

ホメオボックス遺伝子 HOX の子宮体癌および卵巣癌での異常発現と浸潤転移との関連性

副題：異常発現プロファイルを利用した癌の遺伝子診断および治療への臨床応用の検討

(研究課題番号：13671687)

平成13年度-平成14年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 山下 剛
(旭川医科大学医学部講師)

ホメオボックス遺伝子蛋白群(HOX 遺伝子群)は、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、個々の細胞固有の位置を決定するための情報の伝達を担う転写因子の機能をもつことが明らかにされている。本研究では、この細胞の位置情報を制御する HOX 遺伝子の婦人科癌での異常発現の有無を検討し、さらにその異常が遺伝子そのものによるのかあるいはほかの遺伝子の異常による影響なのかを確認することで遺伝子異常を利用した再発予測度、治療可能度の推定が可能であることを明らかにすることを研究の目的とした。

研究組織

研究代表者：山下 剛（旭川医科大学講師）

研究経費

平成 13 年度	: 2, 800 千円
平成 14 年度	: 700 千円
計	: 3, 500 千円

研究発表

(1) 学会誌等

子宮頸癌に対する Sentinel Lymph Node Biopsy に関する予備検討

林 博章、藤井 哲哉、山下 剛、中田 俊之、片山 英人、石川 陸男
日本産婦人科学会雑誌、54, 856-859, 2002

系統的リンパ節郭清の意義

林 博章、藤井 哲哉、山下 剛、石川 陸男
臨床婦人科産科、56, 919-926, 2002

ダイオキシン類代謝酵素と CYP1A1 の遺伝子多型と子宮内膜症および卵巣癌発症との関連性について

山下 剛、超 亜微、大隅 大介、片山 英人、藤井 哲哉、石川 睦男
臨床婦人科産科、223、2002

術後感染予防

林博章、藤井哲哉、山下剛、片山英人、上村淳一、石川睦男
産婦人科の実際、51、2043-2051、2002

Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasionability of cervical cancer cells

Yasuhito Kato, Tsuyoshi Yamashita and Mutsuo Ishikawa
Oncology Reports, 9, 565-569,2002

Cefpirome sulfhate for gynecological infections and prophylaxis of non-laparotomy surgery in patients with benign disease

Hiroaki Hayashi, Tsuyoshi Yamashita, Toshiyuki Nakata, Tesuya Hujii, Takashi Kojima, Hideto Katayama and Mutsuo Ishikawa.

Int. J. Antimicro Agents, 19, 405-411, 2002

The soluble and membrane-anchored forms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor appear to play opposing roles in the survival and apoptosis of human luteinized granulosa cells.

Pan B, Sengoku K, Goishi K, Takuma N, Yamashita T, Wada K, Ishikawa M.

Mol Hum Reprod. 2002 Aug;8(8):734-41.

Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8.

Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N, Hasuike S, Hayashi H, Yamauchi T, Yamashita T, Ishikawa M.

J Assist Reprod Genet. 2002 Nov;19(11):531-5.

(2) 口頭発表

平成 14 年度

加藤育民、山下剛、小島貴志、中田俊之、林博章、石川睦男
子宮癌における Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), Urokinase-type
Plasmminogen Activator (uPA) の発現と浸潤・転移に関する研究
第 53 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会

中田俊之、小島貴志、加藤育民、山下剛、林博章、石川睦男、清水敬生、玉
舎輝彦、山下幸紀、早川和彦、山崎知文
卵巣癌および子宮体癌における子宮内膜症の合併についての検討
第 53 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会

加藤育民、山下剛、田熊直之、千石一雄、石川睦男
ダイオキシン類代謝酵素 CYP1A1 および GSTM1 の遺伝子多型と
子宮内膜症発症の頻度の関連性
第 9 回北海道産婦人科 Gn-RH 研究会

大隈大介、杉村和代、小島貴志、片山英人、中田俊之、山下剛、藤井哲哉、林
博章、石川睦男
卵巣原発の Primitive neuroectodermal tumor (PNET) の一例
北海道婦人科癌化学療法談話会第 36 回例会

中田俊之、林博章、藤井哲哉、山下剛、片山英人、小島貴志、石川睦男
子宮体癌内視鏡下手術 Port site 転移の一例
第 41 回日本産科婦人科内視鏡学会

杉村和代、大隈大介、宮川博栄、土田充、竹内亜紀子、小島貴志、片山英人、
悪性卵巣腫瘍に対する TXL+CBDCA 療法の効果と安全性についての検討
第 49 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会・学術講演会

片山英人、山下 剛、石谷敬之、藤井哲哉、石川睦男
悪性卵巣腫瘍に対する TXL+CBDCA 療法の効果と安全性についての検討
第 39 回日本癌治療学会総会

平成 15 年度

山下剛、石川睦男
子宮内膜症病変を持つ患者におけるダイオキシン類代謝酵素 CYP1A1 および
GSTM1 遺伝子の多型および欠損の基礎的臨床的検討
第 22 回エンドメトリオーシス研究会

藤井哲哉、林博章、内田亜紀子、大隅大介、小島貴志、片山英人、中田俊之、
山下剛、石川睦男
子宮頸癌における sentinel Node Navigation Su
r g e r y の検討
第 5 4 回 日本産科婦人科学会学術講演会

片山英人、林博章、大隅大介、中田俊之、山下剛、藤井哲哉、石川睦男
卵巣癌および子宮体癌に対する TXL+CBDCA 療法の効果と安全性についての
検討
第 5 4 回 日本産科婦人科学会学術講演会

山下 剛、趙 亜薇、加藤育民、大隅大介、石川睦男
Expression profile of the Hox genes in ovarian endometriosis and clear cell
adenocarcinoma
札幌卵巣機能に関する国際シンポジウム

小島貴志、林博章、片山英人、加藤育民、山下剛、藤井哲哉、石川睦男
第 3 報- 子宮頸癌検診の異常細胞診の適正な定期検診とは？
第 43 回日本臨床細胞学会

藤井哲哉、林博章、増田有美、横浜祐子、荻野元子、片山英人、石谷敬之、山下剛、石川睦男

子宮頸癌に対する Sentinel lymph node biopsy に関する予備検討
第 42 回日本産科婦人科内視鏡学会

山下剛、片山英人、藤井哲也、石谷敬之、加藤育民、石川睦男
卵巣癌におけるホメオボックス遺伝子HOXの発現の発現プロファイル
第 61 回日本癌学会

片山英人、山下剛、藤井哲也、石谷敬之、荻野元子、横浜祐子、杉村和代、増田有美、林博章、石川睦男
進行子宮頸癌に対する Neoajuvant chemotherapy としての High dose modified BOMP 療法の効果および予後への寄与の検討
第 40 回日本癌治療学会

山下剛、片山英人、藤井哲也、石谷敬之、加藤育民、石川睦男
ABNORMAL HOX GENE EXPRESSION IN OVARIAN CANCER
7th World Congress on Advances in Oncology and 5th International Symposium on Molecular Medicine

Tetsuya Fujii, Tsuyoshi yamashtia, and Mutsuo Ishikawa
Laparoscopic sentinel node detection in patients with cervical cancer
The 3 rd International Sentinel Node Congress

山下剛、石谷敬之、石川睦男
子宮内膜癌における子宮腺筋症の合併について
第 24 回エンドメトリオーシス研究会

片山英人、大隅大介、河井紀一郎、荻野元子、石谷敬之、山下 剛、藤井哲哉、石川睦男
進行子宮癌に対する Neoajuvant chemotherapy(NAC)の効果および予後への寄与の検討

北海道婦人科癌化療談話会 第39回例会

研究成果

1, 研究目的

(1) 研究の背景

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。この遺伝子群は種を越えて存在しており、ヒトでも同様の遺伝子群が報告されヒトの個体発生において類似の機能を担っていることが報告されている。 *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。癌細胞は、発生時ボディパターン形成に利用したこれら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。事実、癌浸潤転移において重要な遺伝子である細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) の上流遺伝子である ETS-1, ETS-2 を制御する機能をもつ可能性があることが報告されている。勿論、遺伝子の構造異常による蛋白分子の高次構造の異常による正常機能の一部ないし全部の消失もこれらの現象に関わる可能性がある。さらにホメオボックス遺伝子の一つである HOX 遺伝子のような、クラスター構造をとり多数の遺伝子群の時間的空間的発現が様々な器官臓器形成を制御する遺伝子では、その構造異常のみならず発現プロファイルの異常が転移巣 (臓器) の種類にも深く関わっている可能性があるとおもわれる。

婦人科癌の領域では、近年子宮体癌および卵巣癌の患者数増加が顕著であり、これらの疾患が局所病ではなく早期から転移しやすい全身病として考えられていることは重要である。これらの癌の制圧は婦人の健康にとって重要な課題の一つであると考えられるが、様々な治療法が開発されているにもかかわらず進行例、特に転移例では予後が不良である。それは再発例の予測と再発例に対する正確な早期診断、追加治療の困難さがこれらの疾患に対する生存率の向上を

妨げている原因となっている。また医療資源の効果的な投資の観点からも、患者数の増加が懸念される癌での、特に再発の可能性、再発部位の推定、予後の推定に言及できる診断法の開発は重要と考えられ、いわゆる癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子のカテゴリーではなく、その本来的な機能から予測されるホメオボックス遺伝子という初期発生時に機能する遺伝子を標的にした癌診断法は従来法の不足を補う可能性のある診断治療法である可能性がある。このような遺伝子の婦人科癌での役割を明らかにすることにより、癌の再発予測度、治療可能度を推測し、特に原発巣への初期治療が可能と考えられる段階での再発の可能性、再発部位の推定、予後の推定を行うことにより、再発監視を重点的に行うべき、また再発に対する治療を必要とすべき患者の個別化を行い、ならびに予後の推定を行うことは今後の癌患者数の増大を考えるととりわけ重要と思われる。さらにこのような遺伝子を利用した予後推測診断により必要のない患者に対する抗癌剤治療を減少させ、あるいは治療無効と推定される患者の治療への自己決定権とその後の QOL を高め、さらには治療に対する医療費の増大を抑制することにもなんらかの貢献ができることが期待される。

(2) 研究の目的

ホメオボックス遺伝子蛋白群(HOX 遺伝子群)は、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、個々の細胞固有の位置を決定するための情報の伝達を担う転写因子の機能をもつことが明らかにされている。本研究は、この細胞の位置情報を制御する HOX 遺伝子の癌での構造発現異常を利用して、婦人科癌での異常発現の有無を検討しさらに、その異常が遺伝子そのものによるのかあるいはほかの遺伝子の異常による影響なのかを確認し、遺伝子異常を利用した再発予測度、治療可能度の推定を可能にすることを研究の目的とした。

2、研究成果

研究目的 (1)

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し、異常発現の種類程度を正確に把握する。

研究方法

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体癌株 5 種類 (AN3CA, KLE, ISHIKAWA, HEC1A, HEC1B, RL-95)、卵巣癌株 5 種類 (ES-2, SMOV-2, JHOC-6, SKOV-3, CAOV-3) 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手術時に採取された各正常子宮内膜 (分泌期および増殖期)、卵巣上皮組織を使用した。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 にて粉砕した後、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。(1) 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。(2) 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、正常と比較し発現の 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。

研究成績

(1) 子宮体癌における HOX 遺伝子発現異常について

同様に子宮体癌においても 39 個の遺伝子中、3 種類の遺伝子に増幅が認められたが、卵巣癌とは異なりむしろ発現の減弱を大半の遺伝子に認めた。これらの減弱は卵巣癌とは異なり癌細胞でほとんど発現が消失してしまうものであり、卵巣癌と子宮体癌の癌進展における HOX 遺伝子の役割の違いを示唆しているものと考えられた。

(2) 卵巣癌における HOX 遺伝子発現異常について

卵巣癌においては、39 個中 15 種類の遺伝子 (HOXA3, A7, A10, A13, B2, B3, B4, B5, B6 B7, B8, B9, B13, C13, D13) に過剰発現を認めた。この過剰発現は HOX B クラスターに集中して認められた。また、それ以外のクラスターでは主としてはハエの *abd-hox* ホモログである HOX-7 以下に認められた。特に HOX-13 はすべてのクラスターで過剰発現が認められており、HOX 遺伝子異常と卵巣癌の進展に深い関係があることが示唆された。発現の減弱についても多くの遺伝子で認められたが、詳細な検討については今後の課題とした。

考察

前年度までに得られていた HOX 遺伝子の発現異常を Real-time PCR 法を用いることで詳細に検討することができた。その結果子宮体癌と卵巣癌では異常発現プロファイルが異なることが確認された。子宮体癌では過剰発現はむしろ少なく全体としては発現減少を示している可能性が示唆された。また卵巣癌では子宮体癌と異なり、クラスター B および Abd-HOX での異常発現が目立つ結果となった。このことは 2 つの癌における転移進展様式の違いを示している可能性を示唆している。すなわち卵巣癌では子宮体癌と比較し原発巣が小さくても比較的早期に腹腔内に播種していることが臨床的にも示されており、細胞の移動性の亢進がその原因であれ結果であれ、HOX 遺伝子の機能を考えるとそのことは HOX 遺伝子発現異常プロファイルと密接に関連している可能性がある。また 2 つの癌に共通の遺伝子発現異常として Abd-HOX の異常があげられ、このことは子宮卵巣の組織発生を考えた場合その発生母地や発生位置の共通性を示している可能性を示唆していると考えられた。またこれらの異常が 2 つの癌の転移進展の原因の一つであるとすると、この発現異常を制御することで転移

浸潤能が現弱ないしは抑制できる可能性が示唆された。

研究目的（2）

本年度は昨年度の実績をふまえて、異常発現を認めた HOX 遺伝子のアンチセンス DNA の作成を行い、これを遺伝子導入し癌細胞がどのようにその性質を変化させるかを解析する。

研究方法

子宮体癌と卵巣癌に共通して過剰発現が認められた HOXB クラスターおよび HOX13 パラログの結果から、HOXB13 をアンチセンス導入の標的遺伝子としこの遺伝子のアンチセンス導入により、HOXB13 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。まず HOXB13 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の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 ApaI 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子宮体癌細胞では AN3CA 細胞、卵巣癌では SKOV3 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 HOXB13 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。5X10⁴ 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。

研究成績

子宮体癌細胞株、卵巣癌細胞株それぞれに対して HOXB13 遺伝子のアンチセンス DNA の導入に成功した。その結果子宮体癌細胞と卵巣癌では異なる変化を示した。マトリジェルアッセイから子宮体癌細胞では 72 時間の培養にて完全に浸潤能が低下し以後も浸潤能が回復することはなかったが、卵巣癌細胞では 36 時間培養までは時間毎に浸潤能の低下が観察されたが、それ以降も培養を続けると次第に浸潤能が回復してくることが観察された。

考察

子宮体癌および卵巣癌の双方で HOXB13 遺伝子のアンチセンス導入によりその浸潤能が抑制されることが確認された。このことは 2 つの癌においてホメオボックス遺伝子はその転移浸潤に大きな役割を持っているだけでなく HOX 遺伝子そのものが転移浸潤を直接制御している遺伝子のひとつであることを示している。従って HOX 遺伝子の過剰発現を直接制御することにより癌の浸潤転移を抑制できる可能性が示された。また、興味深いことに子宮体癌と卵巣癌ではその抑制パターンに差が出たが、リアルタイム法での計測では子宮体癌細胞株では HOX 遺伝子の過剰発現が 2, 3 種類のみである一方、卵巣癌では B クラスターの多くが過剰発現を示しており遺伝子異常の割合が大きく異なっていることが示されていた。従って子宮体癌では HOX 遺伝子の浸潤転移に占める役割の大きさが卵巣癌に比較し大きいことが予想され、従って 1 種類の遺伝子の発現低下にて細胞の浸潤能が大きく低下する現象が認められたと考えられた。一方卵巣癌では HOXB13 遺伝子アンチセンス導入は一時的には転移浸潤能を抑制するが時間とともに回復してくることから、さらにいくつかの過剰発現の認められた HOX 遺伝子の役割がこれを補う様に働いている可能性が示唆され、

ほかの HOX 遺伝子の機能が重要であることが予想された。従って卵巣癌では 2 つ以上の HOX 過剰発現遺伝子の同時抑制がその転移浸潤能の抑制には不可欠と考えられた。現在卵巣癌で高度に過剰発現がみとめられた HOXB7 についてもそのアンチセンス導入を行うべく研究を継続している。

これらの実験の結果および方法については添付した資料として以下にまとめたので参照されたい。

まとめ

ホメオボックス遺伝子蛋白群(HOX 遺伝子群)は、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、個々の細胞固有の位置を決定するための情報の伝達を担う転写因子の機能をもつが同時に癌細胞の転移浸潤においてもこの機能を再利用している可能性が示唆された。子宮体癌および卵巣癌においては HOX 遺伝子の過剰発現が認められ、これらの過剰発現をアンチセンス導入により抑制すると細胞の転移浸潤能が抑制されることも確認された。以上のことから HOX 遺伝子の過剰発現は子宮体癌および卵巣癌の進展に深く関与しており、この過剰発現を利用して癌の転移浸潤能を評価することができる可能性が示された。また直接の HOX 遺伝子の発現抑制で癌細胞の機能が変化したことから、癌の転移浸潤に HOX 遺伝子が直接関与していることが示され、またこのことから HOX 遺伝子の過剰発現を制御することで癌の浸潤抑制を制御できる可能性が示唆された。さらに子宮体癌と卵巣癌の HOX 過剰発現プロファイルが異なり子宮体癌に比較し卵巣癌では HOXB13 遺伝子単独でのアンチセンス導入では浸潤能の抑制には不十分であることが示されたことから癌の種類により HOX 遺伝子の関わりが異なり多くの種類が過剰発現している場合には、その転移浸潤能の完全な抑制には複数の HOX 遺伝子の発現抑制が必要であることが示された。このことは遺伝子治療の観点から考えると卵巣癌は子宮体癌よりより治療困難な癌であることを意味しており、卵巣癌での発生数や死亡者数の増加と相まって、治療に力点を置くべき疾患であることが明らかになった。

Real-time PCRによるHOXA発現量

A1		A2		A3		A4		A5		A6		A7		A9		A10		A11		A13				
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	21.1	3.7	2.7	2.8		N1	46.8	10.4	6.0	6.3		N1	2.4	3.4	2.4	0.3		N1	2.4	3.4	2.4	0.3	N1	
N3	42.8	3.8	2.7	3.8		N3	104.4	28.7	16.6	9.2		N3	9.0	1.1	0.8	0.8		N3	9.0	1.1	0.8	0.8	N3	
ES-2	77.8	21.5	15.3	0.8	0.2	0.3	58.1	10.7	6.2	0.6	0.1	0.1	5.5	0.3	0.2	0.1	0.1	ES-2	5.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2
SMOV2	64.8	5.0	3.6	0.7	0.2	0.3	112.6	2.0	1.2	1.3	0.1	0.2	100.9	0.8	0.6	1.1	1.4	SMOV2	100.9	0.8	0.6	1.1	1.4	3.5
JHOC-6	88.7	24.5	17.4	1.9	0.5	0.7	117.4	34.3	19.8	2.6	0.3	0.4	40.0	8.4	5.9	0.9	1.1	JHOC-6	40.0	8.4	5.9	0.9	1.1	2.7
SKOV3	35.9	0.7	0.5	0.7	0.2	0.2	43.8	5.5	3.2	0.8	0.1	0.1	3.9	5.5	3.9	0.1	0.1	SKOV3	3.9	5.5	3.9	0.1	0.1	0.2
CAOV3	20.7	1.5	1.0	0.2	0.1	0.1	27.5	8.1	4.7	0.3	0.0	0.1	3.9	1.6	1.2	0.0	0.1	CAOV3	3.9	1.6	1.2	0.0	0.1	0.1
A4		A5		A6		A7		A9		A10		A11		A13										
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1						N1	0.5	1.0	0.6	0.5		N1	9.3	3.2	1.9	1.3		N1	9.3	3.2	1.9	1.3	N1	
N3						N3	0.8	2.7	1.5	0.8		N3	17.7	4.6	2.7	1.6		N3	17.7	4.6	2.7	1.6	N3	
ES-2						ES-2	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	11.3	3.5	2.0	0.1	0.1	ES-2	11.3	3.5	2.0	0.1	0.1	0.1
SMOV2						SMOV2	0.3	3.8	2.2	0.3	0.3	0.5	4.7	1.4	0.8	0.1	0.0	SMOV2	4.7	1.4	0.8	0.1	0.0	0.0
JHOC-6						JHOC-6	0.6	7.2	4.2	0.6	0.8	1.2	41.8	16.2	9.3	0.9	0.6	JHOC-6	41.8	16.2	9.3	0.9	0.6	0.7
SKOV3						SKOV3	0.1	1.1	0.7	0.1	0.1	0.2	17.1	5.6	3.3	0.3	0.2	SKOV3	17.1	5.6	3.3	0.3	0.2	0.3
CAOV3						CAOV3	0.1	0.9	0.5	0.1	0.1	0.1	22.7	13.1	7.6	0.3	0.2	CAOV3	22.7	13.1	7.6	0.3	0.2	0.2
A7		A9		A10		A11		A13																
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	23.5	5.2	3.7	3.2		N1	11.1	0.4	0.3	1.5		N1	1.2	2.1	1.2	0.2		N1	1.2	2.1	1.2	0.2	N1	
N3	81.2	1.0	0.7	7.1		N3	24.0	0.8	0.6	2.1		N3	4.5	4.0	2.3	0.4		N3	4.5	4.0	2.3	0.4	N3	
ES-2	507.8	76.3	54.1	5.1	0.7	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	347.3	128.9	74.5	3.5	9.0	ES-2	347.3	128.9	74.5	3.5	9.0	22.0
SMOV2	9.8	2.5	1.7	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JHOC-6	181.7	59.4	42.1	4.0	0.6	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	45.3	15.7	9.1	1.0	2.5	JHOC-6	45.3	15.7	9.1	1.0	2.5	6.2
SKOV3	7.8	0.7	0.5	0.1	0.0	0.0	4.4	1.1	0.8	0.1	0.1	0.1	177.1	38.9	22.5	3.4	8.7	SKOV3	177.1	38.9	22.5	3.4	8.7	21.1
CAOV3	888.4	27.9	19.8	10.6	1.5	3.4	6.6	9.4	6.6	0.1	0.0	0.1	310.6	119.5	69.1	3.7	9.5	CAOV3	310.6	119.5	69.1	3.7	9.5	23.3
A11		A13																						
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	9.0	1.7	1.2	1.2		N1	0.0	0.0	0.0			N1	0.0	0.0	0.0			N1	0.0	0.0	0.0			
N3	14.9	6.2	4.4	1.3		N3	0.0	0.0	0.0			N3	20.6	1.5	0.8	0.2		N3	20.6	1.5	0.8	0.2	ES-2	
ES-2	3.6	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	8.8	2.9	1.6	0.1	0.1	0.1	30.2	3.6	2.1	0.7		SMOV2	8.8	2.9	1.6	0.1	0.1	
SMOV2	2.5	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	286.9	35.5	20.5	5.5	5.5	17.5	24.7	14.3	0.2		JHOC-6	30.2	3.6	2.1	0.7	0.7		
JHOC-6	1.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	17.5	24.7	14.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	JHOC-6	286.9	35.5	20.5	5.5	5.5	
SKOV3	0.8	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
CAOV3	1.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	CAOV3	17.5	24.7	14.3	0.2	0.2	

Real-time PCRによるHOXB発現量

B2				B3				B4													
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	4.8	0.3	0.2	1.8			N1	1.3	0.3	0.1	0.5			N1	0.0	0.0	0.0	0.0			N1
N3	11.2	0.3	0.2	2.5			N3	3.2	0.3	0.2	0.7			N3	0.0	0.0	0.0	0.0			N3
N4	10.4	0.5	0.3	2.0			N4	3.9	0.8	0.5	0.8			N4	0.4	0.6	0.4	0.1			N3
ES-2	165.2	97.6	56.4	8.6	3.5	4.8	ES-2	20.2	3.5	2.0	1.1	1.4	2.2	ES-2	35.3	8.7	5.0	1.8	25.2		ES-2
SMOV2	4.9	1.2	0.7	0.2	0.1	0.1	SMOV2	16.1	1.5	0.8	0.7	0.9	1.4	SMOV2	67.8	18.7	10.8	2.8	38.9		SMOV2
JHOC-6	1.8	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	3.3	1.8	1.0	0.2	0.2	0.3	JHOC-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	JHOC-6
SKOV3	359.2	177.2	102.5	19.2	7.8	10.8	SKOV3	81.5	6.7	3.8	4.4	5.6	9.0	SKOV3	99.9	26.0	15.0	5.3	73.3		SKOV3
CAOV3	41.7	4.6	2.6	1.8	0.7	1.0	CAOV3	19.0	9.5	5.5	0.8	1.0	1.7	CAOV3	21.4	3.8	2.2	0.9	12.3		CAOV3
B5				B6				B7													
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	1.3	0.4	0.2	0.5			N1	6.5	0.7	0.4	2.4			N1	0.0	0.0	0.0	0.0			N1
N3	5.2	0.7	0.4	1.1			N3	11.2	1.6	0.9	2.5			N3	0.0	0.0	0.0	0.0			N3
N4	4.2	0.1	0.0	0.8			N4	8.8	3.8	2.2	1.7			N4	0.0	0.0	0.0	0.0			ES-2
ES-2	11.3	0.2	0.1	0.6	0.5	1.2	ES-2	28.5	9.8	5.7	1.5	0.6	0.9	ES-2	6.7	6.7	4.6	0.3			SMOV2
SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	6.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	SMOV2	3.6	3.6	2.4	0.2			JHOC-6
JHOC-6	19.6	5.1	3.0	1.0	0.9	2.0	JHOC-6	48.3	4.6	2.7	2.4	1.0	1.4	JHOC-6	3.1	3.1	2.0	0.2			SKOV3
SKOV3	228.5	3.2	1.8	12.2	10.6	24.8	SKOV3	385.4	33.0	19.0	20.6	8.3	11.9	SKOV3	22.6	22.6	14.7	1.2			CAOV3
CAOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	CAOV3	6.5	4.7	2.7	0.3	0.1	0.2	CAOV3	6.5	6.5	4.3	0.3			
B8				B9				B13													
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	2.0	1.2	0.7	0.7			N1	2.5	0.3	0.2	0.9			N1	0.0	0.0	0.0	0.0			N1
N3	4.0	1.9	1.1	0.9			N3	7.8	2.0	1.1	1.7			N3	0.0	0.0	0.0	0.0			N3
N4	3.2	0.6	0.4	0.6			N4	6.2	1.5	0.9	1.2			N4	0.0	0.0	0.0	0.0			ES-2
ES-2	17.8	9.5	5.5	0.9	1.0	1.5	ES-2	140.4	37.9	21.9	7.3	4.2	7.8	ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0			SMOV2
SMOV2	2.0	0.6	0.3	0.1	0.1	0.1	SMOV2	38.1	5.1	2.9	1.6	0.9	1.7	SMOV2	0.5	0.9	0.5	0.0			JHOC-6
JHOC-6	47.4	8.0	4.6	2.4	2.7	3.8	JHOC-6	78.5	26.1	15.1	4.0	2.3	4.2	JHOC-6	42.4	17.1	9.9	2.1			SKOV3
SKOV3	667.8	202.6	117.1	35.7	40.1	56.4	SKOV3	148.4	36.8	21.3	7.9	4.6	8.5	SKOV3	213.7	65.4	37.8	11.4			CAOV3
CAOV3	7.2	3.6	2.1	0.3	0.3	0.5	CAOV3	97.2	34.3	19.8	4.1	2.4	4.4	CAOV3	255.8	119.7	69.2	10.7			

Real-time PCRによるHOXC発現量

C4				C5				C6				C10				C11								
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	52.4	5.3	3.7	7.1		N1	13.1	2.9	1.7	1.8		N1	7196.6	884.7	511.4	968.2		N1	54.7	11.0	6.4	7.4		
N3	60.0	11.0	7.8	5.3		N3	9.7	2.6	1.5	0.9		N3	7399.8	314.2	181.6	650.6		N3	125.0	41.7	24.1	11.0		
N4	47.5	11.5	8.2	5.6		N4	15.0	4.7	2.7	1.8		N4	5921.7	1466.2	847.5	701.1		N4	75.7	11.9	6.9	9.0		
ES-2	95.5	17.6	12.5	1.0	0.1	ES-2	52.4	3.6	2.1	0.5	0.3	0.6	8370.2	1441.8	833.4	84.8	0.1	0.1	29.1	2.7	1.5	0.3	0.0	0.0
SMOV2	3.3	0.4	0.2	0.0	0.0	SMOV2	0.4	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	12.4	21.5	12.4	0.1	0.0	14.3	1.8	1.1	0.2	0.0	0.0	
JHOC-6	4.4	0.8	0.5	0.1	0.0	JHOC-6	0.4	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	722.8	28.1	16.2	15.8	0.0	0.0	10.2	5.5	3.2	0.2	0.0	
SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SKOV3	0.7	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	99.9	96.1	55.5	1.9	0.0	0.0	3.0	2.2	1.2	0.1	0.0	
CAOV3	14.9	0.3	0.2	0.2	0.0	CAOV3	13.6	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	20584.1	4158.2	2403.6	246.6	0.3	0.4	71.8	6.1	3.5	0.9	0.1	
C8				C10				C11				C12				C13								
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1						N1	46.5	4.5	2.6	6.3		N1						N1						
N3						N3	127.7	22.5	13	11.2		N3						N3						
N4						N4	68.9	9.4	5.4	8.2		N4						N4						
ES-2						ES-2	51.4	11.2	6.5	0.5	0	0.1	ES-2					ES-2						
SMOV2						SMOV2	6.9	0.6	0.4	0.1	0	0	SMOV2					SMOV2						
JHOC-6						JHOC-6	117.1	16.3	9.4	2.6	0.2	0.4	JHOC-6					JHOC-6						
SKOV3						SKOV3	1.1	0.4	0.2	0	0	0	SKOV3					SKOV3						
CAOV3						CAOV3	670.7	114.7	66.3	8	0.7	1.3	CAOV3					CAOV3						
C12				C13				C12				C13												
平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	54.0	2.5	1.5	7.3		N1	0.6	1.0	0.6	0.1		N1						N1						
N3	167.0	37.7	21.8	14.7		N3	0.0	0.0	0.0	0.0		N3						N3						
N4	96.0	8.6	5.0	11.4		N4	0.0	0.0	0.0	0.0		N4						N4						
ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	ES-2	1.8	2.6	1.5	0.0	0.2	ES-2						ES-2						
SMOV2	12.3	5.5	3.2	0.1	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2						SMOV2						
JHOC-6	2.6	1.2	0.7	0.1	0.0	JHOC-6	1.6	1.5	0.9	0.0	0.4	JHOC-6						JHOC-6						
SKOV3	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0	SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SKOV3						SKOV3						
CAOV3	9.3	2.4	1.4	0.1	0.0	CAOV3	8.3	7.7	4.5	0.1	1.2	CAOV3						CAOV3						

Real-time PCRによるHOXD発現量

D1				D3				D4					
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max
N1	11.3	3.8	2.2	1.5	0.0	0.0	N1	47.2	13.2	7.6	6.4	0.0	0.0
N3	22.0	1.8	1.0	1.9	0.0	0.0	N3	37.4	26.5	15.3	3.3	0.0	0.0
ES-2	1.7	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	ES-2	113.2	56.6	32.7	1.1	0.2	0.3
SMOV2	2.7	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	SMOV2	7.6	3.8	2.2	0.1	0.0	0.0
JHOC-6	3.5	1.0	0.6	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	14.2	8.0	4.6	0.3	0.0	0.1
SKOV3	13.4	2.5	1.4	0.3	0.1	0.2	SKOV3	70.6	39.2	22.6	1.3	0.2	0.4
CAOV3	14.9	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	CAOV3	147.9	54.2	31.3	1.8	0.3	0.5
D8				D9				D10					
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max
N1	87.3	4.9	2.9	11.7	0.0	0.0	N1	5.9	0.8	0.5	0.8	0.0	0.0
N3	152.1	26.3	15.2	13.4	0.0	0.0	N3	5.5	2.8	1.6	0.5	0.0	0.0
ES-2	159.2	11.1	6.4	1.6	0.1	0.1	ES-2	12.1	1.1	0.6	0.1	0.2	0.3
SMOV2	17.0	3.4	2.0	0.2	0.0	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JHOC-6	293.9	56.6	32.7	6.4	0.5	0.5	JHOC-6	17.6	6.9	4.0	0.4	0.5	0.8
SKOV3	468.5	24.7	14.3	8.9	0.7	0.8	SKOV3	24.4	5.3	3.0	0.5	0.6	1.0
CAOV3	135.0	6.5	3.7	1.6	0.1	0.1	CAOV3	6.5	0.5	0.3	0.1	0.1	0.2
D11				D12				D13					
	平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max		平均値	SD	SEM	Ave/beta	min	max
N1	9.3	2.0	1.2	1.3	0.0	0.0	N1	39.4	14.6	8.4	5.3	0.0	0.0
N3	32.2	4.0	2.3	2.8	0.0	0.0	N3	156.8	67.3	38.9	13.8	0.0	0.0
ES-2	0.7	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	ES-2	2.2	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0
SMOV2	2.9	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	8.7	5.8	3.3	0.1	0.0	0.0
JHOC-6	0.8	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	JHOC-6	2.8	0.8	0.5	0.1	0.0	0.0
SKOV3	6.3	0.5	0.3	0.1	0.0	0.1	SKOV3	2.0	1.1	0.6	0.0	0.0	0.0
CAOV3	11.5	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1	CAOV3	1.2	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0

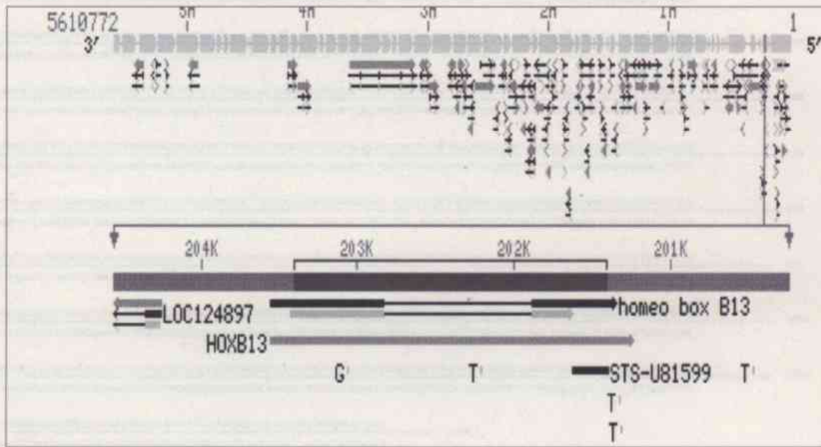
Hox B13 in chromosome

資料 1

Hox B-13 (mRNA) -1269bp

[Faint, illegible text, likely a DNA sequence or description of the mRNA fragment.]

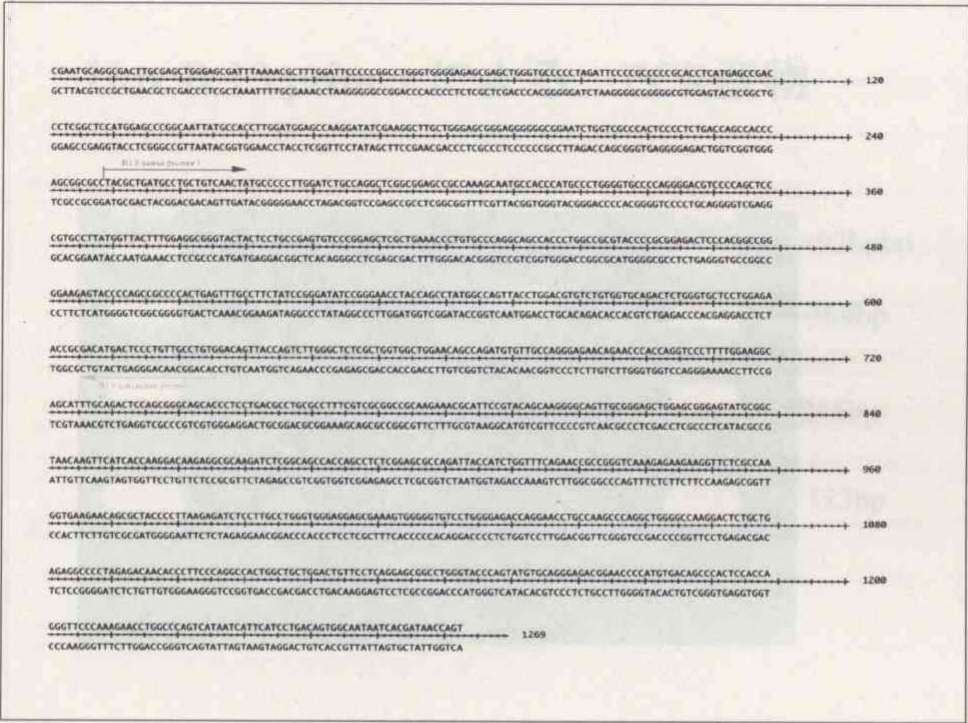
Hox B13 in chromosome



Hox B 13 (mRNA) 1269bp

```

cgaaatgaggcgacttggagctgggagcgatttaaacgcttggattccccggcctgggtgggagagcgagctggg
tgeccccatgatfecccgeccccgcaccteatgagcgcacctgggetecatggagcgggeaanttatgcaacctggat
ggagccaaaggatategaaggcttgcgggagcgggagggggggggggaantctggtegccnctccccctetgacnccncc
negggegeefacgctgatgectgctgcaactatgccccctggatctgcaaggetegggggaggeegccaanngnatgce
nccentgcccctgggggtgccccnggggaagteccccagctcccgtgecttatggtaacttggagggggtactactctgc
cgnatgtccggagctgctganaacctgtgccnaggcagccacctggcggctnccccgggagactccccagggcgg
ggaaagatccccagcccccactgagttgcttatccgggatccgggaacctaccgacctatggcaggtacc
tggacgtgtctgtgtgagactctgggtgctctgggagaccggacatgactccctggtgctgtgacagttaccag
tctgggtctctgctgtgtggtggaacagcagatgtgtgcccaggagagaacagaccnccaggteccctttggangge
ngenttgcagctcagcggggcagccctctgaacctgaccttctgctgctggcggcggcaganaagcaatctctgaca
gcnaagggcgagttggggagctggagcgggagatgctgctaaacagttctatnccnaggcnaagagggcagatctctg
gcagccaccagcctctctggagcagatfaccatctggttcaagaccgcccgggcaagaganaaggtctctgcccna
ggfgaagancagctacccttaagagatctcttgcctgggtgggaggagcgaangtgggggtctctggggagacca
ggnaacctgccnagccagctggggccaaggactctgctgagaggccctagagacaaacctccccagggcactggtct
gctggactgtctctcaggagcggcctgggtaccagttatgtcagggagagcggnaacctctgacagccnctccnca
gggttcccaangaacctggcccagtcataatcattctctgacagttggaantaatcagatnaccagt
    
```



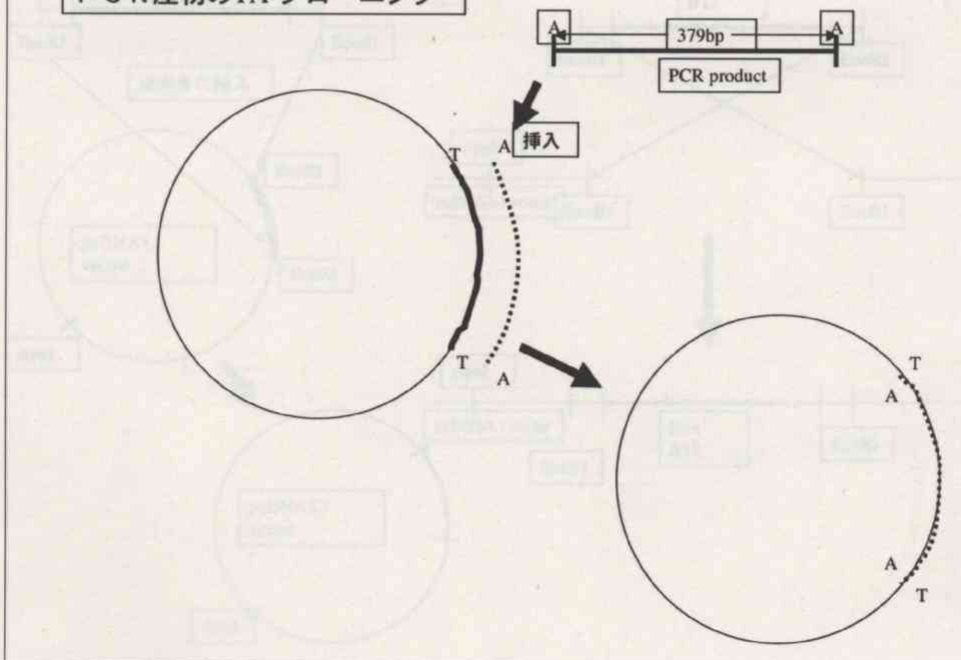
Information of Hox B 13

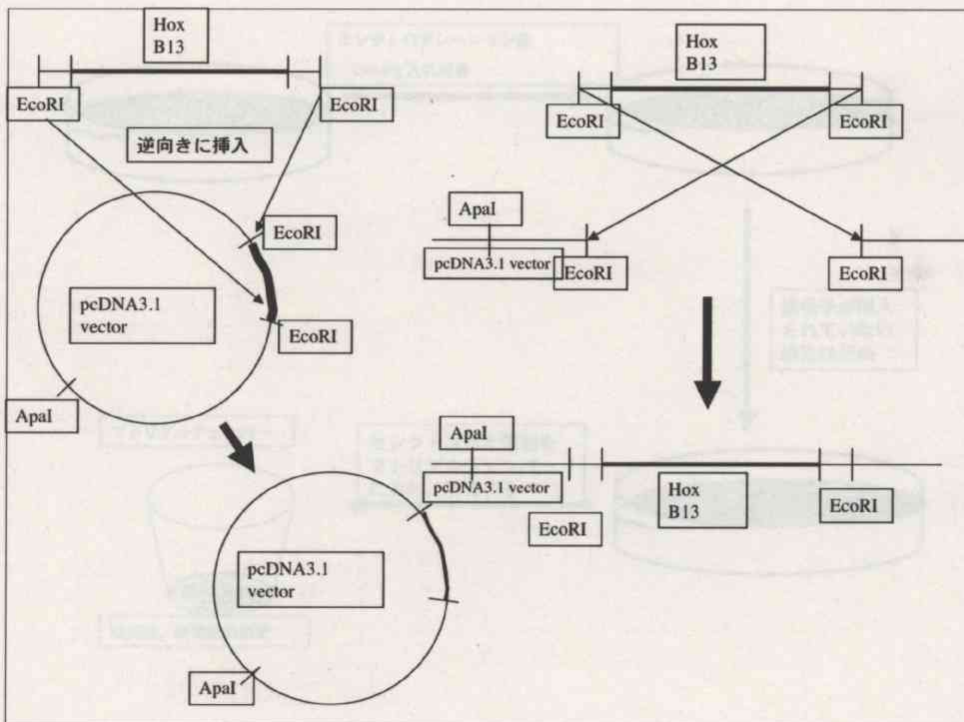
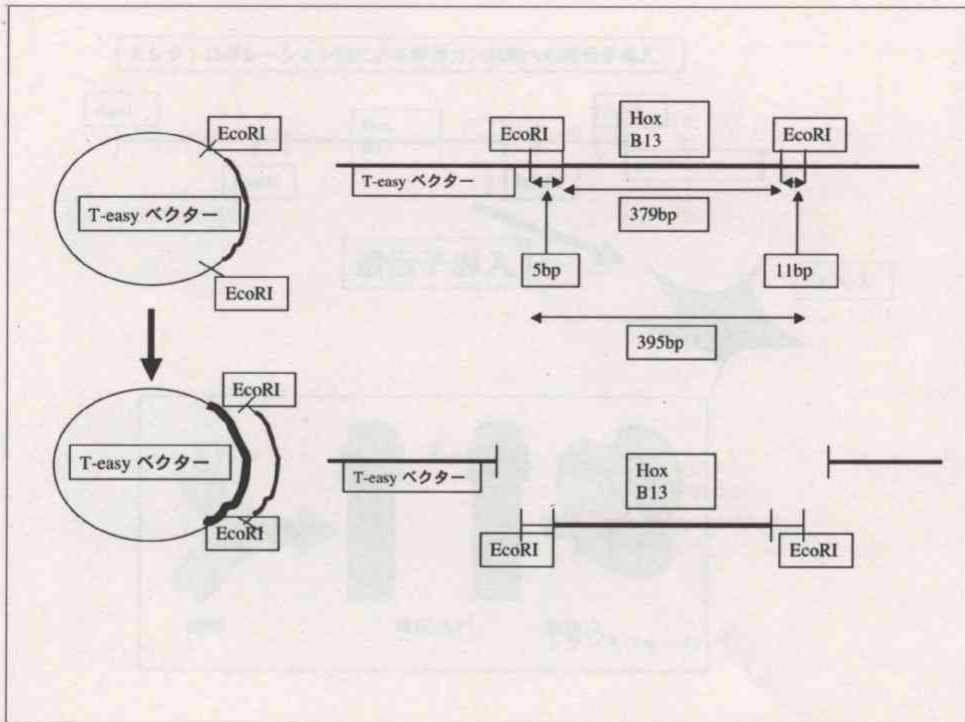
- **acgetgatgeetgetgtaacta** Primer A
- **egacatgactceetgtgectgtg** Primer B
-
- **acgetgatgeetgtgtaactatgceccctggatctgcaaggetggggagcgecaaaageaatge**
- **acecatgeccctgggtgceccagggagctceccagctcectgtgcttattggttaetttggaggcgggtaetactectge**
- **cgagtgteceggagctgctgaaacctgtgceccaggeageacectggcgcgtacecegggagactcecaeggegg**
- **ggaaaggtaceceagecececaetgagtttgecttetatecgggatacgggaaactaecaectatggcaggttacc**
- **tgacgtgtctgtgggagacttgggtgctctcgggagaaaccggacatgactcectgttgcctgtg**

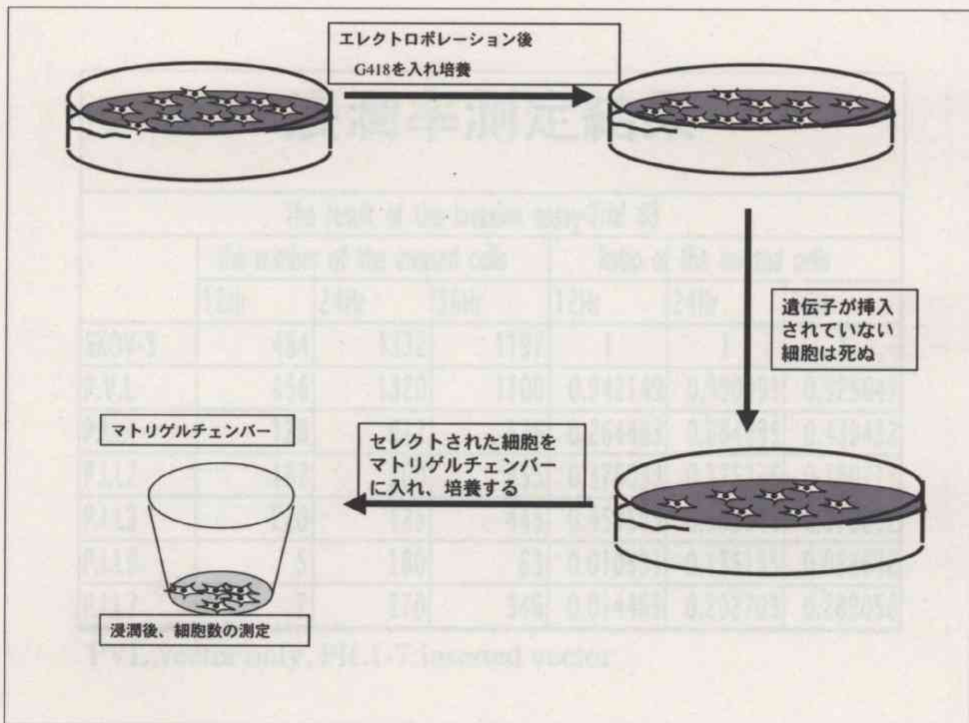
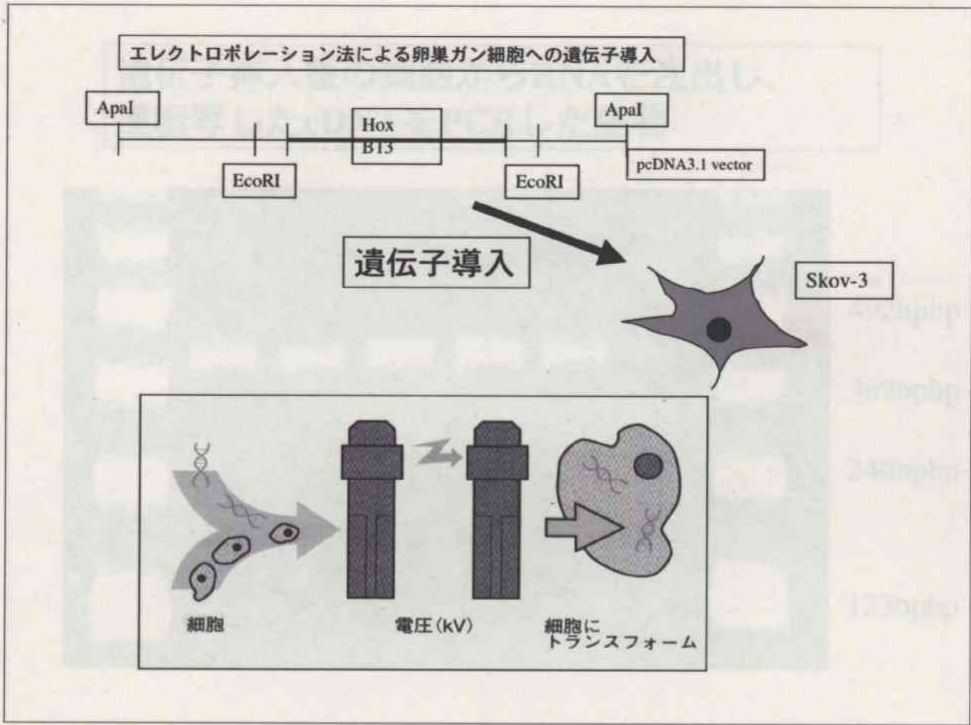
Hox B 13 primer による PCR産物



PCR産物のTA-クローニング







遺伝子挿入後の細胞からRNAを抽出し、
逆転写したcDNAをPCRした産物

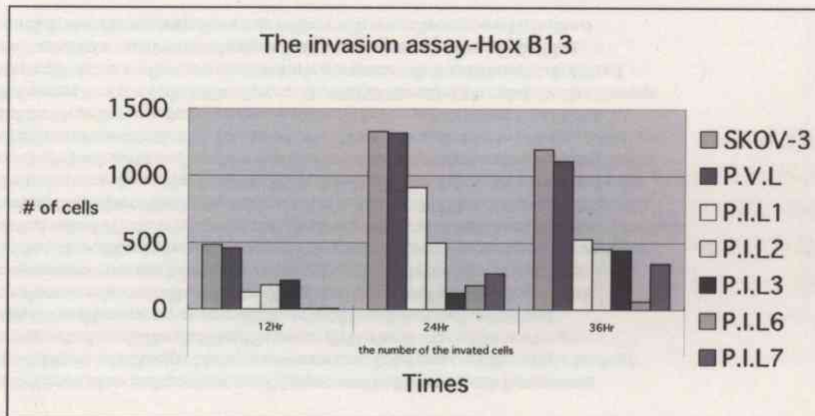


浸潤率測定結果

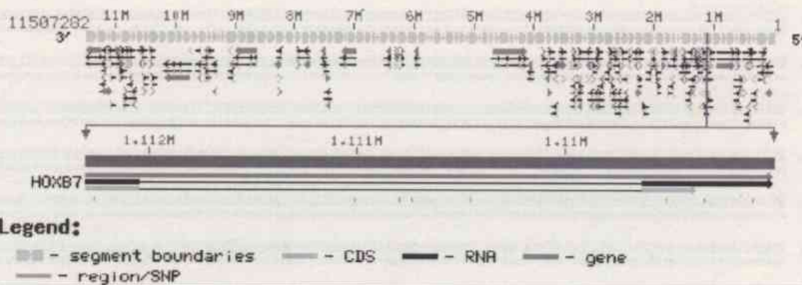
The result of the invasion assay-Trial #3						
	the number of the invated cells			Ratio of the invated cells		
	12Hr	24Hr	36Hr	12Hr	24Hr	36Hr
SKOV-3	484	1332	1197	1	1	1
P.V.L	456	1320	1108	0.942149	0.990991	0.925647
P.I.L1	128	912	526	0.264463	0.684685	0.439432
P.I.L2	182	500	455	0.376033	0.375375	0.380117
P.I.L3	220	125	443	0.454545	0.093844	0.370092
P.I.L6	5	180	63	0.010331	0.135135	0.052632
P.I.L7	7	270	346	0.014463	0.202703	0.289056

P.V.L;vector only, P.I.L1-7:inserted vector

サンプル別の細胞浸潤数結果



Hox B7 in chromosome



Hox B7 (mRNA)-1359bp

cttttgggtaaactggaactaattctgaatatacaaggatctgtaaaaccgacactaaaacgctccgcta
caaacatccgccaatataatgatttattatgcgaatcttatttcaaatcagcctcaatgctggtt
tcgctaccggagcctccagaacaactcttggcttctcaaccgccgcccggctatggagcggggtc
gggctcctcggcctgatcagggcttgaccgccggggggggcctggccggcagagcggcgggctga
cggcgccgctatggctgagccgagttcctcaacatgactgcccgccttgagcagaacctccggggtg
ccggcgactcccaagcggcggccccaaggagcagagggactggactggccggcgaagtaactccgatctc
ccctcgaatggaagctggaactgaccgaacgagggcgcagactacaccgctaccagacctggagcggagaa
ggaatttcaatcaatgctactgacggcggcggcgcacgatgagcgcgcacgctgctacggaaagaca
tcaagatttggttcagaaccggcggatgagtggaanaaggagaacaagaccggccggggacaccggccaagac
agggctgaacagagaggagagagaggtgaggatggagaaaggcagagagagacatgagaaggagagaga
agaagcccagctctggaaactgaaactgaaactcaaacgaafgggaagtaaaaaaacaaaaacaanaaaa
acaanaaaaaacctaftaaatgaaagagtttaaaacttttaaggagagaaaggagaatttggtttca
aactgaaaaaatactacatatgaaagctgctgctggtttttgtaaatatgaaaaggacattatctactg
ttctgtagtttctgaaattaccccttcttatgctattgaagcttggtaaatctgcaattttgtaag
ccctttaaagctgcttggcagctggtgctgactaacctgtggtgcctgcccctgctgctccgccttcc
agcagcggcaaacaggggccttagggagcccaaacctaccactgctgctcccaagcgccttctgctgctg
ctcccgtccccagcccatctccccttaccctgtgttatcaaggatgaaaaataaacgaattaaaaat

Hox B7 mRNA内での PCR 産物範囲

CTTTTGGGTAAATCTGGACTTAATCTGTAATATATCAAGGAATCTGTA AAAACCGACATAAAAACGTCCCTCAAACTATCAGCCAAATATAGTTTATGTAATGTCG 120
GAAAACACATTATAGACTGAGATTAAACATTTATAGTTCTTATAGACTTTGCTGTGATTTCAGGGACGGATGTTATAGAGCGGTTTAACTCACTAACTAATAATACGC
AATGCTTAATTTTCAAAATCTCAGCTCAAGTTCTGGTTCTCCTACCGAGCCTTCCAGAACAACTTCTTGTGCGTTTGGCTTCCAACCCCGAGCGCCGCGGTATGAGCGGTTTC 240
TTACGAAATAAAGATTATAGTTCAGGTTCAGGCAAAGGATGCGCTCGGAAGGGCTTTGTTGAAGAACAACGAAAGGTTGGGGTCGCGGGCCGATACCTGCAGCCAAAGC
GGCGTCTCTCGCCGGTCTGATGAGGGCTTGATCCCGCGGGGGGGGATGGCGGGCAGAGCGCGCCGCGCTACGGCCGGTATGGGCTGAGCCGAGTTCCTTCAACTG 360
CCCGGAAGGAGCGGCCAGCTACGTCCGAAATCGGGCCGGCCCCCCCTACCGCCGCTCGCGCCGGCCAGATCGCCGGCGATACCCGAGCTCGGCTCAAGGAAATGTAC
CACTGCGCGCTTTGAGCAGAACTCTCCGGGGTGTTCGCGCCAGCTCCGCCAAGGGCGGGGCGCAAGGAGCAGAGGGACTCGGACTTGGCGCCGAGADTAATCTCCGGATCTAC 480
GTGACCGCCGGAAACTGCTCTTGGAGAGGCCACACAGGGCCCTGAGGGGTTCCGCCCCCGGGTCTCGCTCTCCCTGAGCTGAACCGCGGCTCTATTGAAGGCTTAGAT
CCCTGATGGAAGCTCAGAACTGACCCGAAAGAGGCCAGACTCACTCCCTACAGCCCTGAGCTGGAGAGGAAATTCATCAACTCGCTACCTGACCGCGCGCCGGCCG 600
GGGAGCTACGCTCGAGCTTTCAGTGGGTTTTCTCCGGGCTCGATGTTGGGGATGCTGGGACCCTGACTCTTCTTAAAGTATGTTAGCGATGGACTGCGCCGCGCCGCG
ATCGAGCTCGGACCGCTCCTCACTCCAGCAAGCAGATCAAGATTGGTTTTCAGAACTGGCCTAAGTGGAAAAGGAAACAAACCCGCGGCGGGGACCTCCGCAAGAC 720
TAGCTTAGCGCGCGCGAGAGCGAGTGCCCTTCTGCTAGTTCAAAACAAAGTCTGGCCCGGTACTTCACTTTTCTCTTTGTTCTGGGCGCCCGCCCTGTTGGCCGTTCTG
AGGCTGAACTGAGGAGGAGAGAGGAGGATGGGGATGAGAAAAGGCGAGAGGAAGACATGAGAAAGGAGAGGAGAGAAAGCCAGCTCTGGGAATCAATCAGGAACTCAAT 840
TCCGACTCGCTCCTCCTCTCCTCTCACTCCCTACTTCTCCGCTCCTCTCTCTGACTTTCCCTCTCTCGGGTCCAGAGCTTGTACTCTCTTGAAGCTTCAAGT 960
GAAAGGGAGTAAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAAACCTATTAAATGAAAGGAGTTAAAAAATTTTTAAAGAGGGGAGAAAGGAAAATTTGGTTTTCA
CTATCCCTCAATTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTTTGTGTTTGGGATAAATTACTTCTCAAAATTTGTAAAAATTCCTCCCTCTTCTCTTAAAAACAAAAAGT 1080
ACATGAAAATAATGATCTATAGGAAGCTGTCAGGTTGGTTTTTTGTACAAATGAAAAGGAACTATCTACTGTTCTGTAGCTTTTGGAATTAACCTCCCTCTCTATGTT 1140
TCGTAATTTTATCATGATATCTTTCAGAGCTCAAAACAAAAAATATTTACTTCTTCTGTAATAGTGGACAAGACTGAAAAGCTTAAATGGAGGGGAAAAGATACAA 1200
GCTATTGTAAGGTTCTTTGAAATCTGCACTTGTAAAGCCCTTTAAGTCTCTTTGTGATCTGTTGAGGAGTGGGTTGACCTTGTGTTGCTGCTCCCTGCCCTGCTGCTCC 1260
CGATAAATCTCAGAAATTTTACAGACTGCAAAATCTGGGAAAATGACGAGAACAACCTGACCCAGACTGATTGGGACCAACGGAGCGGAGGACAGCGAGCGGAGGG 1320
AGCAGCGGACCAAGGGGCTTAGGGAGGCCAAAACCTCACCTCCCGTCCCAAGGCGCTTGCCTGCTGCTTCCCTGCCCTCCCGCCAGCCCTGCTTCACTCTGTG 1359
TGTATCAAGGATGAAAATAAAAACGAATAAAAAT 1359
ACATAGATTTCTACCTTTTATTTGGGTTAAATTTTA

T-Easy Hox B7 PCR 産物

Cattgtattatgcgaatgcttt – sense primer (107bp-128bp)

Cgcagtgcattggaaggaact-antisense primer (344bp-367bp)

PCR Product-

cattgtattatgcgaatgcttttctaaatccagcctcaagttcggtttcgctaccggagcctccaga
acaaacttctgtgcgtttgctccaacccccagcgcgggctatggagcgggtcgggcgcttcttcgc
cggctc gatgcagggtgtacccccggcggggggggcatggcgggagagcggcggcgcttac
cgggcccggctatgggctcgagccgagttcctcaacatgcactgcg

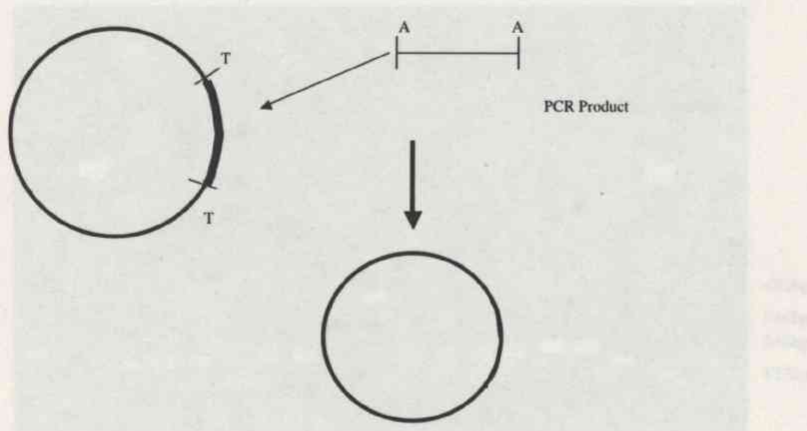
The entire length of PCR Product- 260bp

•It is created by Hot taq and purified in order to use for the further application.

Hox B7 PCR産物 (260bp)



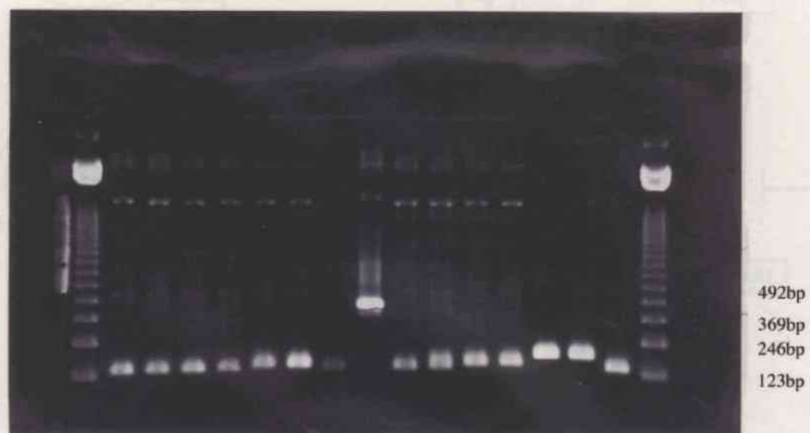
T-Easy ベクター & PCR 産物



Hox B7のPCR産物をT-easyベクターに挿入したプラスミッドDNAをPCRした結果

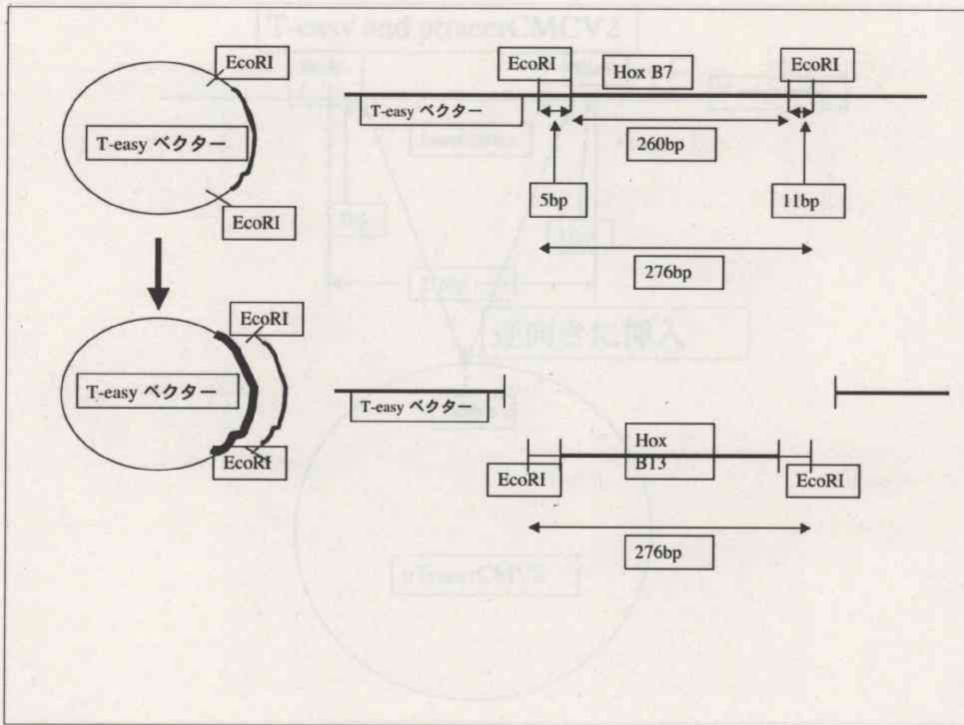


T-7とSp-6 primerでPCRをし、
挿入したPCR産物を確認した結果

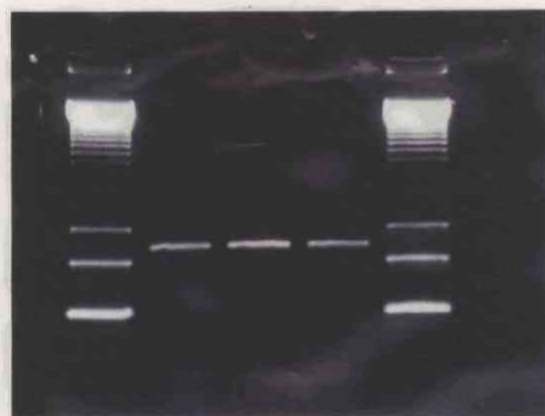


T-7とSp-6 primerでPCRをし、
挿入したPCR産物を確認した結果 その2

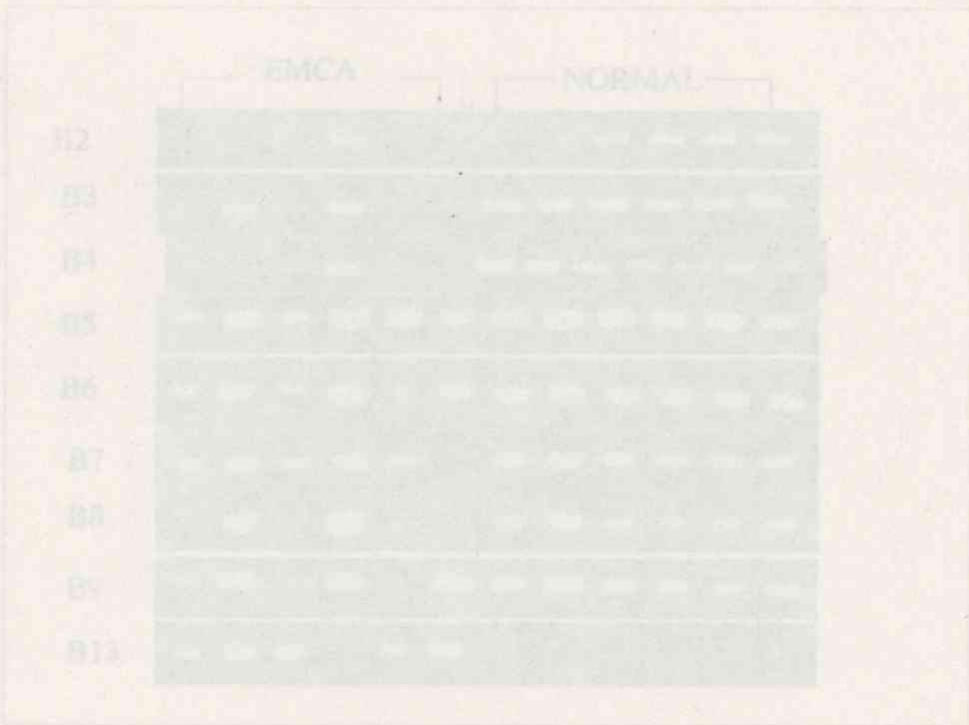
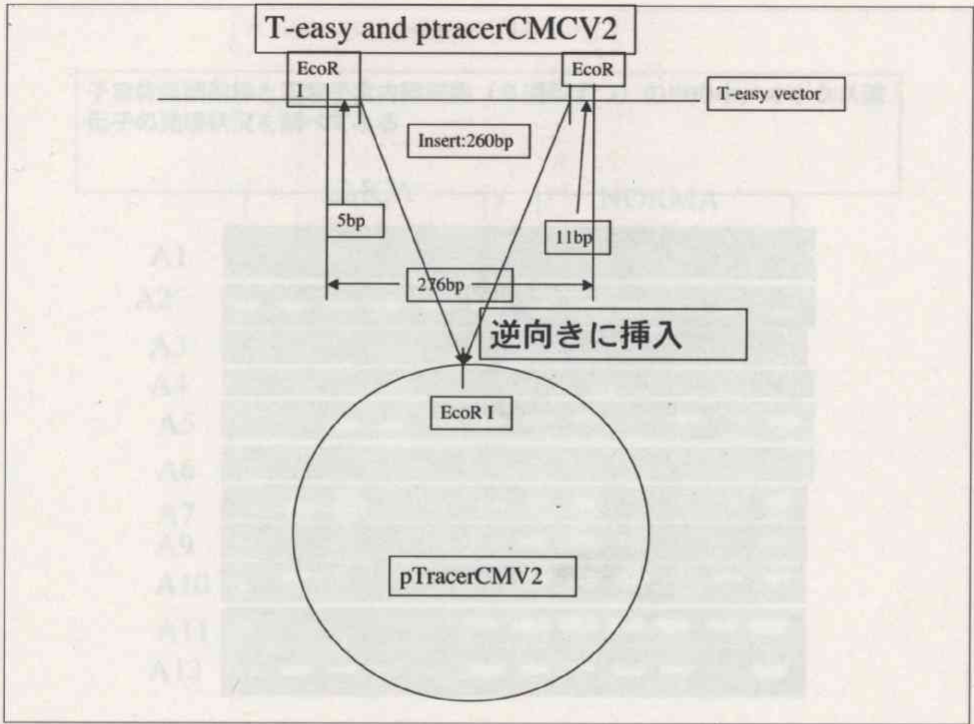




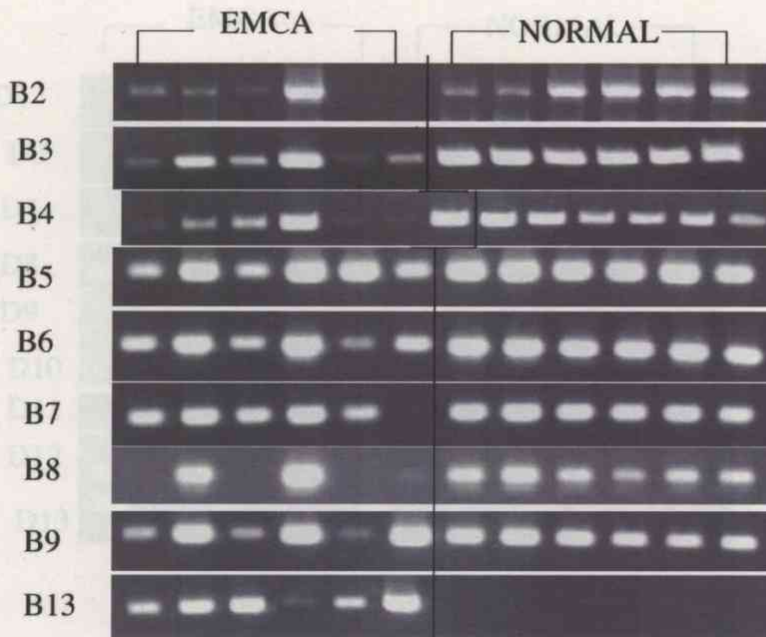
制限酵素EcoRIで抽出した
DNAの確認結果

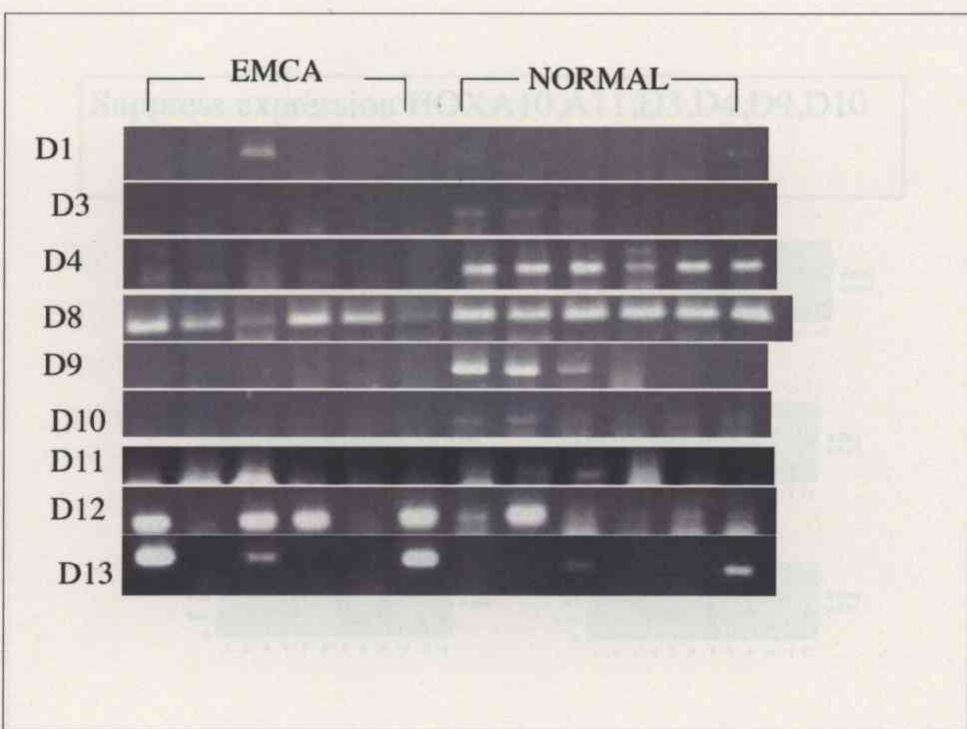
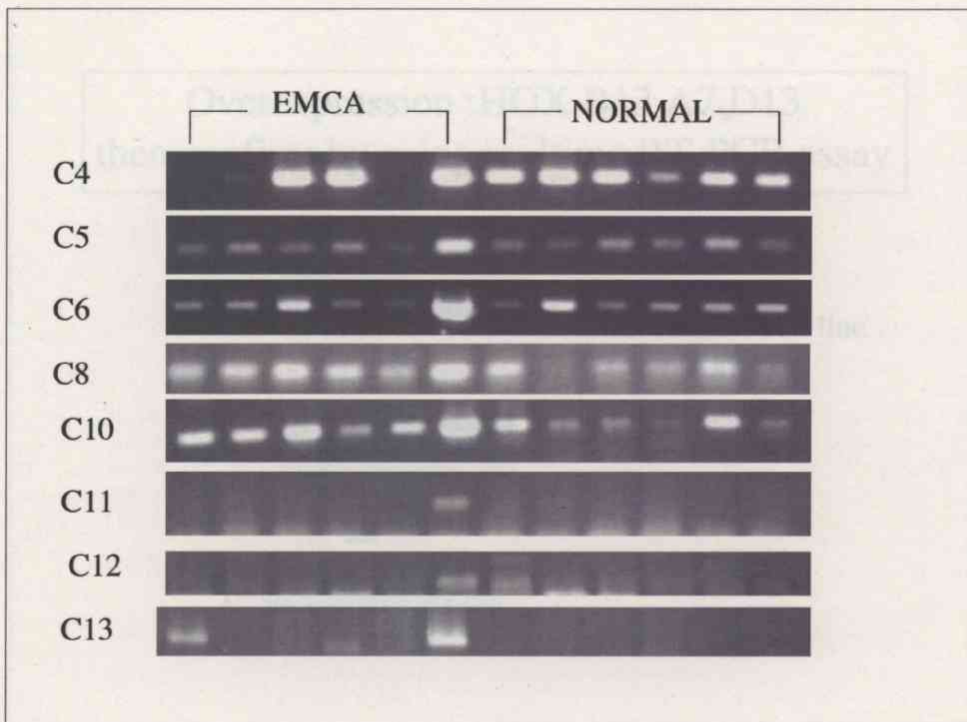


369bp
246bp
123bp

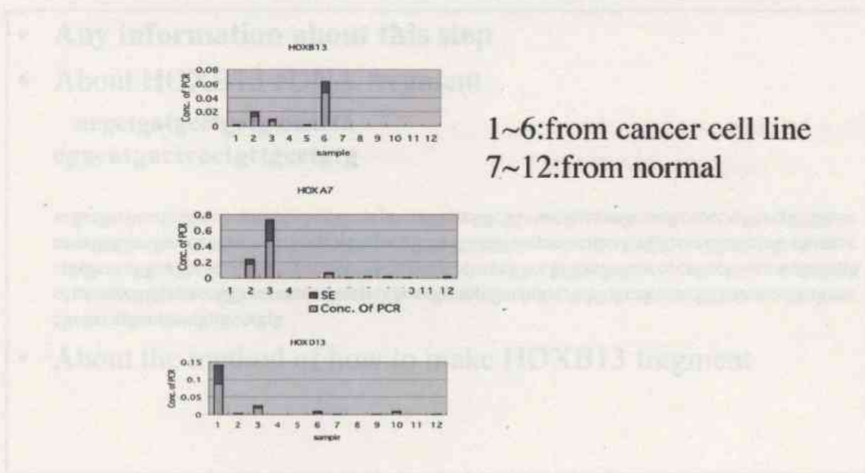


子宮体癌細胞株と正常子宮内膜細胞（6週類ずつ）の中のホメオボックス遺伝子の発現状況を調べてみる

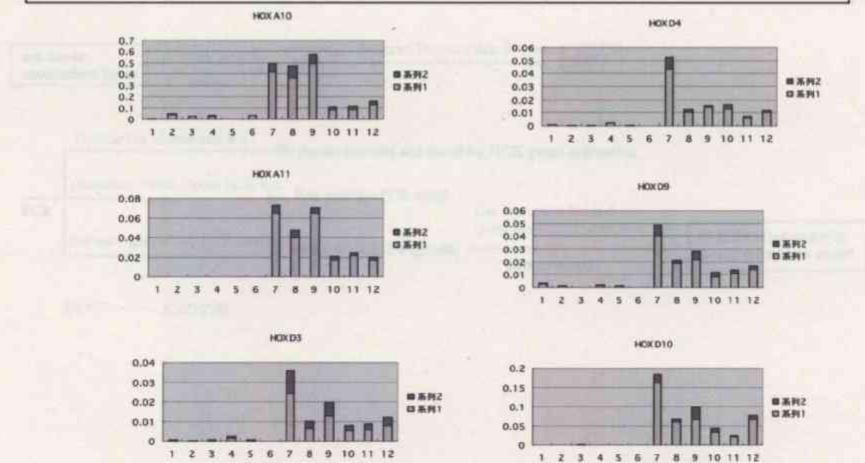




Overexpression :HOX B13,A7,D13
 then confirm by using realtime RT-PCR assay



Suppress expression:HOXA10,A11,D3,D4,D9,D10



Transfecting antisense DNA of HOXB13 into endometrial adenocarcinoma cell line(AN3CA) by electroporation

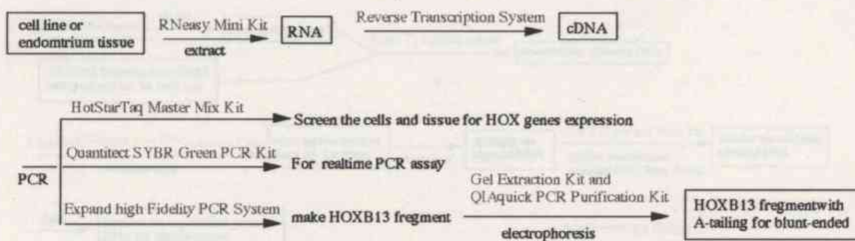
- Any information about this step
- About HOXB13 cDNA fragment

**acgctgatgcctgctgcaacta
cgacatgactcctgttgctgtg**

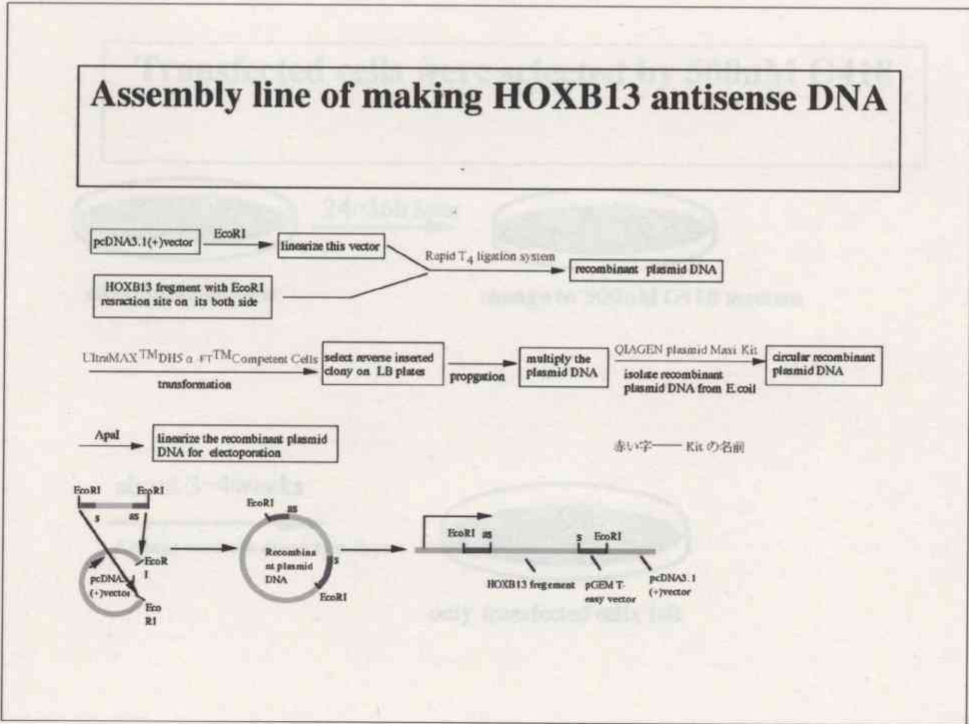
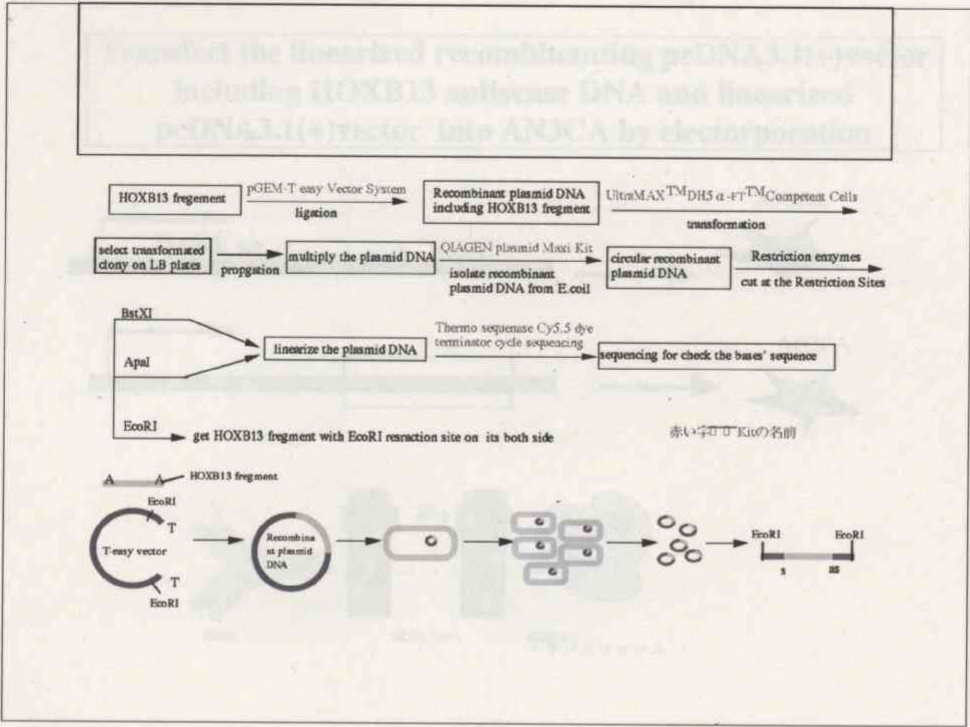
```
acgctgatgcctgctgcaactatgccccctgggatgcccaggctcggcggagccgcaaaagcaatgcacccatgccctgggggc
ccaggggacgtcccagctcccgtgcttatggttactttggaggcgggtactactcctgccgagtgtccggagctcgtgaaacc
ctgtgccaggcagccacccctggccgctaccccgggagactcccacggccgggaagagtacccagccgccccactgagttg
ccttctatccgggatccgggaacctaccagcctatggccagttactggacgtgtctgtgtgagactctgggtgctcctggagaac
cggacatgactcctgttgctgtg
```

- About the method of how to make HOXB13 fragment

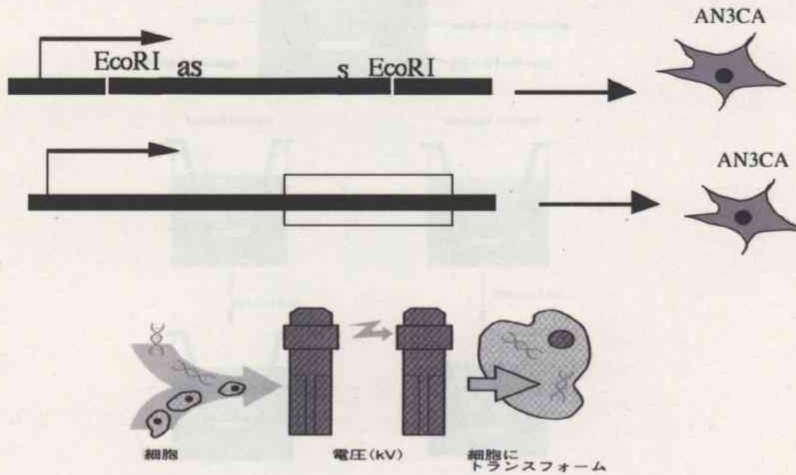
Assembly line of making HOXB13 fragment



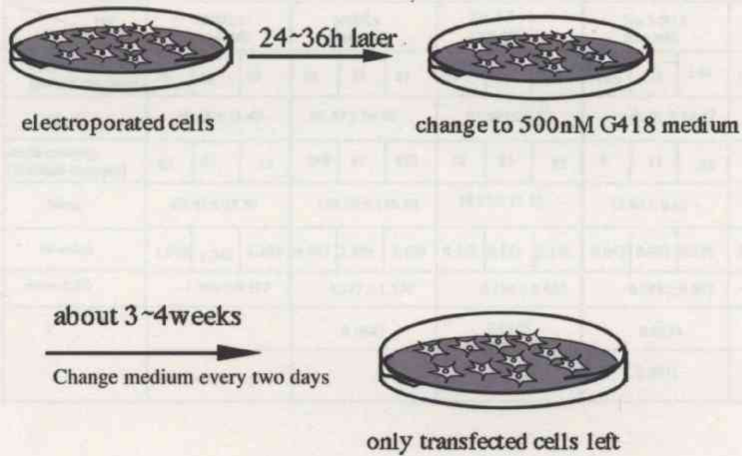
赤い字 — Kitの名前



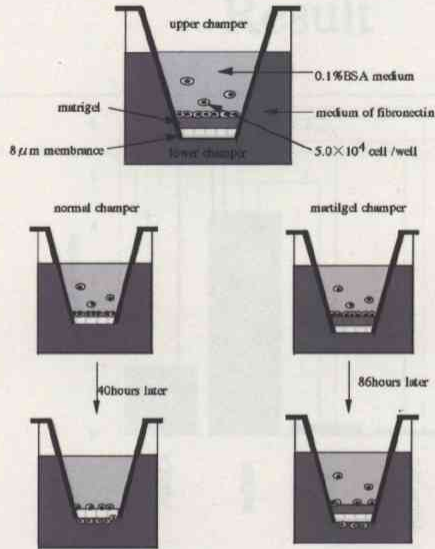
Transfect the linearized recombinant pcDNA3.1(+)vector including HOXB13 antisense DNA and linearized pcDNA3.1(+)vector into AN3CA by electroporation



Transfected cells were selected by 500nM G418



Invasion ability assay

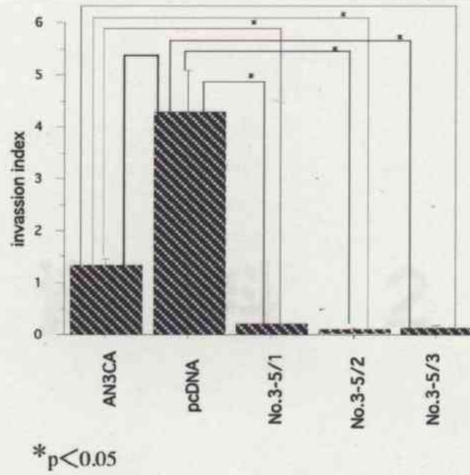


Determine Percent invasion:

$$\% \text{Invasion} = \frac{\text{Mean\# of cells invading through Matrigel insert membrane}}{\text{Mean\# of cells migrating through normal membrane}} \times 100$$

cell	AN3CA (control cell)			pcDNA (test cell)			No.3-5 / 1 (test cell)			No.3-5 / 2 (test cell)			No.3-5 / 3 (test cell)		
#cell invading (normal chamber)	55	38	46	38	36	37	74	91	128	186	113	141	110	73	131
Mean	46.25 ± 11.45			36.87 ± 24.80			97.58 ± 28.87			146.91 ± 37.47			104.33 ± 35.52		
#cells invading (Matrigel chamber)	85	51	53	188	97	192	12	21	22	8	11	22	16	14	10
Mean	63.41 ± 28.97			159.08 ± 110.50			19.25 ± 11.82			13.63 ± 9.65			13.54 ± 10.56		
Invasion	1.545	1.342	1.152	4.947	2.694	5.189	0.162	0.231	0.172	0.043	0.097	0.156	0.145	0.192	0.076
mean ± SD	1.346 ± 0.197			4.277 ± 1.376			0.188 ± 0.037			0.099 ± 0.057			0.138 ± 0.058		
P				0.0687			0.0103			0.0134			0.0065		
							0.0376			0.0341			0.0374		

Result



ABNORMAL HDX GENE EXPRESSION IN OVARIAN CANCER

7th World Congress on Advances in Oncology and 5th International Symposium on
Molecular Medicine

Background and Purpose

Recent reports have provided evidence that HOX genes, which encode transcription factors containing homeodomain protein, contribute to development of several types of cancer, such as leukemia, lung cancer and colon cancer.

HOX genes are located in 4 different clusters and consist of 39 different genes. The function of HOX genes is thought to establish basic body pattern during embryogenesis by controlling cells movement. After birth, expression of HOX genes is diminishing or is held at a low level for tissue maintenance.

However, as HOX gene is believed to regulate the signal information from cells through cell-cell interaction, the up-regulation or down-regulation of certain HOX genes is thought to contribute to the development of malignancies through its function of controlling cells movement.

In this study, we investigated expression profile of the HOX genes in normal ovarian tissues from surgical samples and ovarian cancer cell lines to elucidate the likely possibility.

資料 2

ABNORMAL HOX GENE EXPRESSION IN OVARIAN CANCER

7th World Congress on Advances in Oncology and 5th International Symposium on
Molecular Medicine

Homeobox containing genes



Each HOX gene expressed independently along anterior-posterior axis of embryonic zebrafish.

Mice with HOX gene deletion show perturbed body pattern, indicating HOX genes control body plan and are essential for establishing basic body pattern of the embryo.

Over expression of the HOX genes is thought to regulate cell movement.

Background and Purpose

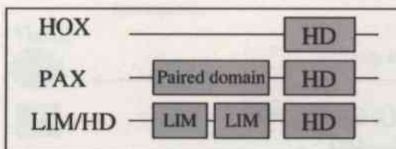
Recent reports have provided evidence that HOX genes, which encode transcription factor containing homeodomain protein, contribute to development of several types of cancer, such as leukemia, lung cancer and colon cancer.

HOX genes are located in 4 different clusters and consist of 39 different genes. The function of HOX genes is thought to establish basic body pattern during embryogenesis by controlling cells movement. After birth, expression of HOX genes is diminishing or is hold at a low level for tissue maintenance.

However, as HOX gene is believed to regulate the signal information from cells through the interaction between cells, abnormal expressions of certain HOX genes may contribute to invasion and /or metastasize in malignancies through its function of controlling cells movement.

In this study, we investigated expression profile of the HOX genes in normal ovarian tissues from surgical samples and ovarian cancer cell lines to elucidate the this possibility.

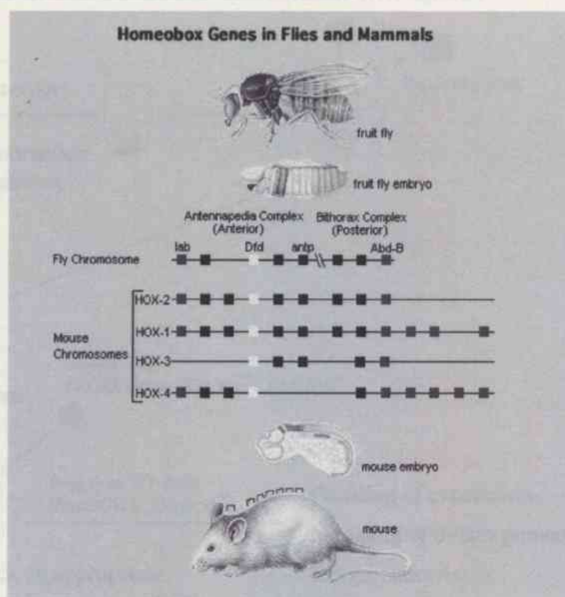
Homeobox containing genes



Each HOX gene expresses segmentally along anterior-posterior axis of mammalian embryo.

Mice with hox gene deleted show posteriorized tissue pattern, indicating HOX genes control cells fate and are essential for establishing basic body pattern of the embryo.

One of function of the HOX genes is thought to regulate cell movement.



Materials and Methods

1, RNA extraction and reverse transcription

Normal ovarian tissue : Surgical specimens of ovary from patients in Asahikawa Medical College Hospital

Cell lines :	SMOV-2	(derived form Clear Cell Carcinoma)	(a gift from Dr.YONAMINE)
	JHOC-6	(CCC)	(a gift from Dr.IISHIKAWA)
	ES-2	(CCC)	(from ATCC)
	SKOV2	(Non CCC)	(from ATCC)
	CAOV3	(Non CCC)	(from ATCC)

2, Reverse-transcription PCR (Real-time PCR)

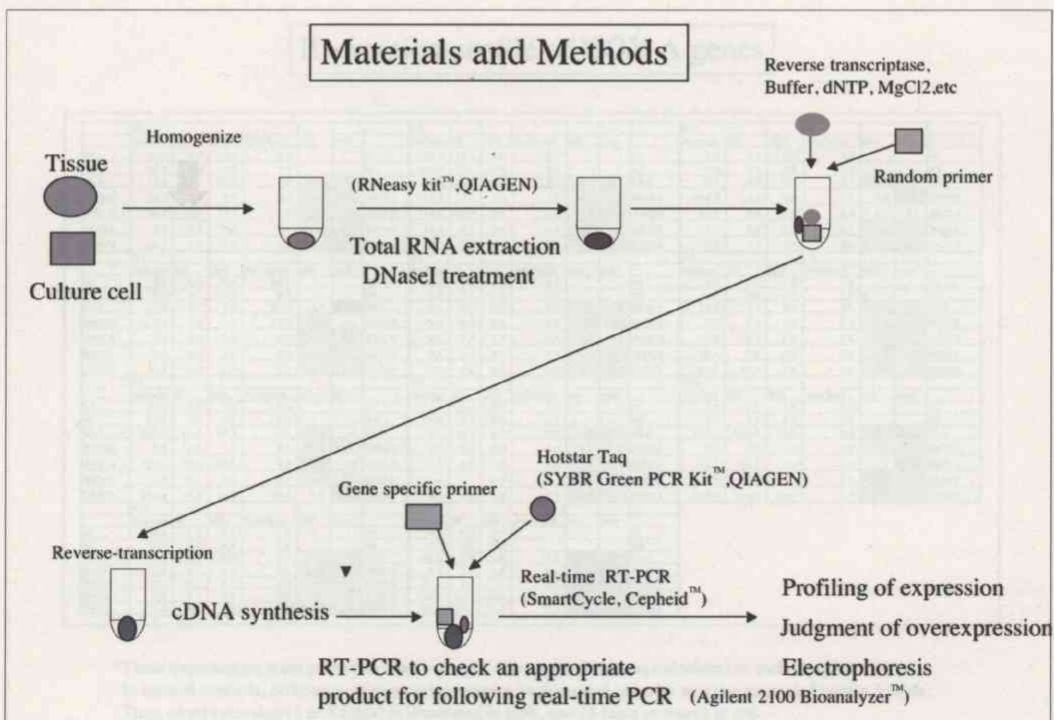
1 μ g of total RNA was served to reverse-transcription, and β -actin was used as internal standard for adjusting the amount of total RNA.

SYBR Green PCR KitTM(QIAGEN) was used for real-time PCR with SmartCycleTM (Cepheid) after confirming the appropriate single target band.

Overexpression was confirmed by electrophoresis used by Agilent 2100 BioanalyzerTM.

Primer sequences of HOX genes were referred from open database.

Expression level of the HOX gene is demonstrated as relative ratio compared to average of that in normal ovarian tissues.



Primer sequence of HOX genes for real-time PCR

Gene	Sense	Antisense	Gene	Sense	Antisense
A1	AGTTGGAGAGTACGGTACTCTG	TGCAGGATGACGGATCTCCAC	C4	ACCGTGCATGAAATGGAAG	CTGGAGTGGTCTCAGAATACC
A2	CTCTTTGACAGACTTTCGGCTT	CGATTTGGGTGAGTGTCTGT	C5	AGATTTACCGGTGATGACCAAC	CGGTTAAAGTGAATCTTTCTCG
A3	GGCTATCTGAAGCTATGATCTCG	AGGCCATGAGCGTGGGGTCATA	C6	CACCTTAGGACATAACACACAGACC	CACCTTATCCGGCGGTCTGGAACC
A4	TGTACCCCTGGATGAAGAAGATCC	CATTCCTCGGTCTGAAACAGATC	C8	TACAGACCCGTGAACCTGG	GGACACAGATTTGACTCTGCG
A5	AAACTCAATTTTGGGTCCTAT	gtacctgcccgaagtgcattgctc	C10	CCACAGGAANTGGCTGAC	CTGGGATTTGAACCAGA
A6	GAGTTCACCTTCAACCGCTACC	GTACTTGGCGGATGCAATGCTC	C11	GCTGCCTTATTGAAATTCAGAT	TGTCGGTCCGTCAGGTTACAGAT
A7	GAGCTGGAGAGAGAGTTCAC	ACCTTCGCTCTTATGCTCTT	C12	TTGCACTGGCAGAGCTGGAGGGCG	CTCCGGTCTGAAACAGACTTGA
A9	CTGTTCAACATGTACTCACCA	CACCTGCTCTTTGCTGGTCT	C13	CCCTACACTAAGGTCAGCTGAA	TACCTGGGCTCAGAGAGGTTCTGTG
A10	AGGCGCAAGCCCTCGCCGAGAG	GCTCTCGAGTATGGTACATATG	D1	CATTAAGTACTTAACCTGAGCC	CGAAGCTCTTGGACTGAGAA
A11	GTACTTACTAGCTCTGGGTCAG	AGTCTCTGTGCACGAGCTCT	D3	CATCAGCAAGCAGATCTCC	AGCGGTTGAAGTGAATCC
A13	ACCTCTGGAAGTCCACTCTGCC	ATGCTGGTACTCTGGATATGC	D4	GGCTTACCCCGGACAGCAATCC	CTTTAGTGTGGGCAAGCTTATGA
B2	TTCCGGCCGACTCCTGTG	CAGGTGATGGCACAGAGCGTA	D8	ACAGTAAAAATCTGTTCCAG	TGTTCTCCCTCAGCTCTTG
B3	AGGCTGGCGCCCGCCAGAG	GAAAGGTGGTTGAGGCCATAGA	D9	TTCCGACCGCAGCAGCAACT	TCTCTCTGTTAGGTTGAGAATCCT
B4	GTGCAAGAGCCCTCGCTAC	CAGAGCCCGTGGGCTCTCCA	D10	TGGTATGAAATGTCATCT	CTGGACATGACATGGAGCTCG
B5	GTTCCTACTCAACCGCTACC	GGCTGCCAGCTGTAGCCAGGCTC	D11	ATGAAGCATTGACGAGTGGCC	CCACTTCGGCACGGGCTGGAC
B6	CCTTCTACCCGAGAAAGAT	TTGCAGAAATTCATCGCTCAT	D12	ATGTAGGGGTGCTGAAATGACCG	CCCCTCTGAGAGACTGCGCTCA
B7	AGATTAATCTCCGATCTA	CAGAGCCGGTGGGCTCTGATG	D13	TCTAAATCAGCCGACATGTGGT	CGGTTCTGAAACCAATGG
B8	AGCAGCCCGGACGCGAGCG	TCCACTTCACTCCCGGTTCTG			
B9	CACTTGGCTCAGCTCGCTCT	CTCTACTCAGATTGAGAGCT			
B13	TGGAACAGCCAGATGTGTGCCA	AGAGGCTGGTGGCTGCCGAGATCT			

*Appropriate PCR product(single clear band) from HOX B1,C9 was not obtained by RT-PCR

Expression profile of HOX A genes

A1						A2						A3					
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max
N1	21.1	3.7	2.7	2.8		N1	46.8	10.4	6.0	6.3		N1	2.4	3.4	2.4	0.3	
N3	42.8	3.8	2.7	3.8		N3	104.4	28.7	16.6	9.2		N3	9.0	1.1	0.8	0.8	
ES-2	77.8	21.5	15.3	0.8	0.2	ES-2	58.1	10.7	6.2	0.6	0.1	ES-2	5.5	0.3	0.2	0.1	0.1
SMOV2	64.8	5.0	3.6	0.7	0.2	SMOV2	112.6	2.0	1.2	1.3	0.1	SMOV2	100.9	0.8	0.6	1.1	1.4
JHOC-6	88.7	24.5	17.4	1.9	0.5	JHOC-6	117.4	34.3	19.8	2.6	0.3	JHOC-6	40.0	8.4	5.9	0.9	1.1
SKOV3	35.9	0.7	0.5	0.7	0.2	SKOV3	43.8	5.5	3.2	0.8	0.1	SKOV3	3.9	5.5	3.9	0.1	0.1
CAOV3	20.7	1.5	1.0	0.2	0.1	CAOV3	27.5	8.1	4.7	0.3	0.0	CAOV3	3.9	1.6	1.2	0.0	0.0
A4						A5						A6					
N1	0.1	0.0	0.0	26.2		N1	0.5	1.0	0.6	0.5		N1	9.3	3.2	1.9	1.3	
N3	0.0	0.0	0.0	6.7		N3	0.8	2.7	1.5	0.8		N3	17.7	4.6	2.7	1.6	
ES-2	2.0	1.1	1.6	33.1	1.3	ES-2	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1	ES-2	11.3	3.5	2.0	0.1	0.1
SMOV2	1.4	1.8	1.1	13.9	0.5	SMOV2	0.3	3.8	2.2	0.3	0.3	SMOV2	4.7	1.4	0.8	0.1	0.0
JHOC-6	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	JHOC-6	0.6	7.2	4.2	0.6	0.8	JHOC-6	41.8	16.2	9.3	0.9	0.6
SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SKOV3	0.1	1.1	0.7	0.1	0.1	SKOV3	17.1	5.6	3.3	0.3	0.2
CAOV3	0.9	0.7	1.4	1.1	0.2	CAOV3	0.1	0.9	0.5	0.1	0.1	CAOV3	22.7	13.1	7.6	0.3	0.2
A7						A9						A10					
N1	23.5	5.2	3.7	3.2		N1	11.1	0.4	0.3	1.5		N1	1.2	2.1	1.2	0.2	
N3	81.2	1.0	0.7	7.1		N3	24.0	0.8	0.6	2.1		N3	4.5	4.0	2.3	0.4	
ES-2	507.8	76.3	54.1	5.1	0.7	ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	ES-2	347.3	128.9	74.5	3.5	
SMOV2	9.8	2.5	1.7	0.1	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JHOC-6	181.7	39.4	42.1	4.0	0.6	JHOC-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	JHOC-6	45.3	15.7	9.1	1.0	2.5
SKOV3	7.8	0.7	0.5	0.1	0.0	SKOV3	4.4	1.1	0.8	0.1	0.0	SKOV3	177.1	38.9	22.5	3.4	
CAOV3	888.4	27.9	19.6	10.6	1.5	CAOV3	6.6	9.4	6.6	0.1	0.0	CAOV3	310.6	119.5	69.1	3.7	
A11						A13						N1					
N1	9.0	1.7	1.2	1.2		N1	0.0	0.0	0.0			N1					
N3	14.9	6.2	4.4	1.3		N3	0.0	0.0	0.0			N3					
ES-2	3.6	0.4	0.3	0.0	0.0	ES-2	20.6	1.5	0.8	0.2		ES-2					
SMOV2	2.3	0.8	0.4	0.0	0.0	SMOV2	8.8	2.9	1.6	0.1		SMOV2					
JHOC-6	1.0	0.1	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	30.2	3.6	2.1	0.7		JHOC-6					
SKOV3	0.8	0.5	0.3	0.0	0.0	SKOV3	286.9	35.0	20.5	5.5		SKOV3					
CAOV3	1.3	0.1	0.0	0.0	0.0	CAOV3	17.3	24.7	14.3	0.2		CAOV3					

*Three experiments were performed and average of the expression was calculated in each sample. In normal controls, difference of expression among each normal samples was demonstrated within 3 folds. Thus, overexpression (3 to 5 folds) is illustrated in pink, and (5 folds or more) in red.

Expression profile of HOX B genes

B2						B3						B4							
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		
N1	4.8	0.3	0.2	1.8		N1	1.3	0.3	0.1	0.5		N1	0.0	0.0	0.0	0.0			
N3	11.2	0.3	0.2	2.5		N3	3.2	0.3	0.2	0.7		N3	0.0	0.0	0.0	0.0			
N4	10.4	0.5	0.3	2.0		N4	3.9	0.8	0.5	0.8		N4	0.4	0.6	0.4	0.1			
ES-2	165.2	97.6	56.4	8.6		ES-2	20.2	3.5	2.0	1.1	1.4	2.2	ES-2	35.3	8.7	5.0	1.8		
SMOV2	4.9	1.2	0.7	0.2	0.1	0.1	SMOV2	16.1	1.5	0.8	0.7	0.9	1.4	SMOV2	67.8	18.7	10.8	2.8	
JHOC-6	1.8	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	3.3	1.8	1.0	0.2	0.2	0.3	JHOC-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SKOV3	359.2	177.2	102.5	19.2		SKOV3	81.5	6.7	3.8	4.4			SKOV3	99.9	26.0	15.0	5.3		
CAOV3	41.7	4.6	2.6	1.8	0.7	1.0	CAOV3	19.0	9.5	5.5	0.8	1.0	1.7	CAOV3	21.4	3.8	2.2	0.9	
B5						B6						B7							
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		
N1	1.3	0.4	0.2	0.5		N1	6.5	0.7	0.4	2.4		N1	0.0	0.0	0.0	0.0			
N3	5.2	0.7	0.4	1.1		N3	11.2	1.6	0.9	2.5		N3	0.0	0.0	0.0	0.0			
N4	4.2	0.1	0.0	0.8		N4	8.8	3.8	2.2	1.7		N4	0.0	0.0	0.0	0.0			
ES-2	11.3	0.2	0.1	0.6	0.5	1.2	ES-2	28.5	9.8	5.7	1.5	0.6	0.9	ES-2	6.7	6.7	4.6	0.3	
SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	6.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	SMOV2	3.6	3.6	2.4	0.2	
JHOC-6	19.6	5.1	3.0	1.0	0.9	2.0	JHOC-6	48.3	4.6	2.7	2.4	1.0	1.4	JHOC-6	3.1	3.1	2.0	0.2	
SKOV3	228.5	3.2	1.8	12.2			SKOV3	385.4	33.0	19.0	20.6			SKOV3	22.6	22.6	14.7	1.2	
CAOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	CAOV3	6.5	4.7	2.7	0.3	0.1	0.2	CAOV3	6.5	6.5	4.3	0.3	
B8						B9						B13							
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		
N1	2.0	1.2	0.7	0.7		N1	2.5	0.3	0.2	0.9		N1	0.0	0.0	0.0	0.0			
N3	4.0	1.9	1.1	0.9		N3	7.8	2.0	1.1	1.7		N3	0.0	0.0	0.0	0.0			
N4	3.2	0.6	0.4	0.6		N4	6.2	1.5	0.9	1.2		N4	0.0	0.0	0.0	0.0			
ES-2	17.8	9.5	5.5	0.9	1.0	1.5	ES-2	140.4	37.9	21.9	7.3			ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0	
SMOV2	2.0	0.6	0.3	0.1	0.1	0.1	SMOV2	38.1	5.1	2.9	1.6	0.9	1.7	SMOV2	0.5	0.9	0.5	0.0	
JHOC-6	47.4	8.0	4.6	2.4	2.7		JHOC-6	78.5	26.1	15.1	4.0	2.3		JHOC-6	42.4	17.1	9.9	2.1	
SKOV3	667.8	202.6	117.1	35.7			SKOV3	148.4	36.8	21.3	7.9			SKOV3	213.7	65.4	37.8	11.4	
CAOV3	7.2	3.6	2.1	0.3	0.3	0.3	CAOV3	97.2	34.3	19.8	4.1	2.4		CAOV3	255.8	119.7	69.2	10.7	

Expression profile of HOX C genes

C4						C5						C6								
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max			
N1	52.4	5.3	3.7	7.1		N1	13.1	2.9	1.7	1.8		N1	7196.6	884.7	511.4	968.2				
N3	60.0	11.0	7.8	5.3		N3	9.7	2.6	1.5	0.9		N3	7399.8	314.2	181.6	650.6				
N4	47.5	11.5	8.2	5.6		N4	15.0	4.7	2.7	1.8		N4	5921.7	1466.2	847.5	701.1				
ES-2	95.5	17.6	12.5	1.0	0.1	0.2	ES-2	52.4	3.6	2.1	0.5	0.3	0.6	ES-2	8370.2	1441.8	833.4	84.8	0.1	0.1
SMOV2	3.3	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	SMOV2	0.4	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	SMOV2	12.4	21.5	12.4	0.1	0.0	0.0
JHOC-6	4.4	0.8	0.5	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	0.4	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	JHOC-6	722.8	28.1	16.2	15.8	0.0	0.0
SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SKOV3	0.7	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	SKOV3	99.9	96.1	55.5	1.9	0.0	0.0
CAOV3	14.9	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	CAOV3	13.6	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	CAOV3	20584.1	4158.2	2403.6	246.6	0.3	0.4
C8						C10						C11								
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max			
N1	0.0			0.0		N1	46.5	4.5	2.6	6.3		N1	54.7	11.0	6.4	7.4				
N3	1.6			0.1		N3	127.7	22.5	13	11.2		N3	125.0	41.7	24.1	11.0				
N4	0.0			0.0		N4	68.9	9.4	5.4	8.2		N4	75.7	11.9	6.9	9.0				
ES-2	5.2			0.6		ES-2	51.4	11.2	6.5	0.5	0	0.1	ES-2	29.1	2.7	1.5	0.3	0.0	0.0	
SMOV2	11.4			0.1	1.0	SMOV2	6.9	0.6	0.4	0.1	0	0	SMOV2	14.3	1.8	1.1	0.2	0.0	0.0	
JHOC-6	11.2			0.1	1.0	JHOC-6	117.1	16.3	9.4	2.6	0.2	0.4	JHOC-6	10.2	5.5	3.2	0.2	0.0	0.0	
SKOV3	0.0			0.0	0.0	0.0	SKOV3	1.1	0.4	0.2	0	0	0	SKOV3	3.0	2.2	1.2	0.1	0.0	0.0
CAOV3	0.0			0.0	0.0	0.0	CAOV3	670.7	114.7	66.3	8	0.7	1.3	CAOV3	71.8	6.1	3.5	0.9	0.1	0.1
C12						C13														
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max									
N1	54.0	2.5	1.5	7.3		N1	0.6	1.0	0.6	0.1										
N3	167.0	37.7	21.8	14.7		N3	0.0	0.0	0.0	0.0										
N4	96.0	8.6	5.0	11.4		N4	0.0	0.0	0.0	0.0										
ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	ES-2	1.8	2.6	1.5	0.0	0.2								
SMOV2	12.3	5.5	3.2	0.1	0.0	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0								
JHOC-6	2.6	1.2	0.7	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	1.6	1.5	0.9	0.0	0.4								
SKOV3	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	SKOV3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0								
CAOV3	9.3	2.4	1.4	0.1	0.0	0.0	CAOV3	8.3	7.7	4.5	0.1	1.2								

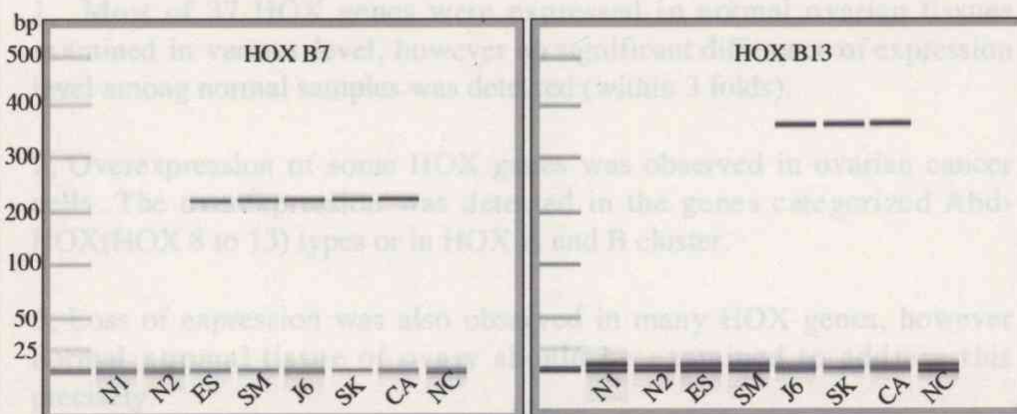
Expression profile of HOX D genes

D1							D3							D4						
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	11.3	3.8	2.2	1.5			N1	47.2	13.2	7.6	6.4			N1	32.0	9.5	5.5	4.3		
N3	22.0	1.8	1.0	1.9			N3	37.4	26.5	15.3	3.3			N3	68.6	1.9	1.1	6.0		
ES-2	1.7	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	ES-2	113.2	56.6	32.7	1.1	0.2	0.3	ES-2	78.6	24.5	14.2	0.8	0.1	0.2
SMOV2	2.7	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	SMOV2	7.6	3.8	2.2	0.1	0.0	0.0	SMOV2	13.9	5.4	3.1	0.2	0.0	0.0
JHOC-6	3.5	1.0	0.6	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	14.2	8.0	4.6	0.3	0.0	0.1	JHOC-6	10.5	8.8	5.1	0.2	0.0	0.1
SKOV3	13.4	2.5	1.4	0.3	0.1	0.2	SKOV3	70.6	39.2	22.6	1.3	0.2	0.4	SKOV3	20.4	4.5	2.6	0.4	0.1	0.1
CAOV3	14.9	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	CAOV3	147.9	54.2	31.3	1.8	0.3	0.5	CAOV3	32.1	14.5	8.4	0.4	0.1	0.1

D8							D9							D10						
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	87.3	4.9	2.9	11.7			N1	5.9	0.8	0.5	0.8			N1	31.8	17.3	10.0	4.3		
N3	152.1	26.3	15.2	13.4			N3	5.5	2.8	1.6	0.5			N3	77.8	14.6	8.5	6.8		
ES-2	159.2	11.1	6.4	1.6	0.1	0.1	ES-2	12.1	1.1	0.6	0.1	0.2	0.3	ES-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SMOV2	17.0	3.4	2.0	0.2	0.0	0.0	SMOV2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	1.8	3.2	1.8	0.0	0.0	0.0
JHOC-6	293.9	56.6	32.7	6.4	0.5	0.5	JHOC-6	17.6	6.9	4.0	0.4	0.5	0.8	JHOC-6	1.4	2.4	1.4	0.0	0.0	0.0
SKOV3	468.5	24.7	14.3	8.9	0.7	0.8	SKOV3	24.4	5.3	3.0	0.5	0.6	1.0	SKOV3	1.4	2.4	1.4	0.0	0.0	0.0
CAOV3	135.0	6.5	3.7	1.6	0.1	0.1	CAOV3	6.5	0.5	0.3	0.1	0.1	0.2	CAOV3	11.3	5.1	3.0	0.1	0.0	0.0

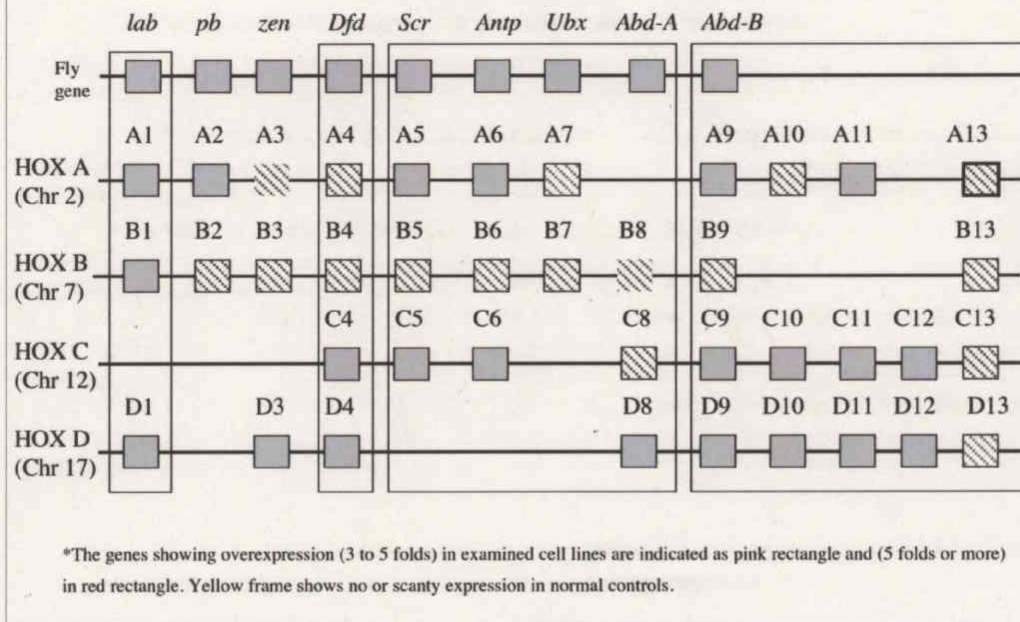
D11							D12							D13						
Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max		Average	SD	SEM	Ave/beta	min	max	
N1	9.3	2.0	1.2	1.3			N1	39.4	14.6	8.4	5.3			N1	5.3	1.5	0.9	0.7		
N3	32.2	4.0	2.3	2.8			N3	156.8	67.3	38.9	13.8			N3	18.8	4.8	2.8	1.7		
ES-2	0.7	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	ES-2	2.2	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	ES-2	72.4	15.2	8.8	0.7	0.4	1.0
SMOV2	2.9	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	SMOV2	8.7	5.8	3.3	0.1	0.0	0.0	SMOV2	12.9	1.2	0.7	0.1	0.1	0.2
JHOC-6	0.8	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	JHOC-6	2.8	0.8	0.5	0.1	0.0	0.0	JHOC-6	2.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1
SKOV3	6.3	0.5	0.3	0.1	0.0	0.1	SKOV3	2.0	1.1	0.6	0.0	0.0	0.0	SKOV3	222.8	33.4	19.3	4.3	2.6	3.9
CAOV3	11.5	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1	CAOV3	1.2	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	CAOV3	3.8	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1

Schematic representation of HOX overexpression in ovarian cancer



* Normal controls : N1, N2
 Cell lines : ES:ES-2, SM:SMOV-2, J6:JHOC-6, SK:SKOV-3, CA:CAOV-3
 Negative control : NC

Overexpression of HOX gene



Conclusions

- 1, Most of 37 HOX genes were expressed in normal ovarian tissues examined in various level, however no significant difference of expression level among normal samples was detected (within 3 folds).
- 2, Overexpression of some HOX genes was observed in ovarian cancer cells. The overexpression was detected in the genes categorized Abd-HOX(HOX 8 to 13) types or in HOX A and B cluster.
- 3, Loss of expression was also observed in many HOX genes, however normal stromal tissue of ovary should be examined to address this precisely.
- 3, The overexpressed HOX genes that are not expressed in normal controls may be associated with the development or invasion/metastasis of ovarian cancer.