

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461959

研究課題名(和文) 乳癌におけるベバシズマブの新しい作用機序に基づいた効果予測因子の検証

研究課題名(英文) HOXB9 expression in breast cancer predicts efficacy of bevacizumab treatment

研究代表者

林田 哲 (Tetsu, Hayashida)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80327543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乳癌における血管新生阻害薬であるベバシズマブの治療とEMTおよび血管新生促進因子であるHOXB9発現と機能解析を通じて、HOXB9が乳癌の進展とベバシズマブに与える役割を明らかにすることを目的とした。HOXB9は乳癌の悪性化に寄与し、HOXB9高発現腫瘍では血管新生阻害により著明な腫瘍抑制効果を示した。すでに先行研究から、大腸癌においてIL-6が腫瘍微小環境における重要な因子であることが示唆されているが、本研究の結果からHOXB9やIL-6が乳癌患者においても血管新生治療における新たなバイオマーカーとして治療法の適切な選択の一助になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Homeobox B9 (HOXB9), a transcriptional factor, regulates developmental processes and tumor progression and has recently been recognized as a strong angiogenic factor in breast cancer progression. This study aimed to investigate the role of HOXB9 in tumorigenesis and angiogenesis. Bevacizumab, an anti-VEGF antibody, remarkably suppressed tumor proliferation by inhibiting angiogenesis in HOXB9-overexpressing xenografts. HOXB9 promotes the secretion of angiogenic factors, including VEGF, to induce tumor proliferation through microenvironmental communication via IL6 signaling; moreover, silencing of VEGF or IL6 terminates microenvironmental crosstalk. Thus, HOXB9 and IL6 may be surrogate markers for bevacizumab treatment in breast cancer.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 ベバシズマブ 血管新生 HOXB9

1. 研究開始当初の背景

抗 VEGF 抗体であるペバシズマブは血管新生阻害薬であり、乳癌に対する大規模臨床試験においてその有効性を示し (E2100・AVADO・RIBBON1)、進行再発乳癌に対する標準治療の一つと考えられている。しかしながら、無増悪生存期間 (PFS) の延長を認めるが、全生存率の改善が認められず、FDA の承認が取り消されるなど、いまだ乳癌における評価が定まっていない。大腸癌に対する大規模臨床試験においても、その有効性が示され (Hurwitz, NEJM. 2004)、進行再発大腸癌に対する標準治療の一つと考えられている。しかしながら実際には、一部の症例では期待されたほどの生存期間の延長が得られない症例が認められ (Kerbel, NEJM. 2008)、高額な薬価や患者の時間的制約などからも、ペバシズマブの投与により恩恵を受ける症例・サブタイプを、よりの確に選別し、正確な適用を図ることが求められているが、現時点で治療効果の予測因子は実用化されていない。薬剤による効果の有無を予測するためには、効果発現メカニズムの解明が不可欠であるが、ペバシズマブにおいては、1) 腫瘍周囲血管新生を抑制することで、腫瘍増大に不可欠な栄養・酸素供給を遮断する、2) ペリサイトが欠損した脆弱で透過性の高い腫瘍血管を「正常化 (normalization)」することで併用抗癌剤の腫瘍組織中濃度を上昇させる、ことが効果発現機序として提唱され、多くの基礎研究で実証されている。これに加えて我々は、第 3 の機序として、「血管内皮・繊維芽細胞等による微小環境の形成と癌細胞の増殖の間にポジティブフィードバックが存在し、ペバシズマブはこれを効率的に阻害することで、腫瘍縮小を誘導する」という新たな効果発現メカニズムを提唱している。本仮説を提唱するに至った過程としてこれまでに以下の実験を行ってきた。転写因子 HOXB9 を固形癌細胞に高発現させることで、新生血管に富んだ、増大速度の極めて早い腫瘍が形成されることを、マウス異種移植モデルを用いて確認した。 (Hayashida, PNAS 2010) また、HOXB9 高発現大腸癌細胞株では、同様の腫瘍増大を認めるが、ペバシズマブにより腫瘍の著明な縮小を認める、ペバシズマブ高感受性腫瘍を形成することを報告した。 (Hoshino, Mol Cancer 2014) この劇的な腫瘍縮小効果は大腸癌・乳癌を問わず、細胞株に依存しない普遍的な現象であったことから、*in vitro* における癌細胞と血管内皮・繊維芽細胞の共培養システムを構築して、ペバシズマブによる腫瘍縮小メカニズムを検証したところ、以下の現象を確認した。

- (1) HOXB9 誘導により固形癌細胞から VEGF を含む血管新生促進因子の分泌が亢進する
- (2) HOXB9 発現により、腫瘍細胞単体では

増殖速度は低下するにも関わらず、共培養下では増殖速度は著明に促進される。また、この増殖はペバシズマブにより効率的に阻害される

(3) VEGF により刺激された血管内皮・繊維芽細胞から、何らかの増殖促進因子 (Factor X) が分泌し、腫瘍増殖に寄与すると考えられた。さらに、その候補因子 (後述) の中和抗体を用いたところ、著明な増殖抑制が認められた。

間質が分泌を行う増殖因子の同定には、共培養を行った培養上清をサンプルとして、増殖に働くサイトカイン・ケモカインを中心に、multiplex 技術を用いて多種類を網羅的に解析した。その結果 HOXB9 発現下では IL-6 および HGF の有意な増加を認め、その後に行った ELISA での検証では、IL-6 がこの系における増殖促進因子として最も有力である可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

前述のように、乳癌における分子標的療法は HER2 をはじめとして効果予測因子が確立され、日常臨床で頻用されているが、ペバシズマブには実用化されたマーカーを認めない。我々は転写因子 HOXB9 が腫瘍血管新生を強力に誘導し増大に寄与することを示したが、乳癌・大腸癌等の固形癌細胞への導入では、増大速度が速く、血管新生阻害薬に対して感受性が高い腫瘍が形成された。この検討から、癌微小環境における間質と癌細胞の相互作用による、細胞増殖のためのポジティブフィードバックが存在し、ペバシズマブはこれを効率的に遮断することで、劇的な腫瘍縮小効果を発現するという新しい作用機序を仮説とした。既に網羅的解析からこの相関に深く関わる因子として IL-6 を同定し、本課題ではこれら因子の基礎的・臨床的検討から、効果予測因子としての有用性を示し実用化を図ることを本研究の目的とする。この目的を達成するために、以下の事項を検討することとした。

- (1) HOXB9 発現乳癌細胞において IL-6 が間質から放出され、増殖に必須であることを *in vitro*, *in vivo* の両者において検証
- (2) ペバシズマブの投与による著明な腫瘍増殖抑制が IL-6 の制御によることを検証
- (3) マウス異種移植モデルおよび乳癌臨床検体における HOXB9 発現と IL-6 の発現の検討と臨床病理学的因子・予後の関係の検証

現時点でポジティブフィードバックに関わる「Factor X」はこれまでの

検討から IL-6 が最有力候補であるが、サイトカイン・ケモカイン以外の因子も候補とし、網羅的解析を施行

トラスツズマブ・ラパチニブに対する HER2 や、セツキシマブに対する K-RAS 変異など、分子標的療法はその効果発現メカニズムに即した効果予測因子が確立され、日常臨床に活用されているが、ペバシズマブはわずかに

図 2. ペバシズマブ添加により VEGF は抑制

VEGF-A が臨床試験において検証が進んでいるのみであり、他に有力な候補は認めない。我々は独自のペバシズマブ高感受性腫瘍モデルを確立し、これを検証することで新たな効果発現メカニズムと、予後予測因子の候補を同定した。実際に進行再発大腸癌にペバシズマブを用いた患者検体の検証により、HOXB9 高発現患者群では驚くべきことに全生存率を有意に延長することを我々は示している。今後基礎的な検証を HOXB9 および IL-6 において進め、最終的には前向き臨床試験につなげることで、予後因子としての臨床での有用性を確立することは、患者が受ける利益の面から極めて意義深い目的であると考えられた。

3. 研究の方法

既に確立されたペバシズマブ高感受性腫瘍を用いて、微小環境を擬似的に再現した *in vitro* の環境で基礎的な知見を得ると同時に、*in vivo* におけるこれら結果の傍証を得ることを目的とする。特に IL-6 はサイトカインであり、血液検査でも測定可能であるため、ペバシズマブの効果予測因子としての有用性をこの段階で詳細に検証する。我々のモデルを繰り返し用いることで、IL-6 以外に間質から分泌されるもしくは、分泌が抑制される因子の推定が可能であり、方法を検討して網羅的解析を行う。

既に我々は乳癌細胞株と血管内皮細胞・繊維芽細胞の共培養システムにより、擬似的に生体内の腫瘍-間質の相互作用を検証するための実験系を構築している。また乳癌細胞株 MDA-MB468 (Triple Negative) は野生株では HOXB9 発現を認めないため、HOXB9 高発現株を構築済みである。仮説に述べたポジティブフィードバックが存在し、ペバシズマブにより、これが遮断されること。また、IL-6 が深くこの現象にかかわっていることを示すために以下の実験を行う。

癌細胞のみの単培養および間質細胞との共培養の両環境で、HOXB9 発現により VEGF および IL-6 の培養上清における発現を ELISA にて検証

HOXB9 発現による癌細胞株の増殖を単培養・共培養下で検証

ペバシズマブ投与により培養上清中の濃度および細胞増殖能が変化するかを検証

IL-6 の中和抗体の投与により、上清中の IL-6 濃度と細胞増殖能を検討

IL-6 の分泌が癌細胞もしくは間質細胞のどちらに由来するかを検証

これらの検証を乳癌細胞株を用いて行うと同時に、ソラフェニブなどの他の血管新生阻害剤においても同様の現象が確認できるかを検討しその普遍性を示す

4. 研究成果

HOXB9 高発現株を用いた検証では、HOXB9

図 4. HOXB9 高発現大腸癌は予後不良である

発現誘導により乳癌細胞株 MDA-MB468 (Triple Negative) において、血管新生促進に因子である bFGF, VEGF, IL-8 が高発現を認め、shHOXB9 による HOXB9 ノックダウンを施行したところ、これら血管新生促進因子は発現の抑制が認められた。さらに培養上清中蛋白を ELISA 法により測定したところ、HOXB9 発現により IL-8 および VEGF 濃度の上昇を認めた。

また、HUVEC を共培養した系において、HOXB9 発現大腸癌細胞は tubular formation を促進し、これは前述の VEGF や IL-8 の増加により生じると考えられた。

これらの結果から、HOXB9 発現乳癌細胞と、HUVEC などの間質細胞の間に相互作用が存在すると考え、共培養における培養上清を、Luminex システムを用いて網羅的にサイトカイン発現解析を行ったところ、bFGF, G-CSF, HGF, IL-6, TGF- α , TGF- β の含有量が、HOXB9 高発現細胞株において有意に上昇していることが認められた。

この結果を ELISA 法で再検証を行ったところ、IL-6 が極めて大きな差を持って、HOXB9 発現と相関を認めた。IL-6 は乳癌細胞の増殖を促進することが報告されているため、この結果から、IL-6 が間質細胞から発現され、細胞増殖を誘導するポジティブフィードバックが存在することが示唆された。

次に、共培養下においてペバシズマブを添加したところ、培養上清中の VEGF 分泌量は HOXB9 陽性 MDA-MB468 細胞との共培養により増加したが、ペバシズマブの投与により著明な抑制が認められた。さらに、ペバシズマブの投与により共培養下においては細胞の増殖抑制が認められた。また、同様に共培養下においては IL-6 の中和抗体により著明に細胞増殖が抑制されることが示された。

すなわち、VEGF により刺激された血管内皮・

繊維芽細胞から、増殖促進因子である IL-6 が分泌され、腫瘍増殖に寄与する。これがペバシズマブの投与によって効率的に阻害されていると考えられた。

本研究成果をまとめると、HOXB9 陽性 MDA-MB468 細胞から VEGF を含む血管新生促進因子が著明に分泌され、活性化された間質細胞との間にポジティブフィードバックを形成することで、細胞増殖を促進したが、ペバシズマブはこれを遮断することで、効率的に細胞増殖抑制を行っていることを確認した。HOXB9 は乳癌の悪性化に寄与し、HOXB9 高発現腫瘍では血管新生阻害により著明な腫瘍抑制効果を示した。本研究によって IL-6 が腫瘍微小環境における重要な因子であることが示唆され、今後さらなる研究を進めることで、HOXB9 や IL-6 が乳癌患者に対する血管新生治療における新たなバイオマーカーとして治療法の適切な選択や、治療効果予測の一助になると考えられた。

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 1 件)

1) Yoshinori Hoshino, Tetsu Hayashida, Akira Hirata, Hidena Takahashi, Naokazu Chiba, Mitsuyo Ohmura, Masatoshi Wakui, Hironitsu Jinno, Hirotoshi Hasegawa, Shyamala Maheswaran, Makoto Suematsu, Yuko Kitagawa, Bevacizumab terminates homeobox B9-induced tumor proliferation by silencing microenvironmental communication. Mol Cancer. 2014 May 5;13(1):102.doi:10.1186/1476-4598-13-10
2. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林田 哲 (Tetsu Hayashida)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：80327543

(2) 研究分担者

高橋 麻衣子 (Maiko Takahashi)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50348661

神野 浩光 (Hiromitsu Jinno)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：20216261

関 朋子 (Tomoko Seki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70528900