

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006 年～2009 年
課題番号：18390330
研究課題名（和文） DNA-PK、ATM を制御する転写因子 Sp1 を分子標的とする放射線増感法の開発
研究課題名（英文） Radio-sensitization by Sp1 through transcriptional regulation of DNA-PK and ATM
研究代表者 細井 義夫
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号 50238747

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学
キーワード：放射線

1. 研究計画の概要

Sp1 を介した DNA2 重鎖切断修復酵素の転写制御を利用して、癌組織や正常細胞の放射線感受性を制御することを目的とする。Sp1 の蛋白質量/活性をあげることができれば、ATM や DNA-PK の蛋白質量/活性は高められ、DNA2 重鎖切断修復能が向上し正常組織を放射線防護することができる。Sp1 の蛋白質量/活性を低下させることができれば、ATM や DNA-PK の蛋白質量/活性は低下し、DNA2 重鎖切断修復能が低下して癌組織を放射線増感することができる。ATM と DNA-PK だけでなく、MDC1、XRCC4 など多くの DNA2 重鎖切断修復酵素のプロモーター領域に Sp1 binding site が存在する。Sp1 を制御することによりそれらの蛋白質量/活性を一括して制御することができ、より効率よく放射線増感することが可能と期待される。さらに、Sp1、ATM、DNA-PK の発現が正常細胞より癌細胞で高いことから、Sp1 を介して癌細胞を選択的に増感できる可能性が高い。以上のことから、癌細胞の選択的放射線増感の分子標的として Sp1 は極めて重要と考えられる。

2. 研究の進捗状況

(1) siRNA による Sp1 の抑制

siRNA としては、目的とした遺伝子の安定的な抑制を目的として、ベクター型の B-Bridge International 社製の TransSilentTM shRNA Vector Mix を利用した。Sp1 に対する siRNA によって、Sp1 の mRNA とタンパク質量は低下した。Sp1 に対する siRNA により Sp1 の発現は低下し、ATM、DNA-PK の発現も低下した。このことから、ATM と

DNA-PK の発現は Sp1 に制御されていること、並びに、Sp1 を介して感受性制御ができる可能性を明らかにした。さらに、培養細胞の放射線感受性が Sp1 を制御することにより高められることを実験により確認した。

(2) Sp1 と Sp3 の dominant negative DNA の expression vector の作成
dominant negative form としては、Zn finger 領域のみを持ち、S/T-rich と Q-rich を持たない構造とし、Sp1 では 580-784 アミノ酸をコードする領域を、Sp3 では 512-712 アミノ酸をコードする領域を dominant negative form DNA としてクローニングした。expression vector に組み込み培養細胞に transfect した。予備的実験では、作成した Sp1 の dominant negative DNA の転写は行われたが、Sp1 の機能に有意に影響を与えることはなく、Ku70、Ku80、DNA-PKcs、ATM の転写に影響を与えることもなかった。Sp3 に関してはクローニングを終えた段階にある。

(3) 正常型 Sp1/Sp3 の expression vector の作成

正常型 Sp1/Sp3 cDNA のクローニングは終了している。正常型 Sp1 と Sp3 の発現のためのベクターとしては pcDNA4/HisMax を用いて発現ベクター作成をしが、まだ細胞への transfection は行っていない。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

平成 20 年 4 月より、東京大学から新潟大学に移動したため、研究成果の発表等に多少の遅れがあります。新潟大学での研究環境の整備や大学院生の教育は順調に進み、平成 21

年4月現在ではほぼ以前の研究環境に復帰しつつあります。

4. 今後の研究の推進方策

これまでのところ、**dominant negative Sp1** はうまく機能していない。これに対して、**siRNA** は **Sp1** の転写を非常に低いレベルまで低下させることができた。このため、今後は **siRNA** を用いた実験を中心に行っていく予定である。また、培養状態が **Sp1** を介した転写制御に与える影響に関しても実験を行っていく予定である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Yamashita H, Nakagawa K, Hosoi Y, Kurokawa A., Fukuda Y, Matusmoto I, Misaka T, Abe K: Umani taste dysfunction in patients receiving radiotherapy for head and neck cancer. Oral Oncology in press.

2. Nakagawa K, Yamashita H, Nakamura N, Igaki H, Tago M, Hosoi Y, Momose T, Ohtomo K, Muto T, Nagawa H: Preoperative radiation response evaluated by 18-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival in locally advanced rectal cancer. Dis Colon Rectum in press.

3. Igaki H, Nakagawa K, Uozaki H, Akahane M, Hosoi Y, Fukayama M, Miyagawa K, Akashi M, Ohtomo K, Maekawa K: Pathological changes in the gastrointestinal tract of a heavily radiation-exposed worker at the Tokai-mura criticality accident. Journal of Radiation Research 49: 55-62, 2008.

4. Enomoto A, Kido N, Ito M, Morita A, Matsumoto Y, Takamatsu N, Hosoi Y, Miyagawa K: Negative regulation of MEKK1/2 signaling by Serine-Threonine Kinase 38 (STK38). Oncogene 27:1930-1938, 2008.

5. Sasano N, Enomoto A, Hosoi Y, Katsumura Y, Matsumoto Y, Shiraishi K, Miyagawa K, Igaki H, Nakagawa K: Free radical scavenger Edaravone suppresses X-ray-induced apoptosis through p53 inhibition in MOLT-4 cells. Journal of Radiation Research 48:495-503, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

1. 第66回日本医学放射線学会学術集会

平成19年4月13-15日横浜市

細井義夫、松本義久、榎本 敦、桂 真理、宮川 清

放射線による phosphatase 不活化を介した EGF 受容体活性化・放射線抵抗性化

2. 日本放射線腫瘍学会第19回学術大会

平成18年11月23-25日仙台市

細井義夫、丹野悠司、松本義久、榎本 敦、富田雅典、高倉かほる、宮川清、Sp1によるDNA2重鎖切断修復酵素の転写制御と放射線感受性制御

3. 日本放射線影響学会第49回大会

平成18年9月6-8日札幌市

細井義夫、丹野悠司、松本義久、榎本 敦、桂真理、高倉かほる、宮川清 Sp1によるDNA2重鎖切断修復酵素の転写制御と放射線感受性制御

4. 第4回日本医学放射線学会生物部会学術大会

平成18年7月1日弘前市

細井義夫、丹野悠司、松本義久、榎本 敦、高倉かほる、宮川 清 Sp1によるDNA2重鎖切断修復酵素の転写制御と放射線感受性制御

5. 第65回日本医学放射線学会学術集会

平成18年4月7-9日横浜市

細井義夫 転写因子 Sp1 による DNA2 重鎖切断修復酵素の転写制御と放射線増感

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし