

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08604

研究課題名(和文) HoxB9による抗癌剤耐性と分子標的治療薬感受性のメカニズムに関する検討

研究課題名(英文) Homeobox B9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated chemoresistance by accelerating TGF $\beta$  pathway

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)：in vitroでは、HoxB9ノックダウンによって、TGF $\beta$  signatureや血管新生因子は抑制され、EMTマーカーも抑制された。それと同時に、抗癌剤に対する感受性は上昇した。また膵癌細胞におけるStem cellマーカーは、HoxB9ノックダウンによって低下を認めた。膵癌切除検体の約46%にHoxB9上昇を認め、HoxB9は無再発生存、全生存に有意な予後因子であった。また検体のけるTGF $\beta$  signatureとHoxB9は正の相関関係を認めた。以上より、HoxB9がTGF $\beta$ 経路を介して、EMT変化を伴い、転移・浸潤傾向を強めると同時に抗癌剤耐性を獲得しているメカニズムが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療における大きな問題点として、癌細胞の抗癌剤耐性を含めた感受性と効果予測因子の正確性が挙げられる。本研究成果により、HoxB9が癌の個別化治療のバイオマーカーとなり、ある種の抗癌剤に治療抵抗性となった癌治療の予後改善のために最終的に臨床応用が可能となる可能性が示唆された。また、HoxB9はある種の分子標的治療薬の効果予測因子となる可能性がすでに検証されており、抗癌剤耐性メカニズムと同様に、分子標的治療薬の感受性変化のバイオマーカーとしても有用となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：TGF $\beta$  signature, Angiogenic factor, and EMT marker were downregulated by knockdown of HoxB9 in vitro. And the sensitivity of chemotherapy reagents was upregulated by knockdown of HoxB9. Approximately 46% of pancreatic cancer resected specimens showed an increase of HoxB9, which was a significant prognostic factor for recurrence-free survival and overall survival. In addition, a positive correlation was observed between the TGF $\beta$  signature and HoxB9 in the resected specimen samples. From these results, it was speculated that HoxB9 acquired anticancer drug resistance at the same time as upregulation of metastasis and infiltration with EMT changes via the TGF $\beta$  pathway.

研究分野：Oncology

キーワード：HoxB9

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、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 が、乳癌の約 40%、肝細胞癌の約 30% に高発現を認め、TGF $\beta$  経路を活性化することで EMT を誘導することを確認した。これにより細胞の遊走能・運動能を更新すると同時に、Stem-Cell like population (CD44+/CD24-) を増加させることを確認した。この Epithelial-Mesenchymal Transition (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散見されるが、詳細な機序は不明である (Chiba N, et al. PNAS 2011. Singh et al. Oncogene 2010)。抗癌剤によって DNA 損傷やタンパク質合成に障害が生じた際に、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生体防御反応を引き起こす。我々はすでに HoxB9 導入細胞において作用機序の異なる 3 種類の抗癌剤 (シスプラチン、ドセタキセル、パクリタキセル) の IC50 値が上昇し感受性が低下することを確認した。またこれまでの研究で HoxB9 は様々な癌腫において独立した予後因子であると同時に、大腸癌・肝細胞癌において分子標的治療薬に対する感受性は逆に高いことを確認した。以上の結果より、EMT 誘導因子である HoxB9 の発現が TGF $\beta$  経路の活性化に影響を及ぼすことで抗癌剤や分子標的治療薬の感受性変化に何らかの影響を与えていることが示唆された。

一方で、癌における転写因子 HoxB9 の役割についてある程度の報告はあるが、抗癌剤感受性メカニズムと結びつける研究はない。また抗癌剤感受性に関する報告は数多く存在するが、分子標的治療薬との関連性を論じている報告は少なく、詳細なメカニズムの検討から抗癌剤・分子標的治療薬の感受性を同時に検証している論文はほとんどない。

## 2. 研究の目的

癌治療における化学療法における大きな課題の一つとして、癌細胞の抗癌剤に対する感受性と効果予測因子が挙げられる。現在まで抗癌剤に対する感受性・耐性については多くの研究がなされているが、その詳細なメカニズムについてはわかっていない。我々は現在までの研究成果により、転写因子 HoxB9 が EMT を通じて癌の転移や浸潤に関わる予後因子であることが示されていると同時に、DNA 損傷・修復の過程に作用して抗癌剤耐性の獲得や分子標的治療薬の感受性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、癌における HoxB9 発現による EMT を介した抗癌剤・分子標的治療薬の感受性メカニズムを明らかにすることによって、HoxB9 が癌における個別化治療に対するバイオマーカーとなり、治療抵抗性となった癌治療の予後改善のため最終的に臨床へ応用していくことを目的として本研究を立案した。

本研究の成果から、HoxB9 の発現を調べることで様々な抗癌剤や分子標的治療薬に対する感受性を予測しながら治療を行うことができることが予想される。HoxB9 の働きをより詳細に検討することで抗癌剤・分子標的治療薬の耐性を解除し特定の治療薬の効果を高められる可能性や、さらには現在でも様々な癌腫に対して行われているように抗癌剤と分子標的治療薬を併用した新規治療法の出現により薬剤耐性の克服にも期待がもたれる。また、HoxB9 の発現抑制機構を検討することで、癌幹細胞集団が形成される分子メカニズムの解明にもつながると考えられる。今回の研究で明らかにしようとする癌細胞における感受性メカニズムの鍵となる HoxB9 の働きは TGF $\beta$  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 から TGF $\beta$  経路を人為的に制御することが可能になれば、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拠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つながることを期待されるとともに、癌個別化治療のバイオマーカーとして臨床応用されることを期待している。

## 3. 研究の方法

### in vitro における抗癌剤・分子標的治療薬感受性メカニズムの検討

HoxB9 を siRNA によってノックアウトし、それぞれの細胞群における Gemcitabine と Paclitaxel の感受性変化を検証する。また TGF $\beta$  recombinant 投与下における抗癌剤に対する感受性の変化を検証するとともに、同様の処理による Stem Cell population の変動を FACS にて検証する。また、その際の TGF $\beta$  signature の変動を確認する。

### 切除検体における HoxB9 と TGF $\beta$ signature 変動の検討

切除標本の免疫染色などとあわせて、分子病理学的に HoxB9 との関係性について検討を行うとともに、生存率や抗癌剤の病理学的効果について比較検討する。

### in vivo における抗癌剤・分子標的治療薬感受性メカニズムの検討

H-ras HoxB9 や H-ras HoxB9 shSmad4 による Xenograft model は作製済みであり、HOXB9 によって腫瘍の増大や転移が増加し shSmad4 によりノックダウンされることを in vivo モデルにおいて確認している。

それらの細胞群による Xenograft model における抗癌剤および分子標的治療薬の感受性変化について検討する。具他的には、抗癌剤または分子標的治療薬の投与によって腫瘍本体や転移個数などの変化を検討する。また治療後に、腫瘍本体や肝・肺などを摘出し、PCR や免疫染色などによって腫瘍や転移の分子病理学的検討を行う。さらには HoxB9 による CD44+/CD24- population を FACS Sorting し、Xenograft model を作製し、上記と同様に抗癌剤および分子標的治療薬の感受性変化などを検討する。また切除検体における HoxB9 と TGFb signature の変動を検討する。

#### 4. 研究成果

膵癌細胞株は Panc1 と MiaPaCa2 を使用した。ともに、HoxB9 の mRNA レベルは正常細胞に比較して上昇を認めた。さらには siRNA による HoxB9 ノックダウンの確認も両細胞において良好にノックダウンされていることを確認した。HoxB9 のノックダウンによって、TGFb signature (TGFb1, TGFb2, CTGF, SERPINE1, SPARC, THBS) や血管新生因子は抑制され、EMT マーカー (E-cadherine, Vinmentin, Fibronectin) も抑制された。それと同時に、Gemcitabine や Paclitaxel に対する感受性は上昇した。また膵癌細胞における StemCell マーカーである CD133, CD44, ESA などは、HoxB9 ノックダウンによって低下を認めた。さらには、血管新生因子や EMT マーカーの変動、さらには抗癌剤に対する感受性、Stem Cell マーカーの変動が TGFb signature 投与下では HoxB9 の効果の相殺を認めた。以上により、膵癌細胞株において HoxB9 が TGFb 経路を介して、EMT 変化を伴い、転移・浸潤傾向を強めると同時に抗癌剤耐性を獲得しているメカニズムが推測された。

膵癌切除検体の約 46% に HoxB9 上昇を認め、HoxB9 は無再発生存 ( $p < 0.01$ )、累積生存 ( $p < 0.01$ ) に有意な予後因子であった。また検体における TGFb signature と HoxB9 は正の相関関係を認めた。また、HoxB9 高発現群では、病理学的な血管浸潤や術後の早期再発症例が多く認められた。以上より、切除検体における実験からも HoxB9 が TGFb 経路を介して、転移・浸潤傾向を増強する可能性が示唆された。

in vivo における検証では、siRNA によるノックダウンされた膵癌細胞株を in vivo 用に調整する工程で、時間が経過し、現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------