

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670627

研究課題名(和文) REIC遺伝子治療による非小細胞肺癌新規治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for non-small cell lung cancer by REIC gene therapy

研究代表者

豊岡 伸一 (Toyooka, Shinichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30397880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：REICはヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が減弱する遺伝子であり、種々のがん細胞で発現が低下している。がん細胞にREIC遺伝子を過剰発現させると、がん細胞に小胞体ストレスによるアポトーシスが誘導されることが認められるが、一方で正常細胞にREIC遺伝子を過剰発現させても傷害を与えないことがわかっている。著者らは基礎実験により非小細胞肺癌・悪性胸膜中皮腫細胞におけるREIC遺伝子発現アデノウイルスベクター(Ad-REIC)の抗腫瘍効果を確認した。また、肺癌および悪性胸膜中皮腫同種移植モデルでの実験で、REICの腫瘍に対する直接効果のみならず、免疫系を介した間接効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：REIC is down-regulated in many human cancer cells and is considered to function as a tumor suppressor. REIC-expressing adenovirus vector (Ad-REIC) induces endoplasmic reticulum (ER) stress and cancer-specific apoptosis in human cancers. We examined the therapeutic impact of Ad-REIC on non-small cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma. We examined the direct anti-tumor effect of Ad-REIC gene therapy on non-small cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma cell lines in vitro, and the distant bystander effect using immunocompetent mouse allograft models with bilateral flank tumors. Ad-REIC treatment showed antitumor effect in many lung cancer and malignant pleural mesothelioma cell lines in vitro. In an in vivo model, Ad-REIC treatment inhibited the growth not only of directly treated tumors but also distant untreated tumors. Ad-REIC treatment not only had a direct antitumor effect but also an indirect bystander effect through stimulation of the immune system.

研究分野：呼吸器外科学・分子腫瘍学

キーワード：REIC遺伝子 非小細胞肺癌 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦の癌死因の第一位を占める予後不良な疾患である。ヒト上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 変異や *ALK* 融合遺伝子等の遺伝子変異が報告され、これらの変異を標的とした多くの新しい治療法が開発され、その有効性が報告されつつある。しかし、非小細胞肺癌の約 60-70%を占める上記遺伝子変異を有さない肺癌の治療法には大きな進歩がなく、*EGFR* 変異肺癌、*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌においても各阻害剤に対する薬剤耐性化が大きな問題となっている。

*REIC* 遺伝子はヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が減弱する遺伝子で、悪性腫瘍でその発現が低下している。*REIC* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-REIC) による *REIC* 強制発現は、癌細胞における小胞体ストレスを惹起しアポトーシスを誘導する直接効果 (Abarzua et al Cancer Res 2005, Kashiwakura et al Cancer Res 2008) と、NK 細胞、さらには樹状様細胞の活性化による抗腫瘍免疫賦活化効果 (間接効果) (Sakaguchi et al J Biol Chem 2009, Watanabe et al Int J Oncol 2009) を主体とした抗腫瘍効果を示すことが知られている。当時当施設では、前立腺癌患者に対して Ad-REIC 治療の臨床研究が進行中であった。申請者は肺癌に対する Ad-REIC の効果を検討し、Ad-REIC が *EGFR* 遺伝子変異等の特定の遺伝子変化の有無にかかわらず肺癌に効果を認めること、さらに、これらの治療効果が GRP78 および CAR の発現状態に関連しているという新しい知見を得ており (図 1)、これらが Ad-REIC の治療効果を推測する新たな分子マーカーとして活用できる可能性を見出した。以上を踏まえ、本研究では、非小細胞肺癌に対する Ad-REIC 治療の臨床応用を目指し、その効果機序の更なる解明、動物モデルでの間接効果の腫瘍免疫学的見地からの検討を行った。

Ad-REIC感受性	高感受性群(着効群)				低感受性群			
肺癌細胞株	H157 (Sq) H838 (Ad) H2087 (Ad) HCC4006 (AD) HCC927 -GR-hlg2 (AD) A849 (AD) H1299 (LC) H2009 (AD) HCC4011 (AD) H822 (AD) H861 (LC) H2228 (AD) HCC927 (AD) H441 (AD) HCC15 (SQ) PC-9 (AD) RPC-9 (AD) H1819 (AD) H3285 (AD) H388 (AD) H460 (LC) H1975 (AD) H1993 (AD) H2170 (SQ) HCC386 (ADSQ)							
カテゴリー	A		B		C			
GRP78蛋白発現	低		高		低		高	
CAR蛋白発現	高	低	高	低	高	低	高	低

図 1. Ad-REIC 治療効果予測マーカー候補の同定

GRP78 低発現-CAR 高発現群 (カテゴリー A) で Ad-REIC 治療効果が高く、GRP78 高発現-CAR 低発現群 (カテゴリー C) で治療効果が低い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非小細胞肺癌に対する Ad-REIC 治療の臨床応用を目指し、その効果機序を更に解明し、動物モデルでの間接効果の検討を行うことであった。

3. 研究の方法

(1) Ad-REIC の直接作用機序である小胞体ストレスを介したアポトーシス誘導に関与する分子と GRP78 の関連について解析し、GRP78 が Ad-REIC 治療の効果予測マーカーとなる理論的根拠を明確にする。

(2) *REIC* 治療により抗腫瘍効果が認められた肺癌細胞株を用いたマウス異種移植モデルにより、Ad-REIC の抗腫瘍効果を検討する。

(3) マウスの皮下腫瘍異所性腫瘍モデルを用いて、皮下腫瘍内投与による Ad-REIC の直接的・間接的抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) Ad-REIC 治療により非小細胞肺癌細胞株においてアポトーシスが誘導されることが確認された (図 2)。 *REIC* 発現の上昇が認められ、JNK のリン酸化の誘導と GRP78 の発現上昇が認められた (図 3)。 Ad-REIC に耐性を示す肺癌細胞株においても、MOI を増加することにより同様の現象が得られた (図 4)。

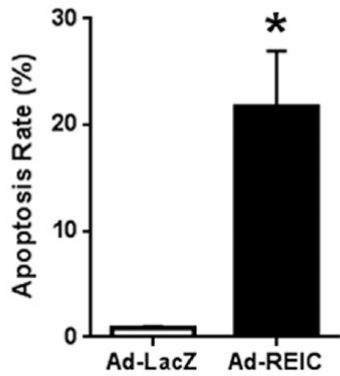
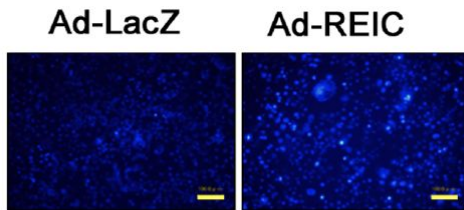


図2. 肺癌細胞株を用いた実験で、Ad-REIC 治療によりアポトーシスが著明に誘導された(Shien et al PLoS One 2014 より引用)。

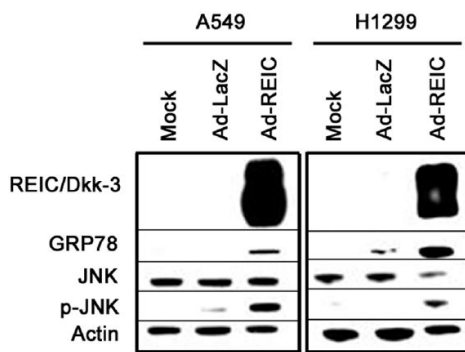


図3. 肺癌細胞株 A549 および H1299 により、REIC 発現の上昇が認められ、JNK のリン酸化の誘導と GRP78 の発現上昇が認められた(Shien et al PLoS One 2014 より引用)。

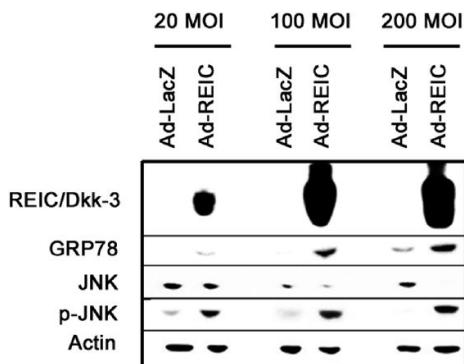


図4. 肺癌細胞株 H460 は Ad-REIC に耐性を示すが、MOI を増加させることにより同様の結果が得られた(Shien et al PLoS One 2014 より引用)。

(2) REIC 治療により抗腫瘍効果が認められた肺癌細胞株を用いたマウス異種移植モデルを作成し、Ad-REIC の抗腫瘍効果を検討したところ、Ad-REIC 投与により腫瘍増殖が抑制された(図5)。

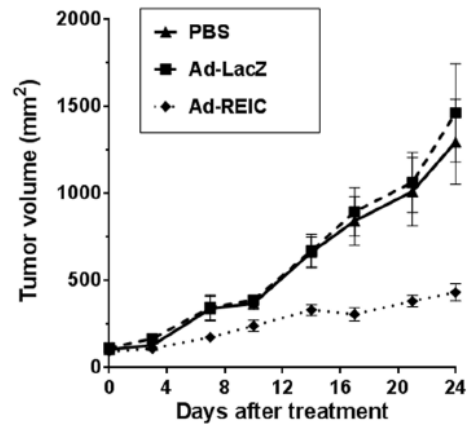


図5. 肺癌細胞株 A549 を用いてマウス異種移植モデルを作成し、Ad-REIC を投与した。Ad-REIC 投与群では明らかに腫瘍増殖が抑制されている(Shien et al PLoS One 2014 より引用)。

(3) マウスの腫瘍細胞株により同種移植モデルを作成し、皮下腫瘍内投与による Ad-REIC の直接的・間接的抗腫瘍効果を検討したところ、REIC 投与により直接 REIC を投与されていない腫瘍にも抗腫瘍効果を認めた(図6, 7)。

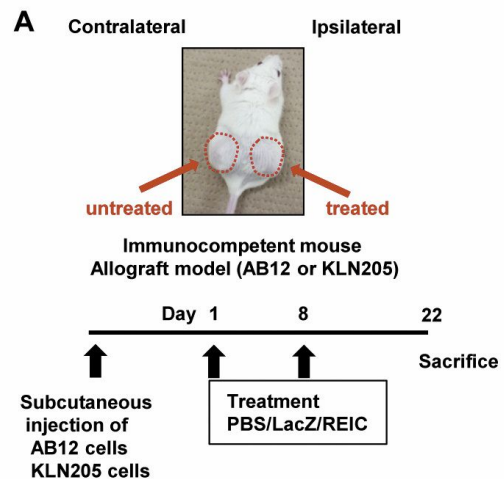


図6. 皮下腫瘍を作成後、Ad-REIC を腫瘍に直接投与する概要 (Suzawa et al Anticancer Res 2017 より引用)。

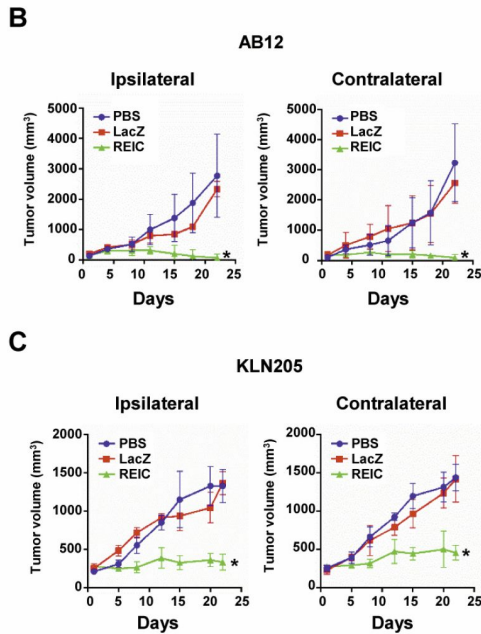


図 7. REIC 投与後の腫瘍の増殖曲線 (Suzawa et al Anticancer Res 2017 より引用)。

#### 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 2 件)

Suzawa K, Shien K, Peng H, Sakaguchi M, Watanabe M, Hashida S, Maki Y, Yamamoto H, Tomida S, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Kumon H, Miyoshi S, Toyooka S. Distant Bystander Effect of REIC/DKK3 Gene Therapy Through Immune System Stimulation in Thoracic Malignancies. Anticancer Res 2017;37:301-307. <http://ar.iiarjournals.org/content/37/1/301.long> (査読有)

Shien K, Tanaka N, Watanabe M, Soh J, Sakaguchi M, Matsuo K, Yamamoto H, Furukawa M, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Huh NH, Miyoshi S, Kumon H, Toyooka S. Anti-Cancer Effects of REIC/Dkk-3-encoding Adenoviral Vector for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer. PLoS One 2014;9: e87900. doi: 10.1371/journal.pone.0087900.

(査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

山本寛齋、諏澤憲、枝園和彦、牧佑歩、宗 淳二、杉本誠一郎、山根正修、大藤剛宏、公文裕巳、三好新一郎、豊岡伸一. 悪性胸膜中皮腫に対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会 2016 年 9 月 30 日 岡山.  
豊岡伸一、諏澤憲、枝園和彦、牧佑歩、山本寛齋、宗 淳二、杉本誠一郎、山根正修、大藤剛宏、公文裕巳、三好新一郎. 胸部悪性腫瘍に対する REIC 遺伝子治療. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016 年 4 月 15 日 大阪

Shinichi Toyooka, Ken Suzawa, Kazuhiko Shien, Masakiyo Sakaguchi, Masami Watanabe, Peng Huang, Kei Namba, Hidejiro Torigoe, Hiroki Sato, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Yuho Maki, Kazunori Tsukuda, Shuta Tomida, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Shinichiro Miyoshi. The proof of concept of REIC/Dkk-3 gene therapy for thoracic malignancies. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016 年 2 月 18 日 米国  
山本寛齋、枝園和彦、牧佑歩、大谷真二、三好健太郎、杉本誠一郎、山根正修、大藤剛宏、渡部昌実、那須保友、公文裕巳、三好新一郎、豊岡伸一. 悪性胸膜中皮腫に対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療. 第 56 回日本肺癌学会学術集会 2015 年 11 月 26 日 横浜

Ken Suzawa, Kazuhiko Shien, Masakiyo Sakaguchi, Masami Watanabe, Shinsuke Hashida, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Yuho Maki, Kazunori Tsukuda, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Shinichiro Miyoshi, Shinichi Toyooka. Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy shows indirect antitumor effects on thoracic malignancies. 第 74 回日本癌学会学術集会. 2015 年 10 月 9 日 名古屋.

Ken Suzawa, Kazuhiko Shien, Peng Huang, Masakiyo Sakaguchi, Mototsugu Watanabe, Shinsuke Hashida, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Yuho Maki, Hiroaki Asano, Kazunori Tsukuda, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Shinichiro Miyoshi, Shinichi Toyooka. Distant bystander effect of REIC/Dkk-3 gene therapy through immune system stimulation in a murine model of thoracic malignancies. 16th World Conference on Lung Cancer. 2015 年 9 月 8 日 米国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊岡 伸一 (TOYOOKA, Shinichi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30397880

### (2) 研究分担者

宗 淳一 (SOH, Junichi)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：90559890

山本 寛斉 (YAMAMOTO, Hiromasa)  
岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号：40467733