

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18695

研究課題名(和文) アネキシンA4アンチセンスオリゴによるプラチナ耐性卵巣癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting Annexin A4 with antisense oligonucleotides improved platinum resistance of ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

中川 慧 (Nakagawa, Satoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30650593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌のプラチナ耐性克服は卵巣癌の治療戦略において重要な課題であり、本研究においてはANX A4のアンチセンスを作成して、その有効性を検証し、機能解析やPDXマウスによる実用化に向けた実験を行った。作成したアンチセンスは明細胞癌のプラチナ耐性を改善し、in vivo, in vitroいずれにおいても腫瘍増殖を抑制した。同様にプラチナ耐性とされている子宮平滑筋肉腫に対しても検討を行ったが、子宮平滑筋肉腫に対するANX A4を介したプラチナ耐性機序は見られなかった。現在卵巣明細胞癌においてPDXを用いたより臨床に近い投与実験やDDSシステムの開発を継続して行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は本邦の婦人科癌で最も予後不良な疾患であり、特に治療の中心となるプラチナ製剤に対する耐性は大きな課題である。特に、本邦では、プラチナ耐性である明細胞癌の割合が高く、そのプラチナ耐性の克服は卵巣癌治療を考える上で重要な課題である。本研究では、プラチナ耐性を誘導すると考えられるAnx A4のアンチセンスを人工核酸を用いて作成し、その有効性を検討した。その結果、作成したアンチセンスはin vitro, in vivoいずれにおいてもプラチナ抵抗性を改善し、プラチナ製剤と併用することで抗腫瘍効果を増強した。今後、組織移行性などの課題を解決し、創薬に向けてさらなる研究を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Recently, such as PARP inhibitors have emerged, various innovative treatments strategies have become available for platinum-sensitive ovarian cancer. However, platinum resistance is still the major issue. Enhanced expression level of annexin A4 (ANXA4) in ovarian clear cell carcinoma (CCC) have associated with chemoresistance of platinum drug. We made oligonucleic acid drugs synthesized with bridged nucleic acid as preclinical model to suppress ANXA4 expression. ANXA4 ASOs suppressed the levels of ANXA4 expression and significantly improved sensitivity to the platinum drugs, and increased intracellular platinum accumulation. In vivo model mice, we observed enhanced antitumor effect when the ANXA4 ASO was treated in combination with the cisplatin. Thus, we demonstrated improvement of platinum drug resistance with administration of ANXA4 ASO both in vitro and in vivo by accumulating intracellular platinum drug. ANXA4 ASO will be a therapeutic option for the ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：ovarian cancer clear cell carcinoma bridged nucleic acid antisense platinum resistance annexin A4

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、研究者個人に帰属します。

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 人と 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 期で発見されることが多く、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。卵巣癌に対してプラチナ製剤は初回治療、術後化学療法キードラッグであり、20 年以上前から世界的に用いられている。この中で、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癌として、他の治療が選択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)。つまり、卵巣癌治療においてプラチナ製剤は治療の核となる抗癌剤であり、その耐性は克服すべき課題である。特に本邦では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) の卵巣癌全体に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これまでに世界に先駆けて OCCC にプラチナ耐性を与える分子として アネキシン A4 (以下 Anx A4) を同定し、そのプラチナ耐性を誘導する作用機序および耐性の責任領域まで特定した (Kim A et al. *Int J Cancer.* 2009, Matsuzaki S et al. *Int J Cancer.* 2014, Morimoto A et al. *Oncotarget.* 2014)。

2. 研究の目的

先行研究として、プラチナ感受性を示す卵巣漿液性がん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 Anx A4 (アネキシン A4) を同定した。Anx A4 は卵巣癌 126 例の免疫組織染色において明細胞がんの約 90% に発現が認められた。次に Anx A4 をプラチナ感受性卵巣がん株に導入し、対照株と比較し、Anx A4 の機能を解析した。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 (カルボプラチン) 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 強制発現株では Anx A4 発現のない親株と比較し、プラチナ暴露後の細胞内プラチナ濃度が著明に低下していることを明らかにしてきた。(Matsuzaki S et al. *Int J Cancer.* 2014)。また、卵巣明細胞がん細胞株において 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た (図 1)。本研究では Anx A4 阻害による

プラチナ耐性克服を臨床応用するための手段の開発を試みた。Anx A4 は細胞質内に存在するため、一般的な抗体医薬では細胞膜を透過できないことから、ターゲットとするのが困難である。このため、架橋型人工核酸を用いたアンチセンスオリゴ (以下 ASO) を用いた核酸医薬での創薬を目的とし、大阪大学薬学部薬学研究科 生物有機化学分野 小比賀教授研究室の協力を得て 16 種類の架橋型人工核酸を導入した Anx A4 アンチセンスオリゴ (以下 Anx A4

ASO) を作製し、これらの Anx A4 ASO 中から最も有効と思われる配列を絞り込んだ。これらを用いて、作用機序の解明と実用化に向けた検証、より効率的な Drug delivery system (DDS) を開発するために以下の実験を行った。

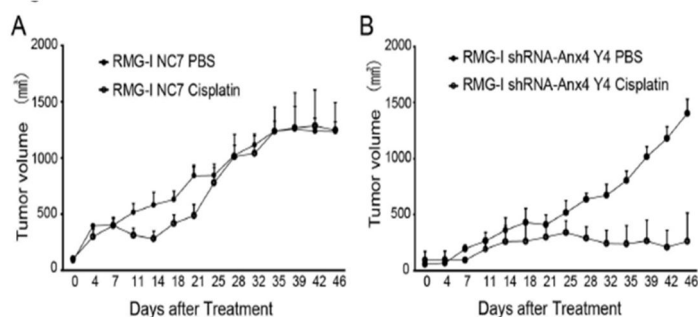


図 1. Anx A4 発現抑制によるプラチナ感受性改善効果 (in vivo)

3. 研究の方法

以下のような構造の人工核酸を挿入した ASO を用いて実験を行った。

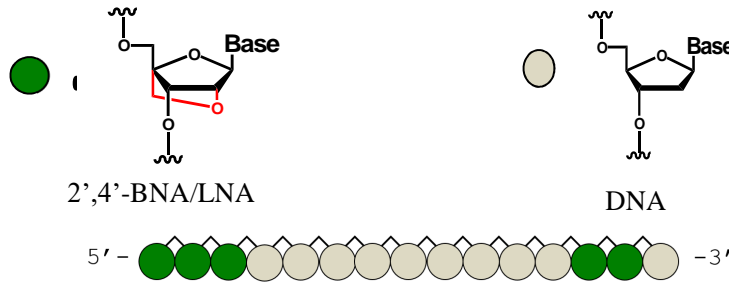


図 2 . 人工核酸を挿入した Anx A 4 ASO

AnxA4 ASO の in vivo での作用機序の解明

In vivo において RMG-1、OVISE を移植した卵巣癌モデルマウスを作成した。PBS または CDDP と AnxA4ASO またはコントロールの ASO を投与した 4 群において、抗腫瘍効果、組織における AnxA4 の抑制効果を腫瘍体積を計測して評価した。また、AnxA4ASO, control ASO 投与群の組織において、ウェスタンブロッティング、免疫染色を行い、AnxA4 の発現レベルの確認と免疫の影響を評価した。

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

卵巣癌の臨床手術検体を超免疫不全マウス(NOG マウス)の皮下に移植し、卵巣明細胞癌の PDX マウスの樹立を試みた。

子宮平滑筋肉腫での検討

婦人科腫瘍の中で卵巣癌と同様非常に予後が悪く、プラチナ抵抗性を示す子宮平滑筋肉腫の細胞株の一部 (SK-LMS 等) でも AnxA4 が高発現することを確認 (図 3) しており、子宮肉腫においても AnxA4 の発現頻度や、増殖、プラチナ抵抗性に関するメカニズムを卵巣癌と同様の手法を用いて検証した。

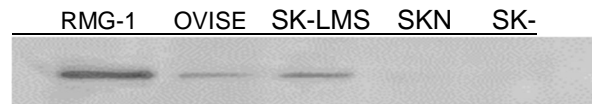


図 3 . 卵巣癌細胞株と平滑筋肉腫における AnxA4 の発現

4. 研究成果

AnxA4 ASO の in vivo での作用機序の解明

RMG-1 細胞において、PBS, CDDP, AnxA4 ASO, Control ASO それぞれを組み合わせ投与した群において CDDP+AnxA4ASO を投与した群においてのみ有意な腫瘍増殖抑制効果が見られ、ASO 投与群では AnxA4 の発現が抑制されていた。(図 4)

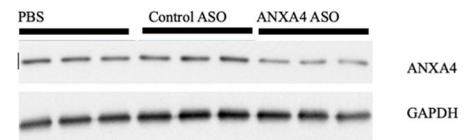
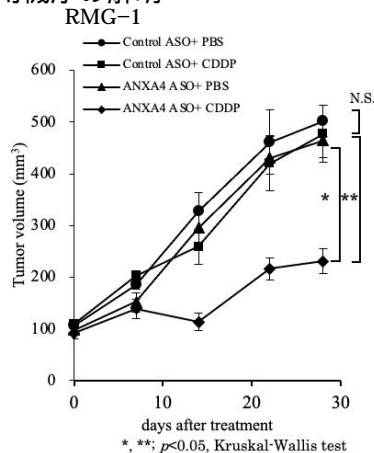


図 4 .RMG-1 を移植した卵巣癌モデルマウスにおけるシスプラチン + ASO 投与における腫瘍増殖抑制効果 (左) と AnxA4 の発現抑制 (右)

また、control, AnxA4ASO いずれを投与した群においても免疫系の細胞の腫瘍内への浸潤は見られず(図5)、in vitro において腫瘍細胞内のプラチナ濃度は上昇していた。(図6)これらのことから免疫を介した抗腫瘍効果ではなく、直接的なプラチナ耐性解除による抗腫瘍効果が示唆された。

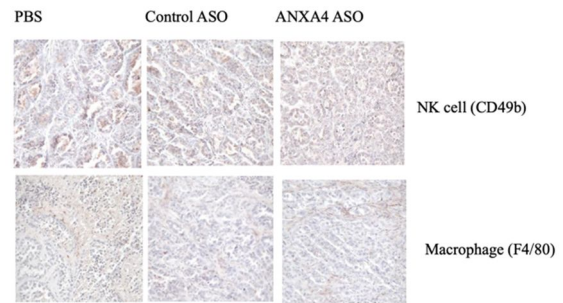


図5. 組織における免疫細胞の浸潤

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

卵巣明細胞癌の臨床検体1系統についてPDXを樹立したが、2020年のCOVID-19流行のため、一旦凍結保存している状況である。今後、PDXマウスを用いたvivoでの効果検証の際に改めて増やす予定としている

RMG-1

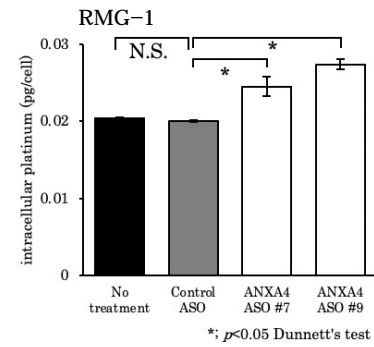


図6. 細胞内シスプラチン濃度(in vitro)

子宮平滑筋肉腫における検討

子宮平滑筋肉腫細胞株においてはAnxA4をSiRNAを用いてノックダウンした細胞株においてIC50を測定したが、プラチナ抵抗性の改善は見られなかった(図7)。一方で、SiRNA単独による20-30%程度の増殖抑制効果はみられており(データ非表示)直接増殖に関わる別の機序が作用している可能性も考えられるため今後のさらなる検討が必要である。

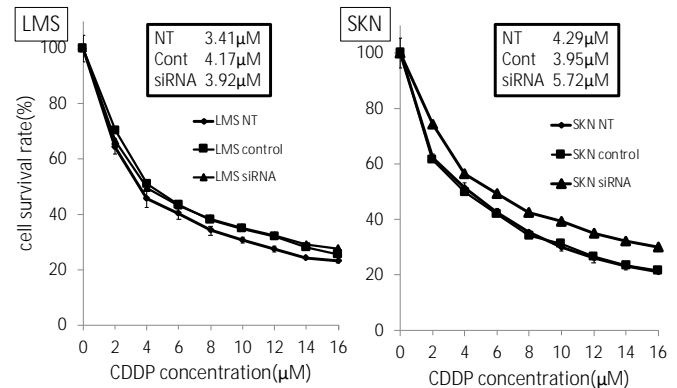


図7. 平滑筋肉腫細胞株におけるAnxA4ノックダウン時のシスプラチンに対するIC50

研究期間を総括して、当初の目的の一つであったより効果的なDDSの開発についてはCOVID-19の流行の影響により計画が遅延しており、引き続き検討が必要な課題である。現在までに判明した結果を論文にまとめ、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

covid-19の流行による緊急事態宣言等の影響で研究施設が一時的に実験停止となり、DDSやPDXマウスの開発について、一部の進捗に遅れが生じた。

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

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