

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591860

研究課題名（和文）卵巣明細胞腺癌の悪性進展機序の解明および新規治療標的分子に関する研究

研究課題名（英文）Elucidating a determinant of development as a novel therapeutic target of ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

宮城 悦子 (MIYAGI ETSUKO)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：40275053

研究成果の概要（和文）：上皮性卵巣癌の中で抗がん剤抵抗性かつ予後不良な明細胞腺癌について、高発現するタンパク質の一つである annexin A4 (ANXA4) を研究対象とした。RNA 干渉によってその発現を抑制した 2 種類の卵巣明細胞腺癌細胞株を用いて、細胞増殖能、運動能、抗がん剤抵抗性における変化が ANXA4 の subtype により異なる事を見出した。酸性型 ANXA4 を優位に発現している細胞株では、ANXA4 発現抑制によって増殖能低下、抗がん剤感受性の改善が認められ、塩基性型優位な細胞株では細胞遊走能、浸潤能が低下していた。

研究成果の概要（英文）：The annexin A4 (ANXA4), one of the highly expressed proteins in ovarian clear cell adenocarcinoma (OCCA), which is typically chemo-resistant and poor-prognosis disease, was our research target. Two OCCA cell lines in which ANXA4 expression is suppressed by shRNA were used. Significantly restricted proliferation and increased chemo-sensitivity were recognized in an acidic-ANXA4-expressing cell, whereas decreased invasiveness was detected in a basic-ANXA4-expressing cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学・卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞腺癌 (ovarian clear cell carcinoma: 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癌 (epithelial ovarian carcinoma: EOC) であ

る。本邦では欧米諸国に比べて OCCA が EOC 全体に占める割合が高く、OCCA の治療成績改善は喫緊の課題である。OCCA は他の EOC と比較して、I 期で発見される率が高く、骨盤腔に大きな腫瘤を形成し、しばしば内膜症、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、その病理組織像のみならず臨床像からも他の EOC とは一線を画する腫瘍である。一方でその治療は OCCA に特化したものは開発されておらず、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いるが、OCCA は抗がん剤に抵抗性を示すことから予後が不良である。

OCCA とその他の EOC の相違を遺伝子発現の側面から明らかにし、OCCA の診断・治療に資する研究はこれまでも国内外で行われている。2002 年 Schwarz らの研究を皮切りに¹、microarray による網羅的手法を中心に mRNA 発現解析が進められ、OCCA では他の EOC と比較して活性酸素代謝に関与する遺伝子群、イオン・トランスポータの機能制御に関わる遺伝子群、細胞増殖に関連する遺伝子群などが高発現していることが明らかとなり、抗がん剤抵抗性との関連や治療の標的分子として注目されている。一方、最近の数年間では proteome 研究等タンパク質ベースの解析結果が発表され、mRNA 発現解析でも指摘された ANXA4、HNF-1 β の発現亢進、WT1 などの発現低下が報告されている^{2,3}。研究代表者らも proteome 比較解析研究から、OCCA に特徴的なタンパク質発現パターンを見出し報告しているが (Morita A, Miyagi E, et al. *Proteomics* 6:5880-90, 2006)、興味深いことに、OCCA 細胞株では ANXA4 タンパク量が一様に増加しているが、2 次元電気泳動でより塩基性の等電点を持つもの (以後、塩基性 ANXA4) が優位の細胞株と、逆に酸性の等電

点を持つもの (以後、酸性 ANXA4) が優位の細胞株が見られた。更に、それぞれの細胞株で RNA 干渉により ANXA4 発現を恒常的に抑制した細胞株を樹立して解析したところ、塩基性 ANXA4 優位の細胞株 OVISE では細胞増殖が変化しないが、酸性 ANXA4 が圧倒的に多い細胞株 OVTOKO では強い増殖抑制が見られた。このことは 2 種類の ANXA4 の機能がそれぞれ異なることを示唆している。また Kim らは、OCCA 細胞株に ANXA4 遺伝子を導入し恒常的に高発現させるとカルボプラチン抵抗性が增强されることを報告し⁴、ANXA4 が OCCA の薬剤抵抗性を克服する治療の分子標的として注目されている。

1. Schwartz DR, et al. *Cancer Res* 62(16):4722-9, 2002.
2. Tomlinson VA, et al. *Br J Cancer* 96(10):1613-20, 2007.
3. Suzuki N, et al. *Hum Cell* 18(3):147-55, 2005.
4. Kim A, et al. *Int J Cancer* 125(10):2316-22, 2009.

2. 研究の目的

酸性、塩基性 2 種類の ANXA4 分子の機能解析を進めるとともに、発現する ANXA4 の種類により OCCA を分類し、その臨床病理学的相違、特に、治療に対する反応性など中心に解析して、OCCA 患者の個別化医療に有用な情報を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床症例で 2 種類の ANXA4 の発現と予後との関連を調べる目的で、次の研究を行った。既に患者の書面による同意を得て手術時に採取した OCCA 組織検体について、第一に抗 ANXA4 抗体による免疫染色を行って発現頻度、強度、分布などを調べた。第二に、タンパク質 2 次元電

気泳動とウェスタン・ブロット法を用いて、酸性 ANXA4 優位型、塩基性 ANXA4 優位型の 2 群に分類し、各群の臨床病理学的特徴、特に悪性度、抗がん剤治療に対する反応性や予後の違いを比較した。

(2) 酸性 ANXA4 と塩基性 ANXA4 の違いを生ずるタンパク質の翻訳後修飾を分子生物学的に明らかにするために、次の研究を行った。塩基性 ANXA4 優位であるが、塩基性、酸性両方の ANXA4 を相当量産生している OCCA 細胞株 OWISE を用い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤存在下での培養や、タンパク抽出サンプルの脱リン酸化酵素処理後に 2 次元電気泳動、ウェスタンブロットティングを行い、2 種類の ANXA4 の検出量を比較した。

(3) OCCA 細胞における ANXA4 タンパク質の機能を明らかにするために、次の実験を行った。まず、ANXA4 発現抑制 OCCA 細胞 OVTOKO, OWISE の 2 種類を用いることで酸性 ANXA4 と塩基性 ANXA4 の機能の違いを推定した。次に、陰性対照にはランダム配列 shRNA を恒常的に発現している同細胞株を使用した。細胞増殖能、抗がん剤（パクリタキセル、カルボプラチン）に対する感受性を WST assay によって、細胞遊走能、浸潤能を chamber assay によって解析した。

4. 研究成果

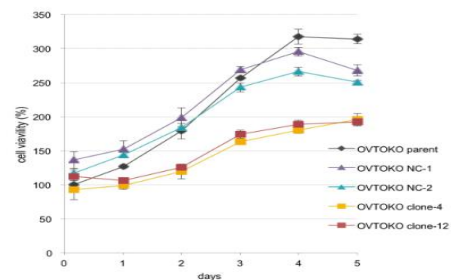
(1) 調査した OCCA 症例の全例で ANXA4 は高度に発現していた。そのうち 9 症例で 2 次元電気泳動を行った。Ⅲ期症例では全て (5 例中 5 例) 酸性型が優位だったのに対し、I 期では半数 (4 例中 2 例) が塩基性型優位だった。細胞株のみならず OCCA 腫瘍でも酸性、塩基性 ANXA4 が発現していることを示したことは、実臨床への実用化の可能

性を示唆する。

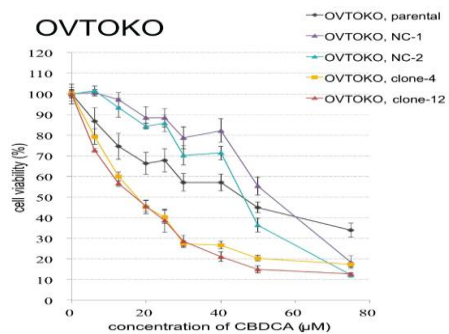
(2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による細胞処理を行っても塩基性 ANXA4 の発現比率は低下しなかった。また、抽出タンパクの脱リン酸化酵素処理を行っても酸性 ANXA4 は減少しなかった。

(3) ANXA4 発現抑制によって、酸性 ANXA4 優位の細胞株 OVTOKO では、増殖能の低下とカルボプラチン感受性の改善を、塩基性 ANXA4 優位の OWISE では、パクリタキセル感受性の改善と、遊走能・浸潤能の低下を認めた。即ち、酸性 ANXA4、塩基性 ANXA4 それぞれが異なる細胞生理学的機能をもつ可能性がある。がんの進展、抗がん剤抵抗性の双方への ANXA4 の関与を示した最初の報告であるとともに、OCCA における ANXA4 を標的とした治療の有効性を示唆する結果である。

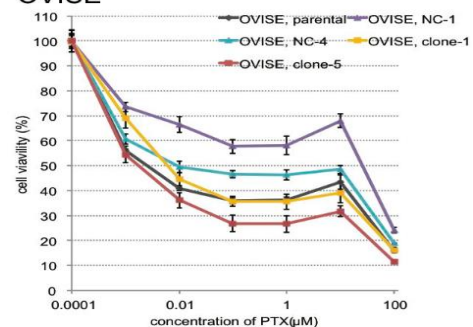
OVTOKO proliferation



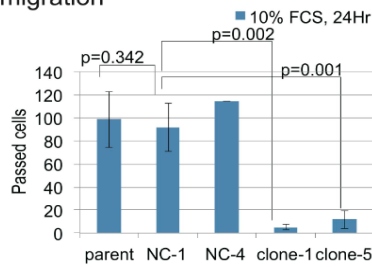
OVTOKO



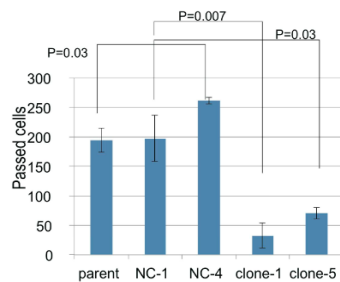
OWISE



OVISE migration



invasion



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y. HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 査読有, 40(12):5389-5401, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks201.

[学会発表] (計 4 件)

1. Mogami T, Yokota N, Yoshihara M, Nakamura Y, Sakuma Y, Koizume S, Asai-Sato M, Miyagi E, Hirahara F, Miyagi Y: Functional analysis of annexin A4 and the implication in ovarian clear cell adenocarcinoma (OCCA) phenotypes. The 3rd Johns

Hopkins Ovarian Cancer Symposium. May 17-18, 2012. Baltimore, USA.

2. Mogami T, Yokota N, Yoshihara M, Nakamura Y, Sakuma Y, Koizume S, Asai-Sato M, Miyagi E, Hirahara F, Miyagi Y: Functional analysis of annexin A4 and the implication in ovarian clear cell adenocarcinoma (OCCA) phenotypes. American Association for Cancer Research Annual Meeting. April 15, 2012. Chicago, USA.
3. 最上多恵, 横田奈朋, 佐藤美紀子, 沼崎令子, 宮城悦子, 平原史樹: 卵巣明細胞腺癌で高発現する annexin A4 の機能解析. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2012 年 4 月 14 日. 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (兵庫県)
4. 最上多恵, 横田奈朋, 常住 淳, 辻祥太郎, 小井詰史郎, 佐藤美紀子, 宮城悦子, 宮城洋平, 平原史樹: 卵巣明細胞腺癌における ANXA4 発現の解析. 第 10 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会. 2011 年 7 月 2 日. 松江しんじ湖温泉ホテル (島根県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 悦子 (MIYAGI ETSUKO)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号: 40275053

(2) 研究分担者

平原 史樹 (HIRAHARA FUMIKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30201734

(3) 連携研究者

宮城 洋平 (MIYAGI YOHEI)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構
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