

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20093

研究課題名(和文)腫瘍融解性Ad-REICを用いた新規癌ワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel cancer vaccine therapy using oncolytic Ad-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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：REIC/Dkk-3遺伝子を基盤シースとする日本発の癌標的治療の創出基盤を強化し、泌尿器科領域の癌のみならず、多くの難治固形癌に対する、癌免疫逃避の抑制および癌ワクチン化を目的とした、次世代REIC遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクター(腫瘍融解性Ad-REIC)遺伝子治療の抗腫瘍免疫学的な展開基盤になるものと判断される。

研究成果の概要(英文)：Reduced expression in immortalized cells (REIC)/Dickkopf 3 (Dkk-3) is a tumor suppressor gene that is downregulated in various cancers. We recently developed a novel specific replication-selective adenovirus Ad-REIC, to achieve more effective therapeutic outcomes and anti-cancer immune escape. In this study, we assessed the anti-tumor immunity effects of replication-selective adenovirus Ad-REIC, and the mechanism had been verify.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：限増殖型アデノウイルスベクター REIC/DKK-3 癌ワクチン 抗癌免疫活性化

## 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、多数の癌では、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 (Cancer Res, 65:9617, 2005, Cancer Res, 68:8333, 2008)。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、臨床試験では岡山大学病院において第一世代 Ad-REIC 製剤 (非増殖型) を使用して、前立腺がんに対する遺伝子治療臨床研究が実施されており、局所腫瘍内投与での高い安全性に加えて、PSA (前立腺がん腫瘍マーカー) の低下、抗腫瘍効果の病理組織学的検証、並びに抗がん免疫の活性化にともなう全身効果が確認されている。

近年申請者らは、従来報告されている制限増殖型アデノウイルスの技術群を有効に組み合わせることにより独自の制限 (癌特異的) 増殖型アデノウイルスを作製した。さらに、このアデノウイルスに、独特の抗癌免疫活性化作用を有する REIC タンパク質を発現する REIC 遺伝子を新たにコードした。これにより、独自性・新規性を兼ね備えた、かつ、既存の制限増殖型ウイルスを用いた癌に対する医薬品群を凌駕する抗癌作用を持つことが期待される、抗癌ウイルス製剤 (腫瘍融解性 Ad-REIC: Oncolytic Ad-REIC) の開発に成功した。Oncolytic Ad-REIC においては、独自の制限増殖型アデノウイルスベクター機能と、REIC 遺伝子発現時の小胞体ストレスによる細胞死誘導作用及び REIC タンパク質による抗癌免疫活性

化作用とが有機的に協働することにより、従来の方法では為しえなかったような著明な癌治療効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

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。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ことを明らかにしており、本申請研究では、我々が新たに開発した REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクター (腫瘍融解性 Ad-REIC) を用いて、REIC/Dkk-3 タンパク質の機能を抗癌免疫の制御と活性化の両面から解析し、当該癌ワクチン治療法の基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクター (腫瘍融解性 Ad-REIC) を用いた新規癌ワクチン療法の開発をするために、各種癌細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* 実験を行う。まず、*in vitro* 実験では、REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターと第一世代 Ad-REIC 製剤 (非増殖型) による各癌細胞における癌選択的細胞死の誘導を比較・検証する。さらに *in vivo* 実験では、腎癌マウスモデルや前立腺癌マウスモデルを用いて、これら REIC 関連試薬・製剤を用いた治療実験を実施する。また、腎癌に対する分子標的治療薬として臨床の場で使用されているソラフェニブとの間で、当該マウス動物実験において治療効果を比較することにより、REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターを

用いた遺伝子・ウイルス治療法の有用性を検証する。また、REIC/Dkk-3 ノックアウトマウスを含む各種の in vivo マウス実験系において、自己癌ワクチン治療法としての REIC 遺伝子治療により誘導される MDSC 分化抑制作用と抗癌免疫活性化作用のメカニズムを明らかにする。

#### 4 . 研究成果

本研究より、REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた治療法の抗腫瘍免疫学的解析をした。さらに、REIC による MDSC の分化抑制に基づく抗癌免疫活性化作用の機序を解明する為の研究を実施した。Immuno-competent マウス等における癌モデル実験系を用いて、REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた抗癌免疫治療を確立するために、以下のことを明らかにした。

1) REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターの in vitro および in vivo での細胞・腫瘍増殖抑制効果を検証した。

ルシフェラーゼを恒常発現する胚細胞癌細胞株 (RENCA-Luc) を用いて同所移植モデル、肺転移モデルを作製し、REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクター及び従来型 Ad-REIC を投与したところ、従来型 Ad-REIC より制限増殖型アデノウイルスベクターの方が強く抗腫瘍効果を認めた。

2) REIC 遺伝子発現制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療および当該タンパク質の、生体内における MDSC 分化抑制作用と抗癌免疫活性化作用の機序を明らかにした。

REIC タンパク質は免疫細胞表面の Key 分子と低親和性で結合し、腫瘍局所での免疫抑制状態を誘導する Key 分子を競合阻害することが判明した。

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明らかにした。

REIC/Dkk-3 KO マウスでのベンゾピレン等を用いた自家発癌モデルを用いて、がん局所では Key 分子による免疫抑制状態が誘導されやすく、次第に免疫逃避可能ながん組織を形成することを再度確認した。

#### 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 6 件)

1.  
Li X, Xu P, Xu N, Guo K, Xu A, Takenaka F, Matsuura E, Liu C, Kumon H, Huang P.

\* Corresponding author

Synergistic effects of the immune checkpoint inhibitor CTLA-4 combined with the growth inhibitor lycorine in a mouse model of renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 in press. (査読あり)

2.  
Wang C, Wang Q, Li X, Jin Z, Xu P, Xu N, Xu A, Xu Y, Zheng S, Zheng J, Liu C, Huang P. \* Corresponding author

Lycorine induces apoptosis of bladder cancer T24 cells by inhibiting phospho-Akt and activating the intrinsic apoptotic cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):197-202. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.168.

3.  
Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, Sakaguchi M.

MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- $\kappa$ B and ROS formation upon ligand binding.

Clin Exp Metastasis. 2016 Aug;33(6):609-27. (査読あり)  
doi: 10.1007/s10585-016-9801-2.  
4.

Xu P, Xu N, Guo K, Xu A, Takenaka F, Matsuura E, Liu C, Kumon H, Huang P. \* **Corresponding author.**

Real-time monitoring of tumor progression and drug responses in a preclinical mouse model of prostate cancer.

Oncotarget. 2016 May 31;7(22):33025-34. (査読あり)  
doi: 10.18632/oncotarget.8846.

5.  
Zhang Y, Li P, Xu A, Chen J, Ma C, Sakai A, Xie L, Wang L, Na Y, Kaku H, Xu P, Jin Z, Li X, Guo K, Shen H, Zheng S, Kumon H, Liu C, Huang P. \*

**Corresponding author.**

Influence of a single-nucleotide polymorphism of the DNA mismatch repair-related gene exonuclease-1 (rs9350) with prostate cancer risk among Chinese people.

Tumour Biol. 2016 May;37(5):6653-9. (査読あり)  
doi: 10.1007/s13277-015-4298-x.

6.  
Guo K, Huang P. \* Xu N, Xu P, Kaku H, Zheng S, Xu A, Matsuura E, Liu C, Kumon H. \* **Corresponding author.**

A combination of YM-155, a small molecule survivin inhibitor, and IL-2 potently suppresses renal cell carcinoma in murine model.

Oncotarget. 2015 Aug 28;6(25):21137-47. (査読あり)  
doi: 10.18632/oncotarget.4121.

[学会発表](計 4 件)

1. Peng Huang, Naijin Xu, Eiji Matsuura, Chunxiao Liu, Masami Watanabe, Hiromi Kumon and Yasutomo Nasu.

Real-time monitoring of tumor progression and drug responses in a preclinical mouse model of prostate cancer.

International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 2016  
2016/11/14-16, seoul, Korea

2. Naijin Xu, Peng Huang, Eiji Matsuura, Chunxiao Liu, Masami Watanabe, Hiromi Kumon and Yasutomo Nasu.

Real-time monitoring of tumor progression and drug responses in a preclinical mouse model of prostate cancer.

Best of ASCO (The Singapore Society of Oncology 2016)  
2016/07/08-10, Singapore.

3.  
Peng Huang, Naijin Xu, Eiji Matsuura, Chunxiao Liu, Masami Watanabe, Hiromi Kumon and Yasutomo Nasu.

Monitoring and imaging tumor progression and tracking drug response in a preclinical mouse model.

The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy.  
2016/07/28-30, Tokyo, Japan.

4.  
Shinichi Toyooka, Ken Suzawa, Kazuhiko

Shien, Masakiyo Sakaguchi, Masami Watanabe, Peng Huang, Kei Namba, Hideo Torigoe, Hiroki Sato, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Yoho Maki, Kazunori Tsukuda, Shuta Tomida, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Shinichirou Miyoshi.  
The proof of concept of REIC/DKK-3 gene therapy for thoracic malignancies.  
Tenth AACR-JCA Joint Conference.  
2016/02/16-20, Maui. USA.

〔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〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

公文 裕巳 (KUMON. HIROMI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：30144760

那須 保友 (NASU.YASUTOMO)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20237572

渡部 昌実 (WATANABE. MASAMI)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：70444677

植木 英雄 (UEKI.HIDEO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：90537218