

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592528

研究課題名(和文) 転写因子HOXD9の子宮頸癌における機能解析と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Expression and Functional Analysis of HOXD9 in Cervical Cancer

研究代表者

塚崎 克己 (Katsumi, Tsukazaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：40118972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌における転写因子HOXD9の発現を検討した。子宮頸癌組織においてHOXD9は、正常子宮頸部組織に比べて高発現しており、臨床病理学的因子では脈管侵襲およびリンパ節転移と有意に相関した。細胞株を用いた検討では、HOXD9を抑制すると細胞増殖が停止し、運動能および浸潤能が抑制された。Gene Chip解析ではHOXD9の抑制により、癌抑制遺伝子P53の活性化が生じていることが示唆された。HOXD9は子宮頸癌における新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression and function of HOXD9 in cervical cancers. As a result, HOXD9 gene was overexpressed in cervical cancer tissues than normal cervical tissues. Clinicopathological analysis using 51 cervical cancer cases revealed HOXD9 expression was associated with lymphovascular space invasion (LVSI) and lymph node metastasis. Silencing of the HOXD9 gene inhibited cell proliferation of cervical cancer cell lines. These results suggested HOXD9 gene is overexpressed in high risk cervical cancer cases and plays important role of cervical cancer cell growth. It has been shown that activation of tumor P53 has occurred by the suppression of HOXD9. HOXD9 is associated with malignant potential in cervical cancer and may be a novel potential target of cervical cancer therapy.

研究分野：子宮頸癌

キーワード：子宮頸癌 HOXD9

## 1. 研究開始当初の背景

長い間、ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮頸部病変につながる重要な病因因子として認識されてきた。ただし、腫瘍形成のプロセスに HPV 感染だけでは発現に十分でない。この発がんに関与する遺伝子のクラスの一つは、ホメオボックス遺伝子ファミリーであると考えられている。ホメオボックスタンパク質は、マスター調節因子であり、増殖、アポトーシス、細胞形状および細胞移動を含む多くの細胞過程を制御する。ホメオボックスタンパク質は、スーパーファミリーに属し、SIX、MSX、PAX、LIM、および HOX といった、多数の遺伝子によりコードされている。ホメオボックスタンパク質のうち、HOX 遺伝子は、胎生期の軸パターン形成の制御に加えて、増殖および分化、細胞間情報伝達、細胞周期進行、造血、およびアポトーシスのような重要な調節因子として作用する転写因子をコードする。ヒトでは、39 の HOX 遺伝子が同定されており、子宮頸癌、肺癌、神経芽細胞腫、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、及び白血病を含む多くの腫瘍において誤発現することが報告されている。Glioma において HOXD9 の発現制御により Apoptosis が誘導されることが示されているが、そのほか癌における HOXD9 と悪性形質との関連を検討した報告はない。予備実験で、申請者は、HOXD9 の発現が子宮頸癌の脈管侵襲に関与する可能性を示した。これらの背景をもとに、子宮頸癌における HOXD9 遺伝子の役割につき検討する

## 2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌における HOXD9 の悪性形質への関与機序を明らかとし、得られた知見をマウスモデルで検証して 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) 子宮頸癌細胞株での HOXD9 の発現解析

RT-PCR 法により子宮頸癌細胞株を用いて HOXD9 の発現を mRNA の発現により検討した。

### (2) 子宮頸部組織での HOXD9 の発現解析と臨床病理学的因子との関連

正常子宮頸部組織 10 例と子宮頸癌組織 51 例での HOXD9 の発現を qPCR 法で比較し、HOXD9 が癌化による高発現するか検討した

子宮頸癌における HOXD9 の発現と臨床病理学的因子 (組織型、腫瘍径、浸潤深度、リンパ節転移、脈管侵襲) との関連を検討した。

### (3) HOXD9 が細胞の増殖・浸潤・運動能に与える影響

siRNA によって HOXD9 の発現を抑制し、細胞増殖能に与える影響を増殖能、浸潤能、運動能から検討した。実験は、XCELLigence Real Time Cell Analyzer DP 用 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) を用いて行った。増殖曲線は、16-well plate (E-plate 16, Roche Diagnostics GmbH) を用いて SKG、SKG b 株で構築し 72 時間で実施した。運動能および浸潤能は、SKG を用いて検討した。

### (4) HOXD9 が細胞周期に与える影響

HOXD9 の抑制が細胞周期に与える影響を SKG b 株で検討した。細胞周期分析は、フローサイトメトリー (Gallios; Beckman Coulter) を用いて行った。siRNA で処理した細胞を、siRNA の処理から 24 時間後に、 $1 \times 10^6$  cell/ml あたり Vybrant DyeCycle Violet Stain (Invitrogen) 1  $\mu$ l で染色し、37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートしたのち、SKG b の siNegative control, siHOXD9 をフローサイトメトリーで測定した。

### (5) HOXD9 遺伝子の細胞内シグナルネットワーク解析

HOXD9 の抑制による分子機構の変化を検討するため、shRNA で遺伝子抑制した SKG、SKG b の全遺伝子発現変化を網羅的に DNA チップ (3D gene 2.5K (東レ)) で解析し、関与する調節遺伝子の候補を web 上の遺伝子解析ソフトである IPA ソフトで抽出した。

### (6) HOXD9 の発現と p53 の活性化の検討

HOXD9 の抑制によって子宮頸癌細胞部で P53 遺伝子の活性が変化するか SKG b 株を用いて検討した。siRNA によって HOXD9 を抑制し、24 時間後、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific) を使って核を抽出した。核抽出サンプル 10ul を使い、TF-Detect™ Human P53 Activity Assay Kit (genecopoeia) を用いて、Envision (Perkin Elmer) で測定した。

### (7) HOXD9 の発現メカニズムの検討

HOXD9 の発現がプロモーターのメチル化によるものかを検討するため、4 種の癌細胞株 Hela、SiHa、SKG1、SKG3a、TC01 での HOXD9 のプロモーター部位のメチル化を検討した。さらに子宮頸癌患者検体 73 例を用いて同様に HOXD9 のプロモーターメチル化を検出、HOXD9 の発現量と相関するか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 子宮頸癌細胞株での HOXD9 の発現解析

RT-PCR 法により子宮頸癌細胞株を用いて HOXD9 の発現を mRNA の発現により検討したところ、8 種の子宮頸癌細胞株全てにおいて HOXD9 の発現を認めた。

### (2) 子宮頸部組織での HOXD9 の発現解析と臨床病理学的因子との関連

正常子宮頸部組織と子宮頸癌組織での HOXD9 の発現を qPCR 法で比較すると、正常子宮頸部での HOXD9 の発現の中央値を 1 としたとき、子宮頸癌組織では 2.1 と、子宮頸癌組織では正常頸部組織に比して有意に HOXD9 が高発現していた。(中央値比 2.2 倍、 $p=0.003$ )

臨床病理学的因子との関連では、組織型では扁平上皮癌および腺癌で有意差は無かった。HOXD9 遺伝子の発現と、腫瘍径、浸潤深度、リンパ節転移、脈管侵襲の病理学的因子うち、HOXD9 の発現量と関連していた因子は脈管侵襲およびリンパ節転移であり、脈管侵襲陽性例およびリンパ節転移陽性例で有意に発現量が高かった (中央値比 2.6 倍、 $p=0.010$ ; 中央値比 3.2 倍、 $p=0.037$ )。

組織型	症例数 (n=51)	HOXD9 (発現量中央値)	有意差
扁平上皮癌	26	1.8	p=0.874
腺癌	25	3.0	
腫瘍径			p=0.874
≤20mm	16	2.7	
>20mm	35	3.7	
浸潤の深さ			p=0.123
≤5mm	11	1.0	
>5mm	40	2.3	
脈管侵襲			p=0.010
なし	19	1.2	
あり	32	3.0	
リンパ節転移			p=0.037
なし	41	1.7	
あり	10	2.5	

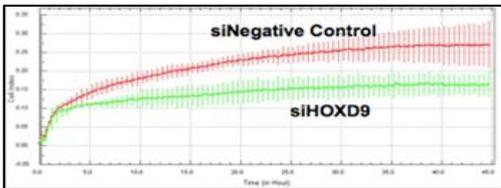
### (3) HOXD9 が細胞の増殖・浸潤・運動能に与える影響

子宮頸癌細胞株 SKG b 株で HOXD9 の発現を抑制すると、増殖能が顕著に低下した。また、SKG b 株において、浸潤・運動能について検討したところ、いずれも抑制された (p<0.01)。

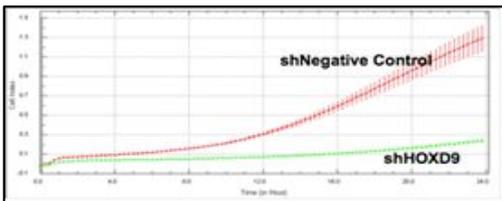
増殖能 (SKG )



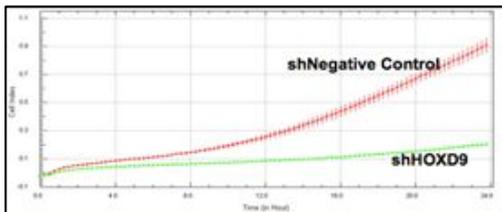
増殖能 (SKG b)



浸潤能 (SKG b)

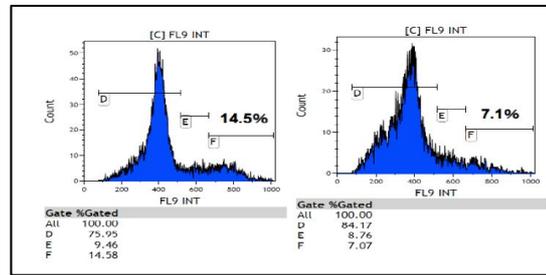


運動能 (SKG b)



### (4) HOXD9 が細胞周期に与える影響

HOXD9 の抑制が増殖能を低下させたが、細胞周期のどの段階に影響を与えているのか検討するため、SKG b 株でフローサイトメトリーによって解析した。図中の D は G1 期を、E は S 期を、F は G2 期を表す。SKG b 株において HOXD9 を抑制すると、G2 期細胞の割合が低下し G1 停止が生じていると考えられた。



Mock 株

HOXD9 抑制株

### (5) HOXD9 遺伝子の細胞内シグナルネットワーク解析

HOXD9 の抑制が、どのような分子機構によって細胞増殖能の低下につながるのかを検討した。SKG、SKG b 株で HOXD9 抑制による全遺伝子変化を DNA チップで解析し、IPA ソフトによって関与している確率の高い調節遺伝子を 10 個抽出したところ、SKG1、SKG b ともに上位に抽出された調節遺伝子として、p53 が同定された。

IPA による解析結果

調節遺伝子	Z score	調節遺伝子	Z score
TP53	3.976	TRM24	4.652
ADIPOQ	3.523	CDKN1A	3.956
H-7	3.232	IL1RN	3.932
GATA6	3.216	TP53	3.525
ADIPOQ	3.521	IRGM	3.448
MITF	3.144	NKX2-3	3.343
PTEN	2.841	ANXA7	3.243
SB203580	2.833	AMPK	3.086
POU3F2	2.646	CDKN2A	3.065
TAZ	2.588	PRKAA	2.975

SKG-

SKG- b

### (6) HOXD9 の発現と p53 の活性化の検討

SKG b において、siRNA により HOXD9 の抑制をすると、P53 の核内濃度が 1.75 倍に増加した。HOXD9 の抑制によって、p53 の核内濃度が上昇し、p53 の活性化が生じていると考えられた。

図：核内の p53 量 (右が抑制株)



### (7) HOXD9 の発現メカニズムの検討

HOXD9 の細胞内での発現メカニズムを検討するため、4 種の癌細胞株 HeLa、SiHa、SKG1、SKG3a、TC01 での HOXD9 のプロモーター部位のメチル化を検討した。この結果、SKG1 を除く 3 つの細胞株で HOXD9 のプロモーターメチル化を検出した。また、実際の子宮頸癌患者検体 73 例を用いて同様に HOXD9 のプロモ-

ターメチル化を検出したところ、73 例中 43 例でメチル化を検出した。しかしながら、子宮頸癌組織でのプロモーターのメチル化と HOXD9 の発現量には相関を認めなかった。

本研究では、子宮頸癌において HOXD9 は脈管侵襲陽性例やリンパ節転移陽性例など、高リスク症例において高い発現を認めた。子宮頸癌細胞株では HOXD9 の抑制により細胞増殖および浸潤能が著明に抑制され、細胞周期解析によって G1 停止が生じていた。HOXD9 の悪性形質に關与する分子機構を解析したところ、HOXD9 は P53 の活性化を抑制していることが示唆された。HOXD9 は子宮頸癌において悪性形質に強く關与する遺伝子と考えられ、分子標的治療の標的遺伝子となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 岩田 卓、転写因子 HOXD9 の子宮頸癌での発現検討と細胞増殖に与える影響、第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会、2013 年 10 月 2 日、神奈川県横浜市 パシフィ横浜
- (2) 岩田 卓、転写因子 HOXD9 の子宮頸癌での発現検討と機能解析、第 13 回日本婦人科がん分子標的研究会、2014 年 3 月 14 日、鳥取県米子市 皆生グランドホテル 天水

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚崎 克己 (ツカザキ カツミ)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：40118972

### (2) 研究分担者

岩田 卓 (イワタ タカシ)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：30296652

谷口 智恵 (ヤグチ トモノリ)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：40424163

### (3) 連携研究者

河上 裕 (カワカミ ユタカ)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：50161287