

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 13201

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791494

研究課題名 (和文) 前立腺癌に対する放射線刺激応答性人工プロモーターの開発

研究課題名 (英文) Development of radiation inducible promoter in prostate cancer

研究代表者

渡部 明彦 (Watanabe Akihiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号 : 20377253

研究成果の概要 (和文) :

前立腺癌において放射線で活性化するとされる転写因子の結合配列をランダムに組み合わせ、TATA box を結合させ人工プロモーターを構築した。構築したプロモーターのうち最も放射線に対する反応性が高かったものにランダム変異を導入し、反応性の改良を試みた。その結果 Clone880-8 において、放射線に対して最も高い反応性が得られた。レトロウイルスを用いてヒト前立腺癌細胞株 LNCap に遺伝子導入し、ルシフェラーゼを clone880-8 の制御下に発現する細胞を樹立した。この細胞において X 線 10Gy の照射にて  $9.12 \pm 0.36$  倍のルシフェラーゼの発現増強を認めた。この細胞をヌードマウスに接種して腫瘍を形成し、X 線 10Gy を照射したところ、照射しない場合と比較して  $4.27 \pm 1.36$  倍のルシフェラーゼの発現増強を認めた。LNCap に遺伝子導入を行い clone880-8 の制御下に fcy::fur 遺伝子を発現する組み換え細胞を樹立したところ、X 線の照射にて fcy::fur の発現が増強された。この細胞において 5-FC 投与における殺細胞効果の放射線による増強を認めた。これらの結果から、放射線応答性プロモーターを用いた遺伝子発現制御が遺伝子治療において有効な方法であると考えられた。

研究成果の概要 (英文) :

A promoter library was developed that is composed of DNA fragments constructed by randomly elongating *cis*-acting elements of transcription factors presumably activated in prostate cancer by radiation, and linking to the TATA box sequence. One promoter with the strongest reactivity to X-ray in LNCap cells of the library was chosen and improved by the introduction of random mutations. A resultant promoter was designated clone 880-8 showing the highest dose-dependent activity enhancement with X-ray irradiation (X-irradiation). A recombinant retrovirus expressing the luciferase gene under the control of clone 880-8 was infected to LNCap that showed  $9.12 \pm 0.36$ -fold enhancement of luciferase activity 12 h after X-irradiation at 10 Gy. When the infected cells were inoculated onto nude mice, enhancement of luciferase expression was  $4.27 \pm 1.36$ -fold 12 h after X-irradiation at 10 Gy. When LNCap was infected with another recombinant carrying the fcy::fur gene downstream to clone 880-8, fcy::fur expression was enhanced by X-irradiation. It was also shown to increase dose-dependent cell killing ratio with 5-fluorocytosine compared to a counterpart without X-irradiation. These results suggest that the method employed in this study is effective to construct a promoter responsive to stimulation. Such promoters can be utilized for stimulation controlled-gene therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は遺伝子産物が傷害あるいは欠損することによる疾患を直接治療するための方法として考案され発達してきた。1990年に ADA 欠損症の治療法として米国ではじめて臨床試験が行われ、その後も様々な疾患に対して数多くの試験が行われている。クローニングした遺伝子を強力なウイルスプロモーターで発現させ、不足している正常な遺伝子産物を目的の細胞に供給することで、これまでにない治療効果を示す例もある一方、導入された遺伝子が過剰に発現し、その産物が大量に供給されるため、場合によっては副作用を引き起こすことも指摘されている。

遺伝子発現は、単独で制御されているわけではなく、多くの遺伝子とともに協調的、あるいは相補的に発現するなど細かく調節されており、不必要な遺伝子発現は細胞全体として制御されている遺伝子発現ネットワークを乱してしまう危険性が付きまとう。さらに、治療用の遺伝子が標的組織以外の正常細胞に導入される場合にも同様の問題が起こる可能性があり、副作用を誘発する危険性がある。すなわち、遺伝子治療においては、標的細胞以外での遺伝子発現を抑制し、標的細胞でも適切な量の遺伝子産物を供給できるような発現制御が求められている。したがって、より適切な遺伝子治療には、効率よく遺伝子を導入する必要があるうえに、遺伝子を導入した後の適切な遺伝子発現制御も必要であるといえる。これまで開発された人為的な遺伝子発現制御は、何らかのケミカルを媒介としたものが中心的であった。たとえば、テトラサイクリンを利用したアロステリック-on、-off システムや、昆虫の変態ホルモンであるエクジソンを利用したステロイドホルモンとレセプターを利用する方法などが

ある。これらの方法は、*in vitro* では効率の良い遺伝子発現制御であるが、コストが高く、遺伝子治療などにおいて特にシステミックに投与することを考えると現実的ではない。その他の方法として、遺伝子発現のタイミングや量を決定する転写因子を利用する方法もある。すなわち、癌細胞などでは、特定の転写因子が活性化していることが知られており、その因子が結合するシスエレメントを利用してプロモーターを構築することにより、その癌細胞で特異的に活性化させるプロモーターの構築が可能であることが報告されている。また、正常の組織で機能する特定の転写因子の存在も知られており、それらを利用したプロモーターも構築できると思われる。共同研究者である Ogawa らは放射線で制御可能なプロモーターについての検討を行い、酸化ストレスにより活性化する4種類の転写因子 (NF- $\kappa$ B, AP-1, NF-Y, CBF-A) の結合配列 (シスエレメント) をランダムに組み合わせ、さらに TATA ボックス配列を結合し作成した人工プロモーターライブラリーを作成し、子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞において放射線に高率に反応するクローンの構築に成功している[1]。さらにランダムな点変異の導入により放射線に対する反応性の改良が可能なることも示し、癌の遺伝子治療に限られるが、放射線と組み合わせることにより遺伝子発現を癌組織に限局した効率の高い、副作用の少ない治療に結びつけることが期待されると考察している。またそれらの構築した人工プロモーターが、HeLa 細胞において超音波照射刺激に対しても反応性を示すことをすでに報告し、活性増強のメカニズムとして放射線と同様に酸化ストレスが関与している可能性を示した。また局所癌だけではなく、骨転移巣による疼痛や脊髄神経圧迫症状に

対する放射線療法と併用することでも、QOL改善効果を期待できるものとも考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌で有効に機能する放射線制御型的人工プロモーターの開発を試み、さらにその治療応用の可能性を探ることを主な目的とした。

## 3. 研究の方法

研究はヒト前立腺癌細胞株 LNCap を用いて行った。まず前立腺癌において、放射線で活性化する転写因子を文献的に検索し、5つの転写因子 (NF- $\kappa$ B, AP-1, Oct-1, p53, Nrf2) を選択した。これらの結合配列をランダムに組み合わせ、TATAbox を結合させることで人工プロモーターを多数構築し、その人工プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したプラスミドを構築した。構築したプラスミドを LNCap に導入し、放射線照射による反応性をルシフェラーゼアッセイを用いてスクリーニングを行った。放射線に対する反応性が最も高かったプロモーターに変異導入型 PCR 法を用いてランダムに変異を導入し、放射線に対する反応性の改良を試みた。

さらに構築した人工プロモーターの前立腺癌の治療応用への可能性を検討するために、レトロウイルスベクターを用いて LNCap に遺伝子導入を行い、構築した人工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組み換え細胞を樹立した。組み換え細胞に放射線を照射し、放射線による反応性を調べた。さらに樹立した細胞をヌードマウスに接種して腫瘍を形成した。腫瘍形成マウスに放射線を照射し、生体内での放射線によるプロモーターの反応性を確認した。同じように構築したプロモーター制御下に自殺遺伝子である HSV-tk あるいは Fcy::Fur を発現する組み換え細胞も樹立し、放射線を照射した後プロドラッグである 5-FU を投与して放射線による殺細胞効果の増強効果を確認した。治療遺伝子を発現する腫瘍形成マウスにおいて、放射線照射と 5-FU の投与を行い、in vivo での放射線遺伝子治療の効果を検討した。

人工プロモーターの活性化に酸化ストレスが関与している可能性が考えられ、抗酸化剤 DMSO、マンニトールを添加して放射線に対する反応性への影響を確認した。

## 4. 研究成果

5つの転写因子 (NF- $\kappa$ B, AP-1, Oct-1, p53, Nrf2) の結合配列をランダムに組み合わせて構築したプロモーターを結合したプラスミドを 27 クローン構築した。プラスミドを LNCap に導入し、放射線に対する反応性をスクリーニングしたところ、Clone880 と名付けたプロモーターにおいて、X 線 10Gy 照射後

72 時間において照射しないものと比較して  $6.67 \pm 1.09$  倍と最も高いルシフェラーゼの発現増強が見られた。

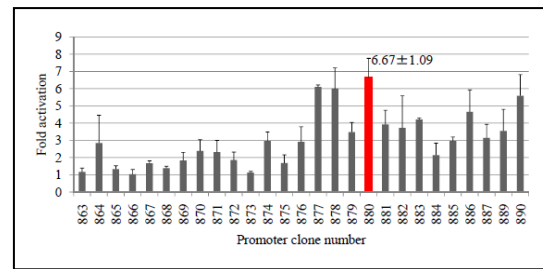


図 1 構築した人工プロモーターの放射線照射に対する反応性 (LNCap, 10Gy, 72hr)

次に Clone880 を鋳型に変異導入型 PCR 法を用いてランダム変異を導入し、新たに 30 プロモーターを構築した。これらについて同様にスクリーニングを行ったところ、Clone880-8 において、X 線 10Gy の照射で放射線を照射しないものと比較して  $10.4 \pm 2.3$  倍と鋳型の Clone880 よりも高い反応性を示した (図 2)。Clone880-8 を鋳型にさらにランダム変異を導入して 46 プロモーターを構築した。しかし、スクリーニングを行ったところ、Clone880-8 を上回る反応性をもったプロモーターは得られなかった (data not shown)。以上より、変異導入型 PCR によるさらなる反応性は困難と考え、Clone880-8 を用いて実験を進めた。

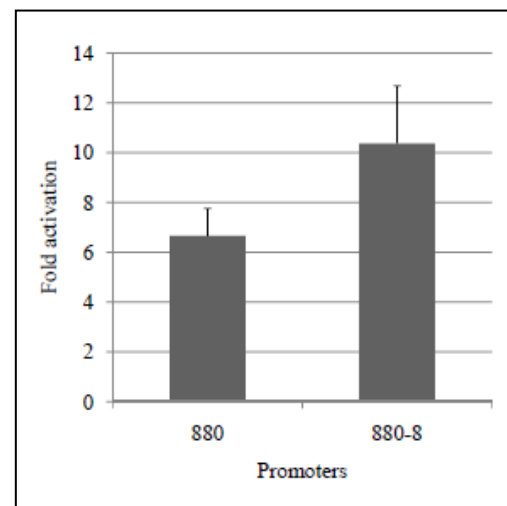


図 2 変異導入型 PCR 法によるプロモーターの反応性の改良 (LNCap, 10Gy, 48hr)

配列分析を行ったところ、Clone880-8 には NF- $\kappa$ B の結合配列が 2 コピー、Oct-1 のものが 3 コピー、p53 のものが 3 コピー、Nrf2 のものが 5 コピー含まれていた。また変異導入型 PCR により Clone880 と比較して 5 か所に

点変異が導入されていた (図 3)。

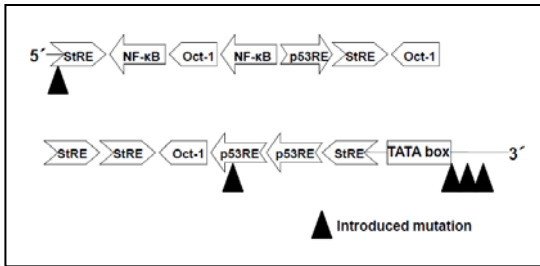


図 3 Clone880-8 の構造

前立腺癌治療における構築した人工プロモーターの臨床応用の可能性を検討するため、レトロウイルスを用いてLNCapに遺伝子導入を行い、Clone880-8の制御下にルシフェラーゼを発現するLNCap-880-8-luc細胞を樹立した。LNCap-880-8-lucに放射線を照射し、プロモーターの反応性をreal-time PCR、ルシフェラーゼアッセイにて確認しところ、組み換え細胞においても同様に放射線に対する高い反応性が確認された (図 4)。

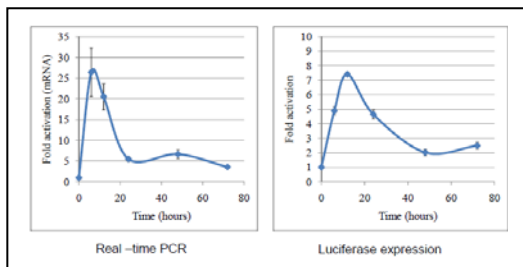


図 4 組み換え細胞における clone880-8 の放射線照射に対する反応性 (LNCap-880-8-luc, 10Gy 12hr)

Clone880-8 の in vivo での反応性を確認するために、LNCap-880-8-luc細胞をKSN/S1cヌードマウスの側腹部皮下に接種し、腫瘍を形成した。また放射線に対して高い反応性をもたないSV40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組み換え細胞、LNCap-SV40-lucを樹立し、対側の側腹部皮下に接種し腫瘍を形成、コントロールとした。マウスに放射線を照射し、12時間後にルシフェラーゼアッセイにて放射線による反応性を確認したところ、放射線の照射により照射していないものと比較して  $4.27 \pm 1.36$  倍と有意なルシフェラーゼの発現増強を認め、生体内でも構築した人工プロモーターが機能することが確認された (図 5)。

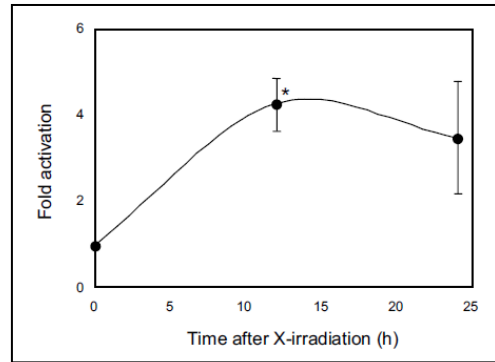


図 5 腫瘍形成マウスにおける Clone880-8 の放射線照射に対する反応性 (LNCap-880-8-luc, 10Gy)

レトロウイルスを用いてLNCapに遺伝子導入を行い、自殺遺伝子であるHSV-TKをClone880-8制御下に発現する細胞をLNCap-880-8-TKを樹立したが、real-time-PCR、免疫プロットングにてHSV-TKの発現が確認できなかった。発現が見られなかった原因については現在調査中である。そこで治療遺伝子を、5-FCを5-FUに変換する酵素を発現する自殺遺伝子Fcy::Furに変更し、同様にLNCap-880-8-Fcy::Furを樹立した。また、SV40プロモーター制御下Fcy::Furを発現するLNCap-SV40-Fcy::Furを樹立し、コントロールとした。それぞれの細胞に放射線を照射し、real-time-PCR、免疫プロットングにてFcy::Furの発現変化を調べたところ、LNCap-880-8-Fcy::Furにおいて、有意な放射線によるFcy::Furの発現増強を認めた (図 6)。

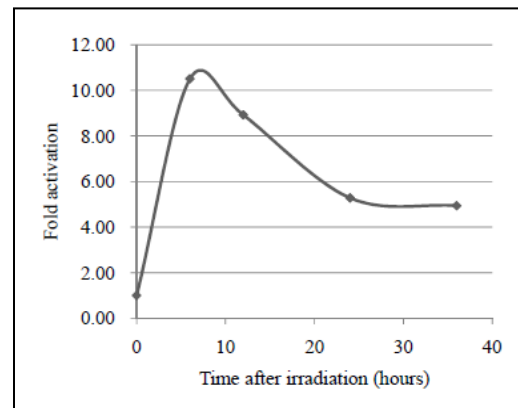


図 6a 放射線照射による Fcy::Fur の mRNA の発現変化 (LNCap-880-8-Fcy::Fur, 10Gy, real-time PCR)

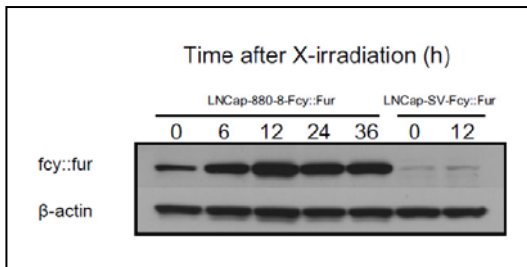


図 6b 放射線照射による Fcy::Fur タンパクの発現変化 (10Gy, イムノブロッティング)

LNCap-880-8-Fcy::Fur に放射線を照射した後、5-FC を添加し、放射線非照射のものと比較した殺細胞効果の増強について WST-1 アッセイにて検討したところ、放射線照射した群において、5-FC による殺細胞効果の有意な増強を認めた。その効果は 5-FC の濃度依存的に増加した (図 7)。

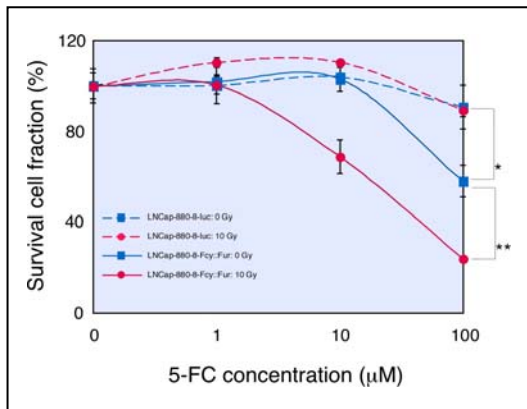


図 7 LNCap-880-8-Fcy::Fur における放射線照射による 5-FC の殺細胞効果の増強 (10Gy)

次に、LNCap-880-8-Fcy::Fur をマウスの側腹部に接種して腫瘍を形成し、放射線照射および 5-FC の投与を行い、in vivo での抗腫瘍効果を調べた。①無治療群、②放射線単独群、③5-FC 投与群、④放射線+5-FC 投与群の 4 群に分け、それぞれの治療後腫瘍の大きさを定期的に計測した。Preliminary なデータではあるが、④放射線+5-FC 投与群において、もっとも腫瘍の増殖が遅く、①無治療群において、最も腫瘍の増殖が速いという結果であり、生体内でも放射線遺伝子治療の効果が確認された。

Clone880-8 の放射線による活性化のメカニズムに酸化ストレスの関与が推察されるが、それを明らかにするために、LNCap-880-8-luc を抗酸化剤である DMSO、マンニトールを添加して反応性の変化を調べた。DMSO、マンニトールいずれにおいても、濃度依存的に放射線による反応性を抑制し、人工プロモーターの活性化に酸化ストレスが関与していることが示唆された。

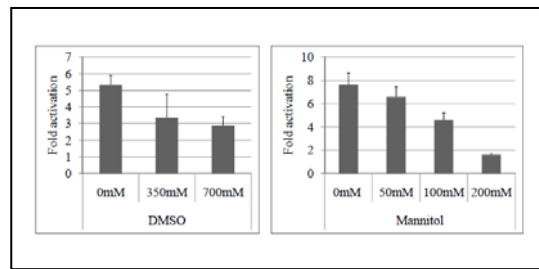


図 8 DMSO、マンニトールによる LNCap-880-8-luc における放射線の反応性の抑制。

以上の結果から、前立腺癌において放射線で活性化する転写因子結合配列を用いて構築した人工プロモーターは、前立腺癌の治療においても有用な可能性が示唆された。また構築し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考えられた。

#### 参考文献

- [1] Ogawa R, Lee S, Kagiya G, et al. Construction of X-ray-inducible promoters through cis-acting element elongation and error-prone polymerase chain reaction. *J Gene Med* 10: 316-24, 2007
- [2] Ogawa R, Lee S, Izumi H, Kagiya G, Yoshida T, Watanabe A, et al. Enhancement of artificial promoter activity by ultrasound-induced oxidative stress. *Ultrason Sonochem*, 16: 379-386, 2009
- [3] Watanabe A, Kakutani S, Ogawa R, et al. Construction of artificial promoters sensitively responsive to sonication. *J Med Ultrason*, 36: 9-17, 2009

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

①森井章裕、渡部明彦、他. 前立腺癌細胞株における放射線遺伝子治療用人工プロモーターの開発. 第 13 回癌治療増感研究シンポジウム (2011 年 2 月 12 日, 奈良)

②森井章裕、渡部明彦、他. 放射線による遺伝子発現制御と前立腺癌の治療応用への検討. 第 98 回日本泌尿器科学会総会 (2010 年 4 月 28 日, 盛岡)

③Akihiro Morii, Akihiko Watanabe, et al. Construction of promoter induced by radiation for human prostate cancer cells. 6

8th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (October 2, 2009, Yokohama)

④森井章裕、渡部明彦、他. 前立腺癌細胞株で放射線刺激に応答するプロモーターの構築. 第 28 回日本アンドロロジー学会学術大会 (2009 年 7 月 4 日, 富山)

⑤森井章裕、渡部明彦、他. 前立腺癌細胞株において放射線に応答する人工プロモーターの改良. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 (2009 年 4 月 16 日, 岡山)

[その他]  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部明彦 (Watanabe Akihiko)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・  
助教  
研究者番号 : 20377253

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :