

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07949

研究課題名(和文) 大腸腫瘍血管新生の分子病態解明と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular dissection of angiogenesis in colorectal cancer

研究代表者

山本 英一郎 (Yamamoto, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：60567915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん血管内皮細胞におけるAEBP1の高発現を同定した。血管内皮細胞HUVECを用いた解析から、AEBP1発現ががん細胞との共培養やTGF- $\beta$ によって誘導されること、そしてAEBP1が血管内皮細胞の増殖、遊走、in vitroチューブ形成を促進することを明らかとした。また大腸がんxenograftモデルを用いた解析から、AEBP1の阻害が腫瘍増殖や血管新生を抑制することが示された。さらにAEBP1がaquaporin 1やperiostinなど血管新生に関わる遺伝子発現を誘導することを明らかとした。これらの結果から、AEBP1が腫瘍血管の治療標的となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍間質は、がん関連線維芽細胞、腫瘍血管内皮細胞(tumor endothelial cell, TEC)、種々の免疫細胞などから構成されている。腫瘍間質細胞はがんの増殖、浸潤および転移に有利な微小環境を構築することから、その制御は重要な治療戦略である。本研究でAEBP1(adipocyte enhancer-binding protein 1)がTECで高発現し、血管新生を促進すること、そしてAEBP1の阻害が腫瘍血管新生を抑制しうるとを明らかとしており、今後がん微小環境におけるAEBP1の機能を解明することで、新たな分子標的治療法の開発につなげることができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We detected frequent upregulation of adipocyte enhancer-binding protein 1 (AEBP1) in TECs. Immunohistochemistry revealed that AEBP1 is upregulated in TECs and cancer stromal cells. Levels of AEBP1 expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were upregulated by tumor conditioned medium derived from CRC cells or by direct co-culture with CRC cells. AEBP1 knockdown suppressed proliferation, migration and in vitro tube formation by HUVECs. In xenograft experiments, AEBP1 knockdown suppressed tumorigenesis and microvessel formation. Depletion of AEBP1 in HUVECs downregulated a series of genes associated with angiogenesis, including aquaporin 1 (AQP1) and periostin (POSTN), suggesting that AEBP1 may promote angiogenesis through regulating those genes. These results suggest that upregulation of AEBP1 contributes to tumor angiogenesis in CRC, which makes AEBP1 a potentially useful therapeutic target.

研究分野：消化器病

キーワード：大腸がん 微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

進行大腸がんに対する抗 VEGF 抗体薬の成功は、腫瘍血管が有望な治療標的たり得ることを示している。しかし既存の VEGF-VEGFR 標的治療には効果の限界や、有害事象も報告されている。また腫瘍血管新生に関わるシグナルは複雑であり、その全容は解明されていない。大腸がんの腫瘍血管新生機構をさらに明らかにするため、申請者らはこれまで培った微量な臨床検体を解析するワークフローを活用し、内視鏡的に切除された大腸がん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、RNA-seq 解析を行った。その結果、AEBP1 (Adipocyte enhancer-binding protein 1) が腫瘍血管内皮で発現上昇し、血管新生に関わっていることを見いだしつつある。

AEBP1 は別名 aortic carboxypeptidase-like protein (ACLP)とも呼ばれ、アディポサイトや大腸脈平滑筋で発現する転写調節因子として同定された。近年では、がんとの関わりも報告されはじめている。例えば、グリオーマ細胞では AEBP1 が発現上昇し、遺伝子発現制御に関わっていること (Mol Cancer Res, 2012)、メラノーマでは AEBP1 の発現上昇が BRAF 阻害剤に対する抵抗性に寄与していることが報告されている (Cell Death Dis, 2013)。また乳がん臨床検体から腫瘍血管細胞を抽出してトランスクリプトーム解析した結果、AEBP1 を含む一連の遺伝子発現上昇を明らかにしたという報告があるが (Am J Pathol, 2008)、腫瘍血管における AEBP1 の機能を解析した報告はいまだない。

### 2. 研究の目的

本研究は、腫瘍血管新生における AEBP1 の機能的役割を明らかとし、新たな診断法・分子標的治療法の開発につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

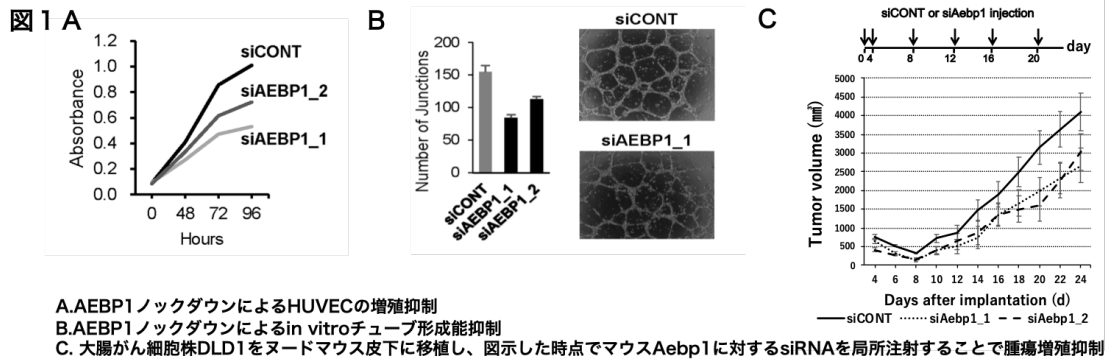
AEBP1 の血管内皮細胞における役割を明らかにし、臨床応用につなげるため、以下のステップに従い研究を行う。

- 血管内皮細胞における AEBP1 下流標的遺伝子と AEBP1 結合配列を網羅的に探索する。  
HUVEC 細胞を用いて、AEBP1 をノックダウン後の遺伝子発現プロファイルデータをすでに取得し、AEBP1 標的遺伝子候補をリストアップしている。この知見を固めるため、HUVEC に AEBP1 を過剰発現させ、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ (Agilent) を用いて遺伝子発現プロファイルに与える影響を検証する。また AEBP1 が non-coding RNA の発現制御に関わっている可能性を考え、AEBP1 ノックダウンあるいは過剰発現後の microRNA 発現を SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ (Agilent) で解析する。
- AEBP1 シグナルの治療標的としての有用性を検証する。  
in vivo での機能を評価するため、AEBP1 と相互作用するタンパクあるいは下流標的遺伝子をノックダウンした HUVEC を、免疫不全マウスに大腸がん細胞株と共移植し、腫瘍形成、血管新生、浸潤、転移に与える影響を検証する。
- AEBP1 シグナルの臨床的重要性と診断マーカーとしての有用性を検証する。  
多数の大腸がん臨床検体を対照に、AEBP1 および相互作用タンパク、下流標的遺伝子の発現を免疫組織染色や定量 RT-PCR で解析し、臨床病期、組織型、脈管浸潤、リンパ節転移、遠隔転移、予後など臨床病理学的因子との相関を解析する。これにより治療法選択 (内視鏡的切除あるいは外科的切除) や予後予測マーカーとしての有用性を検証する。
- AEBP1 シグナル検出系を構築し、治療薬スクリーニングに向けた準備を行う。

### 4. 研究成果

AEBP1 は大腸がん細胞ではほとんど発現しないが、腫瘍血管および大腸がん浸潤部の間質に高発現することを明らかとした。また The Cancer Genome Atlas (TCGA) の RNA-seq データを解析した結果、AEBP1 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。

血管内皮細胞 HUVEC を用いた解析から、AEBP1 発現ががん細胞との共培養や TGF- $\beta$  によって誘導されること、そして AEBP1 が血管内皮細胞の増殖、遊走、in vitro チューブ形成を促進することを明らかとした(図 1A, B)。また大腸がん xenograft モデルを用いた解析から、AEBP1 の阻害が腫瘍増殖や血管新生を抑制することが示された(図 1C)。



さらに AEBP1 が aquaporin 1 や periostin など血管新生に関わる遺伝子発現を誘導することを明らかとした。これらの結果から、AEBP1 が腫瘍血管の治療標的となりうることを報告した (Cancer Sci, 2020; 特願 2018-146981)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nakanishi Hiroyoshi, Sawada Takeshi, Yamamoto Eiichiro et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yorozu Akira, Yamamoto Eiichiro, Niinuma Takeshi, Tsuyada Akihiro, Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Numata Yuto, Kai Masahiro, Sudo Gota, Kubo Toshiyuki, Nishidate Toshihiko, Okita Kenji, Takemasa Ichiro, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu, Takano Kenichi, Suzuki Hiromu	4. 巻 -
2. 論文標題 Upregulation of AEBP1 in endothelial cells promotes tumor angiogenesis in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 鈴木 拓、山本 英一郎、仲瀬 裕志	4. 巻 116
2. 論文標題 大腸がんの分子生物学 発生機構と分子サブタイプ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.116.859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amemori Sadahiro, Yamano Hiro o, Tanaka Yoshihito, Yoshikawa Kenjiro, Matsushita Hiro o, Takagi Ryo, Harada Eiji, Yoshida Yuko, Tsuda Kazunori, Kato Bunichiro, Tamura Eri, Eizuka Makoto, Sugai Tamotsu, Adachi Yasushi, Yamamoto Eiichiro, Suzuki Hiromu, Nakase Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Sessile serrated adenoma/polyp showed rapid malignant transformation in the final 13?months	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niinuma Takeshi, Kitajima Hiroshi, Kai Masahiro, Yamamoto Eiichiro, Yorozu Akira, Ishiguro Kazuya, Sasaki Hajime, Sudo Gota, Toyota Mutsumi, Hatahira Tomo, Maruyama Reo, Tokino Takashi, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu, Suzuki Hiromu	4. 巻 11
2. 論文標題 UHRF1 depletion and HDAC inhibition reactivate epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-019-0668-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hiromu, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiro-o, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu	4. 巻 99
2. 論文標題 Integrated Analysis of the Endoscopic, Pathological and Molecular Characteristics of Colorectal Tumorigenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 33 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro Kazuya, Kitajima Hiroshi, Niinuma Takeshi, Ishida Tadao, Maruyama Reo, Ikeda Hiroshi, Hayashi Toshiaki, Sasaki Hajime, Wakasugi Hideki, Nishiyama Koyo, Shindo Tetsuya, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 104
2. 論文標題 DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 155 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.191262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Uesugi Noriyuki, Kitada Yuriko, Yamada Noriyuki, Osakabe Mitsumasa, Eizuka Makoto, Sugimoto Ryo, Fujita Yasuko, Kawasaki Keisuke, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiroo, Suzuki Hiromu, Matsumoto Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysis of the expression of cancer-associated fibroblast- and EMT-related proteins in submucosal invasive colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2702 ~ 2712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.25646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Koyo, Maruyama Reo, Niinuma Takeshi, Kai Masahiro, Kitajima Hiroshi, Toyota Mutsumi, Hatanaka Yui, Igarashi Tomohiro, Kobayashi Jun-ichi, Ogi Kazuhiro, Dehari Hironari, Miyazaki Akihiro, Yorozu Akira, Yamamoto Eiichiro et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0893-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakasugi Hideki, Takahashi Hideaki, Niinuma Takeshi, et al.	4. 巻 434
2. 論文標題 Dysregulation of miRNA in chronic hepatitis B is associated with hepatocellular carcinoma risk after nucleos(t)ide analogue treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 91 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.07.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Eizuka Makoto, Fujita Yasuko, Kawasaki Keisuke, Yamamoto Eiichiro, Ishida Kazuyuki, Yamano Hiroo, Suzuki Hiromu, Matsumoto Takayuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Molecular Profiling Based on KRAS/BRAF Mutation, Methylation, and Microsatellite Statuses in Serrated Lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 2626 ~ 2638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-018-5167-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Taku, Yamamoto Eiichiro, et al.	4. 巻 53
2. 論文標題 Surface microstructures are associated with mutational intratumoral heterogeneity in colorectal tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1481-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Eizuka Makoto, Habano Wataru, Fujita Yasuko, Sato Ayaka, Sugimoto Ryo, Otsuka Kouki, Yamamoto Eiichiro, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in intramucosal colorectal neoplasias and early invasive colorectal cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 22895-22906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Subtypes of the Type II Pit Pattern Reflect Distinct Molecular Subclasses in the Serrated Neoplastic Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1920 ~ 1928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-018-5016-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Eizuka Makoto, Arakawa Noriyuki, Osakabe Mitsumasa, Habano Wataru, Fujita Yasuko, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiroo, Endoh Masaki, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular profiling and comprehensive genome-wide analysis of somatic copy number alterations in gastric intramucosal neoplasias based on microsatellite status	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 765 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-018-0810-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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 がん微小環境を制御する治療剤	発明者 山本 英一郎、鈴木 拓、萬 躰、菅井 有	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-146981	出願年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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