

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11137

研究課題名(和文) 子宮平滑筋肉腫の治療標的であるAnnexin A4の機能解析

研究課題名(英文) Annexin A4 is a novel therapeutic target for uterine leiomyosarcoma.

研究代表者

藤田 征巳 (FUJITA, MASAMI)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：60303963

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)：子宮平滑筋肉腫(LMS)は極めて予後不良であり新規治療法の開発はもちろん、治療の可能性につながる因子の同定がのぞまれる。申請者はプラチナ製剤の耐性に強く関与しているAnnexin A4 (Anx A4)がLMSの治療標的となりうるかを解析した。Anx A4はLMS細胞株3株のうち2株で、臨床検体では20例中11例(55%)で発現を認めた。SK-LMS細胞株に対し、siRNAを用いAnx A4の発現を抑制したところ、シスプラチンの50%阻害濃度は17.2 μ Mから9.4 μ Mへと有意に低下した($p<0.01$)。機序としてはシスプラチン暴露後の細胞内プラチナ蓄積量が増加する事を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラチナ耐性に大きく関わる因子として我々はAnx A4の解析を続けており、卵巣癌や子宮内膜癌において有望な治療標的因子となることを報告している。しかし、予後不良な子宮平滑筋肉腫での解析は行えていなかった。本研究は、Anx A4の発現が子宮平滑筋肉腫にもあることが示し、また卵巣癌や子宮内膜癌と同様に治療標的因子になりうることを示したことで非常に有意義である。子宮平滑筋肉腫は前述の様に非常に予後不良な疾患であり、Anx A4が有望な治療標的であることが示されたことは子宮平滑筋肉腫に苦しむ患者の予後を改善しうるため、社会的にも貢献できる研究だと考える。

研究成果の概要(英文)：Resistance to platinum drugs remains a significant problem in uterine leiomyosarcoma (LMS). We investigated the role of Annexin A4 (Anx A4) in the resistance to platinum drugs in LMS. The expression of Anx A4 was examined in LMS cell lines using Western blotting analysis. Anx A4 expression was investigated by immunohistochemistry (IHC) using clinical samples of LMS. The IC50 values for cisplatin were measured in SK-LMS parent cells, the SK-LMS-Anx A4-suppressed cell line (SK-LMS-A4 cells), which transfected the Anx A4 siRNA. The expression of Anx A4 was identified in 2 of 3 SK-LMS cells and was identified in 55% (11/20) of the LMS clinical samples using IHC. The IC50 values for cisplatin improved from 17.2 to 9.4 μ M in SK-LMS-A4 cells. Significantly more platinum had accumulated in SK-LMS-A4 cells compared to SK-LMS parent cells. These results indicate that expression of Anx A4 confers platinum resistance by promoting efflux of platinum drugs in LMS cells.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：Annexin A4 プラチナトランスポーター 子宮平滑筋肉腫 抗癌剤耐性 中和抗体

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

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫は早期に転移・再発をきたすことと抗癌剤抵抗性であるため有効な治療法がなく、他の婦人科癌に比べ、その予後は極めて悪い(国立癌センター 癌情報)。しかも、成人女性の約3割が有するとされる子宮筋腫との鑑別が極めて困難であり、子宮筋腫と誤って診断されて治療の機会を逸してしまうこともしばしばある。早期症例では手術療法が主治療であるが、術後の追加補助療法は確立されておらず、放射線や既存の抗癌剤も効果は限定的である。また進行・再発症例においても Gemcitabin + Docetaxel の併用化学療法で36%の奏効率が報告されている(Hensley ML et al. Gynecol Oncol. 2008; 109: 329-34)がPFSは4.4ヶ月であり、生存率の延長には寄与していない。これまでに明らかにされた分子標的治療薬の標的として研究された主だった遺伝子は PDGFR(Anderson SE et al. Int J Gynecol Cancer. 2006;16: 849-53)やKIT(Raspollini MR et al. Gynecol Oncol. 2005; 98: 334-5)など限られたもので、かつそれらをターゲットにした分子標的薬は有効な治療法として位置づけられるには至っていない。そのため、治療標的となる因子の解析や同定は急務である。

2. 研究の目的

子宮平滑筋肉腫は上述の様に、最も予後の悪い疾患のひとつであり、かつ婦人科腫瘍の中で頻度の高い子宮筋腫との鑑別が極めて難しい。そのため、早期発見は困難であり治療を困難にしている。これまでに、PDGFR や KIT の高発現が報告されているが、それらをターゲットにした分子標的薬は有効な治療法にはなりえていない。そこで当研究では、以前、我々が卵巣明細胞癌に高発現し抗癌剤耐性因子として同定しえた Annexin A4 (Anx A4)に着目し、子宮平滑筋肉腫の治療標的となりうるかを検討することとした。

3. 研究の方法

細胞株

子宮平滑筋肉腫細胞株(SK-LMS、SKN、SK-UT1)を用いた。細胞はD-MEMもしくはF-12培地に10%ウシ血清(FBS)(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)、1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加したものを扱い、5% CO₂ の37°Cインキュベーターで培養した。

siRNAを用いたAnx A4のノックダウン

QUIAGENより購入した2種類のAnx A4 siRNAを用い、Anx A4の発現をノックダウンした。Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて遺伝子導入を行った。Anx A4をノックダウンした細胞株はそれぞれ、SK-LMS Anx A4 siRNA1 とSK-LMS Anx A4 siRNA2 とし、Control siRNAを遺伝子導入した株はSK-LMS Control siRNAとした。

IC₅₀(50%阻害濃度)測定

SK-LMS、SK-LMS Control siRNA 株、SK-LMS Anx A4 siRNA1、SK-LMS Anx A4 siRNA2 の4つの細胞について、D-MEM medium + 10% FBS+1% penicillin-streptomycin に懸濁し、1000 cells/well の密度で96-well plates (Costar, Corning Inc, Corning, NY, USA) にまき、24時間培養し、0-100 μM のシスプラチンに暴露させ、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。

ウェスタンブロッティング

細胞はRIPA buffer(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 社, USA)にて1次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBSTで5分間、6回洗浄し、HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (HAF017, R&D 社, Minneapolis, USA)で2次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBS-Tで5分間、6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。

免疫組織学染色

我々の以前の報告と同様の方法にて免疫組織学染色を行った。(Matsuzaki S et al, Int J Cancer. 2018;142:1056-1066.) 子宮平滑筋肉腫の臨床検体 20 例を用い、Anx A4 の発現の評価を行った。1 次抗体として Goat polyclonal anti- Anx A4 antibody (SC-1930, Santa Cruz 社, USA)を用い、1 時間暴露した。2 次抗体や染色方法としては VECTA STAIN ABC kit (PK-4001; Vector Laboratories)を用いた。染色の評価に関しては、光学顕微鏡を用いて観察を行った。染色の評価は下記に従って、染色強度および面積の score を掛けたものを、それぞれ 0~3 = 陰性、4~6 = 陽性、7~9 = 強陽性とした。

染色強度	なし	弱い	普通	強い
染色面積	0~9%	10~40%	41~70%	71~100%
score	0	1	2	3

細胞内プラチナ定量

SK-LMS、SK-LMS Control siRNA 株、SK-LMS Anx A4 siRNA1、SK-LMS Anx A4 siRNA2 の 4 つの細胞をそれぞれ 3×10^6 の 6 乗個の細胞を 15 cm dish に 2 枚ずつ散布した。翌日に、 $100 \mu\text{M}$ のシスプラチンに 1 時間暴露した後に、dish を PBS にて 3 回洗浄し通常の medium に交換した。3 時間後に細胞を回収し、Agilent 7500ce の ICP-MS (Agilent, Santa Clara, CA)を用いて、細胞内プラチナ定量を行った。

統計解析

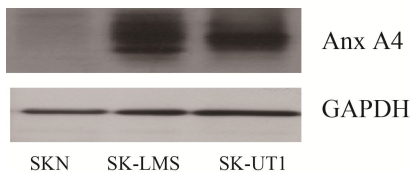
統計解析は One-way ANOVA test と Dunnett テストにより群間の有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

4 . 研究成果

「子宮平滑筋肉腫細胞における Anx A4 の発現」

子宮平滑筋肉腫細胞株 (SK-LMS、SKN、SK-UT1) において Anx A4 の発現の解析を行ったところ、SK-LMS と SK-UT1 の 2 つの細胞株で発現を認めた。我々は Anx A4 とプラチナ耐性との関連を以前報告しており、子宮平滑筋肉腫におけるプラチナ耐性因子の有望な候補として Anx A4 の検討を行っていく方針とした。(Figure1A)

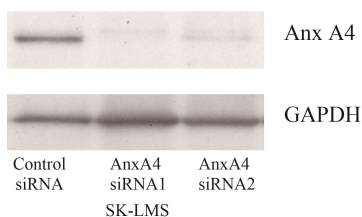
Figure 1A



「子宮平滑筋肉腫臨床検体における Anx A4 の発現」

子宮平滑筋肉腫細胞株において Anx A4 の発現を認めたが、臨床検体において同様に発現を認めるかは未だ解析されなかったため、臨床検体においても同様に発現を認めるか、免疫組織学染色にて解析を行った。臨床検体 20 例中 Anx A4 は 6 例(30%)で強い発現を認め、5 例(25%)で中等度の発現を認めた。

Figure 1B

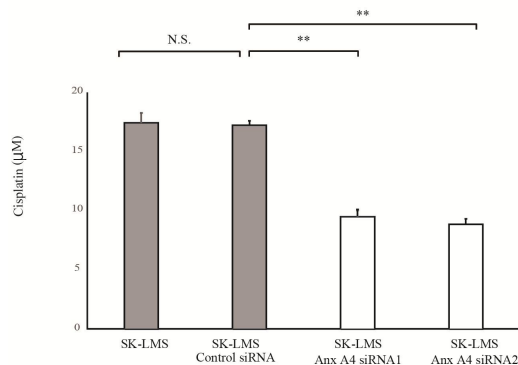


「SK-LMS 子宮平滑筋肉腫細胞株に対して Anx A4 の発現を抑制したところシスプラチンの感受性を改善した」

SK-LMS 細胞株において、Anx A4 をノックダウンした後に、シスプラチンの感受性を解析した。Anx A4 のノックダウンに伴い発現が抑制されていることを、Western Blotting 法にて確認した。(Figure 1B)

SK-LMS 細胞株における Anx A4 のノックダウンは Control siRNA 株におけるシスプラチンの IC₅₀ (17.2μM)と比較して、SK-LMS Anx A4 siRNA1 細胞と SK-LMS Anx A4 siRNA2 細胞で有意な低下を認めた(SK-LMS Anx A4 siRNA1; 9.4μM, p<0.01、SK-LMS Anx A4 siRNA2; 8.8μM, p<0.01) (Figure 1C) これらの結果は Anx A4 の発現を抑制することができれば、子宮平滑筋肉腫に対してシスプラチンが有効な薬剤になりうることを示唆している。

Figure 1C



「Anx A4 の発現抑制はシスプラチン暴露後の細胞内プラチナ蓄積量を減少させた」

SK-LMS、SK-LMS Control siRNA 株、SK-LMS Anx A4 siRNA1、SK-LMS Anx A4 siRNA2 の4つの細胞株について、シスプラチン暴露後のプラチナ蓄積量を評価した。SK-LMS Control siRNA 株細胞におけるプラチナの細胞内蓄積量 (3.8ng/dish)と比較して、SK-LMS Anx A4 siRNA1 と SK-LMS Anx A4 siRNA2 細胞で有意な増加を認めた (SK-LMS Anx A4 siRNA1 8.5ng/dish, p<0.01、SK-LMS Anx A4 siRNA2; 8.7ng/dish, p<0.01)。これらの結果より Anx A4 が子宮平滑筋肉腫細胞株においてプラチナの取り込み、もしくは排出には関連していることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Hiramatsu K, Serada S, Enomoto T, Takahashi Y, Nakagawa S, Nojima S, Morimoto A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Fujimoto M, Takemori H, Ueda Y, Yoshino K, Morii E, Kimura T, Naka T.

LSR Antibody Therapy Inhibits Ovarian Epithelial Tumor Growth by Inhibiting Lipid Uptake

Cancer Res, 78:516-27, 査読有, 2018

DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-17-0910

2. Yoshino K, Kamiura S, Yokoi T, Nakae R, Fujita M, Takemura M, Adachi K, Wakimoto A, Nishizaki T, Shiki Y, Tsutsui T, Kanda Y, Kobayashi E, Hashimoto K, Mabuchi S, Ueda Y, Sawada K, Tomimatsu T, Kimura T.

Combination chemotherapy with irinotecan and gemcitabine for taxane/platinumresistant/refractory ovarian and primary peritoneal cancer: a multicenter phase I/II trial (GOGO-Ov 6).

Cancer Chemother Pharmacol, 80:1239-47, 査読有, 2017

DOI : 10.1007/s00280-017-3468-5

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Nakagawa S, Yoshino K, Kakubari R, Matsuzaki S, Okazawa A, Matsuzaki S, Kobayashi E,

Ueda Y, Naka T, Kimura T.

2',4'bridged nucleic acid antisense for Annexin A4 Improve platinum drug resistance of ovarian
第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017

2. Kakuda M, Matsuzaki S, Nakae R, Tanaka Y, Iwamiya T, Okazawa A, Kobayashi E, Ueda Y,
Yoshino K, Kimura T.

【ワークショップ】 Novel strategy to overcome platinum resistance < 優秀演題賞 >
第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017

3. 角張玲沙 中川 慧 世良田 聡 松崎慎哉 上田 豊 吉野 潔 笠原勇矢
小比賀 聡 仲 哲治 木村 正

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

4. Kakubari R, Serada S, Nakagawa S, Matuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Naka T, Kimura T.

Antisense oligonucleotide of Annexin A4 improved platinum resistance in ovarian clear cell cancer.
第 76 回日本癌学会学術集会 2017

5. Kakuda M, Matsuzaki S, Nakae R, Tanaka Y, Iwamiya T, Okazawa A, Kobayashi E, Ueda Y,
Yoshino K, Kimura T

Novel strategy to overcome platinum resistance in leiomyosarcoma (LMS); blocking ATP7B by copper
ion

The 69th Annual Congress of the Japanese Society of Obstetrics and Gynecology (国際学会) 2017 年

6. ATP7A is a promising therapeutic target for uterine leiomyosarcoma

Kakuda M, Matsuzaki S, Tanaka Y, Takata T, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Kimura T.
第 75 回日本癌学会 2016

7. Kakuda M, Matsuzaki S, Tanaka Y, Takata T, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K Kimura T.

ATP7A is a promising therapeutic target for uterine leiomyosarcoma
第 75 回日本癌学会 2016

8. 角田 守. 松崎慎哉. 田中佑典. 高田友美. 小林栄仁. 上田 豊. 吉野 潔.
木村 正.

ATP7B は子宮平滑筋肉腫の治療標的である
第 58 回日本婦人科腫瘍学会 2016

9. 角田 守. 松崎慎哉. 田中佑典. 高田友美. 小林栄仁. 上田 豊. 吉野 潔.
木村 正.

ATP7B は子宮平滑筋肉腫の治療標的である
第 15 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. Otake A, Ueda Y, Matsuzaki S, Yoshino K, Kimura T.

Taxane-induced peripheral neurotoxicity: A review

Nova Science Publishers, Advances in Medicine and Biology, 4:103-46, 2017

2. Otake A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K.

Chemotherapy for Uterine Sarcomas: A Review

Bentham Science, Frontiers in Drug Design & Discovery, 7:139-151, 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上田 豊

ローマ字氏名：UEDA Yutaka

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁): 1 0 3 4 6 2 1 5

研究分担者氏名：小林 栄仁

ローマ字氏名：KOBAYASHI Eiji

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 5 0 6 1 4 7 7 3

研究分担者氏名：高田 友美

ローマ字氏名：TAKATA Tomomi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 3 0 4 3 7 4 2 0

研究分担者氏名：松崎 慎哉

ローマ字氏名：MATSUZAKI Shinya

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 0 0 4 6 7 5 6 5

研究分担者氏名：吉野 潔

ローマ字氏名：YOSHINO Kiyoshi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 9 0 3 6 2 7 3 0

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。