

学位論文題名

Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas

(大腸癌と肝細胞癌における HOX 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、癌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。細胞の位置情報の担い手として、ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する HOX 遺伝子がよく知られている。ヒトの HOX 遺伝子は合計 39 個同定されており、9 から 11 の HOX 遺伝子からなる 4 つのクラスターを形成している。各 HOX 遺伝子は転写因子をコードしており、それらの下位にある接着因子や増殖因子など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。最近、HOX 遺伝子の発現パターンは、胎生期のみならず成体においても臓器・組織に特異的であることがわかってきた。さらに、様々な癌組織における HOX 遺伝子の発現パターンは正常組織のそれとは異なることが報告されてきている。これらの事実は、HOX 遺伝子が胎生期だけでなく成体においても臓器・組織に特徴的な構築や機能の維持に関与していることを伺わせる。

本研究では、癌細胞が置かれた位置(臓器)に焦点を当て、大腸癌の原発巣と肝転移巣、肝細胞癌の原発巣における HOX 遺伝子の発現パターンを比較検討した。また、大腸が大きく分けて二つの異なった発生起源に由来することから、大腸については右側大腸(盲腸、上行結腸、横行結腸)と左側大腸(下行結腸、S 状結腸、直腸)に分け、大腸癌の HOX 遺伝子の発現パターンを比較した。

【対象と方法】 北海道大学病院第二外科およびその関連施設において 2000 年から 2002 年までに組織提供の同意が得られ治癒切除された大腸腺癌原発癌組織 40 例、大腸腺癌の肝転移組織 11 例、および肝細胞癌の原発組織 25 例を対象とした。大腸腺癌の肝転移巣 11 例のうち 8 例では同一患者からの原発巣組織も得られた。また、大腸癌原発巣から 5 cm 以上離れた非癌部粘膜上皮組織 20 例および肝細胞癌の非癌部肝組織 19 例についても解析の対象とした。各組織から total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA をもとに、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。得られた HOX 遺伝子の発現量は、内因性コントロールとして用いた β -アクチン遺伝子の発現量に対する相対比で表した。統計学的有意差は Mann-Whitney *U* test によって評価した。

【結果】 まず、右側大腸、左側大腸および肝臓の非癌部組織における HOX 遺伝子の発現パターンを調べた。大腸粘膜組織では HOXA9、A11、A13、B5、B6、B7、および B13 が他の HOX 遺伝子に比べて高い発現を示した。右側と左側大腸を比較すると、左側の HOXB13 と D13 の発現は右側よりも有意に高く、一方、右側の HOXB6 と B9 の発現は左側に比べ有意に高いことが明らかとなった。非癌部肝組織では、ほとんどの HOX 遺伝子の発現が無いかあるいは極めて低く、例外的に HOXB クラスターの HOXB2、B3、および B4 が比較的高い発現を示した。

つぎに、癌組織と非癌部組織の HOX 遺伝子の発現パターンを比較した。大腸癌において

は非癌部粘膜組織と異なる発現を示す HOX 遺伝子が、右側と左側大腸で異なっていた。すなわち、左側に生じた大腸癌組織では非癌部粘膜組織に比べ、HOXA9、B3、B8、および B9 の発現が有意に高く、逆に HOXB2、B13、D1、D3、D4、D8、および D12 の発現レベルが有意に低かった。一方、右側大腸に生じた癌組織と非癌部組織の間で発現が異なっていた HOX 遺伝子は HOXA9 と D1 の 2 つのみで、前者の発現は癌組織で、後者は非癌部組織で有意に高かった。肝細胞癌組織と非癌部組織を比較すると、HOXA3 をはじめとする 28 個の HOX 遺伝子の発現レベルが両者間で異なり、それらの HOX 遺伝子の発現はすべて癌組織において有意に高いことが明らかになった。

転移、浸潤性と HOX 遺伝子の発現との関連性を検討したところ、右側大腸癌では肝転移を有する原発大腸癌組織の HOXA3 と D11 の発現が、肝転移のない原発癌組織のそれらに比べ、有意に高いことがわかった。つぎに、肝転移巣と原発巣の HOX 遺伝子の発現を調べた。右側、左側にかかわらず、手術時に肝転移のあった原発大腸癌組織の HOXD8 の発現は肝転移巣のそれに比べ、有意に高かった。さらに、同一患者から原発巣と転移巣の両組織が得られた 8 例でも、1 例を除き、肝転移巣の HOXD8 の発現は原発組織に比べて有意に低かった。

最後に、肝細胞癌における HOX 遺伝子の発現レベルと臨床病理学的因子との間の関連性について検討した。その結果、門脈、肝静脈あるいは胆管に浸潤している肝細胞癌組織の HOXA5 の発現は、それらへの浸潤性のみられない肝細胞癌組織に比べて有意に低かった。

【考察】正常（非癌部）組織における HOX 遺伝子の発現解析結果は、その発現パターンが右側大腸、左側大腸および肝臓のそれぞれの臓器に特徴的であることを示した。これらの発現パターンは、胎生期における HOX 遺伝子の発現パターンと類似しており、器官形成過程だけでなく、その構築や機能の維持にも HOX 遺伝子が何らかの役割を果たしていることを推察させる。

HOX 遺伝子の発現パターンを癌組織と非癌部組織との間で比較した解析から、いくつかの興味深い結果を得た。それらのひとつは、癌組織で発現が変化していた HOX 遺伝子の数が右側大腸に比べて、左側大腸で著明に多かったことである。右側では、癌組織において 2 つの HOX 遺伝子、すなわち HOXA9 の発現増加と HOXD1 の発現低下が認められたのに対し、左側では、これら 2 遺伝子を含む合計 11 の HOX 遺伝子の発現が癌組織で変化していた。これらの結果は、両側の大腸癌で同様の発現変化のみられた HOXA9 と D1 が、大腸癌の発生部位に関係なく発癌・悪性化に関与している可能性を示唆している。一方、左側大腸癌でみられた数多くの HOX 遺伝子の発現変化には、左側大腸に特有の微小環境が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

HOXD8 は、大腸癌の原発巣と肝転移巣組織との間で、その発現レベルが異なっていた唯一の HOX 遺伝子であった。すなわち、肝転移巣組織における HOXD8 の発現レベルは、原発巣組織に比べて有意に低かった。この結果は、HOXD8 が大腸癌の肝転移に対する抑制遺伝子として機能していることを推測させる。さらに、HOXD8 が非癌部肝組織で発現していないという事実とを考え合わせると、HOXD8 の発現低下は、大腸癌細胞に肝臓を正所として認識させる位置情報として働いている可能性が考えられる。

血管や胆管への浸潤を伴った肝細胞癌組織における HOXA5 の発現は、浸潤を伴わない肝細胞癌組織に比べて著明に低かった。肝細胞癌組織の HOXA5 の発現は、非癌部組織に比べ高いことから、HOXA5 は発癌過程では促進的に働くが、浸潤過程においてはむしろ抑制的に機能している可能性が推察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 准教授 濱 田 淳 一

学 位 論 文 題 名

Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas

(大腸癌と肝細胞癌における HOX 遺伝子の発現異常)

細胞の位置情報の担い手として、HOX 遺伝子群がよく知られている。ヒトの HOX 遺伝子は合計 39 個同定されており、9 から 11 の遺伝子からなる 4 つのクラスターを形成している。各 HOX 遺伝子は転写因子をコードしており、それらの下位にある接着因子や増殖因子など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。最近、HOX 遺伝子の発現パターンは、胎生期のみならず成体においても臓器、組織に特異的であり、さらに、様々な癌組織での発現パターンが正常組織でのそれとは異なることが報告されている。

本研究では、大腸癌の原発巣と肝転移巣、肝細胞癌の原発巣における HOX 遺伝子の発現パターンを検討した。大腸癌原発巣 40 例、大腸癌肝転移巣 11 例、肝細胞癌 25 例を対象とした。大腸癌の肝転移巣 11 例のうち 8 例では原発組織も検索できた。また、大腸正常粘膜組織 20 例および非癌部肝組織 19 例についても解析対象とした。各組織から total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA をもとに、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。得られた発現量は、内因性コントロールとして用いた β -アクチン遺伝子の発現量に対する相対比で表した。統計学的有意差は Mann-Whitney *U* test によって評価した。

まず、大腸正常粘膜組織では HOXA9、A11、A13、B5、B6、B7、B13 が他の HOX 遺伝子に比べて高い発現を示した。右側と左側大腸を比較すると、左側の HOXB13 と D13 の発現は右側よりも有意に高く、一方、右側の HOXB6 と B9 の発現は左側に比べ有意に高かった。非癌部肝組織では、ほとんどの HOX 遺伝子の発現が無いか、あるいは極めて低かった。これらの発現パターンは、胎生期における HOX 遺伝子の発現パターンと類似しており、器官形成過程だけでなく、その構築や機能の維持にも HOX 遺伝子が何らかの役割を果たしていることを推察させる。

つぎに、癌組織と非癌部組織の HOX 遺伝子の発現パターンを比較した。大腸癌においては正常粘膜組織と異なる発現を示す HOX 遺伝子が、右側と左側大腸で異なっていた。すなわち、左側の大腸癌組織では正常粘膜組織に比べ、HOXA9、B3、B8、B9 の発現が有意に高く、逆に HOXB2、B13、D1、D3、D4、D8、D12 の発現レベルが有意に低かった。一方、右側の大腸癌組織と正常組織で発現が異なっていた HOX 遺伝子は HOXA9 と HOXD1 の 2 つのみで、前者の発現は癌組織で、後者は非癌部組織で有意に高かった。肝細胞癌組織と非癌部組織を比較すると、合計 28 個の HOX 遺伝子の発現レベルが癌組織において有意に高いことが明らかになった。

転移、浸潤能と HOX 遺伝子の発現との関連性を検討したところ、右側大腸癌では肝転移を有する原発大腸癌組織の HOXA3 と D11 の発現が、肝転移のない原発癌組織のそれらに比べ、有意に高いことがわかった。つぎに、肝転移巣と原発巣とにおける HOX 遺伝子の発現を調べた。肝転移巣での HOXD8 の発現は、大腸の右側、左側にかかわらず、また、肝転移の有無に関わらず、原発大腸癌組織および正常粘膜での発現に比べて有意に低かった。さらに、同一患者から原発巣と肝転移巣の両組織が得られた 8 例でも、1 例を除き、肝転移巣の HOXD8 の発現は原発組織に比べて有意に低かった。最後に、肝細胞癌における HOX 遺伝子の発現レベルと臨床病理学的因子との間の関連性について検討した。その結果、脈管侵襲を有する肝細胞癌組織の HOX A5 の発現は、脈管侵襲を有さない肝細胞癌組織に比べて有意に低かった。

これらの結果から、HOX 遺伝子の発現異常が、大腸癌と肝細胞癌の発生や増殖において何らかの重要な役割を担うことが示唆された。

口頭発表に続き、副査今村雅寛教授より大腸癌と肝細胞癌の予後に関連する HOX 遺伝子の有無についてと正常組織と癌での HOX 遺伝子発現の関連について、副査近藤哲教授より他の癌での発現パターンとの関連について、リンパ節転移などの関連について、主査秋田弘俊教授より HOXA9 の発現亢進は癌腫による差か位置異常によるものかについて、HOX 遺伝子は個々に検討すべきか網羅的に検討すべきかについて、最後に副査濱田淳一准教授より右側大腸癌と左側大腸癌の臨床的な相違点についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を交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。