

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11138

研究課題名(和文) 前立腺癌幹細胞を標的とした新規遺伝子治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new gene therapy strategy for prostate cancer stem cells

研究代表者

黄 鵬 (HUANG, PENG)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究准教授

研究者番号：00610841

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)：本研究では、独立開発したREIC遺伝子ベクター及び前立腺癌のがん幹細胞を用いて、オートファジー誘導の際のどのような細胞内シグナルが癌幹細胞の静止期維持機構の構築に關与するかを明らかにし、癌幹細胞に標的分子基盤を解明した。今回の成果は、REIC/Dkk-3遺伝子を基盤シードとする日本発の癌幹細胞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、小胞体ストレス応答より新規オートファジー誘導遺伝子治療の展開基盤になるものと判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の申請研究による成果は、REIC/Dkk-3遺伝子を基盤シードとする日本発の癌幹細胞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、小胞体ストレス応答より新規オートファジー誘導遺伝子治療の展開基盤になるものと判断された。

研究成果の概要(英文)：In this study, using an independently developed REIC gene vector and prostate cancer cancer stem cells, we clarified what kind of intracellular signal during autophagy induction is involved in the construction of the stationary phase maintenance of cancer stem cells, and elucidated the molecular basis for targeting cancer stem cells. The results of this study are to strengthen the foundation for the creation of cancer stem cell-targeted therapies based on REIC / Dkk-3 gene seeds in Japan, and to correspond to endoplasmic reticulum stress responses not only to urological cancer but also to many refractory solid tumors. We determined that this would be the basis for the development of a new autophagy-induced gene therapy.

研究分野：がん遺伝子治療

キーワード：前立腺がん 癌幹細胞 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞の存在が提唱され、幹細胞が治療抵抗性を示すことから新しいがん治療の標的として注目されている。すなわち転移を制御する治療のストラテジーにおいてがん幹細胞の治療標的にすることが中心課題となっている。

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 REIC/Dkk-3 は、前立腺癌に対する 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、アデノウイルスを用いて強制発現させると小胞体ストレス応答 (図の左) に基づき癌特異的にアポトーシスが誘導されること (Cancer Res, 65:9617, 2005, Cancer Res, 68:8333, 2008) より、癌治療における新規標的としての期待が高い。現在、申請者らによって新規の癌遺伝子治療「癌治療遺伝子 REIC/DKK-3 を用いた前立腺癌に対する in-situ 遺伝子治療」の臨床研究が実施され、癌細胞の選択的アポトーシスと抗ガン免疫の活性化による相乗的効果増強作用が誘導されることが実証されている。

一方で、申請者らの研究より、本学で従来使用している前立腺がん細胞株 RM9 のルシフェラーゼ恒常発現株を基盤に、新たに前立腺がんマーカー PSA を恒常発現する遺伝子組換え細胞「RM9-Luc-PSA 細胞」を樹立した。その結果、「RM9-Luc-PSA 細胞」を用いて様々な担癌マウスモデルがモニタリング可能となった (Oncotarget, 7:33025, 2016)。さらに、マウス iPS 細胞に特定因子を導入することで、マウス前立腺癌がん幹細胞の誘導に成功した。これらの学術的背景に加えて、マウス iPS 細胞由来のマウス前立腺癌がん幹細胞を用いた最近の研究より、REIC/DKK-3 遺伝子導入によるオートファジーが誘導することが実証された (未発表データ)。これらの実験結果は、癌幹細胞静止期維持機構の構築および分子基盤を解析することが、難治性前立腺癌に対するがん幹細胞を標的する新規オートファジー誘導遺伝子治療法の創成基盤の確立につながることを示唆している。

2 . 研究の目的

癌の研究開発において、癌幹細胞を標的する新規治療法の開発は重要な中心課題となっている。申請者らによって新規遺伝子治療「癌治療遺伝子 REIC/DKK-3 を用いた前立腺癌に対する in-situ 遺伝子治療」の臨床研究が実施され、PSA 低下を伴う抗腫瘍効果及び自己癌ワクチン化作用が誘導されることが実証されており、また、最近、申請者らは前立腺癌幹細胞に対する REIC/DKK-3 遺伝子導入によるオートファジーが誘導されることを確認した。本申請研究では、独立開発した REIC 遺伝子ベクター及び前立腺癌のがん幹細胞を用いて、オートファジー誘導の際のどのような細胞内シグナルが癌幹細胞の静止期維持機構の構築に関与するかを明らかにし、癌幹細胞に標的な分子基盤を解明する。さらに、遺伝子治療におけるオートファジー細胞死の誘導の最適化の観点から、難治性前立腺癌に対するがん幹細胞を標的とする新規オートファジー誘導遺伝子治療法の創成基盤の確立を目指す。

3 . 研究の方法

本研究は、「REIC/Dkk-3 遺伝子より癌幹細胞に標的する新規オートファジー誘導遺伝子治療およびメカニズムの解明」をする in vitro 研究と、「がん幹細胞を標的する新規オートファジー誘導遺伝子治療法での最適化」に関する in vivo 研究から成る。この二つの結果を有効的にリンクすることにより、初年度、すなわち in vivo での癌幹細胞マウスモデル治療実験での解析結果に基づき、in vitro 研究で外来性 REIC/DKK3 遺伝子からの小胞体ストレス応答により、オートファジー誘導の際のどのような細胞内シグナルが癌幹細胞静止期維持機構の構築に関与するかを明らかにした。二年目以後には、基盤的な研究として癌幹細胞マウスモデルに対する REIC/DKK3 遺伝子の有効性検証した。さらに、遺伝子治療におけるオートファジー細胞死の誘導の最適化の観点から、難治性前立腺癌に対するがん幹細胞を標的する新規オートファジー誘導遺伝子治療法の創成基盤を実施した。

4 . 研究成果

— がん幹細胞におけるREIC遺伝子ベクターの抗癌作用の機序を解明、その有効性を検証について、

マウス ips 細胞の培地過程中にはマウス前立腺癌細胞 RM-9 の培養上清と正常 ips 培地 1 : 1 混合し、35 日間培養することにより、マウス前立腺癌幹細胞を樹立した。さらに、新規樹立した幹細胞の遺伝子発現性や腫瘍形成性の解析を行った。新規前立腺癌幹細胞を用いた REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターの *in vitro* および *in vivo* での細胞・腫瘍増殖抑制効果の観点から解析した。さらに、Ad-REIC の抗癌作用に基づく小胞体ストレス応答に関する機序を解明し、その有効性を検証した。

外源性 REIC より小胞体ストレス応答に基づきの分子動態を解明、その key 分子の検証について、

㊦人工作成したマウス前立腺癌幹細胞に REIC/Dkk-3 遺伝子ベクターを作用させ、1分、30分、1時間、6時間、24時間後細胞内タンパク質を抽出し、または特異的 siRNA によりノックダウンさせ、遺伝子-タンパク質発現変動をマイクロアレイやタンパク質抗体アレイ等により解析した。また、Western blot 法によりERストレスおよびCa²⁺ シグナリングパスウェイ内の各種タンパク質(ATF6, IRE1, XBP1, ATF4, EIF2, Bip) およびそのリン酸化の動態を解析した。

㊧ 上記㊦のそれぞれの実験状態において細胞核内の標的遺伝子群(転写されるタンパク質群)の同定を行い、REIC/Dkk-3 の癌幹細胞の細胞膜上での結合分子・受容体の同定を試みた。㊦㊧併せて、細胞内シグナルが癌幹細胞静止期維持機構の構築に関わる知見を解明した。

がん幹細胞を標的する新規オートファジー誘導遺伝子治療法での最適化について、

外源性 REIC より小胞体ストレス応答に基づく癌幹細胞に標的治療のメカニズムの一端を解明するため、癌幹細胞マウスモデルに対する REIC/DKK3 遺伝子の有効性を検証した。さらに、我々の確立した REIC/Dkk-3 ノックアウト (KO) マウスを用いた実験系では、生体内の内在性・機能的 REIC/Dkk-3 タンパク質の影響を回避することが可能となり、以下の研究を行った。

⑦ REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターの *in vivo* でのオートファジー誘導腫瘍増殖抑制効果の解析では、GFP と PSA を恒常発現する前立腺癌幹細胞株 (mice ips-RM-9)) を用いて同所移植モデル、肺転移モデル等を作製し、REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを投与した場合の全身の転移に対するオートファジー誘導され治療効果を解析した、さらに、REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて治療を行った腫瘍内における抗癌免疫担当細胞の出現動態、特に抗癌免疫に強く関わりとされる、MDSC、樹状細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、制御性 T リンパ球、ヘルパー T リンパ球、ナチュラルキラー (NK) 細胞等の細胞について、それぞれの細胞表面マーカーに基づき免疫組織学的に解析した。特に当該治療効果については、*in vitro* 検証した key 分子に関する検証した。

⑧ REIC/Dkk-3 KO マウスを用いた生体内での小胞体ストレス応答の機序・免疫抑制作用の解明では、REIC/Dkk-3 KO マウスを用いて、GFP と PSA を恒常発現する前立腺癌幹細胞株より同所移植モデル、肺転移モデル等を作製し、REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍内局所または全身投与した場合の、腫瘍内・骨髄・全身での小胞体ストレス応答よりオートファジー誘導遺伝子治療を含む種々の癌免疫担当細胞の出現動態を解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Xie Jinlin, Lin Wenfeng, Huang Linglong, Xu Naijin, Xu Abai, Chen Binshen, Watanabe Masami, Liu Chunxiao, Huang Peng	4. 巻 16
2. 論文標題 Bufalin suppresses the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3867-3873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Xu N, Li X, Watanabe M, Ueki H, Hu H, Li N, Araki M, Wada K, Xu A, Liu C, Nasu Y, Huang P	4. 巻 8
2. 論文標題 Induction of cells with prostate cancer stem-like properties from mouse induced pluripotent stem cells via conditioned medium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1624-1632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lin Wenfeng, Xie Jinlin, Xu Naijin, Huang Linglong, Xu Abai, Li Hulin, Li Chaoming, Gao Yubo, Watanabe Masami, Liu Chunxiao, Huang Peng	4. 巻 14
2. 論文標題 Glucocalyxin A induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in human bladder cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 418 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijbs.23602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naijin Xu, Linglong Huang, Xiezhao Li, Masami Watanabe, Chaoming Li, Abai Xu, Chunxiao Liu, Qiang Li, Motoo Araki, Koichiro Wada, Yasutomo Nasu, Peng Huang	4. 巻 15
2. 論文標題 The Novel Combination of Nitroxoline and PD-1 Blockade, Exerts a Potent Antitumor Effect in a Mouse Model of Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 919-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijbs.32259	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Xiezhao, Xu Peng, Wang Chongshan, Xu Naijin, Xu Abai, Xu Yawen, Sadahira Takuya, Araki Motoo, Wada Koichiro, Matsuura Eiji, Watanabe Masami, Zheng Junxia, Sun Pinghua, Huang Peng, Nasu Yasutomo, Liu Chunxiao	4. 巻 8
2. 論文標題 Synergistic effects of the immune checkpoint inhibitor CTLA-4 combined with the growth inhibitor lycorine in a mouse model of renal cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 21177-21186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.15505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Xu Jiaqi, Sadahira Takuya, Kinoshita Rie, Li ShunAi, Huang Peng, Wada Koichiro, Araki Motoo, Ochiai Kazuhiko, Noguchi Hirofumi, Sakaguchi Masakiyo, Nasu Yasutomo, Watanabe Masami	4. 巻 14
2. 論文標題 Exogenous DKK-3/REIC inhibits Wnt/ -catenin signaling and cell proliferation in human kidney cancer KPK1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5638-5642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Peng Zhou, Qiongren Wang, Chongshan Wang, Xiezhao Li, Wei Du, Chunxiao Liu, Masami Watanabe, Peng Huang, Abai Xu	4. 巻 10
2. 論文標題 Programmed death ligand 1 expression in bladder rhabdomyosarcoma and its association with clinicopathological features	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 10565-10570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lin Wenfeng, Xie Jinlin, Xu Naijin, Huang Linglong, Xu Abai, Li Hulin, Li Chaoming, Gao Yubo, Watanabe Masami, Liu Chunxiao, Huang Peng	4. 巻 14
2. 論文標題 Glucocalyxin A induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in human bladder cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 418 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijbs.23602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Peng Huang, Peng Xu, Naijin Xu, Xiezhao Li, Masami Watanabe, Chunxiao Liu and Yasutomo Nasu
2. 発表標題 Monitoring preclinical cancer models: Multilateral evaluation of innovating the discovery of therapeutics
3. 学会等名 Third AACR-SNMMI Joint Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naijin Xu, Chaoming Li, Abai Xu, Chunxiao Liu, Qiang Li, Masami Watanabe, Motoo Araki, Koichiro Wada, Yasutomo Nasu, Peng Huang
2. 発表標題 A novel nitroxoline treatment, targeting the PI3K pathway, in combination with PD-1 blockage, exerts a potent prostate cancer anti-tumor effect
3. 学会等名 AUA2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Peng Huang, Peng Xu, Naijin Xu, Xiezhao Li, Masami Watanabe, Chunxiao Liu and Yasutomo Nasu
2. 発表標題 Programmed death ligand 1 expression in bladder RMS (rhabdomyosarcoma) and its association with clinicopathological features
3. 学会等名 AUA2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Peng Huang, Naijin Xu, Masami Watanabe, Yasutomo Nasu
2. 発表標題 Induction of prostate cancer stem cell properties in mouse induced pluripotent stem cells via conditioned medium and tracking drug response
3. 学会等名 JSGT2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 peng huang, Motoo Araki, Ichiro Tsuboi, Tomohiro Hongo, yasutomo Nasu
2. 発表標題 Prostate cancer precision immunotherapy
3. 学会等名 2018 Pearl River Urology Hi-Tec Forum (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Peng Huang, Xiezhao Li, Naijin Xu, Qiang Li, and Kevin Pan
2. 発表標題 Oral nitroxoline in combination with intravesical Bacille Calmette-Guerin shows synergistic antitumor efficacy in mouse bladder cancer orthotopic xenograft
3. 学会等名 AACR2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naijin Xu, Xiezhao Li, Abai Xu, Masami Watanabe, Peng Huang, Yasutomo Nasu, Chunxiao Liu
2. 発表標題 INDUCTION OF PROSTATE CANCER STEM CELL PROPERTIES IN MOUSE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS VIA DEFINED CARCINOMA NICHE AND TRACKING DRUG RESPONSE IN PRECLINICAL RESEARCH
3. 学会等名 AUA2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Xiezhao Li, Naijin Xu, Abai Xu, Masami Watanabe, Peng Huang, Yasutomo Nasu, Chunxiao Liu
2. 発表標題 IMMUNE CHECKPOINT INHIBITOR COMBINED WITH THE GROWTH INHIBITOR LYCORINE SYNERGISTICALLY FUNCTION TO MEDIATE ANTI-TUMOR EFFECTS IN A MOUSE MODEL OF RENAL CELL CARCINOMA
3. 学会等名 AUA2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Peng Huang、Naijin Xu、Xiezhao Li、Abai Xu、Masami Watanabe、Yasutomo Nasu、Chunxiao Liu
2. 発表標題 REAL-TIME MONITORING OF TUMOR PROGRESSION AND DRUG RESPONSES IN A PRECLINICAL MOUSE MODEL OF PROSTATE CANCER
3. 学会等名 AUA2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Combinational Use of Nitroxoline and Its Analogues with Chemotherapies and Immunotherapies in the Treatment of Cancer	発明者 Peng Huang, Ke Pan, Qiang Li	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PET/US2017025388	取得年 2018年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	那須 保友 (nasu yasutomo) (20237572)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	定平 卓也 (sadahira takuya) (20733322)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	植木 英雄 (ueki hideo) (90537218)	岡山大学・医学部・技術専門職員 (15301)	