

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17591

研究課題名（和文）HOX遺伝子群の網羅的解析によるLuminalB乳癌予後予測モデルの確立

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the homeobox family genes in breast cancer demonstrates their similar roles in cancer and development

研究代表者

小谷 依里奈 (ODANI, Erina)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70868398

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）：HOX遺伝子群は39個の遺伝子からなり、胎生期にはHOX遺伝子群内で強く共変動しているため、乳癌における役割を解明するためにHOX遺伝子群全体の網羅的解析を施行した。全ヒト遺伝子の中で、各HOX遺伝子と共変動する遺伝子は染色体上で隣接する他のHOX遺伝子であった。公共データベースから702例の乳癌データを集めメタ解析を行ったところ、HOX遺伝子群を用いたクラスタリングにより、Luminal B乳癌患者において、無再発生存に有意な差を認められた（ $p=0.006$ ）。また予後不良クラスターにおいて、Wnt経路の活性化がより強くみられ、HOX遺伝子同士の相関がより強かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HOX遺伝子群の発現は腫瘍内で強く連動し合い、サブタイプ毎に連動パターンが異なること、またLuminal B症例ではHOX遺伝子群の発現パターンにより予後が規定されることが判明した。すなわち、HOX遺伝子群の網羅的解析により、乳癌の予後を規定することができ、発生時にHOX遺伝子の上流シグナルとして働くWnt経路の活性化を反映していると考えられた。これらの結果から胎生期にHOX遺伝子の強い共変動がみられることと同様の現象が、予後不良な乳癌にも認められ、胎生期と癌におけるHOX遺伝子群の挙動に関して興味深い類似性が示唆され、腫瘍生物学的に重要な意義を持つと考えられた。

研究成果の概要（英文）：To get to the essence of the HOX genes, which are highly homologous and linked, these comprehensive analyses were considered necessary. We used 512 TCGA breast cancer array data to calculate the covariations between the genes in breast cancer. We found out that HOX genes covariate the most with other HOX genes, especially within the chromosomally proximal groups. However, in the normal breast tissue, the expression of HOX genes was random, and much fewer correlations were observed among HOX genes. Furthermore, when we compared Luminal A and B classified by PAM50, co-variation was more strongly observed in Luminal B, which is considered to be more malignant. HOX genes strongly interact with each other in breast cancer, similar to that during development, contrary to the findings observed for normal breast tissue.

研究分野：乳腺外科

キーワード：HOX遺伝子群 乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス(HOX)遺伝子は胎生期の発生におけるマスターレギュレータ遺伝子として互いに強い連動性をもって複数の染色体上に存在し、転写因子として他の多くの遺伝子の調節を担当する。また、菌類、植物からヒトまで、高い相同性をもって種保存的に存在しており、生物において根源的で普遍的な遺伝子である。共通構造として、2つのエクソンと1つのイントロンから構成され、ホメオドメインというDNA結合部位を持つ。

近年、HOX 遺伝子が胎生期のみならず、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、乳癌における HOX 遺伝子群全体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。

発生時には互いに強く連動し綿密に制御し合う HOX 遺伝子群は、乳癌の発生や進展においても重要な働きを行っている可能性があり、これを検討するためには、その全体像を捉えることが不可欠と考えられる。そのため、「HOX 遺伝子群全体の発現パターンは、乳癌の分子生物学的および臨床病理学的な性質を反映するか」が本研究課題の核心をなす学問的問いである。

これに対して答えを出すために、TCGA および公開されている乳癌遺伝子発現アレイデータを用いて、前研究として独自に解析を行ってきた。その結果、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ったところ、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た。同一染色体上に存在する HOXB 遺伝子群において、染色体上の位置的に近い部位にある遺伝子が、同時に高発現していることから、胎生期の HOX 遺伝子発現と同様に、隣り合った HOX 遺伝子同士が乳癌細胞においても強く連動していると考えられた。そのため、これらと共変動する HOX 遺伝子、および非 HOX 遺伝子の両者を解析し、またその連動パターンがサブタイプ別に異なるかどうかを検証した。その結果、HOX 遺伝子群は各群内で互いに強くお互いと連動する傾向にあるが、HOXD 群ではその傾向が弱いことや、A,B,C 群においても、比較的連動しない遺伝子が存在することが明らかになった。また、サブタイプ毎にこの連動パターンが異なることも明らかになった。

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 つのマイクロアレイデータ 702 症例に対してメタ解析の手法を応用して解析を行った。前述の通り、HOX 遺伝子群の発現パターンがサブタイプ毎に異なるため、サブタイプ毎に予後の解析との関連を検証した。その結果、PAM50 により規定される Luminal B 乳癌においてのみ、HOX 遺伝子群を用いたクラスタリングにより、予後不良・良好群を規定することが可能である。

2. 研究の目的

これら学問的背景と前研究の結果をふまえ、乳癌における全 HOX 遺伝子の発現をバイオインフォマティクス的手法により網羅的に解析し、サブタイプや予後を含めた分子生物学的・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。

これまでの HOX 遺伝子群全体と乳癌における検証は、各 HOX 遺伝子に 1 つ 1 つ注目した基礎的な論文と、それらを集めた文献的レビューに留まっている。しかし前実験の結果から、乳癌細胞においても相同性と連動性が高いことが判明した HOX 遺伝子群の本質に迫るには、これら網羅的解析が必要かつ最適と考えられ、これは現在までに報告はなく、HOX 遺伝子群と乳癌の進展・予後に対する独創的なアプローチである。本研究により、乳癌進展メカニズムにおける HOX 遺伝子群の機能的な役割や、Luminal B の臨床検体での予後の検証など、乳癌の基礎・臨床に大きく貢献することを最終的な目標と考え、本研究を遂行した。

3. 研究の方法

我々は HOXB9 遺伝子に着目して、乳癌の進展メカニズムの解明を目的として研究を継続している。しかしこれを進めていく過程において、

- HOXB9 だけでなく他の HOX 遺伝子群の多くが乳癌を含む悪性腫瘍に異常発現する
- HOX 遺伝子群は構造に強い相同性と種を超えた保存性がある
- 発生時には 3' 末端から 5' 末端側に向かって HOX1,2,3... と順に発現し相互作用を示す

ことから、HOX 遺伝子群の全体像を捉えて解明することが必要ではないかと考えるに至った。さらに、この相同性と連動性が高い HOX 遺伝子群の本質に迫るには、バイオインフォマティクス的手法での網羅的な解析を通じて、各 HOX 遺伝子発現の連動を検討することが最適と考えられた。この着想をもとに *in silico* 解析を行い、

- 発生の際と同様に腫瘍においても位置的に近い HOX 遺伝子同士が強く連動し制御し

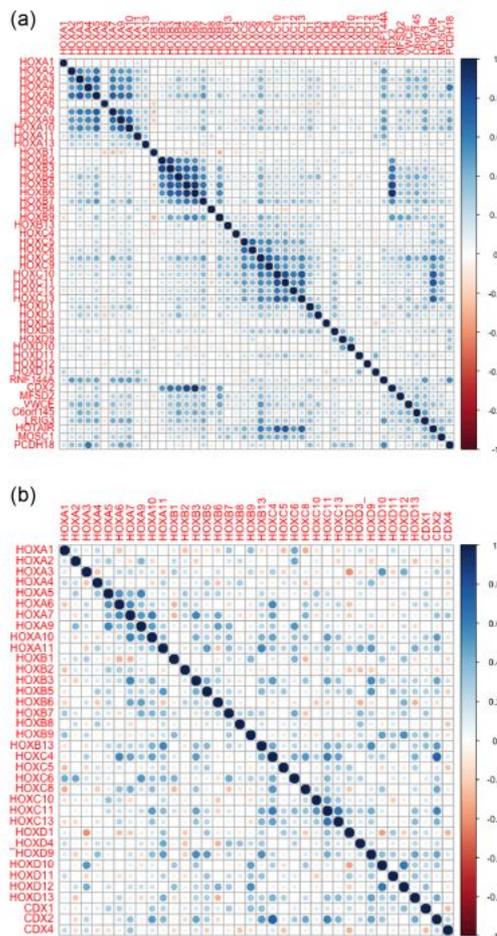


図1 公共データベースを用いたHOX遺伝子群の共発現 (a)luminal B乳癌, (b)正常乳腺組織

合う

- 乳癌のサブタイプ毎に HOX 同士の連動パターンが異なる

- Luminal B 乳癌では HOX 遺伝子群を用いたクラスタリングで予後が規定されることが示されたことにより、これを深く解析することで、臨床応用への道が開けると考えられた。そのため、以下の方法で研究を進めることとした。

HOX 遺伝子群により規定された予後別のクラスターにおける生物学的な差異の検証

前述の通り、Luminal B における全 HOX 遺伝子によるクラスタリングによって予後良好・不良群を分けることができたが、2 群間にどのような生物学的な差異があるのかを解析する。メタ解析で利用したマイクロアレイデータにおいて 2 群間に差がある遺伝子を抽出し、Gene Ontology の解析や pathway 解析によって、予後不良群の腫瘍内で起きている生物学的な事象を抽出する。

Luminal B 群の予後不良を規定するメカニズムの基礎実験による解明

で得られた分子生物学的な知見を、in vitro の系を用いて基礎実験で検証し、Luminal B 群の予後不良を規定する分子生物学的メカニズムを解明する。

HOX 遺伝子群と強く連動する遺伝子を基礎実験による検証

これまでに行われた前研究から、HOX 遺伝子を強く連動する遺伝子 (CDX-2, SKAP-1 等) が判明したため、これらと HOX 遺伝子群の関係を乳癌細胞株でも検証する。これら遺伝子の発現調節により、HOX 遺伝子の発現の変化と、細胞形質の変化の相関を検証する。特に、HOX 遺伝子は胎生期に強く発現する細胞であり、上皮間葉転換 (EMT) などの形質変化を生じることが知られているため、これらを重点

的に検証する。

HOX 遺伝子発現で規定された予後良好・不良クラスターを分けるアルゴリズムの確立

クラスタリングは一定数のサンプルの群のなかで相対的にグループ分けを行うため、単一サンプルに対して予後良好・不良のクラスター分けを行うことができない。そのため、先のマイクロアレイデータを使用し、Luminal B の単一サンプルに対しても予後良好・不良群どちらに当てはまるかを判定できるようにするためのアルゴリズムの構築 (モデル式をつくる) を行う。具体的な手法として、それぞれの群におけるプロベの平均値を定め、それぞれのクラスターの代表を算出する方法がある。また高度なものとしては人工知能を用いた機械学習を使用する手法があり、一般的にはこちらの方がボーダーラインの判別精度が上がるとされている。両者の手法を行い、比較検討していく。

自施設・協力施設の臨床検体データとの照合

で構築したアルゴリズムを用いて、自施設および協力施設の遺伝子発現データと臨床情報を validation cohort として予後解析を行う。すでに 400 例を超える遺伝子発現データを持つ施設と共同し、それぞれの患者が予後良好・不良クラスターのどちらにあてはまるかをアルゴリズムに則って判定し、予後情報と照合する。この過程により、モデル式を修正・改善し、HOX 遺伝子群発現解析によるクラスタリングを、Luminal B 乳癌患者の予後予測ツールとして確立し、新たな multi gene assay として運用を行う。

上記のうち、を初年度から取り組む。平行して の基礎的検討を行い、新たな知見が判明したところで、前者に反映させていく予定である。

4. 研究成果

まず、HOX ファミリーと共発現している遺伝子を調べるために、乳がんと正常乳腺における各 HOX 遺伝子発現の相関係数を算出した。その結果、乳がんのすべてのサブタイプにおいて、隣接する HOX 遺伝子、特に HOX-A、HOX-B、HOX-C の同じクラスターに属する遺伝子は互いに強く相関しており、また近接したクラスターにある HOX 遺伝子は、共発現する傾向があることが確認された。また、当院患者の乳がんサンプルを使用したデータにおいても相関を解析したところ、前述

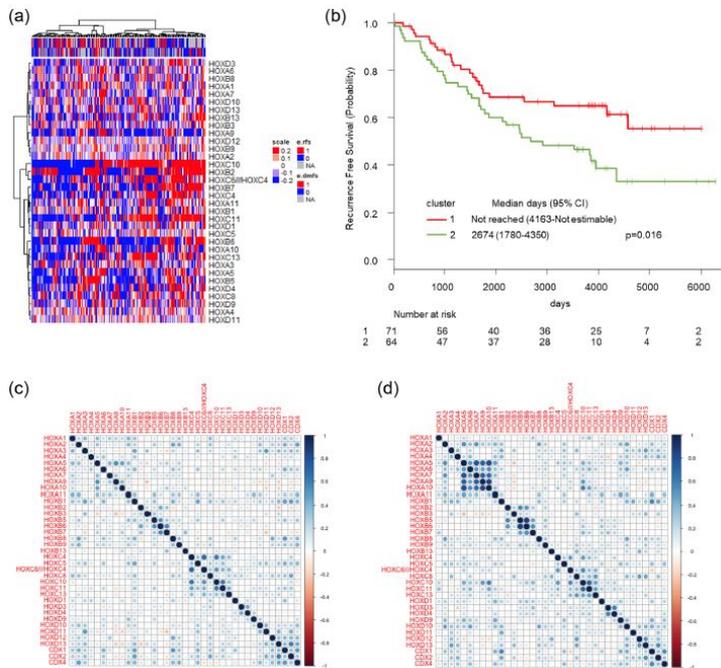


図2 Luminal B 乳癌における HOX 遺伝子発現を用いたクラスター分類と、各分類の共発現状況。(a) 教師無しクラスター分類による遺伝子発現の違い、(b) クラスター分類を用いた予後検討、(c) 共変動(予後良好群)、(d) 共変動(予後不良群)

C クラスター内、特に HOTAIR に近接した遺伝子に強い相関を示した

4 つのデータセットから乳癌のマイクロアレイデータと予後情報を 4 つの公共データベースのデータセットから 702 サンプル収集した。これらを統合し、階層型クラスタリングにより、HOX 遺伝子の発現パターンに基づいて、2 つのクラスターに分類した。その結果、Luminal B 乳癌患者において、2 つのクラスターに属する患者の無再発生存率は統計的に有意な差を認めた ($p = 0.016$)、(図 2) 2 群間の DEGs を用いた Gene Ontology (GO) 解析では、予後不良クラスターで Wnt シグナル伝達経路 (GO:00016605) が活性化されていることが示された。さらに、同じ Luminal B 乳癌患者のデータを用いて、OncotypeDX の再発スコアを仮想的に算出し、再発予測に関する感度と特異度を比較したところ、前述の HOX パターン分類は、既存の再発スコアと同等以上の感度・特異度を達成した。また、この分類を行った Luminal B 乳癌における HOX 遺伝子群の共発現を検討したところ、予後良好群では正常組織の相関パターンと同様に HOX 遺伝子間に相関が認められなかったが、予後不良群では強い相関が見られた。(図 2)

次に、HOX 遺伝子の発現パターンによる予後予測が、他の悪性腫瘍に普遍的に適用できるかどうかを検討した。乳がんは固形がんに属することから、白血病と肉腫の 2 つの非上皮性悪性腫瘍を選び、HOX 遺伝子発現パターンに基づいて 2 群に分類したところ、白血病 ($p=0.00016$)、肉腫 ($p=0.018$) とともに、それぞれの疾患の患者の全生存率は統計的に有意な差が認められることが確認された。(図 3)

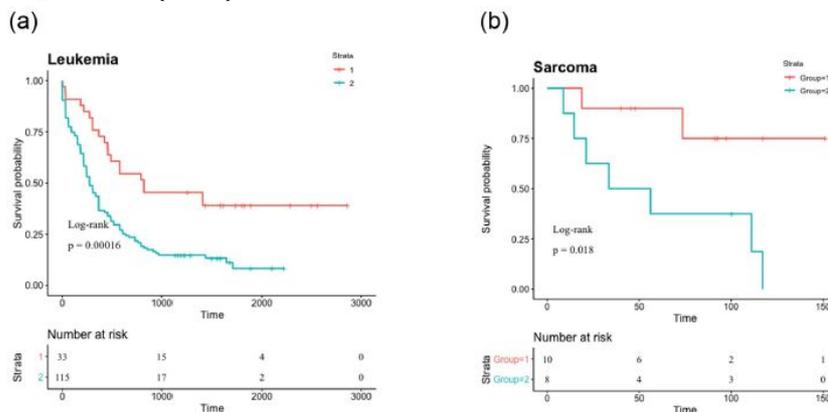


図3 HOX クラスター分類による(a)白血病、(b)肉腫、の予後解析

の公共データベースの結果と同様に、HOX 遺伝子間に強い相関が認められた。一方で、正常な乳腺組織を用いた検討では、HOX 遺伝子間の相関は非常に低いことが確認された。さらに、各サブタイプにおいて、その発現が HOX 遺伝子と強く相関する複数の非 HOX 遺伝子を同定した。(HOTAIR、CDX2、SKAP1、SKAP2、BMP4、FGF5) (図 1) HOXC11 の反対鎖にコードされる長鎖非コード RNA である HOTAIR は、luminal と basal type の双方で HOX-C クラスター遺伝子群の強い相関が確認された。また、HOX 遺伝子の主要な上流シグナルの一つである CDX2 は、すべての乳癌サブタイプで HOX-B cluster と強い相関を示した。

乳がんにおける HOTAIR の役割をさらに検討するため、TCGA 乳がんサンプルを HOTAIR の発現の強さで 2 群に分け、HOX-C クラスターの遺伝子発現パターンを比較した。その結果 HOTAIR 高発現群は、HOTAIR 低発現群に比べ、HOX-

これらの検討は HOX 遺伝子全体に焦点を当て、がん発生におけるその役割に類似点が存在することを証明した初めての研究である。乳がんにおいては、正常乳腺組織とは異なり、発生時と同様に HOX 遺伝子同士が強く相互作用していることを発見した。また、発生過程における HOX 遺伝子の主

要な上流シグナルの一つである Wnt シグナル伝達経路の活性化を伴って、HOX 遺伝子の発現パターンが乳がんの予後を予測することを発見した。本研究で得られた知見は、白血病や肉腫で同様の知見が得られていることを考慮すると、他のがんや悪性腫瘍にも応用できる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------