

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09044

研究課題名(和文) 微小管ダイナミクスに関わるKIF20Bの機能解析と乳癌幹細胞の新規治療への展開

研究課題名(英文) Functional analysis of KIF20B involved in microtubule dynamics and its application to novel treatment of breast cancer stem cells.

研究代表者

大西 隆之(Ohnishi, Takayuki)

山口大学・大学研究推進機構・講師(特命)

研究者番号：30418959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌幹細胞の様に増殖速度が低下するキネシンタンパクのKIF20B遺伝子変異に着目して、癌幹細胞の細胞分裂や増殖の鍵となる因子を同定することを目的とする。KIF20Bの遺伝子の変異は増殖速度の減少と多核細胞の増加の表現型を示したことから、癌幹細胞の発生や進展に関わる変異であるという仮説を立てた。セルソーターによりKIF20B遺伝子変異を持つMCF7細胞を分離し、RNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNA-seq解析を行った。現在、RNA-seqの結果の解析を進めている。また、KIF20Bの変異型の遺伝子を発現するノックインマウスをi-GONAD法を用いて作製を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は抗がん剤に抵抗性があり、抗がん剤による根治が難しい。変異を持つKIF20Bタンパク質を発現するMCF7細胞を分離し、RNA-seqの解析を進めている。また、生体内での機能を明らかにするために、i-GONAD法を用いたKIF20Bの変異型の遺伝子を発現するノックインマウスの作製を進めている。この解析が進めることにより、乳がん幹細胞に関する鍵となる遺伝子群の同定や乳がん幹細胞への新たな診断法や分子標的薬の研究開発への研究基盤を築くことができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on the KIF20B gene mutation, a kinesin protein that reduces the proliferation rate in cancer stem cells, and aim to identify the key factors in the cell division and proliferation of cancer stem cells.

Since the KIF20B gene mutation shows a phenotype of reduced proliferation rate and increased multinucleated cells, we hypothesized that this mutation is involved in the development and progression of cancer stem cells. MCF7 cells with KIF20B gene mutations were isolated using a cell sorter, RNA was extracted, and RNA-seq analysis was performed using a next-generation sequencer. Analysis of the RNA-seq results is currently underway. We are also working on creating knock-in mice expressing a mutant KIF20B gene using the i-GONAD method.

研究分野：分子生物学、生化学、腫瘍生物学

キーワード：乳がん シグナル伝達経路 がん幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは日本人女性の部位別がん年齢調整罹患率の第一位となっており、20~23 人に 1 人が乳がんを罹患している。最近、水上(研究分担者)らはエストロゲン受容体陽性乳がん患者の乳がん細胞を用いて全エキソームシーケンス解析を行ったところ、キネシタンパク質 KIF20B の変異遺伝子を同定した。KIF20B は細胞分裂期の紡錘体形成と染色体分配などの微小管ダイナミクスに関わり、様々ながん細胞ではキネシタンパク質を過剰発現している。ヒト乳腺がん由来細胞株 MCF7 細胞に Kif20b の変異遺伝子を導入すると細胞増殖の遅延が観察されたことから、Kif20b の遺伝子変異はがん細胞またはがん幹細胞の増殖に関わることが予想された。

### 2. 研究の目的

Kif20b の変異遺伝子のがん細胞の分裂・増殖に影響を与えることから、Kif20b の変異遺伝子を発現する MCF7 細胞を分離し、細胞学的、生化学的な特徴や性質を分析する。更に、この結果を基に、分離した Kif20b の変異遺伝子を発現する MCF7 細胞を次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、Kif20b の変異遺伝子を発現する MCF7 細胞の増殖や多核の細胞に関わる遺伝子を同定する。同定した遺伝子群の中で Kif20b の変異遺伝子を発現する MCF7 細胞の増殖を促進し、新たな抗がん剤への鍵となる遺伝子を同定することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### Kif20b 変異体遺伝子の作製

Kif20b 変異体遺伝子は部位特異的変異体の作製方法に従った。変異部位にプライマーを設計し、PCR 反応を行った。次に鋳型 DNA を特異的に切断する制限酵素で反応させ、鋳型 DNA のみを分解し、PCR により増幅されたプラスミド DNA のみが残るようにした。続いてこの溶液を用いて PCR により増幅されたプラスミド DNA を大腸菌に導入した。形質転換した大腸菌のコロニーから Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を使って、プラスミド DNA を抽出した。Kif20b の変異の導入の確認は DNA の塩基配列を決定することにより行った。DNA の塩基配列の決定は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使って行った。Kif20b の変異の導入が確認されたプラスミド DNA を使って、MCF7 細胞への transfection を行った。

MCF7 細胞への transfection に使用するためのプラスミド DNA は Genopure Plasmid Midi Kit (Roche. Diagnostics) を使って精製した。

#### Kif20b 変異体遺伝子発現細胞の観察

Kif20b の野生型や変異型の遺伝子を発現する MCF7 細胞の形態の観察は MCF7 細胞に Kif20b WT と GFP を持つプラスミド (Kif20b WT/GFP)、KIF20B 変異体と GFP を持つプラスミド (Kif20b Mut/GFP) をそれぞれ遺伝子導入した。MCF7 細胞への遺伝子導入は Neon® Transfection System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行った。遺伝子導入後、免疫染色により可視化し、オールインワン蛍光顕微鏡 (keyence) で観察した。

#### Kif20b 変異体遺伝子発現細胞の増殖速度の測定

細胞の増殖速度はリアルタイム細胞アナライザーを使って測定した。MCF7 細胞に Kif20b WT/GFP、Kif20b Mut/GFP を Neon® Transfection System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、xCELLigence (Agilent) の専用チャンバーに播種し、xCELLigence RTCA S16 システム (Agilent) を使って細胞増殖の速度を測定した。

#### i-GONAD 法を利用したチロシナーゼ回復実験

Kif20b の変異型の遺伝子を発現するノックインマウスの作製は研究分担者である水上が導入した i-GONAD 法を用いて行うために、ICR マウスを用いたチロシナーゼを標的としたゲノム編集による遺伝子改変マウスの作製で技術の確認を行った。Integrated DNA Technologies では

sgRNA (シングルガイド RNA) はその長さのために一度に合成することが出来ないため、sgRNA を元来の crRNA (シーアール RNA) と tracrRNA (トレイサー RNA) の 2 種に分けることで、gRNA を 2 本の化学合成 RNA として使用する。そのため、チロシナーゼ回復実験用の tracrRNA (Integrated DNA Technologies) および crRNA (Integrated DNA Technologies) を合成し、tracrRNA と crRNA をアニーリングさせた。次にここに Csa9 タンパク質 (Integrated DNA Technologies) を加え、複合体を形成させた。ロックインを行うために、ドナーオリゴ DNA として、一本鎖オリゴ (ssODN: single-stranded oligodeoxynucleotide) をデザインし、そして tracrRNA・crRNA・Csa9 タンパク質の複合体の溶液に ssODN (Integrated DNA Technologies) を加えることで、ゲノム編集試薬を調整した。ゲノム編集試薬を 0.7 日胚の受精卵のある ICR マウスの卵管膨大部に向けて注入し、電気刺激を行う遺伝子導入装置 (BEX) を使って、電気穿孔法により、受精卵のゲノム編集を行った。チロシナーゼ回復は妊娠 14 から 16 日目のゲノム編集を行った ICR マウスを開腹し、胎仔の目の色で判断した。ICR マウスはアルビノなので、胎仔の目の色は透明であるが、ゲノム編集が成功し、チロシナーゼ遺伝子が回復していた場合、胎仔の目の色は黒色になるので、ゲノム編集の効率が判別可能となる。

#### 4. 研究成果

KIF20B はキネシンファミリーのメンバーであり、細胞質分裂期を通して紡錘体と微小管に局在することが知られている。また、KIF20B は紡錘体または微小管集合には必要ではないが、微小管形成および後期成熟段階に影響することが知られている。がんへの関与については膀胱がん細胞の増殖、アポトーシス阻害および発がん進行を促進するがん遺伝子として作用することが知られている。そのため、Kif20b の変異体は細胞分裂や染色体の分配に影響を与えることが予想された。そこで、乳がんの株化細胞である MCF7 細胞に Kif20b WT/GFP、Kif20b Mut/GFP を遺伝子導入後、Kif20b WT/GFP や Kif20b Mut/GFP を発現する MCF7 細胞を顕微鏡で観察したところ、Kif20b Mut/GFP を発現する MCF7 細胞が Kif20b WT/GFP を発現する MCF7 細胞よりも不均等な分裂が観察され、多核の細胞が増加していた。この結果より、変異型 Kif20b が染色体の分配などに欠陥があることが示唆された。

Kif20b Mut/GFP を発現する MCF7 細胞が不均等な分裂が観察され、多核の細胞が増加していたことから、細胞の分裂において機能不全があるのであれば、細胞の増殖速度に影響が出ている可能性が考えられた。そこで、Kif20b WT/GFP または Kif20b Mut/GFP プラスミド DNA を MCF7 細胞に遺伝子導入後、MCF7 細胞の増殖速度をリアルタイム細胞アナライザーにより測定した。その結果、KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞は KIF20B WT/GFP を発現する MCF7 細胞よりも増殖速度が遅いことが明らかとなった。

KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞の安定的な分離は難しかったことから、Kif20b の変異遺伝子の細胞学的、生化学的な特徴や性質を分析するために、セルソーターにより、KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞を分離することに変更した。次に、セルソーターにより KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞と KIF20B WT/GFP を発現する MCF7 細胞を分離した。セルソーターにより分離した KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。RNA-seq の結果の解析を進めている。

KIF20B Mut/GFP を発現する MCF7 細胞の安定的な分離は難しかったことから、セルソーターによる細胞の分離と並行して、Kif20b の変異型の遺伝子を発現するロックインマウスを i-GONAD 法により作製する予定である。まずはゲノム編集による遺伝子改変マウスの作製で i-GONAD 法の技術の確認を行うために、ICR マウスを用いたチロシナーゼを標的としたゲノム編集による遺伝子改変マウスの作製を行った。その結果、得られた産仔の凡そ 50% でチロシナーゼの遺伝子改変が確認され、i-GONAD 法によるゲノム編集技術を利用した遺伝子改変マウスの作製を進めることが可能であると考えられた。現在、i-GONAD 法を用いた Kif20b の変異型の遺伝子を発現するロックインマウスの作製を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Harada, K., Ferdous, T., Fujiwara, R., Watanabe, K., Mizukami, Y., Mishima, K.	4. 巻 23
2. 論文標題 An elemental diet protects mouse salivary glands from 5-fluorouracil-induced atrophy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13298.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hu, L. Nomura, S., Sato, Y., Takagi, K., Ishii, T., Honma, Y., Watanabe, K., Mizukami, Y., Muto, J.	4. 巻 107
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of differential molecular weight hyaluronic acids on UVB-induced calprotectin-mediated keratinocyte inflammation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2022.06.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Abdillaha, D.A., Kereilwe, O., Mizukami, Y., Watanabe, K., Kadokawa, H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Age-associated changes in gene expression in the anterior pituitary glands of female Japanese black cattle.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mamm Genome.	6. 最初と最後の頁 606-618.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-022-09958-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igase, M., Iwatani, N., Sakai, A., Watanabe, K., Mizukami Y., Mizuno, T.	4. 巻 251
2. 論文標題 The effect of 5-aminolevulinic acid on canine peripheral blood mononuclear cells, Vet Immunol Immunopathol.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vet Immunol Immunopathol.	6. 最初と最後の頁 110473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetimm.2022.110473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komura H, Kakio S, Sasahara T, Arai Y, Takino N, Sato M, Satomura K, Ohnishi T, Nabeshima YI, Muramatsu SI, Kii I, Hoshi M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Alzheimer A Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAK 3 Neurons by Secretion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 452-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.01.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水上 洋一 畑中千春 中川真喜子 西村愛代 渡邊 健司
2. 発表標題 ロボット分注装置を用いた新型コロナウイルスPCR検査の迅速解析方法の開発
3. 学会等名 第32回日本医学看護学教育学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村愛代 渡邊 健司 前田 訓子 山本 滋 諫山 慧士朗 永野浩昭 水上 洋一
2. 発表標題 臨床分離乳癌組織の網羅的遺伝子解析とデータベース分析への応用
3. 学会等名 第32回日本医学看護学教育学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤潤 福田信治 渡邊健司 水上洋一 佐山浩二
2. 発表標題 高濃度トレハロースを用いた新規自家細胞由来 3次元培養皮膚シート作製方法開発
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎恵、佐藤伸哉、水谷有紀子、水上洋一、井上紳太郎
2. 発表標題 ヒト皮膚線維芽細胞でのTMEM2のヒアルロン酸代謝制御における役割
3. 学会等名 第54回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩川麗良、岡本憲明、渡邊健司、水上洋一、永根大幹、山内章寛、金井詠一、高木哲、山下匡、佐藤祐介、川本恵子、岡本まり子
2. 発表標題 TCRシグナル刺激によるイヌTCRレパートリーへの影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諫山慧士朗、渡邊健司、水上洋一
2. 発表標題 LMD法で切り分けた加齢子宮FFPE切片のRNA-seq解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、西村 愛代、諫山 慧士朗、八木 美佳子、康 東天、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNAの体細胞変異は代謝パスウェイを活性化する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	水上 洋一  (Mizukami Yoichi)  (80274158)	山口大学・大学研究推進機構・教授   (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------