

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08694

研究課題名(和文) 膵癌個別化治療を目指したHOXB9によるEMT誘導と血管新生亢進について

研究課題名(英文) HOXB9 induces EMT and angiogenic factor for pancreatic cancer

研究代表者

千葉 斉一 (Chiba, Naokazu)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90348665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：siHoxB9導入細胞では、抗がん剤投与下における生細胞の割合がコントロール細胞に比較して低下していた。また、膵癌幹細胞マーカーも、siHOXB9導入細胞によって低下していた。さらには、前述の結果と共に、siHOXB9導入によるTGFb signature・血管新生因子・EMTマーカーの変動が、全てにおいてTGFb recombinant投与によりReverseされることが確認できた。膵癌切除検体におけるHoxB9の発現量とTGFb signatureとを比較検討したところ、ほとんどのTGFb signatureがHOXB9と正の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で明らかにした膵癌細胞におけるメカニズムの鍵となるHOXB9の働きはTGFb経路を介してEMT変化を引き起こすことで、癌の悪性度や治療抵抗性の有無などの質的診断ができる可能性があると考えられる。今後さらなる詳細なメカニズムが解明され、HOXB9を人為的に制御可能となれば、癌細胞をMesenchymal-Epithelial-Transition (MET) 化することによって治療効果を向上させる可能性につながる。今後の研究でこれまでの根治が困難とされてきた癌治療の限界を克服でき、新たな治療法の開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The percentage of viable cells in siHoxB9-transfected cells was lower than in control cells under anticancer drug treatment. Pancreatic cancer stem cell markers were also decreased by siHOXB9-transfected cells. Furthermore, together with the aforementioned results, it was confirmed that the changes in TGFb signature, angiogenic factors, and EMT markers caused by siHOXB9 transfection were all reversed by TGFb recombinant administration. Comparison of HoxB9 expression and TGFb signature in pancreatic cancer resected specimens showed that most TGFb signatures were positively correlated with HOXB9.

研究分野：Surgical Oncology

キーワード：HOXB9 膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム上に存在する HOX 遺伝子ファミリーの一つである転写因子 HOXB9 は、乳癌の約 40%、肝細胞癌の約 30% に高発現を認め、その発現量は核異型度と相関し、TGF 経路を活性化することで EMT を誘導する。これにより細胞の遊走能、運動能を亢進すると同時に、組織微小環境において血管新生を亢進することを我々は示した (Hayashida et al., PNAS, 2010)。

一方、膵癌の 5 年生存率は約 10-20% と消化器癌の中では最も成績の悪い癌で、切除率も低く、診断時に遠隔転移を認める症例も少なくない。その予後向上のためには、膵癌の分子生物学的特徴を見極め、適切な治療法を選択することが重要である。現在膵癌の腫瘍マーカーとして CEA や CA19-9 が使用されているが、これらのマーカーでは早期発見や個別化治療の指標となることは困難であり、術前の血清マーカーや原発巣の免疫組織化学染色による悪性度マーカーから、より正確に悪性度を反映するバイオマーカーを探索することが急務であると考えられている。そこで我々は現在までに、膵癌根治切除例 102 例に対して切除検体の癌細胞中 HOXB9 を qrtPCR にて測定し、高発現群と低発現群の 2 群に分け (Cut-off level 7.0)、HOXB9 発現が無再発生存率・累積生存率の有意な予後因子であることが示唆された。

また切除検体を HOXB9 抗体により免疫染色を施行すると、高発現群では平均染色陽性率 62.5%、低発現群では平均染色陽性率 12.3% でカットオフ値を 40% に設定すると qrtPCR により分けた 2 群に一致した (Figure 3)。また、HOXB9 高発現群では、有意に血管浸潤陽性、リンパ節転移陽性、術後早期再発などが有意に多く認められ、腫瘍の悪性度の高い群であることが示唆された。

さらに、膵癌では現在のところ国内で保険適応されている分子標的治療薬は、上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害薬である Erlotinib のみであり、様々な分子標的治療薬が治験により検討されているが、いまだ臨床応用に結びつき有効な成績を示したものはない。Erlotinib は EGFR の働きを阻害して癌細胞の増殖を抑制すると考えられている。癌細胞が EGFR 遺伝子変異を持つ場合、腫瘍縮小効果が高いと報告されるが、現在まで満足できる成績を示すことはできていない。また Erlotinib に対する有用な Surrogate マーカーも存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌における HOXB9 発現による TGF β 、EGFR、血管新生因子などを含めた腫瘍悪性度の詳細なメカニズムを明らかにするとともに、新たなる分子標的治療薬の選択と有効な効果予測因子を発見しそれらを臨床応用することとした。膵癌における予後因子や新たなる分子標的治療薬とその効果予測因子については現在までに数多くの研究が行われているが、未だに臨床応用に至っているものは非常に少ない。また明確なカットオフ値が設定できる有意な予後因子は数少なく、TGF 経路や血管新生との関連性から HOXB9 と膵癌とを検討した研究は未だかつてない。EMT 誘導・血管新生亢進を引き起こす HOXB9 と膵癌の腫瘍悪性度への影響を解明することにより、腫瘍悪性度の高い膵癌に対する新たな治療戦略が確立されることが期待される。また、これら一連の研究成果から、HOXB9 が膵癌における個別化治療のマーカーとなり、さらには新たなる分子標的治療薬の選択とその治療効果予測因子として最終的に臨床へ応用していくことを考え、本研究課題を応募するに至った。

3. 研究の方法

すでに、HoxB9 高発現膵癌細胞株 (Panc1、MiaPaCa2) において siHoxB9 による HoxB9 のノックダウンを確認し、さらには血管新生因子の抑制と TGF β signature、EMT マーカーの変化を確認済みである。そこで、これまでの研究成果に基づいて、本研究課題において明らかにすべきことは以下の通りである。

(1) in vitro における HoxB9 による EMT、血管新生の変化の検証

siHoxB9 を HoxB9 高発現膵癌細胞株に導入し、抗癌剤耐性の変化と癌幹細胞マーカーの変動を検証する。

(2) in vitro における HoxB9 による TGF β との関連性の検証

siHOXB9 導入による TGF β signature・血管新生因子・EMT マーカーの変動が TGF β recombinant 投与によりどのように変動するかを検証する。

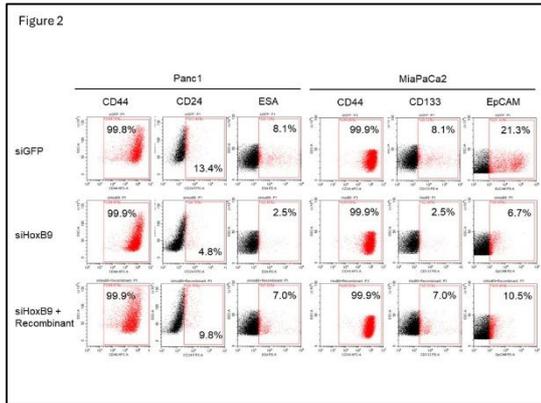
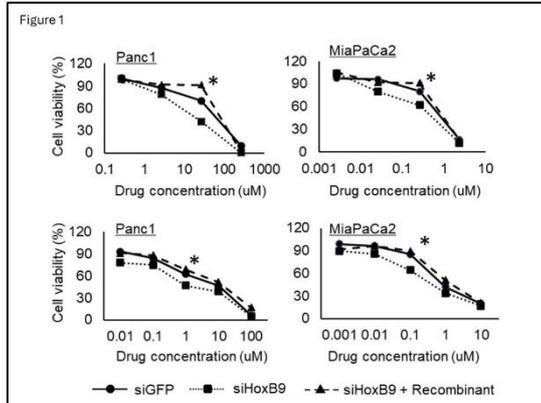
(3) 膵癌臨床検体における HoxB9 と EMT マーカー・血管新生因子・TGF β ・ErbB 経路の比較検討

当科では年間約 20 例の膵癌切除を施行しており、それらの切除検体より RNA を抽出し、得られた RNA から qrtPCR 法を用いて HoxB9 の発現量と EMT マーカーや血管新生因子、TGF β signature とを比較検討する。

4. 研究成果

(1) in vitro における HoxB9 による EMT、血管新生の変化の検証

siHoxB9 導入細胞では、抗がん剤投与下における生細胞の割合がコントロール細胞に比較して低下した。つまり、HOXB9 による抗がん剤耐性の誘導が明らかとなった (Figure 1)。また、膵癌幹細胞マーカーとして CD44、CD24、ESA、CD133、EpCAM を用いて、siHOXB9 導入細胞によって低下していた。つまり、HOXB9 によって膵癌幹細胞マーカーが変動していたことが証明された (Figure 2)。上記 2 系統の実験において、TGFb recombinant 投与により siHOXB9 の変動が Reversa され、HOXB9 による効果が TGFb 経路に関わっていることも同時に示すことができた。

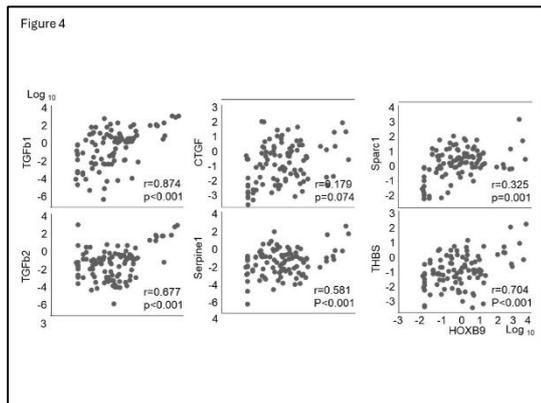
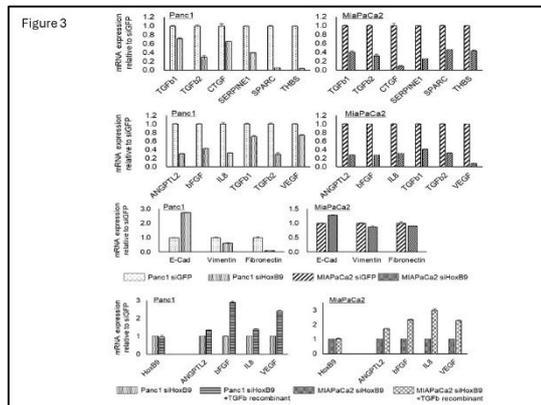


(2) in vitro における HoxB9 による TGFb との関連性の検証

siHOXB9 導入による TGFb signature・血管新生因子・EMT マーカーの変動が、全てにおいて TGFb recombinant 投与により Reverse されることが確認できた (Figure 3)。以上の結果より、HOXB9 は TGFb 経路を経由して様々な効果を発現していることが示唆された。

(3) 膵癌臨床検体における HoxB9 と EMT マーカー・血管新生因子・TGFb・ErbB 経路の比較検討

当科では年間約 20 例の膵癌切除を施行しており、それらの切除検体より RNA を抽出し、得られた RNA から qrtPCR 法を用いて HoxB9 の発現量と TGFb signature とを比較検討した。ほとんどの TGFb signature が HOXB9 と正の相関を認めた (Figure 4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chiba Naokazu, Ochiai Shigeto, Gunji Takahiro, Kobayashi Toshimichi, Sano Toru, Tomita Koichi, Kawachi Shigeyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 HOXB9 mediates resistance to chemotherapy and patient outcomes through the TGF pathway in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 747 ~ 754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.28235	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 -

〔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
---------	---------