

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591943

研究課題名(和文)がん幹細胞をも標的とするREIC遺伝子治療の消化器がんへの応用

研究課題名(英文)Application of REIC/Dkk-3 gene therapy on gastrointestinal cancers targeting cancer stem cells

研究代表者

片岡 健(KATAOKA, Ken)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：10293317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス組織を用いてREIC/Dkk-3の発現局在の詳細なスクリーニングを行ったところ、皮膚と腸上皮組織において幹細胞のニッチとREIC/Dkk-3の局在が一致していた。また腸管上皮細胞株Caco-2を細胞外マトリクスタンパク質に包埋して3次元培養を行ったスフェロイドにおいてもREIC/Dkk-3の発現を認めた。またREIC/Dkk-3の発現制御因子を探索したところ、TNF- α が表皮ケラチノサイトのREIC/Dkk-3発現を低下させることがわかった。REIC/Dkk-3とTNF- α のバランスが発生過程や炎症における表皮ケラチノサイトと血管内皮細胞による組織構築を調整していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Detailed screening of REIC/Dkk-3 expression revealed that REIC/Dkk-3 was localized in stem cells niche of skin and intestinal epithelium. REIC/Dkk-3 expression was also observed in three-dimensional cultured Caco-2 spheroids. To identify factor(s) regulating REIC/Dkk-3 expression in keratinocytes, we screened growth factors and cytokines that were reported to be involved in keratinocyte growth and differentiation. Only TNF- α could down-regulate REIC/Dkk-3 in normal skin keratinocytes among seven factors we screened. The data suggest that expression balance of REIC/Dkk-3 and TNF- α adjust the skin tissue (re)modeling by skin keratinocytes and endothelial cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：REIC/Dkk-3 がん遺伝子治療 腸管上皮組織 皮膚組織 TNF-

1. 研究開始当初の背景

REIC/Dkk-3 は、多くのヒトがん細胞でその発現が低下しているため、がん抑制遺伝子と考えられている。この REIC/Dkk-3 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んで強制発現させると(以降 Ad-REIC と呼ぶ)、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た。この Ad-REIC の抗腫瘍効果には、がん細胞への直接的なアポトーシス誘導(直接効果)と、Ad-REIC に感染した正常細胞がサイトカイン(IL-7)を分泌しNK細胞を腫瘍に動員させる免疫システムを介した腫瘍縮小効果(間接効果)が大きく作用していた。そのため生体内(*in vivo*)では直接効果と間接効果が相乗して作用するため、Ad-REIC を1回投与するだけで劇的な抗腫瘍効果が認められた。Ad-REIC は多くのがん細胞にアポトーシスを誘導するが、膀胱がんとスキルス胃がん細胞は耐性を示した。膀胱がんでは耐性の原因を解明し、克服するためのいくつかの戦略を検討した。さらに我々は感受性細胞が Ad-REIC 抵抗性となるメカニズムを既に解明するなど、臨床治療を睨んだ基盤研究を進めてきた。これらの成果を踏まえてこの Ad-REIC を用いた「REIC 遺伝子治療」は純国産の新規治療法としてヒトへの応用が進められ、岡山大学病院では泌尿器科が中心となって臨床治験を開始した。

悪性腫瘍にも幹細胞が存在するという概念は古くからあり、実際に白血病細胞や脳腫瘍などいくつかの腫瘍では幹細胞の存在が証明されている。一方、消化器がん等の固形腫瘍における幹細胞の存在は未だに不定であるが、実際に腫瘍を形成するのはごく少数の腫瘍形成能を有する細胞集団であることは移植実験などから経験的に知られている。このような腫瘍形成細胞集団を幹細胞マーカーによって選別する試みは近年多く行われ、胃がんや大腸がんなどの消化器がんにおいても CD44、CD133 などの細胞表面マーカーが報告されている。さらに正常腸管組織の幹細胞のマーカーとして LGR-5 や Bmi-1 が発見され、陽性細胞から *in vitro* で腸管様組織(オルガノイド)を形成できることが報告された。このように、消化器がんおよび正常消化管組織の幹細胞を実験に用いることが可能になりつつある。腹膜播種転移を起こし代表的な難治性腫瘍であるスキルス胃がんは *in vitro* の実験で Ad-REIC に耐性であり、直接効果によるアポトーシスの誘導はおこらない。このスキルス胃がんの腹膜播種をターゲットとした新規治療法を開発する研究(科学研究費助成事業 基盤研究C、平成 21~23 年度、代表 片岡健)の中で、Ad-REIC によるがん幹細胞マーカー発現の変化を予備的に検討した。その結果、消化器がん幹細胞マーカーの候補である CD44 と CD133 の発現をとともに低下させることが判明した。

すなわち Ad-REIC のがん幹細胞への抑制的な制御効果が期待される。本研究ではこの「Ad-REIC のがん幹細胞制御機構」について消化器がん全般に効果があるか確認し、さらにそのメカニズムを解明することを目的とする。最終的には REIC 遺伝子治療をがん幹細胞を標的として改良し、特に転移・再発症例に対する治療法が限られている消化器がん患者治療への応用展開を目指す。

2. 研究の目的

本研究ではがん幹細胞に対する REIC 遺伝子治療の新たな効果を解明するため REIC/Dkk-3 の正常機能についての基礎研究を進め、消化器がん等への応用展開を目指す。

3. 研究の方法

(1) REIC/Dkk-3 の発現スクリーニング

REIC/Dkk-3 の正常機能の解明のため、マウス各種組織を用いて REIC/Dkk-3 タンパク質の発現とその詳細な局在をスクリーニングする。また発現を認めた組織については、初代培養細胞や3次元培養スフェロイドを用いてその発現について、詳細な検討を行う。

(2) REIC/Dkk-3 発現制御因子の探索

正常組織における REIC/Dkk-3 の発現を制御する因子については、未だ不明である。そのため REIC/Dkk-3 の強い発現を認めた正常表皮ケラチノサイトを用いて、皮膚組織の増殖や分化関与しているとの報告がある因子を対象にスクリーニングする。

4. 研究成果

マウス組織を用いて遺伝子治療のターゲットである REIC/Dkk-3 の発現局在の詳細なスクリーニングを行った。様々な上皮組織での発現が認められたが、特に皮膚と腸上皮組織において幹細胞のニッチと REIC/Dkk-3 の局在が一致していた。すなわち皮膚においては幹細胞の存在が確認されているバルジ領域周辺、腸管においても幹細胞の存在が示唆されているクリプト周囲の細胞に強い発現を認めた。腸管上皮細胞株 Caco-2 を細胞外マトリクスタンパク質に包埋して3次元培養を行ったスフェロイドにおいても REIC/Dkk-3 の発現を認めたが、スフェロイド形成時に用いるマトリクスタンパク質を変えても発現そのものに影響はなかった。

また REIC/Dkk-3 の発現制御因子の探索については、皮膚組織の増殖や分化関与しているとの報告がある因子を対象にスクリーニングしたところ、TNF- α が表皮ケラチノサイトの REIC/Dkk-3 発現を低下させることがわ

かった。この TNF- による REIC/Dkk-3 の発現調節は表皮のみで、腸管組織などでは認めなかった。

TNF- により表皮ケラチノサイトの増殖が促進するとともにアポトーシスなどの細胞死は抑制され、結果的に細胞数が増加する。一方で毛細血管を構成する血管内皮細胞の運動性に影響を認めることから、REIC/Dkk-3 と TNF- のバランスが発生過程や炎症における表皮ケラチノサイトと血管内皮細胞による組織構築を調整していることが示唆された。

今後は皮膚等の上皮組織の再生において REIC/Dkk-3 と TNF- がどのように連携して組織形成を調節しているかについて、詳細な検討を進める方針である。

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)

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH: DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes. *J Biol Chem* (2014) 289, 23389-23402 (査読有)

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH: SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. *Mol Biol Cell* (2013) 24, 2772-2784

Putranto EW, Murata H, Yamamoto KI, Kataoka K, Yamada H, Futami J, Sakaguchi M, Huh NH Inhibition of RAGE signaling by intracellularly delivered-inhibitor peptides using PEI-cationization. *Int J Mol Med* (2013) 32, 938-944 (査読有)

Ohashi M, Oyama T, Putranto EW, Waku T, Nobusada H, Kataoka K, Matsuno K, Yashiro M, Morikawa K, Huh NH, Miyachi H: Design, synthesis and in vitro apoptotic activity of a series of -benzyl phenylpropanoic acid-type peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma partial agonists with improved aqueous solubility. *Bioorg Med Chem* (2013) 21, 2319-2332 (査読有)

Yamamoto KI, Murata H, Putranto EW,

Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH: DOCK7 is a critical regulator of RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep* (2013) 29, 1073-1079 (査読有)

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* (2012) 37, 428-431 (査読有)

Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto KI, Sakaguchi M, Huh NH: S100A7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett* (2012) 3, 1149-1153 (査読有)

[学会発表](計7件)

綾部雄基、鶴田太輝、阪口政清、片岡健: TNF- による REIC/Dkk-3 の表皮細胞における発現制御と増殖・分化の関係. 第9回日本臨床検査学教育学会学術学会(2014年8月21日、東京)

Kataoka K, Kohara A, Enosawa S: Program for cell culturists and the instructors for cell culturing organized by the JTCA education & research committee. 日本組織培養学会第87回大会(2014年5月30日、東京)

中西徹、野村照代、片岡健: iPS細胞(人工多能性幹細胞)を用いた新しい理科教育の試み 最新科学の体験と理系志望の動機付け. 日本理科教育学会第63回全国大会(2013年8月10日、札幌)

Furue-Kusuda M, Tsutsui T, Kataoka K: Professional training for cell culture "Programs for beginners to experts" 日本組織培養学会第86回大会(2013年5月31日、つくば)

Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH: TRAF6 Ubiquitinates and Stabilizes PINK1 on Damaged Mitochondria Through Interaction with SARM1. 第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11-14日、福岡)

阪口政清、日比野利彦、村田等、井上裕介、山本健一、片岡健、許南浩: S100A8およびS100A9タンパク質の新規受容体の探索とそのがん進展における役割. 第71回日本癌学会学術総会(2012年9月19-21日、札幌)

Putranto Endy Widya, 村田等、山本健一、片岡健、二見淳一郎、山田秀徳、阪口政清、許南浩: 細胞内導入型 RAGE 阻害剤の開発. 日本組織培養学会第85回大会(2012年5月18日、京都)

〔図書〕(計1件)

片岡 健 他、日本組織培養学会編「細胞培養実習テキスト」出版社 じほう、発行 2013年3月30日(執筆・編集委員として参加)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dls.ous.ac.jp/staff/kataoka/saito/TOP.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 健 (KATAOKA, Ken)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：10293317

(2)研究分担者

阪口 政清 (SAKAGUCHI, Masakiyo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70379840

村田 等 (MURATA, Hitoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90579096