

Title	HOXB9と血管新生因子耐性機構『evasive resistance』の関係
Sub Title	Relationship between transcriptional factor HOXB9 and evasive resistance in colorectal cancer
Author	星野, 好則(Hoshino, Yoshinori)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	大腸癌細胞株における転写因子HOXB9発現誘導により、TGFβ経路の活性化及びVEGFをはじめとする血管新生因子の発現亢進が確認された。in vivoマウス異種移植モデルにおいて、HOXB9強制発現群は微小環境における新生血管の増生によって腫瘍増大速度が著明に亢進し、HOXB9強制発現群では対照群に比してbevacizumab治療効果が有意に高かった。転写因子HOXB9はbevacizumab治療効果を示すバイオマーカーとなりえることが示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2011 課題番号：22791300 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22791300seika

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（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791300

研究課題名（和文） HOXB9 と血管新生因子耐性機構『evasive resistance』の関係

研究課題名（英文） Relationship between transcriptional factor HOXB9 and evasive resistance in colorectal cancer

研究代表者

星野 好則 (HOSHINO YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40464945

研究成果の概要（和文）：大腸癌細胞株における転写因子 HOXB9 発現誘導により、TGF β 経路の活性化及び VEGF をはじめとする血管新生因子の発現亢進が確認された。*in vivo* マウス異種移植モデルにおいて、HOXB9 強制発現群は微小環境における新生血管の増生によって腫瘍増大速度が著明に亢進し、HOXB9 強制発現群では対照群に比して bevacizumab 治療効果が有意に高かった。転写因子 HOXB9 は bevacizumab 治療効果を示すバイオマーカーとなりえることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional factor HOXB9 induced human colon cancer cell lines expressed activation of TGF β pathway and secretion of angiogenic factors including VEGF. In xenograft model of nude mice, HOXB9 overexpressed xenografts showed much rapider growth than control. Moreover, HOXB9 overexpressed xenografts had significantly higher tumor shrinkage rate than control in the treatment of bevacizumab. Thus, transcriptional factor HOXB9 may be a candidate for a biomarker of the treatment of bevacizumab in colorectal cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：HOXB9, 血管新生, bevacizumab

1. 研究開始当初の背景

TGF β は、癌の免疫抑制、転移、血管新生、増殖の制御について、極めて重要な役割を果たしている。また TGF β は Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) と呼ばれる、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象を引き起こす key mediator であることが明らかとなり、TGF β による EMT や血管新生因子の誘レセプターや TGF β の細胞内シグナル伝達因子 Smad の異常が報告されており、TGF β のシグナル伝達は大腸癌においても重

要な役割を示すことが明らかになった。一方で、TGF β は細胞外マトリックスの産生や血管新生などの作用をもつため、EMT、癌化、浸潤・転移を促進し、大腸癌を進行させる因子としても注目を浴びている。

近年、転写因子 HOXB9 が TGF β 経路を介して EMT や血管新生に関与していることが乳癌の分野で明らかとなった。HOXB9 は導がん細胞の浸潤・転移機序を説明しうる因子として注目されている。

また TGF β は大腸癌などにおいては TGF β

Homeobox gene ファミリーの一つであり、染色体 17 番長腕に位置している。HOXB9 は約 250 アミノ酸からなる転写因子であり、胎生期の多細胞生物における分化誘導を行っているが、HOXB9 は癌浸潤・転移に関係すると考えられている EMT に関与するだけでなく、血管新生因子誘導にも関与することが確認されている。癌の進展・発育には栄養供給が不可欠であるが、血管新生はこの栄養供給に密接に関与しているため、血管新生阻害効果を持つ抗 VEGF 抗体 bevacizumab が大腸癌治療において重要な位置づけを占めている。

2. 研究の目的

このように HOXB9 は TGF β 経路を介して癌の浸潤・転移・血管新生などに役割を果たしていると考えられる。しかし、HOXB9 が大腸癌など他の癌において、癌の悪性度や予後に与える影響についての報告は認められない。そこで今回我々は大腸癌での HOXB9 の発現と機能を解析し、HOXB9 の発現が大腸癌細胞にどのような影響を与えるか調べた。今回我々は大腸癌での HOXB9 発現と機能解析を通じて、大腸癌の進展に与える役割を検討した。

3. 研究の方法

○Cell culture

大腸癌細胞株 HT29, HCT116, WiDr, SW480 を用いた。HT29, HCT116 には 10%FBS、5%penicillin /streptomycin を添加した Roswell Park Memorial Institute 培地を用いた。HOXB9 を過剰発現した Cell line の作成には、tetracycline 誘導発現系による HOXB9 Open reading frame (Homo sapiens) を pLenti4 vector へ挿入し、これを用いてレンチウイルス感染細胞株を確立した。WiDr, SW480 には 10%FBS、5%penicillin /streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle (D-MEM 培地) を使い、short hairpin RNA を用いた shHOXB9 の Stable clone を作成した。

○RT-PCR

細胞株をそれぞれ 10cm dish に培養し、これらの細胞から、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。HBSS で細胞を洗浄後、RLT Buffer (RLT: β ME=100:1) を 350 μ l 加え、スクレーパーを用いて QIAshredder spin column に移して 1 分間遠心 (13,000rpm:4 $^{\circ}$ C) した。その後、350 μ l 70% エタノールを加え RNeasy spin column で 15 秒遠心 (10,000rpm, full speed) した。カラムを 700 μ l の Buffer RW1、及び 500 μ l の RPE Buffer で 2 回洗浄 (それぞれ添加後 15 秒遠心 (10,000rpm, full speed)) し、1 分間遠心 (13,000rpm:4 $^{\circ}$ C) した後、30 μ l の RNase-free-water を加え 15 秒遠心

(10,000rpm, full speed) し RNA を抽出した。RNA は、2 μ g を High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて、cDNA を合成した。Buffer 10 μ l, Enzyme 1 μ l, RNA 2 μ g に RNA-free-water を加え 20ml とし、95 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。

qRT-PCR には SYBR Green を用いたインターカレーター法を用いた。primer (50 μ M: 0.3 μ l), SYBR Green (Applied Biosystems, 12.5 μ l), RNase-free-water (11.2 μ l) に、それぞれ cDNA を 1 μ l (100 ng/ μ l) 加えて 96well プレートに注入し、懸濁・遠心後 (4 $^{\circ}$ C:3000rpm)、ABI7300 realtime PCR System (Applied Biosystems) によって、標的遺伝子の発現データを得た。

○MTT assay

Flat bottom 96 穴プレート (Costar) に、培養液で希釈した 1.0×10^4 個/ml の細胞溶液 100 μ l を加えた。1・3・5・7 日間培養した後、30 μ l の試薬 (MTT: コハク酸=1:2) を加え、さらにその約 3 時間後にジメチルスルホキシドを 130 μ l 加えて 20 分間緩やかに攪拌し、LS-PLATE manager (Wako) を使い、550~630nm の波長で吸光度を測定した。

○蛍光免疫染色

HT29, HCT116, SW480, WiDr, は Lab-Tek II Chamber Slide 8 wells (USA Scientific Inc.) に蒔き (3×10^3 個/well)、24 時間後に HT29, HCT116 に tetracycline を加えた。さらに 48 時間後に 5 分間 PBS で 2 度洗浄し、4% パラホルムアルデヒド 200 μ l で 30 分間固定した。10mM glycine-PBS で 5 分間 2 度洗浄した後に、0.1% Triton X100 in PBS (SIGMA) 200 μ l で 10 分間処理し、10mM glycine-PBS で 5 分間 2 度洗浄した後に、3% BSA (Wako) で 30 分間ブロッキングを行った。200 倍希釈 Rabbit 抗 HOXB9 抗体 (Santa Cruz) を添加し、4 $^{\circ}$ C で 24 時間 Incubate した。10mM glycine-PBS で 5 分間 3 度洗浄した後に、蛍光抗体 (FITC conjugated Mouse Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) を暗所で 1 時間反応させた。10mM glycine-PBS で洗浄し、DAPI (Roche) にて対比染色を行い、マリノール封入した。

○病理組織の免疫染色

組織をパラフィン包埋切片にした後、各スライドガラスを、キシレンに 5 分ずつ 3 回、100% エタノールに 3 分ずつ 3 回、90% エタノールに 3 分、80% エタノールに 3 分、70% エタノールに 3 分、流水で 10 分間水洗し、トリス塩酸緩衝液に 3 分の順で浸し、脱パラフィンを行った。次に、熱処理用緩衝液にスライドガラスを浸し、20 分間オートクレーブにかけた後、精製水ですすぎ、洗浄液中に 5

分間浸した。続いて、ENVISION キット (Wako) を用いて、湿潤箱内で切片にブロッッキング試薬を滴下し、10 分間反応させたあと、精製水ですすぎ、洗浄液中に浸した。次に、anti-CD31 antibody (Abcam) を PBS で 100 倍に希釈し、スライドガラスに滴下して、4℃で一晩反応させた。翌日、洗浄液で洗い流し、洗浄液中に 20 分間浸した。そして、ポリマー試薬を滴下して 30 分間反応させ、洗浄液で洗い流した後、DAB1 滴を PBS1ml に希釈したものを滴下して 30 秒間反応させ、精製水ですすいだ。さらにマトキシリンで 1 分間対比染色後、精製水で 15 分間水洗した。最後に、脱水・透徹を行い、マリノールで封入した。

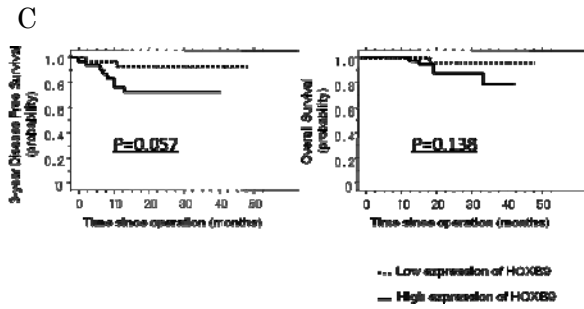
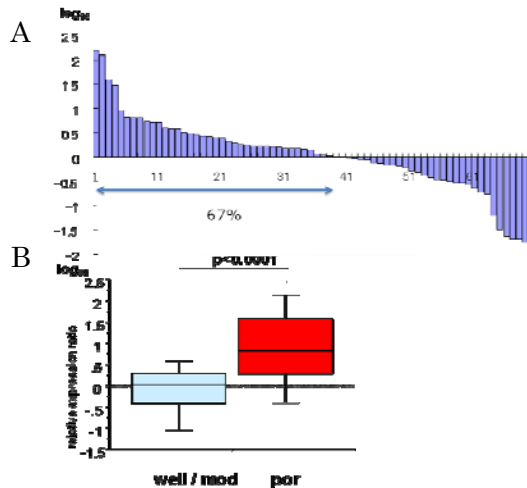
○Xenograft model

動物実験には 5 週齢 BALB/c (nu/nu) 雌を用いた。1 週間飼育後、HT29, HCT116 をそれぞれ PBS に溶解して 3×10^6 個ずつ皮下注射し、HT29 は tetracycline 経口投与 (1mg/ml) の有無で 2 群にわけた (各群 n=4)。皮下注群は腫瘍量が 75mm³ となった時点を Day0 とし、tetracycline 投与群と非投与群に分けた。評価項目として腫瘍体積と腫瘍重量を測定した。Bevacizumab は Day7 より 5mg/kg で腹腔内投与を行い、以降 7 日毎に投与した。対照群には PBS のみを腹腔内に投与した。

4. 研究成果

臨床データにおける HOXB9 の発現

大腸癌臨床凍結検体約 70 例を用いて腫瘍組織、正常粘膜組織のそれぞれから mRNA を抽出し、qRT-PCR で HOXB9 の発現解析を施行した。結果、約 67% の大腸癌において、正常部と比較して癌部で HOXB9 が高発現していることが確認された。中でも低分化型大腸癌では、低分化型・中分化型大腸癌に比べ、有意に HOXB9 が高発現していた。さらに、3 年無病生存期間 (DFS) および全生存期間 (OS) は HOXB9 が高発現群で予後不良であった (図. 1)。



○HOXB9 の発現確認

図 1

- A. 大腸癌組織での HOXB9 mRNA 発現量の比較 (癌部 vs. 正常粘膜)
- B. 分化度による HOXB9 mRNA 発現量の比較 (低分化 vs. 中分化 vs. 高分化)
- C. 大腸癌組織 HOXB9 mRNA 発現量による患者予後の比較

HOXB9 が大腸癌患者の予後に影響する原因を明らかにするため、HOXB9 の高発現及び抑制を誘導し、機能解析を行った。HOXB9 低発現の大腸癌細胞株である HT29, HCT116 に対して tetracycline (tet) 誘導発現による HOXB9 過剰発現細胞株を作成した。tet 存在下 (10 μ g/ml) の培養で HT29-HOXB9 導入株では HOXB9 mRNA は約 250 倍に、HCT116-HOXB9 導入株では約 20 倍に上昇していた。一方、HOXB9 高発現の大腸癌細胞株である SW480, WiDr に対して HOXB9 の発現抑制を行う shHOXB9 株を作成した。これらの細胞で Stable clone を作成した。同様に qRT-PCR を施行したところ、Control に比して SW480-shHOXB9 株では約 0.2 倍、WiDr-shHOXB9 株では約 0.002 倍に HOXB9 の mRNA 発現は抑制されていた (図 2)。

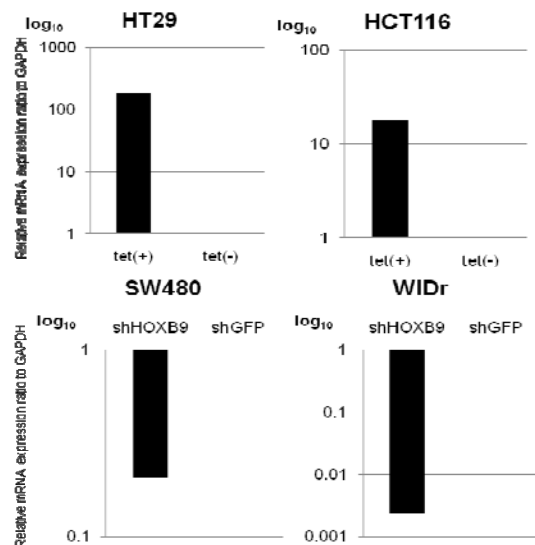


図 2 : qRT-PCR 法での HOXB9 mRNA 発現量比較

さらに細胞タンパク発現の局在化を蛍光免疫染色により調べた。Chamber slide glass に HT29 および HCT116 を培養し、DAPI を用いて HOXB9 蛋白発現局在を調べた。HT29、HCT116 いずれの細胞株でも、tet 存在下では HOXB9 が核内に強く集積していることを DAPI 対比染色で確認した(図 3)。

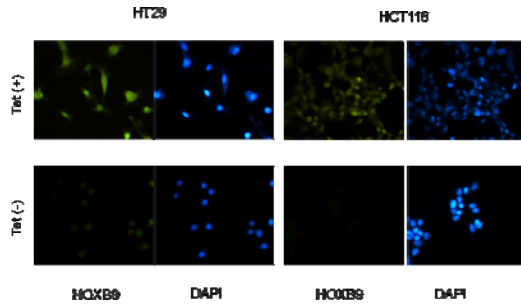
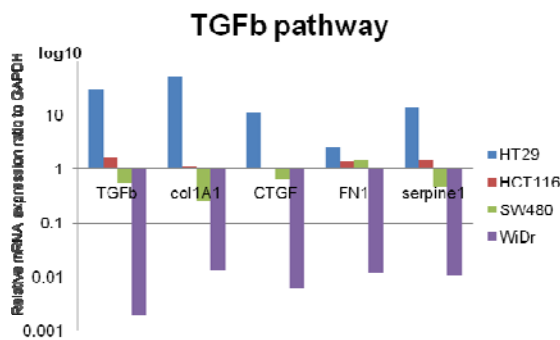


図 3: 蛍光免疫染色による HOXB9 発現部位の検討

TGF β 経路の遺伝子の発現

乳癌細胞では HOXB9 は TGF β 経路を介して癌転移や血管新生に関与している。そこで、大腸癌細胞における HOXB9 と TGF β 経路の関係を検討した。HOXB9 を過剰発現系 (HT29, HCT116) と発現抑制系 (WiDr, SW480) における TGF β ファミリー (TGF β, Col1A1, CTGF, FN1, serpine1) の mRNA 発現量を調べた。の各遺伝子の発現量をそれぞれ調べた。HOXB9 高発現大腸癌細胞株 (HT29, HCT116) では、いずれの mRNA 発現量も増加した。一方、HOXB9 発現抑制大腸癌細胞株 (SW480, WiDr) では、ほぼ全ての mRNA 発現が抑制された (図 4)。大腸癌細胞においても HOXB9 は TGF β 経路を活性化していることが示された。



Angiogenic Factor の発現

乳癌細胞では HOXB9 が血管新生に関わって

図 4: TGF β 系因子に関する mRNA 発現量の比較

いる。今回、大腸癌細胞においても HOXB9 の発現が、血管新生に影響しているのかを確認した。HOXB9 を過剰発現系 (HT29 tet+, HCT116 tet+) と発現抑制系 (WiDr, SW480) における血管新生因子 ANGPLG2、ERG、bFGF、PDGFC、VEGF、IL8) の mRNA 発現量を調べた。HOXB9 高発現

大腸癌細胞株 (HT29 tet+, HCT116 tet+) では、いずれの mRNA 発現量も増加した。一方、HOXB9 発現抑制大腸癌細胞株 (SW480, WiDr) では、ほぼ全ての mRNA 発現が抑制された (図 5)。以上から HOXB9 は大腸癌細胞においても血管新生因子を誘導することが示された。

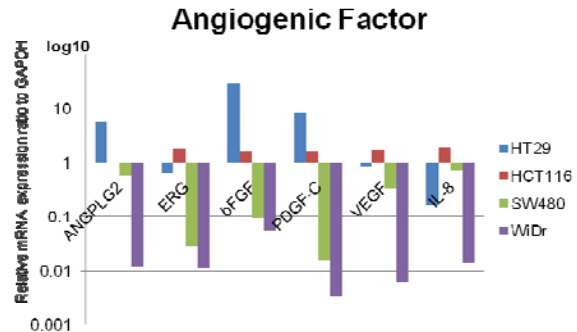


図 5: 血管新生因子に関する mRNA 発現量

MTT assay

大腸癌細胞株において HOXB9 が腫瘍増殖能にどのような影響を与えるかを明らかにするため、MTT により増殖能を評価した。その結果、HOXB9 高発現株 (HT29 tet+, HCT116 tet+) で増殖能が抑制され、HOXB9 発現抑制系 (SW480, WiDr) では有意な増殖を認めた (図 6)。これらの結果は乳癌細胞における HOXB9 などの EMT marker の発現が in vitro における腫瘍増殖を抑えるという結果と一致したものであった。

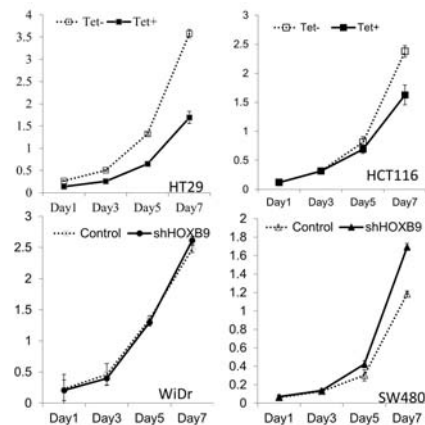


図 6: 細胞の増殖能の比較 (MTT assay: day1, 3, 5, 7)

Xenograft model

これまで述べた結果に基づいて HOXB9 が大腸癌細胞にどのような影響を与えているかを生体で確認するため、nude mouse にヒト由来の大腸癌細胞皮移植モデルを作成した。細胞株には tetracycline 発現調節株である HT29 を用いた。

皮下移植モデルでは tetracyclin 投与群が非

投与群に比して腫瘍体積、腫瘍重量共に有意な増加を示した。

これらのモデルで得られた腫瘍組織を血管内皮細胞に対する抗CD31抗体および抗HOXB9抗体を用いた免疫染色法にて新生血管およびHOXB9の発現を調べた。結果、HT 29 細胞では CD31 および HOXB9 が著しく発現していることが確認され、HOXB9 により血管新生が誘導されていることが示唆された(図 7)。

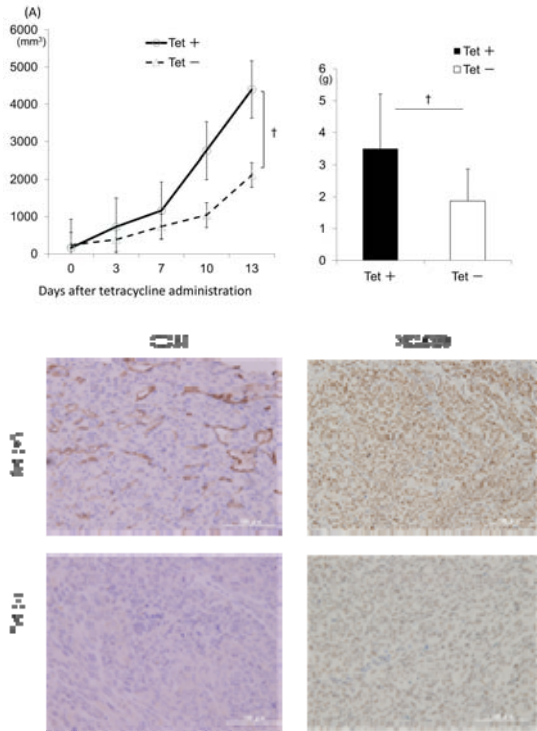


図 7 : A. 腫瘍体積の変化と摘出時腫瘍重量の比較
B. 腫瘍部免疫染色の比較 (CD31, HOXB9)

さらに bevacizumab を加えて治療を行うと対照群に比較して有意に腫瘍縮小率が大きかった(図 8、 $p < 0.005$)。

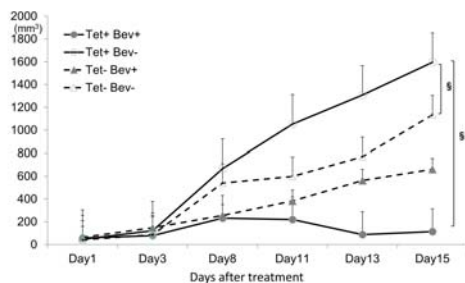


図 8 : 腫瘍体積の変化

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ①転写因子 HOXB9 による大腸癌細胞悪性化と血管新生亢進を通じた癌転移機構の解明
星野好則, 林田哲, 平田玲, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 落合大樹, 代永和秀, 松永篤志, 星野大樹, 北川雄光
第 111 回日本外科学会総会
(紙上開催, 2011 年 5 月 25 日付発刊)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 好則 (HOSHINO YOSHINORI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 40464945