

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16769

研究課題名(和文) 子宮平滑筋肉腫におけるKIF4Aの腫瘍増殖に与える影響の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation to the anti tumor activity of KIF4A in uterine leiomyosarcoma

研究代表者

中川 慧 (Nakagawa, Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30650593

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)：難治性疾患である子宮平滑筋肉腫の治療ターゲットを開発するために isobaric tags for relative and absolute quantitation(iTRAQ)を用いて同定したKIF4Aという分子の機能解析を進めた。in vitroで siRNA によるKIF4Aノックダウンは細胞増殖を抑制し、shRNAを用いたin vivoの検証でも腫瘍増殖を抑制した。機序については結果G2/M期細胞の割合がKIF4Aノックダウンで有意に増加しており、細胞周期の関与が示唆された。また1999-2021年までの臨床サンプルで20/26例(77%)にKIF4Aの発現が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療法の確立されていない子宮平滑筋肉腫に対して、網羅的タンパクのスクリーニングを行った結果からKIF4Aを同定し、その機能解析を行った。子宮平滑筋肉腫は標準療法が確立されておらず、その治療戦略の一つとして新規標的分子が腫瘍増殖に与える影響をin vitro, in vivoで証明したとともに、細胞周期がその機能に関与している可能性を明らかにした。本研究は、治療法の確立されていない平滑筋肉腫の治療についてKIF4Aが新規ターゲットの一つとなり得る点を証明したところが学術、社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：We are currently analyzing the function of KIF4A, a molecule highly expressed in uterine leiomyosarcoma, which was identified using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). We evaluated the cell proliferation rate of KIF4A knockdown cells by siRNA and found that proliferation was significantly suppressed (SK-LMS: $-37.2 \pm 4.73\%$, SKN: $-87.7 \pm 4.02\%$, SK-UT1: $-28.1 \pm 3.00\%$, $p < 0.05$). In vivo, down regulation of KIF4A with shRNA significantly suppressed tumor growth (SK-LMS: $1186 \pm 4.02\%$, SK-UT1: $-28.1 \pm 3.00\%$, $p < 0.05$). (SK-LMS: $1186 \pm 118\text{mm}^3$ vs $461 \pm 84\text{mm}^3$, SK-UT1: $1704 \pm 441\text{mm}^3$ vs $514 \pm 230\text{mm}^3$, $p < 0.05$) Cell cycle analysis of the knockdown lines showed that the percentage of G2/M phase cells was significantly increased with KIF4A. We also evaluated the expression of KIF4A in our clinical sample from 1999-2021, and found that 20/26 (77%) of the patients had KIF4A expression.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：leiomyosarcoma LMS KIF4A antisense biomarker

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫(Uterine Leiomyosarcoma; uLMS)は子宮平滑筋組織から発生する腫瘍であり発生頻度は低く10万人あたり2.8人といわれている。(D'Angelo E et al. Gynecol Oncol. 2010) 平均5年生存率は40% (Shabnam Momtahena et al. J Clin Med Res. 2016) と予後不良な疾患であるが、手術による完全切除以外の治療法は限られており、従来の化学療法の奏効率は20%程度と低い(Seddon B et al. Lancet Oncol 2017)。また、平滑筋種などの良性疾患との鑑別にはMRIなどが用いられるがしばしば変性筋種との鑑別は困難であり、特異度の高い血中マーカーもないことから術前の診断も難しいとされている。我々はこれまでに、卵巣がん、子宮体がんなどでiTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)法を用いて腫瘍特異的なタンパクを同定し、その機能解析や治療標的としての治療法の開発を行ってきた (Hiramatsu K et al. Cancer Res. 2018.)。

2. 研究の目的

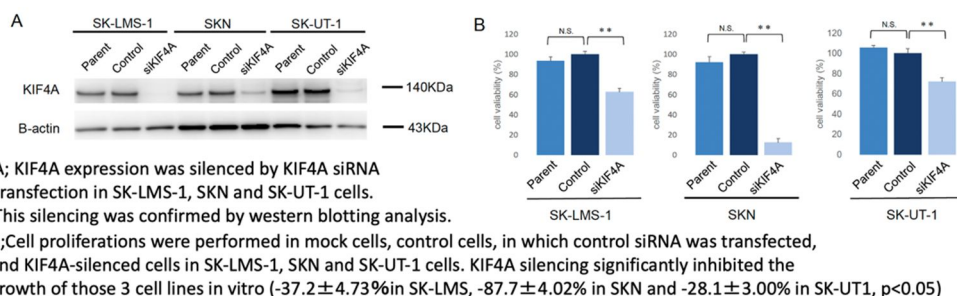
uLMSにおいて特異的に発現の高い分子として同定したKIF4Aが腫瘍増殖や転移に関係するメカニズムを明らかにし、診断マーカー、治療ターゲットとして活用すること。

3. 研究の方法

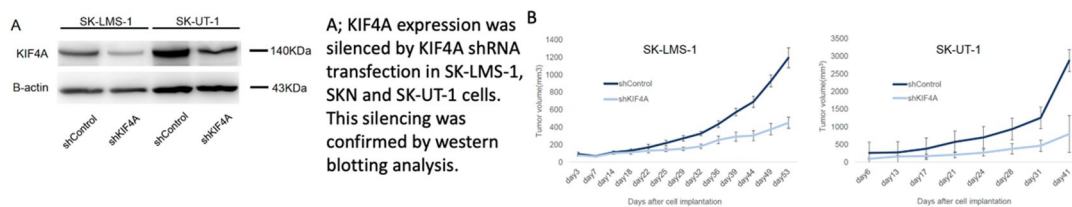
In vitroにおいてsiRNAを用いてKIF4Aの発現を抑制し、その細胞増殖効果、細胞周期に与える影響をWSTアッセイ、Western blotting、フローサイトメトリーを用いて評価した。また、臨床サンプルの免疫染色を行い、子宮筋腫、子宮平滑筋肉腫におけるKIF4Aの発現の評価を行った。

4. 研究成果

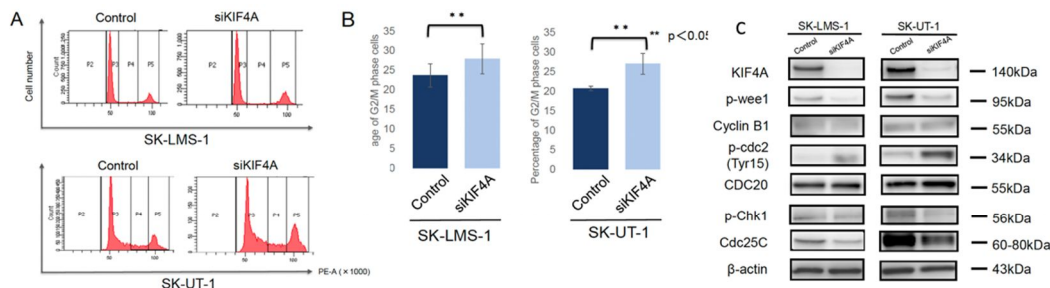
siRNAによるKIF4Aノックダウン細胞の細胞増殖率をMST-8アッセイで評価した結果、増殖が有意に抑制された(SK-LMS-1: $-37.2 \pm 4.73\%$ 、SKN: $-87.7 \pm 4.02\%$ 、SK-UT1: $-28.1 \pm 3.00\%$ 、 $p < 0.05$)。



また、shRNAを用いてKIF4Aノックダウン細胞株を樹立し、ICRヌードマウスに皮下注射して腫瘍サイズの経時変化を評価したin vivoでも同様に、KIF4Aノックダウンにより腫瘍の増大を有意に抑制することを示した。(下図: SK-LMS-1: $1186 \pm 118\text{mm}^3$ vs $461 \pm 84\text{mm}^3$ 、SK-UT1: $1704 \pm 441\text{mm}^3$ vs $514 \pm 230\text{mm}^3$ 、 $p < 0.05$)



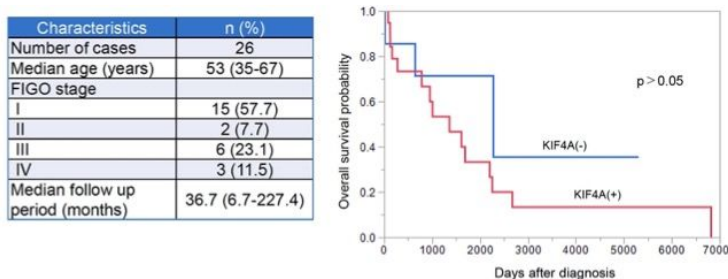
また、ノックダウン株に対する細胞周期解析をおこなったところ、G2/M期細胞の割合はKIF4Aノックダウンで有意に増加していた。この原因として、p-cdc2の脱リン酸化とCDC25の発現低下の関連が示唆されたため、RT-PCRでKIF4A knockdownによるcdc25Cの遺伝子発現の変化を評価したが、mRNAの発現量は変化がなく、分解の阻害に因ると考えて、共免疫沈降、ユビキチンを介した分解阻害効果の検証を行ったが、いずれも有意ではなく、詳細なメカニズムは本研究期間中には明らかにできていない。



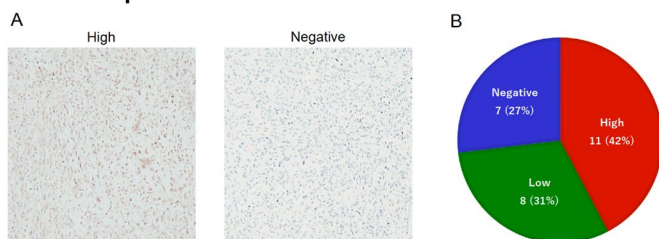
A-B; By FACS, the percentage of G2/M phase cells was significantly increased in KIF4A silencing cells compared to control cells in SK-LMS and SK-UT-1. Whereas in SKN, no significant difference in the percentage of G2/M phase cells between control cells and siKIF4A cells; In western blot analysis, the expression of p-wee1, p-Chk1, and Cdc25C were suppressed and the expression of p-cdc2 (Tyr15) was enhanced in KIF4A silencing cells of SK-LMS-1 and SK-UT-1.

また、1999-2021年までの当院の臨床サンプルで KIF4A の発現評価を行ったところ、20/26例 (77%) で発現が見られた。(予後については高発現群で悪い傾向が見られたが症例数の問題から有意差は得られなかった)

一方で、子宮平滑筋腫には発現はほとんど見られず、診断マーカーとしても応用の可能性が示唆された。



Confirmation of KIF4A expression in uLMS cell lines and in clinical specimens.



A: Representative images of IHC staining for KIF4A in LMS clinical samples.

B: Percentages of KIF4A expression scores in clinical samples.

19/26(73%) of LMS samples expressed KIF4A in IHC.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Chihiro Mizuta, Satoshi Nakagawa 他
2. 発表標題 Downregulating KIF4A significantly suppressed growth of leiomyosarcoma of uterine
3. 学会等名 第80回日本癌学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chihiro Mizuta, Satoshi Nakagawa 他
2. 発表標題 KIF4A can be a therapeutic target for uterine leiomyosarcoma
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田知紘
2. 発表標題 子宮平滑筋肉腫におけるKIF4Aの機能解析
3. 学会等名 婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chihiro Mizuta, Satoshi Nakagawa 他
2. 発表標題 DOWNREGULATING KIF4A SIGNIFICANTLY SUPPRESSED GROWTH OF UTERINE LEIOMYOSARCOMA
3. 学会等名 ESG02021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 SATOSHI NAKAGAWA, Chihiro Mizuta 他
2. 発表標題 Downregulating KIF4A inhibited growth of uterine leiomyosarcoma by regulating cell cycle
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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

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