

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09057

研究課題名(和文) 乳癌におけるHOXB9スプライスバリエントの探求

研究課題名(英文) Identification of a Modified HOXB9 mRNA in Breast Cancer

研究代表者

高橋 麻衣子 (Takahashi, Maiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50348661

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)：近年、HOXB9は発生時のみならず成長後も発現し悪性腫瘍等の発症や悪性化に関わることが明らかになっている。今回我々は、HOXB9と乳癌についての研究を進める中で、HOXB9遺伝子にスプライスバリエント(HOXB9T)が存在することを発見した。このバリエントはフレームシフトによりストップコドンが生じるためコーディングが途中で終了し、DNA結合部位であるホメオドメインや補因子結合部を欠いた構造となるため、HOXB9の構造の変化が下流のシグナル伝達経路へ与える影響は大きい。そのため、HOXB9タンパクがこのバリエントにシフトすることで、乳癌の増殖や進展に寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他のHOX遺伝子では、今回と同じようにホメオドメインを欠くスプライスバリエントが多数報告されており、HOXA9ではスプライスバリエントが白血病の発症に関わっており、治療標的として確立されている。本研究では、悪性度が最も高いトリプルネガティブの乳癌細胞株においてバリエントが多く発現しており、同バリエント高発現クローン株では増殖亢進・アポトーシスが抑制されていることを明らかにしている。これら検討を通じて、HOXB9による腫瘍制御のメカニズム解明を行うことで、未だ治療ターゲットが見つからないトリプルネガティブ乳癌において、治療ターゲットとして確立されれば、その臨床的意義は非常に大きいと考え得られた。

研究成果の概要(英文)：First identified as a developmental gene, HOXB9 is also known to be involved in tumor biological processes, and its aberrant expression correlates with poor prognosis of various cancers. In this study, we isolated a homeodomain-less, novel HOXB9 variant (HOXB9v) from human breast cancer cell line-derived mRNA. We confirmed that the novel variant was produced from variationless HOXB9 genomic DNA. RT-PCR of mRNA isolated from clinical samples and reanalysis of publicly available RNA-seq data proved that the new transcript is frequently expressed in human breast cancer. Exogenous HOXB9v expression significantly enhanced the proliferation of breast cancer cells, and gene ontology analysis indicated that apoptotic signaling was suppressed in these cells. Considering that HOXB9v lacks key domains of homeobox proteins, its behavior could be completely different from that of the previously described variationless HOXB9.

研究分野：乳腺外科

キーワード：HOXB9 スプライスバリエント 乳癌

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス(HOX)遺伝子は、胎生期の発生におけるマスターレギュレータとして他の多くの遺伝子の発現を調節する。菌類、植物からヒトまで高い相同性をもって種保存的に存在しており、生物において非常に根源的で普遍的な遺伝子である。共通構造として、2つのエクソンと1つのイントロンから成り、ホメオドメインというDNA結合部位を持つ。

近年、HOX遺伝子が発生時のみならず成長後個体の正常組織および病的組織においても発現し、悪性腫瘍の発症や悪性化に関わっていることが明らかになってきた。我々が注目するHOXB9は、発生時には乳腺や肺胞の発達に関わるが、乳癌、大腸癌、肺癌での異常発現が報告されている。

我々はこれまでの研究活動を通じて、HOXB9が乳癌細胞の上皮間葉転換(EMT)による悪性化と、微小環境における血管新生を誘導することで、乳癌の進展に寄与することを報告した。(Hayashida, PNAS, 2010) さらにこの基礎研究を進め、HOXB9がEMTを通じてATM経路の活性化を制御し、放射線耐性を獲得すること。また、実際の臨床検体を用いてHOXB9発現が乳癌の独立した予後不良因子であることを報告した。(Chiba, PNAS 2012, Seki, Ann Surg Oncol, 2012) また、E2F1がHOXB9のプロモータ領域に結合し、転写を促進することも明らかにした。(Zhussupova, PLoS One, 2014)

我々はこのHOXB9の研究を進める過程で、mRNAの塩基配列の確認を行ったところ、偶然2種類のmRNA配列を同時に検出し、追加実験の結果からHOXB9遺伝子に、今まで明らかでは無かったスプライスバリエーションが存在することを明らかにすることができた。このHOXB9スプライスバリエーションから生成されるタンパクは、ホメオドメインをコードする領域の前にストップコドンが生じるため、ホメオドメインを欠いた構造となる。(以降スプライスバリエーションはtruncated-formと記載し、wild typeはfull-lengthと記載する)

他のHOX遺伝子では、今回と同じようにホメオドメインを欠くスプライスバリエーションが多数報告されている。なかでもHOXA9では、スプライスバリエーションが白血病の発症に関わっており、治療ターゲットとして同定されている。(CR Stadler, Leukemia 2014) HOXファミリー遺伝子は互いにその構造や働きが共通性が高く、HOXA9と類似の事象がHOXB9で起こることが想定される。HOXB9が腫瘍の進展において果たす役割とその機序は複雑で、癌種毎にその働きが異なることが示唆されている。しかしながらそのメカニズムについてはいくつかの部分的な報告がされているに過ぎず、HOXB9スプライスバリエーションについての知見は全くない。HOXB9スプライスバリエーションが予後や治療効果に関わっていることが証明されれば、HOXB9の腫瘍制御のメカニズムの解明のブレークスルーとなることが期待される。各乳癌細胞株や他臓器細胞株のHOXB9 mRNAのシーケンスを行ったところ、興味深いことに腫瘍の悪性度が最も高い乳癌サブタイプであるトリプルネガティブの乳癌細胞株においてtruncated-formが多く発現しており、乳癌細胞の形質や病原性への関与が考えられた。そのため、未だ治療ターゲットが見つからないトリプルネガティブ乳癌において、HOXB9が治療ターゲットとして確立されれば、その臨床的意義は非常に大きいと考えられる。

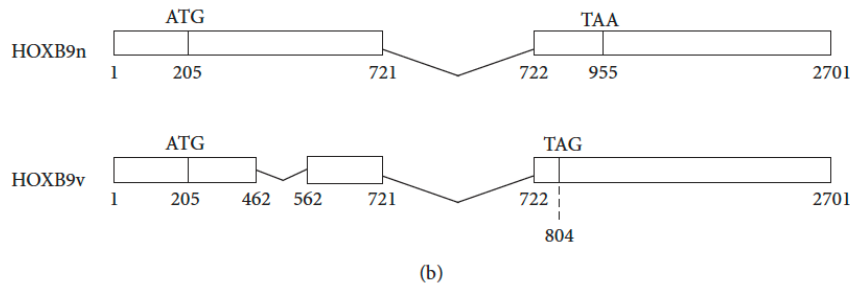
2. 研究の目的

本研究の目的は、HOXB9スプライスバリエーションの生物学的・臨床的意義を明らかにすることである。

前実験として、Full-length及びtruncated-form HOXB9をそれぞれ高発現するMCF7クローンを樹立し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、発現差のある遺伝子のGene Ontology解析を行った。その結果、truncated-formにおいて、programmed cell deathやapoptosis抑制に関連する遺伝子が有意に高発現していた。また、亜鉛イオン代謝の亢進も強く認められ、EMT促進因子の一つであるZEB(Zinc-finger E-box Binding homebox)ファミリー遺伝子がトリプルネガティブ乳癌で高発現していることが知られており、truncated-form HOXB9の高発現により、悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌の特徴をMCF7に誘導することが示唆された。

本研究では、この点に着目してHOXB9 truncated-formがどのようなメカニズムで乳癌悪性化に関わるのかを基礎的に検討する。また臨床検体を用いて、実際のヒト腫瘍においてもHOXB9 truncated-formの存在を確定し、臨床病理学的因子とどのような相関を生じるかを解析することを目的とする。HOX遺伝子群のスプライスバリエーションが血液癌における発がんメカニズムに関わることを示した研究は認められるが、固形癌における報告はない。また、本研究を進めることで、HOXB9スプライスバリエーションが治療標的となり得るかどうかを検討することも目的の一つである。

3. 研究の方法



(b)

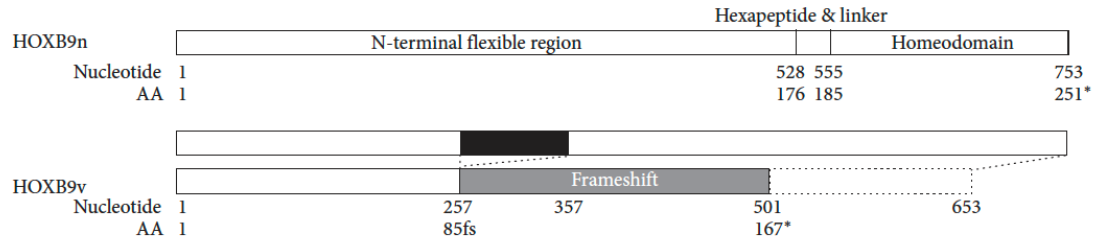


図1 HOXB9 スプライスバリエントの欠失部位と各ドメインの機能

各サブタイプの乳癌細胞株における full-length / truncated-form HOXB9 の比率の検証 full-length / truncated-form HOXB9 の比率については、差異部が GC-rich であること、またそもそも発現量が微量であることから、それぞれのバリエントの定量は技術的に困難であった。しかし我々は、PCR を行わずにデジタル分子バーコードで分子をカウントする nCounter システムを用いて定量系の確立に成功したため、各バリエントを高発現させたクローン株を MCF7 において作成し、まずその発現を確認する。

HOXB9 スプライスバリエント抑制モデルを確立し、乳癌進展抑制効果を得られるか検証 mRNA のスプライシングにはスプライスサイトと呼ばれる部位の認識が必要となるが、同部の配列操作により truncated-form HOXB9 発現を抑制した際に、乳癌進展の抑制を得ることができるかを検証する。

HOXB9 full-length/truncated-form 高発現クローン株における HOX 阻害薬の治療効果 HOX タンパクは多くの cofactor と相互作用し HOX タンパク複合体を形成して働くことが知られ、cofactor の一つである PBX との結合を阻害する HXR9 は HOXB1-9 高発現の乳癌において治療効果が高い。先述の full-length と truncated-form の HOXB9 高発現クローン株および wild MCF7 株における、HXR9 の治療効果の差を検証する。DNA 結合部を欠く truncated-form においては cofactor を含んだ下流の反応も異なることが予想され、治療効果も異なることが想定される。

乳癌臨床検体での truncated-form HOXB9 の存在確認および臨床病理学的因子との相関で使用した nCounter システムを用いた定量系を用いて、臨床検体における存在確認と比率検証を行い、臨床病理学的因子との相関を検討する。

4. 研究成果

ヒト乳癌細胞株 (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC38, BT-474, BT-549, Hs578T, SKBR3) ヒト正常乳腺細胞株 (MCF10A) ヒト結腸癌細胞株 (WiDR) からそれぞれ RNA を単離して、HOXB9 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、MCF7・T47D・MDA-MB-

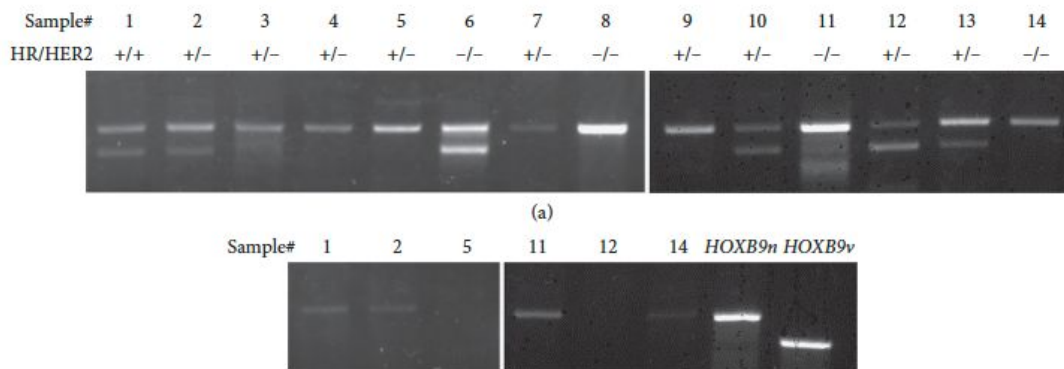


図2 臨床検体における HOXB9v の発現 癌部 (上) 非癌部 (下)

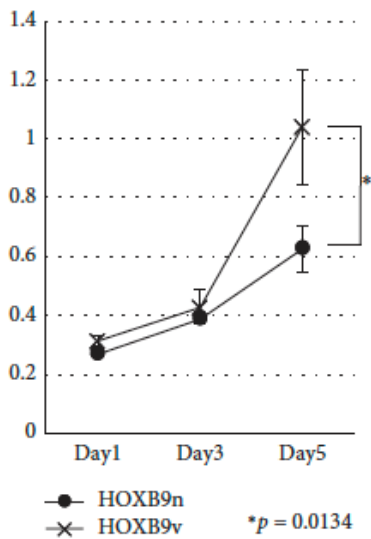


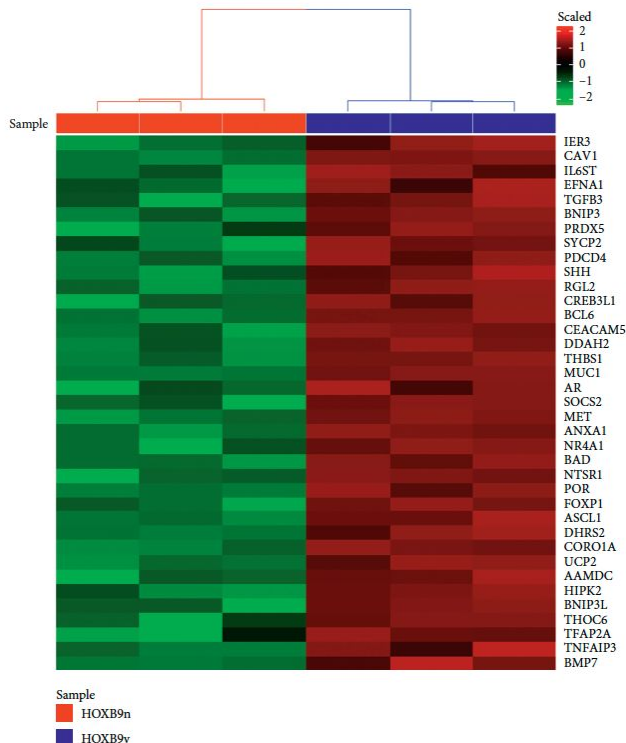
図3 HOXB9n, HOXB9v を過剰発現する MCF7 クローンの細胞増殖速度

231・MDA-MB-468・Hs578T・HCC38・MCF10A 細胞株から HOXB9 の新規のバリエーションが確認された。この新規バリエーションを既存の配列の HOXB9 (HOXB9n) と区別するために HOXB9v と表記する。HOXB9v おけるエクソン 1 の欠失は、フレームシフトによる停止コドン (TAG) の形成をもたらし、167 番目のアミノ酸より遠位のアミノ酸配列を切り捨てることが判明した。したがって、コードされたタンパク質は、ホメオボックスドメイン・DNA 結合ドメイン・補因子相互作用の主な担い手であると考えられる、ヘキサペプチドモチーフを欠いていると考えられた。HOXB9v の配列は GenBank にアクセス番号 LC466645 で提出を行った。

次に、HOXB9v 転写物の存在を確認し、ヒト乳癌細胞株における HOXB9 遺伝子のゲノム DNA 変異を同定するために、PCR 解析を行った。その際のプライマー標的領域は HOXB9v の欠失部位を含み、HOXB9n の PCR 産物は 643bp、HOXB9v は 543bp であった。これを用いて、乳癌細胞株における HOXB9n と HOXB9v の両方の転写物が検出可能であったため、各 PCR 産物の塩基配列を決定し、各バンドが HOXB9n または HOXB9v の正確な配列に対応していることが確認された。一方で乳癌細胞株のゲノム DNA を鋳型とする PCR では HOXB9 のゲノム DNA の変異を示すバンドは検出されなかった。こちらについても PCR 産物の塩基配列を決定したところ、ゲノム DNA に変異や欠失がないことが確認された。これらのことから、2 つの転写産物 (HOXB9n および HOXB9v) は、変異のない HOXB9 ゲノム DNA から産生されたことが確認された。

ヒト乳癌切除検体における HOXB9v-mRNA の存在の確認を行った。HOXB9v は乳癌のサブタイプ分類にかかわらず、癌部の検体から検出されたが、正常乳腺サンプルからは HOXB9v は検出されなかった。乳癌切除検体における HOXB9v の存在をさらに確認するため、一般に公開されている乳がん RNA 配列データセット (GSE119937) を再解析し、得られた配列を HOXB9 遺伝子配列にマッピングした。その結果、多くのサンプルで配列が欠失したエクソン 1 の領域が確認され、この領域は HOXB9v の欠失領域と一致した。

図4 HOXB9n, HOXB9v を過剰発現する MCF7 クローンにおける遺伝子発現解析



HOXB9v 過剰発現クローンの細胞増殖速度が速いため、そのメカニズム解明のため HOXB9n と

乳癌における HOXB9v の役割を明らかにするために、MCF7 細胞株を用いて HOXB9n または HOXB9v を過剰発現させたクローンを複数樹立し、HOXB9n と HOXB9v の遺伝子とタンパク質の発現を各クローンにおいて確認した。3 次元培養と 2 次元培養の両方で細胞増殖アッセイを行ったところ、HOXB9v の過剰発現株の MCF7 細胞ではその増殖が促進された。また、MDA-MB-468 細胞において、HOXB9n または HOXB9v を一過性に過剰発現させて行った細胞増殖アッセイでは、同様に HOXB9v の過剰発現が MDA-MB468 細胞の増殖を増加させることが示された。

18 アミノ酸ペプチドである HXR9 は、HOX タンパク質のヘキサペプチドモチーフを競合的に阻害し、HOX-PBX の結合を阻害することが知られている。前述の HOXB9n・HOXB9v を過剰発現する MCF7 のクローンに対して、HXR9 または対照ペプチドである CXR9 を添加した。その結果 HOXB9v は、PBX タンパク質と相互作用を行うヘキサペプチドモチーフを欠いているが、HXR9 は両クローン細胞株の増殖を有意に阻害した。

HOXB9v 過剰発現する MCF7 細胞クローンを用いてマイクロアレイ解析および遺伝子オンロジー解析を実施した。1056 遺伝子を DEGs として選択し、遺伝子オンロジー解析の結果、HOXB9n 発現細胞と HOXB9v 発現細胞の up-DEGs は、アポトーシス抑制に関連するパスウェイで有意差を示した。また、アポトーシスに關与する 37 遺伝子を比較したヒートマップでは、HOXB9v 発現細胞ではアポトーシスが高度に抑制されていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashoji Ayako, Hayashida Tetsu, Kawai Yuko, Kikuchi Masayuki, Watanuki Rurina, Yokoe Takamichi, Seki Tomoko, Takahashi Maiko, Miyao Kazuhiro, Yamaguchi Shigeo, Kitagawa Yuko	4. 巻 2020
2. 論文標題 Identification of a Modified HOXB9 mRNA in Breast Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/6065736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	関 朋子 (Seki Tomoko) (70528900)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	
研究分担者	林田 哲 (Hayashida Tetsu) (80327543)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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
---------	---------