

# REIC/Dkk-3 遺伝子によるヒト前立腺癌に対する 遺伝子治療の基礎実験

Fernando Abarzua

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 泌尿器病態学

キーワード：前立腺癌, REIC/Dkk-3, アポトーシス, JNK

## はじめに

REIC/Dkk-3 は Dkk ファミリーと呼ばれる分泌蛋白群の一種である。Dkk ファミリーは、Wnt 受容体を介して Wnt シグナル伝達を阻害することが知られている<sup>1,2)</sup>。Wnt シグナルは、細胞の増殖、分化、癌化などの重要な状況において多様な役割を果たしている<sup>3)</sup>。ため、REIC/Dkk-3 も同様に重要な生物学的機能を担うと考えられるが、大部分は未解明のままである。一方、我々は以前に、多くのヒト癌細胞株および癌組織で REIC/Dkk-3 遺伝子の発現が低下していることを見出した<sup>4-7)</sup>。また、プラスミドベクターを用いて REIC/Dkk-3 遺伝子を過剰に発現させると、ヒト骨肉腫細胞の成長が抑制されたとの報告もある<sup>2)</sup>。このような結果は、REIC/Dkk-3 が新規癌抑制遺伝子である可能性を示唆する。

前立腺癌は、欧米では最も一般的な悪性疾患であり、わが国でも増加傾向にある。ホルモン療法を含む様々な治療法が行われるが、多くの場合、最終的にホルモ

ン抵抗性を獲得して治療困難となる。今回我々は、前立腺癌細胞に REIC/Dkk-3 を過剰発現させることにより、c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介して腫瘍特異的にアポトーシスが起ることを発見したので報告する。またそのメカニズムの解明を目的とした基礎実験、ならびに臨床応用を見据えた動物実験の結果も合わせて述べる。

## ヒト前立腺癌における REIC/Dkk-3 の発現低下

我々はまず、様々な細胞で REIC/Dkk-3 の発現を検討した。正常ヒト線維芽細胞 (OUMS-24)、正常前立腺上皮細胞 (PrEC)、および正常前立腺間質細胞 (PrSC) を用いて行ったウエスタンブロット法では、REIC/Dkk-3 タンパク質は62から83 kDa の間で2本のバンドとして検出された (図1 A)。しかし、3種の代表的な前立腺癌細胞株 (PC3, LNCaP, DU145)、4種の前立腺癌以外の癌細胞株においては、REIC/Dkk-3 はほとんど検出されなかった。同様の結果は、免疫染色 (図1 B) でも確認された。REIC/Dkk-3 mRNA の発現低下も、定量的 RT-PCR によって確認された (図1 C)。

次に、ヒト前立腺組織での REIC/Dkk-3 タンパク質の発現を免疫染色により検討した (図1 D)。正常前立腺および前立腺肥大症の上皮細胞、間質細胞では

平成19年3月受理  
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7285 FAX：086-231-3986  
E-mail：akangoab@md.okayama-u.ac.jp

## プロフィール



1994年パラグアイのアスンシオン大学医学部を卒業し、泌尿器科医としての修練を受けた。その間、尿路内視鏡学と尿路悪性腫瘍に対して興味を抱き、この領域において世界をリードしている日本への留学を志した。そして2001年に日本政府文部科学省国費留学生として来日、公文教授の主宰する岡山大学泌尿器科にて1年間研修をし、2002年に岡山大学大学院に入学した。大学院 (病態制御科学専攻病態機構学講座) 入学後は、泌尿器病態学分野 (主任教授：公文裕巳) において尿路性器癌における遺伝子治療を中心としたトランスレーショナル・リサーチプロジェクトの一員として従事した。REIC 遺伝子の研究において Cancer Research に論文発表し、2005年3月の第20回ヨーロッパ泌尿器科学会でベストアブストラクトアワードを受賞した。また、本研究は2005年9月25日の山陽新聞の一面に「新たな癌抑制遺伝子」として掲載され反響を呼んだ。

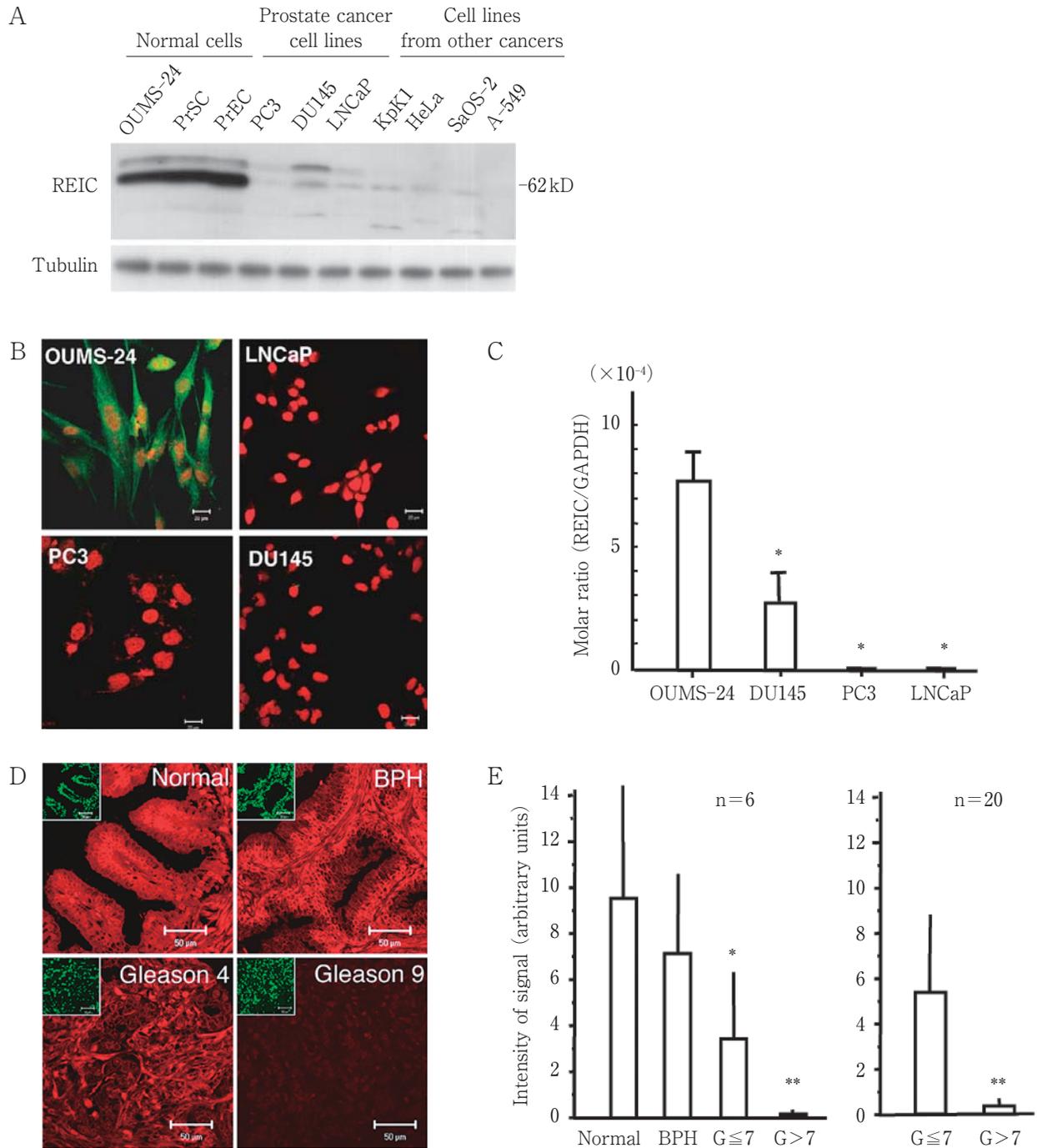


図1 正常細胞，癌細胞中の REIC/Dkk-3 の発現

A：ヒト正常細胞（OUMS-24：正常ヒト線維芽細胞，PrSC：前立腺間質細胞，PrEC：前立腺上皮細胞），ヒト癌細胞株（PC3，DU145，LNCaP：前立腺癌，KpK-1：腎癌細胞，HeLa：子宮頸癌細胞，SaOS-2：骨肉腫細胞，A-549：基底細胞癌）の REIC タンパク質レベルをウエスタン法で解析した。チューブリンはコントロールとして使用。

B：OUMS-24，前立腺癌細胞（PC3，DU145，LNCaP）における REIC/Dkk-3 タンパク質の免疫染色（緑色）。核は propidium iodide で染色した（赤色）。

C：正常ヒト線維芽細胞，前立腺癌細胞の REIC/Dkk-3 mRNA レベルをリアルタイム定量的 RT-PCR で解析した。GAPDH とのモル比で示す。  $p < 0.05$ 。

D：正常前立腺，前立腺肥大症，グリソン 4 および 9 の前立腺癌組織について REIC/Dkk-3 に対する免疫染色を行った。核は Hoechst 33258 で染色。低倍率。

E：LandMark tissue Microarray における REIC/Dkk-3 タンパク質の定量的分析（左）。グリソンスコア 8 以上と 7 以下の新鮮ヒト前立腺癌組織における REIC タンパク質の定量的分析（右）。BPH：benign hypertrophic prostate tissue；G：Gleason score，\*  $p < 0.05$ ；\*\*  $p < 0.01$ 。

REIC/Dkk-3 が検出されたが、前立腺癌では低下していた。さらに前立腺癌の悪性度の指標であるグリソンスコア (2-10) によって、サンプルをグリソンスコア 7 以下および 8 以上の 2 群に分け、REIC/Dkk-3 の発現を定量的に比較検討した結果、市販の前立腺組織マイクロアレイ (図 1 E 左)、および新鮮前立腺癌組織 (図 1 E 右) 共に、REIC/Dkk-3 の発現量は癌の異型度に比例して減少していた。

### REIC/Dkk-3 導入による腫瘍特異的アポトーシス誘導

REIC/Dkk-3 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて、PC3 に REIC/Dkk-3 を過剰発現させた。1 MOI の条件下で REIC/Dkk-3 を導入した PC3 細胞の REIC/Dkk-3 タンパク質レベルは、OUMS-24 と同程度であった (図 2 A)。導入数日後、ほとんどの PC3 細胞が培養容器の底から離れてい

た。この原因を探るため、REIC/Dkk-3 導入の36時間後に TUNEL 法で細胞を染色すると、前立腺癌細胞 (PC3, DU145, LNCaP) では多くの細胞が TUNEL 反応陽性であった。それに対して、正常細胞 (OUMS-24, 前立腺間質細胞, 前立腺上皮細胞) では稀であった (図 2 B)。PC3 では49%, DU145では24%, LNCaPでは41%が TUNEL 反応陽性であったが、正常細胞では1%未満であった (図 2 C)。遺伝子導入から36時間後の PC3 細胞の DNA を分析したところ、REIC/Dkk-3 導入群では、明らかな DNA ladder が観察された (図 2 D)。これらの結果は、もともと REIC/Dkk-3 発現がほとんど認められない前立腺癌細胞に REIC/Dkk-3 を過剰発現させると、選択的にアポトーシスを引き起こすことを示している。

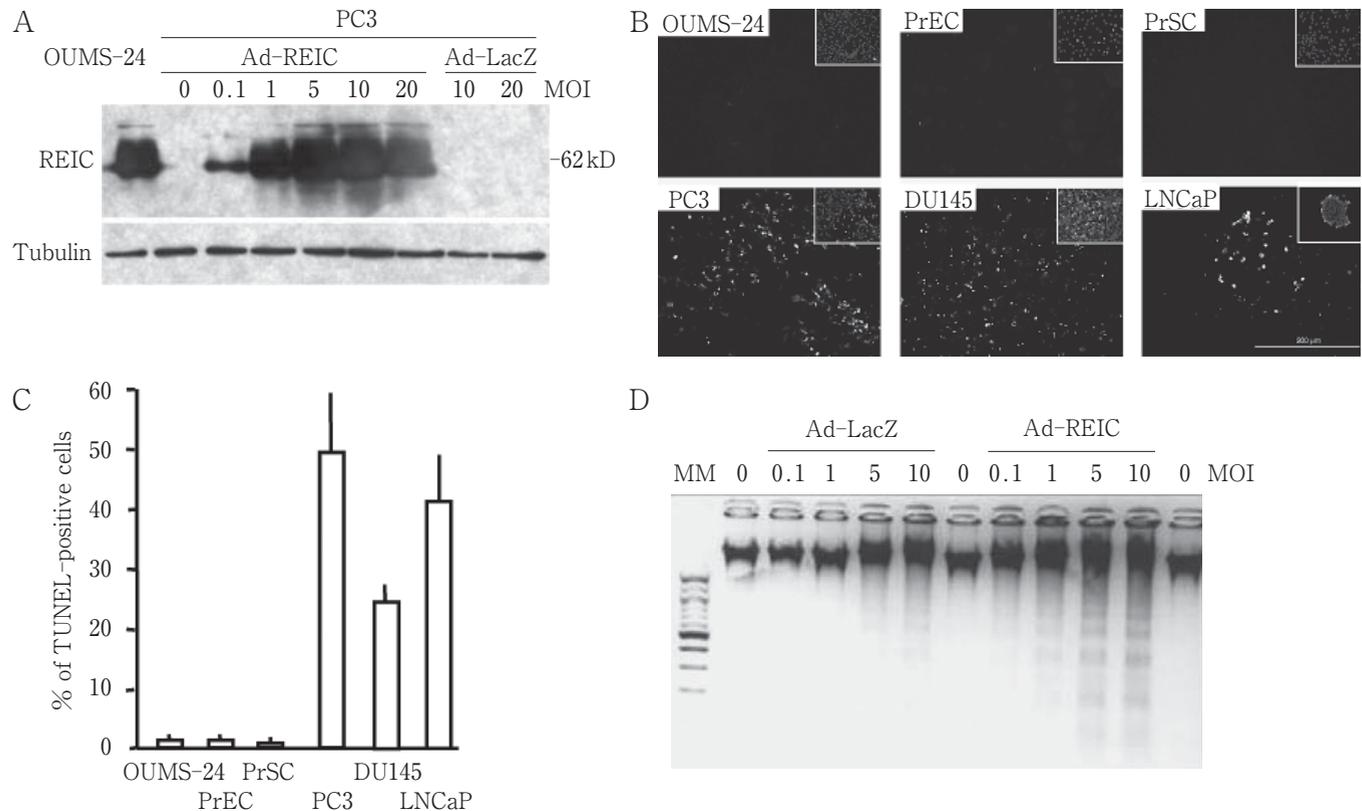


図2 REIC/Dkk-3 の過剰発現によるヒト前立腺癌細胞のアポトーシス誘導

A : アデノウイルスベクターを用いて REIC/Dkk-3 cDNA を導入後36時間の前立腺癌細胞 PC3 における REIC/Dkk-3 タンパク質の発現。OUMS-24は陽性コントロールとして使用。Ad-lacZ=lacZ 導入アデノウイルスベクター。

B : 10 MOI で導入後36時間における正常ヒト前立腺細胞 (OUMS-24, PrEC, PrSC) および前立腺癌細胞 (PC3, DU145, LNCaP) の TUNEL 染色 (緑)。右上は Hoechst 33258染色 (青)。

C : (B) と同条件下で計測した TUNEL 染色陽性細胞の割合。

D : 1 MOI 以上の Ad-REIC を導入した PC3 細胞で特有の DNA 断片が観察された。5 × 10<sup>5</sup> の PC3 細胞を撒いて1日後にウイルスベクターを作用させ36時間後に回収した。

## 腫瘍特異的アポトーシス誘導メカニズムの解明

REIC/Dkk-3 遺伝子による腫瘍特異的なアポトーシスの機序を知るため、PC3 細胞と正常ヒト線維芽細胞 OUMS-24 における、アポトーシスおよび細胞周期調節に関連する様々なタンパク質の発現レベルを調べた。その結果、REIC/Dkk-3 遺伝子を導入した PC3 細胞ではアポトーシス抑制作用を有する Bcl-2 タンパク質が減少していることが明らかになった (図 3 F)。Bax, Bad, Apaf-1, p53, p21 (CIP1/WAF1) および p16 (INK4a) では変化はなかった (結果は未提示)。

Bax 阻害剤である V5 は、アポトーシスを完全に抑制した (図 3 A, B)。細胞質からミトコンドリアへの Bax の移行は Bax 関連アポトーシス経路が働くきっかけとなるが、図 3 C は Bax が REIC/Dkk-3 の導入によってミトコンドリアに移行し、V5 によってその移行が抑制されることを示している。

Bax の上流に存在するアポトーシス関連因子のひとつに c-jun N-terminal kinase (JNK) があり<sup>8,9)</sup>、JNK は Bax のミトコンドリアへの移行を促すことが報告されている<sup>9)</sup>。SP600125 は、JNK の kinase 活性を特異的に阻害する薬剤であるが、これを PC3 細胞に加えたところ、REIC/Dkk-3 遺伝子導入によるアポトー

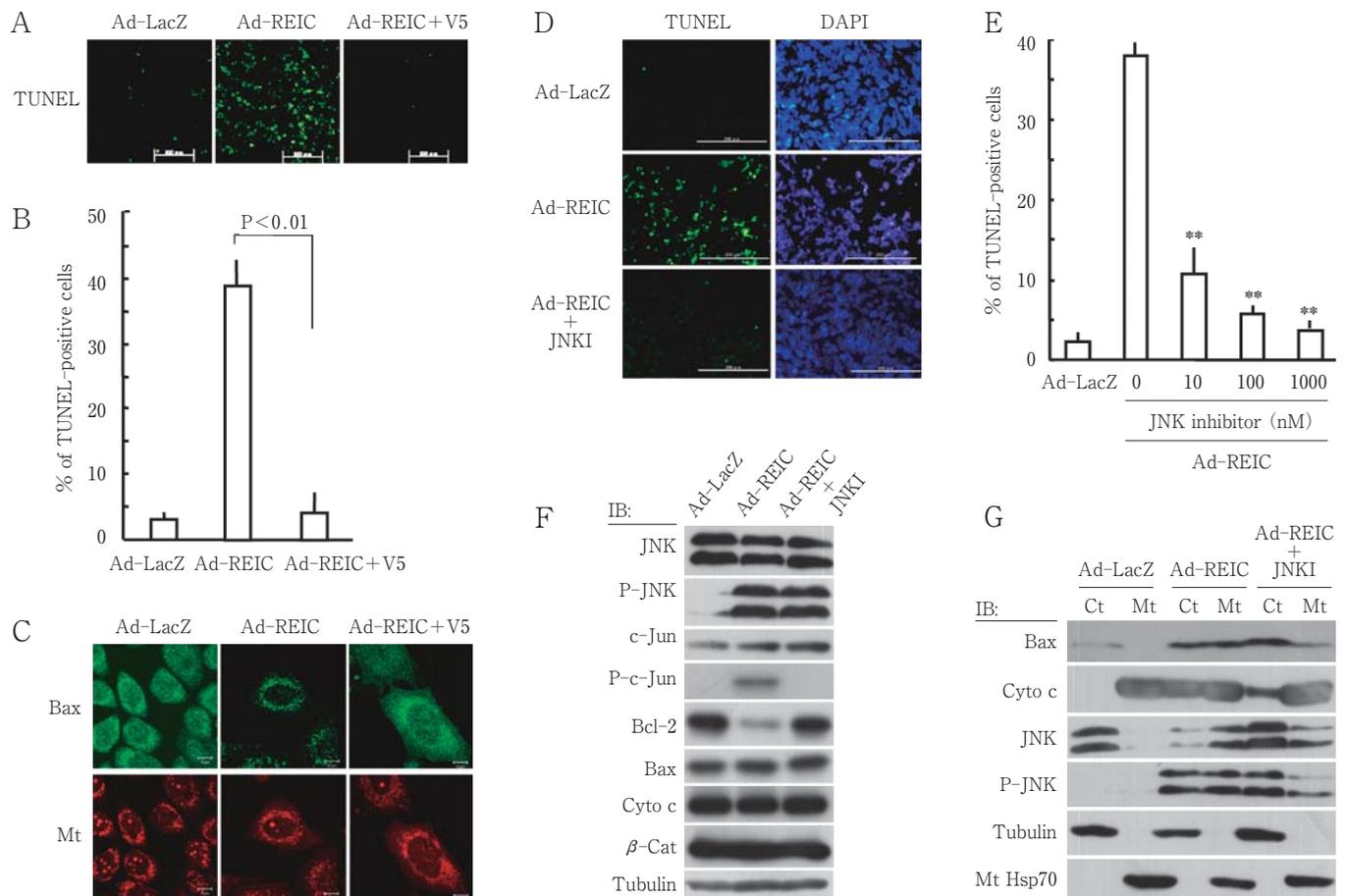


図3 Ad-REIC による PC3 細胞のアポトーシス誘導における Bax と JNK の関与  
A : 10 MOI で Ad-REIC, Ad-lacZ 導入後36時間における PC3 細胞の TUNEL 染色。Bax に対するペプチド抑制剤 (V5) は、導入一時間前より培地中に200 $\mu$ M加えた。スケールバー=200 $\mu$ m。  
B : Bax 抑制剤 V5 による PC3 細胞のアポトーシス抑制効果。TUNEL 陽性細胞数は(A)と同条件下で計測。  
C : Bax タンパク質の免疫染色。10 MOI のベクター投与36時間後の PC3 細胞。ミトコンドリアの細胞内局在は Mitotracker (Mt) にて染色。  
D : A と同様に処理した PC3 細胞の TUNEL 染色。JNK 阻害剤である SP600125を10nm用いた。  
E : JNK 阻害剤 SP600125による REIC/Dkk-3 誘導アポトーシスの抑制効果。TUNEL 陽性細胞数はCと同条件下にて計測。  
F : D と同様の PC3 細胞中のタンパク質をウエスタン法にて解析。P : phosphorylated ; cyto C : cytochrome c ;  $\beta$ -cat :  $\beta$ -catenin。  
G : D と同様の PC3 細胞から分画した細胞質とミトコンドリアにおけるタンパク質レベルをウエスタン法にて解析。

シスは濃度依存的に抑制された (図 3 D, E). Bax は PC3 細胞の細胞質で検出されるが, REIC/Dkk-3 導入細胞では著明にミトコンドリアへ移行していた (図 3 G). Bax のミトコンドリアへの移行はチトクロム C の細胞質への放出に関与しており, この移行は JNK 阻害剤 SP600125 によって抑制された. これらの結果より, REIC の過剰発現は JNK を活性化し, Bcl-2 蛋白レベルを減少させ, Bax のミトコンドリアへの移行を促して cytochrome C を細胞質に放出させ, 最終的にアポトーシスを起こすものと考えられる. 最近 Hsieh らは, REIC/Dkk-3 遺伝子の過剰発現は caspase 3 の活性化を通じて様々なヒト癌細胞でアポトーシスを起こすと報告しており<sup>10</sup>, caspase 3 は cytochrome C の下流でアポトーシスを担う主要因子として知られている.

### JNK より上流のメカニズムの解明をめざして

JNK の活性化が REIC/Dkk-3 による前立腺癌細胞のアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしていることが分かったが, JNK がどのような機序で活性化されるのか, またなぜ正常細胞ではアポトーシスが起これず, 癌細胞特異的にアポトーシスが誘導されるのかは明らかではない. その問題を解決するひとつの糸口として, HSP (熱ショックタンパク) や小胞体ストレスが挙げられる.

小胞体ストレスは, JNK の上流の伝達系路のひとつである. 我々は, 小胞体ストレスに関与する Bip や CHOP が REIC/Dkk-3 を過剰発現している癌細胞特異的に発現が亢進することを見出した. これは, REIC/Dkk-3 によって癌細胞特異的に小胞体ストレスが惹起されていることを示唆しており, 現在より詳細な解析を行っているところである.

また, マウス腎癌細胞株 RENCA においても REIC/Dkk-3 の過剰発現によりアポトーシスが誘導されることを確認した. この際, HSP 阻害剤を併用すると REIC/Dkk-3 の効果は増強され, HSP 誘導剤によりその効果は抑制された. ウェスタンブロット法, 免疫沈降法により HSP 阻害剤/誘導剤は JNK の活性化に影響していることが明らかになった. マウス正常線維芽細胞 NIH-3T3 においては, REIC/Dkk-3 の過剰発

現によりアポトーシスが誘導されることを確認した. この際, HSP 阻害剤を併用すると REIC/Dkk-3 の効果は増強され, HSP 誘導剤によりその効果は抑制された. ウェスタンブロット法, 免疫沈降法により HSP 阻害剤/誘導剤は JNK の活性化に影響していることが明らかになった. マウス正常線維芽細胞 NIH-3T3 においては, REIC/Dkk-3 の過剰発

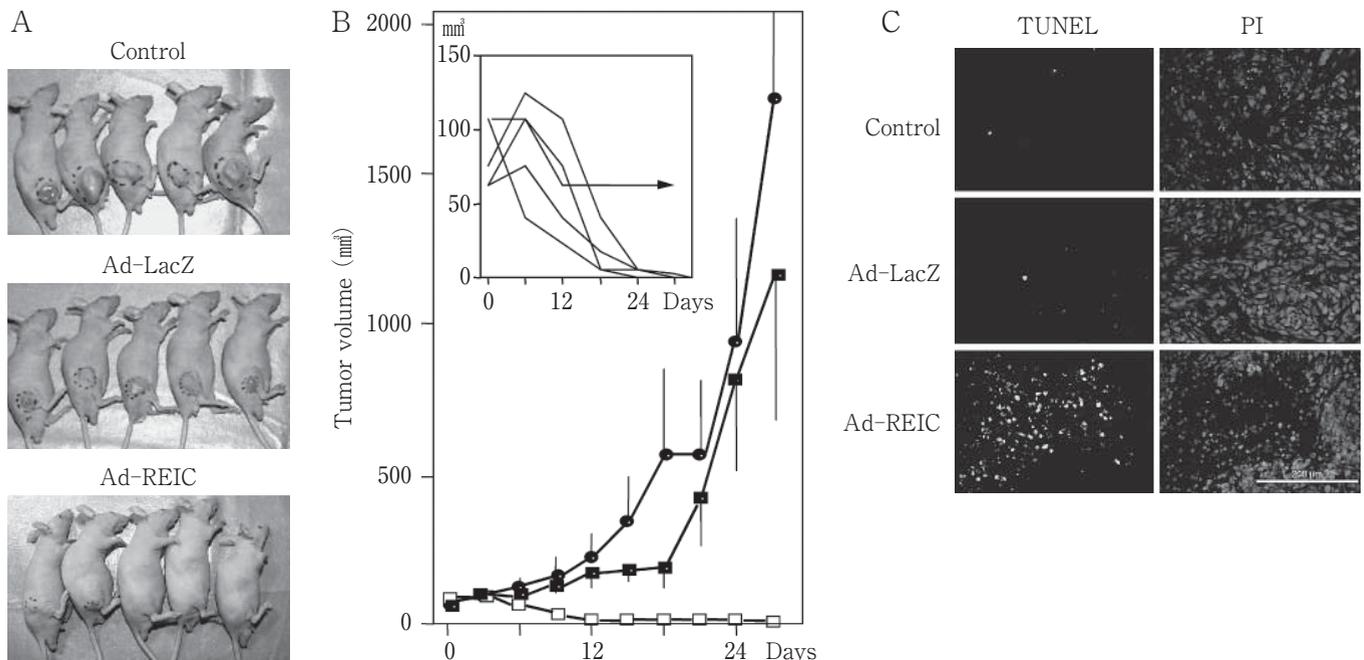


図4 スードマウス移植 PC3 細胞の腫瘍性増殖に対する Ad-REIC の効果

$2.5 \times 10^6$  個の PC3 細胞をスードマウス皮下に注入し, 1 週間後にウイルスベクター ( $2.5 \times 10^8$  pfu) もしくは PBS を腫瘍内に注入した. 腫瘍サイズは, 注入後 27 日間, 3 日毎に測定した.

A: 観察期間終了時の腫瘍外観.

B: 5 匹のスードマウスの平均腫瘍容積. 挿入図は REIC 注入したマウスの個々の腫瘍容積. ウイルス注入 30 日後, 5 匹中 4 匹のマウスで腫瘍が消失していた.

C: ウイルス注入 30 日後の腫瘍組織の TUNEL 染色. PI=核を視覚化するために propidium iodide で染色.

現のみではアポトーシスには至らないが、HSP 阻害剤を併用するとアポトーシスが誘導された。以上の結果は、REIC/Dkk-3 を過剰発現させた際の癌細胞と正常細胞の反応の相違には、小胞体ストレスや HSP が重要な役割を果たしていることを示唆する。

### REIC/Dkk-3 を用いた in vivo における研究

REIC/Dkk-3 遺伝子導入によるアポトーシス誘導効果を、動物実験で調べた。2.5×10<sup>6</sup>個の PC3 細胞をヌードマウスの皮下に注入し、1 週間後、腫瘍容積が 30~100cm<sup>3</sup>に達した時点で、REIC/Dkk-3 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを腫瘍中に注入した。対照群では、注入後 1 か月の観察期間中に腫瘍が徐々に増大した (図 4 A, B) のに対し、REIC/Dkk-3 投与群では、5 匹中 4 匹のマウスにおいて腫瘍が完全に消失した。さらに一匹のマウスにおいては、腫瘍は完全に消失はしなかったものの縮小を示し、観察期間を通じて縮小したままの状態を維持した。この腫瘍を観察期間終了後に切除し TUNEL 法で染色したところ (図 4 C)、多くの細胞が TUNEL 反応陽性を呈したのに対し、対照群の腫瘍ではアポトーシスは見られなかった。以上の結果は、REIC/Dkk-3 遺伝子が、p53<sup>11,12</sup> や mda-7<sup>13,14</sup> と同様に癌治療のターゲットになり得ることを強く示唆している。

### ま と め

前立腺癌細胞に REIC/Dkk-3 を過剰発現させることにより、選択的にアポトーシスを誘導することができた。アポトーシスにいたる経路において、JNK の活性化と Bax のミトコンドリアへの移行が主要な役割を担っていることが確認された。このアポトーシス誘導作用は、動物モデルにおいても著しい腫瘍抑制効果として表れた。今回の発見は、治療困難な前立腺癌に対する、新たな分子標的治療の地平を開拓することに繋がると我々は期待している。

### 文 献

- 1) Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A and Aaronson SA : Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* (2001) **3**, 683-686.
- 2) Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA and Gorlick R : Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res* (2004) **64**, 2734-2739.
- 3) Moon RT, Bowerman B, Boutros M and Perrimon N : The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* (2002) **296**, 1644-1646.
- 4) Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y and Namba M : A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) **268**, 20-24.
- 5) Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima O and Namba M : Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **289**, 257-263.
- 6) Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, Shimizu N and Namba M : Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* (2001) **19**, 117-121.
- 7) Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arao Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H and Huh NH : Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* (2004) **171**, 1314-1318.
- 8) Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D and Davis RJ : The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* (2002) **22**, 4929-4942.
- 9) Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N and Gotoh Y : JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J* (2004) **23**, 1889-1899.
- 10) Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT and Chen WY : Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* (2004) **23**, 9183-9189.
- 11) Chen PL, Chen YM, Bookstein R and Lee WH : Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* (1990) **250**, 1576-1580.
- 12) Fujiwara T, Cai DW, Georges RN, Mukhopadhyay T, Grimm EA and Roth JA : Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst* (1994) **86**, 1458-1462.
- 13) Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ, Young CS, Kitada S, Reed JC, Goldstein NI and Fisher PB : The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 14400-14405.
- 14) Fisher PB, Gopalkrishnan RV, Chada S, Ramesh R, Grimm EA, Rosengeld MR, Curiel DT and Dent P : mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene : from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol Ther* (2003) **2**, S23-37.