

平成23年 5月 20日

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791505

研究課題名 (和文)

アポトーシス誘導新規前立腺癌遺伝子治療と放射線療法併用に関する基盤的研究

研究課題名 (英文)

Foundational investigation for combination treatment with new cancer suppressor gene therapy and radiation therapy.

研究代表者

枝村 康平 (EDAMURA KOUHEI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90535816

研究成果の概要 (和文)：

新規癌抑制遺伝子 REIC による抗腫瘍効果はこれまでに報告されているが、今回新たに放射線治療との併用による相乗効果を検討した。REIC 遺伝子療法と放射線療法の併用により、正常細胞に比べてヒト前立腺癌細胞では増殖が顕著に抑制され、これはアポトーシス誘導による効果であることが判明した。REIC 遺伝子療法と放射線療法との併用療法は前立腺癌治療の新たな選択肢となり得る可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：

Combination treatment with cancer suppressor gene, REIC gene therapy and radiation therapy significantly inhibited the cell growth of prostate cancer cells. These therapeutic responses were consistent with the apoptosis induction. I thus concluded that the combination treatment may be a promising therapeutic intervention for the treatment of prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：遺伝子治療、前立腺癌、アポトーシス、放射線治療

1. 研究開始当初の背景

岡山大学発の癌治療遺伝子 REIC に関するこれまでの研究により、REIC 遺伝子発現に

よる癌特異的アポトーシスの誘導や生体内での抗癌免疫活性化などの抗腫瘍効果が証明されている。これらの抗癌活性は、REIC

遺伝子発現による ER ストレス誘導や、分泌 REIC タンパク質による免疫賦活化作用によると考えられている。また、これらの遺伝子発現系においては、その初期段階においてプロモーターの働きが大きな役割を果たすため、プロモーターの選択は DNA コンストラクトを設計・改良する上で重要であると考えられる。本申請研究は、これらの知見を背景に行われた。

2. 研究の目的

これまで、世界各国で単一遺伝子による遺伝子治療の臨床研究が数多く実施されており、少なくとも安全性は問題なく一定の治療効果も認められている。しかしながら、腫瘍量が大きい症例に対する単一遺伝子治療では、既存の治療法を凌駕するに至っていないのが現状である。また前立腺癌に対しては、放射線療法が標準治療のひとつとなり、早期の限局性前立腺癌に対しては根治的治療手段の有用なオプションとなっている。また、近年では3次元原体照射による治療効果の向上と副作用の軽減が示唆されている。しかし、放射線治療は基本的に局所治療であり、遠隔転移を有する症例に対しては対処療法としか成りえず、また晩期合併症としての直腸障害等の副作用にも留意しなければならない。今回我々は、岡山大学で同定された不死化関連遺伝子の1つである REIC/Dkk-3 を用いた遺伝子治療の実現を見据え、REIC/Dkk-3 遺伝子導入と放射線療法の併用による相乗効果を検討し放射線治療の副作用の軽減ならびに適応の拡大の可能性を明らかにすることを企図して当該研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) Ad-CMV-REIC アデノウイルスベクターの作製

全長 REIC/Dkk-3 cDNA を CMV プロモーターを含む pShuttle プラスミドベクターに導入し、その後、Adeno-X expression kit (タカラバイオ社)を用いて、アデノウイルス作製用コスミドに全長 REIC/Dkk-3 を CMV プロモーター領域と共に組み込んだ。HEK293 細胞にこのコスミドを transfection することにより、シードとなる Ad-CMV-REIC を作製した。また、このシードをもとに、実験に用いる Ad-CMV-REIC の拡大生成・精製を行った。LacZ 遺伝子を含むアデノウイルスベクター (Ad-CAG-LacZ) を対照として用いた。

(2) 細胞および細胞培養

正常細胞 (PrEC)・癌株化細胞 (PC3, LNaP, DU145) は ATCC (American Type Culture Collection) から入手した。これらの細胞株は、10% (v/v) ウシ胎児血清、ペニシリン (100IU/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml) で補足した F12 または RPMI-1640 medium (Invitrogen 社) を用いて、5% CO₂ 条件下でそれぞれ培養した。

(3) ウェスタンブロット分析

REIC タンパク質の発現は、ウェスタンブロットにより調べた。細胞を PBS で2回洗浄し、溶解バッファー (50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml ロイペプチン、5 μ g/ml アプロチニン、2 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 10 mM β -GP) にてタンパク質を抽出した。遠心分離後、上清中のタンパク質量を調整し、同量の 2 x SDS sample buffer で希釈し、95°C で5分間加熱した。サンプル (10 μ g タンパク質) を 7.5% SDS-PAGE ゲルで泳動し、PVDF 膜に

転写した。10%無脂肪ミルク粉末、6%グリシン、0.1% Tween-20 を含む Tris buffered saline (TBS)を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。我々が作製した抗ヒト REIC/Dkk-3 抗体(1:1000)を一次抗体として用いた。TBS (T-TBS)、0.1% Tween-20 を用いて十分に洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体を添加した。さらに、T-TBS を用いて十分に洗浄した後、enhanced chemiluminescence detection method (ECL kit) により、発色させた。この分析法により、Ad-CMV-REIC ベクターによる REIC タンパク質の発現を確認した。

(4) 細胞死 (アポトーシス) アッセイ

In vitro における細胞死誘導を調べるために、前立腺癌細胞を平底6ウェルプレートに播き24時間培養した。細胞を Ad-LacZ および Ad-CMV-REIC で100 MOI (multiplicity of infection) で無血清培地中にて2時間処理した後、新鮮完全培地に交換した。48時間のインキュベーション後、Hoechst 33342 ストック溶液を2 μ g/ml の濃度で添加し、細胞を暗条件下で10分間インキュベーションした。Hoechst 33342 は、インターキレーター染色試薬であり、クロマチンの総量とクロマチンの凝縮程度を調べることができる。蛍光顕微鏡を用いて高度に凝縮し分断した核を有する細胞死が認められた細胞を同定した。細胞死が認められた細胞は、顕微鏡下で3~5の異なる視野において計数した。

4. 研究成果

最初に、Adeno vector-REIC/Dkk-3 のコントロールである Adeno Lac-Z を用いて、癌株化細胞における導入効率を検討した。数種類の癌株化細胞において、実験継続に支障のない導入効率を確認できた。引き続き、併用療

法による前立腺の正常細胞・癌株化細胞数種の細胞増殖抑制効果を MTS で解析した。癌細胞において、Adeno vector-REIC/Dkk-3 単独、放射線療法単独のものに比べ、併用した群では細胞増殖の抑制効果が顕著に見られた。また、Tunnel 法を用いて併用療法による前立腺の正常細胞・癌株化細胞数種のアポトーシス誘導能を検討した。正常細胞では Tunnel 陽性を示す細胞は低頻度であったのに対し、癌細胞においては Adeno vector-REIC/Dkk-3 単独群、放射線療法単独群ともにアポトーシスが誘導されていた。さらに両者の併用群では単独群に比べてさらに高いアポトーシス誘導能が確認された。これらの結果より、REIC/Dkk-3 と放射線の併用療法は In vitro において前立腺癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを効率良く誘導することが確認された。さらに、今回新たに作成した Ad-CMV-REIC アデノウイルスベクターを用いて同様の実験を行った。結果、これまでの Adeno vector-REIC/Dkk-3 と比べて同等以上のアポトーシス誘導効果が確認された。

以上の結果より、REIC/Dkk-3 遺伝子治療と放射線療法の併用療法の有用性が示唆された。In vivo における Adeno vector-REIC/Dkk-3 単独療法の効果は既に証明されており、今後、放射線療法との併用による in vivo での抗腫瘍効果とアポトーシス誘導効果を検証する予定である。

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 1件)

1. Zhang K, Watanabe M, Kashiwakura Y, Li SA, Edamura K, et.al., Expression

pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types
and the implications of the soluble form in
prostatic acinar development. Int J Oncol.,
査読有、Vol. 37 (6) 2010、pp. 1495–1501

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝村 康平 (EDAMURA KOUHEI)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：90535816