

令和 2 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：2017～2019

課題番号：17K11278

研究課題名(和文) ATP7Bを標的とした子宮平滑筋肉腫に対する新規治療法の樹立

研究課題名(英文) Copper ions are promising therapeutic target against ATP7B positive uterine leiomyosarcoma

研究代表者

松崎 慎哉 (Matsuzaki, Shinya)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467565

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)：申請者はATP7Bが子宮平滑筋肉腫細胞株のSK-LMS-1において発現を認め、臨床検体では14例中11例(78.6%)で発現を認めることを同定した。SK-LMS-1細胞に対しpRS-ATP7B shRNAを遺伝子導入し恒常的にATP7Bを抑制した細胞株を樹立した(SK-LMS-ATP7B細胞)。SK-LMS-ATP7B細胞はin vitro, in vivoにおいてプラチナ耐性が改善することが示された。ATP7Bに対する阻害薬は現在のところ開発されていないが、本研究ではCuSO4を投与することにより、ATP7Bの機能が抑制されることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は難治性疾患である子宮平滑筋肉腫の予後を改善させうる研究成果を示した。本研究で解析を行ったATP7Bは子宮平滑筋肉腫のみならず、他の婦人科癌や癌腫においても発現を認めると予想され本研究でえられた成果は他の癌種にも用いることができると考えられる。本研究ではプラチナ耐性に着目したが、ATP7Bを発現する腫瘍では銅イオンを併用して投与することで必要なプラチナ製剤の量を減少させ、副作用を軽減させることも可能だと考えられる。銅イオンは人体に安全に投与できる量も知られており、比較的早期に臨床応用ができると考えられ、今後の癌の治療に速やかに応用されると期待される点で社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Platinum resistance is a major concern in leiomyosarcoma (LMS) treatment. The role of ATP7B in LMS resistance to platinum drugs was investigated both in vitro and in vivo. Western blot analysis of SK-LMS-1 cells (leiomyosarcoma cell line) revealed strong ATP7B expression. ATP7B silencing with siRNA resulted in a significantly reduced cisplatin half-maximal inhibitory concentration value. Immunohistochemistry showed the overexpression of ATP7B in 11 of 14 clinical LMS samples (78.6%). A permanent SK-LMS-ATP7B-suppressed cell line (SK-LMS-7B cells) was generated and tumor-xenografted mice were produced via inoculation with SK-LMS-1 parent or SK-LMS-7B cells. Cisplatin exhibited a significant antitumor effect in xenografts of SK-LMS-7B cells compared with those of SK-LMS-1 parent cells. Copper sulfate (CuSO4) was identified as a preferential inhibitor of ATP7B expression both in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：婦人科腫瘍学 プラチナ耐性 子宮平滑筋肉腫 プラチナ製剤 ATP7B

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫 (以下、LMS)はI期ですら5年生存率が約56%で、早期に転移・再発をきたすため、II期以上の5年生存率は約7%であり、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)。早期症例では手術が主治療であるが、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。分子標的治療薬の開発が望まれるが、標的となりうる主だった遺伝子はPDFGR (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なっていない。そこで本研究では、子宮平滑筋肉腫の抗癌剤耐性すなわちプラチナ耐性克服のターゲットとして、銅イオン (Cu<sup>2+</sup>) のトランスポーターであり、かつ細胞内のプラチナを細胞外へ排出するプラチナトランスポーターであるATP7Bに着目した (Clin Cancer Res. 2009;15: 3770-80, Future Med Chem. 2009; 1: 1125-42)。我々はATP7Bの機能抑制を行い、子宮平滑筋肉腫のプラチナ耐性が克服され、治療標的となることを報告している。これらの結果よりLMSに対して、ATP7Bは有効な治療標的となることは確かであるが、現在阻害薬がなく臨床応用に至っていない。そこで、本研究はATP7Bの阻害薬を開発しLMSのプラチナ耐性を克服することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究期間内で、ATP7BがLMSにおいてプラチナ耐性と関連していることを検討する。そして、関連がある場合はLMSの新規治療法として、ATP7Bに対する阻害剤を作成し、その有用性を証明する。In vitroで阻害剤の効果が確認できた場合は、続いてXenograftモデルにおいてATP7B阻害剤とプラチナ製剤の併用を行うことで抗腫瘍効果が認められるかを確認する。

### 3. 研究の方法

#### 細胞株

子宮平滑筋肉腫細胞 (SK-LMS-1、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)を添加したものをを用い、5% CO<sub>2</sub> の37°Cインキュベーターで培養した。

#### ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは過去と同様の方法で行った (Matsuzaki S *et al.* Int J Cancer. 2014;134:1796-809.)。1次抗体はRabbit monoclonal anti-ATP7B antibody (SAB1403592; Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を用い、2次抗体としてHRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK)を用いた。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

申請者の過去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.)。LMSの臨床検体14例を用い、ATP7Bの発現の評価を行った。

1次抗体としてrabbit polyclonal anti-ATP7B antibody (SAB1403592; Sigma-Aldrich)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

#### SK-LMS-1細胞に対してATP7Bの発現を恒常的に抑制させた細胞株の樹立

SK-LMS-1細胞株に対してATP7Bの発現を恒常的に抑制させた細胞株を樹立するため、SK-LMS-1細胞株にLipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いてATP7B shRNAを組み込んだpRSベクターをトランスフェクションし、30 ng/mlのPuromycin (Invitrogen)を用いることでセレクションした。2つのSK-LMS-1 ATP7B ノックダウン株を作成しそれぞれSK-LMS-7B-21、SK-LMS-7B-33細胞を作成した。また、コントロールとして、空ベクターをトラン

スフェクションしたコントロールベクター (SK-LMS CV 細胞)を樹立した。

### IC<sub>50</sub> (50%阻害濃度)測定

SK-LMS-1、SK-LMS CV、SK-LMS-7B-21、SK-LMS-7B-33 の4つの細胞について、D-MEM medium + 10% FBS + 1% penicillin-streptomycin に懸濁し、2000 cells/well の密度で 96-well plates (Costar, Corning Inc, Corning, NY, USA) にまき、24 時間培養し、0-500 μM の Cisplatin 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。

### SK-LMS-1 Xenograft モデルの樹立と Cisplatin 感受性試験

ICR nu/nu マウスに対し、SK-LMS-1、SK-LMS CV、SK-LMS-7B-21、SK-LMS-7B-33 細胞をそれぞれ 2.5×10<sup>6</sup> 細胞ずつ皮下移植を行った。Cisplatin 投与は 3 mg/kg の量を 1 週間に 2 回、4 週間にわたり腹腔内投与し、コントロールとして PBS を投与した。腫瘍体積は週 2 回、PBS もしくは Cisplatin 投与開始後 8 週間目まで行った。

### CuSO<sub>4</sub> 前投与後の Cisplatin の IC<sub>50</sub> 測定

SK-LMS-1 細胞に対し、CuSO<sub>4</sub> 15 μM を Cisplatin 投与 3 時間前から暴露した群 (CuSO<sub>4</sub> 処理群)と無処理群に対して様々な濃度の Cisplatin を投与し IC<sub>50</sub> を測定し、SK-LMS-1 細胞に対して CuSO<sub>4</sub> 前投与が Cisplatin 感受性に与える影響を検討した。

### 細胞内プラチナ定量

SK-LMS-1、SK-LMS CV、SK-LMS-7B-21、SK-LMS-7B-33、SK-LMS-1 CuSO<sub>4</sub> 前投与群、SK-LMS CV CuSO<sub>4</sub> 前投与群の 6 つの条件下で細胞内プラチナ蓄積量の定量を行った。それぞれ 4 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を 15 cm dish に 2 枚ずつ散布し、翌日に、100 μM の Cisplatin 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。SK-LMS-1 細胞および SK-LMS CV 細胞に対しては CuSO<sub>4</sub> を前投与しその後 Cisplatin 100 μM の暴露を 1 時間行った群も作成した。それぞれの細胞は medium 交換を行った 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。

### SK-LMS-1 Xenograft モデルにおける CuSO<sub>4</sub> 前投与による Cisplatin 感受性の変化の検討

ICR nu/nu マウスに対し、SK-LMS-1 細胞を 2.5×10<sup>6</sup> 細胞ずつ皮下移植を行った。SK-LMS-1 Xenograft モデルに対し、PBS 投与群、Cisplatin 投与群、CuSO<sub>4</sub> 前投与後に Cisplatin 投与 (CuSO<sub>4</sub> + Cisplatin 群)の 3 群において Cisplatin の感受性を検討した。各群はそれぞれ 5 匹ずつ作成した。Cisplatin 投与は 3 mg/kg の量を 1 週間に 2 回、4 週間にわたり腹腔内投与し、コントロールとして PBS を投与した。CuSO<sub>4</sub> + Cisplatin 群では CuSO<sub>4</sub> 1 mg/kg の投与を Cisplatin 投与 3 時間前に行った。腫瘍体積は週 2 回、PBS もしくは Cisplatin 投与開始後 8 週間目まで行った。

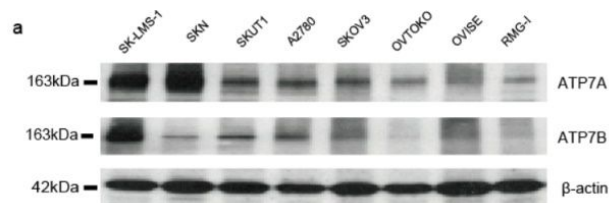
### 統計解析

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

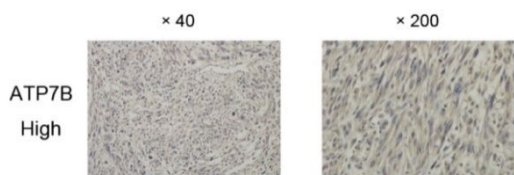
### 「子宮平滑筋肉腫における ATP7B の発現」

子宮平滑筋肉腫の細胞株である SK-LMS-1、SKN、SK-UT1 において ATP7B の発現を検討したところ SK-LMS-1 細胞株における発現を確認した。



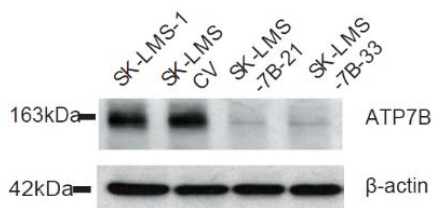
### 「LMS 臨床検体における ATP7B の発現」

LMS 細胞株において ATP7B 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示されていない。そのため、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ところ臨床検体 14 例中 ATP7B は 8 例 (57.2%) で下記に示す様な、強い発現を認めた。

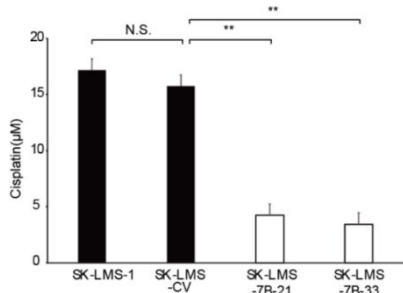


「SK-LMS-1 細胞に対して ATP7B の発現を抑制したところ Cisplatin の感受性を改善した」

SK-LMS-1 細胞株において、ATP7B をノックダウンした後に、Cisplatin の感受性を解析した。ATP7B のノックダウンは、Western Blotting 法にて確認した。

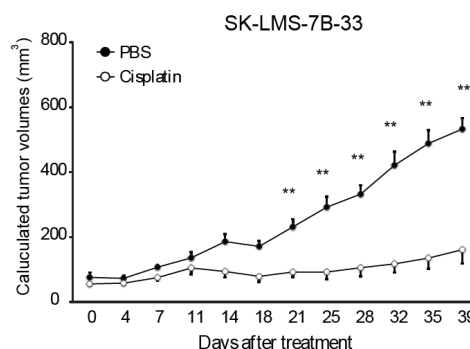
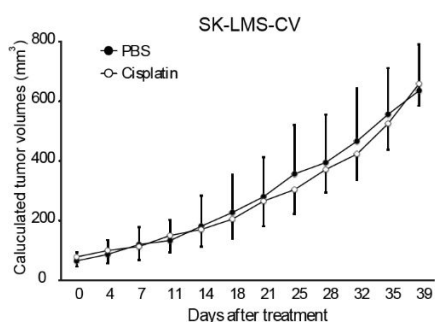


SK-LMS CV 細胞株の Cisplatin の IC<sub>50</sub> (17.2 μM) と比較して、SK-LMS-7B-21 細胞 (4.2 μM,  $P < 0.01$ ) と SK-LMS-1-7B-33 細胞 (3.4 μM,  $P < 0.01$ ) において IC<sub>50</sub> の有意な改善を認めた。これらの結果より ATP7B の抑制が LMS においてプラチナ感受性を改善させることを示した。



「SK-LMS-1 細胞株と ATP7B を抑制した SK-LMS-1 細胞株の Xenograft モデルにおける Cisplatin 感受性試験」

ATP7B が抑制された細胞株が Xenograft モデルにおいて Cisplatin 感受性が改善するかの検討を行った。SK-LMS CV 細胞では Cisplatin 投与は有意な腫瘍抑制効果を示すことができなかった (635.6 ± 63.4 mm<sup>3</sup>: PBS 投与群、533.0 ± 81.3 mm<sup>3</sup>: Cisplatin 投与群)。

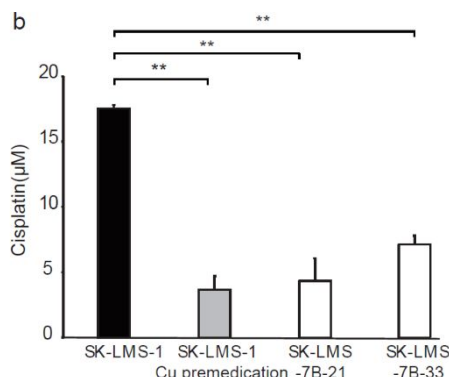


しかし、SK-LMS-7B-33 細胞を移植した Xenograft モデルでは (635.6 ± 63.4 mm<sup>3</sup>: PBS 投与群、138.0 ± 95.0 mm<sup>3</sup>: Cisplatin 投与群) の様に有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ( $P < 0.01$ )。これらの結果は ATP7B の発現を抑制することで LMS における Cisplatin 耐性が改善すること示唆している。

「CuSO<sub>4</sub> の前投与は Cisplatin 感受性を有意に改善させる」



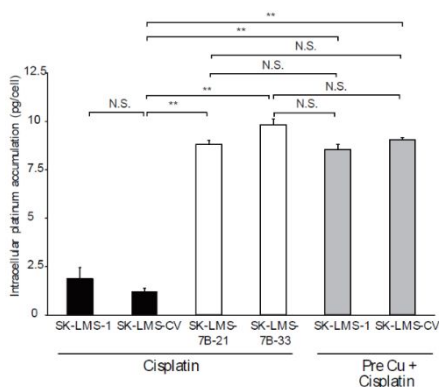
我々は ATP7B が銅のトランスポーターであることに着目し、銅イオンを負荷したのちに Cisplatin を投与すれば銅が優先的に排出され、Cisplatin の感受性が向上するのではないかと考えた。そこで SK-LMS-1 細胞に対し CuSO<sub>4</sub> を前投与した後に Cisplatin を投与した群と、前投与を行わない群とを比較した。前投与を行わない群では Cisplatin の IC<sub>50</sub> は 17.5 μM であったが、前投与群では 3.7 μM ( $P < 0.01$ ) と有意に IC<sub>50</sub> が低下していることを確認した。これらの IC<sub>50</sub> 値は ATP7B を抑制した SK-LMS-7B-21, 33 細胞と同程度であった。



### 「CuSO<sub>4</sub>を前投与することで Cisplatin 暴露後の細胞内プラチナ蓄積量が上昇する」

SK-LMS-1、SK-LMS CV 細胞に対して Cisplatin 100 μM を 3 時間暴露した後に細胞を回収して細胞内プラチナ蓄積量を測定したところそれぞれ 1.9 pg/cell、1.2 pg/cell であった。同条件で解析を行った SK-LMS-7B-21、7B-33 細胞ではそれぞれ 8.8 pg/cell、9.8 pg/cell と有意に上昇しており ( $P < 0.01$ )、この結果から ATP7B の発現抑制は細胞内プラチナ排出量の低下に伴う細胞内プラチナ蓄積量の増加を認めることを示した。

SK-LMS-1 細胞に対し、CuSO<sub>4</sub> を前投与した後に Cisplatin を同条件で投与したところ、細胞内プラチナ蓄積量は 8.6 pg/cell と有意に増加しており、SK-LMS-7B-21、7B-33 細胞と同程度であった。このことから、CuSO<sub>4</sub> の前投与は ATP7B のプラチナ排出を阻害し、細胞内プラチナ蓄積量を増加させ、その結果プラチナ感受性を向上させたと考えられた。



### 「CuSO<sub>4</sub>を前投与することで SK-LMS-1 の *in vivo* における Cisplatin 耐性が改善した」

CuSO<sub>4</sub> の前投与が Xenograft モデルにおいても Cisplatin 感受性を改善させるかの検討を行った。SK-LMS-1 Xenograft モデルにおいて Cisplatin 投与は有意な腫瘍抑制効果を示すことができなかった ( $698.0 \pm 97.4 \text{ mm}^3$ : PBS 投与群、 $676.1 \pm 110.3 \text{ mm}^3$ : Cisplatin 投与群,  $P = 0.895$ )。一方、CuSO<sub>4</sub> + Cisplatin 群では Cisplatin 投与は有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ( $259.8 \pm 58.5 \text{ mm}^3$ ,  $P = 0.006$ )。これらの結果から CuSO<sub>4</sub> は *in vivo* においても LMS の Cisplatin 耐性を改善させることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 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	4. 巻 80
2. 論文標題 Combination chemotherapy with irinotecan and gemcitabine for taxane/platinum-resistant/refractory ovarian and primary peritoneal cancer: a multicenter phase I/II trial (GOGO-0v 6)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol	6. 最初と最後の頁 1239-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-017-3468-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 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	4. 巻 78
2. 論文標題 LSR Antibody Therapy Inhibits Ovarian Epithelial Tumor Growth by Inhibiting Lipid Uptake	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 516-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-17-0910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kakuda M, Matsuzaki S, Ueda Y, Shiomi M, Matsuzaki S, Kimura T, Fujita M, Egawa-Takata T, Kobayashi E, Serada S, Yoshino K, Naka T, Kimura T	4. 巻 222
2. 論文標題 Copper ions are novel therapeutic agents for uterine leiomyosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Obstet Gynecol	6. 最初と最後の頁 64.e1-64.e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajog.2019.07.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakagawa S, Yoshino K, Kakubari R, Matsuzaki S, Okazawa A, Matsuzaki S, Kobayashi E, Ueda Y, Naka T, Kimura T
2. 発表標題 2',4'bridged nucleic acid antisense for Annexin A4 Improve platinum drug resistance of ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kakuda M, Matsuzaki S, Nakae R, Tanaka Y, Iwamiya T, Okazawa A, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Kimura T
2. 発表標題 【ワークショップ】Novel strategy to overcome platinum resistance < 優秀演題賞 >
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kubota S, Kiyohara Y, Okazawa A, Matsuzaki S, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Kimura T, Inoue M
2. 発表標題 Key role of Notch-ASCL1 pathway for trans-differentiation in a mixed small cell carcinoma/adenocarcinoma of uterine cervix
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中江瑠璃子 岡澤晶子 柿ヶ野藍子 岩宮正 小玉美智子 松崎慎哉 小林栄仁 橋本香映 馬淵誠士 上田豊 澤田健二郎 富松拓治 吉野潔 木村正
2. 発表標題 当科における子宮平滑筋肉腫に対するゲムシタピン/ドセタキセル併用療法の有用性についての検討 < 優秀ポスター賞 >
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kakubari R, Serada S, Nakagawa S, Matuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Naka T, Kimura T
2. 発表標題 Antisense oligonucleotide of Annexin A4 improved platinum resistance in ovarian clear cell cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kakuda M, Matsuzaki S, Nakae R, Tanaka Y, Iwamiya T, Okazawa A, Kobayashi E, Ueda Y, Yoshino K, Kimura T
2. 発表標題 Novel strategy to overcome platinum resistance in leiomyosarcoma (LMS); blocking ATP7B by copper ion
3. 学会等名 The 69th Annual Congress of the Japanese Society of Obstetrics and Gynecology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Otake A, Ueda Y, Matsuzaki S, Yoshino K, Kimura T	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 103-46
3. 書名 Advances in Medicine and Biology	

〔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
研究分担者	上田 豊  (Ueda Yutaka)  (10346215)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	岩宮 正  (Iwamiya Tadashi)  (40790936)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	小林 栄仁  (Kobayashi Eiji)  (50614773)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	吉野 潔  (Yoshino Kiyoshi)  (90362730)	大阪大学・医学系研究科・准教授    (14401)	