

平成 23 年 5 月 11 日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390426  
 研究課題名（和文）不死化関連遺伝子群による Oncogenic Ras 制御と前立腺癌化抑制機構の解明  
 研究課題名（英文）The molecular function of immortalization-related genes in the regulation of Oncogenic Ras and prostatic carcinogenesis.  
 研究代表者  
 公文 裕巳（KUMON HIROMI）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：30144760

## 研究成果の概要（和文）：

岡山大学で同定した新規の不死化関連遺伝子群について、前立腺正常上皮細胞および前立腺癌細胞における発現動態が、細胞内での Ras シグナリングの抑制および細胞増殖抑制にどのような分子機構により関わるのかを系統的に解析した。特に、不死化関連遺伝子の一つである REIC/Dkk-3 の発現が、活性化 Ras タンパク質を抑制することにより Akt タンパク質の非活性化に関与することを明らかにした。また、REIC 発現による細胞死の分子シグナル伝達を、分子シャペロンタンパク質である BiP/GRP78 タンパク質が負に制御することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular function of novel immortalization-related genes, which were identified at Okayama University, in the intracellular Ras signaling and cell growth of prostate normal and cancer cells. In particular, we disclosed that the expression of REIC/Dkk-3, one of the immortalization-related genes, inactivated Akt signaling by down-regulating activated Ras. We also elucidated that the expression of BiP/GRP78, one of molecular chaperones, suppresses the REIC/Dkk-3-induced apoptotic signaling.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：不死化関連遺伝子、Ras、Ras-GTP、Akt、BiP/GRP78、前立腺分化

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、抗腫瘍効果を有する新規癌抑制遺伝子を同定するために、正常線維芽細胞に比較し不死化ヒト線維芽細胞において発現が消失ないし著しく低下している遺伝子を subtraction hybridization法にて検索、それらの遺伝子とタンパク質の機能について基礎研究を行ってきた。同定された3種類の不死化関連遺伝子のひとつであるREIC/Dkk-3は、1) ヒトの非小細胞肺癌、肝細胞癌、腎細胞癌などの癌細胞で高頻度に発現が低下していること (BBRC, 289:257, 2001 ; J.Urol., 171:1314, 2004)、2) 発現低下の主たる要因は promoter領域のメチル化によること (Gene, 282:151, 2002)、3) 前立腺癌では、検討した52例全てのヒト前立腺癌組織でタンパク質の発現が低下、その程度は組織学的悪性度と相関していたこと、ならびに、アデノウイルスを用いて強制発現させるとアポトーシスが誘導されること (Cancer Res, 65:9617, 2005) より、新規の癌抑制遺伝子として報告した。我々は、このような背景の中、REIC/Dkk-3を含む新規不死化関連遺伝子群の発現そのものが癌化を根源的に抑制する機能を有し、また、前立腺癌では癌化の過程においてその発現低下が極めて重要なイベントとなる可能性に着目した。特に、REIC/Dkk-3の発現動態が、強い発癌作用を有する Oncogenic Rasシグナリングに対しどのような影響を持つのかを解明することが、前立腺の癌化を理解する上で重要であると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

岡山大学で同定した新規不死化関連遺伝子群の前立腺正常上皮細胞および前立腺癌細胞における発現と、細胞内での Rasシグナリングの抑制、細胞増殖抑制、ならびに転移・血管新生抑制の分子機構を系統的に解析し、これら遺伝子群による

Oncogenic Ras 制御と前立腺癌化抑制機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 不死化関連遺伝子の発現動態が癌化シグナリングにおよぼす影響の解析

単量体 p21GTP 結合タンパク質 (Small GTPase) である Ras は、不活性型の GDP 結合状態と活性型の GTP 結合状態間を循環し、増殖・形質転換・アポトーシス・移動・細胞周期の進行など、多くの細胞機能を制御している。したがって、Ras-GTP の細胞内蓄積は、正常細胞の癌化誘導の一つの条件になると考えられる。この活性型 Ras (Ras-GTP) の細胞内での半定量化には、EZ-Detect-Ras Activation Kit (PIERCE Biotechnology 社) を用いた。

培養中のヒト前立腺正常上皮細胞: PrEC 細胞 (Lonza 社より購入) において、REIC 遺伝子発現を特異的 siRNA によりノックダウンさせ、癌化に関連するタンパク質の発現変動や活性化について、主にウエスタンブロット法により解析を行った。特に、いかなるタンパク質が不死化関連遺伝子のシグナルの下流に存在するかという観点から検討を行うべく、Ras シグナリングの根幹である Ras-GTP レベルと、主要タンパク質 Akt と Raf の活性化に焦点を絞り解析した。さらに、Ras-V12 遺伝子をトランスフェクションさせ Oncogenic Ras を細胞内に蓄積させた癌化誘導状態において不死化関連遺伝子の発現と Ras シグナリングの動態および細胞増殖・アポトーシス誘導についての解析を行った。また、同様の観点から、癌細胞を用いた実験系においても解析を行った。癌細胞における一過性の遺伝子発現のためのトランスフェクションには、Lipofectamine 2000 試薬 (Invitrogen 社) を用い、ヒト前立腺正常上皮細胞 (PrEC) においては FuGENE HD 試薬 (Roche 社) を用いた。各細胞の細胞

増殖の解析には、MTS アッセイキット (Promega 社) を用いた。

#### (2) 分泌型 REIC/Dkk-3 タンパク質の生理学的機能の解析

通常、REIC/Dkk-3 タンパク質は細胞質内に存在しており、その一部が分泌型 REIC/Dkk-3 として間質、結合織、および血中に分泌されると考えられる。そこで、前立腺分化における分泌型 REIC/Dkk-3 タンパク質の機能の解明を目的として、前立腺由来細胞である RWPE-1 細胞の培養系において、Matrigel (BD Biosciences 社) を用いた3次元培養による腺管構造形成アッセイを行った。

#### (3) 不死化関連遺伝子の前立腺癌 Stable transfectant 細胞株での機能解析

マウス前立腺癌細胞 RM9 細胞株は T. C. Thompson 教授 (The University of Texas, Houston, TX) より譲渡された。REIC タンパク質を恒常発現する RM9 細胞株は、全長の REIC 遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを Lipofectamine 2000 により RM9 細胞にトランスフェクションし、さらに G418 (Sigma 社) によりセクションをかけることにより、クローン細胞株として樹立した。この細胞株を用いて、いかなるタンパク質が REIC/Dkk-3 発現シグナルの下流に存在するのかを、タンパク質2次元泳動法を用いたプロテオミクス解析を行い同定した。

#### (4) REIC 全身ノックアウト (KO) マウスでの解析

REIC 全身 KO マウスは、マウス REIC 遺伝子の exon 5 と exon 6 が欠損しているマウスであり、当該マウスでは機能的な REIC タンパク質が産生されない。岡山大学動物実験施設において、当該マウスの genotyping を行いながら、法令に基づく拡散防止措置等の管理されたゲージにて REIC 全身 KO マウスの飼育、繁殖を行った。REIC 全身 KO マウス

は、REIC KO/WT (ヘテロ) マウス同士の交配により作出した。

#### 4. 研究成果

本申請研究では、前立腺正常上皮細胞および癌細胞等において、不死化関連遺伝子 REIC 発現に伴う癌化抑制 (Ras 関連分子を中心に) ・細胞死誘導のシグナリングの解析を行った。まず、前立腺正常上皮細胞において、不死化関連遺伝子 REIC 発現を特異的 siRNA によりノックダウンすることにより、活性型の Ras がアップレギュレーションされることを確認した。この状態で、Ras-V12 遺伝子をトランスフェクションさせ Oncogenic Ras を細胞内に蓄積させた癌化誘導状態においては、Ras シグナリングの根幹である Akt タンパク質の活性化が認められた。興味深いことに、活性化 Ras の作用を負に制御する p21-WAF および p16-INK4A タンパク質の発現については変化がなかったことより、癌化誘導状態においては REIC タンパク質が、Akt タンパク質の活性化を抑制することにより癌化を防ぐ役割を果たしていると考えられた。さらに今回の研究により、REIC 遺伝子の強発現による細胞死誘導シグナリングの新しい制御機構の一端が明らかとなった。これまで、REIC 遺伝子の強発現に基づく強力な治療効果の達成を目的とする Ad-REIC 剤の使用により、前立腺癌等の担癌マウスモデル実験において強力な腫瘍縮小効果が得られることが報告されている。しかしながら、多くの癌種、癌細胞種が Ad-REIC に感受性を示す一方で、Ad-REIC に耐性を示す癌細胞が存在することが明らかとなっており、その癌細胞死誘導における耐性メカニズムは明らかでなかった。本年度の研究においては、その薬剤耐性の主たる要因が、癌細胞内での分子シャペロンタンパク質である BiP/GRP78 に存在することを見出し、REIC 発現による細胞死の分子シグナル伝達を BiP/GRP78 タンパク質が負に制御することを明らかにした。

また、本研究では、マウス由来前立腺癌細胞である RM9 細胞において REIC タンパク質を安定発現する株を作製しコントロール細胞と比べることにより、REIC 発現によるシグナル

の下流に位置する因子を、タンパク質2次元泳動法を用いたプロテオミクス解析で同定した。結果として、発癌および細胞増殖に関わるとされる、eEF1A-1 (Eukaryotic elongation factor 1A-1)、GRP78 (78kDa glucose-regulated protein)、ARD (Aci-reductone dioxygenase)、MRP-L12 (39S ribosomal protein L12)、Peroxioredoxin-1等のタンパク質が、REIC発現によるシグナリングを構成している可能性が示唆された。今後、新規に同定されたこれらのREIC関連因子のRas活性化への作用および抗腫瘍作用、生理学的機能の観点からの解析が進められる予定である。また、REIC全身ノックアウト (KO) マウスでの解析については、現時点でも研究が進行中であり、本研究終了後も引き続き詳細な解析を行う。

最近、不死化関連遺伝子REIC/Dkk-3の細胞増殖サイクル異常・癌化における重要性を指摘する論文が相次いで報告されており、これらの報告は本申請研究での成果の追試、補強として位置づけられる。特に、今回の新知見であるREIC/Dkk-3のRasシグナリング抑制作用は未だ報告が無く、学術的に価値の高い知見となる可能性が高い。今後、岡山大学で同定した新規の不死化関連遺伝子群について更なる基盤的研究を遂行し、単に前立腺癌のみならず難治固形癌に対する、日本初の革新的癌医薬の創造につなげていきたい。

## 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)

① Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development. (査読有)

Zhang K, Watanabe M, Kashiwakura Y, Li SA, Edamura K, Huang P, Yamaguchi K, Nasu Y, Kobayashi Y, Sakaguchi M, Ochiai K, Yamada H, Takei K, Ueki H, Huh NH, Li M, Kaku H, Na Y, Kumon H.

Int J Oncol. 2010 Dec;37(6):1495-501.

② Down-regulation of BiP/GRP78 sensitizes resistant prostate cancer cells to gene-therapeutic overexpression of REIC/Dkk-3. (査読有)

Tanimoto R, Sakaguchi M, Abarzua F, Kataoka K, Kurose K, Murata H, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

Int J Cancer. 2010 Apr 1;126(7):1562-9.

③ REIC/Dkk-3 stable transfection reduces the malignant phenotype of mouse prostate cancer RM9 cells. (査読有)

Chen J, Watanabe M, Huang P, Sakaguchi M, Ochiai K, Nasu Y, Ouchida M, Huh NH, Shimizu K, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H.

Int J Mol Med. 2009 Dec;24(6):789-94.

④ Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of interleukin-7. (査読有)

Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Ochiai K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

J Biol Chem. 2009 May 22;284(21):14236-44.

⑤ Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. (査読有)

Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH, Kumon H.

Int J Oncol. 2009 Mar;34(3):657-63.

⑥ REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. (査読有)

Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H.

Cancer Gene Ther. 2009 Jan;16(1):65-72.

⑦ Mechanistic analysis of resistance to REIC/Dkk-3-induced apoptosis in human bladder cancer cells. (査読有)

Kobayashi T, Sakaguchi M, Tanimoto R, Abarzua F, Takaishi M, Kaku H, Kataoka K, Saika T, Nasu Y, Miyazaki M, Kumon H, Huh NH.

Acta Med Okayama. 2008 Dec;62(6):393-401.

⑧ Down-regulation of inhibition of differentiation-1 via activation of activating transcription factor 3 and Smad regulates REIC/Dickkopf-3-induced apoptosis. (査読有)

Kashiwakura Y, Ochiai K, Watanabe M, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaoka M, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH, Kumon H.  
Cancer Res. 2008 Oct 15;68(20):8333-41.

⑨ An N-terminal 78 amino acid truncation of REIC/Dkk-3 effectively induces apoptosis. (査読有)

Abarzua F, Kashiwakura Y, Takaoka M, Watanabe M, Ochiai K, Sakaguchi M, Iwawaki T, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH, Kumon H.  
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Oct 31;375(4):614-8.

[学会発表] (計 5件)

○国際会議における口頭発表

① Kumon H. 「Management of locally advanced/metastatic prostate cancer gene therapy for prostate cancer」, Congress of the Societe Internationale d'Urologie (30th), Shanghai, China, 1-5 Nov 2009

② Kumon H. 「A Magic bullet concept for cancer therapy」 The 15th Annual Meeting of Chinese Urological Association, Kunming, China, 18-21 Sep 2008

③ Kumon H. 「Gene therapy for prostate cancer」, The third forum of Urinary Cancer. Beijing, China, 12 Apr 2008

○国内学会・シンポジウム等における口頭発表

④ 公文裕巳 「シンポジウム がん免疫細胞・遺伝子治療の新展開『固形がんに対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療の開発』」, 日本癌学会学術総会, 横浜, 1-3 Oct 2009

⑤ 公文裕巳 「ICONT 事業の現状とアジアスタディの展開」, アジアンスタディ岡山' 08, 岡山, 8 Jun 2008

[図書] (計 1件)

① 公文裕巳、「新規癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3

による遺伝子治療の臨床開発」、メディカルドゥ社、遺伝子医学 MOOK⑰、2010年、p132-7

[産業財産権]

○出願状況 (計 3件)

①名称:「遺伝子発現を上昇させるシステム及び該システムを保持したベクター」

発明者: 公文 裕巳、許 南浩、阪口 政清、渡部 昌実

権利者: 岡山大学、桃太郎源(株)

種類: 特許

番号: 特願 2009-264299

出願年月日: 2009年11月19日

国内外の別: 国内

②名称:「特異的プロモーターの活性を上昇させるシステム及び該システムを保持したベクター」

発明者: 柏倉 祐司、公文 裕巳、渡部 昌実

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-082358

出願年月日: 2009年3月30日

国内外の別: 国内

③名称:「新規悪性中皮腫治療剤及び免疫賦活化剤」

発明者: 公文 裕巳、那須 保友、渡部 昌実、柏倉 祐司

権利者: 岡山大学、桃太郎源(株)

種類: 特許

番号: 特願 2008-196857号

出願年月日: 2008年7月30日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

公文 裕巳 (KUMON HIROMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 30144760

(2) 研究分担者

許 南浩 (HUH NAMHO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 70142023

阪口 政清 (SAKAGUCHI MASAKIYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 70379840

那須 保友 (NASU YASUTOMO)  
岡山大学・岡山大学病院・教授  
研究者番号：20237572

筒井 研 (TSUTSUI KEN)  
岡山大学・自然生命科学研究センター・教授  
研究者番号：70108158