

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16859

研究課題名（和文）ATP7Bを標的としたプラチナ抵抗性卵巣癌の新規治療方法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Therapeutic Approach for Platinum-Resistant Ovarian Cancer by Targeting ATP7B

研究代表者

角田 守（Kakuda, Mamoru）

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30923031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ATP7B高発現のプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において、ATP7Bの発現をノックダウンすることで細胞内のプラチナ蓄積量が増加しプラチナ抵抗性が改善することが確認された。また臨床検体においても、ATP7Bの発現を認めた症例は有意に予後不良であった。in vivoモデルにおいても、ATP7Bをノックダウンした細胞株を皮下移植した群ではPBS投与群に比べてCisplatin投与群において著明な抗腫瘍効果を認め、プラチナ耐性卵巣癌においてATP7Bが治療ターゲットになりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんは、予後の悪い疾患の一つとして知られ、手術療法と化学療法による治療法が確立されているが、再発率も高いため治療に難渋する。特に初回治療後半年以内に再発したプラチナ製剤抵抗性の再発症例は予後が非常に悪く、その再発例を対象とした新しい治療法が待たれる。本研究はプラチナ抵抗性の克服が急務であるプラチナ抵抗性卵巣がんにおいてATP7Bが治療ターゲットとなりうることを示した。

研究成果の概要（英文）：In platinum-resistant ovarian cancer cell lines with high expression of ATP7B, it was confirmed that knocking down ATP7B expression increases intracellular platinum accumulation and improves platinum sensitivity. Moreover, in clinical specimens, cases exhibiting ATP7B expression were significantly associated with poor prognosis. In vivo model, xenografts of cells with ATP7B knockdown demonstrated significantly enhanced antitumor effects with cisplatin treatment compared to the PBS-treated group, suggesting that ATP7B could be a potential therapeutic target in platinum-resistant ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：ATP7B プラチナ抵抗性卵巣がん CuSO4

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは、予後の悪い疾患の一つとして知られ、手術療法と化学療法による治療法が確立されているが、再発率も高いため治療に難渋する。特に初回治療後半年以内に再発したプラチナ製剤抵抗性の再発症例は予後が非常に悪く、その再発例を対象とした新しい治療法が待たれる。私は以前、子宮平滑筋肉腫に対して CuSO₄ を premedication として用いることでプラチナ耐性の大きな原因である ATP7B のプラチナ輸送能が飽和されシスプラチンの感受性が改善されることを報告した。本研究ではプラチナ抵抗性の克服が急務であるプラチナ抵抗性卵巣がんにおいて、同様の効果を得られるかを検討し新たな治療方法の開発へ取り組む。

2. 研究の目的

卵巣がんのプラチナ抵抗性に大きく関わる因子として、ABC 輸送体である ATP7B が最近注目されている。細胞内の銅濃度の恒常性維持に参与しているが、銅の排出のみならず細胞内のプラチナ製剤の排出も行っていることが報告されている。以前、我々は ATP7B を高発現する子宮平滑筋肉腫において、in vitro および in vivo において ATP7B がプラチナ抵抗性に参与していること、および副作用のない生理的濃度の銅イオンを premedication として用いることで ATP7B のプラチナ輸送能が飽和されシスプラチンの感受性が改善されたことを報告した。今回、プラチナ抵抗性卵巣がんにおいて同様の効果を得られるかを検討することを目的とし、プラチナ抵抗性卵巣がんにおける ATP7B の発現を検討し、解析することで予後因子としての検討、プラチナ抵抗性の機序、新たな治療方法の開発へ取り組むことができると考える。

3. 研究の方法

プラチナ抵抗性卵巣がんでは ATP7B の発現が上昇しており、ATP7B の発現を抑制することがプラチナ抵抗性の克服につながるか、さらに CuSO₄ を premedication として用いることでプラチナ抵抗性を改善できるかを in vitro、in vivo で検証する。卵巣がん細胞株並びにプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において ATP7B の発現の変化並びにプラチナ製剤の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を測定する。2017 年-2021 年の間に当院で手術が行われた 276 例の卵巣がんの臨床検体において ATP7B の発現を確認し、プラチナ抵抗性を示した 128 例とプラチナ感受性を示した 148 例を比較し、ATP7B の発現の強弱と予後の関連性を評価する。ATP7B を高発現しているプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において、siRNA を用いて ATP7B をノックダウンし、IC₅₀ 値の低下を確認する。

ICP-MS 法を用いて、卵巣がん細胞株と比べてプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において細胞内プラチナ蓄積量が低下していることを確認し、ATP7B をノックダウンすることで細胞内プラチナ蓄積量が増加していることを確認する。pRS ベクターを用いた ATP7B の shRNA をプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株に遺伝子導入し、恒常的に ATP7B の発現を抑制した細胞株を作成し、細胞内プラチナ蓄積量が上昇していること、IC₅₀ 値が低下していることを確認する。プラチナ抵抗性卵巣がん細胞株並びに恒常的に ATP7B をノックダウンした卵巣がん細胞株を皮下移植したマウスモデルを作成し、それぞれにおいて Cisplatin による抗腫瘍効果を確認する。プラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において、細胞毒性がなく ATP7B の発現が増強しない CuSO₄ 濃度を検討し、免疫蛍光染色にて細胞内にある ATP7B の細胞膜への移動を確認する。CuSO₄ を premedication として用いることで、Cisplatin の IC₅₀ 値並びに細胞内プラチナ蓄積量がどのように変化するかを評価する。プラチナ抵抗性卵巣がん細胞株を皮下移植した in vivo モデルにおいて、premedication を行わない群、premedication として CuSO₄ (0.25mg/kg) を投与した low dose 群、premedication として CuSO₄ (1mg/kg) を投与した high dose 群において、それぞれプラチナ感受性がどのように変化するかを評価し、それぞれの群において、Cu の血中濃度や貧血、生化学検査にて臓器障害が起こっていないかを検討する。PDX マウスモデルにおいても ATP7B の発現を確認し、CuSO₄ による premedication を行った上でプラチナ製剤の投与による治療を行い、実際の癌患者でも ATP7B を標的とすることでプラチナ製剤の抗腫瘍効果が認められることを明らかにする。

4. 研究成果

卵巣がん細胞株 (A2780、OVSAH0、SKOV3 並びにシスプラチン低濃度暴露を繰り返すことにより作成したプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株 (A2780cisR、OVSAH0cisR、SKOV3cisR) において ATP7B の発現の変化並びにプラチナ製剤の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を測定し、プラチナ抵抗性卵巣癌細胞株を樹立した。また臨床検体においても、2017 年~2021 年の間に大阪大学医学部附属病院で手術が行われた 276 例の卵巣がんにおいて、VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) を用いて ATP7B の発現を確認したところ、ATP7B の発現は 144 例 (52.1%) に認めた。また ATP7B の発現を認めた 144 例においては 5 年生存率は 22%であったのに対して、ATP7B の発現を認めなかった 132 例の 5 年生存率は 43%と有意に予後不良であった。次に ATP7B を高発現しているプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において、siRNA を用いて ATP7B をノックダウンし、IC₅₀ 値の低下すなわちプラチナ抵抗性の改善を確認した。また Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) 法

を用いて、卵巣がん細胞株と比べてプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において細胞内プラチナ蓄積量が低下していることを確認し、ATP7B をノックダウンすることによりプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株において細胞内プラチナ蓄積量が増加していることを確認した。pRS ベクター (OriGene)を用いた ATP7B の shRNA をプラチナ抵抗性卵巣がん細胞株に遺伝子導入し、恒常的に ATP7B の発現を抑制した細胞株を作成し、細胞内プラチナ蓄積量が上昇していること、IC50 値が低下していることを確認した。それらの細胞株を用いた in vivo モデルにおいても、コントロール株を皮下移植した群においては Cisplatin 投与群と PBS 投与群で腫瘍体積・重量に差はありませんでしたが、ATP7B をノックダウンした細胞株を皮下移植した群では PBS 投与群に比べて Cisplatin 投与群において著明な抗腫瘍効果を認め、プラチナ耐性卵巣癌において ATP7B が治療ターゲットになりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------