

ホメオボックス遺伝子の過剰発現によるヒト肺癌細胞

A549の細胞運動性および浸潤性の増強

学位論文内容の要旨

目 的

癌の浸潤・転移を発生生物学的に考察すると、細胞のもつ固有の空間的位置情報の変化が原因と捉えることができる。動物胚の発生過程において形態情報を位置情報に変換する遺伝子はホメオボックス遺伝子とよばれ、この遺伝子群が位置情報の最終的な担い手である細胞接着因子遺伝子の発現を調節しながら胚の形態形成を進めていく。脊椎動物では出生後も造血組織、腎臓、肝臓、中枢神経などでホメオボックス遺伝子の組織特異的な発現パターンが認められる。ヒト第2染色体に存在するHOXD3ホメオボックス遺伝子の発現は正常肺組織では認められないが、肺癌の原発巣および転移巣ではしばしば認められる。このような背景から、HOXD3ホメオボックス遺伝子の発現異常は、癌細胞の転移・浸潤性と密接に関連していると予測される。そこで本研究では、ホメオボックス遺伝子の一つであるHOXD3をヒト肺癌細胞A549に導入して過剰発現させ、細胞の接着、運動および浸潤性の変化について解析を行った。

方法および結果

【HOXD3の導入と発現】動物細胞でのHOXD3発現ベクターとして Taniguchiらによって構築されたpMAMneo-HOX4A(+)を用いた。コントロールには、ネオマイシン耐性遺伝子のみを発現するpMAMneoを用いた。ヒト肺癌細胞A549にそれぞれのベクターを導入し、HOXD3過剰発現株 (HOX+1, HOX+2), ネオマイシン耐性遺伝子発現株 (Neo1, Neo2) を得た。HOXD3の発現は、RT-PCR法にて調べた。コントロールとしてヒト β アクチンを同じ条件で増幅した。HOXD3遺伝子の発現は、親株およびコントロールクローンでは非常に低かったが、HOX+1とHOX+2では高いことが明らかとなった。

【接着分子の発現】細胞表面の接着分子であるインテグリン $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αIIb , αv , $\alpha \text{v}\beta 3$ および $\alpha \text{v}\beta 5$ の抗体を用い、フローサイトメトリーにてこれらの分子の発現を調べた。親株および他のすべてのクローンにおいてインテグリン $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha \text{v}\beta 3$ および $\alpha \text{v}\beta 5$ の発現が認められた。これらのうち、 $\alpha 3$, $\beta 3$ および $\alpha \text{v}\beta 3$ の発現はHOX+1とHOX+2で増強した。インテグリン $\alpha 4$ の発現は、HOX+1とHOX+2のみで認められた。インテグリン αIIb の発現は、親株を含めたいずれのクローンにおいても認められなかった。

【細胞の接着性】フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンおよびBSAに対する細胞の接着性を経時的に調べた。フィブロネクチンとビトロネクチンに対してHOX+1とHOX+2は親株およびコントロールクローンと比較して高い接着性を示した。ラミニンとBSAに対する接着性は各クローンとも同程度であった。

【細胞の運動性】フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンおよびフィブリノーゲンに対する細胞運動性をトランスウエルチャンバーを用いたハプトタキシスアッセイにて調べた。フィブロネクチン、ビトロネクチンおよびフィブリノーゲンに対する細胞運動性は、親株およびコントロールクローンと比較してHOX+1とHOX+2で有意に増強した。ラミニンに対する細胞運動性は各クローンとも同程度であった。次にインテグリン β 1、インテグリン β 3に対する中和抗体で各クローンを処理して、フィブロネクチンとビトロネクチンに対するハプトタキシスアッセイを行った。親株とコントロールクローンのフィブロネクチンに対する細胞運動性は、抗インテグリン β 1抗体によってほぼ完全に抑制されたのに対し、抗インテグリン β 3抗体によっては全く抑制されなかった。HOX+1とHOX+2のフィブロネクチンに対する細胞運動性は、抗インテグリン β 1抗体あるいは抗インテグリン β 3抗体によって部分的に抑制された。ビトロネクチンに対する細胞運動性は、親株とコントロールクローンでは抗インテグリン β 1抗体あるいは抗インテグリン β 3抗体の単独処理によって部分的に抑制され、両抗体での処理では完全に抑制された。HOX+1およびHOX+2のビトロネクチンへの細胞運動性は各抗体の単独処理でも部分的に抑制され、両抗体の処理ではさらに抑制されたが完全ではなかった。

【ウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター(uPA)およびetsファミリー遺伝子の発現】uPAとその転写因子であるetsファミリー遺伝子(ets-1, ets-2, E1AF)のmRNAの発現をRT-PCR法を用いて調べた。HOX+1およびHOX+2のuPA, ets-1およびets-2の発現は親株およびコントロールクローンと比較して高かった。E1AFとHOXD3の発現程度には明らかな相関性は認められなかった。

【In vitroの浸潤性】基底膜モデルとして頻繁に利用されているマトリゲルに対する浸潤性を調べた。HOX+1とHOX+2は、親株およびコントロールクローンと比較して有意に高い浸潤性を示した。さらに、浸潤アッセイ系にプラスミノゲンを添加すると、HOX+1とHOX+2においてのみ浸潤性の増強傾向が認められた。

考 察

A549細胞のフィブロネクチンやビトロネクチンに対する細胞運動性がHOXD3遺伝子の過剰発現によって増強する原因として、インテグリン分子の発現亢進と機能性の変化が考えられる。A549細胞は、フィブロネクチンに対する細胞運動に際しては本来インテグリン β 1を使用しているが、HOXD3が過剰に発現されるとインテグリン α v β 3の発現が亢進し、 α v β 3と β 1の両方を利用するようになることが示唆された。ビトロネクチンに対する運動性の亢進はインテグリン β 3の発現亢進とその利用によると考えられる。A549のHOXD3過剰発現株においてuPAの発現の増強が認められた。uPAの転写因子の一つにetsファミリー遺伝子が知られている。HOXD3過剰発現株においてets-1, ets-2の著明な発現の亢進が認められ、HOXD3は、転写因子であるetsファミリーのその上位の転写因子としてuPAの発現を促している可能性が示唆された。uPAはプラスミノゲンをプラスミンに変換することにより様々な細胞外マトリックスを分解し、また、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を潜在型から活性型に変換させる。uPAの発現と転移・浸潤性との相関は肺癌を含め多くの癌において報告されており、インテグリン β 3の発現はヒトメラノーマの悪性化に伴って増加すること、およびヒト乳癌細胞の骨転移と関連することが報告されている。uPAのほかにetsファミリー遺伝子によって転写が調節される遺伝子としてMMPに属するMMP-1, MMP-3, MMP-9などが挙げられる。これらの分子は癌の転移・浸潤に関わる分子である。実際、HOXD3過剰発現株のマトリゲルへの浸潤性は、コントロール株に比べ有意に高かった。従って、癌細胞におけるHOXD3の発現異常は、転移関連遺伝子の発現を亢進し、転移・浸潤性を増強している可能性が示唆された。

結 語

ヒト肺癌細胞A549の転移・浸潤は癌細胞に特有な遺伝子発現によって起こるというよりは、むしろ発生過程の遺伝子発現プログラムを模倣あるいは借用している可能性が高いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

ホメオボックス遺伝子の過剰発現によるヒト肺癌細胞

A549の細胞運動性および浸潤性の増強

癌の浸潤・転移を発生生物学的に考察すると、細胞のもつ固有の空間的位置情報の変化が原因と捉えることができる。動物胚の発生過程において形態情報を位置情報に変換する遺伝子はホメオボックス遺伝子とよばれ、この遺伝子群が位置情報の最終的な担い手である細胞接着因子遺伝子の発現を調節しながら胚の形態形成を進めていく。ホメオボックス遺伝子の発現異常は、癌細胞の転移・浸潤性と密接に関連していると予測される。そこで本研究では、ホメオボックス遺伝子の一つであるHOXD3をヒト肺癌細胞A549に導入して過剰発現させ、細胞の接着、運動および浸潤性の変化について解析を行った。ヒト肺癌細胞A549にHOXD3発現ベクターとネオマイシン耐性遺伝子のみを発現するベクターをそれぞれ導入し、HOXD3過剰発現株および、ネオマイシン耐性遺伝子発現株を得た。HOXD3の発現はRT-PCR法にて調べた。HOXD3遺伝子の発現は、コントロール株、親株に比較して、HOXD3過剰発現株で高く認められた。細胞表面の接着分子であるインテグリンの発現を抗体を用い、フローサイトメトリーにて調べた。コントロール株、親株に比較して、HOXD3過剰発現株でインテグリン $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ および $\beta 3$ 鎖の発現の亢進が認められた。フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンへの細胞接着性および細胞運動性を調べた。HOXD3過剰発現株では、コントロール株、親株に比較して、フィブロネクチン、ビトロネクチンへの細胞接着性および細胞運動性の亢進が認められた。癌の転移・浸潤に関与する細胞外マトリックス分解酵素のひとつであるウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター (uPA) とその転写因子であるetsファミリーのmRNA発現を

RT-PCR法で調べた。コントロール株、親株に比較して、HOXD3過剰発現株においてuPAの発現が亢進し、uPAの転写因子であるets-1、ets-2の発現の亢進が認められた。また、HOXD3過剰発現株ではコントロール株、親株に比較して、基底膜モデルであるマトリゲルへの浸潤性が増強した。

中和抗体を用いた細胞運動性の実験より、HOXD3遺伝子の過剰発現によってA549細胞のフィブロネクチンやビトロネクチンに対する細胞運動性が増強する原因としては、インテグリン分子の発現亢進と機能性の変化が考えられた。また、HOXD3遺伝子はetsファミリーの転写を調節し、etsファミリーを介してuPAの転写を調節している可能性が示唆され、HOXD3遺伝子の過剰発現によるマトリゲルへの浸潤性の増強の原因としてはこれらの細胞外基質の分解系の促進が考えられた。

以上から、癌細胞A549におけるHOXD3遺伝子の発現異常は、HOXD3遺伝子によって支配されている転移関連分子であるインテグリン、uPA、etsファミリーの発現を亢進し、癌細胞の接着、運動および浸潤性を増強している可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査細川教授よりin vivoでのHOXD3遺伝子の過剰発現による転移の変化、およびHOXD3遺伝子の過剰発現を行わない癌細胞について、HOXD3遺伝子の発現と癌細胞の転移、浸潤性について質問がなされた。副査守内教授より、HOXD3の過剰発現株での細胞運動性の増強とインテグリン分子の発現との関係、およびuPAの発現増強とets-1、ets-2の発現との関係についての質問がなされた。主査宮坂教授より、HOXD3遺伝子の発現と、臨床的な癌の悪性度との関係について質問がなされた。また、白土助教授から、形態温存の治療としての放射線治療とホメオボックス遺伝子についての質問がなされた。申請者は、メラノーマと乳癌におけるHOXD3の発現、in vitroの実験の結果および、インテグリン分子の発現と転移との報告などに基づいて、概ね妥当な回答を行った。

動物胚の発生過程での位置情報を担うホメオボックス遺伝子と癌細胞の運動性、浸潤性の関係を検討した研究はまだ少なく、先駆的な研究として学位論文に値するものと判断した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。