

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500403

研究課題名（和文） 刺激応答性遺伝子発現制御システムの構築と遺伝子治療への利用

研究課題名（英文） Construction of a stimulation-responsive gene regulation system and its application for gene therapy.

研究代表者

小川 良平（OGAWA RYOHEI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・講師

研究者番号：60334736

研究成果の概要（和文）：構築した放射線応答性のプロモーター下に各種遺伝子を結合した遺伝子カセットをレトロウイルスベクターで導入する系を確立した。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞は、マウス皮下に形成された腫瘍中でもその発現制御が可能であった。自殺遺伝子である *fcy::fur* 遺伝子を導入した細胞は、放射線刺激に応じてその発現を増強し、*in vitro* での放射線依存性の自殺遺伝子治療が可能であった。また、異なる種類の転写因子の結合配列の使用により前立腺癌細胞で働く放射線応答性プロモーターを取得した。さらに、超音波刺激でマイクロ RNA がその発現を変化し、超音波の生物影響に関与しうることを突き止めた。このようなマイクロ RNA の標的配列は、遺伝子発現制御に利用できること、さらに、超音波応答性のプロモーターとの組み合わせで、より高性能な遺伝子発現制御システムの構築が可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We have established a retrovirus vector system to stably introduce a gene cassette consisting of a constructed radiation responsive promoter and a gene of interest. In a cell line expressing the luciferase gene, we showed expression of the luciferase gene was possible with radiation. In addition, with an established cell line expressing the *fcy::fur* gene, a suicide gene, it was possible to enhance cell killing effect when radiation was delivered, showing radiation dependent suicide gene therapy simulation *in vitro*. Furthermore, using another set of *cis*-elements, we successfully obtained radiation responsive promoters effectively working in a prostate cancer cell line. Moreover, we found that sonication changed expressions of microRNAs that could be involved in response of a cell to ultrasound. In addition, we showed that target sequences of microRNAs that decrease their expressions by sonication could be a more fine-tuned ultrasound mediated gene regulation system when combined with an ultrasound responsive promoter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体制御・治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療において、治療遺伝子投与後の発現制御により効果の高い治療が期待される。例えば、放射線により活性制御が可能なプロモーターを使用することで、治療遺伝子の発現を癌組織である放射線照射領域に限定することができ、より効率的で副作用の少ない癌の遺伝子治療の開発に結びつくと考えられている。刺激にตอบสนองして活性化する天然のプロモーターも存在するが、生理的な限界があり、より性能の優れたものの開発が必要である。

我々は、刺激により活性化する転写因子の結合配列（シスエレメント）をランダムに組み合わせ TATA ボックスに結合したものが、その刺激にตอบสนองして活性化するプロモーターになりうることを見いだした。この方法は、刺激により活性化する転写因子のシスエレメントのみを使用するため、刺激応答性のプロモーターを高率に取得できると考えた。

しかしながら、我々が以前に開発したものは、細胞特異性が高く、また、刺激がない状態でも比較的高い活性を示すなど、更なる改良が必要と思われた。また、11 個のプロモーターからなるライブラリから取得したものであり、この方法の優位性などについて十分には示せていなかった。

2. 研究の目的

我々が開発した刺激応答性プロモーターの構築法が、異なる種類の細胞や異なる種類の刺激にも応用可能な、一般的なものであることを示す。また、刺激がない状態でのプロモーター活性を抑制する方法など、完成したプロモーターに対して新たな改良を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞、ヒト前立腺癌由来の LNCaP 細胞および白血病由来の U937 細胞を用いて実験を行った。培養は、10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培養液を使用して 37°C、5% CO₂ 環境下で行なった。

(2) プロモーターライブラリの構築

2 つのライブラリを構築した。1 つ目のライブラリは、転写因子 NF κ B (nuclear factor kappa B)、AP-1 (activating protein-1)、NF-Y (nuclear factor-Y)、CBF-A (CArG binding factor-A) の結合配列を合成し、それらをランダムに組み合わせて、ヒトヘムオキシゲナーゼ I 遺伝子プロモーターの TATA ボックスを含む DNA 断片に結合して構築した断片を pGL3-Control ベクター (プロメガ社製) のルシフェラーゼ (luc) 遺伝子の 5' 上流にそれぞれ導入して構築した。2 つ目のライブラリは、前立腺癌細胞に放射線を照射した場合に活性化する転写因子、NF κ B、AP-1、

Oct-1 (octamer transcription factor-1)、p53、Nrf-2 (NF-E2 related factor-2) の結合配列を合成して、1 つ目のライブラリと同様に作成した。これらライブラリのベクターをそれぞれ一時的に導入した細胞に刺激を加えて、luc 活性の増強により応答性の評価を行った。活性の高いプロモーターは組み換えレトロウイルス (rrV) 作成用プラスミドにリクローニングした。

(3) rrV ベクターによる遺伝子導入

pSIREN-RetroQ ベクター (タカラバイオ社製) の U6 プロモーターを除き、合成プロモーターと luc 遺伝子からなる遺伝子カセットを導入して、rrV 作成用ベクターを構築した。また緑色蛍光タンパク (EGFP) 遺伝子や fcy::fur 遺伝子を luc 遺伝子と入れ替えることにより、それぞれの外来遺伝子を反応性の高いプロモーターで発現する rrV 作成用ベクターを構築した。

構築したプラスミドをパッケージング細胞である、AmphoPack293 (タカラバイオ社製) に導入し、48 時間培養後、その上清をウイルス液として、HeLa 細胞、LNCaP 細胞、U937 細胞に感染して遺伝子導入を行なった。

(4) 放射線照射

X 線照射は、2.5 cm 径あるいは 5 cm 径の培養皿に培養した細胞に X 線発生装置 (MBR-1520-3; 日立メディコ社製) を使用して行なった (5 Gy/min)。陽子線照射には、財団法人若狭湾エネルギー研究センター (福井県敦賀市) の多目的シンクロトロン・タンデム加速器 (W-MAST) を使用した (2 Gy/min)。

(5) 超音波照射

理学療法用の超音波照射装置 (ソニックマスター ES-2, OG 技研社製) で、1 MHz の超音波を 10% の Duty Factor で、0.5 W/cm² 程度の強度で照射した。

(6) 抗癌剤処理

各種抗癌剤を、治療時のそれぞれの抗癌剤の血中濃度を参考に細胞培養液に添加した。15 分程度培養した後に細胞を洗浄し、その後一定時間後に細胞を回収し、アッセイを行なった。

(7) luc アッセイ

luc の活性測定には、Dual luciferase assay kit (プロメガ社製) を使用した。2.5 cm 径の細胞培養皿に培養した細胞に 400 μ l の passive lysis buffer (kit に付属) を加え、10 μ l の細胞溶解液を 50 μ l のキットの基質液と混合し、すぐに発光をルミノメーターで測定した。一時的な遺伝子導入の場合は、同時に導入した phRL-TK により発現する Renilla luc を内部標準として、rrV で導入した場合は細胞溶解液のタンパク量で標準化を行い、相対活性を計算した。

(8) マイクロ RNA (miRNA) の Gene Chip 解析およびリアルタイム PCR 解析

細胞に刺激を与えた後、miRNeasy mini kit (キアゲン社製) を使用してトータル RNA を抽出した。抽出した 1 μ g のトータル RNA を FlashTag RNA Labelling Kit (Genisphere 社製) で処理をしたものを Gene Chip miRNA array ver. 1.0 に導入し、48°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行なった。その後、洗浄と染色を行ない専用スキャナーでシグナルを読み込んだ。Gene Chip による分析は 2 回繰り返した。これにより得られたデータは、miRNA QC Tool アプリケーションソフトウェアを使用して、分析を行なった。

抽出したトータル RNA の一部は miScript Reverse Transcription Kit (キアゲン社製) で cDNA に変換した。この cDNA を鋳型に、miScript Primer Assay (キアゲン社製) を特異的プライマーとして、miScript SYBR Green PCR Kit (キアゲン社製) を使用して、Mx3000P QPCR システム (アジレントテクノロジー社製) を使用して、リアルタイム PCR の反応及び解析を行った。

(9) 担癌マウスの生体腫瘍内での遺伝子発現制御

刺激応答性プロモーター下に luc 遺伝子を安定的に導入した細胞を KSN マウスの脇腹に皮下接種し腫瘍形成をおこなった。発光基質ルシフェリン EF (プロメガ社製) を腹腔投与し、in vivo bioluminescence イメージングシステム (Aequoria-2D/c8600; 浜松ホトニクス社製) を用いて発光量を計測した。その後、放射線照射 8 時間~24 時間後に、再度ルシフェリンを腹腔内接種し、発光量を計測した。

(10) in vitro 自殺遺伝子治療

刺激応答性プロモーター下流に fcy::fur 遺伝子を安定的に発現する組換え細胞に刺激を与え、直後に細胞を回収して 96 ウェルプレートに植え替えた。あるいは、96 ウェルプレートに植えた後に刺激を与えた。これらの細胞に 0~10 mM の 5-fluorocytosine を溶解した培養液で 24 時間培養した。その後洗浄し、新しい培養液でさらに 24 時間培養した。これに、Cell Counting Kit (Dojindo 社製) の WST-1 試薬を 10 μ l 添加し、さらに 1~2 時間培養後にマイクロプレートリーダー (iMark; バイオラッド社製) で 450 nm の吸光度を測定することで、生細胞数を相対的に評価した。

4. 研究成果

(1) 新たな放射線応答性人工プロモーターの開発

まず、我々が開発した方法が、実際に高効率に刺激応答性プロモーターを取得するのに有効な方法であることを示すために、前回とほぼ同様の方法で、62 個のプロモーターからなるライブラリを構築した。一時的に HeLa

細胞に導入し、放射線照射後 6 時間にデュアルルシフェラーゼアッセイでそれぞれのプロモーターの応答性を評価したところ、57 個のプロモーター (91.9%) が luc の発現を有意に増強した。この中で 3 種類のプロモーター (クロン 831、843、848) が、10 倍以上の発現増強を示すことが判明した。

これら 10 倍以上の発現増強を引き起こすプロモーターを luc 遺伝子とともに rrV ベクターで安定的に HeLa 細胞に導入した。さらに、以前に作成した 11 個のプロモーターからなるライブラリで最も反応性の高かったクロン 11 プロモーターにランダムに点変異を導入して反応性を改良したクロン 11-9-37 についても、同様に rrV ベクターで HeLa 細胞に導入した。

これら放射線応答性プロモーターの塩基配列データは GenBank に登録した (accession numbers, 831: HQ542862, 843: HQ418223, 848: HQ418224, 11-9-37: EF536082)。

新たに取得したプロモーターを安定的に導入した HeLa 細胞は、一時的導入の場合と比較して刺激を与えないときの luc 活性が高く、刺激後の増強割合は一時的導入の時の 40-70% 程度であった。一方、11-9-37 プロモーターは、それほど大きな変動はなく、10 Gy の X 線を照射した 6 時間後に約 20 倍の増強を示した。このプロモーターは、EGFP 遺伝子や fcy::fur 遺伝子の発現も X 線の刺激により同様に増強することが示された。また、構築した組換え細胞に陽子線を照射したところ、luc 遺伝子の発現を有意に増強することが判明した。X 線と比較して応答性は低かったが、プロモーターの反応性の順序はどちらの放射線でも同じであった。これらの結果は、光線である X 線と粒子線である陽子線の刺激に対して、細胞が同じような反応を示すためであると考えている。

X 線や陽子線で細胞を刺激すると、細胞内酸化ストレスを起すことが知られている。また、作成したプロモーターは、NF κ B や AP-1 などのように、酸化ストレスに関係する転写因子の結合配列を含んでおり、本プロモーターの活性化が両放射線による酸化ストレスに関与することも考えられる。そこで、水酸化ラジカルを消去する、ジメチルスルホキシドあるいは D-マンニトールの存在下で細胞に両放射線を照射した。その結果、それぞれ添加量依存的に luc 発現の増強割合が減少することが示され、本プロモーターの活性化が、両放射線による酸化ストレスに関与しうることが示された。

次に、この 11-9-37 プロモーターと、クロン 831 プロモーター下に luc を発現する HeLa 細胞をマウスに接種し、形成された腫瘍に放射線を照射して、生体での反応性を調べてみた。10 Gy の X 線で、それぞれ 2.3 倍、1.7

倍、15 Gy の X 線それぞれ 2.7 倍、2.3 倍の増強を示した。有意な増強ではあったが、*in vitro* で観察されたものよりも大きく抑制されていた。X 線を照射しない場合でも、SV40 プロモーターによるものと同様以上のシグナルを検出しており、マウス血中のサイトカイン、ホルモンなどの生理活性物質によってプロモーターが活性化したためであるかも知れない。

次に、11-9-37 プロモーター下に *fcy::fur* 遺伝子を結合した遺伝子カセットを導入した HeLa 細胞に 10 Gy の X 線を照射し、その後、5-FC 存在下で培養したところ、X 線を照射したもののみ、5-FC の濃度依存的に細胞生存率が低くなる事が示された。これは、*fcy::fur* 遺伝子の発現が放射線刺激で増加したためであろう。この結果は、この人工プロモーターを使用したシステムの利用により、放射線依存的な自殺遺伝子治療が可能である事を示唆している。しかしながら、放射線を照射しない場合でも、高い濃度の 5-FC 存在下では細胞生存率の減少が観察される。刺激を受けないときの発現をより抑制する必要があると思われる。

(2) 前立腺癌細胞で働く放射線応答性プロモーターの構築

HeLa 細胞で放射線応答性のプロモーターは、他の細胞では顕著な放射線応答性を示さない。これは、細胞の由来する組織によって、刺激に应答するシグナル伝達経路が異なり、活性化する転写因子の種類が異なるためだと思われる。また、癌細胞では正常細胞では通常活性化してない転写因子が常時活性化している場合もあり、癌の種類によってもプロモーター構築に使用できるシスエレメントは異なると思われる。

そこで、前立腺癌細胞で異なるシスエレメントを利用して放射線応答性のプロモーターの構築を試みた。前立腺癌細胞に放射線を照射した時に活性化する転写因子を論文データから推定し、NF κ B、AP-1、Oct-1、p53、Nrf-2 の 5 種類の転写因子を選択した。これらのシスエレメントを合成し、28 個のプロモーターからなるライブラリを HeLa 細胞の場合と同様に構築した。それぞれ LNCaP 細胞に導入し、10 Gy の放射線を照射後 72 時間に、デュアルルシフェラーゼアッセイでプロモーターの活性化を調べたところ、13 個のプロモーターが有意に活性を増強した (約 46.4%)。これらのうち最も反応性の高いクロン 880 プロモーター (約 6.7 倍の増強) にランダムに点変異を導入し、改良を試みたところ、10 Gy の X 線照射後 48 時間で luc 活性が 10.4 倍に増強する、クロン 880-8 プロモーターを得た。クロン 880 プロモーター、880-8 プロモーターの塩基配列は、GenBank に登録した (各 HQ418221, HQ418222)。

HeLa 細胞の場合と同様に、rrV ベクターで安定的に導入した LNCaP 細胞を使用し、抗酸化剤を添加することで X 線照射による下流遺伝子の発現増強に抑制がかかること、マウス腫瘍中での X 線照射による発現増強すること、*in vitro* での放射線依存的な自殺遺伝子治療が可能であることなどを示した。

(3) 放射線以外の刺激によるプロモーターの活性化

クロン 880-8 プロモーターの増強が LNCaP 細胞への放射線刺激による酸化ストレスに起因することが推定される。そこで、酸化ストレスを誘起する、抗癌剤処理でも活性化が起こるかどうか調べてみた。880-8 プロモーター下 luc 遺伝子を結合した遺伝子カセットを安定的に導入した LNCaP 細胞を 7 種類の抗癌剤で処理をした。12 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイで評価したところ、ドキシソルビンで最も高い反応性を示した。詳しく調べたところ、ドキシソルビンの処理濃度および処理時間に依存して増強し、処理濃度の高過ぎや処理時間の長過ぎの場合は、luc 活性の増強が抑制される。また、この増強は、D-マニトールの添加濃度依存的に抑制されることから、酸化ストレスに関与することが示唆された。ただ、880-8 プロモーターの活性化に寄与しない抗癌剤のうち、イフォスファミドやドセタキセルなどもその処理により細胞内酸化ストレスを誘起すると報告されており、本プロモーターが、酸化ストレスのみで活性化されるのではないことが示唆された。このプロモーター下に *fcy::fur* 遺伝子を発現する LNCaP 細胞は、5 μ M のドキシソルビンを 15 分間処理した時のみ、5-FC 濃度依存的に生存率が下がる。抗癌剤で制御する遺伝子治療という新しいタイプの治療に結びつく可能性を示唆した。

低強度の超音波照射が細胞内酸化ストレスを誘起することが知られている。また、HeLa 細胞で放射線により活性化するプロモーターが、低強度超音波にも应答して活性化する。そこで、前立腺癌細胞用に作成したプロモーターライブラリを超音波刺激でスクリーニングを行なった。それぞれのプラスミドを LNCaP 細胞に一時的に導入後、1 MHz、0.5 W/cm²、10 % Duty factor で 60 秒間照射した 12 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイでプロモーターの反応性を評価した。その結果、28 個のうち 27 個で有意な発現増強を示し (96.4%)、13 個で 10 倍以上の増強を示した。また、880-8 も 10 倍以上の発現増強を示した。これらのうち、最も高い反応性を示す 3 つのプロモーターを再度同様のアッセイで評価したところ、お互い有意差はなかったが、クロン 880-8 プロモーターが最も高い反応性を示した (15.5 倍)。そこで、880-8 プロモーター下の luc 遺伝子を安定的に導入

した LNCaP 細胞を使用して、さらに解析を行ったところ、超音波の強度および照射時間依存的に発現増強が観察された。また、1 MHz の超音波を照射した時のみ、5-FC 濃度依存的に細胞の生存率が下がることが示された。超音波は人体にも安全に使用できる可能性があり、このシステムと超音波の組み合わせは、癌治療だけでなく、その他の遺伝子治療にも有用かもしれない。

(4) 超音波刺激による miRNA 発現の変化とその生物作用への影響

細胞にストレスを与えると、遺伝子発現が変化し、そのストレスに対応することが知られている。近年、そのようなストレス応答に、miRNA が関与しているとの報告が続いている。我々も、超音波を照射したときに遺伝子発現が変化することを観察したが、その遺伝子発現変化に miRNA が関与しうると考えて解析を行った。1 MHz の超音波をアポトーシスが起こる条件で U937 細胞に 60 秒間照射した。照射 4 時間後にトータル RNA を抽出し、Gene Chip で miRNA の発現変化を調べた。U937 細胞では放射線の刺激により 0.65 倍以上減少するものが 8 種類、2 倍以上に増加するものが 7 種類同定された。これらのうち発現量及びその変化が大きいものについて、リアルタイム PCR により、発現の経時変化を解析し、それらの発現変化を確認した。特に発現減少割合の大きい、miR-720 と miR-424* について、これらの miRNA を rrV ベクターで強制発現する細胞株を構築した。また、増加割合の大きい、miR-663 および miR-663B については、これら miRNA の相補配列により機能を阻害する RNA (Tough Decoy RNA) を発現するベクターを安定に導入した細胞株を作成した。これら新たに構築した細胞株の miRNA の発現は、標的配列を mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に提示するように導入したベクターや、リアルタイム PCR による発現量の定量により確認した。これら 4 つの細胞について、超音波によるアポトーシスの誘導割合を比較してみると、miR-663B の働きを抑制した細胞株で、親株の U937 と比較して有意に高いアポトーシスの誘導が観察された。この miRNA を強制発現した細胞では、アポトーシスを促進する遺伝子である CREBZF や KSR2 の標的配列を mRNA の 3' UTR にもつ luc の発現を抑制することが示された。したがって、U937 細胞に超音波を照射した場合、miR-663B はその発現を増加することにより、細胞のアポトーシスを抑制するように調節していると考えられる。このように、超音波による細胞へのストレスは miRNA の発現変化を引き起こし、それによって細胞のストレス応答が修飾を受けていると考えられた。

(5) 超音波刺激で発現が変化する miRNA とその遺伝子発現制御への利用

同様に、HeLa 細胞にも 1 MHz の超音波を照射し、照射 4 時間後にトータル RNA を抽出して miRNA の発現変化を調べた。その結果、0.7 倍以下に減少するものが 7 種類、1.4 倍以上に増加するものが 4 種類同定された。HeLa 細胞の場合は、超音波照射により発現が減少するものに焦点を絞り、miR-452、miR-92b、miR-423-5p および miR-744 について、リアルタイム PCR によりその発現変化を確認した。つぎに、これら miRNA に対する 100%相補配列を合成し、ランダムに結合したものを luc 遺伝子 mRNA の 3' UTR に提示するように導入したプラスミドを構築し、16 種類のライブラリを作成した。それぞれを HeLa 細胞に一時的に導入した後に、1 MHz の超音波を照射した。6 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイを行なったところ、超音波照射により発現が 2 倍以上に増強する T#1 および T#4 の 2 種類を見いだした。塩基配列分析をしたところ、430 塩基対、426 塩基対それぞれからなる DNA 断片で、両方とも 16 個の標的配列を含んでいた。超音波に応答するクロン 831 プロモーター下の luc 遺伝子の 3' UTR にこれらの標的配列を組み込んだものをそれぞれ安定的に HeLa 細胞に導入し、1 MHz の超音波を照射した。その結果、標的配列を導入したものは、していないものと比較して、全体的に luc 遺伝子の発現が落ちているが、超音波を照射していない場合の発現抑制の割合がより大きいため、よりめりはりのある発現制御が可能になった。このように、刺激により発現が変化する miRNA の標的配列は人工的な遺伝子発現制御に利用できることが示された。現在、831 プロモーター下流の fcy::fur 遺伝子の 3' UTR にこれらの標的配列を導入した組換え細胞を構築し、超音波による自殺遺伝子治療の制御を試みている。

また、同様に、LNCaP 細胞に X 線を照射した場合の miRNA の発現変化、および、それら miRNA の標的配列の遺伝子発現制御への利用についての検討も行っている。

5. 主な発表論文等

(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 7 件)

- ① Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, T. Kondo, N. Doi, L. B. Feril, Jr. Regulation of gene expression in human prostate cancer cells with artificially constructed promoters that are activated in response to ultrasound stimulation. *Ultrason Sonochem.* 査読有 . 2012 (DOI: 0.1016/j.ultsonch.2012.05.007).
- ② Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, S. Fukuda, K. Kume, T. Hasegawa, M. Hatashita, H. Izumi and T. Ishimoto.

Regulation of gene expression in retrovirus vectors by X-ray and proton beam radiation with artificially constructed promoters. *J Gene Med*. 査読有. 2012. 14: 316-327. (DOI: 10.1002/jgm.2625)

- ③ Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe. Ultrasound stimulation induces microRNA expression changes that could be involved in sonication-induced apoptosis. *J Med Ultrason*. 査読有. 2012. (DOI: 10.1007/s10396-012-0364-9)
- ④ Ogawa R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui, G. Kagiya, N. Doi, Q. L. Zhao, L. B. Feril, Jr. An artificially constructed radiation responsive promoter is activated with doxorubicin treatment. *Cancer Gene Ther*. 査読有. 2012. 19: 345-351. (DOI: 10.1038/cgt.2012.7)
- ⑤ Morii, A., R. Ogawa, A. Watanabe, S. Kakutani, K. Kume, T. Kondo and H. Fuse. Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 査読有. 2012. 19: 219-227. (DOI: 10.1038/gt.2011.89.)
- ⑥ Furusawa Y., Y. Fujiwara, P. Campbell, Q. L. Zhao, R. Ogawa, M. A. Hassan, Y. Tabuchi, I. Takasaki, A. Takahashi, T. Kondo. DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines. *PLoS ONE*. 査読有. 2012. (DOI: 10.1371/journal.pone.0029012)
- ⑦ Kagiya, G., R. Ogawa, J. A. Cook, R. Choudhuri, M. Hatashita, Y. Tanaka, B. G. DeGraff, and J. B. Mitchell. Improvement and induction property of radiation-responsive promoter through DNA shuffling of 5'-flanking regions of the human p21 gene. *J. Biosci. Bioeng*. 査読有. 2010. 110:118-123、(DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.12.013)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui Z-G, and Kondo T: Effect of sonication on miRNA expressions and its application for gene expression control with ultrasound. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- ② 森井章裕, 小川良平, 渡部明彦, 近藤 隆, 布施英樹: 超音波による遺伝子発現制御と治療応用への検討. 第 10 回日本超音波治療研究会, 2011, 11, 26, 東京.
- ③ Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Kondo T, Fuse H: Controlling gene expression by an anticancer drug inducible artificial promoter. 第 70 回日本癌学会総会, 2011, 10, 3-5, 名

古屋.

- ④ Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Fuse H, Kondo T.: Controlling gene expression by an ultrasound inducible artificial promoter. 第 70 回日本癌学会総会, 2011, 10, 3-5, 名古屋.
- ⑤ 小川良平: 超音波照射のマイクロRNA発現への影響とそれによる遺伝子発現の変化. 日本超音波医学会第 84 回学術集会新技術開発セッション, 2011, 5, 29, 東京.
- ⑥ Morii A., Watanabe A., Ogawa R., Kondo T., Fuse H.: Construction of promoter induced by radiation for human prostate cancer cells. 第 68 回日本癌学会総会, 2009, 10, 1-3, 横浜.
- ⑦ Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Kondo T, Fuse H: Differential expression profiles of microRNA in prostate cancer cells in response to X-ray irradiation. 第 69 回日本癌学会総会, 2010, 9, 22-24, 大阪.
- ⑧ Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Fuse H, Kondo T.: Analyses of expression profile changes of microRNA in HeLa cells in response to X-ray or ultrasound. 第 69 回日本癌学会総会, 2010, 9, 22-24, 大阪.
- ⑨ Ogawa R., Morii A., Watanabe A., Fuse H., Kondo T.: Regulation of gene expression by radiation responsive artificial promoters in recombinant virus vector. 第 68 回日本癌学会総会, 2009, 10, 1-3, 横浜.
- ⑩ 小川良平, 鍵谷 豪, 近藤 隆: 基礎系シンポジウム 超音波応答性遺伝子発現誘導メカニズムの解析-. 第 8 回超音波治療研究会, 2009, 11, 28, 東京.

[その他]

ホームページ等

<http://opirut.u-toyama.ac.jp/researchers/index-admin.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 良平 (OGAWA RYOHEI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・講師

研究者番号: 60334736

(2) 研究分担者

鍵谷 豪 (KAGIYA GO)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号: 30524243

趙 慶利 (ZHAO QING-LI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 90313593