

色素性母斑および悪性黒色腫における PAX 遺伝子の発現

学位論文内容の要旨

緒言

癌の発生ならびに悪性化は、癌細胞による形態形成プログラムの部分的な借用現象と捉えることができる。そして形態形成のマスター調節因子として働く遺伝子群には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、転写因子をコードしており、その下位にある多くの標的遺伝子の発現を調節しながら形態形成を進めていく。近年、様々なホメオボックス遺伝子の発現異常と、癌化及びその後の悪性化とを関連付けて考えられるようになってきた。

PAX 遺伝子もまたホメオボックス遺伝子ファミリーに属し、ショウジョウバエの分節遺伝子である *paired* のヒトホモログとして同定された遺伝子である。ヒトの PAX 遺伝子は、9 種類 (PAX1-9) が同定されており、ペアードボックスと呼ばれる領域を共通に持っている。この部分は特定の塩基配列を認識する DNA 結合ドメイン (ペアードドメイン) をコードしている。

これまで PAX 遺伝子の発現異常は、遺伝病の原因遺伝子という観点から注目されてきたが、癌においても特定の PAX 遺伝子の発現に異常がみられることが報告されている。

本研究では、9 種類の PAX 遺伝子の mRNA レベルでの発現量を定量するシステムを確立し、そのシステムを用いて、神経堤由来細胞より発生する良性の色素性母斑と悪性黒色腫との間で PAX 遺伝子の発現を比較し、癌化・悪性化における PAX 遺伝子の役割について検討した。

材料と方法

1. 臨床検体：インフォームド・コンセントの得られた患者より切除された悪性黒色腫 16 検体、色素性母斑 5 検体を対象とした。
2. ヒト悪性黒色腫細胞株：MMIV, A375M, MeWo, C8161, AKI, G361, MMac, GAK を使用した。
4. PAX4 発現ベクターの細胞内への導入：リポフェクション法にて行った。
5. RNA 抽出と cDNA 化：トライゾールを使用して、臨床検体から全 RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を合成した。
6. 定量的リアルタイム RT-PCR：PAX9 遺伝子、 β -actin にそれぞれのプライマー対を作成。サイバーグリーン蛍光色素と ABI PRISM 7900HT を使用して定量的 RT-PCR を行った。内因性コントロール遺伝子 (β -actin) の発現量で、標的 PAX 遺伝子の発現量を補正した相対比を用いた。
7. 細胞増殖性の検討：悪性黒色腫細胞 (C8161 および MeWo) について MIT アッセイ変法を行った。
8. 細胞周期の解析：propidium iodide 染色後フローサイトメトリーにて検討した。

9. DNA 合成能の解析：BrdU を取り込ませ、抗 BrdU 抗体を用いた ELISA で定量した。

10. 脱 DNA メチル化の有無の解析：5-azacytidine で処理し、脱 DNA メチル化した細胞より全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて *PAX4* の発現量を測定した。

結果および考察

本研究では、癌化ならびに悪性化は癌細胞による形態形成プログラムの部分的な借用現象と捉え、形態形成遺伝子のマスター調節遺伝子のひとつである 9 種類の *PAX* 遺伝子の mRNA レベルでの発現量を、色素性母斑と悪性黒色腫間で比較した。その結果、色素性母斑組織は *PAX3*, *PAX4* および *PAX9* 遺伝子を発現しており、悪性黒色腫では *PAX4* および *PAX9* の発現が色素性母斑に比べ低下していることを見出した。

これまでの癌における *PAX* 遺伝子の役割に関する報告のほとんどは、*PAX* 遺伝子が癌化あるいは悪性化に対して促進的に作用することを述べている。これらの報告はすべて *PAX* 遺伝子が癌遺伝子としての役割を担っていることを示唆するものである。一方、*PAX* 遺伝子が癌抑制遺伝子的に働くことを示した報告としては、*PAX2* および *PAX8* によるウィルムス腫瘍の癌抑制遺伝子である *WT1* の転写活性化が論じられているだけである。

PAX4 および *PAX9* 遺伝子は、神経堤由来の正常細胞である色素性母斑では高い発現がみられ、神経堤由来の悪性腫瘍である悪性黒色腫組織および培養細胞株では著しい発現の低下がみられたことから、両 *PAX* 遺伝子は悪性黒色腫においては癌抑制遺伝子として働いている可能性を考えた。そこで、本研究では *PAX4* 遺伝子に焦点を当て、この遺伝子の悪性黒色腫における発現低下あるいは消失の生物学的意義を明らかにするために、悪性黒色腫細胞に *PAX4* 遺伝子を強制発現させ、その生物学的性状の変化について観察した。まず悪性黒色腫細胞株 C8161 および MeWo ともに *PAX4* を過剰発現させると、増殖能が低下することが明らかとなった。さらに PI 染色後のフローサイトメトリー解析から、*PAX4* の過剰発現は細胞周期を G0/G1 期で停止させている可能性が示唆された。また *PAX4* 過剰発現により DNA 合成能が低下した。これはおそらく G1 期から S 期への移行が妨げられた結果と考えられる。これらの事実は、*PAX4* が悪性黒色腫において癌抑制遺伝子として働きうることを強く示唆している。

G1 から S 期への移行には、p53 と RB の 2 つの経路が関与することが知られているが、本実験に使用した細胞株のうち MeWo は、変異型 p53 遺伝子のみを有しており、p53 経路による細胞周期の制御機構は破綻していると考えられる。両細胞株とも *PAX4* 過剰発現によって同様の増殖抑制および G0/G1 アレストを示したことから、*PAX4* による細胞周期の停止には p53 経路ではなく RB 経路が関与していると考えられる。また、転写因子としてではなく、*PAX4* 蛋白が RB 経路に関わる分子の機能を直接修飾している可能性も考えられる。今後 *PAX4* の標的遺伝子の探索を行う予定である。

そして DNA の脱メチル化剤である 5-Aza 処理によって両細胞株ともに *PAX4* の発現が誘導されたことから、おそらく悪性黒色腫における *PAX4* 遺伝子の発現低下は DNA のメチル化に起因するものと考えられた。今後、*PAX4* 遺伝子のメチル化部位を含め悪性黒色腫における *PAX4* 遺伝子のサイレンシング機序の詳細についても解析を進めていきたい。

結語

悪性黒色腫組織 (16 例)、色素性母斑組織 (5 例) および悪性黒色腫細胞株 (8 株) で 9 種の *PAX* 遺伝子の発現を解析した。色素性母斑は、9 種の *PAX* 遺伝子のうち *PAX3*, 4 および 9 を発現していた。一方、悪性黒色腫組織ならびに細胞株の *PAX4* および 9 の発現は、色素性母斑に比べ有意に低下していた。他の *PAX* 遺伝子の発現は、全てにおいてなかった。*PAX4* 過

剰発現細胞の増殖は、対照細胞に比べ有意に抑制されることが明らかとなった。更に、*PAX4* 過剰発現細胞では G0/G1 期にある細胞の割合が増加していた (G1 アレスト)。よって *PAX4* の発現の低下が、悪性黒色腫の細胞増殖を促進している可能性が示唆された。また、悪性黒色腫における *PAX4* 遺伝子の発現低下の原因として DNA のメチル化の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 近 藤 哲

学位論文題名

色素性母斑および悪性黒色腫における *PAX* 遺伝子の発現

癌の発生ならびに悪性化は、癌細胞による形態形成プログラムの部分的な借用現象と捉えることができる。そして形態形成のマスター調節因子として働く遺伝子群には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、転写因子をコードしており、その下位にある多くの標的遺伝子の発現を調節しながら形態形成を進めていく。近年、様々なホメオボックス遺伝子の発現異常と、癌化及びその後の悪性化とを関連付けて考えられるようになってきた。

PAX 遺伝子もまたホメオボックス遺伝子ファミリーに属し、ショウジョウバエの分節遺伝子である *paired* のヒトホモログとして同定された遺伝子である。ヒトの *PAX* 遺伝子は、9種類 (*PAX1*~*9*) が同定されており、ペアードボックスと呼ばれる領域を共通に持っている。この部分は特定の塩基配列を認識する DNA 結合ドメイン (ペアードドメイン) をコードしている。

本研究では、9種類の *PAX* 遺伝子の mRNA レベルでの発現量を定量するシステムを確立し、そのシステムを用いて、神経堤由来細胞より発生する良性の色素性母斑と悪性黒色腫との間で *PAX* 遺伝子の発現を比較し、癌化・悪性化における *PAX* 遺伝子の役割について検討した。

その結果、色素性母斑組織は *PAX3*, *PAX4* および *PAX9* 遺伝子を発現しており、悪性黒色腫では *PAX4* および *PAX9* の発現が色素性母斑に比べ低下していることを見出した。

このことから、両 *PAX* 遺伝子は悪性黒色腫においては癌抑制遺伝子として働いている可能性を考えた。そこで、本研究では *PAX4* 遺伝子に焦点を当て、この遺伝子の悪性黒色腫における発現低下あるいは消失の生物学的意義を明らかにするために、悪性黒色腫細胞に *PAX4* 遺伝子を強制発現させ、その生物学的性状の変化について観察した。まず悪性黒色腫細胞株 C8161 および MeWo とともに *PAX4* を過剰発現させると、増殖能が低下することが明らかとなった。さらに PI 染色後のフローサイトメトリー解析から、*PAX4* の過剰発現は細胞周期を G0/G1 期で停止させている可能性が示唆された。また *PAX4* 過剰発現により DNA 合成能が低下した。これはおそらく G1 期から S 期への移行が妨げられた結果と考えられる。これらの事実は、*PAX4* が悪性黒色腫において癌抑制遺伝子として働きうることを強く示唆している。

G1 から S 期への移行には、p53 と RB の2つの経路が関与することが知られているが、本実験に使用した細胞株のうち MeWo は、変異型 p53 遺伝子のみを有しており、p53 経路による細

胞周期の制御機構は破綻していると考えられる。両細胞株とも PAX4 過剰発現によって同様の増殖抑制および G0/G1 アレストを示したことから、PAX4 による細胞周期の停止には p53 経路ではなく RB 経路が関与していると考えられる。また、転写因子としてではなく、PAX4 蛋白が RB 経路に関わる分子の機能を直接修飾している可能性も考えられる。今後 PAX4 の標的遺伝子の探索を行う予定である。

そして DNA の脱メチル化剤である 5-Aza 処理によって両細胞株ともに PAX4 の発現が誘導されたことから、おそらく悪性黒色腫における PAX4 遺伝子の発現低下は DNA のメチル化に起因するものと考えられた。今後、PAX4 遺伝子のメチル化部位を含め悪性黒色腫における PAX4 遺伝子のサイレンシング機序の詳細についても解析を進めていきたい。

公开发表に当たり、副査近藤哲教授より、1) 色素性母斑から悪性黒色腫が発生するのか、2) 対照組織として色素性母斑で良いのか、3) PAX9 の検討はしたのかについて質問があった。次いで、副査守内哲也教授より 1) PAX 遺伝子が下流の癌遺伝子に影響を及ぼす報告はあるのか、2) RB 経路と PAX4 について何か検討しているのか、3) PAX9 の今後の研究の進め方について質問があった。次に主査山本有平教授より、1) PAX3 が悪性黒色腫の生存に必要とはどういうことか、2) PAX 遺伝子と予後、病期の関係はあるのか、3) この研究の臨床応用についての質問とコメントがあった。いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、PAX4 遺伝子が悪性黒色腫において癌抑制遺伝子として働いていることをはじめて明らかにした点で高く評価され、今後悪性黒色腫の病態の解明や新たな治療法の開発につながることを期待される。

審査員一同、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や所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。