



Title	Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A
Author(s)	松崎, 慎哉
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34298
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	松崎 慎哉
論文題名 Title	Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. (Annexin A4は銅のトランスポーターであるATP7Aを介して、プラチナ耐性獲得に関与する)
論文内容の要旨	
【 目的 】 これまでに我々は化学療法抵抗性である卵巣明細胞腺癌において Annexin A4 (Anx A4) がプラチナ耐性へ関与することを報告してきた。当研究では Anx A4 がプラチナ耐性を誘導する機序解明を目的とした。	
【 方法 】 Anx A4 が弱陽性である子宮内膜癌細胞株 HEC1 を用いた。HEC1 細胞株に対してコントロールベクターを導入した HEC1 コントロールベクター株および HEC1 細胞株に Anx A4 cDNA を遺伝子導入した HEC1 Anx A4 安定発現株を樹立し、これらを用いて Cisplatin の IC_{50} (50%阻害濃度) と細胞内プラチナ蓄積量、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。プラチナ耐性を誘導する機序としてはプラチナトランスポーターと知られる ATP7A に着目し、細胞を Biotin 標識した後の Western Blotting (WB) 法、細胞染色法を用い、プラチナ系薬剤投与前後の細胞内における局在の変化を検討した。また、HEC1 Anx A4 安定発現株に対し、ATP7A siRNA にて ATP7A の発現を抑制することによる、Cisplatin の IC_{50} および細胞内プラチナ蓄積量の変化を解析した。	
【 成績 】 Anx A4 の強制発現により、Cisplatin の IC_{50} は $8.4 \mu M$ (HEC1 コントロールベクター株) から $34.9 \mu M$ (HEC1 Anx A4 安定発現株) へ有意に上昇した ($p < 0.01$)。また、ヌードマウスを用いた in vivo での Cisplatin による腫瘍増殖抑制率は HEC1 コントロールベクター株の 69% に対し、HEC1 Anx A4 安定発現株では 5% と有意に腫瘍増殖抑制率が低かった ($p < 0.01$)。Cisplatin 投与後の細胞内プラチナ蓄積量はコントロールベクター株では 0.15 pg/cell に対し、HEC1 Anx A4 安定発現株では 0.03 pg/cell へ有意に低下し ($p < 0.01$)、プラチナ排出の促進がプラチナ耐性を誘導していると考えられた。次に、細胞二重染色法を用いて、プラチナ系薬剤投与による Anx A4 と ATP7A の局在を解析したところ HEC1 コントロールベクター株では Anx A4 の発現は認められず、ATP7A のみ細胞質から細胞膜へと局在を変化させていたのに対して、HEC1 Anx A4 安定発現株ではプラチナ系薬剤投与後 Anx A4 と ATP7A は共に細胞質から細胞膜へと局在を変え、共局在していた。これらの結果は Biotin 標識を用いた WB 法によっても裏付けられた。また、HEC1 Anx A4 安定発現株に対し ATP7A siRNA を用いて ATP7A の発現を抑制したところ Cisplatin の IC_{50} が $34.9 \mu M$ から HEC1 親株やコントロール株と同等の $11.0 \mu M$ にまで改善した。Cisplatin 投与後の細胞内プラチナ蓄積量は、HEC1 Anx A4 安定発現株にコントロール siRNA を遺伝子導入した細胞株では 0.03 pg/cell であったのに対し、ATP7A siRNA を遺伝子導入した細胞株では 0.113 pg/cell と有意に上昇しており ($p < 0.01$)、ATP7A の発現抑制により細胞内プラチナ蓄積量が HEC1 の親株やコントロールベクター株と同等のレベルにまで上昇していることが明らかとなった。	
【 結論 】 Anx A4 はプラチナ系薬剤投与後細胞質から細胞膜へと局在を変え、細胞膜において ATP7A と共局在し、プラチナ耐性を誘導していることが初めて示された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松崎 慎哉			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	木村 正
	副 査	大阪大学教授	野々村 祝夫
	副 査	大阪大学教授	野口 眞三郎

論文審査の結果の要旨

我々は以前、Annexin A4 (Anx A4) がプラチナ (Pt) 系薬剤排出を促進し、Pt 耐性へ関与することを報告した。当研究ではその機序解明のため、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、Cisplatin の IC_{50} (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 IC_{50} は $8.4\mu M$ から $34.9\mu M$ へ上昇した。In vivo における Cisplatin 投与では HEC1 コントロール株は 55% に対し、HEC1-A4 株では 5% と有意に腫瘍増殖抑制率が低かった。Cisplatin 暴露後の細胞内 Pt 濃度はコントロール株では $0.34pg/cell$ に対し、HEC1-A4 株では $0.09pg/cell$ へ低下し、Pt 排出の促進が Pt 耐性の原因と考えられた。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、共局在していた。また、HEC1-A4 株の Cisplatin IC_{50} は siRNA を用いた ATP7A のノックダウンにより $34.9\mu M$ から $11.0\mu M$ へコントロール株と同等の感受性にまで改善した。これらの結果より、Anx A4 と ATP7A の細胞膜での共局在や機能における関連を示すことに成功した。

Anx A4 は ATP7A のプラチナ排出を促進し、Pt 耐性を獲得していることを初めて示すことに成功したため、学位の授与に値すると思われる。