

学 位 論 文 題 名

ホメオボックス遺伝子 *HOXD3* アンチセンス発現

ベクター導入によるヒト悪性黒色腫細胞の

in vitro 浸潤性の低下

学位論文内容の要旨

癌の浸潤・転移を発生生物学的に捉えると、細胞の持つ固有の空間的位置情報の変化が原因と考えることができる。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呼ばれ、転写調節因子をコードしている。ホメオボックス遺伝子にはいくつかのファミリーがあるが、そのうちのひとつであるクラス I ホメオボックス遺伝子 (*HOX*) 群は、ヒトを含む広範な脊椎動物においても高度に保存されている。*HOX* 遺伝子は胎生期の細胞に空間的な位置情報を与え、形態形成のプログラムを実行に移すマスター調節遺伝子と考えられてきたが、脊椎動物では出生後も造血組織、腎臓、肝臓、中枢神経などで組織特異的な発現パターンが認められる。

腎癌、肺癌、子宮頸癌などの固形癌においては、*HOX* 遺伝子の発現パターンが、癌組織と正常組織間で異なり、成体においても *HOX* 遺伝子群が組織構築の保持に関与していると考えられている。また、*HOXD3* 遺伝子の強制発現が、細胞接着因子インテグリン $\beta 3$ の発現を促し、それを介した細胞接着や運動性を増強させることが、ヒト赤白血病細胞ならびに肺癌細胞を用いた遺伝子導入実験で明らかにされている。また、ヒト血管内皮細胞を血管新生因子のひとつ basic fibroblast growth factor (bFGF) で刺激すると、*HOXD3* 遺伝子の発現が高まるとともに、インテグリン $\beta 3$ およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) の発現が亢進することが報告されている。以上の事実は、*HOXD3* が転移・浸潤関連分子の転写を調節している可能性を示唆している。

悪性黒色腫は、メラノサイト由来の悪性腫瘍で、高い転移・浸潤性を示すことがひとつの特徴である。そこで、*HOXD3* ホメオボックス遺伝子が、悪性黒色腫細胞の転移・浸潤性に関与するののか否かを調べるために、*HOXD3* を発現しているヒト悪性黒色腫細胞株 A375M に *HOXD3* アンチセンス発現ベクターを導入し、細胞の運動・浸潤性の変化および運動・浸潤性に関与する遺伝子の発現変化について解析した。

まず、ヒト正常メラノサイトおよび 7 系のヒト悪性黒色腫細胞株の *HOXD3* の発現を reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で調べた。*HOXD3* の発現は、正常メラノサイトでは認められなかったが、悪性黒色腫細胞株では 7 系中 6 系に認められた。そこで、*HOXD3* アンチセンス発現ベクターを作製して *HOXD3* を発現している悪性黒色腫細胞株 A375M にリポフェク

シオン法で遺伝子導入した。遺伝子導入操作後、ネオマイシンを含んだ選択培地で培養し、5系の *HOXD3* アンチセンスを高発現した細胞クローンを得た。親株、ネオマイシン耐性遺伝子のみを発現する2系の細胞クローン、ならびに *HOXD3* アンチセンス発現ベクターを導入したが発現の極めて低かった1クローンを対照群として用いた。

内皮下基底膜への浸潤モデルとして頻用されるマトリゲルへの浸潤性は、対照細胞クローンおよび親株に比べ、*HOXD3* アンチセンス発現クローンにおいて有意に低かった。細胞外マトリクス成分であるビトロネクチンおよびラミニン-1に対する接触走化性、ならびにファゴカイネティック・トラック・アッセイで測定された細胞運動性もまた、*HOXD3* アンチセンスを発現させることによって有意な低下が認められた。また、マトリゲルおよびラミニン-1上に細胞を播種した場合、親株および対照細胞クローンはすみやかに接着し、細胞突起を形成し伸展した（細胞伸展）のに対し、*HOXD3* アンチセンス発現株は細胞伸展を示すものが少なかった。

マトリゲルの主成分はラミニン-1であるので、*HOXD3* アンチセンスの発現による細胞浸潤、運動および伸展性の低下は、ラミニンに対する接着因子の発現低下によると考え、フローサイトメトリーあるいはRT-PCR法でそれらの発現を解析した。その結果、ラミニンをリガンドとするインテグリンならびに67 kDaラミニンレセプターの発現は、すべてのクローンにおいて同程度であることが明らかとなった。つぎに、細胞浸潤に関与する細胞外マトリクス分解酵素とそのインヒビターの発現について調べた。マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) 群に属する MMP-1、MMP-2、MMP-3、MT1-MMP、MT2-MMP およびそれらのインヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1、TIMP-2、ならびにセリンプロテイナーゼ群に属する uPA、そのレセプター (uPA レセプター) およびインヒビターである PA インヒビター (PAI)-1、PAI-2 の発現は、各クローン間において差を認めなかった。

以上の結果は、*HOXD3* アンチセンスによる細胞浸潤・運動性の低下が、細胞接着因子や細胞外マトリクス分解酵素の発現変化に起因するのではなく、他の機序によって引き起こされていることを示唆している。つぎに細胞浸潤・運動性の低下に関与する候補因子を個別に調べていくのではなく、*HOXD3* アンチセンスによって発現の変化する因子を包括的、網羅的に解析した。すなわち、*HOXD3* アンチセンス発現クローンとネオマイシン耐性対照クローン間における mRNA の発現パターンを比較するため cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、細胞骨格関連蛋白である cdc42 interacting protein 4 (CIP4)、CIP4 とホモロジーの高い KIAA0554 およびトロポミオシン II (TPM2) の発現が、*HOXD3* アンチセンスを発現させることによって増強することが明らかとなった。

CIP4 は、Rho ファミリーに属する低分子量 G 蛋白 Cdc42 の下流にある標的分子のひとつであり、そのアミノ酸配列から Cdc42 からのシグナル伝達や細胞骨格の制御に関与していると考えられている。活性型 Cdc42 は、葉状突起や細胞膜のラップリングに先行して起こる形態変化である糸状突起や microspike の形成に関わっている。葉状突起やラップリングの形成は、細胞運動性と相関する現象であるので、Cdc42 の活性化もまた細胞運動と結びついていると考えられる。TPM2 はアクチン結合蛋白で、アクチンフィラメントを安定化する働きがあり、転移性の低いマウス悪性黒色腫細胞において高発現していることが知られ

ている。糸状突起、葉状突起やラッフリングの形成にはアクトミオシン系の細胞骨格蛋白の重合・脱重合・再構成がすみやかにおこる必要があり、それぞれに関わる分子の量的バランスが重要となる。従って、TPM2 や CIP4 の異常発現は、アクトミオシン系の再構成システムに異常をきたし、その結果、細胞進展や細胞運動の低下を引き起こしていると考えられる。

以上の結果より、ホメオボックス遺伝子 *HOXD3* は、浸潤・運動を制御するマスター調節遺伝子として働いている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

ホメオボックス遺伝子 *HOXD3* アンチセンス発現

ベクター導入によるヒト悪性黒色腫細胞の

in vitro 浸潤性の低下

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 (*HOX*) 遺伝子と呼ばれ、転写調節因子をコードしており、ヒトを含む広範な脊椎動物においても高度に保存されている。*HOX* 遺伝子は胎生期の細胞に空間的な位置情報を与え、形態形成のプログラムを実行に移すマスター調節遺伝子と考えられてきた。これまでの報告により、ヒト赤白血病細胞ならびに肺癌細胞を用いた遺伝子導入実験で *HOXD3* 遺伝子の強制発現が細胞接着や運動性を増強させることから *HOXD3* が転移・浸潤関連分子の転写を調節している可能性が示唆される。

悪性黒色腫は、メラノサイト由来の悪性腫瘍で、高い転移・浸潤性を示すことがひとつの特徴である。そこで、*HOXD3* ホメオボックス遺伝子が、悪性黒色腫細胞の転移・浸潤性に関与するの否かを調べるために、*HOXD3* を発現しているヒト悪性黒色腫細胞株 A375M に *HOXD3* アンチセンス発現ベクターを導入し、細胞の運動・浸潤性の変化およびそれに関与する遺伝子の発現変化について解析した。遺伝子導入操作後、ネオマイシンを含んだ選択培地で培養し、5系の *HOXD3* アンチセンスを高発現した細胞クローンを得た。親株、ネオマイシン耐性遺伝子のみを発現する2系の細胞クローン、ならびに *HOXD3* アンチセンス発現ベクターを導入したが発現の極めて低かった1クローンを対照群として用いた。

内皮下基底膜への浸潤モデルとして頻用されるマトリゲルへの浸潤性は、対照細胞クローンおよび親株に比べ、*HOXD3* アンチセンス発現クローンにおいて有意に低かった。細胞外マトリクス成分であるビトロネクチンおよびラミニン-1 に対する接触走化性、ならびにファゴカイネティック・トラック・アッセイで測定された細胞運動性もまた、*HOXD3* アンチセンスを発現させることによって有意な低下が認められた。また、マトリゲルおよびラミニン-1 上に細胞を播種した場合、親株および対照細胞クローンはすみやかに接着し、細胞突起を形成し伸展（細胞伸展）したのに対し、*HOXD3* アンチセンス発現株は細胞伸展を示すものが少なかった。

マトリゲルの主成分はラミニン-1 であるので、*HOXD3* アンチセンスの発現に

よる細胞浸潤、運動および伸展性の低下は、ラミニンに対する接着因子の発現低下によると考え、フローサイトメトリーあるいは RT-PCR 法でそれらの発現を解析した。その結果、ラミニンをリガンドとするインテグリンならびに 67 kDa ラミニンレセプターの発現は、すべてのクローンにおいて同程度であることが明らかとなった。次に、細胞浸潤に関与する細胞外マトリクス分解酵素とそのインヒビターの発現について調べたが、各クローン間において差を認めなかった。そこで、*HOXD3* アンチセンス発現クローンと対照クローン間における mRNA の発現パターンを比較するため cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、細胞骨格関連蛋白である *cdc42 interacting protein 4 (CIP4)*、*CIP4* とホモロジーの高い *KIAA0554* および *tropomyosin2(TPM2)* の発現が、*HOXD3* アンチセンスを発現させることによって増強することが明らかとなった。*TPM2* や *CIP4* の異常発現は、アクチン系系の再構成システムに異常をきたし、その結果、細胞伸展や細胞運動の低下を引き起こしていると考えられる。また、腫瘍関連抗原の一つである *melanoma-associated antigen (MAGE)-1* の発現も、*HOXD3* アンチセンスを発現させることによって増強することが明らかとなった。以上の結果より、ホメオボックス遺伝子 *HOXD3* は、浸潤・運動性を制御するマスター調節遺伝子として働いている可能性が示唆された。

公開發表において、副査の加藤教授より導入ベクター発現の強弱の原因および *in vitro* 浸潤能と臨床的な浸潤能の関連についての質問があった。それに対し、導入実験の手技、特徴などにつき適宜文献的知識も加えて説明した。次いで、主査の杉原教授より臨床応用の可能性など今後の展望についての質問があった。その質問に対しても、現在までの結果を踏まえた上で、*in vivo* の実験計画、臨床応用の可能性につき文献的考察を加えて解答した。また、副査の守内教授よりベクター導入により遺伝子発現に差の認められた *MAGE-1* についての質問があった。申請者は現在までに解明されている *MAGE-1* の事項につき解答し、*HOXD3* と *MAGE-1* の関連についての推論を述べた。また、会場の藤田先生からベクター導入後の細胞接着因子の機能変化につき質問があった。今回の研究では機能変化についての検討は行っていないが、今後の検討課題として興味深い旨を述べた。いずれの質問に対しても、申請者は自己の研究結果と文献的知識に基づいて概ね妥当に解答した。

この論文は、形態形成遺伝子 *HOXD3* と癌細胞の浸潤能の関与につき検討した点で高く評価され、今後の浸潤・転移のメカニズム解明が大いに期待できる。

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。