



The analysis of HOXA-family gene expression and its clinical significance in colorectal cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-07-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡辺, 洋平 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000077

The analysis of HOXA9 expression and its clinical significance in colorectal cancer

(大腸癌における HOXA9 遺伝子の発現解析とその臨床的意義の検討)

福島県立医科大学 器官制御外科学講座

渡辺 洋平

要旨

Homeobox (HOX) 遺伝子ファミリーは、組織の形態形成の制御に関連する調節因子であり、食道癌や胃癌など消化器系癌において HOX 遺伝子の発現異常が報告されている。しかし、これまで大腸癌における HOX 遺伝子の発現に関する報告はほとんどない。そこで、今回われわれは、大腸癌における HOXA 遺伝子の発現を解析し、臨床病理学的背景因子や予後との関連を検討した。

まず、大腸癌臨床検体を用いて癌組織と正常組織における HOXA クラスターの全 11 遺伝子 (A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A9、A10、A11、A13) の mRNA 発現解析を RT-PCR 法にて行った。また、RT-PCR 法で発現に最も差が認められた HOXA9 遺伝子について、大腸癌臨床検体における mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。次いで、免疫組織化学染色法にて HOXA9 の癌組織における発現を解析し、臨床病理学的因子との相関について検討した。続いて、癌細胞における HOXA9 発現の生物学的意義を調べるため、大腸癌細胞株 12 種類での HOXA9 mRNA の発現を解析し、siRNA オリゴを用いて HOXA9 をノックダウンし、形態や細胞増殖の変化を検討した。

HOXA クラスター遺伝子のうち HOXA9 の mRNA 発現が癌組織で正常組織に比べて有意に亢進していた ($P<0.01$)。また、免疫組織化学染色では、231 例中 161 例 (69.6%) で癌部に HOXA9 の過剰発現を検出した。その発現は、主に癌細胞の核に認められた。HOXA9 発現と臨床病理学的因子との関連を検討した結果、発現陽性例ではリンパ節転移陽性が有意に多く ($P=0.02$)、stage III 以上の症例が多かった ($P=0.03$)。12 種類の大腸癌細胞株のうち HOXA9 の発現が最も高かった SW48 を用いて、siRNA 法によって HOXA9 をノックダウンした結果、細胞の形態や細胞の増殖に変化は認めなかった。

大腸癌において HOXA9 の過剰発現は、リンパ節転移とステージに有意な関連

を認めた。以上より H0XA9 の発現は大腸癌の進展に際し、その浸潤や転移に関与する可能性が示唆された。

はじめに

大腸癌は、世界で 3 番目に罹患率の多い癌であり、世界中で毎年約 123 万人が発症し 60 万人が死亡している¹⁾。日本においても大腸癌の罹患率はこの数十年の間に欧米と肩を並べるほどになっている²⁾。大腸癌の診断や治療の進歩は、無再発生存率や全生存期間の延長に寄与しているものの、いまだ進行癌においては治療効果が充分でない症例が多い。そこで化学療法の効果予測因子や予後予測因子、さらには分子標的治療の標的となるような遺伝子の同定が不可欠である。

Homeobox (HOX) 遺伝子ファミリーは、組織の形態形成の制御に関連する調節因子であり、胚発生期間中の胚のパターニングに関与し、成体においても組織特異的な分化の維持にとっても重要な役割を果たしている^{3,4)}。それぞれ異なる染色体上に存在する *HOXA*、*B*、*C*、*D* の 4 つのクラスターに分類される 39 の転写因子のサブファミリーで構成され^{5,6)}、細胞の成長や生存に影響を与える。下流の遺伝子の転写を制御する転写因子をコードすることで、組織や臓器特異性を維持する制御遺伝子として知られている^{7,8,9)}。

HOX 遺伝子は例えば女性の生殖管の機能や肺高血圧症、肺気腫で血管新生および創傷修復などに関与することが報告されている^{10,11,12)}。また、*HOX* 遺伝子の発現が疾患によって異なることが近年報告されている。例えば *HOXA13* 遺伝子の変異は、多指症や手・足・性器症候群を生成し、ヒト奇形に関連する¹³⁾。*HOX* 遺伝子の発現の変化は、その機能ゆえに、細胞の生存や組織の形態形成を変化させ、細胞の成長や浸潤を促進するような癌遺伝子としての機能を有する可能性も示唆されている^{14,15)}。さらに *HOX* 遺伝子は、白血病、皮膚、前立腺癌、乳癌および卵巣癌を含む多くの癌で発現異常をきたすことが確認されてきている^{8,16~21)}。一部の癌では予後や臨床病理学的因子との関連を示唆する報告も見受け

られる。しかし、*HOX* 遺伝子の発現変化が、癌の生物学的機能に与える影響については不明な点が多い⁸⁾。また、消化器系の固形腫瘍である食道癌、胃癌や肝細胞癌と *HOX* 遺伝子の発現に関する報告は散見されているが^{22~28)}、大腸癌と *HOX* 遺伝子との関連についての報告はわずかにあるのみであり^{29, 30)}、大腸癌における *HOX* 遺伝子の発現とその生物学的意義は明らかでない。そこで今回われわれは、*HOX* 遺伝子のなかでも、すでに食道癌や胃癌、肝細胞癌などで関連が報告されている *HOXA* クラスターに着目し、大腸癌症例を対象に *HOXA* 遺伝子ファミリーの発現を解析した。その結果、*HOXA* 遺伝子ファミリーのなかで、大腸癌で発現変化が認められる遺伝子について、予後と臨床病理学的背景因子との関連を解析した。

材料

大腸癌臨床検体

本研究では、1991 年 1 月から 2007 年 12 月までの期間に当科で手術を施行した大腸癌症例の臨床検体 231 例を用いた。本研究の実施にあたっては、当施設の規定に従って倫理委員会の承諾を得ている。(承認番号 1615)

大腸癌細胞株

当実験室にて継代培養している 12 種類のヒト大腸癌培養細胞株 Colo201、Colo205、HCT15、HCT116、LoVo、LS174T、LS180、RK0、SW48、SW480、SW620、SW837 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) を用いた。

方法

大腸癌臨床検体における *HOXA* 遺伝子の mRNA 発現解析

上記大腸癌症例のうち、癌部と非癌部の凍結組織が得られた 10 例 (case 1～10) を対象にして *HOXA* 遺伝子の mRNA 発現を解析した。手術にて摘出された検体は直ちに凍結保存した。癌部と非癌部の検体をそれぞれ約 7 x 7 mm 角の大きさの切片とし、1ml の Trizol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) に入れ、ホモジェナイザーを用いて破碎した。クロロホルム 200 μ l を加えたのち、12,000 rpm、15 分間遠心した。最上層の透明の液体部を回収し、500 μ l のイソプロパノールを加え 12,000 rpm、10 分間遠心した。上清を破棄した後、ペレットに 75%エタノールを 1 ml 加え 12,000 rpm、5 分間遠心して上清を破棄し、DNase と RNase を含まない水に溶解して total RNA 溶液とした。Super script III cDNA synthase kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) を用い、付属手順書に従って、Total RNA 5 μ g から random hexamer をプライマーとして cDNA を合成した。

続いて、KAPA taq Extra HotStart ReadyMix with dye (Nippon Genetics Corporation, Tokyo, Japan) を用い、プロトコールに従い *HOXA* クラスターの全 11 (*A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A5*, *A6*, *A7*, *A9*, *A10*, *A11*, *A13*) 遺伝子と内部標準コントロールとして β -actin (*ACTB*) の RT-PCR を施行した。使用したプライマーは、下記の通りである。

HOXA1 F: cccatggaggaagtgaagaaa R: ggacccatgggagatgagaga

HOXA2 F: agtctcgcctttaaccagca R: ggcctcactactgctctcagg

HOXA3 F: aatgccagcaacaaccctac R: tgaccagcgaatgcatagag

HOXA4 F: ccctggatgaagaagatcca R: gaggatcgcacatcttggtgtt

HOXA5 F: gtgaagaagccctgttctcg R: aacgagattgaagggggact

HOXA6 F: cgcgcaaataagattcctatt R: gaccgagttggactgttggt

HOXA7 F: ggcttgccctgctacctagt R: gaagctggaagcatctccac

HOXA9 F: ccacgcttgacactcacact R: tcgtcttttgcgcggtcttt

HOXA10 F: gggggaaaaagccatatcat R: gggagaattgtggtgtgctt

HOXA11 F: gcttggaagcttctggtgac R: aattgaggacaggccaacac

HOXA13 F: ctggaacggccaaatgtact R: agagattcgtcgtggctgat

β-actin (ACTB) F: gctcgtcgtcgacaacggctc R: caaacatgatctgggtcatcttctc

HOX 遺伝子では、各々94℃5 分間変性させ、94℃60 秒、60℃45 秒、72℃45 秒を計 35 サイクル行った。*ACTB* は、94℃で 5 分間変性させ、94℃30 秒、55℃30 秒、72℃30 秒を計 25 サイクル行った。PCR 産物を 2%アガロースゲル（エチジウムブロマイド含有）で電気泳動し、case 1～10 について正常組織（N）と癌組織（T）における発現を比較した。

大腸癌臨床検体における *HOXA9* mRNA の発現解析

HOXA9 遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の発現解析を行った。RT-PCR の際と同様に、癌部と非癌部の凍結組織が得られた 40 例の臨床検体を用いた。Fast Start Universal Probe (Roche Diagnostics K. K., Tokyo, Japan) を用いて反応液を調製し、7500 Real-time PCR system (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) を用いて測定を行った。PCR 条件は 50℃で 2 分間、続いて 95℃で 10 分間の初期変性を行い、95℃で 15 秒間、次いで 60℃で 1 分間の反応を 40 サイクル繰り返し行った。各遺伝子の mRNA 発現量は *ACTB* の mRNA 発現量を内部標準コントロールとし、 $\Delta \Delta Ct$ 法にて定量した。測定は各々3 回施行し、その平均で示した。*HOXA9*、*ACTB* のプライマーは、Applied Biosystems からそれぞれ Hs00266821_m1、Hs99999903_m1 を購入し使用した。

大腸癌臨床検体における *HOXA9* 発現と臨床病理学的背景因子の関連

大腸癌 231 症例を対象に、免疫組織学的染色法にて HOXA9 の発現を検討した。手術摘出標本を 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋されたブロックは 4 μ m で薄切、キシロールによる脱パラフィン後、エタノール、次いでリン酸バッファー液 (pH 7.2) に置換した。0.3%過酸化水素を添加したメタノールに浸けて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、Protein Block (Dako Japan Corporation, Tokyo, Japan) にてブロッキングした。一次抗体として抗ヒト HOXA9 ポリクローナル抗体 (Novus Biologicals, Southpark Way, USA) を希釈倍率 1:1000 として使用し、二次抗体として Envision/HRP 標識ウサギ一次抗体用試薬 (Dako Japan Corporation, Tokyo, Japan) を用いて免疫染色を行った。発色には DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 発色基質を用いた。HOXA9 抗体による免疫組織化学染色法の結果は以下のように評価した。発現は主に細胞の核に認められたことから、核に染まりが認められる細胞を陽性細胞とした。陽性細胞の比率は、200 μ m $\times$ 200 μ m の領域を任意に 3 箇所選び、癌組織では癌細胞、正常組織では腺空を形成する細胞から陽性細胞の占める割合を算出した。陽性染色がある細胞の割合、10%以上の場合を陽性とし、10%未満の場合は陰性と判断した。性別、年齢、深達度、所属リンパ節転移、肝転移、組織型(分化型癌、未分化型癌)、リンパ管侵襲、静脈侵襲、局在部位(結腸、直腸)および stage について各臨床病理学的因子と HOXA9 の発現の相関について検討した。なお、深達度・所属リンパ節転移の有無・同時性遠隔転移の有無・TNM 分類の stage については TNM 分類第 7 版³¹⁾に従って表記した。リンパ管侵襲・静脈侵襲については大腸癌取り扱い規約第 7 版補訂版³²⁾に従い表記した。

大腸癌培養細胞株における HOXA9 mRNA の発現解析

大腸癌細胞株の培養液は RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis,

USA)並びに DMEM (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)を使用し、それぞれに 10% fetal bovine serum (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Tokyo, Japan)を添加した。すべての細胞株は 5%CO₂、37°Cで培養した。

続いて、大腸癌細胞株各々で 80%コンフルエントの状態に細胞を回収し、前述した TRIzol を製品の説明書に従って用い、total RNA を抽出した。クロロホルム 200 μ l を加えたのち、12,000 rpm、15 分間遠心した。3 層に分かれた最上層のみを回収し、500 μ l のイソプロパノールを加え 12,000 rpm、10 分間遠心した。上清を破棄した後、ペレットに 75%エタノールを 1 ml 加え 12,000 rpm、5 分間遠心し、上清を破棄し、DNase と RNase を含まない水に溶解し total RNA 溶液とした。続いて各サンプルの Total RNA 5 μ g から Super script III cDNA Synthesis Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)を使い、Random hexamer を用いてプロトコールに従い cDNA を合成した。合成した cDNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法による解析を行った。

HOXA9 のノックダウンによる細胞の増殖や形態の変化

HOXA9 の発現をノックダウンするための siRNA は HOXA9 Stealth Select RNAiTM siRNA HSS142497 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)を用い、コントロールは、Stealth RNAiTM siRNA Negative Control Med GC (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)を使用した。ノックダウンする細胞は、リアルタイム RT-PCR 法にて最も高い発現を示した大腸癌培養細胞株 SW48 を用いた。10 cm シャーレに 2×10^6 個の細胞を播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)を用いて、20 nM の HOXA9 とコントロールの siRNA オリゴを各々遺伝子導入した。細胞は 48 時間培養した後回収した。ノックダウンの確認は回収した細胞から抽出した total

RNA から cDNA を合成しリアルタイム RT-PCR にて行った。

上記手法にて作成したノックダウン細胞とコントロール細胞の形態および細胞数の確認を行った。SiRNA オリゴの導入からそれぞれ 24 時間後、48 時間後の形態をおよび細胞数を比較した。細胞数については Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) を用いカウントして比較した。

統計解析

実験は、同様の方法で 3 回繰り返し行い、結果を統計学的に解析した。2 群間の発現解析には、student-*t* 検定を行い、HOXA9 の発現と臨床病理学的背景因子との関連は χ^2 検定を用いて統計処理を行った。生存分析は、Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、log-rank 検定を行った。*P* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意差ありと判定した。統計処理は GraphPad PRISM Ver. 5.03 (Graphpad software, La Jolla, USA) にて行った。

結果

大腸癌臨床検体における *HOXA* 遺伝子の mRNA 発現解析

正常組織と癌組織の mRNA 発現程度を比較検討した結果、最も異なっていたものは *HOXA9* であった。その他 *HOXA1*、*HOXA4* の mRNA 発現も一定の傾向が得られた。*HOXA9* は 10 例中 8 例 (Cases 1、2、3、4、5、6、7、10) で正常組織に比べて癌組織で発現が亢進していた。*HOXA1* は 10 例中 7 例 (Cases 1、3、4、5、7、8、9) で、正常組織に比べて癌組織で亢進していたが、2 例 (Cases 6、10) では癌組織の発現が低下していた。また、*HOXA4* mRNA 発現では、5 例 (Cases 1、3、6、8、9) で癌組織の発現が低下していたが、その他の症例では癌組織、正常組織ともに発現が認められなかった。そのほかの *HOXA* 遺伝子の mRNA 発現は、

癌組織と正常組織を比べて一定の傾向は認められなかった (Fig. 1)。

大腸癌臨床検体における *HOXA9* mRNA の発現解析

大腸癌 40 症例を用いたリアルタイム RT-PCR の解析の結果、*HOXA9* mRNA の発現は、正常組織に比べて癌組織で有意に亢進していた ($P<0.01$) (Fig. 2)。

大腸癌症例における *HOXA9* の発現と臨床病理学的背景因子の関連

免疫組織染色化学法による *HOXA9* の発現は、大腸癌 231 例中、癌組織で 161 例 (69.6%) に認められた (Fig. 4)。発現陽性 161 例と陰性 70 例に分けて、臨床病理学的背景因子との関連を調べた。その結果、発現陽性例では所属リンパ節転移症例が有意に多かった ($P=0.02$)。また進行度を Stage II 以下と III 以上の 2 群にわけて解析すると発現陽性例で stage III 以上の症例が有意に多かった ($P=0.03$)。その他、性別、年齢、深達度、肝転移、組織型、静脈侵襲、リンパ管侵襲、癌の局在部位と *HOXA9* の発現の間には有意な関連は認められなかった (Table 1)。また、*HOXA9* の発現の有無と生存期間の解析においては、統計学的に有意差は認められなかった (観察期間中央値 1717 日) (Fig. 5)。また、進行度を stage II 以下と III 以上でそれぞれ発現陽性、陰性での予後の解析を行ったが、有意差は認めなかった (stage II 以下: $P=0.31$ 、stage III 以上: $P=0.07$)。また、所属リンパ節転移の有無別にそれぞれ発現陽性、陰性にわけて予後の解析を行ったが、有意差は得られなかった (所属リンパ節転移あり: $P=0.09$ 、所属リンパ節転移なし: $P=0.35$)。

大腸癌培養細胞株における *HOXA9* mRNA 発現解析

大腸癌培養細胞株すべてにおいて *HOXA9* mRNA の発現が認められたが、発現レベ

ルは様々であった。これらの細胞株のうち、SW48 が *HOXA9* の mRNA 発現レベルが最も高かった (Fig. 3)。

HOXA9 ノックダウンによる細胞の増殖や形態の変化

HOXA9 mRNA 発現レベルが最も高かった大腸癌細胞株 SW48 を用いて、siRNA オリゴにより *HOXA9* の発現をノックダウンした。その結果、*HOXA9* mRNA 発現は、コントロール細胞に比べて、およそ 70% の低下を認めた (Fig. 6)。ノックダウン細胞とコントロール細胞の比較では 24 時間後および 48 時間後においても細胞の形態に変化を認めなかった (Fig. 7)。また細胞数の比較でも 24 時間後および 48 時間後に有意な差は認めなかった (Fig. 8)。

考察

本研究では大腸癌症例における *HOXA* 遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法、およびリアルタイム RT-PCR 法にて解析した結果、*HOXA9* の mRNA 発現が正常御組織に比べて癌組織で有意に発現が亢進していることを見出した。大腸癌における *HOXA* 遺伝子に関する報告はほとんどなく、その臨床的意義も含めて検討したものとしては本報告が初めてである。*HOXA9* の発現変化のメカニズムについては、*HOX* 遺伝子のヒストン修飾によるプロモーターのメチル化や脱メチル化によって引き起こされるとする報告がある^{33, 34, 35)}。Kim ら³⁶⁾によると筋層非浸潤膀胱癌において *HOXA9* 遺伝子の高度のメチル化が *HOXA9* 遺伝子の発現低下と関連しており、*HOXA9* 遺伝子のメチル化の検索が疾患の進行や再発、予後予測のマーカーになり得ると報告している。大腸癌では、*HOXA9* の発現が亢進していることより、この機序は外挿できない可能性があるが、その他のメカニズムとして、*HOX* 遺伝子クラスターでエンコードされた miRNA が、mRNA と翻訳機構との間の mRNA を切断ま

たは干渉することによって *HOX* 遺伝子発現を調節するとの報告もあり³⁷⁾、発現変化のメカニズムについては未だ明らかでないことが多く、今後検討されるべき課題である。

さらに、大腸癌臨床検体について免疫組織化学染色法を用いて *HOXA9* の発現を解析した結果、231 例中 161 例 (69.6%) で mRNA 同様、発現亢進が明らかとなった。*HOXA9* 発現と臨床病理学的背景因子との関連を検討した結果では、陽性症例に有意に所属リンパ節転移例が多く、stage III 以上の進行症例が多かった。このことから、*HOXA9* 発現亢進が、浸潤や転移に関与する可能性が示唆された。同様にこれまで、*HOX* 遺伝子とリンパ節転移に関する報告は散見される。Hassan ら³⁸⁾は、口腔扁平上皮癌においてリンパ節転移陽性の癌ではリンパ節転移陰性の癌に比べて *HOXC6* の発現亢進を認めたとしている。また、Makiyama ら¹⁷⁾はリンパ節転移陽性のヒト乳癌においてリンパ節転移陰性の乳癌に比して *HOXB7* の発現レベルが低かったと報告している。*HOX* 遺伝子発現変化がリンパ節転移を引き起こす機序は明らかではなく、発現亢進、低下などの違いはあるが、本研究での *HOXA9* 発現とリンパ節転移との関連が支持される。また、*HOXA9* の発現は、*TGF-β2* をコードする遺伝子の活性化などにより癌関連線維芽細胞を誘導し腫瘍の成長に寛容な微小環境を促進するとの報告^{39,40)}があり、細胞浸潤能への関与が考えられる。大腸癌における *TGF-β2* の発現についても今後検討が必要かもしれない。

Gilbert ら¹⁴⁾はヒト乳房腫瘍において *HOXA9* の発現は、癌抑制遺伝子である *BRCA1* の機能とリンクしており、*BRCA1* 発現を調節することで腫瘍の進行を制御していると報告している。この報告では、*HOXA9* 発現を抑制することにより癌抑制遺伝子である *BRCA1* の機能の減弱をもたらすことを示している。また、Raman ら¹⁵⁾は、ヒト乳癌における研究で悪性形質転換に対してアポトーシスを誘導し遺伝

子変異から正常な細胞を保護するために極めて重要な癌抑制遺伝子である p53 の発現の欠損を認め、その主な原因が *HOXA5* の発現の欠如による可能性がある と報告している。これらの報告は異なる疾患での報告でありメカニズムをそのまま大腸癌に引用できるものではないが、*HOX* 遺伝子が癌抑制遺伝子の機能や発現を直接的にあるいは間接的に制御しており、*HOX* 遺伝子発現の恒常性が乱れることが癌化に関与している可能性が示唆された。

他の癌種では、*HOX* 遺伝子の発現異常が予後と関連するとの報告もあるが、本研究では、*HOXA9* 発現と予後との関連は認められなかった。進行癌症例では、予後に補助化学療法の有無が影響する可能性が考えられる。StageⅢ以上で術前や術後になんらかの化学療法が施行された症例は 79 例で、施行されなかった症例は 25 例であった。本研究の対象症例は 1991 年から 2007 年と期間が長く、その間、化学療法の内容にも大きな変革がみられており *HOXA9* の発現が予後に反映されなかった原因のひとつである可能性が考えられた。また、StageⅣの進行癌症例では生存例でも追跡期間が短い症例が多かった（追跡期間中央値 1045 日）ことも予後に有意差が得られなかった一因と考えられた。

本研究では *HOXA9* の癌における生物学的意義を明らかにするため、siRNA オリゴを用いた *HOXA9* のノックダウン実験も行なっている。約 70%の発現低下が得られた siRNA オリゴを用いて、ノックダウン細胞とコントロール細胞の 24 時間後および 48 時間後の細胞の変化について検討を行ったが、細胞の形態や細胞数に変化に明らかな変化は認められなかった。そこで我々は *HOXA9* に連動して発現が変動する遺伝子を検索し、その分子生物学的意義を明らかにするために、*HOXA9* ノックダウン細胞を用いて、マイクロアレイ解析を行っているところである。現在詳細を解析中であるが、*HOXA9* の発現低下に連動して複数の遺伝子の変動が認められ、そのうち浸潤や転移に関与する遺伝子である *MMP7*^{41, 42, 43)} の発現

低下も確認されている（データ未発表）。これは本研究において確認された、HOXA9 の過剰発現と転移に関する結果を支持するものであるが、今後詳細な検討が必要であると考えている。

本研究では、ヒト大腸癌組織を用いた検討により、約 70% の症例の癌組織で、HOXA9 が過剰発現していることを新たに見出した。また、HOXA9 の発現は、予後との明らかな関連は認めなかったものの、各種臨床病理学的背景因子のなかでも、とりわけ大腸癌の予後に深く関連する可能性のあるリンパ節転移や進行度と関連することが確認された。これらの結果は、本分子が大腸癌の予後予測因子として有用となる可能性を示しており、更に症例を集積するなどして検討していく必要がある。さらに今後は *HOXA9* の過剰発現の機序や、大腸癌における生物学的意義を明らかにすることが検討課題であると考えられた。

Figure legends

Figure 1：大腸癌臨床検体における HOXA 遺伝子の mRNA 発現解析

HOXA9 mRNA は 10 例中 8 例で正常組織に比べて癌組織で発現が亢進していた。そのほかの HOXA 遺伝子の mRNA 発現は一定の傾向は認められなかった。

Figure 2：大腸癌臨床検体における HOXA9 の mRNA 発現解析

HOXA9 mRNA の発現は正常組織に比べて癌組織で亢進を認めた ($P < 0.01$)。

Figure 3：大腸癌臨床検体の免疫組織化学染色による HOXA9 の発現

免疫染色による HOXA9 の発現は、主に細胞の核に認められた。大腸癌 231 例中、161 例が陽性、70 例が陰性であった。

Figure 4：大腸癌培養細胞株における HOXA9 mRNA の発現

12 種類の大腸癌培養細胞株すべてに HOXA9 mRNA の発現が認められた。SW48 が HOXA9 の mRNA 発現レベルが最も高かった。

Figure 5：大腸癌における HOXA9 の発現と予後

HOXA9 の発現と予後（全生存期間）に有意な関連は認めなかった。

Figure 6：大腸癌培養細胞株 SW48 における siRNA による HOXA9 の発現

HOXA9 mRNA 発現は、コントロール細胞に比べて、およそ 70% の低下を認めた。

Figure 7：HOXA9 ノックダウンによる細胞形態の変化

コントロール細胞とノックダウン細胞の形態に変化は認めなかった。

Figure 8：HOXA9 ノックダウンによる細胞数の変化

コントロール細胞とノックダウン細胞の細胞数に有意な差は認めなかった。

引用文献

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
2. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H and The Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2013;43:328-336.
3. Ford HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer. *Cell Biol Int* 1998;22:397-400.
4. Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42:421-9.
5. Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 2001;188:161-9.
6. Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:1-9.
7. Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ* 1993;4:431-41.
8. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:281-91.
9. Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol* 1997;173:168-77.
10. Taylor HS. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med* 2000;18:81-9.
11. Golpon HA, Geraci MW, Moore MD, Miller HL, Miller GJ, Tudor RM, Voelkel NF. HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Pathol* 2001;158:955-66.
12. Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, Hunt TK, Young DM, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res* 2001;100:46-56.
13. Goodman FR, Scambler PJ. Human HOX gene mutations. *Clin Genet* 2001;59:1-11.

14. Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbegnon MK, Clemmer VB, Benezra M, Licht JD, Boudreau NJ, Tsai KK, Welm AL, Feldman MD, Weber BL, Weaver VM. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. *J Clin Invest* 2010;120:1535-50.
15. Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 2000;405:974-8.
16. Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Moriuchi T. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2006;15:797-802.
17. Makiyama K, Hamada J, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, Tamoto E, Shindo G, Matsunaga A, Teramoto K, Komuro K, Kondo S, Katoh H, Koike T, Moriuchi T. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep* 2005;13:673-9.
18. Rossi Degl'Innocenti D, Castiglione F, Buccoliero AM, Bechi P, Taddei GL, Freschi G, Taddei A. Quantitative expression of the homeobox and integrin genes in human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2007;20:621-9.
19. De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol* 2010;36:141-9.
20. Beachy SH, Onozawa M, Silverman D, Chung YJ, Rivera MM, Aplan PD. Isolated Hoxa9 overexpression predisposes to the development of lymphoid but not myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2013; S0301-472X:00054-4.
21. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cellexpansion. *Blood* 2002;99:121-9.
22. Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;17:753-60.
23. Gu ZD, Shen LY, Wang H, Chen XM, Li Y, Ning T, Chen KN. HOXA13 promotes cancer cell growth and predicts poor survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:4969-73.

24. Han Y, Tu WW, Wen YG, Li DP, Qiu GQ, Tang HM, Peng ZH, Zhou CZ.
Identification and validation that up-expression of HOXA13 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer based on immunohistochemistry. *Med Oncol* 2013;30:564.
25. Yang YC, Wang SW, Wu IC, Chang CC, Huang YL, Lee OK, Chang JG, Chen A, Kuo FC, Wang WM, Wu DC. A tumorigenic homeobox (HOX) gene expressing human gastric cell line derived from putative gastric stem cell. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1016-23.
26. Rossi Degl'Innocenti D, Castiglione F, Buccoliero AM, Bechi P, Taddei GL, Freschi G, Taddei A. Quantitative expression of the homeobox and integrin genes in human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2007;20:621-9.
27. Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T, Shimada H, Tomita M, Takahashi T, Kosaki K. Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. *Congenit Anom (Kyoto)* 2004;44:18-26.
28. Huang T, Chesnokov V, Yokoyama KK, Carr BI, Itakura K. Expression of the Hoxa-13 gene correlates to hepatitis B and C virus associated HCC. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1041-4.
29. De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E, Cillo C. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1993;29A:887-93.
30. Kanai M, Hamada J, Takada M, Asano T, Murakawa K, Takahashi Y, Murai T, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep*. 2010 ;23:843-51.
31. Leslie H. Sobin, Christian Wittekind, Mary K. Gospodorowicz (編) , UICC 日本委員会 TNM 委員会 (訳) :TNM 悪性腫瘍の分類 日本語版 第7版 金原出版, 東京 2010
32. 大腸癌研究会(編):大腸癌取扱い規約(第7版補訂版) 金原出版, 東京 2009
33. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:361-71.
34. Fanti L, Perrini B, Piacentini L, Berloco M, Marchetti E, Palumbo G, Pimpinelli S. The trithorax group and Pc group proteins are differentially involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Chromosoma*. 2008;117:25-39.

35. Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14372-7.
36. Kim YJ, Yoon HY, Kim JS, Kang HW, Min BD, Kim SK, Ha YS, Kim IY, Ryu KH, Lee SC, Kim WJ. HOXA9, ISL1 and ALDH1A3 methylation patterns as prognostic markers for nonmuscle invasive bladder cancer: Array-based DNA methylation and expression profiling. *Int J Cancer* 2013;133: 1135-1142.
37. Chopra VS, Mishra RK. "Mir"acles in hox gene regulation. *Bioessays*. 2006;28:445-8.
38. Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, Zhang X, Kashiwazaki H, Yamazaki Y, Inoue N, Moriuchi T. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res* 2006;16:217-24
39. Ko SY, Barengo N, Ladanyi A, Lee JS, Marini F, Lengyel E, Naora H. HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. *J Clin Invest* 2012;122:3603-17.
40. Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 1996;16:4842-51.
41. Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, Urushihara M, Huang CL. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;58:384-91.
42. Ioannidis I, Dimo B, Karameris A, Vilaras G, Gakiopoulou H, Patsouris E, Lazaris AC. Comparative study of the immunohistochemical expression of metalloproteinases 2, 7 and 9 between clearly invasive carcinomas and "in situ" trophoblast invasion. *Neoplasma*. 2010;57:20-8.
43. Kitamura T, Biyajima K, Aoki M, Oshima M, Taketo MM. Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas. *Lab Invest*. 2009;89:98-105.

Fig. 1 大腸癌臨床検体におけるHOX遺伝子のmRNA発現解析 (RT-PCR)

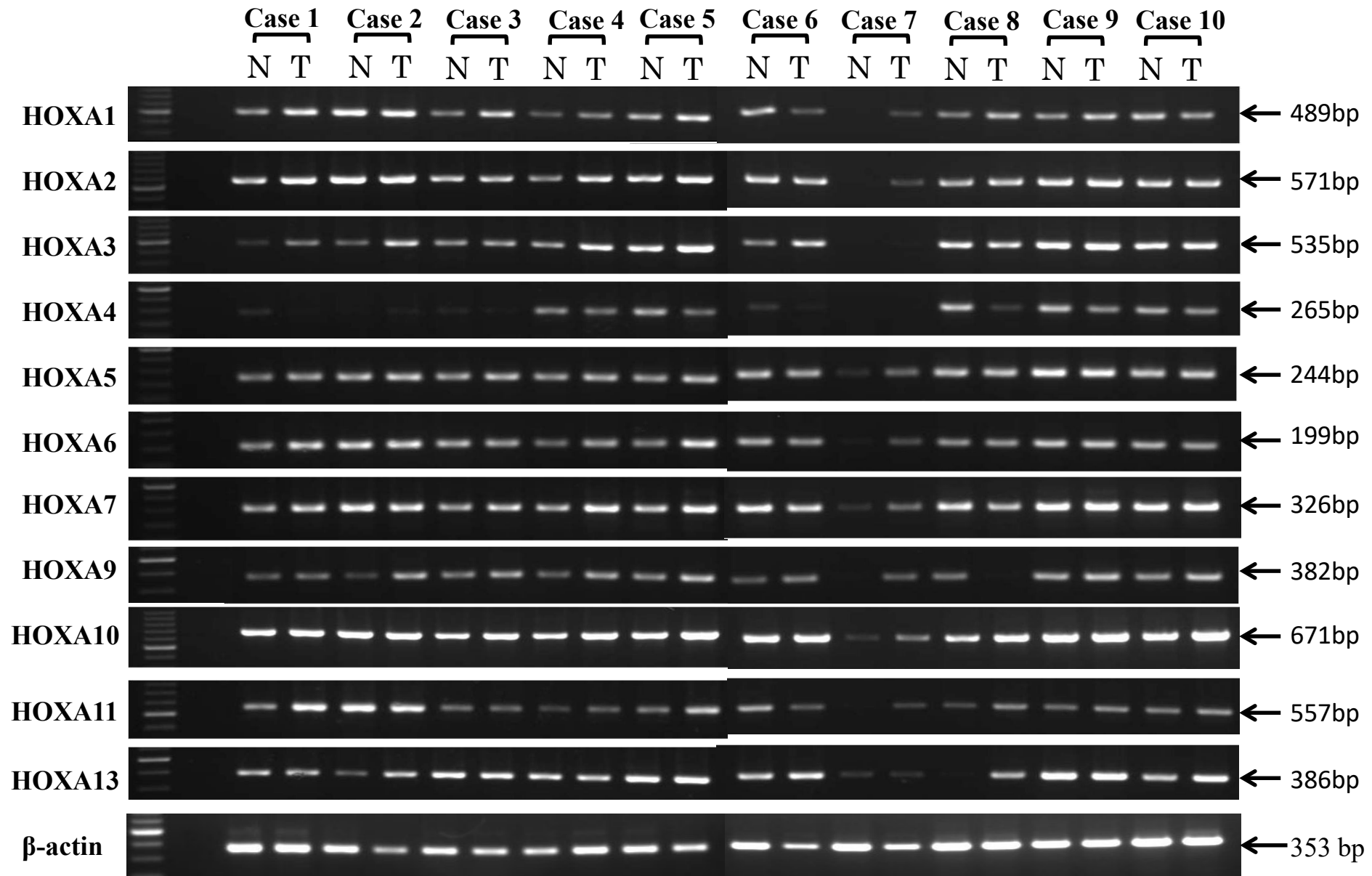
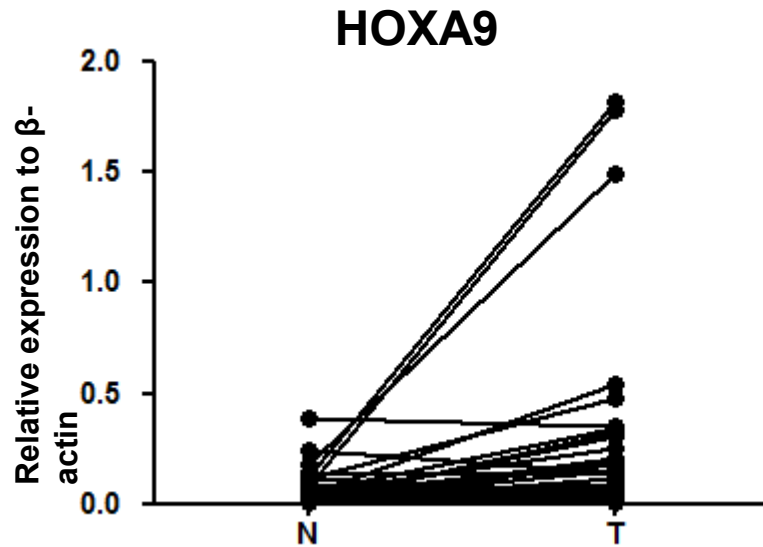


Fig. 2 大腸癌臨床検体におけるHOXA9, A5, A13のmRNA発現解析
(リアルタイムRT-PCR)



$P=0.0041$

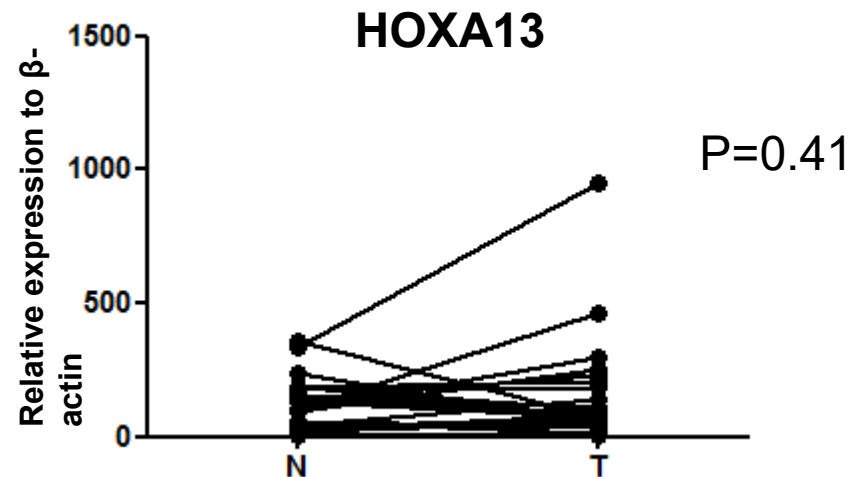
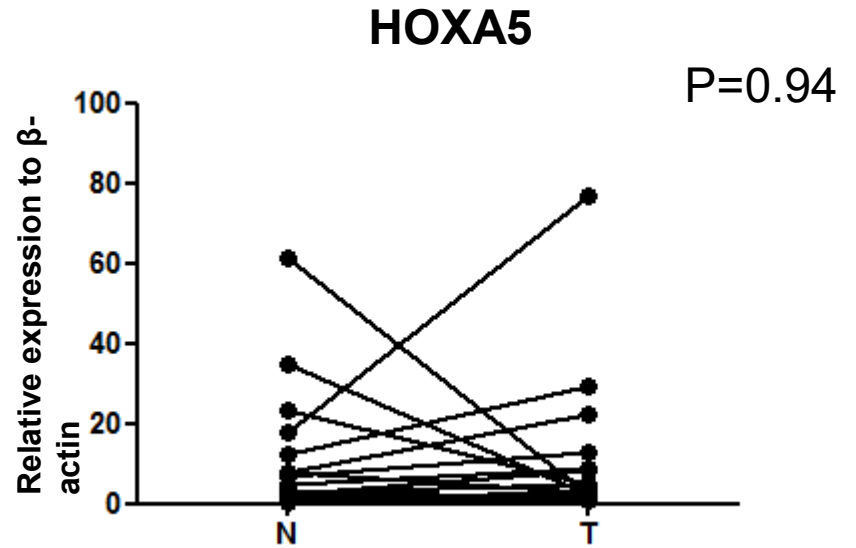


Fig. 3 大腸癌培養細胞株におけるHOXA9mRNAの発現

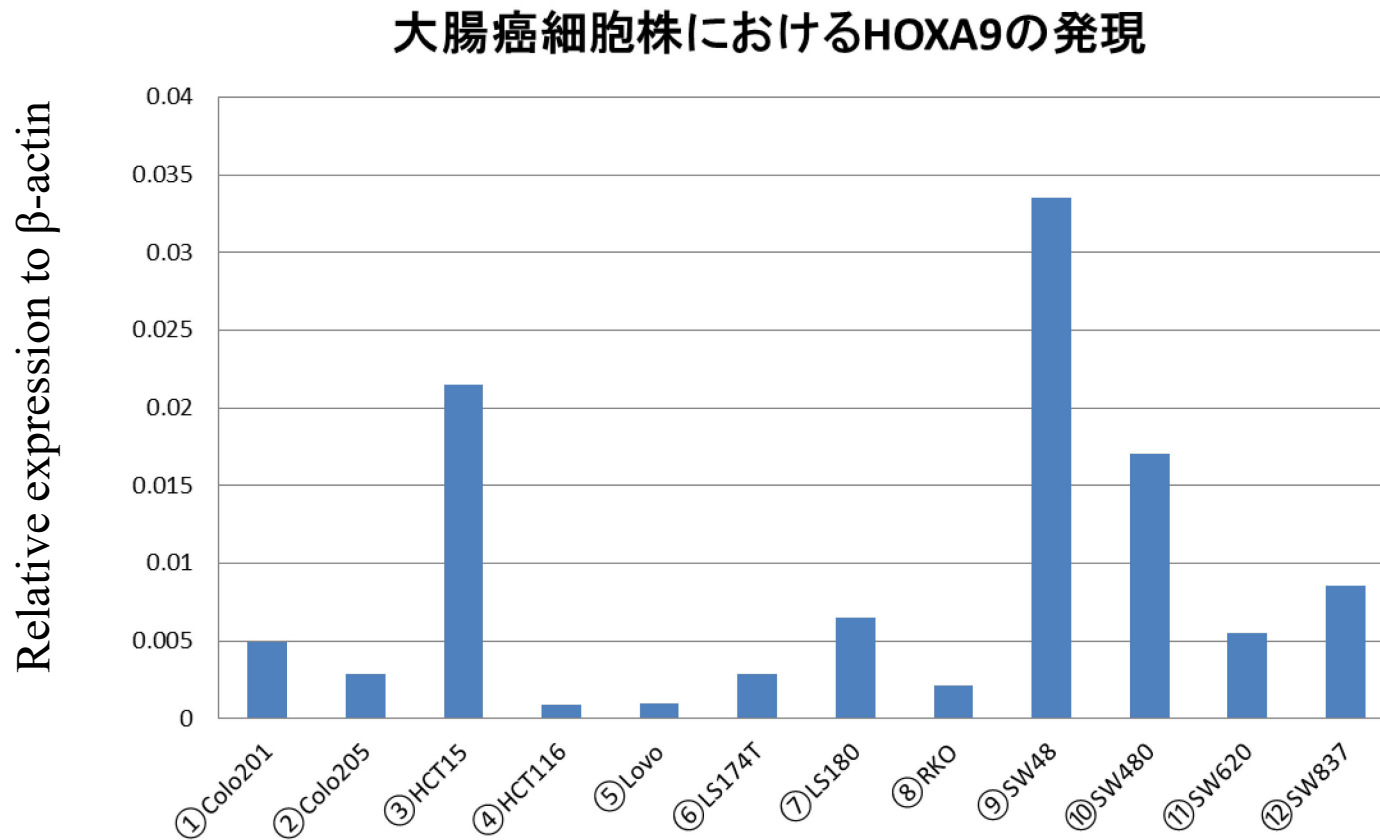
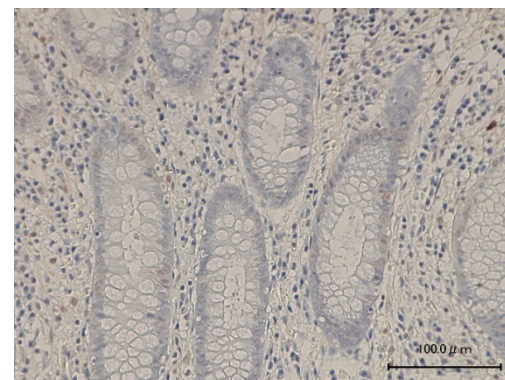
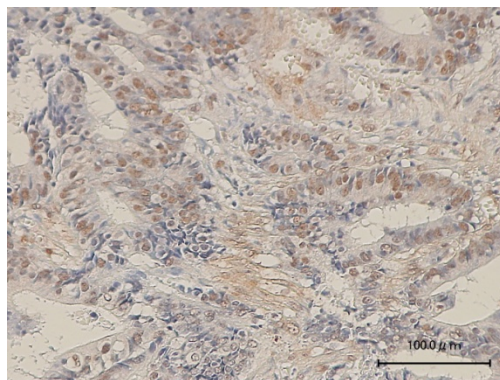


Fig. 4 大腸癌臨床検体の免疫組織化学染色におけるH0XA9の発現

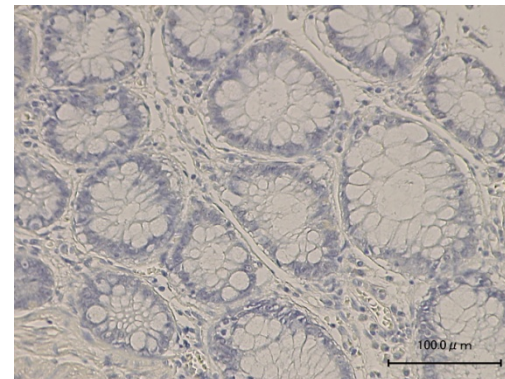
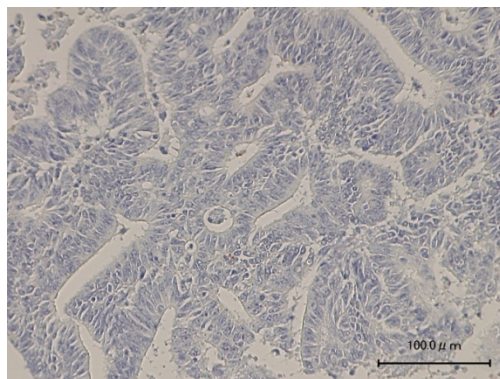
癌組織

正常組織

陽性例



陰性例①



陰性例②

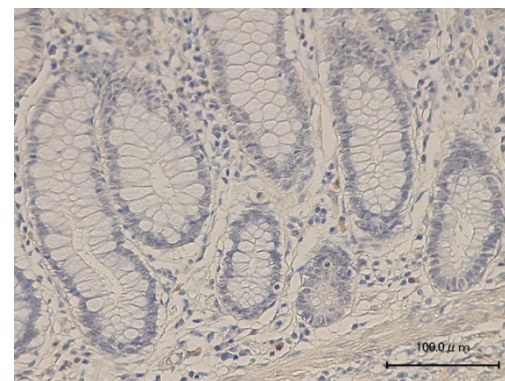
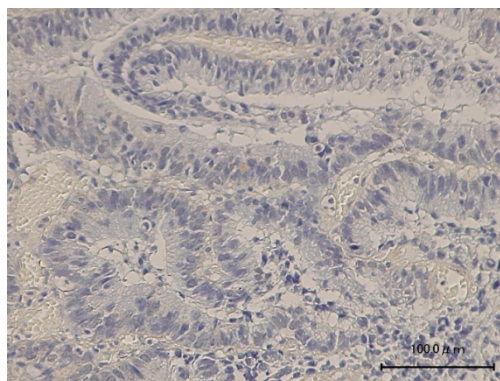


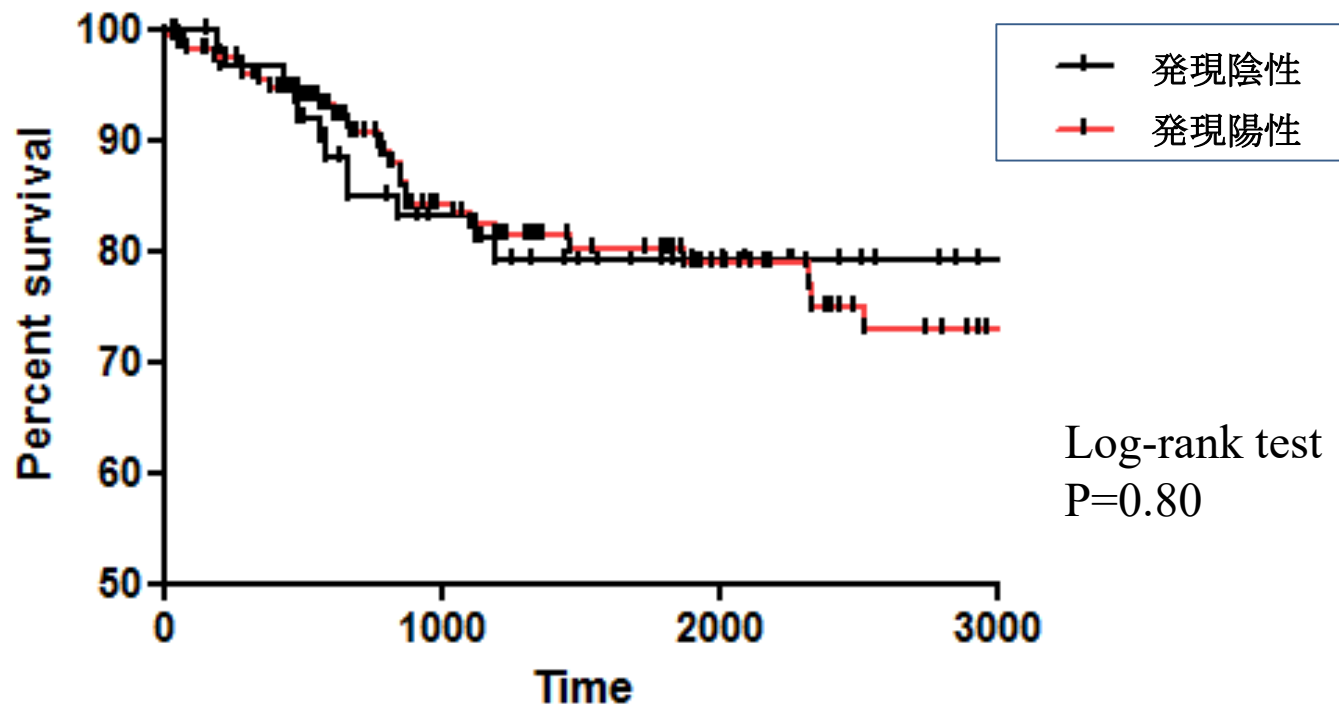
Table. 1

大腸癌臨床検体におけるHOXA9の発現と臨床病理学的背景因子の関連

因子		合計 (n=231)	HOXA9		P 値
			陽性 (n=161)	陰性 (n=70)	
性別	男性	136	96	40	0.77
	女性	95	65	30	
年齢	60歳未満	57	40	17	1.00
	60歳以上	174	121	53	
壁深達度	T1	28	19	9	0.28
	T2	27	22	5	
	T3	159	106	53	
	T4	17	14	3	
リンパ節転移	陽性	95	74	21	0.024
	陰性	136	87	59	
肝転移	あり	31	22	9	1.00
	なし	200	139	61	

因子		合計 (n=231)	HOXA9		P 値
			陽性 (n=157)	陰性 (n=74)	
組織型	Well	103	64	36	0. 29
	Med	100	74	31	
	Por	7	4	3	
	Muc	19	15	4	
リンパ管侵襲	あり	183	127	57	1. 00
	なし	48	34	14	
静脈侵襲	あり	181	128	53	0. 60
	なし	50	33	17	
局在部位	C	13	7	6	0. 70
	A	40	30	10	
	T	26	17	9	
	D	13	8	5	
	S	73	51	22	
	R	66	48	18	
Stage	O	5	4	1	0. 032
	I	36	25	12	
	II	85	52	33	
	III	67	52	14	
	IV	38	28	10	

Fig. 5 大腸癌におけるH0XA9の発現と予後



追跡期間中央値 1717日

Fig. 6 大腸癌培養細胞株SW48におけるsiRNAによるHOXA9の発現

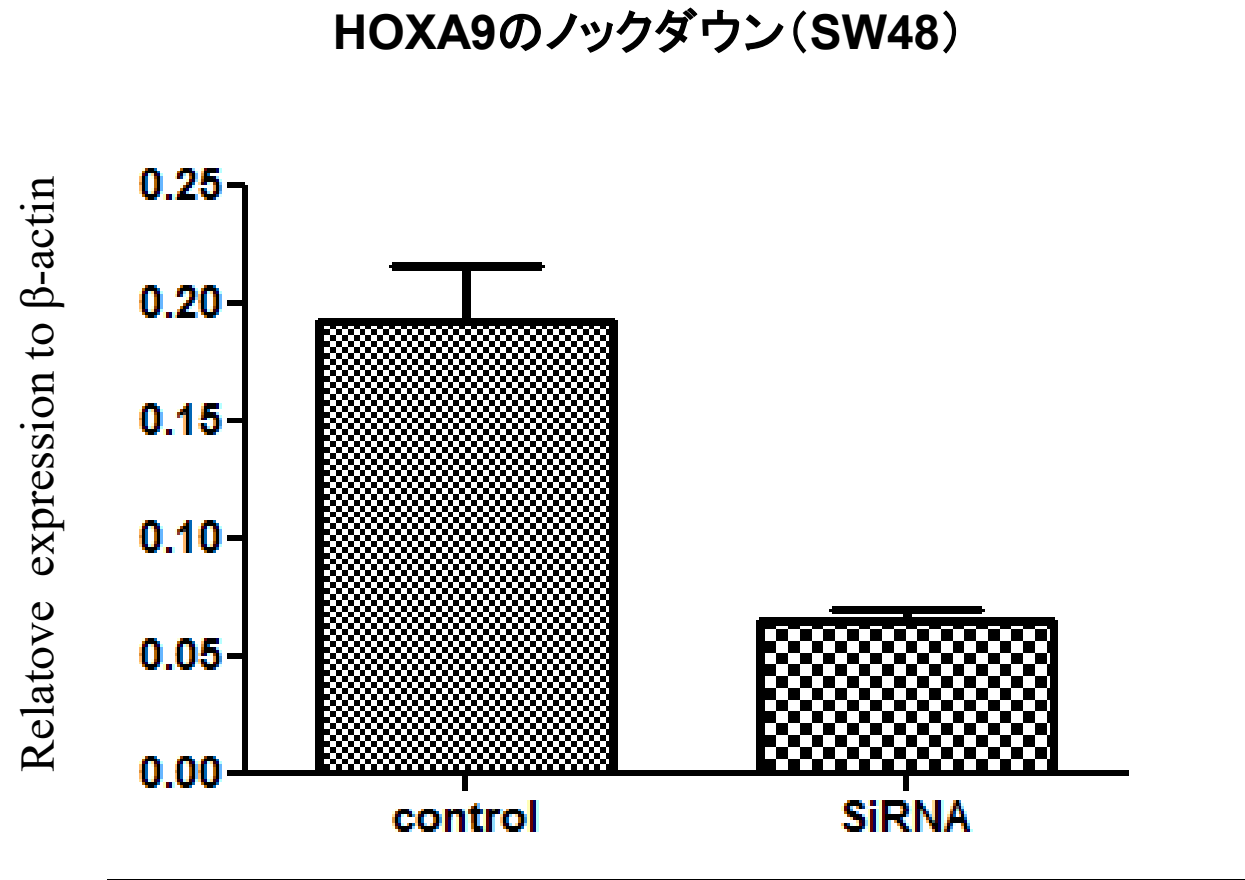
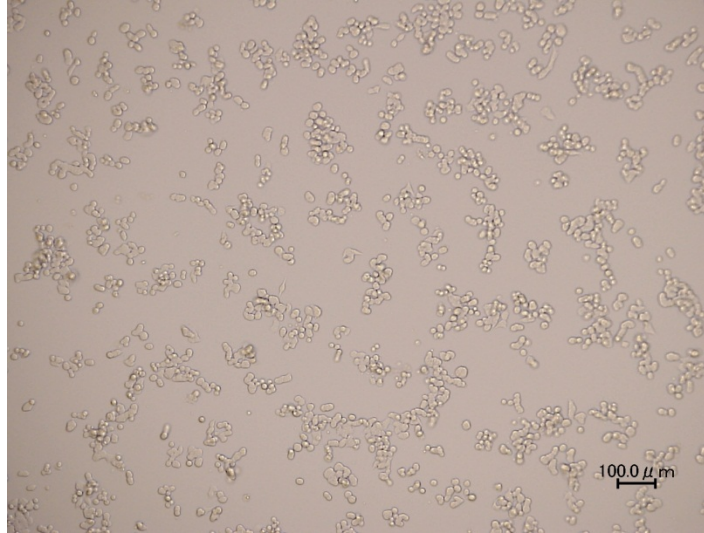


Fig. 7 HOXA9ノックダウンによる細胞増殖・形態の変化

24H

48H

SW48
Control siRNA



SW48
HOXA9 siRNA

