

アデノウイルスベクターを用いた REIC/Dkk-3 遺伝子導入による前立腺癌の転移抑制効果について

枝村 康平

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：Dkk-3, REIC, 前立腺癌, 転移

Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy for prostate tumor *in vivo* and *in vitro*

Kohei Edamura

Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒 言

前立腺癌は米国男性において最も罹患頻度の高い癌であり、癌関連死としては2番目に位置する疾病である¹⁾。近年、日本人男性においてその発生率が上昇傾向にあるとされ、高齢男性患者の泌尿器科診療の際には、常に留意を要する疾患となっている。前立腺癌の治療法には、根治的前立腺摘出術、抗男性ホルモン療法、放射線療法などがあり、比較的良好な治療成績が得られている。しかしながら、一部の症例では予後不良な転移をたどり、これら治療抵抗性前立腺癌に対する新しい治療法の開発は臨床の場において至急の課題となっている。

前立腺癌の進展にはしばしば、癌細胞のアポトーシスの抑制²⁾と浸潤能、移動能の上昇³⁾が伴うことが報告

されている。その過程では、促進的もしくは抑制的なエフェクターによってアポトーシスや転移が制御され^{4,5)}、また多数のタンパク質が抗腫瘍的な作用を示す事が報告されている⁶⁻⁹⁾。REIC/Dkk-3 遺伝子は、Wnt 受容体を介して Wnt シグナル経路を阻害する事が知られている Dickkopf (Dkk) 遺伝子ファミリーの一員で^{10,11)}、最近アポトーシスの誘導^{12,13)}や浸潤抑制^{14,15)}において役割を担っている事が報告された。

REIC/Dkk-3 遺伝子は、正常組織に比べてヒトの癌細胞株¹⁶⁻¹⁹⁾および癌組織^{13,20)}で発現が低下していることが報告されており、さらにグリソンスコアの高い癌検体ではその発現低下がより顕著であることも確認されている^{13,20)}。これらの知見は、REIC/Dkk-3 遺伝子が癌抑制遺伝子として機能するかもしれないこと、また、ヒトの癌を治療する新しい標的であり得ることを示している。

新しい治療法を探るため現在様々な遺伝子治療の臨床試験が行われているが、我々のグループもマウスモデル、臨床試験共にその可能性を示唆してきた²¹⁻²⁴⁾。特に前立腺癌に対する遺伝子治療に関し

平成20年6月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7287 FAX：086-231-3986
E-mail：koheee@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



昭和51年9月8日生
平成13年3月 宮崎医科大学医学部卒業
平成13年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院泌尿器科 医員（研修医）
平成14年3月 岡山中央病院 医師
平成16年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 入学
平成19年9月 同修了
平成18年7月 ベイラー医科大学 研究員
平成19年10月 テキサス大学 ポスドク
現在に至る

て、アデノウイルスをベクターとして用いた遺伝子導入システムはその高い導入効率により確かな有効性が報告されている^{13,25)}。今回我々はマウス REIC 遺伝子、ヒト REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて、マウス前立腺癌同所移植モデルでの腫瘍抑制効果、転移抑制効果について検討した。

方 法

1. 細胞株

T. C. Thompson 教授 (Baylor College of Medicine, Houston, TX) より RM-9 細胞の分与を受けた。これは Zipras/myc-9 を導入した mouse prostate reconstitution (MPR) システムにより作製されたマウス前立腺癌細胞である²⁶⁾。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 培地に 10% 牛胎児血清 (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY), 10mM HEPES を加えて培養した。

2. REIC/Dkk-3 導入アデノウイルスベクター

REIC cDNA をコスミド pAxCAwt に挿入し、COS-TPC 法 (Takara Bio, Shiga, Japan) によってアデノウイルスベクターに導入した。LacZ 導入アデノウイルスベクターをコントロールとして使用した¹³⁾。

3. 動物実験

C57/BL6 マウスをペントバルビタール (0.1mg/g body weight) の腹腔内注射で麻酔し、下腹部正中切開を加えて RM-9 細胞 (5.0×10^3 個/ $10 \mu\text{l}$ of Hanks' balanced salt solution) を前立腺 dorsal lobe に注入した。1 週間後、腫瘍径が 5 mm に達した時点でマウス REIC/Dkk-3 導入アデノウイルス (Ad-mREIC) もしくはヒト REIC/Dkk-3 導入アデノウイルス (Ad-hREIC) あるいは Ad-LacZ (1.2×10^8 PFU) を直接腫瘍内に注入した。同量の PBS をコントロールとして使用した。

4. 前立腺同所移植モデルの計測

我々が以前開発した経直腸超音波イメージングシステムを用いて腫瘍径を 3 日毎に計測した²⁷⁾。腫瘍容積は $1/2 \times (\text{短径})^2 \times (\text{長径})$ で求めた。

5. 組織学的解析

後腹膜リンパ節を摘出し、ホルマリン固定したのちパラフィン包埋した。ブロックを 5 mm 毎にスライスし、作製した切片をヘマトキシリン・エオジン染色して転移を検索した。

6. インベージョンアッセイ

24-well マトリゲルインベージョンチャンバー (BD Biosciences, Bedford, MA) を用いてインベージョンアッセイを行った。チャンバー上部に無血清 DMEM 培地で調整した RM-9 細胞 (2.5×10^5 個) を加え、10MOI の Ad-REIC もしくは Ad-LacZ をすぐに添加した。ウェル底部に 50% FBS 入り DMEM 培地を加え、37°C で 24 時間インキュベーションした。その後チャンバー上部の細胞を取り除き、メンブレン底部の細胞を固定してヘマトキシリンで染色し、200 倍視野にて浸潤細胞の観察を行った。% 浸潤は下記の計算式にて求めた。

$$\frac{\text{マトリゲルインサートメンブレンを浸潤している平均細胞数}}{\text{コントロールインサートメンブレンを移動する平均細胞数}} \times 100$$

細胞移動能の測定は、コントロールインサート (BD Biosciences, Bedford, MA) を用い、細胞を 1×10^5 個/well に調整して上記と同様の方法を用いた。

7. ザイモグラフィ

培養中の RM-9 に 10MOI の Ad-REIC または Ad-LacZ を加え、24 時間インキュベーションした後に無血清培地 Opti-MEM (GIBCO/BRL, Carlsbad, CA) に交換してさらに 24 時間インキュベーションした。各コンディション培地を回収、濃縮し、SDS サンプルバッファーと混濁して 1 mg/ml のゼラチンを含む 7.5% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、2.5% Triton X-100 で SDS を除去し、反応液中 (50 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mmol/l CaCl_2 , 1 $\mu\text{mol/l}$ ZnCl_2) で 37°C, 16 時間インキュベーションした。1% クマシーブリリアントブルー G250 (CBB-G250) で染色し、脱色液 (10% メタノール, 5% 酢酸) で適度に脱色した後 MMP 活性を観察した。

8. 統計学的解析

データの解析には、2 群間では Mann-Whitney の U 検定および Fisher の直接法を用いた。P < 0.05 の場合を有意差ありとした。

結 果

1. Ad-REIC の腫瘍内投与による前立腺腫瘍増殖の抑制作用

我々は以前、Ad-REIC による REIC タンパク質の

過剰発現が前立腺癌皮下腫瘍モデルにてアポトーシスを誘導する事を突き止めた¹³⁾。この結果を踏まえ、今回は前立腺癌同所移植モデルを用いて転移抑制効果の有無を確認し、遺伝子治療へ向けての新たなステップに進む事を目的とした。まず、この動物モデルにおける Ad-REIC の前立腺腫瘍増殖抑制効果を確認した。

腫瘍のモニタリングにはマウスを犠牲にすることなく計測可能な経直腸エコーシステムを使用した (図 1 A)。Ad-REIC を投与した群ではコントロール群に比べて顕著に腫瘍増大が抑制されていた (図 1 B)。摘出した前立腺腫瘍の TUNEL 染色を行ったところ、コントロール群に比べて Ad-REIC 群では多くの細胞が陽

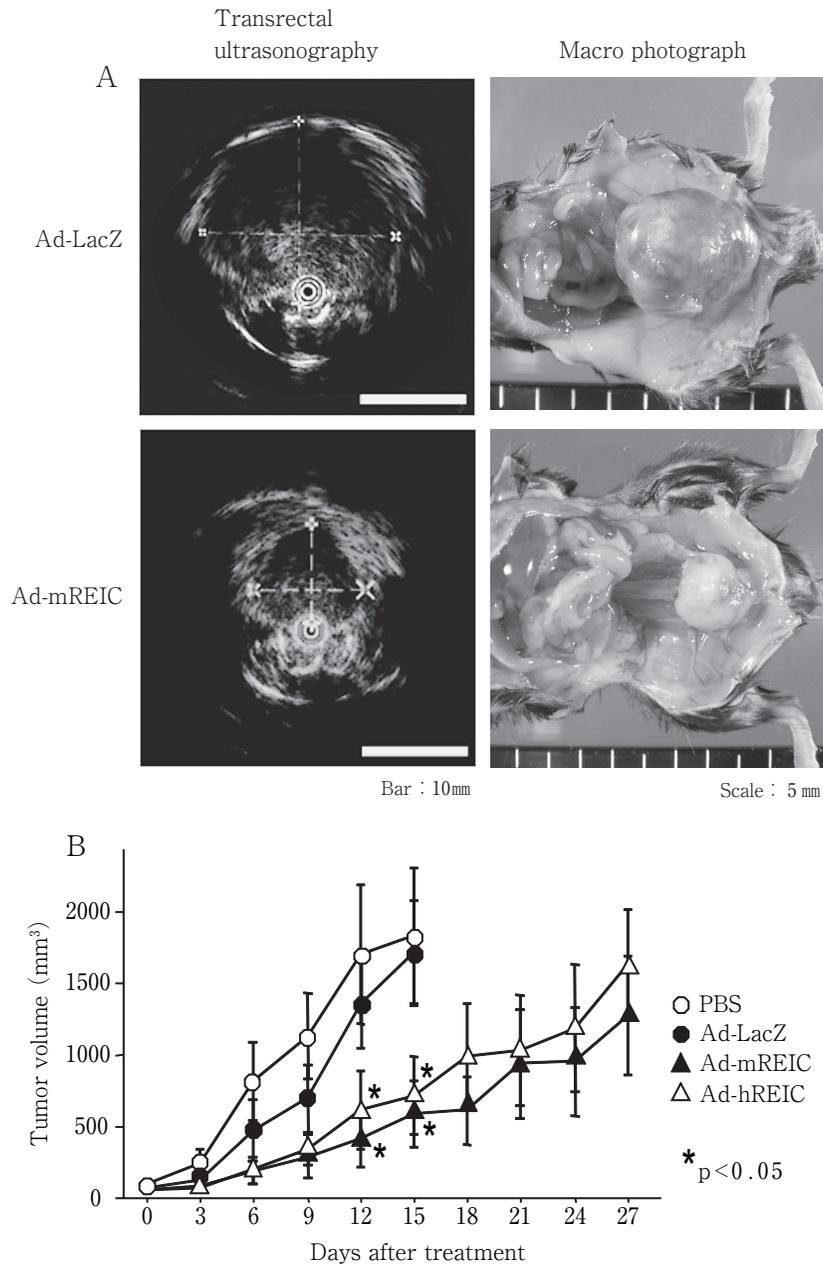


図 1 Ad-REIC の腫瘍内投与による前立腺腫瘍増殖の抑制 (A, B)

A : Representative macroscopic and transrectal ultrasonographic views of orthotopic RM-9 tumors on day 15 after Ad-mREIC or Ad-LacZ treatment.

B : Orthotopic RM-9 tumors were formed and injected intratumorally with Ad-mREIC, Ad-hREIC, Ad-LacZ, or PBS on treatment day 0. Tumor size was measured by TRUS and data represent the average of 5 individual mice in each group; bars, \pm SEM. A significant difference was observed (* $p < 0.05$) between the Ad-REIC and Ad-LacZ treatments.

性反応を示した。(data not shown).

2. Ad-REIC 腫瘍内投与によるリンパ節転移の抑制作用

RM-9 細胞の前立腺注入によって、局所の前立腺腫

瘍が形成されるのみならず後腹膜リンパ節転移が引き起こされる²²⁾。前立腺腫瘍容積が大きいほどリンパ節転移の頻度が高い傾向があるため、経直腸エコーで経時的に観察し、前立腺腫瘍容積が750mm³に達した時点で

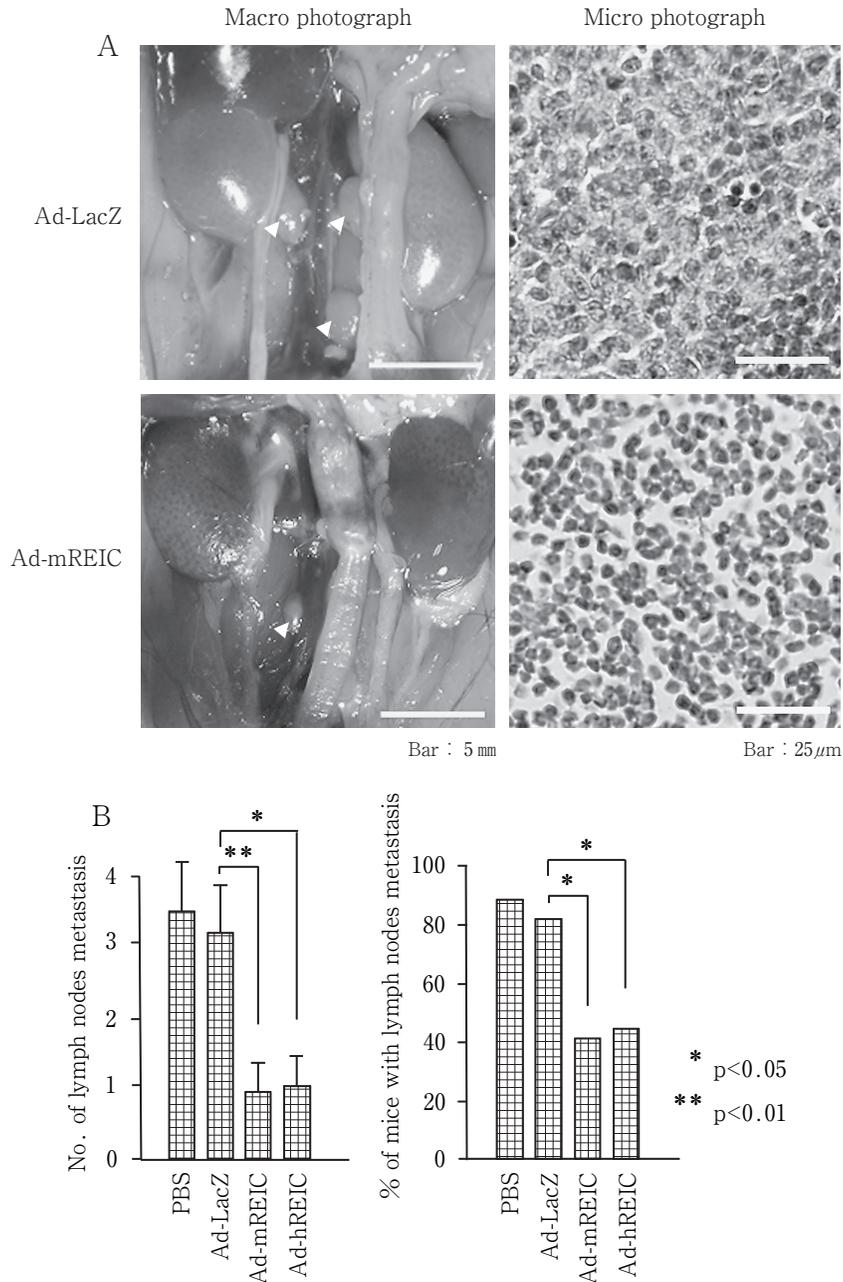


図2 Ad-REIC 腫瘍内投与によるリンパ節転移の抑制作用 (A, B)

A: Representative macroscopic and microscopic views of RM-9 metastasis in the retroperitoneal lymph nodes after Ad-mREIC or Ad-LacZ treatment. The mice in each group were sacrificed when the tumor volume reached an average of 750mm³ by TRUS measurement. Arrowheads indicate the retroperitoneal lymph nodes. The lymph node sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological RM-9 metastasis was revealed in the lymph node of the Ad-LacZ-treated mouse but not of the Ad-mREIC-treated mouse.

B: The number of metastatic lymph nodes and incidence of metastasis were analyzed when the tumor volume reached an average of 750mm³ by TRUS measurement. The data represent the average of 10 to 12 individual mice in each group; bars, \pm SEM, or percentage of animals with lymph node metastasis.

リンパ節の摘出，組織学的検索を行った（図 2 A）．リンパ節転移の個数と頻度を測定したところ，Ad-LacZ 群では 3.2 ± 0.6 個のリンパ節転移を認めたのに対し，Ad-mREIC 群では 0.9 ± 0.4 個と減少していた（図 3 B）．さらに，コントロール群では82%の頻度でリンパ節転移を認めたが，Ad-REIC 群では42~45%の転移陽性率に留まっていた（図 2 B）．

3. Ad-REIC 投与による RM-9 細胞の浸潤，移動能抑制作用

細胞の浸潤，移動能は転移活性を決定する重要な因

子であり²⁸⁾，マトリゲルインベージョンアッセイシステムはその活性の測定に有用である事は以前より報告されている^{14,29)}．このシステムを用いて RM-9 細胞の浸潤活性を測定したところ，コントロール群に比べ Ad-REIC 群では活性が約50%に低下していた（図 3 A）．また，同システムのチャンバーを交換して細胞の移動能を測定した結果，Ad-REIC 群の移動細胞数は約3分の1に減少していた（図 3 A）．なお，同条件での形態的変化，アポトーシスの誘導等は確認されなかった．

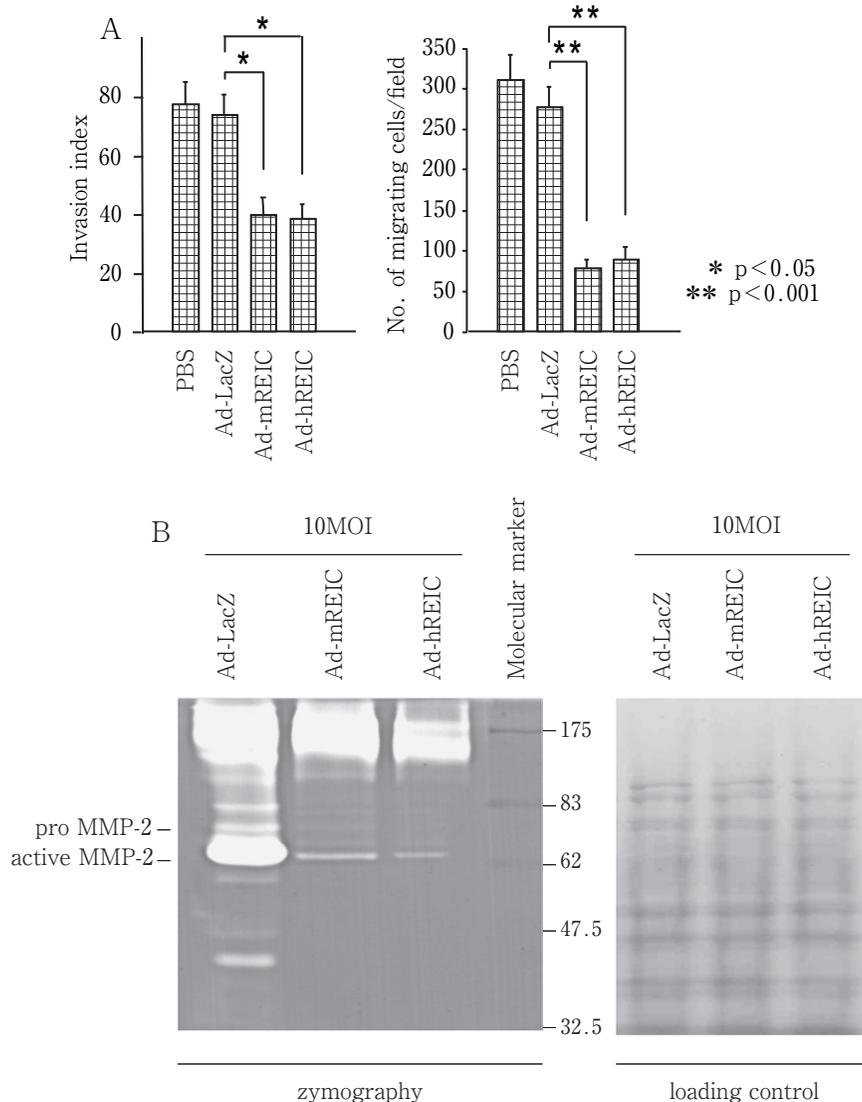


図 3 Ad-REIC 投与による RM-9 細胞の浸潤，移動能抑制作用 (A, B)

A : In vitro invasion assay through Matrigel and transwell migration assay were performed as described in the “Materials and Methods.” Data represent the average of 3 independent experiments in each group; bars, \pm SEM.

B : Extracellular secretion of both the pro and active forms of MMP-2 was determined by zymography. As a loading control, a similarly loaded gel was run, electroblotted onto a nitrocellulose membrane, and stained with CBB-G250. The experiment was done in triplicate.

4. Ad-REIC 投与による RM-9 細胞の MMP-2 分泌抑制

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は細胞外基質を分解し, 癌細胞の浸潤, 転移に関与することが知られている⁵⁾. Ad-REIC による浸潤抑制作用と MMP 活性の関連について検討するためゼラチンゼイモグラフィを行った. コントロール群では潜在型, 活性型から成る 2 本の MMP-2 バンドを確認できた³⁰⁾, Ad-REIC 群では明らかなシグナルの低下を認めた. 特に活性型 MMP-2 のシグナル低下が顕著であった (図 3 B). 各治療群の生存期間を検討した結果, Ad-mREIC または Ad-hREIC を投与した群において明らかな生存期間の延長を認めた (data not shown).

結 論

マウス前立腺癌細胞 RM-9 の同所移植モデルにおいて, 単回の Ad-REIC 腫瘍内投与による遺伝子導入で, 腫瘍増殖, リンパ節転移の抑制が可能であった. その作用メカニズムとして, REIC タンパク質発現によるアポトーシス誘導および MMP-2 活性抑制作用が重要と考えられた. 前立腺癌に対し, Ad-REIC を用いた局所遺伝子治療が有用である可能性が示唆された.

文 献

- 1) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ : Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* (2005) 55, 10-30.
- 2) Rittmaster RS, Thomas LN, Wright AS, Murray SK, Carlson K, Douglas RC, Yung J, Messieh M, Bell D, Lazier CB : The utility of tissue transglutaminase as a marker of apoptosis during treatment and progression of prostate cancer. *J Urol* (1999) 162, 2165-2169.
- 3) Sehgal I, Baley PA, Thompson TC : Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* (1996) 56, 3359-3365.
- 4) Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G : Apoptosis : target of cancer therapy. *Clin Cancer Res* (2002) 8, 2024-2034.
- 5) Curran S, Murray GI : Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* (1999) 189, 300-308.
- 6) Ren C, Li L, Goltsov AA, Timme TL, Tahir SA, Wang J, Garza L, Chinault AC, Thompson TC : mRTVP-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities. *Mol Cell Biol* (2002) 22, 3345-3357.
- 7) Watanabe M, Nasu Y, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nagai A, Sasano T, Shimada T, Daida H, Kumon H : Adeno-associated virus 2-mediated intratumoral prostate cancer gene therapy : long-term maspin expression efficiently suppresses tumor growth. *Hum Gene Ther* (2005) 16, 699-710.
- 8) Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, Opolon P, Menashi S, Soria C, Yeh P, Perricaudet M, Lu H : AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum Gene Ther* (2001) 20, 515-526.
- 9) Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME : Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* (2001) 61, 5284-5288.
- 10) Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, et al. : Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* (1999) 238, 301-313.
- 11) Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C : Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* (2002) 417, 664-667.
- 12) Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT, Chen WY : Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* (2004) 23, 9183-9189.
- 13) Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH : Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* (2005) 65, 9617-9622.
- 14) Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA, 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.
- 15) Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK : Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* (2006) 25, 5027-5036.
- 16) Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, 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.
- 17) Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima O, 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.
- 18) Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N, Shimizu K : Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in

- human tumor cells. *Gene* (2002) 282, 151-158.
- 19) Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arai Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H, Huh NH : Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* (2004) 171, 1314-1318.
 - 20) Kawano Y, Kitaoka M, Hamada Y, Walker MM, Waxman J, Kypka RM : Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* (2006) 25, 6528-6537.
 - 21) Nasu Y, Timme TL, Yang G, Bangma CH, Li L, Ren C, Park SH, DeLeon M, Wang J, Thompson TC : Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med* (1998) 4, 1062-1064.
 - 22) Nasu Y, Bangma CH, Hull GW, Lee HM, Hu J, Wang J, McCurdy MA, Shimura S, Yang G, Timme TL, Thompson TC : Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer : suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther* (1999) 6, 338-349.
 - 23) Nasu Y, Djavan B, Marberger M, Kumon H : Prostate cancer gene therapy : outcome of basic research and clinical trials. *Tech Urol* (1999) 5, 185-190.
 - 24) Watanabe M, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nasu Y, Nagai A, Shimada T, Daida H, Kumon H : Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther* (2005) 12, 1126-1132.
 - 25) Nasu Y, Kusaka N, Saika T, Tsushima T, Kumon H : Suicide gene therapy for urogenital cancer : current outcome and prospects. *Mol Urol* (2000) 4, 67-71.
 - 26) Lu X, Park SH, Thompson TC, Lane DP : Ras-induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* (1992) 70, 153-161.
 - 27) Kusaka N, Nasu Y, Arata R, Saika T, Tsushima T, Kraaij R, Bangma CH, Kumon H : Transrectal ultrasound for monitoring murine orthotopic prostate tumor. *Prostate* (2001) 47, 118-124.
 - 28) Lester BR, McCarthy JB : Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* (1992) 11, 31-44.
 - 29) Albini A : Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. *Pathol Oncol Res* (1998) 4, 230-241.
 - 30) Vayalil PK, Katiyar SK : Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* (2004) 59, 33-42.

