

新規がん抑制遺伝子 REIC/Dkk-3 によるがん遺伝子治療

柏倉 祐司

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ナノバイオ標的医療イノベーションセンター

キーワード：REIC/Dkk-3, 遺伝子治療, アポトーシス, 小胞体ストレス, 抗腫瘍免疫

Cancer gene therapy by a novel tumor suppressor gene, REIC/Dkk-3

Yuji Kashiwakura

Innovation Center Okayama for Nanobio-Targeted Therapy, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

REIC/Dkk-3は岡山大学で発見された癌治療遺伝子であるが、その強い抗腫瘍活性と高い汎用性から国内外から非常に高い注目を受けている。林原賞を頂いた対象論文は悪性中皮腫に対するREIC/Dkk-3遺伝子治療を内容とするものであるが、我々は近年精力的にREIC/Dkk-3研究を推進しておりその論文で紹介できる内容はまさに「氷山の一角」にすぎない。REIC/Dkk-3の理解を深めできるだけ多くの研究者の興味を喚起するために、本稿は一論文の紹介に留めず我々がここ数年取り組んできたREIC/Dkk-3関連研究全体を俯瞰する内容とした。

REIC/Dkk-3 遺伝子及び蛋白

REIC/Dkk-3は、岡山大学でヒト正常線維芽細胞の不死化に伴って発現が低下する遺伝子として同定さ

れ、後に *Xenopus* の頭部形成に関わる *Dkk* (*dickkopf*) 遺伝子ファミリーの哺乳類メンバーと相同であることが明らかになったものである¹⁾。線維芽細胞をコバルト照射するとほとんどの細胞は細胞死を起こすか増殖を停止する（静止細胞）、増殖を停止しない（不死化）細胞の mRNA と静止細胞の mRNA とを用い *subtractive hybridization* を行い、不死化細胞で発現が著しく低下ないし消失している mRNA がプロファイリングされた。その中の未知の mRNA で *Dkk* 遺伝子 family と同性的の高いものとして REIC (Reduced Expression in Immortalized Cell)/*Dkk-3* が同定され、われわれはその癌治療遺伝子としてのポテンシャルに着目してきた。哺乳類の *Dkk* はこれまで4つの遺伝子が知られており、*Dkk-1* は分泌タンパク質として LRP-5/-6 と結合することで細胞外から Wnt シグナルを負に制御すると報告されている²⁾。REIC/*Dkk-3* のライガンドは未だに同定されていないが、*Dkk-1* とは異なるメカニズムで細胞増殖抑制やアポトーシス誘導を行い、癌化抑制・癌細胞死誘導を制御する分子であると考えられる。REIC/*Dkk-3* 遺伝子は染色体11p15.1に位置し9つの exon, 2つの promoter からなる1050bp cDNA, 350アミノ酸, 約50~70kDa (糖鎖付加の度合

平成21年4月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-6625 FAX：086-235-6625
E-mail：yu-kashi@cj9.so-net.ne.jp

プロフィール



昭和44年4月10日生
平成8年3月 岡山大学医学部卒業
平成16年3月 順天堂大学大学院医学研究科博士課程修了
平成8年4月 東京通信病院内科研修医
平成10年4月 東京通信病院循環器内科専修医
平成11年11月 順天堂大学循環器内科医員
平成16年4月 順天堂大学循環器内科助手
平成16年9月 米国ジョンスホプキンス大学循環器内科・博士研究員
平成18年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
ナノバイオ標的医療イノベーションセンター特任講師
平成21年4月 同准教授
現在に至る

いにより違う)の蛋白である。4つの(putative) N-glycosylation site, 2つの coiled-coil 及び cysteine rich domain を持つ分泌蛋白であるが, 上述した通りそのライガンドは同定されていない。広範な癌細胞及び不死化細胞でその発現低下が認められるが, その要因として promoter 領域のメチル化によるエピジェネティックなサイレンシングによることが報告されている³⁾。

REIC/Dkk-3 アデノウイルスによる癌遺伝子治療

まず, REIC/Dkk-3 発現はヒトの非小細胞肺癌でも著しく低下しており, プラスミドを用いて REIC/Dkk-3 遺伝子を強制発現させた時有意な増殖抑制が認められた⁴⁾。さらに, REIC/Dkk-3 は肝細胞癌, 食道癌, 胃癌, 前立腺癌, 腎細胞癌などの広範囲のがん種において高頻度に発現が低下していることから, REIC/Dkk-3 は癌抑制遺伝子として機能している可能性が考えられた⁵⁾。我々は REIC/Dkk-3 のもつ癌抑制遺伝子としての機能を実証するため, 臨床検体の発現解析に加えて, REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスによるヒト前立腺癌細胞並びにヒト悪性中皮腫細胞株でのアポトーシス誘導能とそのメカニズムの解析を行った。

1. 前立腺癌

前立腺癌では, 検討した52例全てのヒト前立腺癌組織で蛋白発現が低下しており, 低下の程度は組織学的悪性度に相関し, Gleason Score 8 以上の症例では完全に消失していた。In vitro でヒト前立腺癌由来株 PC 3 細胞に REIC/Dkk-3 アデノウイルス(以下 Ad-REIC)を感染させると, 対象(LacZ アデノウイルス, 以下 Ad-LacZ)に比較して有意にアポトーシスが誘導された。そのアポトーシスの機序として c-jun N 末端 Kinase (JNK) の活性化に起因する Bax のミトコンドリア移行と Bcl-2 のダウンレギュレーションが直接的に関与することが証明された。このことは何らかの細胞内ストレスが原因となり JNK が活性化しミトコンドリアを介するアポトーシス経路が直接的に活性化されたものと考えられた。また, 前立腺癌細胞株ではホルモン感受性や p53の有無に関わらずアポトーシスが誘導されるのに対し, 正常前立腺上皮由来細胞や線維芽細胞ではアポトーシスは全く誘導されなかった(癌選別的アポトーシス)。In vivo 実験では, PC 3 細胞由来ヌードマウス皮下腫瘍に Ad-REIC (2.5 ×

10⁸pfu/100ml PBS) を1回局所注入するだけで著明な腫瘍縮小効果が認められた⁶⁾。

次に, 同所性前立腺癌マウスモデルで, Ad-REIC (上記と同量)局注が腫瘍容量を縮小させるだけでなく腹腔内リンパ節転移を著明に抑制することが確認された⁷⁾。その機序として MMP-2 産生抑制が考えられ, REIC が何らかの機序により腫瘍のプロテアーゼ産生を低下させ, 転移, 浸潤を抑制することが明らかとなった。これらのデータは REIC/Dkk-3 の強制発現がアポトーシス誘導作用とともに, 癌抑制遺伝子としての幅広い抗癌化作用を有することを示唆するものである。

その他の尿路生殖器癌を用いた治療実験でも Ad-REIC の有効性は確認されており⁸⁾, 腎細胞癌株ではこのアポトーシスの誘導が JNK 経路を阻害するヒートショックタンパク質などのストレス応答タンパク質の発現状態と負に関連すること⁹⁾, さらに, 膀胱癌細胞株では, アポトーシスの誘導が内因性 Bcl-2 の発現状態と負に関連することも明らかにしている。

2. 悪性中皮腫

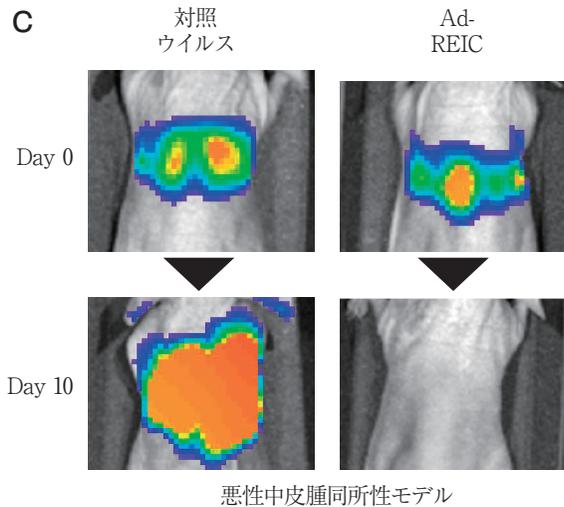
悪性中皮腫に対する遺伝子治療に関しては, 1990年代から始まっており, 自殺遺伝子や, IL-2, interferon- α などの臨床研究 Phase I / II において一定の効果をあげているものの, より効果的な遺伝子治療システムの構築が待望されている。我々は, REIC/Dkk-3 遺伝子にその治療遺伝子としての可能性を見出し, 悪性中皮腫に対する抗腫瘍効果を検討した。組織学的発現解析では, 検討したヒト悪性中皮腫組織35例中31例(89%)で正常胸膜組織に比較して REIC/Dkk-3 蛋白発現が低下しており(図1 A), また検討した4種類のヒト由来の不死化悪性中皮腫細胞(H28, 211H, H2032, H2052)全てで発現が低下していた。211H 細胞において Ad-REIC 感染がアポトーシスを起こし, その機序は前立腺癌同様 JNK リン酸化によるミトコンドリア-アポトーシス経路の活性化(カスパー3の活性化)であること, その JNK リン酸化が小胞体ストレス(endoplasmic reticulum stress: ER stress)に起因することなどを明らかにした(図1 B)。治療実験においては211H 細胞の同所性モデルマウスに対し Ad-REIC (2 × 10⁸pfu/100ml PBS) を胸腔内投与したところ単回投与で有意に腫瘍容量が縮小し(図1 C), また生存率の改善がみられる(図1 D)という有望なものであった¹⁰⁾。こうした結果から REIC/Dkk-3 遺伝子治療は将来的に悪性中皮腫治療の一翼を担う可能性

A

●ヒト悪性中皮腫組織において REIC の発現は高率に低下

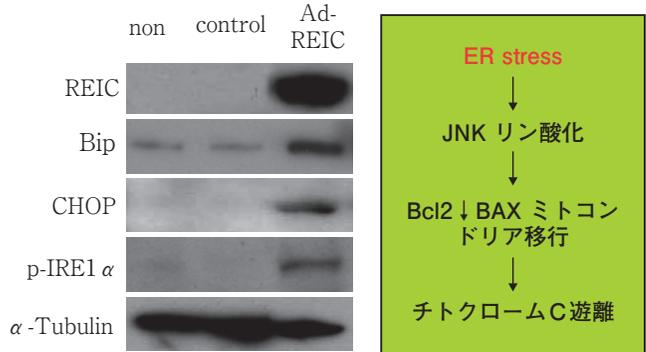
REIC 発現	悪性中皮腫	正常胸膜
(+++)	0	5
(++)	0	4
(+)	4	1
(-)	31	0
Negative/ Total (%)	31/35 (89%)	0/10 (0%)

C



B

●Ad-REIC の抗腫瘍メカニズムの解明—
小胞体ストレスを介するアポトーシス誘導



D

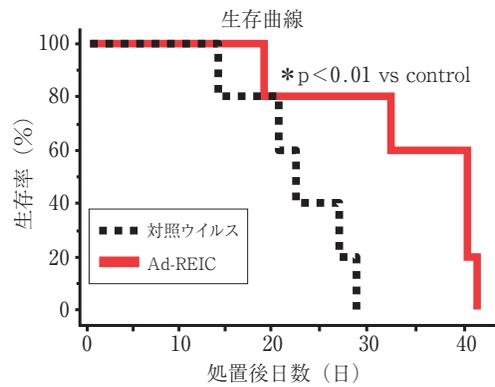


図 1

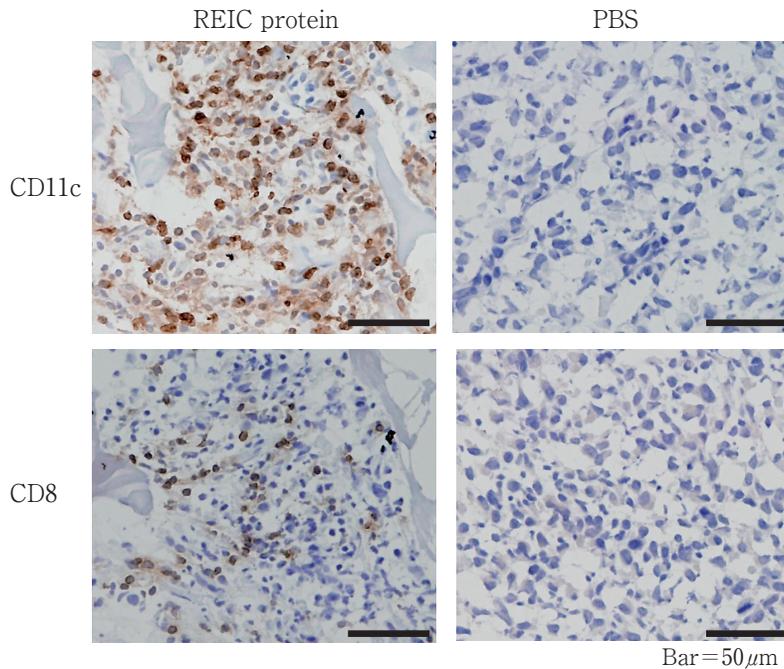


図 2 ヒト REIC タンパク質の腫瘍内局所投与により、CD11c 細胞及び CD8 細胞が腫瘍内へ浸潤。REIC タンパク質が、抗癌免疫活性の上昇に関与する可能性を示唆。

が十分にあると考えられた。

REIC 小分子化とポリマーによる REIC/Dkk-3 遺伝子治療

ウイルスベクターは抗原性などの問題で用途が限られる場合がある。近年高分子ポリマーの固形癌に対するパッシブターゲティングが EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) 効果という癌組織特異的な親和性によってもたらされることが明らかにされ、高分子素材による癌への遺伝子導入が着目されている。我々はウイルスベクターに代わる遺伝子運搬体として陽イオン生分解性ポリマーに着目した。そこでまず、ポリマーに結合させる REIC/Dkk-3 遺伝子の量を出来るだけ多くするために REIC/Dkk-3 の癌抑制遺伝子としての最小機能単位を検討し、REIC/Dkk-3 遺伝子の最小化を図った。そして数種類の REIC/Dkk-3 truncation を作成し行った実験で N 末端 78 アミノ酸 (REIC¹⁻⁷⁸) が全長 REIC に比較しより効率的に小胞体ストレスを引き起こし、さらにアポトーシスを誘導することをつきとめた。また、その遺伝子断片は正常細胞には全く細胞障害性を示さなかった (選択的癌細胞死の保持)。更に一定の比率で REIC¹⁻⁷⁸ と生分解性ポリマー (日東電工) と併用することで強力な *in vivo* 抗腫瘍効果を持つことを明らかにした¹¹⁾。生分解性ポリマーは、文字どおり生分解性であることから細胞内に取り込まれ高分子から毒性の低い低分子へ速やかに分解される。既存のトランスフェクション試薬に比較し遺伝子導入の際の細胞毒性は極めて低く、*in vitro* の実験では試薬による影響がほとんど無視できる。一方で遺伝子導入効率は細胞によっては従来の試薬とほぼ同等であり、かつ細胞障害性が低い。更にポリマーに対する抗体産生は通常認められず、「反復投与」が可能であることもウイルスベクターにはない大きな魅力である。

REIC 分泌蛋白の抗腫瘍免疫活性

REIC/Dkk-3 は分泌蛋白であるがそのレセプターは未だに不明である。しかし、マウスを用いた REIC/Dkk-3 遺伝子治療実験において、投与した腫瘍内に極めて広範に細胞死が観察されることから、REIC/Dkk-3 蛋白が何らかのバイスタンダー効果又は抗腫瘍免疫活性をもつことが早くから指摘されていた。我々はヒト REIC/Dkk-3 蛋白を精製しヒト末梢血単球

に添加したところ、単球の形態が樹状様細胞に変化し CD86 や CD40 などの樹状細胞特異的表面抗原マーカーを発現することを発見した¹²⁾。さらに精製ヒト REIC/Dkk-3 蛋白をマウス前立腺癌細胞由来皮下腫瘍に直接複数回注入したところ腫瘍塊が縮小し、その腫瘍切片において CD11c 陽性細胞と CD8 陽性細胞が集ぞくしていることが観察された (図 2)。これらは REIC/Dkk-3 蛋白が未知のレセプターを介して単球の樹状様細胞への分化を促進することで最終的に killer T cell を活性化し、抗腫瘍活性を発揮することを強く示唆したものであった。また同所性前立腺癌の肺転移マウスモデルにおいて Ad-REIC の前立腺癌局所投与後に肺転移巣も縮小することから、Ad-REIC が ER stress で腫瘍細胞にアポトーシスを引き起こすと同時に、細胞死した又は Ad-REIC に抵抗性のある腫瘍細胞から分泌された REIC/Dkk-3 蛋白が上記の抗腫瘍免疫メカニズムにより局所及び遠隔腫瘍を縮小させる可能性が高いと考えている。これらは Ad-REIC のヒト臨床投与の有用性と REIC/Dkk-3 蛋白治療の高いポテンシャルを示唆するものである。

ま と め

一連の研究において REIC/Dkk-3 が広範な癌細胞に強力な抗腫瘍効果を持つことが明らかになった。喫緊の課題は Ad-REIC のヒト臨床試験の開始であるが、ポリマーを用いた非ウイルス遺伝子治療そして REIC/Dkk-3 蛋白治療等の魅力ある治療戦略を更に臨床実用に近づけることが今後の使命であると考えている。林原賞の受賞を契機に更に精進していきたい。

謝 辞

今回の林原賞受賞にあたり公文裕巳教授に多大なる御指導を賜りましたこと、この場をお借りして深謝申し上げます。

文 献

- 1) 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.
- 2) Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C : LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* (2001) 411, 321-325.
- 3) 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

- tion in human tumor cells. *Gene* (2002) 282, 151-158.
- 4) Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, Shimizu N, Namba M : Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* (2001) 19, 117-121.
 - 5) Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT, Chen WY : Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* (2004) 23, 9183-9189.
 - 6) 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.
 - 7) Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M, Kashiwakura Y, Ebara S, Saika T, Watanabe M, Huh NH, Kumon H : Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* (2007) 14, 765-772.
 - 8) Tanimoto R, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH : REIC/Dkk-3 as a potential gene therapeutic agent against human testicular cancer. *Int J Mol Med* (2007) 19, 363-368.
 - 9) Abarzua F, Sakaguchi M, Tanimoto R, Sonogawa H, Li DW, Edamura K, Kobayashi T, Watanabe M, Kashiwakura Y, Kaku H, Saika T, Nakamura K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH : Heat shock proteins play a crucial role in tumor-specific apoptosis by REIC/Dkk-3. *Int J Mol Med* (2007) 20, 37-43.
 - 10) Kashiwakura Y, Ochiai K, Watanabe M, Abarzua F, Sakaguchi M, Takaoka M, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH, Kumon H : Down-regulation of inhibition of differentiation-1 via activation of activating transcription factor 3 and Smad regulates REIC/Dickkopf-3-induced apoptosis. *Cancer Res* (2008) 68, 8333-8341.
 - 11) Abarzua F, Kashiwakura Y, Takaoka M, Watanabe M, Ochiai K, Sakaguchi M, Iwawaki T, Tanimoto R, Nasu Y, Huh NH, Kumon H : An N-terminal 78 amino acid truncation of REIC/Dkk-3 effectively induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 375, 614-618.
 - 12) Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH, Kumon H : Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. *Int J Oncol* (2009) 34, 657-663.