

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	趙 亜薇
<h3>学位論文題目</h3> <p>Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer (子宮体癌におけるホメオボックス遺伝子 HOX13 の過剰発現と 浸潤転移能の解析に関する研究)</p> <p>共著者名 山下 剛、石川 睦男</p> <p>未公表</p> <h3>研究目的</h3> <p>脊椎動物のホメオボックス遺伝子座は四つのクラスターからなり、各クラスターは 10 個程度の遺伝子を含んでいる。ホメオボックス遺伝子は形態形成のマスター調節因子として、動物の発生や形態形成過程において重要な働きをしていることが明らかになっている。ヒトの Class I ホメオボックス遺伝子である HOX 遺伝子は、合計 39 個の遺伝子群よりなり、それぞれ転写因子をコードし、胎生期の形態形成のマスター遺伝子として働くだけでなく、成体期以降も臓器・組織に特徴的な形態・機能の維持に役立っていると考えられている (引用文献 1)。近年、HOX 遺伝子が悪性腫瘍の発生や進展においても重要な役割を果たしていることが示唆され、とりわけその発現異常と癌転移浸潤との関連性に関して、肺癌や乳癌を始めとした上皮性腫瘍で報告がなされ始めている (引用文献 2)。乳癌と同様のエストロゲン依存性腫瘍である子宮体癌においてもいくつかの報告があるが (引用文献 3)、いずれも HOX 構成遺伝子群のごく一部についての異常が検討されたものであり、子宮体癌における発現異常の意義および役割については十分に解明されていない現状がある。</p> <p>本研究では、HOX 遺伝子の発現異常が癌浸潤転移を誘導する可能性があるとの仮説をもとに、まず正常子宮内膜および子宮体癌細胞株を用いて real-time PCR 法により HOX 遺伝子の発現プロファイルについて検討した (実験 I)。次に、これらの遺伝子のうち過剰発現を認めた HOX 遺伝子のアンチセンスベクター導入による HOX 発現抑制の効果と癌細胞の浸潤能について、アンチセンス導入細胞株とコントロール細胞 (未導入株とベクターのみ株) での浸潤能の差をケモインベジョンア</p>			

ッセイを用いて比較した（実験Ⅱ）。又、過剰発現を認めた HOX 遺伝子の発現レベルについてエストロゲン依存性の有無を比較検討した（実験Ⅲ）。

材 料 ・ 方 法

実験Ⅰ

その使用に対し同意の得られたヒト正常子宮内膜組織 12 例と子宮体癌細胞 6 株 (RL-95、KLE、ISHIKAWA、HEC-1A、HEC-1B、AN3CA) より total RNA を抽出し逆転写反応を行い、cDNA を得た。39 個の HOX 遺伝子及び内部標準としての β -actin の発現量を Quantitative real-time PCR 法にて調べ、発現プロファイルを作成し、内部標準で補正後相対比にて判定し、癌細胞と正常組織間での比較を行った。

実験Ⅱ

1. HOXB13 アンチセンス遺伝子導入

HOXB13 遺伝子の exon1 をカバーする特異的 primer を用いて PCR を行い、得られたバンドから PCR 産物を抽出後、pGEM-T Easy Vector を介して *pcDNA3.1 (+)Vector* に挿入し、HOXB13 アンチセンス発現ベクターを合成した。このベクターがエレクトロポレーション法を用いて子宮体癌細胞株 AN3CA に導入した。導入細胞は 48 時間後、350 μ g/ml の Geneticin(G418)を含む 10%FBS-DMEM で培養された。2 週間後、増殖してきた個々のコロニーをトリプシン・EDTA 溶液を浸み込ませた濾紙の薄片を用いてピックアップして 24well plate に移し、Geneticin 存在下で培養を続けた。

2. ケモインベジジョンアッセイ

マトリゲルコートされたトランスウェル・チャンバー（フィルターの pore size 8 μ m、直径 6.5mm）を用いて、ケモインベジジョンアッセイにて浸潤能を測定した。チャンバー上室のマトリゲル上に 500 μ l の細胞懸濁液（ 5×10^4 cells, 0.1%BSA-DMEM）を注入した。チャンバー下室にケモアトラクタントとして 750 μ l のフィブロネクチン溶液（10 μ l/ml）を入れた。これを CO₂ インキュベーター内に 86 時間静置した後、フィルター上面の細胞を拭き取り、細胞をフィルターごとに 70% エタノール溶液に 30 分間浸し固定して、Trypan blue 染色を施し、フィルター下面に浸潤した細胞を顕微鏡下で観察した。×200 倍率で 20 視野をランダムに選び細胞数をカウントし、1 視野に当たり観察された細胞数の平均値を計算した。細胞の浸潤能はマトリゲルコートしたフィルターを通過した細胞数とコントロールフィルターでの細胞数の比で表し、浸潤能をそれぞれの細胞間で比較検討し

た。

実験Ⅲ

培養された子宮体癌細胞株 AN3CA に対して、10%FBS/DMEM 培養液で 80%Confluent 到達後 phenol red free 培養液で 24 時間培養し、 17β -エストラジオール濃度を 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M に調整後投与するか、あるいは 10^{-5} M の濃度で 2、4、6、8、10、12、22 時間培養後、細胞の RNA を抽出、逆転写した後、Quantitative real-time PCR 法を用いて HOXB13 発現量を検討した。

成 績

実験Ⅰ

HOXA1、A3、A4、A6、B1、C9、C12、D1、D11 遺伝子は子宮内膜癌細胞と正常子宮内膜組織の両群で全例検出レベル以下であった。A2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、C4、C8、C10、D3、D4、D9、D12、D13 遺伝子は両群で検出されたが発現量に差を認めなかった。一方、A5、A10、A11、A13、B2、C5、C6、D8、D10 遺伝子においては子宮内膜癌細胞より正常子宮内膜組織の方が高いレベルで発見していた。A7 と A9 遺伝子発現は体癌 6 株中、それぞれ 2、3 株に正常子宮内膜組織と同じレベルで発現した。HOXB13、C13、C11 遺伝子は正常子宮内膜組織で陰性、体癌 6 株中の発現がそれぞれ 6、5、1 株であった。ただし、体癌細胞株で遺伝子の平均発現量は HOXB13 の方が HOXC13 より 40 倍ぐらい高いと認められた。

実験Ⅱ

フィブロネクチンを用いたケモインベージョンアッセイにより、HOXB13 アンチセンス DNA 導入子宮体癌細胞株はコントロール株と比較して、90%程度の浸潤能の低下を認めた。

実験Ⅲ

投与 10 時間以内では HOXB13 遺伝子が投与時間の長さと共に発現量が増加した。また、投与濃度によって発現量も増加した。

考 案

HOX 遺伝子の機能と考えられている細胞の持つ固有の空間の位置情報の伝達機能が変化することで、すなわち悪性腫瘍ではその過剰発現により癌浸潤転移が誘導される可能性があるとの仮説を立てた。本研究では、39 個の HOX 遺伝子の発現プロファイルの検討により、正常子宮内膜組織で

HOXD10 の発現が文献と一致し（引用文献 3）、癌細胞株では HOXB13、C13、C11 遺伝子が過剰発現していることを確認した。癌細胞で過剰発現した 3 つの遺伝子の発現レベルから見ると、HOXB13 遺伝子をもっとも重要な遺伝子である可能性が示唆された。

更に、この過剰発現が癌細胞の転移・浸潤に直接影響を与えているかどうかを判断するために、過剰発現していた 3 種類の HOX 遺伝子のうち、HOXB13 のアンチセンスを子宮体癌細胞株に導入し検討した。ケモインベジションアッセイの結果、アンチセンス導入細胞株の浸潤能はオリジナル細胞株に比較し 90%程度の低下を示した。従って、HOXB13 遺伝子はその過剰発現により子宮体癌細胞の浸潤能に強い影響を与えていることが示唆された。

子宮体癌のリスクファクターの一つとしてのエストロゲンが注目されているが、その発癌での分子メカニズムについてはまだ不明な点が多い。本研究では、HOXB13 の発現レベルは投与したエストロゲンに対して時間及び濃度依存性を示すことを明らかにした。

本研究では HOX 遺伝子の正常子宮内膜組織と子宮内膜癌での発現プロファイルを初めて明らかにした。また、HOXB13 遺伝子が子宮内膜癌で重要な役割を果たしていることを示唆した。エストロゲンが HOXB13 の発現調節を介して子宮体癌の浸潤転移に影響を与えている可能性を示唆した。

結 論

1. リアルタイムPCR法を用いて、6 種類の子宮体癌細胞株および患者から同意の得られた正常子宮内膜組織における 39 個の HOX 遺伝子の発現状況を検討し、癌細胞株および癌組織では HOXB13 遺伝子が過剰発現していることを確認した。
2. HOXB13 遺伝子はその過剰発現により子宮体癌細胞の浸潤能に強い影響を与えていることが示唆された。
3. エストロゲンが HOXB13 の発現調節を介して子宮体癌の浸潤転移に影響を与えている可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. McGinnis W, Krumlauf R: Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302, 1992
2. Hamada J, Omasu T, Okada F, Fukuuchi K, Okubo Y, Takahashi Y, Tada M, Miyazaki Y, Taniguchi Y, Shirato H, Miyazaki K, Moriuchi T: Overexpression of Homeobox gene

HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. *Int J Cancer* 93: 516-525, 2001.

3. Osborne J, Hu CZ, Hawley C, Underwood LJ, O'Brien TJ, Baker VV: Expression of HOXD10 Gene in Normal Endometrium and Endometrial Adenocarcinoma. *J Soc Gynecol Invest* 5:277-280, 1998.

参 考 論 文

山下 剛、趙 亜薇、大隅 大介：ダイオキシン類代謝酵素 CYP1A1 の遺伝子多型と子宮内膜症及び
卵巣癌発症との関連性について。産婦人科治療 85 : 223, 2002.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	趙 亜薇
<p>審査委員長 藤 枝 憲 二 ㊞</p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 ㊞</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊞</p> <p>審査委員 千 石 一 雄 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer</p> <p>(子宮体癌におけるホメオボックス遺伝子 HOXB13 の過剰発現と浸潤転移能の解析に関する研究)</p>			
<p>Class I ホメオボックス遺伝子である HOX 遺伝子は、39 個の遺伝子群よりなり胎生期の形態形成のマスター遺伝子として働くだけでなく、成体期以降も臓器・組織に特徴的な形態・機能の維持に役立っていると考えられている。近年、HOX 遺伝子が悪性腫瘍の発生や進展においても重要な役割を果たしていることが示唆され、とりわけその発現異常と癌転移浸潤との関連性に関して注目されている。しかし子宮体癌においてその発現異常の意義および役割については十分に解明され</p>			

ていない。

論文提出者は、子宮体癌の浸潤転移における HOX 遺伝子の役割を明らかにするために、まず正常子宮内膜および子宮体癌細胞株を用いて real-time PCR 法により 39 個の HOX 遺伝子の発現プロファイルについて検討した。正常子宮内膜組織で HOXD10 の発現が文献と一致し、癌細胞株では HOXB13、C13、C11 遺伝子が過剰発現していることを確認した。さらにその過剰発現レベルから判断し、HOXB13 遺伝子がもっとも重要な遺伝子であることを示唆した。次に、過剰発現を認めた HOX 遺伝子のアンチセンスベクター導入による HOX 発現抑制の効果と癌細胞の浸潤能について比較検討した。HOXB13 アンチセンス導入細胞株の浸潤能はオリジナル細胞株に比較し 90% 程度の低下を示し HOXB13 遺伝子はその過剰発現により子宮体癌細胞の浸潤能に強い影響を与えていることを示唆した。さらに、子宮体癌のリスクファクターの一つとしてのエストロゲンが注目されているが、その発癌での分子メカニズムについてはまだ不明な点が多い。本研究では、HOXB13 の発現レベルは投与したエストロゲンに対して時間及び濃度依存性を示すことを明らかにした。

以上の研究成果は子宮内膜癌における癌浸潤転移機構の一端を明らかにした意義がある。なお、論文提出者に対して、本論文及び関連分野に関する試問を行い適切な解答がえられた。従って、本論文は学位論文に値するものと判断した。