

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861412

研究課題名(和文) 刺激応答性遺伝子発現制御システムの治療応用の検討

研究課題名(英文) Study on clinical application of a stimulation responsive gene regulation system.

研究代表者

森井 章裕 (Morii, Akihiro)

富山大学・大学病院・診療助手

研究者番号：20377279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに開発した放射線応答性に働く遺伝子発現制御システムの改良を試みた。論文情報を基に構築した放射線応答性プロモーターの活性化がin vivoでは抑制された。そこでin vivoで、放射線で活性化する転写因子の情報を実際に取得し、それを基にプロモーターを作成した。その結果、これまでのものと同等の放射線応答性を示す新たな人工プロモーターの取得に成功した。また、組織特異的に発現するマイクロRNAの標的配列を目的遺伝子に導入することで、当該マイクロRNAを発現していない組織でのみ目的遺伝子の発現制御が可能となった。このような改良を積み重ね、最終的には治療応用できるシステムの開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：I made attempts to improve our radiation responsive gene regulation system. Promoters previously constructed based on published information showed attenuated reactivity in in vivo experiments. Thus, in this study, I constructed promoters based on information about radiation responsive transcription factors actually obtained from irradiated tumor transplanted on mice. Newly obtained promoters showed reactivity to radiation equivalent to previously obtained ones. In addition, I introduced target sequences of a microRNA with tissue-specific expression into our gene of interest under the control of a radiation responsive promoter. The gene was expressed in a radiation regulation manner only in cells without the microRNA. I hope that this system will eventually lead to actual clinical application after steps of improvements.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 遺伝子発現制御 プロモーター

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、高い治療効果が期待される。例えば、放射線により活性の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。最近では、細胞のシグナルを利用した、高度な遺伝子発現の制御が試みられている。研究レベルでは一定の成功を収めており、治療応用が期待される。

我々は、特定の刺激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た後に、TATA ボックス配列を結合することにより、汎用されている天然の刺激応答性プロモーターよりも性能の高いプロモーターの構築が可能であることを示した。さらに、プロモーター断片中へのランダムな点変異の導入により、よりすぐれたプロモーターへの改良が可能であることも示した。この方法により放射線 (X 線、陽子線)、超音波、抗癌剤の刺激に応答し下流の遺伝子の発現を 10 倍以上増強するプロモーターの構築に成功した。また、発現増強にメリハリを付けるために、同じ刺激によって発現が減少するマイクロ RNA (miRNA) を同定し、その標的配列を目的遺伝子の mRNA に組み込むことで、刺激後の発現も低減するが、刺激のない場合の発現はそれ以上に抑制することに成功した。

開発したプロモーターは動物体内でも刺激に反応して有意に活性化することを確認しているが、in vitro の場合と比較して増強倍率が大きく下がる。刺激のない状態での活性が高いことや低酸素での働きが悪いことが問題で、そのため、治療遺伝子を使用した動物実験では、明確な治療効果は期待できない。

本研究計画では、遺伝子の発現や発現制御についてより性能の高いものにするための改良を行うことを主な目的とした。これらの検討を通して、実際の遺伝子治療に応用できるシステムの構築に近づきたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究計画では、次にあげる 2 つの点を目的に検討を行った。1 つめは、生体内でも刺激による活性増強の大きなプロモーターの構築、もう一つは、遺伝子の発現や発現制御についてより性能の高いものにするための改良である。

in vivo での発現増強が小さいのは刺激を加えない時の発現が高いのが問題であると考えられる。刺激応答性プロモーターを構築する原理自体は利用できると考えられるので、in vivo での遺伝子発現データを基にプロ

モーターを作成し、まず培養細胞でその応答性の評価を行う。最終的には、in vivo での評価が必要になるが、我々が開発した原理自体は in vivo でも応用可能なことを証明すること、また、遺伝子発現制御システムの改良については、いくつかの転写因子やその結合配列などを組み合わせた遺伝子回路の構築や、組織特異的に発現する miRNA を利用することで、どの程度の遺伝子発現制御が可能であるかを見極めることを本研究の主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現、miRNA 発現の網羅的解析

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞およびヒト前立腺癌細胞由来の LNCaP 細胞を培養細胞として使用した。それぞれの細胞は、10% 牛胎児血清および抗生物質を含む RPMI1640 培養液中で培養した。動物実験では、KSN ノードマウス (メス、4 週齢) の左脇腹に 2×10^6 個の LNCaP 細胞を等容量の高濃度マトリゲルとともに投与した。その後、約一ヶ月で腫瘍が形成され、同程度の大きさの腫瘍を持ったマウスを選択し、10 Gy のエックス線を照射した。エックス線照射 0 時間、6 時間、12 時間後に腫瘍を回収した。これらの腫瘍から RNeasy Universal Mini Kit (Qiagen 社製) 及び培養細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製) を利用して、全 RNA を抽出した。これらの RNA を WT Terminal Labeling and Hybridization Kit (Affymetrix 社製) および WT Expression Kit (Ambion 社製) で処理をしたのち、Gene Chip の Human ST Gene Array (Affymetrix 社製) で遺伝子発現の網羅的解析データの収集を行った。取得したデータは、Gene Spring および Ingenuity Pathway Analysis にて解析を行った。また、HeLa 細胞および、LNCaP 細胞に 10 Gy の放射線を照射し、0 時間、6 時間後に細胞を回収し、miRNeasy Mini Kit を使用して全 RNA の抽出を行った。HRT FlashTag RNA Labeling Kit (Genisphere 社製) で RNA に標識をして、miRNA array ver. 2.0 を使用して miRNA の網羅的解析データの収集を行った。取得データは miRNA QC Tool を使用してデータ解析を行った。

(2) 人口プロモーターの構築とエックス線による活性化評価

マウスに形成した腫瘍に放射線を照射した網羅的遺伝子発現解析データをもとに、in vivo において放射線刺激で活性化する転写因子を決定した。これらのうち、特に活性化割合の大きなものについて選択し、MotifMap (<http://motifmap.ics.uci.edu>) を利用して探索したそれぞれのコンセンサス配列を基にそれらの結合配列を合成した。合成したコンセンサス配列を等モルずつ混合し、リガーゼ反応でランダムに結合し、pGL3-Control プラスミド (プロメガ社製) の SV40 プロモーターと入れ換えてクローニングした heme

oxygenase 1(H01) 遺伝子プロモーターの TATA ボックス配列 (pGL3-TATA) の上流にクローニングした。インサートを確認できたプラスミドを LNCaP 細胞に一時的に導入し、20~24 時間後に 10 Gy のエックス線を照射した。8 時間培養後に細胞を回収して、デュアルルシフェラーゼアッセイを行い、同じように処理をしたエックス線を照射していない細胞におけるルシフェラーゼ活性との比較から、プロモーターの活性化割合を算出し、プロモーターの評価とした。

(3)miR-200c 標的配列のルシフェラーゼ発現ベクターへの導入とレトロウイルスによる遺伝子導入

miR-200c の配列に相補的な配列が 2 コピータンデムに並ぶ DNA を合成した。これを、pmirGLO ベクター (プロメガ社製) のホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に 1 コピーの合成 DNA (2 コピーの標的配列)、合成 DNA を 2 コピー (4 コピーの標的配列)、同棲 DNA を 3 コピー (6 コピーの標的配列) 導入した 3 種類のプラスミドを構築し、それぞれの効果を細胞に導入して、デュアルルシフェラーゼアッセイで評価した。

次に成績の良かった 4 コピーの標的配列を含む DNA 断片を HeLa 細胞で放射線刺激により活性化する P37 プロモーター¹⁾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レトロウイルスに組み込むプラスミド pRet37-luc¹⁾のルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域に導入し、レトロウイルス作成用ベクターを構築した。構築したベクターはパッケージング細胞である Amphi293 細胞 (TAKARA Bio 社製) にエフェクテン遺伝子導入試薬 (キアゲン社製) で導入した。3 日間培養したのち、培養上清を回収し、精製したのちに、HeLa 細胞、LNCaP 細胞に添加し、組み換えウイルスを感染することで安定的遺伝子導入を行った。遺伝子導入後は、ベクターにピューロマイシン耐性遺伝子がコードされているので、ピューロマイシンで選択して、遺伝子導入細胞の濃縮を行った。

(4)擬似低酸素下でのプロモーターアッセイ

放射線応答性プロモーター (P80-8 プロモーター²⁾、P37 プロモーター)下にルシフェラーゼ遺伝子を結合した遺伝子カセットをレトロウイルスで安定的に導入した LNCaP 細胞、HeLa 細胞を構築した。これらの細胞を 0 mM、100 mM、200 mM の CoCl₂ 存在下で培養し、10 Gy の放射線を照射した。12 時間 (LNCaP) あるいは 9 時間 (HeLa) 後に回収して溶解し、タンパク量あたりのルシフェラーゼ活性を測定し、放射線を照射していないものと比較した。

4. 研究成果

(1)in vivo での放射線刺激による遺伝子発現変化とその情報を基にしたプロモーターの

構築

まず、LNCaP 細胞に in vitro での培養状態と、マウスに形成した腫瘍の状態の LNCaP 細胞から全 RNA を抽出し、Gene Chip マイクロアレイに供した。その結果、in vivo の状態にした時、2 倍以上発現増強する遺伝子が 295 個の見出され、これらの結果をもとに、Ingenuity Pathway Analysis によりどのような生物学的な機能の発動があるかを調べてみたところ、

Cancer

Organismal Injury and Abnormalities

Cell Death and Survival

Tumor Morphology

Immune Cell Trafficking

Cell-mediated Immune Response

などの機能発現が推定された。ヌードマウスに腫瘍として形成するだけで、かなり大きく遺伝子発現パターンが変化することが示された。

次に、マウスに植えた腫瘍に放射線を照射し、6 時間後、12 時間後、24 時間後に腫瘍を回収して、その遺伝子発現変化について調べてみた。その結果、遺伝子発現の変化が一番大きいのは 6 時間後であった。6 時間後に照射していないものと比較して発現が 2 倍以上になる遺伝子は 161 個、2 分の 1 以下になる遺伝子は 287 個であった。これらの遺伝子の発現を増加させることから活性化が推定されるパスウェイとしては、

BRCA1 in DNA damage response

Mitotic roles of polo-like kinase

ATM signaling

Hereditary breast cancer signaling

Cell cycle check point control

Cell cycle: DNA damage check point

P53 signaling

などが挙げられる。

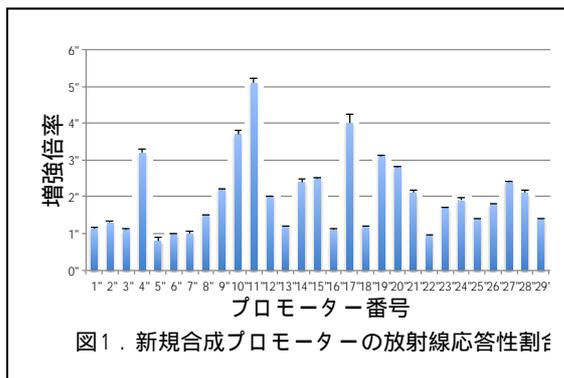
活性化が推定される転写因子については表 1 に示す。これらのうち、活性化の程度、各転写因子の結合配列の類似性、配列の長さなどを考慮して、表 1 中の黄色で示す枠の転写因子を選択し、結合配列を合成した。これをもとに、これまでに 30 種類のプロモーターを構築し、それぞれを LNCaP 細胞に導入し、放射線刺激による活性化を下流に結合したルシフェラーゼ遺伝子の発現増強割合で評価した。結果を図 1 で示す。最大応答するプロモーターは、番号 11 番で約 5 倍の発現増強が認められた。予想通り in vivo で活性化する転写因子の情報を基に放射線応答性プロモーターの構築に成功した。最終的な確認として in vivo での応答性について見ていきたい。

これらのプロモーターはおそらく in vivo でも in vitro に近い増強割合を示すのではないかと期待している。今回は、できなかったが、TATA ボックス配列も H01 由来ではなく、よりシンプルな異なる由来のもの、例えば、CMVIE プロモーターの最小プロモーターなど

を代替として使用することで、その活性や放射線応答性がどのように影響を受けるかについて調べてみたいと考えている。

表1 . 腫瘍中で放射線に反応して活性化が推定される転写因子群

活性化する転写因子	活性化指数	p-value of overlap
TP53	5.443	9.22E-25
CREB1	3.293	4.44E-03
CDKN2A	3.048	1.98E-07
STAT1	2.879	5.36E-07
IRF1	2.772	8.14E-06
TP73	2.733	1.24E-04
BRCA1	2.709	9.80E-08
RELA	2.592	2.26E-05
NFATC2	2.449	2.10E-03
MTPN	2.425	2.26E-04
STAT3	2.410	7.07E-15
IRF7	2.400	6.72E-05
CTNNB1	2.400	4.53E-02
IRF3	2.388	2.08E-04
HIF1A	2.377	2.41E-03
STAT4	2.219	4.57E-04
FOXO1	2.219	1.22E-02
NOTCH1	2.200	1.05E-02
EGR1	2.157	1.48E-05
TP63	2.149	3.69E-08
NFYA	2.000	9.32E-04

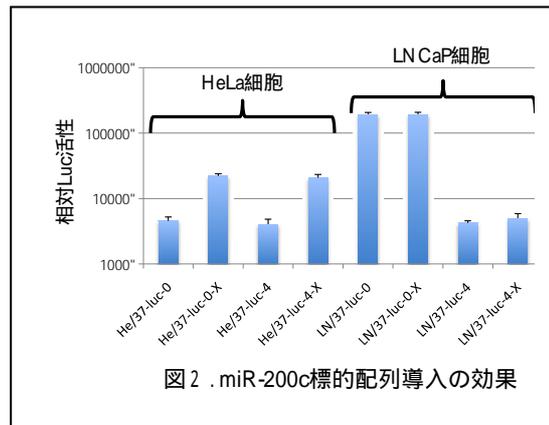


(2)HeLa 細胞および LNCaP 細胞での miRNA 発現プロファイルの解析と miR-200c を利用した組織特異的遺伝子発現制御

まず、HeLa 細胞と LNCaP 細胞を in vitro で培養し、それぞれ 10⁶個の細胞から全 RNA

を抽出し、適切な処理の後に GeneChip マイクロアレイに供して、miRNA の発現の解析を行った。その結果、HeLa ではほとんど発現せず、LNCaP で高い発現を示す miRNA として、miR-200c を見出した。この miRNA は、上皮間葉転換を阻害することが知られており、がん抑制的に働くと考えられている。実際に、悪性度の高い癌細胞では高い割合で発現の抑制や喪失が起こっている。この miRNA の標的配列を導入した遺伝子発現が悪性度の高いがん細胞の代表としての HeLa 細胞で、また、miR-200c を発現する正常細胞の代替としての LNCaP 細胞でどのような影響を受けるか、放射線応答性プロモーター、P37 下に結合したルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域にその相補配列を 2 コピー、4 コピー、6 コピー導入して調べてみた。その結果、2 コピーでは、LNCaP での発現抑制が小さく(約 70%)、4 コピーと 6 コピーで同程度の大きな抑制(>90%)が見られた。しかし、6 コピーでは、HeLa 細胞での発現でも抑制(約 50%)がかかることがわかった。そこで、4 コピーの相補配列を標的配列として利用することとした。

この 4 コピーの標的配列を導入したルシフェラーゼ遺伝子を P37 プロモーター下に結合した遺伝子カセットをレトロウイルスで HeLa 細胞および LNCaP 細胞に導入して、その Luc 発現と放射線応答性について調べてみた(図2)。このプロモーターは HeLa 細胞では miR-200c の標的配列有る無しに関わらず、発現、放射線応答を示しているが、LNCaP 細胞



では、放射線の照射有る無しに関わらず、標的配列のない場合は高い発現を、標的配列を導入すると細胞タンパクあたりのルシフェラーゼ活性は大きく抑制されており、HeLa 細胞で放射線を照射しない場合と同等であった。ルシフェラーゼ遺伝子を自殺遺伝子である fcy::fur 遺伝子¹⁾に入れ換えた遺伝子カセットをレトロウイルスで安定的に導入した HeLa 細胞および LNCaP 細胞を構築した。5-フルオロシトシンをプロドラッグとして使用した in vitro での自殺遺伝子治療のシミュレーションの予備実験を行ったところ、HeLa 細胞でのみ顕著な細胞死の誘導が認められた。現在再現性の検討を行っている。

この方法は、組織特異的な発現を示す

miRNA を同定すれば有用な方法となると思われる。

(3) 擬似低酸素環境における P80-8 プロモーターと P37 プロモーターの放射線応答性への影響

P80-8 プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子を結合した遺伝子カセットを安定的に遺伝子導入した LNCaP 細胞および P37 プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子を結合した遺伝子カセットを安定的に遺伝子導入した HeLa 細胞を CoCl_2 を含む培養液中の擬似低酸素環境下で 10 Gy のエックス線を照射したところ、HeLa 細胞では CoCl_2 を含まない培養液中では約 25 倍の発現増強が認められたが、100 μM の CoCl_2 存在下では約 17 倍、200 μM では、約 3 倍と濃度依存的に応答性が抑制されることが示された。LNCaP 細胞でも同様で、約 8.2 倍の増強が、4.8 倍、2.2 倍に抑制されることが示された。逆に、転写因子 HIF が結合する HBS を 4 コピー結合したプロモーターは放射線には応答しないが、低酸素下で活性化し、200 μM の CoCl_2 存在下では約 5 倍発現増強することが示された³⁾。現在、これら放射線応答性プロモーターと低酸素下で活性化するプロモーターとの融合、あるいは、遺伝子回路を利用した組み合わせにより低酸素下でも十分に発現増強が確保できる遺伝子発現システムの構築を進めている。

< 引用文献 >

1) Ogawa, R., S. I. Lee, G. Kagiya, H. Hirano, S. Fukuda, T. Kondo and T. Kodaki. (2008) Construction of X-ray inducible promoters through cis-acting element elongation and error-prone PCR. *J. Gene Med*, 10, 316.

2) Morii, A., R. Ogawa, A. Watanabe, S. Kakutani, K. Kume, T. Hasegawa, T. Kondo and H. Fuse. (2012). Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation. *Gene Ther*, 19, 219.

3) Kagiya, G., R. Ogawa, R. Choudhuri, J. A. Cook, M. Hatashita, Y. Tanaka, K. Koda, K. Yamashita, M. Kubo, F. Kawakami, J. B. Mitchell. Selective enhancement of hypoxic cell killing by tempol-regulated suicide gene expression. *Oncol Rep* (In Press).

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 1 件)

小川良平、森井章裕、渡部明彦、近藤隆、
実験講座 臨床応用を目指した超音波遺伝

子導入の検討、Surgery Frontier、査読有り、
vol 22、2015、pp73-77

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森井章裕 (MORII Akihiro)
富山大学・附属病院・診療助手
研究者番号：20377279