

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～ 2012

課題番号：23791746

研究課題名（和文） 刺激応答性発現制御システムの開発と前立腺癌治療への応用

研究課題名（英文） Development of a gene controlling system with stimulations and its application for prostate cancer treatment

研究代表者

森井 章裕 (MORII AKIHIRO)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：20377279

研究成果の概要（和文）：

放射線で活性化する転写因子結合配列をランダムに結合することで、放射線に応答する人工プロモーターを構築した。構築した人工プロモーターにランダム変異を導入することで改良を行った。またその反応性は *in vivo* でも確認された。さらに自殺遺伝子を用いた実験において、放射線による殺細胞効果の増強が確認された。また、前立腺癌細胞に放射線を照射し、マイクロ RNA の発現変化を調べ、変化の大きかったマイクロ RNA の標的配列を用いた発現制御を試みた。さらに人工プロモーターとマイクロ RNA の発現制御を合わせることで、さらに精度の高い放射線発現制御が可能であった。

研究成果の概要（英文）：

A promoter library was developed that was composed of DNA fragments constructed by randomly elongating *cis*-acting elements of transcription factors (NFκB, AP-1, Oct-1, p53, Nrf-2). A promoter derivative with randomly introduced mutations showed significantly improved reactivity. The response of the constructed promoter to X-ray was also observed *in vivo*. Significant increase in dose-dependent cell killing was also observed when combined suicide gene therapy and X-irradiation.

We identified eight miRNAs that are downregulated in response to X-ray irradiation, and inserted artificial target sequences composed of randomly combined complementary sequences into three representative miRNAs into the 3'UTR of the luciferase gene. The target sequences suppressed the expression, and then released the expression after X-ray irradiation, as expected. When we combined an artificial target sequence with the radiation-responsive promoter, it resulted in a clear-cut gene regulation of expression that was greater than that induced by the promoter alone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学

キーワード：遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

放射線はこれまで癌治療において長きにわたり重要な役割を担ってきた。しかし、放

放射線抵抗性の腫瘍の存在や、正常組織への副作用が治療の妨げになる場合も少なくない。また遺伝子治療は前立腺癌をはじめ、癌治療において臨床応用が期待されているが、安全性や低い導入効率の問題から一般的な治療にはなっていない。これらの欠点を克服する方法のひとつに、両者を組み合わせた放射線遺伝子治療があげられる。今回我々は前立腺癌細胞株において放射線刺激で活性化する人工プロモーターを構築し、治療応用への可能性について検討した。また、これまで放射線などの物理的的刺激で遺伝子発現を調節するマイクロ RNA (miRNA) の発現変化が認められることが報告されている。そこで、前立腺癌において放射線刺激による発現変化が大きい miRNA を調べ、その相補配列を導入遺伝子の 3' 非翻訳領域に組み込むことによる放射線による遺伝子発現制御の可能性と実効性を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線で活性化する転写因子結合配列をランダムに組み合わせることで、前立腺癌において放射線に応答する新たな人工プロモーターを構築し、さらにその反応性の改良を行うことである。また構築した人工プロモーターの *in vitro*, *in vivo* での反応性を調べ、前立腺癌放射線遺伝子治療における臨床応用の可能性を検討することである。

また、放射線で発現が変化するマイクロ RNA を調べ、その結合配列をベクターに組み込むことで遺伝子発現制御が可能かを検討する。さらに人工プロモーターとマイクロ RNA の相補配列を組み合わせることで、より精度の高い放射線遺伝子発現制御を目指す。

3. 研究の方法

細胞は主に前立腺癌細胞株 LNCaP を用いた。放射線で活性化する転写因子の結合配列をランダムに組み合わせ、TATA box と組み合わせることで、多数の人工プロモーターを構築した。構築したプロモーターをデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価し、放射線の増強効果の高いプロモーターを選択した。選択したプロモーターに変異導入型 PCR 法にてランダムに変異を導入することでプロモーターの改良を試みた。改良したプロモーターの制御下にルシフェラーゼ遺伝子を発現する遺伝子カセットを、組換えレトロウイルスベクターで LNCaP 細胞に安定的に導入した。In vitro では、人工プロモーターの放射線応答性の評価を定量的リアルタイム PCR、および、ルシフェラーゼアッセイにより行った。また、抗酸化剤である dymethyl

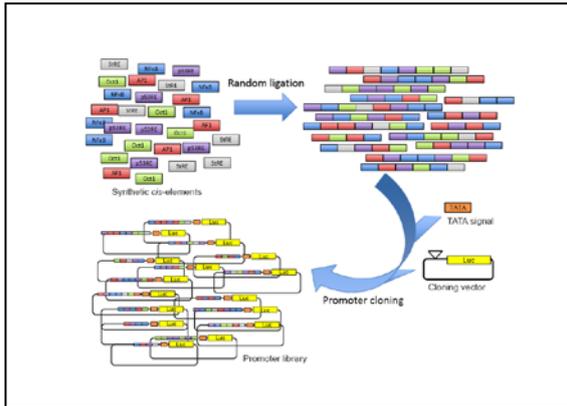
sulphoxide (0mM-700mM) および D-mannitol (0mM-200mM) の存在下で X 線を照射し、プロモーター活性化の酸化ストレスの関与を調べた。また、*in vivo* では安定的に遺伝子導入した細胞をヌードマウスへの投与により腫瘍を形成した後にバイオルミネッセンスにてルシフェラーゼ活性を定量することにより行った。また、5-フルオロシトシン (5-FC) を、細胞毒性の強い 5-フルオロウラシル (5-FU) に変換する酵素遺伝子 (fcy::fur) をクローン 880-8 プロモーターで発現する遺伝子カセットを LNCaP 細胞に安定的に導入した。この細胞において、放射線による fcy::fur 遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法、およびイムノブロットング法にて評価した。プロドラッグ 5-FC の存在下での放射線による殺細胞効果の増強について WST-1 アッセイにより検討した。

さらに LNCaP 細胞に 10 Gy の X 線を照射し 6 時間後に RNA を抽出してマイクロアレイで分析を行い、照射の有無による miRNA の発現の変化を比較した。変化の大きかった miRNA についてリアルタイム PCR 法で発現の経時変化を確認した。さらに、放射線の照射にて発現が低下する miRNA の相補配列を複数コピー、あるいは 3 種の miRNA の相補配列をランダムに結合したものをルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に導入したプラスミドを構築して、放射線によるルシフェラーゼの発現増強について比較した。また、前章で構築した人工プロモーターでルシフェラーゼを発現する組み換えウイルスベクターのルシフェラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームのすぐ下流に miRNA の相補配列を結合し、恒常的に遺伝子導入された細胞を構築して放射線による発現増強効果を評価することで、臨床応用の可能性について検討した。

4. 研究成果

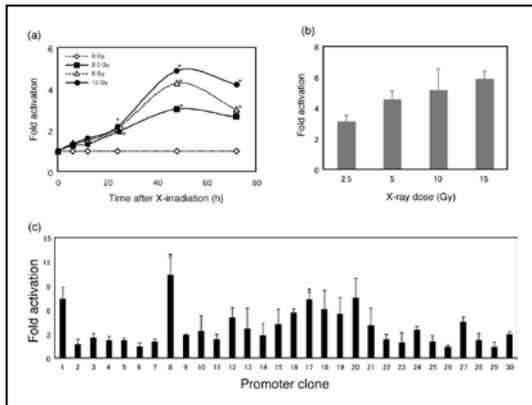
前立腺癌細胞において放射線刺激で活性化する転写因子を文献的に検索し、NF- κ B、AP-1、Oct-1、Nrf-2、p53 の 5 種類を選択した。これらの転写因子の結合配列をランダムに組み合わせ、28 クローンの人工プロモーターからなるプラスミドライブラリーを構築した (図 1)。

図 1



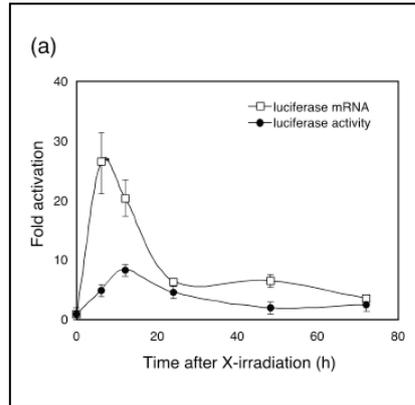
構築したプロモーターの中で 10 Gy の X 線照射により、クローン 880 プロモーターが 6.67 ± 1.09 (mean \pm SD) 倍と最も高い増強活性を持つことを見いだした(図 2)。また、その反応性は、X 線照射後 48 時間でピークに達し、また線量依存的に反応性が増強されることが確認された(図 2)。クローン 880 プロモーターランダムな変異を導入し、 10.4 ± 2.3 倍とさらに高い増強活性をもつクローン 880-8 プロモーターを取得した(図 2)。

図 2



塩基配列分析により鋳型のプロモーターと比較して 5 か所の点変異の導入を確認した。このプロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子を発現する遺 LNCaP 細胞を樹立し、10 Gy の X 線照射による発現増強を調べたところ、転写レベルでは 6 時間後、翻訳レベルでは 12 時間後にピークとなり、それぞれ 26.4 ± 5.9 、 9.12 ± 0.36 倍に達した(図 3)。

図 3



抗酸化剤である dymethyl sulphoxide および D-mannitol 存在下では発現増強が抑制されることから、プロモーターの活性化に酸化ストレスの関与が示唆された(図 4)。この細胞でマウスの脇腹に形成した腫瘍に、10 Gy の X 線を照射したところ、約 4.27 ± 1.36 (mean \pm SE) 倍の増強を示すことが示された(図 5)。

図 4

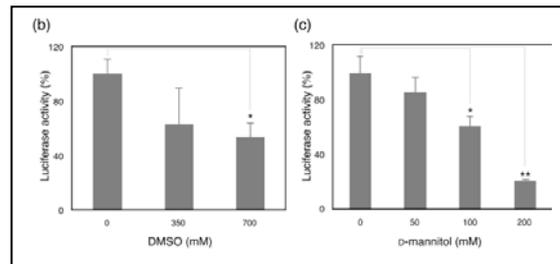
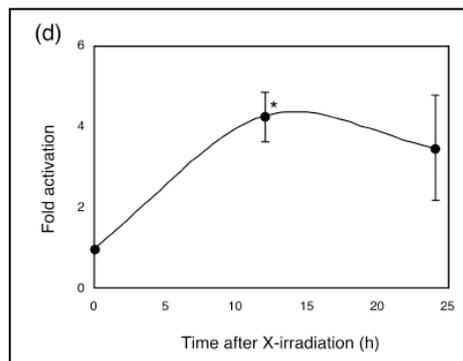
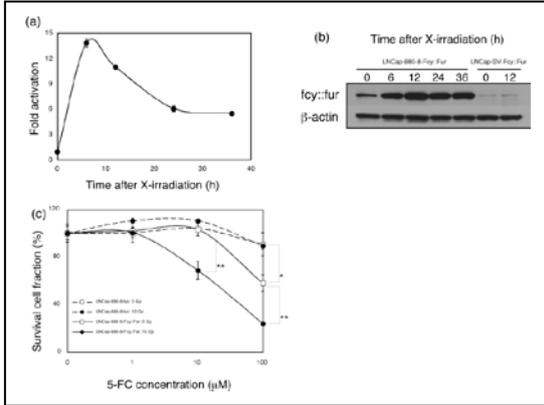


図 5



fcy::fur 遺伝子をクローン 880-8 プロモーターで発現する細胞に X 線を照射したところ、ルシフェラーゼの場合と同様に酵素遺伝子の発現増強が観察された。この細胞を 5-FC 存在下で培養したところ、10 Gy の X 線を照射した場合にのみ、5-FC の濃度依存的に殺細胞効果の増強が観察された(図 6)。

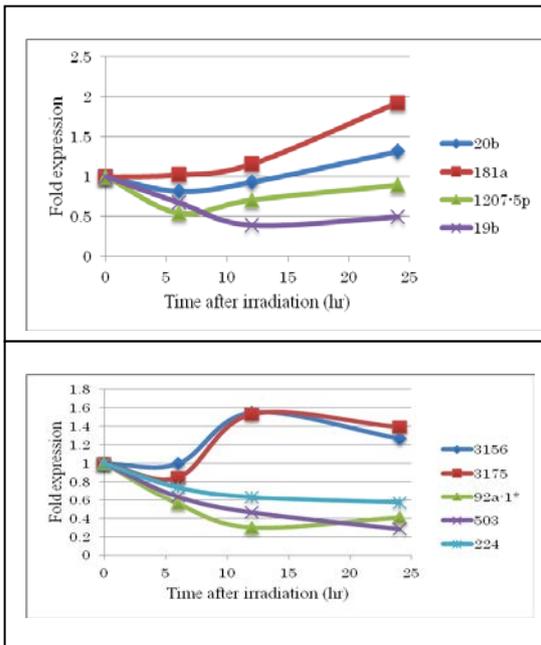
図 6



以上の結果から、転写因子結合配列をランダムに組み合わせて構築した人工プロモーターが生体内でも放射線刺激で活性化し、さらに、培養細胞で自殺遺伝子治療が可能であることが示され、放射線遺伝子治療への応用可能性が示唆された。また、人工プロモーターの活性化には酸化ストレスの関与が示唆される。

X線照射後の LNCaP 細胞において、マイクロアレイにて多数の miRNA の発現変化が見られた。定量的リアルタイム PCR によるさらなる解析により、miR-19b、92a-1*、503 の放射線刺激による顕著な発現低下が観察された(図 7)。

図 7



これらの相補配列を組み合わせたものを標的配列として、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'

非翻訳領域に導入したプラスミドを構築し、LNCaP 細胞にそれぞれ導入したところ、標的配列のないものと比較してルシフェラーゼ活性の減少が認められた。さらに、これらの細胞に 10 Gy の X 線を照射した場合としない場合の発現を比較したところ、miR-503 の標的配列を 4 コピー含むプラスミドあるいはこれらの 3 種の miRNA の相補配列をランダムに組み合わせて作成した標的配列 10-1 を含むプラスミドを導入した細胞において、照射群でそれぞれ 1.87 ± 0.48 (mean \pm SD) 倍(図 8)及び 1.46 ± 0.14 倍(図 9)の発現増強効果を確認した。

図 8

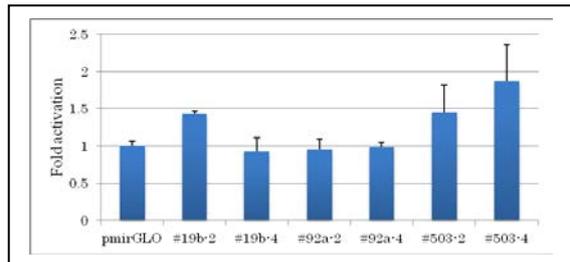
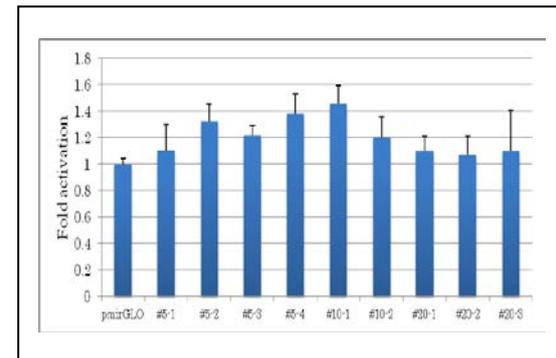
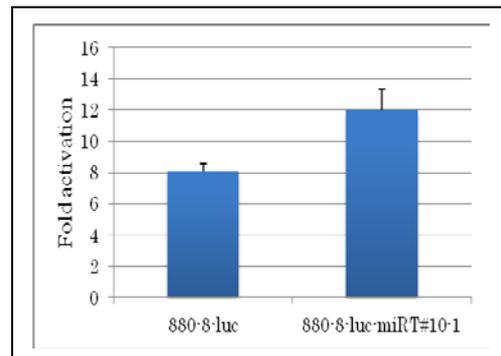


図 9



組み換えウイルスを用いて恒常的に遺伝子導入された細胞において、前章で構築した人工プロモーターと miRNA の相補配列を含む組み換えウイルスベクターによるものにおいて、人工プロモーター単独のものと比較して増強効果の有意な改善を認めた(図 10)。

図 10



以上のことから、放射線照射された前立腺癌細胞株 LNCaP において多数の miRNA の発現変化が観察された。これより放射線照射により発現が変化する miRNA の相補配列を組み込むことで放射線による遺伝子発現制御の可能性が示された。放射線応答性人工プロモーターこれらを組み合わせることで、さらに高い精度の遺伝子発現制御が可能と思われることが示唆される。

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 2 件)

(1) Morii A, Ogawa R, Watanabe A, et al. Utilization of microRNAs with decreased expression levels in response to X-ray irradiation for fine-tuning radiation-controlled gene regulation. Int J Mol Med 査読有, in press.

(2) Morii A, Ogawa R, Watanabe A, et al. Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation. Gene Ther 査読有 19: 219-27, 2012

[学会発表] (計 2 件)

(1) Morii A, Ogawa R, Watanabe A, et al. Controlling gene expression in human prostate cancer cells by ultrasound-responsive promoters. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology. August 29, 2012, Kyoto

(2) Morii A, Ogawa R, Watanabe A, et al. Controlling gene expression by anticancer drug inducible artificial promoter. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 5, 2011, Nagoya

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 章裕 (MORII AKIHIRO)
富山大学・大学病院・助教
研究者番号：2377279

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：