

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591699

研究課題名（和文） 腹膜播種性転移がんの特性を利用した統合的新規遺伝子治療プロトコールの開発

研究課題名（英文） New combinatorial approach to peritoneal dissemination of scirrhou gastric carcinoma based REIC/Dkk-3 gene therapy

研究代表者

片岡 健 (KATAOKA KEN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10293317

研究成果の概要（和文）：

スキルス胃がん腹膜播種マウスモデルに REIC/Dkk-3 発現アデノウイルスを投与したところ、抗腫瘍効果が認められた。腫瘍部分にはナチュラルキラー細胞が動員されており、REIC/Dkk-3 遺伝子治療はスキルス胃がんに対する統合的なアプローチの選択肢になりうると考えられた。さらにミトコンドリアの品質管理に重要な分子 PINK1 が、REIC/dkk-3 遺伝子治療の耐性克服の新しい標的となることが新たに示された。また REIC/Dkk-3 の正常組織における発現制御因子のスクリーニングの結果、TNF- α が同定された。

研究成果の概要（英文）：

A single intraperitoneal injection of REIC/Dkk-3 adenovirus suppressed tumor dissemination and disease progression of scirrhou gastric carcinoma (SGC) in the mouse model. Immunomodulation by Ad-REIC led to recruitment of natural killer cells inside tumor nodules. We conclude that REIC/Dkk-3 gene therapy may be a potential tool in combinatorial approaches to achieve curative effects in SGC. We also demonstrated that PINK1, a key molecule for the mitochondrial protection system, was a new target molecule to sensitize resistant cancer cells to REIC/Dkk-3 gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：REIC/Dkk-3, Gene Therapy, Scirrhou Gastric Carcinoma, Peritoneal Dissemination

1. 研究開始当初の背景

REIC (Reduced Expression in Immortalized Cells) は、不死化した細胞でその発現が低下する遺伝子として本研究室

で最初に発見された。その後、塩基配列の相同性から Dkk (Dickkop) ファミリーに属することがわかり、別名 Dkk-3 とも呼ばれている。この Dkk ファミリーの他のメンバーは Wnt シグナルを阻害することが知られてい

るが、REIC/Dkk-3の機能については未だ不明である。

REIC/Dkk-3は肺がんや前立腺がんなど様々な腫瘍において発現が消失または低下しており、がん抑制遺伝子と考えられている。さらにアデノウイルスを用いてREIC/Dkk-3を強制的に発現させると(以降Ad-REICとする)、小胞体ストレスを介してがん細胞のみにアポトーシスが誘導される。In vivoにおいてもヒト前立腺がん細胞を移植したマウスにAd-REICを投与すると、腫瘍がほぼ完全に消滅した。

多角的な解析からAd-REICの抗腫瘍効果は、がん細胞の直接的アポトーシス誘導作用、正常線維芽細胞などからのインターロイキン-7分泌を起点としたNK細胞の動員、ABCトランスポーター遺伝子の発現抑制による抗がん剤感受性の向上など多岐にわたることが判明した。現在、前立腺がんを標的としたREIC/Dkk-3遺伝子治療は岡山大学病院などで臨床試験を開始している。

腹膜播種は腹腔内を経由するがんの転移形式であり、胃がんなどの腹腔内臓器由来のがんではリンパ節転移に次いで多い。胃がん手術後の場合、再発症例の半分を腹膜播種が占めるが、予後不良で5年生存率は外科切除がなされた場合でも数%しかない。早期診断が困難であるため、病態が完成してから初めて治療が開始されるのが現状である。そのため非常に難治性であり、標準的な治療法も確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は上記のような背景の下に、Ad-REICによるREIC遺伝子治療を難治性がんの代表であるスキルス胃がん腹膜播種に応用しようというものである。

3. 研究の方法

本研究はヒトがん細胞株を用いてAd-REICの効果とその機序の細胞生物学的解析を行った。In vivoの検討では胃がんマウスモデルとして、スキルス胃がん細胞株OCUM-2MD3細胞をヌードマウスへ腹膜播種させた実験系を用いた。またREIC/Dkk-3タンパク質の発現解析はマウス組織の免疫染色によって行った。

4. 研究成果

スキルス胃がん細胞株OCUM-2MD3に対してIn vitroにおけるAd-REICのアポトーシス誘

導を検討したところ、前立腺がん細胞株PC3に比べて明らかな耐性を示した。そこで、まずアデノウイルスベクターを用いたAd-REICに対する耐性獲得の鍵となる小胞体ストレス関連タンパク質BiPの発現についてスキルス胃がん細胞株を用いて調べた。確認した3株全てで、これまで確認されているAd-REIC耐性がん細胞株と同レベル以上のBiPタンパク質発現が確認された。これまでにBiP機能阻害効果が知られている緑茶カテキン(EGCG)を用いてみたが、残念ながらAd-REICによるアポトーシス誘導に対して限定的な増強効果しか認めなかった。

さらにIn vivoでの効果を検討するため、まずヌードマウスにOCUM-2MD3細胞を腹腔内注射する腹膜播種モデルを我々の手で再現した。その上で腹膜播種後1日目にAd-REICを腹腔注射して検討したところ、播種性腫瘍の数とその増大を抑制する効果が認められた。さらにAd-REIC投与により実際のマウス腫瘍組織内でアポトーシスが誘導されていること、CD49bにより染色されるナチュラルキラー細胞が腫瘍組織内へ動員されていることが確認された。すなわちスキルス胃がんOCUM-2MD3細胞を用いたマウス腹膜播種モデルでは、主にAd-REIC腹腔内投与による腫瘍免疫系の賦活化によって腹膜播種が抑制されたと考えられた。

興味深いことにスキルス胃がん細胞株OCUM-2MD3で、幹細胞マーカーであるCD133とCD44が高発現していた。さらに両マーカーの高発現は、Ad-REICにより減少した。このことはAd-REICががん幹細胞に対して、幹細胞性を抑制する可能性を示唆している。しかし現状ではその程度は十分ではなかったため、今後効果を増強する条件を突き止める方針である。OCUM-2MD3の他に様々ながん細胞株でCD133の発現を確認したが、今後はCD133の発現の意味が比較的明らかとなっている中枢神経系の腫瘍で、Ad-REICによるがん幹細胞への効果を検討していく方針である。

Ad-REICは様々ながんに対してアポトーシスを誘導することができるが、一方で膀胱がんなどではAd-REIC耐性が認められた。Ad-REICに感受性である前立腺がん細胞株から耐性細胞株を樹立して感受性株と比較したところ、小胞体タンパク質BiP/GRP78の発現量がAd-REIC耐性に正に相関していた。さらにBiP/GRP78発現をsiRNAによって抑制したところ、耐性株の感受性が回復した。またAd-REIC耐性の前立腺がん細胞ではBe1-2ファミリータンパク質の発現を抑制することで、Ad-REICの効果を大きく高めることができた。このように臨床応用で今後問題となりうるAd-REIC耐性に対しても、すでに機序を解明しつつある。

新たな知見としてさらに、パーキンソン病の原因遺伝子である PINK1 の発現制御がこの耐性克服に応用できることが明らかになった。8 種類の膀胱がん細胞の Ad-REIC 感受性と PINK1 の発現を調べたところ、両者の間に正の相関が認められた。さらに耐性細胞に対して siRNA を用いて PINK1 の発現を低下させると、部分的にはあるが Ad-REIC 感受性が亢進した。このとき Bcl-2 ファミリー分子の発現を確認したところ、Ad-REIC によって低下することが明らかになった。すなわちがん細胞に対してミトコンドリア機能阻害によるストレス（と Ad-REIC によって誘導される小胞体ストレスの複合ストレスが効果的であったといえる。この知見を踏まえて、今後は複合ストレス戦の研究を進展させる方針である。

REIC/Dkk-3 の正常機能を解明するため、主に上皮組織での発現を詳細に解析した。皮膚、口腔粘膜、食道、子宮頸部といった扁平上皮組織では発現を認めたが、角膜では発現を認めなかった。これら上皮組織における REIC/Dkk-3 の発現は特異的で、すでにある程度分化した層においてのみその発現を認めた。このことは REIC/Dkk-3 の発現を制御しているなんらかの因子が存在することを意味する。そこでヒト皮膚ケラチノサイトを用いて、発現制御分子のスクリーニングを行った。その結果、Tumor Necrosis Factor (TNF)- α が皮膚ケラチノサイトの REIC/Dkk-3 発現を低下させることを発見し、組織などを用いて確認した。TNF- α は皮膚の炎症時に発現して、ケラチノサイトの遊走などを制御することが知られているため、今後は REIC/Dkk-3 発現の意味を追求していく方針である。

本研究課題は一部に計画の変更などはあったものの、総合的には順調に進行した。今後は REIC/Dkk-3 遺伝子治療を基盤としたがん特異的な「複合ストレス戦略の開発を進めていく方針である。また本研究課題の成果から、REIC/Dkk-3 の正常機能を解明する足がかりが得られた。今後は機能解明へ向けた研究へ軸足を移し、REIC/Dkk-3 の機能の全容を解明したい。

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 15 件)

1. *Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N: Expression pattern of REIC/Dkk-3 in mouse squamous epithelia. Clin Exp Dermatol (In press) (査読有) *Corresponding

author

2. *Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto KI, Sakaguchi M, Huh NH: S100A7 Promotes the Migration and Invasion of Osteosarcoma Cells via Receptor for Advanced Glycation End Products. Oncol Lett (2012) 3, 1149-1153 (査読有) *Corresponding author
3. Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H.: Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. Acta Med Okayama (2012) 66, 7-16 (査読有)
4. Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by downregulation of BRPK/PINK1. Oncol Rep (2012) 27, 695-699 (査読有)
5. Sakaguchi M, Huh NH, Namba M: A novel tumor suppressor, REIC/Dkk-3 gene identified by our in vitro transformation model of normal human fibroblasts works as a potent therapeutic anti-tumor agent. Adv Exp Med Biol (2011) 720, 209-215 (査読有)
6. Ochiai K, Watanabe M, Ueki H, Huang P, Fujii Y, Nasu Y, Noguchi H, Hirata T, Sakaguchi M, Huh NH, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H: Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1. Biochem Biophys Res Commun (2011) 412, 391-395 (査読有)
7. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto KI, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH: TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. PLoS One (2011) 6, e23132 (査読有)
8. Than SS, *Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Intraperitoneal administration of an adenovirus vector

- carrying REIC/Dkk-3 gene suppresses peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Oncol Rep* (2011) 25, 989-995 *Corresponding author (査読有)
9. Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Abarzua F, Than SS, Sonogawa H, Makino T, Shimizu T, Huh NH: Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Exp Dermatol* (2011) 20, 273-277 (査読有)
 10. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami J, Yamada H, Kataoka K, Huh NH: A New Cytosolic Pathway from a Parkinson's Disease-associated Kinase, BRPK/PINK1: Activation of Akt via mTORC2. *J Biol Chem* (2011) 286, 7182-7189 (査読有)
 11. Kataoka K, Sakaguchi M, Li KP, Taketa C, Yamamoto KI, Du G, Funahashi H, Murata H, Huh NH: Internalization of REIC/Dkk-3 protein by induced pluripotent stem cell-derived embryoid bodies and extra-embryonic tissues. *Int J Mol Med* (2010) 26, 853-859 (査読有)
 12. Kataoka K, Huh NH: Application of a Thermo-Reversible Gelation Polymer, Mebiol Gel, for Stem Cell Culture and Regenerative Medicine. *Journal of Stem cells and Regenerative medicine* (2010) 6, 10-14 (査読無)
 13. Tanimoto R, Sakaguchi M, Abarzua F, Kataoka K, Kurose K, Murata H, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Down-regulation of Bip/Grp78 sensitizes resistant prostate cancer cells to gene-therapeutic overexpression of REIC/Dkk3. *Int J Cancer* (2010) 126, 1562-1569 (査読有)
 14. Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of IL-7. *J Biol Chem* (2009) 284, 14236-14244 (査読有)
 15. Chen J, Watanabe M, Huang P, Sakaguchi M, Ochiai K, Nasu Y, Ouchida M, Huh NH, Shimizu K, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H: REIC/Dkk-3 stable transfection reduces the malignant phenotype of mouse prostate cancer RM9 cells. *Int J Mol Med* (2009) 24, 789-794 (査読有)
- [学会発表] (計 21 件)
- 講演 (学会シンポジウム、セミナー)
1. 片岡 健: REIC/Dkk-3 遺伝子治療へ小体ストレスを介した多彩な抗腫瘍効果へ。国立成育医療研究センター研究所特別セミナー (2011年9月、東京)
 2. Kataoka K: Current achievements and clinical application of stem cell research in Okayama University. International Symposium and Workshop for Stem Cell Therapy (2009年10月、インドネシア)
 3. 片岡 健, 許 南浩: 幹細胞基礎研究の現状と未来へ In vivo / in vitro における組織幹細胞研究 へ。日本組織培養学会第82回大会シンポジウム(2009年5月、栃木)
- 国際学会発表
1. Kubo M, Moriguchi M, Maehara M, Kataoka K, Huh NH, Inagawa K: The development of improved cultured epithelium using $\beta 3$ cDNA-transduced keratinocytes to increase its take-rate. 17th International Society for Cellular Therapy Annual Meeting (2011年5月、オランダ)
 2. Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH: PINK1/BRPK inhibits apoptotic cell death and enhances cellular invasiveness through an activation of mTORC2 pathway. The 16th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (2010年9月、ポルトガル)
 3. Kim, DJ, Kataoka K, Sano S, Kiguchi K, DiGiovanni J: Impact of Bcl-xL deficiency in mouse keratinocytes on susceptibility to both UVB- and chemically-induced skin carcinogenesis. 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2009年4月、米国)
- 国内学会発表
1. 前原 奈都美、片岡 健、杜 剛、村田 等、

- 山本 健一、阪口 政清、許 南浩 : 正常皮膚における REIC/Dkk-3 の発現制御因子の検索. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月、横浜)
2. Kataoka K, Sakaguchi M, Ono T, Morishita M, Yamamoto KI, Murata H, Huh NH: Promotion of migration and invasion of osteosarcoma cells by S100A7 through RAGE. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
 3. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto KI, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH: TIRAP is a critical transducer of RAGE-mediated inflammatory signaling. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
 4. Murata H, Jin Y, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH: Mitochondrial malfunction by PINK1 knockdown augments apoptosis induced by adenovirus carrying REIC/Dkk-3. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
 5. 片岡 健、阪口 政清、杜 剛、前原 奈都美、村田 等、許 南浩 : REIC/Dkk-3 の扁平上皮における発現とその制御因子の探索. 日本組織培養学会第 84 回大会 (2011 年 5 月、東京)
 6. Jin Y, Murata H, Kataoka K, Sakaguchi M, Huh NH: PINK1 knockdown increases the apoptosis induced by adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 overexpression on bladder cancer cells. 日本組織培養学会第 84 回大会 (2011 年 5 月、東京)
 7. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Kataoka K, Huh NH: BRPK/PINK1 promotes tumor progression through activation of mTORC2 pathway. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
 8. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto KI, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH: TIRAP, an adaptor protein for TLR-2/-4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding (多機能受容体 RAGE の下流信号伝達機構の解明). 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
 9. Kataoka K, Than SS, Sakaguchi M, Abarzua F, Taketa C, Yashiro M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Intraperitoneal Administration of an Adenovirus Vector Carrying REIC/Dkk-3 Gene Suppresses Peritoneal Dissemination of Scirrhous Gastric Carcinoma Cells. 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月、大阪)
 10. Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Makino T, Shimizu T, Huh NH: Reduced expression of REIC/Dkk-3, a putative tumor suppressor gene, in hyperproliferative epidermis. 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月、大阪)
 11. 片岡 健、阪口 政清、李 坤鵬、杜 剛、武田 千佳、舟橋 弘晃、村田 等、許 南浩 : 分化誘導したマウス ES 細胞及び iPS 細胞における Cy3 標識 REIC/Dkk-3 タンパク質のエンドサトーシスによる取り込み. 日本組織培養学会第 83 回大会 (2010 年 5 月、岡山)
 12. Than SS, Kataoka K, Putranto EW, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Yashiro M, Sakaguchi M, Huh NH: Effect of Adenovirus-mediated Overexpression of REIC/Dkk-3 on Scirrhous Gastric Carcinoma Cells. 日本組織培養学会第 83 回大会 (2010 年 5 月、岡山)
 13. Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Nasu Y, Kumon H, Huh NH: Intraperitoneal Normal human fibroblast mis-targetedly infected with adenovirus REIC have a tumor-suppressive ability in vivo. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009 年 12 月、横浜)
 14. 村田 等、阪口 政清、片岡 健、許 南浩 : BRPK/PINK1 の mTORC2 経路活性化を介したがん浸潤への寄与. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月、横浜)
 15. 阪口 政清、片岡 健、村田 等、許 南浩 : 超高効率発現ベクターの開発とがん遺伝子治療薬としての REIC/Dkk-3 アデノウイルスベクターへの応用. 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月、横浜)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者

片岡 健 (KATAOKA KEN)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：10293317

(2) 研究分担者
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

(3) 連携研究者