

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861217

研究課題名(和文) 肝細胞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) Homeobox B9 expression, associated with poor prognosis, is a potential predictor of sensitivity to sorafenib in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

千葉 斉一 (CHIBA, NAOKAZU)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90348665

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)：肝細胞癌におけるHoxB9発現による血管新生亢進のメカニズムを明らかにし、肝細胞癌に対する個別化治療に対するバイオマーカーの確立を目指し、さらにはSorafenibの効果予測因子への応用を試みた。HoxB9発現量は肝細胞癌切除症例における無再発生存率に寄与する有意な独立因子であった。切除検体においてHoxB9と血管新生因子であるPDGF、PDGFR、VEGFなどは正の相関関係の傾向を認め、HoxB9高発現肝細胞癌細胞株において、siHoxB9によりHoxB9をKnock downすることにより、PDGF、PDGFR、VEGFの発現量は有意に低下し、さらにpMEKやpRafなども低下していた。

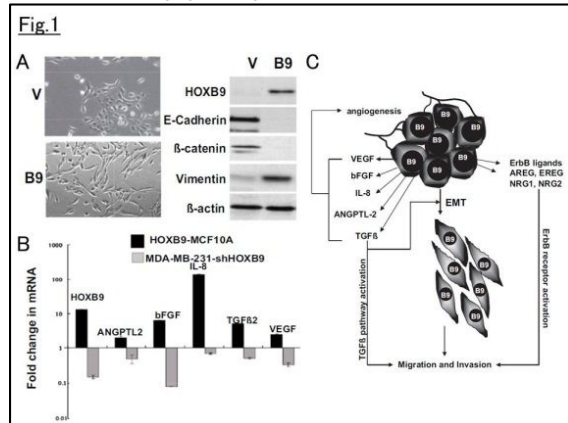
研究成果の概要(英文)：Homeobox B9 (HoxB9), a transcriptional factor, regulates developmental processes and tumor progression and has recently been recognized as one of important transcriptional factors related to angiogenesis. The purpose of this study is elucidate whether HoxB9 affects tumor angiogenesis and therapeutic response to Sorafenib in HCC. HoxB9 was highly expressed in 29 of 79 (37%) patients. HOXB9 induced angiogenesis and tumor proliferation in vitro, which resulted in poor overall survival. Sorafenib remarkably suppressed tumor proliferation by inhibiting angiogenesis and Raf/ERK pathway in HOXB9-overexpressing cells, and it improved overall survival in HOXB9-overexpressing patients. HOXB9 overexpression in clinical specimens was significantly correlated with increased several angiogenic factors and Raf/ERK pathway.

研究分野：Oncology

キーワード：HoxB9 Sorafenib

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% 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 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間質移行) 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) (図 1)。



一方、肝細胞癌切除後の予後向上のためには、外科的切除後に起きる多中心性再発の抑制、肝内転移の抑制のほか、転移巣が形成されたあとの腫瘍増殖を抑制することが重要と考えられている。肝内転移再発は原発巣の悪性度に依存し、現在では AFP や PIVKA が悪性度マーカーとされている。しかし、これらのマーカーでは肝内転移再発を予測する能力が十分とは言えないのが現状である。そこで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。そこで現在までに、我々は肝細胞癌根治切除例 30 例に対して HOXB9 を免疫染色し高発現群と低発現群の 2 群に分け、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。高発現群では平均染色陽性率 78.5%、低発現群では平均染色陽性 7.3% でカットオフ値を 30% に設定すると明確に 2 群に分けることが可能であった。

一方で HOXB9 高発現群では有意に病理学的肝内転移が多く認められ、また血管浸潤陽性が多い傾向を認め、腫瘍の悪性度の高い群であることが示唆された。さらに、切除不能な肝細胞癌に対して 2009 年に適応追加された分子標的薬 Sorafenib は増殖因子レセプターの下流にある MAP キナーゼカスケードの重要な分子 Raf キナーゼ阻害薬としてスクリーニングされた低分子化合物で、VEGFR-2、PDGFR、Flt3、c-Kit などの血管新生および細胞増殖にかかわるレセプターチロシンキナーゼに対し強い阻害活性を有している。現在 Sorafenib 治療において、予後予測因子の

抽出が世界で広く研究されている。そこで今回我々は肝細胞癌における HOXB9 発現による血管新生因子亢進を含めた腫瘍悪性度亢進のメカニズムを明らかにすることで個別化治療のマーカー確立とともに、Sorafenib 治療における効果予測因子への応用を目的とした

2. 研究の目的

肝細胞癌における予後因子や Sorafenib の治療効果判定因子については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。また図 2、3 のように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 と肝細胞癌とを検討した研究は未だかつて無い。EMT 誘導・血管新生亢進を引き起こす HOXB9 と肝癌の腫瘍悪性度への影響を解明することにより、再発率の高い肝細胞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 が肝癌における個別化治療のマーカーとなり、さらには Sorafenib に対する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、本研究課題を申請するに至った。

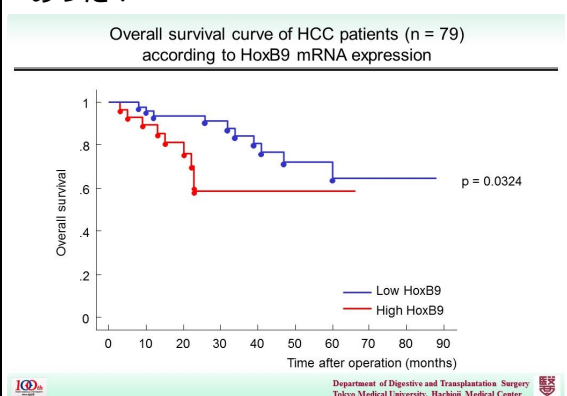
3. 研究の方法

2006 年から 2012 年までの肝切除検体より cDNA を抽出し、HoxB9 の発現量と無再発生存・累積生存との関係性、血管新生因子や Sorafenib の作用機序における Signature の発現量との相関関係を検討する。

HoxB9 高発現細胞株に siHoxB9 を導入し HoxB9 を Knock down することによって、血管新生因子や Sorafenib の作用機序における Signature の発現量との相関関係を検討する。

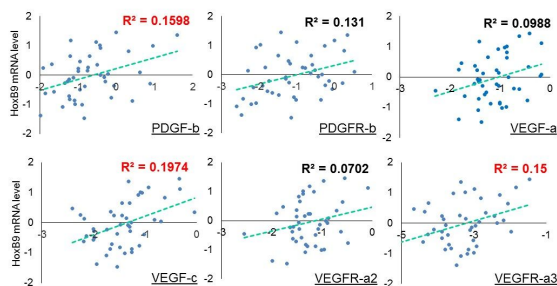
4. 研究成果

HoxB9 発現量は肝細胞癌切除症例における無再発生存率に寄与する有意な独立因子であった。



また切除検体において HoxB9 と血管新生因子である PDGF, PDGFR, VEGF などは正の相関関係の傾向を認めた。

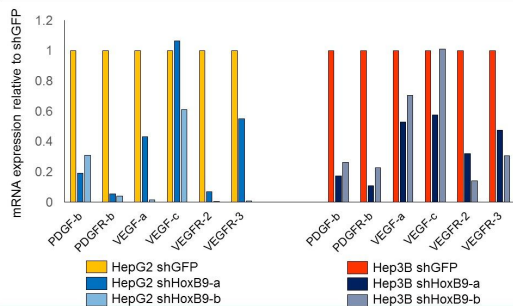
Correlation of relative HoxB9 expression and angiogenic factors in HCC patients



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

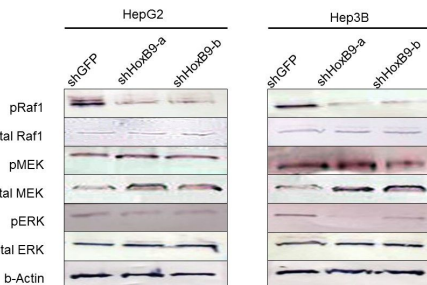
さらに HoxB9 高発現肝細胞癌細胞株において、siHoxB9 により HoxB9 を Knock down することにより、PDGF、PDGFR、VEGF の発現量は有意に低下し、さらには pMEK や pRaf などとも低下していた。

mRNA expression of angiogenic factors in HOXB9-suppressed cell lines using RT-qPCR



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

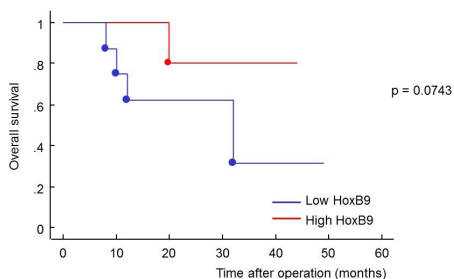
Protein expression of the RAF/MEK/ERK pathway in HOXB9-suppressed cell lines using Western-Blotting



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

続いて、Sorafenib 治療を施行した肝細胞癌症例に限ると、HoxB9 高値の症例の方が全生存期間では有意に良好な成績であった。

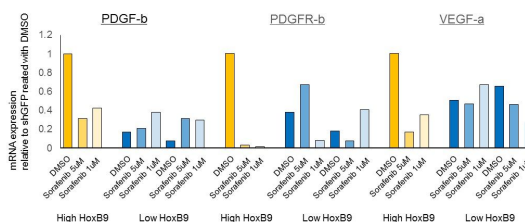
Overall survival curve of HCC patients treated with Sorafenib (n = 15) according to HoxB9 mRNA expression



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

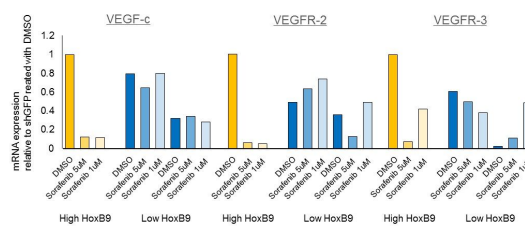
そして、HoxB9 高値の細胞株の方が Sorafenib による血管新生因子や作用機序における Signature の抑制効果が有意に高かった。

mRNA expression of angiogenic factors treated with Sorafenib in HOXB9-suppressed cell lines using RT-qPCR



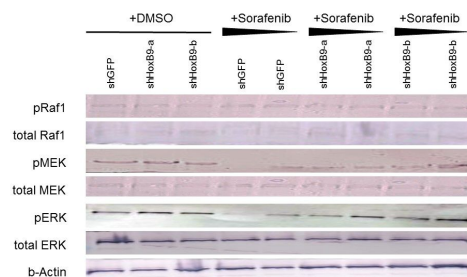
Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

mRNA expression of angiogenic factors treated with Sorafenib in HOXB9-suppressed cell lines using RT-qPCR



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

The RAF/MEK/ERK pathway in HOXB9-suppressed cell lines treated with Sorafenib using Western-Blotting



Department of Digestive and Transplantation Surgery, Tokyo Medical University, Hachioji Medical Center

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. Homeobox B9 expression, associated with poor prognosis, is a potential predictor of sensitivity to sorafenib in hepatocellular carcinoma. 日本ハンガリーポーランド外科学会、2014 年 10 月 17 日、東京
2. 肝細胞癌に対する個別化治療における転写因子 HOXB9 のバイオマーカーとしての役割 東京医科大学医学会総会、2014 年 6 月 7 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 斉一 (CHIBA, Naokazu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90348665

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：