

学 位 論 文 題 名

Disordered expression of HOX genes in
human non-small cell lung cancer

(ヒト非小細胞肺癌におけるHOX遺伝子の発現)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

癌における組織構築の乱れや浸潤・転移は、癌細胞による胚発生時の形態形成プログラムの借用現象と捉えることができる。胚発生過程において形態形成プログラムを実行するマスター調節因子に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、180塩基からなるホメオボックスを持ち、ホメオボックスは60個のアミノ酸からなるホメオドメインをコードしている。ホメオボックス蛋白は、ホメオドメインを介して塩基配列特異的にDNAに結合し、標的遺伝子の発現を制御しながら形態形成を進めていく。ホメオボックス遺伝子のひとつのファミリーに属するHOX遺伝子は、ヒトでは39個同定されており、A、B、C、Dの4つのクラスターを形成している。各クラスターにはパラログ番号の若いHOX遺伝子から順番にゲノムの3'側から5'側に向けて9から11個並んでいる。胚発生の形態形成過程において、HOX遺伝子はクラスターの3'側の遺伝子が体のより頭側で発現し、5'側にある遺伝子がより尾側で発現する。また、時間的にも3'側の遺伝子から順序よく発現していく。このように、HOX遺伝子は空間的・時間的に規則正しい発現パターンを示す。

最近、39個HOX遺伝子が胎生期だけでなく成体においても臓器・組織に特徴的な発現パターンを示すこと、ならびにHOX遺伝子の発現異常と癌の発生や進展との関連性が報告されてきている。腎癌、大腸癌、膀胱癌、悪性黒色腫および前立腺癌などのHOX遺伝子の発現は、正常組織における発現と異なることが報告されている。しかしながら、これらの癌組織におけるHOX遺伝子の発現解析は、特定のHOX遺伝子のみを対象にしていたり、あるいは定性的な発現解析法によるものが多く、39個のHOX遺伝子すべての発現を定量的に解析したものはきわめて少ない。本研究では、肺癌におけるHOX遺伝子の役割をより明らかにするために、リアルタイムPCRを基盤とした定量性に優れた発現解析法を用いて、ヒト非小細胞肺癌と非癌部組織における39個のHOX遺伝子の発現を調べた。さらに、非小細胞肺癌組織におけるHOX遺伝子の発現パターンと臨床病理学的因子との関連性について検討した。

【対象と方法】

北海道大学病院第2外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者から手術切除された癌組織41例(腺癌28例、扁平上皮癌13例)と非癌部組織15例を対象とした。

手術切除組織より全RNAを抽出し、逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型に各HOX

遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った。各 HOX 遺伝子の発現量は内部標準として用いた β -actin 遺伝子の発現量で各 HOX 遺伝子の発現量を補正した相対比で表した。免疫組織化学的解析は、一次抗体にヤギ抗ヒト HOXA5 (あるいは HOXA10) ポリクローナル抗体を用いた SAB 法で行った。統計学的有意差は StatView 5.0 を用いてノンパラメトリック解析である Mann-Whitney U test、Kruskal-Wallis rank test、あるいは Spearman rank correlation test を行い、p 値が 0.01 未満を有意差ありと判定した。

【結果】

非癌部組織ではクラスター B の 3'側に位置する HOXB2、B3、B4、B5 および B6 と HOXA3 の発現が高く、クラスターの 5'側に位置するパラログ 9 から 13 の HOX 遺伝子の発現はみられないか、あるいはきわめて低かった。

癌組織と非癌部組織の HOX 遺伝子の発現を比較すると、HOXA1、A5、A10 および C6 の発現に有意な差を認めた。扁平上皮癌では、これらの 4 つの HOX 遺伝子の発現は非癌部組織と比較し有意に高かった。一方、腺癌では HOXA5 および A10 の 2 つの HOX 遺伝子の発現が非癌部組織と比較し有意に高かった。腺癌と扁平上皮癌の HOX 遺伝子の発現を比較すると、HOXA1、D9、D10、および D11 の発現が扁平上皮癌において有意に高かった。

次に、癌組織における HOX 遺伝子の発現と臨床病理学的因子との関連性について検討した。リンパ節転移の有無によって各 HOX 遺伝子の発現に有意差を認めなかったが、腺癌においてリンパ節陽性例の HOXB7 の発現はリンパ節転移陰性例よりも低い傾向が見られた ($p=0.0295$)。腫瘍マーカーである CEA の値と HOXD3 および D4 の発現との間に弱い相関を認めた。その他の腫瘍マーカー (SCC、NSE、CYFRA21-1 および ProGRP)、病期分類、組織型および喫煙歴と各 HOX 遺伝子の発現との間には関連性を認めなかった。

腺癌および扁平上皮癌において非癌部組織と比較し発現の高かった HOXA5 および A10 について蛋白レベルでの発現を調べるために免疫組織化学的検討を行った。HOXA5、A10 ともに癌細胞と気管支上皮の細胞質が染色され、肺胞上皮や間質細胞は染色されなかった。また、HOXA5、A10 ともに扁平上皮化生においても染色された。

【考察】

本研究では、腺癌および扁平上皮癌ともに癌組織の HOXA5 および A10 の発現レベルは、非癌部組織に比べ、有意に高いことが明らかとなった。HOXA5 は癌抑制遺伝子 p53 の転写と機能を促進しているという報告がある。また、HOXA10 は、p53 の標的遺伝子である p21 の転写のアクチベーターとして働き、細胞周期を停止させ分化を促すことが報告されている。これらの報告は、HOXA5 および A10 が癌抑制遺伝子として機能する可能性を示唆しており、癌組織でこれらの発現亢進がみられた本研究結果とは一見矛盾している。しかしながら、免疫組織化学的解析は、両 HOX 蛋白質ともに、癌細胞の核ではなく細胞質に存在することを示しており、これらが転写因子として働いていないことを示唆している。HOX 蛋白質は転写因子本体として働くだけでなく、他の転写因子と複合体を形成し転写活性化能を調節する作用も知られている。HOXA5 および A10 蛋白質は、細胞質に留まることによって癌抑制遺伝子産物の働きを妨げているのかもしれない。扁平上皮癌で発現が高かった HOXA1 および HOXC6 は、それぞれ乳癌および前立腺癌細胞において細胞増殖と細胞死からの回避に対し促進的に働くことが示されているので、扁平上皮癌においても増殖・生存に対し有利な条件を提供している可能性が考えられる。現時点では、個々の HOX 遺伝子が肺癌の発生あるいは進展にどのように関わって

いるのか推測の域を出ないが、本研究によって肺癌関連 HOX 遺伝子を見出せたことは、発生生物学的観点から肺癌を理解するにあたって大いに役立つことが期待される。

【結語】

本研究によって、非小細胞肺癌における HOX 遺伝子の発現異常が、癌の発生あるいは進展だけでなく、腺癌や扁平上皮癌などの組織学的多様性にも関与し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 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer

(ヒト非小細胞肺癌におけるHOX遺伝子の発現)

癌における組織構築の乱れや浸潤・転移は、癌細胞による胚発生時の形態形成プログラムの借用現象と捉えることができる。胚発生過程において形態形成プログラムを実行するマスター調節遺伝子に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のひとつのファミリーに属するHOX遺伝子は、胎生期だけでなく成体においても臓器・組織に特徴的な発現パターンを示すこと、ならびにHOX遺伝子の発現異常と癌の発生や進展との関連性が報告されてきている。本研究では、非小細胞肺癌におけるHOX遺伝子の発現を調べ、臨床病理学的因子との関連を検討した。

北海道大学病院第2外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者41検体(腺癌28例、扁平上皮癌13例)と非癌部組織15検体を対象とした。手術切除組織より全RNAを抽出し、逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型に各HOX遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的リアルタイムPCRを行った。各HOX遺伝子の発現量は内部標準として用いた β -actin遺伝子の発現量で各HOX遺伝子の発現量を補正した相対比で表した。免疫組織化学的解析は、一次抗体にヤギ抗ヒトHOXA5(あるいはHOXA10)ポリクローナル抗体を用いたSAB法で行った。統計学的解析にはMann-Whitney U test、Kruskal-Wallis rank test、あるいはSpearman rank correlation testを用い、p値が0.01未満を有意差ありと判定した。

非癌部組織ではクラスターBの3'側に位置するHOXB2、B3、B4、B5およびB6とHOXA3の発現が高く、クラスターの5'側に位置するパラログ9から13のHOX遺伝子の発現はみられないか、あるいはきわめて低かった。癌組織と非癌部組織のHOX遺伝子の発現を比較すると、HOXA1、A5、A10およびC6の発現に有意な差を認めた。扁平上皮癌では、これらの4つのHOX遺伝子の発現は非癌部組織と比較し有意に高かった。一方、腺癌ではHOXA5およびA10の2つのHOX遺伝子の発現が非癌部組織と比較し有意に高かった。腺癌と扁平上皮癌のHOX遺伝子の発現を比較すると、HOXA1、D9、D10、およびD11の発現が扁平上皮癌において有意に高かった。次に、癌組織におけるHOX遺伝子の発現と臨床病理学的因子との関連性について検討した。リンパ節転移の有無によって各HOX遺伝子の発現に有意差

を認めなかったが、腺癌においてリンパ節転移陽性例の HOXB7 の発現はリンパ節転移陰性例よりも低い傾向が見られた。腫瘍マーカーである CEA の値と HOXD3 および D4 の発現との間に弱い相関を認めた。その他の腫瘍マーカー (SCC、NSE、CYFRA21-1 および ProGRP)、病期分類、組織型および喫煙歴と各 HOX 遺伝子の発現との間には関連性を認めなかった。腺癌および扁平上皮癌において非癌部組織と比較し発現の高かった HOXA5 および A10 について蛋白レベルでの発現を調べるために免疫組織化学的検討を行った。HOXA5、A10 ともに癌細胞の細胞質が染色された。また、HOXA5、A10 ともに扁平上皮化生においても染色された。

本研究では、腺癌および扁平上皮癌ともに癌組織の HOXA5 および A10 の発現レベルは、非癌部組織に比べ、有意に高いことが明らかとなった。HOXA5 は癌抑制遺伝子 p53 の転写と機能を促進しているという報告がある。また、HOXA10 は、p53 の標的遺伝子である p21 の転写のアクチベーターとして働き、細胞周期を停止させ分化を促すことが報告されている。これらの報告は、HOXA5 および A10 が癌抑制遺伝子として機能する可能性を示唆しており、癌組織でこれらの発現亢進がみられた本研究結果とは一見矛盾している。しかしながら、免疫組織化学的解析は、両 HOX 蛋白質ともに、癌細胞の核ではなく細胞質に存在することを示しており、これらが転写因子として働いていないことを示唆している。HOX 蛋白質は転写因子本体として働くだけでなく、他の転写因子と複合体を形成し転写活性化能を調節する作用も知られている。HOXA5 および A10 蛋白質は、細胞質に留まることによって癌抑制遺伝子産物の働きを妨げている可能性がある。扁平上皮癌で発現が高かった HOXA1 および C6 は、それぞれ乳癌および前立腺癌細胞において細胞増殖と細胞死からの回避に対し促進的に働くことが示されているので、扁平上皮癌においても増殖・生存に対し有利な条件を提供している可能性が考えられる。現時点では、個々の HOX 遺伝子が肺癌の発生あるいは進展にどのように関わっているのか推測の域を出ないが、本研究によって肺癌関連 HOX 遺伝子を見出したことは、発生生物学的観点から肺癌を理解するにあたって大いに役立つことが期待される。

口頭発表において、副査近藤教授より、HOX 遺伝子の発現と予後との関係、HOX 遺伝子の臨床応用、リンパ節転移の術前予測への応用について質問があった。続いて副査守内教授より、HOXA5 および A10 の癌抑制遺伝子としての報告と本研究結果との関係、HOXD3 および D4 の発現の相関性、CEA と肺癌の予後の関係について質問があった。最後に主査秋田教授より、過去の肺癌における HOX 遺伝子に関する報告、HOX 遺伝子の遺伝子変異の報告、過去のヒト肺癌細胞株を用いた HOXD3 に関する研究結果と本研究の HOXD3 に関するデータとの関連、HOX 遺伝子の前癌病変での発現、HOX 遺伝子の RNA レベルと蛋白質レベルでの発現の一致性、肺癌における今後の HOX 遺伝子の基礎研究の展望について、質問があったが、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研究データと文献的考察を混じえて適切に回答した。

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と判定した。