

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18日現在

機関番号:32607

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2009 ~ 2011

課題番号:21591618

研究課題名(和文) 低酸素細胞に対する殺細胞効果の増強と治療への応用

研究課題名(英文) Enhancement of hypoxic cell killing and gene therapy applications to cancer treatment

研究代表者

鍵谷 豪(KAGIYA GO)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号:30524243

研究成果の概要(和文):ニトロキシド化合物の1つ, テンポールに低酸素環境下, HIF1 α の発現を強力に誘導する作用を見いだした。本研究ではHIF1で制御される遺伝子治療用ベクターを構築し, テンポールによる殺細胞効果の増強を評価することである。*in vitro*において, 低酸素環境下テンポールによる自殺遺伝子発現を介した殺細胞効果は, 約50倍の増強を示した。また, 生体腫瘍においてもテンポールによるHIF1 α 発現誘導作用を確認した。

研究成果の概要(英文): We have found that tempol, one of nitoxides, strongly induced the expression of hypoxia inducible-factor (HIF)1 α with a combination of hypoxic conditions. The aim of this study is to construct the plasmids that regulate the expression of suicide gene with tempol and to evaluate the enhancement of the cell killing effect by tempol. The transfected cells with the plasmid encoding suicide gene indicated the highest cell killing effect after treatment of 5-FC, tempol and hypoxic mimic CoCl₂.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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:低酸素細胞領域, ニトロキシド化合物, 殺細胞効果

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍には細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する酸素濃度の低い低酸素細胞領

域が存在する。一般に腫瘍組織の約10~15%が低酸素細胞領域で占められており, この領域は不十分な栄養状態と低酸素分圧下であ

るため、生存した状態ではあるが細胞分裂を一時停止した休止期細胞を多く含む。放射線治療は DNA に作用点を持つため、休止期細胞より増殖する細胞に強く殺細胞効果を示す。また、細胞内の酸素濃度は放射線の生物効果の1つ、酸素効果に影響を与えるため低酸素分圧下では DNA への損傷が少ないことが知られている。このため、低酸素細胞領域における休止期細胞は放射線抵抗性であり、また弱い酸素効果のため治療後において残存する可能性があり、再発の原因として問題視されている。この問題を克服するために、低酸素細胞領域の放射線作用を増感させる低酸素細胞増感剤、ミソナダゾールやニトロイミダゾール等が開発されてきた。しかし、これら薬剤は *in vitro* レベルでは放射線増感効果を示すが、*in vivo* レベルではその増感効果は低く、また胃腸障害、末梢神経障害を引き起こす等の問題が報告されている。このため、現在、低酸素細胞を特異的に根絶する有用な治療は無く、新たな方法が模索されている。このような背景の下、我々はニトロキシド化合物の1つ、テンポールに低酸素環境下、Hypoxia Inducible Factor (HIF)1 α の発現を強力に増強する作用を見いだした。つまり、HIF-1 結合配列である低酸素応答因子 (HRE : hypoxia response element) の下流に殺細胞効果を示す自殺遺伝子を結合した遺伝子治療用ベクターは、その遺伝子発現をテンポール添加により、低酸素細胞領域特異的に増強できると予測され、放射線抵抗性である低酸素癌細胞領域克服へ向けての新たな治療法になると考えられる。

2. 研究の目的

テンポールにより、低酸素細胞領域特異的に自殺遺伝子発現を増強する遺伝子治療用ベクターを構築し、*in vitro* でその殺細胞効

果の増強を評価すること。また、担癌マウスを用いテンポールにより生体内腫瘍低酸素細胞領域で自殺遺伝子発現の誘導を評価すること。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞

導入遺伝子の一過性発現による測定には、ヒト乳癌細胞由来の MCF7, ヒト前立腺癌細胞由来の LNCap, およびヒト骨肉腫由来の Saos2 を用いた。*in vitro* での殺細胞効果の増強評価、および担癌マウスを用いた生体内腫瘍でのテンポールによる HIF1 α 発現誘導評価については、自殺遺伝子 FcyFur 融合遺伝子を発現する安定発現株 (MCF7 由来) 3 種、またはルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を発現する安定発現株 3 種をそれぞれ用いた。これら細胞株は、10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培養液にて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 環境下で培養をおこなった。

(2) プラスミドの構築

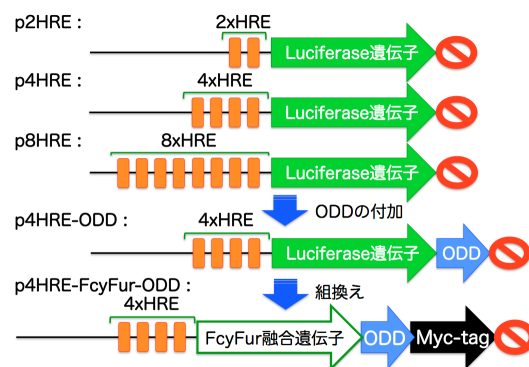


図1 構築したプロモーター及び遺伝子の構造

構築したプロモーターおよび遺伝子の構造を図1に示す。2, または4つのHRE配列とTATA boxを含むオリゴヌクレオチドを設計し、Luc遺伝子を保有するプラスミド pGL4.11 を鋳型に long-PCR をおこない、HREによりLuc遺伝子を発現制御するプラスミド配列の増幅をおこなった。制限酵素反応後、Dpn I 処理によりメチル化された鋳型プラスミドを消化し、ライゲーション反応をおこないプラ

スミド p2HRE, p4HRE を構築した。プラスミド p8HRE は, p4HRE を鋳型に PCR により 4 つの HRE 配列を含む DNA 断片の増幅をおこない, これら増幅断片をプラスミド p4HRE の TATA box 上流に挿入することで HRE 配列が 8 つタンデムに配列したプラスミド p8HRE を構築した。プラスミド p4HRE-ODD は HIF1 α 由来の酸素依存的分解ドメイン (ODD: oxygen dependent degradation domain) を PCR で増幅し, Luc 遺伝子下流に挿入することで構築した。自殺遺伝子 FcyFur 融合遺伝子を搭載するプラスミド p4HRE-FcyFur-ODD は, p4HRE-ODD の Luc 遺伝子をプラスミド pORF-Fcy::Fur を鋳型に増幅した FcyFur 融合遺伝子に組換え, また, その遺伝子発現を確認するため Myc-tag 配列を ODD 下流に挿入し構築した。構築した全てのプラスミドの塩基配列は, 配列分析をおこない確認した。

(3) Luc 発現誘導率測定

構築したプラスミドを, 遺伝子導入試薬を用い各細胞株へ遺伝子導入後, デュアルルシフェラーゼ測定 (DLR) により Luc 発現誘導率を測定した。テンポール濃度依存性に関してはテンポールの終濃度を 1mM および 2 mM に変化させ評価した。酸素濃度依存性に関しては, 腫瘍内の酸素濃度の中央値が 1.3% (0~5%の幅) と報告されているため, 酸素濃度を 0.5, 1.0, 3.0, 5.0% と変化させ, 誘導 24 時間後に DLR 測定をおこない発現誘導率を決定した。細胞種による発現誘導率の変化については, 酸素濃度を 1% とし LNCap, MCF7, Saos2 の 3 種類の細胞株を用い誘導 24 時間後に DLR 測定をおこない発現誘導率を決定した。各細胞群の発現誘導率は大気酸素分圧下, テンポール非添加細胞群の Luc 活性値を基準として算出した。

(4) コロニーアッセイ法による *in vitro* の殺細胞効果の増強評価

低酸素環境下テンポール添加により自殺遺伝子 FcyFur 融合遺伝子を発現する安定株 (ヒト乳癌細胞 MCF7 由来) 3 種を用いた。規定細胞数をディッシュに播種約 24 時間後, 0.2% 牛胎児血清に調整した RPMI1640 へ培養液を交換した。その後, 5-FC, テンポール, および低酸素環境と類似した作用を示す塩化コバルトをそれぞれ終濃度 10 mM, 2 mM, 100 μ M で細胞へ添加した。24 時間培養後, 牛胎児血清を 10% となるように細胞試料へ添加した。さらに 24 時間培養後, 規定した細胞数を別のディッシュへ播種し, 約 2 週間の培養後, 形成したコロニーをメチレンブルーで染色をおこない細胞生存率の測定をおこなった。

(5) 担癌マウスを用いた生体腫瘍内でのテンポールによる HIF1 α の発現増強評価

プラスミド p4HRE-ODD を MCF7 へ遺伝子導入し, 薬剤選択により染色体に p4HRE-ODD の配列を保持する安定発現株の構築に成功した。この安定発現株をマトリゲルと共に KSN マウスの脇腹背側皮下に接種し腫瘍形成をおこなった。ソムノペンチル麻酔薬による腹腔麻酔後, 発光基質ルシフェリンを腹腔内接種し, *in vivo* イメージングシステム (IVIS Imaging System) を用い発光値を計測した。その後, 100 mM テンポールを 500 μ l 腹腔内接種し, 6 時間後再度, ルシフェリンを腹腔内接種し, 同システムを用い発光値を計測した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子治療用ベクターの構築

イムノプロット分析を用い, 大気酸素分圧下テンポール添加細胞群において HIF1 α の発現が誘導すること, また 1% 酸素分圧下テンポール添加細胞群において, HIF1 α の発現がより増強することを確認した (図 2)。HIF1

α は HIF1 β , p300 と共にプロモーター領域内の HRE に結合し転写を活性化する。テンポールにより低酸素細胞領域内で転写活性を増強するプロモーター配列を探索するため、Luc 遺伝子のプロモーター領域内の HRE 数を 2, 4, 8 と変化させたプラスミド p2HRE, p4HRE, p8HRE を構築した。その結果, 1%低酸素分圧, 2 mM テンポール添加条件下で, HRE 数 2, 4, 8 と変化させたプロモーターの発現誘導率は, 大気分圧下テンポール非添加細胞の Luc 活性を基準とし, それぞれ 7.5, 23, 4.5 倍と有意に増加した。しかし, これら構築した3つのプロモーターの大気酸素分圧下テンポール非添加条件下での転写活性は高く, 遺伝子治療用ベクターのプロモーターとして用いた場合, 正常組織における副作用が懸念された。このため, 酸素濃度依存的にタンパクを分解するシグナル, ODD を最も高い発現誘導活性を示したプラスミド p4HRE の Luc 遺伝子下流に結合し, プラスミド p4HRE-ODD を構築した。その発現誘導率は, 大気酸素分圧下 2 mM テンポール添加細胞群において 24 倍, 1%酸素分圧下テンポール非添加細胞群において 22 倍を示し, 1%低酸素分圧下テンポール添加細胞群においては 218 倍と最も高い発現誘導率を示した。また, 大気酸素分圧下テンポール非添加条件下では低い発現活性を示した。つまり, 4つの HRE から構成されるプロモーターと ODD 配列を遺伝子治療用ベクターに搭載した場合, 正常組織における副作用を

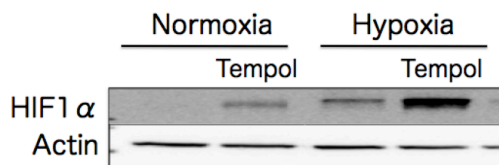


図2 イムノブロット分析によるテンポールによる HIF1 α の発現増強

回避できると考えられた。

(2) テンポールによる遺伝子治療用ベクターの発現誘導特性

構築したプラスミド p4HRE-ODD の発現誘導特性 (テンポール濃度依存性, 酸素濃度依存性, 細胞株依存性) の評価を試みた。テンポール濃度依存性に関し, 1%酸素分圧下, 1 mM, 2mM テンポール添加細胞群において発現誘導率は 42, 218 倍を示し, 濃度と共に上昇した。テンポール添加による発現誘導率の酸素濃度依存性に関しては, 酸素濃度 1%まで発現誘導率は上昇し, 最大値 218 倍に達した。それ以上の酸素濃度では発現誘導率は低下した。細胞株に LNCap, MCF7, Saos2 を用い, 1%酸素分圧下 2 mM テンポール添加による発現誘導率は, それぞれ 221 倍, 217 倍, 34 倍を示した (図3)。Saos2 の発現誘導率が LNCap, MCF7 と比較し低い, どの細胞株も大気酸素分圧下テンポール非添加細胞群と比較すると有意に高い発現誘導率を示した。このため, プロモーター領域内に4つの HRE をコードし, ODD を付加したベクターは, 治療用ベクターの発現制御配列として有用であることが示唆された。

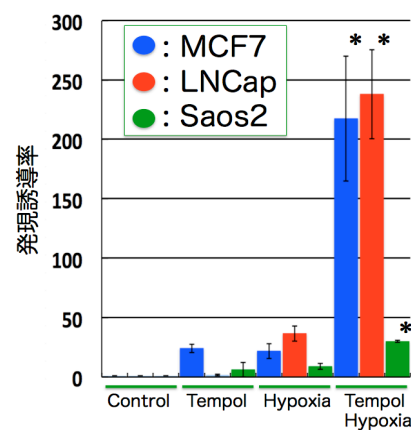


図3 各細胞株の発現誘導率の比較
*: p < 0.01 vs control

(3) *in vitro* での自殺遺伝子による殺細胞効果の増強

プラスミド p4HRE-ODD の Luc 遺伝子を自殺遺伝子 FcyFur 融合遺伝子に組換えた遺伝子治療用プラスミド p4HRE-FcyFur-ODD を構築した。FcyFur 融合タンパクはシトシンデアミナーゼ活性を持ち, プロドラッグである 5-FC

を抗がん剤である 5-FU へ代謝し殺細胞効果を示すことが知られている。この治療用プラスミドを MCF7 に遺伝子導入し、ネオマイシンによる薬剤選択により、染色体に p4HRE-FcyFur-ODD の配列を保持する安定発現株を選択した。低酸素環境下テンポールによる FcyFur 融合遺伝子発現を介した殺細胞効果の増強を評価するため、上記で構築した安定発現株を用い、コロニーアッセイにより細胞生存率を評価した。その結果、5-FC とテンポール、また低酸素環境を擬似的に引き起こすことが知られている塩化コバルトを共に添加した試料のみにおいて、G2 期で細胞周期を停止した細胞像が多く観察され、また高い殺細胞効果が観察された (図 4)。これは、塩化コバルトとテンポール添加により FcyFur 融合遺伝子発現が強く誘導され 5-FC を抗がん剤である 5-FU へ代謝し細胞死が引き起こされたと考えられる。殺細胞効果の定量化を試みた結果、5-FC 添加群の塩化コバルトとテンポール添加試料の生存率は 0.01 を示し、塩化コバルト単独添加試料の生存率 0.51 と比較し、約 50 倍のテンポールによる FcyFur 融合遺伝子発現を介した殺細胞効果の増強を示した。テンポール単独添加試料の生存率は、5-FC 添加、非添加群共に低い生存率を示し、テンポールの細胞毒性によるものと考えられる。これらの結果は、低酸素環境下でテンポールにより殺細胞遺伝子の発現を誘導し、*in vitro* レベルで殺細胞効果の増強をはじめて示したものである。今後は、テンポールに代わる高い HIF1 α 発現活性を有し、かつ細胞毒性の低いニトロキシド化合物の探索を行う予定である。

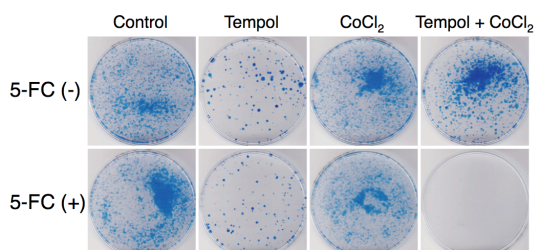


図4 FcyFur融合遺伝子発現による殺細胞効果の増強
5-Fc(-):5-FC非添加試料, 5-Fc(+):5-FC添加試料

(4) 担癌マウスを用いた生体内腫瘍でのテンポールによる HIF1 α の発現増強

マウス生体内腫瘍でのテンポールによる HIF1 α 発現増強を *in vivo* 光イメージングシステムを用い評価した。*in vitro* と比較しテンポールによる Luc 遺伝子発現誘導率は約 2 倍と低い値を示したが、生体内腫瘍でもテンポールは HIF1 発現を増強することが判明した。この低い発現誘導率は、低酸素細胞領域に到達するテンポール濃度が影響しているとも考えられる。

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 5 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.org/10.1016/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](https://doi.org/10.1002/jgm.2625).
- ③ 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](https://doi.org/10.1038/cgt.2012.7).

- ④ Kawakami F., M. Suzuki, N. Shimada, G. Kagiya, E. Ohta, K. Tamura, H. Maruyama and T. Ichikawa. Stimulatory effect of α -Synuclein on the tau-phosphorylation by GSK-3 β . *FEBS J* 査読有, 2011 278:4895-4904, DOI: [10.1111/j.1742-4658.2011.08389.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08389.x)
- ⑤ 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](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.12.013)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Go Kagiya, R. Ogawa, M. Hatashita, Y. Tanaka, K. Kouda, S. Fukuda, and J. B. Mitchell. Enhancement of hypoxic cell killing by the nitroxide Tempol. 10th International Congress on Targeted Anticancer Therapies, 2012. 3. 8, Amsterdam
- ② 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 幸田華奈, 福田茂一, ニトロオキシド化合物テンポールを用いた低酸素細胞に対する殺細胞効果の増強, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011. 11. 17, 神戸市
- ③ 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, 松本英樹, ニトロオキシド化合物による HIF-1 α の発現増強, 第 49 回日本医学放射

線学会生物部会学術大会, 2010. 7. 9, 札幌市

- ④ 小川良平, 鍵谷 豪, 近藤 隆, 超音波応答性遺伝子発現誘導メカニズムの解析, 第 8 回日本超音波治療研究会・基礎シンポジウム, 2009. 11. 28, 東京都千代田区
- ⑤ 佐藤英介, 鍵谷 豪, 稲田龍司, 梅田徳男, 小川幸次, 五味 勉, 斉藤京子, 長谷川智之, 原 秀剛, 村石 浩, 尾崎正則, 武田 徹, 丸山浩一, 診療放射線技師教育における学術国際交流, 第 3 回日本診療放射線学教育学会大会, 2009. 8. 1, 相模原市
- ⑥ 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 田中良和, プロモーターシャッフリングを用いた放射線応答プロモーターの構築, 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会, 2009. 7. 10, 富山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵谷 豪 (KAGIYA GO)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 30524243

(2) 研究分担者

小川 良平 (OGAWA RYOHEI)
富山大学大学院・医学薬学研究部・講師
研究者番号: 60334736

(3) 連携研究者

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号: 40142377