

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2009  
 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）  
 Radiation sensitization through regulation of transcriptional factor Sp1  
 研究代表者  
 細井 義夫 (HOSOI YOSHIO)  
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
 研究者番号：50238747

研究成果の概要（和文）：Ku70、Ku80、DNA-PKcsのプロモーター領域にはSp1結合配列が存在し、さらにATM、XRCC4、NBS1、MRE11など他のDNA2重鎖切断の修復に関与する遺伝子にもSp1結合は配列が存在することから、Sp1による共通の転写制御が示唆された。Sp1に対するsiRNAにより発現を抑制するとこれらの遺伝子の発現も抑制され、細胞の放射線感受性は高められた。

研究成果の概要（英文）：The protein and mRNA levels of Sp1, Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, NBS1, MRE11 and MDC1 were down regulated by the Sp1-siRNA treatment. The DSBs-repair after 80 Gy irradiation and DNA-PK activity were suppressed by the Sp1-siRNA treatment. The surviving fraction after irradiation was also suppressed by the Sp1-siRNA treatment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：放射線・Sp1・ATM・DNA-PK

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌手術標本と大腸癌手術標本を用いて正常組織と癌組織の免疫組織染色、DNA-PK活性測定、ウエスタンブロットを行って比較検討した結果、① 正常組織に比べ癌組織においてATM、Ku70、Ku80、DNA-PK、転写因子Sp1の発現量が高く、② 正常組織に比べ癌組織でDNA-PK活性が高く、③ ATM、Ku70、Ku80、DNA-PKcs、Sp1の発現に正の相関関係が認められ、④ ATM、Ku70、Ku80、DNA-PKcsのプロモーター領域にSp1のbinding siteが複数存在することを明らかにした。この結果から、ATM、Ku70、Ku80、DNA-PKcsが転写因子Sp1

により制御され、癌細胞で過剰発現し、癌を放射線抵抗性に誘導しているものと考えられる。このため、転写因子Sp1の蛋白質量や活性を測定することにより放射線感受性を予測できる可能性が考えられ、逆にSp1の蛋白質量や活性を制御することによりATM、Ku70、Ku80、DNA-PKcsの発現を介して放射線感受性を制御できることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、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しようとするも

のである。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。Sp1 を制御することにより放射線増感することの利点としては、個々の DNA2 重鎖切断修復酵素の阻害剤を使うことに比べ多くの修復関連蛋白質の蛋白質量を一括して低下させられる点にある。ATM と DNA-PK だけでなく、MDC1、XRCC1 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 が存在し、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。

### 3. 研究の方法

#### (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

TransSilent™ shRNA Vector Mix を利用した。

(2) Sp1 の活性化/活性抑制が ATM と DNA-PK の活性・mRNA 量・蛋白質量、放射線感受性、細胞周期、DNA2 本鎖切断修復能に及ぼす影響

siRNA による Sp1 の発現抑制系が確立し、その細胞を用いて *Ku70*、*Ku80*、*DNA-PKcs*、*ATM* の転写を real-time PCR で、蛋白質量をウェスタンブロットで調べた。DNA-PK 活性は p53 のアミノ酸配列の一部の合成ペプチドを基質として [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP を用いて測定する。ATM 活性は活性化によりリン酸化される部位特異的抗体により調べた。

### 4. 研究成果

Sp1 に対する siRNA を用いて Sp1 の発現を低下させ、その影響を検討した。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ことを明らかにした。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明らかにした。通常培養状態では DNA-PK、ATM は Sp1 により転写制御されていたが、臨床的放射線抵抗性の原因となる G<sub>0</sub> 期細胞では Sp1 による転写制御が不完全であることが新たに明らかとなった。このため、G<sub>0</sub> 期細胞での転写制御・増感効果を確認する必要があることが新たに生じた。contact inhibition が起こるマウス培養細胞を用いて contact inhibition を G<sub>0</sub> と考えて放射線感受性を調べた結果、G<sub>0</sub> 期細胞は細胞周期を

同調しない細胞に比べ放射線抵抗性を示した。ATM 阻害剤がこれらの細胞の放射線感受性に及ぼす影響を検討した。ATM 阻害剤は G<sub>0</sub> 期細胞でより強い放射線増感効果を示した。この結果から、ATM は G<sub>0</sub> 期細胞の放射線抵抗性の維持に関与していること、ATM 阻害剤が放射性抵抗性細胞のより選択的増感ができる可能性が示唆された。

### 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 20 件)

- ① Taniguchi K, Hirohashi N, Iwasaki Y, Hosoi Y, Kamiya K: Evacuation from the restricted zone of the damaged Fukushima nuclear power plant; facing with the reality. Lancet in press. (査読有り)
- ② Sasano N, Enomoto A, Hosoi Y, Katsumura Y, Matsumoto Y, Morita A, Shiraishi K, Miyagawa K, Igaki H, Nakagawa K: Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations. Cancer Letters 293: 52-57, 2010. (査読有り)
- ③ Morita Q, Yamamoto S, Sang B, Tanaka, K, Suzuki N, Aoki S, Ito A, Nanao T, Ohya S, Yoshino M, Zhu J, Enomoto A, Matsumoto Y, Funatsu O, Hosoi Y, Ikekita M: Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. Cancer Research 70: 257-265, 2010. (査読有り)
- ④ 細井義夫: 増殖因子受容体活性化による DNA 損傷修復の制御. 細胞 The CELL 43: 207-210, 2010. (査読無し)
- ⑤ 細井義夫: 前立腺癌治療を例として考える LQ モデルと寡分割照射. 癌の臨床 56:445-449, 2010. (査読無し)
- ⑥ Oyama S, Yamakawa H, Sasagawa N, Hosoi Y, Futai E, Ishiura S: Dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, functionally interacts with the DNA-dependent protein kinase complex in an isoform-dependent manner. PLoS ONE 4: e4199 1-12, 2009. (査読有り)
- ⑦ Yamashita H, Nakagawa K, Hosoi Y, Kurokawa A., Fukuda Y, Matsumoto I, Misaka T, Abe K: *Umani* taste dysfunction in patients receiving radiotherapy for

- head and neck cancer. *Oral Oncology* 45: 19-23, 2009. (査読有り)
- ⑧ 細井義夫: 放射線増感剤・防護剤の現状と展望. *治療学* 43: 711-714, 2009. (査読無し)
- ⑨ 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* 51: 1055-60, 2008. (査読有り)
- ⑩ 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. (査読有り)
- ⑪ 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. (査読有り)
- ⑫ 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. (査読有り)
- ⑬ Yamashita H, Nakamura N, Abe K, Asakage T, Ohmoto M, Okada S, Matsumoto I, Hosoi Y, Sasano N, Yamakawa S, Ohtomo K, Nakagawa K: Relation between acute & late irradiation impairment of four basic tastes and irradiated tongue volume in patients with head and neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 66: 1422-1429, 2006. (査読有り)
- ⑭ Hosoi Y, Kapp LN, Murnane JP, Matsumoto Y, Enomoto A, Ono T, Miyagawa K: Suppression of anchorage-independent growth by expression of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, *ATDC*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348: 728-734, 2006. (査読有り)
- ⑮ Tonotsuka N, Hosoi Y, Miyazaki S, Miyata G, Sugawara K, Mori T, Ouchi N, Satomi S, Matsumoto Y, Nakagawa K, Miyagawa K, Ono T: Heterogeneous expression of DNA-dependent protein kinase in esophageal cancer and normal epithelium. *International Journal of Molecular Medicine* 18: 441-447, 2006. (査読有り)
- ⑯ Hosoi Y: Anti-tumor effects induced by low-dose total-body irradiation. Low-dose exposures and bio-defense system. Proceedings of the international symposium on low-dose radiation exposures and bio-defense system. Tanaka S, Fujikawa K, Oghiso Y. Institute for Environmental Sciences, Japan. pp27-29, 2006. (査読有り)
- ⑰ Nakagawa K, Kanda Y, Yamashita H, Hosoi Y, Oshima K, Ohtomo I, Ban N, Yamakawa S, Nakagawa S, Chiba S: Preservation of ovarian function by ovarian shielding when undergoing total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: a report of two successful cases. *Bone Marrow Transplantation* 37: 583-587, 2006. (査読有り)
- ⑱ Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nakagawa K, Miyagawa K: Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 363-368, 2006. (査読有り)
- ⑲ Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Yamamoto H, Monobe M, Ikeda H, Aono K, Hosoi Y, Suzuki N, Hareyama M, : The association of DNA-dependent protein kinase activity with chromosomal

instability and risk of cancer. Carcinogenesis 27: 117-122, 2006. (査読有り)

- ⑫ Morita A, Zhu J, Suzuki N, Enomoto A, Matsumoto Y, Tomita T, Suzuki T, Ohtomo K, Hosoi Y: Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. Cell Death and Differentiation 13: 499-511, 2006. (査読有り)

〔学会発表〕(計 40 件)

- ① 細井義夫: 前立腺癌を例として考える LQ モデルと寡分割照射、第 40 回放射線による制癌シンポジウム、平成 22 年 7 月 10 日、札幌市。
- ② 佐藤元俊、川口弦、青山英史、笹井啓資、細井義夫: 過酸化水素・放射線による ATM を介した p53 Ser15 のリン酸化、第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 22 年 7 月 9 日、札幌市。
- ③ 川口弦、佐藤元俊、青山英史、笹井啓資、細井義夫: 放射線による EGF 受容体・ERK1/2 活性化の機序解明、第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 22 年 7 月 9 日、札幌市。
- ④ 細井義夫: 放射線による DNA 損傷と修復、第 1 回放射線生物学セミナー、平成 22 年 3 月 13 日、東京都。
- ⑤ 細井義夫: 転写因子 Sp1 を分子標的とした放射線増感、日本放射線影響学会第 52 回大会、平成 21 年 11 月 11 日、広島市。
- ⑥ 佐藤元俊、川口弦、竹原和宏、奥山圭介、笹井啓資、細井義夫: 過酸化水素・放射線による ATM を介した p53 Ser-15 のリン酸化、第 121 回日本医学放射線学会北日本地方会、平成 21 年 11 月 6 日、仙台市。
- ⑦ 竹原和宏、奥山幸介、川口 弦、佐藤元俊、笹井啓資、細井義夫: 細胞の増殖状態による DNA2 重鎖切断修復酵素の発現と放射線感受性、第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 21 年 7 月 10 日、富山市
- ⑧ 奥山幸介、竹原和宏、川口 弦、佐藤元俊、笹井啓資、宮川 清、加藤宝光、関根絵美子、高橋桃子、岡安隆一、細井義夫: 低線量重粒子線照射による ERK1/2 活性化、第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 21 年 7 月 10 日、富山市。
- ⑨ 細井義夫: 臨床的放射線生物学、第 44 回

日本医学放射線学会秋季臨床大会、平成 20 年 10 月 22 日、郡山市。

- ⑩ 細井義夫: “分子放射線治療” — 分子生物学は放射線治療を変えられるか? —、第 102 回新潟臨床放射線学会、平成 20 年 7 月 5 日、長岡市。
- ⑪ 笹野仲史、榎本敦、細井義夫、松本義久、勝村庸介、森田明典、宮川清、中川恵一: 低濃度エダラボンによる放射線増感効果、第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 20 年 6 月 20 日、高知市。
- ⑫ 笹野仲史、榎本敦、細井義夫、松本義久、勝村庸介、森田明典、宮川清、中川恵一: 低濃度エダラボンによる放射線増感効果、第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 20 年 6 月 20 日、高知市。
- ⑬ 細井義夫、笹野仲史、榎本敦、中川恵一: p53 を介したエアダラボン (ラジカット) による放射線防護効果、第 38 回放射線による制癌シンポジウム—基礎と臨床の対話—、平成 20 年 6 月 20 日高知市。
- ⑭ 細井義夫、榎本敦、笹野仲史、加藤宝光、関根絵美子、岡安隆一、宮川清: 重粒子線照射による EGF 受容体の活性化、第 67 回日本医学放射線学会総会、平成 20 年 4 月 4-6 日、横浜市。
- ⑮ 細井義夫: 重力と低線量放射線の情報伝達経路、宇宙利用シンポジウム (第 24 回) 平成 20 年 1 月 17-18 日、東京都。
- ⑯ 笹野仲史、榎本 敦、細井義夫、勝村庸介、井垣 浩、白石憲史郎、宮川 清、中川恵一: エダラボンの放射線防護効果、日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会、平成 19 年 12 月 13-15 日福岡市。
- ⑰ 細井義夫、榎本 敦、笹野仲史、加藤宝光、関根絵美子、岡安隆一、宮川 清: 重粒子線による EGF 受容体活性化、日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会、平成 19 年 12 月 13-15 日、福岡市。
- ⑱ 笹野仲史、榎本 敦、細井義夫、白石憲史郎、宮川 清、勝村庸介、中川恵一: エダラボンの放射線防護効果、日本放射線影響学会第 50 回大会、平成 19 年 11 月 14-17 日、千葉市。
- ⑲ 榎本 敦、木戸直樹、伊藤道彦、森田明典、細井義夫、宮川 清: 新規 MAP3K 結合因子の機能解析、日本放射線影響学会第 50 回大会、平成 19 年 11 月 14-17 日、千葉市。

- ⑳ 山本真一、森田明典、伊藤あずさ、榎本敦、松本義久、船津 修、細井義夫、鈴木紀夫、池北雅彦：オルトバナジン酸ナトリウムによる p53 制御メカニズムの解明、日本放射線影響学会第 50 回大会、平成 19 年 11 月 14-17 日、千葉市。
- ㉑ 細井義夫、榎本 敦、笹野仲史、加藤宝光、関根絵美子、藤井義大、岡安隆一、宮川清：重粒子線による EGF 受容体を介した ERK の活性化、日本放射線影響学会第 50 回大会、平成 19 年 11 月 14-17 日、千葉市。
- ㉒ 細井義夫：Transactivation of EGF receptor by X-irradiation. The 100th Anniversary of Tohoku University, The 5th Japan-US Cancer Therapy Symposium & The 5th S. Takahashi Memorial International Joint Symposium. 平成 19 年 9 月 7-9 日、仙台市。
- ㉓ 笹野仲史、榎本 敦、細井義夫、白石憲史郎、井垣 浩、勝村庸介、宮川 清、中川恵一：エダラボンの放射線防護効果、第 46 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 19 年 7 月 20-21 日、つくば市。
- ㉔ 細井義夫、榎本 敦、笹野仲史、加藤宝光、関根絵美子、岡安隆一、宮川 清：重粒子線照射による EGF 受容体の活性化、第 46 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 19 年 7 月 20-21 日、つくば市。
- ㉕ 松本義久、Sushima M. Bhosle、富田雅典、鈴木紀夫、細井義夫、宮川 清：Missing links in the mechanism of DNA double-strand break repair through the non-homologous end-joining pathway. 13th International Congress of Radiation Research、平成 19 年 7 月 8-12 日、サンフランシスコ市。
- ㉖ 細井義夫、宮川 清：Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses activation of ERK1/2 and epidermal growth factor receptor induced by X-irradiation. 13th International Congress of Radiation Research、平成 19 年 7 月 8-12 日、サンフランシスコ市。
- ㉗ 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、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。
- ㉘ 笹野仲史、榎本 敦、松本義久、細井義夫、宮川 清、中川恵一：エダラボンの放射線防護効果、第 9 回癌治療増感研究シンポジウム、平成 19 年 2 月 10-11 日、奈良市。
- ㉙ 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、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。
- ㉚ 榎本 敦、木戸直樹、森田明典、伊藤道彦、松本義久、細井義夫、宮川清：新規 JNK カスケード制御因子の機能解析とそれを標的としたアポトーシス増感、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。
- ㉛ 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、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。
- ㉜ 松本義久、BHOSLE Sushma M.、富田雅典、榎本 敦、森田明典、鈴木紀夫、細井義夫、宮川清：NHEJ 修復酵素群の DNA 二重鎖切断部位への動員とリン酸化による制御、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。
- ㉝ 和田成一、松本義久、大戸貴代、浜田信行、原孝光、船山知夫、坂下哲哉、深本花菜、柿崎竹彦、鈴木芳代、細井義夫、鈴木紀夫、小林泰彦：高 LET 重イオンによる DNA 損傷への Ku80 の反応、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。
- ㉞ 富田雅典、松本義久、細井義夫、古澤佳也、矢野安重、酒井一夫：重イオンによる細胞致死効果と DNA 依存性プロテインキナーゼの応答、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。
- ㉟ 笹野仲史、細井義夫、白石憲史郎、榎本敦、宮川清、勝村庸介、中川恵一：エダラボンの放射線防護効果、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。
- ㊱ 細井義夫：低線量全身照射による癌転移抑制効果、平成 18 年度サマースクール「ナノの世界から宇宙まで」((社)日本アイソトープ協会主催)、平成 18 年 7 月 27 日、箱根町。
- ㊲ 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、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。
- ㊳ 細井義夫：時間が修復に及ぼす影響の分子機構、第 36 回放射線による制癌シンポジウム「基礎と臨床の対話」、平成 18 年 6 月 30 日、弘前市。
- ㊴ 細井義夫：Biological basis for chemo-radiotherapy. IAEA/RCA Regional Training Course on Radiation Biology for Radiation Oncology. 平成 18 年 5 月 18 日、千葉市。

- ④⑩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、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。

[図書] (計 2 件)

- ①細井義夫：放射線腫瘍学の生物学的基礎。がん放射線療法 2010、大西 洋，唐澤克之，唐澤久美子監修、(株)篠原出版社、149-158。
- ②細井義夫：放射線による DNA 損傷と染色体異常。放射線医科学-生体と放射線・電磁波・超音波-、大西武雄監修、学会出版センター、p11-13、2007 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細井 義夫 (HOSOI YOSHIO)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所  
教授

研究者番号：50238747

### (2) 研究分担者

松本 義久 (MATSUMOTO YOSHIHISA)  
(H18 年度)  
東京工業大学・原子炉工学研究所  
助教授

研究者番号：20302672

榎本 敦 (ENOMOTO ATSUSHI)  
(H18 年度→H19 年度)  
東京大学・大学院医学系研究科  
助手  
研究者番号：20323602

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：