

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年～2009 年

課題番号：20790262

研究課題名 (和文) 卵巣明細胞腺癌治療薬の開発を目指したアネキシン IV 複合体の機能解析

研究課題名 (英文) Characterization of annexin IV complex for new therapeutic development to ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者 横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教
荒川 憲昭 (ARAKAWA NORIAKI)

研究成果の概要 (和文)：

上皮性卵巣癌で悪性度の高い明細胞腺癌(CCA)にて特徴的に発現しているアネキシン IV (ANX4) の機能については不明な点が多い。ANX4 の病態生理的役割を明らかにするために、ANX4 の相互作用タンパク質の同定を行った。CCA 細胞において ANX4 は核内にて Ca^{2+} 非依存的にタンパク質複合体を形成しており、免疫沈降法にて精製した ANX4 複合体の構成成分を質量分析装置により解析することで、ANX4 複合体に含まれる様々な核酸結合性タンパク質を同定した。

研究成果の概要 (英文)：

The protein annexin IV (ANX4) is elevated specifically and characteristically in ovarian clear cell adenocarcinoma (CCA), a highly malignant histological subtype of epithelial ovarian cancer. To clarify the functional and physiological role of the ANX4 protein in CCA, we conducted proteomic analyses to identify its binding partners. This analyses revealed that ANX4 formed a protein complex with several nucleic acid binding proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌はそのほとんどが上皮性腫瘍であり、組織型に富む癌である。卵巣癌組織型は、主に粘液性、漿液性、類内膜、明細胞(CCA)の4種類に分類され、中でも CCA は早期で発見される率が高いにも関わらず再発率が高く、また化学療法に抵抗性を示す悪性度の

高い組織型である。日本においては、全卵巣癌組織型の中で明細胞腺癌が占める割合が欧米諸国に比べて高く、CCA の治療成績改善は喫緊の課題となっている。我々は先に、プロテオミクスのアプローチから、CCA 特異的にアネキシン IV (ANX4) が発現上昇していることを見だし、さらに ANX4 の RNA 干

渉による発現抑制が、CCA 細胞の増殖阻害を引き起こすことを明らかにした。これは少なくとも CCA において、ANX4 が細胞の増殖や生存に関わっていること示唆する結果であり、ANX4 が CCA に対する新しい抗悪性腫瘍薬の標的となる可能性を示すものである。

ANX4 は、哺乳類では 12 種類存在する ANX ファミリータンパク質の 1 つである。ANX ファミリーは Ca^{2+} /リン脂質結合タンパク質として知られ、細胞膜脂質二重層内のリン脂質に結合し、細胞膜融合や輸送に関連すると推定されている。ANX4 に関しては、癌細胞の抗悪性腫瘍薬の抵抗性獲得機構との関連性が報告されているほか、HeLa 細胞において Ca^{2+} 依存的にホモ 3 量体を形成し、Cl⁻チャネルを活性化することなどが報告されている。しかし、未だ ANX4 には不明な点が多く、卵巣上皮における機能についての報告はほとんどない。

2. 研究の目的

タンパク質の生理機能は、相互作用タンパク質の機能からある程度推定できる可能性がある。そこで、ANX4 の生理的役割および機能の解明に役立てることを目的として、CCA における ANX4 がタンパク質複合体を形成しているのか、また、その構成因子は何かを調べることで、CCA 治療薬の開発に繋げる知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ANX4 複合体の検出

OVISE からタンパク質を抽出し、一次元目にブルーネイティブ (BN) -PAGE、二次元目に SDS-PAGE を用いた二次元電気泳動によりタンパク質を分離し、抗 ANX4 ヤギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った (2D-WB)。

(2) ANX4 複合体の精製

抗 ANX4 マウスモノクローナル抗体とプロテイン G 結合マグネットビーズを混合し、DMP により抗体とプロテイン G を架橋した抗体ビーズを作製した。OVISE のタンパク質抽出液に抗体ビーズを添加し洗浄後、0.5% NP40、2 M 尿素を含むグリシン緩衝液 (pH3.0) にて ANX4 複合体を溶出した (Fig.1A)。比較対照として ANX4 shRNA 安定発現 OVISE 細胞 (ANX4 ノックダウン OVISE) を用いた。

(3) ANX4 複合体構成成分の解析

上述の両精製標品に含まれるタンパク質を 2 種類の方法を用いて解析を行った。①両

精製標品を SDS-PAGE により分離し、ゲル染色後、親細胞(OVISE)にのみ強く検出されたバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化後、LC-MS/MS 解析により同定した。②両精製標品をトリプシン消化後、iTRAQ タグ (レポーター質量 114,116) で標識した。標識後、2つのサンプルを混合し、LC-MS/MS 解析によりタンパク質の同定、定量を行った。

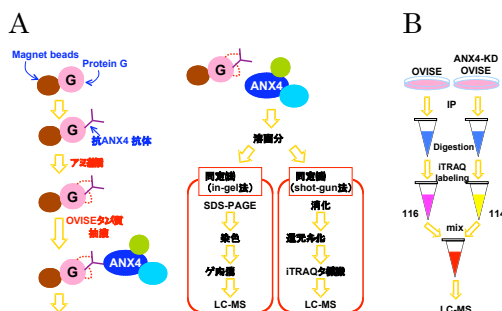
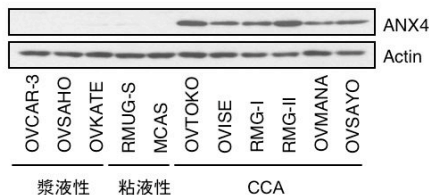


Fig.1 ANX4複合体の解析手法

(A) ANX4複合体の精製方法。(B) iTRAQ法の概略。

4. 研究成果

A



B

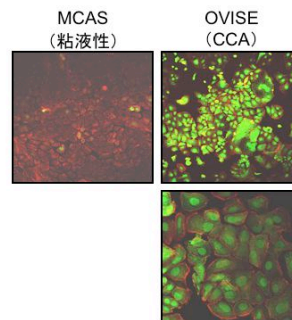


Fig.2 CCA 細胞における ANX4 の発現上昇

(A) 各卵巣癌細胞株における ANX4 の発現を、ウエスタンブロットにより比較した。(B) 免疫蛍光染色の結果。赤: Actin、緑: ANX4 (写真は重ね合わせたもの)。

(1) CCA における ANX4 の発現

種々の組織型を示す卵巣癌細胞株からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析により ANX4 の発現量の比較を行った結果、

CCA 特異的に ANX4 が発現上昇していることが確認できた (Fig.2A)。また、OVISE 細胞において抗 ANX4 抗体で免疫蛍光染色を行った結果、細胞全体に ANX4 の存在が認められたが、特に核において強いシグナルが検出された (Fig.2B)。CCA 細胞において、ANX4 は主に核に局在していることが示唆された。

(2) CCA における ANX4 合体の検出

ANX4 がタンパク 合体を形成しているのかどうかを調べるために、OVISE から様々な界面活性剤を用いてタンパク を抽出し、抗 ANX4 抗体にて 2D-WB を行った。その結果、SDS を除く様々な界面活性剤の存在下で、ANX4 単量体の分子量 (36 kDa) よりも遙かに大きい 2 種類のスポットが検出された。これらのスポットは界面活性剤の種類によって泳動度に違いが られた (Fig.3A)。したがって CCA 細胞中では ANX4 は 合体として存在していることが示唆された。

次に、ANX ファミリーは Ca^{2+} 依存的にリン脂 と Z 相互作用すると考えられているため、OVISE における ANX4 合体の形成への Ca^{2+} の影響を調べた。タンパク 抽出液に過剰量の EGTA を加え室温にて 30 分インキュベートした結果、ANX4 のスポットの泳動度に変化は られなかった (Fig.3B)。したがって、CCA 細胞中における ANX4 の 合体形成は、 Ca^{2+} 非依存的に起きることが考えられた。

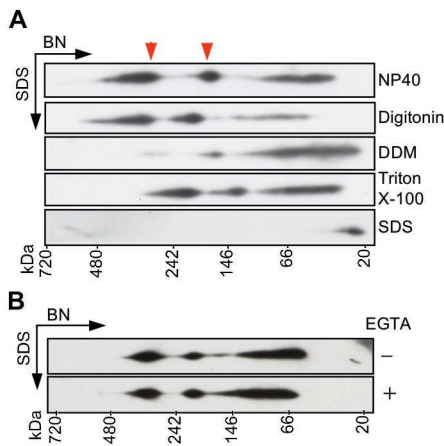


Fig. 3 ANX4 複合体の検出および複合体形成における種々の化合物の影響。 様々な界面活性剤を用いて、OVISE 細胞からタンパク を抽出し、2D-WB にて ANX4 を検出した。(A) ANX4 合体形成における種々の界面活性剤存在の影響。(B) カルシウムイオンキレート剤の影響

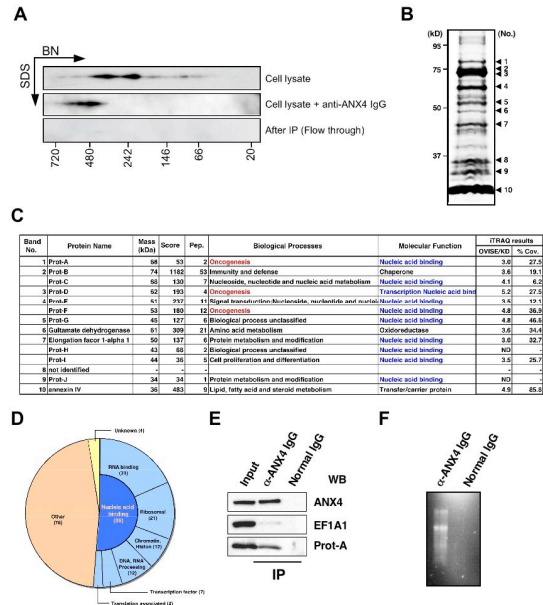


Fig. 4 ANX4 複合体の構成成分の同定
 抗 ANX4 IgG による 合体の精製。OVISE からタンパク を抽出した時、そしてタンパク 抽出液に抗 ANX4 IgG を添加した時、プロテイン G により免疫沈降した後の残液における ANX4 合体を 2D-WB にて検出した。(B) ANX4 合体精製標品の電気泳動像。1 mg のタンパク 抽出液から 合体を精製し、SDS-PAGE 分離後、蛍光染色を行った。(C) 電気泳動にて検出されたバンドから同定されたタンパク 群とその機能分類。(D) ショットガン 析にて同定されたタンパク の機能分類。細胞にて 3 倍以上高く定量されたタンパク (168 個) を分類した。(E) 免疫沈降産物に含まれる同定されたタンパク のウエスタンブロットによる検出。(F) 免疫沈降産物に含まれる核酸。精製標品からタンパク を除去後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色した。

(3) ANX4 合体の構成成分の同定

CCA 細胞における ANX4 合体を単離するために、抗 ANX4 抗体を用いて免疫沈降法により精製を行った。OVISE から得られたタンパク 抽出液を抗 ANX4 抗体ビーズにて処理した結果、電気泳動上検出される 2 種の ANX4 合体は、IgG と結合して高分子側にシフトし、免疫沈降後の非吸着画分からは検出されないことが確認された (Fig.4A)。これは本抗体により ANX4 合体が精製できることを示している。ANX4 抗体を架橋したビーズを用いて OVISE 細胞から単離した ANX4 合体精製標品を SDS-PAGE で展開し、SYPRO-Ruby 染色を行った結果、十本以上のバンドが検出された (Fig.4B)。これらのバンドは ANX4 ノックダウン細胞からは検出できなかったため、ANX4 合体の構

成因子であると考えられた。検出されたバンドのうち、メジャーバンド (No. 1 から 10) をゲル内消化後、質量分析装置にて測定した結果、ほとんどが核酸結合タンパク質として同定された (Fig. 4C)。この結果は、ショットガン解析からも同様の結果が得られた。OVISE とその ANX4 ノックダウン細胞から得られた ANX4 複合体精製標品のトリプシン消化物を iTRAQ タグで標識し、2D-ナノ LC 質量分析装置にて定量解析を行った。検出・同定されたタンパク質群の中で、ノックダウン細胞と比べて親細胞の方で 3 倍以上高い定量比が得られた 168 個のタンパク質を分類した結果、半数以上が DNA や RNA などの核酸結合性のタンパク質であることが分かった (Fig. 4C および D)。そこで、これらの同定されたタンパク質が ANX4 抗体の免疫沈降産物に本当に含まれているのかどうか検証するために、当該タンパク質抗体を用いて検証実験を行った。Fig. 4E に示すように、EF1A1 や Prot-A タンパク質が各々の抗体にて検出された。さらに ANX4 複合体に核酸が含まれるのかどうか調べるために、本精製標品からタンパク質をフェノールクロロホルムにて除去し、得られた上清をプロパノール沈殿にて濃縮し、アガロースゲルに展開した。エチジウムブロマイド染色した結果、核酸と思われるバンドが検出された。これらの結果から、ANX4 複合体には多数の核酸結合性タンパク質および核酸が含まれていることが示唆された。

以上の結果より、ANX4 は CCA 細胞において核内にて核酸結合性タンパク質とともに、機能している可能性が示された。CCA における ANX4 の詳細な機能はまだわかっていない。本研究成果は、ANX4 の機能解明に繋がる重要な知見である。

5. 主な発表論文等 〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の構成因子の同定. 日本生化学会 2009. 10. 22 神戸
- ② 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の機能解析. 日本ヒトプロテオーム機構. 2009. 7. 28. 東京
- ③ 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 新規 p53 ターゲット ANX4 は卵巣明細胞腺癌の p53 活性を低下させる. 日本ヒトプロテオーム機構 2009. 7. 27. 東京
- ④ 田矢史織, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子,

- 平原史樹, 平野久. 卵巣明細胞腺癌におけるリン脂質結合タンパク質アネキシン IV の性状解析. BMB2008. 2008. 12. 11. 神戸
- ⑤ Noriaki Arakawa, Yusuke Masuishi, Yuko Yamanaka, Hiroshi Kawasaki, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Hisashi Hirano. New potential therapeutic targets for ovarian clear cell carcinoma. Meeting of methods in protein structure analysis. 2008. 8. 27. 札幌
 - ⑥ Noriaki Arakawa, Yusuke Masuishi, Yuko Yamanaka, Hiroshi Kawasaki, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Hisashi Hirano. Proteomic analysis for identification of therapeutic targets of ovarian clear cell carcinoma. 4th Asian Oceania Human Proteome Organisations 2008. 6. 23. ケアンズ

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 1 件)

名称: 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子
権利者: 公立大学法人横浜市立大学
種類:
番号: 特願 2010-035737
出願年月日: 2010 年 2 月 22 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
荒川 憲昭 (ARAKAWA NORIAKI)
横浜市立大学
・生命ナノシステム科学研究科・助教
研究者番号: 60398394