

学位論文の要約

Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells

(Annexin A4 は、卵巣明細胞腺癌細胞株の増殖、抗癌剤抵抗性、  
運動能・浸潤能に関連している)

March, 2014

2014年3月

Tae Mogami

最上 多恵

Obstetrics and Gynecology

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 産婦人科学

( Doctoral Supervisor : Fumiki Hirahara, Professor )

( 指導教員 : 平原 史樹 教授 )

## Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells

(Annexin A4 は、卵巣明細胞腺癌細胞株の増殖、抗癌剤抵抗性、運動能・浸潤能に関連している)

<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0080359>

### 1. 序論

卵巣癌は、先進国における婦人科臓器発生悪性腫瘍の中で死亡原因の第一位を占める疾患である (IARC, 2008). 日本人女性の癌死亡率第 9 位の疾患であり、罹患率、死亡率ともに増加傾向にある (国立がん研究センターがん対策情報センター, 2013). 上皮性卵巣癌は、漿液性腺癌, 明細胞腺癌, 類内膜癌, 粘液性腺癌の 4 つの組織型に分類されるが, 日本を含めたアジアにおいて, 明細胞腺癌の発生が他地域に比較して多いことが指摘されている. 日本では, 卵巣明細胞腺癌は上皮性卵巣癌の約 24% を占め, 増加傾向にある (日本産科婦人科学会, 2008).

卵巣明細胞腺癌は, 上皮性卵巣癌の標準的化学療法に抵抗性であり, 進行癌では他組織型に比較して予後不良である. また, 卵巣明細胞腺癌は, 類内膜腺癌同様, 子宮内膜症を頻繁に合併することが知られており, 内膜症性嚢胞を発生母地とすると考えられている. 分子生物学的な解析からもいくつかの特徴的な結果が報告されており, 卵巣明細胞腺癌に個別的な早期診断方法, 有効な治療法を確立すべく, 特に癌進展や化学療法抵抗性に関わるメカニズムの解明は急務である.

現在までに, DNA マイクロアレイを用いた, 卵巣明細胞腺癌の遺伝子発現プロファイリングの報告が複数存在する. それらによれば, 卵巣明細胞腺癌では, 酸化ストレス反応, 炎症関連, グリコーゲン代謝関連, 血液凝固関連の遺伝子の発現が有意に亢進していた (Yamaguchi et al., 2010). 我々の研究グループは, 2 次元電気泳動によって分離したタンパクの質量分析を行い, 卵巣明細胞腺癌におけるタンパク発現の網羅的解析を行った. この中で, 他の組織型に比較して特に明細胞腺癌で発現が上昇しているタンパクの一つとして annexin A4 を, 最初に見出し報告した (Morita et al., 2006). Annexin A4 は, 現在までに, 遺伝子発現解析からも, 我々の報告以外のタンパク発現解析からも, 卵巣明細胞腺癌での発現亢進が指摘されているタンパクである (Kim et al., 2009; Marquez et al., 2005; Miao et al., 2009; Schwartz et al.,

2002; Toyama et al., 2012; Tsuchiya et al., 2003; Yamaguchi et al., 2010; Zorn et al., 2005).

アネキシンは、カルシウムイオン結合部位を構成する共通のドメインを C 末端側に複数もったタンパク群で、真核生物でその発現は高度に保存されている。ヒトをはじめ脊椎動物では、annexin A 群が発現しており 12 種類が存在する。N 末端側ドメインが他のタンパクとの相互作用を行い、その機能を発揮すると考えられている。主な機能としては、endo-, exocytosis, membrane scaffolding, Ca<sup>2+</sup> signaling などがあげられる。Annexin A4 の個別の機能については不明な点が多い。癌組織では、腎細胞癌、胃癌、子宮内膜癌、卵巣明細胞腺癌などで発現の亢進が認められている。Annexin A4 の癌細胞株における機能に関しては、強制発現によって抗癌剤抵抗性 (Han et al., 2000; Kim et al., 2009)、運動能 (Zimmermann et al., 2004) の亢進を認めたとの報告が存在するが、卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた報告は、調べ得た限り存在しない。また、annexin A4 には 2 次元電気泳動で異なる等電点を示す 2 つのサブタイプが存在することを我々のグループが見出しているが、その成因は不明である。本研究に用いた細胞株では、OVTOKO が酸性型優位、OVISE が塩基性型優位の annexin A4 発現パターンである。

以上より、本研究の目的を、予後不良な組織型である卵巣明細胞腺癌で高頻度に高発現している annexin A4 に着目し、annexin A4 の卵巣明細胞腺癌の進展、化学療法抵抗性との関連を調べることと、annexin A4 の等電点の異なる 2 つのサブタイプの構造的、機能的な差異を調べることに、とした。

## 2. 実験材料と方法

卵巣明細胞腺癌細胞株 OVTOKO, OVISE を用いた。Short hairpin RNA (shRNA) を発現するプラスミドベクターを遺伝子導入し、G-418 によって選択して、annexin A4 恒常発現抑制株を作製した。コントロールには、非認識ランダム配列の shRNA を発現するプラスミドが恒常発現する株を作製し、これを用いた。臨床検体は、横浜市立大学の倫理委員会の承認を得て、同意のある症例を対象とし、手術による切除検体を用いた。

細胞増殖能と抗癌剤感受性の検討は、細胞の viability を WST-1 assay によって測定して行った。細胞運動能と浸潤能は、チャンバー法による transwell assay で評価した。Annexin A4, LMP2, RHAMM の発現はウエスタン・ブロッティングで調べた。臨床検体における annexin A4 の発現は、免疫組織染色を行い、染色範囲と染色強度をそれぞれ 0 から 3 の 4 段階に分類してその合計値を IHC スコアとして評価した。Annexin A4 の異なる等電点をもつ 2 つのサブタイプは、2 次元電気泳動で分離し、ウエスタン・ブロッティングで検出した。翻訳後修飾による変化は、リン酸化の可能性を lambda protein phosphatase で、カルシウムイオン結合の可能性を EDTA で、リジン残基アセチル化の可能性を HDAC (histone deacetylase) 阻害剤

(SAHA もしくは MS-275) で処理することによって検討した.

### 3. 結果と考察

臨床検体の免疫組織染色の結果, 本研究に用いた 52 例全ての卵巣明細胞腺癌組織で annexin A4 は高度に発現していた. 他の組織型では, 4 例の粘液性腺癌全てと, 6 例の類内膜腺癌のうちの 2 例で, annexin A4 の IHC スコア 4 以上を認めた. それに対し, 3 例の未分化癌全てと, 漿液性腺癌の 93% (13 例 / 14 例) では annexin A4 陰性であった. 良性症例では, 2 例のみではあるが, 本研究に用いた粘液性腺腫のどちらも annexin A4 の IHC スコア 6 と高発現を示した. 正常卵巣は, 6 例のみではあるが, 表層上皮や卵細胞, 卵胞細胞の他, 間質細胞も含め, annexin A4 陰性であった.

細胞増殖能は, OVTOKO では, annexin A4 の発現抑制によって著明に抑制され, 細胞の倍加時間は約 2.5 倍に延長した. OVISE でも同様の傾向を認め, 倍加時間は約 2 倍に延長したが, コントロール株のうちの 1 つで, 同様の増殖抑制を認めた.

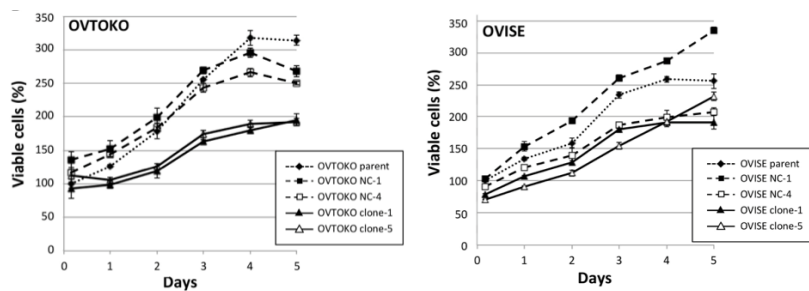


図 1. Annexin A4 発現抑制は, 細胞増殖を抑制した.

抗癌剤感受性は, annexin A4 発現抑制によって, OVTOKO でカルボプラチン, OVISE でパクリタキセルに対して, 改善を示した. カルボプラチンに対する OVTOKO の 50%阻害濃度は, コントロール株に比較して 40%以下に低下した. パクリタキセルに対しては, OVTOKO は非常に抵抗性で, 50%阻害濃度は 50  $\mu$ M 以上であった. OVTOKO では, annexin A4 発現抑制によって感受性の変化は認めなかった. これに対して, OVISE では, 2 つのコントロール株で感受性が異なったために結論には至らなかったが, annexin A4 発現抑制によってパクリタキセル感受性改善の傾向を認めた.

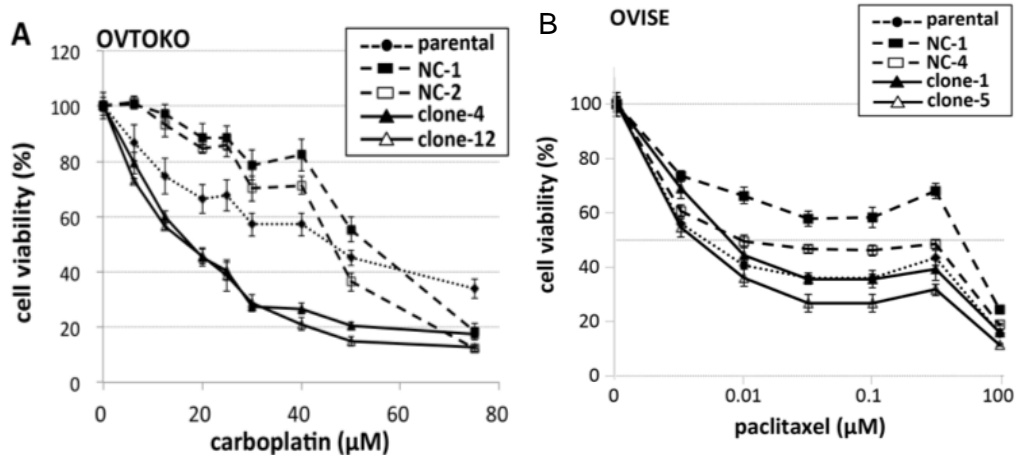


図 2. Annexin A4 発現抑制は，OVTKO のカルボプラチン感受性，OVISE のパクリタキセル感受性を改善した。

細胞運動能と浸潤能は，OVISE でのみ，annexin A4 発現抑制で有意に抑制された。

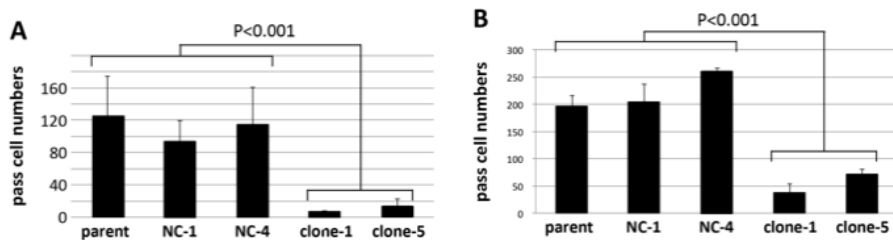


図 3. Annexin A4 発現抑制は，OVISE の運動能 (A)，浸潤能 (B) を抑制した。

胃癌細胞株 AGS の報告で，annexin A4 強制発現によって膜タンパクの RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor), LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2) の発現促進を認めたとされている (Lin et al., 2012). RHAMM は，既に細胞運動能を亢進するとの報告が複数存在する (Foley et al., 2012; Hall et al., 1994). LAMP2 は，黒色種，大腸癌，線維肉腫で浸潤・転移に関連することが報告されている (Sarafian et al., 1998). 我々の細胞株においてもその発現を検討したところ，RHAMM は OVTKO, OVISE のどちらにおいても発現はわずかであったが，LAMP2 は OVISE で相当量の発現を認め，annexin A4 発現抑制によって LAMP2 の発現は著明に低下した。OVISE は，その運動能，浸潤能を LAMP2 に依存しており，annexin A4 がその発現量の調節に関連しているために，OVISE でのみ annexin A4 発現抑制によって運動能，浸潤能の低下を認めたと考えられた。

発現抑制による表現型変化を認めた細胞株がそれぞれ異なったことは，OVTKO と OVISE で優位に発現しているサブタイプが異なることによると仮説を立て，phosphatase 処理，EDTA 処理，HDAC 阻害剤処理で 2 次元電気泳動におけるサブタイプの発現比率が異なるかを調べた。

実験を行った範囲では、変化を認めなかった。さらに、臨床検体から抽出したタンパクを用いて2次元電気泳動を行って2つのサブタイプが様々な比率で発現していることを確認した。これを、病期、予後、化学療法奏効性や、免疫組織染色における細胞内局在と関連するか調べたが、実験を行った範囲では、有意な傾向は認めなかった。

本研究で我々は、卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた発現抑制系においても、annexin A4は細胞増殖、抗癌剤抵抗性、運動能、浸潤能に関与していることを明らかにした。そして、異なる等電点をもつ2つのサブタイプが、異なる細胞生理学的機能をもちうる可能性を提示した。今後のさらなるサブタイプ成因の解明は、卵巣明細胞腺癌の診断・治療、予後の改善に寄与するannexin A4の、さらなる理解を促すと考える。

#### 引用文献

Foley JP, Lam D, Jiang H, Liao J, Cheong N, McDevitt TM, Zaman A, Wright JR, and Savani RC. (2012). Toll-like receptor 2 (TLR2), transforming growth factor- $\beta$ , hyaluronan (HA), and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) are required for surfactant protein A-stimulated macrophage chemotaxis. *J Biol Chem*, 287(44), 37406-37419.

Hall CL, Wang C, Lange LA, and Turley EA. (1994). Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol*, 126(2), 575-588.

Han EK, Tahir SK, Cherian SP, Collins N, and Ng SC. (2000). Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *Br J Cancer*, 83(1), 83-88.

IARC, GLOBOCAN 2008, "Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide."

(accessed on Nov 22, 2013)

<http://globocan.iarc.fr/>

Kim A, Enomoto T, Serada S, Ueda Y, Takahashi T, Ripley B, Miyatake T, Fujita M, Lee CM, Morimoto K, Fujimoto M, Kimura T, and Naka T. (2009). Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *Int J Cancer*, 125(10), 2316-2322.

国立がん研究センターがん対策情報センター, "がん情報サービス" (accessed Nov 22, 2013)

<http://ganjoho.jp/public/index.html>

Lin LL, Huang HC, and Juan HF. (2012). Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays. *PLoS One*, 7(9), doi: 10.1371/journal.pone.0044615

Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP, Liu J, Broaddus R, Frumovitz M, Atkinson EN, Smith DI, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC Jr, and Lu KH. (2005). Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon. *Clin Cancer Res*, 11(17), 6116-6126.

Miao Y, Cai B, Liu L, Yang Y, and Wan X. (2009). Annexin IV is differentially expressed in clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*, 19(9), 1545-1549.

Morita A, Miyagi E, Yasumitsu H, Kawasaki H, Hirano H, and Hirahara F. (2006). Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Proteomics*, 6(21), 5880-5890.

日本産科婦人科学会 (2008) 婦人科腫瘍委員会報告. 2006 年度卵巣腫瘍患者年報. *日産婦誌* 60, 1052-1085.

Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, Letesson JJ, Van den Brule F, Castronovo V, Wattiaux R, and Coninck SW. (1998). Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer*, 75(1), 105-111.

Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM, and Cho KR. (2002). Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 62(16), 4722-4729.

Toyama A, Suzuki A, Shimada T, Aoki C, Aoki Y, Umino Y, Nakamura Y, Aoki D, and Sato

TA. (2012). Proteomic characterization of ovarian cancers identifying annexin-A4 phosphoserine aminotransferase, cellular retinoic acid-binding protein 2, and serpin B5 as histology-specific biomarkers. *Cancer Sci*, 103(4), 747-755.

Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, and Hirohashi S. (2003). Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*, 163(6), 2503-2512.

Yamaguchi K, Mandai M, Oura T, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Matsui S, Murphy SK, and Konishi I. (2010). Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene*, 29(12), 1741-1752.

Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J, Teller S, Junker H, Schmoll D, Protzel C, Scharf C, Kleist B, and Walther R. (2004). Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer Lett*, 209(1), 111-118.

Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CG, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, and Birrer MJ. (2005). Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 11(18), 6422-6430.



## 論文目録

### I 主論文 (本人を筆頭とする原著論文)

Mogami T, Yokota N, Asai-Sato M, Yamada R, Koizume S, Sakuma Y, Yoshihara M, Nakamura Y, Takano Y, Hirahara F, Miyagi Y, Miyagi E. Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *PLoS One*, 8(11), doi: 10.1371/journal.pone.0080359. November 11, 2013.

### II 副論文 (原著論文の内容と関係のある論文)

### III 参考論文 (原著論文の内容以外の論文)

Mogami T, Haruya S, Yokota N, Suzuki R, Sukegawa A, Asai-Sato M, Miyagi E, Hirahara F. Serum KL-6 for diagnosis of ovarian carcinoma associated with dermatomyositis: two case reports and characteristic clinicopathological factors. *Int Canc Conf J*, 1, 83-87. April 2012.

加藤沙絵, 最上多恵, 宇佐美友希, 倉澤健太郎, 平吹知雄, 白須和裕. 診断に苦慮した虫垂粘液性嚢胞腺癌の卵巣転移の1例. *日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌*, 第47巻第4号, 411頁~416頁. 平成22年11月発行