

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19591919
研究課題名(和文) 婦人科癌浸潤転移現象におけるホメオボックス遺伝子メチル化制御機構の解析に関する研究
研究課題名(英文) Analysis of methylation of HOX related genes in gynecologic cancers
研究代表者 山下 剛 (YAMASHITA TSUYOSHI)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30271787

研究成果の概要：

遺伝子の発現調節機の一つに遺伝子のメチル化がある。多くの癌細胞でそのプロモーター領域での塩基シトシンのメチル化が報告されている。これにより DNA への転写因子の結合が阻害され、遺伝子の発現異常が起こると考えられる。今回我々は最近我々が発見した DLX1 遺伝子の卵巣癌におけるメチル化機構の異常による調節機構異常の破綻の有無について検討した。さらに、子宮頸癌における HOX 遺伝子の過剰発現が癌浸潤転移に与える影響についても検討した。この結果子宮頸癌においても HOX 過剰発現が認められ、過剰発現した遺伝子をアンチセンスで抑制すると、癌浸潤転移現象が減弱することが判明した。DLX1 については正常と癌組織の間でメチル化現象の違いは認められなかったが、DLX1 は卵巣癌の中で漿液性腺癌には発現しないことが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：卵巣癌、HOX,DLX,メチル化

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス遺伝子群はハエの胚発生を制御する遺伝子として発見された。ホメオドメインと呼ばれる共通の蛋白構造をもち、こ

の機能ドメインが標的 DNA に結合することにより転写制御を行い、初期発生に必要な関連蛋白の時間的空間的発現の調節を行っていることが多数報告されてきた。in vitro およ

びノックアウトマウスの研究から、ホメオボックス遺伝子蛋白群は蛋白複合体を作り機能すること、初期発生において手足などの構造体を構成する細胞群に対して、構造体を形成する個々の細胞の固有の位置を決定するため情報の伝達を担っていることが明らかになってきた。最近このホメオボックス遺伝子群の機能が癌細胞においても機能している可能性があることが報告されている。婦人科癌の領域では、すでに我々は卵巣癌および子宮体癌での HOX 遺伝子の異常発現について論文に発表してきた。今回子宮頸癌についても行ったので報告する。

また、我々は HOX 同様に初期発生に関わる遺伝子として正常組織には発現しないが卵巣癌のみに過剰発現する未報告の新規遺伝子 DLX1 を発見した。DLX はホメオボックス遺伝子の一つで distal-less homeobox 遺伝子である。今回我々は DLX の過剰発現機構の一つとしてメチル化現象が関わっているかどうか検討した。

2. 研究の目的

(1) 子宮頸癌における HOX 遺伝子の異常発現とアンチセンス導入

癌細胞は、発生時ボディパターン形成に利用した HOX などの遺伝子群を再発現、あるいは消失させ、細胞群の位置情報の乱れを誘発することで癌浸潤および転移に深く関わっている可能性がある。婦人科癌の領域では、すでに我々は卵巣癌および子宮体癌での HOX 遺伝子の異常発現について論文に発表してきた。本研究では、子宮頸癌での異常発現の有無を検討した。さらに過剰発現の認められた HOX 遺伝子のうち HOXC5 について、過剰発現した HOXC5 のアンチセンスを癌細胞に導入し、遺伝子の過剰発現を抑制することで癌細胞の浸潤能にどのような影響があるかを検討

した。

(2) DLX 遺伝子のメチル化とその発現異常について

我々は今回新たに DLX 遺伝子クラスターの一つである DLX1 が過剰発現することを見いだした。DLX はホメオボックス遺伝子の一つで distal-less homeobox 遺伝子である。脊椎動物の頭部発生に関与しておりマウスではとうぶおよび鰓弓の形成部位にその発現が認められる。現在のところ、外側神経板由来の外胚葉の形成を制御し、basal ganglia および cereberal cortex の GABAergic neuron を制御する。癌との関わりでは現在肺がん、前立腺癌において遺伝子異常との関連が報告されている。今回我々はヒト DLX 遺伝子の卵巣癌における発現異常について検討し、この発現異常が DLX 遺伝子の転写領域のメチル化と関わっているかどうか検討した。哺乳類のゲノムにおいては、メチル化を通して細胞や組織における遺伝子の発現を制御していると考えられる。このようなメカニズムは当然卵巣上皮においても同様に機能していると考えられる。検討に当たり、ゲノム上のメチル化異常そのものについては bisulfite 法にてメチル化変換を行い、そのメチル化状態の変化を検出して癌細胞でのメチル化状態を PCR法を用いて検討した。また片方がメチル化された CpG 対を選択的にメチル化し、DNA メチル化模様を細胞系列特異的に維持しているメチル化酵素 Dnmt1 においてもその酵素の異常によるメチル化機構の異常が起こりえるかどうか検討した。

(3) DLX 遺伝子における組織型別の発現様式の違い

DLX1 は卵巣癌において過剰発現が認められる。そこで我々は、DLX1 に卵巣癌組織特異的発現異常が認められるかどうか検討した。

3. 研究の方法

(1)子宮頸癌におけるHOX遺伝子の異常発現とアンチセンス導入

発現異常の有無を解析するためには目的細胞から total RNA を抽出する必要がある。標的細胞として子宮頸癌株 7 種類 (Caski, HeLa, HT-3, SiHa, ME180, C33A, C41) を用いてまず癌細胞の培養を行った。同時に正常対照としては当附属病院にて倫理委員会の承認後インフォームドコンセントのもとで得られた子宮筋腫手術時に採取された各正常子宮頸部組織を使用した。培養細胞はコンフレント時にトリプシンを用いて細胞を回収した。手術検体は採取後直ちに液体窒素にて凍結され、その後用いられた。培養細胞では shredder にて、凍結組織では homogenizer にて粉碎した後、ともにそれぞれの total RNA を抽出用キットを用いて遺伝子を抽出した。抽出された RNA は spectrophotometer にてその濃度が $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整された後、 $1\mu\text{g}$ を用いて逆転写が行われた。逆転写にはランダムプライマーが用いられ、逆転写酵素により cDNA が作成された。さらに、生成された cDNA を用いて Real-time PCR が行われ各検体での目的遺伝子の発現量が、正常対照を発現量 1 とした相対比により詳細に計測された。その概要は以下の通りである。HOX 遺伝子の子宮体癌および卵巣癌での発現プロファイルを作成するために、39 個の HOX 遺伝子の特異的プライマーをそれぞれ作成し内部標準となる PCR 産物を作成した。

これらの遺伝子産物の配列が目的の HOX 遺伝子産物の塩基配列であることを nested PCR および sequence 法を用いて確認した。これらの遺伝子産物を目的細胞での遺伝子の発現を数値化して比較する内部標準として用いるために、その産物を $1/10$ ずつ希釈する希釈系列を作成しオリジナルの 10^{-3} から 10^{-12} までの溶液を作成した後、それらの $1\mu\text{l}$ を用

いて Real-Time PCR を行った。このような各遺伝子での発現量を計測し PCR 回数と発現量との間の標準曲線を作成した後、子宮体癌細胞株と正常子宮内膜細胞および卵巣癌細胞株と正常卵巣上皮細胞から抽出した RNA より作成された cDNA を $1\mu\text{l}$ ずつ使用して再び Real-Time PCR を行った。発現量の正確性を高めるために同時に β -actin 発現量を計測し各サンプル間の RNA 量の初期値の差を補正した。発現の異常については、正常組織細胞での発現量を 1 とした場合の癌細胞での発現量の増減を相対的に判定し、正常に比較し発現の 2 倍以上のものを異常と判定した。しかしながら、遺伝子の発現減弱については正常検体から純粋に上皮のみを取り出すことが現時点では困難なため、以後の検討課題とし参考データとした。

HOXC5 アンチセンス導入実験においては、まず HOXC5 遺伝子の全長のシーケンスより、内因性の RNA 生成を阻害するため、翻訳開始点近傍のシーケンスで他の HOX 遺伝子とのホモロジーが高くない塩基配列を選択し、ここに特異的プライマーを作成し PCR を行った。作成した PCR 遺伝子産物はシーケンスによりその塩基配列が確認された後、ベクター (pGEM-Teasy) に結合された。その後ベクターは大腸菌にトランスフォームされ、培養後再度シーケンスを行いその配列に誤りがないことが確認された。大腸菌によって増幅されたアンチセンス用フラグメントは ERI により切断され、ERI により切断されたもう一つのベクター (pcDNA3.1) にライゲーションされた。この後さらにシーケンスにてベクター上の塩基配列に異常がないことを確認したあと、ベクターは SSPI にて切断され直線化され癌細胞への遺伝子導入用ベクターとされた。遺伝子導入に当たっては、ジーンパルサーを用いたエレクトロポレーション

法が用いられた。導入用の癌細胞には SiHa 細胞が使用された。まず、標的細胞を培養し 2.6×10^6 個の細胞に対して作成されたベクター $50 \mu\text{g}$ が導入された。電気パルスにて導入培養の後、G418 を用いて導入細胞と非導入細胞の選別が行われた。5 日間の再培養のあと細胞の一部が回収され遺伝子の導入がベクター由来のエネオマイシン配列を利用した PCR 法にて確認された。

引き続きこの HOX C5 アンチセンス導入癌細胞の転移浸潤能が非導入細胞に対して低下しているかどうかを確認するためにマトリジェルアッセイを行った。 5×10^4 個の細胞をマトリジェルチャンバー上に乗せ、その後 12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間培養しマトリジェルを通過しメンブレンに固着した細胞のカウントを行った。非導入細胞にて同様の計測を行い、これを正常対照とし、遺伝子導入細胞でどの様に変化するかを計測した。

(2) DLX 遺伝子のメチル化とその発現異常について

MSP(Methylation-specific PCR)法

まず、コンピューターにより計算された BOXB7, B13 の上流領域数カ所において、メチル化選択的プライマーとメチル化非選択的プライマーの両方を **upstream** および **downstream** の双方において作成した。これは重亜硫酸塩による塩基置換反応 (バイサルファイト変換 **bisulfite-mediated conversion, BMC**) により塩基配列の違いが生じる CpG 部位を数個含む配列上に設計されたプライマーである。メチル化された DNA を検出したい時は CpG 部位の C をそのまま C として、メチル化されていない時は C を T としたメチル化 DNA 特異的、非メチル化 DNA 特異的なプライマーである。

プライマー設計後、抽出した DNA に BM

C を行った。その際キアゲン社の **EpiTect Bisulfite Kit** を用いた。これによりオリジナル DNA 上のメチル化されていない C は U へ、メチル化されている C は構造上の安定性のためにそのまま C となり、この反応を受けず U に変換されない。U は最終的に T として認識されることになる。故にメチル化状態の違いが塩基配列の違いへと変換される。すでに作成したメチル化特異的プライマーを用いることでメチル化した場合には PCR によりバンドを形成することができると同時に同じ塩基配列上を非メチル化プライマーで PCR を行うことで PCR 上のバンドが形成されていないことが確認できる。これを BMC 前後の PCR によりバンドの有無を比較することで BMC によりメチル化特異的プライマーでバンドが確認されればその塩基は非メチル化の状態であったことが確認できる。さらに正常細胞でのそれと比較することで癌細胞特異的な状態であるかどうかを判明する。

(3) DLX 遺伝子における組織型別の発現様式の違い

組織特異的発現異常の有無を解析するために、標的細胞として卵巣癌株 5 種類 (OVCA3, SKOV3, CAOV3, CAOV4, KURAMOCHI) を用いてまず癌細胞の培養を行った。培養細胞はコンフレント時にトリプシンを用いて細胞を回収し、total RNA を抽出用キットを用いて遺伝子を抽出した。同時に正常対照および癌組織としては当附属病院にて倫理委員会の承認後インフォームド Consent のもとで得られた子宮筋腫手術時に採取された正常卵巣上皮および卵巣癌組織を使用した。培養細胞はコンフレント時にトリプシンを用いて細胞を回収した。手術検体は採取後直ちに液体窒素にて凍結され、その後用いられた。抽出された RNA は spectrophotometer にてその

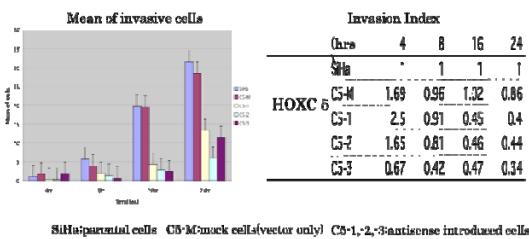
濃度が 1µg/µl に調整された後、1µg を用いて逆転写が行われた。逆転写にはランダムプライマーが用いられ、逆転写酵素により cDNA が作成された。さらに、生成された cDNA を用いて Real-time PCR が行われ各検体での目的遺伝子の発現量が詳細に計測され、異なる組織での発現量の違いが比較された。

4. 研究成果

(1) 子宮頸癌における HOX 遺伝子の異常発現とアンチセンス導入

HOX 遺伝子 39 個の遺伝子中、7 種類の遺伝子 (HOXB9, C5, C6, C8, C10, C11, C13) に増幅が認められた。過剰発現は HOXB および C クラスターに認められ、HOXA および D には認められなかった。過剰発現はパラログ 9 より腹側方向に認められ、頭側方向には認められなかった。HOXC5, 6, 8 および C13 においては正常子宮頸部組織で遺伝子の発現が認められなかった。過剰発現の認められた HOXC5 において、HOXC5 アンチセンス導入により、オリジナル細胞と比較し C5 アンチセンス導入細胞では、8 時間後よりその浸潤能の低下が観察され、16 時間ないし 24 時間後におよそオリジナル細胞の 60% 程度までの浸潤能の低下を観察した。

Result of chemo-invasion assay



同時に作成した mock 細胞では浸潤能の低下は観察されなかった。以上より、子宮頸癌においても、子宮体癌や卵巣癌同様に HOX 遺伝子の癌浸潤能に対する直接的な影響が確認

された。子宮体癌、卵巣癌同様過剰に発現している HOX 遺伝子を制御することで癌転移の制御が可能となる可能性が示された。

(2) DLX 遺伝子のメチル化とその発現異常について

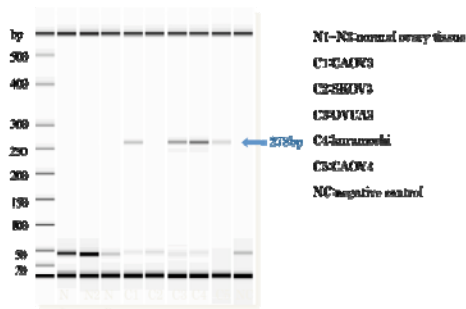
癌細胞をもちいた MSP 法では BMC 前後でのメチル化の差が検出できなかった。また、正常細胞との差も検出されなかった。結果を図に示す。メチル化酵素である Dnmt1 の異常発現があれば DLX 異常発現との間に関連性があり得るとして発現解析を行ったがこれについても異常を認めなかった。これらの結果により考えられるのは、転写開始領域の上流におけるメチル化の状態はメチル化されていない状態、すなわち発現している状態で、このことが正常細胞での状態と差がなかったことから、メチル化の影響と発現異常の間には関連がないと考えられた。

(3) DLX 遺伝子における組織型別の発現様式の違い

対照となる正常卵巣上皮(手術検体)では DLX の発現は全く認められなかった。一方、SKOV3 位階の細胞株ではそのすべてに発現が認められたが、SKOV3 では発現が認められなかった。SKOV3 は漿液性線が由来の細胞株であることから組織発現の違いとして、漿液性腺癌、粘液性腺癌、明細胞性腺癌、類内膜性腺癌のそれぞれの組織を複数個採取し、それぞれにおいて Real-time PCR 法を用いて発現の有無を検討した。その結果、類内膜性腺癌由来組織では 4 組織中 4 組織で DLX の発現を認めた。粘液性腺癌では 5 組織中 4 組織で発現を認めた。明細胞腺癌では 3 組織中 1 組織で発現を認めた。以上 3 組織型では 100% ではないが、そのすべてに DLX の発現が認められた。しかしながら、漿液性腺癌 4 組織では 4 組織とも

DLX の発現は認められなかった。同時に腹膜中皮由来組織である卵管上皮、内膜上皮、腹膜組織より同様に Real-time PCR にて発現の有無を検討したところ、それらのいずれにおいても DLX の発現は認められなかった。細胞株での結果から推測されるように、漿液性腺癌での DLX の発現は認められなかったことから、卵巣癌の癌の組織型の違いと DLX の発現様式が深く関わっていることが推測された。また同時に行った正常卵管、子宮内膜、腹膜等でも DLX の発現が認められないことから、腹膜由来の組織(中胚葉)では通常これらは発現せず、癌化の過程で組織形態や分化の方向性に変化が現れるときに発現し何らかの影響を与えている可能性があることが推測された。

Overexpression of *DLX1* in ovarian carcinoma cell lines



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 山下 剛、片山 英人、加藤 育民、荻野元子、横浜 祐子、西脇 邦彦、千石 一雄

Laparoscopic sentinel node navigation surgery followed by laparoscopic radical hysterectomy as minimally invasive surgery in early invasive cervical cancer

第 16 回国際婦人科内視鏡学会 (16th ISGE)

第 8 会アジアパンパシフィック婦人科内視鏡

学会 (8th APAGE)

第 47 回日本産科婦人科内視鏡学会 (47th JSGOE)

2007 年 3 月 19 日、大阪市

2. 西脇邦彦、山下剛

The homeobox-containing gene *Dlx1* is expressed in ovarian cancer tissues, but not serous adenocarcinoma of the ovary

99th AACR Annual Meeting,

2008 年 4 月 15 日、サンディエゴ市、米国

3. 山下剛、千石一雄

ABNORMAL EXPRESSION OF HOX AND DLX HOMEBOX GENES IN OVARIAN CANCER AND INVASION ABILITY IN ANTISENSE INTRODUCED OVARIAN CANCER CELLS

The 12th International Gynecologic Cancer Society (IGCS) biannual Meeting

2008 年 10 月 27 日、バンコク市、タイ国

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 剛 (TSUYOSHI YAMASHITA)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30271787

(2) 研究分担者

片山英人 (KATAYAMA HIDETO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20359491

西脇邦彦 (NISHIWAKI KUNIHICO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90419218

(3) 連携研究者

該当無し