

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861491

研究課題名(和文) iTRAQ法による網羅的膜蛋白質の解析を用いた子宮平滑筋肉腫の新しい治療法の樹立

研究課題名(英文) A new therapeutic target of uterine leiomyosarcoma identified by Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ).

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮平滑筋肉腫は極めて予後不良であり新規治療法の開発がのぞまれる。申請者は子宮平滑筋肉腫(LMS)において特異的に発現している候補蛋白質としてATP7AおよびATP7Bを選別した。LMS細胞株に対し、siRNAを用いATP7AおよびATP7Bの発現を抑制したところ、Cisplatinの50%阻害濃度がそれぞれ17.0 μM から6.1 μM 、4.3 μM へと有意に低下した($p < 0.01$)。同条件下で細胞内プラチナ濃度を計測したところ、細胞内プラチナ濃度がコントロール株と比較し有意に上昇しており($p < 0.01$)、ATP7AおよびATP7Bはシスプラチン取り込みや排出に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of ATP7A and ATP7B in uterine leiomyosarcoma (LMS) cells which had high level expression of ATP7A and ATP7B. In LMS cell lines, knockdown the expression of ATP7A and ATP7B improved the sensitivity of Cisplatin in vitro. Compared with control LMS cells, knockdown of ATP7A and ATP7B induced roughly 4-fold greater chemosensitization to Cisplatin (IC50: 17.0 μM to 6.1 μM , 4.3 μM respectively; $p < 0.01$) To elucidate the mechanism underlying platinum resistance induced by ATP7A and ATP7B, intracellular platinum accumulation of LMS control cells, LMS silencing ATP7A cells and ATP7B cells after Cisplatin exposure were analyzed. Significantly increased platinum had accumulated in LMS silencing ATP7A and ATP7B cells compared with LMS control cells ($p < 0.01$). Thus, intracellular platinum accumulation was increased in LMS silencing ATP7A cells and ATP7B cells. To perform further investigation, we generate stable ATP7A and ATP7B knockdown cell lines.

研究分野：医歯薬学

キーワード：婦人科腫瘍 子宮平滑筋肉腫 プラチナ耐性 プラチナトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫は1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、期以上の5年生存率は約7%となっており、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)。しかも、成人女性の約3割が有するとされる子宮筋腫との鑑別が極めて困難であり、子宮筋腫と誤って診断されて治療の機会を逸してしまうこともしばしばある。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。また進行・再発症例においてもGemcitabin + Docetaxel の併用化学療法で36%の奏効率が報告されている(Hensley ML et al. *Gynecol Oncol.* 2008; 109: 329-34.) がPFSは4.4ヶ月であり、生存率の延長には寄与していない。これまでに明らかにされた分子標的治療薬の標的として研究された主だった遺伝子は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して位置づけられるには至っていない。膜蛋白質以外の蛋白質で明らかにされた子宮平滑筋肉腫に関わる遺伝子としてはCalponin(Horiuchi A et al. *JNCI* 1999; 91: 790-796, Takahashi K et al. *Cancer Res* 2001; 61: 3969-3977)やLmp2(Hayashi T et al. *Cancer Res* 2002; 62: 24-27)が挙げられるが治療応用には至っていない。

2. 研究の目的

申請者も以前から子宮平滑筋肉腫を特徴付ける蛋白質(遺伝子)の同定を試み、数種類の子宮平滑筋肉腫特異的な分子を同定しているが、いずれも膜蛋白質ではなく、創薬には結びつけられていない。そこで当研究では、子宮平滑筋肉腫に特異的に発現する膜蛋白質の網羅的な解析を行い、同定した膜蛋白質の解析が必要と考えた。これまで我々は、iTRAQ法を用いて子宮内膜癌に特異的に発現している膜蛋白質としてBST-2を同定し、ヌードマウスを用いた実験において抗体療法に成功した。(Yokoyama T et al, *Int J Cancer.* 2013; 132: 472-84)今回、同様の手法であるiTRAQ法(LC-MS/MS)を用いて同定した子宮平滑筋肉腫の標的膜蛋白質を解析、治療応用することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞株

平滑筋肉腫細胞株(SK-LMS, SKN, SK-UT1)、卵巣漿液性腺癌細胞株(A2780, OVSAGO)、卵巣明細胞腺癌株(OVTOKO, OVISE, RMG-1)胎児腎細胞細胞株(HEK293)肝細胞癌(HepG2)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)を添加したものをいい、5%CO₂の37°Cインキュベーターで培養した。

siRNAを用いたATP7AおよびATP7Bのノックダウン

QUIAGENより購入した2つのATP7A siRNAおよびATP7B siRNAを用い、ATP7A、ATP7Bの発現をノックダウンした。Lipofectamine 3000(Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて遺伝子導入を行った。ATP7Aをノックダウンした細胞株はそれぞれ、ATP7A-4とATP7A-6とし、ATP7Bをノックダウンした細胞株はそれぞれ、ATP7B-2とATP7B-3とした。

IC₅₀(50%阻害濃度)測定

SK-LMS、SK-LMSコントロールsiRNA株、SK-LMS ATP7A-4、SK-LMS ATP7A-6株、SK-LMS ATP7B-1、SK-LMS ATP7B-2の6つの細胞について、D-MEM medium + 10% FBS+1% penicillin-streptomycinに懸濁し、1000 cells/wellの密度で96-well plates(Costar, Corning Inc, Corning, NY, USA)にまき、24時間培養し、0-100 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。

ウェスタンブロッティング

細胞はRIPA buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x phosphatase inhibitor cocktail(Nacalai Tesque)and 1x protease inhibitor cocktail(Nacalai Tesque))に溶解し、遠心分離(13,200 rpm, 4°C, 15 min)し、遠心上清を回収した。タンパク質の濃度はbovine serum albumin(BSA)を標準物質として、DC Protein Assay kit(Bio-Rad)を用いて定量した。抽出したタンパク質は5-20% gradient SDS-PAGEゲル(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて分離し、PVDF膜(Millipore, Bedford, MA, USA)に転写した。PVDF膜を1% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20(TBST)で1時間振とうすることでブロッキングし、chicken polyclonal anti-ATP7A antibody(ab13995; Abcam, Cambridge UK)あるいはmouse monoclonal anti-ATP7B antibody(ab124973; Abcam, Cambridge UK)にて1次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBSTで5分間、6回洗浄し、HRP-conjugated goat anti-chicken IgG(Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK)あるいはHRP-conjugated donkey anti-mouse IgG(Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK)で2次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBS-Tで5分間、6回洗浄し、enhanced chemiluminescence(ECL) reaction

system (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA)により、シグナルを検出した。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。(Yokoyama T et al, Int J Cancer. 2013; 132: 472-84) 子宮平滑筋肉腫の臨床検体 26 例を用い、ATP7A の発現および ATP7B の発現の評価を行った。

1 次抗体として ATP7A (ab131400; Abcam, Cambridge UK) もしくは ATP7B (ab124973; Abcam, Cambridge UK) 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-4002; 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

下記に従って、染色強度および面積の score をつけたものを、それぞれ ATP7A は 0~3 = 陰性、4~6 = 陽性、7~9 = 強陽性とし、ATP7B は 0~2 = 陰性、3~5 = 陽性、6~9 = 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

細胞内プラチナ定量

SK-LMS、SK-LMS コントロール siRNA 株、SK-LMS ATP7A-4、SK-LMS ATP7A-6 株、SK-LMS ATP7B-2、SK-LMS ATP7B-3 の 6 つの細胞株をそれぞれ 5 x 10⁶ 乗個の細胞を 15 cm dish に 2 枚ずつ散布した。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。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。

ATP7A、ATP7B を恒常的にノックダウンした細胞株の樹立

SK-LMS 細胞株に対して ATP7A および ATP7B を恒常的にノックダウンした細胞株を樹立するため、SK-LMS 細胞株に Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) を用いて ATP7A shRNA および 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、40 ng/ml の Puromycin (Invitrogen) を用いることでセクションした。3 つの SK-LMS

ATP7A ノックダウン株および 3 つの ATP7B ノックダウン株を作成しそれぞれ SK-LMS ATP7A ShRNA1-3、SK-LMS ATP7B shRNA1-3 株を作成した。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 (CV) を樹立した。

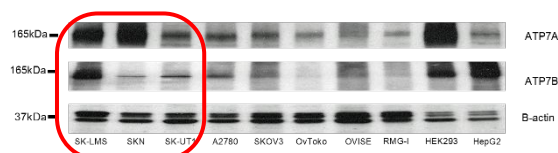
統計解析

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

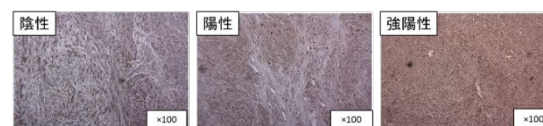
「子宮平滑筋肉腫細胞株における ATP7A および ATP7B の発現」

子宮平滑筋肉腫において高発現する膜蛋白質として ATP7A および ATP7B を同定した。これらを他の細胞株と比較し検討したところ子宮平滑筋肉腫細胞株では卵巣漿液性腺癌細胞株や、卵巣明細胞腺癌細胞株、他の細胞株と比較し ATP7A および ATP7B の強発現を認めた。このことから、子宮平滑筋肉腫細胞株で ATP7A および ATP7B は発現を認め、子宮平滑筋肉腫が両者の発現を認める可能性が示された。(Figure1A)



「子宮平滑筋肉腫臨床検体における ATP7A および ATP7B の発現」

子宮平滑筋肉腫細胞株において ATP7A および 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 26 例中 ATP7A は 20 例 (77%) で、ATP7B は 14 例で発現を認めた (54%)。(Figure1B)

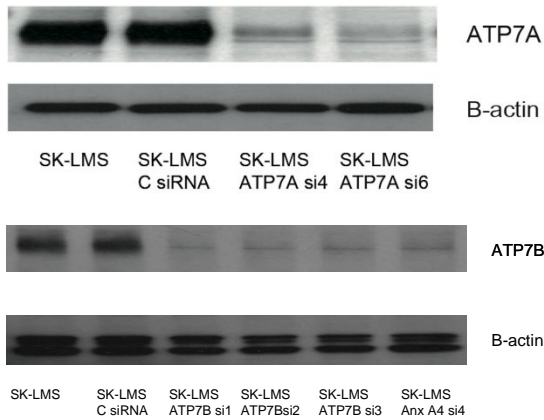


➡ ATP7Aは、77%において陽性であった
ATP7Bは、54%において陽性であった

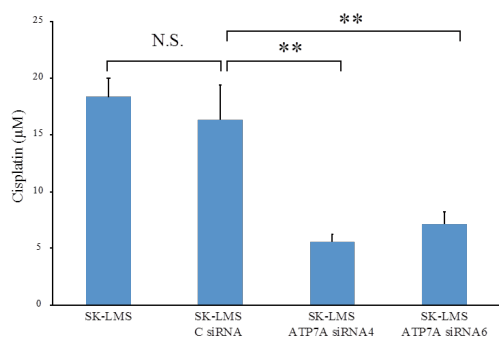
「SK-LMS 細胞株に対して ATP7A および ATP7B の発現を抑制したところ Cisplatin の感受性を改善した」

SK-LMS 細胞株において、ATP7A および ATP7B をノックダウンした後に、Cisplatin との感受性を解析した。ATP7A および ATP7B のノックダウンが行えて

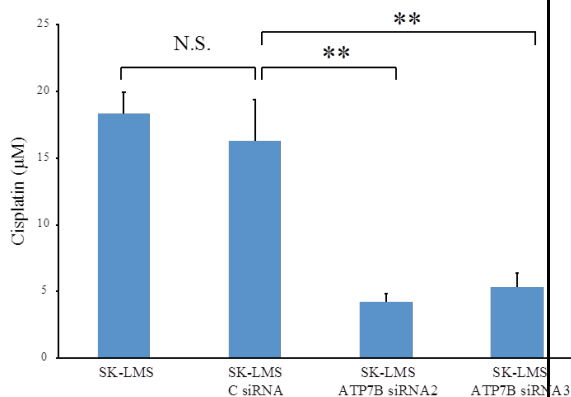
いることを、Western Blotting 法にて確認した。(Figure2A)



SK-LMS 細胞株における ATP7A のノックダウンはコントロール siRNA 株における Cisplatin の IC₅₀(17.0 μM) と比較して、SK-LMS ATP7A-4 細胞と SK-LMS ATP7A-6 細胞で有意な低下を認めた(SK-LMS ATP7A-4 ; 6.1 μM, p<0.01、SK-LMS ATP7A-6;7.2 μM, p<0.01) (Figure2B)



同様に SK-LMS ATP7B-2 細胞と SK-LMS ATP7B-3 細胞で有意な低下を認めた(SK-LMS ATP7B-2 ; 4.3 μM, p<0.01、SK-LMS ATP7B-3;5.3 μM, p<0.01)(Figure2C)



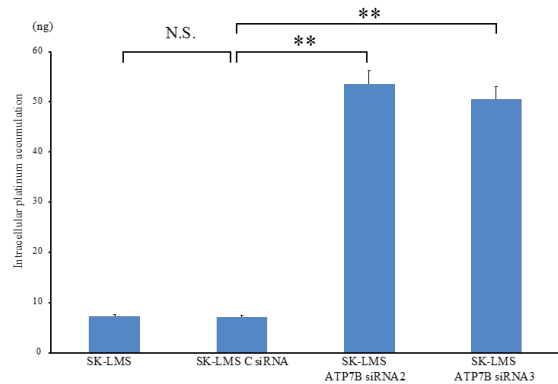
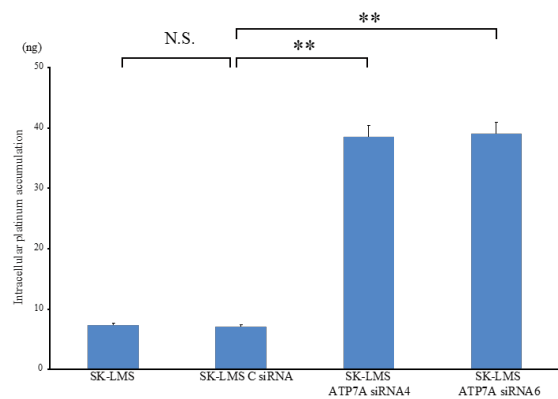
「ATP7A および ATP7B の発現抑制は Cisplatin 暴露後の細胞内プラチナ蓄積量を増加させた」

SK-LMS、SK-LMS コントロール siRNA 株、SK-LMS

ATP7A-4、SK-LMS ATP7A-6 株、SK-LMS ATP7B-2、SK-LMS ATP7B-3 の 6 つの細胞株をについて、Cisplatin 暴露後のプラチナ蓄積量を評価した。

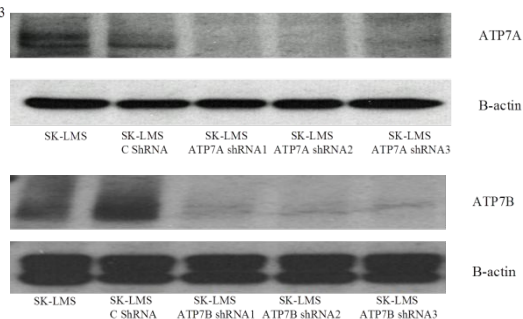
SK-LMS コントロール細胞における Cisplatin の蓄積量(7.2ng)と比較して、プラチナの細胞内蓄積量は ATP7A ノックダウン細胞と ATP7B ノックダウン細胞で有意な増加を認めた(ATP7A-4 ; 38.8ng, p<0.01、ATP7B; 52ng, p<0.01)。

これらの結果より ATP7A および ATP7B が子宮平滑筋肉腫においてプラチナの取り込み、もしくは排出に関連していることが示された。(Figure2D)



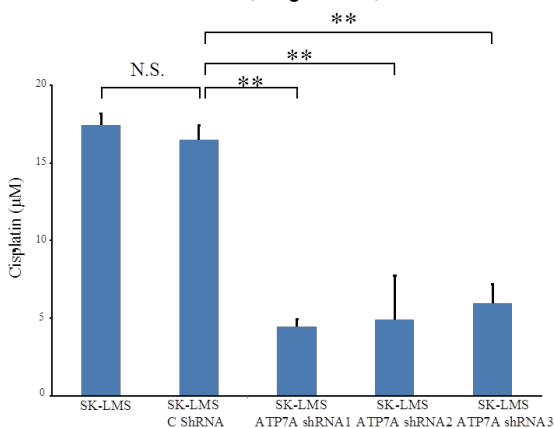
「ATP7A もしくは ATP7B の発現を恒常的に抑制した細胞株の樹立」

子宮平滑筋肉腫細胞株 SK-LMS においてより詳細な機能解析を行うために ATP7A もしくは ATP7B の発現を恒常的に抑制した細胞株を作成し、SK-LMS ATP7A shRNA 細胞株 1~3、SK-LMS ATP7B shRNA 細胞株 1~3 とした。ATP7A、ATP7B の発現が抑制されていることを Western Blotting 法にて確認した。(Figure3A)

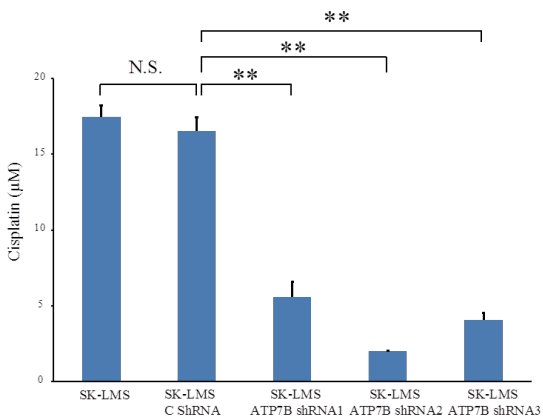


「ATP7A および ATP7B の恒常的に発現が抑制された細胞株では Cisplatin 感受性が向上していた」

SK-LMS ATP7A shRNA 細胞株 1~3 はコントロールベクター株における Cisplatin の IC₅₀(16.5 μM)と比較して3クローンにおいて 5 μM 前後と有意な低下を認め(p<0.01)、シスプラチンの感受性が約 3 倍に上昇し、改善することが示された。(Figure3B)



SK-LMS ATP7B shRNA 細胞株 1~3 は ATP7A shRNA 株と同様にコントロールベクター株における Cisplatin の IC₅₀(16.5 μM)と比較して 3 クローンにおいて 4 μM 前後と有意な低下を認め(p<0.01)、感受性が約 4 倍に上昇することが示された (Figure3C)



まとめ

子宮平滑筋肉腫において ATP7A および ATP7B が強発現していることを初めて示した。また、これらの発現を抑制することでプラチナ製剤が子宮平滑筋肉腫の治療ターゲットとなりうることを示した。

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 3 件)

1. 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
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. 松崎慎哉, <若手の最新研究コーナー> iTRAQ 法による網羅的膜蛋白質解析を用いた子宮平滑筋肉腫の新しい治療法の樹立, *産科と婦人科*, 査読有, 82(2):82-86, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 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術講演会, 4.18-20/'14, 東京
2. 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, 網羅的蛋白質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術講演会, 4.18-20/'14, 東京
3. 松崎慎哉, Annexin A4 はプラチナ耐性癌の治療ターゲットである, 第 1 回新潟産婦人科シンポジウム, 9.14/'14, 新潟
4. 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

〔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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし