

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20159

研究課題名(和文) 子宮頸癌の悪性形質に關与する転写因子HOXD9の機能解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Involvement of transcription factor HOXD9 in the malignant phenotype of cervical cancer

研究代表者

菅 裕佳子 (SUGA, Yukako)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40459558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌細胞株のSKG3B株でHOXD9を抑制したことにより活性化する調節因子としてP53が選択された。SiHaとSKG3B株でHOXD9を抑制すると、p53遺伝子の発現には変化せず、P53タンパク発現が増強した。SiHaおよびSKG3B株でHOXD9を抑制すると、E6/7プロモーターを結合したLuciferase活性は有意に低下した。SiHa株を用いたChip assayではHOXD9がP97プロモーターに結合することが示された

研究成果の概要(英文)：Expression changes of all genes by suppressing HOXD9 in cervical cancer cell lines SKG-3B were examined by DNA chip. Based on IPA analysis, P53 signaling was activated after suppression of HOXD9 expression in SKG-3B cells. P53 gene expression did not change, while the P53 protein level was elevated in HOXD9 suppressed SKG3B and SiHa cells. Luciferase activity was significantly decreased after HOXD9 expression was suppressed in SKG-111B cells. In the CHIP assay in SiHa cells (HPV16 positive), HOXD9 was shown to directly bind to the P97 promoter.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：HOXD9 P97プロモーター 子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

HOX 遺伝子は DNA 結合ドメイン (Homeobox domain) を有し、他の遺伝子の転写を制御する遺伝子群で、これまでに 39 種が同定されている。その多くは動植物ともに進化の過程で保存され、多細胞生物の形態形成や組織特異的な遺伝子の発現制御に重要なはたらきをしていることが判明している。近年、この HOX 遺伝子が癌の分野で注目され、多くの癌で過剰発現し、癌の増殖・浸潤・転移や抗がん剤耐性に密接に関与することが報告されている (Nature Review; 361, 2010)。

HOX 遺伝子の各種癌における機能解析が盛んに行われている中で、婦人科癌においては、その解析はほとんど行われていないのが現状であり、これまでに婦人科癌で機能や予後との関連が報告されている HOX 遺伝子は数例の報告があるにすぎない。

子宮頸癌では 39 種の HOX 遺伝子の発現を検討した報告があり、頸癌で高発現する遺伝子は、HOXD9 であったと報告されている (Gynecol Oncol. 84; 216, 2002) が、機能解析は行われていない。

申請者らが、HOXD9 の発現抑制によって 4 種の子宮頸癌細胞株で HOXD9 の発現を抑制すると全ての細胞株で増殖が有意に抑制された (第 64 回日本産科婦人科学会総会 2013)。この分子機構を解明するため、HOXD9 を抑制することによって発現変化する遺伝子を Gene Chip で網羅的に評価し、ウェブ上のパスイ解析ソフトである IPA によって解析した。結果、P53 によって制御される遺伝子群が有意に発現増強していることが明らかとなった。すなわち、子宮頸癌は HPV E6 遺伝子の働きによって P53 タンパクが不活化するが、HOXD9 を抑制することで P53 の活性が上昇し、G1 arrest が生じて細胞増殖が抑制される可能性がある。

2. 研究の目的

子宮頸癌における HOXD9 の悪性形質への関与を遺伝子抑制実験、遺伝子過剰発現実験、を行って明らかとするとともに、本研究で得られた知見を検証し、HOXD9 を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) HOXD9 の発現量と子宮頸癌の臨床病理学的特徴の検討

手術した子宮頸癌 50 例について、HOXD9 の発現量を q-PCR で検討し、年齢、進行期、腫瘍径、組織型、浸潤深度、リンパ管侵襲、リンパ節転移についてカイ 2 乗検定で検討した。

TCGA データベースで同じ条件 (手術症例、リンパ節廓清、IB-IIIA 期) で症例を抽出し、と同様の検討を行って、自験例と同様の結果であるか検討した。

(2) 細胞内 pathway 解析

SKG-B 株で HOXD9 抑制による全遺伝子発現変化を DNA チップ (3D gene® 25K) で網羅

的に解析した。

遺伝子全体の発現変化をもとに、関与している確率の高い調節遺伝子を IPA® (Ingenuity pathway analysis) で 10 個抽出した。

(3) P53 遺伝子およびタンパク発現と HOXD9

IPA で抽出された候補調節遺伝子である P53 について、HPV16 型陽性株である頸癌細胞株 SiHa 株と SKG3B 株を用いて HOXD9 遺伝子発現を抑制した。

p53 遺伝子発現を RT-PCR 法で検討し、ウェスタンブロット法で P53 タンパクの発現を検討した。

(4) HPV16 型 E6/7 遺伝子発現と HOXD9

HPV16 型陽性株である頸癌細胞株 SiHa 株と SKG3B 株で HOXD9 遺伝子を抑制し、E6 および E7 遺伝子発現変化を RT-PCR 法で検討した。

HPV16 型 E6/7 遺伝子のプロモーター (P97 プロモーター) である P97 レポーター・プラスミド pGL3-P97 を用いた luciferase assay によって、HOXD9 が P97 プロモーターを介して E6/7 遺伝子発現を誘導するか検討した。

Chromatin Immunoprecipitation assay (Chip assay) によって HOXD9 が E6/7 のプロモーターに結合しているか検討した。C-myc 標識 HOXD9 タンパクを発現するプラスミド pCMV-hHOXD9-C-myc-DDK を SiHa 株に導入し、48 時間後に、抗 c-myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈殿した DNA 中に P97 プロモーターが含まれるか PCR 法で検討した。

(5) HOXD9 抑制による in vivo での検討

HOXD9 の抑制によって in vivo でも細胞増殖が抑制されるか検討した。BALB/c nude mice に HOXD9 を抑制した 5x10⁶ 個の SiHa 株を皮下移植し 28 日目に腫瘍径を測定した。

4. 研究成果

(1) HOXD9 の発現量と子宮頸癌の臨床病理学的特徴の検討

自験例の 50 例では HOXD9 の発現量と関連する因子は脈管侵襲とリンパ節転移であった。(自験例)

Clinicopathologic characteristics	n=50	Low expression (n=20)	High expression (n=30)	χ^2 -test, P-value	Fisher's exact test, P-value
Gender			30		
male	0	0	0		1.000
female	50	20	30		
Age					
≤45		15	17	0.186	0.190
>45		5	13		
FIGO stage				0.924	—
IB1	39	16	23		
IB2	4	1	3		
IIA1	5	2	3		
IIA2	2	1	1		
Pathologic types					
Squamous	26	9	17	0.419	0.423
Adenocarcinoma	24	11	13		
Stromal invasion					
≤10	24	11	13	0.419	0.423
>10	26	9	17		
Lymphovascular space invasion					
Yes	33	7	26	<0.001	<0.001
No	17	13	4		
Pelvic lymph node metastasis					
Yes	10	1	9	0.030	0.032
No	40	19	21		
Vaginal involvement					
Yes		3	4	0.868	0.869
No		17	26		

TCGA データベースを用いた解析では脈管侵襲とリンパ節転移に加えて、組織型が抽出された。すなわち、組織型以外は同様の結果であった。

(TCGA データベースからの解析)

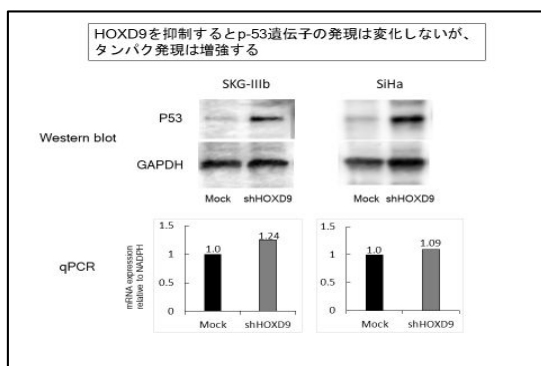
Clinicopathologic characteristics	n=231	Low expression (n=77)	High expression (n=154)	X ² -test, P-value	Fisher's exact test,
Gender			30		
male	0	0	0		1.000
female	231	77	154		
Age				0.456	0.457
≤45	122	38	84		
>45	109	39	70		
FIGO stage				0.360	0.361
I B1/B2	162	57	105		
IIA/IB	69	20	49		
Pathologic types					
Squamous	187	45	142	<0.001	<0.001
Adenocarcinoma*	44	32	12		
Stromal invasion					
NR	231				
Lymphovascular space invasion					
Yes	61	17	44	0.011	0.011
No	66	33	33		
NR	104				
Pelvic lymph node metastasis					
Yes	37	8	29	0.034	0.035
No	128	52	76		
NR	66				
Vaginal involvement					
NR	231				

(2) 細胞内 pathway 解析

HOXD9 を抑制した SKG3B 株で、Mock 株と 3D-Gene でマイクロアレイを行い、結果を IPA で解析したところ、最も変化した pathway は P53 であった。

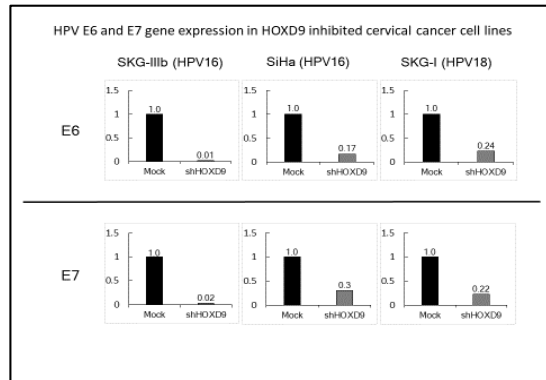
調節遺伝子	Z score
TP53	3.976
ADIPOQ	3.523
H-7	3.232
GATA6	3.216
ADIPOQ	3.521
MITF	3.144
PTEN	2.841
SB203580	2.833
POU3F2	2.646
TAZ	2.588

(3) P53 遺伝子およびタンパク発現と HOXD9 HPV16 型陽性株の SKG-3B と SiHa 株で HOXD9 を抑制すると、P53 の遺伝子発現は変化しないが、P53 タンパクの発現量が増強された。

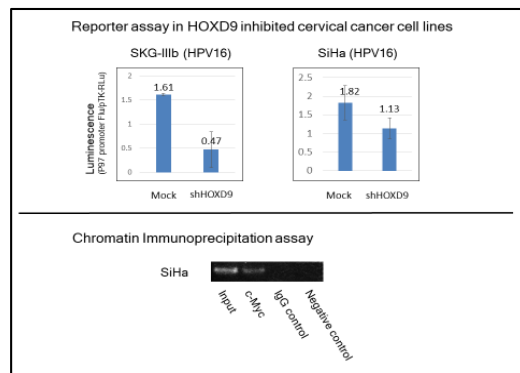


(4) HPV16 型 E6/7 遺伝子発現と HOXD9 HOXD9 の発現を SKG3B 株と SiHa 株、SKG-I

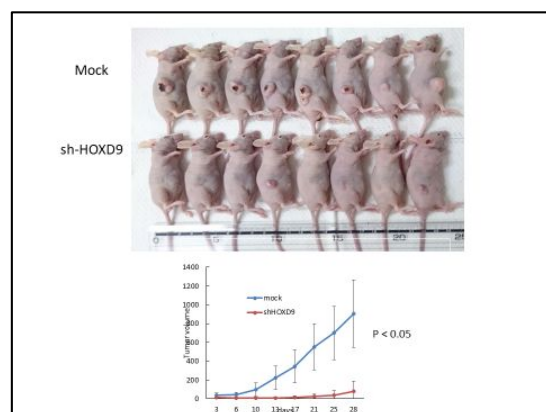
株で抑制したところ、HPV 遺伝子の E6/E7 遺伝子の発現が顕著に抑制された。



さらに、HPV16 型の E6/7 プロモーターである P97 プロモーターを用いてプロモーターアッセイを行ったところ、HOXD9 の抑制によって P97 プロモーターの活性が有意に低下した。また、実際に P97 プロモーターに HOXD9 が結合するか SiHa 株を用いて ChIP assay で確認したところ、P97 プロモーターが anti-MYC 抗体で沈殿し、HOXD9 が P97 プロモーターに直接結合することが示された。



(5)HOXD9 抑制による in vivo での検討 HOXD9 抑制株は in vivo 実験でも Mock 株に比べて顕著に増殖が抑制された。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 佐伯直彦、岩田卓、菅裕佳子、青木大輔、ほか。子宮頸癌における転写因子 HOXD9 の悪性形質への関与と分子生物学的機序の解明。第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会。2017 年
- (2) 岩田卓、菅裕佳子、青木大輔、ほか。転写因子 HOXD9 が子宮頸癌の悪性形質に与える影響。第 15 回 日本婦人科がん分子標的研究会。2016 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅 裕佳子 (SUGA, Yukako)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 40459558

(4)研究協力者

河上 裕 (KAWAKMI, Yutaka)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号 : 50161287

岩田 卓 (IWATA, Takashi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号 : 30296652