

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent for pancreatic cancer

(膵癌に対する将来有望な治療薬としての新規 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター)  
澤原大明、白羽英則、内田大輔、加藤博也、永原照也、岩室雅也、片岡淳朗、堀口 繁、  
渡部昌実、阪口政清、高木章乃夫、能祖一裕、那須保友、公文裕巳、岡田裕之

Cancer gene therapy 23(8): 278-283, 2016

平成 28 年 5 月 米国消化器病週間 2016 に発表

# 主論文

## Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent for pancreatic cancer

(膵癌に対する将来有望な治療薬としての新規 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター)

### [緒言]

近年、外科手術や化学療法は進歩しているが、膵癌患者の予後は依然として不良のままである。診断時に外科手術を検討できる患者は約 20%程度であり、膵癌に対して標準化学療法のゲムシタビンで治療を行った際の 5 年生存率は 5%にも満たない。既存治療での効果は未だ不十分であり、新規膵癌治療の開発が急務となっている。Reduced expression in immortalized cells (REIC)/Dkk-3 遺伝子は、2000 年に岡山大学で同定された癌抑制遺伝子であり、様々な癌種においてその発現が低下していることが確認されている。泌尿器癌や悪性中皮腫では、REIC 遺伝子導入による ER ストレスを介した癌細胞選択的細胞死や腫瘍免疫誘導効果が報告されており、膵癌においても REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-CAG-REIC) を用いた遺伝子治療の有効性について報告されている。また 2011 年からは岡山大学病院において前立腺癌に対する Ad-CAG-REIC を用いた遺伝子治療の第 1 相試験が開始され、抗腫瘍効果が確認されている。遺伝子治療においてより高い効果を得るために、遺伝子発現を向上させる Super gene expression(SGE)システムを用いた新規 Ad-REIC (Ad-SGE-REIC) が開発され、今回膵癌に対する Ad-CAG-REIC と Ad-SGE-REIC の有効性を比較検討した。

### [材料と方法]

#### 細胞株と細胞培養

ヒト膵癌細胞株の ASPC1 と MIPaCa2 を用いた。ASPC1 と MIPaCa2 は 10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸、ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。

#### アデノウイルスベクターの組成

第 1 世代の Ad-CAG-REIC はアデノウイルスベクターに CAG プロモーターを用いた REIC/Dkk-3 遺伝子を組み込んだアデノウイルス製剤である。第 2 世代の Ad-SGE-REIC は従来型のアデノウイルスベクターの REIC/Dkk-3 遺伝子下流に癌細胞特異的に発現を増強する hTERT を含む 3 つのエンハンサー (hTERT、SV40、CMV) を保持した設計となっている。この SGE システムにより REIC 蛋白の高発現が得られている。コントロール遺伝子には Ad-LacZ を用いた。

#### ウェスタンブロット

細胞は 6 穴プレートに播き、フルコンフルエンスまで培養し、Ad-CAG-REIC と Ad-SGE-REIC を 30MOI で導入した。その後 PBS で 2 回洗浄し、2×サンプルバッファーとメルカプトエタノールを用いて蛋白を回収しサンプル調製した。SDS-PAGE でタンパク質を分離後、PVDF メンブレンへ転写し、ブロッキング処理をした。その後、一次抗体 (IRE1 $\alpha$ 、p-JNK、p-c-Jun、REIC、 $\beta$ -actin) 反応、二次抗体反応を行った後、検出した。

#### MTT アッセイ

6 穴プレートに各 well 20 万の細胞を播き、24 時間インキュベートした。細胞に Ad-LacZ、Ad-CAG-REIC、Ad-SGE-REIC をそれぞれ 100MOI で導入し、72 時間インキュベートした。遺伝子導入後の細胞増殖能を MTT アッセイで評価した。

#### アポトーシスアッセイ

6 穴プレートに各 well 20 万の細胞を播き、24 時間インキュベートした。細胞に Ad-LacZ、Ad-CAG-REIC、Ad-SGE-REIC をそれぞれ 100 multiplicity of infection (MOI) で導入し、72 時間インキュベートした。遺伝子導入後のアポトーシスをヘキスト染色で評価した。

## 動物実験

8週齢のメスのBALB/cマウス15匹に、膵癌細胞株のASPC1を200万/匹の細胞数で皮下接種し、各群5匹ずつ、計3群にランダムに振り分けた。皮下接種1週間後に腫瘍の形成を確認し、 $1.0 \times 10^9$  plaque forming units (pfu)のAd-LacZ、Ad-CAG-REIC、Ad-SGE-REICを腫瘍内投与した。初回のアデノウイルスベクター投与日をday0とし、以後day7、14、21、28と1週毎に同量のアデノウイルスベクターを投与し、腫瘍径を経時的に測定した。BALB/cマウスはday35にsacrificeした。腫瘍体積は $V = 1/2 \times [(短径)^2 \times (長径)]$ の計算式で求めた。

## [結果]

### SGEシステムはREIC発現を増強する

ASPC1とMIAPaCa2の2つの細胞株にAd-CAG-REICとAd-SGE-REICをそれぞれ30MOIで導入し、ウエスタンブロットでREIC発現を比較した。いずれの細胞株においても、Ad-SGE-REIC導入により、Ad-CAG-REICより有意にREIC発現が増強していた。

### Ad-SGE-REICはAd-CAG-REICよりアポトーシス誘導効果が高くなる

ASPC1とMIAPaCa2の2つの細胞株での検討において、MTTアッセイによる細胞増殖能の評価では、Ad-CAG-REICはAd-LacZと比較して、それぞれ $62.0 \pm 4.5\%$ 、 $39.6 \pm 1.6\%$ の細胞増殖能の低下を認めた。Ad-SGE-REICでは、Ad-LacZと比較して、それぞれ $83.1 \pm 2.2\%$ 、 $67.2 \pm 4.2\%$ と著明な細胞増殖能の低下を認めた。ヘキスト染色によるアポトーシスアッセイでは、Ad-CAG-REICではASPC1;  $40.4 \pm 1.7\%$ 、MIAPaCa2;  $38.8 \pm 3.5\%$ のアポトーシスを認め、Ad-SGE-REICではASPC1;  $73.9 \pm 1.5\%$ 、MIAPaCa2;  $70.0 \pm 0.6\%$ のアポトーシスを認め、有意にアポトーシスの増加を認めた。

### Ad-SGE-REICはJNKシグナル伝達を介したアポトーシス増強効果がある

REIC/Dkk-3はこれまでの研究において、膵癌を含む色々な癌腫で、ERストレスを介し、JNKのシグナル伝達を介してアポトーシスを誘導することが分かっている。このため、ASPC1とMIAPaCa2の細胞株において、Ad-CAG-REICおよびAd-SGE-REICを導入した際のJNKシグナル伝達のactivationを比較した。ウエスタンブロットでの評価を行ったところ、IRE1 $\alpha$ 、p-JNK、p-c-JunのいずれにおいてもAd-CAG-REICよりAd-SGE-REICの方が有意に高発現していた。

### XenograftモデルにおいてAd-SGE-REICの腫瘍内投与は高い抗腫瘍効果がある

ASPC1を用いたxenograftモデルにおいて、Ad-CAG-REICとAd-SGE-REICの抗腫瘍効果を検討した。Ad-CAG-REICはAd-LacZと比較して $41.4 \pm 9.8\%$ の抗腫瘍効果を認めた。Ad-SGE-REICでは、 $60.7 \pm 9.9\%$ とより強い抗腫瘍効果を認めた。

## [考察]

膵癌患者において、外科手術のみが根治的治療であるが、膵癌の診断時に外科手術の適応があるのはわずか20%程度である。進行膵癌患者の生存期間中央値は約6ヶ月、5年生存率は5%にも満たず、非常に予後の悪い疾患であり、新規治療の開発が急務である。

REIC/Dkk-3は様々な癌腫において発現が低下している癌抑制遺伝子である。アデノウイルスベクターにCAGプロモーターを用いたREIC/Dkk-3遺伝子を組み込んだ第1世代アデノウイルス製剤(Ad-CAG-REIC)での基礎研究において、様々な癌腫においてアポトーシス誘導が起こることが報告されており、膵癌においてもAd-CAG-REICの有効性について報告されている。遺伝子治療において、より高い効果を得るために、従来型のアデノウイルスベクターのREIC/Dkk-3遺伝子下流にhTERT、SV40、CMVの3つのエンハンサーを保持した第2世代Ad-REIC(Ad-SGE-REIC)が開発された。そこで今回膵癌に対する第1世代Ad-CAG-REICと第2世代Ad-SGE-REICの効果の比較検討を行った。まず、膵癌細胞株のREIC発現の比較において、Ad-SGE-REICは著明にREIC発現を増強した。Ad-CAG-REICは膵癌において、アポトーシスを増加させることにより細胞増殖能を低下させることが既に報告されている。そこで、MTTアッセイおよびヘキスト染色を行って、Ad-CAG-REICとAd-SGE-REICを導入した膵癌細胞の細胞増殖能およびアポトーシスについて比較した。Ad-CAG-REICと比較して、有意にAd-SGE-REICの細胞増殖能の低下とアポトーシスの増加が認められた。

Ad-CAG-REICによるREIC/Dkk-3強制発現により、ERストレスを介したJNKシグナル伝達経路を介して癌細胞のアポトーシス誘導が起こり、抗腫瘍効果をもたらすことが、膵癌を含む様々な癌腫において報告されている。Ad-SGE-REICでも同様のメカニズムでアポトーシス誘導が起こっており、またAd-CAG-REICと比較してactivationは亢進していた。

Ad-SGE-REICの抗腫瘍効果について検討するため、ASPC1を用いたxenograftモデルを作成した。Ad-CAG-REICは抗腫瘍効果を認めたが、よりAd-SGE-REICでより高い抗腫瘍効果を認めた。これらの結果から、Ad-SGE-REICは膵癌に対する有効な新規治療薬となる可能性がある。我々は膵癌に対するAd-CAG-REICと抗癌剤ゲムシタビン併用療法の可能性について以前報告をしている。この報告において、ASPC1を用いたxenograftモデルにおけるAd-CAG-REIC群の抗腫瘍効果はday28時点でAd-LacZ群と比較して25%程度であり、Ad-CAG-REICとゲムシタビン併用群での抗腫瘍効果は55%程度であった。今回の検討において、Ad-SGE-REIC群はゲムシタビンの併用なしの単独療法であるが、day28時点で $50.0 \pm 13.0\%$ の抗腫瘍効果を認めており、Ad-SGE-REICは単独療法でも高い治療効果が期待される。REIC/Dkk-3はこれまでの研究において、腫瘍免疫誘導効果についても報告されている。しかし今回の検討においては腫瘍免疫誘導効果については検討できておらず、今後更なる検討が必要である。

近年超音波内視鏡(EUS)が普及しており、膵癌に対する治療薬のデリバリーシステムとして、EUSは有効な手段と言える。実際にONYX-015、HF10など、いくつかのEUSガイド下に治療薬を局注する臨床試験が現在行われている。また膵癌および肝転移を有する患者においては、既に標準化されている経皮的な局注療法も投与方法として選択肢となる。

## [結論]

膵癌細胞株にREIC遺伝子導入を行ったところ、Ad-CAG-REICと比較して、Ad-SGE-REICのREIC蛋白発現は有意に高いものとなり、細胞増殖能の低下とアポトーシスの増加が認められた。またマウスモデルにおける検討でもAd-SGE-REICはより高い抗腫瘍効果を認めた。Ad-SGE-REICは膵癌に対する有効な新規治療となる可能性がある。