

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18440

研究課題名(和文) がん特異的なREICの構造を判別する薬効評価系の開発及びその構造と機能の評価

研究課題名(英文) Establishment of monitoring method for Ad-REIC-based therapeutic effects on cancer using the newly developed anti-REIC antibody that recognizes the cancer specific REIC conformation

研究代表者

木下 理恵 (Kinoshita, Rie)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40518297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：REICは、様々ながん種において発現が低下しており、がん抑制遺伝子として機能する。そしてREICの強い抗がん作用を利用して、アデノウイルスを用いた遺伝子治療製剤(Ad-REIC)が開発され、前立腺がん・悪性中皮腫を対象とした臨床試験が実施中である。本研究では、この治療をモニターする方法を確立するため、血中REIC濃度を定量可能な新規REICモノクローナル抗体を取得し、sandwich ELISA系を検討した。そしてAd-REIC投与後にREICタンパク質の血中濃度が上昇することを示した。REICは、複数種のがんで臨床試験を実施・計画中であり、REIC治療の薬効評価法として実用化を推進中である。

研究成果の概要(英文)：Reduced expression in immortalized cells (REIC) is a tumor suppressor gene and has been studied as a promising therapeutic gene for cancer gene therapy. Intratumoral injection of adenovirus vector carrying the human REIC (Ad-REIC) elicits cancer cell-specific apoptosis and anti-cancer immune responses. In addition, Ad-REIC gene therapy resulted in complete response in the case of metastatic castration-resistant prostate cancer patient. We obtained various anti-REIC monoclonal antibodies and developed a sandwich ELISA method for measuring the REIC protein concentration in the human blood. Using this assay, we have successfully developed the method for monitoring cancer treatment with Ad-REIC.

研究分野：分子生物学

キーワード：REIC 遺伝子治療 がん

## 1. 研究開始当初の背景

REIC (Reduced expression immortalized cell)は、岡山大学で2000年に広範ながん種において一様に遺伝子の発現が抑制されているがん抑制遺伝子として発見された (BBRC. 268, 2000) (Cancer Res. 65, 2005)。REICのがん治療は、腫瘍局所だけではなく転移がんにも高い治療効果を示しており、REICは、がん治療に重要な複数の生理活性をもつ優れたがん治療遺伝子である。この抗がん活性を最大限に活かす方法として、アデノウイルスを用いた遺伝子治療製剤(Ad-REIC)を開発し、岡山大学病院において前立腺がんを対象とした局所腫瘍内投与での臨床試験を実施し、その成果として、2015年、Ad-REIC 遺伝子治療による転移性去勢抵抗性前立腺がんの著効(完全寛解)例について論文発表を行った (Clin Med Insights Oncol. 23;9, 2015)。

前立腺癌の治療効果の判定は腫瘍マーカーであるPSAを用いて評価を行っている。しかし治療をモニターする方法としては、REICタンパク質の血中濃度の変動によりその治療効果の推測を早期に行うことが望ましい。またアデノウイルスの投与濃度及び複数回投与する場合の投与間隔など治療プロトコルの改善においても有用であるため、市販の抗REIC抗体を用いて血中濃度の測定系の確立を進めたが、正常細胞から分泌されているREICの血中濃度は高濃度であり、市販品では治療をモニターする系を確立するに至らなかった。そこで、独自にエピトープが多岐にわたる抗REIC高親和性モノクローナル抗体12種類及びポリクローナル抗体を整備し、それらを用いたELISA法によるREICタンパク質濃度の測定系を確立した。

## 2. 研究の目的

遺伝子治療前後の前立腺癌患者血清を用いて、REICタンパク質濃度をELISA法により測定する過程で、N末端ドメインを認識する

N-1抗体では、がん特異的なREICの構造が認識されづらいことを見出した。他のドメインを認識する抗体を用いた場合とは異なり、N-1抗体では、治療後に明らかな濃度の上昇があり、さらに外科的治療により腫瘍を摘出した場合に顕著なREIC濃度の上昇が確認された。この結果より、REICの遺伝子治療の効果は、N-1抗体を使用することによる血中REICタンパク質濃度の測定結果を指標にモニターすることが可能であることが示唆された。

Ad-REICは、前立腺癌のみならず、悪性中皮腫・腎癌・脳腫瘍など複数の癌種において遺伝子治療の臨床試験にむけて研究を行っている。このようにREICによる遺伝子治療は今後、様々な癌種に波及していく計画となっている。そこでREICタンパク質の血中濃度測定系の様々な癌種への適応の確認・測定系の整備は、複数の癌種に波及する遺伝子治療の薬効の予測のために早急な実用化が必要である。さらに、近年、治療前に医薬品の効果を予測するコンパニオン診断は、新規医薬品開発と同時に診断方法を開発することが求められる。そこで本研究により、血中REIC濃度の測定法の検討を進め、REIC遺伝子治療の製剤化を前進させる診断方法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) REICタンパク質の血中濃度に基づいた、複数の癌種における遺伝子治療の薬効評価系の確立

健常人血清、肺がん患者血清、肝がん患者血清を入手し、REICタンパク質の濃度を複数種のモノクローナル抗体を用いて測定した。具体的な測定方法としては、各種モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせで行うsandwich ELISA法により測定を行った。

(2) REIC遺伝子治療の効果を判定可能なN-1

#### 抗体のエピトープの決定と結合因子の探索

REICをN末端側から異なる箇所まで削った発現ベクターを用いて、タンパク質を生産し、その親和性からN末端ドメイン認識N-1抗体のエピトープを決定した。さらにREICのN末端ドメインに付加されている4箇所のN結合型糖鎖および2箇所のO結合型糖鎖の付加パターンを変化させた変異体を作製し、糖鎖を介した抗体との結合の有無を確認した。

また各種REICモノクローナル抗体を用いて、血清から免疫沈降法によりREICタンパク質および結合分子を単離し、LC-MS/MSにより解析した。

#### 4. 研究成果

(1) REICタンパク質の血中濃度に基づいた、複数の癌種における遺伝子治療の薬効評価系の確立

REICモノクローナル抗体を用いたsandwich ELISA測定系の有効性を複数のがん種で検証するため、健康人10例の血清と肝がん患者10例、肺がん患者15例の未治療の血清を詳細に比較・検討し、前立腺がんだけでなく、他のがん種においてもこの測定系が適応可能であることを示した。REICは、多岐にわたるがん種において抗がん作用を示していることから、この測定系も複数種のがんで適応可能であり、REIC治療の薬効評価およびコンパニオン診断薬としての実用化が期待される(PCT/JP2016/078839)。

(2) REIC遺伝子治療の効果を判定可能なN-1抗体のエピトープの決定と結合因子の探索

N末端側を異なる箇所まで削った各種変異体とN-1抗REIC抗体の親和性解析より、N-1抗体のエピトープを決定した。またそのエピトープの構造解析予測を行った結果、REICのN末端・C末端2箇所に存在するコイルドコイルドメインの一部であることが確認された。これらの結果より、N-1抗体認識部位は、コイルドコイルのヘリックス構造を介した疎水性相互作用で何らかの分子と結合し

ており、その分子はがん患者において発現が上昇していることが示唆された。REICタンパク質の糖鎖の有無は、N-1抗体の親和性に影響がないことを確認した。さらにREICタンパク質は、がん細胞で過剰発現が認められているMMP(Matrix metalloproteinase)-2, MMP-9血中プロテアーゼの基質となるとの報告があるが、ヒト血清より精製したREICタンパク質をSDS-PAGEおよびWestern Blottingで解析した結果、N末端の分解は生じていないことを確認した。

現在、新規に同定したがん免疫に関連するREIC結合受容体の解析中であり、がんの進展を抑制するREICの作用点解明につながる研究へと発展させる。

#### 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9件)

Sakaguchi M, Kinoshita R, Putranto EW, Ruma IMW, Sumardika IW, Youyi C, Tomonobu N, Yamamoto KI, Murata H. Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Acta Med Okayama*. 2017 Dec;71(6):459-465. 査読有 doi:10.18926/AMO/55582. Review.

Xu J, Sadahira T, Kinoshita R, Li SA, Huang P, Wada K, Araki M, Ochiai K, Noguchi H, Sakaguchi M, Nasu Y, Watanabe M. Exogenous DKK-3/REIC inhibits Wnt/  $\beta$ -catenin signaling and cell proliferation in human kidney cancer KPK1. *Oncol Lett*. 2017 Nov;14(5):5638-5642. 査読有 doi: 10.3892/ol.2017.6833.

Sumardika IW, Youyi C, Kondo E, Inoue Y, Ruma IMW, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Tomida S, Shien K, Satoh H, Yamauchi A, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Toyooka S, Nishibori M, Sakaguchi M.  $\beta$ -1,3-galactosyl-0-glycosyl-glycoprotein  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 Increases MCAM Stability, Which Enhances S100A8/A9-Mediated Cancer Motility. *Oncol Res*. 2017. (in press) 査読有 doi: 10.3727/096504017X15031557924123.

Putranto EW, Kinoshita R, Watanabe M,

Sadahira T, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Kataoka K, Inoue Y, Winarsa Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Kubo M, Sakaguchi Y, Saito K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, Sakaguchi M. Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of a hTERT promoter at the 3'-side of the transgene. *Oncol Lett.* 2017 Jul;14(1):1041-1048. 査読有  
doi: 10.3892/ol.2017.6201.

Sakaguchi M, Sadahira T, Ueki H, Kinoshita R, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Nasu Y, Ochiai K, Kumon H, Huh NH, Watanabe M. Robust cancer-specific gene expression by a novel cassette with hTERT and CMV promoter elements. *Oncol Rep.* 2017 Aug;38(2):1108-1114. 査読有  
doi: 10.3892/or.2017.5710.

Sakaguchi M, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, Murata H, Kinoshita R, Winarsa Ruma IM, Putranto EW, Inoue Y, Morizane S, Huh NH, Tsuboi R, Hibino T. Identification of an S100A8 Receptor Neuroplastin- and its Heterodimer Formation with EMMPRIN. *J Invest Dermatol.* 2016 Nov;136(11):2240-2250.  
doi:10.1016/j.jid.2016.06.617.

Saho S, Satoh H, Kondo E, Inoue Y, Yamauchi A, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Tomida S, Sakaguchi Y, Saito K, Iioka H, Huh NH, Toyooka S, Sakaguchi M. Active Secretion of Dimerized S100A11 Induced by the Peroxisome in Mesothelioma Cells. *Cancer Microenviron.* 2016 Dec;9(2-3):93-105. 査読有  
doi:10.1007/s12307-016-0185-2.

Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, Sakaguchi M. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- B and ROS formation upon ligand binding. *Clin Exp Metastasis.* 2016 Aug;33(6):609-27. 査読有  
doi:10.1007/s10585-016-9801-2.

Futami J, Atago Y, Azuma A, Putranto EW, Kinoshita R, Murata H, Sakaguchi M. An efficient method for the preparation of

preferentially heterodimerized recombinant S100A8/A9 coexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res.* 2016 Mar 19;6:94-100. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrep.

〔学会発表〕(計5件)

木下理恵 村田等 山本健一 許南浩 日比野利彦 阪口政清 S100A8/A9 を標的としたがん転移制御法の開発、日本組織培養学会第90回大会、2017年6月30日、岡山理科大学(岡山県岡山市)

阪口政清 木下理恵 村田等 山本健一 日比野利彦 許南浩 転移先臓器を感知する受容体、日本組織培養学会第90回大会、2017年7月1日、岡山理科大学(岡山県岡山市)

村田等 西川茜 山本健一 木下理恵 阪口政清 ミトコンドリア呼吸鎖複合体への作用を介した SARM1 の神経細胞死誘導、日本組織培養学会第90回大会、2017年7月1日、岡山理科大学(岡山県岡山市)

Rie Kinoshita, Akira Yamauchi, Hiroki Sato, Yusuke Inoue, Kazuhiko Shien, Shuta Tomida, Hitoshi Murata, Shinichi Toyooka, Eisaku Kondo and Masakiyo Sakaguchi Development of novel biologics for cancer metastasis via prevention of extracellular S100A8/A9 function. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association、2017年9月30日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Rie Kinoshita, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Eisaku Kondo, Nam-Ho HuH and Masakiyo Sakaguchi Development of a novel biologics for suppression of S100A8/A9-induced cancer metastasis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association、2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

阪口政清、木下理恵、村田等、山本健一、許南浩、日比野利彦 他、ニューサイエンス社、月刊「細胞」(2017年3月号)、2017、39-42

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称: REIC/Dkk-3 タンパク質を有効成分として含む TGF 阻害剤  
発明者: 木下理恵、二見淳一郎、公文裕巳  
権利者: 国立大学法人 岡山大学  
桃太郎源株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/022588

出願年月日：2017年6月19日  
国内外の別：外国

名称：遺伝子発現カセット及びその産生物  
発明者：阪口政清、西堀正洋、村田等、  
山本健一、木下理恵  
権利者：国立大学法人 岡山大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/079219  
出願年月日：2016年10月3日  
国内外の別：外国

名称：活性構造の REIC/Dkk-3 タンパク質  
を特異的に認識して結合する抗体、及び該抗  
REIC/Dkk-3 抗体を用いた癌治療のモニタリ  
ング  
発明者：木下理恵、二見淳一郎、公文裕巳  
権利者：国立大学法人 岡山大学  
桃太郎源株式会社  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/078839  
出願年月日：2016年9月27日  
国内外の別：外国

名称：REIC/Dkk-3 タンパク質を有効成分と  
して含む TGF 阻害剤  
発明者：木下理恵、二見淳一郎、公文裕巳  
権利者：国立大学法人 岡山大学  
桃太郎源株式会社  
種類：特許  
番号：特願 2016-121187  
出願年月日：2016年6月17日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下 理恵 (KINOSHITA Rie)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：40518297