

氏 名 おがわ りょうへい  
小川 良平

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 富医薬博乙第54号

学位授与年月日 平成27年2月27日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第4項該当

学位論文題目 刺激応答性遺伝子発現制御システムの開発とその治療応用に関する基礎的研究

論文審査委員

(主査) 教授 森 寿

(副査) 教授 二階堂 敏雄

(副査) 教授 野口 京

(副査) 教授 北島 勲

(紹介教員) 教授 近藤 隆

# 論文内容の要旨

## 〔目的〕

放射線は癌治療に長く貢献してきたが、腫瘍周辺の正常組織への照射による副作用の問題がつかまとう。この問題の解決のための物理学的、工学的なアプローチとして、粒子線治療や強度変調放射線治療などが開発された。一方、分子生物学的な観点から、放射線治療と遺伝子治療を組み合わせた放射線遺伝子治療が提案されている。放射線刺激による治療遺伝子の発現制御もその一法で、前もって投与した治療遺伝子が放射線照射により発現を開始することで、標的とする領域でのみ治療遺伝子と放射線の両方の効果が期待される。この治療法に天然の放射線応答性遺伝子のプロモーターの利用が検討されてきたが、天然のプロモーターでは生理的な限界があると考え、放射線応答性プロモーターを人工的に作成する方法を開発し、その治療応用について検討することとした。

## 〔方法並びに成績〕

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、さらに基本転写因子結合配列であるTATAボックス配列に結合してプロモーターを作成した。これらをルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したプラスミドを複数作成し、プロモーターライブラリーとした。はじめに、11種類のプラスミドからなるライブラリーを作成した。各種ヒトの癌細胞にそれぞれ導入後、10 Gyのエックス線を照射し、6時間後のルシフェラーゼ発現の変化を指標にプロモーターの評価を行った。応答性は細胞特異的であったが、この中でクロン11プロモーターが、HeLa細胞で約5.1倍と高い発現増強を示した。

次に、プロモーター断片へのランダムな変異の導入を行うことで、プロモーターのエックス線応答性の改良を試みた。プロモーター断片をPCR法で増幅する際の反応混合液にマンガニンイオンを添加することでポリメラーゼの働きを不安定にし、プロモーター配列にランダムな変異を導入した。1回目のPCR後に取得したプロモーターのうち反応性が最も改良されていたものを鋳型に2回目のPCRを行ったところ、10 Gyのエックス線に反応して20倍以上の発現増強を示すプロモーターの取得に成功した。

プロモーター作製法の確認のため再度62個のプラスミドからなるプロモーターライブラリーを作成して、その放射線応答性を調べた。細胞に導入後、10 Gyのエックス線照射により大半のプロモーターが活性化し、本方法論の有効性を確認した。この検討により下流のルシフェラーゼ遺伝子の発現を10倍以上増強するものを3種類見いだした。

上記の改良プロモーターおよびこれら3つの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遺伝子カセットを、レトロウイルスベクターを利用して安定的に導入した細胞をそれぞれ確立した。これらの細胞は、一時的遺伝子導入の場合と比較して、発現増強水準の低下や増強期間の短縮などが観察されたが、照射したエックス線の線量依存的にルシフェラーゼ発現を増強した。また、エックス線よりも低い割合であったが、

陽子線の照射でも同様にルシフェラーゼの発現を増強した。

放射線の照射は細胞内酸化ストレスを誘導する。両放射線によるプロモーターの活性化に、細胞内酸化ストレスが関与している可能性を調べるために、抗酸化物質として知られる、ジメチルスルホキシドおよびD-マンニトール存在下で放射線の照射を行った。その結果、それぞれの抗酸化物質の濃度依存的にルシフェラーゼ発現の増強が抑制され、酸化ストレスの関与が示唆された。

次に、生体内でのこれらのプロモーターの放射線応答性を調べた。構築したプロモーター下にルシフェラーゼを結合した遺伝子カセットを安定的に導入した細胞をヌードマウスの両脇腹に投与して腫瘍を形成した。片側の腫瘍にエックス線を照射したところ、照射しない側の腫瘍と比較して有意にルシフェラーゼの発現が増強した。しかしながら、*in vitro*の場合と比較して増強割合が大きく低下していた。原因は不明であるが、体内の生理活性物質の影響などにより、一部の転写因子がエックス線照射がない場合でも活性化するためではないかと考えている。

これらの結果を受け、*in vitro*での自殺遺伝子治療実験を行った。まず、細胞毒性の低い5-フルオロシトシンを細胞毒性の高い5-フルオロウラシルに変換する酵素をコードした`fcy::fur`遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子と入れ換えて安定的に導入した組み換え細胞を作成し、エックス線照射により発現が増強することを確認した。次に、異なる濃度の5-フルオロシトシンを含む培地中でこの細胞を培養したところ、10 Gyのエックス線を照射した細胞で、5-フルオロシトシン濃度依存的に顕著な細胞生存率の低下が観察され、エックス線照射による自殺遺伝子治療の制御の可能性が示唆された。しかしながら、高濃度の5-フルオロシトシン存在下では、放射線を照射しない場合でも細胞死が促進されるため、より厳格なプロモーター活性の制御などの改良が必要かもしれない

〔総括〕

今回取得したプロモーターは改良すべき点が多く、そのまま治療に応用できる可能性は低いと思われる。しかしながら、本研究で示した放射線応答性プロモーターの取得法は比較的容易で、適切な転写因子の選択や取得後の改良により、生理的な限界を持たない、治療応用に適したプロモーターの作成に有用であると考えている。今後は、刺激応答性の遺伝子発現制御システムとしてその改良を続けていくとともに、本研究の方法論がより広い範囲で応用可能なことを示したい。

# 学位論文審査の要旨

## 〔研究目的〕

放射線は癌治療に使用されているが、癌周辺の正常組織への照射による障害が問題である。この問題を解決するための物理・工学的な改良として、粒子線治療や強度変調放射線治療などが開発された。一方、分子生物学的方法により、放射線治療と遺伝子治療を組み合わせた放射線遺伝子治療が提案されている。放射線による治療関連遺伝子の発現により、標的とする領域でのみ作用する治療遺伝子と放射線の両方の効果が期待される。これまで内在性の放射線応答遺伝子プロモーターの利用が検討されてきたが、小川良平氏は、放射線応答性のプロモーターを人工的に作製する方法を新たに開発し、その有用性について検討した。

## 〔方法並びに成績〕

### 1) 放射線応答性人工プロモーターの作製

放射線で活性化が報告されている転写因子(NF- $\kappa$ B, AP-1, CBF-A, NF-Y)の結合配列をランダムに組み合わせ、TATA配列に結合したプロモーターを作製し、ルシフェラーゼ(Luc)遺伝子上流に導入しプロモーターライブラリーとした。ヒトの癌細胞株(HeLa, DU145, PC3など)にそれぞれ導入後、10 GyのX線を照射し、6時間後のLuc活性を指標にプロモーターの評価を行った。応答性は細胞種により異なったが、No. 11プロモーターが、HeLa細胞で約5.1倍と高い発現増強を示した。次に、プロモーター配列への変異導入型PCR法によるランダムな変異導入を行うことで、X線応答性の改良を試み、2回の変異導入型PCRにより、10 GyのX線に反応して20倍以上の発現増強を示すプロモーターの取得に成功した。

### 2) 安定発現細胞株でのプロモーター活性の評価

同定したプロモーターにLuc遺伝子を結合した遺伝子カセットを、レトロウイルスベクターを用い、安定的に導入したHeLa細胞を確立した。安定発現細胞では発現誘導効率の低下や誘導時間の短縮などが観察されたが、照射したX線の線量依存的にLuc発現を増強した。またX線よりも低い効率であったが、陽子線照射でも遺伝子発現を増強した。

### 3) プロモーター活性化機構の解析

放射線によるプロモーターの活性化に、細胞内酸化ストレスが関与している可能

性を調べるために、抗酸化物質のジメチルスルホキシドおよびD-マンニトールの効果を検証した。その結果、それぞれの抗酸化物質の濃度依存的に遺伝子発現増強が抑制され、酸化ストレスの関与が示唆された。

#### 4) 生体内での放射線応答性の評価

構築したプロモーター下にLucを結合した遺伝子カセットを安定的に導入した細胞をヌードマウスの両脇腹に移植し腫瘍を形成させ、片側の腫瘍にX線を照射したところ、非照射側と比較し有意にLucの発現が増強した。しかしながら、培養細胞と比較して、非照射時の活性が高く、また増強効率は大きく低下した。

#### 5) 自殺遺伝子誘導による細胞死誘導効果の評価

細胞毒性の低い5-フルオロシトシン (5-FC)を、細胞毒性の高い5-フルオロウラシル (5-FU) に変換する酵素 (fcy::fur) の遺伝子を、放射線応答性プロモーターに接続した遺伝子発現ベクターを構築し、安定的に導入した細胞を作製し、X線照射により発現が増強することを確認した。次に、この細胞を5-FCを加えて培養し、10 GyのX線を照射すると、5-FC濃度依存的に顕著な細胞生存率の低下が観察され、X線照射による自殺遺伝子治療の可能性が示唆された。

#### [総括]

本研究で、小川良平氏は、放射線に応答し遺伝子発現を誘導できる新規人工プロモーターの開発に成功し、自殺遺伝子を用いて、培養細胞で、放射線による細胞死の増強効果を示した点は新規性が高い。本研究で示された放射線応答プロモーター開発方法は、比較的簡便に作製でき、適切な転写因子結合配列の選択や取得後の改良、プロモーター活性化の機構を明確にする事で、治療応用に適した遺伝子発現プロモーターの開発につながり、医学における学術的重要性を含んでいる。しかしながら、今回取得したプロモーターは、個体レベルでは遺伝子発現誘導効率が低く、また、より厳密な遺伝子発現制御が必要であるため、臨床での治療に応用するには、更なる改良が期待される。

以上より、本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。