

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861103

研究課題名(和文)胃癌浸潤転移におけるHOXB9の役割の解明

研究課題名(英文) Experimental and clinicopathological analysis of HOXB9 in gastric cancer

研究代表者

加藤 文彦(Kato, Fumihiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90573428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HOXB9がいくつかの腫瘍の悪性度と相関すると近年報告されている。今回の研究では胃癌切除検体69例のHOXB9発現を免疫染色法にて評価し、予後および免疫組織学的因子との関係を検討した。結果、HOXB9陽性群では腫瘍深達度、リンパ節転移、リンパ管浸潤、静脈浸潤が優位に多く、全生存率が悪い傾向があった。さらに、胃癌細胞株TMK-1においてHOXB9発現亢進によるリンパ管新生マーカーの発現の変化を調べた。結果、HOXB9高発現細胞株ではマーカーの一つであるVEGF-D発現が亢進していた。HOXB9発現は胃癌において、リンパ管新生さらにはリンパ節転移を導き、予後を増悪させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relationship between HOXB9 expression and tumor malignancy was recognized recently. In this study, HOXB9 positivity was evaluated immunohistologically in resected tumor tissue from 69 gastric cancer patients, and the association between prognosis and clinicopathologic factors was determined. The HOXB9 gene was also overexpressed in human gastric cancer TMK-1 cells and the effect on the expression of VEGF-C, VEGF-D, and VEGFR-3 determined. We found that the depth of tumor invasion, the number of node metastases, lymphatic invasion, and vascular invasion were significantly associated with HOXB9 positivity. Overall survival was decreased in HOXB9-positive patients. The expression of VEGF-D mRNA was increased in HOXB9 overexpressing TMK-1 relative to control cells. In conclusion, HOXB9 positivity correlated with gastric cancer progression and lymphangiogenesis marker expression. HOXB9 was likely to associate with lymphogenic metastasis.

研究分野：上部消化管外科

キーワード：胃癌 HOXB9 バイオマーカー リンパ管新生 VEGF-D

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) とは、上皮細胞がなんらかの刺激を受けることで間葉系の細胞の性質を獲得する現象である。細胞間の接着は弱まり、丸かった細胞は紡錘形になり、細胞の移動能が上がる。それに伴い、細胞は E-cadherin といった上皮性のマーカーを喪失し、N-cadherin や vimentin といった間葉系のマーカーを獲得するようになる。EMT によって癌細胞は移動性が増し周囲の間質に浸潤しやすくなるとされ、近年注目されている。EMT を誘導する EMT inducer として TGF- β が広く知られており、癌の浸潤・転移に関わる分子と考えられている。

転写因子 HOXB9 はヒトゲノム上に 39 種存在する HOX 遺伝子ファミリーの一つである。これらは共通の配列である 61 アミノ酸からなる homeobox モチーフを持ち、4 本の染色体上にクラスターを形成して存在している (Garcia-Fernandez et al., Nat Rev Genet, 2005)。HOX 遺伝子群は胎生期における器官形成時の分化に重要な役割を演じているが、腫瘍の発生・進展に深く関わっていることが近年多数報告されている。我々のグループでは HOXB9 の EMT inducer としての性質に注目し、悪性腫瘍との関係についての研究を行ってきた。ヒト乳癌細胞株において HOXB9 発現は EMT を誘導し、癌細胞の遊走能と浸潤能を亢進し、血管新生をもたらす。さらに、In vivo では HOXB9 発現により腫瘍の増大、肺転移が導かれ、形成腫瘍の血管新生も亢進していることが示された。乳癌臨床検体においては、HOXB9 高発現群は血管新生が亢進しており、有意に予後が悪かった。

一方で、胃癌と HOXB9 に関しては多くは明らかにされていない。胃癌のリンパ節転移は、転移過程において最も早期に観察され予後を決する重要な因子である。胃癌の浸潤・転移を考える上で、リンパ行性の転移をもたらすリンパ管新生は重要な要素であると考えられる。

2. 研究の目的

以上の知見より、我々は以下の仮説を導いた。

胃癌において HOXB9 発現は EMT を導き、腫瘍の発育・浸潤・転移をもたらすのではないかと？

HOXB9 は胃癌に対し血管新生、さらにはリンパ管新生を亢進させるのではないかと？

胃癌臨床検体において、HOXB9 発現は臨床病理学的結果と相関するのではないかと？

上記を明らかにし、さらには胃癌における血管新生阻害・リンパ管新生阻害を機序とした抗転移薬の開発を目指し、今回の研究を着想するに至った。

3. 研究の方法

(1)- 当院における胃癌切除検体 69 例を用いて HOXB9 の発現の確認を免疫染色にて行った。HOXB9 陽性群と陰性群で、進行度・組織型・リンパ管浸潤・静脈浸潤・予後などの項目につき、臨床病理学的患者比較を行った。

さらにリンパ管マーカーである D2-40 を用いて胃癌臨床検体のリンパ管濃度を免疫染色にて評価し、HOXB9 陰性群と陽性群での比較を行った。

(2)- 我々が保有する胃癌細胞株胃癌培養株 5 種 (TMK-1, MKN-28, MKN-45, MKN-74, KATO) の HOXB9 発現を定量的 PCR 法にて比較解析した。そこで最も HOXB9 が低発現であった TMK-1 に対し、ウイルスベクターを用いて HOXB9 を高発現させた TMK-1/HOXB9 とコントロール株である TMK-1/LacZ を作成した。

この細胞株を用いて HOXB9 による EMT の誘導を評価した。具体的には定量的 PCR 法にて EMT マーカーである E Cadherin, N Cadherin, Vimentin, Snail, Slug, Twist の発現量の変化を解析した。さらには増殖能・遊走能・浸潤能の変化を検討した。具体的には MTT Assay, Scratch Assay, Invasion Assay を行った。

HOXB9 誘導による血管新生およびリンパ管新生を検討した。具体的には、血管新生マーカー (VEGF-A, bFGF, IL-8, ANGPTL2, TGF- β 1, TGF- β 2) ・リンパ管新生マーカー (VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3) の比較を PCR 法にて行った。

(3) Tet on System にて作成した胃癌細胞株 TMK-1/TR/HOXB9 を免疫不全マウスの背部に移植した Xenograft モデルを作成した。この細胞はテトラサイクリン経口投与にて、In vitro にても HOXB9 発現調節が可能である。本実験にて HOXB9 発現による継時的な腫瘍径と重量の増大を比較解析した。

4. 研究成果

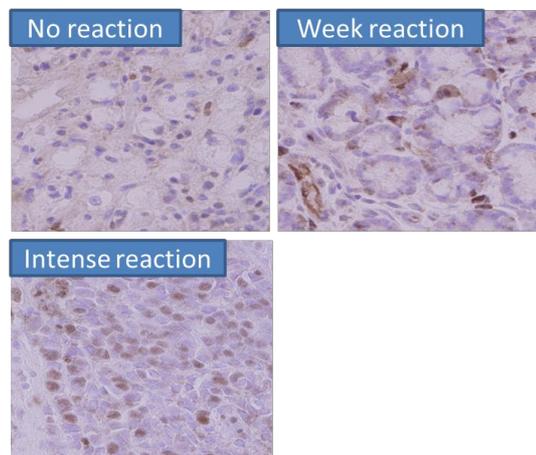


図1. HOXB9による胃癌臨床検体染色

範囲	Points	反応の強度	Points
< 33% positive	0	No reaction	0
33-66% positive	1	Weak reaction	1
> 66% positive	2	Intense reaction	2

0-1 points = HOXB9 陰性, 2-4 points = HOXB9 陽性

図2. HOXB9判定スコアリング

Characteristics	症例数	HOXB9		P値
		陰性	陽性	
男	51	23	28	0.78
女	18	7	11	
年齢				0.23
< 60	35	18	17	
≥ 60	34	12	22	
腫瘍深達度				0.012*
T1-2	25	16	9	
T3-4	44	14	30	
リンパ節転移				0.007*
陰性	30	19	11	
陽性	39	11	28	
リンパ管浸潤				0.003*
陰性	19	14	5	
陽性	50	16	34	
静脈浸潤				0.017*
陰性	21	14	7	
陽性	48	16	32	

図3. HOXB9と臨床病理学的因子

(1)- HOXB9 を免疫染色し、染色強度と染色範囲でスコアリングし陰性か陽性かを判定した(図1、図2)。胃癌切除検体 69 例のうち、HOXB9 陰性は 30 例、陽性は 39 例と陽性率は 56.5%であった。

HOXB9 陽性群では腫瘍深達度が深く(p=0.012)、リンパ節転移陽性例が有意に多かった(p=0.007)。さらに、リンパ管浸潤(p=0.003)および静脈浸潤(p=0.017)も有意に多いという結果であった(図3)。HOXB9 は胃癌の悪性度と相関しているものと考えられた。

さらに予後に関しても解析した(図4)。HOXB9 陽性の胃癌は有意に全生存率が低いという結果が得られた。HOXB9 は胃癌の予後規定因子であった。

(1)- 我々の保有している胃癌検体は主に病理学的診断の前に腫瘍から採取した癌組織の薄片であった。リンパ管は主に粘膜下組織に存在するため、我々の検体では評価困難であった。臨床検体におけるリンパ管新生の評価は断念した。

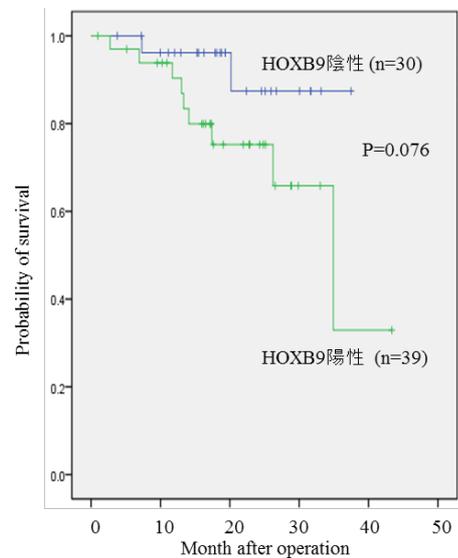


図4. HOXB9と胃癌術後全生存率

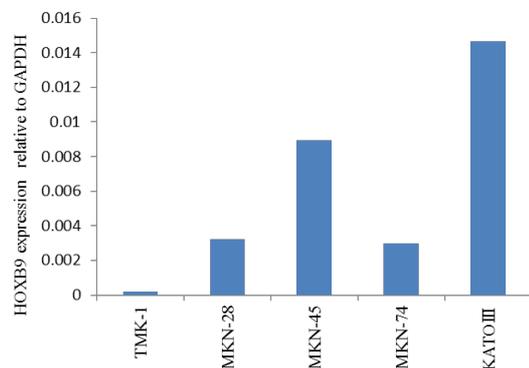


図5. 胃癌野生株におけるHOXB9発現の比較(定量的PCR)

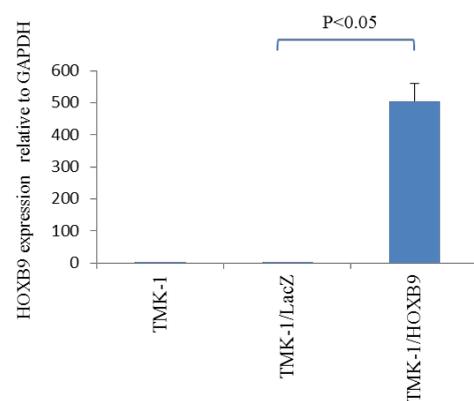


図6. HOXB9発現調整

(2)- HOXB9 低発現胃癌野生株である TMK-1 に対し、HOXB9 発現調整を行い、定量的 PCR 法により Transfectant の mRNA が首尾よく亢進していることを確認した。

TMK-1/HOXB9 とそのコントロールとの比較実験において、EMT マーカーの変化は確認できなかった。また、MTT Assay、Scratch Assay、Invasion Assay においても明らかな差は確認されなかった。

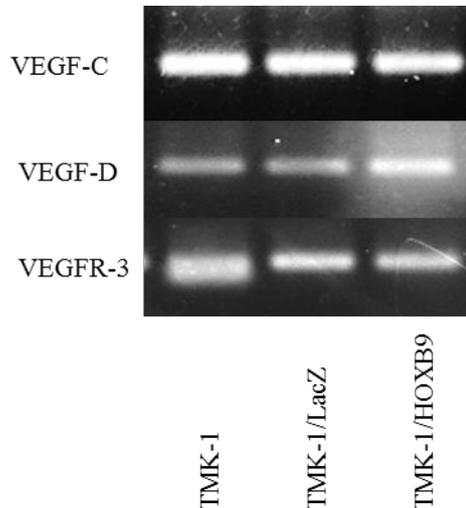


図7. リンパ管新生マーカー発現比較

TMK-1/HOXB9 とそのコントロールとの比較実験において、各種血管新生マーカーの mRNA 発現の変化は確認できなかった。一方で、リンパ管新生マーカーである VEGF-D の mRNA 発現量が TMK-1/HOXB9 で亢進していることが PCR 法により確認された(図7)。

(3)マウス Xenograft モデルにおいて、HOXB9 高発現腫瘍とコントロールの間には、腫瘍径および腫瘍重量に関して有意な差は観察されなかった。

今回の実験において、HOXB9 発現は胃癌において悪性度と正の相関があり、予後不良因子であることが判明した。仮説で考えた EMT の誘導や血管新生の亢進については今回の一連の実験では示されなかった。しかし、HOXB9 がリンパ管新生を導く可能性について示された。HOXB9 発現がリンパ管新生を導き、リンパ節転移が起こることにより予後が増悪している可能性が示唆された。HOXB9 は、胃癌の制御における、新しいターゲットバイオマーカーとしてさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

加藤文彦、HOXB9 expression and cancer progression. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference; The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. 2013年12月16日~18日、東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県浦安市)

加藤文彦、胃癌における HOXB9 発現とリンパ管新生、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者
加藤 文彦 (KATO, Fumihiko)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90573428

(2)研究分担者
該当者なし

(3)連携研究者
該当者なし

(4)研究協力者
和田 則仁 (WADA, Norihito)
慶應義塾大学・医学部・講師

林田 哲 (HAYASHIDA, Tetsu)
慶應義塾大学・医学部・助教

北川 雄光 (KITAGAWA, Yuko)
慶應義塾大学・医学部・教授