

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09001

研究課題名(和文) 消化器癌における新規癌関連遺伝子REICの機能解析と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) The analysis of the function and the clinical application of REIC/ Dkk-3 gene in digestive organ cancer

研究代表者

加藤 博也 (Kato, Hironari)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60619039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌、胆道癌の細胞株における実験で、REIC遺伝子の導入による癌細胞特異的なアポトーシスが誘導されることが証明された。また肝細胞癌手術検体を用いた免疫組織染色では、癌部でのREIC発現が低下していることが証明された。膵癌細胞株にヒトPBMCとREIC蛋白を加えることで、PBMCの樹状細胞への分化誘導を促進し、CTLの活性化を介した腫瘍免疫誘導効果をもたらすことが証明された。これらの結果をもとに、肝癌に対するREIC遺伝子導入治療の医師主導治験が開始された。

研究成果の概要(英文)：The reduced expression in immortalized cells REIC/the dickkopf 3 (Dkk-3) gene induced cancer selective apoptosis in cell lines of hepatocellular carcinoma and cholangio cell carcinoma. REIC/Dkk 3 expression was decreased in resected HCC tissues by immunohistochemical staining. The REIC/DKK3 protein and peripheral blood mononuclear cells synergistically enhanced anticancer immunological effects against pancreatic cancer cells. The clinical trial of REIC/DKK3 gene therapy for the patients with hepatocellular carcinoma started.

研究分野：消化器内科学

キーワード：遺伝子治療 REIC DKK3

#### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌は、本邦における癌死亡原因の半数以上を占め、有効な治療法の開発は急務となっている。REIC(reduced expression in immortalized cell)遺伝子は、当該施設において独自に単離・同定された癌関連遺伝子であり、種々の固形癌においてその発現が遺伝子レベル、蛋白レベルで低下している。本施設の研究により膵癌に対する REIC 遺伝子導入治療による抗腫瘍効果が基礎実験において証明されている(Uchida D et al, J Gastroenterol Hepatol 29(5):973-83, 2014)。

さらに導入効率を大幅に改善した新型アデノウイルスベクター(Ad-SGE-REIC)が開発され(Watanabe M et al, Oncol Rep 31(3):1089-95, 2014)、さらなる抗腫瘍効果が期待される。

また癌細胞のアポトーシスのみならず、正常細胞から分泌された REIC 蛋白が樹状細胞を活性化し、キラーT細胞を誘導することによる抗腫瘍効果を示す可能性が報告されており(Watanabe M et al, Oncol Lett 7(3):595-601, 2014)、局所のみならず、遠隔病変にも効果を示す可能性が指摘されていた。

#### 2. 研究の目的

癌治療遺伝子 REIC の難治性消化器癌における抗腫瘍効果を証明し、遺伝子治療の標的分子となり得るかどうかを明らかにし、臨床応用可能な治療法を開発する為の基盤を確立する。主に下記の項目について検証することを目的とした。

REIC の消化器癌における機能

新型アデノウイルスベクター Ad-SGE-REIC を用いた抗腫瘍効果の検討

REIC 蛋白を介した腫瘍免疫誘導効果の検討

臨床応用に向けての pre-clinical study

#### 3. 研究の方法

REIC の消化器癌における機能：各種消化器癌における REIC 発現を、培養細胞による Western Blotting、臨床検体の免疫組織染色によって評価する。

新型アデノウイルスベクター Ad-SGE-REIC を用いた抗腫瘍効果の検討：Ad-SGE-REIC による導入効率を従来のベクターと比較するため、癌細胞株に遺伝子導入を行い、発現強度を Western blotting で解析する。さらに導入によるアポトーシス誘導能を比較、評価する。

REIC 蛋白を介した腫瘍免疫誘導効果の検討：癌細胞と PBMC を共培養し、REIC 蛋白投与による免疫効果誘導能を

検証する。

臨床応用に向けての pre-clinical study：癌細胞移植マウスモデルを用いて Ad-SGE-REIC の抗腫瘍効果、REIC 蛋白投与による腫瘍免疫誘導能を検証する。

#### 4. 研究成果

REIC の消化器癌における機能：肝細胞癌、胆道癌における実験においても、他癌腫と同様、c-Jun N-terminal kinase pathway を介した ER stress 誘発による癌細胞特異的なアポトーシスが誘導されることが Western blot によって証明された。また肝細胞癌手術検体を用いた免疫組織染色では、癌部での REIC 発現が低下していることが証明された。

新型アデノウイルスベクター Ad-SGE-REIC を用いた抗腫瘍効果の検討：従来のベクターと比較し、新型ベクターによる導入効率は大幅に改善し、よりアポトーシス効果が増強されることが証明された(Sawahara H et al, Cancer Gene Ther 23(8): 278-83, 2016)。また肝癌細胞株を用いた実験においても、膵癌同様に REIC 遺伝子導入によるアポトーシス誘導効果を認めた(Sawahara H et al, J Gastroenterol Hepatol 32(10):1769-77, 2017)。

REIC 蛋白を介した腫瘍免疫誘導効果の検討：膵癌細胞株にヒト PBMC と REIC 蛋白を加えることで、PBMC の樹状細胞への分化誘導を促進し、CTL の活性化を介した腫瘍免疫誘導効果をもたらすことが in vitro、in vivo 実験によって証明された(Uchida D et al, J Gastroenterol Hepatol 31(6): 1154-9, 2017)。

臨床応用に向けての pre-clinical study：前述のように新型ベクターの有用性、REIC 蛋白による腫瘍免疫誘導効果を動物モデルによって証明した。これらのデータをもとに、肝癌に対する REIC 遺伝子導入治療の医師主導治験が、岡山大学病院において 2017 年度から開始されている。

#### 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3件)

Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Sakaguchi M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Kumon H, Okada H: Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent

for pancreatic cancer. Cancer Gene Therapy. 2016 Aug;23(8):278-83. 査読有

Uchida D, Shiraha H, Kato H, Sawahara H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Kumon H, Yamamoto K: Synergistic anti-pancreatic cancer immunological effects by treatment with reduced expression in immortalized cells/dickkopf-3 protein and peripheral blood mononuclear cells: Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2016 Jun;31(6):1154-9. 査読有

Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Kato R, Oyama A, Nagahara T, Iwamuro M, Horiguchi S, Tsutsumi K, Mandai M, Mimura T, Wada N, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Nakamura S, Watanabe M, Sakaguchi M, Takaki A, Nouse K, Yagi T, Nasu Y, Kumon H, Okada H: Promising therapeutic efficacy of a novel reduced expression in immortalized cells/dickkopf-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma: Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2017 Oct;32(10):1769-77. 査読有

〔学会発表〕(計10件)

澤原大明、REIC/Dkk-3遺伝子導入による肝細胞癌治療の検討、第101回日本消化器病学会総会、2015/4/24、仙台

Sawahara H, Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 inhibits cell growth and induces apoptosis in pancreatic cancer and hepatocellular carcinoma, DDW2015, 2015/5/19, Washington DC

澤原大明、REIC/Dkk-3遺伝子導入による肝細胞癌治療の検討、第41回日本肝臓学会西部会2015/12/3、名古屋

Uchida D, Development of a novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral agent: its robust and promising therapeutic effects in pancreatic cancer, DDW2016, 2016/5/21, San Diego

内田大輔、Development of a novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral agent for the treatment of pancreatic cancer、第20

回国際膵臓学会、2016/8/6、仙台

内田大輔、難治性消化器癌に対する革新的遺伝子治療の開発～研究室から医師主導治療へ～、第106回日本消化器病学会中国支部例会、2016/11/12、岡山

大山淳史、難治性肝細胞癌に対するREIC/Dkk-3を用いた遺伝子治療、第53回肝臓学会総会、2017/6/8、広島

大山淳史、肝癌に対するREIC/DKK-3遺伝子治療、第16回日本肝がん分子標的研究会、2017/6/24、徳島

Oyama A, REIC/DKK-3 protein concentration induce the positive effect to the mortality of hepatocellular carcinoma, UEG week 25th, 2017/11/30, Barcelona

Sawahara H, Innovative therapeutic efficacy of a novel REIC/Dkk-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma, UEG week 25th, 2017/11/30, Barcelona

〔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

加藤 博也 (KATO Hironari)  
岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号：60619039

(2)研究分担者

内田 大輔 (UCHIDA Daisuke)  
岡山大学・大学病院・医員  
研究者番号：50749215

白羽 英則 (SHIRAHA Hidenori)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：40379748

那須 保友 (NASU Yasutomo)  
岡山大学・医歯薬総合研究科・教授  
研究者番号：20237572

堤 康一郎 (TSUTSUMI Koichiro)  
岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号：40610910

松下 浩志 (MATSUSHITA Hiroshi)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：20786107

岩室 雅也 (IWAMURO Masaya)  
岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号：30645403

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )