

## 学位論文題名

## ヒト神経芽腫細胞 GOTO の分化における

## HOX 遺伝子の役割

## 学位論文内容の要旨

【目的】 癌における組織構築の乱れや転移・浸潤あるいは胎児性蛋白の産生などは、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。実際、形態形成のマスター調節因子として働く HOX 遺伝子の発現異常が、乳癌、腎癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など多くの癌において報告されてきている。さらに、特定の HOX 遺伝子の発現異常が、癌細胞の増殖性、運動性、浸潤性、転移性などに影響を及ぼすことも知られている。これらの事実は、HOX 遺伝子の発現異常が、癌の発生や癌細胞の悪性形質の発現に深く関与することを示唆している。

神経芽細胞腫は、小児に多い癌のひとつであり、その悪性度は肝転移などを起こすものから自然退縮してしまうものまで多様である。また、神経芽細胞腫由来の培養株は、特定の培養条件下で神経細胞様あるいはシュワン細胞様細胞へ分化することが知られている。本研究では、癌化あるいは癌の悪性化とは方向性の異なる癌細胞の分化という現象に HOX 遺伝子が関与しているのかを明らかにするために、ヒト神経芽腫細胞を分化誘導剤で処理し、HOX 遺伝子の発現変化について調べた。

【方法および結果】 ヒト神経芽腫 GOTO 細胞を分化誘導剤 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) あるいは dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) で処理すると、それぞれシュワン細胞様あるいは神経様細胞へ分化した。すなわち、BrdU で処理すると、扁平でやや大型の多角形を呈するものが多く観察され、シュワン細胞のマーカーとなる遺伝子 (*S100 $\beta$*  および *myelin basic protein (MBP)*) の発現が亢進した。一方、dbcAMP で処理すると、細長い細胞突起を伸ばした紡錘形を呈した細胞が多くなり、神経細胞のマーカーとなる *neuron-specific enolase (NSE)* 遺伝子の発現が亢進した。シュワン細胞様あるいは神経様細胞への分化に伴う HOX 遺伝子の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法で調べたところ、39 個の HOX 遺伝子のうち、シュワン細胞様細胞への分化に際しては *HOXC6* および *HOXC11* の発現亢進がみられた。一方、神経様細胞への分化に際しては、*HOXC6*, *HOXC10* および *HOXC11* の発現が亢進した。

*HOXC6* 遺伝子の転写産物には 2 つのアイソフォームの存在が知られている。そこで、シュワン細胞様あるいは神経様細胞への分化に伴い発現が亢進した *HOXC6* のアイソフォームを同定するために、RT-duplexPCR を行った。その結果、GOTO 細胞は *HOXC6* の両アイソフォームを発現しており、シュワン細胞様細胞への分化に際しては isoform 1 の発現が亢進し、一方、神経様細胞への分化に際しては isoform 2 の発現が亢進することが明らかとなった。

分化誘導剤処理によって発現の亢進した HOX 遺伝子が、GOTO 細胞のシュワン細胞様あるいは神経様細胞への分化に関与しているのか否かを明らかにするために、*HOXC6* あるいは *HOXC11* 遺伝子を GOTO 細胞に強制発現させ、分化マーカーであ

る *NSE*, *S100β* および *MBP* の発現変化を調べた。 *HOXC6* isoform 1, *HOXC6* isoform 2 および *HOXC11* の発現ベクターを GOTO 細胞に導入し、48 時間後に RNA を抽出し、 *NSE*, *S100β* および *MBP* の発現を RT-duplexPCR 法で解析した。各発現ベクターを単独で導入した際には *HOXC11* 発現ベクター導入細胞でのみ *S100β* 遺伝子の弱い発現が認められた。一方、 *HOXC11* と *HOXC6* isoform 1 あるいは *HOXC6* isoform 2 とを共導入すると、 *HOXC11* と *HOXC6* isoform 1 の両方を導入した細胞で *S100β* 遺伝子の高い発現が認められた。次に、 *HOXC6* および *HOXC11* による *S100β* 遺伝子の転写活性化に必要な転写制御領域を調べるために、転写開始点の上流-1014 から+71 のプロモーター領域を含む DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド pGL3/basic-*S100β*-(-1014~+71) を GOTO 細胞に導入した。同時に *HOXC6* isoform 1, *HOXC6* isoform 2, *HOXC11* の発現プラスミドあるいはそれらのコントロールプラスミドも導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、 *HOXC6* isoform 1 と *HOXC11* を共に発現させた GOTO 細胞は、コントロールプラスミド導入細胞の約 6 倍のルシフェラーゼ活性を示した。 *HOXC11* のみを、あるいは *HOXC11* と *HOXC6* isoform 2 とを共発現させた GOTO 細胞はコントロールに比べ、約 4 倍のルシフェラーゼ活性を示した。また、 *HOXC6* isoform 2 のみを発現させた GOTO 細胞のルシフェラーゼ活性は、コントロール細胞と同じであったが、 *HOXC6* isoform 1 のみを発現させた場合には、コントロール細胞の約 2.5 倍であった。

【考察】以上の結果は、GOTO 細胞を分化誘導剤 BrdU あるいは dbcAMP で処理すると、それぞれシュワン細胞様あるいは神経様細胞に分化すること、ならびに *HOXC6* isoform 1 と *HOXC11* の発現亢進が GOTO 細胞のシュワン細胞様細胞への分化、少なくともそのマーカーとなる *S100β* 遺伝子の発現誘導に関与することを強く示唆している。さらに、ルシフェラーゼを利用したレポーターアッセイによって、 *HOXC6* あるいは *HOXC11* による *S100β* 遺伝子の転写活性化に関わる制御領域が *S100β* 遺伝子の転写開始点からその上流 1,014 bp の領域内にあることを明らかにした。このことは、 *HOXC6* あるいは *HOXC11* が *S100β* 遺伝子に対してプロモーター活性を有することを示唆している。 *HOXC6* あるいは *HOXC11* 遺伝子を導入した GOTO 細胞の内在性 *S100β* 遺伝子の発現を調べた実験と異なり、レポーターアッセイでは *HOXC6* isoform 1 のみの強制発現でも *S100β* 遺伝子に対するプロモーター活性が見い出された。また同様のことが *HOXC6* isoform 2 と *HOXC11* とを共発現させた GOTO 細胞でも認められた。これらの矛盾点は、それぞれのアッセイ感度の違いによるのかもしれない。あるいは *S100β* 遺伝子の-1014 から+71 以外の領域に *HOXC6* isoform 1 単独によるプロモーター活性を抑制する部位や *HOXC11* によるプロモーター活性を抑制する *HOXC6* isoform 2 結合部位があるのかもしれない。

dbcAMP 処理による神経様細胞への分化に伴い発現の亢進した *HOXC6* isoform 2 および *HOXC11* を GOTO 細胞に強制発現させても神経細胞のマーカーである *NSE* 遺伝子の発現に変化はみられなかった。 dbcAMP 処理によって *HOXC10* の発現も亢進することから、 *NSE* の発現には両 *HOX* 遺伝子に加え *HOXC10* の発現も必要であるのかもしれない。また、これらの *HOX* 遺伝子は、 *NSE* の発現には関与しておらず、他の神経様細胞の分化形質の発現に何らかの役割を演じている可能性も考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 葛 巻 暹  
副 査 教 授 佐々木 文章

学 位 論 文 題 名

## ヒト神経芽腫細胞 GOTO の分化における *HOX* 遺伝子の役割

癌における組織構築の乱れや転移・浸潤あるいは癌胎児性蛋白の産生などは、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。実際、形態形成のマスター調節因子として働く *HOX* 遺伝子の発現異常が、乳癌、腎癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、悪性黒色腫など多くの癌において報告されてきている。これらの事実は、*HOX* 遺伝子の発現異常が癌の発生や癌細胞の悪性形質の発現に深く関与することを示唆している。神経芽細胞腫は小児に多い癌のひとつであり、その悪性度は肝転移などを起こすものから自然退縮してしまうものまで多様である。また、神経芽細胞腫由来の培養株は、特定の培養条件下で神経細胞様あるいはシュワン細胞様細胞へ分化することが知られている。本研究では、癌化あるいは癌の悪性化とは方向性の異なる癌細胞の分化という現象に *HOX* 遺伝子が関与しているのかを明らかにするため、ヒト神経芽腫細胞を分化誘導剤で処理して *HOX* 遺伝子の発現変化を調べた。

ヒト神経芽腫 GOTO 細胞を分化誘導剤 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) で処理すると扁平でやや大型の多角形を呈するものが多く観察され、シュワン細胞のマーカーとなる遺伝子 *S100β* および *myelin basic protein (MBP)* の発現が亢進した。一方、dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) で処理すると、細長い細胞突起を伸ばした紡錘形を呈した細胞が多くなり、神経細胞のマーカーとなる *neuron-specific enolase (NSE)* 遺伝子の発現が亢進した。シュワン細胞様あるいは神経様細胞への分化に伴う *HOX* 遺伝子の発現変化を mRNA レベルで調べたところ、39 個の *HOX* 遺伝子のうち、シュワン細胞様細胞への分化に際しては *HOXC6 isoform 1* および *HOXC11* の発現亢進がみられた。一方、神経様細胞への分化に際しては、*HOXC6 isoform 2*, *HOXC10* および *HOXC11* の発現が亢進した。次に、分化誘導剤処理によって発現の亢進した *HOX* 遺伝子を強制的に GOTO 細胞に発現させ、分化マーカー遺伝子の発現変化を解析した。その結果、*HOXC11* と *HOXC6 isoform 1* の両方を導入した細胞では、*S100β* 遺伝子の高い発現が認められた。さらに、両 *HOX* 遺伝子を導入した GOTO 細胞は、*S100β* 遺伝子に対する高いプロモーター活性を有することがルシフェラーゼを利用したレポーターアッセイによって明らかとなった。以上の結果は、GOTO 細胞を分化誘導剤 BrdU あるいは dbcAMP で処理すると、それぞれシュワン細胞様あるいは神経様細胞に分化すること、ならびに *HOXC6 isoform 1* と *HOXC11* の発現亢進が GOTO 細胞のシュワン細胞様細胞への分

化, 少なくともそのマーカーとなる *S100β* 遺伝子の発現誘導に関与することを強く示唆している。

公开发表において, 副査の葛巻暹教授から, 1) 分化誘導剤処理によって発現の低下した *HOX* 遺伝子の有無, 2) 分化に伴う細胞増殖性の変化, および 3) 国内外における神経芽腫細胞株の分化と *HOX* 遺伝子の発現を検討した報告例の有無についての質問があった。続いて, 副査の佐々木文章教授より, 1) IMR32 細胞など神経芽腫細胞の分化実験にしばしば用いられる細胞株を対象としなかった理由, 2) *HOX* 遺伝子の強制発現による形態学的変化, 3) 神経芽細胞腫の悪性度のマーカーとなる *N-myc* 遺伝子の発現, および 4) 神経芽細胞腫の臨床検体における *HOX* 遺伝子の発現解析についての質問があった。最後に, 主査の守内哲也教授から, 分化誘導剤で処理した実験では *S100β*, *MBP* および *NSE* 遺伝子の発現が亢進したが, *HOX* 遺伝子導入実験では *S100β* 遺伝子のみの発現亢進がみられた理由に関して質問があった。いずれの質問に対しても, 申請者は主旨をよく理解し自らの実験データと文献的考察を交えて適切な回答を行った。

この論文は, ヒト神経芽細胞腫の分化に関与する遺伝子を明らかにした点で高く評価され, 今後この成果は神経芽細胞腫の分化メカニズムの解明に大いに役立つことが期待される。

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。