

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09288

研究課題名(和文)新規核酸医薬を用いたアネキシンA4阻害による卵巣癌プラチナ耐性克服へのアプローチ

研究課題名(英文)A Novel Nucleic Acid Medicine Approach to Overcome Platinum Resistance in Ovarian Cancer by Inhibiting Annexin A4

研究代表者

吉野 潔 (Yoshino, Kiyoshi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：90362730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではANXA4の発現を抑制するオリゴヌクレオチドを作製しANXA4発現の抑制を試みた。その結果、ノックダウン効率の高い2つのアンチセンスオリゴ(ASO)を作成し得た。ANXA4 ASOを導入した細胞は、プラチナ製剤であるシスプラチンやカルボプラチンに対する感受性が高まり、プラチナ製剤の細胞内蓄積量が増加した(それぞれ34.0%、48.4%の増加)。モデルマウスを用いた実験では、ANXA4 ASOとシスプラチンを併用することで抗腫瘍効果が増強された。ANXA4 ASOが卵巣明細胞癌の治療選択肢となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤が効かないタイプの卵巣癌に対して、アネキシンA4蛋白を抑制する核酸と抗がん剤の併用が実験のなかでは腫瘍縮小効果を示した。さらに研究を進めることによって将来新たな治療薬の候補となる可能性があり、難治性と考えられている卵巣がん患者さんの予後改善に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Platinum agents are widely used as chemotherapy for ovarian cancer. Therefore, platinum resistance is a major problem. We found that elevated expression levels of annexin A4 (ANXA4) in clear cell carcinoma of the ovary (CCC) was associated with platinum chemoresistance by promoting platinum efflux. Based on these results, we designed an oligonucleotide and try to suppress the expression of ANXA4 using it. We created two candidates antisense oligos (ASOs) with high knockdown efficiency (knockdown rates: 96.9% and 94.5%). The ANXA4 ASO-transfected cells showed increased sensitivity to the platinum drugs, cisplatin or carboplatin (42.5% and 55.2%, respectively) and increased intracellular accumulation of platinum drugs (34.0% and 48.4%, respectively). In experiments using model mice, the combination of ANXA4 ASO and cisplatin enhanced the anti-tumor effect. These results suggest that ANXA4 ASO may be a potential therapeutic option for ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣がん プラチナ耐性 核酸医薬 明細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラチナ製剤は卵巣癌治療において最も有効な抗癌剤であり、初回治療に標準的に使用される、それ故プラチナ製剤が効かないすなわちプラチナ耐性は克服すべき課題である。我々はこれまでに卵巣癌細胞にプラチナ耐性を与える分子として アネキシン A4(以下 AnxA4)を同定し、その作用機序および耐性の責任領域まで特定した。

2. 研究の目的

AnxA4 は、細胞質内に局在しており、生体内での AnxA4 阻害は容易ではない。既存の低分子化合物、抗体製剤等での機能抑制は困難である。本研究は AnxA4 の機能を抑制するアンチセンスオリゴ(ASO)を作製すること、およびその投与により卵巣癌のプラチナ耐性を克服することを目的とした研究である。

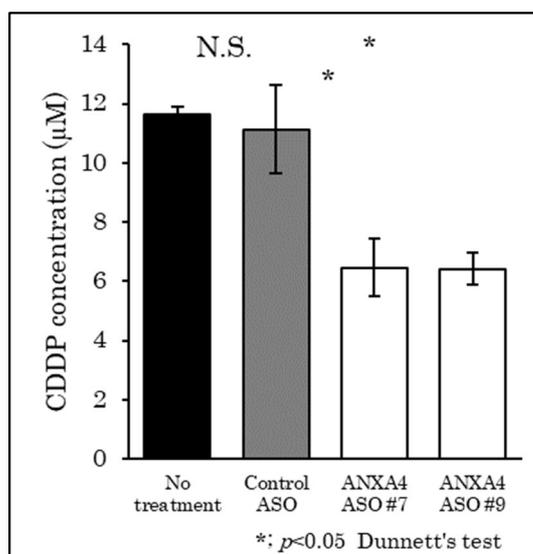
3. 研究の方法

AnxA4ASO の作製

ANXA4mRNA に対する短い相補的な連続した塩基配列を抽出し、ターゲット配列を絞り込んだ後、ASO 自体を安定化させる処理を行った。16 種類のオリゴヌクレオチドと LNA を含むプライマーを Gene Design 社 (大阪) で合成した。AnxA4 を高発現する HEC-1 細胞 (10⁴ 細胞/ウェル) の培養を行い、100nM の AnxA4ASO をトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞を回収し、リアルタイム PCR アッセイを評価した。ANXA4 の発現量を GAPDH と比較してノックダウン率を算出し、ASO の阻害効果を解析した。

抗腫瘍効果の判定

IC50 値を測定する実験では、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 2000 個の細胞を培養し、翌日、ASO のトランスフェクションを行った。0.001~10 μM のシスプラチンまたは 10~100 μM のカルボプラチンを曝露した 72 時間後に、IC50 値を MTT アッセイで測定した (図 1)。



(図 1. MTT アッセイにおける IC50 値)

細胞内プラチナ蓄積量の定量化

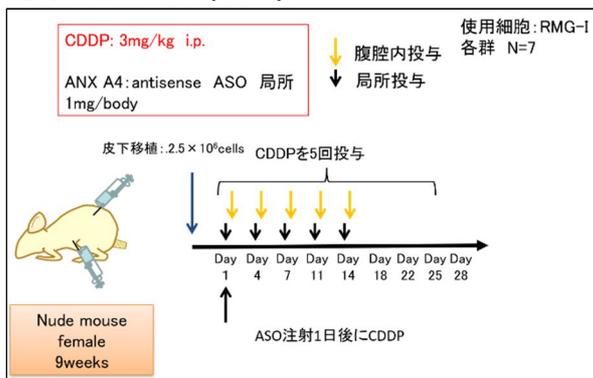
細胞内の白金の蓄積量を定量するために、RMG-1 または OVISE 細胞を 2×10⁶ 細胞/プレートに懸濁した。100nM の ASO をトランスフェクションし、48 時間後に 100 μM のシスプラチンを曝露した。1 時間後に培地交換を行った。培地交換から 3 時間後に細胞を回収し、細胞内のシスプラチンを誘導結合プラズマ質量分析装置で評価した。

蛋白発現の評価

ウェスタンブロッティング および免疫組織化学的染色を用いて AnxA4 蛋白の発現を解析した。

In vivo におけるプラチナ耐性の改善の評価

シスプラチン耐性の評価として、ICR nu/nu マウスに、RMG-1 では 2.5×10^6 個、OVISe では 5×10^6 個の細胞をそれぞれ皮下に移植した。腫瘍の大きさが約 100mm^3 に達した時点で、マウスをランダムに4つのグループ（コントロールASOとPBS、コントロールASOとシスプラチン、ANXA4 ASOとPBS、ANXA4 ASOとシスプラチン）に分けた。ANXA4 ASOまたはコントロールASOを 1mg/kg ずつ週2回、腫瘍内に投与した。ASO投与の翌日、 3mg/kg のシスプラチンまたは同量のPBSを腹腔内に注射した（図2）。



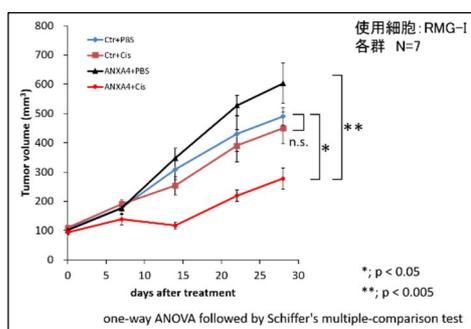
(図2. In vivoにおけるプラチナ 耐性改善の評価)

4. 研究成果

16種類のAnx A4 アンチセンスオリゴ (Anx A4 ASO) を作製した。そのうち5種類のAnx A4 ASOはAnx A4の発現を抑制することを確認し、in vitroの実験系においてプラチナ感受性を改善することを確認した。その中でもAnx A4発現抑制効果の高い2種類のASOを以下の実験に用いた。

ANXA4 ASOは卵巣明細胞癌細胞株のプラチナ蓄積量を増加させプラチナ耐性を改善したRMG-1細胞では、ANXA4 ASOを導入した細胞のIC50値は $6.42 \mu\text{M}$ であったのに対し、対照ASOを導入した細胞のIC50値は $11.12 \mu\text{M}$ であった ($p=0.012$)。OVISe細胞においても、ANXA4 ASOをトランスフェクトした細胞ではIC50値が有意に低かった ($p < 0.01$)。細胞内のプラチナの蓄積量を定量的に分析した結果 ANXA4を過剰に発現させた細胞では、細胞内の白金の蓄積量が減少した。ANXA4 ASOを導入した細胞では、コントロールのASOを導入した細胞や無処理の細胞と比較して、プラチナの蓄積量が有意に増加していた。このことは、ANXA4のノックダウンによって白金製剤の流出が間接的に抑制されたことを示唆している。

ANXA4 ASOはIn vivoにおいて卵巣明細胞癌のプラチナ耐性を改善したヌードマウス ($n=7$) を用いて皮下移植された明細胞癌細胞株由来腫瘍に対してAnx A4 ASOの前投与 (局注) によりシスプラチン (3mg/kg) の腫瘍縮小効果の改善が認められた (図3)。



(図3. Anx A4 ASOによる抗腫瘍効果の改善)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊東 優, 遠藤 洋子, 近藤純平, 松崎 慎哉, 小林 栄仁, 木村 敏啓, 上田 豊, 上浦 祥司, 吉野 潔, 木村 正, 井上 正宏
2. 発表標題 CTOS法による卵巣がんの化学療法感受性予測と新規治療法の探索
3. 学会等名 第18回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Ito, Satoshi Nakagawa, Kosuke Hiramatsu, Shinya Matsuzaki, Eiji Kobayashi, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Shoji Kamiura, Tadashi Kimura, Masahiro Inoue
2. 発表標題 Development of ex vivo chemosensitivity assay using patient-derived spheroids of ovarian cancer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakubari, R. Nakagawa, S. Kobayashi, E. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Yoshino, K. Kimura, T.
2. 発表標題 Antisense oligo nucleotide of Annexin A4 improves platinum resistance in ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa, S.
2. 発表標題 Targeting Annexin A4 with antisense oligonucleotides improves platinum resistance of ovarian cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	上田 豊 (Ueda Yutaka) (10346215)	大阪大学・医学系研究科・講師 (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	松崎 慎哉 (Matsuzaki Shinya) (00467565)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	中川 慧 (Nakagawa Satoshi) (30650593)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	

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