

令和元年6月20日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10072

研究課題名(和文) 癌個別化治療を目指したHOXB9によるCellular Senescence誘導

研究課題名(英文) Induction of cellular senescence by HOXB9 for tailor-made treatment

研究代表者

千葉 斉一 (Chiba, Naokazu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90348665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HOXB9導入による Galactosidase染色、PML染色、細胞周期の変化を計測すると、HOXB9遺伝子増幅により Galactosidase染色、PML染色は陽性細胞が増加し、Western Blotでp21が増幅され、細胞周期はG1期の細胞が増加していた。一方でp21やHOXB9をノックダウンすると、Cellular Senescenceも減弱していた。その結果より、HOXB9はp21を経由してCellular Senescenceを誘導することが判明した。また外科切除検体においては、HOXB9とp21には正の相関が認められ、HOXB9とp21には関連性のあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cellular Senescenceのメカニズムに関する報告は散見されるが、臨床応用に至っているものは少なく、既に乳癌や肝細胞癌の予後因子として研究が進められているHOXB9と、これによるCellular Senescenceのメカニズム解明を意図した研究は未だかつてない。老化関連遺伝子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子は幹細胞機能維持、細胞老化(Cellular Senescence)、細胞癌化という生物現象にそれぞれオーバーラップしながら関わっていると考えられ、以上の一連の研究成果から、HOXB9が癌治療の個別化バイオマーカーとなり、最終的には新たな分子標的治療薬の開発の一端を担う可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Positive cells in b-Galactosidase and PML were up-regulated and p21 genes and G1 phase cells were amplified by induction of HOXB9. On the other hand, knocking down of p21 and HOXB9 also attenuated cellular senescence. The results showed that HOXB9 induces cellular senescence via p21 pathway. In addition, in the surgically resected specimens, HOXB9 and p21 were positively correlated, suggesting that HOXB9 and p21 are related.

研究分野：Oncology

キーワード：HOXB9 Cellular Senescence

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞複製の正確な遂行は生命を維持する上での必須条件であり、その異常は癌などの疾患の原因となっている。外的要因によりゲノムに異常が生じると細胞周期チェックポイント機構が働き異常細胞の増殖を防ぐための安全装置が作動することが知られている。Cellular Senescence とは発癌の危険性のある修復不可能な DNA 障害が生じることで起こる不可逆的な増殖停止状態のことで、この現象はアポトーシスと同様重要な癌抑制機構であると考えられている。一方でこの Cellular Senescence は慢性炎症の惹起や癌の進展など生体に不利益をもたらす可能性も示唆されている。

我々の現在までの研究成果により HOXB9 遺伝子が Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) を通じて癌の転移や浸潤に関わる因子であり、さらには放射線照射による DNA 修復機構へ影響を与えていることが確認されている。この EMT という現象は癌の浸潤・転移に深く関係する一方で、癌幹細胞理論や Cellular Senescence とに関連した報告は認めるが詳細な機序はいまだ不明である。そこで HOXB9 遺伝子による癌の悪性化のメカニズム解明と Cellular Senescence の関連性を解明するため本研究課題を申請した。

2. 研究の目的

転写因子 HOXB9 はヒトゲノム上に 39 種存在する HOX 遺伝子ファミリーの一つで、HOX 遺伝子群は胎生期における器官形成時の分化に重要な役割を演じているが、近年腫瘍の発生と進展に深く関わっていることが多数報告されている。一方細胞老化 (Cellular Senescence) 現象が癌抑制機構に働くと同時に発癌作用や癌の悪性度への影響を及ぼす作用を有する可能性が報告されている。我々は HOXB9 遺伝子に注目し、本遺伝子が Cellular Senescence 誘導を中心として癌の悪性化に寄与することを明らかにし、さらには癌細胞でこれらのメカニズムを利用した新しい癌バイオマーカーの確立を目的とし本研究を立案した。

3. 研究の方法

1)HOXB9 による細胞周期チェックポイント機構の詳細な検討

HOXB9 導入によりどのような経路で細胞周期が停止しているのか検討するため、HOXB9 導入細胞において p21、p16、PML 以外の細胞周期チェックポイント機構のパラメータ (p53、Cyclin D、Cyclin E、Rb など) の変化を検証する。

2)p21 ノックアウトによる HOXB9 導入細胞における Cellular Senescence と細胞周期の変化
現在の研究成果から重要なメカニズムは p21/p53 経路であると推定されており、p21 をノックアウトするため、我々はすでに sh p21 のプラスミドを作製済みである。その sh p21 を用いて p21 をノックアウトし、HOXB9 導入細胞における Cellular Senescence と細胞周期の変化を検討する。

3)HOXB9 ノックアウトによる上記結果の Reverse の検証

以上の結果を踏まえて、HOXB9 高発現細胞 (MB231 など) において shHOXB9 により HOXB9 をノックダウンし上記結果の逆効果を検証する。

4)in vivo における HOXB9 導入後の p21 ノックダウンの効果の検証

我々はすでに Ras 誘導 MCF10A に HOXB9 を導入し、その細胞を免疫不全マウスに異種移植した in vivo モデルにおいて HOXB9 導入により腫瘍径の増大や転移の亢進を確認している。そこでさらに sh p21 をあらかじめ導入した Ras 誘導 MCF10A 細胞に HOXB9 を導入し、腫瘍の継時的変化や転移の有無などを検討する。

5)臨床検体における HOXB9 と細胞周期チェックポイント機構との相関関係の検討

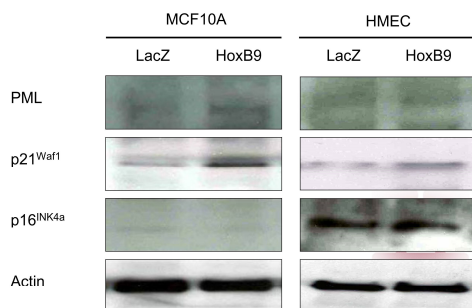
外科手術において得られた検体を処理し RNA を抽出し、その組織中の HOXB9 と p21、Cyclin D、Rb などの細胞周期パラメータの変化を PCR 法にて検討する。さらには臨床検体と予後とを照会し HOXB9 と腫瘍悪性度との関連性につき検討する。

4. 研究成果

1) HoxB9 による細胞周期チェックポイント機構の詳細な検討

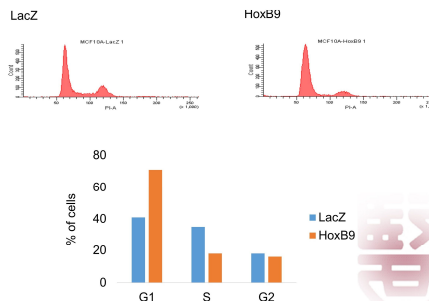
HoxB9 導入により、p21 経路や PML 蛋白の増幅が確認された一方で、p16 経路では変化を認めなかった (図 1)。FACS による細胞周期分析では G1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少していた (図 2)。

図1: HoxB9によるSenescence markerの変動



Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

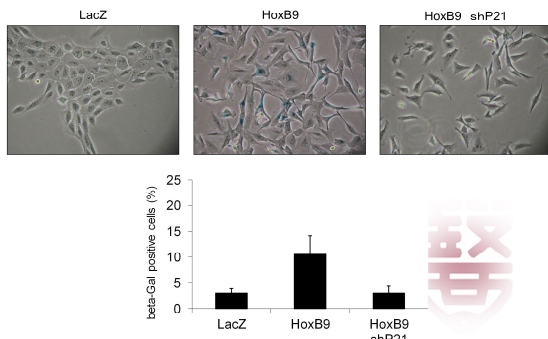
図2: HoxB9による細胞周期変動



Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

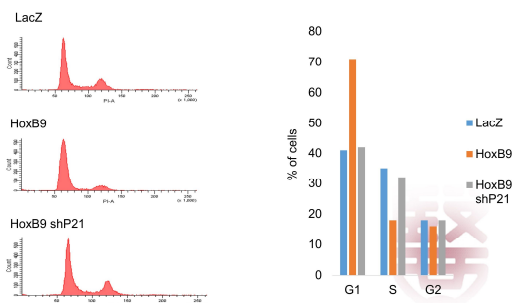
2) p21 ノックアウトによる HoxB9 導入細胞における Cellular Senescence と細胞周期の変化
現在の研究成果から重要なメカニズムは p21/p53 経路であると推定された。そこで p21 を shRNA によってノックアウトすることにより、Galactosidase 染色陽性細胞が減少し、細胞周期分析では G1 期の細胞が減少し、S 期の細胞が増加しており、HoxB9 によって増幅された Cellular Senescence が抑制されていた (図 3、4)。

図3: shP21によるβGalactosidase染色



Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

図4: shP21による細胞周期変動

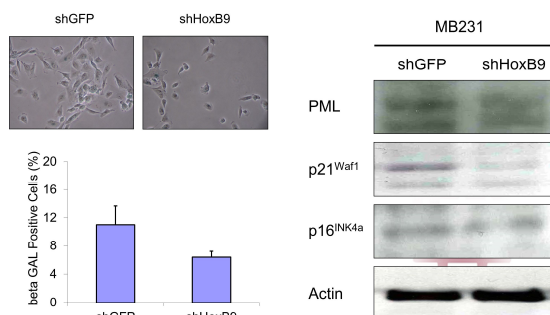


Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

3) HoxB9 ノックアウトによる上記結果の Reverse の検証

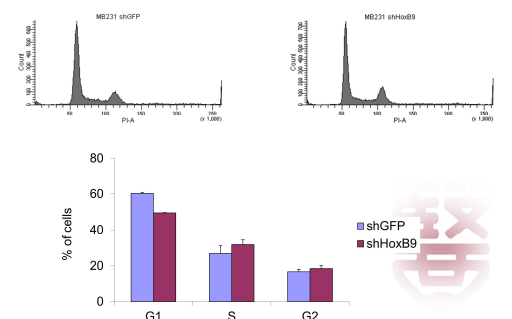
HoxB9 高発現細胞である MB231 において shHoxB9 により HoxB9 をノックダウンすると、Galactosidase 染色陽性細胞は減少し、p21 や PML も減少していた (図 5)。細胞周期分析では、G1 期の細胞が減少し、S 期の細胞は増加していた (図 6)。つまり、上記 Cellular Senescence に関して、Reverse effect が再現された。

図5: shHoxB9によるReverse effect



Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

図6: shHoxB9による細胞周期変動



Department of Digestive and Transplantation Surgery
Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

4) in vivo における HoxB9 導入後の p21 ノックダウンの効果の検証

現在、sh p21 をあらかじめ導入した Ras 誘導 MCF10A 細胞に HOXB9 を導入し、腫瘍の継時的変化や転移の有無などを検討する予定で実験を検討中である。

5)臨床検体における HOXB9 と細胞周期チェックポイント機構との相関関係の検討
外科手術において得られた検体を処理し RNA を抽出し、その組織中の HOXB9 と p21 の変化を検証すると、HOXB9 と p21 には有意な相関関係を認めた。今後さらに、臨床検体と予後とを照会し HOXB9 と腫瘍悪性度との関連性につき検討する予定である。

5. 主な発表論文等

現在執筆中

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 佐野達、千葉齊一、郡司崇裕、小澤陽介、疋田康祐、沖原正章、富田晃一、大島剛、河地茂行．癌個別化治療を目的とした HOXB9 による Cellular Senescence 誘導 平成 28 年度東京医科大学医学会総会、東京．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。