

学位論文題名

ヒト乳癌組織および非癌部組織における  
HOX 遺伝子の mPNA 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転移・浸潤は、細胞のもつ空間的位置情報の異常によって引き起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 A, B, C, D の 4 つのクラスターを形成し、合計 39 個同定されている。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は、個々の 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、HOX 遺伝子は、成体においても組織・臓器に特徴的な発現パターンを示すことがわかってきた。一方、腎癌、大腸癌、悪性黒色腫、肺癌、子宮癌、乳癌、膀胱癌などの HOX 遺伝子の発現は、それらの由来する正常組織とは異なることが報告されており、HOX 遺伝子の発現異常と癌化とを関連付けて考えることが可能になってきた。しかしながら、これら癌組織における HOX 遺伝子の発現解析報告は、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レベルを定量的に解析したものはきわめて少ない。本研究では、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、ヒト乳癌組織と非癌部組織における 39 個の HOX 遺伝子すべての発現を調べた。さらに、乳癌組織における 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。

【症例および細胞株】

北大医学部附属病院腫瘍外科およびその関連施設 (12 施設) においてインフォームドコンセントの得られた浸潤性乳癌患者から手術切除され、浸潤性乳管癌と診断された癌組織 18 例と非癌部組織 6 例を対象とした。ヒト乳癌細胞株は ZR-75-1, HCC721, HCC1500, MDA-MB-231, MDA-MB-435S を使用した。

【方法】

手術切除組織および培養細胞から全 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 RT-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  $\beta$ -アクチン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の百分率で表した。p53 遺伝子の変異の有無は、Yeast p53

functional assay にて判定した。プロゲステロン受容体ならびにエストロゲン受容体の有無については通常の乳癌の手術切除組織の EIA 検査にて行った。統計学的有意差は Stat.View を用いてノンパラメトリック解析である Mann-Whitney の U 検定にて評価した。

#### 【結果】

非癌部組織では, HOXA4, B9 を除くパラログ 2 から 9 に属する全ての HOX 遺伝子が発現し, パラログ 10 から 13 に属する HOX 遺伝子は, C10 および C13 を除き, 発現していないか, あらういは極めて低い発現しか認めなかった。

浸潤性乳管癌組織と非癌部組織の HOX 遺伝子の発現を比較すると, HOX A1, A2, A3, A5, A9, C11, D3, D4, D8, D9 および D10 の発現量に両者の間で有意な差を認めた。非癌部組織に比べ乳癌組織において, HOX C11 の発現は高かったのに対し, 他の A および D クラスターの HOX 遺伝子の発現は低かった。

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調べてみたところ, 以下のことが明らかとなった。

- 1) 充実腺管癌は, 乳頭腺管癌・硬癌に比べ HOXA1 の発現が有意に低かった。
- 2) 手術切除時にリンパ節転移のあった症例の HOXB7 の発現は, リンパ節転移のない症例に比べ有意に低かった。
- 3) プロゲステロン受容体陽性例 (4 例) は陰性例 (14 例) に比べ, HOXD12 および D13 の発現が有意に高かった。エストロゲン受容体陽性例 (7 例) と陰性例 (11 例) 間で個々の HOX 遺伝子の発現を比較したが, 発現量に有意差を示す HOX 遺伝子は見出せなかった。
- 4) p53 遺伝子に変異のある浸潤性乳管癌 (7 例) の HOXC5 の発現は, 変異のない浸潤性乳管癌 (11 例) と比べ有意に低かった。また, 非癌部組織の HOXC5 の発現レベルは野生型 p53 をもつ癌組織と同程度であった。さらに, ヒト乳癌細胞株を用いて HOXC5 の発現と p53 遺伝子の変異の有無を検討したところ, p53 遺伝子に変異のある乳癌細胞株 (2 株) の HOXC5 の発現は野生型 p53 をもつ乳癌細胞株 (3 株) に比べ低かった。
- 5) その他の臨床病理学的因子として, エストロゲン受容体の有無, 腫瘍径, 乳管内進展の有無, 閉経の有無あるいは腫瘍マーカー (CEA および CA15-3) の発現と HOX 遺伝子の発現パターンとの関連性について検討したが, いずれも関連性を示唆する特定の HOX 遺伝子は認められなかった。

#### 【考察】

本研究の結果から, 乳癌の発生および悪性化に関与するであろういくつかの HOX 遺伝子が明らかとなった。個々の HOX 遺伝子が乳癌の発生あるいは癌化に伴う性状変化にどのように関わっているかを現時点で言及することは困難ではあるが, 他家の報告を考え合わせるといくつかの興味深い推察ができる。HOXA5 の発現は非癌部組織で高く, 癌組織で低いことが認められた。HOXA5 は癌抑制遺伝子 p53 の発現を促す事が知られており, 今回検討した乳癌組織においても HOXA5 の発現低下に伴う p53 の発現低下が発癌に関与している可能性が考えられる。一方, p53 遺伝子に変異のある癌組織の HOXC5 の発現は, 変異のない癌組織に比べ有意に低いという現象を見出した。HOX 遺伝子の発現調節機構については不明の点が多く, p53 蛋白がその機構の一役を担うとすれば非常に興味深い。野生型 p53 蛋白が HOXC5 の転写に必要なのか, あるいは変異型 p53 蛋白が HOXC5 の転写に対して抑制的に働くのか, 大きく 2 つの可能性が考えられる。いずれにしても, HOX 遺伝子の発現ネットワークにおける p53 の役割については, HOXA5 および HOXC5 を含め今後明らかにしていきたい課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 長 嶋 和 朗

学 位 論 文 題 名

## ヒト乳癌組織および非癌部組織における HOX 遺伝子の mPNA 発現

癌における組織構築の乱れや転移・浸潤は、細胞のもつ空間的位置情報の異常によって引き起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A, B, C, Dの4つのクラスターを形成し、合計 39 個同定されている。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は、個々の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、HOX 遺伝子は、成体においても組織・臓器に特徴的な発現パターンを示すことがわかってきた。一方、腎癌、大腸癌、悪性黒色腫、肺癌、子宮癌、乳癌、膀胱癌などのHOX 遺伝子の発現は、それらの由来する正常組織とは異なることが報告されており、HOX 遺伝子の発現異常と癌化とを関連付けて考えることが可能になってきた。しかしながら、これら癌組織におけるHOX 遺伝子の発現解析報告は、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レベルを定量的に解析したものはきわめて少ない。本研究では、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、ヒト乳癌組織と非癌部組織における39 個のHOX 遺伝子すべての発現を調べた。さらに、乳癌組織における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。

乳癌組織では非癌部組織と比べ、HOXA1,3,5,9,D3,4,5,9,10 で発現が低く、HOXC11 で発現が高かった。また、p53 変異を持つ乳癌ではHOXC5 の発現が低く、細胞株を用いた実験でも同様の結果を得た。浸潤性乳管癌症例内での検討では、充実腺管癌は、乳頭腺管癌・硬癌に比べHOXA1 の発現が有意に低く、手術切除時にリンパ節転移のあった症例のHOXB7 の発現は、リンパ節転移のない症例に比べ有意に低かった。また、プロゲステロン受容体陽性例は陰性例に比べ、HOXD12 およびD13 の発現が有意に高かった。その他の臨床病理学的因子として、

エストロゲン受容体の有無、腫瘍径、乳管内進展の有無、閉経の有無あるいは腫瘍マーカーの発現と HOX 遺伝子の発現パターンに関連性についても検討したが、いずれも関連性を示唆する特定の HOX 遺伝子は認められなかった。

本研究の結果から、乳癌の発生および悪性化に関与するであろういくつかの HOX 遺伝子が明らかとなった。HOX 遺伝子の発現調節機構については不明の点が多く、個々の HOX 遺伝子が乳癌の発生あるいは癌化に伴う性状変化にどのように関わっているかを現時点で言及することは困難ではあるが、今回検討した乳癌組織において、HOXA5 の発現低下に伴う p53 の発現低下が発癌に関与している可能性が考えられる。一方、p53 遺伝子に変異のある癌組織の HOXC5 の発現は、変異のない癌組織に比べ有意に低いという現象を見出した。

質疑応答においては長嶋教授から、正常 Adult 乳腺での HOX の発現では duct と acinus のどちらによるものか、正常乳腺における個体差は年齢や性周期と関係があるのかについて、Mastopathy や癌の組織での検討について、HOXC11 と p53 との関係について、HOXC11 と形態発生についての質問があった。次いで守内教授から、p53 と HOXB5 について、症例中の特異的に発現値の高いものについての臨床的な差について、臨床的応用について、PAX 遺伝子などの検討について、小池教授から、HOX 遺伝子と各種癌の発現・分化度の違いでの発現の差について、HOX 遺伝子と p53 以外の癌遺伝子との関連についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本研究の結果から、HOX 遺伝子の発現ネットワークにおける p53 の役割については、HOXA5 および HOXC5 を含め、今後明らかにしていきたい課題である。

審査委員一同は、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。