

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390382

研究課題名(和文) REIC/Dkk-3 遺伝子治療による自己癌ワクチン化療法の基盤解析

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of personalized-cancer vaccination by REIC/Dkk-3 based gene therapy.

研究代表者

公文 裕巳 (Kumon, Hiromi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30144760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療遺伝子REIC/Dkk-3を用いた固形癌に対するin situ遺伝子治療では、「癌細胞の選択的アポトーシス」と「抗癌免疫の活性化」による相乗的效果増強作用(自己癌ワクチン化)が誘導されることが示されている。本申請研究では、当該治療による自己癌ワクチン化機序として、発現したREICタンパク質による骨髄系免疫抑制細胞(MDSC)の分化抑制機構と、その下流の現象としての細胞傷害性T細胞(CTL)の活性化が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In situ gene therapy with tumor suppressor, REIC/Dkk-3, induces cancer-specific apoptosis and activation of anti-cancer immune. The combined effects seem to be important for the therapeutic outcomes of personalized-cancer vaccination. In this study, we elucidated that the suppressive effect of REIC/Dkk-3 on the differentiation of MDSC and the following CTL activation are important for the mechanism of the personalized-cancer vaccination.

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 癌ワクチン 骨髄系免疫抑制細胞 REIC/Dkk3

## 1. 研究開始当初の背景

岡山大学で同定された癌抑制・治療遺伝子 REIC/Dkk-3 は、1)ヒトの非小細胞肺癌、肝細胞癌、腎細胞癌などの癌細胞で高頻度に発現が低下していること (BBRC, 289:257, 2001, J.Urol, 171:1314,2004)、2) 発現低下の主たる要因は promoter 領域のメチル化によること (Gene, 282:151, 2002)、3) 前立腺癌では、検討した 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。さらに我々の研究により、外因性 REIC/Dkk-3 タンパク質が、樹状細胞を分化誘導し、マウス生体内で抗癌免疫を賦活化させることも実証されている (Int J Oncol, 34:657, 2009)。

現在、新しい癌治療戦略としての「癌ワクチン」が注目され、樹状細胞療法やペプチドワクチン等が種々検討され、前立腺癌に対する新規の樹状細胞ワクチンが本年 4 月 FDA で承認された。REIC 遺伝子治療のコンセプトは、基本的にはこれらの癌ワクチンと共通するものの、腫瘍局所での自己の癌細胞の選択的細胞死による大量の癌抗原の提示と樹状細胞の分化誘導による抗癌免疫の同時活性化に基づく「自己癌ワクチン化」という全く新しい戦略の実現を目指すものである。つまり、REIC 遺伝子治療製剤は、自己癌のワクチン化という究極のパーソナライズド・メディシン (個別化医療) を実現するものであり、その抗腫瘍免疫学的基盤を確立することで、遺伝子医薬の新時代を拓くことが可能になると考えている。

これらの学術的背景に加えて、マウスの骨髄細胞を用いた近年の研究により、REIC/Dkk-3 タンパク質が骨髄系免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid-derived suppresser cell) の分化を強力に抑制することが証明された。また、同所性マウス腎腫瘍モデルを用いた実験では、REIC/Dkk-3 タンパク質の腹腔内投与により腫瘍増殖が有意に抑制されることも示されている。これらの実験結果は、広範な抗

癌免疫担当細胞の抑制作用を示す MDSC の分化を REIC/Dkk-3 タンパク質が阻害するメカニズムの詳細を解析することが、次世代癌ワクチン化療法としての REIC 遺伝子治療の抗腫瘍免疫学的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

本申請研究では、REIC/Dkk-3 遺伝子治療の効果を抗癌免疫の活性化と制御の両面から系統的に解析し、当該遺伝子治療の自己癌ワクチン化療法としての免疫学的基盤の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

REIC/Dkk-3 遺伝子治療による次世代癌ワクチン化療法の免疫学的基盤を構築するために、MDSC 等の骨髄球系免疫担当細胞の分化機序・生理的機能およびその制御メカニズムについて解析した。既に保持していた REIC/Dkk-3 遺伝子・当該タンパク質および REIC/Dkk-3 全身ノックアウト (KO) マウスに関連する実験系と骨髄・末梢血細胞培養、各種担癌マウスモデル作製と治療実験、抗癌免疫の活性化の解析等を組み合わせて、REIC/Dkk-3 タンパク質の MDSC 等の骨髄球系細胞への作用に焦点を当てた。

具体的な実験手法としては、各種免疫担当細胞の表面マーカーに対する特異抗体を用いたフローサイトメトリー法および各種のタンパク質発現量を解析するウエスタンブロット法を中心に解析を進めた。

REIC 全身 KO マウスは、マウス REIC/Dkk-3 遺伝子の 5 番目のエクソンと 6 番目のエクソンが欠損しているマウスであり、当該マウスでは機能的な REIC タンパク質が産生されない。岡山大学動物実験施設において、当該マウスの genotyping を行いながら、法令に基づく拡散防止の措置を取り REIC 全身 KO マウスの飼育、繁殖を行い、研究を行った。

## 4. 研究成果

癌の標的医療の研究開発において、新たな分子標的薬の探索とともに癌ワクチンの創製、

特に、その臨床効果の検証と効果増強法の解明が中心課題となっている。抗癌免疫の制御に関する最近の注目すべき研究として、骨髄系免疫抑制細胞 (MDSC) 等の骨髄球系免疫細胞が、癌に対する免疫監視機構や抗腫瘍免疫を負に制御して癌の悪性進展に中心的役割を担っていることが明らかにされつつある。しかし、未だ、MDSC の分化に関与する Pro-inflammatory-Cytokine や MDSC の作用機序については未知の部分が少ない。一方、癌抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 を治療遺伝子とする固形癌に対する in-situ 遺伝子治療は、「癌細胞の選択的アポトーシス」と「抗癌免疫の活性化」による相乗の効果増強作用(自己癌ワクチン化)を誘導し、原発巣のみならず転移巣に対しても顕著な治療効果を示すことが複数の動物モデルで実証されている。

本研究により、REIC タンパク質が生体内において MDSC の分化を強力に抑制することが明らかとなった。その分子機序として、特定の核内転写因子が関与する可能性が示唆された。本申請研究で、自己癌ワクチン化療法としての REIC/Dkk-3 遺伝子治療の免疫学的機序の一角が、MDSC の分化抑制と癌抗原特異的 CTL 細胞の誘導に基づくことが明らかになった。当該成果は、REIC/Dkk-3 遺伝子をシースとする癌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次世代自己癌ワクチン化療法の展開基盤になるものと期待される。

#### 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)

Watanabe M., Sakaguchi M., Kinoshita R., Kaku H., Ariyoshi Y., Ueki H., Tanimoto R., Ebara S., Ochiai K., Futami J., Li SA., Huang P., Nasu Y., Huh NH., Kumon H., A novel gene expression system strongly enhances the anticancer effects of a REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector, *Oncology Reports*, 査読有, 31 巻, 2014, 1089-95,

DOI:10.3892/or.2013.2958.

Watanabe M., Nasu Y., Kumon H., Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy: development of an autologous cancer vaccination therapy, *Oncology Letters*, 査読有, 7 巻, 2014, 595-601, DOI:10.3892/ol.2013.1777

Sugimoto M., Watanabe M., Kaku H., Li SA., Noguchi H., Ueki H., Sakaguchi M., Huh NH., Nasu Y., Kumon H., Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy, *Oncol Rep*, 査読有, 28 巻, 2012, 1645-1652, DOI:10.3892/or.2012.2001.

Hirata T., Watanabe M., Kaku H., Kobayashi Y., Yamada H., Sakaguchi M., Takei K., Huh NH., Nasu Y., Kumon H., REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer, *Int J Oncol*, 査読有, 41 巻, 2012, 559-564, DOI:10.3892/ijo.2012.1503

Kawauchi K., Watanabe M., Kaku H., Huang P., Sasaki K., Sakaguchi M., Ochiai K., Huh NH., Nasu Y., Kumon H., Preclinical safety and efficacy of in situ REIC/Dkk-3 gene therapy for prostate cancer, *Acta Med Okayama*, 査読有, 66 巻, 2012, 7-16, <http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/amo/vol66/iss1>

Jin Y., Murata H., Sakaguchi M., Kataoka K., Watanabe M., Nasu Y., Kumon H., Huh NH., Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by downregulation of BRPK/PINK1, *Oncol Rep*, 査読有, 27 巻, 2012, 695-699, DOI:10.3892/or.2011.1543.

Ochiai K., Watanabe M., Ueki H., Huang P., Fujii Y., Nasu Y., Noguchi H., Hirata T., Sakaguchi M., Huh NH., Kashiwakura Y., Kaku H., Kumon H., Tumor suppressor

REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 412 巻, 2011, 391-395, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.109.

〔学会発表〕(計 14 件)

Huang P et al., Immunomodulation and anti-cancer activity of REIC/Dkk-3 protein, European Society of Gene and Cell Therapy, 2013/10/26, Madrid Spain

Kumon H., Ad-REIC/Dkk-3(REIC expressing Adenoviral vector) for prostate cancer, Korea-Japan Urological Congress, 2013/9/13, Seoul Korea

公文裕巳, 前立腺がん遺伝子治療: Ad-REIC によるがんワクチン治療法の開発、浜松カンファレンス、2013 年 8 月 3 日、浜松

Watanabe M et al., A super gene expression system strongly enhances the anticancer effects of the REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector, Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2013/7/5, Japan Okayama

Simazu Y et al., Analysis of combination therapy of the adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3(Ad-REIC) and the integrin antagonist cilengitide, Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2013/7/5, Japan Okayama

Ariyoshi Y et al., Adenovirus-mediated REIC-Dkk-3 gene therapy induces tumor antigen-specific cytotoxic T-cell activation in mouse cancer models, Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2013/7/5, Japan Okayama

公文裕巳, がんワクチン機能を有する遺伝子医薬 Ad-REIC の開発、癌免疫外科研究会、2013 年 5 月 16 日、岡山

Ariyoshi Y et al., A phase / study of reduced expression in immortalized cells(REIC/Dkk-3) gene therapy for prostate cancer: Challenge to

establish as a cancer vaccine, Asian Pacific Prostate Society 2013, 2013/4/14, Melbourne Australia

Kumon H., Clinical development of in situ REIC gene therapy in East Asia, Symposium of the East Asian Gene Therapy Innovative Group, 2013/3/30, Japan Okayama

Kumon H., Emergence of REIC as a novel key player in the cancer arena, Symposium of the East Asian Gene Therapy Innovative Group, 2013/3/30, Japan Okayama

Hirata T et al., REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector(Ad-REIC) as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer, Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2012/6/29, Japan Kumamoto

Sasaki K et al., A phase / study of reduced expression in immortalized cells(REIC/Dkk-3) gene therapy for prostate cancer: A summary of neoadjuvant group, Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2012/6/29, Japan Kumamoto

佐々木克己、癌の遺伝子治療 前立腺癌に対する遺伝子治療 - 新規治療法の開発をめざした岡山大学の取り組み -、日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月 22 日、横浜

Kumon H., In situ REIC/Dkk-3 gene therapy creating a new generation of cancer vaccine, Trend of gene & cell therapy as translational research in USA and JAPAN, 2011/7/14, Japan Fukuoka

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 「REIC/Dkk-3 タンパク質の部分領域ポリペプチド」

発明者: 公文 裕巳、渡部 昌実、二見 淳一郎、

藤井 康之、植木 英雄  
権利者：岡山大学、桃太郎源(株)  
種類：特許  
番号：W02012002582 A1  
出願年月日：2011年7月1日  
国内外の別：PCT出願

名称：「REIC発現アデノウイルスベクター」  
発明者：渡部 昌実、公文 裕巳、許 南浩、  
阪口 政清  
権利者：岡山大学、桃太郎源(株)  
種類：特許  
番号：特願2011-117321  
出願年月日：2011年5月25日  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

特に無し。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

公文 裕巳 (KUMON HIROMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30144760

### (2)研究分担者

許 南浩 (HUH NAMHO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70142023  
2011～2012年まで分担者

渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)  
岡山大学・岡山大学病院・准教授  
研究者番号：70444677

阪口 政清 (SAKAGUCHI MASAKIYO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70379840

賀来 春紀 (KAKU HARUKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：60346426

植木 英雄 (UEKI HIDEO)  
岡山大学・医学部・技術専門職員  
研究者番号：90537218

(3)連携研究者  
無し。