

学位論文題名

HOXD3 enhances motility and invasiveness
through the TGF- β -dependent and
-independent pathways in A549 cells

(HOXD3 は TGF- β 依存性及び非依存性の経路を介して
A549細胞の運動性・浸潤性を増強する)

学位論文内容の要旨

【目的】ホメオボックス遺伝子は、胎生期の形態形成や成体の組織構築の維持における細胞の位置情報を規定する遺伝子群を支配する。この遺伝子の異常発現が幾つかの癌で観察されており、癌の浸潤・転移に関与する可能性が報告されている。ヒト・クラス I ホメオボックス遺伝子 *HOX* は細胞の分化と形態形成を調節するマスター遺伝子であるが、どのようなシグナル伝達系を介して、どのような遺伝子の発現を調節するかを具体的、かつ、包括的に示した報告はない。ヒト肺癌細胞株 A549 細胞に *HOX* 遺伝子のひとつである *HOXD3* を過剰発現させると、*integrin* $\beta 3$ の発現が増加し、運動性・浸潤性が亢進する。本研究では、cDNA マイクロアレイ法により、*HOXD3* の過剰発現による運動性・浸潤性の亢進がどのようなメカニズムによるのか、その遺伝子発現ネットワークを明らかにすることを目的とした。

【方法】*HOXD3* 遺伝子を導入した A549 細胞クローンと、非導入細胞クローン(空ベクターを導入した)から、mRNA を抽出した。逆転写により cDNA を得て、7075 ヒト遺伝子からなる IncyteGEM マイクロアレイによる解析を行った。*integrin* $\beta 3$ の発現差係数を基準にして、発現差 1.6 倍以上の遺伝子を *HOXD3* 反応性の遺伝子と判定した。これらについて、*HOXD3* 導入細胞 2 クローンと非導入細胞 2 クローンから得た全 RNA を用いて半定量的 reverse transcriptase-duplex polymerase chain reaction (以下 sRT-dPCR) による裏付け解析を行った。*HOX* 導入細胞と非導入細胞の培養液中に含まれる潜在型および活性型 TGF- β を bioassay, ELISA 法および immunoblot 法により検出した。2 系の非導入細胞を、活性型 TGF- β (0.4, 2, 10 ng/ml) で処理し、マイクロアレイおよび sRT-dPCR で発現変化のみられた遺伝子の発現について sRT-dPCR で解析した。細胞運動性は、8 μ m の小孔の開いたフィルターで上下に仕切られたトランスウエル・チャンバーを用いた。フィルター下面に fibronectin (以下 FN), vitronectin (以下 VN) あるいは I 型コラーゲン (以下 COL-I) をコートし、上室に細胞を入れ 6 時間後にフィルター下面に移動した細胞を計数した。In vitro 浸潤性はトランスウエル・チャンバーを用い、内皮下基底膜モデルである Matrigel および COL-I ゲルへの浸潤性を測定した。

【結果および考察】

cdNA マイクロアレイ解析による HOXD3 下流遺伝子の同定：7075 ヒト遺伝子のうち発現差が 1.6 倍以上の遺伝子は 241 遺伝子 (3.4%) であった。HOXD3 過剰発現に反応して発現が増減したこれらの遺伝子は、(1)細胞外基質構成要素：thrombospondin-1 (以下 TSP-1) (5.6 倍)； β ig-h3 (5.4 倍)；developmental endothelial locus-1 (以下 Del-1) (4.3 倍)；VN (0.6 倍)，(2)細胞接着分子：CD24 (4.1 倍)；CD44 (2.1 倍)；desmoglein (0.6 倍)；plakoglobin (0.6 倍)；desmoplakin (0.4 倍)，(3)細胞外基質の分解に関連する分子：plasminogen activator inhibitor-1 (以下 PAI-1) (2.9 倍)；tissue transglutaminase (以下 tTG2) (2.8 倍)；matrix metalloproteinase-2 (以下 MMP-2) (2.7 倍)，(4)細胞骨格関連分子：galectin (2.6 倍)；quiescin (2.4 倍)；各種ケラチン，(5)成長因子，サイトカインなど，に分類された。マイクロアレイ解析で差違をみとめた遺伝子は，sRT-dPCR による裏付け解析でも同様の結果が得られたが，7 遺伝子の発現には差が見出されなかった。

HOXD3 過剰発現細胞による活性型 TGF- β 産生：HOXD3 導入細胞で発現が著増した TSP-1， β ig-h3，PAI-1，MMP-2，CD44 は，TGF- β により正の制御を受けることが知られている。bioassay および ELISA 法では，HOX 導入細胞と非導入細胞の培養液中の全 TGF- β は，6~9 ng/ml で有意な差はないものの，活性型 TGF- β は，HOX 導入細胞に有意に多く含まれていた (約 3 ng/ml)。immunoblot 法では，活性型 TGF- β に相当する約 25 kDa のバンドと活性化により生ずる latency-associated peptide に相当する 85 kDa のバンドが HOX 導入細胞に多く検出され，活性化を受けていない潜在型 TGF- β に相当する 110 kDa のバンドが非導入細胞に多く検出された。また，TGF- β の活性化因子として知られている MMP-2，TSP-1-CD36 系，urokinase-type plasminogen activator-plasmin 系の阻害因子の存在下での培養では，HOX 導入細胞で TGF- β の活性化は阻害されなかった。この系における TGF- β の活性化機序の解明には，さらなる検討が必要である。

活性型 TGF- β に対する非導入細胞の遺伝子発現変化：2 クローン の非導入細胞を活性型 TGF- β で処理すると，sRT-dPCR 上 TSP-1， β ig-h3，syndecan-1，PAI-1，MMP-2，transgelin などの発現レベルが濃度依存性に増加し，VN は減少した。他方，活性型 TGF- β 処理の影響を受けない遺伝子には，HOXD3 のほか，HOXD3 で誘導される integrin β 3，Del-1，tTG2，CD24，CD44，そして HOXD3 で抑制される desmoglein，desmoplakin，plakoglobin など desmosome 構成因子が含まれていた。このように HOXD3 導入細胞では TGF- β 伝達系を含む複数のシグナル伝達系が活性化されている可能性が示唆された。

活性型 TGF- β による運動性・浸潤性の増強：HOXD3 導入細胞では内皮下基底膜モデルである Matrigel や COL-I ゲルへの浸潤増強および FN，VN，COL-I への haptotaxis 亢進をみとめた。TGF- β 処理は非導入細胞の COL-I への浸潤性並びに haptotaxis を濃度依存性に増強したが，Matrigel への浸潤と FN，VN への haptotaxis には影響を与えなかった。HOXD3 導入細胞の COL-I 浸潤および haptotaxis は，TGF- β 中和抗体，TGF- β レセプター抗体，組み換えヒト可溶性 TGF- β レセプター II 処理により抑制されたことから，この表現形質が内因性の TGF- β 作用に依存するものであることが示された。

【結語】cdNA マイクロアレイ解析により，HOXD3 は 1) TGF- β シグナル伝達系を活性化すること，および 2) 細胞-細胞間，細胞-細胞外基質間相互作用，細胞骨格系に関わる多くの遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

HOXD3 enhances motility and invasiveness through the TGF- β -dependent and -independent pathways in A549 cells

(HOXD3 は TGF- β 依存性及び非依存性の経路を介して
A549細胞の運動性・浸潤性を増強する)

形態形成や組織構築の維持における細胞の位置情報を規定するホメオボックス遺伝子群 HOX の異常発現が、癌の浸潤や転移に影響をおよぼす可能性を示唆する報告がなされている。しかし今まで、HOX 遺伝子がどのような遺伝子の発現を調節し、どのようなシグナル伝達系を介して、この現象をおこすのかを具体的に示した研究はなかった。本研究では、HOXD3 遺伝子を過剰発現させたヒト肺癌細胞株 A549 において変動する遺伝子発現を cDNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析することによって、この問題を明らかにすることを目的とした。

cDNA マイクロアレイ解析の結果、HOXD3 過剰発現に反応して発現が変化した遺伝子は、細胞外基質構成要素、細胞接着分子、細胞外基質の分解に関連する分子、細胞骨格関連分子、成長因子、サイトカインをコードするものに分類できた。これらの多くの遺伝子発現の変化は、RT-PCR 法による解析でも確認された。HOXD3 導入細胞で発現が著増した遺伝子には、TGF- β により正の制御を受けることが知られているトロンボスポンディン-1 遺伝子などがあつた。事実、HOX 導入細胞培養液中には活性型 TGF- β が有意に多く含まれていることが確認された。HOXD3 導入細胞はまた、内皮下基底膜モデルで浸潤性の増強を示した。この現象は TGF- β に対する抗体などの処理により抑制されたことから、この表現形質が内因性の TGF- β 作用に依存することが示された。一方 HOXD3 導入細胞では、発現が TGF- β で影響を受けず逆に抑制されるデスモソーム構成因子らの遺伝子群があることも証明された。以上のことから、HOXD3 導入細胞では TGF- β 伝達系のみならず複数のシグナル伝達系が活性化されている可能性が示唆された。

審査に当たっては、副査守内教授より、1. マイクロアレイ解析とRT-PCR法によって得られたデータ間の一部解離、2. HOXD3遺伝子が関わるTGF- β に依存しない経路、3. TGF- β の活性化機構、について質問があつた。さらに副査加藤教授より、1. 今回得られたデータの他の細胞株における普遍性、2. 活性型TGF- β の働きを抑えて癌の浸潤性を

阻止できるか、3. 多様性を持つ癌に対処するための研究の方向性、について質問があった。また主査葛巻が、1. HOXD3によって発現が増加する遺伝子群と減少する遺伝子群の調節領域の違い、2. 癌の転移・浸潤に関わるHOX遺伝子間の共通性、3. TGF- β に依存しない経路に線維芽細胞増殖因子が関与する可能性、について質問をおこなった。申請者はいずれの質問に対しても適切に回答した。

この論文は、cDNA マイクロアレイ解析によりホメオボックス遺伝子 HOXD3 が、TGF- β を初めとする複数のシグナル伝達系を活性化し、細胞・細胞間、細胞・細胞外基質間相互作用、細胞骨格系に関わる多くの遺伝子発現を制御して、癌の浸潤性に関わっていることを初めて明らかにしたことで高く評価される。今後、この研究をさらに進めることによって、癌の浸潤、転移のメカニズムがさらに明らかにされることと共に、治療への応用の可能性が期待される。

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。