

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861425

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子REICの抗癌免疫逃避機構の解析

研究課題名(英文) The mechanism analysis of anti-cancer immune escape by tumor suppressor gene REIC

研究代表者

黄 鵬 (HUANG, PENG)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00610841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3を治療遺伝子とする固形癌に対するin-situ遺伝子治療は、「癌細胞の選択的アポトーシス」と「抗癌免疫の活性化」による相乗的効果増強作用(自己癌ワクチン化)を誘導し、原発巣のみならず転移巣に対しても顕著な治療効果を示すことが複数の動物モデルで実証されている。本申請研究では、広範な抗癌免疫担当細胞の抑制作用を示すMDSCの分化をREIC/Dkk-3タンパク質が阻害するメカニズムが明らかとなっており、次世代癌免疫逃避の抑制および癌ワクチン化療法としてのREIC遺伝子治療の抗腫瘍免疫学的基盤の確立につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In-situ gene therapy of cancer suppressor gene REIC / Dkk-3 against solid cancer, displayed that the synergistic effects of the "activation of the anti-cancer immunity" and "selective apoptosis of cancer cells", has been demonstrated in several animal models. In this study, REIC / Dkk-3 protein had been elucidated that the suppressive effect on the differentiation of MDSC, furthermore, the mechanism also be verify.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子治療 癌ワクチン 骨髄系免疫抑制細胞 REIC/Dkk3

1. 研究開始当初の背景

岡山大学の我々のグループにより同定された癌抑制・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、1) ヒトの非小細胞肺癌、前立腺癌、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 症例全ての癌組織でタンパク質の発現が低下しており、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病巣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が証明されている。さらに我々の研究により、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の形態を有する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ることが示されている (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.)。

現在、新しい癌治療戦略として「癌免疫逃避の抑制および癌ワクチン」が注目され、樹状細胞療法やペプチドワクチン等が種々検討され、前立腺癌に対する新規の樹状細胞ワクチンも 2011 本年 4 月 FDA で承認された。こ

れらの背景の中、本研究実施者は研究申請時までに、研究のコアである REIC 遺伝子・タンパク質の抗癌免疫活性のメカニズムについて精力的に研究を行い、またその抗癌活性を固形癌に対する革新的標的医療に応用することを目指してきた。

2. 研究の目的

癌免疫逃避機構に関する最近の注目すべき研究として、骨髄系免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid-derived suppresser cell) が、癌に対する免疫監視機構や抗腫瘍免疫を負に制御し、癌の悪性進展に中心的役割を担っていることが明らかにされつつある。我々は、以前より REIC (Reduced Expression in Immortalized Cells) 癌抑制遺伝子発現アデノウイルス (Ad-REIC) の腫瘍局所投与により、「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。我々の最近の研究において、REIC タンパク質が MDSC の分化を強力に抑制する機能を有する可能性が明らかとなったことから、本研究では、REIC/Dkk-3 の機能を生体内における抗癌免疫活性化の観点から解析し、当該タンパク質による免疫逃避機構の制御機構を解析した。

3. 研究の方法

REIC/Dkk-3 遺伝子治療による癌免疫逃避の制御および癌ワクチン化の観点から、MDSC 等の骨髄球系免疫担当細胞の分化機序・生理的

機能およびその制御メカニズムについて解析した。既に保持している REIC/Dkk-3 遺伝子・当該タンパク質・ノックアウトマウスに関連する実験系と、骨髄・末梢血細胞培養、各種担癌マウスモデル作製と治療実験、抗癌免疫の活性化の解析等の技術を組み合わせ、REIC/Dkk-3 タンパク質の MDSC 等の骨髄球系抑制細胞への作用に焦点を当て、

1) REIC/Dkk-3 タンパク質による MDSC 分化抑制の細胞内の分子機序の解明

2) REIC/Dkk-3 遺伝子治療に基づく生体内での MDSC 分化抑制作用と抗癌免疫活性化作用のメカニズムの解明

3) REIC/Dkk-3 ノックアウトマウスを用いた、生体内での MDSC の分化機序・免疫抑制作用の解明

を目指して研究を行った。

4. 研究成果

本研究により、REIC/Dkk-3 タンパク質が MDSC (骨髄系免疫抑制細胞) の分化を強力に抑制する分子機序の一端が明らかとなった。

1) REIC/Dkk-3 タンパク質による MDSC 分化抑制の細胞内の分子機序を解明された。外因性 REIC/Dkk-3 タンパク質を介する PBMC から MDSC または樹状細胞への分化には、細胞内の複数の STAT シグナリングパスウェイが関与し得ることが示唆された。

2) 担癌マウスモデルを用いて、REIC/Dkk-3 遺伝子治療による生体内での MDSC 分化抑制作用と抗癌免疫活性化作用のメカニズムの解明を、併せて実施した。

3) 本申請研究では、REIC/Dkk-3 ノックアウトマウスを用いて、生体内での MDSC の分化機序・免疫抑制作用の解明を行った。その中で、REIC/Dkk-3 ノックアウトマウスを用いた腫瘍免疫解析が、MDSC 機能の解析に有用であることが確認された。

我々の上記の結果により、癌免疫担当細胞の制御(抑制)を担う MDSC の分化を REIC/Dkk-3 タンパク質が阻害する機構が、REIC による癌免疫逃避の抑制作用および癌ワクチン治療法としての REIC 遺伝子治療の効果に密接に関連していることが示唆された。本研究により、REIC/DKK-3 遺伝子を基盤シーズとする日本発の癌標的治療の創出基盤を強化されたと考える。また、泌尿器科領域の癌のみならず多くの難治固形癌に対して、癌免疫逃避の制御を目指す、また癌ワクチン治療法としての REIC 遺伝子治療の抗腫瘍免疫学的な展開基盤が確立されたと考える。今後、当該腫瘍内環境において新規 Immune Checkpoints の発現・動態プロファイルを解析し、より効果的な癌免疫活性化治療法としての REIC 遺伝子治療の深化を目指す。

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 5 件)

Kinoshita R, Watanabe M, Huang P, Li SA, Sakaguchi M, Kumon H, Futami J.

The cysteine-rich core domain of REIC/Dkk-3 is critical for its effect on monocyte differentiation and tumor regression.

Oncology Reports, 査読有, 2015.

DOI: 10.3892/or.2015.3885.

Ma C, Liu C, Huang P, Kaku H, Chen J, Guo K, Ueki H, Sakai A, Nasu Y, Kumon H, Shimizu K, Watanabe M.

Significant association between the Axin2 rs2240308 single nucleotide polymorphism and the incidence of prostate cancer.

Oncology Letters, 8 巻, 789-794, 査読有, 2014.

DOI: 10.3892/ol.2014.2177

Sakaguchi M, Watanabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IM, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene.

Molecular Biotechnology, 56 巻, 621-630, 査読有, 2014.

DOI: 10.1007/s12033-014-9738-0.

Watanabe M, Sakaguchi M, Kinoshita R, Kaku H, Ariyoshi Y, Ueki H, Tanimoto R, Ebara S, Ochiai K, Futami J, Li SA, Huang P, Nasu Y, Huh NH, Kumon H.

A novel gene expression system strongly enhances the anticancer effects of a REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector.

Oncology Reports, 31 巻, 1089-1095, 査読有, 2014.

DOI: 10.3892/or.2013.2958.

Liu C, Zheng S, Shen H, Xu K, Chen J, Li H, Xu Y, Xu A, Chen B, Kaku H, Nasu Y, Kumon H, Huang P, Watanabe M.

Clinical significance of CD24 as a predictor of bladder cancer recurrence.

Oncol Lett, 6 巻, 96-100, 査読有, 2013.

DOI: 10.3892/ol.2013.1357

[学会発表] (計 1 件)

Huang P et al . , Immunomodulation and anti-cancer activity of REIC/DKK-3 protein.

European Society of Gene and Cell Therapy, 2013/10/26, Madrid Spain.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特に無し

6．研究組織

(1)研究代表者

黄 鵬（HUANG PENG）

岡山大学・医歯薬総合研究科・助教

研究者番号：00610841

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し