

学 位 論 文 題 名

ホメオボックス遺伝子 HOXD3 過剰発現による
細胞運動性の増強に果たすインテグリン $\beta 3$ の役割

学位論文内容の要旨

【緒言・目的】癌における転移の成立過程は、癌細胞の原発巣からの遊離に始まり、最終的には標的臓器における増殖、すなわち転移巣の形成で完了する。この癌の転移という現象は、基本的には、癌細胞の空間（位置）的移動と捉えることができる。細胞・組織の空間的移動は、胚発生時の形態形成過程において最もダイナミックに起こる。転移という現象を発生学の立場からみると、癌細胞による形態形成プログラムの部分的な借用あるいは誤用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として、ホメオボックス遺伝子が知られている。ホメオボックス遺伝子は、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群は 183 塩基のホメオボックスを共通にもつ転写調節因子遺伝子の集合体で、ホメオボックス遺伝子にはいくつかのファミリーが存在する。そのうち、ショウジョウバエの *antennapedia* (*Antp*) に属するものは Class I ホメオボックス遺伝子 (HOX) とよばれ、ヒトでは、現在までに 39 個同定されている。HOX 遺伝子は、胎生期の細胞に空間的位置情報を与え、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して働くが、脊椎動物では出生後も発現しており、造血組織、腎臓、肝臓、中枢神経などの組織で特徴的な発現パターンがみられる。一方、癌組織における HOX 遺伝子の発現パターンはその発生母地となった正常組織との間で異なることが最近明らかにされ、HOX 遺伝子の発現異常と発癌、転移・浸潤とを関連させて考えることが可能になってきた。

実際、Hamada らは、HOX 遺伝子のひとつである HOXD3 遺伝子をヒト肺癌細胞 A549 に導入・過剰発現させると、細胞運動能、浸潤能ならびに転移能が増強することを明らかにした。また、HOXD3 遺伝子の過剰発現によって多くの遺伝子の発現が変化することも見いだしており、HOXD3 過剰発現によって、1) インテグリン $\beta 3$ の発現を亢進すること；2) 細胞間接着因子の一つである E-カドヘリンの発現を消失させることを明らかにした。

インテグリンは主として細胞外基質への細胞の接着を媒介する分子であり、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体を形成する。インテグリン $\beta 3$ 鎖は $\alpha 11b$ 鎖あるいは αv 鎖と二量体を形成するが、HOXD3 過剰発現 A549 細胞においては αv 鎖とヘテロ二量体を形成する。インテグリン $\alpha v \beta 3$ は、1) 皮膚原発の悪性黒色腫が垂直方向への浸潤性増殖を示す時期に発現する；2) 骨転移性乳癌で発現頻度が高い；3) 前立腺癌細胞の悪性度と相関するなどの報告があり、インテグリン $\alpha v \beta 3$ が癌の転移・浸潤において何らかの役割を担っていると考えられている。

今回、HOXD3 過剰発現による細胞運動性の増強において、インテグリン $\beta 3$ がどのような役割を担っているのか検討した。

【材料と方法・結果】A549 細胞に HOXD3 遺伝子あるいはインテグリン $\beta 3$ 遺伝子の発現ベクターを導入し、HOXD3 過剰発現細胞ならびにインテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞を得た。対照としてネオマイシン (Neo) 耐性細胞および Neo/ハイグロマイシン (Hyg) 両耐性細胞を用いた。フローサイト

メトリーによる細胞表面の接着分子の解析から、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では HOXD3 過剰発現細胞と同様にインテグリン $\beta 3$ の発現が亢進し、インテグリン $\alpha v \beta 3$ のヘテロダイマーを形成していることが明らかとなった。また、ウエスタン・ブロットング法による解析では、HOXD3 過剰発現細胞でみられた E-カドヘリンの消失はインテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では認められなかった。

固相化した細胞外マトリクスに対する細胞遊走能（ハプトタキシス）および方向性をもたない細胞運動能、いわゆる random motility（ファゴカイネシス）を調べた。その結果、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞の運動性は、HOXD3 過剰発現細胞と同様に対照細胞のそれに比べて有意に高かった。また、ファゴカイネティック・アッセイ系に抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体を加えてインテグリン $\alpha v \beta 3$ 分子の機能阻害を行ったところ、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞および HOXD3 過剰発現細胞の運動性はほぼ完全に抑制された。

細胞同士が接着した状態からの運動性を測定する in vitro wound healing アッセイでは、HOXD3 過剰発現細胞＞インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞＞対照細胞の順序で高い運動性が認められた。

【考察】Hamada らは、ヒト肺癌細胞 A549 にホメオボックス遺伝子 HOXD3 を過剰発現させると、細胞の運動性が増強することを報告している。本研究では、3 種類の細胞運動アッセイにより、この細胞運動性の増強が HOXD3 過剰発現によって発現の亢進したインテグリン $\beta 3$ によって引き起こされることを明らかにした。

インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞は、HOXD3 過剰発現細胞と同様に、インテグリン $\alpha v \beta 3$ のヘテロ二量体からなるインテグリン分子を細胞表面に形成していた。インテグリン $\alpha v \beta 3$ のリガンドである細胞外マトリクスに対するハプトタキシスは、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞および HOXD3 過剰発現細胞でともに高かった。この事実は、HOXD3 過剰発現によるハプトタキシスの増強がインテグリン $\alpha v \beta 3$ によることを強く示唆している。2 つめのファゴカイネティック・トラック・アッセイで測定される方向性を持たない細胞運動性もまた、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では HOXD3 過剰発現細胞と同様に対照細胞に比べて高かった。この運動性は、抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体で完全に抑制されたことから、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 依存性であることが明らかとなった。さらに、最後の In vitro wound healing アッセイの結果から、E-カドヘリンを発現しているインテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞の運動性は、対照細胞よりは高いが、E-カドヘリンを消失した HOXD3 過剰発現細胞よりも低いことが明らかとなった。このアッセイは、コンフルエントになった状態の細胞に一筋の傷、すなわち wound をつけ、その wound edge からの細胞の遊離をみるもので、細胞間の接着性が強ければ wound edge から遊走可能な細胞の供給は少ないと考えられることから、上述の結果は細胞間の接着性の差違によるものと考えられた。

【まとめ】本研究の結果から、HOXD3 過剰発現によって生じたヒト肺癌細胞 A549 の運動性の増強は、HOXD3 過剰発現によって発現の亢進したインテグリン $\beta 3$ によることが明らかとなった。また、HOXD3 過剰発現による E-カドヘリンの発現消失は細胞集塊からの細胞の遊離を容易にしているものと推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 柴 田 健 一 郎

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

ホメオボックス遺伝子 HOXD3 過剰発現による 細胞運動性の増強に果たすインテグリン $\beta 3$ の役割

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

これまでの研究により、HOX 遺伝子のひとつである HOXD3 遺伝子をヒト肺癌細胞 A549 に導入・過剰発現させると、細胞運動能、浸潤能ならびに転移能が増強するとともに、インテグリン $\beta 3$ を含めた多くの転移関連遺伝子の発現が変化することが明らかにされている。本研究は、HOXD3 を過剰発現させた A549 細胞の細胞運動性の増強にインテグリン $\beta 3$ の発現亢進がどのように関わっているのかを検討したものである。

まず、ヒト肺癌細胞 A549 細胞に HOXD3 遺伝子あるいはインテグリン $\beta 3$ 遺伝子の発現ベクターを導入し、HOXD3 過剰発現細胞ならびにインテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞を得た。対照としてネオマイシン (Neo) 耐性細胞および Neo/ハイグロマイシン (Hyg) 両耐性細胞を用いた。まず、フローサイトメトリーにより細胞表面の接着分子の解析を行い、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では HOXD3 過剰発現細胞と同様にインテグリン $\beta 3$ の発現が亢進し、インテグリン $\alpha v \beta 3$ のヘテロダイマーを形成していることを確認した。ウエスタン・ブロッティング法による解析では、HOXD3 過剰発現細胞でみられた E-カドヘリンの消失は、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では認められなかった。

次に、得られた細胞株を用いて、固相化した細胞外マトリクスに対する細胞遊走能 (ハプトタキシス) および方向性をもたない細胞運動能、いわゆる random motility (ファゴカイネシス) を調べた。その結果、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞のヒトロネクチンとフィブリノーゲンに対するハプトタキシスおよびファゴカイネシスは、HOXD3 過剰発現細胞と同様、親株 A549 細胞や対照細胞のそれに比べて有意に高かった。また、ファゴカイネティック・アッセイ系に抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体を加えてインテグリン $\alpha v \beta 3$ 分子の機能阻害を行ったところ、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞および HOXD3 過剰発現細胞の運動性は親株 A549 細胞や対照細胞のレベルにまで抑制された。in vitro

wound healing アッセイでは、HOXD3 過剰発現細胞＞インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞＞対照細胞の順序で高い運動性が認められた。

以上の結果は次のように考察される。インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞は、HOXD3 過剰発現細胞と同様に、インテグリン $\alpha v \beta 3$ のヘテロ二量体からなるインテグリン分子を細胞表面に形成していた。インテグリン $\alpha v \beta 3$ のリガンドである細胞外マトリクスに対するハプトタキシスは、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞および HOXD3 過剰発現細胞でともに高かった。この事実は、HOXD3 過剰発現によるハプトタキシスの増強がインテグリン $\alpha v \beta 3$ によることを強く示唆している。2つめのファゴカイネティック・トラック・アッセイで測定される方向性を持たない細胞運動性もまた、インテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞では HOXD3 過剰発現細胞と同様に対照細胞に比べて高かった。この運動性は、抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体で完全に抑制されたことから、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 依存性であることが明らかである。さらに、in vitro wound healing アッセイの結果から、E-カドヘリンを発現しているインテグリン $\beta 3$ 過剰発現細胞の運動性は、対照細胞よりは高いが、E-カドヘリンを消失した HOXD3 過剰発現細胞よりも低いことが明らかとなった。このアッセイは、培養細胞がコンフルエントになった状態で一筋の傷をつけ、傷縁からの細胞の遊離をみるもので、細胞間の接着性が強ければ傷縁から遊走可能な細胞の供給は少ないと考えられることから、上述の結果は細胞間の接着性の差違によるものと考えられた。

これらのことから、HOXD3 過剰発現によって生じたヒト肺癌細胞 A549 の運動性の増強は、HOXD3 過剰発現によって発現の亢進したインテグリン $\beta 3$ によることが明らかとなった。また、HOXD3 過剰発現による E-カドヘリンの発現消失は細胞集塊からの細胞の遊離を容易にしているものと推測された。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、HOXD3 過剰発現細胞における運動性の増強は HOXD3 過剰発現によって発現の亢進したインテグリン $\beta 3$ によって引き起こされることを示し、癌細胞における形態形成遺伝子の発現異常がその支配下にある細胞接着因子の発現を変化させ、転移形質のひとつである細胞運動能を増強することを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。