

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08973

研究課題名(和文) 内皮細胞特異的スプライシングバリエントからアプローチする癌微小環境の分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular dissection of Cancer microenvironment-related genes

研究代表者

山本 英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60567915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん臨床検体から腫瘍部分の血管内皮と対照正常部分の血管内皮を分離して、トランスクリプトーム解析を行い、大腸がん間質において高発現している一連の遺伝子、SVを同定した。多数検体を用いた定量RT-PCRおよび免疫組織染色から、遺伝子Aに着目した。遺伝子AをノックダウンすることでHUVEC・HMVECの増殖能、遊走能およびin vitroチューブ形成能が阻害されることを見いだした。大腸がん細胞をヌードマウスに移植後、マウス遺伝子Aに対するsiRNAを局所投与することでxenograftの増殖抑制効果が認められた。以上から遺伝子Aは新規治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified genes and splicing variant which were altered in the tumor endothelial cells. We then validated the results by RT-qPCR, and identified gene A as a novel candidate of the tumor endothelium-related gene. The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets revealed that higher expression of gene A is associated with worse overall survival of CRC patients. Knockdown of gene A in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) suppressed cell proliferation and in vitro tube formation. Injection of siRNA against gene A in mice transplanted with human CRC cells suppressed formation of microvessels in the xenografted tumors. Microarray analysis revealed that knockdown of gene A in HUVEC significantly affected gene expression signatures, including cell cycle regulation and interferon signaling. Our results suggest that gene A may play an important role in the angiogenesis in CRC, and that it could be a potential therapeutic target.

研究分野：消化器がん

キーワード：微小環境 大腸がん 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管新生は、増殖・浸潤・転移に関わる重要な機構である。そのため、がん微小環境における血管新生の制御は、がんの進行抑制のための有望な戦略である。しかし血管新生に関わるシグナル経路は複雑であり、その全容は解明されていない。

血管新生阻害療法は 1972 年に Judah Folkman によって提唱され、90 年代初頭に血管内皮増殖因子 VEGF が単離されて以来、抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体(ベバシズマブ)や低分子 VEGFR 阻害剤(ソラフェニブ)などが臨床応用されるに至っている。しかし既存の VEGF-VEGFR 標的治療にはその効果の限界や、重大な有害事象が起こることも報告されている。

Folkman が提唱した概念の根底には、腫瘍血管は正常血管と同様の性質を有し、がん細胞のように薬剤抵抗性を獲得しないという前提があった。しかし腫瘍血管内皮は、形態学的にも分子生物学的にも正常血管内皮とは異なることが明らかになってきた。2000 年に St. Croix らが磁気マイクロビーズ法を用いて大腸がん組織から腫瘍血管細胞の単離に成功し、腫瘍血管内皮の遺伝子解析を行った。以後、様々な組織の腫瘍から腫瘍血管内皮が単離され、腫瘍血管における遺伝子発現には組織特異性があることが報告されている。

ヒト遺伝子の 90%以上は選択的スプライシングの制御を受けているとされる。これはタンパク質に多様性を与え、その多くは細胞・組織特異的かつ発生段階依存的に制御されている。近年、機能的に重要なスプライシングが相次いで報告されている。例えば、転写因子 FOXP1 には細胞の分化を促進する Exon18 と未分化細胞特異的な Exon18b が存在し、選択的スプライシングによって転写後修飾された FOXP1-ES (Exon18b を含む) が、ES 細胞の多分化能を制御するスイッチのように働く (Gabut M, *Cell*, 2011)。また Wang ET らは、スプライシングバリエーション (SV) の網羅的な解析から、組織特異的なスプライシングパターンを 22,000 箇所以上マップし、スプライシングが組織形成において選択的に行われることを示した (*Nature*, 2008)。従来、スプライシングは RNA エlement とスプライシング因子によって局所的に制御されていると考えられてきたが、クロマチン構造やヒストン修飾といったエピジェネティクス機構もまた、主要な役割を担うことが明らかにされた (Luco RF, *Cell*, 2011)。さらに最近では ENCODE Project により、細胞・組織の種類によってクロマチン構造が異なることが報告された (*Nature*, 2012)。

選択的スプライシングがタンパク質構造の多様性を通して細胞の分化・発生制御に重要な役割を担っていることから鑑みて、がん間質内皮細胞 (Tumor associated Endothelial Cells, TECs) の性質の決定にも関与している可能性が高いと考えられる。

### 2. 研究の目的

がん微小環境において、内皮細胞は血管新生の刺激を受けて応答する。がん間質内皮細胞 (Tumor associated Endothelial Cells, TECs) における遺伝子発現変化を解析することは、腫瘍血管新生の分子機構を明らかにする為に必須であると考えられる。転写後修飾の一つであるスプライシング機構が細胞・組織に特異的かつ重要な働きをしている可能性が高いことを踏まえ、本研究ではがん間質内皮細胞に特異的なスプライシングバリエーション (SV) の同定とその機能解明を目標とする。その為の手段として、消化器がんの内視鏡検体から分離した TECs を対象に、高速シーケンサー解析とバイオインフォマティクス解析の組み合わせを最大限に活用して、以下の 3 段階の目標達成を目指す。

大腸がん臨床検体からの内皮細胞分離と全 RNA 抽出

内皮細胞の RNA シーケンス (RNA-seq) による SV の網羅的探索と TECs 特異的 SV の同定

機能解析と腫瘍血管新生における役割の解明

### 3. 研究の方法

#### 1) 消化器がん臨床検体からの内皮細胞の分離

大腸内視鏡治療と外科手術検体から採取した大腸がん組織を酵素処理 (Collagenase I, DNase I, etc) した後、CD31 をマーカーとして内皮細胞を、EpiCAM をマーカーとして上皮細胞を分離する。

#### 2) 全転写産物のシーケンサー解析

高速シーケンサーを用いて Paired-End RNA-seq 実験を行う。遺伝子発現量は Real-time PCR と同様の結果が得られることを確認する。

#### 3) バイオインフォマティクスによるスプライシング解析とバリエーションの同定

がん間質内皮細胞 (TECs) に特異的に発現する遺伝子、スプライシングバリエーション (SV) の同定を目指す。

#### 4) *in vitro* における機能解析

目的遺伝子の血管新生・細胞周期などを与える影響を *in vitro* 血管内皮細胞チューブ形成アッセイ・BrdU 細胞周期アッセイ・MTT アッセイなどの細胞学的手法を用いた解析を行う。

#### 5) *in vivo* における機能解析

Xenograft を作成し、機能解析を行う。腫瘍増殖能および病理組織解析による浸潤・転移の解析、さらにセルソーターを用いた細胞

分離および分子生物学的解析を行う。また、必要に応じてルシフェラーゼアッセイや蛍光プローブを用いた生体イメージングを行う。

#### 4. 研究成果

大腸がん臨床検体から腫瘍部分の血管内皮と対照正常部分の血管内皮を分離して、トランスクリプトーム解析を行い、大腸がん間質において高発現している一連の遺伝子、SVを同定した。多数検体を用いた定量 RT-PCR および免疫組織染色から、遺伝子 A に着目した。遺伝子 A は大腸がん組織の血管内皮に高発現しており、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の RNA-seq データを解析した結果、遺伝子 A 高発現が大腸がんの予後不良因子であることを見いだした。

次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) やヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) を大腸がん細胞株由来の Tumor conditioned medium (TCM) で刺激することで遺伝子 A の発現が誘導されること、遺伝子 A をノックダウンすることで HUVEC・HMVEC の増殖能、遊走能および in vitro チューブ形成能が阻害されることを見いだした。また大腸がん細胞株と HUVEC とをヌードマウスに共移植することで、血管新生および腫瘍形成が促進されることが知られているが、遺伝子 A をノックダウンした HUVEC を大腸がん細胞と共移植した場合、xenograft の血管新生が低下した。また、大腸がん細胞をヌードマウスに移植後、マウス遺伝子 A に対する siRNA を局所投与することで xenograft の増殖抑制効果が認められた。さらに HUVEC 細胞を用いて、遺伝子 A ノックダウンが遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した結果、遺伝子 A が AQP1、POSTN など既報の腫瘍血管新生促進因子の発現に必要であることを見いだした。

#### 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 18 件)

(1) Aoki H, Yamamoto E, Yamano H, Sugai T, Kimura T, Tanaka Y, Matsushita H, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Nakaoka M, Yoshida Y, Harada T, Sudo G, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Niinuma T, Kai M, Nojima M, Suzuki H, Nakase H. Subtypes of the Type II Pit Pattern Reflect Distinct Molecular Subclasses in the Serrated Neoplastic Pathway. *Dig Dis Sci*. 2018 Mar 15. doi: 10.1007/s10620-018-5016-5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29546645. 査読あり

(2) Sugai T, Eizuka M, Arakawa N, Osakabe M, Habano W, Fujita Y, Yamamoto E,

Yamano H, Endoh M, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular profiling and comprehensive genome-wide analysis of somatic copy number alterations in gastric intramucosal neoplasias based on microsatellite status. *Gastric Cancer*. 2018 Feb 21. doi: 10.1007/s10120-018-0810-5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29468422. 査読あり

(3) Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, Niinuma T, Yamano H, Harada T, Matsushita H, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Tanaka Y, Yoshida Y, Aoyama T, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Kai M, Sawada N, Sugai T, Nakase H, Suzuki H. Epigenetic silencing of SMOC1 in traditional serrated adenoma and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 20;9(4):4707-4721. doi: 10.18632/oncotarget.23523. eCollection 2018 Jan 12. PubMed PMID: 29435136; PubMed Central PMCID: PMC5797007. 査読あり

(4) Sugai T, Takahashi Y, Eizuka M, Sugimoto R, Fujita Y, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular profiling and genome-wide analysis based on somatic copy number alterations in advanced colorectal cancers. *Mol Carcinog*. 2018 Mar;57(3):451-461. doi: 10.1002/mc.22769. Epub 2017 Dec 23. PubMed PMID: 29230882; PubMed Central PMCID: PMC5814737. 査読あり

(5) Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Hasegawa T, Tokino T, Sugai T, Shinomura Y, Nakase H, Suzuki H. Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Lett*. 2017 Nov;14(5):5703-5710. doi: 10.3892/ol.2017.6911. Epub 2017 Sep 8. PubMed PMID: 29113198; PubMed Central PMCID: PMC5661378. 査読あり

(6) Sugai T, Yoshida M, Eizuka M, Uesugii N, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Analysis of the DNA methylation level of cancer-related genes in colorectal cancer and the surrounding normal mucosa. *Clin Epigenetics*. 2017 May 18;9:55. doi: 10.1186/s13148-017-0352-4. eCollection

2017.  
PubMed PMID: 28533824; PubMed Central  
PMCID: PMC5437595. 査読あり

(7) Tanaka Y, Yamano HO, Yamamoto E,  
Matushita HO, Aoki H, Yoshikawa K, Takagi  
R,  
Harada E, Nakaoka M, Yoshida Y, Eizuka M,  
Sugai T, Suzuki H, Nakase H. Endoscopic  
and molecular characterization of  
colorectal sessile serrated  
adenoma/polyps with  
cytologic dysplasia. *Gastrointest Endosc.*  
2017 Dec;86(6):1131-1138.e4. doi:  
10.1016/j.gie.2017.05.006. Epub 2017 May  
10. PubMed PMID: 28501592. 査読あり

(8) Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO,  
Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H,  
Maruyama R, Toyota M, Hatahira T, Nakase  
H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M,  
Suzuki H. Epigenetic silencing of  
diacylglycerol kinase gamma in colorectal  
cancer. *Mol Carcinog.* 2017  
Jul;56(7):1743-1752. doi:  
10.1002/mc.22631. Epub 2017  
Mar 6. PubMed PMID: 28218473. 査読あり

(9) Eizuka M, Sugai T, Habano W, Uesugi N,  
Takahashi Y, Kawasaki K, Yamamoto E,  
Suzuki H, Matsumoto T. Molecular  
alterations in colorectal adenomas and  
intramucosal adenocarcinomas defined by  
high-density single-nucleotide  
polymorphism arrays. *J Gastroenterol.*  
2017 Nov;52(11):1158-1168. doi:  
10.1007/s00535-017-1317-2. Epub 2017 Feb  
14. PubMed PMID: 28197804; PubMed  
Central PMCID: PMC5666076. 査読あり

(10) Sugai T, Eizuka M, Takahashi Y,  
Fukagawa T, Habano W, Yamamoto E, Akasaka  
R,  
Otuska K, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular  
subtypes of colorectal cancers  
determined by PCR-based analysis. *Cancer  
Sci.* 2017 Mar;108(3):427-434. doi:  
10.1111/cas.13164. PubMed PMID: 28083970;  
PubMed Central PMCID: PMC5378279. 査読あ  
り

(11) Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto  
E, Harada T, Aoki H, Maruyama R,  
Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T,  
Nakase H, Suzuki H. TET1 Depletion Induces

Aberrant CpG Methylation in Colorectal  
Cancer Cells. *PLoS One.* 2016 Dec  
15;11(12):e0168281. doi:  
10.1371/journal.pone.0168281.  
eCollection 2016. PubMed  
PMID: 27977763; PubMed Central PMCID:  
PMC5158030. 査読あり

(12) Sugai T, Habano W, Takagi R, Yamano  
H, Eizuka M, Arakawa N, Takahashi Y,  
Yamamoto E, Kawasaki K, Yanai S, Ishida K,  
Suzuki H, Matsumoto T. Analysis of  
molecular alterations in laterally  
spreading tumors of the colorectum. *J  
Gastroenterol.* 2017 Jun;52(6):715-723.  
doi: 10.1007/s00535-016-1269-y. Epub 2016  
Oct 4. PubMed PMID: 27704264. 査読あり

(13) Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E,  
Niinuma T, Kai M. Relationship Between  
Noncoding RNA Dysregulation and  
Epigenetic Mechanisms in Cancer. *Adv Exp  
Med  
Biol.* 2016;927:109-35. doi:  
10.1007/978-981-10-1498-7\_4. Review.  
PubMed PMID:  
27376733. 査読あり

(14) Arakawa N, Sugai T, Habano W, Eizuka  
M, Sugimoto R, Akasaka R, Toya Y,  
Yamamoto E, Koeda K, Sasaki A, Matsumoto  
T, Suzuki H. Genome-wide analysis of DNA  
copy number alterations in early and  
advanced gastric cancers. *Mol Carcinog.*  
2017  
Feb;56(2):527-537. doi: 10.1002/mc.22514.  
Epub 2016 Aug 24. PubMed PMID:  
27312513. 査読あり

(15) Sugai T, Sugimoto R, Habano W, Endoh  
M, Eizuka M, Tsuchida K, Yamamoto E,  
Kawasaki K, Yanai S, Matsumoto T, Suzuki  
H. Genetic differences stratified by  
PCR-based microsatellite analysis in  
gastric intramucosal neoplasia. *Gastric  
Cancer.* 2017 Mar;20(2):286-296. doi:  
10.1007/s10120-016-0616-2. Epub 2016 May  
28.  
PubMed PMID: 27236438. 査読あり

(16) Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E,  
Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma  
T, Kai M, Yamano HO, Sugai T, Tokino T,  
Shinomura Y, Imai K, Suzuki H. A genomic  
screen for long noncoding RNA genes

epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2016 May 24;6:26699. doi: 10.1038/srep26699. PubMed PMID: 27215978; PubMed Central PMCID: PMC4877637. 査読あり

(17) Sawada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita H, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. *Oncotarget.* 2016 Jun 7;7(23):35106-18. doi: 10.18632/oncotarget.9044. PubMed PMID: 27145369; PubMed Central PMCID: PMC5085213. 査読あり

(18) Sugimoto R, Sugai T, Habano W, Endoh M, Eizuka M, Yamamoto E, Uesugi N, Ishida K, Kawasaki T, Matsumoto T, Suzuki H. Clinicopathological and molecular alterations in early gastric cancers with the microsatellite instability-high phenotype. *Int J Cancer.* 2016 Apr 1;138(7):1689-97. doi: 10.1002/ijc.29916. Epub 2015 Dec 17. PubMed PMID: 26538087; PubMed Central PMCID: PMC4738431. 査読あり

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60567915