

# Aberrant Expression of HOX Genes in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma Tissues

(口腔異形性組織および扁平上皮癌における HOX 遺伝子の発現異常)

## 学位論文内容の要旨

【背景・目的】癌における組織構築の乱れや浸潤・転移を発生生物学的に考えると、細胞のもつ位置情報の異常に基づく現象と捉えることができる。発生過程において細胞に位置情報を与え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、その下位にある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である HOX 遺伝子群は4つの異なった染色体上に9~11個の HOX 遺伝子からなる遺伝子集合体として存在し、合計39個の遺伝子が同定されている。近年、HOX 遺伝子は胎生期の形態形成過程だけでなく成体においても臓器・組織に特徴的な発現を示すこと、また、乳癌、腎癌、肺癌、悪性黒色腫、膀胱癌、前立腺癌などの HOX 遺伝子の発現パターンは、それらの発生した正常臓器の発現パターンとは異なることが明らかとなってきた。このように HOX 遺伝子の発現異常と癌化あるいは浸潤・転移を関連づけて考えられるようになってきたが、口腔癌におけるその役割は未だに明らかではない。本研究の目的は、口腔癌の発生あるいは浸潤・転移に HOX 遺伝子の発現異常が関与しているか否かを明らかにすることである。

【材料・方法】北海道大学病院においてインフォームド・コンセントを得た患者から生検あるいは外科切除した口腔扁平上皮癌組織31例、異形成組織11例および正常口腔粘膜組織10例を対象とした。各組織から RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を得た。cDNA を鋳型にして各 HOX 遺伝子に特異的なプライマー・ペアを用いて SYBR-green の蛍光強度を指標にしたリアルタイム PCR を行った。RNA のサンプル間における量的ばらつきを考慮して、内部標準として  $\beta$ -アクチンの発現量を測定し、各 HOX 遺伝子の発現を、HOX 遺伝子/内部標準遺伝子の発現量比で評価した。各組織における HOX 遺伝子の発現と臨床病理学的パラメーターとの関連を Mann-Whitney U test および Kruskal-Wallis rank test を用いて統計学的に検討し、 $p < 0.01$  を統計学的に有意とした。統計解析は Statview (SAS, USA)にて算出した。

### 【結果】

#### 1. 正常口腔粘膜における HOX 遺伝子の発現

正常口腔粘膜において39個の HOX 遺伝子のうち HOXA2, B2, D3, D4, D8 および D9 の発現が他の HOX 遺伝子に比べ有意に高かった。なかでも HOXD8 の発現が最も

高かった。

## 2. 正常口腔粘膜, 異形成および扁平上皮癌組織における HOX 遺伝子発現の違い

39 個のうち 18 個 (HOXA1, A2, A3, A5, A9, B3, B6, B7, B9, C4, C6, C8, C9, C11, C13, D9, D10 および D11) の HOX 遺伝子の発現が, 正常粘膜組織に比べ扁平上皮癌組織において有意に高かった ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test). 異形成組織においては, HOXA2, A3, B3 および D10 の発現が正常粘膜組織より有意に高く ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test), 一方 HOXA1, B7, B9 および C8 の発現が扁平上皮癌組織より有意に低いことが明らかとなった ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test).

## 3. リンパ節転移の有無による扁平上皮癌の HOX 遺伝子発現の違い

リンパ節転移を有する扁平上皮癌組織の HOXC5, C6 および C8 の発現は, リンパ節転移のないものに比べ高い傾向を示した. なかでも HOXC6 の発現はリンパ節転移陽性群において有意に高かった ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test).

### 【考察】

#### 1. 正常口腔粘膜における HOX 遺伝子の発現について

正常口腔粘膜において HOX 遺伝子の D クラスター, とりわけ HOXD8 および D9 の発現が他の HOX 遺伝子に比べ高かった. HOXD8 および D9 は正常の唾液腺, 甲状腺, 気管, 肺および胸腺において高い発現を示すことが既に知られており, 発生学的見地から考えても矛盾しない結果と考えられた.

#### 2. 正常口腔粘膜, 異形成および扁平上皮癌組織における HOX 遺伝子発現の違い

正常口腔粘膜, 異形成および扁平上皮癌組織間で発現に有意差のあった HOX 遺伝子は 18 個だった. そのうち 4 個の HOX 遺伝子 (HOXA2, A3, B3 および D10) の発現が正常粘膜組織より異形成組織において有意に高く, 4 個の HOX 遺伝子 (HOXA1, B7, B9 および C8) の発現が異形成組織より扁平上皮癌組織において有意に高く, 18 個すべての HOX 遺伝子の発現が正常粘膜組織より扁平上皮癌組織において有意に高かった. このことから, 正常口腔粘膜から異形成や扁平上皮癌が発生する過程において HOX 遺伝子の発現が変化することが示唆された.

#### 3. 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移と HOX 遺伝子発現の関連性

HOXC5, C6 および C8 の発現はリンパ節転移陽性群において陰性群よりも高かった. リンパ節転移性の前立腺癌では HOXC4, C5, C6, またリンパ節転移性の口腔扁平上皮癌では HOXC8 の高発現を認めた報告があり, HOXC4-8 の高発現は前立腺癌のみならず口腔扁平上皮癌のリンパ節転移に関与することが示唆された.

以上の結果から, 特定の HOX 遺伝子の発現異常が口腔粘膜の異形成や扁平上皮癌の発生ならびに転移能の獲得に関与していると考えられた.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男  
副 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 進 藤 正 信  
副 査 教 授 守 内 哲 也 (医学研究科)

学位論文題名

## Aberrant Expression of HOX Genes in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma Tissues

(口腔異形性組織および扁平上皮癌における HOX 遺伝子の発現異常)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

### 【背景と目的】

癌における組織構築の乱れや浸潤・転移を発生生物学的に考えると、細胞のもつ位置情報の異常に基づく現象と捉えることができる。発生過程において細胞に位置情報を与え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、その下位にある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である HOX 遺伝子群は4つの異なる染色体上に9-11個の HOX 遺伝子からなる遺伝子集合体として存在し、合計39個の遺伝子が同定されている。近年、HOX 遺伝子は胎生期の形態形成過程だけでなく成体においても臓器・組織に特徴的な発現を示すこと、また、乳癌、腎癌、肺癌などの HOX 遺伝子の発現パターンは、それらが発生した正常臓器の発現パターンとは異なることが明らかとなってきた。このように HOX 遺伝子の発現異常は癌化あるいは浸潤・転移と関連づけて考えられるようになってきたが、口腔癌におけるその役割は未だに明らかではない。本研究の目的は、口腔癌の発生あるいは浸潤・転移に HOX 遺伝子の発現異常が関与しているか否かを明らかにすることである。

### 【材料と方法】

北海道大学病院において生検あるいは外科切除した口腔扁平上皮癌組織31例、異形成組織11例および正常口腔粘膜組織10例を対象とした。各組織からRNAを抽出し、逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型にして各HOX遺伝子に特異的なプライマー・ペアを用いてSYBR-greenの蛍光強度を指標にしたリアルタイムPCRを行った。RNAのサンプル間における量的ばらつきを考慮して、内部標準として $\beta$ -アクチンの発現量を測定し、

各 HOX 遺伝子の発現を、HOX 遺伝子／内部標準遺伝子の発現量比で評価した。

### 【結果ならびに考察】

#### 1. 正常口腔粘膜における HOX 遺伝子の発現について

正常口腔粘膜において 39 個の HOX 遺伝子のうち HOXA2, B2, D3, D4, D8 および D9 の発現が他の HOX 遺伝子に比べ有意に高かった。とりわけ HOXD8 および D9 の発現が他の HOX 遺伝子に比べ高かった。HOXD8 および D9 は正常の唾液腺、甲状腺、気管、肺および胸腺において高い発現を示すことが既に知られており、発生学的見地から考えても矛盾しない結果と考えられた。

#### 2. 正常口腔粘膜、異形成および扁平上皮癌組織における HOX 遺伝子発現の違い

正常口腔粘膜、異形成および扁平上皮癌組織間で発現に有意差のあった HOX 遺伝子は 18 個 (HOXA1, A2, A3, A5, A9, B3, B6, B7, B9, C4, C6, C8, C9, C11, C13, D9, D10 および D11) だった。そのうち 4 個の HOX 遺伝子 (HOXA2, A3, B3 および D10) の発現が正常粘膜組織より異形成組織において有意に高く、4 個の HOX 遺伝子 (HOXA1, B7, B9 および C8) の発現が異形成組織より扁平上皮癌組織において有意に高く、18 個すべての HOX 遺伝子の発現が正常粘膜組織より扁平上皮癌組織において有意に高かった。このことから、正常口腔粘膜から異形成や扁平上皮癌が発生する過程において HOX 遺伝子の発現が変化することが示唆された。

#### 3. 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移と HOX 遺伝子発現の関連性

HOXC5, C6 および C8 の発現はリンパ節転移陽性群において陰性群よりも高かった。リンパ節転移性の前立腺癌では HOXC4, C5, C6, またリンパ節転移性の口腔扁平上皮癌では HOXC8 の高発現を認めた報告があり、HOXC4-8 の高発現は前立腺癌のみならず口腔扁平上皮癌のリンパ節転移に関与することが示唆された。

以上の結果から、特定の HOX 遺伝子の発現異常が口腔粘膜の異形成や扁平上皮癌の発生過程ならびに転移能の獲得に関与していると推察した。

論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。論文提出者は、①なぜ HOXD8 は正常口腔粘膜において高く発現するのか、②癌は発生母地と同じ Hox gene の発現を示すか、③転移性癌における Hox C6 gene の機能は、などいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は特定の HOX 遺伝子の発現異常が口腔粘膜の異形成や扁平上皮癌の発生過程ならびに転移能の獲得に関与していることを示唆した点において新規性が高く、今後の歯科医学の発展にも大きく貢献するものと評価した。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。