

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10770

研究課題名(和文)新規癌抗原分子KIF20Aの神経膠腫における発現・機能解析

研究課題名(英文) Expression and function analysis of novel cancer antigen molecule KIF20A in gliomas

研究代表者

三輪 点 (MIWA, TOMORU)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20365282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：発現解析の結果、正常脳組織や他の癌腫細胞株と比較して新規癌抗原KIF20Aは神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織において強く発現していることが確認できた。次に細胞周期に与える影響や細胞死誘導の有無を解析した結果、ダウンレギュレーションしたKIF20Aは神経膠腫において細胞質分裂障害による細胞増殖抑制をきたしていることが確認できた。それらを踏まえ、担癌(神経膠腫)マウスモデルにおける抗腫瘍効果の評価を行い、免疫組織学的解析によるKIF20Aの発現、また脳腫瘍増殖能・浸潤能への影響が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の知見は今後神経膠腫における免疫療法においてKIF20Aが分子標的の一つとなる可能性を示唆することができ、国内外において未だ難渋している神経膠腫の治療に対して十分希望を与えうる内容であると考えられる。また本分子は癌の増殖を中心に腫瘍のBiologyに強く関与しており、我々の研究結果は神経膠腫のみならず、他の癌腫治療への波及効果も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the tumor-associated antigen, KIF20A, was highly expressed in gliomas, but was rarely expressed in adult normal tissues. Down-regulation of KIF20A induced glioma cell growth suppression due to the failure of cytokinesis, and therefore, KIF20A has an essential role in glioma cell proliferation. Although immunological investigations are needed before KIF20A is investigated clinically, our findings indicate that KIF20A may be a promising molecular target for glioma immunotherapy.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：KIF20A 神経膠腫 治療標的分子 Oncoantigen Cytokinesis

## 1. 研究開始当初の背景

原発脳腫瘍で最多を占める神経膠腫は手術、化学療法、放射線治療といった集学的治療をもつてなお根治困難な悪性脳腫瘍である。特に Grade である膠芽腫の生命予後は約 18 ヶ月程度と最悪である。悪性神経膠腫は非常に浸潤性なため全摘出はほとんど不可能であり非外科的治療に頼らざるを得ない状況である。この新たな治療法の開発に対して、我々はこれまで神経膠腫における癌抗原分子の同定に成功してきた。これらの癌抗原はその発現が癌細胞特異的であり、癌細胞の増殖に不可欠であるという理想的な癌抗原 (Oncoantigen) の特徴を有するものであり臨床応用にむけて研究中である。近年さまざまな試みで癌抗原分子の同定がなされてきているが、cDNA マイクロアレイの技術を用いて新規癌抗原分子 KIF20A が同定されている。新規癌抗原分子 KIF20A は膵癌を中心として発現・機能解析がすでになされており、ペプチドワクチン免疫治療として臨床試験が行われるまで研究が進んでいる。KIF20A は神経膠腫においても理想的な癌抗原分子として強く期待され、我々が同定してきた神経膠腫抗原分子とともにペプチドカクテルワクチン療法として臨床応用できるものと考えている。

我々のこれまでの実験では脳組織を含め正常組織における KIF20A の発現は非常にわずかである一方で、6 種の神経膠腫細胞株において高発現が認められ、またそれはすでに KIF20A の研究が進んでいる膵癌細胞株や大腸癌細胞株と遜色ない発現レベルであった。我々は複数の神経膠腫患者組織においても高発現していることを確認しており、Bioinformatics を応用した複数のデータベース解析 (Oncomine, REMBRANDT) でもその裏づけはなされている。そして神経膠腫の KIF20A の発現量が高いほど生命予後が悪いという結果が複数のデータベース解析 (REMBRANDT, PrognoScan) で明らかになっており、我々のこれまでの研究でも KIF20A 阻害下で神経膠腫細胞株の増殖が抑制されることから非常に有望な治療標的分子として期待される。

また近年の幹細胞研究の進展にともなって悪性神経膠腫を含めた様々な悪性腫瘍に癌幹細胞が存在することが明らかとなっている。治療抵抗性で再発するという癌の特徴の原因の 1 つとして self-renewal、multipotency、tumor initiating といった特徴を持つがん幹細胞が注目されている。癌幹細胞は腫瘍形成・増殖・再発の要因になっていると考えられるようになり、悪性神経膠腫治療の新たな治療ターゲットとしても重視されている。我々は神経膠腫患者の検体から脳腫瘍幹細胞株を樹立し、脳腫瘍幹細胞抗原の同定とそれを標的とした治療の研究も行ってきた。KIF20A が脳腫瘍幹細胞に対しても共通した治療標的であるかどうかも検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規癌抗原 KIF20A (Kinesin family member 20A) が神経膠腫の分子治療標的となりうるかを検証するものである。新規癌抗原 KIF20A は膵癌を中心にすでに免疫治療の標的分子として期待されているが、本分子は癌細胞の増殖に強く関与することから Oncoantigen という理想的な癌抗原として特に期待されている。我々はすでに複数の神経膠腫組織や細胞株で KIF20A が高発現し、Knockdown Assay で増殖抑制効果を示すという結果を得ており、神経膠腫でのさらなる発現・機能解析を試みることで KIF20A を標的とした新たな治療法の開発を目指す。近年注目されている脳腫瘍幹細胞に対しても本分子が治療標的になり得るかを検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では新規癌抗原分子 KIF20A の発現・機能解析を行う。多数の神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株・他臓器の正常組織における KIF20A の発現を Western blot、quantitative PCR、免疫染色によって解析し、WHO grade と KIF20A の発現の相関性を解析する。また他の癌種では細胞周期に応じて KIF20A 発現量が変化するという報告があり、神経膠腫細胞での細胞周期と KIF20A 発現量の関係性を明らかにする。機能解析では siRNA を用いて KIF20A を knock down することで細胞周期、細胞死、Autophagy に与える影響を評価する。また前臨床実験として、神経膠腫担癌マウスモデルに RNAi による KIF20A 阻害を行うことによって腫瘍の組織学的な変化、生存率の変化、正常脳組織への影響を評価し新たな治療法開発の可能性を検証する。

## 4. 研究成果

まず、各種神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株における KIF20A の発現解析を Western blot によって行い、さらに SYBR green を用いた quantitative PCR でも発現解析を行うことで定量的な評価も可能となったため Western Blot の結果の再現性を検討した。その結果、新規癌抗原 KIF20A は正常脳組織や他の癌腫細胞株と比較して神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織において強く発現していることが確認できた。

次に、抗腫瘍効果をもたらすメカニズムの解明として細胞周期に与える影響や細胞死誘導の有無を解析した。神経膠腫細胞株を細胞周期 M 期に同調させた際に KIF20A の発現量がどのように変化するのか評価した。siRNA による KIF20A 阻害下における細胞周期を FACS で解析し、アポトーシス誘導能に関しては Caspase 3/7 activity を測定した。KIF20A 阻害下での Autophagy

誘導の有無の証明には Autophagy marker (LC3/p62) の発現を Western blot で調べることで評価した。その結果ダウンレギュレーションした KIF20A は神経膠腫において細胞質分裂障害による細胞増殖抑制をきたしていることが改めて確認できた。

それらの KIF20A の発現解析、機能解析を踏まえ、担癌（神経膠腫）マウスモデルにおける抗腫瘍効果の評価を行った。in vitro 実験によって KIF20A が癌細胞の増殖に関与していることは明らかであり、担癌（神経膠腫）マウスモデルにおいて RNAi を用いた KIF20A 阻害による治療を試みた。RNAi を用いて KIF20A が knock down された神経膠腫細胞株を調整し、この細胞株を免疫不全マウスの脳や皮下に移植した。一定期間後に担癌マウスから腫瘍を摘出し凍結切片を作成した。この検体を用いた免疫組織学的解析により KIF20A の発現、脳腫瘍増殖能・浸潤能への影響が確認された。

これらの新たな知見は今後神経膠腫における免疫療法において KIF20A が分子標的の一つとなる可能性を示唆することができ、国内外において未だ難渋している神経膠腫の治療に対して十分希望を与えうる内容であった。

#### <参考文献>

- 1) Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, et al. Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J Neurooncol.* 2012;106(3):519-529.
- 2) Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, et al. Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Mol Cancer.* 2011;10:60.
- 3) Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, et al. Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene.* 2004;23(7):1420-1427.
- 4) Takahashi S, Yamada-Okabe H, Hamada K, et al. Downregulation of uPARAP mediates cytoskeletal rearrangements and decreases invasion and migration properties in glioma cells. *J Neurooncol.* 2011;103(2):267-276.
- 5) Saito K, Iizuka Y, Ohta S, et al. Functional analysis of a novel glioma antigen, EFTUD1. *Neuro Oncol.* 2014;16(12):1618-1629.
- 6) Imai K, Hirata S, Irie A, et al. Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2011;104(2):300-307.
- 7) Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, et al. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene.* 2004;23(13):2385-2400.
- 8) Gasnereau I, Boissan M, Margall-Ducos G, et al. KIF20A mRNA and its product MKIp2 are increased during hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 2012;180(1):131-140.
- 9) Yamashita J, Fukushima S, Jinnin M, et al. Kinesin family member 20A is a novel melanoma-associated antigen. *Acta Derm Venereol.* 2012;92(6):593-597.
- 10) Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, et al. Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Res.* 2005;65(1):105-112.
- 11) Asahara S, Takeda K, Yamao K, et al. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2013;11:291.
- 12) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-5828.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yoshida K, Miwa T, Akiyama T, Nishimoto M, Kamamoto D, Yoshida K: Primary Intracranial Rhabdomyosarcoma in the Cerebellopontine Angle Resected After Preoperative Embolization. *World Neurosurg* 116:110-115, 2018. doi: 10.1016/j.wneu.2018.05.054. 査読あり
2. Tamura R, Miwa T, Ohira T, Yoshida K: Diagnosis and treatment for pure aqueductal tumor. *J Clin Neurosci* 44, 260-263, 2017. doi: 10.1016/j.jocn.2017.06.059. 査読あり

##### 〔学会発表〕(計 9 件)

1. 三輪点, 田村亮太, 佐々木光, 吉田一成: Pilocytic astrocytoma 全摘出不能例の嚢胞性拡大に対する治療と課題. 日本脳神経外科学会第 77 回学術総会, 2018
2. 西本真章, 尾原健太郎, 釜本大, 田村亮太, 三輪点, 吉田一成, 佐々木光: 頭蓋内 Germinoma おける腫瘍免疫機構関連因子の検討. 第 36 回日本脳腫瘍病理学会, 2018
3. 西本真章, 三輪点: 放射線治療著効後、播種性病変を認めた橋グリオーマの一例. 第 8 回信濃町小児がんクラスター症例検討会, 2018

4. Miwa T, Tamura R, Sasaki H, Yoshida K: Treatment strategy for the expanding cyst of pediatric pilocytic astrocytomas. 26th Congress of the European Society for Pediatric Neurosurgery. 2018
5. Miwa T, Tamura R, Sasaki H, Yoshida K: Treatment strategy for the expanding cyst of pediatric pilocytic astrocytomas. 18th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, 2018
6. Miwa T, Tamura R, Ohira T, Yoshida: Pure aqueductal tumors: A rare entity. 5th Quadrennial meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS), 2017
7. 三輪点, 田村亮太, 佐々木光, 吉田一成: Pilocytic astrocytoma 全摘出不能例の嚢胞性拡大に対する対応. 第45回日本小児神経外科学会, 2017
8. 三輪点, 佐々木光, 大平貴之, 吉田一成: 中脳実質病変に対する総合的治療戦略. 日本脳神経外科学会第75回学術総会, 2016
9. Miwa T, Tamura R, Horikoshi T, Yoshida K: Pure aqueductal pilocytic astrocytoma. 17<sup>th</sup> International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。