

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	山脇 芳
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第762号
学位授与の日付	平成29年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. (Sox2によるp21抑制機構は子宮体がんの予後不良因子となる)
論文審査委員	主査 教授 近藤 英作 副査 教授 藤井 雅寛 副査 教授 榎本 隆之

博士論文の要旨

【背景と目的】 子宮体がんは婦人科がんの中でも最も頻度の高いがんのひとつである。その多くは初期に発見され根治が得られるものの、進行期に発見された場合は有効な治療法に乏しく、予後は不良である。したがって、難治子宮体がんの増殖メカニズムや治療標的の解明は喫緊の課題である。Sox2とはES細胞の自己複製や分化多能性に関与している、多能性幹細胞因子の1つである。近年様々ながん種においても発がん因子としての役割が報告されているものの、子宮体がんにおけるSox2の役割は未だ明らかではない。今回、申請者らはSox2が子宮体がんの治療標的や予後予測マーカーになりうるかを明らかにするため、主に分子生物学的手法により詳細な検討を行った。

【方法】 第一に当院で初回手術を行った子宮体部類内膜腺がん258例に対して、Sox2の免疫組織染色を行い、組織学的分化度および臨床予後との相関を統計学的に検討した。p21, p53, Ki-67についても同一症例で免疫組織染色を行い、Sox2発現との相関や予後との関連を検討した。次に、子宮体がん細胞株10株 (HEC1, HEC1A, HEC50B, JHUEM3, JHUEM7, AN3CA, EN, Ishikawa[t1]) に対して、Western blotting (以下WB)法によるタンパク発現解析、real-time PCR法[t2]によるmRNA発現解析、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、クロマチン免疫沈降にて、子宮体がん細胞におけるSox2の機能と標的因子を検討した。さらに、免疫不全マウスを用いてSox2の造腫瘍能への影響を評価した。

【結果】 子宮体部類内膜腺がん症例の免疫組織染色の結果、組織学的分化度が低く悪性度が高いほどSox2発現頻度が高く、Sox2発現と組織学的分化度に有意な相関がみられた ($p < 0.0001$)。さらに、Sox2陽性例とSox2陰性例で生存解析をおこなった所、進行症例では全生存期間および無増悪生存期間ともにSox2陽性例で短く ($p = 0.0307$, $p = 0.0027$)、多変量解析でSox2は独立予後因子であった。

子宮体がん細胞株10株におけるSox2タンパク発現をWB法で、mRNA発現をreal-time PCR法で解析したところ、HEC59, JHUEM7, ENの3株でSox2発現を認めた。次に、siRNAによるSox2発現抑制をSox2陽性3株に対して行くと、いずれも有意な細胞増殖抑制が認められた。また、細胞周期解析から、Sox2発現抑制に伴うG1期細胞の増加が認められ、同時に細胞老化マーカーであるSA- β -GALの増加が確認された。さ

らに、免疫組織染色における Sox2 陽性症例において Ki-67 陽性例が有意に多い ($p < 0.0001$) ことが明らかになった。以上の結果より、Sox2 は子宮体がん細胞の細胞増殖と細胞周期調整に寄与していることが明らかになった。

さらに、HEC59, EN の 2 株に対し、siRNA による Sox2 発現抑制時の細胞周期関連タンパクの変化を WB 法で検討したところ、p21 の顕著な発現上昇が認められた。p21 は細胞周期抑制性タンパクであり、その上昇は細胞周期の停止と細胞老化をきたしうするため、これまでの結果と矛盾しないと考えられた。免疫組織染色の評価では、p21 の代表的な制御因子である p53 と Sox2 には有意な相関は認めず、Sox2 による p21 の制御は p53 とは独立した機構であると考えられた。次に Sox2 が p21 を直接的に結合し制御しているかを明らかにするため、同 2 株でクロマチン免疫沈降を行い評価したところ、Sox2 と p21 (CDKN1A) プロモーター領域との間に直接的結合が認められた。以上の結果より、Sox2 は子宮体がん細胞の増殖に寄与し、p21 が Sox2 の直接的な標的因子のひとつであることが明らかになった。

Sox2 の造腫瘍能への影響を評価するために、siRNA で Sox2 発現を抑制した細胞 (EN) を免疫不全マウスに皮下移植したところ、Sox2 発現を抑制した細胞では著しく腫瘍形成が抑制され、Sox2 が子宮体がんの造腫瘍能にも寄与していることが明らかになった。

最後に Sox2 と p21 の免疫組織染色の結果を Sox2 発現および p21 発現で 4 群に分け全生存期間を比較検討すると、Sox2 陽性かつ p21 陰性の群が最も予後不良であった。また Sox2 陽性かつ p21 陰性の群とそれ以外の 2 群で分け比較検討した結果も同様に有意に予後不良である事が明らかになった。

【結論】 *in vitro* および *in vivo* の解析により、p21 は Sox2 の直接標的因子であり、Sox2 は子宮体がん細胞の増殖、細胞周期調整、造腫瘍能に寄与していることが明らかになった。さらに、Sox2 および Sox2/p21 の発現評価は臨床的な予後予測に有用であると考えられた。

審査結果の要旨

(目的) 難治子宮体がんの増殖メカニズムや治療標的の解明は喫緊の課題である。今回、申請者らは未だ明らかでない子宮体がんにおける Sox2 の役割について解析し、Sox2 が子宮体がんの治療標的や予後予測マーカーになりうるかを明らかにするため、主に分子生物学的手法により詳細な検討を行った。

(方法) 当院で初回手術を行った子宮体部類内膜腺がん 258 例に対して、Sox2 の免疫組織染色を p21, p53, Ki-67 の発現と併せて行い、Sox2 の組織学的分化度および臨床予後との相関を統計学的に検討した。次に、子宮体がん細胞株 10 株においてタンパク発現解析、mRNA 発現解析、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、クロマチン免疫沈降にて、Sox2 の機能と標的因子を検討した。さらに、免疫不全マウスを用いて Sox2 の造腫瘍能への影響を評価した。

(結果)

子宮体部類内膜腺がん症例の免疫組織染色の結果、組織学的分化度が低く悪性度が高いほど Sox2 発現頻度が高く、Sox2 発現と組織学的分化度に有意な相関がみられた ($p < 0.0001$)。さらに、Sox2 陽性例と Sox2 陰性例で生存解析をおこなった所、進行症例では全生存期間および無増悪生存期間ともに Sox2 陽性例で短く ($p = 0.0307$, $p = 0.0027$)、多変量解析で Sox2 は独立予後因子であった。子宮体がん細胞株 10 株における Sox2 タンパク発現を WB 法で、mRNA 発現を real-time PCR 法で解析したところ、HEC59, JHUEM7, EN の 3 株で Sox2 発現を認めた。次に、siRNA による Sox2 発現抑制を Sox2 陽性 3 株に対して行くと、いずれも有意な細胞増殖抑制が認められた。また、細胞周期解析から、Sox2 発現抑制に伴う G1 期細胞の増加が認めら

れ、同時に細胞老化マーカーである SA-β-GAL の増加が確認された。さらに、免疫組織染色における Sox2 陽性症例において Ki-67 陽性例が有意に多い ($p < 0.0001$) ことが明らかになった。

また、HEC59, EN の 2 株に対し、siRNA による Sox2 発現抑制時の細胞周期関連タンパクの変化を WB 法で検討したところ、p21 の顕著な発現上昇が認められた。さらに ChipSeq 解析で Sox2 と p21 (CDKN1A) プロモーター領域との間に直接的結合が認められた。siRNA で Sox2 発現を抑制した細胞 (EN) を免疫不全マウスに皮下移植したところ、Sox2 発現を抑制した細胞では著しく腫瘍形成が抑制され、Sox2 が子宮体がんの造腫瘍能にも寄与していることが明らかになった。最後に Sox2 と p21 の免疫組織染色の結果を Sox2 発現および p21 発現で 4 群に分け全生存期間を比較検討すると、Sox2 陽性かつ p21 陰性の群が最も予後不良であった。また Sox2 陽性かつ p21 陰性の群とそれ以外の 2 群で分け比較検討した結果も同様に有意に予後不良である事が明らかになった。

(考察)

1. Sox2 は統計学的解析の結果、子宮内膜癌の独立予後因子であった。
2. Sox2 は子宮体がん細胞の細胞増殖と細胞周期調整に寄与していることが明らかになった。
3. Sox2 は子宮体がん細胞の増殖に寄与し、p21 が Sox2 の直接的な標的因子のひとつであることが明らかになった。
4. Sox2 が子宮体がんの造腫瘍能にも寄与していることが明らかになった。

(結論)

in vitro および in vivo の解析により、p21 は Sox2 の直接標的因子であり、Sox2 は子宮体がん細胞の増殖、細胞周期調整、造腫瘍能に寄与していることが明らかになった。さらに、Sox2 および Sox2/p21 の発現評価は臨床的な予後予測に有用であると考えられた。

(審査における当該論文の評価)

当学術論文では、子宮内膜癌 (類内膜腺癌) において機能不明であった Sox2 遺伝子発現の臨床学的・生物学的意義の基盤 (患者予後との相関、内膜腺癌細胞の p21 を介する細胞周期への関与による増殖促進、p21 promotor 領域への結合による制御反応様式) をある程度解明している。当研究成果は本邦における第一線のがん医学研究国際誌に掲載され、また、当学術論文は将来的な患者医療現場への応用・実用についての可能性を持つ研究成果であることが期待された。よって学位論文としての価値を認める。