

学 位 論 文 題 名

Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes
in human esophageal squamous cell carcinoma

(ヒト食道扁平上皮癌における HOX 及び ParaHOX 遺伝子の発現異常)

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、細胞のもつ空間的位置情報の異常により引き起こされる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位置情報に変換する遺伝子にホメオボックス遺伝子群が知られている。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。ホメオボックス遺伝子は、構造と機能面から便宜上、*HOX*遺伝子群、非*HOX*ホメオボックス遺伝子群および非典型ホメオボックス遺伝子群の3つに分けられる。ヒトでは、*HOX*遺伝子は合計39個同定されており、9から11個の*HOX*遺伝子からなる4つの遺伝子集合体（クラスター）を形成している。ヒトの非*HOX*ホメオボックス遺伝子群には*ParaHOX*遺伝子とよばれる*CDX*や*PDX*などが属している。最近では、これらのホメオボックス遺伝子が発生のみならず成体における様々な生命現象にも重要な働きを果たしていることが明らかとなってきた。また、白血病をはじめいくつかのヒト癌組織において*HOX*あるいは*ParaHOX*遺伝子の発現異常が報告されてきている。本研究では、食道癌における*HOX*および*ParaHOX*遺伝子の役割を明らかにするため、ヒト食道扁平上皮癌と正常食道粘膜における39個の*HOX*遺伝子と4個の*ParaHOX*遺伝子の発現を定量解析し、そ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食道扁平上皮癌患者から手術切除された癌組織48例と正常粘膜組織7例を対象とした。手術切除組織より全RNAを抽出して逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型に各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。各遺伝子の発現量は、内部標準として用いた β -アクチン遺伝子の発現量で補正した相対比で表した。免疫組織学的解析は、一次抗体にヤギ抗ヒトHOXA5およびウサギ抗ヒトHOXD9ポリクローナル抗体を用いた酵素抗体法で行った。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を行い、p値が0.01未満を有意差ありと判定した。

【結果】

- (1) 正常食道粘膜では、*HOX*遺伝子の各々のクラスターの3'側に位置する *HOXA1*、*A2*、*A3*、

B2、*B3*、*B4*、*B5*、*C4*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* 遺伝子の発現は認められないか、あるいはきわめて低かった。*CDX*遺伝子と *PDX*遺伝子の発現はきわめて低かった。

(2) 39個の *HOX*遺伝子のうち24個の遺伝子 (*HOXA5*、*A6*、*A10*、*A13*、*B6*、*B7*、*B8*、*B9*、*B13*、*C5*、*C6*、*C8*、*C9*、*C10*、*C13*、*D3*、*D4*、*D8*、*D9*、*D10*、*D11*、*D13*) および3個の *ParaHOX* 遺伝子 (*CDX1*、*CDX2*、*PDX1*) の癌組織における発現は、正常粘膜組織に比べ、有意に高かった ($p<0.01$)。

(3) 癌組織を深達度別に T1(粘膜下組織まで)、T2 (固有筋層まで)、T3 (食道外膜まで) の3群にわけて検討した。*HOXA5*、*A10*、*B13*、*C6*、*C10*、*C13*、*D13* の7個の遺伝子は、T1 および T3 群に比べ、T2 群で最も高い発現レベルを示した ($p<0.01$)。

(4) *HOX*および *ParaHOX*遺伝子の発現レベルとリンパ節転移、リンパ管浸潤、静脈浸潤、組織型、腫瘍の局在、腫瘍マーカー (CEA、SCC) などの臨床病理学的因子との相関性について検討したが、いずれの因子とも有意な相関性は認められなかった。

(5) 癌組織において mRNA レベルでの発現亢進がみられた *HOX* 遺伝子のうち、*HOXA5* と *D9*について、蛋白レベルでの発現を免疫組織化学的に検討した。正常食道粘膜においては、*HOXA5* は基底細胞の細胞質に検出されたが、*HOXD9* は検出されなかった。癌組織においては、*HOXA5*、*D9* ともに癌細胞の細胞質が強く染色され、その染色強度は各々の mRNA の発現レベルと相関した。

【考察】

胚発生過程において形態形成のマスター遺伝子として働く *HOX*、*ParaHOX*遺伝子が、食道扁平上皮癌の発生と進展に関与するとの仮説をたてて本研究を行った。

(1) 正常食道粘膜においては、3'側の *HOX*遺伝子の発現が高く、5'側は低かった。この発現パターンは胎生期の食道と類似しており、成体においても胎生期の発現パターンが概ね維持されていることが明らかとなった。また、*CDX*、*PDX*遺伝子の発現が低かったことから、これらの遺伝子はヒト成体の食道組織の構築や機能には関与していないと考えられた。

(2) 癌組織での発現が正常粘膜よりも高かった24個の *HOX* 遺伝子のうち、20個 (*HOXA5/A6*、*HOXB6/B7/B8/B9/B13*、*HOXC5/C6/C8/C9/C10/C11*、*HOXD1/D3/D4/D8/D9/D10/D11*) が同じクラスター内で隣接する遺伝子であった。隣接する *HOX*遺伝子は、同様のエピジェネティックな機構によって制御されている可能性が高く、食道扁平上皮癌ではその制御機構が破綻している可能性が考えられた。

(3) 7個の *HOX*遺伝子 (*HOXA5*、*A10*、*B13*、*C6*、*C10*、*C13*、*D13*) は、深達度 T1、T2 群に比べ、T3 群で有意に高い発現を示した。このことは、深達度による癌細胞を取り巻く微小環境の違いが、*HOX*遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性を考えさせる。

(4) *HOXA5* および *D9* 蛋白の免疫組織化学的解析は、これらの蛋白が癌細胞の核ではなく細胞質に存在していることを明らかにした。この結果は、これらの蛋白が直接転写に関与していないことを示唆している。*HOX* 蛋白は DNA 結合因子としてだけではなく、Smad 蛋白や CREB 蛋白のような蛋白に結合してその機能を抑制することが知られている。したがって、*HOXA5* や *D9* 蛋白は癌組織の細胞質で、p53 蛋白のような癌抑制遺伝子産物の機能を抑制している可能性も考えられる。

(5) マウスにおける *CDX* 蛋白は *HOXA5* の調節因子であることが知られている。従って、

本研究において *HOXA5* 遺伝子の発現が癌組織で高かったことは、*CDX1* や *CDX2* 遺伝子の発現が癌組織で高かったことに起因している可能性がある。また、*CDX1* や *CDX2* 遺伝子は食道粘膜の腸上皮化生に関与する遺伝子であるが、本研究で食道扁平上皮癌の発生にも関与していることが示唆された。

本研究の結果から、食道扁平上皮癌における *HOX*、*ParaHOX* 遺伝子の発現ネットワークの乱れが癌化や悪性化に関与している可能性が示唆された。この結果は、発生生物学的観点から食道扁平上皮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。今後は、*HOX* や *ParaHOX* 遺伝子の生物学的機能の解明のほか、これらの遺伝子の詳細なネットワークを解明するような実験が必要である。

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

Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma

(ヒト食道扁平上皮癌における HOX 及び ParaHOX 遺伝子の発現異常)

癌における組織構築の乱れや浸潤・転移は、細胞のもつ空間的位置情報の異常により引き起こされる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位置情報に変換する遺伝子にホメオボックス遺伝子群が知られている。最近では、ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する *HOX*・*ParaHOX* 遺伝子が発生のみならず成体における様々な生命現象にも重要な働きを果たしていることが明らかとなってきた。また、白血病をはじめいくつかのヒト癌組織において *HOX*・*ParaHOX* 遺伝子の発現異常が報告されてきている。本研究では、ヒト食道扁平上皮癌と正常食道粘膜における39個の *HOX* 遺伝子と4個の *ParaHOX* 遺伝子の発現を定量解析し、そ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。

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食道扁平上皮癌患者から手術切除された癌組織48例と正常粘膜組織7例を対象とした。手術切除組織より全RNAを抽出して逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型に各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。各遺伝子の発現量は、内部標準として用いた β -アクチン遺伝子の発現量で補正した相対比で表した。免疫組織学的解析は、一次抗体にヤギ抗ヒト *HOXA5* およびウサギ抗ヒト *HOXD9* ポリクローナル抗体を用いた酵素抗体法で行った。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を行い、p値が0.01未満を有意差ありと判定した。

正常食道粘膜では、*HOX* 遺伝子の各々のクラスターの3'側に位置する *HOXA1*、*A2*、*A3*、*B2*、*B3*、*B4*、*B5*、*C4* 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* 遺伝子の発現は認められないか、あるいはきわめて低かった。*CDX*、*PDX* 遺伝子の発現はきわめて低かった。癌組織と正常食道粘膜の発現を比較すると、39個の *HOX* 遺伝子のうち24個 (*HOXA5*、*A6*、*A10*、*A13*、*B6*、*B7*、*B8*、*B9*、*B13*、*C5*、*C6*、*C8*、*C9*、*C10*、*C13*、*D3*、*D4*、*D8*、*D9*、*D10*、*D11*、*D13*) および3個の *ParaHOX* 遺伝子 (*CDX1*、*CDX2*、*PDX1*) の癌組織における発現は、正常粘膜組織に比べ有意に高かった ($p<0.01$)。癌組織を深達度別

に T1(粘膜下組織まで)、T2 (固有筋層まで)、T3 (食道外膜まで) の 3 群にわけて検討すると、*HOXA5*、*A10*、*B13*、*C6*、*C10*、*C13*、*D13* の 7 個の遺伝子において、T1、T3 群に比べ T2 群で最も高い発現レベルを示した ($p<0.01$)。その他、リンパ節転移、リンパ管浸潤、静脈浸潤、組織型、腫瘍の局在、腫瘍マーカー (CEA、SCC) などの臨床病理学的因子との相関性について検討したが、いずれの因子とも有意な相関性は認められなかった。癌組織において mRNA レベルでの発現亢進がみられた *HOX* 遺伝子のうち、*HOXA5* と *D9* について、蛋白レベルでの発現を免疫組織化学的に検討した。正常食道粘膜においては、*HOXA5* は基の細胞質に検出されたが、*HOXD9* は検出されなかった。癌組織においては、*HOXA5*、*D9* ともに癌細胞の細胞質が強く染色され、その染色強度は各々の mRNA の発現レベルと相関した。

本研究では、正常食道粘膜において、3'側の *HOX* 遺伝子の発現が高く、5'側は低いことが判明した。この発現パターンは胎生期の食道と類似しており、成体においても胎生期の発現パターンが概ね維持されていることが明らかとなった。また、*CDX*、*PDX* 遺伝子の発現が低かったことから、これらの遺伝子はヒト成体の食道組織の構築や機能には関与していないと考えられた。癌組織での発現が正常粘膜よりも高かった 24 個の *HOX* 遺伝子のうち、20 個 (*HOXA5/A6*、*HOXB6/B7*、*B8/B9/B13*、*HOXC5/C6/C8/C9/C10/C11*、*HOXD1/D3/D4/D8/D9/D10/D11*) が同じクラスター内で隣接する遺伝子であったことから、隣接する *HOX* 遺伝子は、同様のエピジェネティックな機構によって制御されている可能性が高く、食道扁平上皮癌ではその制御機構が破綻している可能性が考えられた。7 個の *HOX* 遺伝子 (*HOXA5*、*A10*、*B13*、*C6*、*C10*、*C13*、*D13*) は、深達度 T1、T2 群に比べ、T3 群で有意に高い発現を示したことから、深達度による癌細胞を取り巻く微小環境の違いが、*HOX* 遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性を考えさせる。免疫染色の結果から、*HOXA5* および *D9* 蛋白が癌細胞の核ではなく細胞質に存在していたことは、これらの蛋白が直接転写に関与していないことを示唆している。*HOX* 蛋白は非 DNA 結合因子として、*Smad* 蛋白や *CREB* 蛋白のように直接蛋白に結合してその機能を抑制することが知られていることから、*HOXA5* や *D9* 蛋白は癌組織の細胞質で、*p53* 蛋白のような癌抑制遺伝子産物の機能を抑制している可能性も考えられる。さらに、マウスにおける *CDX* 蛋白は *HOXA5* の調節因子であることが知られている。本研究において *HOXA5* 遺伝子の発現が癌組織で高かったことは、*CDX1* や *CDX2* 遺伝子の発現が癌組織で高かったことに起因している可能性がある。また、*CDX1* や *CDX2* 遺伝子は食道粘膜の腸上皮化生に関与する遺伝子であるが、本研究で食道扁平上皮癌の発生にも関与していることが示唆された。

本研究の結果から、食道扁平上皮癌における *HOX*、*ParaHOX* 遺伝子の発現ネットワークの乱れが癌化や悪性化に関与している可能性が示唆された。この結果は、発生生物学的観点から食道扁平上皮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、近藤教授より、*HOX* 蛋白における転写因子としての機能の有無、食道扁平上皮癌と *HOX* 遺伝子との因果関係および特定の *HOX* 遺伝子に対する機能解析の有無について質問があった。続いて守内教授より、免疫染色で細胞質が染色されたことについての考察、癌の多段階発現という観点からの *HOX* 遺伝子の役割、*HOX* と *ParaHOX* 遺伝子の起源の違い、*CDX* 遺伝子とバレット食道の関係、*CDX* 遺伝子の位置特異性の有無について質問があった。最後に秋田教授より、細胞株を用いた免疫染色の有無、ウェスタンブロット法による核や細胞質の分画の確認、免疫染色においての腫瘍の部位による染色の相違、食道扁

平上皮癌の前癌病変における遺伝子や蛋白の発現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な解答をした。

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。