

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792317

研究課題名（和文）口腔癌における HOX 遺伝子群の発現状態と癌関連遺伝子への影響・制御の検討

研究課題名（英文）The analysis of expression state of HOX family genes and their effects for cancer-associated in oral cancer

研究代表者

神津 由直（KOUZU YUKINAO）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70400942

研究成果の概要（和文）：本研究では、転写因子である HOX family とその関連遺伝子の、口腔扁平上皮癌との潜在的関係性を検討した。リアルタイム PCR にて HOX 遺伝子群の口腔扁平上皮癌由来細胞株における mRNA の発現状態を確認した結果、多くの HOX 遺伝子群の中で、HOXA1 および関連遺伝子の発現が亢進していた。また、臨床検体においても mRNA およびタンパクレベルで発現の亢進を認めた。さらに、siRNA を用いた HOXA1 発現抑制実験を行ったところ、細胞増殖能の抑制効果を認めた。以上より HOXA1 および関連遺伝子は口腔扁平上皮癌と密接に関係し、特に HOXA1 は腫瘍の進展に重要な役割を果たす可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to examine the potential relationship of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and HOX family which is transcription factors. We evaluated the status of HOX genes mRNA expression in OSCC cell lines by real-time PCR. The expression of HOXA1 and oral cancer related genes were particularly increased in all OSCC-derived cell lines. Similar to cell lines, increased expression was observed at mRNA and protein levels in clinical specimens. In addition, suppression of HOXA1 expression with siRNA significantly inhibited cell proliferation compared with the control cells. We suggested that HOXA1 and oral cancer related gene are closely related to OSCC and HOXA1 may play an important role in tumor progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：HOX family、HOXA1、口腔癌、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

核内転写因子である *Homoobox (HOX)* 遺伝子群は、4つの Family を持つ。脊椎動物では、HOX 遺伝子群は、各染色体上において約 40 個の遺伝子が 4つの遺伝視座に約 10 個ずつクラスター上に存在していることが知られている。これらの遺伝子クラスター

はコンプレックスと呼ばれ、各々約 100kb の DNA 領域を占めている。また、それら遺伝子群は同じ方向にコードされており、それらの発現は染色体上の位置を反映している。HOX 遺伝子群は多くの遺伝子に対するコントロールチャネルの役割を果たしており、発生初期における形態形成や分化に置ける関

与が報告されている。また、性ホルモンによる主要な制御を受け、月経周期の子宮内膜の発達や、受精卵の着床に関与している。また出生後の正常な赤血球や巨核球が生成される過程の制御因子でもあり、白血病細胞の生成にも深く関わっている。本遺伝子の欠損により、着床前後の正常な免疫抑制である T 細胞が多クローン化するといった、局所の免疫機構の破綻を来すことが報告されており、癌化と免疫システムの維持への深い関わりが示唆される。このように、転写因子である *HOX family* は胎児タンパクや分化のコントロールチャネルであるので、癌化に深く関係していることが推測でき、本解析は口腔癌においても発癌機構の解明に役立つものと思われる。

当教室では、ヒト全遺伝子搭載マイクロアレイ (affymetrix 社) を用いて口腔癌組織における遺伝子発現について解析を行ってきた。本研究において、そのデータを活用して、*HOX* 遺伝子群の口腔癌における発現状態と癌関連遺伝子との関係を解析し、*in vitro* の機能解析を行い、さらに実際の口腔癌臨床サンプルで機能を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は単一遺伝子を云々する研究でなく、一つの機能を果たす遺伝子群として核内転写因子である *HOX* 遺伝子群を捉え、遺伝子群相互の関連や調節制御機構にまでおよぶメカニズムの変化や異常を総合的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 口腔癌における *HOX* 遺伝子群の発現状態を独自に作成・保有しているマイクロアレイ・データベースとプロテオームマップで明らかにする。
- (2) パスウェイ解析により、主要な癌関連遺伝子との関係を考察し、特に本遺伝子が影響を及ぼすと考えられる癌関連遺伝子を絞り込む。
- (3) Real-time PCR により口腔癌細胞株と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株を用いて *HOX* 遺伝子群と絞り込まれた癌関連遺伝子群の mRNA の発現状態を明らかにする。
- (4) Western blot 法により口腔癌細胞株と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞を用いて *HOX* 遺伝子群と絞り込まれた癌関連遺伝子群のタンパクの発現状態を明らかにする。
- (5) 実際の臨床検体を用いて Real-time PCR により *HOX* 遺伝子群と絞り込まれた癌関連遺伝子群の mRNA 発現を定量する。
- (6) 実際の臨床検体を用いて免疫染色法により *HOX* 遺伝子群と絞り込まれた癌関連遺伝子群のタンパク発現を定量する。
- (7) 口腔癌細胞株において、siRNA 導入等、

本遺伝子の形質転換を行い、細胞株の変化による浸潤能に対する影響を解析する。

同様にマウスでの転移実験により転移能への影響を明らかにする。

4. 研究成果

本研究において、正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株(HNOK)と口腔癌細胞株 10 種類を用い、Affymetrix 社製 GeneChipTM (HumanGenome U133 Plus 2.0array,54,675 プローブ搭載)を使用して転写因子 *HOX* 遺伝子群の口腔癌細胞株における発現状態を、マイクロアレイで解析した。

gene	fold change	gene	fold change
HOXA10	211.95	HOXD-AS1	5.16
HOXA1	91.84	HOXA13	4.479
HOXB7	49.517	HOXA4	4.275
HOXD11	38.423	HOXD3	4.076
HOXC9	20.091	HOXB3	3.876
HOXB9	19.438	HOXB-AS5	3.287
HOXA9	17.291	HOXB13	3.268
HOXB13	13.189	HOXA5	3.241
HOXA7	10.734	HOXC8	3.213
HOXA11	10.666	HOXB6	2.38
HOXC10	9.438	HOXA11-AS	2.367
HOXA3	8.173	HOXD1	2.285
HOXD13	7.408	HOXD9	2.266
HOXA6	7.241	HOXB5	2.238
HOXB-AS3	6.989	HOXC11	2.142
HOXB8	6.314	HOXB-AS4	2.138
HOXD10	5.986		

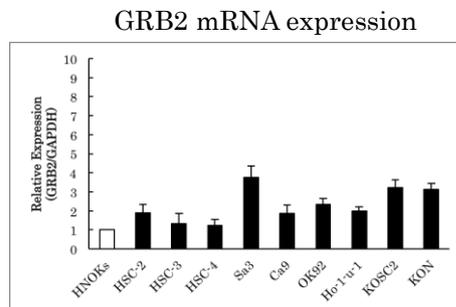
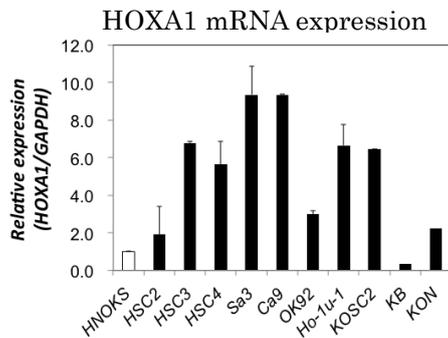
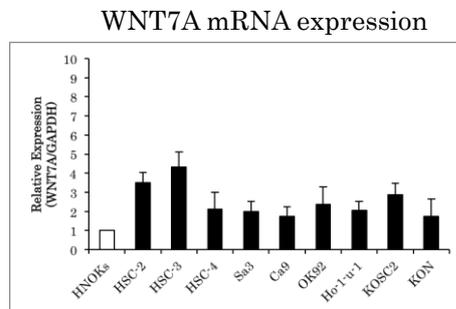
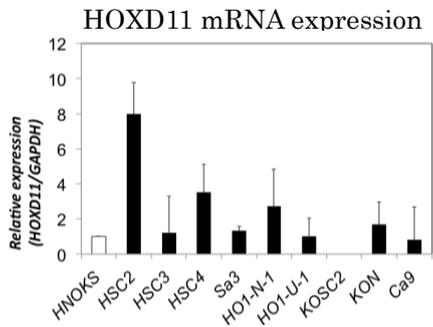
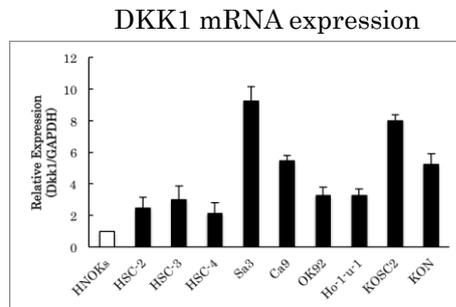
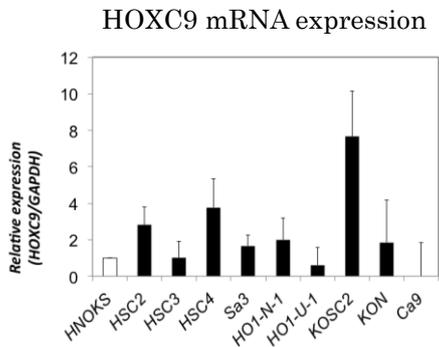
それらのうち、特に発現が上昇していた遺伝子を下に示す。

	microarray fold change	癌の報告	機能
HOXA1	91.8	乳癌・肺腺癌	転写因子
HOXB7	49.5	<u>口腔癌</u>	転写因子
HOXC9	20.1	神経芽細胞腫	転写因子
HOXD11	38.4	子宮癌	転写因子
HOXA10	212	論文発表 済 Yamatoji M et al.	転写因子

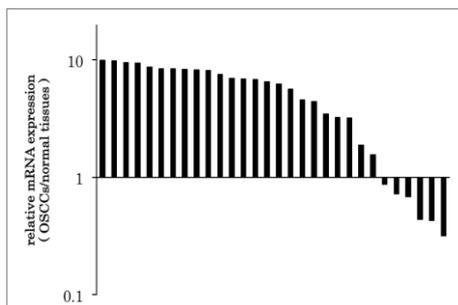
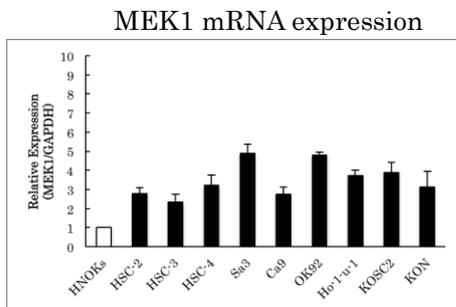
正常口腔粘膜上皮と比較して口腔癌細胞株で発現が特に亢進していたものは *HOXA1*, *HOXB7*, *HOXC9*, *HOXD11*, *HOXA10* の 5 種類あった。
上記 *HOX* 遺伝子群全てのプライマーを作成し(*HOXB7* は既に口腔癌で報告されている

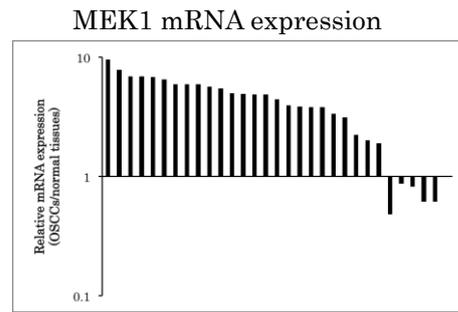
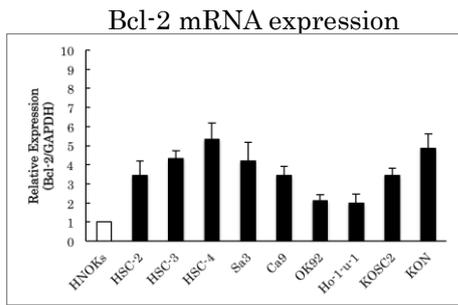
ため除外した)、口腔扁平上皮癌細胞株 10 種について RT-PCR 法を用いて mRNA 発現解析を行った。その結果、HOXA1 および HOXA10 遺伝子のみ、全ての口腔癌細胞株において正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株と比べて発現上昇を認めた。HOXA10 については既に報告した (Yamatoji et al. 2010)。

次にパスウェイ解析により、HOX 遺伝子群に関連すると考えられる遺伝子を検索し、Dkk1、Wnt7A、GRB2、MEK1、Bcl-2 の 5 遺伝子を選び出した。各々について口腔癌細胞株における mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて分析した。

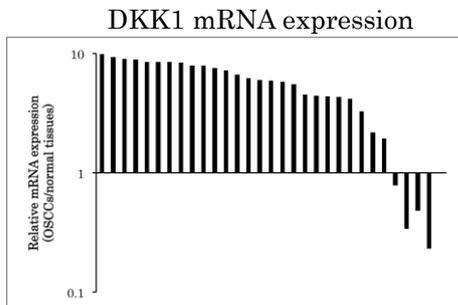
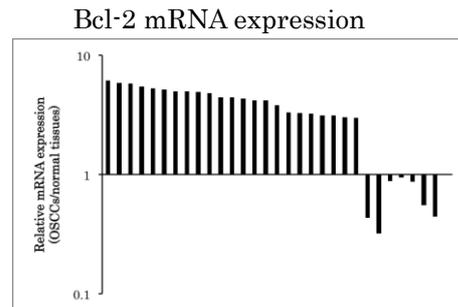


口腔癌臨床検体 30 例における HOXA1 mRNA レベルを解析したところ、80% (24/30 例) で HOXA1 の発現上昇が認められた。

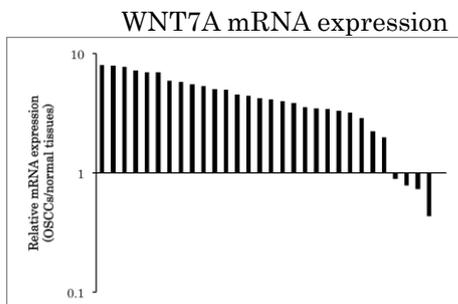




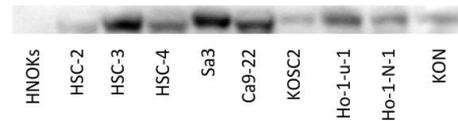
各々の遺伝子で有意な発現の亢進が認められた。
 HOXA1 と同様に口腔癌臨床検体 30 例を用いて mRNA レベルを解析した。
 DKK1 は 87%、WNT7A は 87%、GRB2 は 80%、MEK1 は 83%、Bcl-2 は 77% で発現上昇が認められた。



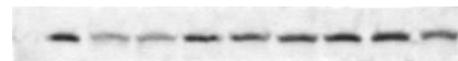
次に、HOXA1、DKK1、Bcl-2 について、タンパクにおける発現状態について確認した。その結果、全ての口腔癌細胞株において正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株と比べて発現上昇を認めた。



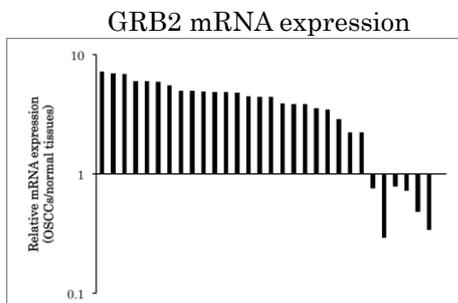
HOXA1



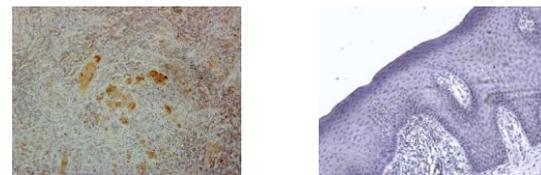
DKK1



Bcl-2



また、免疫組織化学染色における HOXA1 遺伝子の発現との関連を調べたところ、正常組織と比べて腫瘍において有意に染色されており高発現が示唆された。



口腔扁平上皮癌(×400) 正常組織(×200)

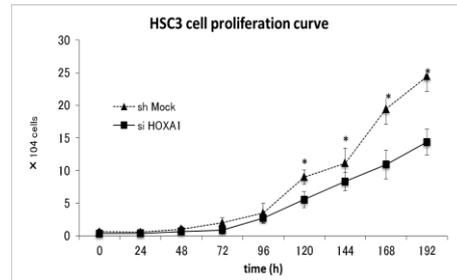
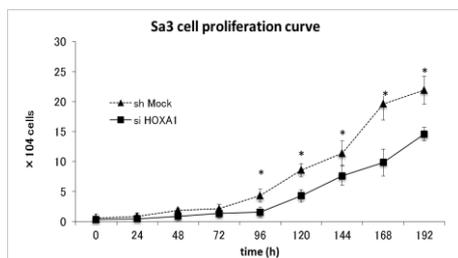
IHC スコアリングシステムにより臨床指標

との相関を調べたところ、primary tumor size において有意な相関を認めた。

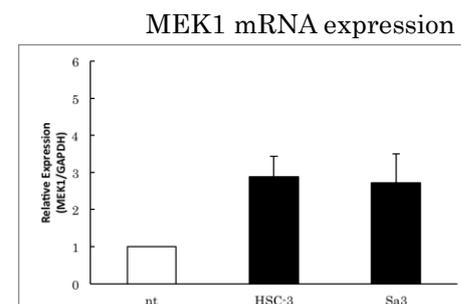
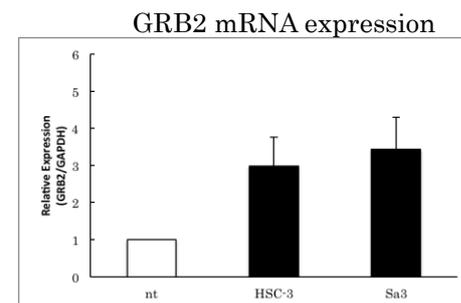
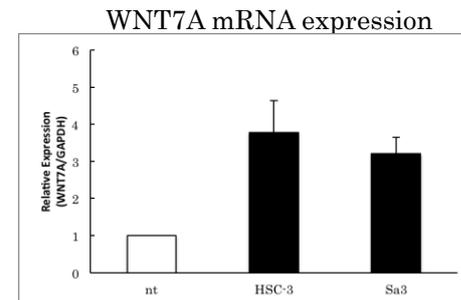
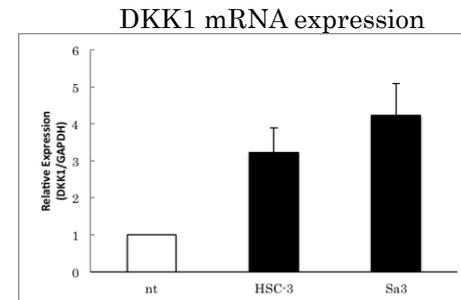
IHC スコアと臨床指標との相関

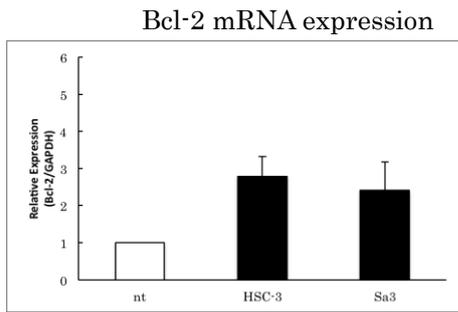
		(+)	(-)	p-value
Age	< 60	12	6	0.2463
	60~70	7	5	
	70<	18	10	
Gender	Male	36	11	0.2728
	Female	5	6	
T	1	9	5	0.0483
	2	13	8	
	3	12	1	
	4	4	5	
	1+2	22	13	
	3+4	16	6	
N	-	19	15	0.0736
	+	22	2	
Stage	I	9	5	0.0814
	II	6	9	
	III	6	0	
	IV	15	3	
	I + II	15	14	
Grade	well	25	9	0.5066
	moderate	14	6	
	poor	1	3	
Location	tongue	18	10	
	Gingiva	15	10	
	Buccal mucosa	2	0	
	lip	0	0	
	Oral floor	3	0	
	sinus	0	0	

次に siRNA を用いて HOXA1 をサイレンシングし、細胞増殖能試験を行った。その結果、siHOXA1 と Mock とで、Sa3 では 96 時間後、HSC-3 では 120 時間後に、有意な増殖能の相違が認められた。wound healing assay、invasion assay では HNOKs と各細胞株で有意差は認めなかった。



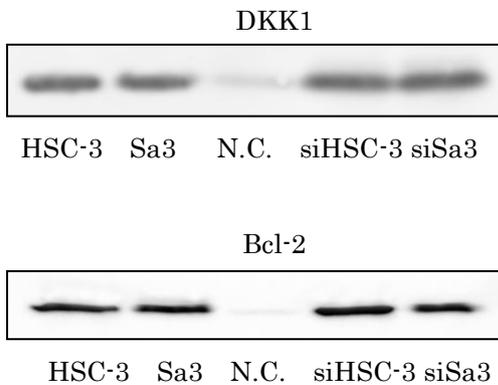
さらに我々は、siRNA で HOXA1 をサイレンシングした口腔癌細胞で、先に選び出した遺伝子の mRNA 発現を調べた。





その結果、全ての遺伝子で有意な発現の変化は認めなかった。

Western blotting で DKK1 と Bcl-2 のタンパク発現を確認したが、統計学的有意差は認めなかった。



以上より、その機序については今後さらなる検討が必要であるが、HOX 遺伝子 family は口腔癌において、発症・進展に重要な機能を有していると考えられ、腫瘍マーカーおよび治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神津 由直 (KOUZU YUKINAO)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：70400942

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

