

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23650625  
 研究課題名（和文） 新世代REICアデノウイルスによる純国産がん遺伝子治療の統合新戦略  
 研究課題名（英文） Innovative improvement of cancer therapeutic adenovirus vector carrying REIC gene  
  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要（和文）：抗がんウイルス製剤 REIC アデノウイルスに、独自に開発した「がん特異的新規プロモーターシステム」と「新規アデノウイルスアダプター」を適用することで、REIC アデノウイルスを高機能化させることに成功した。これは、従来に比較して遥かに強力ながん選択的なアデノウイルス感染と REIC 遺伝子発現を可能にし、抗腫瘍効果を大幅に上昇させた。

研究成果の概要（英文）：Adenovirus vector is one of the most widely used vectors for cancer gene therapies. One of the serious problems associated with adenovirus vector-based gene therapy is that expression of Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR), a receptor for the adenovirus vector, is often reduced among advanced cancers. In this study, we attempted to highly enhance expression of a cargo gene by modifying promoter and applying a developed adenovirus-adaptor protein. A newly designed Ad-REIC showed 10 to 100 fold higher expression in a cancer specific manner than that attained by previous one. This vector certainly improved the therapeutic effect for a wide variety of human cancers. The selective anti-cancer function of the new Ad-REIC shows a great promise for clinical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：がん遺伝子治療、アデノウイルス、REIC

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスベクターを用いた、がん遺伝子治療の現行法における最大の課題は抗腫瘍効果の不足である。これは主として次の2つの重要克服課題より成っている。

- (1) 目的遺伝子の標的細胞への導入あるいは発現頻度の不足（目的遺伝子の単一細胞あたりの発現量が低くなる）
- (2) 正常組織への副作用（標的外の組織・細胞に対する感染による毒性）

これら2点はいずれもほぼ並列の重要解決課題である。(1)では、既存の治療用アデノウイルスベクター（5型）の感染効率は、細胞表面に存在する受容体 CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) に依存する。そのため、CAR の発現が乏しい細胞にはアデノウイルスベクターの導入効率は激減するが、悪性化したがんに共通して、CAR の発現低下が頻繁に認められている。(2) 上述の CAR は正常細胞にも発現しており（特に上皮系細胞に発現が顕著）、正常組織に対する感染が報告されている。（平成22年度国立医薬品食品衛生研究所報告書、日本薬理学雑誌 137, 70-74, 2011）。

## 2. 研究の目的

がん遺伝子治療における上記アデノウイルスの持つ問題点を克服した「新世代 REIC アデノウイルス」を作成することを目的とする。計画期間内の達成目標として、(1)、REIC ががん抑制遺伝子の発現効率を従前の10倍以上に引き上げる、(2)、(1)の高効率発現システムをがん特異的プロモーターに応用してがん選択的 REIC 高効率遺伝子発現を成し遂げる、(3)、アダプタータンパク質によるアデノウイルス感染効率の向上を試みる(2) ミュータント型 REIC 遺伝子作成の必要性を検討する（安全性の担保：REICには血管新生能があるという可能性が指摘されているため）、を掲げた。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞と培地：ヒト胎児腎細胞株 HEK293 (Human embryonic kidney cell line transformed with adenovirus 5 DNA)、ヒト前立腺がん細胞株 PC3 (Human cell line derived from bone metastasis of prostate grand adenocarcinoma)、ヒト胆管がん細胞株 HuCCT1 は ATCC (Rockvill, MD) より購入した。HEK293、PC3、HuCCT1 は DMEM/ F12 培地 (Gibco, Carlsbad, CA) にそれぞれ最終濃度が 10% となるように牛胎児血清 (FBS) を加えて培養した。

(2) 新世代 Ad-REIC の作製：プロモーターサンドイッチ技術を hTERT promoter に適用したドナーベクターにヒト REIC/Dkk-3 の full-length cDNA を挿入して cosmid vector pAxCawt に組込み、COS-TPC 法<sup>10)</sup>に従って HEK293 細胞より増幅した。exCAR-EGF アデノウイルスアダプタータンパク質は、HEK293 細胞に当タンパク質発現プラスミドベクターのトランスフェクションにより産生させ、精製した。

(3) ウェスタン解析：遠心により回収した細胞を細胞溶解液 (150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10・g/ml leupeptin, 10・g/ml aprotinin and 200・g/ml phenylmethanesulfonyl fluoride, 10 mM Tris-HCl/ pH 7.4) で懸濁し、遠心分離して得られた上清を全細胞タンパク質抽出液とした。SDS 含有ポリアクリルアミドゲルを作製し、タンパク質サンプルの電気泳動を行った。その後、トランスファー装置にゲルと PVDF 膜 (GE Healthcare, Lawrence, MA) をセットしてゲル内タンパク質の PVDF 膜へのトランスファーを行った。その後、PVDF 膜を 10% スキムミルクでブロッキング (1時間、室温) した後、1次抗体、2次抗体の順にそれぞれ室温で1時間反応させた。目的タンパク質のバンドの検出は、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて行った。

(4) 細胞死の評価（培養系）：Ad-REIC（旧型、新規作成型）を感染させ、そのアポトーシス誘導効果を Hoechst 染色により比較検討した。また、濃度依存的増殖抑制効果を MTS assay で評価した。

(6) 胆管がんモデルマウス：HuCCT1 を皮下移植したヌードマウスを用いて Ad-REIC（旧型、新規作成型）の局所投与による抗腫瘍効果を検討した（腫瘍サイズの測定、病理解析）。

#### 4. 研究成果

(1) 従来型の（強力と呼ばれる）プロモーター（CMVやCAG）に比して、数十〜数百倍の発現効率をもつプロモーターシステムを新たに構築し、これをアデノウイルスベクターに組み込めば、その有用性は計り知れない。我々は、現存する最も強力とされるプロモーター（CMVやCAG）をはるかに越える超高効率発現プロモーターシステムを開発しようと考え、計 12 種類のプロモーターシステム群を作製してそれらの活性を比較検討した。その結果、プロモーターの活性を超強力に上昇させる法則を見いだした。この法則を利用した技術を「プロモーターサンドイッチ技術」と名付けた。標的遺伝子をプロモーターでサンドイッチする簡便な方法であるが、その効果は絶大である。使用するプロモーターの長さや相性が遺伝子発現増幅に大きく影響する。最適なプロモーターコンビネーションを検討した結果、CMVプロモーターを利用した「CMV-CMV」が最も活性が高いことがわかった。

(2) 上記の「プロモーターサンドイッチ技術」をさらにテロメラーゼ（hTERT）プロモーターに応用してがん特異性を保持させることに成功した。この成果より、がん特異的超高効率遺伝子発現が可能となった。hTERT プロモーターは古くからその特異性に注目されているものの CAG や CMV プロモーターなどに比べると、いずれも発現強度が数 100 分の 1 と非常に弱いという致命的な欠点を持っていた。我々の開発した超高効率がん特異的プロモーターシステムにより、このような問題を容易に克服することが可能となった。

(3) がん特異的アデノウイルス感染を向上させるため、アデノウイルス表面抗原であるファイバータンパク質に結合するCAR細胞外ドメイン（exCAR）-EGF 融合アダプタータンパク質を創製した。これをREICアデノウイルスベクターに結合させ、腫瘍特異的アデノウイルス感染が成立するかどうかの検討を行った。結果、EGF受容体を高発現する種々がん細胞において特異的感染効率の顕著な上昇が認められた。

(4) REIC タンパク質は血管新生を亢進するとの報告がある。REIC をミュータント化することで、このような作用を回避できるかもしれない。そこで、REIC のミュータント化を試みた。遺伝子ランダムミューテーションを行い、得られた種々ミュータント化 REIC について検討した。結果、得られた全てに関して、REIC の発現低下や安定性の低下が認められた。このことから、REIC は野生型のままでの利用が最適であると判断した。我々のこれまでの動物実験による検討結果から、野生型 REIC 発現による血管新生は認められていない。

上述により開発した「新世代 REIC アデノウイルス」について、抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* で評価した。総合的な抗腫瘍性治療効果を判定するため、従来の REIC アデノウイルスと「新世代 REIC アデノウイルス」を担がん移植モデルマウスへ投与し、治療効果を比較した。その結果、新世代 REIC アデノウイルスは、従来に比較して REIC タンパク質の発現を 10-100 倍のレベルで強力に上昇させ、強力な抗腫瘍効果を *in vivo* で示すことが判明した。次に、新世代 REIC アデノウイルス投与による過剰発現 REIC が、腫瘍周囲の血管新生亢進に働くかどうかの検討を病理学的に行った。結果として、移植がん細胞由来腫瘍の顕著な縮小を認め、血管新生の増進も検出されなかった。これらの結果から、新世代 REIC アデノウイルスは従来に比較し、その抗腫瘍効果を大幅に上昇させることが判明した。

アデノウィルスベクターは、安全性の観点から高く評価されてきたが、抗がん剤として効果を持たせるためには人体に大量に投与する必要があった。このため、生体における副作用（大量投与による過剰免疫応答）の問題点を抱えている。我々は、REICをアデノウィルス（Ad-REIC）として使用した場合、がんの治療手段として非常に有望であることを見だし、その臨床応用に向けた努力をしてきた。しかし、やはり上記のようなアデノウィルス特有の副作用の問題点が懸念されている。すなわち、投与量を極度に減らしても同等の効果が得られるような新しいアデノウィルスベクターの開発が望まれていたのである。当研究より、Ad-REICを大幅に改善することができた。これは、従来のものに比較して生体内投与量を極度に減らすことが可能と考えられ、治療効果を残したままで、副作用の大幅な改善に大きく貢献することが期待される。

#### 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 16 件）

以下、全て査読あり

- ① Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E. Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2013. doi: 10.1038/onc.2013.66. (in press).
- ② Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 29: 1073-1079, 2013.
- ③ Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH, S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 73: 172-183, 2013.
- ④ 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. *Int J Oncol.* 28: 1645-1652, 2012.
- ⑤ 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.* 41: 559-564, 2012.
- ⑥ Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett.* 3: 1149-1153, 2012.
- ⑦ 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.* 66: 7-16, 2012.
- ⑧ Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in mouse squamous epithelia. *Clin Exp Dermatol.* 37: 428-431. 2012.
- ⑨ 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.* 27: 695-699, 2012.
- ⑩ 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.* 412: 391-395, 2011
- ⑪ Sakaguchi M, Murata M, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE*, 6: e23132, 2011.
- ⑫ Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 17: 4965-4974, 2011.
- ⑬ Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh NH, Tsuda T, Yamanishi K, Komine M, Iwatsuki K. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *J Am Acad Dermatol.* 64: 879-887, 2011.
- ⑭ Than SS, Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Intraperitoneal administration of an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 suppresses peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Oncol Rep.* 25: 989-995, 2011.
- ⑮ Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami JI, Yamada H, Kataoka K, Huh NH. A new cytosolic pathway from a Parkinson's disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via MTORC2. *J Biol Chem.* 286: 7182-7189, 2011.
- ⑯ Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Abarzua F, Than SS, Sonogawa H, Makino T, Shimizu T, Huh NH. Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Exp Dermatol.* 20: 273-277, 2011.
- [学会発表] (計1件)
- ① 許南浩, Molecular Mechanisms of Interaction between S100A8/A9 and Their Receptors, RAGE and Newly Identified Receptors, 19th International Charles Heidelberger Symposium of Cancer Research (招待講演)、2013年02月14日～2013年02月16日、鹿児島
- [産業財産権]
- 出願状況 (計3件)
- ① 名称: NPTN $\beta$ とS100A8の結合の阻害を指標とする細胞増殖抑制剤のスクリーニング方法  
発明者: 阪口政清、日比野利彦、山本真実、許南浩  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願2012-204279  
出願年月日: 2012年09月18日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: PINK1のユビキチンアッセイ及びスクリーニングへの利用  
発明者: 村田 等、阪口政清、許南浩  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許、特願 2012-165160  
出願年月日: 2012年07月25日  
国内外の別: 国内
- ③ 名称: アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター  
発明者: 阪口政清、近藤英作、許南浩、手塚克成  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願2012-085969

出願年月日：2012年04月04日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

片岡 健 (KATAOKA KEN)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：10293317

村田 等 (MURATA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90579096

### (3) 連携研究者

該当無し