

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592516

研究課題名(和文) i T R A Q法による子宮体癌化学療法抵抗性に関わる蛋白質の同定とメカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation of a candidate protein associated with chemo-resistance of endometrial carcinomas

研究代表者

上田 豊 (Ueda, Yutaka)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10346215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌の化学療法抵抗性に関わる因子としてAnnexin A4 (Anx A4) が同定された。その機序としては、プラチナに暴露されると、Anx A4とATP7A は共に細胞質から細胞膜へと局在を変えて共局在し、Pt 排出の促進されるものと考えられた。この作用において、ANXA4のN末端側のCa<sup>2+</sup>結合部位が関与し、プラチナ暴露後のCl濃度の上昇が関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Enhanced expression of Annexin A4 (Anx A4) increases chemoresistance to platinum through increased extracellular efflux of the drug. Exposure to platinum drugs induced relocation of Anx A4 from the cytoplasm to the cellular membrane, where it became colocalized with ATP7A, a copper transporter also well known as a mechanism of platinum efflux. Calcium-binding site in the annexin repeat induces chemoresistance to the platinum drug by elevating the intracellular chloride.

研究分野：医歯薬学

キーワード：婦人科腫瘍 子宮体癌 化学療法 抵抗性 蛋白質発現

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮体癌患者が急増している。初期の子宮体癌は手術によって完治させるが、進行・再発子宮体癌においては化学療法の役割が極めて重要である。特にタキサン製剤・アンスラサイクリン製剤・プラチナ製剤はその鍵とされている(子宮体がん治療ガイドライン)。しかしながら、進行・再発子宮体癌に対しては海外では放射線療法が中心に行われてきたこともあって、子宮体癌に対する抗癌剤感受性に関わる蛋白質の研究は数少ない(Koshiyama et al. Anticancer Res. 2001;21:2925-32., Shu et al. Mol Cell Biochem. 2011;353:225-33. Epub 2011 Mar 26., Yoshida et al. Anticancer Res. 2011;31:1271-7.)

2. 研究の目的

子宮体癌においてはタキサン製剤・アンスラサイクリン製剤・プラチナ製剤が key drug と考えられているが、これら薬剤に抵抗性を示した場合、有効な治療法は確立されていない。したがって、これら薬剤に対する感受性向上・耐性克服が重要であり、当研究は、子宮体癌におけるタキサン製剤・アンスラサイクリン製剤・プラチナ製剤感受性に関わる蛋白質を同定し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

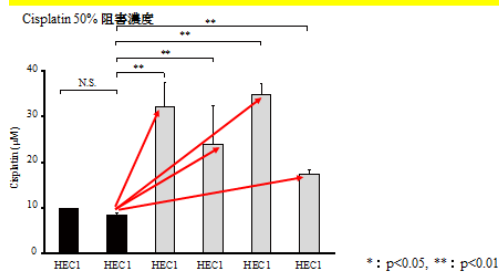
子宮体癌の化学療法の奏効率向上のための基礎研究を実施した。化学療法(TEC療法)が奏効した進行・再発子宮体癌組織および化学療法に抵抗性であった進行・再発子宮体癌において特異的に発現が増強または減弱している蛋白質を2種同定したが、そのうち Annexin A4 (Anx A4) については機能解析まで行った。詳細は研究成果の項に記載する。

4. 研究成果

**Anx A4 安定発現株におけるプラチナ耐性の検討**

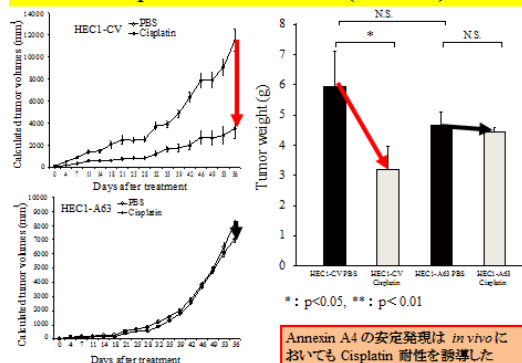
Anx A4 が弱陽性である子宮内膜癌細胞 HEC1 を用い、Anx A4 cDNA を遺伝子導入し、安定発現株 HEC1-A4 株を樹立した。次に、CisplatinのIC50(50%阻害濃度)と細胞内Pt濃度、ヌードマウスを用いた *in vivo* での腫瘍増殖抑制率を評価した。Anx A4 の安定発現により、CisplatinのIC50は有意に上昇し、*in vivo* における Cisplatin 投与では有意に腫瘍増殖抑制率が低下した。

**HEC1 Annexin A4 安定発現株はプラチナ耐性が誘導された**



Annexin A4 安定発現株では Cisplatin の IC50 が上昇していた

**Cisplatin 感受性試験 (in vivo)**

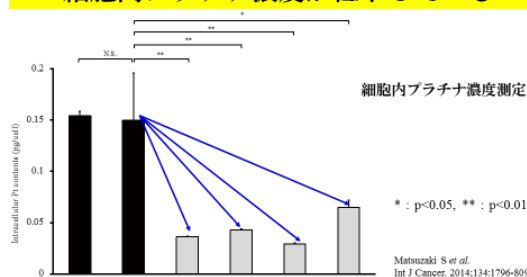


Annexin A4 の安定発現は *in vivo* においても Cisplatin 耐性を誘導した

**Anx A4 安定発現株におけるプラチナ耐性の機序の解析**

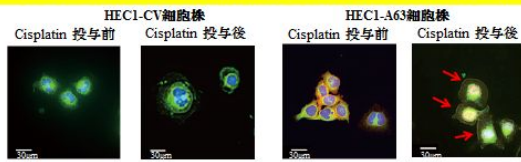
Cisplatin 暴露後の細胞内 Pt 濃度はコントロール株に比し HEC1-A4 株では有意に低下し、Pt 排出の促進が Pt 耐性の原因と考えられた。

**Annexin A4 安定発現株では細胞内プラチナ濃度が低下している**



また、細胞二重染色法を行ったところ、Cisplatin 暴露後 Anx A4 と ATP7A は共に細胞質から細胞膜へと局在を変え、共局在した。また HEC1-A4 株の Cisplatin IC50 は siRNA を用いた ATP7A のノックダウンによりコントロール株と同等の感受性にまで改善した。

HEC1-A63 細胞株では Annexin A4 と ATP7A は  
プラチナ薬剤投与後細胞膜へ移動し、共局在する



Blue : DAPI Green : ATP7A Red : Annexin A4 Orange : Merge

細胞膜における Annexin A4 と ATP7A の 共局在を認めない < 細胞膜における Annexin A4 と ATP7A の 共局在を認める

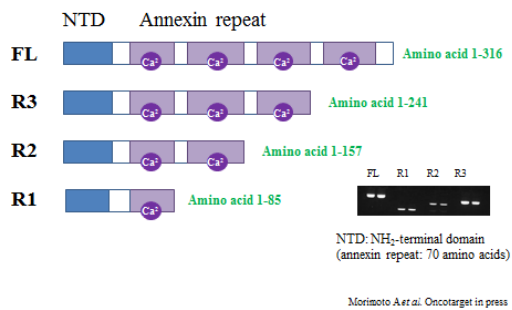
両者の差は Cisplatin 暴露後に細胞膜に Annexin A4 が局在しているかどうかである

これらの結果より Cisplatin 投与により Anx A4 は ATP7A と細胞膜で共局在して、Pt 排出の促進に関与することが明らかとなった (Int J Cancer. 2014;134:1796-809, Expert Opin Ther Targets. 2014;18:403-14)。

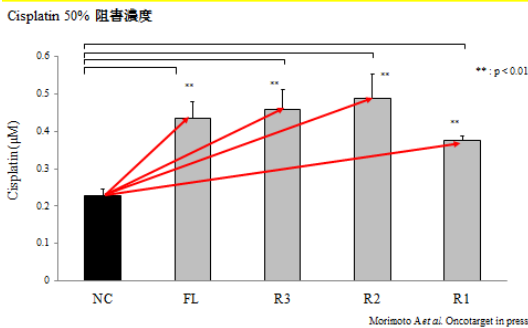
### Annexin A4 の機能領域解析

ANXA4 の deletion mutant 安定発現株では、Cisplatin 投与により IC50 は有意に上昇したが、N 末端側の annexin repeat を1個だけ有する株の Ca<sup>2+</sup>結合部位が機能なくなる point mutation を導入した株では薬剤耐性が誘導されなかった。

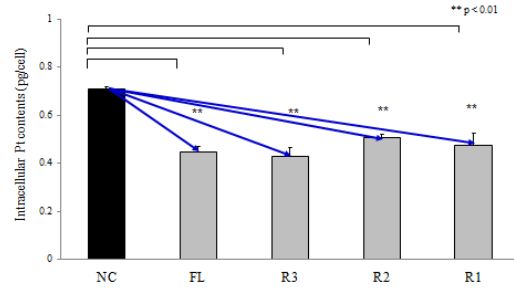
### Annexin A4 Deletion Constructs の作成



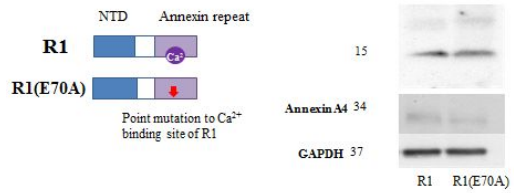
### NUGC3 Annexin A4 安定発現株では プラチナ耐性が誘導された



### NUGC3 Annexin A4 安定発現株では 細胞内プラチナ濃度が低下している

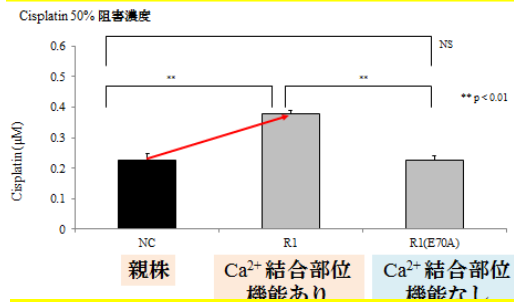


### R1 (E70A) の作成

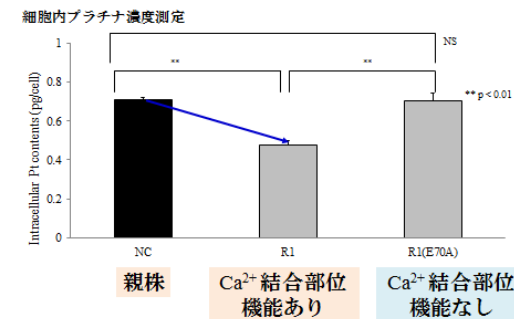


R1 の Annexin repeat の Ca<sup>2+</sup> 結合部位に対し、Point mutation を入れ、無機能化

### Ca<sup>2+</sup> 結合部位が Cisplatin 耐性に 関与している



### Ca<sup>2+</sup> 結合部位が Cisplatin 排出に 関与している



これらのことから、ANXA4 のプラチナ耐性には少なくともN末端側のCa<sup>2+</sup>結合部位が関与していることが示された (Oncotarget. 2014;5:7776-87)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, Naka T., Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner, *Oncotarget*, 査読有, 5(17):7776-87, 2014
2. Matsuzaki S, Serada S, Morimoto A, Ueda Y, Yoshino K, Kimura T, Naka T., Annexin A4 is a promising therapeutic target for the treatment of platinum-resistant cancers, *Expert Opin Ther Targets*, 査読有, 18(4):403-14, 2014, doi: 10.1517/14728222.2014.882323
3. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, Naka T., Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A, *Int J Cancer*, 査読有, 134(8):1796-809, 2014 doi: 10.1002/ijc.28526
4. Yokoyama, T. Enomoto, T. Serada, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Kyo, S. Iwahori, K. Fujimoto, M. Kimura, T. Naka, T., Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer, *Int J Cancer*, 査読有, 132(2): 472-84, 2013 doi: 10.1002/ijc.27679
5. 新堂真利子 上田豊 吉野潔, 【子宮体がん 子宮頸がんの薬物治療】子宮体がんに対する薬物療法の実践 術後補助化学療法・化学放射線療法の進め方, *臨床腫瘍プラクティス*, 査読有, 9(1): 16-21, 2013
6. 上田豊 榎本隆之 木村正, 【子宮体がん 診療アップデート】治療のトピックス 進行・再発子宮体がんの治療解説/特集), *臨床婦人科産科*, 67(5): 505-10, 2013

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 松崎慎哉 角田守 松崎聖子 久保田哲 中川慧 清原裕美子 平松宏祐 森本晶子 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, プラチナ耐性因子である Annexin

A4 はプラチナ耐性癌の治療ターゲットとなりうる, 第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 2.21/'15, 福岡

2. 中川慧 上田豊 平松宏祐 清原裕美子 森本晶子 松崎慎哉 高田友美 小林栄仁 木村敏啓 磯部晶 馬淵誠士 澤田健二郎 吉野潔 藤田征巳 筒井建紀 木村正, タキサン・プラチナ抵抗子宮体癌に対する GLIF 療法の有効性と有害事象の検討, 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.17-19/'14, 栃木
3. 中川慧 上田豊 木村敏啓 小林栄仁 磯部晶 馬淵誠士 澤田健二郎 吉野潔 藤田征巳 筒井建紀 木村正, プラチナ抵抗性の再発子宮体癌に対して GLIF 療法が著効した 1 例, 第 130 回近畿産科婦人科学会学術集会, 6.28-29/'14, 大阪
4. 平松宏祐 吉野潔 高田友美 松崎慎哉 木村敏啓 小林栄仁 上田豊 藤田征巳 仲哲治 木村正, 網羅的タンパク解析およびバイオインフォマティクスを用いた類内膜癌発生臓器の鑑別マーカーの探索, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
5. 松崎慎哉 森本晶子 中川慧 平松宏祐 木村敏啓 小林栄仁 上田豊 吉野潔 藤田征巳 仲哲治 木村正, IMP-2 は子宮内膜癌におけるパクリタキセル耐性に関与している, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
6. 森本晶子 松崎慎哉 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 榎本隆之 仲哲治 木村正, Annexin A4 の発現は細胞内クロールイオン濃度を上昇させ、プラチナ耐性を誘導している, 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.18-20/'14, 東京
7. 森本晶子 榎本隆之 世良田聡 木村敏啓 上田豊 藤田征巳 仲哲治 木村正, Annexin A4 の機能領域解析を用いた癌細胞プラチナ耐性機構の解明, 第 72 回日本癌学会学術総会, 10.3-5/'13, 横浜
8. 中川慧 上田豊 松崎慎哉 小林栄仁 木村敏啓 磯部晶 馬淵誠士 澤田健二郎 吉野潔 藤田征巳 筒井建紀 木村正 山崎正人 西尾幸浩 山本敏也 加藤宗寛 志木保彦 足立和繁 小川晴畿, タキサン製剤・プラチナ製剤抵抗性子宮体癌に対する GLIF 療法に関する第 1 相臨床試験 (GOGO-EM2), 第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.19-21/'13, 東京

9. 森本晶子 榎本隆之 平松宏祐 松崎慎哉 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 仲哲治 木村正, Annexin A4 の機能領域解析を用いた癌細胞プラチナ耐性機構の解明, 第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.19-21/'13, 東京
10. 松崎慎哉 中川慧 平松宏祐 清原裕美子 森本晶子 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 榎本隆之 仲哲治 木村正, Annexin A4 はプラチナトランスポーターとして知られるATP7Aを介してプラチナ耐性獲得に関与する, 第12回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 7.6/'13, 奈良
11. 松崎慎哉 森本晶子 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 榎本隆之 木村正 仲哲治, Annexin A4 の発現は銅のトランスポーターでありプラチナの排出に関与すると知られるATP7A を介して, 耐性獲得に関与する, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌
12. 大門映美子 宮武崇 上田豊 細井文子 高田友美 久毅 太田信行 横井猛 上浦祥司 長松正章 榎本隆之 木村正, 子宮体癌類内臓腺癌中リスク群における術後補助化学療法の有効性の検討, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌
13. 清原裕美子 木村敏啓 吉野潔 平松宏祐 松崎慎哉 小林栄仁 上田豊 藤田征巳 井上正宏 榎本隆之 木村正, CTOS 培養法を用いた子宮体癌に対する抗癌剤感受性試験, CTOS 培養法を用いた子宮体癌に対する抗癌剤感受性試験, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌
14. 森本晶子 榎本隆之 松崎慎哉 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 仲哲治 木村正, プラチナ耐性に関与する Annexin A4 の機能領域解析, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌
15. 松崎慎哉 森本晶子 横山拓平 小林栄仁 木村敏啓 上田豊 吉野潔 藤田征巳 榎本隆之 木村正 仲哲治, Annexin A4 の発現は銅のトランスポーターでありプラチナの排出に関与すると知られるATP7A を介して, 耐性獲得に関与する, 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 5.10-13/'13, 札幌
16. Matsuzaki, S. Morimoto, A. Serada, S.

Yokoyama, T. Kimura, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Enomoto, T. Naka, T. Kimura, T., Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A, The 104th Annual Meeting American Association for Cancer Research, 4.6-10/'13, Washington DC, U.S.A

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上田豊 (UEDA, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 10346215

### (2)研究分担者

榎本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号: 90283754

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

吉野 潔 (YOSHINO, Kiyoshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 90362730

木村敏啓 (KIMURA, Toshihiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号: 90584524

小林栄仁 (KOBAYASHI, Eiji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 50614773

### (3)連携研究者

なし