognostic biomarker of metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2023;43:105-114. doi:10.21873/anticancer.16139

18. Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* 1990;85:904-915. doi:10.1172/JCI114518

19. van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG. Proteinase 3, Wegener's autoantigen: From gene to antigen. *J Leukoc Biol* 2001;69:177-190

20. Ge S, Zhu X, Xu Q, Wang J, An C, Hu Y et al. Neutrophils in ANCA-associated vasculitis: Mechanisms and implications for management. *Front Pharmacol* 2022;13:957660. doi:10.3389/fphar.2022.957660

21. Shamamian P, Pocock BJ, Schwartz JD, Monea S, Chuang N, Whiting D et al. Neutrophil-derived serine proteinases enhance membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent tumor cell invasion.

Surgery 2000;127:142-147. doi:10.1067/msy.2000.101155

22. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG et al. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001;189:197-206. doi:10.1002/jcp.10014

23. Hu D, Ansari D, Zhou Q, Sasor A, Said Hilmersson K, Andersson R. Low P4HA2 and high PRTN3 expression predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Scand J Gastroenterol* 2019;54:246-251. doi:10.1080/00365521.2019.1574360

24. Wei Z, Wu B, Wang L, Zhang J. A large-scale transcriptome analysis identified ELANE and PRTN3 as novel methylation prognostic signatures for clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Physiol* 2020;235:2582-2589. doi:10.1002/jcp.29162

25. Fatalaska A, Rusetska N, Bakuła-Zalewska E, Kowalik A, Zięba S, Wroblewska A et al. Inflammatory proteins HMGA2 and PRTN3 as drivers of vulvar squamous cell carcinoma progression. *Cancers (Basel)* 2020;13. doi:10.3390/cancers13010027

26. The Cancer Genome Atlas database. PanCancer Atlas. <https://portal.gdc.cancer.gov/> Accessed 13 Dec 2023.

27. Wang J, Wang X, Guo Y, Ye L, Li D, Hu A et al. Therapeutic targeting of SPIB/SPI1-facilitated interplay of cancer cells and neutrophils inhibits aerobic glycolysis and cancer progression. *Clin Transl Med* 2021;11:e588. doi:10.1002/ctm2.588
28. Stryker Z, Rajabi M, Davis P, Mousa SA. Evaluation of Angiogenesis Assays. *Biomedicines* 2019;7:37. doi:10.3390/biomedicines7020037
29. Weng M, Yue Y, Wu D, Zhou C, Guo M, Sun C et al. Increased MPO in colorectal cancer is associated with high peripheral neutrophil counts and a poor prognosis: A TCGA with propensity score-matched analysis. *Front Oncol* 2022;12:940706. doi:10.3389/fonc.2022.940706
30. Kemik O, Sumer A, Kemik AS, Hasirci I, Purisa S, Dulger AC et al. The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer. *World J Surg Oncol* 2010;8:85. doi: 10.1186/1477-7819-8-85
31. Zhou JM, Jiang H, Yuan T, Zhou GX, Li XB, Wen KM. High hnRNP AB expression is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 2019;18:6459-6468. doi: 10.3892/ol.2019.11034
32. Ishigami SI, Arie S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto

- M et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;78:1379-1384. doi: 10.1038/bjc.1998.688
33. Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Ikegami H, Toyama Y et al. IL-32-PAR2 axis is an innate immunity sensor providing alternative signaling for LPS-TRIF axis. *Sci Rep* 2013;3:2960. doi:10.1038/srep02960
34. Novick D, Rubinstein M, Azam T, Rabinkov A, Dinarello CA, Kim SH. Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3316-3321. doi:10.1073/pnas.0511206103
35. Kawaguchi M, Yamamoto K, Kataoka H, Izumi A, Yamashita F, Kiwaki T, Nishida T, Camerer E, Fukushima T. Protease-activated receptor-2 accelerates intestinal tumor formation through activation of nuclear factor- κ B signaling and tumor angiogenesis in *ApcMin/+* mice. *Cancer Sci* 2020;111:1193-1202. doi:10.1111/cas.14335
36. Pawar NR, Buzza MS, Antalis TM. Membrane-anchored serine proteases and protease-activated Receptor-2-Mediated signaling: Co-conspirators in cancer progression. *Cancer Res* 2019;79:301-310. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1745
37. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial

growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:385-403.

doi:10.1038/nrd.2015.17

38. Schiffmann LM, Fritsch M, Gebauer F, Günther SD, Stair NR, Seeger JM, Thangarajah F, Dieplinger G, Bludau M, Alakus H, Göbel H. Tumour-infiltrating neutrophils counteract anti-VEGF therapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2019;120:69-78.

doi:10.1038/s41416-018-0198-3

39. Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonecchi R, Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 2020;20:485-503.

doi:10.1038/s41568-020-0281-y

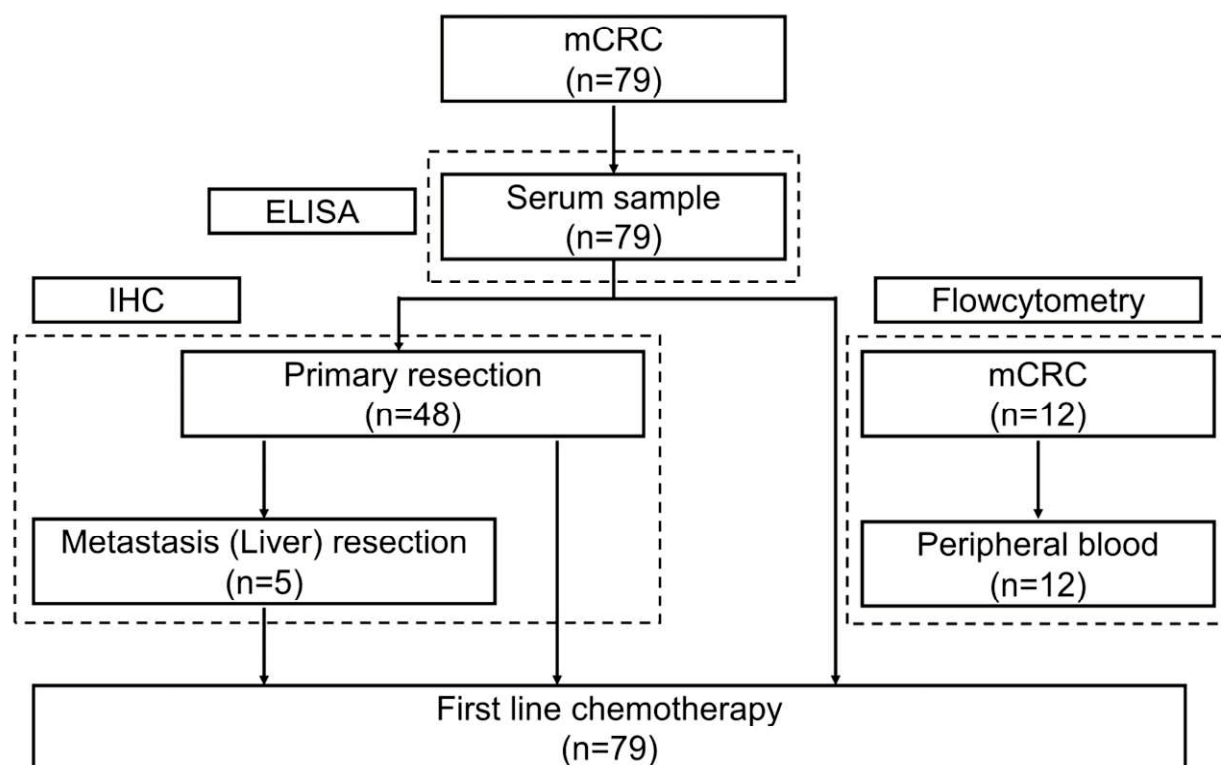
40. Hwang TL, Wang WH, Wang TY, Yu HP, Hsieh PW. Synthesis and pharmacological characterization of 2-aminobenzaldehyde oxime analogs as dual inhibitors of neutrophil elastase and proteinase 3.

Bioorg Med Chem 2015;23:1123-1134. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.056.

41. Huang X, Ni B, Xi Y, Chu X, Zhang R, You H. Protease-activated receptor 2 (PAR-2) antagonist AZ3451 as a novel therapeutic agent for osteoarthritis. *Aging (Albany NY)* 2019;11:12532-12545.

doi:10.18632/aging.102586.

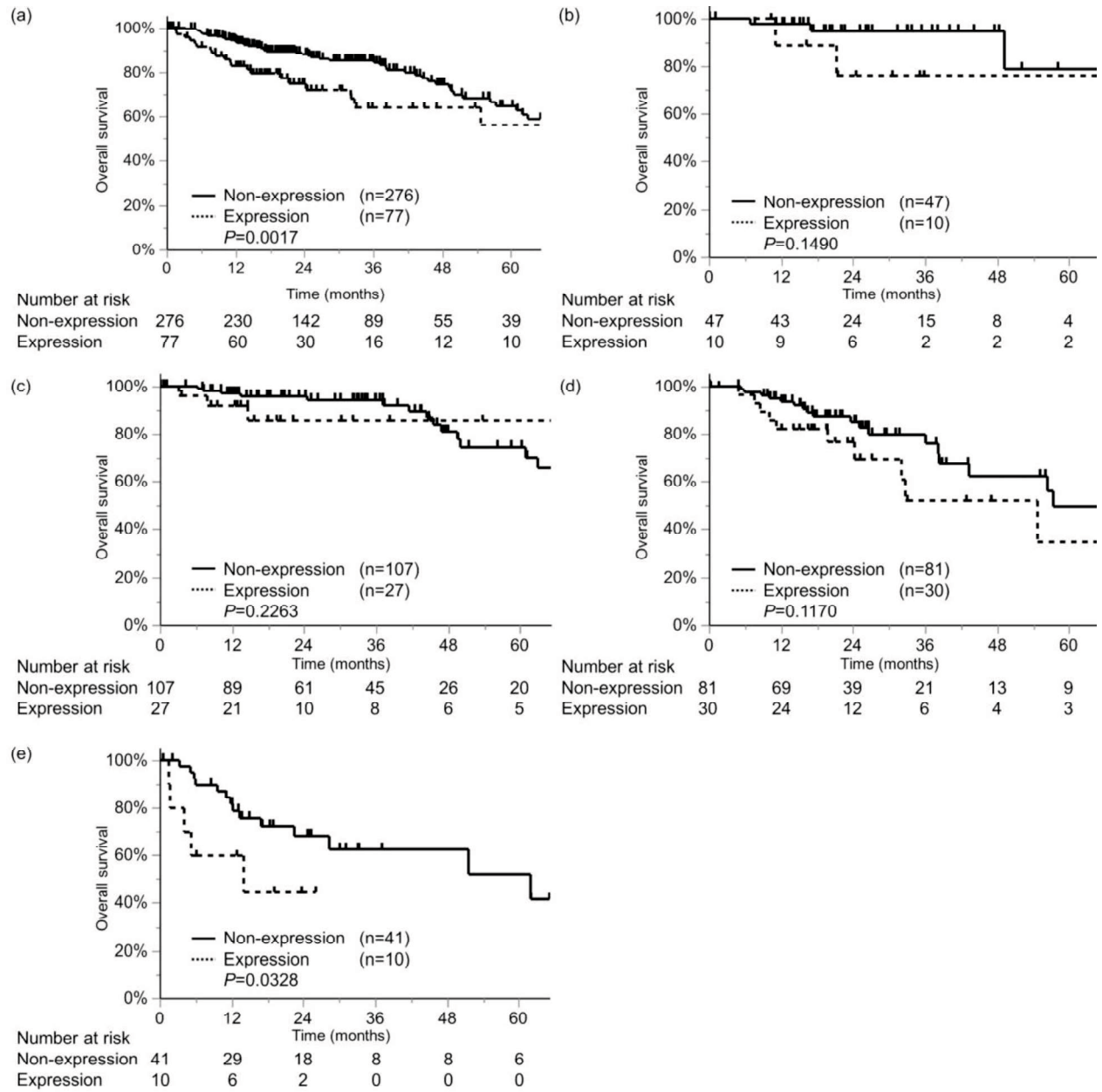
図 1 .



本研究のフローチャート

合計 79 人の mCRC 患者が登録された。患者の治療前血清を用いて ELISA で血清 PRTN3 値を測定した。全 79 例から切除された化学療法前の 48 例の原発性腫瘍と 5 例の転移性腫瘍(肝)の組織検体を用いて免疫染色をした。全 79 例の血清 PRTN3 値の予後への影響および一次化学療法の有効性との関連を検討した。mCRC 患者 12 人の治療前末梢血全血検体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

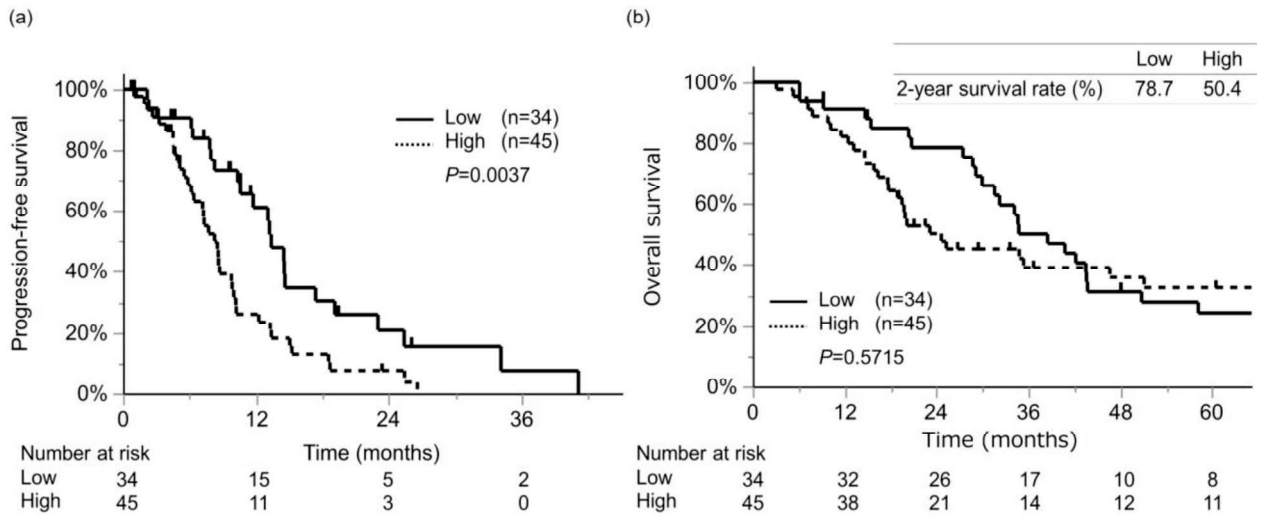
図 2.



The Cancer Genome Atlas データベースの PRTN3 発現による CRC 患者の生存曲線解析

患者は PRTN3 の発現/非発現により 2 群に分けた。(a) 全患者 (b) Stage I (c) Stage II (d) Stage III (e) Stage IV

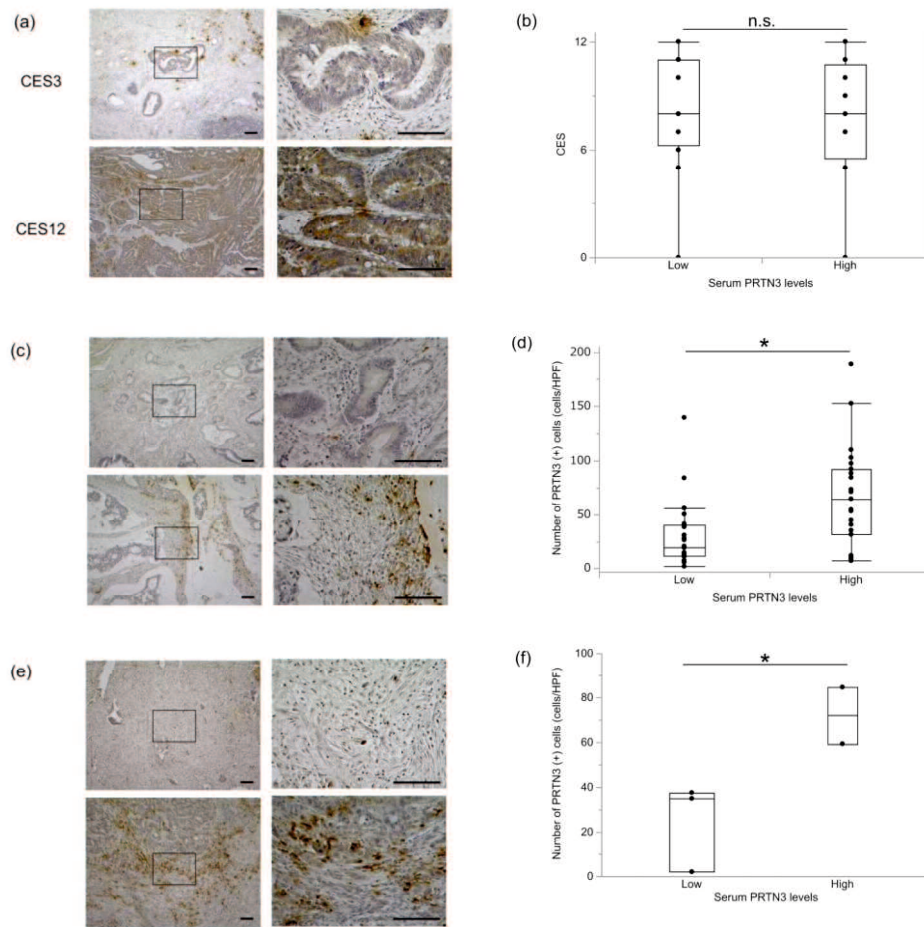
図 3.



mCRC 患者における血清 PRTN3 値による生存曲線解析

時間依存性受信者動作特性曲線解析を用いて同定されたカットオフ値 (21.6ng/ml) に基づいて、血清 PRTN3 値に応じて 2 群に分けた：高発現群 ($\geq 21.6\text{ng/ml}$) と低発現群 ($< 21.6\text{ng/ml}$)。(a) 無増悪生存期間 (b) 全生存期間と 2 年生存率

図 4.

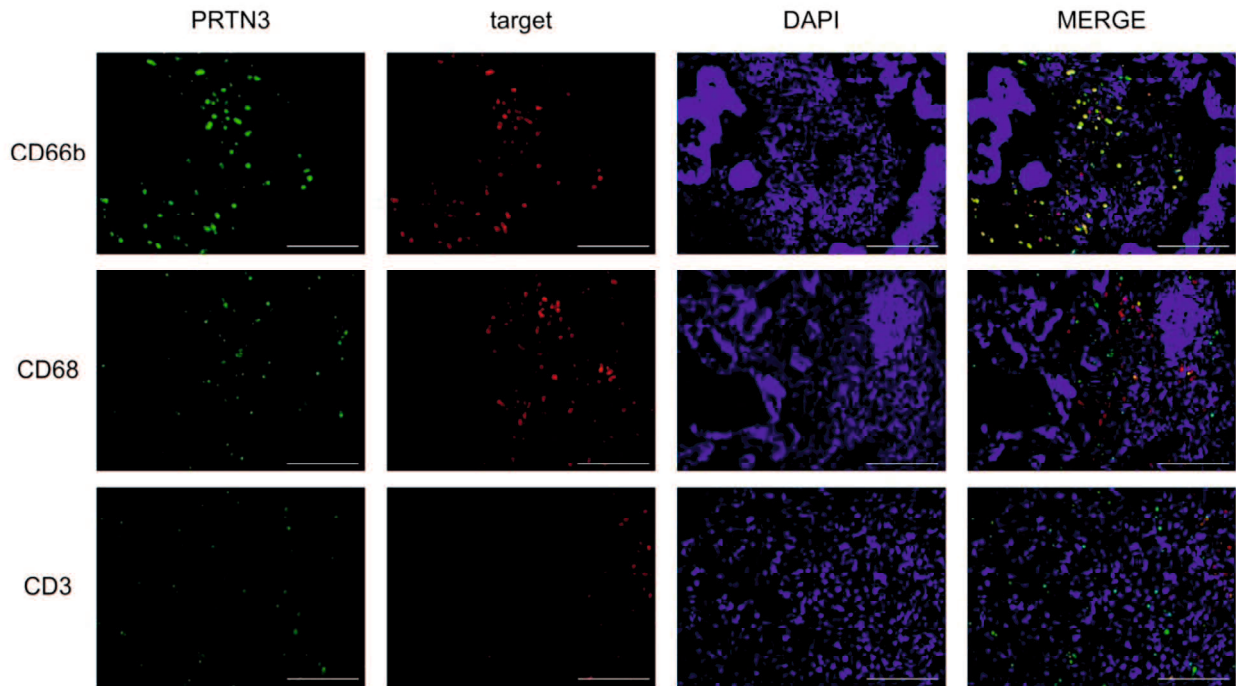


切除標本における PRTN3 の発現(免疫組織学的染色)

スケールバー： 100 μ m。 (a) 原発腫瘍における PRTN3 発現の代表的画像。 CES=4 \times (強度スコア-1) +頻度スコア。強度スコアは 0 (陰性)、1 (弱陽性)、2 (中等度陽性)、3 (強陽性)。頻度スコアは、1 (5-24%)、2 (25-49%)、3 (50-74%)、4 (75-100%) である。(b) 血清 PRTN3 と CES 値の相関。(c) および(e) 原発巣および肝転移巣の間質細胞における PRTN3 発現の代表例。上段は間質に数個の陽性細胞を認めた症例。(d) および(f) 原発性および転移性腫瘍の間質における血清 PRTN3 値と PRTN3 陽性細胞数との相関。

*P<0.05

図 5.

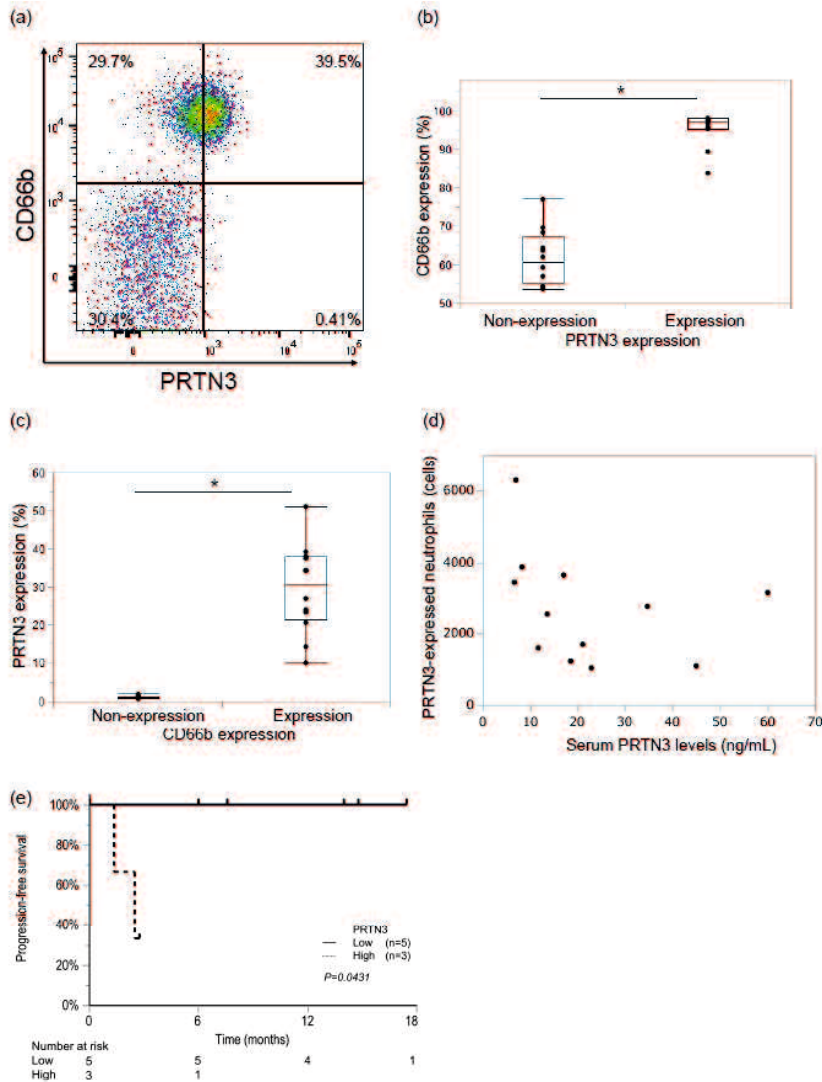


腫瘍微小環境の免疫細胞における PRTN3 の発現

原発巣組織における PRTN3 (緑)、CD66b (赤)、CD68 (赤)、CD3 (赤)、核染色 (青)、共発現 (黄) の代表的な免疫蛍光画像。スケールバー： 100

μm

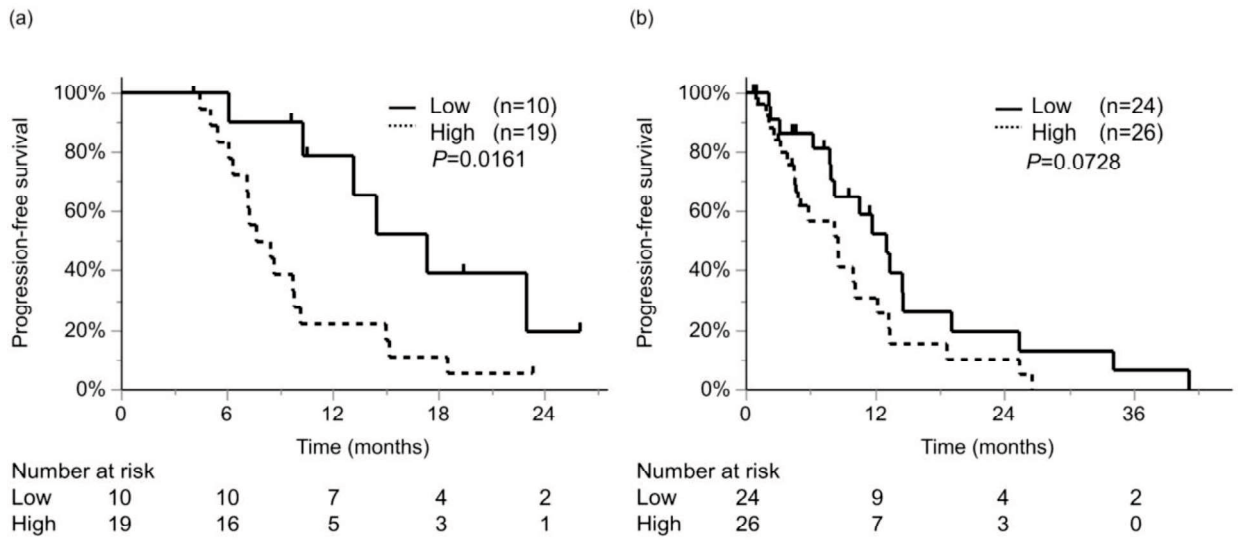
図 6.



mCRC 患者の末梢血細胞における PRTN3 の発現

(a) 生細胞の CD66b/PRTN3 染色の代表図。(b) PRTN3 発現に対する CD66b 発現の割合 (n=12)。(c) CD66b 発現量に対する PRTN3 発現量の割合 (n=12)。(d) 血清 PRTN3 値と PRTN3 陽性好中球数との相関 (n=12)。R=0.3163。P=0.3166。*P<0.05 (e) 化学療法を受けた患者 8 人のサブグループにおける血清 PRTN3 値 (カットオフ値は 21.6ng/ml) と無増悪生存率との関係。P=0.043

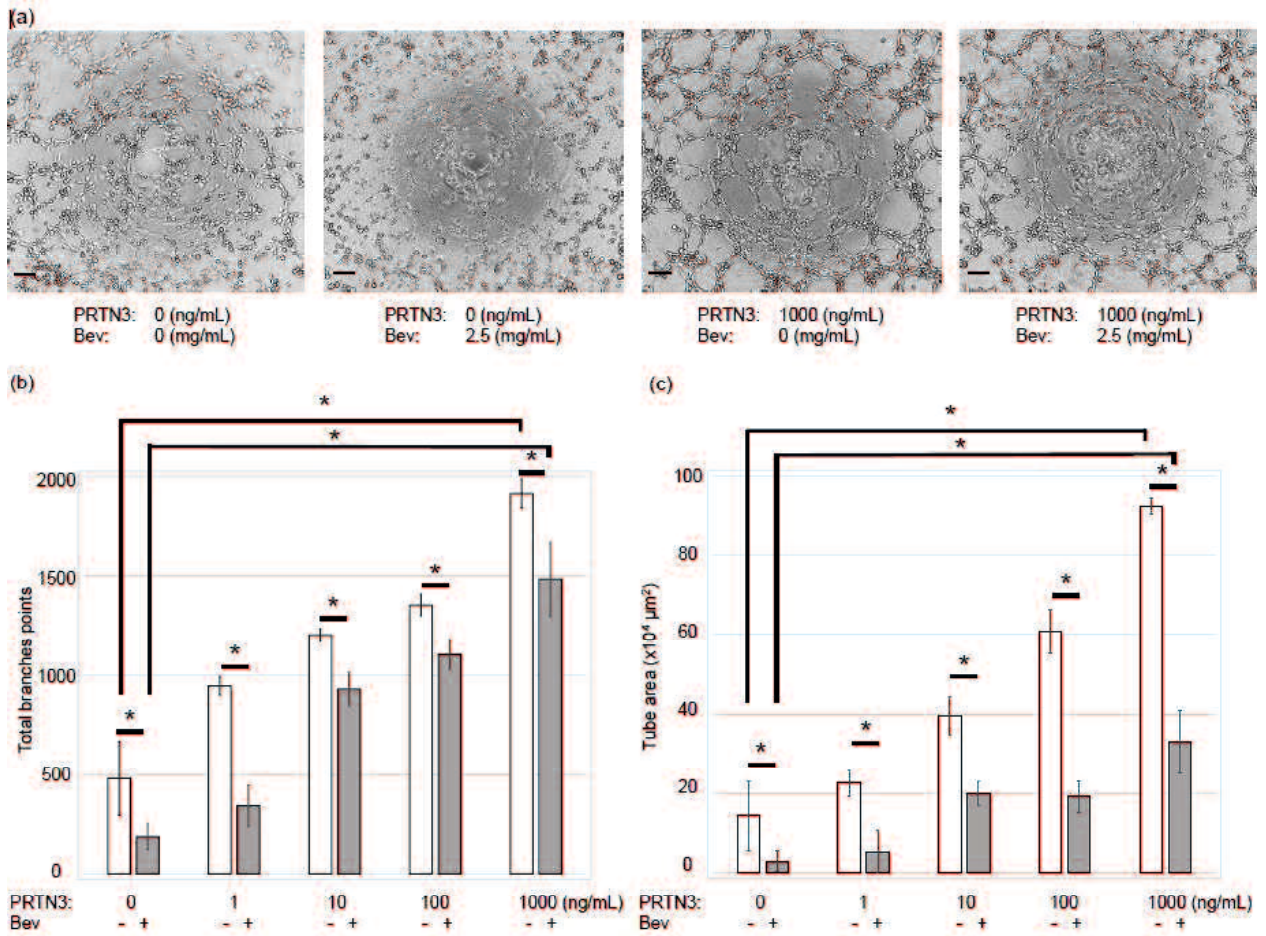
図 7.



Bev 治療サブグループにおける PRTN3 発現に応じた無増悪生存期間

(a) Bev 治療を受けた患者の無増悪生存期間。(b) Bev 非治療患者の無増悪生存期間。*P<0.05

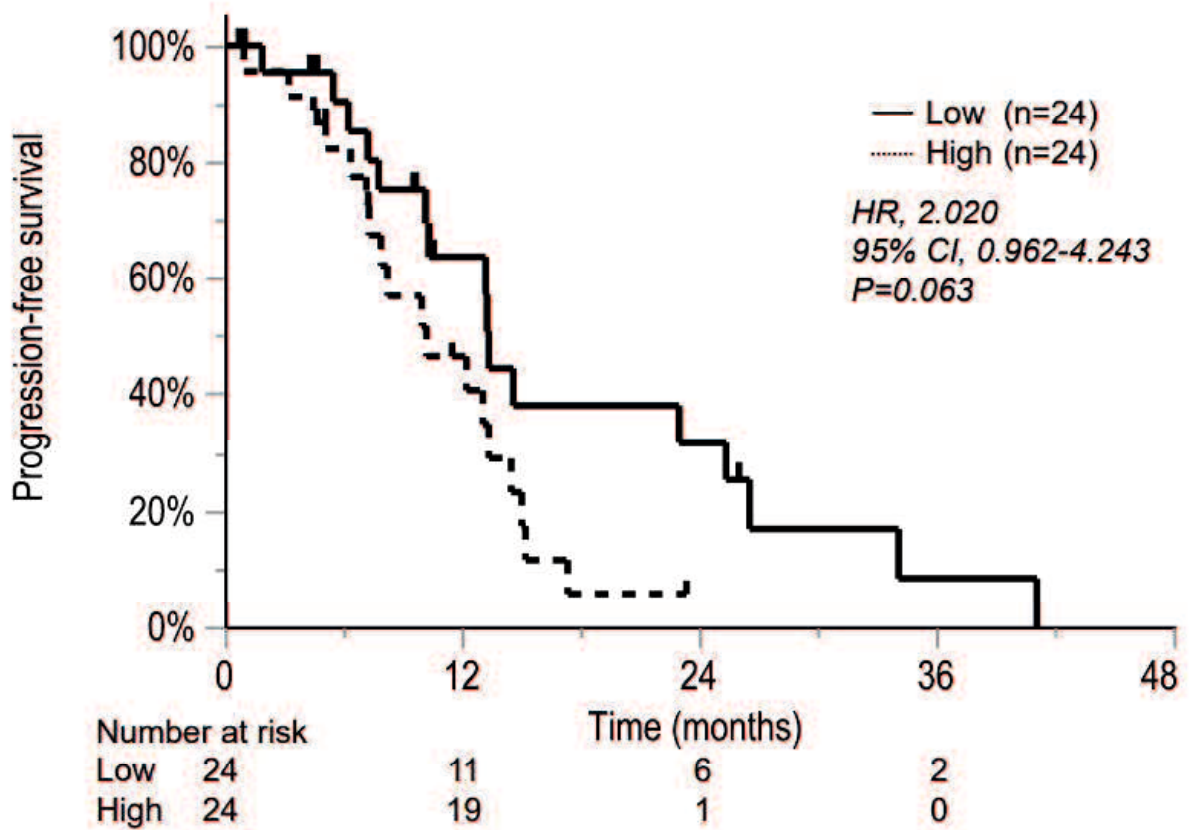
図 8.



PRTN3 の血管新生作用と Bev 感受性

内皮チューブ形成キットを用いて Tube 形成アッセイを行った。PRTN3 は終濃度 0-1000ng/mL、Bev は終濃度 0-2.5mg/mL で、各ウェルあたり 2.5×10^4 細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞に添加した。37°C、5% CO₂ で 2 時間培養後、分枝数とチューブ面積を評価した。(a) Tube 形成アッセイの代表的な画像。スケールバー：100 μm 。(b) 分枝の数。分枝数は PRTN3 の用量依存的に増加した。Bev 投与により分岐点数は減少する。PRTN3 投与は Bev 投与に関係なく、用量依存的に分岐点数を増加させた。(c) Tube 面積。*P < 0.05

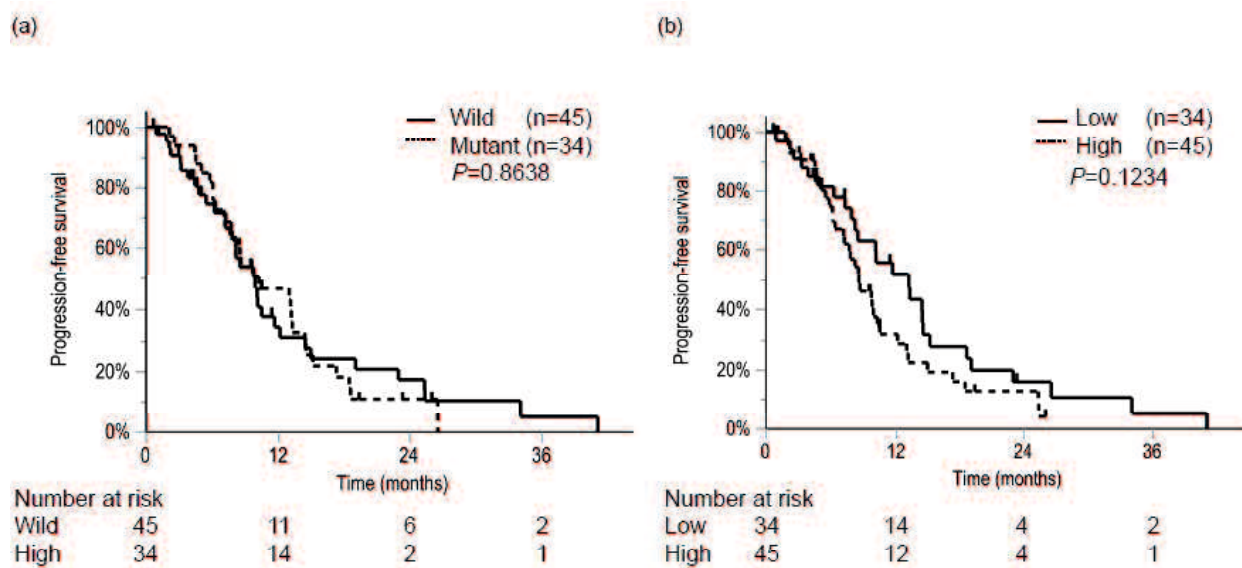
補足図 1.



原発性腫瘍間質の PRTN3 発現による無増悪生存期間

カットオフ値中央値（30 個／高倍率野）に基づき、患者を間質 PRTN3 発現により 2 群に分けた。HR、2.020；95%CI、0.962-4.243；P=0.063。

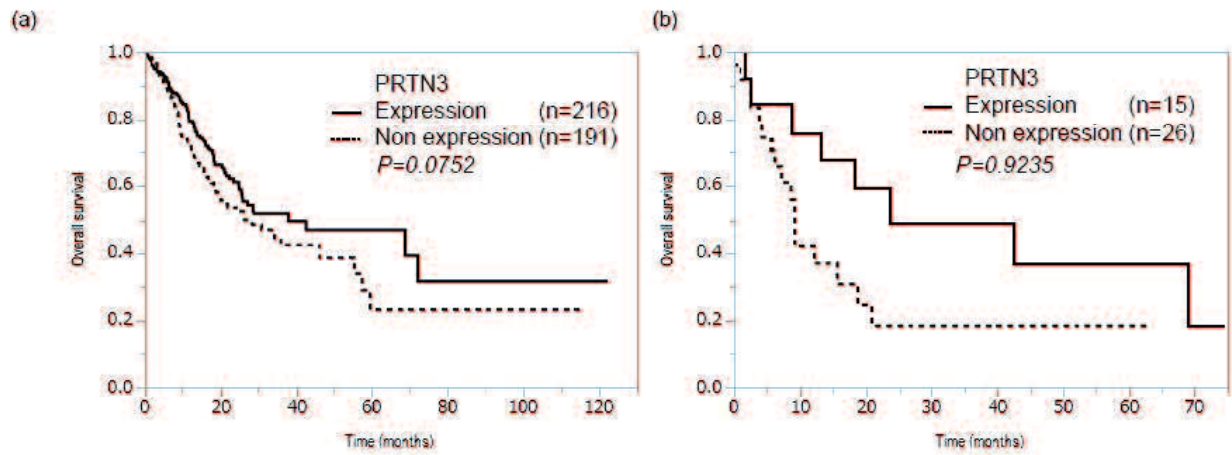
補足図 2.



RAS 変異と血清 CA19-9 値による無増悪生存期間

(a) 無増悪生存期間。患者は RAS の状態により 2 群に分けた。P=0.063. (b) 無増悪生存期間。カットオフ値 39U/ml (当施設の標準値) に基づく血清 CA19-9 値によって患者を 2 群に分けた。P=0.1234.

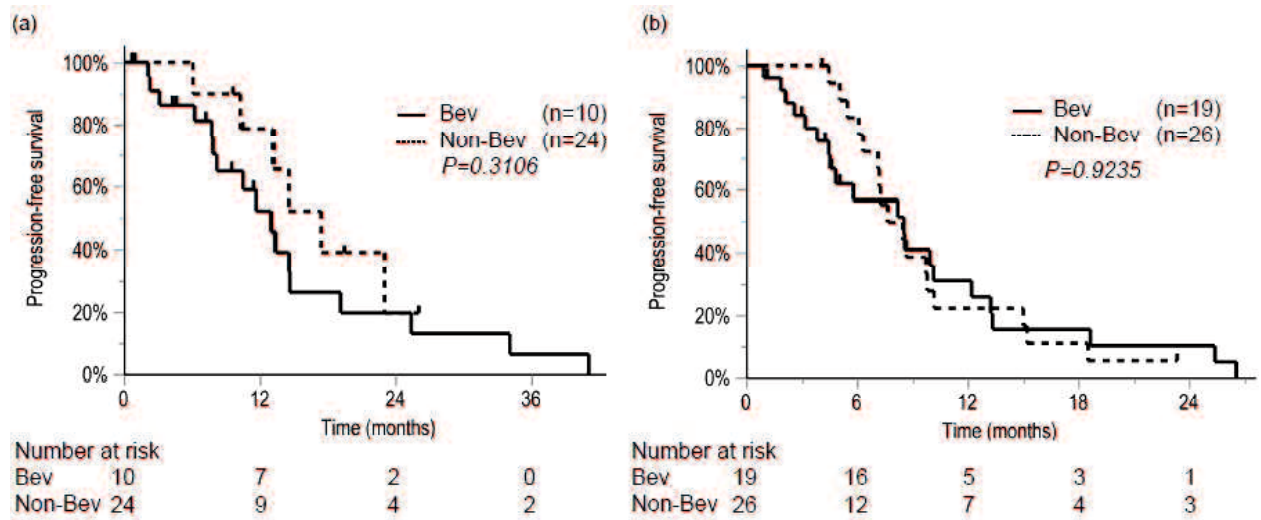
補足図 3.



The Cancer Genome Atlas データベースの PRTN3 発現による胃癌患者の生存曲線解析

患者は PRTN3 の発現/非発現により 2 群に分けた。(a) 全患者 (b) StageIV

補足図 4.



PRTN3 発現による Bev 治療患者の無増悪生存期間

(a) 血清 PRTN3 低値群で Bev 治療を受けた患者の無増悪生存期間 (b) 血清 PRTN3 高値群で Bev 治療を受けた患者の無増悪生存期間。

表 1. 血清 PRTN3 値と臨床病理学的特徴の比較

Characteristics	Serum PRTN3 low (n=34)	Serum PRTN3 high (n=45)	<i>P</i> -value
Age (years)	67.5 [57.25, 76.25]	66 [55.5, 74.0]	0.593
Sex (male/female)	15/19	26/19	0.229
WBC (/μl)	6395 [4740, 7925]	7290 [5480, 8410]	0.160
Neutrophil count (/μl)	4133 [2803, 5279]	5011 [3593, 6682]	0.089
CEA level (ng/ml)	35.35 [12.95, 90.7]	51.8 [11.4, 331.7]	0.392
CA19-9 level (U/ml)	49.85 [10.6, 485.0]	66.2 [17.9, 260.8]	0.628
Tumor location (right/left)	13/21	21/24	0.454
T category (1/2/3/4)	0/1/11/22	0/1/22/22	0.337
N category (0/1/2/3)	6/15/8/5	11/13/12/9	0.559
Metastasis			
M1 (a/ b/c)	21/5/2	20/10/7	0.181
H (0/1/2/3)	11/11/9/3	14/13/11/7	0.847
PUL (0/1/2/3)	25/5/4/0	30/7/7/1	0.778
P (0/1/2/3)	26/2/3/3	30/3/6/6	0.808
Histological grade (un-/differentiated)	5/29	5/40	0.634
RAS (mutant/wild)	12/22	23/21	0.270
Chemotherapy			
1st line (singlet/doublet/triplet)	7/27/0	9/34/2	0.310
Fluorouracil (+/-)	34/0	45/0	-
Oxaliplatin (+/-)	28/6	34/11	0.467
Irinotecan (+/-)	0/34	4/41	0.074
Anti-VEGF antibody (Bev) (+/-)	10/24	19/26	0.240
Anti-EGFR antibody (+/-)	14/20	11/34	0.114
Number of regimens (1/2/3-)	13/10/11	21/13/11	0.685
Operation			
Primary resection (+/-)	29/5	38/7	0.917
Metastasis resection (+/-)	20/14	24/21	0.626
Radical resection (R0, 1/R2, unresected-)	17/17	19/26	0.492

表 2. 無増悪生存における危険因子の単変量および多変量解析

Factor	Cut-off	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		HR	95% CI		P-value	HR	95% CI		P-value
			Lower	Upper			Lower	Upper	
Serum PRTN3 (ng/ml)	>21.6	2.173	1.269	3.723	0.005	2.082	1.188	3.647	0.010
Age (years)	>65	0.921	0.545	1.555	0.757				
Sex	Male/female	1.162	1.162	1.940	0.565				
WBC count (/μl)	>8600	1.707	0.922	3.162	0.089	1.807	0.964	3.388	0.065
Neutrophil count (/μl)	>4920	1.477	0.884	2.470	0.137				
CEA level (ng/ml)	>6.0	0.893	0.354	2.254	0.812				
CA19-9 level (U/ml)	>37	1.517	0.889	2.588	0.127				
Tumor location	Right/left	1.263	0.756	2.109	0.372				
T category		1.039	0.678	1.638	0.865				
N category		1.360	1.050	1.756	0.020	1.222	0.931	1.604	0.148
Metastasis	a/b/c	1.200	0.808	1.725	0.355				
Operation (radical resection)	R0, 1/R2, unresected	0.619	0.369	1.037	0.068	0.589	0.341	1.018	0.058

表 3. 2年生存期間における危険因子の単変量及び多変量解析

Factor	Cut-off	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		HR	95% CI		P-value	HR	95% CI		P-value
			Lower	Upper			Lower	Upper	
Serum PRTN3 (ng/ml)	>21.6	3.095	1.331	7.197	0.009	4.531	1.569	13.085	0.005
Age (years)	>65	0.786	0.387	1.595	0.505				
Sex	Male/female	1.918	0.919	4.005	0.083	1.890	0.745	4.792	0.180
WBC count (/ μ l)	>8600	1.018	0.418	2.483	0.968				
Neutrophil count (/ μ l)	>4920	1.520	0.751	3.075	0.245				
CEA level (ng/ml)	>6.0	4.093	0.557	30.07	0.166				
CA19-9 level (U/ml)	>37	1.146	0.693	3.062	0.321				
Tumor location	Right/left	1.228	0.401	1.653	0.570				
T category		1.001	0.546	1.925	0.997				
N category		1.663	1.160	2.406	0.006	1.572	1.056	2.339	0.026
Metastasis	a/b/c	1.724	1.016	2.814	0.044	1.633	0.903	2.955	0.105
Operation (radical resection)	R0, 1/R2, unresected	0.241	0.103	0.561	0.001	0.133	0.046	0.383	<0.001

表 4. 化学療法の最良効果判定と血清 PRTN3 値

		All specimens			With bevacizumab treatment			Without bevacizumab treatment		
		Serum			Serum			Serum		
		PRTN3	<i>P</i> -value		PRTN3	<i>P</i> -value		PRTN3	<i>P</i> -value	
PRTN3 low (n=34)		high (n=45)			low (n=10)	high (n=19)		low (n=24)	high (n=26)	
Best overall response			<0.001				<0.001			0.004
Partial response	21 (61.8)	5 (11.1)		8 (80.0)	2 (10.5)		13 (54.2)	3 (11.5)		
Stable disease	10 (29.4)	27 (60.0)		2 (20.0)	13 (68.4)		8 (33.3)	14 (53.9)		
Progressive disease	3 (8.8)	13 (28.9)		0	4 (21.1)		3 (12.5)	9 (34.6)		

補足表 1. タンパク質包括的解析

Serum sample						Tissue sample					
Rank	Proteins	OS \geq 3 (n=9) Mean	OS<2 (n=11) Mean	Fisher's ratio	P- value	Rank	Proteins	OS \geq 3 (n=9) Mean	OS<2 (n=11) Mean	Fisher's ratio	P - value
1	MPO	29407.4	51014.8	4.65	<0.001	1	B7-H2	16059.9	51353.8	2.25	0.050
2	PRTN3	7979.2	15841.6	3.44	<0.001	2	RETN	1154.2	2410.2	1.91	0.045
3	OLR1	460.7	752.5	2.74	0.004	3	LYZ	9132.7	21434.3	1.74	0.063
4	IL-8	3318.9	7096.9	2.59	0.008	4	MPO	8607.6	32262.0	1.60	0.078
5	LTF	8649.9	14674.9	2.26	0.003	5	PRTN3	10824.1	37279.8	1.50	0.095
6	BPI	3032.8	5904.1	2.03	0.011	6	LTF	33540.5	103092.6	1.43	0.085
7	hnRNP A2/B1	4424.2	7377.9	1.94	0.018	7	FGR	201.4	451.5	1.38	0.080
8	PGLYRP1	948.4	1503.8	1.79	0.008	8	HIST1H1C	2266.3	6839.2	1.38	0.037
9	VEGF121	4635.7	11089.3	1.55	0.021	9	ALP	56779.7	133198.1	1.33	0.072
10	CCL7	2773.6	5455.0	1.21	0.107	10	TGM3	2036.7	166.0	1.32	0.234

補足表 2. フローサイトメトリーを行った患者の背景

Case	PRTN3 levels (ng/ml)	CD66+PRTN3+ (%)	Chemotherapy	PFS (M)
1	6.7	24	no	-
2	7.0	34.2	no	-
3	8.3	39.2	yes	14.0
4	11.7	38	yes	14.8
5	13.6	34.5	yes	7.6
6	17.6	37.5	yes	17.4
7	18.6	51.1	no	-
8	21.1	23.4	yes	6.0
9	22.9	9.81	yes	2.8
10	34.8	27	yes	1.3
11	45.1	14.1	yes	2.5
12	59.9	20.5	no	-

補足表 3. Bev 投与患者と非投与患者の臨床病理学的背景の比較

Characteristics	With Bev (n=29)	Without Bev (n=50)	P -value
PRTN3 (high/low)	19/10	26/24	0.240
Age (years)	69 [62.0, 77.0]	65 [55.0, 73.5]	0.165
Sex (Male/Female)	10/19	31/19	0.018
WBC (/ μ l)	6200 [5020, 8285]	6700 [5450, 8465]	0.726
Neutrophils	4345 [3025, 6625]	4732 [3613, 6088]	0.555
CEA (ng/ml)	78.2 [15.2, 223.1]	37.3 [10.2, 122.9]	0.191
CA19-9 (U/ml)	106.4 [42.9, 993.2]	31.7 [10.7, 129.7]	0.008
Tumor location (Right/Left)	16/13	18/32	0.097
T category (1/2/3/4)	0/0/10/19	0/2/23/25	0.201
N category (0/1/2/3)	6/10/7/6	11/18/13/8	0.965
Metastasis			
M1(a/ b /c)	13/7/2	28/8/7	0.424
H (0/1/2/3)	9/6/9/5	16/18/11/5	0.421
PUL (0/1/2/3)	18/3/7/1	37/9/4/0	0.094
P (0/1/2/3)	20/2/2/5	36/3/7/4	0.525
Histological grade (un-/differentiated)	2/27	8/42	0.222
RAS (mutant/wild)	21/8	12/37	<0.001
Chemotherapy			
1st line (singlet/doublet/triplet)			
Fluorouracil (+/-)	29/0	50/0	-
Oxaliplatin (+/-)	28/1	34/16	0.001
Irinotecan (+/-)	3/26	1/49	0.109
Anti-VEGF antibody (+/-)	29/0	0/50	<0.001
Anti-EGFR antibody (+/-)	0/29	25/25	<0.001
Number of regimens (1/2/3-)	7/11/11	27/12/11	0.031
Operation			
Primary resection (+/-)	24/5	43/7	0.700
Metastasis resection (+/-)	16/13	28/22	0.943
Radical resection (+/-)	12/17	24/26	0.568