

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09099

研究課題名（和文）消化管癌に対するANXA1を用いた抗がん剤耐性出現モニタリング

研究課題名（英文）Emergence of anticancer drug resistance of ANXA1 for gastrointestinal tract cancers

研究代表者

小野澤 寿志（ONOZAWA, Hisashi）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50622338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アネキシンはCa²⁺/リン脂質結合タンパク質であり、p53と共同して様々ながんの発生・進展・転移に関連する。そのアネキシン遺伝子群の一つであるアネキシンA1の発現上昇が抗がん剤耐性をもたらすことを明らかにした。乳癌においてアネキシンA1はARID1A遺伝子失活型変異に伴って発現が誘導されることから、消化器癌細胞株（胃癌）でもその相関を調べたが、この細胞実験や胃癌手術切除検体においてアネキシンA1とARID1A発現の相関は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アネキシンA1の高発現が抗がん剤耐性をもたらすことから、抗がん剤の治療を長く継続できるためにはアネキシンA1が発現誘導されないほうが良い。そのため、アネキシンA1の発現を誘導する上流の因子であるARID1Aとの関連の解明を試みた。その理由は、乳癌でARID1A遺伝子の失活型変異がアネキシンA1の発現を誘導するためである。胃癌細胞株でARID1Aをノックダウンすると、目的としたアネキシンA1は発現誘導されず、他のアネキシンA6などが発現誘導されていた。本研究ではアネキシンA1は抗がん剤の耐性に寄与するが、その経路を明らかにすることはできなかったため、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The family of Annexin is Ca²⁺/phospholipid-binding proteins that corporates with p53 on cancer development, progression, and metastasis. We found that elevated expression of Annexin A1, one of the annexin gene family, confers resistance to anticancer drugs. Because Annexin A1 expression is induced by ARID1A gene truncating mutations in breast cancer, we investigated the expression of both Annexin A1 and ARID1A to confirm their correlations in gastrointestinal cancer cells (gastric cancer). In addition, we performed immunohistochemical staining for Annexin A1 and ARID1a in surgically resected gastric cancer specimens. However, no correlation between Annexin A1 and ARID1A expressions was observed in cell experiment and gastric cancer tumor.

研究分野：消化器外科学

キーワード：消化器癌 ANXA1 抗がん剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

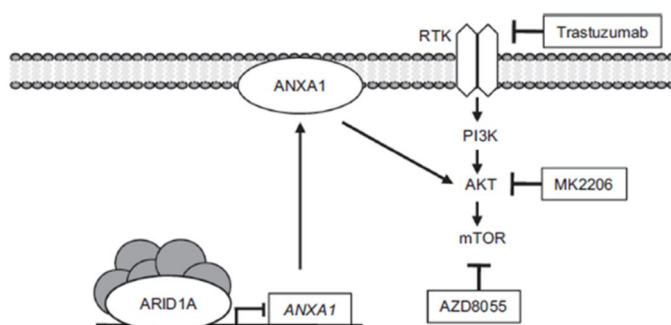
1. 研究開始当初の背景

化学療法に対する獲得耐性の評価：

近年、個別化療法が急速に進歩し標準治療として行われるようになってきた。例えば胃癌の HER2 増幅に対する特異的なチロシンキナーゼ阻害剤 (Trastuzumab) の効果は非常に高く、HER2 陽性胃癌の 1 次治療として選択することが推奨されている。しかしながら、治療標となる遺伝子異常を欠く腫瘍に対しては従来の殺細胞性の抗癌剤が用いられる。その際、治療効果の測定は測定可能病変の画像評価 (CT や PET) や腫瘍マーカー (CEA や CA19-9) が用いられるのが一般的であるが、抗癌剤に対する耐性の出現を評価することは一般的に行われていない。そのため、耐性獲得の評価を治療経過中に評価することができれば、最適なタイミングでの薬剤変更が可能となり治療効果を最大限得られる可能性がある。

ANXA 発現と治療効果の評価：

アネキシンは Ca²⁺/リン脂質結合タンパク質であり、p53 と共同して様々ながんの発生・進展・転移に関連すると多くの報告がある。また、消化器癌においては、特に疾患の予後不良性と相関することから、予後予測のバイオマーカーとしての有用性もある。しかしながら、アネキシンの発現制御を司る経路の解明は未だ十分ではなく、乳癌研究において、HER2 陽性胃癌における ARID1A 欠損が ANXA1 の発現上昇をもたらして



AKT 経路を活性化する (Berns, et al. Clin Cancer Res. 2016) という研究が報告されている。

抗癌剤への耐性出現の評価の有用性：

抗癌剤は治療開始当初に腫瘍縮小効果がみられていたとしても、治療経過途中で必ず効果の減弱が認められるようになる。従って、耐性獲得の評価を治療経過中に評価することができれば、最適なタイミングで薬剤変更をおこなうことができる。そのため、ANXA1 発現が治療経過中に増減するか否か、またその発現が耐性獲得のバイオマーカーとして有用かどうかを検討することが本研究の 2 つ目の学術的な問いになる。

2. 研究の目的

上記背景の、
について消化器癌である胃癌と大腸癌細胞株を用いて検討する。ANXA1 と抗癌剤耐性についての検討に加え、ANXA1 と p53 との相互関連の検討、ANXA1 乳癌で ANXA1 の発現を制御する因子と報告された ARID1A との相互関連を明らかにする。

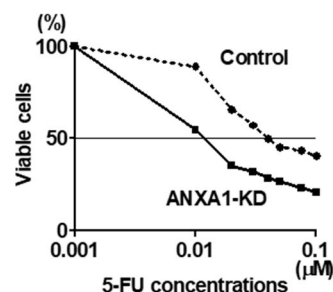
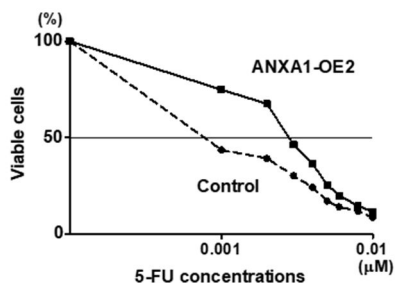
3. 研究の方法

ANXA1、p53、ARID1A の発現は胃癌切除検体の免疫組織染色法にて評価する。ANXA の上流に位置する ARID1A との相関については、ARID1A を細胞株にてノックダウンし、ネガティブコントロールの細胞株とともに、マイクロアレイ解析をおこない、ANXA1 を含むアネキシン遺伝子群の発現を検討する。

4. 研究成果

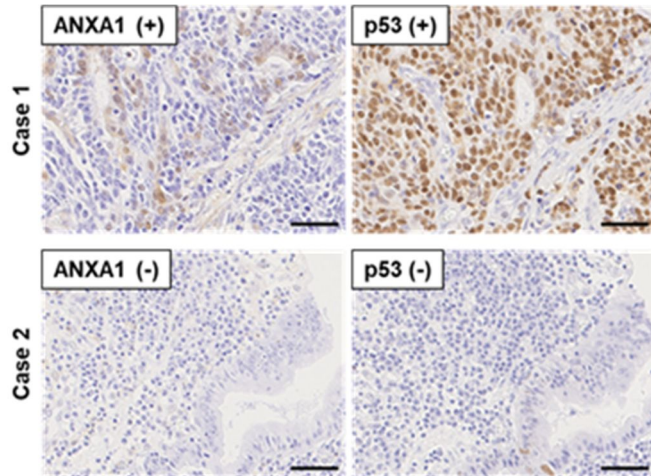
ANXA1 は抗癌剤耐性に
関与する：

癌細胞株において ANXA1 を高発現させたところ、癌治療のキードラッグである 5-FU への抵抗性の増大をもたらし、一方で、ANXA1 の低発現が 5-FU への抵抗性の減弱をもたらすことを報告した。



ANXA1 と p53 発現の検討：

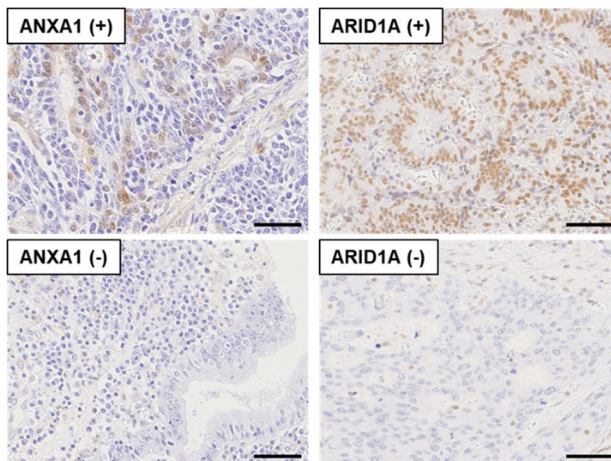
次に、当科において手術切除された胃癌検体 231 例において、ANXA 1 と p53 の発現を免疫染色法にて検討した。Case1 や Case2 のごとく、ANXA 1 と p53 は染色され、全症例の発現評価を陽性と陰性に分けておこなった。その結果、ANXA1 と p53 がともに発現陽性となるのが 64 例（28%）でともに発現陰性となるのが 78 例（34%）となり、ANXA1 と p53 タンパク発現は何らかの関連が示唆された。しかしながら、近年 TP53 遺伝子変異は、活性型遺伝子変異に加えて、失活型の遺伝子変異があることが明らかとなってきている。



従来の活性型遺伝子変異であれば TP53 は発現陽性となるのだが、失活型の変異の場合 TP53 染色が陰性となり、TP53 が野生型で染色陰性となっている例との区別がつかなくなる。そのため、免疫染色法にて p53 の発現を評価した場合は、TP53 の遺伝子変異と関連づけることが難しく、TP53 の機能の面と結びついた解析をすることが困難であり、今回の検討から結論を引き出すにはさらなる検討が必要であることが示唆された。

	Total (n=231)	p53		P value
		positive (n=109)	negative (n=122)	
ANXA1				
Positive	108	64 (59%)	44 (41%)	<0.001
Negative	123	45 (43%)	78 (57%)	

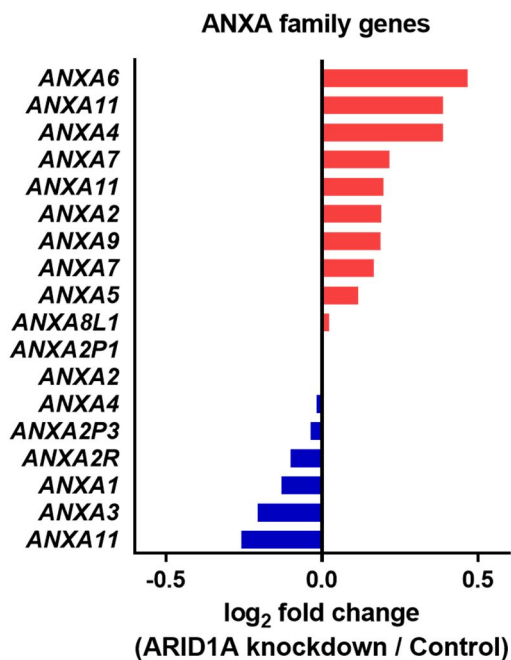
最後に、乳癌研究にて示唆された ANXA1 発現を促す ARID1A 遺伝子に着目した。ARID1A 遺伝子は多くのがんで変異をきたすが、特に卵巣癌や子宮体癌などでその変異が同定されている。また、ARID1A 遺伝子は胃癌のドライバー遺伝子の 1 つでもある。変異の特徴は、ドライバー遺伝子として失活型変異をきたすことであり、そのタンパク発現が消失するところである。そのため、免疫組織染色法を用いて、その発現の評価をおこなえば、発現陰性イコール失活型変異と考えて良いと思われる。



本研究では、上記 p53 研究で用いた胃癌切除検体に症例を追加し、独立した胃癌手術切除検体 200 例と 220 例群とした。これら両群に ARID1A 染色と ANXA1 追加染色をおこない、相関を検討した。しかしながら、この 2 群においては共に、ANXA1 と ARID1A の発現の相関は得られなかった (P=0.475 と P=0.080)。

	Test cohort (n=200)				Validation cohort (n=220)			
	Total	ARID1A		P value	Total	ARID1A		P value
		positive (n=161)	negative (n=39)			positive (n=180)	negative (n=40)	
ANXA1-no. (%)				0.475				0.080
positive	91	71 (44)	20 (51)		98	75 (43)	23 (58)	
negative	109	90 (56)	19 (49)		122	105 (57)	17 (42)	

次に、ARID1A は ANXA1 の上流に位置することが以前の研究で示されているので、癌細胞株にて ARID1A を siRNA を用いてノックダウンし、ANXA1 を含むアネキシン遺伝子群の発現の増減をマイクロアレイをもちいて解析した。その結果、ARID1A ノックダウンにて ANXA6、ANXA11、ANXA4 の発現が上昇する一方で、ANXA11 (別のプロローベ)、ANXA3、ANXA1 の発現はコントロール細胞と比べて減少した。今回は mRNA の解析のみでありタンパク発現の検討はしていないものの、胃癌細胞株では ARID1A の発現低下に伴って ANXA1 発現が誘導されるというよりは、発現が抑制される傾向があることがわかった。胃癌の臨床検体での解析でも ANXA1 と ARID1A の発現の相関はなかったことから、胃癌における ANXA1 と ARID1A の二つの因子の相関関係は乳癌と異なり弱いのだと推測された。もちろん、胃癌のなかでも HER2 陽性胃癌においては抗 HER2 阻害剤(トラスツズマブとエンハーツ)が高い治療効果をもたらすことから、この経路の重要性は高く、今後さらなる研究が必要と思われる。



消化管癌に対する ANXA1 を用いた抗がん剤耐性出現モニタリング

タイトル英語 : Emergence of anticancer drug resistance of ANXA1 for gastrointestinal tract cancers

概要 (200):

アネキシンは Ca²⁺/リン脂質結合タンパク質であり、p53 と共同して様々ながんの発生・進展・転移に関連する。そのアネキシン遺伝子群の一つであるアネキシン A1 の発現上昇が抗癌剤耐性をもたらすことを明らかにした。乳癌においてアネキシン A1 は ARID1A 遺伝子失活型変異に伴って発現が誘導されることから、消化器癌細胞株 (胃癌) でもその相関を調べたが、この細胞実験や胃癌手術切除検体においてアネキシン A1 と ARID1A 発現の相関は認められなかった。

概要英文 (<1000)

The family of Annexin is Ca²⁺/phospholipid-binding proteins that corporates with p53 on cancer development, progression, and metastasis. We found that elevated expression of Annexin A1, one of the annexin gene family, confers resistance to anticancer drugs. Because Annexin A1 expression is induced by ARID1A gene truncating mutations in breast cancer, we investigated the expression of both Annexin A1 and ARID1A to confirm their correlations in gastrointestinal cancer cells (gastric cancer). In addition, we performed immunohistochemical staining for Annexin A1 and ARID1a in surgically resected gastric cancer specimens. However, no correlation between Annexin A1 and ARID1A expressions was observed in cell experiment and gastric cancer tumor.

意義

癌においてアネキシン A1 の高発現が抗癌剤に対する耐性をもたらすことから、抗癌剤の治療を長く継続できるためにはアネキシン A1 が発現誘導されないほうが良い。そのため、アネキシン A1 の発現を誘導する上流の因子である ARID1A との関連の解明を試みた。理由として、乳癌では ARID1A 遺伝子の失活型変異がアネキシン A1 の発現を誘導するためである。胃癌細胞株を用いて ARID1A をノックダウンして、アネキシン遺伝子群の発現を検討したところ、目的としたアネキシン A1 は発現誘導されず、他のアネキシン A6 などが発現誘導されていた。本研究ではアネキシン A1 は抗癌剤の耐性に寄与するが、その経路を明らかにすることはできなかったので、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Yamada Leo, Saito Motonobu, Thar Min Aung Kyi, Saito Katsuharu, Ashizawa Mai, Kase Koji, Nakajima Shotaro, Onozawa Hisashi, Okayama Hirokazu, Endo Hisahito, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Mimura Kosaku, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 24
2. 論文標題 Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 60~71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-020-01094-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroshi, Saito Motonobu, Nakajima Shotaro, Saito Katsuharu, Nakayama Yuko, Kase Koji, Yamada Leo, Kanke Yasuyuki, Hanayama Hiroyuki, Onozawa Hisashi, Okayama Hirokazu, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Mimura Kosaku, Ohki Shinji, Goto Akiteru, Kono Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 PD-L1 overexpression in EBV-positive gastric cancer is caused by unique genomic or epigenomic mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81667-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kase Koji, Saito Motonobu, Nakajima Shotaro, Takayanagi Daisuke, Saito Katsuharu, Yamada Leo, Ashizawa Mai, Nakano Hiroshi, Hanayama Hiroyuki, Onozawa Hisashi, Kono Koji, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 ARID1A deficiency in EBV-positive gastric cancer is partially regulated by EBV-encoded miRNAs, but not by DNA promotor hypermethylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 21~30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Leo Yamada, Motonobu Saito, Aung Kyi Thar Min, Katsuharu Saito, Koji Kase, Hisashi Onozawa, Hirokazu Okayama, Shotaro Fujita, Hisahito Endo, Wataru Sakamoto, Zenichiro Saze, Tomoyuki Momma, Shinji Ohki, Kosaku Mimura, Koji Kono	4. 巻 27
2. 論文標題 Explore the correlation between ARID1A and ANXA1 expressions in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann. Cancer Res. Ther	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Takuro, Okayama Hirokazu, Nakajima Shotaro, Saito Katsuharu, Nakano Hiroshi, Endo Eisei, Kase Koji, Ito Misato, Yamauchi Naoto, Yamada Leo, Kanke Yasuyuki, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 21
2. 論文標題 Tn Antigen Expression Defines an Immune Cold Subset of Mismatch-Repair Deficient Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9081 ~ 9081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Kumamoto Kensuke, Okayama Hirokazu, Matsumoto Takuro, Nakano Hiroshi, Saito Katsuharu, Matsumoto Yoshiko, Endo Eisei, Kanke Yasuyuki, Watanabe Yohei, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 16
2. 論文標題 Downregulation of PAICS due to loss of chromosome 4q is associated with poor survival in stage III colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Wataru, Ohki Shinji, Onozawa Hisashi, Okayama Hirokazu, Endo Hisahito, Fujita Shotaro, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 5
2. 論文標題 Long-term Outcomes of Lower Rectal Cancer Patients Treated with Total Mesorectal Excision and Lateral Pelvic Lymph Node Dissection after Preoperative Radiotherapy or Chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 129 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23922/jarc.2020-054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Momma Tomoyuki, Okayama Hirokazu, Kanke Yasuyuki, Fukai Satoshi, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Validation of Gene Expression-Based Predictive Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4642 ~ 4642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13184642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 NEUPANE PRAJWAL、MIMURA KOSAKU、NAKAJIMA SHOTARO、OKAYAMA HIROKAZU、ITO MISATO、THAR MIN AUNG KYI、SAITO KATSUHARU、ONOZAWA HISASHI、FUJITA SHOTARO、SAKAMOTO WATARU、SAITO MOTONOBU、SAZE ZENICHIRO、MOMMA TOMOYUKI、KONO KOJI	4. 巻 41
2. 論文標題 The Expression of Immune Checkpoint Receptors and Ligands in the Colorectal Cancer Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4895 ~ 4905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 元伸 (SAITO Motonobu) (90611749)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関