

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791260

研究課題名(和文)

新規 EMT 誘導因子 HOXB9 による乳癌悪性化および癌幹細胞群増加メカニズムの検証
研究課題名(英文)

HOXB9 promotes the acquisition of tumorigenic phenotypes in breast cancer

研究代表者

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80327543

研究成果の概要(和文):

転写因子 HOXB9 が上皮間質転換(EMT)を誘導することで、癌細胞それ自身の悪性度を高めると同時に、血管新生を通じて腫瘍微小環境を変化させることで、腫瘍増大や転移先における生着を促進していることが確認された。この効果に TGF 経路の活性化の寄与が重要であることが示されると同時に、臨床検体病理学的にも HOXB9 発現乳癌は悪性度が高く、予後が悪いことが示され、今後予後予測因子として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

In this study, we demonstrated that HOXB9, a member of homeobox genes, expression promoted tumor neovascularization and metastasis in *in vitro* and *in vivo* assay. These findings imply that overexpression of HOXB9 contributes to tumor progression through activation of signaling pathways that alter both tumor-specific cell fates like epithelial-mesenchymal transition (EMT) and tumor-stromal microenvironment. Moreover, Clinical outcomes were significantly different between the patients with HOXB9 positive and negative, suggesting HOXB9 might be a significant prognostic factor for clinical outcomes in breast cancer patient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌, HOXB9, EMT, 予後因子, 微小環境, 血管新生

1. 研究開始当初の背景

転写因子 HOXB9 はヒトゲノム上に 39 種存在する HOX 遺伝子群の一つであり、この遺伝子群は近年腫瘍の発生・進展に深く関わっていることが多数報告されている。同じ HOXB クラスター上の HOXB7 (Wu et al, Cancer Res, 2006) や HOXB13 (Ma et al, Cancer Cell, 2004) が乳癌の進展に重要な役割を担っていることが報告されているが、HOXB9 と癌の関係については未だ知見が得られていない。

我々は特に癌幹細胞理論や EMT 及び血管新生による微小環境の改変に HOXB9 が重要な役割を持つと考え、乳癌の悪性化に寄与するメカニズムを解明すべく本研究を企画した。さらに、HOXB9 発現とヒト乳癌における臨床病理学的因子や予後との関連性は未だ報告されていないため、乳癌における HOXB9 の臨床病理学的因子や予後との関連性も合わせて検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) HOXB9 が乳腺上皮細胞に Epithelial to mesenchymal transition (EMT; 上皮間質移行) を誘導すること、またこの現象に TGF 経路の活性化が深く関与することを確認する。
- (2) EMT による癌幹細胞分画の増大は既に報告されているが、HOXB9 による TGF 経路活性化を通じた EMT においても、本現象が生じることを明らかにする。
- (3) 乳癌細胞における HOXB9 発現により、血管新生を通じて腫瘍微小環境の変化がもたらされることを確認する。
- (4) これら現象を通じて、HOXB9 が乳癌の悪性化に寄与することを基礎研究の観点から明らかとし、さらに乳癌臨床検体を用いて、HOXB9 発現が予後因子となり得るかどうかを検証する。

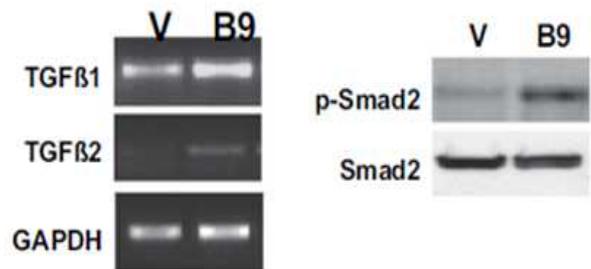
3. 研究の方法

- (1) 乳癌患者検体から癌部と非癌部を laser capture micro dissection 法により分離し、HOXB9 の発現を PCR にて検討した。次にその機能を解析するため、乳腺上皮細胞株 MCF10A にレンチウイルスベクターを用いて HOXB9 を導入し、EMT 誘導を確認すると共に血管新生促進因子の発現とこれによる新生血管の誘導を確認した。
- (2) MCF10A への HOXB9 導入により、smad2 のリン酸化促進と TGF 2 プロモータ領域への HOXB9 の結合とそれによる転写活性化を確認を行う。これに引き続き、TGF 経路の標的遺伝子群の発現亢進の検討、及び MDA-MB231 細胞での HOXB9 発現抑制モデルを用いて TGF 経路の抑制が生じるかを検証する。
- (3) CD44(+)/CD24(-) 細胞群を精製し、mammosphere 形成能を検証する。その際に上記の TGF 経路阻害薬を用いて、sphere 形成能に差異が生じるかを検討する。
- (4) 2004 年 1 月から 2005 年 1 月までに当院で手術を施行した浸潤性乳管癌患者 141 例を対象とし、抗ヒト HOXB9 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。HOXB9 陰性と HOXB9 陽性に分類し、両群間における臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。

4. 研究成果

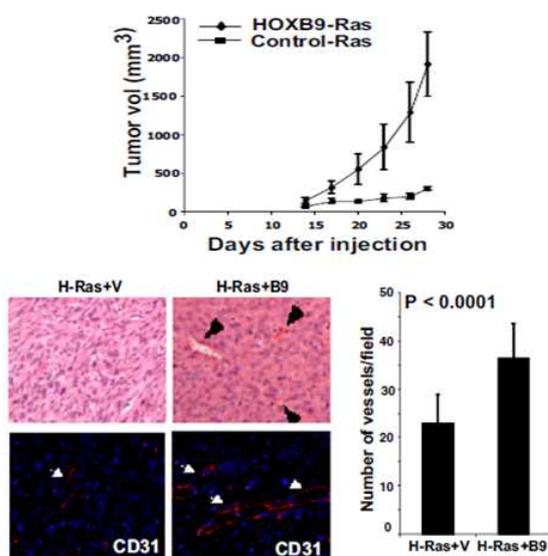
- (1) 乳癌患者検体 40 例中 17 例で癌部での HOXB9 発現亢進があり、核異型度と有意な相関を認めた。MCF10A への HOXB9 導入により、細胞形態の変化と上皮系マーカーの喪失・間質系マーカーの獲得を認め、さらに細胞遊走能・浸潤能の亢進を認め、これらの現象が ErbB-AKT 経路及び TGF 経路の活性化に深く依存していることを示した。特に TGF 経路に関しては、乳腺上皮細胞 MCF10A にレンチウイルスベクターを用いて HOXB9 を高発現させると、EMT の誘導と同時に TGF 1 及び 2 の高発現が認められ、後者の HOXB9 プロモータ領域への結合が CHIP 法により確認された。これに伴い smad2 のリン酸化と TGF 経路の標的遺伝子の高発現を確認し、特異的 TGF 阻害剤の添加により、これらが抑制されると同時に、Mesenchymal to Epithelial Transition (MET) が認められ、かつ細胞遊走能の抑制が観察された。

Smad2 phosphorylation



- (2) HOXB9 高発現に伴い VEGF, bFGF 等の血管新生促進因子の発現が亢進したため、*in vivo* における腫瘍増大・転移を検討するため、変異 H-RAS-IRES-GFP を MCF10A に導入して癌化を誘導し、これに HOXB9 高発現を誘導した細胞をマウス乳腺に異種移植し、肺転移能・血管新生等を評価した。*in vitro* において MCF10A-HRAS-HOXB9 の細胞増殖能はむしろ抑制されたが、*in vivo* の系では著明な腫瘍増大を認め、CD31 の蛍光染色で腫瘍血管新生の亢進が認められた。さらにコントロール群では認められない肺の微小転移が 75% で観察された。逆に、HOXB9 高発現乳癌細胞株 MDA-MB231 に 2 種の sh-HOXB9 を感染させ、それぞれ 80% 以上の発現抑制を得た細胞では血管新生因子発現の抑制が認められ、異種移植モデルでコントロール群では認められなかった肺の微小転移が観察されなかった。

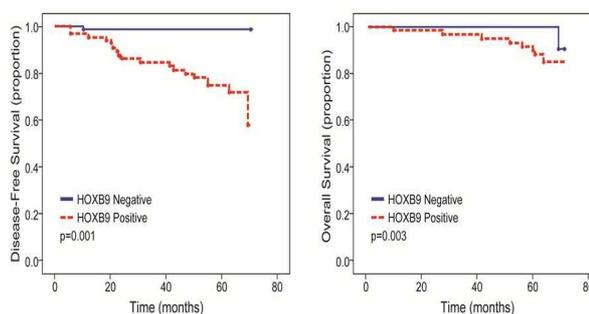
Tumors overexpressing HOXB9



(3) 乳癌における癌幹細胞のマーカである CD44(+)/CD24(-) 群が HOXB9 の導入により増加を認め、一方で HOXB9 高発現細胞株である MDA-MB231 細胞において shRNA をレンチウイルスで導入すると、この HOXB9 発現のノックダウンにより、癌幹細胞分画の低下を認め、これらの現象に TGF 経路の関与が必須であることが示された。

(4) 抗ヒト HOXB9 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、非染色を HOXB9 陰性、弱染色と強染色を HOXB9 陽性に分類し、両群間における臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。HOXB9 陽性は 69 例 (48.9%) であり、2 群間を比較すると腫瘍径・ホルモン受容体状況・HER2 状況・腋窩リンパ節転移・nuclear grade で有意差を認めた。luminal type に比べ basal-like type では有意に HOXB9 陽性乳癌の比率が高かった。Kaplan-Meier 法で Disease-Free Survival (DFS) および Overall Survival (OS) を比較すると、HOXB9 陽性では有意に予後不良 (DFS; HR=20.7, p=0.001, OS; HR=9.21, p=0.003) であり、多変量解析では HOXB9 陽性は DFS における独立した予後不良因子であった。(HR=15.532, p=0.009) 腫瘍の大きさを T2 症例に限ったサブグループ解析では、HOXB9 強発現腫瘍においては、発現の無い腫瘍に比較して、血管内皮のマーカである CD31 および CD34 発現細胞が有意に増加し、血管新生の亢進が示唆され、それに伴い Ki67 発現細胞の割合も有意に増加しており、前記の基礎研究による知見と臨床検体における所見が一致する結果となった。

Kaplan-Meier plots of clinical outcomes by HOXB9 expression



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2件)

Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, Kitajima M., Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis. *J Oncol.* 2011; 591427 査読あり

Hayashida T, Takahashi F, Chiba N, et al., HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):1100-5 査読あり

[学会発表](計10件)

Seki H, HOXB9 Expression as a New Independent Prognostic Factor in Human Breast Cancer., San Antonio Breast Cancer Symposium 2010年12月11日, 米国 San Antonio

林田哲, EMT 制御を通じた癌幹細胞抑制の可能性の検討, 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月28日, 京都

林田哲, 転写因子 HOXB9 による細胞悪性化及び微小環境の変化を介した乳癌進展メカニズムの解析, 第69回日本癌学会学術集会, 2010年9月24日, 大阪

平田玲, 林田哲, 長谷川博俊ら, 大腸癌進展における HOXB9 遺伝子発現の検討, 第19回日本がん転移学会学術集会, 2010年6月17日, 金沢

林田哲, 転写因子 HOXB9 による TGF 経路活性及び腫瘍血管新生促進による乳癌悪性化メカニズムの検討, 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010 年 4 月 8 日, 名古屋

Tetsu Hayashida, HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, induces angiogenesis, invasion, and lung metastasis, 7th European Breast Cancer Conference, 2010 年 3 月 25 日, スペイン・バルセロナ

Tetsu Hayashida, Overexpression of HOXB9 in breast cancer mediates induction of EMT, tumor angiogenesis, and lung metastasis., AACR/JCA Joint Conference, 2010 年 2 月 8 日, 米国ハワイ

Tetsu Hayashida, HOXB9 Promotes the Acquisition of Tumorigenic Phenotypes in Mammary Epithelial Cells, San Antonio Breast Cancer Symposium, 2009 年 12 月 13 日, 米国 San Antonio

林田哲, 乳癌における EMT と癌幹細胞の関連性の追求, 第 18 回日本がん転移学会学術集会, 2009 年 7 月 23 日, 旭川

林田哲, EMT 誘導因子 hoxb9 の機能解析を基にした新しい乳癌進展阻害法の検討, 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009 年 4 月 2 日, 福岡

〔図書〕(計 1 件)

林田哲, 神野浩光, 北川雄光, 消化器癌と EMT (epithelial - mesenchymal transition), Surgery Frontier 2010; 17(2):147-51:メディカルレビュー社

〔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

林田 哲
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80327543

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし