

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4月1日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791473

研究課題名（和文） 表在性難治性膀胱癌に対する癌選択的膀胱注入治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of novel intravesical agents for the treatment of refractory superficial bladder cancer

研究代表者

渡部 昌実（WATANABE MASAMI）

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：70444677

研究成果の概要（和文）：

膀胱癌は、尿路性器癌の中でも最も罹患率の高い癌疾患の一つである。現在、経尿道的な膀胱腫瘍の切除手術後に、残存腫瘍や浮遊・播種膀胱癌細胞を治療するために、抗癌剤を膀胱腔内に注入する治療方法が用いられている。癌治療遺伝子である REIC/Dkk-3 遺伝子をコードするアデノウイルスベクター（Ad-REIC）剤は、様々な癌細胞において癌特異的細胞死を誘導する。本申請研究で我々は、Ad-REIC 剤の膀胱腔内注入療法が、膀胱癌疾患の治療に有用である可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Bladder cancer is one of the most common urogenital malignancies. The intravesical instillation of anti-cancer agent is an attractive strategy to treat a superficial lesion or floating/disseminated cancer cells after transurethral operation. An adenovirus carrying REIC/Dkk-3, a tumor suppressor gene, (Ad-REIC) exhibits cancer-specific apoptotic effects in various types of cancer cells. In this study, we demonstrated that the intravesical instillation of Ad-REIC could be an attractive therapeutic method for the treatment of human bladder cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 泌尿器科学、遺伝子治療、細胞治療、再生医療

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： 膀胱癌、遺伝子治療、抗癌免疫、分化

1. 研究開始当初の背景

表在性膀胱癌の治療では経尿道的手術が行われるが、多くの症例で再発が認められ、また再発を繰り返すうちに悪性度の高い浸潤性膀胱癌になる患者も一定の頻度で認められる。BCG膀胱内注入療法は約30年前にMoralesらによりその有用性が報告されたもので、これまでに多くの患者に恩恵を与えてきた。しかし、BCG療法で難治性、または忍容性のない患者に対する治療の選択肢が少ないのが現状であり、新しい表在性膀胱癌の治療戦略の確立が待望されている。

癌抑制・治療遺伝子である REIC (Reduced Expression in Immortalized Cells) は、不死化細胞を用いた研究から岡山大学で独自に単離・同定された遺伝子で、正常細胞で活発に発現し、膀胱癌も含めた癌細胞ではその発現が著しく抑制されている。表在性膀胱癌に限らず癌治療では、(1) 癌細胞選択的な細胞死誘導、(2) 抗癌免疫の活性化の2つが治療の鍵であることは世界のコンセンサスといえる。REIC 遺伝子は、この2つの機能を併せ持ち、しかも、多種類の癌に適用可能であり、21世紀の夢の癌治療遺伝子と呼ぶにふさわしい機能を持つことが既に証明をされている。申請者らは最近の前立腺癌マウスモデルを用いた実験で、REIC 発現アデノウイルス剤 (Ad-REIC) および REIC タンパク質のそれぞれ単剤の局所癌内投与により腫瘍が縮小し、また全身効果としての抗癌細胞免疫の活性化が起こることを証明している。この機序として、REIC タンパク質により単球から癌抗原提示能を持つ樹状細胞様の細胞が分化誘導され、結果として抗癌性をもつ CTL リンパ球が全身性に活性化されたことが考えられる (*Int J Oncol.* 2009, 34(3):657-63.)。また、Ad-REIC 剤投与により正常細胞から IL-7 が分泌誘導され、抗癌作用を持つ NK 細胞が活性化されることも証明されている (*J Biol Chem.* 2009, 284(21):14236-44.)。以上の背景を踏まえて、本申請研究では、表在性難治性膀胱癌に対する癌選択的膀胱注入治療薬の開発のための基盤研究を行った。

2. 研究の目的

本申請研究では、癌治療に有用と考えられる REIC 遺伝子・タンパク質の抗腫瘍効果のメカニズムについて研究を行うことにより、こ

の機序を膀胱癌に対する革新的標的医療に応用することを目的とした。具体的には、これまでの学術的背景を基盤として、難治性の表在性膀胱癌における Ad-REIC 剤と REIC タンパク質の有用性を、アポトーシス誘導および抗癌免疫学的観点から検証し、癌選択的膀胱注入治療薬の開発の基盤となる研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト膀胱正常上皮細胞 (初代培養株) およびヒト膀胱癌細胞株 (RT4, KK47, T24, J82, UMUC3, TCCSUP, 5637, HT1376) において細胞内タンパク質を抽出し、Western blot 法により REIC タンパク質の発現の状態を解析した。

(2) 上記の正常および癌細胞の培養系において、Ad-REIC 剤を 10 MOI, 100 MOI にて投与し、それぞれの細胞の細胞死誘導頻度を解析した。コントロールのアデノウイルスとして、Ad-LacZ を用いた。

(3) 一部の Ad-REIC 剤耐性の膀胱癌細胞株については、浮遊した培養条件で Ad-REIC 剤投与を行い、Ad-REIC 剤が当該膀胱癌細胞の増殖能におよぼす影響について解析を加えた。

(4) ノードマウス膀胱腔内にヒト表在性膀胱癌由来の RT4 細胞を移植し、同所性表在性膀胱癌マウスモデルを確立するための動物実験を行った。

4. 研究成果

癌抑制遺伝子 REIC がコードする REIC タンパク質の抗癌免疫活性化作用を、表在性難治性膀胱癌に対する癌選択的膀胱注入治療薬の開発に応用するための基盤研究を実施した。申請者は、以前より REIC 遺伝子発現アデノウイルス (Ad-REIC) の腫瘍内局所投与により、「癌細胞選択的なアポトーシス」に基づく抗腫瘍治療効果が得られることを証明している。本申請研究により申請者は、表在性膀胱癌における Ad-REIC 剤の有用性をアポトーシス誘導の観点から検証した。結果として、ヒト膀胱正常上皮細胞およびヒト膀胱癌細胞株 (RT4, KK47, T24, J82, UMUC3, TCCSUP, 5637, HT1376) 培養系において、Ad-REIC 剤による癌細胞選択的な細胞死誘導作用を証明し得た。

また、これらの膀胱癌細胞の通常培養状態でのREICタンパク質の発現は著明に低下または欠如していた。これらのin vitro実験の結果をもとに、同所性膀胱癌マウスにおけるAd-REIC剤を用いた治療の至適投与量を設定するためのin vivo実験系の確立に関する研究を行った。すなわち、ヌードマウス膀胱腔内にヒト表在性膀胱癌由来のRT4細胞を移植する同所性表在性膀胱癌マウスモデルの作製に関する実験を行い、当該細胞に由来する膀胱内腫瘍のマウスモデルを確立した。さらに、本申請研究に関連する研究として、精製REICタンパク質の細胞分化における機能の解析を進め、特にREICタンパク質が各種の免疫担当細胞の分化の過程において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、2012年1月には、REIC/Dkk-3タンパク質の免疫学的な作用を示したPapatriantafyllou M.らの論文が*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2012, Jan 31;109(5):1631-6.)に発表され、今後、REICタンパク質の免疫学的な作用がクローズアップされてくることが予想される。本申請研究では、REIC遺伝子発現に伴い生成・分泌される新規サイトカイン様タンパク質REICの抗癌免疫学的な作用機序の一部を世界に先駆けて明らかにしており、本研究での成果が、膀胱癌を含む難治固形癌に対する革新的癌標的・免疫医療の創造につながっていくことが期待される。

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 7 件)

① 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.* (査読有) 2012 Mar; 27(3):695-9. doi: 10.3892/or.2011.1543. Epub 2011 Nov 10.

② 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. (査読有) 2012 Feb; 66(1):7-16.

③ 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. (査読有) 2011 Aug 26; 412(2):391-5. Epub 2011 Aug 3.

④ Lei Wang, Haruki Kaku, Peng Huang, Kexin Xu, Kai Yang, Jiheng Zhang, Ming Li, Liping Xie, Xiaofeng Wang, Akiko Sakai, Masami Watanabe, Yasutomo Nasu, Kenji Shimizu, Hiromi Kumon, Yanqun Na.

Single Nucleotide Polymorphism WRN Leu1074Phe Is Associated with Prostate Cancer Susceptibility in Chinese Subjects.

Acta Med Okayama. (査読有) 2011 In press.

⑤ Watanabe M, Ueki H, Ochiai K, Huang P, Kobayashi Y, Nasu Y, Sasaki K, Kaku H, Kashiwakura Y, Kumon H.

Advanced two-step transcriptional amplification as a novel method for cancer-specific gene expression and imaging.

Oncol Rep. (査読有) 2011 Jul 1. [Epub ahead of print]

⑥ Huang P, Chen J, Wang L, Na Y, Kaku H, Ueki H, Sasaki K, Yamaguchi K, Zhang K, Saika T, Nasu Y, Watanabe M, Kumon H.

Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence.

Med Oncol. (査読有) 2011 May 1. [Epub ahead of print]

⑦ Tabata K, Kurosaka S, Watanabe M,

Edamura K, Satoh T, Yang G, Abdelfattah E, Wang J, Goltsov A, Floryk D, Thompson TC. Tumor growth and metastasis suppression by Glipr1 gene-modified macrophages in a metastatic prostate cancer model. *Gene Ther.* (査読有) 2011 Apr 21. [Epub ahead of print]

[図書] (計2件)

① Watanabe M, Kaku H, Huang P, Kumon H, Nasu Y.
REIC/Dkk-3 gene therapy.
Nihon Rinsho. (査読無) 2011 Jun; 69 Suppl 5:559-63.

② Nasu Y, Sasaki K, Kumon H, Kaku H, Watanabe M.
Suicide gene and immuno gene therapy for prostate cancer.
Nihon Rinsho. (査読無) 2011 Jun;69 Suppl 5:554-8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)
岡山大学・岡山大学病院・准教授
研究者番号：70444677