

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06847

研究課題名(和文)人工核酸を用いたアンチセンスは卵巣明細胞癌のプラチナ耐性を改善する

研究課題名(英文) To improve platinum drug resistance of ovarian clear cell carcinoma with antisense oligonucleotides including artificial nucleic acid

研究代表者

中川 慧 (Nakagawa, Satoshi)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30650593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌は婦人科腫瘍のなかで最も予後不良な疾患であり、プラチナ耐性が患者の予後を決する最大の要因である。我々はこれまでに卵巣癌のプラチナ耐性に関わる分子としてAnnexin (以下Anx) A4を同定し、本研究においてはAnxA4をターゲットとした、人工核酸を用いたアンチセンスを作成し、AnxA4を抑制することで、卵巣明細胞癌細胞株のプラチナ抵抗性を改善することを試みた。アンチセンスの投与により *in vitro*, *in vivo* いずれにおいても、腫瘍増殖の抑制に成功しAnxA4の発現抑制による細胞内プラチナ濃度の増加が寄与していると考えられた。引き続き、投与経路、修飾基の検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の本邦での罹患数、死亡者数はともに増加傾向にある。進行期で発見されることが多く、手術後、あるいは再発してからの抗癌剤治療の効果が患者の予後を決する最大の要因である。抗癌剤治療の中心はプラチナ製剤であり、プラチナ感受性の場合にはプラチナ製剤投与を受けながら社会復帰する患者さんも多数存在する。本研究で用いているAnxA4アンチセンスは、プラチナ耐性を改善することが証明され、臨床応用が可能になれば抗癌剤治療の効果を上げるとともに、薬剤の使用量の減量やQOLの向上に寄与する可能性がある。また、人工核酸は人工的に合成できることから、大量生産が可能であり、質の均一化や価格の面で将来性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is highly resistant to platinum based cancer chemotherapy treatment. We previously reported that Annexin (Anx) A4 protein was overexpressed in OCCC tissues and associating with chemoresistance to platinum-based cancer drugs. To overcome the platinum chemoresistance, we thought antisense oligonucleotides (ASOs) to be a good therapeutic option in a way of highly specific therapy for improving chemoresistance by suppressing the expression of Annexin A4 in cancer cells. We generated ASO targeting Anx A4 with 2', 4'-bridged nucleic acid. By transfection of Anx A4 ASO, platinum resistance have improved both *in vitro* and *in vivo*. AnxA4 have associated with efflux of platinum anti-tumor drug. In conclusion, We are currently in the process of developing the drug delivery system, developing nucleic acid drugs which has higher binding affinity to target RNA in a clinical settings. Anx A4 could be a therapeutic option for ovarian OCCC with platinum resistance.

研究分野：卵巣癌

キーワード：Annexin A4 卵巣癌 核酸医薬 プラチナ抵抗性 明細胞癌 アンチセンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科腫瘍のなかで最も予後不良な疾患であり、本邦での罹患数、死亡者数はそれぞれ約 8000 人、5000 人と報告されておりともに増加傾向にある。腹腔内への播種あるいは遠隔転移を伴う III 期、IV 期の進行がんにおいては手術で肉眼的腫瘍を全て切除し得たとしてもミクロレベルの癌細胞は残存するため術後の再発予防、あるいは再発してからの抗癌剤治療の効果が患者の予後を決定する最大の要因である。プラチナ製剤は卵巣癌治療の核となる抗癌剤であるが、その耐性は克服すべき課題である。初回治療終了から 6 ヶ月未満の再発はプラチナ抵抗性の再発卵巣がんとして、他の抗癌剤が投与されるが奏効率は低く、その生命予後の中央値は 6 ヶ月である。一方、初回治療終了から 6 ヶ月以上経過ののち再発する卵巣がんはプラチナ製剤の再投与が奏効することが多い (Ozols RF et al. *Semin Oncol.* 2006)。特に本邦では卵巣癌全体の中でプラチナ製剤に耐性で予後不良とされる ovarian clear cell carcinoma(以下 OCCC)が占める割合が世界と比して 2 倍以上高く、年々その割合も増加しており、(Sugiyama T, et al. *Cancer.* 2000) プラチナ耐性を克服する新たな治療法が必要である。我々の先行研究ではプラチナ感受性を示す卵巣漿液性がん由来の細胞株とプラチナ耐性を示す卵巣明細胞がん由来の細胞株を用いて、プロテオーム解析法を行い、プラチナ耐性を示す卵巣明細胞がん細胞株において高発現する蛋白質 Annexin (以下 Anx) A4 を同定した。Anx A4 導入株は 2 倍以上のプラチナ抵抗性を示し、その機序として Anx A4 導入株はプラチナ製剤の細胞外排出を促進することで細胞内のプラチナ蓄積を減少させ、結果的にプラチナ抵抗性に寄与していることを明らかにしてきた (Kim A et al. *Int J Cancer.* 2009, Kim A et al. *Expert Opin Ther Targets.* 2010)。さらに、Anx A4 は ATP7A と共に細胞質から細胞膜へ移動し ATP7A のプラチナ排出を促進することも示した (図 1) (Matsuzaki S et al. *Int J Cancer.* 2014)。また、卵巣明細胞癌細胞株において Anx A4 をノックダウンすることで、in vitro, in vivo ともにプラチナ感受性が改善されることを示しアネキシンリピートと呼ばれるその責任領域まで特定した (図 2) (Morimoto A et al. *Oncotarget.* 2014)。

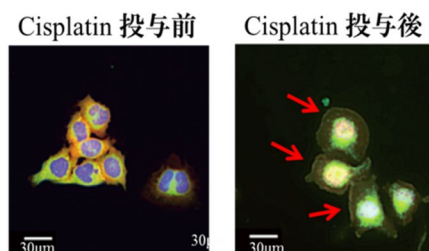


図 1 . シスプラチン投与により Anx A4 は細胞膜へ移動する

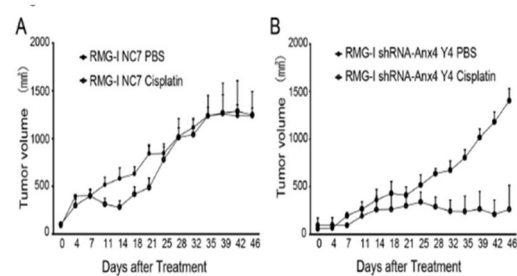


図 2 . Anx A4 発現抑制によるプラチナ感受性改善効果(in vivo)

2. 研究の目的

卵巣癌抗癌剤治療の鍵となるのは依然としてプラチナ製剤であり、世界的標準治療薬として初回治療に用いられている。プラチナ製剤への感受性、抵抗性の改善は卵巣癌患者全体の予後改善のための重要なポイントである。

我々は、これまで世界に先駆けて、AnxA4 の機能解析を行ってきたが、本研究では卵巣癌のプラチナ耐性克服を目指して AnxA4 をターゲットとした治療を臨床応用するために、架橋型人工核酸を用いたアンチセンスオリゴ(以下 ASO)を作成し、これにより Anx A4 の mRNA を

阻害、分解し、AnxA4 の発現を抑制することで核酸医薬による創薬、臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

<平成29年度>

(1) AnxA4 ASO による細胞内プラチナ蓄積量への影響

これまでに作成した AnxA4 ASO のうち抑制効果の高かった ASO を用いて、濃度勾配をつけてシスプラチン、カルボプラチンにそれぞれ72時間暴露し、OCCC 細胞株 RMG-1 と OVISe それぞれにおける50%増殖阻害濃度の測定と、細胞内プラチナ含有量の測定を行った。

(2) AnxA4 ASO の最適化

本研究では、まず AnxA4 の mRNA をターゲットとした 15mer の塩基配列のうちエステル型の架橋型人工核酸を両端にそれぞれ2mer 搭載した AnxA4ASO を作成し、有効な配列の検討を行った。これらの有効であった配列の ASO について、人工核酸の挿入数を変更したり挿入する人工核酸の修飾基をアミド型をはじめとするその他の修飾基を用いることで、薬効の増強や、安定性を増すことができる可能性があるため、それらを作成し、有効性の評価を *in vitro* で行った。

<平成30年度>

(3) *in vivo* におけるシスプラチン投与時の腫瘍増殖抑制と AnxA4 の発現抑制の関連

in vivo において RMG-1、OVISe それぞれを移植したマウスに PBS またはシスプラチンを腹腔内投与し、コントロール ASO または AnxA4 ASO(1mg/kg)を局所投与する4群の治療実験を行なった。さらに同様の系を用いて、2回 AnxA4 ASO を投与した腫瘍を摘出し、*in vivo* における腫瘍内の AnxA4 の発現抑制効果をウエスタンブロットで確認し、腫瘍の増殖抑制効果と AnxA4 の抑制の関連を評価した。

(4) 腫瘍免疫と人工核酸投与の関係の評価

AnxA4ASO を投与した際に、腫瘍の増殖抑制が腫瘍免疫の活性化など、間接的な原因によるものではなく、直接的なプラチナ製剤耐性を改善したことによるものであることを示すために、免疫染色を行い、腫瘍内に免疫細胞の浸潤が増加していないか評価を行った。

(5) 手術摘出卵巣癌組織由来 Patient-Derived tumor Xenografts (PDX)の開発

AnxA4 ASO の薬効を評価する際に、細胞株の xenograft では腫瘍組織中の AnxA4 の発現レベルが一定であるのに対して、卵巣癌組織中の AnxA4 は癌組織中に均一に高発現する症例だけではなく、発現が高い部位と低い部位が混在した heterogeneity を示す症例も存在すると考えられる。このため、AnxA4 の発現レベルがヘテロな卵巣癌に対して ASO が臨床で薬効を発揮することを検証するために PDX マウスを用いた実験系の準備を行った。

4. 研究成果

(1) AnxA4 ASO による細胞内プラチナ蓄積量への影響

これまでの実験で候補に絞り込んだ # 7、# 9の(図3)

2,4-架橋型 AnxA4 ASO を卵巣明細胞癌細胞株 RMG-1 へトランスフェクションさせたのち、濃度勾配をつけて(0-35 μ M)シスプラチンに暴露させ、細胞における薬剤50%阻害濃度を算出したところ、

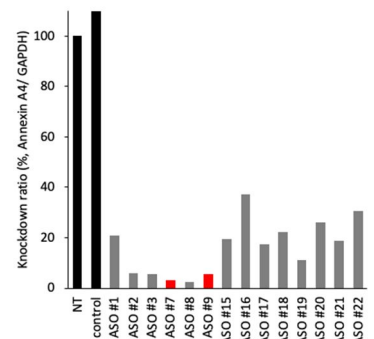


図3 RT-PCR で抑制効果の高い ASO を絞り込む

コントロール群に比較しその 50%阻害濃度(IC50)は有意に低下した(図4)。この細胞内に蓄積するシスプラチンを定量的に測定・解析したところ、コントロール群と比較して AnxA4 ASO を用いた卵巣癌細胞では、細胞内プラチナ蓄積量が約 25%増加していた(図5)。卵巣明細胞癌細胞株 OVISe についても同様の結果が得られた。また、本邦において卵巣癌治療に頻用されるカルボプラチンに関して RMG-1、OVISe で薬剤耐性が改善することが明らかになった(図省略)。

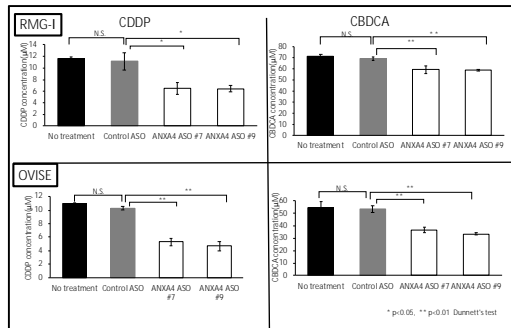


図4 AnxA4ASO によりプラチナ IC50 は低下した

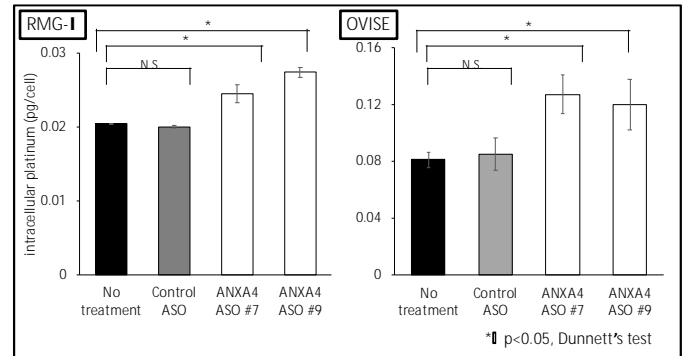


図5 AnxA4ASO により細胞内プラチナ含有量は増加した

他の卵巣癌細胞株(OTOKO、SKOV3、OVSAHO、A2780)についてはいずれも ANXA4 の恒常的な発現レベルが低く、本検討の対象外とした。以上の結果を総合して、細胞内からのプラチナ製剤の排出が AnxA4 ASO により抑制され、細胞内のシスプラチン含有量が増え、その結果プラチナ感受性の改善がみられるという仮説に合致する結果となった。

(2) AnxA4 ASO の最適化

架橋構造の変化については、アミド型の架橋構造に変化させた ASO や両端の人工核酸の挿入量を変化させた ASO を作成して in vitro で AnxA4 の発現の評価を行ったが AnxA4 の抑制に関して有意な変化が得られなかった。現在他の構造や、架橋構造への修飾基の検討をおこなっている。

(3) in vivo におけるシスプラチン投与時の腫瘍増殖抑制と AnxA4 の発現抑制の関連

結果、AnxA4ASO とシスプラチンを併用した群では他の3群に比して、腫瘍の増殖が有意に抑制された(図6)。ANXA4ASO 投与群では、無治療、コントロール投与群に比して、有意に ANXA4 の発現が抑制されていることが明らかになった。(図7)

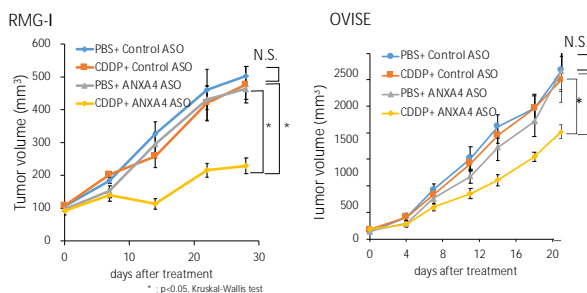


図6 AnxA4ASO と CDDP 投与群では腫瘍増殖が抑制された

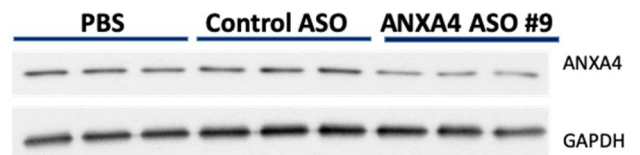


図7 AnxA4ASO 投与群では AnxA4 が抑制された(RMG-1)

(4) 腫瘍免疫と人工核酸投与の関係の評価

腫瘍組織の切片を CD49b 抗体(NK 細胞活性)、F4/80 抗体(マクrophage 活性)で免疫染色し、抗腫瘍免疫と ASO 投与の関係性の評価を行なった結果、免疫の賦活化は確認されなかった。これらの結果から、AnxA4 ASO は腫瘍免疫とは関係なく、直接的に抗がん剤抵抗性を改善し、抗腫瘍効果を発揮していると考えられた(図8)

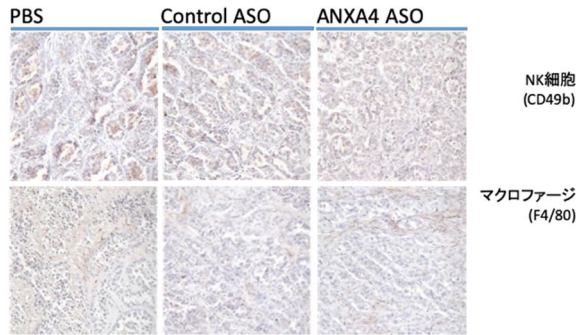


図8 AnxA4ASO 投与群でマクロファージ、Nk 細胞の集積は確認されなかった

(5) 手術摘出卵巣癌組織由来 Patient-Derived tumor Xenografts (PDX)の開発
 卵巣癌の手術検体を超免疫不全マウス(NOG マウス)の皮下に移植し、PDX マウス数系統を樹立した。PDX 腫瘍の凍結保存を行い、今後治療効果の検討を行なえる体制の準備を行った。

以上より、AnxA4 はプラチナ製剤と併用することで、AnxA4 の発現を抑制し、卵巣明細胞癌のプラチナ抵抗性を改善して腫瘍増殖抑制に寄与することが示された。(論文投稿準備中)
 今後、PDX マウスを用いて、より臨床に近い状況での評価や投与経路の工夫を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

1. Satoshi Nakagawa

Targeting Annexin A4 with antisense oligonucleotides improves platinum resistance of ovarian cancer

AACR Annual Meeting 2019 Atlanta

2. Reisa Kakubari, Satoshi Nakagawa, Eiji Kobayashi, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura

Antisense oligonucleotide of Annexin A4 improves platinum resistance in ovarian clear cell carcinoma

第70回日本産科婦人科学会学術講演会 2018年 名古屋

3. Satoshi Nakagawa

2',4'bridged nucleic acid antisense for Annexin A4 Improve platinum drug resistance of ovarian clear cell carcinoma 第69回日本産科婦人科学会学術集会 2017年 広島

4. 角張玲沙 中川慧

アネキシン A4 に対するアンチセンス核酸は卵巣明細胞癌の薬剤耐性を改善させる

第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2017年 熊本

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。