

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07754

研究課題名(和文) イヌREIC/Dkk-3によるホルモン療法抵抗性前立腺がん治療戦略の創出

研究課題名(英文) Establishment of the new strategy with REIC/Dkk-3 against androgen independent prostate cancer.

研究代表者

落合 和彦 (Ochiai, Kazuhiko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30550488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ前立腺がんでは多くがAR発現低下によるホルモン療法抵抗性であり、ヒトの難治性ホルモン療法抵抗性前立腺がん病態と類似性が高いため、本研究ではREIC/Dkk-3とその相互作用分子が形成する複合体の動態を解析し、イヌの前立腺がんにおけるAR成熟メカニズム制御機構を明らかにすることを目的とした。

研究期間中にイヌ前立腺がん由来株化細胞を樹立し、その性状について解析を行った。また、イヌのREIC/Dkk-3とコシャペロンタンパク質であるSGTAとの相互作用がARシグナリングにおよぼす影響について精査し、査読付き英語論文を24報、学会発表を11回、さらに、産業財産権として特許出願を1件行った。

研究成果の概要(英文)：The pathological condition of canine prostate cancer resembles that of human androgen-independent prostate cancer. Both canine and human androgen receptor (AR) signalling are inhibited by overexpression of the dimerized co-chaperone SGTA, which is considered to cause the development of androgen-independency. REIC interferes with SGTA dimerization and rescues AR signalling. This study aimed to assess the effects of REIC and SGTA interactions on AR signalling in the canine androgen-independent prostate cancer cell line CHP-1.

MTH and Halo-tag PD assays showed that canine REIC interacted with SGTA and interfered with SGTA dimerization. Additionally, reporter assays revealed that canine REIC restored AR signalling. Therefore, we confirmed the interaction between canine SGTA and REIC, as well as their role in AR signalling. Our results suggest that this interaction might contribute to the development of a novel strategy for androgen-independent prostate cancer treatment.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：前立腺がん REIC/Dkk-3 SGTA イヌ ホルモン療法抵抗性 ARシグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

近年の獣医療技術革新により、伴侶動物の寿命は長期化し、それに伴い腫瘍性疾患は増加傾向にある。人と伴侶動物が幸福に共存するには健康寿命の増進こそが不可欠であり、転移や再発を伴う難治性固形がんに対するがん治療ブレイクスルーが必要となっている。

申請者は前所属である岡山大学において発見された Reduced Expression in Immortalized Cells (REIC) の構造と機能について研究を進めてきた。REIC は正常細胞に比べ不死化細胞においてその発現が減弱する遺伝子群の 1 つとして同定された (BBRC., 268:20-24, 2000)。REIC はショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子である Dkk-3 のヒトホモログであるが、ヒトの多種類のがんで高頻度に発現が低下していること (BBRC., 289:257-63, 2001; Cancer Res., 68: 9617-22, 2005) ヒト前立腺がん細胞担がんマウスに REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-REIC/Dkk-3) を用いて強制発現させると、アポトーシスを誘導すると同時に全身性に抗がん免疫活性を賦活化する機能を持つことを明らかにした (Cancer Res., 65: 9617-22, 2005; Int. J. Oncol., 34: 657-63, 2009)。現在 Ad-REIC/Dkk-3 は物質特許所有者である岡山大学病院において、前立腺がんをターゲットとしたヒト臨床研究が進行中であり、ホルモン療法抵抗性患者において、原発病巣および転移リンパ節への投与で高い治療実績を上げている。申請者はさらにイヌの乳腺腫瘍細胞株における REIC/Dkk-3 遺伝子およびタンパク質発現の減少を立証し、Ad-REIC/Dkk-3 による抗腫瘍効果についても証明した (Vet. J., 197: 769-75, 2013)。

我々のこれまでの研究で、REIC/Dkk-3 の強制発現によるアポトーシス誘導シグナルである JNK 活性化の原動力として小胞体ストレスが重要であること、また、Hsp70 や 90 の JNK 機能制御への介入が明らかとなっている (Cancer Res., 68: 8333-41, 2008 ; J. Biol. Chem., 284: 14236-44, 2009)。しかし、REIC/Dkk-3 の生理的なメカニズムを理解するために不可欠な分子間相互作用ネットワークについては未解明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

申請者は REIC/Dkk-3 相互作用分子を特定するために Yeast Two-Hybrid Assay を行い、REIC/Dkk-3 相互作用分子候補として分子モータータンパク質 Dynein の軽鎖サブユニットである Tctex-1 を同定した (BBRC., 412: 391-5, 2011)。さらに、Tctex-1 とともに未成熟な AR 複合体と相互作用し、AR 複合体の核内への輸送および成熟を制御する分子である Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat-containing protein  $\alpha$  (SGTA) との結合についてもヒトとイヌの両方で同定しつつあった。また、ヒトでの臨床研究においては

Ad-REIC/Dkk-3 投与によりホルモン療法抵抗性患者で著効が見られているが、そのメカニズムは明らかとなっていなかった。本申請では REIC/Dkk-3 と Tctex-1 および SGTA の相互作用が、ホルモン療法抵抗性前立腺がん症例の多いイヌで AR 成熟機構に参与している可能性を踏まえ、ホルモン療法抵抗性前立腺がんにおける REIC/Dkk-3 投与がホルモン療法剤感受性復帰に与える影響について解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト前立腺がん cDNA ライブラリーを標的とした Yeast Two-Hybrid Assay により同定された REIC/Dkk-3 相互作用タンパク質候補である SGTA との相互作用部位について、両分子の部分配列を作製し、哺乳類細胞 Two-Hybrid Assay (MTH) を用いて同定した。また、アンドロゲン受容体 (AR) 非発現前立腺がん細胞株 PC-3 を用いて REIC/Dkk-3 存在下/非存在下における AR シグナリングをレポーターアッセイによって解析した。この際 AR および SGTA の強制発現を行い、REIC/Dkk-3 と SGTA の相互作用と AR シグナリングの関係について考察した。イヌの前立腺がん株化細胞の樹立を試み、AR、REIC/Dkk-3 および SGTA の発現状況を検証するとともに REIC/Dkk-3 強制発現実験を行い SGTA による AR 成熟制御に与える影響について精査した。

### 4. 研究成果

研究計画初年度においては、イヌ前立腺がんホルモン療法抵抗性獲得メカニズム解明の一助として、本申請課題の研究成果である Kato *et al.*, 2015. *The Veterinary Journal* 206: 143-148 (Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. 研究代表者落合が責任著者) を発表した。この論文では、ホルモン療法抵抗性前立腺がんの割合が非常に多いイヌで、前立腺がん症例より分離された病理組織における SGTA 過剰発現を確認し、今回新たにクローニングしたイヌ SGTA ホモログの過剰発現が培養細胞において AR シグナル伝達を阻害することを証明した。これにより、イヌ前立腺がん悪性化の一因子としての SGTA の位置づけを確認した。さらに、本申請課題の目標の一つであった。イヌ前立腺がん細胞株の樹立を行い、ホルモン療法抵抗性症例より AR シグナル伝達非応答性の CHP-1 株の樹立をおこなった。さらに性状解析を行い、AR シグナル伝達機構の破綻について証明した。その結果を Azakami *et al.*, 2016. *Veterinary Comparative Oncology*. 15:557-562. (The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the

co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein  $\alpha$ )として発表した。

研究計画 2~3 目では、イヌ前立腺がんホルモン療法抵抗性獲得メカニズム解明の一助として、本申請課題の研究成果である Ochiai *et al.*, 2016. *Oncotarget*, 4:3283-3296. (Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity) を発表した。この論文では、REIC/Dkk-3 が SGTA 過剰発現により阻害されている AR 分子複合体成熟を促進し、AR シグナル伝達機構を復帰させ、さらにヒトでホルモン療法感受性の指標となる Prostate Specific Antigen (PSA) の mRNA 発現を誘導したことから、REIC/Dkk-3 がホルモン療法抵抗性前立腺がんの病態改善に効果がある可能性を示した。これにより、イヌ前立腺がん悪性化の一因子として考えられている SGTA と REIC/Dkk-3 の相互作用機構解析の意義を確認し、更なるイヌでの研究展開が可能となった。さらに、REIC/Dkk-3 の汎用的な抗腫瘍効果を証明するためにネコにおける REIC/Dkk-3 の機能的な位置づけを確認する研究を行い、抗腫瘍作用について、Ochiai *et al.*, 2017. *Veterinary Comparative Oncology*. 15\*1181-1186. (Properties of the feline tumour suppressor reduced expression in immortalized cells; REIC/Dkk-3)として発表した。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24 件)

1. The role of IFN- $\gamma$  in regulating Nfkbiz expression in epidermal keratinocytes.

Ishiguro-Oonuma T, Ochiai K, Hashizume K, Morimatsu M. *Biomed Res*. 2015;36(2):103-7.

2. Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Udagawa C, Kato Y, Watanabe M, Bonkobara M, Morimatsu M, Omi T. *Biomed Res*. 2015;36(2):155-8.

3. Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Wada S, Orino K, Watanabe K. *BMC Vet Res*. 2015;11:159.

4. Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein  $\alpha$  (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. Kato Y, Ochiai K, Michishita M, Azakami D, Nakahira R, Morimatsu M, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Kobayashi M, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Omi T. *Vet J*. 2015;206(2):143-8.

5. Nfkbiz regulates the proliferation and

differentiation of keratinocytes.

Ishiguro-Oonuma T, Ochiai K, Hashizume K, Iwanaga T, Morimatsu M. *Jpn J Vet Res*. 2015;63(3):107-14.

6. Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity. Ochiai K, Morimatsu M, Kato Y, Ishiguro-Oonuma T, Udagawa C, Rungsuriyawiboon O, Azakami D, Michishita M, Ariyoshi Y, Ueki H, Nasu Y, Kumon H, Watanabe M, Omi T. *Oncotarget*. 2016;7(3):3283-96.

7. The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein  $\alpha$ . Azakami D, Nakahira R, Kato Y, Michishita M, Kobayashi M, Onozawa E, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Ishioka K, Sako T, Ochiai K, Omi T. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(2):557-562.

8. Primary T-cell high-grade lymphoma of the feline uterus. Azakami D, Onozawa E, Miyabe M, Ochiai K, Michishita M, Hirano T, Momota Y, Ishioka K, Sako T. *J Vet Med Sci*. 2016;78(5):913-6.

9. Properties of the feline tumour suppressor reduced expression in immortalized cells (REIC/Dkk-3). Ochiai K, Oda H, Shono S, Kato Y, Sugihara S, Nakazawa S, Azakami D, Michishita M, Onozawa E, Bonkobara M, Sako T, Shun-Ai L, Ueki H, Watanabe M, Omi T. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(4):1181-1186.

10. PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo. Teramachi J, Inagaki Y, Shinohara H, Okamura H, Yang D, Ochiai K, Baba R, Morimoto H, Nagata T, Haneji T. *Oral Dis*. 2017;23(2):181-188.

11. Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System. Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, Tada N, Ochiai K, Chong YH, Kato Y, Mitsui H, Gin A, Oda H, Azakami D, Tamura K, Sako T, Inagaki T, Sakamoto A, Tsutsui T, Bonkobara M, Tsuchida S, Ikemoto S. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165000.

12. Oncocytic carcinoma of the salivary gland in a dog. Nakahira R, Michishita M, Kato M, Okuno Y, Hatakeyama H, Yoshimura H, Azakami D, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K. *J Vet Diagn Invest*. 2017;29(1):105-108.

13. MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. Kobayashi M, Saito A, Tanaka Y, Michishita M, Kobayashi M, Irimajiri M, Kaneda T, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K, Hori T, Kawakami E. *J Vet Med Sci*. 2017;79(4):719-725.

14. Pancreatic neuroendocrine carcinoma with exocrine differentiation in a young cat. Michishita M, Takagi M, Kishimoto TE, Nakahira R, Nogami T, Yoshimura H,

Hatakeyama H, Azakami D, Ochiai K, Takahashi K. *J Vet Diagn Invest*. 2017;29(3):325-330.

15. The Downregulation of the Expression of CD147 by Tumor Suppressor REIC/Dkk-3, and Its Implication in Human Prostate Cancer Cell Growth Inhibition. Mori A, Watanabe M, Sadahira T, Kobayashi Y, Ariyoshi Y, Ueki H, Wada K, Ochiai K, Li SA, Nasu Y. *Acta Med Okayama*. 2017;71(2):135-142.

16. Identification of tumor-initiating cells derived from two canine rhabdomyosarcoma cell lines. Kishimoto TE, Yashima S, Nakahira R, Onozawa E, Azakami D, Ujike M, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Michishita M. *J Vet Med Sci*. 2017;79(7):1155-1162.

17. Canine REIC/Dkk-3 interacts with SGTA and restores androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer cell lines. Kato Y, Ochiai K, Kawakami S, Nakao N, Azakami D, Bonkobara M, Michishita M, Morimatsu M, Watanabe M, Omi T. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):170.

18. Small head size and delayed body weight growth in wild Japanese monkey fetuses after the Fukushima Daiichi nuclear disaster. Hayama SI, Tsuchiya M, Ochiai K, Nakiri S, Nakanishi S, Ishii N, Kato T, Tanaka A, Konno F, Kawamoto Y, Omi T. *Sci Rep*. 2017;7(1):3528.

19. Robust cancer-specific gene expression by a novel cassette with hTERT and CMV promoter elements. Sakaguchi M, Sadahira T, Ueki H, Kinoshita R, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Nasu Y, Ochiai K, Kumon H, Huh NH, Watanabe M. *Oncol Rep*. 2017;38(2):1108-1114.

20. Disseminated histiocytic sarcoma with hemophagocytosis in a rabbit. Ishimori M, Michishita M, Yoshimura H, Azakami D, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K. *J Vet Med Sci*. 2017;79(9):1503-1506.

21. Overexpression of REIC/Dkk-3 suppresses the expression of CD147 and inhibits the proliferation of human bladder cancer cells. Horikawa Y, Watanabe M, Sadahira T, Ariyoshi Y, Kobayashi Y, Araki M, Wada K, Ochiai K, Li SA, Nasu Y. *Oncol Lett*. 2017;14(3):3223-3228.

22. Exogenous DKK-3/REIC inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and cell proliferation in human kidney cancer KPK1. Xu J, Sadahira T, Kinoshita R, Li SA, Huang P, Wada K, Araki M, Ochiai K, Noguchi H, Sakaguchi M, Nasu Y, Watanabe M. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5638-5642.

23. Functional alteration of canine isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) via an R174K mutation. Kawakami S, Ochiai K, Kato Y, Michishita M, Hiramata H, Obara R, Azakami D, Watanabe M, Omi T. *J Vet Med Sci*. 2018;80(1):85-91.

24. R132 mutations in canine isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) lead to functional changes. Kawakami S, Ochiai K, Azakami D, Kato Y, Michishita M, Morimatsu M,

Ishiguro-Oonuma T, Onozawa E, Watanabe M, Omi T. *Vet Res Commun*. 2018;42(1):49-56.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. イヌ SGTA ホモログのクローニングと前立腺がん細胞のアンドロゲンシグナル伝達機構に与える影響の検討 落合和彦、加藤由比子、中平嶺、道下正貴、皆上大吾、高橋公正、近江俊徳 日本獣医臨床病理学会 2015 年大会 2015 年 5 月 30 日
2. 前立腺がん関連遺伝子 SGTA イヌホモログの構造および機能解析 加藤由比子、落合和彦、中平嶺、道下正貴、皆上大吾、高橋公正、近江俊徳 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月
3. イヌ前立腺がん関連遺伝子 SGTA が AR シグナル伝達に与える影響の検討 加藤由比子、落合和彦、近江俊徳 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月
4. イヌとヒトで異なるアミノ酸配列が DNA 相同組換えタンパク質 RAD51 の機能に及ぼす影響の解析 落合和彦、関野大輝、澤谷瑞季、蓮見翔、宇田川智野、近江俊徳 第 47 回日本比較臨床医学会学術集会 2016 年 10 月
5. イヌ前立腺がん関連遺伝子 SGTA 分子内ドメインの機能解析 加藤由比子、落合和彦、川上翔太、近江俊徳 第 47 回日本比較臨床医学会学術集会 2016 年 10 月
6. SGTA 機能制御を起点とした前立腺がん新規治療戦略の創出 加藤由比子、落合和彦、近江俊徳 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日
7. イヌ IDH1 ホモログのクローニングと機能解析 川上翔太、落合和彦、道下正貴、近江俊徳 日本獣医臨床病理学会 2017 年大会 2017 年 6 月 25 日
8. がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 ネコホモログの構造と乳腺腫瘍に対するアポトーシス誘導能の解析 落合和彦、杉原思穂、小田民美、川上翔太、平間日奈子、皆上大吾、近江俊徳 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
9. IDH1 イヌホモログの変異が機能におよぼす影響の検討 川上翔太、落合和彦、尾原涼、道下正貴、近江俊徳 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
10. CMAH 遺伝子解析による猫 AB 式血液型の分子基盤 近江俊徳、中澤翔太、宇田川智野、多田尚美、三井寛子、落合和彦、加藤由比子、皆上大吾、左向敏紀、筒井敏彦、盆子原誠、土田修一 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
11. イヌ乳腺腫瘍細胞株で生じた p53 遺伝子変異の検出と機能解析 平間日奈子、落合和彦、道下正貴、近江俊徳 第 48 回日本比較臨床医学会学術集会 2017 年 12 月 10 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：REIC/Dkk-3 タンパク質の部分領域ポリペプチド

発明者：公文裕巳、渡部昌実、二見淳一郎、藤井康之、植木英雄、落合和彦

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：発明特許

番号：特許第 5936129 号（2016 年 5 月 20 日付）米国出願番号 14/9644013（2017 年 5 月 9 日付）

出願年月日：2011 年 7 月 1 日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

所属研究室 HP

<http://www.nvlu.ac.jp/veterinary-nursing/members/002.html/>

6．研究組織

(1)研究代表者

落合 和彦（Ochiai kazuhiko）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30550488

(2)研究分担者

皆上 大吾（Azakami Daigo）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80453934