



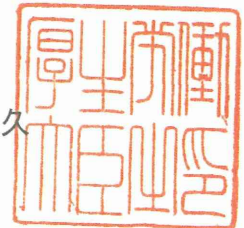
厚生労働省発科0304第2号

平成26年3月4日

岡山大学病院

病院長 榎野博史 殿

厚生労働大臣 田村憲久



遺伝子治療臨床研究実施計画について

平成25年8月8日付けで申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。

なお、臨床研究の中止、終了等に伴う厚生労働大臣への報告については、遺伝子治療臨床研究に関する指針及び関係通知の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するよう願います。

記

課 題 名 : 悪性胸膜中皮腫に対する Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究

総括責任者 : 豊岡 伸一 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床遺伝子医療学教授)



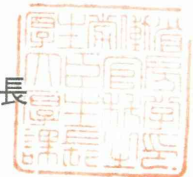
科 発 0 3 0 4 第 2 号

平 成 2 6 年 3 月 4 日

岡山大学病院

病院長 榎 野 博 史 殿

厚生労働省大臣官房厚生科学課長



遺伝子治療臨床研究実施計画について

平成 25 年 8 月 8 日付けで申請のあった遺伝子臨床研究実施計画については、平成 26 年 3 月 4 日厚生労働省発科 0304 第 2 号により厚生労働大臣から実施して差し支えない旨通知されたところであるが、当該臨床研究の実施に当たっては、下記に留意して適切に実施するようお願いする。

記

- 1 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号、全部改正平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号、一部改正平成 21 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)
- 2 「遺伝子治療臨床研究に関する指針について」
(平成 14 年 3 月 27 日付け 13 文科振第 1144 号・科発第 0327001 号文部科学省研究振興局長及び厚生労働省大臣官房厚生科学課長連名通知)
- 3 「遺伝子治療臨床研究に関する指針の改訂等について」
(平成 16 年 12 月 28 日付け 16 文科振第 931 号・科発第 1228003 号文部科学省研究振興局長及び厚生労働省大臣官房厚生科学課長連名通知)

(参考)

<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html#3>

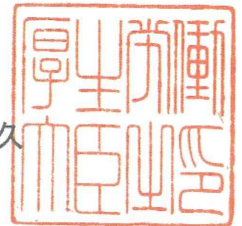


厚生労働省発科0304第5号
環自野発第1403041号
平成26年3月4日

岡山大学病院

病院長 榎野 博史 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



環境大臣 石原 伸晃



遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律
に基づく第一種使用規程の承認について（通知）

平成25年8月8日付けで承認申請のあった第一種使用規程について、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）第4条第1項の規定に基づき、別紙のとおり承認したので通知する。

承認番号 14-36V-0002

遺伝子組換え生物等の種類の名称	Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3 (REIC/Dkk-3) 遺伝子を発現する非増殖性の遺伝子組換えヒトアデノウイルス5型 (Adv/hREIC)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<p>治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号</p> <p>治療施設の名称 岡山大学病院</p> <p>(1) Adv/hREIC溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内のP2レベルの実験室（以下「P2実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。</p> <p>(2) 凍結状態のAdv/hREIC溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2実験室内の安全キャビネット内で行う。Adv/hREIC希釈溶液の保管は、P2実験室内の冷凍庫において行う。なお、Adv/hREIC希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通過して他のP2レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。</p> <p>(3) Adv/hREIC溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルスの不活化(0.18%若しくは0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬処理又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。)を行った後、岡山大学病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下単に「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。</p> <p>(4) P2実験室内の安全キャビネット内でAdv/hREIC溶液を緩衝液で希釈し、所定の投与量に調整したもの（以下「Adv/hREIC液」という。）を、二重に密閉し、岡山大学病院総合診療棟IVR-CT室（以下「CT室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブから成るデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。</p> <p>(5) 悪性胸膜中皮腫に罹患した被験者に対するAdv/hREIC液の投与は、CT室において、局所麻酔下で、Adv/hREIC液をあらかじめ留置している胸腔内チューブを用いて、又はCTガイド下に注入用穿刺針を用いて、胸水貯留を認める胸腔内又は評価可能な1病変部に注入することにより行う。注入針の抜去は慎重に行い、Adv</p>

／h R E I C液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には、滅菌された不織布を二重に敷き詰める。

- (6) 被験者へのA d v／h R E I C液の投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、C T室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下単に「個室」という。）に移送する。
- (7) (5)及び(6)で用いた注入セット等の器具、布及びガーゼ類は、ウイルスの不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルスの不活化を行い、再利用する。これらのウイルスの不活化をC T室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気はH E P Aフィルターを用いた換気により約5分に1回（1時間に12回）入れ替える。
- (8) A d v／h R E I C液の投与後24時間、被験者を個室内で管理する。また、A d v／h R E I C液を胸腔内に注入する際に胸腔内カテーテルチューブを挿入した場合は、その抜去後24時間、又は被験者より排出された胸水中のA d v／h R E I Cが陰性であることが確認できるまで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物等（血液、体液、尿及び糞便等をいう。以下同じ。）は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルスの不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、研究用検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、A d v／h R E I C溶液の取扱いに準ずる。排泄物等が床等に落下した場合は床等を消毒液で掃き清掃する。
- (10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルスの不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄するか、又は十分洗浄する。ウイルスの不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (11) 個室における被験者の管理を終了する前に、被験者の血液及び尿中のA d v／h R E I Cが陰性であることを確認する。A d v／h R E I Cが確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。ま

	<p>た排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は、床等を消毒液で掃き清掃する。</p> <p>(12) 個室における被験者の管理の終了後に、遺伝子治療臨床研究実施計画書（悪性胸膜中皮腫に対するReduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究に関する実施計画書）に示す観察期間内に被験者の血液又は尿中からAdV/hREICが検出された場合には、直ちに被験者を個室における管理下に移し、(8)から(11)までと同様の措置を執る。</p>
--	---

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
「難治性固形がん（悪性胸膜中皮腫、前立腺がん）に対する次世代自己がん
ワクチン治療法としての REIC/Dkk-3 遺伝子治療臨床研究」
分担研究報告書

「前立腺がんに対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療臨床研究」

研究分担者	公文裕巳	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
	渡部昌実	岡山大学病院	准教授
	賀来春紀	岡山大学病院	講師
	江原 伸	岡山大学病院	講師
	佐々木克己	岡山大学病院	助教
	高本 篤	岡山大学病院	助教

研究要旨

REIC/Dkk-3(Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3) 遺伝子は、岡山大学で同定されたがん抑制遺伝子である。その遺伝子発現により、抗腫瘍効果（局所におけるがんの選択的アポトーシス誘導と全身抗腫瘍免疫の活性化による「自己がんワクチン化」効果）を有する画期的ながん治療遺伝子である。この REIC/Dkk-3 遺伝子を搭載したがん治療遺伝子製剤である REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター(Ad-REIC)を用いた臨床研究を前立腺がんを対象として実施し、安全性、有効性を確認する。さらに、POC（proof of concept）を確立し、本格的な実用化に向けたデータを蓄積する。

A. 研究目的

前立腺がんに対する REIC/Dkk-3 遺伝子を用いた遺伝子治療の臨床研究を実施する。安全性の検討（最大耐量の推定）を主要エンドポイントとし、治療効果の観察を副次的エンドポイントとする研究を実施する。

B. 研究方法

A 群：内分泌療法抵抗性再燃前立腺がん
B 群：ハイリスク初発限局性前立腺がん

を対象とし、投与量のレベルを4段階に設定し、各群の治療を実施する。血液生化学的検査・生理検査にて安全性を確認し、血液腫瘍マーカー（PSA）および前立腺組織を用いた免疫組織学的、分子生物学的解析にて有効性を評価する。（遺伝子治療臨床研究実施計画概要書を資料-1として添付）。倫理面への配慮として、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

平成 25 年 12 月までに、A 群 7 例、B 群 15 例において投与を行った。これにより実施した Vector dose level 1～4 ($1 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{12}$ vp) では、安全性がおおむね確認され、 1×10^{12} vp～ 3×10^{12} vp を投与した症例の一部において、臨床的有効性を示唆する所見が得られた。Dose level 3 (1×10^{12} vp) 投与群では、発熱 (Grade-1) が観察される症例が認められた。引き続き、臨床研究を継続・完遂し、データ解析を進める。

D. 考察

平成 25 年度において、Vector dose level 1～4 ($1 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{12}$ vp) について、主要エンドポイントである安全性がほぼ確認できた状況にある。ただ、高用量ベクター (1×10^{12} vp および 3×10^{12} vp) 投与群で、発熱 (Grade-1 から Grade-2) が観察されており、今後、本研究を進行するにあたり、注意が必要と考えられた。また、治療効果については、腫瘍マーカー、組織学的解析を指標とすることにより、一部の症例においては一定の有効性が認められた状況にある。

E. 結論

A 群および B 群で、平成 25 年 12 月までに計 22 症例において治療が実施をされ、おおむね安全性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Ochiai K, Watanabe M, Azakami D, Michishita M, Yoshikawa Y, Udagawa

C, Metheenukul P, Chahomchuen T, Aoki H, Kumon H, Morimatsu M, Omi T. Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours. *Vet J.* 2013 Sep;197(3):769-75.

2. 学会発表：

- 1) A phase I / II study of reduced expression in immortalized cells (REIC/Dkk-3) gene therapy for prostate cancer: Challenge to establish as a cancer vaccine. Ariyoshi Y., Watanabe M., Sasaki K., Hirata T., Tanimoto R., Kaku H., Ebara S., Watanabe T., Nasu Y., Kumon H. Asian Pacific Prostate Society 2013, 2013 年 4 月 13-16 日, Melbourne, Australia
- 2) Adenovirus-mediated REIC-Dkk-3 gene therapy induces tumor antigen-specific cytotoxic T-cell activation in mouse cancer models. Ariyoshi Y., Hirata T., Watanabe M., Tanimoto R., Sasaki K., Kaku H., Ebara S., Watanabe T., Nasu Y., Kumon H. 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2013 年 7 月 4-6 日, Okayama
- 3) Analysis of combination therapy of the adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 (Ad-REIC) and the integrin antagonist cilengitide. Simazu Y., Kurozumi K., Ichikawa T., Fujii K., Onishi M., Ishida J., Watanabe M., Nasu Y., Kumon H., Date I. 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, 2013 年 7 月 4-6 日, Okayama

4) Immunomodulation and anti-cancer activity of REIC/Dkk-3 protein. Huang P., Watanabe M., Nasu Y., Kaku H., and Kumon H. European Society of Gene and Cell Therapy, 2013年10月25-28日, Madrid, Spain

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
「難治性固形がん（悪性胸膜中皮腫、前立腺がん）に対する次世代自己がん
ワクチン治療法としての REIC/Dkk-3 遺伝子治療臨床研究」
分担研究報告書

「悪性胸膜中皮腫に対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療臨床研究」

研究分担者 豊岡伸一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
宗 淳一 岡山大学病院 助教
山本寛斉 岡山大学病院 助教

研究要旨

REIC/Dkk-3(Reduced Expression in Immortalized Cells/Dickkopf-3) 遺伝子は岡山大学で同定されたがん治療遺伝子であり、その遺伝子発現により抗腫瘍効果（局所におけるがんの選択的アポトーシス誘導と全身抗腫瘍免疫の活性化による「自己がんワクチン化」効果）が発揮される。現在、REIC/Dkk-3 遺伝子を搭載したがん治療遺伝子製剤である REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター（Ad-REIC）を用いた臨床研究が、前立腺がんを対象として実施されている。本研究は、悪性胸膜中皮腫の症例に対して Ad-REIC 製剤を治療投与し安全性、有効性を確認することを目的とするものであり、当該治療法の本格的な実用化に向けたデータを蓄積する。

A. 研究目的

胸膜悪性中皮腫に対する Ad-REIC 製剤を用いた臨床研究の実施承認に向けて種々の作業を行い、承認・治療開始を目指す。

B. 研究方法

国への承認申請に向けて、岡山大学内および関係省庁との間で種々の準備作業を行う。（遺伝子治療臨床研究実施計画概要書を資料-2として添付）。また本研究、すなわち胸膜悪性中皮腫に対する

Ad-REIC 製剤を用いた臨床研究において使用する CMV プロモーターに基づく Ad-REIC 製剤を確保する。

C. 研究結果

平成 25 年度には学内審査が終了し、また、国への申請については事務当局（厚生労働省厚生科学課）との間で、正式受理に向けて各種の作業が実施された。使用する治療製剤の仕様の変更（CAG プロモーターの Ad-REIC 製剤から、実際に使用が予定されている CMV プロモ-

ターの Ad-REIC 製剤への変更)、製造委託先の変更に伴う手続き等も完了した。結果として、「悪性胸膜中皮腫に対する REIC/Dkk-3 遺伝子治療臨床研究」である本研究の実施に関する国の手続きを完了した(結果を資料-3として添付)。

D. 考察

臨床研究の実施という観点からは計画よりやや遅れ気味であるが、本年度、国での審査を完了したことから、引き続き、適切に課題の進捗をはかる。

E. 結論

悪性胸膜中皮腫に対する臨床研究の開始に向けた作業を引き続き進行させる。

F. 研究発表

1. 論文発表:

1) Shien K, Tanaka N, Watanabe M, Soh J, Sakaguchi M, Matsuo K, Yamamoto H, Furukawa M, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Huh NH, Miyoshi S, Kumon H, Toyooka S. Anti-cancer effects of REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector for the treatment of non-small cell lung cancer. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87900.

2. 学会等発表:

1) Ad-REICによる自己がんワクチン治療
臨床各科領域における難治固形がんへの適応拡大
-胸部悪性腫瘍(肺がん・中皮腫)-
豊岡伸一

岡山大学機能強化戦略プロジェクト
-難治固形がんの遺伝子治療-
キックオフシンポジウム

平成25年9月1日

岡山コンベンションセンター、岡山市

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

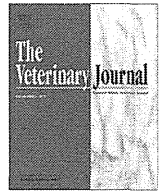
該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ochiai K, Watanabe M, Azakami D, Michishita M, Yoshikawa Y, Udagawa C, Metheenukul P, Chahomchuen T, Aoki H, Kumon H, Morimatsu M, Omi T.	Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours.	Vet J.	197(3)	769-75	2013
Shien K, Tanaka N, Watanabe M, Soh J, Vet J. Sakaguchi M, Matsuo K, Yamamoto H, Furukawa M, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Huh NH, Miyoshi S, Kumon H, Toyooka S.	Anti-cancer effects of REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector for the treatment of non-small cell lung cancer.	PLoS One.	9(2)	e87900	2014

IV. 研究成果の刊行物・別冊



Molecular cloning and tumour suppressor function analysis of canine REIC/Dkk-3 in mammary gland tumours



Kazuhiko Ochiai^{a,*}, Masami Watanabe^b, Daigo Azakami^a, Masaki Michishita^c, Yasunaga Yoshikawa^d, Chihiro Udagawa^a, Pornphimon Metheenukul^e, Thippayarat Chahomchuen^e, Hiroshi Aoki^a, Hiromi Kumon^b, Masami Morimatsu^f, Toshinori Omi^a

^a Department of Veterinary Nursing and Technology, School of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University, Tokyo 180-8602, Japan

^b Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8558, Japan

^c Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University, Tokyo 180-8602, Japan

^d Laboratory of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Aomori 034-8628, Japan

^e Department of Veterinary Technology Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

^f Division of Disease Model Innovation, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0815, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 28 April 2013

Keywords:

Canine
Mammary gland tumours
REIC/Dkk-3
Tumour suppressor gene

ABSTRACT

REIC/Dkk-3, a member of the human Dickkopf (Dkk) family, plays a role as a suppressor of growth in several human cancers. In this study, the tumour suppression function of canine REIC/Dkk-3 was investigated. The full-length open reading frame of the canine REIC/Dkk-3 homologue was cloned and the tissue distribution of REIC/Dkk-3 mRNA was determined, along with the subcellular localisation of the REIC/Dkk-3 protein in canine cancer cell lines. Expression of REIC/Dkk-3 was lower in mammary gland tumours and in canine mammary carcinoma cell lines than in normal mammary gland tissue. Overexpression of REIC/Dkk-3 induced apoptosis in canine mammary carcinoma cell lines. These results show that expression of REIC/Dkk-3 is downregulated in canine mammary tumours and that one of the functions of this gene is induction of apoptosis.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The gene encoding 'Reduced expression in immortalised cells' (REIC) is a tumour suppressor gene identical to the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene (Tsuji et al., 2000). REIC/Dkk-3 is ubiquitously expressed in normal cells in mice and humans, whereas its expression is significantly downregulated in cancer cells (Zhang et al., 2010). We and other investigators have previously shown that overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in multiple cancer cell lines, but not in normal cells (Hsieh et al., 2004; Abarzua et al., 2005; Kashiwakura et al., 2008; Mizobuchi et al., 2008; Sakaguchi et al., 2009).

Endoplasmic reticulum (ER) stress-induced signalling is activated during REIC/Dkk-3-induced apoptosis (Sakaguchi et al., 2009). ER stress plays a role in the induction of apoptosis and occurs when specific glycosylated proteins are overexpressed and protein folding and secretion are impaired (Herr and Debatin, 2001). The GRP78 protein (also called BiP), which is associated with protein folding in the ER and is a key signalling molecule of ER stress (Shen et al., 2002), is upregulated during REIC/Dkk-3-in-

duced apoptosis (Kashiwakura et al., 2008). In addition, induction of caspase-dependent apoptosis by REIC/Dkk-3 is regulated by JNK phosphorylation, along with ER stress (Abarzua et al., 2005; Kashiwakura et al., 2008).

In a previous study, we demonstrated that REIC/Dkk-3 plays a role in monocyte differentiation and tumour regression (Watanabe et al., 2009). Intratumoral administration of REIC/Dkk-3 suppresses tumour growth, resulting in an accumulation of dendritic cells (CD11c⁺) and cytotoxic T cells (CD8⁺), and enhanced the anti-cancer activity of splenocytes. Mouse and human studies have shown that REIC/Dkk-3 induces tumour-specific apoptosis and enhances anticancer immunity (Sakaguchi et al., 2009; Watanabe et al., 2009), and its activity is currently being tested in clinical trials in human cancer patients.¹

A tumour suppressor function of REIC has not been investigated in dogs previously. There is only a predicted sequence of the REIC/Dkk-3 homologue in dogs on the ERL database.² Although REIC/Dkk-3 is a secreted protein (Tsuji et al., 2000), secreted peptides are not identified within the predicted sequence of canine REIC/

* Corresponding author. Tel.: +81 422 4151.

E-mail address: kochiai@nvl.u.ac.jp (K. Ochiai).

¹ See: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01197209?term=REIC%2FDkk-3&rank=1>.

² See: <http://www.genome.gov/11008069>.

Dkk-3. The elucidation of the structure and tumour suppressor functions of canine REIC/Dkk-3 may help to establish novel therapeutic strategies for treating canine mammary gland tumours.

Mammary tumours are common in female dogs, as well as in women, and there are some molecular and biological similarities between canine and human mammary tumours (Moe, 2001; Egenvall et al., 2005; Rivera and von Euler, 2010; DeSantis et al., 2011). In this study, we investigated the structure and tumour suppressor function of canine REIC Dkk-3. We postulated that, due to its strong tumour suppressor function, REIC/Dkk-3 may be suitable as a new therapeutic agent for canine mammary tumours. We cloned the full-length open reading frame (ORF) of canine REIC/Dkk-3 and investigated the tissue distribution of REIC/Dkk-3 mRNA and the subcellular localisation of the REIC/Dkk-3 protein in canine cancer cell lines. In addition, we examined the expression of REIC/Dkk-3 protein in canine mammary tumours and in normal mammary glands. To confirm the tumour suppressor function of REIC/Dkk-3, we investigated whether the expression of REIC/Dkk-3 in canine mammary tumour cell lines induces apoptosis.

Materials and methods

cDNA cloning and sequencing of canine REIC/Dkk-3

Canine REIC/Dkk-3 was amplified by PCR using the following oligonucleotide primers: cREIC/Dkk-3F (5'-ATGCGGGCTCGGGGACACCTGCTGTGC-3') and cREIC/Dkk-3R primer (5'-CTAAATCTCTCTCTCCAGCA-3'). The primers were designed from the sequences of the canine EST database³ (GenBank DN376871.1) and the predicted sequence of canine REIC/Dkk-3 homologue (GenBank XM_534060.2).

RNA was obtained from canine total brain RNA (Biochain) and reverse transcribed using SuperScript III (Life Technologies). PCR amplification was performed using PrimeSTAR (Takara) and dATP was added to the PCR products using a 10× A-attachment kit (Toyobo). PCR products were cloned into pGEM-T Easy (Promega). The sequences were determined for at least five independent clones (ABI 3100; Applied Biosystems). Nucleotide and amino acid (aa) sequences were analysed and compared with the canine predicted sequence and human and mouse sequence with Genetyx software.

Tissue samples

With permission from the Ethics Committee, we obtained tissue samples from the Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University (approval number 11-50, date of approval 27 May 2011). The study included three samples from mammary tubulopapillary carcinomas, two from mammary solid carcinomas and three from non-neoplastic mammary gland tissues. The tissue samples for immunoblot analysis were stored at -70 °C, whereas the tissue samples for histopathological examination were fixed in formalin, dehydrated in alcohol, embedded in paraffin wax, sectioned and stained with haematoxylin and eosin. All the samples were classified by veterinary pathologists according to the WHO classification (Misdorp et al., 1999).

Cell lines and culture

Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) and 293T cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Six canine mammary carcinoma cell lines (CIP-p, CIP-m, CHM-p, CHM-m, CNM-p and CNM-m) were kindly provided by Dr N. Sasaki, Laboratory of Veterinary Surgery, University of Tokyo, Japan; these cell lines were established from primary mammary tumours of three dogs that also had metastatic lesions (Uyama et al., 2006). The cell lines were maintained in RPMI 1640 (Wako) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Life technologies), and incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂.

Tissue distribution of REIC/Dkk-3 mRNA

Reverse transcriptase (RT)-PCR reactions were performed using total RNA from ~24 tissues obtained from the Dog Tissue Total RNA Panel (Zyagen). PCR amplification of canine REIC/Dkk-3 was performed using the following primers: 5'-ATGACCAACACGGAAACC-3' and 5'-CTAAATCTCTCTCTCCAGC-3'. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and β-glucuronidase (GUSB) were used as RT-PCR controls (Brinkhof et al., 2006).

Transfections and immunostaining

To generate haemagglutinin (HA)-tag fusion proteins, the *Sall*/*EcoRI* fragment of REIC/Dkk-3 cDNA was cloned into the pMACS Kk.HA (C) vector (Miltenyl Biotech) (Fig. 1a). Immunocytochemical staining for REIC/Dkk-3 in CHM-p cells overexpressing REIC/Dkk-3 was performed by co-staining for the ER using the ER-ID Red Assay Kit (Enzo Life Sciences). Cells were plated and cultured to 30–40% confluency in LabTek chambers (Nalgene) and were transfected with the pMACS Kk.HA (C) vector containing HA-Tagged canine REIC/Dkk-3 by FuGENE HD (Promega). Forty-eight hours after transfection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 100 mM phosphate buffer and blocked with 5% normal goat serum in phosphate buffered saline (PBS). The cells were incubated with polyclonal anti-HA antibodies (1:100 dilution) (561, MBL) overnight at 4 °C and then with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes) for 1 h. To stain the nuclei, the cells were incubated with Hoechst 33342 (Dojindo) for 15 min at room temperature. The fluorescent staining was visualised under a fluorescence microscope system (BZ-9000; Keyence).

Immunoblot analysis

293T cell monolayers were cultured to 80% confluence on 6-well plates and the cells were transfected as described above. The cells were lysed in ice-cold radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (Nacalai Tesque) and incubated for 15 min at 4 °C. Canine tissue was homogenised in ice-cold RIPA buffer. Insoluble fragments were removed by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C and supernatants were stored at -80 °C. Protein concentrations were determined using a Protein Assay Bicinchoninate kit (Nacalai). Extracted protein (~10 µg) was mixed with 6× loading buffer, consisting of 450 mM Tris pH 6.8, 45% sucrose, 5% β-mercaptoethanol, 15% sodium dodecyl sulphate (SDS) and bromophenol blue, and separated by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels (Bio-Rad). Proteins were electro-transferred onto polyvinylidene fluoride membranes in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 20% methanol. Following transfer, membranes were blocked with 10% non-fat dry milk and 6% glycine in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and were developed with rabbit polyclonal anti-human REIC/Dkk-3 antibody (10365-1-AP, Proteintech) and antibodies specific for caspase-3 (9962, Cell Signaling Technology), cleaved-caspase-3 (9961, Cell Signaling Technology) and β-actin (sc-69879, Santa Cruz). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and the electrochemiluminescence (ECL) Pro substrate kit (Perkin Elmer) were used for the detection of antibody-bound proteins. Densitometric analysis was performed and the REIC/Dkk-3-to-β-actin ratio was calculated using Image J software (version 1.44).⁴

Apoptosis assay

To examine the in vitro induction of apoptosis after treatment, CIP-p cells were seeded in flat-bottomed 6-well plates and incubated for 24 h. Cells were then treated with the control adenovirus (Ad), Ad-LacZ or Ad-human (h) REIC/Dkk-3 at the indicated multiplicity of infection (MOI) in serum-free medium (500 µL) for 2 h, then the medium was exchanged with fresh complete medium (2 mL). After further incubation for 72 h, Hoechst 33342 stock solution was added to the medium to a final concentration of 2 µg/mL and the cells were incubated in the dark for 10 min (Kawasaki et al., 2009). Apoptotic cells were identified on the basis of the presence of highly condensed or fragmented nuclei using fluorescence microscopy. Apoptotic cells were counted in five different fields under a microscope; 100 cells were evaluated in each field.

Statistical analysis

Student's *t* test was used to compare the difference between the mean values. *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Cloning and structural analysis of canine REIC/Dkk-3

The ORF of canine REIC/Dkk-3 cDNA determined in this study (GenBank AB733648) had 1047 base pairs (bp) and was predicted to code for 348 aas. The full length ORF of canine REIC/Dkk-3 was 213 bp and 71 aas longer than the predicted sequence of canine REIC/Dkk-3 (GenBank XM_534060.2, ORF: 834 bp, 277 aas). This discrepancy is due to a missense mutation accompanied by a stop codon in XM_534060.2 (positions 200–202), which is located between the first and second ATGs of AB733648 (Fig. 1a). Therefore,

³ See: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>.

⁴ See: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

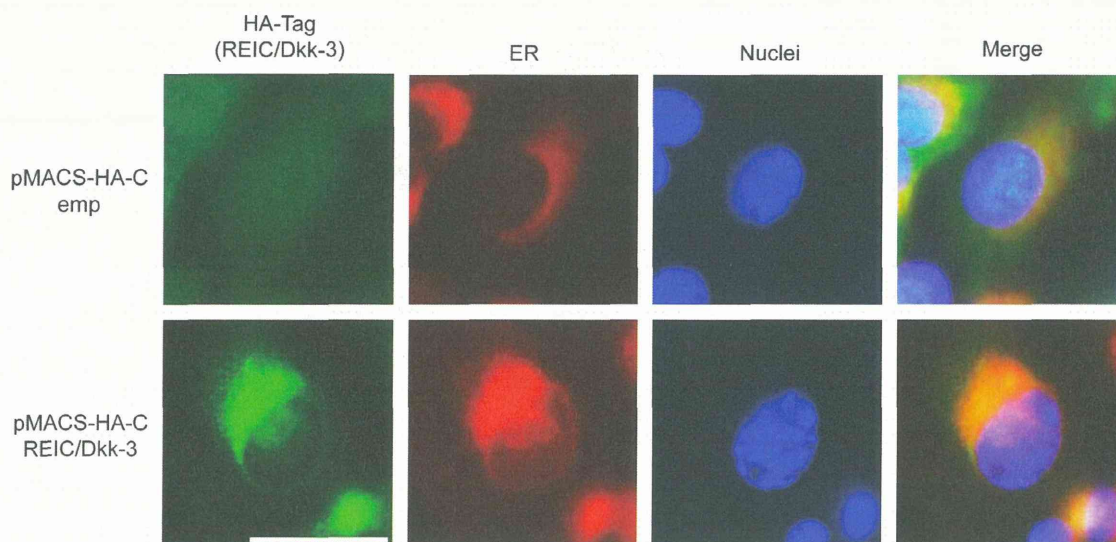


Fig. 2. Subcellular localisation of canine REIC/Dkk-3. Co-localisation of REIC/Dkk-3 and endoplasmic reticulum (ER) was examined by double immunofluorescence staining and imaged using fluorescence microscopy. Images in green, red and blue show the subcellular localisation of the haemagglutinin (HA) tag alone, or HA-tagged REIC/Dkk-3, ER and nuclei, respectively. The areas of overlap between the REIC/Dkk-3 and ER are shown in yellow in the overlay image. The image merging was performed using BZ-Analyzer software (Keyence). Bar = 50 μ m.

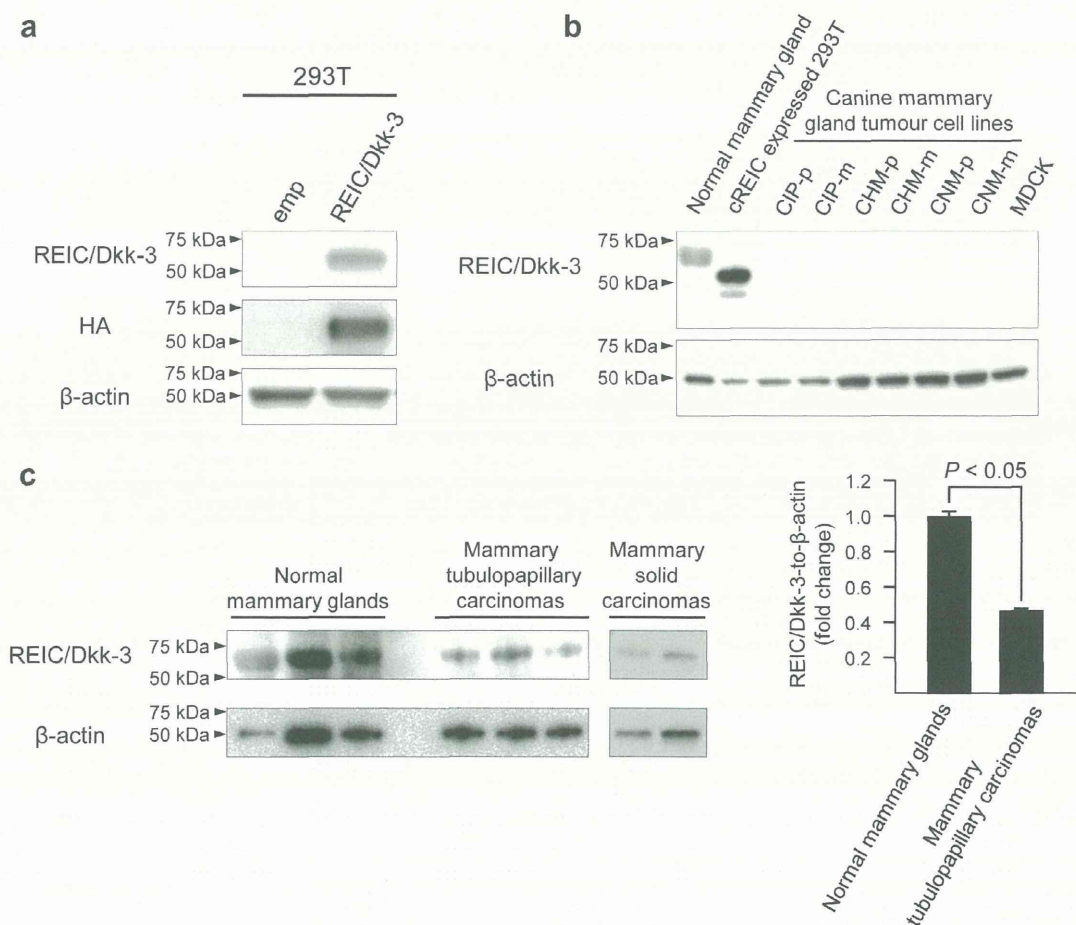


Fig. 3. Expression of REIC/Dkk-3 protein in canine cell lines and mammary gland tumours. (a) To test the cross-reactivity of anti REIC/Dkk-3 antibodies for the canine protein, immunoblotting was performed in 293T cells that were transfected with an empty haemagglutinin (HA)-tagged vector alone (emp) or HA-tagged canine REIC/Dkk-3. β -Actin was used as a reference protein for normalisation for protein loading. (b) Expression levels of canine REIC/Dkk-3 protein were determined by immunoblot analysis of normal canine mammary glands and canine mammary gland cancer-derived cell lines. β -actin was used as a loading control. (c) Protein levels of REIC/Dkk-3 were analysed in three normal mammary glands (controls), three tubulopapillary mammary carcinomas and two solid mammary carcinomas by Western blot analysis. The results shown are representative of three independent experiments. All immunoblots were performed on independent membranes, although reprobing was not performed.

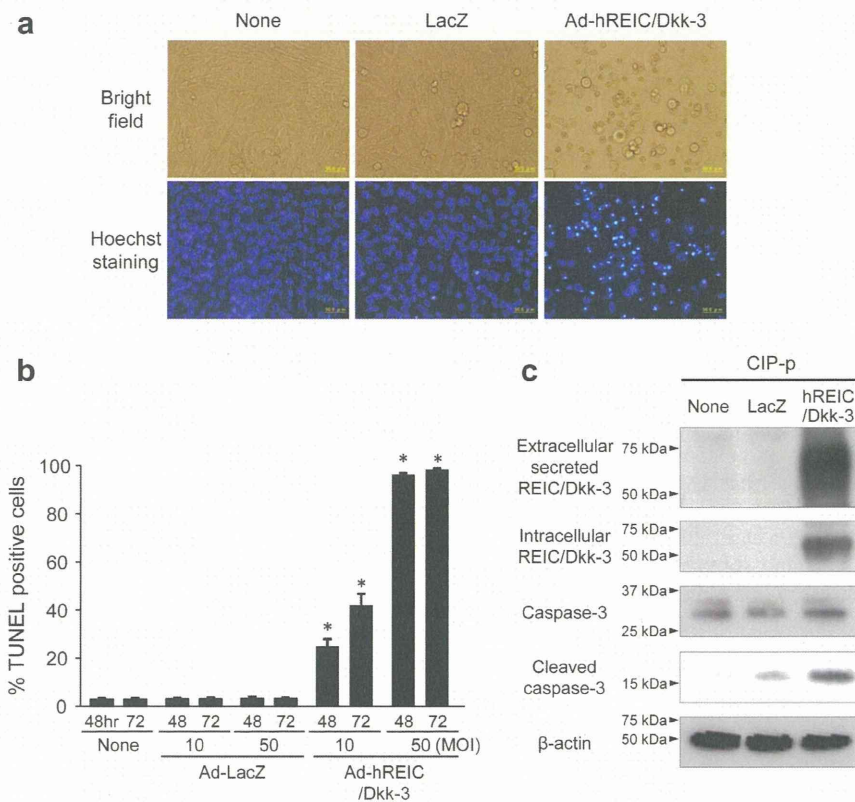


Fig. 4. Induction of apoptosis in canine mammary gland tumour cell lines due to overexpression of REIC/Dkk-3. (a) Induction of apoptosis in CIP-p cells after Ad-hREIC/Dkk-3 treatment was examined using Hoechst 33342 staining. Cells were infected with 50 multiplicities of infection (MOIs) of Ad-LacZ, Ad-REIC/Dkk-3 or control vector alone and incubated for 72 h. (b) Percentages of apoptotic CIP-p cells at 48 and 72 h after treatment with Ad-hREIC/Dkk-3 at different MOIs. A total of five different fields were examined under a microscope to determine the apoptotic rate. A statistically significant difference was observed between Ad-hREIC/Dkk-3 and the control Ad-LacZ treatment (* $P < 0.05$). (c) Western blot analysis for the indicated proteins in CIP-p cells treated with Ad-REIC/Dkk-3. The extracellularly secreted REIC/Dkk-3 was detected in the culture supernatant 48 h after transfection. Bar = 50 μ m.

ubiquitously expressed in all canine tissues that were examined (see Appendix A: Supplementary Fig. 1). The REIC/Dkk-3 protein exhibited a punctate localisation pattern in the cytoplasm when examined by immunostaining (Sakaguchi et al., 2009); our previous studies showed that the REIC/Dkk-3 protein is predominantly localised to the ER in human and murine cells (Zhang et al., 2010; Ochiai et al., 2011). We therefore performed co-staining experiments for ER and REIC/Dkk-3 in a canine cell line which was transiently transfected with HA-tagged canine REIC/Dkk-3. REIC/Dkk-3 was mainly localised around the ER in canine cells (Fig. 2).

Expression of REIC/Dkk-3 protein in canine mammary gland tumour cell lines and tissues

Since antibodies recognising canine REIC/Dkk-3 are not available, we first performed immunoblotting in 293T cells transfected with canine REIC Dkk-3 using antibodies that detect the HA-tagged canine REIC/Dkk-3 protein (Fig. 3a). Bands of the same size were detected with anti-HA antibody and anti-human REIC-Dkk-3 antibodies, confirming that the antibodies against human-REIC/Dkk-3 can detect canine REIC/Dkk-3. Next, we examined REIC/Dkk-3 expression in normal canine mammary glands and in various cell lines derived from canine mammary gland tumours. In the normal canine mammary gland, the REIC/Dkk-3 protein was detected as a single band ~60 kDa by immunoblot analysis. In contrast, REIC/Dkk-3 protein was barely detectable in six canine mammary gland cancer cell lines, nor in MDCK cells (Fig. 3b). Consistent with this observation, the levels of canine REIC/Dkk-3 protein were lower

in canine mammary tubulopapillary carcinomas than in normal mammary gland tissue ($P < 0.05$) (Fig. 3c). A solid mammary carcinoma also showed reduced expression of REIC/Dkk-3.

Apoptosis of canine mammary gland tumour cell lines induced by overexpression of REIC/Dkk-3

To examine a possible use of REIC/Dkk-3 as a tool for targeted gene-based therapy for canine mammary gland tumours, we overexpressed REIC/Dkk-3 in cancer cells by using a replication-deficient adenovirus vector. Within a few days after infection, most of the tumour cells had detached from the bottom of the culture vessels (Fig. 4a). Hoechst 33342 staining confirmed that apoptotic cells were frequently observed in Ad-hREIC/Dkk-3-treated CIP-p cells. The extent of apoptosis 72 h after treatment at MOIs of 10 and 50 was 42.0% and 98.6%, respectively. Significant induction of apoptosis was observed in Ad-hREIC/Dkk-3-treated cells, unlike that observed in control cells treated with Ad-LacZ ($P < 0.05$) (Fig. 4b). These results confirmed that human REIC/Dkk-3 overexpression induced apoptosis in canine mammary gland cancer cells, suggesting that Ad-hREIC/Dkk3 may be useful as a new therapeutic agent for canine tumours.

Next, we determined whether REIC/Dkk-3-induced apoptosis in CIP-p cells was caspase-dependent. The intra- and extracellular levels of REIC/Dkk-3 protein increased in transfected CIP-p cells, but not in cells infected with the Ad-LacZ vector alone (Fig. 4c). Infection of CIP-p cells with Ad-REIC/Dkk-3 did not alter the levels of caspase-3, but increased the expression of cleaved caspase-3 (Fig. 4c).