

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23897

研究課題名（和文）HOX遺伝子群の発現とWnt経路活性による乳癌予後予測モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of a Breast Cancer Prognostic Model Based on HOX Gene Expression and Wnt Pathway Activity

研究代表者

横江 隆道（Yokoe, Takamichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：90649956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：HOX遺伝子群は胎生期の発生を司るマスターレギュレーターであるが、悪性腫瘍の発症や進展に関わっていることが近年報告された。共変動するHOX遺伝子群の全体の働きは未だ解明されていない。本研究では、Luminal乳癌におけるHOX遺伝子群の発現パターンと、Wntとの関係、および臨床の予後との関係について明らかにすることを目的とした。公開データの解析から、Luminal乳癌ではHOX-C10遺伝子が中心となって予後を分けていることが分かった。また、HOXシグネチャーによる予後予測アルゴリズムを用いることで正確にLuminal乳癌の予後を予測できることが示された（感度61%、特異度64%）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去のHOX遺伝子と乳癌に関する報告は、個々のHOX遺伝子に注目した検討に留まっている。本研究ではHOX遺伝子全体に着目し、乳癌の臨床病理学的データと統合して網羅的な解析を行った点で、学術的貢献度が高いと言える。ホルモン陽性乳癌の予後予測は補助化学療法の施行の判断に直結するため、OncotypeDX等の様々な多遺伝子アッセイが商用化されているが、いずれも乳癌の全遺伝子発現をクラスター分類して予後と相関させている。本研究では、一貫した機能を持つと考えられる単一のHOX遺伝子ファミリーの機能解析を通じて予後予測を行っており、他の多遺伝子アッセイとは異なる新しい方法で臨床に貢献する研究となった。

研究成果の概要（英文）：The HOX gene group is a master regulator of development during the embryonic period. It has recently been reported that HOX gene is involved in the development and progression of malignant tumors. The overall function of HOX genes has not yet been elucidated. The purpose of this study was to clarify the relationship between the expression pattern of HOX genes in luminal breast cancer and Wnt pathway, and also between HOX gene expression pattern and clinical prognosis. Analysis of public data revealed that the HOX-C10 gene plays a central role in dividing the prognosis of Luminal breast cancer. It was also shown that the prognosis of luminal breast cancer can be accurately predicted using a prognosis prediction algorithm based on the HOX signature (sensitivity 61%, specificity 64%).

研究分野：乳癌

キーワード：HOX遺伝子 Luminal乳癌 クラスターリング 予後予測 共変動解析

1. 研究開始当初の背景

(1)ホメオボックス(HOX)遺伝子は、高い相同性を持って種保存的に存在し、複数の染色体上に位置する、胎生期の発生において非常に重要なマスターレギュレータ遺伝子である。転写因子としてお互いに強く連動しながら他の多くの遺伝子調節を担当する。

近年、HOX 遺伝子が個体の正常組織および病的組織にも発現し、悪性腫瘍の発症や進展に関わっていることが明らかになり、乳癌においても多くの HOX 遺伝子が異常発現することが知られている。個々の HOX 遺伝子については、腫瘍における個別の役割が明らかになりつつあるが、乳がんにおける HOX 遺伝子群全体および関連する遺伝子の網羅的な発現パターンや、サブタイプ別の検討は、これまで全くなされていない。

(2)前実験として、in silico で HOX 遺伝子群全体の発現パターンと乳癌の分子生物学的・臨床病理学的性質との関係について検討した。TCGA 乳癌データにおいて、全 38 種類の HOX 遺伝子発現に対してクラスタリングを行い、HOXB2, B3, B5, B6 という 4 遺伝子の高発現により規定される特徴的なクラスターを発見し、サブタイプ毎にこの連動パターンが異なることが示された。更に pathway 解析により、Wnt 経路活性がこれらの HOX 遺伝子と強く連動発現していることが明らかになった。

次に、HOX 発現パターンと予後の関連の検討のため、公開されている 4 つの乳癌遺伝子発現マイクロアレイデータ 702 症例に対してメタ解析を行い、HOX 遺伝子群を用いたクラスタリング(以下 HOX シグネチャー)が予後と関連することが分かった。特に、この HOX シグネチャーは術後補助化学療法の適応判断が難しい Luminal B 乳癌の予後を規定することが示唆された。

2. 研究の目的

これら学術的背景と前実験の in silico の結果を踏まえ、in vitro および実際の臨床検体で、Luminal B 乳癌における HOX シグネチャーと Wnt 経路活性の分子生物学的・臨床病理学的意義を明らかにすることを本研究計画の目的と定めた。

本研究により、乳癌進展メカニズムにおける Wnt 経路の役割の解明や、臨床において術後補助化学療法の適応の判断となる予後予測方法の確立と、Wnt 経路阻害による創薬の開発など、乳癌の基礎・臨床において極めて独創的かつ創造的な貢献となることが予想される。

3. 研究の方法

機械学習を用い、ある単独のサンプルの予後を HOX シグネチャーで予測するアルゴリズムをすでに確立している。その上で、以下を明らかにする。

(1) Wnt 経路活性による HOX 遺伝子発現の变化解析

各 Luminal 乳癌細胞株 (T47D, MCF7 等) の HOX シグネチャーを確認し、予後良好・不良のどちらに分かれるか確認する。その上で、Wnt 経路の活性を予後良好細胞株では亢進させ、予後不良細胞株では抑制させることで、HOX シグネチャーの変化を確認する。具体的には、予後良好細胞株は Lithium chloride 下で培養し、不良群では -catenin 阻害薬下での培養後、mRNA を抽出し qPCR またはマイクロアレイにて HOX シグネチャーを再評価する。また、CDX 遺伝子は HOX 遺伝子群と Wnt 経路活性の連動に強く関わり、ハブのような働きをし得ると考えている。そのため、CDX 遺伝子を含めた HOX 関連遺伝子の変化も同時に評価する。

(2) 臨床検体において HOX シグネチャーと Wnt 経路活性による予後の解析

自施設および協力施設の実際の臨床検体の予後情報と、HOX シグネチャー(予後良好群か不良群か)を照合し、このアルゴリズムの妥当性を評価する。

以上の解析により、実臨床において術後補助化学療法の適応の判断となる新たな予後予測方法の確立が可能である。また、-catenin 阻害薬を用いて Wnt 経路を不活化する方法を応用し、予後の悪い Luminal B 乳癌に対する創薬開発に繋がると考える。

4. 研究成果

(1)全 HOX 遺伝子の中で、Luminal 乳癌のクラスタリングにおいて予後を分けている遺伝子がどれであるか、公開データを用いて解析を行なった。その結果から、Luminal 乳癌のクラスタリングにおいて特に HOX-C10 遺伝子が中心となり予後を分けていることが明らかとなった(図 1)。

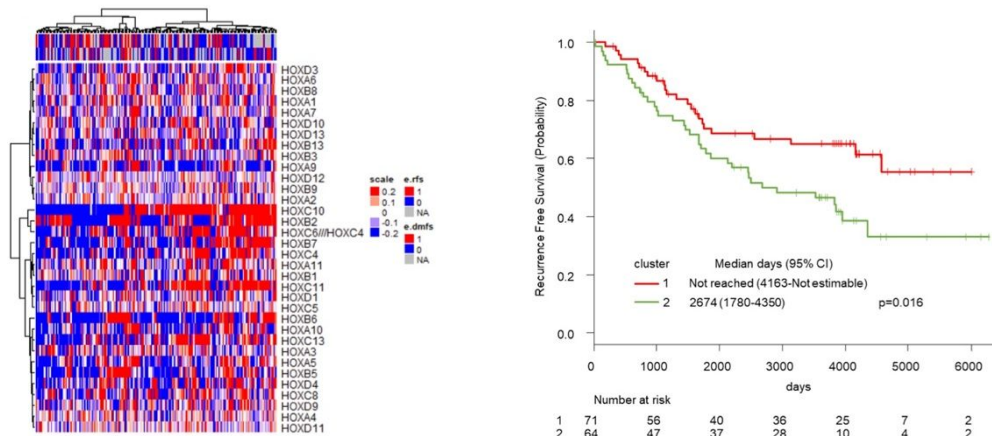


図1 HOX 遺伝子による Luminal 乳癌のクラスタリングと予後との関係

(2)Luminal 乳癌細胞株の実験では、T47D と MCF7 は予後が良好である Luminal A に分類されることが分かった。これらの細胞株に対して Wnt 経路の活性化を行い、HOX-C10 を中心とした HOX 遺伝子の発現および HOX シグネチャーの変化を確認する実験を行なった。

(3)Luminal 乳癌における HOX シグネチャーを用いた予後の解析については、始めの段階としてオンライン公開データを用いて HOX シグネチャーによる予後予測アルゴリズムの妥当性を評価した。Luminal 乳癌の予後予測検査として OncotypeDX が既に実用化されており、研究用に使用できる OncotypeDX の擬似アルゴリズムを入手した。オンライン公開データを対象とした Luminal 乳癌の再発予測アルゴリズムの感度と特異度は、OncotypeDX の擬似アルゴリズムでは感度 54% と特異度 31%であったが、HOX シグネチャーによる予後予測アルゴリズムを用いると感度 61% と特異度 64%であり、HOX シグネチャーを用いることでより正確に Luminal 乳癌の予後を予測できることが示された(図2)。白血病、肉腫の公開データを用いた解析でも、HOX シグネチャーによって予後を分けることができた(図3)。

	oncotype DX Breast Cancer Assay			mammoprint		HOX pattern		
	High	Inter-mediate	Low	High	Low	cluster 2	cluster 1	
pts without recurrence	74	29	22	23	35	39	27	47
pts with recurrence	61	33	21	7	45	16	37	24
recurrence sensitivity	54%			75%		61%		
recurrence specificity	31%			53%		64%		

図2

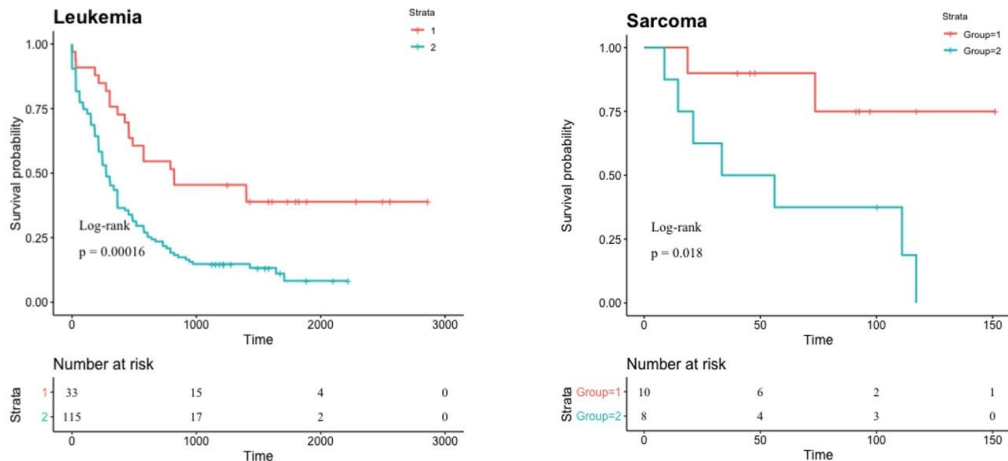


図3 白血病および肉腫における HOX シグネチャーを用いた予後解析

(4)HOX 遺伝子の共変動解析では、公開データを用い、乳癌において HOXA, B, C 同士が強く共変動していることが示され、正常乳腺では共変動が弱いことが示された。当院の臨床検体を用いた同様の解析でも一致した結果が得られた。HOX シグネチャーでも、より悪性度が高い方が強い共変動を認める結果は一致していた。

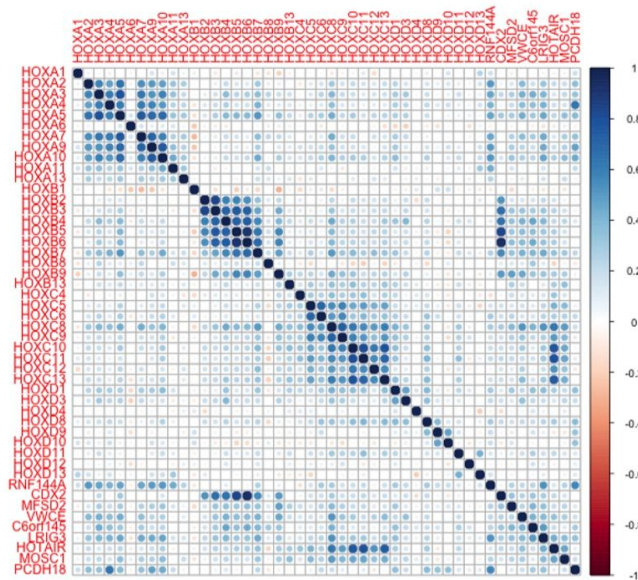


図4 Luminal B 乳癌における全 HOX 遺伝子による共変動解析

過去の HOX 遺伝子と乳癌に関する報告は、個々の HOX 遺伝子に注目した検討に留まっている。本研究では HOX 遺伝子全体に着目し、乳癌の臨床病理学的データと統合して網羅的な解析を行った点で、学術的貢献度が高いと言える。

ホルモン陽性乳癌の予後予測は補助化学療法の施行の判断に直結するため、OncotypeDX 等の様々な多遺伝子アッセイが商用化されているが、いずれも乳癌の全遺伝子発現をクラスター分類して予後と関連させている。本研究では、一貫した機能を持つと考えられる単一の HOX 遺伝子ファミリーの機能解析を通じて予後予測を行っており、他の多遺伝子アッセイとは異なる新しい方法で臨床に貢献する研究となった。

現在、HOX シグネチャーを用いた予後予測のアルゴリズムの実用化を目指している。また、細胞株における Wnt 経路についての検討も行い、Luminal 乳癌に対する新たな治療法の開発に取り組む予定である。

<引用文献>

- (1) Shah N, Sukumar S (2010) The Hox genes and their roles in onco- genesis. *Nat Rev Cancer* 10:361-371.
- (2) Wellik DM (2009) Hox genes and vertebrate axial pattern. *Current topics in developmental biology*. Elsevier, Amsterdam, pp 257-278
- (3) Deschamps J, Duboule D (2017) Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the Hox clock. *Genes Dev* 31:1406-1416.
- (4) Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM (2014) HOX genes and their role in the development of human cancers. *J Mol Med* 2014;92:811- 823.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横江 隆道
2. 発表標題 HOX遺伝子発現プロファイルの乳癌における臨床的および分子生物学的意義の検討
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------