

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22855

研究課題名（和文）乳癌におけるHOXB9スプライスバリエーションの生物学的・臨床的病理学的意義の解明

研究課題名（英文）HOXB9 mRNA variant in breast cancer

研究代表者

中小路 絢子（Nakashoji, Ayako）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30876321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：HOXB9は上皮間葉転換および血管新生誘導により乳癌進展に寄与することが知られる。新たに発見したHOXB9スプライスバリエーションについて、乳癌細胞株および乳癌臨床検体に同バリエーションが広く発現している一方、正常乳腺では発現が認められないことをこれまでに確認しており、今回、その乳癌における役割を解明することを目的とし研究を行った。結果、HOXB9スプライスバリエーションは乳癌において、アポトーシスを抑制することにより細胞増殖に寄与し、なかでも外因性経路に関わっていると考えられた。また、HOX阻害薬の効果から、DNA結合部を欠く同バリエーションにおいては補因子を含めた下流の反応も異なっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HOX遺伝子群の他のHOX遺伝子では同様にホメオドメインを欠くスプライスバリエーションが報告されており、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。一方、HOX遺伝子群のスプライスバリエーションが固形癌の進展に関わることを示した研究は当研究以外なく、今回の結果の学術的な意義は非常に大きいと考えられる。今後は、当施設内の乳癌検体および正常乳腺検体のサンプル数をさらに増やし臨床的因子との比較や分子生物学的な解析を目指す。また、治療ターゲットとしての有用性についても検討していく。

研究成果の概要（英文）：HOXB9 is known to be involved in tumor biological processes, and its aberrant expression correlates with poor prognosis of various cancers. We isolated a homeodomain-less, novel HOXB9 variant (HOXB9v) from human breast cancer cells. In this study, we aimed to uncover the role of the variant in 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. The results of the apoptosis assay indicated that HOXB9v is involved in external pathway of apoptosis. Considering that HOXB9v lacks key domains of homeobox proteins, its behavior could be completely different from that of the previously described variationless HOXB9. Further research analyzing the two transcripts individually is warranted to re-evaluate the true role of HOXB9 in cancer.

研究分野：乳癌

キーワード：HOXB9 乳癌 ホメオボックス遺伝子

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であり、生物において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。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。

先行研究では、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や、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が示されている。

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、2種類の mRNA 配列を同時に検出し、追加実験により、HOXB9 遺伝子に、これまで報告の無い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。(以降バリエーションは HOXB9v と記載し、wild type は HOXB9n と記載する。)

乳癌細胞株および当施設の乳癌手術検体に HOXB9 mRNA のシーケンスを行ったところ、HOXB9v は乳癌サブタイプに関わらず広く認められた。一方、正常乳腺検体の解析では HOXB9v の発現は認められず、同バリエーションの乳癌細胞の形質や病理性への関与が考えられた。

図 HOXB9 スプライスバリエーションの(a)配列と(b)mRNA 構造 (c)タンパク構造



2. 研究の目的

本研究では、新たに存在を明らかにした HOXB9 スプライスバリエーションの、乳癌における生物学的・臨床的意義を解明し、乳癌悪性化に関わるメカニズムについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HOXBv 高発現細胞における増殖アッセイ

トリプルネガティブ乳癌の細胞株である MDA-MB-468 細胞に HOXB9n 及び HOXB9v をそれぞれ transient transfection により高発現させ、その増殖能を比較した。また、ホルモン陽性乳癌の細胞株である MCF7 において、HOXB9n 及び HOXB9v をそれぞれ高発現する MCF7 細胞クローンを樹立し、増殖能を比較した。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

(1)で樹立した細胞株において、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。

(3) HOX 阻害薬使用による検討

HOX タンパクの cofactor の一つである PBX との結合を阻害する HXR9 を用いて、(1)で樹立した細胞株における治療効果を比較した。

(4)apoptosis 検出アッセイ

(2)の結果より、HOXB9v 高発現株は apoptosis の抑制に関連する遺伝子が高発現していたため、アネキシン V を用いた apoptosis 検出アッセイを行った。Actinomycin D を使用した intrinsic pathway の検証、また、TNF α を用いた extrinsic pathway の検証を行った。

4 . 研究成果

MDA-MB-468 細胞に HOXB9n 及び HOXB9v をそれぞれ transient transfection により高発現させその増殖能を比べたところ、HOXB9v 高発現細胞で増殖が亢進していた。また、HOXB9n 及び HOXB9v をそれぞれ高発現する MCF7 細胞クローンを樹立したところ、同様に HOXB9v 高発現株において増殖が亢進していた。

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 解析を行ったところ、HOXB9v 高発現株において、programmed cell death や apoptosis 抑制に関連する遺伝子が有意に高発現しており、HOXB9v 高発現は apoptosis の抑制を通じて乳癌細胞の増殖を促進している可能性が考えられた。

これを受け、HOXB9n および HOXB9v 高発現クローン株および wild MCF7 株を用い、アネキシン V を用いた apoptosis 検出アッセイを行った。Actinomycin D を使用した intrinsic pathway の検証では、3 つの株の apoptosis に差は見られなかったが、TNF α を用いた extrinsic pathway の検証では、HOXB9v 高発現クローン株において apoptosis が抑制されていることを示す結果を得た。

また、HOX タンパクの cofactor の一つである PBX との結合を阻害する HXR9 を用いて、HOXB9n または HOXB9v 高発現クローン株における治療効果を検証した。その結果、HOXB9v 高発現株では、HOXB9n 高発現株と比べ、HXR9 の治療効果が低いことを示す結果を得た。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るが、DNA 結合部を欠く HOXB9v においては cofactor を含んだ下流の反応も異なっていることを示唆する結果であった。

以上の結果より、HOXB9 スプライスバリエントは乳癌において、apoptosis を抑制することにより細胞増殖に寄与しており、apoptosis のなかでも extrinsic pathway に関わっていると考えられた。また、HOX 阻害薬の治療効果の評価から、DNA 結合部を欠く HOXB9v においては cofactor を含んだ下流の反応も異なっていることが示唆された。

HOX 遺伝子群の他の HOX 遺伝子では HOXB9v と同様にホメオドメインを欠くスプライスバリエントが報告されており、なかでも 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、治療ターゲットとして同定されている。一方、HOX 遺伝子群のスプライスバリエントが固形癌の進展に関わることを示した研究は当研究以外なく、今回の結果の学術的な意義は非常に大きいと考えられる。

今後は、当施設内の乳癌検体および正常乳腺検体のサンプル数をさらに増やし臨床的因子との比較や分子生物学的な解析を目指す。また、治療ターゲットとしての有用性についても検討していく。

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