

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15946

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性胆膵癌における耐性獲得機序の解明とREIC遺伝子治療の有効性の検討

研究課題名(英文) Assessment of the efficacy of REIC/Dkk-3 gene therapy for pancreaticobiliary carcinoma

研究代表者

内田 大輔(Uchida, Daisuke)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50749215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：REIC/Dkk-3遺伝子(以下REIC)は、癌細胞において発現が低下しており、REICを癌に強制的に発現させることで細胞死を誘導する。REICを用いた遺伝子治療は、前立腺癌、悪性中皮腫、肝癌についてはすでに臨床試験が開始されている。その他の癌腫についても研究が進行中であり、本研究では胆道癌、膵癌と、抗癌剤耐性を獲得した癌細胞に対するREICの効果を検証し、いずれにおいても他の癌と同様に癌細胞死を誘導することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌、胆道癌および抗癌剤耐性をもった癌に対する新たな治療法として、REIC遺伝子治療が有用である可能性を示した。すでに泌尿器癌、悪性中皮腫、肝癌に対する臨床試験が進行中であり、本研究の成果をもとにさらに対象とする癌腫が拡大されることが期待される。難治癌として知られる膵癌、胆道癌における新規治療法として期待され、その学術的意義、社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：REIC/Dkk-3 gene expression was decreased in various cancer cells, and overexpression of REIC/Dkk-3 gene induces cancer cell death. This novel gene therapy for prostate cancer, malignant mesothelioma, and hepatocellular carcinoma was previously reported, and clinical studies have already started. We evaluated the efficacy of this gene therapy for pancreaticobiliary cancer including drug-resistant cancer cells. Our study proved the efficacy of REIC/Dkk-3 gene therapy using adenoviral vector for pancreaticobiliary cancer cell including drug-resistant cells.

研究分野：消化器腫瘍学

キーワード：遺伝子治療 REIC/Dkk-3遺伝子 胆道癌 膵癌

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦における癌死亡原因第 4 位、胆道癌は第 6 位と非常に予後不良な癌で、根治に至る症例はほぼ存在せず、新規治療法の開発は急務である。膵癌、胆道癌が予後不良である原因の一つとして、腫瘍内ヘテロ不均一性とそれに伴う薬剤耐性獲得が挙げられる。そのため、単一の治療では根治は困難であり、複数を組み合わせた多角的な治療が必要になると考える。REIC(reduced expression in immortalized cell)遺伝子は、当該施設において独自に単離・同定された癌関連遺伝子である。REIC 遺伝子導入によって小胞体ストレス応答を介した癌細胞特異的アポトーシスが誘導され、その抗腫瘍効果は前立腺癌、悪性中皮腫など種々の固形癌において証明されている。膵癌においては第一世代 REIC 遺伝子治療とゲムシタピンを併用することで抗腫瘍効果が増強されることを当該施設での基礎実験において証明されており、近年では、導入効率を大幅に改善した第二世代アデノウィルスベクター(Ad-SGE-REIC)が開発され、膵癌においては従来のベクター以上の抗腫瘍効果が証明された。

### 2. 研究の目的

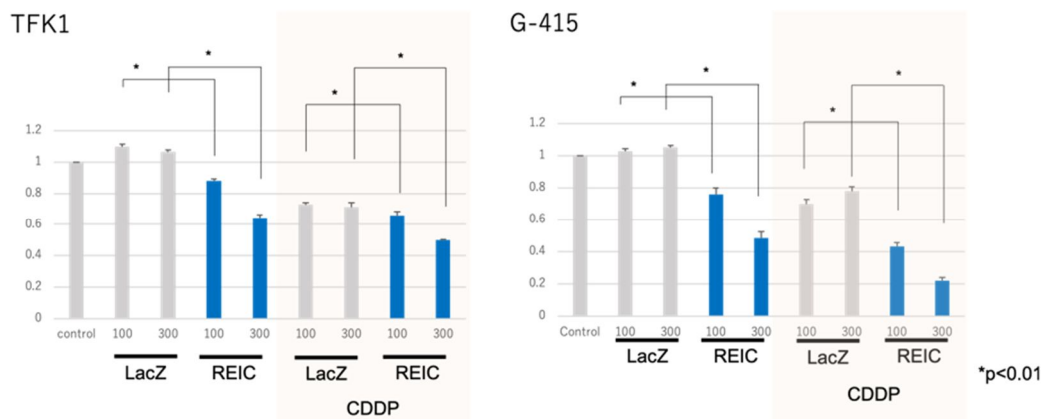
胆膵癌における抗癌剤耐性獲得機序を解明し、抗癌剤耐性胆膵癌に対する新型アデノウィルスベクターを用いた REIC 遺伝子導入治療の有効性を証明し、臨床応用可能な治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

膵癌における REIC 遺伝子治療の有用性についてはすでに進行中で結果が得られていたため、まず通常胆道癌細胞(TFK-1、G-415、TKKK)を用いて、胆道癌細胞株に対する REIC 遺伝子治療の有効性について検証を行った。抗癌剤併用による効果も検証し、併用する抗癌剤は Cisplatin(CDDP)を用いた。次に抗癌剤耐性胆道癌細胞、膵癌細胞を樹立し、それぞれの細胞に対する REIC 遺伝子治療の有効性について検証を行った。REIC 遺伝子導入については、当該施設で開発した新型アデノウィルスベクターである Ad-SGE-REIC を用いた。また抗癌剤耐性株を樹立する過程において、細胞表面マーカーに違いが生じるかどうかをフローサイトメトリー、western blotting 等で評価を行った。

### 4. 研究成果

胆道癌細胞株においても、in vitro において Ad-SGE-REIC の投与による REIC 遺伝子導入とそれに伴うアポトーシスの誘導が確認され、抗癌剤(CDDP)併用でも相加効果を認めた(下図)。

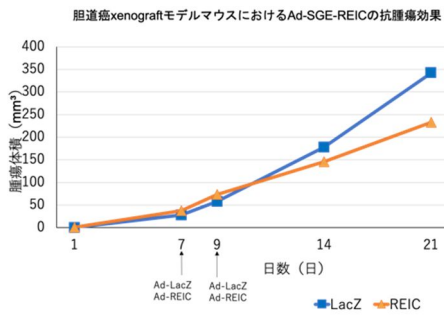
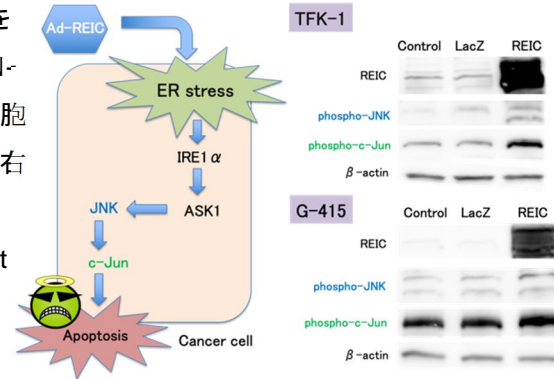


様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

**MTT assay による増殖能評価**

REIC 遺伝子導入によるシグナル伝達を western blotting で検証したところ、c-Jun-N-terminal kinase pathway の活性化を認め、小胞体ストレスを介した細胞死と考えられた (右図)。

また胆道癌細胞(G-415)を移植した xenograft モデルマウスにおける in vivo での実験においても、Ad-SGE-REIC 投与によって抗腫瘍効

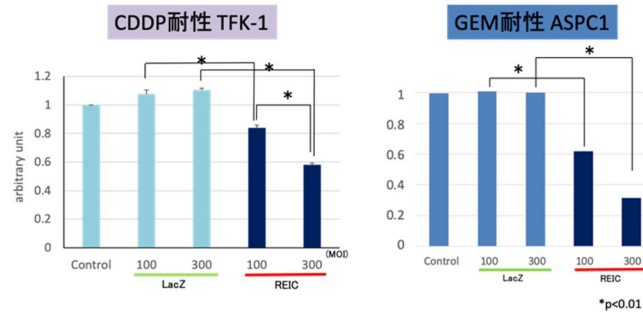


果を認

めた (下図)。

抗癌剤耐性株については、膵癌細胞株 (ASPC1) には Gemcitabine (GEM)、胆管癌細胞株 (TFK-1) には Cisplatin (CDDP) をそれぞれ低濃度から暴露し、徐々に濃度を高めながら継代を繰り返すことで耐性株を樹立した。抗癌剤耐性獲得過程において、細胞接着因子である E-cadherin の発現変化を認め、耐性獲得において関与している可能性が示唆された。獲得機序の検証については現在も引き続き継続して実験を行っている。

それぞれの抗癌剤耐性細胞株に対しても in vitro で Ad-SGE-REIC 投与を行ったところ、通常細胞株同様にアポトーシスが誘発された (右図)。現在も xenograft モデルマウスを用いた動物実験を継続中である。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

大山淳史、澤原大明、内田大輔、他、難治性肝細胞癌に対する REIC/Dkk-3 を用いた遺伝子治療、第 53 回肝臓学会総会、2017/6/8、広島

大山淳史、白羽英則、澤原大明、内田大輔、他、肝臓に対する REIC/DKK-3 遺伝子治療、第 16 回日本肝がん分子標的研究会、2017/6/24、徳島

Hiroaki Sawahara, Hidenori Shiraha, Daisuke Uchida, et al. Innovative therapeutic efficacy of a novel REIC/Dkk-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma, UEG Week 25<sup>th</sup>, 2017/11/30, Barcelona

Atsushi Ohyama, Daisuke Uchida, et al. REIC/DKK-3 protein concentration induce the positive effect to the mortality of hepatocellular carcinoma, UEG Week 25<sup>th</sup>, 2017/11/30, Barcelona

Emi Tanaka, Daisuke Uchida, et al. The efficacy of REIC/Dkk-3 gene therapy for cholangiocarcinoma, 2018/6/5, Washington D.C.

田中瑛美、内田大輔、他、REIC/Dkk-3 遺伝子導入における胆道癌の新規治療法開発、2018/11/2、神戸

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：白羽 英則

ローマ字氏名：Hidenori Shiraha

研究協力者氏名：澤原 大明

ローマ字氏名：Sawahara Hiroaki

研究協力者氏名：大山 淳史

ローマ字氏名：Ohyama Atsushi

研究協力者氏名：田中 瑛美

ローマ字氏名：Tanaka Emi

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。