

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462602

研究課題名(和文) ANXA4サブタイプの機能解析に基づく卵巣明細胞腺癌の抗がん剤耐性克服戦略の研究

研究課題名(英文) Study to overcome the inherent chemoresistance of ovarian clear cell adenocarcinoma based on the functional analyses of ANXA4 molecular subtypes

研究代表者

宮城 悦子 (MIYAGI, Etsuko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40275053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮性卵巣がんの中でも、卵巣明細胞腺癌は日本人に多く化学療法に抵抗性で予後不良であり、その治療成績の改善は喫緊の課題である。本研究代表者らが明細胞腺癌に特徴的に高発現するタンパク質として見出したアネキシンA4 (ANXA4) には、抗がん剤耐性など様々な機能が報告されているがその作用機構を含めて詳細は不明である。

本研究では、翻訳後修飾で生ずる2種類のANXA4サブタイプの機能が異なり、それぞれが、卵巣がん治療に使用されるパクリタキセル、カルボプラチンに対する抵抗性に関わることで、その機構の一部に、細胞小器官のリソゾームが関わるオートファジーと呼ばれる自己貪食能が関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Clear cell adenocarcinoma (CCA) is the frequent histologic subtype of the epithelial ovarian cancer in Japanese population. Because it shows resistance to chemotherapy resulted in poor prognosis, the improvement of the treatment is really needed. The group of the principal investigator of this research found annexin A4 (ANXA4) as a highly enriched protein in CCA. Although ANXA4 has been known as a protein involved in chemoresistance in other types of cancers, precise mechanisms of the resistance is still unclear.

The present study disclosed that there are two different molecular types of ANXA4, and each type is involved in Paclitaxel and Carboplatin resistance respectively, which are usually used in ovarian cancer chemotherapy. We further demonstrated a possibility that the chaperon-mediated autophagy through LAMP-2 protein could be involved in the chemoresistance mechanism.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣がん パクリタキセル ANXA4 卵巣明細胞腺癌

1. 研究開始当初の背景

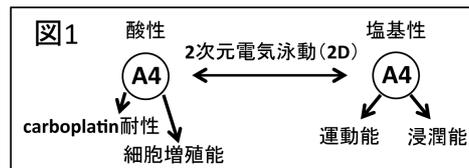
卵巣明細胞腺癌 (ovarian clear cell adenocarcinoma: OCCA) は早期で発見される率が高いにも関わらず再発率が高く、また化学療法に抵抗性を示す予後不良の上皮性卵巣がん (epithelial ovarian cancer: EOC) である。本邦では欧米諸国に比べて EOC 全体に占める OCCA の割合が高く、治療成績改善は特に本邦における喫緊の課題である。OCCA は stage I で発見される率が高く、しばしば内臓症、血栓塞栓症、高カルシウム血症を合併するなどの特徴を示し、他の EOC とは一線を画する腫瘍である。一方で治療は OCCA に特化したものはなく、他の EOC と同様の手術療法 + プラチナム系薬剤とタキサン系薬剤、あるいは CPT-11 併用による化学療法が行われており、OCCA は化学療法に抵抗性を示すことから予後が不良である。

OCCA が示す抗がん剤抵抗性については、OCCA の低い増殖能、細胞内から薬剤を排出する ATP-binding cassette (ABC) transporter の *ABCC3*, *ABCF2* の発現、薬剤解毒に関わる glutathione peroxidase 3 (*GPx3*), glutaredoxin (*GLRX*), superoxide dismutase (*SOD2*) の発現や DNA 修復能の関与などが指摘されている (引用文献)。研究代表者のグループも含めた複数の最近の研究から OCCA に特徴的に高発現していることが明らかとなった annexin A4 (ANXA4) タンパク質は様々な機能を有することが実験的に示されているが、特に、プラチナム系の抗がん剤抵抗性に関与する可能性があり注目されている。Kim らは ANXA4 を高発現させた OCCA 細胞が *in vitro* で carboplatin に対する抵抗性を示し、carboplatin の細胞内濃度が低下していることを報告している (引用文献)。

2. 研究の目的

研究代表者らは OCCA で発現する ANXA4 には翻訳後修飾の違いによると推定される等電点の異なる 2 つのサブタイプが存在すること、培養 OCCA 細胞株や臨床検体の間で

両者の存在量比が異なること、ANXA4 サブタイプの発現量比が顕著に異なる 2 種類の OCCA 細胞株において ANXA4 発現を恒常的に knock-down した細胞を作製して解析すると、等電点電気泳動でより酸性側に泳動されるサブタイプ (acidic-A4) と、その塩基性側に泳動されるサブタイプ (basic-A4) の機能に差があり、acidic-A4 が carboplatin 耐性に関与する可能性があること、等を見出して研究を進めている (図 1)。



ANXA4 の 2 つのサブタイプを生む可能性のある翻訳後修飾については、リン酸化と histone deacetylase (HDAC) によるリジン残基の脱アセチル化 (リジン残基が陽性に荷電する) について検討して否定的な結果を得ている。リジン残基脱アセチル化は、抗がん剤として臨床応用も始まっている SAHA (vorinostat) などの所謂 HDAC inhibitor (HDACI) を用いて検討したが、これらの HDACI では抑制されない Sirt1 に代表される sirtuin family に属する class III HDAC の研究も他分野では進んでいる。

本研究では、OCCA における ANXA4 の 2 つのサブタイプの成因を分子レベルで解析し、その修飾の違いによる機能差を糸口に、ANXA4 の機能、特に抗がん剤耐性に関わる機能について解析し耐性克服技術の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

株化ヒト卵巣明細胞腺癌細胞のうち、acidic-A4 を圧倒的に発現する OVTOKO 細胞と、acidic- / basic-A4 の両方を発現するが basic-A4 が優位である OVISE 細胞を見出し、更に、各細胞で ANXA4 発現を shRNA により恒常的にノックダウンした細胞株を樹立している (図 2)。これらの細胞を用いた *in vitro* の実験で、抗がん剤耐性と

機能の異なる2つのANXA4サブタイプを生む可能性のある翻訳後修飾，に関する研究を進める．

ANXA4ノックダウン細胞株の検定

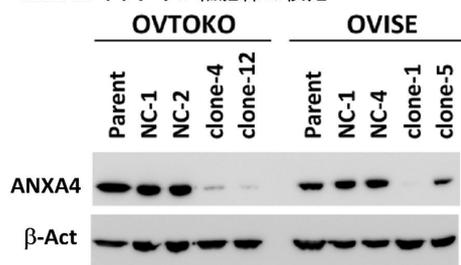


図2. shRNAの恒常的発現によるANXA4ノックダウン細胞のウエスタンブロット.

先行する研究では OVISe, OVTOKO の2つの細胞株それぞれについて，野生型対照細胞（非 ANXA4 標的 shRNA の導入株）と ANXA4- ノックダウン細胞において，paclitaxel, carboplatin に対する抗がん剤抵抗性や，運動能・浸潤能などががん細胞の悪性形質に関わる表現系が変化することを示した．

(1) sirtuin family に属する NAD⁺依存性の class III HDAC, 特に Sirt1 による脱アセチル化が ANXA4 の2つのサブタイプ生成に關与する可能性を 培養 OCCA 細胞を用いた in vitro の薬理的解析で検討する．可能性が示唆されれば，shRNA を用いた遺伝子発現ノックアウト法を用いてより直接的に証明する．

(2) acidic- / basic-A4 の両方を発現するが basic-A4 が優位である OVISe 細胞からタンパク質を抽出，ANXA4 抗体を用いた免疫沈降法により ANXA4 タンパク質を濃縮し，質量分析などの手法で，アミノ酸残基の修飾について解析する．特にアセチル化されると陽性電価を失うリジン残基に注目する．

(3) OCCA 細胞の薬剤耐性や，その他の表現系に発現に關与する分子が明らかにされた時点で，実際の外科切除卵巣がん組織での免疫染色による発現解析研究を進める．

4. 研究成果

(1) sirtuin family に属する NAD⁺依存性の class III HDAC, 特に Sirt1 による脱アセ

チル化が ANXA4 の2つのサブタイプ生成に關与する可能性の検討：1次元の電気泳動による分子量には差がなく，等電点に差がある ANXA4 の2つのサブタイプの成因について，これまでの解析では，まず，リン酸化による翻訳後修飾とそれによる陽性電価の獲得を想定し，脱リン酸化酵素処理，脱リン酸化酵素阻害剤の処理などの薬理的な手法で解析したが，關与は否定的であった．また，リジン残基のアセチル化による陽性電価の喪失を想定し，培地に HDACi を添加する解析でも，2つのサブタイプの等電点の変化は見られなかった．そこで，HDACi による阻害を受けない class III HDAC である Sirt1 によるリジン残基のアセチル化の可能性を検討した．ANXA4 の2つのサブタイプを発現する OVISe 細胞の培地に Sirt1 活性阻害剤である NADH を添加し，8時間，24時間，48時間後に細胞からタンパク質を抽出して2次元電気泳動する薬理的な実験を行ったが，NADH 添加で，2つのサブタイプの量比に変化は見られなかった．総合すると，ANXA4 の2つのサブタイプ生成に，リン酸化，リジン残基のアセチル化の關与は否定的であると推測される．

(2) 質量分析による ANXA4 サブタイプ生成の解析：OVISe 細胞から ANXA4 タンパク質を抗 ANXA4 抗体により免疫沈降することができれば，質量分析による解析が可能となる．そこで，入手可能な市販されている ANXA4 抗体を使って様々な条件を検討したが，ANXA4 タンパク質を免疫沈降することができなかった．そこで，免疫沈降やウエスタンブロットに使用できる定評のある抗体が市販されている FLAG タグを付加する ANXA4-FLAG 発現ベクターを作成，2つのサブタイプを産生する OVISe 細胞に導入して強制発現させる系の構築を試みた．ANXA4-FLAG の産生には成功したが，抗 FLAG タグ抗体による ANXA4-FLAG の免疫沈降はできなかった．FLAG タグの位置や FLAG 以外のタグの検討が今後の課題と考

えられる。

(3) ANXA4 が OCCA 細胞の運動能・浸潤能に影響するメカニズム: ANXA4 ノックダウンにより, acidic-A4 を専ら発現する OVTOKO 細胞は, その *in vitro* の運動能・浸潤能に影響を受けないが, basic-A4 優位であるが両方の ANXA4 を発現する OVISE 細胞は顕著な運動能・浸潤能の低下を認めた。basic-A4 が, この2つの表現系に関与することが推測されたが, そのメカニズムは不明である。そこで, 胃癌 AGS 細胞で, ANXA4 により遺伝子発現が誘導される遺伝子群の中から(引用文献), 文献的に細胞の接着や運動, 浸潤に関与することが報告されている膜タンパク質をコードする遺伝子として, RHAMM(引用文献), LAMP2(引用文献)に注目して, OVTOKO, OVISE 細胞での発現を検討した。その結果, ANXA4 ノックダウンで運動能, 浸潤能に顕著な影響を受けた OVISE 細胞のみで, LAMP2 タンパク質の高い発現と ANXA4 ノックダウンによる発現減弱が認められた。両細胞とも RHAMM の発現は僅かで, ANXA4 ノックダウンでの発現量の変化は見られなかった。basic-A4 が LAMP2 の発現を介して運動能, 浸潤能に関わる可能性が示唆された(図3)。

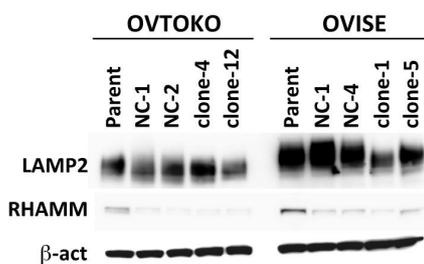


図3. OVISE細胞, OVTOKO細胞におけるLAMP2, RHAMMタンパク質の発現とANXA4ノックダウンの影響。

(4) LAMP2 発現と Autophagy 関連分子の免疫染色による解析: 当初の研究では, ANXA4 と OCCA 細胞の運動能, 浸潤能との関係で着目した LAMP2 は, 最近の研究から chaperon mediated autophagy (CMA) に必須の分子で癌細胞の抗がん剤耐性にも寄与する可能性を示唆されている。そこで外科切

除卵巣癌のホルマリン固定パラフィン包埋病理検体で, LAMP2, autophagy 関連分子の Beclin-1, LC3A/B, 及び関連するシグナル分子として活性化(リン酸化)NF-kB p65 の免疫染色による解析を行った。LAMP2 の発現は OCCA を含む様々な組織型の EOC で発現が認められた。また, LAMP2 発現陽性の腫瘍では, Beclin-1, LC3A/B, 活性化型 NF-kB の発現を伴う傾向が見られた(図4,5)。

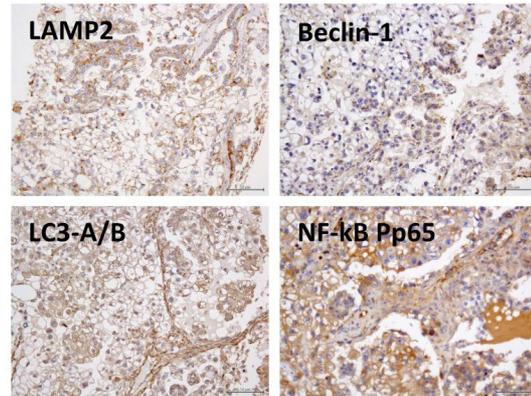


図4. 卵巣明細胞腺癌組織におけるLAMP2, Beclin-1, LC3-A/B, 活性化型リン酸化NF-kB p65の免疫染色。

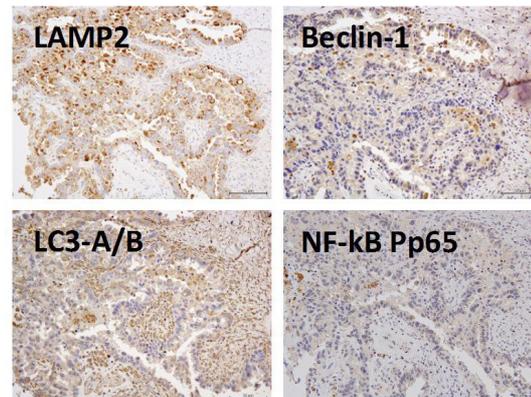


図5. 卵巣漿液性腺癌組織におけるLAMP2, Beclin-1, LC3-A/B, 活性化型リン酸化NF-kB p65の免疫染色。

< 引用文献 >

- 総説 Itamochi, et al.: Cancer Sci 99, 2008, 653-8.
Kim A, Enomoto T, Serada S, et al.: Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. Int J Cancer 125, 2009, 2316-22.

Lin LL, Huang HC, Juan HF:
Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays. *PLoS One* 7: e44615, 2015.

Foley JP, Lam D, Jiang H, et al.:
Toll-like receptor 2 (TLR2), transforming growth factor-beta, hyaluronan (HA), and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) are required for surfactant protein A-stimulated macrophage chemotaxis. *J Biol Chem* 287, 2012, 37406–19.
Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, et al.:
Letesson JJ, Van den Brule F, et al.:
Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer* 75, 1998, 105–11.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)すべて査読有

Koizume S, Yamada R, Miyagi E, Miyagi Y, et al. 12 人中 10 番目:
High-level secretion of tissue factor-rich extracellular vesicles from ovarian cancer cells mediated by filamin-A and protease-activated receptors. *Thromb Haemost*, 115(2): 299-310, 2016. doi: 10.1160/TH15-03-0213.
Umayahara K, Miyagi E, Takizawa K, et al. 17 人中 6 番目: Phase II study of concurrent chemoradiotherapy with weekly cisplatin and paclitaxel in patients with locally advanced uterine cervical cancer: The JACCRO GY-01 trial. *Gynecol Oncol*, 140(2): 253-258, 2016. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.12.008.
Mizushima T, Asai-Sato M, Miyagi E, et al. 13 人中 13 番目: Aberrant expression of the cell polarity regulator aPKC λ is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A possible marker for predicting CIN prognosis. *Int J Gynecol Pathol*, 35(2): 106-117, 2016. doi: 10.1097/PGP.0000000000000228.
Asano R, Hirahara F, Miyagi E, et al. 10 人中 10 番目: Aberrant expression of erythropoietin in uterine leiomyoma:

implications in tumor growth. *Am J Obstet Gynecol*, 213(2): 199.e1-8, 2015. doi: 10.1016/j.ajog.2015.02.016.
Koizume S, Miyagi Y. Diverse Mechanisms of Sp1-Dependent Transcriptional Regulation Potentially Involved in the Adaptive Response of Cancer Cells to Oxygen-Deficient Conditions. *Cancers (Basel)* 8(1), 2015. Review. doi: 10.3390/cancers8010002.
Koizume S, Miyagi Y. Tissue factor-factor VII complex as a key regulator of ovarian cancer phenotypes. *Biomark Cancer* 6; 7(Suppl 2):1-13, 2015. doi: 10.4137/BIC.S29318. Review.
Koizume S, Miyagi Y. Anti-apoptotic genes are synergistically activated in OVSAYO cells cultured under conditions of serum starvation and hypoxia. *Genomics Data* 5:129-131, 2015. doi:10.1016/j.gdata.2015.05.029
Koizume S, Yamada R, Miyagi E, Miyagi Y, et al. 10 人中 7 番目: Lipid starvation and hypoxia synergistically activate ICAM1 and multiple genes in an Sp1-dependent manner to promote the growth of ovarian cancer. *Mol Cancer*, 14(1): 77, 2015. doi: 10.1186/s12943-015-0351-z.
Chijiwa T, Yamada R, Miyagi Y, et al. 18 人中 17 番目: Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. *Int J Oncol* 47: 61-70, 2015. doi: 10.3892/ijo.2015.2997.
Umeda S, Miyagi E, Furuya M, et al. 9 人中 3 番目: Uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors (UTROSCT) with metastasis: clinicopathological study of two cases. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(3): 1051-1059, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971308/>
Asai-Sato M, Hirahara F, Miyagi E, et al. 6 人中 6 番目: Reappraisal of mechanical exfoliating cytology for the detection of peritoneal dissemination during the surgical staging of epithelial ovarian carcinomas and borderline tumours. *Acta Cytol*, 58(3): 255-261, 2014. doi: 10.1159/000360412.
Tokinaga A, Miyagi E, et al. 7 人中 7 番

目: Colonic low-grade endometrial stromal sarcoma and orthotopic endometrial stromal tumor with limited infiltration sharing the JAZF1-SUZ12 gene fusion. *Pathol Int*, 64(4): 178-182, 2014. doi: 10.1111/pin.12151.

Ihata Y, Miyagi E, Hirahara F, et al. 9人中2番目: Amino acid profile index for early detection of endometrial cancer: verification as a novel diagnostic marker. *Int J Clin Oncol*, 19(2): 364-372, 2014. doi: 10.1007/s10147-013-0565-2.

Koizume S, Miyagi Y. Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII pathway: Possible therapeutic targets. *World J Clin Oncol* 5(5):908-920, 2014. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.908.

Nagahama K, Miyagi E, Tanaka R, Furuya M, et al. 8人中6番目: A case of synchronous mucinous metaplasia and neoplasia of the female genital tract without an STK11 or KRAS mutation. *Gynecol Oncol Case Rep*, 5: 4-5, 2013. doi: 10.1016/j.gynor.2013.02.005.

Arakawa N, Miyagi E, Miyagi Y, Hirano H, et al. 9人中2番目: Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Proteome Res*, 12(10): 4340-4350, 2013. doi: 10.1021/pr400282j.

Mogami T, Yamada R, Miyagi Y, Miyagi E, et al. 12人中12番目: Annexin A4 is involved in proliferation, chemo-resistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *PLoS One*, 8(11): e80359, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080359.

[学会発表](計5件)

Miyagi E, Motoki Y, Wark JD, Garland SM, et al. 8人中1番目: Web-based survey on knowledge for cervical cancer prevention among young women: comparison in Japan and Australia. EUROGIN 2015, Sevilla (Spain), 2015, 2.4

Miyagi E, Sukegawa A, Wark JD, Garland SM,

et al. 9人中1番目: Surveys on attitudes for HPV vaccination among young women in Kanagawa Prefecture, Japan. 15th IGCS, Melbourne (Australia), 2014, 11.9

Miyagi E, Motoki Y, Hirahara F, et al. 11人中1番目: Women against cervical cancer in Japan; Local activities in Yokohama City. EUROGIN2013, Florence (Italy), 2013, 11.3

Furuya M, Kobayashi N, Miyagi E, Miyagi Y: Inflammatory microenvironment of endometriosis-associated ovarian cancers: Suppressed CXCL4 and SOCS1 in the macrophages. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜(神奈川県横浜市), 2013, 10.4

Itoh S, Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Miyagi Y, et al. 8人中5番目: Characteristics of tissue-factor bearing microparticles secreted from ovarian cancer cells. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜(神奈川県横浜市), 2013, 10.3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 悦子 (MIYAGI, Etsuko)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40275053

(2) 研究分担者

宮城 洋平 (MIYAGI, Yohei)
地方独立行政法人神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がん分子病態学部・総括部長
研究者番号: 00254194

山田 六平 (YAMADA, Roppei)
地方独立行政法人神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がん生物学部・技幹
研究者番号: 30404974