

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09550

研究課題名(和文) 転写因子HOXD9が子宮頸癌の悪性形質に関与する分子機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) The Molecular Mechanisms of Transcription Factor HOXD9 Involvement in the Malignant Phenotype of Cervical Cancer and Development of Therapeutic Strategies

研究代表者

谷本 慧子 (Tanimoto, Satoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30897377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HPV18型陽性の子宮頸癌細胞株であるSKG-1株とHela株を用いてHOXD9がHPV18型の初期プロモーターであるP105プロモーターを介して細胞の悪性形質に影響を与えているか検討し、その分子機構の解明を行った。その結果、HPV18型陽性の子宮頸癌においてHOXD9は、その抑制によって細胞はアポトーシスを誘導されて細胞死に至る。その分子機構として、HOXD9はHPVのP105プロモーターに直接結合してE6遺伝子の発現を促進することでP53タンパクの分解を促進し、E7遺伝子の発現を促進することによりRbタンパクのがん抑制機能を阻害しE2Fを活性化させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、HPV18型が原因となっている子宮頸癌において、HOXD9がHPVの105プロモーターに結合して、がん遺伝子であるE6およびE7の発現を促進することが示された。また、HOXD9の遺伝子発現を抑制することで、細胞はアポトーシスを生じて死滅する。以前、我々はHPV16型の子宮頸癌でも、18型と同様にHOXD9が細胞生存に必須の分子であることを示している。HPV16型と18型は、子宮頸部扁平上皮癌の約6割、腺癌では8割を占めており、HOXD9が子宮頸癌治療の新たな分子標的となる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether HOXD9 affects the malignant traits of cervical cancer cells positive for HPV18, using the SKG-1 and Hela cell lines. We focused on the P105 promoter as an early promoter of HPV18 and elucidated the molecular mechanisms involved. Our results showed that HOXD9 inhibition induces apoptosis in HPV18-positive cervical cancer cells, leading to cell death. Mechanistically, HOXD9 directly binds to the HPV P105 promoter, promoting the expression of the E6 gene, which in turn facilitates the degradation of the P53 protein. Furthermore, HOXD9 promotes the expression of the E7 gene, inhibiting the tumor-suppressive function of the Rb protein and activating E2F.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：HOXD9 HPV18 子宮頸癌

### 1. 研究開始当初の背景

HOX 遺伝子は DNA 結合ドメイン(Homeobox domain)を有し、他の遺伝子の転写を制御する遺伝子群で、これまでに 39 種が同定されている。近年、この HOX 遺伝子が癌の分野で注目され、多くの癌で過剰発現し、癌の増殖・浸潤・転移や抗がん剤耐性に密接に関与することが報告されている (Nature Review;361,2010)。

申請者のグループは、HPV16 型陽性子宮頸癌における HOX 遺伝子群の発現と臨床病理学的因子を検討し、HOXD9 が子宮頸癌の悪性化に深く関与する因子であること、その分子メカニズムについて明らかとした (図 1: Hirao N. et al. Gynecol Oncol.155:340,2019)。具体的には、HOXD9 は HPV16 型の初期プロモーターである P97 プロモーターに結合し、癌遺伝子である E6 および E7 の発現を促進することで子宮頸癌の悪性化形質に決定的な役割を果たす。

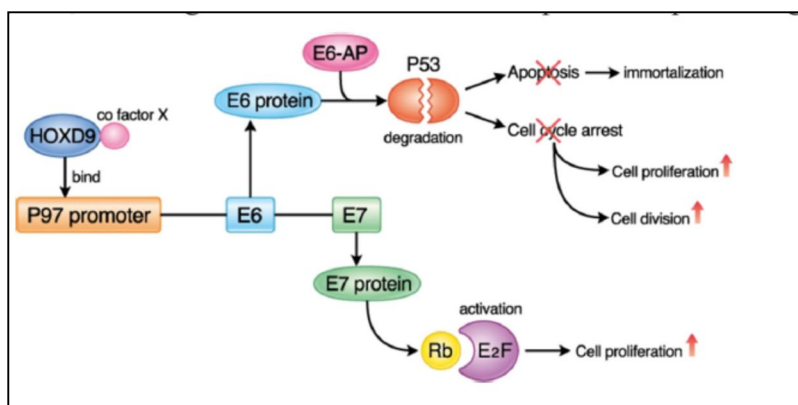


図 1  
HOXD9 は HPV16 型の P97 プロモーターに直接結合して E6/7 の発現を促進し、子宮頸がんの悪性化に関与する

(Hirao N. et al. Gynecol

Oncol. 155:340,2019)

本研究ではまず、申請者は HOXD9 が、HPV16 型陽性子宮頸癌の P97 プロモーターだけでなく、HPV18 型子宮頸癌の HPV-P105 プロモーターを制御し、悪性形質に深く関与するか検討する。また、子宮頸部腺癌や小細胞癌、神経内分泌癌は原因となる HPV は 16 型と 18 型の 2 つのみとされ、他のハイリスク HPV が原因となることは極めてまれであるとされる。このため、HOXD9 の解析により、扁平上皮癌のみならず難治性とされるこれらの組織型の新たな治療の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子 HOXD9 が HPV16 型のみならず HPV18 型子宮頸癌においても、E6/7 の発現を制御しているかを検討し、さらには HOXD9 を標的とした新たな治療法の開発を目指すことである。HOXD9 が HPV16 型陽性子宮頸癌において HPV-P97 プロモーターに直接結合して HPV-E6/7 遺伝子発現を促進することで、癌の悪性形質に深く関与することを明かしたことは申請者らの独自の研究であり、極めて独創的である。また、HOXD9 を単独で抑制することで、子宮頸癌細胞株の増殖が停止し細胞死に至ることは、HOXD9 が HPV16 型陽性子宮頸癌の治療標的となることを示唆している。本研究で 18 型 HPV でも同様に P105 プロモーターを制御していることが示されれば、子宮頸癌の約 6 割の治療につながる可能性がある。また、子宮頸癌で難治性とされる子宮頸部腺癌、小細胞癌や神経内分泌癌などの組織型は、HPV16 型または 18 型のみが検出されるとされ、HOXD9 経路の阻害剤開発は組織型に拘わらず有効な新規治療の開発につながると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) HOXD9 抑制が HPV18 型陽性頸癌細胞株の悪性形質に与える影響 ~ in vitro, in vivo ~

HPV18 型陽性子宮頸癌細胞株である SKG-1 および HeLa 細胞株にレンチウィルスの shRNA 用いて遺伝子抑制を行い、増殖能を WST-1 assay で評価し、細胞周期に与える影響を検討

する。

(2) HOXD9 抑制によるアポトーシス誘導の評価

HPV16 型陽性頸癌株では HOXD9 の抑制により P53 タンパクの分解が抑制され、P53 タンパク発現量が増加することがアポトーシス誘導のメカニズムと考えられる。HPV18 型陽性頸癌株でも様に P53 タンパクが増加するか Western Blot 法で検討する。

HOXD9 抑制 HPV18 型陽性頸癌細胞株を用いて、MTT assay および Annexin と 7AAD を用いたフローサイトメトリーにより、アポトーシスが誘導されているか検討する

(3) HOXD9 の HPV-P105 プロモーターを介した HPV-E6/7 遺伝子発現への関与

既に申請者らは HPV16 型陽性頸癌株で HOXD9 が HPV-P97 プロモーターを介して HPV-E6/7 遺伝子発現を制御する知見を得ている。HPV18 型陽性頸癌株で同様な検討する。

HPV P105 プロモーターを用いた promoter assay を行う。実験に用いる luciferase 標識 P97 プロモーターのプラスミドは研究協力者株元より貸与されている。

HOXD9 抑制により HPV-E6/7 遺伝子発現が抑制されるか RT-PCR 法によって検討する。

HPV P97 プロモーターの ChIP Assay を行い、HOXD9 が P105 プロモーターに直接結合するのか、他の分子を介して制御するか検討する。

(4) HOXD9 抑制による E7 遺伝子抑制と転写因子 E2F の不活化の検討

子宮頸癌では E7 遺伝子過剰発現により Rb が不活化される結果転写因子 E2F が活性化され、細胞周期促進タンパクである MCM2 および PCNA が誘導されて G1 アレストが解除される。HOXD9 抑制によって G1 アレストが生じるか検討する。

HOXD9 抑制株での、RB 遺伝子と E2F 遺伝子および MCM2、PCNA 遺伝子発現を検討する。

フローサイトメトリーによって G1 アレストが生じるか検討する。

(5) 既存薬剤を用いた Drug repositioning の検討

文献的に HOXD9 の発現に関与する可能性のある薬剤を検索し、候補薬剤を得る。

複数の子宮頸癌細胞を用いて、培養液中に候補薬剤を添加し、HOXD9 抑制作用があるか検討する。

4. 研究成果

(1) HOXD9 抑制が HPV18 型陽性頸癌細胞株の悪性形質に与える影響

HPV18 型陽性子宮頸癌細胞株である SKG-1 および HeLa 細胞株にレンチウィルスの shRNA 用いて遺伝子抑制を行い、WST-1 assay で細胞像臓側を検討したところ、2 つの細胞株ともに細胞増殖が顕著に抑制され (図 1B)、WST-1 assay でも増殖抑制が確認できた (図 1C)。

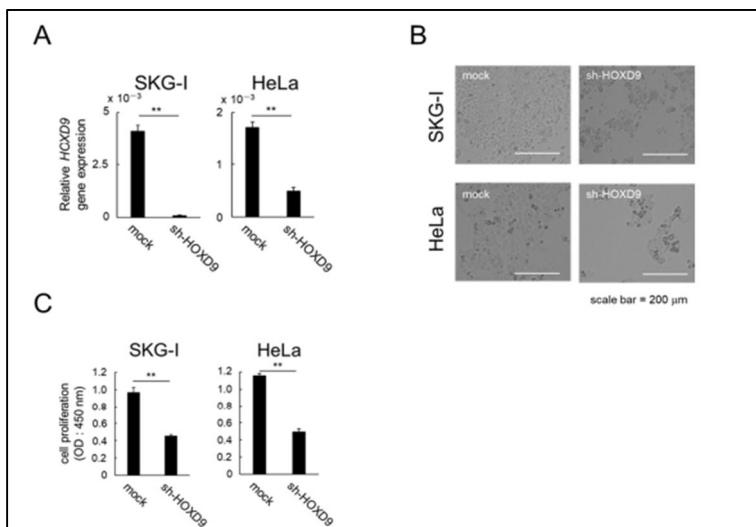


図 1 (文献 1 より引用)

## (2) HOXD9 抑制によるアポトーシス誘導の評価

HPV16 型陽性頸癌株では HOXD9 の抑制により E6 遺伝子発現は顕著に抑制された (図 2B)。Rb 遺伝子発現は抑制されなかったが、一方で Rb タンパク量は増加した (図 2C,D)。Apoptosis assay では、アポトーシス (7AAD low, AnnexinV high) および、死細胞 (7AAD high, AnnexinV high) の分画の割合が上昇していた (図 2E)。これは、HOXD9 の抑制によって E6 遺伝子発現が低下し、Rb の分解が抑制されることによって Rb のがん抑制遺伝子としての働きが促進し、アポトーシスが誘導されたと考えられる。

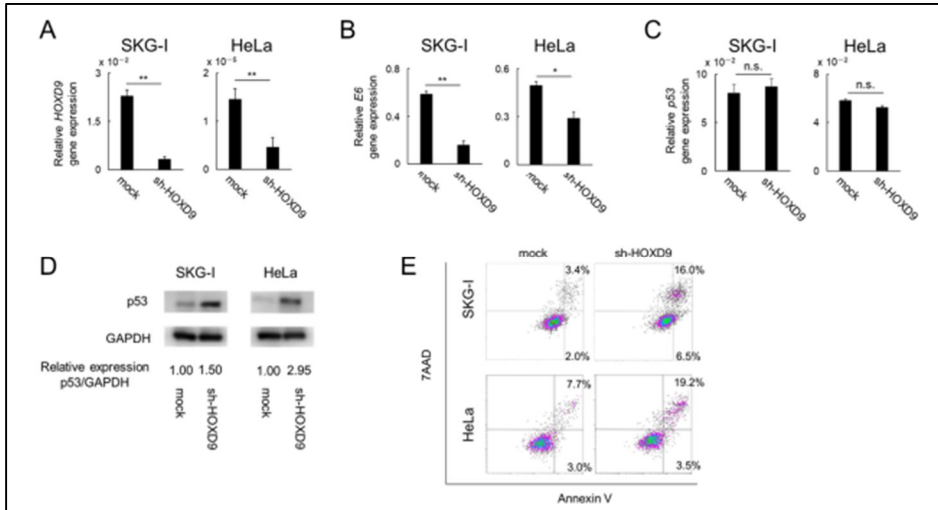


図 2 (文献 1 より引用)

## (3) HOXD9 の HPV-P105 プロモーターを介した HPV-E6/7 遺伝子発現への関与

P105 プロモーターを用いたルシフェラーゼ・アッセイでは、HOXD9 の抑制によって P105 プロモーターが抑制されることが示された (図 3A)。また、ChIP アッセイでは、HOXD9 が P105 プロモーターに直接結合していることが示された (図 3B)。

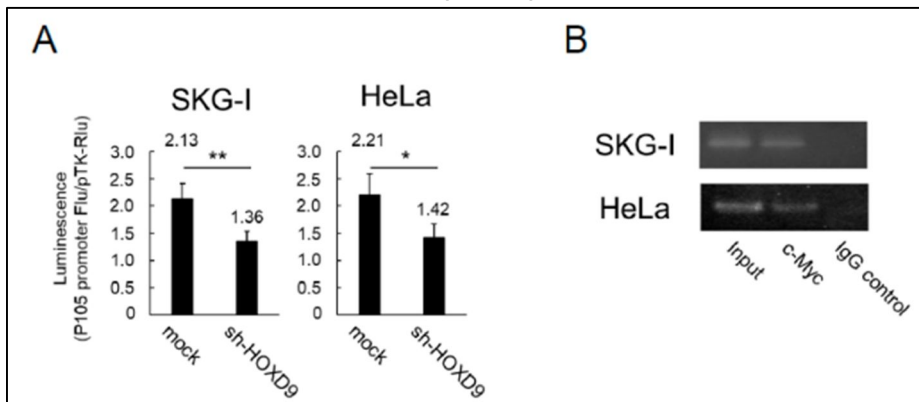


図 3 (文献 1 より引用)

## (4) HOXD9 抑制による E7 遺伝子抑制と転写因子 E2F の不活化の検討

HOXD9 抑制によって E7 遺伝子発現が抑制された (図 4A)。Rb1 および E2F 遺伝子発現は変化しなかった (図 4B,C)。E2F の標的遺伝子である MCM2、PCNA 遺伝子発現は低下し (図 4D,E)、G1 アレストが生じた (図 4F)。

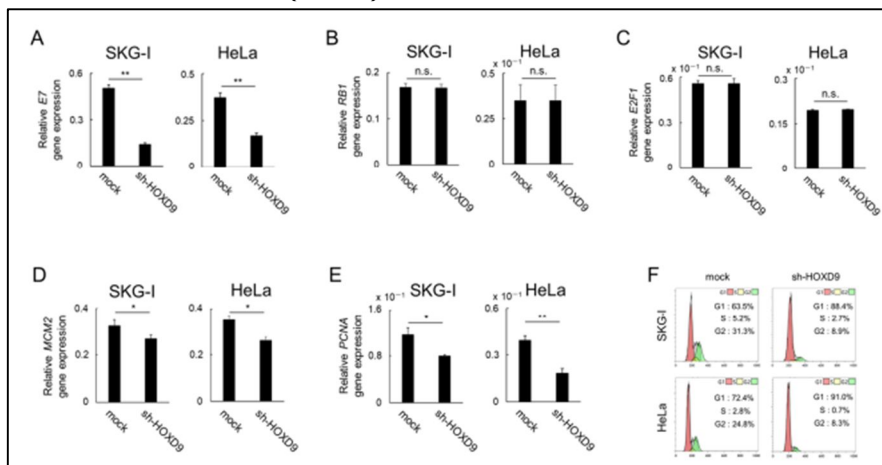


図 4 (文献 1 より引用)

### (5) 既存薬剤を用いた Drug repositioning の検討

文献的に HOXD9 の発現に関与する可能性のある薬剤としてオールトランスレチノイン酸 (ATRA) を選択した。ATRA は急性前骨髄球性白血病に対する既承認薬 (製品名: ベサノイド) であり、レチノイン酸応答配列 (RARE) に結合し、近傍の遺伝子群の転写調節を行うシグナル分子である。また、脊椎動物の胚発生初期には、HOX 遺伝子群の発現を調整することで胚運命を決定づける役割を担っており、in vitro で HOXD9 を抑制する効果も報告されている (Quan Hong, et al. Bioengineered, 2021)。子宮頸癌細胞株 SiHa および SKG3a 株に ATRA を添加し、細胞の形態学的変化を観察したところ、DMSO 群と比較して、ATRA 添加群では有意に死細胞の割合が増加し (図 5A)、細胞増殖の低下も認められた (図 5B)。

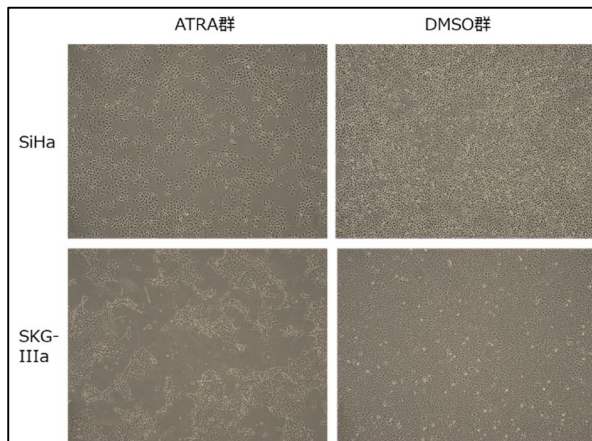


図 5 A

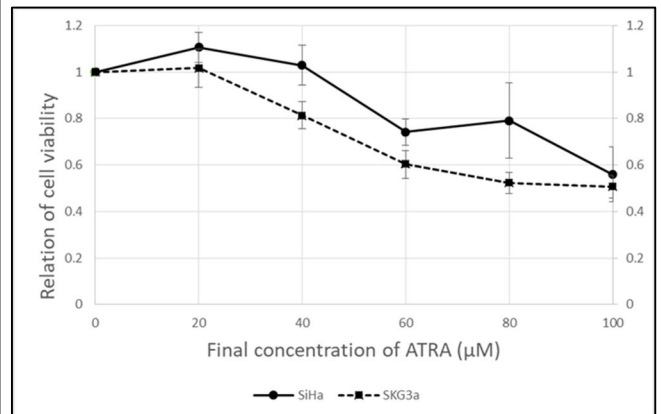


図 5 B

本研究によって、HOXD9 が HPV18 型陽性の子宮頸癌において、105 プロモーターに直接結合して HPV の E6 および E7 遺伝子の発現を誘導し、細胞の不死化、増殖促進に関与することが明らかとなった。また、急性前骨髄球性白血病に用いられる ATRA が HOXD9 の発現を抑制することが示され、新たな子宮頸がん治療の開発につながる可能性が示された。

文献 1 : Hayashi S, **Iwata T (corresponding author)**, Imagawa R, Sugawara M, Chen G, **Tanimoto S**, Sugawara Y, Tanaka I, Matsui T, Nishio H, Nakamura M, **Katoh Y**, Mori S, Kukimoto I, Aoki D. Transcription Factor Homeobox D9 Drives the Malignant Phenotype of HPV18-Positive Cervical Cancer Cells via Binding to the Viral Early Promoter. *Cancers*. 2021;13(18):4613.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hayashi Shigenori, Iwata Takashi, Imagawa Ryotaro, Sugawara Masaki, Chen Guanliang, Tanimoto Satoko, Sugawara Yo, Tanaka Ikumo, Matsui Tomoya, Nishio Hiroshi, Nakamura Masaru, Katoh Yuki, Mori Seiichiro, Kukimoto Iwao, Aoki Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Transcription Factor Homeobox D9 Drives the Malignant Phenotype of HPV18-Positive Cervical Cancer Cells via Binding to the Viral Early Promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4613 ~ 4613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13184613	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今川 遼太郎, 岩田 卓, 陳 冠良, 西尾 浩, 仲村 勝, 林 茂徳, 森定 徹, 阿部 大誠, 加藤 侑希, 松下 麻衣子, 青木 大輔
2. 発表標題 転写因子HOXD9はP105プロモーターに結合することで、HPV18型陽性の子宮頸がんの悪性形質に関与する
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

〔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	岩田 卓  (Iwata Takashi)  (30296652)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師   (32612)	
研究分担者	加藤 侑希  (Yuki Kato)  (60733649)	日本大学・医学部・助教   (32665)	

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