

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791499
 研究課題名(和文) 乳癌個別化治療を目指したHOXB9によるEMT誘導とDNA修復メカニズムの解明
 研究課題名(英文) Homeobox B9 induces EMT-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses
 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 は上皮間葉転換 (EMT) を誘導する因子であり、これにより乳腺上皮細胞に EMT を生じることで放射線照射への耐性が生じた。これは、ATM のリン酸化を介した DNA 修復機構が HOXB9 陽性細胞では早期に生じ、結果として γ H2AX および 53BP1 の foci 形成が早期に促進されていた。これら現象は smad4 経路を抑制することで阻害されるため、この EMT を介した放射線耐性誘導機序に TGF β 経路の活性化が必須であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We show that HOXB9 confers resistance to ionizing radiation by promoting DNA damage response. In non-irradiated cells, HOXB9 induces spontaneous DNA damage, phosphorylated histone 2AX and p53 binding protein 1 foci, and increases baseline ataxia telangiectasia mutated (ATM) phosphorylation. The effect of HOXB9 on the response to ionizing radiation requires the baseline ATM activity before irradiation and EMT induced by TGF- β , a HOXB9 transcriptional target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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 TGF β 放射線 ATM

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 β 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)。この EMT という現象は癌の浸潤や転移に深く関係する一方で、放射線や抗癌剤への耐性獲得に関連する報告が認められるが、詳細な機序は未だ不明である。

(Singh et al., Oncogene, 2010)

放射線によって DNA 損傷が生じた際に、細胞は修復を試みるほか、細胞周期の一時停止、あるいは自発的な細胞死などの生体防御反応を引き起こす。この反応が生じる過程では、主に DNA 二重鎖切断(Double strand DNA breaks) の認識に関わる ATM (ataxia-telangiectasia mutated)、DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) と 1 本鎖 DNA の認識に関わる ATR(ATM- and Rad3-related) の 3 分子が知られている。これを基に、我々は EMT 誘導因子の一つである HOXB9 の TGF β 経路の活性化による放射線耐性獲得メカニズムを解明するために以

下に示す研究を想起した。

正常乳腺上皮細胞 MCF10A にレンチウイルスを用いて HOXB9 の導入を行い、EMT を誘導すると、放射線感受性が低下することを確認した。次に、ATM 経路における γ H2AX と 53BP1 の両因子に着目し、放射線照射前後における両因子の発現量の変化を免疫蛍光染色にて計測したところ、HOXB9 導入細胞では放射線照射する前に、既にそれらの発現量が高く、照射後早期(10 分)に、さらなる発現亢進が認められた。一方照射後 12 時間以降ではコントロール細胞に比較して γ H2AX の発現量は減少していた。

また HOXB9 導入細胞の放射線照射後の細胞周期分析では、G2/M-arrest の段階からコントロール細胞より早く G1 期、S 期へ移行していた。

以上の結果より、HOXB9 の発現が ATM 経路に影響を及ぼし、 γ H2AX や 53BP1 の発現調節を行うことで、放射線による DNA 損傷からの効率的な修復と細胞周期の早期回復において重要な役割を担っていることが示唆される。

2. 研究の目的

乳癌における放射線治療は残存乳房における局所再発防止や骨転移に対する治療に汎用されている。我々の現在までの研究成果により、転写因子 HOXB9 が EMT を通じて乳癌の転移や浸潤に関わる予後因子であることが示されると同時に、DNA 損傷・修復の過程に作用し放射線や抗癌剤耐性の獲得に重要な役割を持つことが示唆されている。これらの知見をもとに、乳癌における HOXB9 発現による放射線耐性獲得のメカニズムを明らかにすることによって、乳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、臨床への応用を試みることを目的とする。

具体的には以下のことを示すことを目的とする。

1) ATM 阻害剤、DNAPK 阻害剤、ATR 阻害剤を用いた γ H2AX と 53BP1 の経時的変化の検討

HOXB9 導入細胞における照射前と照射後の γ H2AX、53BP1 の高発現が ATM 経路を経由していることの確認と HOXB9 の DNAPK や ATR 経路への関与の有無を検証するため、それら 3 分子の阻害剤を処理した後、放射線を照射し γ H2AX や 53BP1 の経時的変化を検討する。

2) 放射線照射前後の pATM、MDC1、BRCA1 の経時的変化の検証

HOXB9 により ATM 経路が活性化されることは示唆されたが、更なる詳細なメカニズムの解明のため、ATM 経路における他の因子である pATM、MDC1、BRCA1 の放射線照射

による経時的変化を検討する。

3) HOXB9 における TGF β 経路と ATM 経路との関連性の検証

HOXB9 による EMT 誘導は主に TGF β 経路によるものと考えられているが (Hayashida et al., PNAS, 2010)、HOXB9 による ATM 経路の活性化が TGF β 経路を介するものなのかを検証するため、TGF β recombinant 添加または TGF β 経路阻害による放射線照射後の γ H2AX と 53BP1 の経時的変化を検討する。

4) In vivo における放射線照射後の HOXB9 と ATM 経路の関連性の検討

我々はすでに腫瘍形成能を獲得するため癌遺伝子 H-Ras/V12 誘導 MCF10A に HOXB9 を導入し、その細胞を免疫不全マウスに異種移植した in vivo モデルの作製に成功しており、そのモデルを利用して in vivo における放射線照射後の γ H2AX と 53BP1 の経時的変化を検討する。

5) 臨床検体における乳癌組織中の HOXB9 と γ H2AX、53BP1 との相関関係の検討

外科手術により得られた乳癌検体を処理し RNA を抽出し、その組織中の HOXB9 と γ H2AX、53BP1 の相関関係を PCR 法により検討する。

放射線耐性獲得メカニズムに関する報告は認めるが、臨床応用に至っているものは非常に少なく、既に乳癌の予後因子として示されている HOXB9 とこれによる TGF β 経路の活性化、DNA 修復に働く ATM 経路、らの関連性に着目し、放射線耐性のメカニズム解明を意図して本研究を行った。これら EMT 誘導を行う HOXB9 と放射線耐性のメカニズムを解明することにより、治療困難な転移性乳癌に対する、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 が乳癌における個別化治療のマーカーとなり、残存乳房再発予防や転移性乳癌の予後改善のために、最終的に臨床へ応用していくことを考えていく予定である。

3. 研究の方法

研究方法の概要は大きく分けて 1) 現在までの研究成果の検証・発展、2) in vivo モデルを用いたよりヒトに近い系での検証、3) 臨床検体を用いて、基礎研究で示された事象に実臨床における裏づけが認められるか否かの検証、の 3 点を重点的に行う。1) に関しては HOXB9 による放射線耐性獲得のメカニズム解析を中心に行い、同時に in vivo モデルの確立及び臨床検体の収集を平行して行う。

① in-vitro における HOXB9 の放射線照射耐性に対するメカニズムの検証

(1) HOXB9 を導入した乳腺上皮細胞 MCF10A にあらかじめ ATM 阻害剤単剤、DNAPK 阻害剤単剤、ATR 阻害剤を接触させ、その後放射線を

照射して照射前、照射後 10 分、照射後 30 分の γ H2AX や 53BP1 の発現量を免疫蛍光染色にて計測し、HOXB9 を導入していないコントロール細胞と比較検討する。

(2) 放射線照射後の pATM や MDC1 などの発現量を免疫蛍光染色にて計測し、HOXB9 を導入していないコントロール細胞と比較検討する。前述の結果から、 γ H2AX や 53BP1 の上流とされる pATM は HOXB9 導入細胞においてより亢進していることが予想される。また MDC1 は 53BP1 と同様に誘導される分子であり、DNA 修復の経路が亢進していると仮定するならば、HOXB9 導入細胞において発現量の増加が予想される。これにより、HOXB9 による ATM 経路の活性化をより詳細に確認することが可能である。

(3) 我々はすでに乳腺上皮細胞 MCF10A にあらかじめ TGF β 1 を添加すると EMT を誘導し、放射線感受性が低下することを確認した。そこでこれら細胞に放射線を照射して照射前、照射後 10 分、照射後 30 分の γ H2AX や 53BP1 の発現量を免疫蛍光染色にて計測し、TGF β を添加しないコントロール細胞と比較検討する。

(4) TGF β 経路のシグナル伝達において重要な役割を果たしている Smad4 を阻害することによって TGF β 経路を遮断することが可能である。我々はすでにレンチウイルスを用いて HOXB9 導入細胞に shSmad4 をさらに導入した細胞を準備し、shSmad4 によって Mesenchymal-Epithelial transition (MET: 間様上皮移行) を引き起こし、さらに放射線感受性が shSmad4 導入細胞で上昇することを確認している。そこで上記 (3) と同様に γ H2AX や 53BP1 の発現量を計測し、比較検討する。

4. 研究成果

我々はまず HOXB9 を導入し、EMT を生じた乳腺上皮細胞および、HOXB9 を shRNA を用いて抑制し、MET を生じた MDA-MB231 へ放射線を照射し、細胞の生存率を測定した。これによると、いずれも Epithelial の性質を持つ細胞では放射線照射の効果が大きく、Mesenchymal の性質を示す細胞では低いことが示された。(図 1)

次に、 γ H2AX および 53BP1 の foci の発現を検討した。放射線照射前後における両因子の発現量の変化を免疫蛍光染色にて計測した

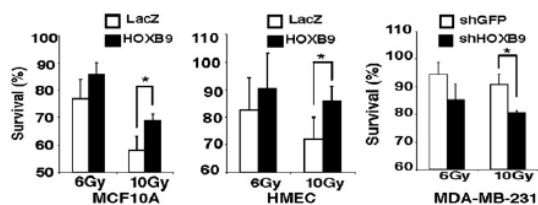


図 1

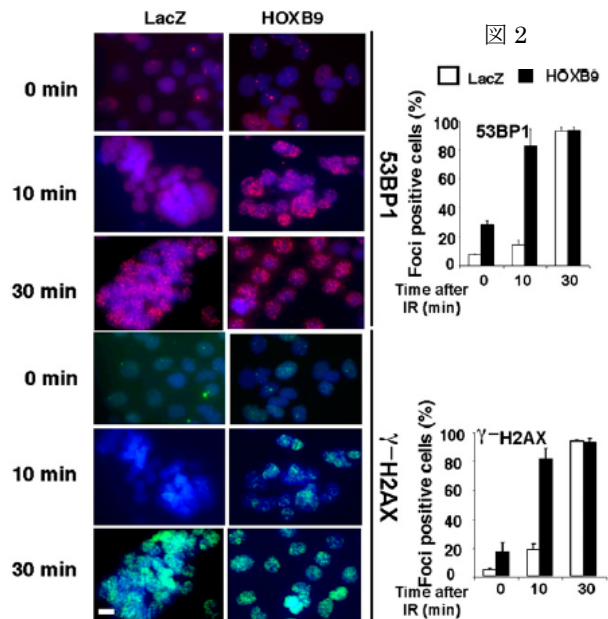


図 2

ところ、HOXB9 導入細胞では放射線照射する前に、既にそれらの発現量が高く、照射後早期 (10 分) に、さらなる発現亢進が認められた。一方照射後 12 時間以降ではコントロール細胞と比較して γ H2AX の発現量は減少していた (図 2)。すなわち、HOXB9 陽性細胞では、DNA 修復応答が早期に働く事がしめされ、pATM の発現を検討したところ、これらは HOXB9 陽性細胞においてリン酸化の度合いが高いことから、この DNA 修復応答は ATM の経路を介して生じることが示唆された。(図 3) TGF β は強力な EMT inducer であり、HOXB9 は TGF β 2 のプロモータ領域に直接結合することで発現を亢進することを我々は示し、HOXB9 による EMT に TGF β 経路の活性化が重要であることを確認している。本研究においては、TGF β 経路の活性化に必須である smad4

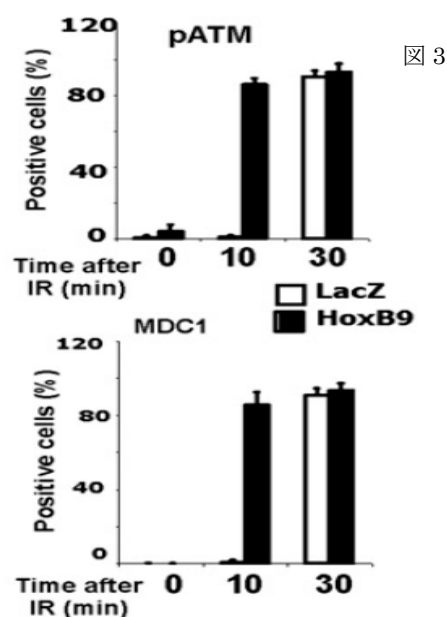
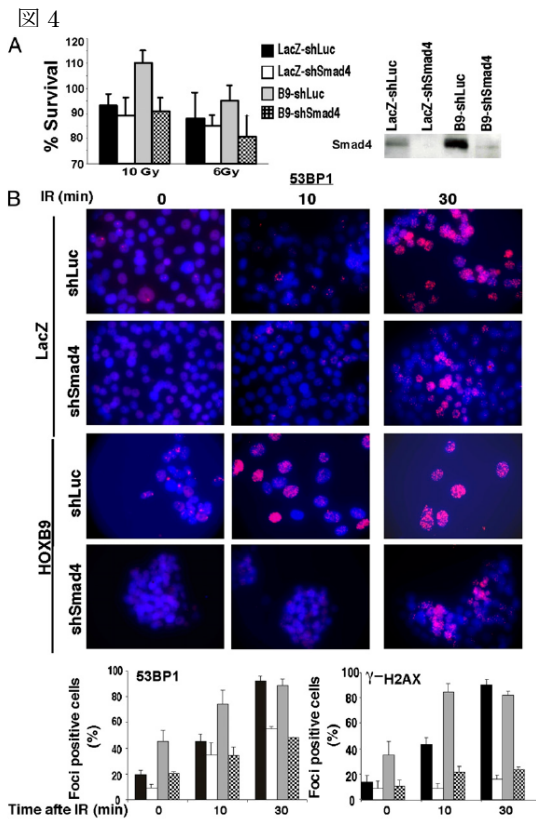


図 3

を shRNA によりノックダウンすることで、ATM 経路を介した DNA 修復機構の早期発現に TGF β 経路の活性化が必須であるか否かを検討した。図 4 に示すように、細胞の放射線照射への耐性、 γ H2AX および 53BP1 の foci の発現ともに smad4 発現を抑制することでこれらの獲得が阻害されることが示された。これらの結果から、HOXB9 による EMT 誘導で生じる放射線耐性メカニズムには、TGF β 経路の活性化が必須であることが確認された。



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 5 件)

1) Chiba N, Comaills V, Shiotani B, Takahashi F, Shimada T, Tajima K, Winokur D, Hayashida T, Willers H, Brachtel E, Vivanco MD, Haber DA, Zou L, Maheswaran S., Homeobox B9 induces epithelial- to -mesenchymal transition -associated radioresistance by accelerating DNA damage responses., Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 21;109(8):2760-5. doi: 10.1073/pnas.1018867108. 査読あり

2) Seki H, Hayashida T, Jinno H, Hirose S, Sakata M, Takahashi M, Maheswaran S, Mukai M, Kitagawa Y., HOXB9 expression promoting

tumor cell proliferation and angiogenesis is associated with clinical outcomes in breast cancer patients., Ann Surg Oncol. 2012 Jun;19(6):1831-40. doi: 10.1245/s10434-012-2295-5. 査読有り

3) Ono Y, Hayashida T, Konagai A, Okazaki H, Miyao K, Kawachi S, Tanabe M, Shinoda M, Jinno H, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y., Direct inhibition of the transforming growth factor- β pathway by protein-bound polysaccharide through inactivation of Smad2 signaling. Cancer Sci. 2012 Feb;103(2):317-24.

doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02133.x. 査読あり

4) Tetsu Hayashida, Epithelial -mesenchymal transition and tumor microenvironment propose the seed and soil theory of the present age, Nihon Rinsho. Suppl, 2012 7: 203-7 査読なし

5) 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;doi: 10.1155/2011/591427. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1) 林田 哲, Homeobox B9 is a potential surrogate marker for bevacizumab in combination with chemotherapy in colorectal cancer, AACR/JCA Joint Conference, 2013/2/24, 米国 Maui

2) 林田 哲, 大腸癌における HOXB9 発現による腫瘍血管新生亢進とベバシズマブの効果予測の検討, 日本癌治療学会学術集会, 2012/10/25, パシフィコ横浜 (横浜)

3) 林田 哲, Homeobox B9: A potential surrogate marker for bevacizumab in combination with chemotherapy in colorectal cancer, 日本癌学会学術総会, 2012/9/19, ロイトン札幌 (札幌)

4) 星野好則, Homeobox B9: a potential surrogate marker for bevacizumab in combination with chemotherapy in colorectal cancer, ASCO Annual Meeting 2012, 2012/6/4, 米国 Chicago

5) 関大仁, HOXB9 Expression as a New Independent Prognostic Factor in Human Breast Cancer, San Antonio Breast Cancer Symposium 2011, 2011/12/6, 米国 San Antonio

6) 林田哲, EMT・血管新生からみた新しい Seed & Soil Theory と乳癌治療戦略, 第 19 回日本乳癌学会学術総会, 2011/9/2, 仙台国際センター (宮城)

7) 林田哲, EMT・血管新生からみた Seed & Soil Theory と固形癌個別化治療, 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2011/6/30, アクトシティ浜松 コンgressセンター (静岡)

8) 林田哲, The relationship of HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis to clinical outcomes of patients with breast cancer., 2011 ASCO Annual Meeting, 2011/6/6, 米国 Chicago

6. 研究組織

(1) 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