

Title	大腸癌に対する血管新生阻害剤の新規作用機序の解明とこれに基づく効果予測法の開発
Sub Title	Bevacizumab terminates HOXB9 induced tumor proliferation
Author	北川, 雄光(Kitagawa, Yuko) 長谷川, 博俊(Hasegawa, Hirotochi) 林田, 哲(Hayashida, Tetsu) 岡林, 剛史(Okabayashi, Koji)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>大腸癌では抗VEGF抗体である血管新生阻害薬であるベバシズマブが登場し、臨床応用されている。本研究は大腸癌におけるHOXB9発現と機能解析を通じて、HOXB9が大腸癌の進展に与える役割を検討し、血管新生阻害薬であるベバシズマブの治療との関連を明らかにすることを目的とした。HOXB9は大腸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、HOXB9やIL-6が大腸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の一助になると考えられた。</p> <p>Homeobox B9 (HOXB9), a transcriptional factor, regulates developmental processes and tumor progression and has recently been recognized as a strong angiogenic factor. 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, and it improved overall survival and provided prolonged progression-free survival in HOXB9-overexpressing patients. 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.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(B)(一般) 研究期間：2013～2015 課題番号：25293292 研究分野：外科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25293292seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25293292seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293292

研究課題名(和文) 大腸癌に対する血管新生阻害剤の新規作用機序の解明とこれに基づく効果予測法の開発

研究課題名(英文) Bevacizumab terminates HOXB9 induced tumor proliferation

## 研究代表者

北川 雄光 (Kitagawa, Yuko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20204878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌では抗VEGF抗体である血管新生阻害薬であるベバシズマブが登場し、臨床応用されている。本研究は大腸癌におけるHOXB9発現と機能解析を通じて、HOXB9が大腸癌の進展に与える役割を検討し、血管新生阻害薬であるベバシズマブの治療との関連を明らかにすることを目的とした。HOXB9は大腸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、HOXB9やIL-6が大腸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. 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, and it improved overall survival and provided prolonged progression-free survival in HOXB9-overexpressing patients. 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.

研究分野：外科学

キーワード：大腸癌 HOXB9 ベバシズマブ 血管新生 インターロイキン6

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の学術的背景

抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは血管新生阻害薬であり、大腸癌に対する大規模臨床試験においてその有効性を示し(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、ベバシズマブより恩恵を受ける症例を、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、ベバシズマブにおいては、以下の事例が効果発現機序として提唱されている。

(2) 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  
(3) 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

これに加えて我々は、「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、ベ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仮説として検討するに至った。

我々は転写因子 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、ベバシズマブにより腫瘍の著明な縮小を認める、ベバシズマブ高感受性腫瘍を形成することを確認した。この劇的な腫瘍縮小効果は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、ベ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。

HOXB9 誘導により大腸癌細胞から VEGF を含む血管新生促進因子の分泌が亢進する。

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、この増殖はベバシズマブにより効率的に阻害される。

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

本研究課題では、研究背景で述べられた仮説を実証すると同時に、ポジティブフィードバックに関わる HOXB9・IL-6 などの各種因子が、臨床におけるベバシズマブの効果予測を行う上で有用か否かの基礎的検討を十分にを行い、臨床試験の実施を最終的な目的として想起された。以下に研究目的の概要を記載する。

分子標的療法はその効果発現メカニズムに基づく予測因子が確立され、臨床応用されるケースを認めるが、ベ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、大腸癌細胞への導入では、増大速度が速く、ベバシズマブに対して感受性が高い腫瘍を形成した。このベバシズマブ高感受性腫瘍を用いた検討から、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、ベ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目的とした。

この目的を達成するために、予定した研究は以下の通りである。

- (1) HOXB9 発現大腸癌において 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) ベ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大腸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
  - (4) 現時点でポジティブフィードバックに関わる「Factor X」は 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
  - (5) HOXB9 および IL-6 の発現と奏功を副次目的とした臨床試験のコンセプトシートおよびプロトコルの作成
- まずは基礎的な検証を HOXB9 および IL-6

において進め、最終的には前向き臨床試験を行うことで、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と考えられる。このように、本研究は基礎研究と臨床を繋ぐトランスレーショナルリサーチとしても、非常に有益性の高い研究課題と考えられた。

### 3. 研究の方法

本研究課題における仮説は前実験の結果より導き出されたものであり、既に確立されたベ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した。

#### (1) 癌細胞-間質におけるポジティブフィードバックとベバシズマブとの関係の検証

大腸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用いて研究を遂行した。大腸癌細胞株 HT29 と HCT116 は野生株では HOXB9 発現を認めないため、テトラサイクリン誘導システムを用いた HOXB9 高発現株の構築を行った。これら手法を用いて仮説に述べたポジティブフィードバックが存在し、ベバシズマブにより、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った。

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

ベ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

#### (2) 癌細胞との相互作用により間質から分泌される因子のさらなる検索

共培養下における HOXB9 の発現の有無により、細胞増殖に関わるサイトカイン・ケモカインの中で培養上清中の濃度が増減するものを網羅的に検討した結果、IL-6 が HOXB9 発現時に著明な濃度上昇を認めたため、癌細胞との相互作用により間質から分泌される因子の候補とした。このスクリーニングには multiplex 技術を用いて、複数のタンパク質濃度を一度に網羅的に測定することが可能であり、サイトカイン・ケモカインに限定せず、細胞増殖促進因子をさらに選別して測定した。候補となる因子は全て ELISA により、

癌細胞のみの単培養および間質細胞との共培養下の二つの条件下における培養上清中の濃度を再検した。

#### (3) 臨床検体における HOXB9 および IL-6 発現の検討

進行再発大腸癌に対してベバシズマブを使用した患者 39 例の凍結検体から mRNA を抽出し、HOXB9 発現と予後の相関を解析し、無増悪生存率・全生存率の両者において相関が認められるかを検討した。さらに、IL-6 についても定量 PCR を行い、HOXB9 発現と相関を認めるか否かを検証した。我々の仮説が正しければ、HOXB9 高発現大腸癌では IL-6 発現が上昇することが予想される。

### 4. 研究成果

#### (1) 癌細胞-間質におけるポジティブフィードバックとベバシズマブとの関係の検証

テトラサイクリン誘導システムを用いた HOXB9 高発現株を用いた検証では、HOXB9 発現誘導により大腸癌細胞 HT29 および HCT116 の両者において、血管新生促進因子である bFGF, VEGF, IL-8, AREG, ERG が高発現を認め、WiDr および SW480 に対する 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 発現大腸癌細胞と、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- $\alpha$ , TGF- $\beta$  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。(図1)

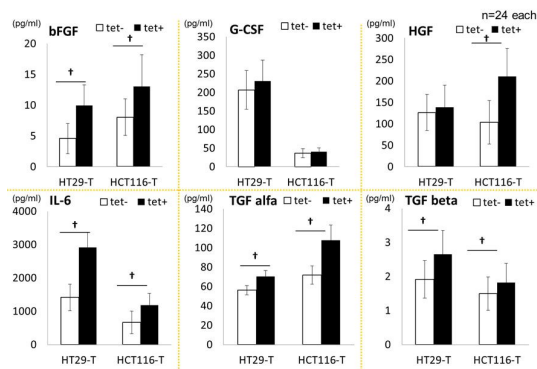


図1. HOXB9 高発現と培養上清中の各種サイトカイン濃度

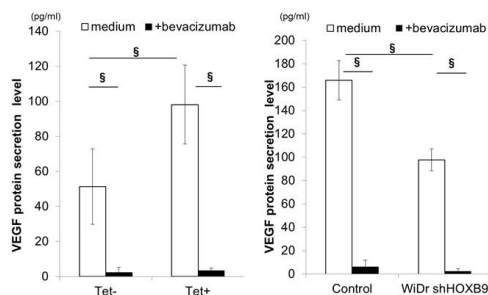


図 2. ベバシズマブ添加により VEGF は抑制

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 は大腸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、共培養下においてベ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 陽性大腸癌細胞との共培養により増加したが、ベバシズマブの投与により著明な抑制が認められた。(図 2) さらに、ベ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。これがベ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。

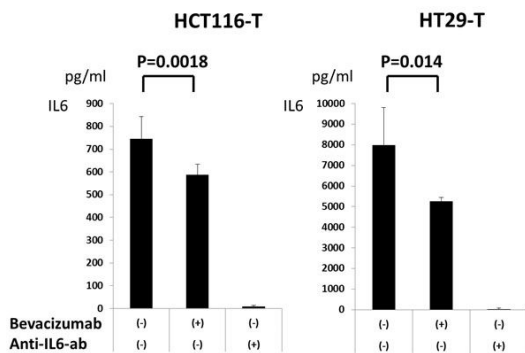


図 3. ベバシズマブ添加により IL-6 は抑制される

実際に、IL-6 の培養上清中の濃度は、ベバシズマブの添加によって有意に減少し、当然 IL-6 中和抗体によっても著明に抑制される。(図 4) これらの結果から、HOXB9 高発現大腸癌細胞と間質の間にはポジティブフィードバックが存在し、ベバシズマブにより、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ことができたと考えられた。

## (2) 臨床検体における HOXB9 および IL-6 発現の検討

大腸癌臨床凍結検体約 70 例を用いた定量 RT-PCR による HOXB9 発現解析を行ったところ、約 67%の大腸癌において癌部で HOXB9 の高発現を認め、特に低分化型大腸癌、及び肝転移症例において有意に HOXB9 が高発現していた。3 年無病生存期間および全生存期間は HOXB9 高発現群で予後不良であった。(図 4)

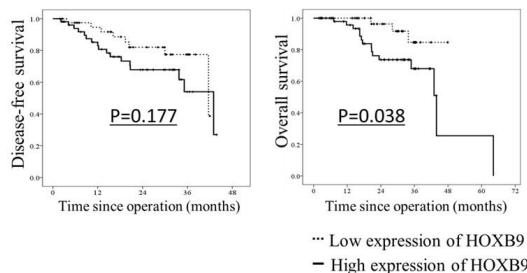


図 4. HOXB9 高発現大腸癌は予後不良である

今回の結果を受け、我々は IL-6 についても定量 PCR を行い、HOXB9 発現と相関を認めるか否かを検証した。その結果、患者検体における IL-6 の正常部と癌部の発現の増大量は HOXB9 高発現群において IL-6 発現量が高く、仮説を裏付ける結果であった。

本研究成果をまとめると、HOXB9 陽性大腸癌細胞から 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、大腸癌細胞増殖を促進したが、ベ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 は乳癌と同様に大腸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 が大腸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

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Aiko Nagayama, Tetsu Hayashida, Hiromitsu Jinno, Maiko Takahashi, Tomoko Seki, Akiko Matsumoto, Takeshi Murata, Hutan Ashrafian, Thanos Athanasiou, Koji Okabayashi, and Yuko Kitagawa, Comparative effectiveness of neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer: A network meta-analysis. J Natl Cancer Inst. (2014) 106 (9): dju203. doi: 10.1093/jnci/dju203 査読あり

2) Zhussupova A, Hayashida T, Takahashi M, Miyao K, Okazaki H, Jinno H, Kitagawa Y. An E2F1-HOXB9 Transcriptional Circuit Is Associated with Breast Cancer Progression. PLoS One. 2014 Aug 19;9(8):e105285. doi: 10.1371/journal.pone. 0105285. 査読あり

3) Takahashi M, Hayashida T, Okazaki H, Miyao K, Jinno H, Kitagawa Y. Loss of B-cell Translocation Gene 2 expression in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Predicts Tamoxifen Resistance. Cancer Sci. 2014 Jun;105(6):675-82. doi: 10.1111/cas.12410. 査読あり

4) Yoshinori Hoshino, Tetsu Hayashida, Akira Hirata, Hidena Takahashi, Naokazu Chiba, Mitsuyo Ohmura, Masatoshi Wakui, Hiromitsu Jinno, Hirotooshi 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: 10.1186/1476-4598-13-102. 査読あり

5) Kohei Shigeta, Tetsu Hayashida, Yoshinori Hoshino, Koji Okabayashi, Takashi Endo, Yoshiyuki Ishii, Hirotooshi Hasegawa, Yuko Kitagawa. Expression of epidermal growth factor receptor detected by cetuximab indicates its efficacy to inhibit in vitro and in vivo proliferation of colorectal cancer cells, PLoS ONE 2013, 8(6): e66302 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 林田 哲、EMT および血管新生を誘導する転写因子 HOXB9 を通じたトランスレショナルリサーチの実践、第 21 回日本乳癌学会学術総会、2013 年 6 月 27 日～29 日、浜松アクトシティ(静岡県浜松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 雄光(Yuko Kitagawa)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20204878

(2)研究分担者

長谷川 博俊(Hirotooshi Hasegawa)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00218455

林田 哲(Tetsu Hayashida)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327543

岡林 剛史(Koji Okabayashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00338063

(3)連携研究者

なし