

## 主論文の要旨

**Expression of chromobox homolog 7 (CBX7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation**

Chromobox homolog 7 (CBX7)の発現は卵巣明細胞腺癌の予後不良因子であり、それはTRAILが誘導するアポトーシス経路の制御を介している

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 生殖器腫瘍制御学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

新城 加奈子

## 【緒言】

上皮性卵巣癌は4つの組織型に分類されるが、その中でも明細胞腺癌は他の組織型に比べ化学療法に抵抗性を示すものも多く、予後不良である。また、日本では上皮性卵巣癌のうち20%を占める組織型であり、欧米の発生頻度より高いのが特徴である。よって卵巣明細胞腺癌の病態解明は重要であると考えられる。

CBX7はpolycomb repressive complex 1 (PRC1)の構成因子の一つであり、遺伝子の転写制御に関わっている。また、最近 INK4a/ARF locus の non-coding RNA である CDKN2B-AS (ANRIL)が CBX7 と共同して INK4a/ARF locus の発現を制御しているとの報告があった。さらに、子宮内膜症を有する日本人女性のゲノム解析で ANRIL のイントロンの SNP が子宮内膜症と強い関連があると報告があった。卵巣明細胞腺癌の発症に子宮内膜症が深く関わっていることは以前から言われており、CBX7 と ANRIL は卵巣明細胞腺癌の発症に関わっているのではないかと考えた。しかし、CBX7は INK4a/ARF locus や cyclinE1 などの相反する機能の遺伝子の転写を制御するとの報告がある。また、癌腫によって予後因子としての報告が異なっている。そこで、我々は卵巣明細胞腺癌における CBX7 の役割を検討した。

## 【方法】

### ①卵巣明細胞腺癌での CBX7 と ANRIL の発現確認

卵巣明細胞腺癌細胞株である KOC7C, TOV-21G, JHOC-5, JHOC-7, JHOC-8, JHOC-9 と、卵巣明細胞腺癌の手術時に採取した組織における CBX7 と ANRIL の発現を定量 PCR、western-blotting 法、RNA-FISH、蛍光免疫染色を用いて確認した。Negative control としてヒト子宮内膜上皮細胞株、positive control として前立腺癌細胞株の PC3 を使用した。

### ②卵巣明細胞腺癌組織で CBX7 の発現と患者の予後との相関解析

1986～2009年に当施設で手術を行った81例の卵巣明細胞腺癌患者の手術時に採取した組織を用い、CBX7の免疫染色を行った。10%以上の癌細胞で核が染色されている場合を陽性と判定した。Kaplan-Meier法を用いて、生存率解析を行った。

### ③CBX7 をノックダウンした卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた機能解析

CBX7に対する2つの siRNA (siCBX7-1, siCBX7-2) とネガティブコントロールの siRNA (siNC)を卵巣明細胞腺癌細胞株である KOC7C, TOV21G にリポフェクション法で導入した。それらを用い、MTS assay, migration assay, invasion assay, FACS を用いた cell cycle analysis を行った。

### ④CBX7 ノックダウン株とコントロール株での遺伝子発現比較解析

SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarray (Agilent Technologies) を使用し、マクロアレイ法で、CBX7 ノックダウン株とコントロール株の mRNA 発現レベルの比較を行った。データの解析には GeneSpring GX11.05.1 を使用した。

### ⑤CBX7 ノックダウン株を用いたアポトーシス解析

CBX7 に対する siRNA 導入した KOC7C, TOV21G とコントロール株を用いて

TNFSF10 の mRNA の発現を定量 PCR で確認し、Cleaved PARP の発現を Western-blotting 法で確認、TUNEL assay, cell cycle analysis を行った。

## 【結果】

①卵巣明細胞腺癌では CBX7 と ANRIL の発現を認めた。

CBX7 は卵巣明細胞腺癌の細胞株で mRNA, タンパクレベルで発現が見られた。また、卵巣明細胞腺癌の組織検体でもタンパクレベルで発現が見られた。卵巣明細胞腺癌の細胞株で ANRIL の発現を認めた(Figure1a-c)。ANRIL と CBX7 は細胞の核で発現があることを RNA-FISH と蛍光免疫染色で確認した。(Figure1d)

卵巣明細胞腺癌の手術検体 81 例で CBX7 の免疫染色を行った。CBX7 は癌細胞の核で発現が見られた(Figure1f,g)。81 例中 64 例(79%)が CBX7 陽性で、17 例(21%)が CBX7 陰性であった。

②卵巣明細胞腺癌において CBX7 の発現は予後不良因子である。(Table1, Figure2)

多変量解析を用いて、患者の臨床因子を解析したが、患者の年齢、FIGO stage, 治療開始前の CA125, 治療時期、CBX7 陽性の中で、FIGO stage(II-IV vs I)のみが OS, PFS と関連があった。

Kaplan-Meier 法を用いた解析から、CBX7 陽性群は陰性群に比べ、OS, PFS ともに有意に低かった。また、FIGO 分類の stage I では有意差はなかったが、stage II - IV では CBX7 陽性群は陰性群に比べ、OS, PFS ともに有意に低かった。

③CBX7 をノックダウンすると細胞の生存性が低下した。(Figure3)

MTS assay で、CBX7 ノックダウン株はコントロール株に比べ有意に細胞の生存性が低下した。CBX7 のノックダウンは浸潤能、遊走能に影響はしなかった。CBX7 ノックダウン株では、おおむね G0/G1 arrest を起こしており、p16 の発現が増加していた。

④CBX7 ノックダウン株ではアポトーシス関連の遺伝子の発現が増加していた。(Figure4)

CBX7 ノックダウン株とコントロール株の遺伝子発現比較から 8 倍、 $p > 0.05$  をカットオフとして、CBX7 ノックダウン株で発現増加した 35 遺伝子を抽出した。Pathway analysis から CBX7 がアポトーシス関連遺伝子、炎症関連遺伝子を down-regulation していることが示唆された。その中でも、特に我々は TNFSF10 (tumor necrosis factor superfamily 10 member)に注目をした。

⑤CBX7 をノックダウンすることでアポトーシスが誘導された (Figure5)

定量 PCR の結果、CBX7 ノックダウン株ではコントロール株に比べ、TNFSF10 の mRNA の発現が有意に上昇していた。

CBX7 ノックダウン株ではコントロール株に比べ、Cleaved PARP タンパクの上昇を認め、TUNEL 法でアポトーシス細胞の有意な増加を認め、cell cycle analysis では subG1 phase の細胞の割合が増加を認めた。

## 【考察】

我々は、CBX7 の発現が卵巣明細胞腺癌の予後不良に関連していると初めて証明した。

CBX7 は Polycomb Group (PcG) proteins の一つであり、EZH2 や BMI1 などの PcG proteins は癌の進行に強い関連があるとすでに知られている。CBX7 は follicular lymphoma の進行に強い関連があると報告されている。しかし、甲状腺癌では E-cadherin の発現を促進し、tumor suppressor として働くと報告された。CBX7 は癌種によって違う役割を持つと考えられる。本研究では、卵巣明細胞腺癌において CBX7 は腫瘍促進的に働くという結果であった。

CBX7 を含む PRC1 は ANRIL と協同して、INK4a/ARF locus の転写を抑制し、p16, p14ARF の発現を低下させていると前立腺癌細胞を用いた研究で報告されている。我々も CBX7 ノックダウンすることで、CDKN2A の発現上昇、G0/G1 arrest を確認したが、一部のノックダウン株で有意な結果が得られなかった。そこで、我々は、CBX7 は他の遺伝子の抑制にも関わっているのではないかと考えた。

マイクロアレイの結果から、CBX7 によって抑制されている可能性のある遺伝子の pathway analysis を行い、TNFSF10 に注目をした。TNFSF10 は TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) として知られている。TRAIL は TRAIL-R1, TRAIL-R2 と結合し、caspase-8, caspase-3 を活性化するトリガーになる。我々は、CBX7 をノックダウンすることでアポトーシスが誘導されることを確認した。CBX7 は TRAIL やアポトーシス関連因子の発現調節に関わっている可能性を示唆した。TRAIL は癌細胞において、重要なアポトーシス誘導因子であり、TRAIL や TRAIL receptor に対するアゴニストが新たな抗腫瘍薬として期待されている。最近、TRAIL アゴニストに対する耐性を示す癌も認められており、癌種によって TRAIL pathway の関与が異なっていることを示唆する。卵巣明細胞腺癌では CBX7 は TRAIL の発現調節に関わっており、TRAIL pathway をターゲットとする抗腫瘍薬は卵巣明細胞腺癌に有効かもしれない。

## 【結論】

CBX7 の発現は卵巣明細胞腺癌の予後不良因子である。また、CBX7 のノックダウンは TRAIL-pathway を介したアポトーシスを誘導する。