

学位論文題名

Altered Expressions of *HOX* genes in
Human Cutaneous Malignant Melanoma

(ヒト皮膚悪性黒色腫における *HOX* 遺伝子発現の変化)

学位論文内容の要旨

【緒言】 癌の浸潤・転移は、原発巣から癌細胞の遊離に始まり、最終的には標的臓器における増殖で完了する。すなわち癌細胞の発生母地からの空間的な位置移動と捉えることができる。形態形成のマスター調節遺伝子にホメオボックス遺伝子が知られている。ヒトのホメオボックス遺伝子群のうち、クラス I に属するものは、*HOX* 遺伝子と呼ばれている。*HOX* 遺伝子群は A~D の 4 つのクラスターを形成し、それぞれ別の染色体に位置し、現在 39 個の遺伝子が知られている。*HOX* 遺伝子は胎生期の細胞に空間的な位置情報を与え、形態形成プログラムを実行に移す遺伝子と考えられてきた。

最近、*HOX* 遺伝子の発現は、胚発生の過程だけでなく、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分かってきた。さらに癌組織では *HOX* 遺伝子群の発現パターンが正常組織のそれと異なることが報告され、*HOX* 遺伝子の発現パターンの変化と、発癌・浸潤・転移を結び付けて考えることが可能になってきた。

そこで我々は、*HOX* 遺伝子の発現変化が、悪性黒色腫の発生や転移に関与すると考え、悪性黒色腫と色素性母斑において、*HOX* 39 遺伝子の発現パターンについて解析を行った。

【材料と方法】

1. 臨床検体： 同意を得た、悪性黒色腫 15 例、色素性母斑 7 例について解析を行った。
2. RNA 抽出と cDNA 化： トライゾールを使用して、臨床検体から全 RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を合成した。
3. 定量的リアルタイム RT-PCR： *HOX* 39 遺伝子、 β -actin、それぞれのプライマー対を作成。サイバーグリーン蛍光色素と ABI PRISM 7900HT を使用して定量的 RT-PCR を行った。サンプルにおける mRNA の較差を考慮し、内因性コントロール遺伝子(β -actin) の発現量で、標的 *HOX* 遺伝子の発現量を補正した相対比を用いた。
4. 解析： 統計学的解析には、マンホイットニー U テストを用いた。 $p < 0.01$ を統計学的な有意差とした。クラスター解析には、MATLAB6.1 によるプログラムを使用し行った。

【結果】

1. 悪性黒色腫と色素性母斑における *HOX* 遺伝子の発現： 悪性黒色腫において、*HOXA11, A13, B9, D12, D13* の 5 遺伝子の発現が、色素性母斑よりも高く有意差を認めた。さらに、悪性黒色腫 15 例に対しクラスター解析を行った。その結果、悪性黒色腫の採取部位による、*HOX* 遺伝子の発現パターンの分類は不可能であった。
2. 腫瘍の厚さの違いによる *HOX* 遺伝子の発現の違い： 悪性黒色腫の pT ステージの違いによる、*HOX* 遺伝子の発現の違いについて検証を行った。その結果、*HOXA11, B2* 遺伝子の発現は、pT1, pT2, pT3 と比較して pT4 において有意に高かった。一方、*HOXC13* 遺伝子

子の発現は pT4 において有意に低かった。

3. 転移の有無による *HOX* 遺伝子の発現の違い：まず、リンパ節転移の有無に関しては有意差を認めなかった。しかし、術後の遠隔転移の有無に関して、*HOXA1, A2, B13, C4* の 4 遺伝子の発現が、術後に遠隔転移を認めた症例において高く、明らかな有意差を認めた。さらに、*HOX/β-actin* の発現比において、*HOXA2* は 0.000321~0.000364、*HOXB13* は 0.000273~0.000399 の範囲で、術後の遠隔転移の有無を識別可能であった。

【考察】 本研究において我々は、以下の 2 つの仮説の証明を試みた。

1) *HOX* 遺伝子の発現異常は、悪性黒色腫の発生と進行（浸潤や転移）に関係している。

2) *HOX* 遺伝子の発現パターンは、悪性黒色腫細胞の位置を決定している。

まず、悪性黒色腫と色素性母斑の比較において、*HOXA11, A13, B9, D12, D13* の 5 遺伝子に有意差を認めた。つまり、この 5 遺伝子の発現異常が、悪性黒色腫の発生に関係していると考えられる。また興味深いことに、この 5 遺伝子はすべて *Abd-B* ファミリー（尾側領域）に属している。

次に、腫瘍の厚さにより、*HOXA11, B2, C13* の 3 遺伝子に有意差を認めた。皮膚悪性黒色腫における腫瘍の厚さは、主に垂直方向への浸潤の程度を反映している。それゆえに、この 3 遺伝子の発現変化は垂直方向への浸潤能に関係しているのかもしれない。

さらに、術後に遠隔転移を認めた群では、遠隔転移を認めなかった群と比較して、*HOXA1, A2, C4, B13* の 4 遺伝子に、明らかな有意差を認めた。この 4 遺伝子は、悪性黒色腫と色素性母斑において違いを認めた 5 遺伝子と、腫瘍の厚さにより違いを認めた 3 遺伝子とは異なる遺伝子であった。つまり、発生と浸潤に関係する *HOX* 遺伝子と、転移に関係する *HOX* 遺伝子は異なると考えられる。

しかし、なぜ遠隔転移を認めた群で、この 4 遺伝子が増加したかは不明である。そこで、我々は以下のように推測する。*HOXA1, A2* の発現は、fibroblast growth factor (FGF) ファミリーに属する成長ホルモンと、成長因子によって調節されており、悪性黒色腫も成長ホルモンレセプターと FGF レセプターを発現している。それゆえに、そのようなホルモンや成長因子により、特定の *HOX* 遺伝子の発現変化を経て、遠隔転移を引き起こすのかもしれない。次に、*HOXC4* は膀胱癌や前立腺癌のほとんどで発現が確認されている。悪性黒色腫を含め、*HOXC4* の過剰発現は、悪性度が変化する際の一般的な経路の一つなのかもしれない。また、遠隔転移を認めた症例で、*HOXB13* 遺伝子の発現増加は非常に興味深い。なぜなら、これによりパラログ 13 に属する 4 遺伝子(*HOXA13, B13, C13, D13*) すべてに有意差を認めたからである。同一パラログの *HOX* 遺伝子は、互いに協力し補うことが知られている。つまり、悪性黒色腫においては、4 つの *HOX13* 遺伝子を含むネットワークの乱れが、結果的に悪性度を増強しているのかもしれない。今後、*HOX* 遺伝子間の発現ネットワークの解析や、下流の標的遺伝子の同定が、転移におけるこの 4 遺伝子の役割を、より詳しく理解するために必要である。

さらに本研究では、悪性黒色腫の検体において、*HOXA2* もしくは *B13* の相対的発現比 (*HOX/β-actin*) が 0.00035 以上で遠隔転移を発生しやすいことを示している。悪性黒色腫は高率に転移を引き起こす腫瘍として知られている。それゆえに、手術検体から将来的な転移のリスクを予測する事が出来れば、その臨床的意義は非常に高い。

最近、成人ヒト線維芽細胞には、胎生期に獲得した *HOX* 遺伝子の位置情報が保存されているという報告がなされた。しかし、本研究では悪性黒色腫において部位による発現パターンの違いを認めなかった。つまり、悪性黒色腫において *HOX* code が郵便番号として機能するという仮説は棄却される結果となった。

まとめとして、*HOX* 遺伝子の発現異常は、ヒト悪性黒色腫の発生や浸潤、転移に関係しているという仮説が証明された。さらに、ある特定の *HOX* 遺伝子は、遠隔転移を予測する有用なマーカーになるかもしれない。

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 杉 原 平 樹

学 位 論 文 題 名

Altered Expressions of *HOX* genes in Human Cutaneous Malignant Melanoma

(ヒト皮膚悪性黒色腫における *HOX* 遺伝子発現の変化)

形態形成のマスター調節遺伝子である *HOX* 遺伝子群は A~D の 4 つのクラスターを形成し、現在 39 個の遺伝子が知られている。最近、*HOX* 遺伝子の発現は、胚発生の過程だけでなく、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分かってきた。本研究は、*HOX* 遺伝子の発現変化が、悪性黒色腫の発生や転移に関与すると考え、同意を得た悪性黒色腫 15 例、色素性母斑 7 例について、*HOX* 39 遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、悪性黒色腫において *HOXA11, A13, B9, D12, D13* の 5 遺伝子の発現が、色素性母斑よりも高く有意差を認めた。つまり、この 5 遺伝子の発現異常が、悪性黒色腫の発生に関与していると考えられる。また興味深いことに、この 5 遺伝子はすべて *Abd-B* ファミリー(尾側領域)に属している。次に、腫瘍の厚さの違いによる比較において、*HOXA11, B2, C13* の 3 遺伝子の発現に有意差を認めた。この 3 遺伝子の発現変化は垂直方向への浸潤能に関係していると考えられる。さらに、術後の遠隔転移の有無に関して、*HOXA1, A2, C4, B13* の 4 遺伝子の発現に明らかな有意差を認めた。この 4 遺伝子は、色素性母斑との比較と、腫瘍の厚さによる比較で有意差を認めた遺伝子とは異なる。つまり、発生と浸潤に関係する *HOX* 遺伝子と、転移に関係する *HOX* 遺伝子は異なると考えられる。しかし、なぜ遠隔転移を認めた群でこの 4 遺伝子が増加したかは不明である。そこで、我々は以下のように推測する。*HOXA1, A2* の発現は、fibroblast growth factor (FGF) ファミリーに属する成長ホルモン (GH) などによって調節され、悪性黒色腫も GH レセプターや FGF レセプターを発現している。そのため、GH や成長因子の変化が遠隔転移に関与しているのかもしれない。次に、*HOXC4* の過剰発現は、膀胱癌や前立腺癌などで広く確認されている。そのため、悪性黒色腫を含め悪性度が変化する際の一般的な経路の一つなのかもしれない。さらに、遠隔転移を認めた群における *HOXB13* の発現増加は非常に興味深い。なぜなら、これによりパラログ 13 に属する 4 遺伝子すべてに有意差を認めたからである。同一パラログの *HOX* 遺伝子は、互いに協力し補うことが知られている。つまり、悪性黒色腫においては、パラログ 13 を含むネットワークの乱れが、結果的に悪性度を増強しているのかもしれない。今後、*HOX* 遺伝子間の発現ネットワークの解析や、下流の標的遺伝子の同定が必要である。さらに本研究では、*HOXA2, B13* によって術後の遠隔転移の有無を識別可能であった。悪性黒色腫は高率に転移を引き起こす腫瘍として知られている。それゆえに、手術検体から将来的な転移のリスクを予測する事が出来れば、その臨床的意義は非常に高い。最近、成人ヒト線維芽細胞には、胎生期に獲得した *HOX* 遺伝子の位置情報が保存されているという報告がなされた。し

かし、本研究では悪性黒色腫において部位による発現パターンに違いを認めなかった。つまり、悪性黒色腫において *HOX* code は郵便番号として機能はしていないと考えられる。まとめとして、*HOX* 遺伝子の発現異常は、ヒト悪性黒色腫の発生や浸潤、転移に関係していると考えられる。さらに、ある特定の *HOX* 遺伝子は、遠隔転移を予測する有用なマーカーになるかもしれない。

公開発表において、副査 杉原 平樹 教授より 1) リンパ節転移の有無や原発巣と転移巣の比較の具体的な方法について、2) 腫瘍の厚さによる発現の違いは原因と結果のどちらなのか質問があった。次いで、副査 守内 哲也 教授より 1) 症例を増やすために各大学からのサンプル提供の可能性、2) 悪性黒色腫では *Abd-B* ファミリーに属する *HOX* 遺伝子の発現が高かったことについて質問とコメントがあった。最後に、主査 秋田 弘俊 教授より 1) 転移予測における prospective study の可能性、2) 各遺伝子について今後予定している分子細胞生物学的な検証について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、悪性黒色腫における *HOX39* 遺伝子の発現パターンを定量的に解析し、*HOX* 遺伝子の発現異常が、悪性黒色腫の発生、浸潤、転移に関係していることを明らかにした点で高く評価され、今後、皮膚悪性黒色腫に対する診断、治療、予後予測への応用が期待される。

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。