

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293352

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3による癌化シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Suppression of oncogenic signaling by tumor suppressor REIC/Dkk-3

研究代表者

公文 裕巳(Kumon, Hiromi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・特命教授

研究者番号：30144760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000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が誘導されることがその主要な機序である。またこれまでに、癌治療遺伝子・タンパク質REIC/Dkk-3による癌細胞増殖抑制作用が報告されており、本申請研究では、当該治療による癌化シグナル制御機構を明らかにする為の研究を実施し、関連する重要な因子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：Reduced expression in immortalized cells (REIC)/Dickkopf (Dkk)-3 is a tumor suppressor gene and has been studied with respect to the application of cancer gene therapy. Our previous studies demonstrated that adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 overexpression induced significant apoptosis in the treated tumor sites. In this study, we further investigated the mechanisms underlying the antitumor therapeutic effects of Ad-REIC and clarified that the treatment inhibits cancer progression via modification of several oncogenic signaling.

研究分野：泌尿器科学、遺伝子治療学

キーワード：遺伝子治療 癌増殖抑制 REIC/Dkk-3

## 1. 研究開始当初の背景

REIC/Dkk-3 の癌治療遺伝子としての臨床応用は近年脚光を浴びており、岡山大学を中心としたグループにより、複数の難治性固形癌（前立腺癌、悪性胸膜中皮腫、肝臓癌、膵臓癌、悪性グリオーマ等）への癌遺伝子治療への応用が進められている。これまでに REIC/Dkk-3 の癌抑制遺伝子としての重要性を指摘する論文が相次いで報告されてはいるものの、今回の新発見である「REIC/Dkk-3 による Oncogenic シグナリング- 癌化制御機構」についての報告はほとんど存在しなかった。今回の本基盤的研究の遂行により、遺伝子治療のみならず新たな標的医療の創出が可能となり、難治固形癌に対する革新的癌医療の創造につながっていくことが期待された。

## 2. 研究の目的

REIC/Dkk-3 遺伝子の発現とその分泌型タンパク質が、正常細胞、癌化誘導細胞および各種の癌細胞において、どのような分子機序で抗癌化作用・癌増殖抑制作用を発揮するのかを明らかにする。正常細胞では、特異的 siRNA による REIC/Dkk-3 等の目的遺伝子ノックダウン時の各種 Ras 関連遺伝子-タンパク質発現の変動解析を行う。同様に、癌化誘導時の正常細胞と各種癌細胞における REIC/Dkk-3 の発現と Ras シグナリング動態との関係について、Ras 関連分子の発現・活性化への影響を解析する。また、REIC/Dkk-3 タンパク質及び癌関連タンパク質を *in vitro* で投与した場合の、Oncogenic シグナリング動態および細胞増殖抑制・浸潤能抑制効果の有無を検証し、これら分泌型タンパク質の抗癌作用を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 癌細胞および正常細胞での REIC/Dkk-3 による抗細胞増殖作用の解析：

単量体 p21GTP 結合タンパク質 (Small GTPase) である Ras は、不活性型の GDP 結合状態と活性型の GTP 結合状態間を循環し、増殖・形質転換・アポトーシス・移動・細胞周期の進行など、多くの細胞機能を制御している。したがって、Ras-GTP の細胞内蓄積は、正常細胞の癌化誘導の主な要因になると考えられている。ヒト由来の正常上皮細胞を通常培養した状態で、特異的 siRNA により REIC/Dkk-3 遺伝子をノックダウンさせ、遺伝子-タンパク質発現変動をウェスタンブロット法により解析した。特に Ras シグナリングに関連する分子として細胞表面に局在する Wnt receptors、更に Oncogenesis-related genes としての Metastasis-related genes (MMP タンパク質や関連する因子群) に着目し、これらの発現・活性化の動態や各細胞の表現型 (細胞増殖を中心に) を解析した。

同様の観点から、REIC/Dkk-3 の分泌型タンパク質の作用メカニズムについて解析した。REIC/Dkk-3 は通常細胞質に存在しており、その一部が分泌型 REIC/Dkk-3 として間質、結合織、および血中に存在する。既に、REIC/Dkk-3 の強制発現が細胞外マトリックスの分解酵素である MMP-2 の発現を抑制することを報告しているが (Cancer Gene Ther, 14:765, 2007) この分子メカニズムは明らかでなかった。Ras シグナリングの下流の Akt および GSK-3 の機能が抑制された結果 MMPs の発現が抑制される経路や、分泌型 REIC/Dkk-3 が Wnt receptor とそのリガンドの結合を阻害し canonical pathway を通して MMPs を抑制する経路が考えられ、分泌型 REIC/Dkk-3 タンパク質の機能について解析を行った。

## (2)ウェスタンブロット法

各タンパク質の発現は、ウェスタンブロット法により解析した。各種細胞を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 µg/ml ロイペプチン, 5 µg/ml アプロチニン, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 10 mM -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、濃縮 SDS sample buffer で希釈し、95 °C で5分間加熱した。サンプル(10 µg 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 (T-TBS)を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。一次抗体(1:1000 ~ 希釈)を反応後、T-TBS により3回洗浄し、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3回洗浄した後、enhanced chemiluminescence detection 法(ECL kit を使用)によりバンドを発光させた。

## 4 . 研究成果

癌治療遺伝子 REIC/Dkk-3 をコードしたアデノウイルスベクター:Ad-REIC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が誘導される。これまでに癌治療遺伝子・タンパク質 REIC/Dkk-3 による癌細胞増殖抑制作用が報告されており、本申請研究では、当該治療による癌化シグナル制御機構を明らかにする為の研究を実施し、関連する重要な因子群 (  $\beta$ -catenin, c-Myc, NF- $\kappa$ B, RAGE, S100, Emmprin, p38 ) を同定した。本研究の成果は後述する学術論文等により発表した。

## 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21件)

Promising therapeutic efficacy of a novel REIC/Dkk-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma.

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. (査読有) J Gastroenterol Hepatol. 2017 ; In press. doi: 10.1111/jgh.13757.

Distant Bystander Effect of REIC/DKK3 Gene Therapy Through Immune System Stimulation in Thoracic Malignancies.

Suzawa K, Shien K, Peng H, Sakaguchi M, Watanabe M, Hashida S, Maki Y, Yamamoto H, Tomida S, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Kumon H, Miyoshi S, Toyooka S. (査読有) Anticancer Res. 2017 ;37(1):301-307.

Expression analysis of Dickkopf-related protein 3 (Dkk3) suggests its pleiotropic roles for a secretory glycoprotein in adult mouse.

Inoue J, Fujita H, Bando T, Kondo Y, Kumon H, Ohuchi H. (査読有) J Mol Histol. 2017;48(1):29-39. doi: 10.1007/s10735-016-9703-2.

Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 gene: neoadjuvant intraprostatic injection for high-risk localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. Kumon H, Ariyoshi Y, Sasaki K, Sadahira T, Araki M, Ebara S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. (査読有) Cancer Gene Ther. 2016;23(11):400-409. doi: 10.1038/cgt.2016.53.

A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy. Oka T, Kurozumi K, Shimazu Y, Ichikawa T, Ishida J, Otani Y, Shimizu T, Tomita Y, Sakaguchi M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. (査読有) Sci Rep. 2016 Sep 14;6:33319. doi: 10.1038/srep33319.

Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent for pancreatic cancer. 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. (査読有) Cancer Gene Ther. 2016;23(8):278-83. doi: 10.1038/cgt.2016.31.

The induction of antigen-specific CTL by in situ Ad-REIC gene therapy. Ariyoshi Y, Watanabe M, Eikawa S, Yamazaki C, Sadahira T, Hirata T, Araki M, Ebara S, Nasu Y, Udono H, Kumon H. (査読有) Gene Ther. 2016;23(5):408-14. doi: 10.1038/gt.2016.7.

Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity. Ochiai K, Morimatsu M, Kato Y, Ishiguro-Oonuma T, Udagawa C, Rungsuriyawiboon O, Azakami D, Michishita M, Ariyoshi Y, Ueki H, Nasu Y, Kumon H, Watanabe M, Omi T. (査読有) Oncotarget. 2016;7(3):3283-96. doi: 10.18632/oncotarget.6488.

Synergistic anti-pancreatic cancer immunological effects by treatment with

reduced expression in immortalized cells/dickkopf-3 protein and peripheral blood mononuclear cells. 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. (査読有) J Gastroenterol Hepatol. 2016;31(6):1154-9. doi: 10.1111/jgh.13259.

Feasibility of Neoadjuvant Ad-REIC Gene Therapy in Patients with High-Risk Localized Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Araki M, Ebara S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. (査読有) Clin Transl Sci. 2015;8(6):837-40. doi: 10.1111/cts.12362.

Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results in a Patient with Metastatic CRPC Following Chemotherapy. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Ebara S, Hiraki T, Kanazawa S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. (査読有) Clin Med Insights Oncol. 2015;9:31-8. doi: 10.4137/CMO.S23252.

The cysteine-rich core domain of REIC/Dkk-3 is critical for its effect on monocyte differentiation and tumor regression. Kinoshita R, Watanabe M, Huang P, Li SA, Sakaguchi M, Kumon H, Futami J. (査読有) Oncol Rep. 2015;33(6):2908-14. doi: 10.3892/or.2015.3885.

Integrin antagonist augments the therapeutic effect of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy for malignant glioma. Shimazu Y, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Onishi M, Ishida J, Oka T,

Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. (査読有) Gene Ther. 2015;22(2):146-54. doi: 10.1038/gt.2014.100.

Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy: Development of an autologous cancer vaccination therapy (Review). Watanabe M, Nasu Y, Kumon H. (査読有) Oncol Lett. 2014;7(3):595-601. doi: 10.3892/ol.2013.1777.

〔学会発表〕(計 3件)

Hiromi Kumon: Adenovirus vector carrying REIC/DKK-3 Gene (Ad-REIC): A new class of therapeutic cancer vaccines, International Society for Cell & Gene Therapy of Cancer (ISCGT), Seoul, Korea, Nov.14,2016.

Hiromi Kumon: New Horizons of Ad-REIC Gene Therapy, The 4th Symposium of East Asian Gene Therapy Innovative Group - Gene Therapy in East Asia - ,Okayama,Japan, Jun.21,2015.

Hiromi Kumon: Ad-REIC Gene Therapy for Prostate Cancer, The 4th International Forum on Frontiers in Urology (IFFU), Beijing,China, Apr.25,2015.

〔図書〕(計 1件)

公文 裕巳 株式会社エヌ・ティー・エス 『次世代がん治療』1 節担当  
固形がんに対する REIC 遺伝子組み込みアデノウイルス(Ad-REIC)製剤の開発.2017.  
In press.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

公文 裕巳 (KUMON,HIROMI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授  
研究者番号: 30144760

### (2)研究分担者

阪口 政清 (SAKAGUCHI,MASAKIYO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 70379840

### (3) 研究分担者

高本 篤 (TAKAMOTO,ATSUSHI)

岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号: 30716816

### (4) 研究分担者

江原 伸 (EBARA,SHIN)

岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号: 70379741

### (5) 研究分担者

佐々木 克己 (SASAKI,KATSUMI)

岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号: 80467745