

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791560

研究課題名（和文） 卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性克服を目的としたアネキシン A 4 阻害による癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of chemosensitizing cancer therapy for ovarian clear cell carcinoma by targeting Annexin A4.

研究代表者

金 雅子 (KIM AYAKO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：00571225

研究成果の概要（和文）：

申請者は卵巣明細胞腺癌において Annexin A4 が高発現し、カルボプラチン抵抗性を示すことを報告してきた。今回申請者は、卵巣明細胞腺癌の RMG-I 株において Annexin A4 のノックダウン株を樹立し、卵巣癌治療に用いられる薬剤の感受性が改善するかを検討した。Annexin A4 ノックダウン株はコントロールに比べ、シスプラチンおよびカルボプラチンへの薬剤感受性が約 2 倍改善し、エピルビシンおよびパクリタキセルに対する感受性の改善も認めた。また薬剤感受性に一致して、薬剤誘導性の p53 の発現も増加した。Annexin A4 の抑制によりシスプラチンの感受性は *in vivo* でも有意に改善した。これらの結果は Annexin A4 が卵巣明細胞癌における多剤薬剤耐性因子であり、治療標的因子となる可能性があることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression of Annexin A4 induces chemoresistance to chemosensitive cells and enhanced expression of Annexin A4 has been shown in ovarian clear cell carcinoma (CCC). In this study, we have established stable knockdown of Anx A4 expression in ovarian clear cell carcinoma RMG-I cell lines and demonstrated that knockdown of Anx A4 induced chemosensitization to Cisplatin, Carboplatin, Epirubicin and Paclitaxel. Consistent with this improved chemosensitivity, chemotherapy-induced p53 expression was increased. In a RMG-I cell xenograft model, significant xenograft chemosensitization toward Cisplatin was demonstrated by knockdown of Anx A4. These results suggest that inhibition of Anx A4 induces significant multidrug chemosensitization in ovarian CCC cells. Thus, Anx A4 blockage might be a novel therapeutic target of chemoresistance in patients with multidrug-resistant ovarian CCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は日本では毎年新たに約 8000 人が診断され、4000 人が死亡する婦人科悪性腫瘍で、近年増加傾向にある。腹腔内臓器である卵巣は悪性腫瘍化しても早期には無症状であることが多く、III 期以上の進行癌として診断されることがほとんど（70%以上）である。また治療面ではこの 30 年間で手術技術の向上と奏効率のより高い（多剤）化学療法レジメンの開発等によってめざましく改善したが、手術および化学療法後 2 年以内に半数以上が再発し、III 期の 5 年生存率は 30% と低い値である。また卵巣癌は、子宮頸癌における細胞診のように有効なスクリーニング法が未だ確立されていないため、早期診断を可能とする疾患特異的マーカー、あるいは抗癌剤耐性に関わる病因蛋白質を同定し、診断/治療効果の向上を目指すことは重要である。卵巣明細胞腺癌は上皮性卵巣悪性腫瘍の中でも漿液性腺癌、類内膜性腺癌等の組織型と比較してタキソール/カルボプラチンを初めとする抗癌剤に耐性を示し、予後不良とされる組織型である。日本では全体の上皮性卵巣悪性腫瘍に占める明細胞腺癌の割合が 20% 以上と、欧米の数% と比べて非常に高頻度であるが、その原因は明らかには分かっていない。また、卵巣明細胞腺癌は、近年生殖年齢女性で増加傾向にある子宮内膜症の卵巣病変、すなわち卵巣チョコレート嚢胞との強い関連が示唆されており、卵巣チョコレート嚢胞が悪化した場合の組織型のほとんどは明細胞腺癌であることが分かっている。

以上のような背景から、申請者はプロテオミクス手法を用いて、抗癌剤抵抗性である卵巣明細胞腺癌細胞株と抗癌剤感受性である漿液性腺癌細胞株におけるタンパク質発現差解析をした。その結果、明細胞腺癌で有意に高発現を示した蛋白質の 1 つとして Annexin A4 を同定した。複数の細胞株を用いた確認実験でも、明細胞腺癌すべてにおいて Annexin A4 は mRNA レベル、蛋白質レベル共に高発現を示すことが分かった。また、120 余りの卵巣癌腫瘍検体を用いて Annexin A4 に対する免疫組織化学染色を行ったところ、細胞株だけでなく実際の腫瘍組織においても Annexin A4 は明細胞腺癌で非常に高い発現を示すことが分かった (Kim et al, 2009 IJC)。

続いて、Annexin A4 と明細胞腺癌の抗癌剤耐性との関連、およびそのメカニズムを調べ

るために抗癌剤感受性株の漿液性腺癌細胞株に Annexin A4 を遺伝子導入、強制発現させてカルボプラチンに対する感受性が親株と比較して変わるかを MTT アッセイによって調べた結果、Annexin A4 発現株の方が有意にカルボプラチン耐性になっていた。さらに Annexin A4 が抗癌剤耐性を与えるメカニズムとして、Annexin A4 が細胞膜を裏打ちする形で局在することや過去の文献で、細胞内輸送やエクソサイトーシス、イオンチャネルの制御等の働きがあるということからヒントを得て、Annexin A4 は薬剤の取り込みあるいは排出を変化させることで薬剤が効きにくくするという仮説を立てた。そして Annexin A4 発現株と親株とでカルボプラチン処理後の細胞内 Pt 濃度を比較したところ、Annexin A4 発現株で有意に細胞内 Pt 濃度が低下していることが分かり、Annexin A4 は細胞内に取り込まれた薬剤の排出を促進することで耐性を誘引している可能性を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では卵巣明細胞腺癌に高発現し、抗癌剤耐性と深く関係する蛋白質である Annexin A4 を阻害することが抗癌剤感受性を向上させることにつながることを証明し、抗癌剤感受性改善を目指した癌治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 細胞株

RMG-I (ヒト卵巣明細胞腺癌) は JCRB より入手した。細胞は RPMI 培地に 10% ウシ血清 (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)、1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加したのを用い、5% CO<sub>2</sub> の 37° C インキュベーターで培養した。

### AnxA4 ノックダウン細胞株の樹立

AnxA4 ノックダウン RMG-I 細胞株を樹立するため、RMG-I 細胞は Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) を用いて市販の Anx A4 short hairpin RNA をコードする plasmid (shRNA ANX4, plasmid KH06928N, SABiosciences [Qiagen], Frederick, MD, USA) をトランスフェクションし、600 μg/ml の Geneticin (Invitrogen) を用いることでセクションした。2 つの RMG-I-AnxA4shRNA クローンを樹立し、Y4 と R5 と名付けた。コ

ントロールとして、空ベクターをトランスフェクションし、クローン NC7 を樹立した。

### 細胞増殖アッセイ

RMG-I NC7 と RMG-I AnxA4 Y4 と RMG-I AnxA4R5 は RPMI medium + 10% FBS に懸濁し、1500 cells/well の密度で 96-well plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) にまき、48, 72h, 96 時間、培養した。それぞれの時間において WST-8 assay (Cell Counting Kit-SF; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) により、細胞の増殖を microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

### ウェスタンブロッティング

細胞は RIPAbuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) and 1x protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)) に溶解し、遠心分離 (13,200 rpm, 4° C, 15 min) し、遠心上清を回収した。タンパク質の濃度は bovine serum albumin (BSA) を標準物質として、DC Protein Assay kit (Bio-Rad) を用いて定量した。抽出したタンパク質は 5-20% gradient SDS-PAGE ゲル (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて分離し、PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。PVDF 膜を 1% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST) で 1 時間振とうすることでブロッキングし、goat polyclonal anti-Anx A4 antibody (sc-1930; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、あるいは rabbit polyclonal anti-p53 antibody (#9282; Cell Signaling, Boston, USA) にて 1 次抗体反応を室温で 1 時間行った。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) あるいは HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK) で 1 次抗体反応を室温で 1 時間行った。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回洗浄し、enhanced chemiluminescence (ECL) reaction system (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) により、シグナルを検出した。ローディングコントロールとして、GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology) に対する抗体を 1 次抗体として用いた。

### 薬剤誘導性 p53 の発現解析

細胞内に取り込まれた抗癌剤による p53 発現誘導を調べるため、RMG-I NC7 と

RMG-I-AnxA4-Y4 を 25  $\mu$ M Cisplatin, 200  $\mu$ M Carboplatin あるいは 400 nM Epirubicin で 24 時間処理した。細胞は PBS で 2 回洗浄し、RIPA buffer でタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法により、p53 の発現量を確認した。

### Reverse-transcription-PCR

reverse-transcription-PCR (RT-PCR) 法を用いて RMG-I、RMG-I NC7、RMG-I-AnxA4-Y4、RMG-I-AnxA4-R5 における Anx A4 の mRNA の発現量を調べた。RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いてそれぞれの細胞よりトータル RNA を抽出した。Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて cDNA を調製し、TaKaRa ExTaq (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) を用いて PCR を行った。Anx A4 のプライマー配列は forward; 5' -AGCCTCGCCTTGCCGA-3', reverse; 5' -CTGGTGCCTGGGGCG-3', ;  $\beta$ -actin のプライマー配列は forward; 5' -AGCCTCGCCTTGCCGA-3', reverse; 5' -CTGGTGCCTGGGGCG-3' を用いた。Anx A4 の PCR サイクルは 10 秒間 98° C で熱変性させ、30 秒間 60° C にてアニーリング、30 秒間 72° C にて慎重を 25 サイクル行った。 $\beta$ -actin の PCR サイクルは 10 秒間 98° C で熱変性させ、30 秒間 60° C にてアニーリング、30 秒間 72° C にて慎重を 33 サイクル行った。

### IC<sub>50</sub> 測定

RMG-I、RMG-I NC7、RMG-I-AnxA4-Y4、RMG-I-AnxA4-R5 の 4 つの細胞について、RPMI medium + 10% FBS+1% penicillin-streptomycin に懸濁し、1500 cells/well の密度で 96-well plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) にまき、24 時間培養し、様々な濃度の抗癌剤 (0-300  $\mu$ M Carboplatin 0-50  $\mu$ M Cisplatin, 0-1,000 nM Epirubicin) に暴露させ、72 時間後に生存している細胞を WST-8 assay により測定し細胞増殖が 50% 抑制される抗癌剤の濃度を決定した。

### In vivo での抗癌剤感受性アッセイ

ICR (out-bred Institute of Cancer Research strain) nu/nu mice マウス (4 週齢メス) の皮下に RMG-I、RMG-I NC7、RMG-I-AnxA4-Y4 を  $2.5 \times 10^6$  cells/100  $\cdot$  1 (PBS: マトリゲル = 1:1) で移植した。移植後 7 日目にマウスを 2 群に分け、PBS あるいは 3 mg/kg の Cisplatin を週 2 回の頻度で 4 週間投与した。腫瘍体積は長径 x 短径 x 高さより計算した。薬剤投与終了 4 週後に腫瘍重量を計測した。

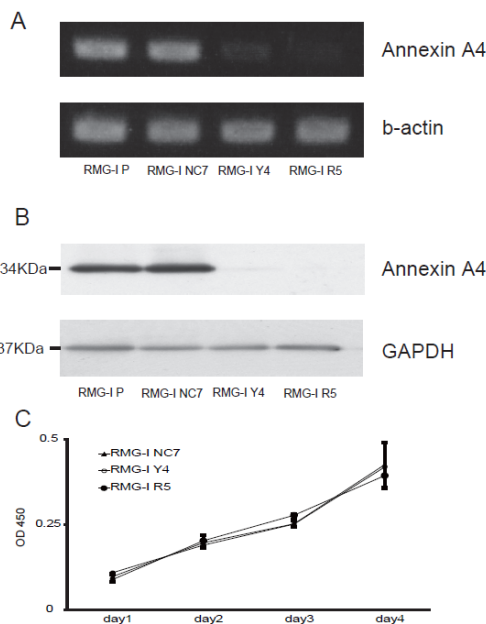
## 統計解析

統計解析はOne-way ANOVA testとDunnettテストにより群間の有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

## 4. 研究成果

### Anx A4 ノックダウン RMG-I 細胞株の樹立

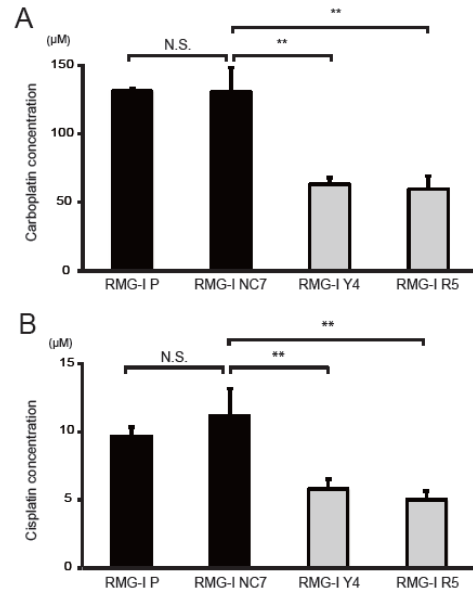
卵巣明細胞腺癌において、Anx A4 を阻害することが抗癌剤感受性の増強となることを証明するため、Anx A4 の shRNA を安定発現させることで、Anx A4 を恒常的にノックダウンさせた RMG-I 細胞株を樹立した。RT-PCR 解析、ウェスタンブロット法により、RMG-I 細胞、コントロールベクター処理株 (RMG-I NC7) と比較して、RMG-I-AnxA4shRNA-Y4 (Y4) と RMG-I-AnxA4shRNA-R5 (R5) では mRNA レベル、タンパク質レベルで Anx A4 の発現が抑制されていることが確認された (Figures 1A, 1B)。これらの 4 種類の細胞の間には細胞増殖速度に有意な差はみられず、Anx A4 のノックダウンは細胞増殖に大きな影響を与えないことが確認された (Figure 1C)。



### Anx A4 の発現抑制は Cisplatin と Carboplatin の感受性を向上させる。

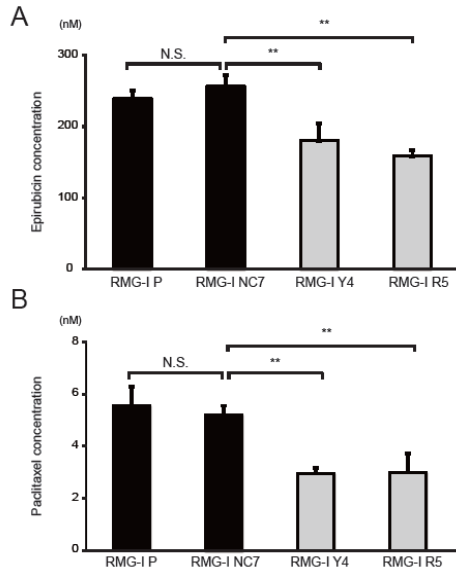
これらの 4 つの細胞株について、Cisplatin と Carboplatin の感受性を解析した。NC7 細胞における Cisplatin の  $IC_{50}$  ( $11.2 \mu M$ ) と比較して、Cisplatin の  $IC_{50}$  は Y4 細胞と R5 細胞で有意な低下を認めた (Y4;  $5.8 \mu M$ ,  $p < 0.01$ , R5;  $5.0 \mu M$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 2 A)。同様に Carboplatin に対する  $IC_{50}$  も NC7 細

胞の ( $130 \mu M$ ) と比較して、Y4 細胞と R5 細胞において有意な低下を認めた (Y4;  $63 \mu M$ ,  $p < 0.01$ , R5;  $60 \mu M$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 2 B)。Anx A4 の発現を抑制させることで Cisplatin と Carboplatin の  $IC_{50}$  はおよそ半分程度に低下することが判明した。



### Anx A4 の発現抑制は Epirubicin と Paclitaxel の感受性を向上させる。

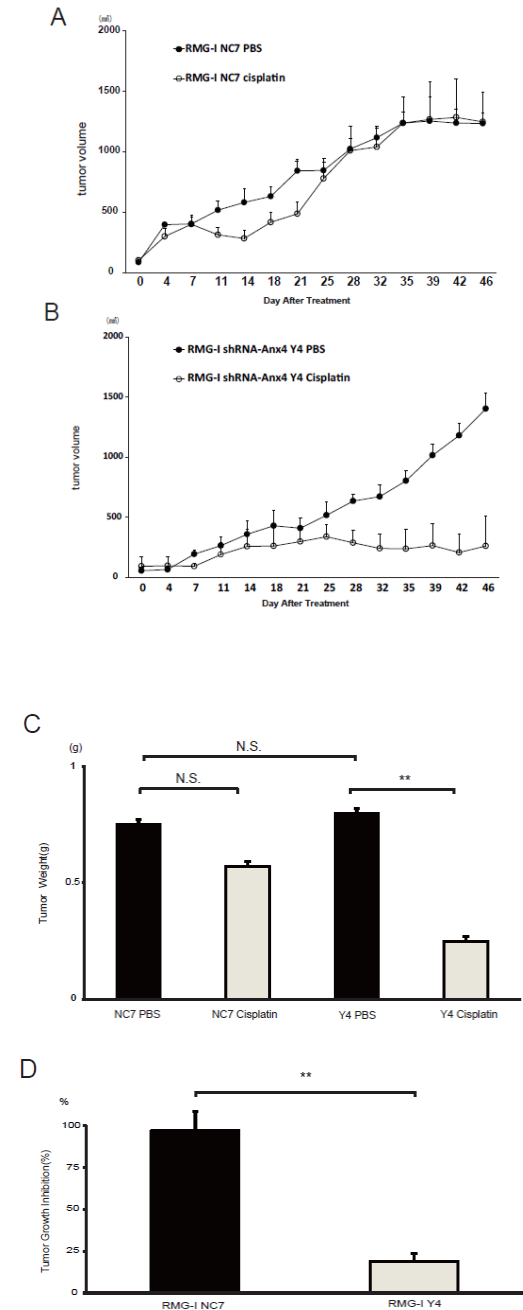
次に、プラチナ製剤以外で卵巣がんの化学療法に用いられている Epirubicin と Paclitaxel に対する感受性と Anx A4 発現との関係を解析した。Epirubicin の  $IC_{50}$  に関して、NC7 cells ( $256.7 nM$ ) と比較して、AnxA4 の発現を恒常的にノックダウンさせた Y4 と R5 では有意な低下を認めた (Y4;  $180.3 nM$ ,  $p < 0.01$ ; R5 cells;  $159.1 nM$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 3A)。さらに Paclitaxel に対する  $IC_{50}$  も NC7 cells ( $5.5 nM$ ) と比較して、AnxA4 の発現を恒常的にノックダウンさせた Y4 と R5 では有意な低下を認めた (Y4 cells:  $2.9 nM$ ,  $p < 0.01$ ; R5:  $3.0 nM$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 3 B)。Epirubicin と Paclitaxel についても、Anx A4 の発現を抑制することによりその感受性が 2 倍程度改善した。



Anx A4 の発現を抑制した RMG-I 細胞は *in vivo* でもプラチナ製剤に対する感受性改善を示す。

卵巣明細胞腺癌において、Anx A4 の発現を抑制することが抗癌剤感受性を向上するかどうかを明らかにするため、NC7 と Y4 を ICR nu/nu マウス皮下に移植したゼノグラフトモデルを作成した。細胞を生着させた後、Cisplatin あるいは PBS を週 2 回、腹腔内投与を計 8 回行った。両者において、PBS 投与群における腫瘍の増殖速度は同程度であった。NC7 において、平均腫瘍体積は PBS 投与群で 1233 ( $\pm$  88.5) mm<sup>3</sup> であるのに対して cisplatin 投与群で 1246 ( $\pm$  243.8) mm<sup>3</sup> であり、NC7 のゼノグラフトモデルにおいて、cisplatin による抗腫瘍効果は認められなかった (Figure 4A;  $p=0.18$ )。RMG-I 親株においても NC7 と同様の結果であった。これに対し、Y4 ゼノグラフトモデルにおいて、平均腫瘍体積は PBS 投与群で 1402 ( $\pm$  126.7) mm<sup>3</sup> であるのに対して cisplatin 投与群で 176 ( $\pm$  28.0) mm<sup>3</sup> であり、Y4 ゼノグラフトモデルにおいて *in vivo* で cisplatin に対する抗腫瘍効果の改善が認められた (Figure 4 B;  $p<0.01$ )。cisplatin 投与群における 46 日目の NC7 ゼノグラフトモデルにおける計算上の腫瘍体積の減少率は (3.0  $\pm$  12.5%) であったのに対して、Y4 ゼノグラフトモデルの減少率は (72.1  $\pm$  4.6%) であった。46 日目において、PBS 処理群における NC7 ゼノグラフトモデルにおける腫瘍重量は (750  $\pm$  70 mg) であったのに対して、Y4 ゼノグラフトモデルの減少率は (580  $\pm$  70 mg) であり、統計的な有意差が見られなかった (Figure 4C)。対照的に、cisplatin 投与群における 46 日目の腫瘍重量については、

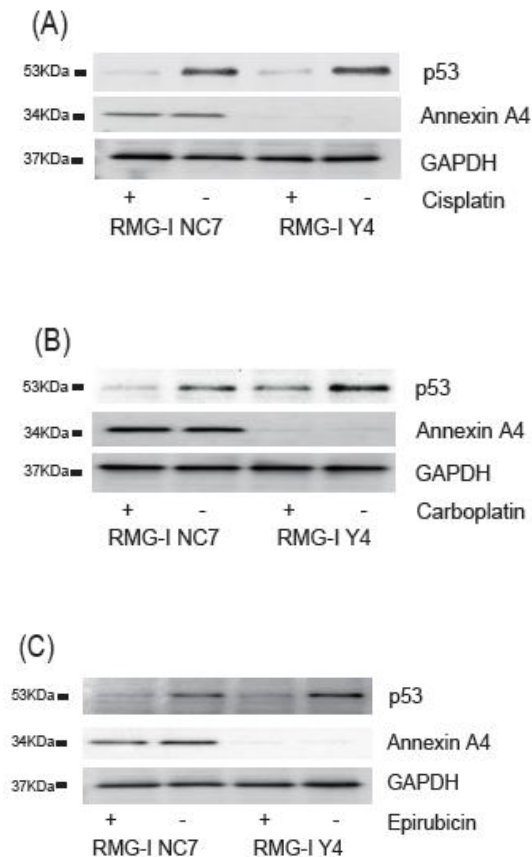
NC7 ゼノグラフトモデルでは (800  $\pm$  65 mg) であったのに対して、Y4 ゼノグラフトモデルの腫瘍重量は (250  $\pm$  20 mg) であり、Anx A4 のノックダウンにより cisplatin 感受性の改善が *in vivo* でも認められた (Figure 4C)。



### Anx A4 の発現抑制は薬剤により誘導される p53 の発現を増強する

NC7 と Y4 細胞を用いて、薬剤投与時に誘導される p53 の発現量の変動をウェスタンブロットにて評価した。Cisplatin、Carboplatin、および Epirubicin で 24 時間処理した RMG-I 細胞では p53 の発現上昇が認められた

(Figure 5)。同様の薬剤処理を行った Y4 細胞では NC7 細胞に比べて p53 の発現誘導が強く認められた (Figure 5)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2012 31, 14. 査読有  
<http://www.jeccr.com/content/31/1/14>
- ② Kim A, Serada S, Enomoto T, Naka T. Targeting annexin A4 to counteract chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. Expert Opin Ther Targets. 2010;14(9):963-71. 査読有  
DOI:10.1517/14728222.2010.511180

[学会発表] (計 2 件)

- ① Annexin A4 は既知の薬剤トランスポーターを介して卵巣明細胞腺癌のプラチナ系

薬剤耐性に関与する

第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、  
2011 年 8 月 (大阪)

金 雅子、松崎 慎哉、横山 拓平、木村 敏啓、上田 豊、吉野 潔、榎本 隆之

- ② 子宮内膜癌における Annexin A4 の発現とプラチナ系抗癌剤耐性の機序解明

第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、  
2011 年 8 月 (大阪)

松崎 慎哉、榎本 隆之、金 雅子、横山 拓平、森本 晶子、三好 ゆかり、木村 敏啓、上田 豊、吉野 潔、藤田 征巳、木村 正

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 雅子 (KIM AYAKO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：00571225