

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

**A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of  
adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy**

(悪性グリオーマに対して第 2 世代 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルス  
(Ad-SGE-REIC) はより強い抗腫瘍効果を発揮する)

岡 哲生、黒住和彦、島津洋介、市川智継、石田穰治、大谷理浩、清水俊彦、富田祐介、  
阪口政清、渡部昌実、那須保友、公文裕巳、伊達 勲

Scientific Reports 6:33319 (1-10),2016

平成 28 年 9 月 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会に発表

## 主論文

### A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy

(悪性グリオーマに対して第2世代 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルス (Ad-SGE-REIC) はより強い抗腫瘍効果を発揮する)

#### [緒言]

悪性グリオーマは治療困難な腫瘍であり、新しい治療法が開発されても臨床試験で効果が示せないことが多い。従来の外科手術、放射線治療、化学療法に加えて、多くの研究者が新しい治療法を模索している。

Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) は癌抑制遺伝子であり、様々な癌で発現が低下していると報告されている。前立腺癌、悪性胸膜中皮腫においては endoplasmic reticulum (ER) ストレスを介してアポトーシスを誘導したという報告があり、グリオーマ細胞に関しては、REIC/Dkk-3 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を阻害し、caspase を活性化することで細胞増殖を抑制することが報告されている。また、前立腺癌においては REIC/Dkk-3 による免疫反応を介した抗腫瘍効果の報告もある。

第2世代 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルス (Ad-SGE-REIC) は CMV プロモーターの下流に、REIC/Dkk-3 遺伝子およびウシ成長ホルモン polyA 付加配列を含む DNA 構築物を挿入し、さらにその下流に hTERT エンハンサー、SV40 エンハンサー、CMV エンハンサーを連結させることで、REIC/Dkk-3 遺伝子が高効率に発現すると報告されている。

今回我々は、悪性グリオーマ細胞に対する、Ad-SGE-REIC の抗腫瘍効果について検討した。

#### [材料と方法]

##### 細胞株

ヒト悪性グリオーマ細胞株(U87 $\Delta$ EGFR)、マウス悪性グリオーマ細胞株 (GL261)、正常ヒトアストロサイトを使用した。正常ヒトアストロサイトは Takara Bio Inc.より購入した。

##### アデノウイルス

Ad-SGE-REIC, Ad-CAG-REIC(第1世代 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルス), Ad-LacZ(コントロールベクター)は複製欠損アデノウイルス 5 型を用いて作製され、当院泌尿器科から提供を受けた。

### 細胞毒性アッセイ

悪性グリオーマ細胞株(U87ΔEGFR、GL261)、正常ヒトアストロサイトを培養し、Ad-SGE-REIC, Ad-CAG-REIC, あるいは Ad-LacZ(MOI 10)で処理し、24, 48, 72 時間後の培養 well 底面の細胞数を回収し、Z2 Coulter Counter(Beckman Coulter)を用いてカウントした。

### ウエスタンブロット解析

全細胞タンパク解析には、培養細胞を 1%SDS に溶解し、超音波破碎した。核内タンパク解析には、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit(Thermo Scientific)を用いてタンパクを抽出した。サンプルを電気泳動し、PVDF 膜に転写し、5%スキムミルクでブロッキングし、一次抗体反応を行った。その後二次抗体反応を行い、シグナル検出には ECL Prime Western Blotting Detection System(GE Healthcare Life Sciences)を用いた。バンド濃度は、ImageJ software (NIH)を用いて定量した。

### 動物実験

動物実験は、岡山大学動物実験規則に準拠し行った。U87ΔEGFR グリオーマ細胞を無胸腺マウス(balb/c-nu/nu)の脳基底核へ移植した。移植 7 日目に Ad-SGE-REIC, Ad-CAG-REIC, Ad-LacZ( $3.6 \times 10^7$  plaque-forming units(PFU))を単独で腫瘍内に局所投与した。また、GL261 グリオーマ細胞を無胸腺マウス(balb/c-nu/nu)あるいは C57BL/6N の脳基底核へ移植し、同様のプロトコールで治療を行った。

### 免疫染色

Syngeneic glioma モデルにおいて、腫瘍移植 4 週目にマウスを屠殺し、脳組織を摘出し、パラフィン切片を作成した。脱パラフィン、親水化後、3%過酸化水素含有メタノール、オートクレーブで処理し、ブロッキングを行った後、一次抗体反応を行った。その後二次抗体反応を行い、The Dako Cytomation Envision+ System-HRP Kit(Dako Cytomation)を用いて DAB 染色を行った後、コンバーター-POD で処理し、光学顕微鏡下で観察を行った。

### [結果]

#### Ad-SGE-REIC による REIC/Dkk-3 タンパクの発現上昇

Ad-SGE-REIC で処理した U87ΔEGFR ヒトグリオーマ細胞、GL261 マウスグリオーマ細胞は、Ad-CAG-REIC で処理した細胞と比較して有意に REIC/Dkk-3 タンパクの発現が上昇していた。

#### 悪性グリオーマ細胞における Ad-SGE-REIC による細胞毒性効果

U87ΔEGFR ヒトグリオーマ細胞、GL261 マウスグリオーマ細胞に対して Ad-SGE-REIC 群は、Ad-CAG-REIC 群、Ad-LacZ 群と比較して有意に細胞毒性効果を示した。

#### 正常ヒトアストロサイトにおける Ad-SGE-REIC による細胞毒性の検討

正常ヒトアストロサイトを Ad-SGE-REIC、Ad-CAG-REIC、Ad-LacZ で処理して経時的観察を行ったが、細胞毒性は示さなかった。

#### 悪性グリオーマ細胞における REIC/Dkk-3 による ER ストレス関連因子、caspase の発現と $\beta$ -catenin の分解

U87 $\Delta$ EGFR グリオーマ細胞を Ad-SGE-REIC で処理することにより、Ad-CAG-REIC 群と比較して、リン酸化 IRE1 $\alpha$ 、BiP、リン酸化 JNK といった ER ストレス関連因子や活性化型 caspase-9 の発現が有意に上昇した。また、核内  $\beta$ -catenin の発現は有意に減少した。

#### マウス脳腫瘍モデルにおける Ad-SGE-REIC の効果

U87 $\Delta$ EGFR マウス脳腫瘍モデルにアデノウイルスを  $3.6 \times 10^7$  PFU 投与した場合、Ad-SGE-REIC 治療群で Ad-LacZ 治療群、Ad-CAG-REIC 治療群と比較して有意に生存期間が延長した。また GL261 マウス脳腫瘍モデルでは、Ad-SGE-REIC 治療群は有意に生存期間が延長した。GL261 マウス syngeneic 脳腫瘍モデルでも Ad-LacZ 治療群と比較して有意に生存期間が延長した。

#### マウス syngeneic 脳腫瘍モデルにおける Ad-SGE-REIC の免疫反応

マウス syngeneic 脳腫瘍モデルにおいて、脳組織を CD8、CD11c で免疫染色を行ったところ、Ad-SGE-REIC 治療群で腫瘍部に CD8 陽性細胞、CD11c 陽性細胞の強い浸潤が見られた。

#### [考察]

##### グリオーマに対する in vitro での Ad-SGE-REIC の効果

これまでプラスミドを用いて悪性グリオーマ細胞に REIC/Dkk-3 を遺伝子導入し、アポトーシスを誘導したという報告がある。当科島津らは、REIC/Dkk-3 の発現が上昇することによりアポトーシス細胞が増加し、そして caspase-9 が活性化され、核内  $\beta$ -catenin が減少したと報告している。

我々の結果でも同様に、Ad-SGE-REIC を投与し、REIC/Dkk-3 の発現が上昇することにより、caspase-9 が活性化され、核内  $\beta$ -catenin が減少していた。また、ER ストレス関連因子の発現も上昇していた。Ad-SGE-REIC は、Ad-CAG-REIC と比べて、これらの効果が増強されていた。

##### Ad-SGE-REIC の効果

Ad-CAG-REIC は、CAG プロモーターの下流に、REIC/Dkk-3 遺伝子およびウシ成長ホルモン polyA 付加配列を含む DNA 構築物を挿入した構造をしているが、SGE システムでは、CMV

プロモーターの下流に、REIC/Dkk-3 遺伝子およびウシ成長ホルモン polyA 付加配列を含む DNA 構築物を挿入し、さらにその下流に human telomerase reverse transcriptase エンハンサー、Simian virus 40 エンハンサー、cytomegalovirus エンハンサーを連結させることで、REIC/Dkk-3 遺伝子が高効率に発現すると報告されている。また、マウス前立腺癌モデルにおいて生存期間の延長も報告されている。

#### グリオーマに対する In vivo での Ad-SGE-REIC の効果

Ad-SGE-REIC 治療群は、Ad-LacZ 治療群、Ad-CAG-REIC 治療群に比べてマウスの生存期間が延長した。syngeneic 脳腫瘍モデルにおいては、腫瘍部に CD8、CD11c 陽性細胞の強い浸潤が見られ、何らかの免疫機構を介する抗腫瘍効果の可能性も示唆された。

#### Future direction

Ad-REIC は、当院泌尿器科において、前立腺癌に対して臨床試験 phase I / II a が行われ、当院第二外科においては、悪性胸膜中皮腫に対して Ad-SGE-REIC の臨床試験 phase I が行われている。当科においても、悪性グリオーマに対して、シレンジタイドなどの薬剤やベバシズマブなどの分子標的薬との併用療法を用いて臨床試験を行っていきたい。

#### [結論]

Ad-SGE-REIC は、Ad-CAG-REIC と比べ、REIC/Dkk-3 の発現効率が高く、悪性グリオーマに対して強い抗腫瘍効果が得られた。