

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

2014 年度

富山大学大学院医学薬学研究部 放射線基礎医学講座

小川 良平

A basic study on development of a stimulation responsive gene
regulation system and its application for cancer therapy

Department of Radiological Sciences
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences
University of Toyama

Ryohei Ogawa

目 次

1. 緒言	1
2. 本論	4
2-1. 背景	4
2-2. 材料と方法	7
2-2-1. 細胞とバクテリアおよびその培養	7
2-2-2. プロモータープローブベクターおよびプロモーターライブラリーの構築	8
2-2-3. 変異導入型 PCR (epPCR) によるプロモーター断片への変異の導入	11
2-2-4. 一時的遺伝子導入	11
2-2-5. エックス線および陽子線照射	12
2-2-6. ルシフェラーゼアッセイによるプロモーターの評価	12
2-2-7. 組み換えレトロウイルスの作成と安定遺伝子導入細胞の確立	14
2-2-8. 放射線によるプロモーター活性に対する抗酸化剤の影響	17
2-2-9. EGFP 遺伝子発現の蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターによる検出	18
2-2-10. 発現タンパク質の検出	18
2-2-11. 動物実験	20
2-2-12. 自殺遺伝子治療 <i>in vitro</i> シミュレーション	21
2-2-13. 塩基配列分析	21
2-2-14. 統計学的解析	22
2-3. 結果	23

2-3-1. プロモーターの構築と DU145 細胞での特性評価	23
2-3-2. 異なる癌細胞株におけるクロン 11 プロモーターの特性	23
2-3-3. 変異導入型 PCR 法によるクロン 11 プロモーターの改良	24
2-3-4. 構築プロモーターの構造解析	26
2-3-5. 第二のプロモーターライブラリーの構築	26
2-3-6. レトロウイルスベクターによる安定的な遺伝子導入細胞での構築プロモーターの特性評価	27
2-3-7. 陽子線照射によるプロモーターの活性化	29
2-3-8. 抗酸化剤添加によるエックス線刺激によるルシフェラーゼ発現増強の抑制	31
2-3-9. 構築プロモーターの <i>in vivo</i> での働き	31
2-3-10. <i>fcy::fur</i> 遺伝子発現細胞の構築と自殺遺伝子治療の <i>in vitro</i> でのシミュレーション	31
2-4. 考察	34
3. 結語および今後の検討	41
4. 謝辞	43
5. 参考文献	44
6. 図	51

1. 緒言

放射線は長く癌治療に貢献しているが、従来型の治療では常に正常組織への副作用が懸念され、放射線治療後の局所再発も少なからず認められる。さらに、癌の種類により放射線感受性は様々であり、放射線による治療効果が期待できない種類の癌も知られている。このため、放射線の生物学的応答と物理的線量分布を考慮した治療の質的改善が求められている (1,2)。

このような状況下で放射線治療の治療様式の改良も進められている。放射線量の計算に基づいて、各方向から三次元的に照射し分けることで、標的組織特異的な照射を可能にする三次元原体照射が行われるようになった。その後、さらに精密な照射野の線量調節を可能にすることで、強度変調放射線治療 (IMRT) が開発された。IMRT は、治療計画の最適化をコンピューターシステムによる線量配分計算を行うことで実現する。このシステムは同一照射野内の照射野を複数の区画に分けて線量強度を変化させることで、標的病変が高感受性組織を取り囲む場合でも、高感受性組織への照射線量の抑制と病変部への高線量の投与の両立が可能である (3)。

また、陽子線や炭素線などの粒子線にはブラッグピーク現象が知られている。この現象は、粒子線が物質に入射すると少しずつエネルギーを失いながら進み、一定の速度にまで減速すると周囲の物質との激しい相互作用を開始することによって起る。したがって、入射面でよりも相互作用を起こす物質内部でのエネルギー付与が相対的に大きくなる線量分布を形成する。これにより放射線照射で正常組織への被曝を避けて治療を行うことが可能となる。このような粒子線を

利用した放射線治療は有効であり、有害事象も少ないと報告されている (4,5)。

一方、放射線の物理学的特性や照射機器の改良による治療効率の向上だけでなく、近年発展してきた分子生物学的な知識に基づく改良も試みられている。そのような解決法の一つとして、放射線遺伝子治療と呼ばれる、放射線治療と遺伝子治療との組み合わせによる治療法が提唱されている (6)。

遺伝子治療は、特定の遺伝子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、その後もさまざまな疾患に対して多くの臨床試験が行われている (7-10)。我が国でも多くの臨床試験が行われており、これまで治療が困難であった病気にも対応できるようになれば、将来の医療の一翼を担うであろうと期待される。

通常、治療に使用される遺伝子は、ウイルスなどを由来とする強力なプロモーターで発現することによりその遺伝子産物が大量に供給されるが、技術的な問題から発現量の詳細な調節は行われなことが多い。これにより、不足している正常な遺伝子産物が目的の細胞に供給されることで、これまでにない治療効果を示す例もある。しかしながら、導入された遺伝子の発現が過剰であり、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可能性も指摘されている (11)。特に癌の遺伝子治療においては、細胞死を引き起こす働きを持ったタンパク質の遺伝子を利用する場合もあり (12)、無秩序な治療遺伝子の大量発現は正常組織への影響も懸念される。

このように、放射線治療、遺伝子治療の両者ともに長所、短所が指摘されているが、放射線遺伝子治療は、これらを組み合わせることでお互いに補完でき

るのではないかという提案である。具体的には、放射線感受性を修飾する遺伝子を利用する方法や、放射線により治療遺伝子の発現を調節する方法などが挙げられる。複数の方法を組み合わせることにより、治療の時間的、空間的な制御がより厳密になり、さらには、治療に要する照射放射線量および遺伝子投与量を減ずることにもつながると思われ、副作用の少ない、効果的な治療の確立が期待される。

このような背景のもと、放射線の刺激で発現を制御できる遺伝子発現システムを人工的に構築することができれば、放射線遺伝子治療に利用できると考えた。また、同様の方法で、放射線以外の刺激により遺伝子発現を制御できるシステムの構築が可能であれば、より多くの治療へ応用の可能性が期待できると考え、研究に着手した。本研究では、放射線で活性化する転写因子の結合配列を用いた放射線遺伝子治療用の人工プロモーターを構築し、これを自殺遺伝子の発現制御に用いて治療応用の可能性について検討した。

2. 本論

2-1. 背景

細胞は、放射線照射による刺激を受けて、ストレス応答遺伝子や初期成長応答遺伝子などの遺伝子の発現を開始することが知られている。これらの遺伝子のプロモーターは、放射線による遺伝子発現制御への利用可能性が示されている。例えば、Hallahanらは、初期成長応答遺伝子の一つである *egr-1* 遺伝子のプロモーターを使用することで腫瘍壊死因子 (TNF) の発現を放射線で制御できることを示した。さらに、マウスに移植した腫瘍にこの遺伝子カセットを導入することで放射線を照射して TNF の発現を促し、放射線治療と遺伝子治療の両方の治療の組み合わせが可能であることを示した (13)。しかしながら、天然のプロモーターには生理的な限界があり、治療応用に向いていない場合もあると思われる。そこで、私たちは、放射線刺激に応答して活性化するプロモーターをはじめとした遺伝子発現制御システムを構築し、放射線遺伝子治療への利用を検討した。

人工的なプロモーターの作成法や改良法に関する報告は多い。Liらは、筋細胞特異的な転写因子の結合配列などを組み合わせ、筋組織で高い活性を持つプロモーターを開発した (14)。Scottらのグループは、*egr-1* 遺伝子プロモーターの刺激応答に関与する転写因子結合配列を複数結合した改良プロモーターが、野生型の *egr-1* 遺伝子プロモーターよりも応答性が高いこと、その結合配列間の距離は放射線応答性にあまり影響がないことなどを見いだした (15,16)。我々も、大腸菌中でプロモーター活性のない哺乳動物細胞ゲノム由来のDNA断片にラン

ダムな変異を導入することでプロモーター活性を付与できること (17)、ボックスウイルスのプロモーター活性を示す短いDNA断片を組み合わせることで高い活性のものが構築できること (18)、ほ乳動物のプロモーターの機能をDNAシャッフリングにより改良できること (19)、また、ほ乳動物の転写因子結合配列を組み合わせることでプロモーター活性をもつDNA断片が構築できること (20)などを示した。プロモーターがDNAの一次構造である塩基配列シグナルを一つの単位として成り立っており、転写因子などの転写関連タンパク質が結合するそれら配列シグナルが集合して機能していると考え、プロモーターの構築や改良はそれほど困難ではないと考えられる。しかしながら、同じ配列でも転写因子に強く認識される場合も、ほとんど認識されない場合もある。これは、おそらく、DNAの高次構造やエピジェネティックな修飾、さらには他のDNA結合因子との関係など周りのコンテキストも転写因子の結合に影響するためだと思われる。しかしながら、これらがプロモーターの性質にどのように影響するかは完全には明らかになっておらず、新たに、希望する性質を持った人工プロモーターを構築する場合、その設計を困難にしている。

そこで今回、似たような性質を持った転写因子を選択し、それらの結合配列をランダムに組み合わせる方法によりプロモーターを構築することとした。すなわち、放射線刺激で活性化する複数の転写因子を選択し、それらが結合する塩基配列を含む DNA 断片をそれぞれ合成してランダムに組み合わせた後に TATA ボックス配列と結合することで、様々な程度の応答性を持った、放射線に応答して活性化するプロモーターが構築できると予想した (Figure 1)。この方法により構築されるプロモーターの基本構造は、放射線応答性が予想されるもの

であり、多くのものが放射線で活性化すると考えられる。したがって、この方法で作成すれば、比較的小さいサイズのプロモーターライブラリーからでも、目的の性質を備えたプロモーターを取得できると考えた。論文などのデータから、放射線に応答して活性化する転写因子として古くから知られている、Nuclear factor kappa-B (NF- κ B) (21-23)、Nuclear factor-Y (NF-Y) (24)、Activator protein-1 (AP-1) (25)、CArG binding factor-A (CBF-A) (26) を選択し、これらの結合配列をランダムに結合したプロモーターの構築を試みた。さらに、構築したプロモーターのうち優れた反応性を示すものについて、*in vivo* での応答性や癌治療に利用される自殺遺伝子の発現制御などについて確認し、治療応用の可能性について検討した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞とバクテリアおよびその培養

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞および CaSki 細胞、ヒト前立腺癌由来の DU145 細胞、PC3 細胞および LNCaP 細胞、ヒト乳癌細胞由来の MCF7 細胞、HMC1-8 細胞および YMB1 細胞、ヒト肺癌由来の A549 細胞、ヒト小細胞肺癌由来の SBC5 細胞、ヒト骨肉腫由来の SaOS2 細胞および Hs871.T 細胞、ヒト膵臓癌由来の AsPC1 細胞を使用した。HeLa 細胞、CaSki 細胞、MCF7 細胞、HMC1-8 細胞、YMB1 細胞および SBC5 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した (Tokyo, Japan)。残りの細胞については、American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。すべての細胞は RPMI1640 培地に、10% の牛胎児血清と適切な濃度のペニシリン、ストレプトマイシンを添加した培地中で、37°C、5%二酸化炭素雰囲気下で培養した。

また、本研究では組み換えレトロウイルス産生用のパッケージング細胞として遺伝子組み換え細胞である AmphoPack293 細胞 (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan) を使用した。この細胞はヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞から作出されており、ゲノム中に導入されたモロニー Maus 白血病ウイルスの gag 遺伝子と env 遺伝子を発現して、ウイルスのパッケージングに必要なこれらの遺伝子産物を供給する。パッケージング細胞に導入された組み換えウイルス作製用プラスミドから Ψ 配列を有するレトロウイルスゲノム様 RNA が転写され、ウイルス様粒子に取り込まれ細胞培養液に放出される。このウイルス様粒子表面は、ram1 受容体を認識することによりマウス以外の細胞にも感染性を示す両指向性のエンベロープタンパク質を提示しており、マウスをはじめとした多くの哺乳動物細胞に感

染し、内部のレトロウイルスゲノム様 RNA を導入する。

遺伝子操作実験には、大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセル (Nippon Gene, Toyama, Japan) を使用した。大腸菌の培養は、37°C で、Luria-Bertani 培地 (トリプトン 1% (w/v)、酵母エキス 0.5% (w/v)、塩化ナトリウム 1% (w/v)) を使用して行った。Luria-Bertani 培地の材料はすべて BD Diagnostics 社 (Sparks, MD, USA) から購入した。すべての遺伝子操作実験は、Sambrook と Russell の記述を参考にした (27)。

2-2-2. プロモータープローブベクターおよびプロモーターライブラリーの構築

はじめに、構築したプロモーターを導入することで下流のルシフェラーゼ遺伝子を発現し、それを指標に導入したプロモーターの性質を調べることのできる、プロモータープローブベクターの構築をおこなった。まず、DU145 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型に、一組のプライマー 5'-atggtacctccgctggcccacgtgac-3' および 5'-atgagctccggccggtgctgggctcggtt-3' を使用して PCR をおこない、ヒトヘムオキシゲナーゼ 1 遺伝子プロモーターの TATA ボックス配列を含む DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片は制限酵素 SacI と KpnI で消化し、プラスミド pGL3-Basic (Promega Corp., Madison, WI, USA) の SacI-KpnI 部位に導入し、pGL3-TATA を構築した。次に、pGL3-TATA を制限酵素 SalI で消化し、クレノウ断片で処理した後にセルフライゲーションを行うことで、ポリ A シグナルのすぐ下流側に存在する SalI 認識部位を破壊し、pGL3-TATA Δ Sal を構築した。次に、合成したオリゴヌクレオチド (5'-cggagtcgactccggtac-3') をアニーリングバッファー (100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH7.5) 中で、95°C、5 分処理した後に室温に放置して除冷することでセ

ルフアニーリングし、pGL3-TATA Δ Sal の KpnI 部位に導入することで pGL3-TATA-Sal を構築した。この pGL3-TATA-Sal は、Luc 遺伝子上流に配置した TATA ボックス配列のすぐ上流に、ユニークな SalI 部位を持つプラスミドであり、この部位に転写因子結合配列を導入することで、プロモーターライブラリーを構築した。

プロモーターは、合成した転写因子結合配列をランダムに組み合わせ、pGL3-TATA-Sal の SalI 部位に導入し、TATA ボックス配列の上流部分に転写因子結合配列を配置することで構築した。第一のプロモーターライブラリーを作成するために使用した合成転写因子結合配列は、NF- κ B (5'-ggaaatcccc-3', 5'-tggagtcccc-3', 5'-ggaaagcccc-3') (21-23)、NF-Y (5'-cattggg-3') (24)、AP-1 (5'-tgtctcag-3') (25)、CBF-A (5'-ccatataagg-3') (26) である。合成したこれらのオリゴヌクレオチドは、それぞれの相補配列とアニーリングし二本鎖 DNA として使用した。同様に、SalI 認識部位の配列を含む短いオリゴヌクレオチドも合成し、相補鎖とアニーリングした。これらの合成 DNA は、ライゲースによる結合が効率良く進むように 5'側に 5'gatc-3'の突出配列を付加した。アニーリングした合成 DNA は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで末端にリン酸基を付加した後に、転写因子結合配列は等モルずつ、SalI 認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドはその 100 分の 1 加えてライゲーション反応を行った。ライゲーション反応後、制限酵素 SalI で消化した。この消化した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動に供し、50~200 bp 程度のサイズの DNA を抽出・精製した。pGL3-TATA-Sal を制限酵素 SalI で消化し、アルカリフォスファターゼ (BAP) で処理した後に、アガロースゲルから精製した DNA 断片をライゲーション反応

により導入した。pGL3-TATA-Sal の SalI 部位に挿入断片を保持しているプラスミドのうち、試験的に 11 個のプラスミドを選択し順番に pGL3-X (X は 1~11 で、単離した順番) という名前をつけ、最初のプロモーターライブラリーとした。それぞれのプラスミドに含まれるプロモーターの名称は、クロン X プロモーターとした。

第二のプロモーターライブラリーもほぼ同様の方法で作成したが、いくつかの点で改良を行った。まず、プロモータープローブベクターは、最初のプロモーターライブラリーのプラスミド pGL3-11 を制限酵素 KpnI と SacII で消化後にクレノウフラグメントで処理し、セルフライゲーションすることで新たなプラスミドプローブベクター、pGL3-DU-TATA を構築した。このプラスミドベクターは、TATA ボックス配列の上流に、このプラスミド上で唯一の KpnI 認識部位と SacI 認識部位を持つため、プロモーター断片の構築には、NF- κ B、AP-1、CBF-A、NF-Y 結合配列に加えて、制限酵素 KpnI 認識配列を含む合成 DNA および制限酵素 SacI 認識部位配列を含む DNA 断片を合成した。プロモーター846 から 862 までは、前回と同様に 5'-gatc-3'配列を 5'側の突出配列としてライゲーション反応の効率化のために付加したが、プロモーター801 から 845 までは、突出配列を付加せず、平滑末端のままでライゲーションをおこないプロモーターの構築を試みた。これらの合成 DNA は、それぞれの相補鎖とアニーリングした後に、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで末端にリン酸基を付加し、転写因子結合配列は、等モルずつ、制限酵素認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドはその 100 分の 1 ずつ加えてライゲーション反応を行った。ライゲーション反応後、制限酵素 KpnI および SacI で消化した。pGL3-DU-TATA も制限酵素 KpnI と SacI で消化し、消

化した DNA 断片をライゲーション反応により導入した。pGL3-DU-TATA の KpnI-SacI 部位に 100 bp 以上の挿入断片を保持しているプラスミドを 62 種類選択し、第二のプラスミドライブラリーとした。これらのプラスミドは、順番に pGL3-X (X は 801~862 で、単離した順番) という名前をつけた。それぞれのプラスミドに含まれるプロモーターの名称は、クローン X プロモーターとした。

2-2-3. 変異導入型 PCR (epPCR) によるプロモーター断片への変異の導入

pGL3-11 を鋳型に、プライマー 5'-tctattaattgttccgggaagctag-3' と 5'-cggccatggtccggccggtgctgggc-3' を使用して、PCR を行うことで増幅する pGL3-11 に含まれる合成転写因子結合配列を pGL3-DU-TATA の KpnI と SacI 部位に導入し、pGL3-11-DU を構築した。次に、この pGL3-11-DU (10 ng) を鋳型に、プロモーター領域全体を増幅する epPCR 用プライマー 5'-ggcaagcttgccagaacatttctcta-3' と 5'-cggccatggtccggccggtgctgggc-3' (10 pmol ずつ) を 100 µl の変異バッファー (10 ml Tris-HCl pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 or 0.75 MnCl₂, 0.2 mM dNTP, 5 U Taq ポリメラーゼ (Takara Bio Inc.)) に添加し、サーマルサイクラー (TPC 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で、95°C 3 分のインキュベーションの後に、94°C 20 秒、60°C 30 秒、72°C 60 秒の温度変化を 35 サイクル、さらに 72°C で 3 分間インキュベートして変異導入断片を作成した。この増幅断片は、精製後に制限酵素 HindIII と NcoI で消化して、pGL3-DU-TATA の HindIII-NcoI 部位にクローニングし、変異導入プロモーターライブラリーを構築した。

2-2-4. 一時的遺伝子導入

構築したプラスミドベクターは、遺伝子導入試薬であるエフェクテン (QIAGEN K. K., Tokyo, Japan) を使用して、メーカーのマニュアルに沿って遺

伝子導入を行った。デュアルルシフェラーゼアッセイでプロモーターの活性を評価する場合、60 mm の細胞培養皿に 1.5×10^6 の細胞を蒔き、37°C のインキュベーターで一晩培養した。まず、細胞を 37°C で暖めた RPMI1640 培地でリンスし、1.0 μg の pGL3-X と 10 ng の phRL-TK (Promega Corp.) を含むエフェクテン複合体を培養皿に添加した。これを 37°C で 6 時間培養した後、トリプシン処理により、細胞を回収した。回収した細胞は血球計算盤を使用して数え、35 mm 細胞培養皿 1 枚あたりに $2 \sim 3 \times 10^5$ 個の細胞を蒔き 37°C で一晩培養した後に、放射線照射に供した。

2-2-5. エックス線および陽子線照射

エックス線を照射は、まず、上記のように準備した 35 mm 細胞培養皿に蒔いた細胞の培地を 37°C に暖めていた 2 ml の新鮮な RPMI1640 培地と照射直前に交換した。これをエックス線発生装置 (MBR-1520-3, Hitachi Medical Technology Corp., Tokyo, Japan) のチャンバー内に設置したターンテーブルの中央に静置し、回転しながら、5 Gy/min の照射率でエックス線の照射を行った。

陽子線照射の場合は、上記に示す通りに遺伝子導入した 60 mm に培養した細胞をトリプシンで回収した後に $2 \sim 3 \times 10^5$ 個の細胞を 12.5 cm² フラスコで一晩培養し、陽子線照射に供した。若狭湾エネルギー研究センター (Tsuruga, Japan) の W-MAST シンクロトロン (28) に設置されてある生物学研究用高エネルギー照射施設の照射野に設置し、200 MeV の陽子線を 2.0 Gy/min の線量率で 10 Gy まで照射した。

2-2-6. ルシフェラーゼアッセイによるプロモーターの評価

一時的遺伝子導入後の人工プロモーターによるルシフェラーゼの発現の評価

は、遺伝子導入効率などのばらつきを標準化するために、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。デュアルルシフェラーゼアッセイキット (Promega Corp.) を利用し、構築プロモーターによるホタルルシフェラーゼの発現を、phRL-TK の単純ヘルペスウイルス I 型チミジンキナーゼ遺伝子プロモーターで発現するウミシイタケルシフェラーゼを内部標準として補正する。放射線照射後の適当なタイミングで細胞から培地を除き、PBS で一度リンスを行った。これに上記キットに含まれる 300 μ l のパッシブリスバッファーを細胞に添加して、室温で 15 分間、プラットホーム振盪装置で細胞を振盪し溶解した。この上清 10 μ l を取り、キットに含まれる 50 μ l の Luciferase Assay Reagent II と混合し、ホタルルシフェラーゼ反応を行った。その後、同じくキットに含まれる 50 μ l の Stop & Glow Reagent を添加することによりウミシイタケルシフェラーゼ反応を行った。それぞれの発光は、ルミノメーター (TD-20/20, Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) で測定した。各発現系の評価は、ホタルルシフェラーゼによる発光値をウミシイタケルシフェラーゼによる発光値で除した Relative Luminescent Unit (RLU) で行った。また、人工プロモーターによるルシフェラーゼ発現の増強は、照射した試料の RLU 値を同条件で照射しなかった試料の RLU 値で除した Fold activation として表した。

安定的な遺伝子導入後の人口プロモーターの評価の場合、放射線などの刺激を与えた細胞と刺激を与えない細胞では、増殖速度などの評価の前提条件が異なる事があると思われる。そのため、一時的に導入したプラスミドからのウミシイタケルシフェラーゼの発現と、安定的に導入されたゲノムから発現するホタルルシフェラーゼの発現の比率が変わる可能性も考えられる。そこで組み換

えウイルスで安定的に遺伝子導入した細胞で発現するルシフェラーゼの活性を指標にしたプロモーターの評価には、デュアルルシフェラーゼアッセイではなくホタルルシフェラーゼを発現している細胞の溶解液のタンパク質濃度を基準としての評価も行った。その場合は放射線照射後の適当なタイミングで細胞から培地を除き、PBS で一度リンスした後にデュアルルシフェラーゼアッセイキットのパッシブ細胞溶解液を 300 μ l 加え、プラットホーム振盪装置で 15 分振盪した。細胞溶解液の上清 10 μ l と Luciferase Assay Reagent II 50 μ l を加えホタルルシフェラーゼの発光をルミノメーターで測定した。タンパク濃度は BioRad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて Bradford 法にて測定した。この場合は、ルシフェラーゼ活性の測定値をタンパク濃度で除した値を Relative Luminescent Unit (RLU) として評価した。同様に、人工プロモーターによるルシフェラーゼ発現の増強は、照射した試料の RLU 値を同条件で照射しなかった試料の RLU 値で除した Fold activation として表した。

2-2-7. 組み換えレトロウイルスの作成と安定遺伝子導入細胞の確立

組み換えレトロウイルス構築用のプラスミド pSIREN-RetroQ は Takara Bio Inc. より購入した。プロモーター断片は、pGL3-11-9-37 を鋳型に、5'-cgcagatctgagtcggggactccagatcc-3' と 5'-gcggggcccatggtccggccggtgctgggttcg-3' をプライマーとして使用し、364 塩基のクロン 11-9-37 プロモーターを増幅した。一つ目のプライマーの 5' 側には付加配列として制限酵素 BglII 認識部位配列が含まれており、二つ目のプライマーには 5' 側に制限酵素 ApaI 認識部位が含まれている。PCR 後に増幅断片を制限酵素 BglII と ApaI で消化し、pSIREN-RetroQ の U6 プロモーターと入れ換えるように BglII と ApaI 部位に導入し、pRet-37 を構築し

た。SV40 プロモーターや人工プロモーターのクロン 831、843、848 についても pSIREN-RetroQ の同じ制限酵素部位に同様の方法で導入し、pRet-SV、pRet-31、pRet-43、pRet-48 を構築した。実際に使用した鋳型プラスミドおよびプライマーの組み合わせは、以下の通りである。SV40 : pGL3-Control を鋳型に 5'-cgcagatctgcgatctgcattcaattag-3'および 5'-gcggggcccatggtggctttaccaacagtaccg-3'をプライマーとして使用、クロン 831 : pGL3-831 を鋳型に 5'-ggctcgagatctgcgatctaagtaagctt-3'および 5'-gcggggcccatggtccggccggtgctgggctcg-3'をプライマーとして使用、クロン 843 : pGL3-843 を鋳型にクロン 831 の場合と同じプライマーを使用、クロン 848 : pGL3-848 を鋳型にクロン 831 の場合と同じプライマーを使用。

ルシフェラーゼ遺伝子は pGL3-control (Promega) を鋳型にして 5'-gcattccggtactgttg-3'と 5'-ggcgaattcactctagaattacac-3'の両プライマーを用いて PCR 法で増幅した。増幅した DNA 断片 (ルシフェラーゼ遺伝子) は、両端に認識配列の存在する制限酵素 NcoI と EcoRI で消化した後、pRet-37、pRet-SV、pRet-31、pRet-43、pRet-48 のプロモーター下流に位置する NcoI-EcoRI 部位に導入し、組み換えレトロウイルス作成用プラスミド pRet-37-luc、pRet-SV-luc、pRet-31-luc、pRet-43-luc、pRet-48-luc を構築した。同様に、ほ乳動物細胞用に改良された緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子の場合、プラスミド pEGFP-N1 (Promega Corp.) を鋳型に、5'-ggatccaccggtcgccacc-3'と 5'-ggcgaattcaatgtggtatggctg-3'の両プライマーを用いて PCR 法で増幅した。増幅した DNA 断片 (EGFP 遺伝子) は、両端に認識配列の存在する制限酵素 NcoI と EcoRI で消化した後、pRet-37、pRet-SV のプロモーター下流に位置する

NcoI-EcoRI 部位に導入し、組み換えレトロウイルス作成用プラスミド pRet-37-EGFP、pRet-SV-EGFP を構築した。Fcy::Fur タンパク質の遺伝子についても同様の方法でクローニングを行った。この遺伝子は酵母のシトシンデアミンナーゼ遺伝子とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を結合したもので、融合タンパク質をコードする自殺遺伝子である (29)。この fcy::fur 遺伝子の発現検出のために PCR 増幅の際に、遺伝子産物の C-末端にフラッグタグ配列 (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) が導入されるように、これに対応した塩基配列をプライマーに付加した。PCR には、プラスミド pORF5-Fcy::Fur (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を鋳型として、5'-ggctctagattatttagtagtatctgtccc-3' (XbaI 認識部位とフラッグタグ配列コード領域とその下流にストップコドンを加えた) と 5'-gagacagaggagaccatgggtcac-3' (NcoI 認識部位を含む) をプライマーとして利用した。fcy::fur 遺伝子を含む増幅した DNA 断片は、制限酵素 NcoI と XbaI で消化した後、pRet-37 の NcoI-XbaI 部位に導入し、組み換えレトロウイルス作成用プラスミド pRet-37-Fcy::Fur を構築した。

ここで構築した組み換えウイルス作成用プラスミドは、3'側のレトロウイルスの LTR に変異が導入されておりプロモーター活性を失っている。この変異は組み換えウイルスが感染細胞のゲノムにインテグレートする際に、5'側の LTR にも相同組み換えにより導入されることで 5'側の LTR も活性を失い、その下流に位置する目的の遺伝子を発現する人口プロモーターの活性にはほとんど影響しない。したがって、目的の遺伝子の発現は、人口プロモーターの活性にのみ左右される。

組み換えレトロウイルスを作成するために、構築した 10 μg の組み換えレトロウイルス作製用プラスミドを CalPhosTM Mammalian transfection kit (Takara Bio Inc.) を使用して 60 mm のコラーゲンコートした培養皿に培養した 1.0×10^6 個の AmphoPack293 細胞に導入した。48 時間培養後にウイルス粒子を含む培養上清を回収し、0.45 μm のフィルターで細胞片を取り除いた後、組み換えウイルスの感染促進用にポリブレン (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) を 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えた。このウイルス液を 100 mm の細胞培養皿に培養した 1.0×10^6 個の HeLa 細胞に添加して 6-8 時間培養した。培地交換の後、3 日間培養し、さらに 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗生物質であるピューロマイシン (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を含む培地で 3 日間培養し、生存した細胞を安定遺伝子導入細胞とした。安定遺伝子導入細胞は、使用した組み換えレトロウイルス作成用プラスミドの名称をもとに名前をつけた。例えば、pRet-37-luc を使用して作成した安定遺伝子導入 HeLa 細胞の名称は、HeLa/Ret-37-luc とした。

2-2-8. 放射線によるプロモーター活性化に対する抗酸化剤の影響

放射線によるプロモーター活性の増強に対する抗酸化剤の影響を観察する実験については、安定遺伝子導入細胞を使用して行った。まず、細胞に 10 ng の pRL-TK をエフェクテン試薬により一時的に遺伝子導入し、37°C で 6 時間培養した。この遺伝子導入細胞をトリプシン処理で回収し、35 mm 細胞培養皿に 2×10^5 個蒔いた。37°C で一晩培養した後、細胞培養液をあらかじめ 37°C に暖めていた 50 mM あるいは 100 mM の D-mannitol、または、70 mM あるいは 140 mM ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む新鮮な RPMI1640 培地と交換した。その後、10 Gy のエクソ線あるいは陽子線を照射した。放射線照射後、細胞は通常通り

8 時間 37°Cで培養し、デュアルルシフェラーゼアッセイに供した。ホタルルシフェラーゼの発現量はそれぞれ同じ細胞で検出されるウミシイタケのルシフェラーゼの活性で修正した。これらの放射線照射の有無による違いを比較することで、放射線による増強度を算出した。抗酸化剤添加の影響は、同じ種類の同じ濃度の抗酸化剤を含む培養細胞で放射線照射の有無によるルシフェラーゼの発現量の違いを比較することで増強度を算出し、さらに、それらを、抗酸化剤を添加していない場合の増強度と比較することで、抗酸化剤の影響を算出した。

2-2-9. EGFP 遺伝子発現の蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターによる検出

HeLa/Ret-37-EGFP および HeLa/Ret-31-EGFP の放射線による EGFP 遺伝子発現の増強による蛍光の増強を蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで検出した。実験の一日前に 60 mm の細胞培養皿に 1×10^6 個の細胞を蒔き、37°Cで一晩培養した。この細胞に 10 Gy の X 線を照射し、8 時間 37°Cで培養した後、EGFP からの蛍光を検出するために 525 nm のフィルターを使用して蛍光顕微鏡 (Eclipse TE300 equipped with Y-FL Epifluorescence System, Nikon Corp., Tokyo, Japan) で観察した。この時の画像を蛍光顕微鏡に結合したデジタル CCD カメラ (C4742-95-12, Hamamatsu Photonics K. K., Hamamatsu, Japan) で撮影し、コンピュータ上においてアプリケーションソフトウェア (Argus, version 1.4.1., Hamamatsu Photonics K. K.) で編集した。

同様に、一晩培養した細胞に 5 Gy あるいは 10 Gy のエックス線を照射し、その後 37°Cで培養した。8 時間後、細胞をトリプシン処理で回収し、PBS で適当な濃度にけん濁した。この細胞を 535 nm のフィルターをセットしたフローサイトメーター (EPICS XL, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) で解析した。

2-2-10. 発現タンパク質の検出

10 Gy のエックス線を照射し様々な時間培養した後、4°Cに冷やした PBS で 2 回細胞を洗浄した。プロテアーゼインヒビターカクテル (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を含む細胞溶解バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM Ethylenediaminetetra acetic acid, NaCl, 1% Triton X-100) で溶解した。細胞溶解液のタンパク質の濃度は BioRad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて Bradford 法にて測定した。各サンプルのタンパク質の濃度を細胞溶解バッファーで調整した細胞溶解液に、5 ml の良く冷やした洗浄バッファー (50 mM Tris-Cl pH7.4, 150 mM NaCl) で 5 回洗浄した抗フラッグ M2 モノクローナル抗体が結合したビーズ (Sigma-Aldrich Inc.) けん濁液を等量添加した。ゆっくりと振盪しながら 4°Cで一晩反応し、1 ml の良く冷やした洗浄バッファーで 8 回洗浄した。特異的に結合しているフラッグタグを持った Fcy::Fur タンパク質を 2 × Laemli サンプルバッファー (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl) を加え 95°Cで 10 分間処理して溶出した。これを遠心器にかけて上清を集め、トリスグリシンバッファーの SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動後、イモビロン PDF 膜 (Merk Millipore, Billerica, MA, USA) に電氣的に転写した。一次抗体には抗フラッグ M2 モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich Corp.) を用い、二次抗体にはホースラディッシュペーパーオキシダーゼ修飾ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Merk Millipore) を用いた。目的タンパク質のバンドの検出は ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) 検出試薬処理による発光を、LAS4000 Luminescent Imaging Analyzer (Fujifilm Corp., Tokyo,

Japan) を使用して画像化することで行った。内部標準として、細胞溶解液中の β -アクチンを、同様の SDS-アクリルアミドゲル電気泳動後のイムノブロッティングにより検出した。一次抗体には、抗ヒト β -アクチンモノクローナル抗体を二次抗体には、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ修飾ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Merk Millipore) を用いた。

2-2-11. 動物実験

すべての動物実験は、富山大学動物実験委員会に認可された方法で行った。細胞培養皿で培養した HeLa/Ret-SV-luc、HeLa/Ret-37-luc、HeLa/Ret-31-luc 細胞をトリプシン処理により回収し、PBS で $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整した。50匹の5週令のメスの KSN/Slcヌードマウス (Sankyo Labo Service, Toyama, Japan) の両脇腹の皮下にそれぞれ同じ細胞を 200 μl 接種した。約1ヶ月後、同程度の腫瘍サイズのマウスを39匹選択し、放射線照射実験に供した。すべてのマウスはネンブタールを 500 mg/g 体重で腹腔内投与して麻酔をかけた。まず、麻酔したマウスに 100 mg/g 体重の割合で、PBS に溶解したルシフェラーゼの基質試薬 Luciferin EF (Promega Corp.) を腹腔内投与した。マウスは基質投与10分後にバイオルミネッセンス検出装置 (AEQUORIA-2D/c8600, Hamamatsu Photonics K. K.) で腫瘍内のバイオルミネッセンスを60秒間検出した。その後、マウスを固定器で固定し、また片側の腫瘍を鉛板で覆った。マウスを固定器ごとエックス線発生装置 (MBR-1520-3, Hitachi Medical Technology Corp.) のチャンバー内に設置したターンテーブルに乗せ、回転しながら、覆っていない方の腫瘍のみに 5 Gy/min の照射率で 10 Gy あるいは 15 Gy のエックス線を照射した。マウスはエックス線照射後ケージにもどし、水、餌を十分摂れる環境で8時間飼育した。マウスに再度ネ

ンブタールを接種して麻酔を行った後、luciferin EFを同量投与した後、同様のタイミングで腫瘍からのバイオルミネッセンスを測定した。測定したそれぞれの腫瘍の発光はWasabi Application Software (version 1.5, Hamamatsu Photonics K.K.) で定量した。照射した側の腫瘍からの発光量を照射していない側の腫瘍からの発光量で除したものを放射線照射の前後で比較し、その割合をFold activationとしてルシフェラーゼ遺伝子の発現増強を評価した。

2-2-12. 自殺遺伝子治療 in vitro シミュレーション

1×10⁶個のHeLa/Ret-37-Fcy::Fur細胞を60 mm細胞培養皿に蒔き37°Cで一晩培養した。10 Gyのエックス線を照射した後すぐに、PBSで洗浄しトリプシン処理により細胞を回収した。細胞培養用の96ウエルマイクロプレートに1ウエル当たり0.6×10⁴個の細胞を蒔き、0、0.01、0.1、1.0、10.0 mMの5-フルオロシトシン (5-Fluorocytosine; 5-FC) を含む培養液中で、37°Cで48時間培養した。5-FCを含まない培地に交換した後、37°Cで1時間培養し、各ウエルに10 μlのWST-1試薬 (Cell Counting Kit, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を添加し、37°Cで2時間培養した。マイクロプレートリーダー (iMark, Bio-Rad Laboratories) で450 nmの吸光度 (630 nmをリファレンスに設定) を測定した。生細胞 (survival cell fraction: SC) の割合を下の式で算出した。

$$SC (\%) = 100 \times AS / AC$$

ASは450 nmでのサンプルの吸光度を表し、ACはコントロールの吸光度を表した。コントロールの値は5-FCを添加しない細胞の値とした。

2-2-13. 塩基配列分析

塩基配列分析はBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を利用して cycle sequence PCR法により実行した。適切なプライマーを設計して、構築したプラスミドやプロモーターについて以下のように分析を行った。3.2 pmolのそれぞれのプライマーと500 ngの鋳型DNAおよびキットに含まれる8.0 μ lのプレ混合液を含むDNA配列分析混合液をGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)にかけPCRを行った。精製したPCR産物を4%のPAGEによる配列分析(ABI Prism DNA Sequencer 377; Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA)にかけた。

2-2-14. 統計学的解析

全ての値は特に記載がなければ平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表した。2群間比較には対応のないスチューデントT検定を用いた。2群以上の比較検定には one-way analysis of variance (ANOVA)を用いた。P < 0.05の場合統計学的に有意差ありと判定した。

2-3. 結果

2-3-1. プロモーターの構築と DU145 細胞での特性評価

4 種類の転写因子の結合配列を含む合成 DNA をランダムに組み合わせ、プロモータープローブベクターである pGL3-TATA-Sall の TATA ボックス配列の上流に導入することで、試験的に 11 種類のプロモーターを含むプラスミドライブラリー（第一のプロモーターライブラリー）を構築した。これらのプラスミドをそれぞれヒト前立腺癌由来の DU145 細胞に導入し、24 時間後にルシフェラーゼの活性を測定したところ、5 種のプラスミドで TATA ボックス配列のみを含む pGL3-TATA よりも高い活性を示した。これらのうち、クロン 6 プロモーターおよびクロン 11 プロモーターと名付けたものが SV40 プロモーターでルシフェラーゼ遺伝子を発現する pGL3-Control よりも高いルシフェラーゼ活性を示した (Figure 2A)。つぎに、これらのプラスミドを DU145 細胞に導入し 18 時間培養した後に 10 Gy のエクソ線を照射した。さらに 6 時間培養した後にルシフェラーゼ活性を調べたところ、3 種類のプラスミドで有意な発現増強が観察された。その中でクロン 11 プロモーターを含む pGL3-11 を導入した細胞はエクソ線を照射しない場合と比較して 1.87 ± 0.17 倍 ($p = 0.002$) のルシフェラーゼ発現を示し、最も大きな増強が認められた (Figure 2B)。

2-3-2. 異なる癌細胞株におけるクロン 11 プロモーターの特性

次に、DU145 細胞でエクソ線に対して最も高い応答性を示したクロン 11 プロモーターについて、他の癌細胞での応答性について調べてみた。DU145 細胞の場合と同様に、用意した 13 種類の細胞に pGL3-11 を導入後、10 Gy のエクソ線を照射し、その 6 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。Figure

3 に示すように、13 細胞株のうち 4 つの細胞株で、放射線照射後有意にルシフェラーゼ発現が増強した。これらのうち DU145、PC3、SBC2 については約 2 倍の増強が認められた。ヒトの子宮頸癌由来の HeLa 細胞では 5.10 ± 0.25 倍の増強が観察された。その他の細胞については、この条件ではルシフェラーゼの発現増強は認められなかった。この結果は、クロン 11 プロモーターの放射線応答性が、細胞特異的であることを示している。

次に、第一のプロモーターライブラリーのプラスミドをそれぞれ HeLa 細胞に一時的に遺伝子導入し、10 Gy のエクソ線照射 6 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイを行なったところ、11 クロンのプロモーターのうち 7 クロン (約 63.6%) で、放射線を照射しない場合と比較してルシフェラーゼ発現の有意な増強 ($p < 0.05$) が認められた (Figure 4)。この中で最も高い応答性を示したクロン 11 プロモーターは、エクソ線の線量依存的に活性を増強し (Figure 5A)、10 Gy でエクソ線を照射した場合、9 時間後に 6.13 ± 1.29 倍と最大の応答性を示した。その後、徐々にルシフェラーゼ活性は低下して行くが、48 時間後でも、放射線刺激を与えないものと比較して 4 倍近くのルシフェラーゼ活性を示した (Figure 5B)。

2-3-3. 変異導入型 PCR 法によるクロン 11 プロモーターの改良

次に、作成したプロモーターの放射線応答性の改良を試みた。我々は、以前、プロモーター活性を示す DNA 配列にランダムな点変異を導入することで、そのプロモーターの転写活性が変化することを確認しており (17)、点変異の導入により放射線応答性の改良も可能であると考えた。変異の導入は、変異導入型 PCR 法でおこなった。これは、クロン 11 プロモーターを含む DNA 断片を PCR 法で

増幅する際に、マグネシウムイオンに加えてマンガンイオンを添加することで、Taq ポリメラーゼの正確な DNA 複製に影響を与え、誤った塩基の導入を促す方法である。先立って行った予備実験で、0.5 mM のマンガンイオンを添加した条件下で PCR を行なうことで、約 1% の点変異の導入を認めた。また、この方法で作成したプロモーターを容易にクローニングできるように改良したプロモータープローブベクター pGL3-DU-TATA を材料と方法で示したように構築した。このプラスミドベクターにクローン 11 プロモーターをクローニングし、pGL3-11-DU を構築した。このプラスミドベクターに含まれる TATA ボックスの下流側の配列が pGL3-11 と多少異なっているが、そのプロモーターとしての活性はほとんど変わらないことを確認している (Figure 6C)。pGL3-11-DU を鋳型に変異導入型 PCR 法で 5 つの変異プロモーターを pGL3-DU-TATA にクローニングした。これらをそれぞれ HeLa 細胞に一時的に導入し、5 Gy のエクソ線に対する応答性を 6 時間後に評価したところ、pGL3-11-DU が 2.51 ± 0.19 倍の発現増強を示したのに対して pGL3-11-9 と名付けたプラスミドが 3.54 ± 0.41 倍の発現増強であることが示され、これらの中でもっとも高い放射線応答性を示した。さらに、pGL3-11-9 を鋳型に再度変異導入型 PCR を行い 42 個の変異プロモーターを作出し、同様の方法で評価したところ、5 Gy のエクソ線を照射した 6 時間後に 6.69 ± 0.46 倍の発現増強を示す pGL3-11-9-37 プラスミドを取得した (Figure 6A)。このプラスミドに含まれるプロモーターの特性についてさらに評価を行った。まず、細胞に導入し 24 時間後にルシフェラーゼ活性を調べると、変異導入前のプラスミド、pGL3-11-DU や pGL3-11-9 よりもその活性が低くなっていた (Figure 6B)。しかしながら、10 Gy の放射線の対する応答性は、照射後

6 時間で約 21.57 ± 6.07 倍と非常に高く (Figure 6C)、変異導入型 PCR によるランダムな変異の導入がプロモーター機能の改良に利用できることが示された。

2-3-4. 構築プロモーターの構造解析

クローン 11 プロモーターとそれに由来するプロモーターの塩基配列分析により、構造解析を行った。その結果、クローン 11 プロモーターは 364 bp で、NF- κ B 結合配列が 10 コピー、AP-1 結合配列が 3 コピー、NF-Y 結合配列が 2 コピーで、CBF-A 結合配列 1 コピー含まれていた (Figure 7)。また、プロモーター内にはいくつかの欠失やリアレンジメントが見つかった。おそらく、転写因子結合配列やランダム結合を促進するために導入した 5' 突出配列などの多くの繰り返し配列のためだと考えられる。この配列をクローン 11-9 プロモーターおよびクローン 11-9-37 プロモーターの配列と比較してみると、クローン 11-9 プロモーターで 4 つの点変異が、クローン 11-9-37 プロモーターではそれらに加えて 2 つの点変異が認められた。活性やエックス線に対する反応性の変化は、これらの点変異に由来すると考えられる。これら 3 つのプロモーターの配列は、GenBank に登録し、以下のアクセッション番号を付与された (クローン 11 プロモーター : EF536080、クローン 11-9 プロモーター : EF536081、クローン 11-9-37 プロモーター : EF536082)。

2-3-5. 第二のプロモーターライブラリーの構築

次に本方法の可能性を見極めるために、第一のプロモーターライブラリーと同じ 4 種類の転写因子の結合配列をランダムに組み合わせた断片を pGL3-DU-TATA に導入し、同様の手法で新たに 62 種類のプロモーター断片を含むプラスミドライブラリーを構築した (第二のプロモーターライブラリー)。それぞれのプラスミドを HeLa 細胞に導入し 24 時間後にルシフェラーゼの活性を

調べたところ、プラスミド pGL3-Control に含まれる SV40 プロモーターによるルシフェラーゼ活性よりも強いものは認められなかった (Figure 8B)。これらの遺伝子導入細胞に 10 Gy のエックス線を照射し、その後 6 時間培養してルシフェラーゼ活性を測定したところ、62 種類中 57 種類のプロモーターがルシフェラーゼ活性を有意に増強した (91.9%)。この中で特に応答性の高かった 3 種類のプロモーター、クロン 831、843、848 プロモーターは、10 Gy のエックス線に反応して下流のルシフェラーゼ遺伝子の発現をそれぞれ 11.17 ± 1.72 倍、 13.54 ± 3.01 倍、 10.96 ± 0.56 倍発現を増強することが示された (Figure 8A)。

高い反応性を示すこれら 3 種類のプロモーターについて塩基配列分析による構造解析を行った。クロン 831 プロモーターは 295 塩基からなり、9 コピーの NF- κ B 結合配列と 5 コピーの CBF-A 結合配列からなることが示された。クロン 843 プロモーターは 330 塩基長で、8 コピーの NF- κ B 結合配列、7 コピーの CBF-A 結合配列および 3 コピーの AP-1 結合配列からなることが示された。さらに、クロン 848 プロモーターは 406 塩基からなり、10 コピーの NF- κ B 結合配列、1 コピーの CBF-A 結合配列、3 コピーの AP-1 結合配列および 2 コピーの NF-Y 結合配列からなることが示された。Figure 9 にこれらのプロモーターにおけるそれぞれの結合配列の配置を模式的に表した構造図を示す。第二のプロモーターライブラリーから選択した 3 つのプロモーターの配列は、GenBank に登録し、以下のアクセッション番号が付与された (クロン 831 プロモーター : HQ542862、クロン 843 プロモーター : HQ418223、クロン 848 プロモーター : HQ418224)。

2-3-6. レトロウイルスベクターによる安定的な遺伝子導入細胞での構築プロモーターの特性評価

次に、プロモーターの性質をより治療に即した状況で調べるために、クロン 11-9-37 プロモーター、クロン 831 プロモーター、クロン 842 プロモーター、クロン 848 プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ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細胞へ導入し、HeLa/Ret-37-luc、HeLa/Ret-31-luc、HeLa/Ret-43-luc および HeLa/Ret-48-luc 細胞を作成した。また、コントロールとして、SV40 プロモーターと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導入した HeLa/Ret-SV-luc を構築した。遺伝子導入したそれぞれの HeLa 細胞にエックス線を照射したところ、HeLa/Ret-SV-luc を除くすべての細胞で、線量依存的にルシフェラーゼの発現量が増加したが、一時的な遺伝子導入の場合と多少異なる応答性が観察された。クロン 831、843、848 プロモーターについては刺激を与えない時のルシフェラーゼの発現量が増加したためか、増強度が一時的な遺伝子導入の場合と比較して 20–60%程度に落ちた (Figure 10A)。次に、発現増強度に大きな変化のなかった HeLa/Ret-37-luc 細胞に 10 Gy のエックス線を照射し、その後のルシフェラーゼ発現の変化について調べた。9 時間後の増強度が約 30 倍に達し、増強度では一時的な遺伝子導入との大きな違いはなかった。しかしながら、エックス線照射から 24 時間後には非照射の同細胞によるルシフェラーゼの発現とほぼ同等となり、一時的な遺伝子導入の場合と比較してルシフェラーゼ発現増強の持続時間の短縮が明らかとなった (Figure 10B)。これらの違いはおそらく遺伝子カセットが導入された周辺の DNA 構造あるいはそれに結合するタンパク質の違いなどによるものと思われる。

HeLa/Ret-37-luc に 2 Gy のエックス線を照射すると、ルシフェラーゼ発現は、

約 9 時間後に 2.40 ± 0.29 倍 ($p < 0.01$) まで増強して最大値に達し、その後 24 時間までに照射していないものと同程度のルシフェラーゼ発現レベルにもどる (Figure 10C)。2 Gy の放射線は、通常の癌の放射線治療における一回分の線量であり、本方法による放射線遺伝子治療に応用できるプロモーター取得の可能性を示唆している。

クローン 11-9-37 プロモーターで EGFP 遺伝子を発現する遺伝子カセットを安定的に導入した HeLa/Ret-37-EGFP 細胞を構築した。この細胞に 10 Gy の放射線を照射して、遺伝子発現の変化を蛍光強度の変化で観察した。Figure 11A に示すように、エックス線を照射する前の細胞はほとんど蛍光を発しておらず、蛍光顕微鏡では EGFP 遺伝子の発現を確認できないが、10 Gy のエックス線照射 8 時間後に観察すると、Figure 11B に示すように緑の蛍光を発する細胞が数多く認められた。同様に、エックス線照射 8 時間後に HeLa/Ret-37-EGFP 細胞を回収してフローサイトメトリーで蛍光強度の測定を行ったところ、エックス線を照射しない HeLa/Ret-37-EGFP 細胞は野生株細胞の蛍光強度分布とほぼ同じ位置で単峰型分布を示し、ほとんど蛍光を発していないことがわかる。エックス線を照射し、8 時間培養後に回収した細胞をフローサイトメーターで分析したところ、線量依存的に蛍光強度の高い右側にも新たなピークが出現して二峰性の分布を示すようになる。これは、エックス線の刺激により EGFP の発現が増加し、強い蛍光を発するようになったためと考えられる (Figure 11C)。この結果は、ルシフェラーゼ以外の遺伝子でも構築したプロモーターが放射線による遺伝子発現制御に利用できることを示している。

2-3-7. 陽子線照射によるプロモーターの活性化

近年、日本各地で癌治療のための陽子線照射施設が整備されつつある。福井県敦賀市の若狭湾エネルギー研究センターに設置されている、最高で 200 MeV まで陽子線を加速できるシンクロトロン・タンデム加速器システム W-MAST は多目的であるが、癌治療のための照射も行なっている (28)。質量を持つ粒子の流れである陽子線はエックス線などの光子線とは物理学的な性質が異なる。しかしながら、それらの生物効果は類似点も多い。例えば、陽子線の照射によるヒト唾液腺癌由来細胞の生存率、および、マウスの腸クリプト細胞の生存率を指標にした検定では、その生物学的効果比 (RBE) はそれぞれ 1.08、および、1.11 で、エックス線とほぼ同等であった (30)。そこで、陽子線でも合成プロモーターの活性化が可能であるか、作成した安定遺伝子導入細胞株に照射して調べてみた。その結果、HeLa/Ret-31-luc、HeLa/Ret-43-luc、HeLa/Ret-48-luc および HeLa/Ret-37-luc への 10 Gy の陽子線の照射により、6 時間後にそれぞれ 3.01 ± 0.60 倍 ($n = 3$)、 1.92 ± 1.14 倍 ($n = 3$)、 2.59 ± 0.35 倍 ($n = 3$) および 5.81 ± 1.47 倍 ($n = 3$) の発現増強が観察された。このように陽子線の照射によってもプロモーターの活性化を介して、有意なルシフェラーゼ発現の増強が認められた (Figure 12)。陽子線によるルシフェラーゼ発現の増強は、同線量のエックス線による増強よりも低い割合であったが、HeLa 細胞における組み換え体間の相対的な増強度の関係がエックス線によるものと類似しており、エックス線の場合と同様の機序による活性化であることが示唆される。以前の検討で、同線量のエックス線および陽子線を水に照射した場合、活性酸素の発生量などに違いがあることが指摘されているが (31)、エックス線との増強度の違いは、このような物理化学的な違いが影響している可能性も考えられる。

2-3-8. 抗酸化剤添加による放射線刺激によるルシフェラーゼ発現増強の抑制

放射線の刺激により、細胞は酸化ストレス状態に陥ることが知られている (32)。また、プロモーター構築に使用した転写因子のうち NF- κ B や AP-1 などは、酸化ストレスによっても活性化することが報告されている (33)。これらのことから、クロン 11-9-37 プロモーターの活性化に、放射線刺激により誘導される酸化ストレスの関与が推察される。そこで、ヒドロキシラジカルのカベンジャーである DMSO や D-mannitol を、放射線を照射する直前に添加した場合のクロン 11-9-37 プロモーター活性化への影響を調べてみた。その結果、10 Gy の X 線による発現増強が、50 mM および 100 mM の D-mannitol でそれぞれ $23.98 \pm 5.73\%$ および $34.29 \pm 12.76\%$ 、70 mM および 140 mM の DMSO の添加で $36.01 \pm 19.58\%$ および約 $56.22 \pm 8.59\%$ 抑制された (Figure 13A)。陽子線による増強も同様の割合での発現増強の抑制が観察された。具体的には、10 Gy の陽子線による発現増強が、50 mM および 100 mM の D-mannitol でそれぞれ $14.28 \pm 12.36\%$ および $48.88 \pm 11.26\%$ 、70 mM および 140 mM の DMSO の添加で $57.56 \pm 0.55\%$ および $71.13 \pm 5.76\%$ 抑制された (Figure 13B)。これら結果は、放射線刺激によるクロン 11-9-37 プロモーターの活性化に、酸化ストレスが関与することを示唆している。

2-3-9. 構築プロモーターの in vivo での働き

次に、構築したプロモーターの治療応用の可能性について検討するために、ヌードマウスをモデル動物として使用し、生体でのプロモーターの放射線応答性について調べた。HeLa/Ret-37-luc 細胞、HeLa/Ret-31-luc 細胞、あるいは、HeLa/Ret-SV-luc 細胞をそれぞれマウスの後背部両脇腹皮下に接種し直径約 5-10

mm 程度の腫瘍を形成した。これらのマウスの左側の脇腹を鉛板で遮蔽し、マウスに 10 Gy あるいは 15 Gy のエックス線を照射して 8 時間後にルシフェラーゼ発現の増強をバイオルミネッセンス検出装置で測定した。HeLa/Ret-SV-luc 細胞の腫瘍では、10 Gy のエックス線照射後でも 0.95 ± 0.20 倍 ($n = 3$) とまったく増強は見られなかったが、HeLa/Ret-31-luc 細胞の腫瘍では 10 Gy のエックス線照射後に、照射しない場合と比較すると 1.75 ± 0.72 倍 ($p < 0.05$; $n = 8$)、15 Gy で 2.31 ± 0.65 倍 ($p < 0.05$; $n = 3$) の増強が観察された。HeLa/Ret-37-luc 細胞の腫瘍では 10 Gy のエックス線照射後に、照射しない場合と比較すると 2.29 ± 0.12 倍 ($p < 0.01$; $n = 5$)、15 Gy で 2.67 ± 0.50 倍 ($p < 0.05$; $n = 5$) の増強が認められた (Figure 14)。このようにどちらの細胞の場合でも *in vivo* でルシフェラーゼ発現の有意な増強が観察され、エックス線によるそれぞれの合成プロモーターの活性化が認められた。ただ、*in vitro* と比較し増強割合はかなり低い。今後は、原因の究明とさらなる改良が必要だと思われる。

2-3-10. fcy::fur 遺伝子発現細胞の構築と自殺遺伝子治療の *in vitro* でのシミュレーション

次に、ルシフェラーゼ遺伝子や EGFP 遺伝子の代わりにクロン 11-9-37 プロモーター下に自殺遺伝子である fcy::fur 遺伝子を発現する遺伝子カセットをレトロウイルスベクターで安定的に導入した細胞 (HeLa/Ret-37-Fcy::Fur) を作成し、5-FC との組み合わせで *in vitro* での自殺遺伝子治療を検討した。使用した自殺遺伝子、fcy::fur 遺伝子は、癌治療用の自殺遺伝子として開発されたもので、酵母のシトシンデアミナーゼをコードする fcy-1 遺伝子とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする fur-1 遺伝子を融合した人工遺伝子である (28)。

この遺伝子の産物は両酵素の活性を保持していることが確認されている。シトシンデアミナーゼ活性の弱い哺乳動物細胞に対して毒性の低い 5-FC は、前者の酵素活性により毒性の高い 5-フルオロウラシル (5-Fluorouracyl; 5-FU) に効率的に変換される。5-FU は、後者の酵素活性によりさらに 5-fluoroUMP に変換される。その後、細胞内でさらに様々に変換され、酵素阻害やゲノムへ取り込みなどを介し効率的に細胞死を誘導する (33)。

まず、この細胞にエックス線を照射し、**fcy::fur** 遺伝子の発現増強をタンパク質の検出により調べた。エックス線照射後 0 時間でも **HeLa/Ret-37-luc** と比較すると多少発現していることがわかる。この発現は、エックス線照射 6 時間から顕著になり 12 時間でピークに達したが、24 時間後にはほぼ照射前の状態に戻った (Figure 15A)。そこで、10 Gy のエックス線を照射した **HeLa/Ret-37-Fcy::Fur** を 5-FC を含む培地で培養したところ、5-FC の濃度依存的に細胞の生存率が顕著に低下した。この現象は、**HeLa/Ret-37-luc** や、エックス線を照射していない細胞では観察されず、**HeLa/Ret-37-Fcy::Fur** へのエックス線の照射により **fcy::fur** 遺伝子発現が促進されることで 5-FC から 5-FU に変換されることで引き起こされた細胞死によるものであると考えられる。しかしながら、エックス線を照射しない場合でも **fcy::fur** 遺伝子を多少発現しているためか、5-FC を高い濃度で添加すると細胞死が起こる (Figure 15B)。これらの結果は、クロン 11-9-37 プロモーターがこのままの状態では治療に応用できる完全な物ではないことを示している。しかしながら、また、本研究で我々が示した方法が、治療応用できるプロモーター取得の可能性を示唆する結果であるとも考えている。

2-4. 考察

本研究論文では、刺激に応答して活性化するプロモーターの構築法と作成したプロモーターの性質、さらに、その治療応用の可能性について検討した。

本論文で検討した、刺激応答性の人工プロモーターは、刺激に応じて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、基本転写因子が認識するTATAボックス配列に結合して構築した。この方法は、刺激に応答して活性化する転写因子をあらかじめ選択しているため刺激に応答して活性化するプロモーターを取得できる効率が高いと考えた。本研究論文では2つのプロモーターライブラリーを構築したが、第一のライブラリーでは、63.6%のプロモーターがエックス線の刺激に応答して下流のルシフェラーゼ遺伝子の発現を有意に増強し、第二のプロモーターライブラリーでは91.9%と、ほとんどすべてのプロモーターがエックス線の刺激に応答した。もちろん、刺激応答性はエックス線の照射線量などの条件にも左右されるが、非常に高い割合で目的の刺激に応答するプロモーターを取得できることが示された。実際、同様の方法で構築した前立腺癌細胞で機能する放射線応答性プロモーター取得のためのライブラリーでも、46.6%という高い割合で10 Gyのエックス線に応答するプロモーターを取得した(34)。このように、本研究論文で示した方法は有効であり、刺激に応答して活性化する転写因子の選択を慎重に行えば、比較的簡単に刺激応答性のプロモーターの取得が可能であると思われる。

今回取得した放射線応答性プロモーターは、細胞特異性が高く、クロン11プロモーターは、HeLa細胞でのみ高い反応性が観察された。また、第二のプロモーターライブラリーのプロモーターもヒト前立腺癌由来のLNCaP細胞で放射線

応答性を示すものもあったが、HeLa 細胞における応答性と比較して劣っていた (34)。これは、おそらく、癌細胞の由来や癌化の程度などにより、刺激に応答して活性化する転写因子の種類が異なるためと考えられる。実際、Nrf2、p53、Oct1 など異なる種類の転写因子の結合配列を利用して同様の方法で作成したプロモーターは、LNCaP 細胞でも本研究論文の合成プロモーターと同等レベルの応答性を示した (34)。

本研究論文では、出版された研究論文を検索して見いだした、放射線刺激で活性化する NF- κ B、AP-1、CBF-A、NF-Y の 4 種類の転写因子を選択し、その結合配列を利用して HeLa 細胞で働くプロモーターを取得した。作成したプロモーターライブラリーから取得した応答性の高いプロモーターの構造を調べてみたところ、NF- κ B と CBF-A の結合配列を含む割合が高いことが示された。これら 2 つの転写因子が高い放射線応答性を保持するなど、他の 2 つと比較して特に放射線応答性に強く関わっている可能性が考えられる。今回選択した転写因子の中でも放射線に対する応答性に違いが示されており、本研究論文で利用した転写因子が最適の選択であるかどうかは不明である。62 個のプロモーターを含む第二のプロモーターライブラリーのうち、反応性の高いプロモーターでもルシフェラーゼ遺伝子発現の増強倍率は、最大でも 10 倍程度で頭打ちであったが、このことも転写因子の選択に起因する可能性がある。放射線刺激を与える前後の遺伝子発現プロファイルの違いを網羅的に調べることで、放射線応答性プロモーターを取得するためのより適切な転写因子の組み合わせを見いだすことが可能かもしれない。

変異導入型 PCR によるプロモーター断片への変異導入による機能の改良は、

単純な操作で実施可能であり、効果も高いことが示された。以前に、大腸菌中でプロモーター活性を持たない HeLa 細胞ゲノム由来の DNA 断片に変異導入型 PCR により点変異を導入することで、大腸菌中でのプロモーター活性を付与できること、この手法を繰り返すことで、その活性を向上できることなどを示した (17)。原核生物の転写メカニズムは真核生物のそれとは異なるが、おそらく転写因子結合配列が形成されてプロモーター活性を持ち、さらに変異が導入されることにより転写因子と DNA との親和性が上がることで転写活性が向上したと考えている。今回の機能の改良は、単純に転写活性が向上したというのではなく、刺激により増加する遺伝子の発現量の割合が増加したわけであるから、刺激がない時の転写活性が減弱したか、刺激がある時の転写活性が向上したなどの現象が引き起こされたためであると考えられる。実際、クロン 11 プロモーターに変異を導入することで取得したクロン 11-9 プロモーター、さらに変異を導入したクロン 11-9-37 プロモーターは、変異導入前よりも放射線を照射していない時の転写活性（下流遺伝子の発現）が減少していることが示された (Figure 6B、クロン 11 プロモーター ; SV40 の $35.85 \pm 16.6\%$ 、クロン 11-9 プロモーター : SV40 の $8.80 \pm 1.29\%$ 、クロン 11-9-37 プロモーター ; SV40 の $4.76 \pm 0.23\%$ (一時的遺伝子導入データ))。これは、変異の導入によって DNA の構造に影響があったためではないかと考えている。すなわち、変異の導入が DNA の高次構造の変化を引き起こし、例えば、刺激がなく周りに転写因子少ない場合、転写関連因子が DNA に接近しにくい構造となっており、刺激が加わることにより転写関連因子が増加することで DNA の構造がほどけると、転写因子は以前と同様に接近・結合するなどのモデルが考えられる。変異を導入するための変異導入型 PCR

法は従来 DNA がコードしているタンパク質の機能改良などに利用されてきた方法であるが (35)、DNA の一次構造の変化は、DNA 自体の機能についても影響を与え、プロモーターなどの改良にも利用できることが示された。今後は、変異導入の頻度と活性変化の関係など、より体系的な検討を実施したい。

ウイルスベクターの利用は治療応用を考えた場合に重要になると思われる。そこで、レトロウイルスベクターを利用して、構築した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の細胞への導入を試みた。プロモーターの機能をほぼ保持したまま安定的に細胞への導入が可能であったが、いくつかの問題点も浮上した。例えば、プロモーターの性質が完全には同じでなかったことである。この安定的な導入により、発現増強割合の変化や発現増強の継続期間の変化などが観察された。これはレトロウイルスが細胞のゲノムにインテグレートするため、インテグレートした部位の環境に影響されるためではないかと考えている。あるいは、プラスミド上とレトロウイルスゲノム上での DNA コンテキストの違いによるものという可能性もある。他の問題点としては、大量の組み換えレトロウイルスの取得が困難で細胞への遺伝子導入までに時間がかかることや、組み換え可能な DNA 量に制限があり導入遺伝子の数が限られるなども、治療応用を考えた場合、問題と思われる。

開発したクロン 11-9-37 プロモーターの刺激応答性のメカニズムはよくわかっていない。抗酸化物質の存在下では刺激応答性が抑制されることから、酸化ストレスの関与が示唆された。また、このプロモーターは、細胞内酸化ストレスを引き起こす抗癌剤であるドキソルビシン処理 (36) にも応答して活性化する (37, 38) (Figure 16)。一方、他の抗癌剤、例えばマイトマイシン C の処理では、

クロン 11-9-37 プロモーターは活性化しないが、マイトマイシン C も細胞内酸化ストレスを引き起こすことが報告されている (39)。したがって、このプロモーターの活性化には、単純に酸化ストレス状態であれば十分というわけではなく、ある特定の酸化ストレスあるいは酸化ストレスに加えてそれ以外の要因も必要であることを示唆している。例えば、DNA との相互作用が関与する可能性もある。放射線が DNA 損傷を引き起こすことは良く知られているが、プロモーターの活性を向上させるドキソルビシンやシスプラチンも DNA と相互作用し損傷を引き起こすことが知られている。ただ、ドキソルビシンは二本鎖 DNA の鎖間に侵入し DNA トポイソメラーゼを阻害する (40)。一方、シスプラチンは DNA の鎖間に架橋を形成することが知られており (41)、引き起こす損傷の詳細は大きく異なる。また、マイトマイシン C も架橋形成、アルキル化などを引き起こし DNA と相互作用をすることが知られている (42)。発現増強のメカニズムはそれほど単純ではなさそうである。今後も解析を続けたい。

今回開発したプロモーターは、動物の体内でも、エックス線の刺激に応答して下流遺伝子の発現を増加することが示された。しかしながら、その増加割合は *in vitro* で観察される場合と比較して大きく抑制された。これらの抑制の原因は現時点では不明である。ただ、動物実験の際、放射線照射のない場合でも HeLa/Ret-37-luc や HeLa/Ret-31-luc 細胞で形成された腫瘍から、HeLa/Ret-SV-luc 細胞による腫瘍の SV40 プロモーターによるルシフェラーゼ発現によるものと同等レベルのシグナルを検出している。In vitro において刺激がない状態では、クロン 11-9-37 プロモーターによるルシフェラーゼ遺伝子の発現は SV40 プロモーターのものと比較して $15.95 \pm 0.33\%$ 程度であることが判明しており (安定的

遺伝子導入データ)、*in vivo* では何らかの原因で刺激がない時の活性が上昇したと考えられる。例えば、マウス血中に含まれるホルモンやサイトカインなどの生理活性物質の働きにより人工プロモーターの活性化に関与する転写因子が刺激のない状態でも活性化することで、プロモーターの基本転写活性を高めているのではないかと推測される。対策としては、転写因子の選択を論文データでなく、実際の状況に即して行うことである程度解決できるのではないかと考えている。現在、ヌードマウスに標的とする癌細胞で腫瘍を形成し、放射線を照射することで活性化する転写因子の探索を行っている。得られる情報を基に、本方法で再度プロモーターを構築する予定である。

クローン 11-9-37 プロモーターが、*in vitro* でエックス線や陽子線に応答して下流遺伝子の発現を顕著に増加することや、抑制されてはいたが *in vivo* でも、エックス線に応答することが判明したことを受けて、自殺遺伝子を利用した放射線遺伝子治療の *in vitro* でのシミュレーションを行った。細胞毒性の低い 5-FC を抗癌剤にも使用される細胞毒性の高い 5-FU に変換する酵素の遺伝子、*fcy::fur* をクローン 11-9-37 プロモーターで発現する遺伝子カセットとして HeLa 細胞に安定に導入して検討を行った。このプロモーターは、放射線に応答して十分な量の *fcy::fur* 遺伝子の発現を誘導し、同じ細胞に 5-FC 非存在下で放射線照射した場合、あるいは HeLa/Ret-37-luc に 5-FC 存在下で放射線照射した場合と比較すると、1 mM 以上の 5-FC の添加により統計的に有意な細胞死の促進が観察されている。このプロモーターは、放射線刺激のない時には、放射線刺激を加えた場合の三十分の一程度である。また、SV40 プロモーターの 16%程度の活性を示すのみであり、このプロモーターで発現した EGFP タンパク質の蛍光強度のプロ

一サイトメーターによる分析でも、親株の HeLa 細胞と比較するとやや右側へのシフトするのみである (Figure 11C)。しかしながら、10 mM の 5-FC 存在下では放射線を照射しない場合でも、約 20%と放射線を照射したものの半分近い細胞死の促進が観察された (Figure 15B)。刺激がない時の発現による細胞死の促進は、開発したプロモーターの欠点ではあるが、5-FC の添加濃度や添加のタイミング、さらには添加期間などを調整することである程度の改良が可能ではないかと考えている。また、自殺遺伝子である *fcy::fur* の mRNA およびタンパク質に、例えば、ヘルペスウイルス サイミリの RNA 分解促進配列の AU Rich Element (43) やマウスのオルニチンデカルボキシラーゼ由来のタンパク質分解促進配列である PEST 配列 (44) などの付加による半減期の調節などによってもかなりまで改良が可能だと考えている。さらに、エックス線の刺激により発現が減少するマイクロ RNA の結合配列を治療遺伝子に含めることで、エックス線を照射しない場合は弱いながらも発現している治療遺伝子の発現を強く抑制し、照射した場合はそれが解除されることでプロモーターの働きを妨げない新たな遺伝子発現制御システムの検討も開始した (45)。

本論文で示した一連の検討において、今回開発した方法で構築した人工プロモーターがエックス線および陽子線に応答して活性化し、下流に結合した遺伝子の発現を増強することが示された。さらに、この活性化は生体でも起こり、*in vitro* での検討ではあるが、自殺遺伝子治療にも利用可能であることが示された。まだいくつか問題があるため、今回使用したプロモーターをそのまま治療応用することは難しいが、プロモーターを構築する方法論自体は有効であり、今後の改良などにより、癌治療応用の可能性を追求したい。

3. 結語および今後の検討

今回示した放射線応答性プロモーター構築法は比較的容易で、適切な転写因子を選択すれば目的の性質を持ったものを取得できる可能性も高いと思われる。その上、おそらくは他の刺激に応答するプロモーターの取得にも応用可能である。実際、これまで低強度超音波刺激 (46-48) や抗癌剤処理 (37, 38) などによって活性化するプロモーターを、今回と同じ方法により構築したプロモーターライブラリーから選択できることを示している。いずれの場合も、*in vitro* での自殺遺伝子治療が可能であった。今後は、この方法論が、より広い範囲で応用可能なことを示したい。

現在、治療応用可能なものを作成するために、以下のようないくつかの検討を続けている。一つ目は、考察にも記したが、マイクロ RNA の利用である。マイクロ RNA は、タンパク質をコードしない 20 塩基程度の小分子の RNA である。マイクロ RNA は、通常、mRNA の 3' 非翻訳領域に存在するマイクロ RNA の相同配列に相補的な配列を標的として結合し、遺伝子の発現を抑制することで遺伝子発現の調節を行っている。組織特異的な発現を示すものや刺激応答性の発現を示すものも知られている。考察に示したように、刺激応答性のものはその標的配列とプロモーターとの組み合わせでよりタイトな発現制御を実現できることが示された (45, 49)。また、組織特異的な発現を示すマイクロ RNA の標的配列を目的遺伝子の mRNA に組み込むことにより、そのマイクロ RNA を発現している組織での目的遺伝子の発現が抑制される。クローン 11-9-37 プロモーターの下流に、癌細胞でしばしば発現が抑制される miR-200c (50, 51) の標的配列を

組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を結合した遺伝子カセットを作製した。この遺伝子カセットを、miR-200c を発現しない HeLa 細胞に導入した場合、放射線応答性に発現した。一方、miR-200c を大量に発現する細胞では、放射線の照射が有る無しに関わらずほとんどルシフェラーゼが発現しないことを確かめた。このシステムの応用により、治療遺伝子のより高度な組織特異的発現を実現できると思われる。

また、クロン 11-9-37 プロモーターを利用することで、放射線による shRNA の発現制御が可能であることも確認した。このシステムにより、放射線の刺激で shRNA を介した遺伝子発現の抑制が可能となる。現在、いくつかの癌治療抵抗性に働く遺伝子を標的とした遺伝子カセットを細胞に導入し、エックス線の刺激による癌細胞の治療感受性の制御についての検討を行っている。

腫瘍組織を作る癌細胞は一樣ではなく、治療抵抗性も細胞によって異なることが知られている。したがって、腫瘍の効率的な治療には、放射線との組み合わせを考えても一つの遺伝子の発現や抑制では限界がある。今後は、ヘルペスウイルスやバキュロウイルスなどの複数の遺伝子を導入できるベクターを利用し、個々の遺伝子を放射線などの刺激で細かく制御できるような遺伝子発現制御システムを構築することで、新しい放射線遺伝子治療に結びつけていきたい。

4. 謝辞

本学位論文は平成 19 年 4 月から平成 23 年 3 月にわたり、富山大学大学院医学薬学研究部 放射線基礎医学講座において行われた研究内容をまとめたもので、公表された 2 論文 (52, 53) をもとに構成されたものである。

稿を終えるに当たり、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 放射線基礎医学講座 近藤 隆 教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、多くの面でご助言、ご協力を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 腎泌尿器科学講座 渡部明彦 助教、同 森井章裕 助教、公衆衛生学講座 崔 正国 助教、北里大学医療衛生学部医療衛生工学科 鍵谷 豪 講師、その他の共同研究者諸氏に深謝致します。また、最後に終始ご支援を賜りました、放射線基礎医学講座の諸氏に感謝いたします。

5. 参考文献

1. Khuntia D, Reddy CA, Mahadevan A, Klein EA, Kupelian PA, Recurrence-free survival rates after external-beam radiotherapy for patients with clinical T1-T3 prostate carcinoma in the prostate-specific antigen era: what should we expect? *Cancer*, 2004; **100**: 1283–92.
2. D’Ambrosio DJ, Pollack A, Harris EE, Price RA Jr, Verhey LJ, Roach M 3rd, Demanes DJ, Steinberg ML, Potters L, Wallner PE, Konski A, Assessment of external beam radiation technology for dose escalation and normal tissue protection in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008; **70**: 671–7.
3. Intensity Modulated Radiation Therapy Collaborative Working Group: Intensity-modulated radiotherapy: current status and issues of interest. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001; **51**: 880-914.
4. Zietman AL, DeSilvio ML, Slater JD, Rossi CJ Jr, Miller DW, Adams JA, Shipley WU, Comparison of conventional-dose vs high dose conformal radiation therapy in clinically localized adenocarcinoma of the prostate. *JAMA*. 2005; **294**: 1233-9.
5. Slater JD, Rossi CJ Jr, Yonemoto LT, Reyes-Molyneux NJ, Bush DA, Antoine JE, Miller DW, Teichman SL, Slater JM, Conformal proton therapy for early-stage prostate cancer. *Urology*, 1999; **53**: 978-84.
6. Mauceri HJ, Hanna NN, Staba MJ, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR, Radiation-inducible gene therapy. *C. R. Acad. Sci. III.*, 1999; **322**: 225–8.
7. Herzog RW, Cao O, Hagstrom JN, Wan L, Gene therapy for treatment of inherited

- haematological disorder. *Expert Opin Biol Ther*, 2006; **6**: 509-22.
8. Fiandaca M, Forsayeth J, Bankiewicz K, Current status of gene therapy trials for Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 2008; **209**: 51-7.
 9. Geffney MM, Hynes SO, Barry F, O'Brien T, Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 2007; **152**: 175-88.
 10. Cross D, Burmester JK, Gene therapy for cancer therapy: past present and future. *Clin Med Res*, 2006; **4**: 218-27.
 11. Rissanen TT, Rutanen J, Yla-Herttuala S, Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia. *Adv Gene*, 2004; **52**: 117-64.
 12. Tibbrrghien P, Use of suicide genes in gene therapy. *J Leukoc Biol*, 1994; **56**: 203-9.
 13. Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, Toledano A, Hellman S, Kufe DW, Weichselbaum RR, Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med*, 1995; **1**: 786-91.
 14. Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R, Synthetic muscle promoters: Activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, 1999; **17**: 241-5.
 15. Marples B, Scott SD, Hendry JH, Embleton MJ, Lashford LS, Margison GP, Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy. *Gene Ther*, 2000; **7**: 511-7.
 16. Scott SD, Joiner MC, Marples B, Optimizing radiation-responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy. *Gene Ther*, 2002; **9**: 1396-402.
 17. Kagiya G, Ogawa R, Hatashita M, Takagi K, Kodaki T, Hiroishi S, Yamamoto K,

- Generation of a strong promoter for Escherichia coli from eukaryotic genome DNA. *J Biotechnol*, 2005; **115**: 239–48.
18. 小川良平、柳田昇、佐伯早木子、大川節子. プロモーター、それを含むプラスミド及び組換えアビポックスウイルス. 特許, 登録番号:**2638677**, 1997 年.
19. Kagiya G, Ogawa R, Cook JA, Choudhuri R, Hatashita M, Tanaka Y, DeGraff BG, Mitchell JB, Improvement and induction property of radiation-responsive promoter through DNA shuffling of 5'-flanking regions of the human p21 gene. *J Biosci Bioeng*. 2010; **110**: 118-23.
20. Ogawa R, Kagiya G, Kodaki T, Fukuda S, Yamamoto K, Construction of strong promoters by random cis-acting element elongation. *BioTechniques*, 2007; **42**: 628-32.
21. Ueda T, Akiyama N, Sai H, Oya N, Noda M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, c-IAP2 is induced by ionizing radiation through NF- κ B binding sites. *FEBS Lett*, 2001; **491**: 40–4.
21. Hong SY, Yoon WH, Park JH, Kang SG, Ahn JH, Lee TH, Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha-, cd40-, and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem*, 2000; **275**: 18022–8.
22. Kanno M, Fromental C, Staub A, Ruffenach F, Davidson I, Chambon P, The SV40 TC-II (kappa B) and the related h-2kb enhansons exhibit different cell type specific and inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the ap-2 binding site have no enhanson properties. *EMBO J*, 1989; **8**: 4205–14.

23. Hu Z, Jin S, Scotto KW, Transcriptional activation of the *mdr1* gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem*, 2000; **275**: 2979–85.
24. Hallahan DE, Dunphy E, Kuchibhotla J, Kraft A, Unlap T, Weichselbaum RR, Prolonged c-jun expression in irradiated ataxia telangiectasia fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996; **36**: 355–60.
25. Datta R, Rubin E, Sukhatme V, Qureshi S, Hallahan D, Weichselbaum RR, Kufe DW, Ionizing radiation activates transcription of the *egr1* gene via CArG elements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 10149–53.
26. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2001.
27. Hatori S, Kurita T, Hayashi Y, et al. Developments and applications of accelerator system at the WakasaWan Energy Research Centre. *Nucl Instrum Meth Phys Res*, 2005; **241**: 862–69.
28. Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M, In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated Transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res*, 2000; **60**: 3813-22.
29. 鍵谷豪、山本和高、丸山市郎、福田茂一、久米恭、横濱則也、畑下晶範、高城啓一、遠藤伸之、羽鳥聡、栗田哲郎、林豊、土手雅人、山田政信、山田裕章、森順一、安藤興一、古澤佳也、青木瑞穂、小池幸子、鶴沢玲子. 若狭湾エネルギー研究センター180 MeV陽子線の生物学的効果比. *Annual Report of The Wakasa Wan Energy Research Center*, 2001; **4**: 72.

30. Fukuda S, Endo N, Kagiya G, Kondo T, Free radical formation by protons. *Jpn J Med Phys*, 2004; **24**: 85.
31. Riley PA, Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 1994; **65**: 27-33.
32. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 2010; **49**: 1603-16.
33. Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Kakutani S, Kume K, Hasegawa T, Kondo T, Fuse, H, Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation. *Gene Ther*, 2012; **19**: 219-27.
34. Lane MD, Seelig B, Advances in the directed evolution of proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2014; **10**:129-136.
35. Gewirtz DA, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 1999; **57**: 727-41.
36. Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui Z-G, Kagiya G, Fukuda S, Kume K, Hasegawa T, Hatashita M, Izumi H, Ishimoto T, Feril LB Jr., Development of a therapeutically important radiation induced promoter. *Bioengineered*, 2013; **4**: 44-9.
37. Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui Z-G, Kagiya G, Doi N, Zhao Q-L, Feril LB Jr., An artificially constructed radiation responsive promoter is activated with doxorubicin treatment. *Cancer Gene Ther*, 2012; **19**: 345-51.

38. Doroshow JH, Akman S, Chu FF, Esworthy S, Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmac Ther*, 1990; **47**: 359-70.
39. Hortobágyi GN, Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, 1997; **54** Suppl 4: 1-7.
40. Crul M, van Waardenburg RC, Beijnen JH, Schellens JH, DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat Rev*. 2002 ; **28**: 291-303.
41. Gause GF, Dudnik YV, Interactions of antineoplastic antibiotics and DNA. *Antibiot Chemother*, 1980; **28**: 102-8.
42. Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ, AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol*, 1994; **14**: 7984–95.
43. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M, Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 1986; **234**: 364–8.
44. Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Cui Z-G, Takasaki I, Doi N, Kondo T, Fuse H, Utilization of microRNAs with decreased expression levels in response to X-ray irradiation for fine-tuning radiation-controlled gene regulation. *Int J Mol Med*, 2013; **32**: 9-16.
45. Watanabe A, Kakutani S, Ogawa R, Lee S-I, Yoshida T, Morii A, Kagiya G, Feril LB Jr., Fuse H, Kondo T, Construction of artificial promoters sensitively responsive to sonication. *J Med Ultrason*, 2009; **36**: 9-17.
46. Ogawa R, Lee S-I, Izumi I, Kagiya G, Yohsida T, Watanabe A, Kakutani S, Kondo T,

- Feril LB Jr., Ishimoto T, Enhancement of artificial promoter activity by ultrasound-induced oxidative stress. *Ultrason Sonochem*, 2009; **16**: 379-86.
47. Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui Z-G, Kagiya G, Kondo T, Doi N, Feril LB Jr., Regulation of gene expression in human prostate cancer cells with artificially constructed promoters that are activated in response to ultrasound stimulation. *Ultrason Sonochem*, 2013; **20**: 460-7.
48. Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui Z-G, Kondo T, Effect of sonication on miRNA expressions and its application for gene expression control with ultrasound. *The International Workshop on Advanced Sonochemistry Proceedings*. 2011; **20**: 75-7
49. Kunz M, MicroRNAs in melanoma biology. *Adv Exp Med Biol*. 2013; **774**: 103-20
50. Tu HF, Lin SC, Chang KW, MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013; **21**: 104-11.
51. Ogawa R, Lee SI, Kagiya G, Hirano H, Fukuda S, Kondo T, Kodaki T, Construction of X-ray-inducible promoters through cis-acting element elongation and error-prone polymerase chain reaction. *J Gene Med*, 2008; **10**: 316-24.
52. Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui ZG, Kagiya G, Fukuda S, Kume K, Hasegawa T, Hatashita M, Izumi H, Ishimoto T, Feril LB Jr., Regulation of gene expression in retrovirus vectors by X-ray and proton beam radiation with artificially constructed promoters. *J Gene Med*, 2012; **14**: 316-27.

6. ☒

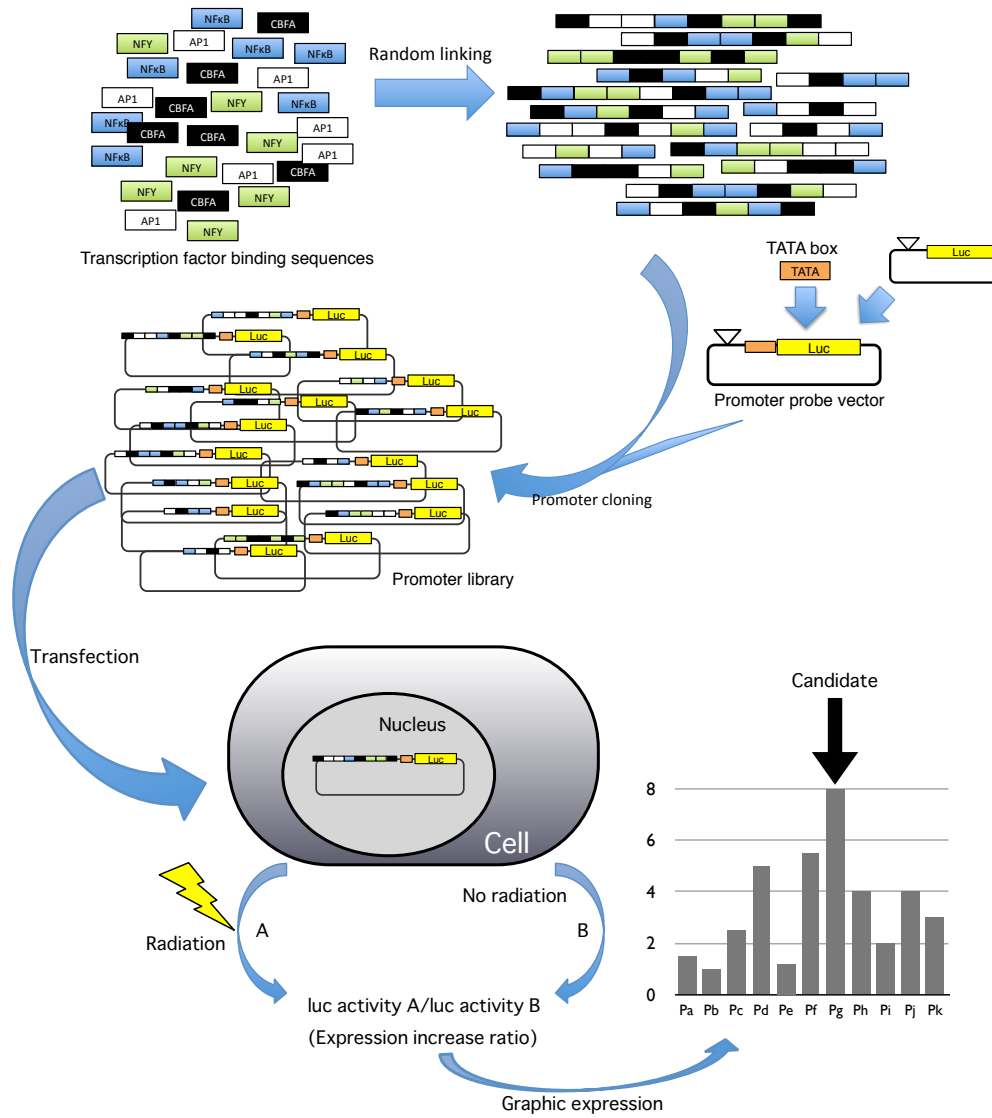


Figure 1 Construction of radiation responsive promoter library and selection method for radiation responsive promoters.

A promoter library was constructed by cloning randomly combined DNA fragments containing four transcription factors upstream of the TATA box sequence in a promoter probe vector. Cells were transfected with each vector and exposed to radiation to see if luciferase activity increases. Promoters were evaluated by calculating ratios of luciferase activity after radiation to one before radiation and selected the ones showing higher ratios as candidate promoters.

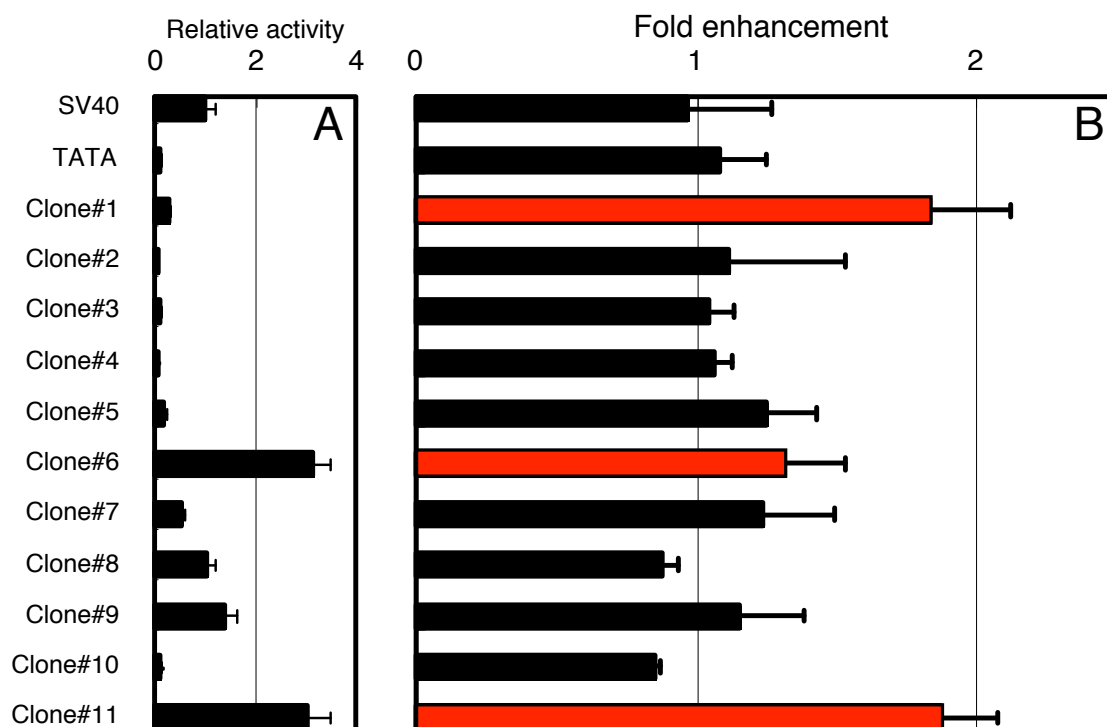


Figure 2 Promoter activities and their X-ray inductions of synthetic DNA fragments in DU145 cells.

A. Promoter activities without X-ray irradiation. Luciferase activities driven by synthesized promoters were expressed as the values of the promoter activities and they were expressed relative to that driven by SV40 in the pGL3-Control. The red bars indicate significant increase in luciferase expression in response to X-ray irradiation ($p < 0.05$). B. The promoter activities 6 h after X-ray irradiation. All of the values of the activities are expressed relative to those in the identically prepared samples except for X-ray irradiation. The error bars represent the standard deviations ($n = 3$). The presented figure was depicted based on the representative findings of 3 independent experiments.

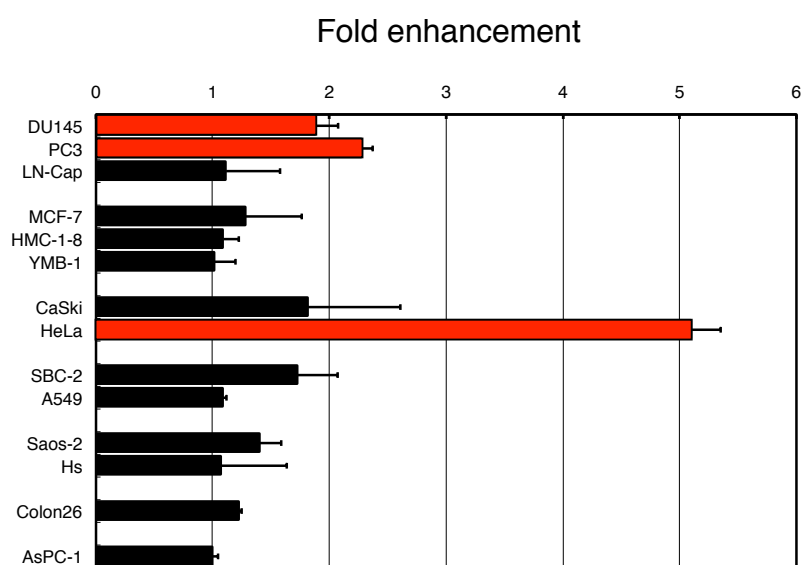


Figure 3 Inductions of clone 11 promoter activities by X-ray in various cancer cell lines.

All of the values of the activities are expressed relative to the same samples without X-ray irradiation. The red bars indicate significant increase in luciferase expression in response to X-ray irradiation ($p < 0.05$). The error bars represent standard deviations ($n = 3$). The presented figure was depicted based on the representative findings of 2 independent experiments.

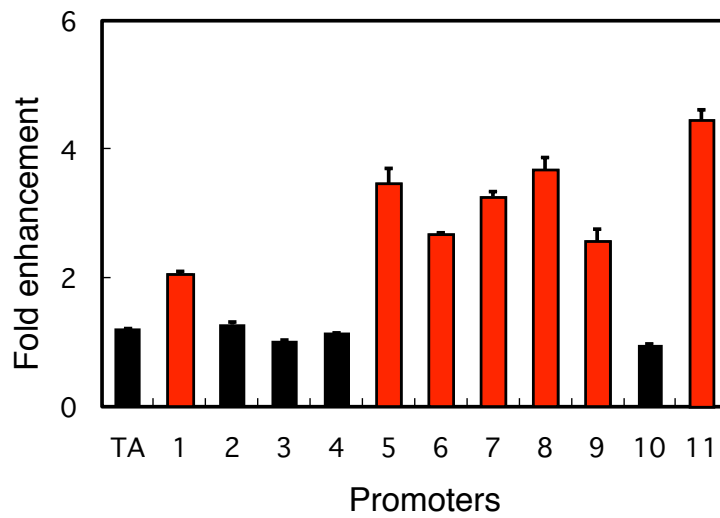


Figure 4 Promoter reactivity to X-ray irradiation in HeLa cells.

HeLa cells were transfected with a plasmid containing one of the constructed promoter clones (clone 1 to 11). Luciferase activity was assessed 6 h after the transfected cells were irradiated with 10 Gy X-ray. Fold activation was calculated by comparing luciferase activity of transfected cells with X-ray irradiation to the identically treated cells except for X-ray irradiation. The red bars indicate significant increase in luciferase expression in response to X-ray irradiation ($p < 0.05$). The error bars represent the standard deviations ($n = 3$). TA: Promoter consisting of only a TATA box sequence.

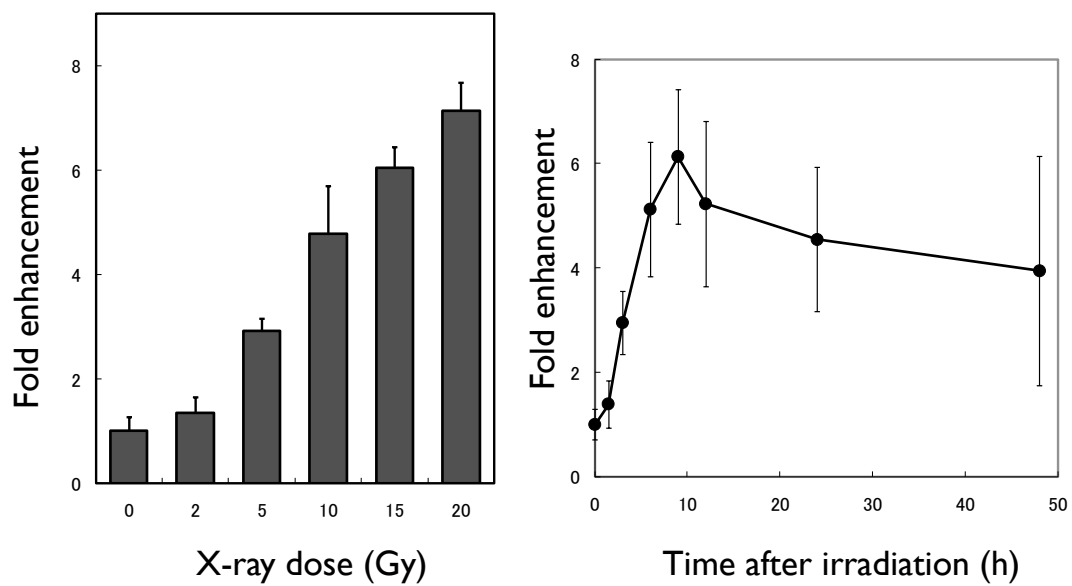


Figure 5 Reactivity of clone 11 promoter to X-ray in HeLa cells.

A. Induction of luciferase activities by X-ray irradiation at various doses. The bars represent the standard deviations ($n = 3$ to 5). The presented figure was depicted based on a typical representative of 2 independent experiments. B. Kinetics of luciferase activities after X-ray irradiation. The bars represent the standard deviations ($n = 3$ to 6). The presented figure was depicted based on the representative findings of 2 independent experiments.

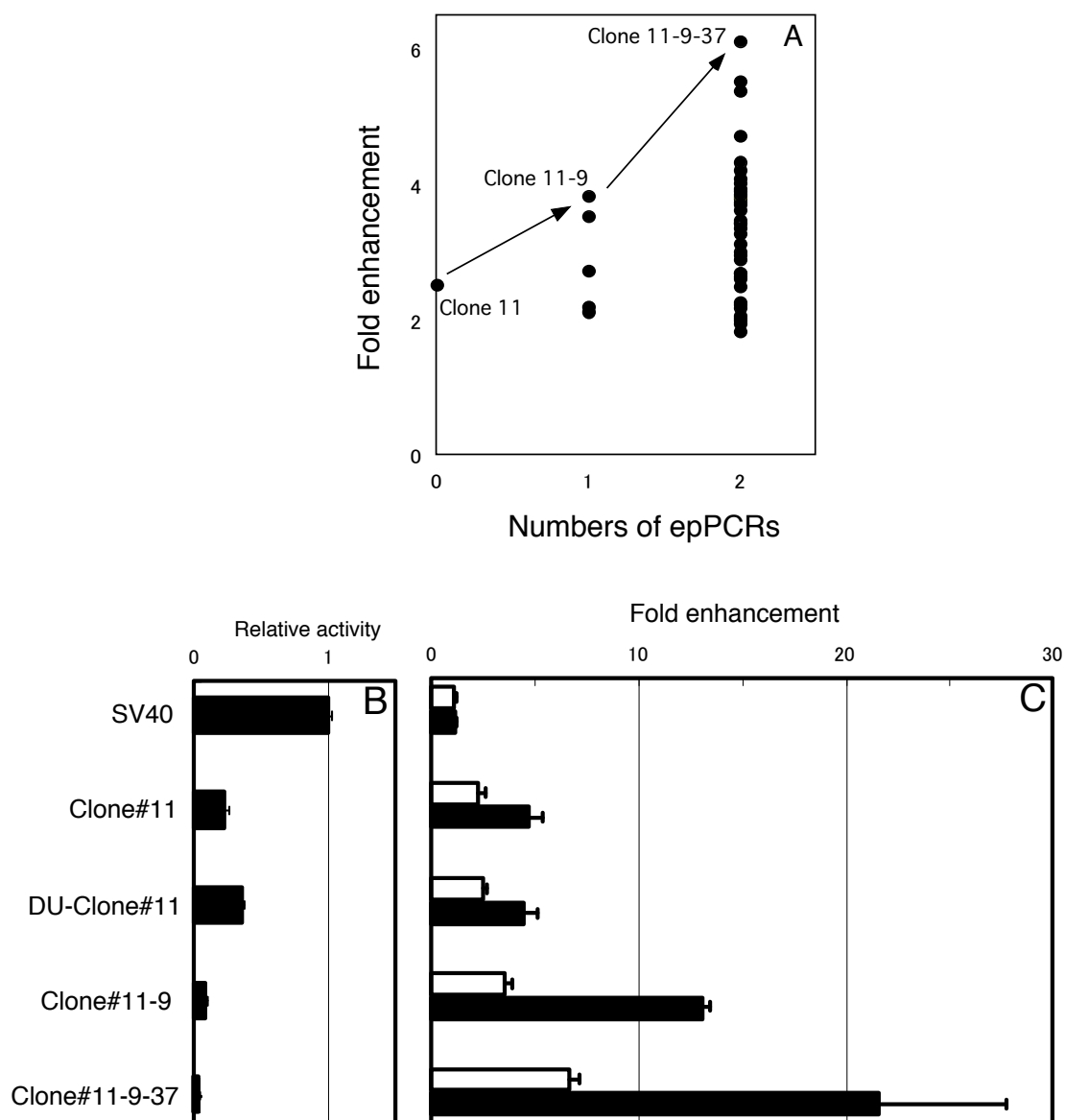


Figure 6 Improvement of the clone 11 promoter reactivity to X-ray irradiation with random mutations introduced by error prone PCR (epPCR).

A. The reactivity distribution of clones generated from clone 11 promoter during improvement by two-step epPCR. B. The promoter activity transition of improved promoters without X-ray irradiation. The bars represent standard deviations ($n = 3$). The presented figure was depicted based on the representative findings of 3 independent experiments. C. Transition of improved promoter reactivity to X-ray irradiation. Open box: Induction of promoter activities 6 h after 5 Gy irradiation. Solid box: The induction of promoter activities 6 h after 10 Gy irradiation. The bars represent standard deviations ($n = 3$). The presented figure was depicted based on the representative findings of 3 independent experiments.

Clone#11	1	GAGTCGGGAACTCCAGATCCCAATGGATCCTGAGACAGATCCTGAGACA	50
		←2←5←4←4	
Clone#11-9		GAGTCGGGAACTCCAGATCCCAATGGATCCTGAGACAGATCCTGAGACA	
Clone#11-9-37		GAGTCGGGAACTCCAGATCCCAATGGATCCTGAGACAGATCCTGAGACA	
Clone#11	51	GATCGGGGATTCCGATCCCAATGGATCGGGGACTTTCCGGGAACTCCA*	100
		←1←6←3←2	
Clone#11-9		GATCGGGGATTCCGATCCCAATGGATCGGGGACTTTCCGGGAACTCCA	
Clone#11-9-37		GATCGGGGATTCCGATCCCAATGGATCGGGGACTTTCCGGGAACTCCA	
Clone#11	101	GATCGGAAAGTCCCGATCGGGAAGTCCAGATCGGAAAGTCCCGATCC	150
		←3←2←3	
Clone#11-9		GATCGGAAAGTCCCGATCGGGAAGTCCAGATCGGAAAGTCCCGATCC	
Clone#11-9-37		GATCGGAAAGTCCCGATCGGGAAGTCCAGATCGGAAAGTCCCGATCC	
Clone#11	151	TTATATGGGATCTGGAGTCCCGATCTGTCTCAGGATCTGGAGTCCCGA	200
		←5←2←4←2	
Clone#11-9		TTATATGGGATCTGGAGTCCCGATCTGTCTCAGGATCTGGAGTCCCGA	
Clone#11-9-37		TTATATGGGATCTGGAGTCCCGATCTGTCTCAGGATCTGGAGTCCCGA	
Clone#11	201	TCGGAAAGTCCCGACTCCGGTACCTCCGCCTGGCCACGTGACCCGCC	250
		←3	
Clone#11-9		TCGGAAAGTCCCGACTCCGGTACCTCCGCCTGGCCACGTGACCCGCC	
Clone#11-9-37		TCGGAAAGTCCCGACTCCGGTACCTCCGCCTGGCCACGTGACCCGCC	
Clone#11	251	GAGCATAAATGTGACCGGCCGCGGCTCCGGCAGTCAACGCCTGCCTCCTC	300
Clone#11-9		GAGCATAAATGTGACCGGCCGCGGCTCCGGCAGTCAACGCCTGCCTCCTC	
Clone#11-9-37		GAGCATAAATGTGACCGGCCGCGGCTCCGGCAGTCAACGCCTGCCTCCTC	
Clone#11	301	TCGAGCGTCCTCAGCGCAGCCGCCCGCCGCGGAGCCAGCACGAACGAGCC	350
Clone#11-9		TCGAGCGTCCTCAGCGCAGCCGCCCGCCGCGGAGCCAGCACGAACGAGCC	
Clone#11-9-37		TCGAGCGTCCTCAGCGCAGCCGCCCGCCGCGGAGCCAGCACGAACGAGCC	
Clone#11	351	CAGCACCGGCCGGA	
Clone#11-9		CAGCACCGGCCGGA	
Clone#11-9-37		CAGCACCGGCCGGA	

Figure 7 Nucleotide sequences of clone 11 promoter and improved mutants.

Incorporated cis-acting elements are indicated with underlines with numbers (corresponding to numbered synthetic DNA oligomers described under Materials and Methods) and directions are expressed as arrowheads. The potential TATA-box sequence is framed squared with hatched lines. NF- κ B binding motifs with the same mutation introduced in clone 11-9-37 were framed squared. A mutation possibly caused by deletion due to homologous recombination introduced during the cloning of the fragment was marked with an asterisk. Mutations introduced with epPCR highlighted with black background.

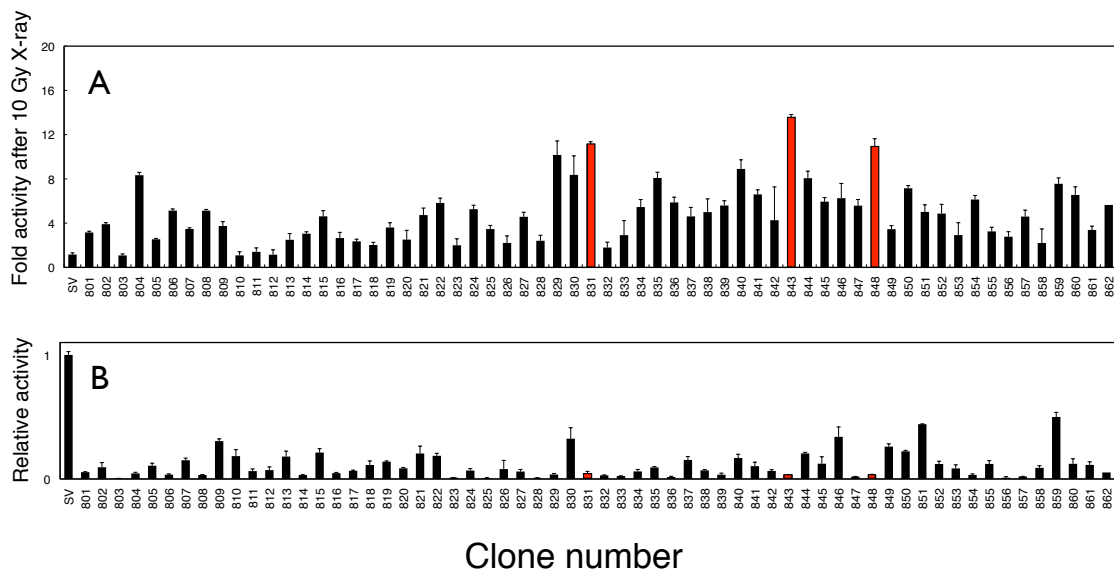


Figure 8 Screening of a promoter library for reactivity to X-ray irradiation.

A. HeLa cells transfected with 62 constructed promoters were exposed 10 Gy X-ray and subjected to dual luciferase assay 6 h after that. Fold activations were calculated by dividing values of luciferase activities of irradiated transfected cells with those of the same transfected cells without X-ray irradiation. The red bars indicate three best promoters in their reactivity to X-ray irradiation. B. Relative background activities (activities without X-ray irradiation) of all the 62 promoters to that of the SV40 promoter determined by dual luciferase assay. Luciferase activity driven by the SV40 promoter was set to 1. SV: control with pGL3-SV-luc. Error bars represent the standard deviations ($n = 3$).

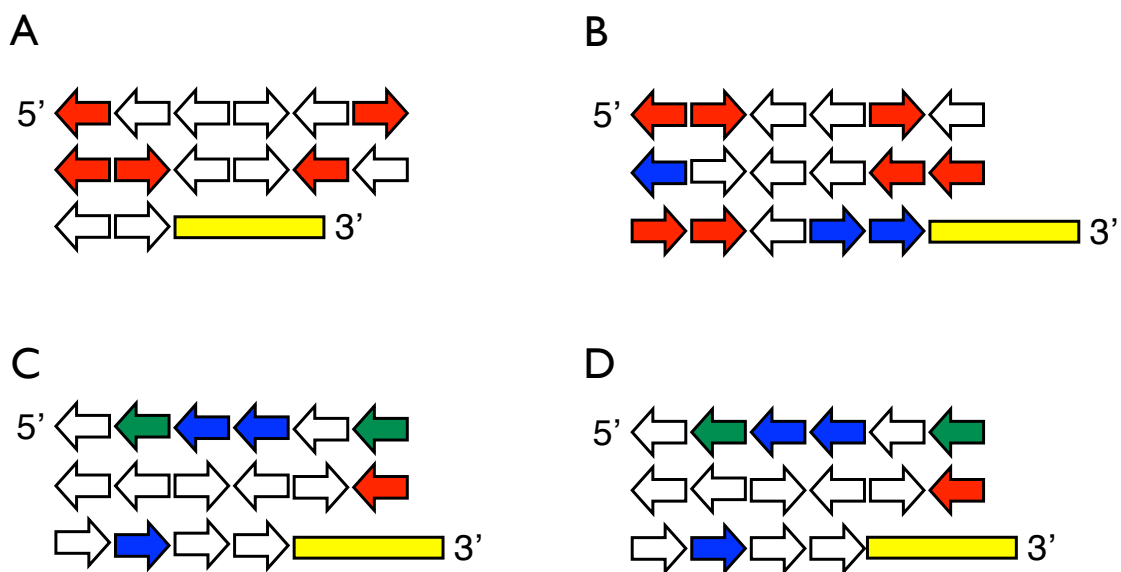


Figure 9 Schematic representations of structural features of constructed promoters responsive to **X-ray**. (a) clone 831, (b) clone 843, (c) clone 848 and (d) clone 11-9-37. Arrows represent transcription factor binding sequences. Colors and directions show their kinds and directions. Red arrows: CBF-A, white arrows: NF- κ B, blue arrows: AP-1 and green arrows: NF-Y. The yellow boxes at the most downstream represent a DNA fragment containing TATA box sequence.

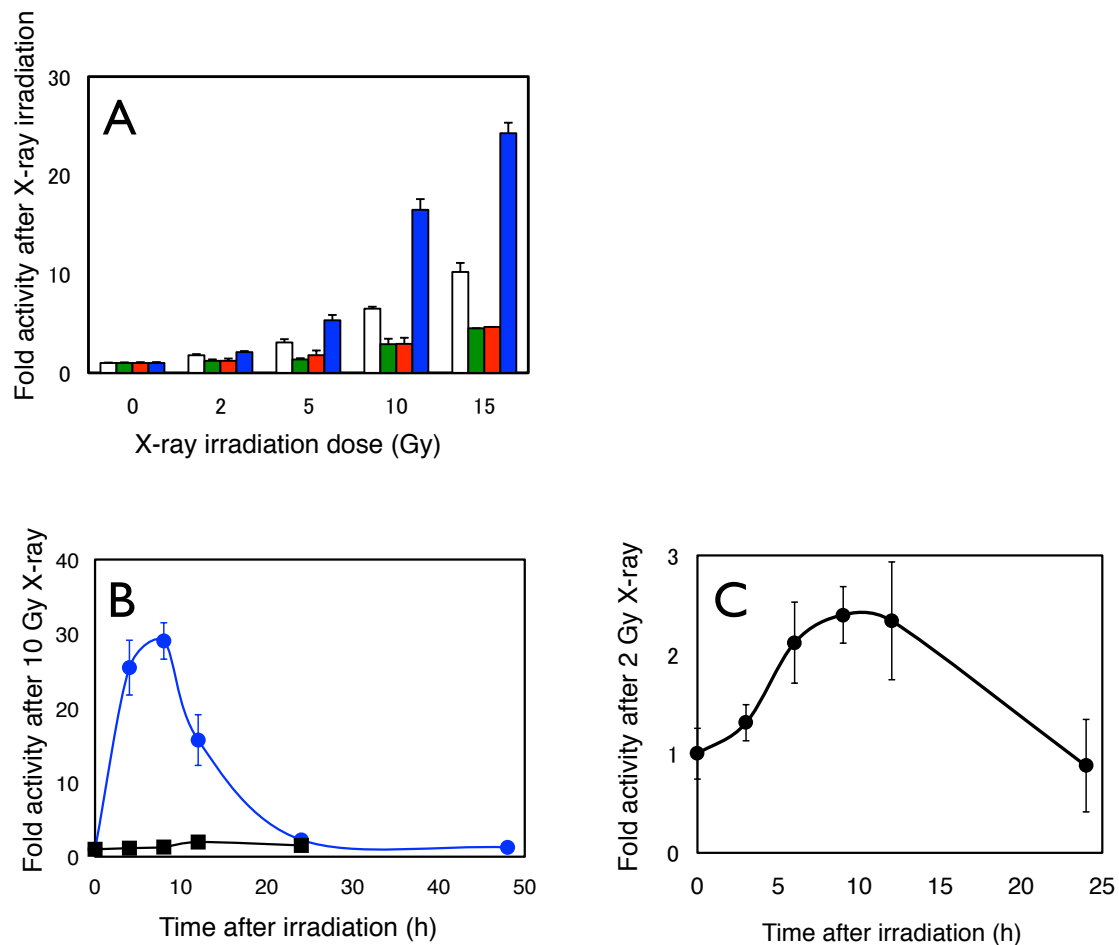


Figure 10 Responses of constructed promoters to X-ray in stably transfected HeLa cells.

A. Highly responsive promoters of clone 831, 843, 848 and 11-9-37 were integrated into recombinant retrovirus vectors. HeLa cells infected with a recombinant were exposed to various doses of X-ray and subjected to dual luciferase assay 6 h after that. Fold activations were calculated by dividing values of luciferase activities of irradiated infected cells with those of the same infected cells without X-ray irradiation. White bars: clone 831, green bars: clone 843, red bars: clone 848 and blue bars: clone 11-9-37. Error bars represent the standard deviations ($n = 3$). B. Kinetic responses of luciferase activities of HeLa cells infected with a recombinant to X-ray irradiation at 10 Gy. Blue line with solid circular markers: HeLa/Ret-37-luc, black line with solid square markers: HeLa/Ret-SV-luc. Error bars represent the standard deviations ($n = 3$). C. A kinetic response of luciferase activity of HeLa/Ret-37-luc to X-ray irradiation at 2 Gy. Error bars represent the standard deviations ($n = 3$).

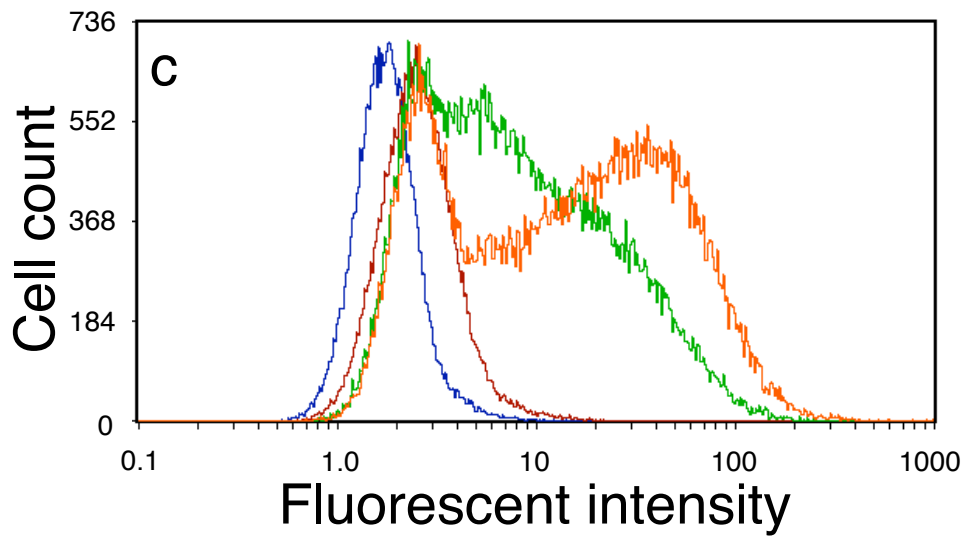
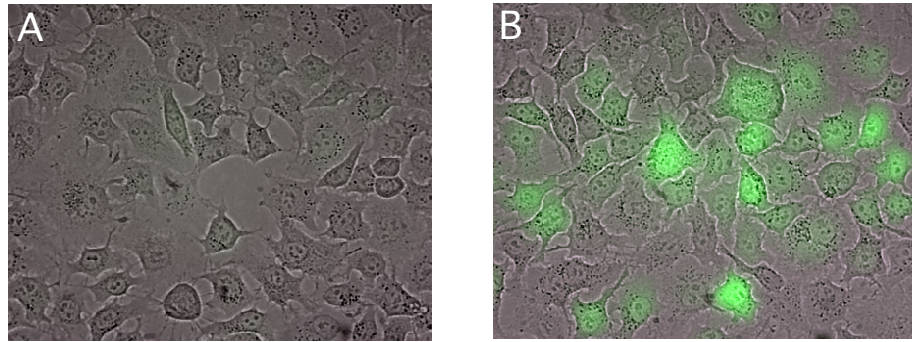


Figure 11 Enhancement of EGFP fluorescence with clone 11-9-37 promoter by X-ray irradiation. HeLa/Ret-37-EGFP cells were observed on a fluorescent microscope without (a) or with (b) X-ray irradiation at 10 Gy. The cells were observed 8 h after X-ray. (c) Wild type HeLa cells without X-ray (blue line) and HeLa/Ret-37-EGFP were analyzed with flowcytometry 8 h after X-ray irradiation at 0 Gy (purple line), 5 Gy (green line) or 10 Gy (orange line).

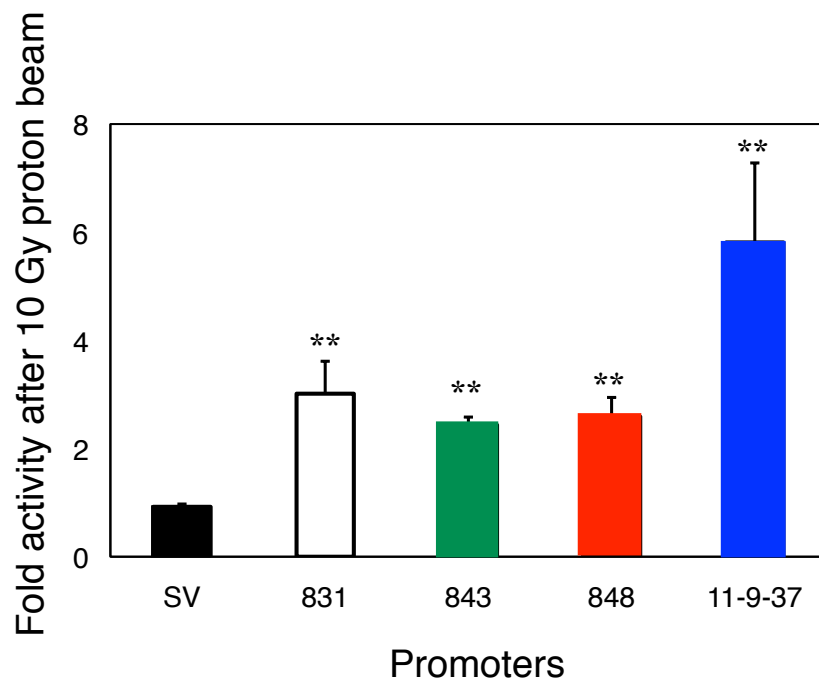


Figure 12 Responses of constructed promoters to proton beam in stably transfected HeLa cells.

Luciferase gene expression of HeLa cells infected with a recombinant retrovirus was evaluated 6 h after proton beam irradiation at 10 Gy. SV: HeLa/Ret-SV-luc (black bar), 831: HeLa/Ret-31-luc (white bar), 843: HeLa/Ret-43-luc (green bar), 848: HeLa/Ret-48-luc (red bar), 11-9-37: HeLa/Ret-37-luc (blue bar). Error bars represent the standard deviations (n = 3). Statistically significant differences were indicated with asterisks (**: p<0.01).

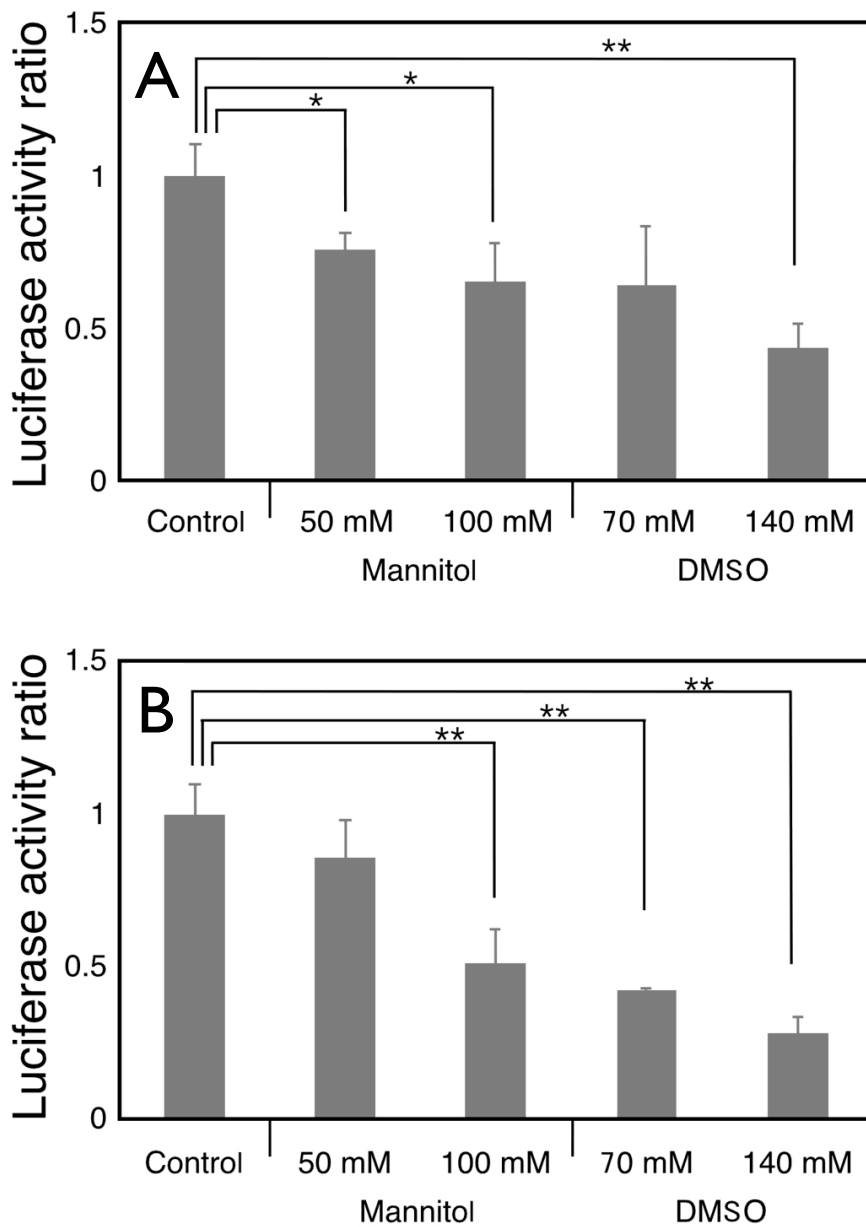


Figure 13 Suppression of enhancement of luciferase expression with anti-oxidants.

Enhancement of luciferase expression in HeLa/Ret-37-luc by X-ray (A) or proton beam (B) irradiation was suppressed by addition of an antioxidant, D-mannitol or DMSO. Error bars represent the standard deviations (n = 3). Statistically significant differences were indicated with asterisks (*: p<0.05, **: p<0.01).

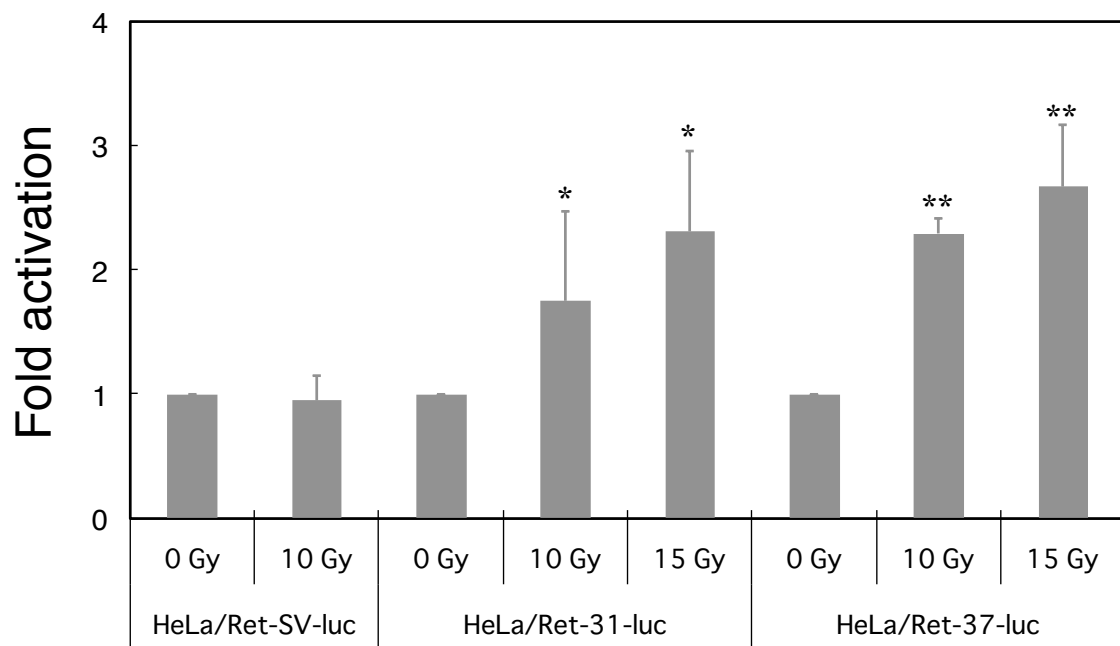


Figure 14 Reactivity of artificially constructed promoter to X-ray in infected HeLa cells in vivo. In vivo luciferase expression was augmented in response to X-ray irradiation at 10 Gy. After tumor tissues of infected HeLa cells of similar sizes were formed in the both flanks of five nude mice, one of the tumors was irradiated with X-ray at 10 Gy or 15 Gy. Immediately before and 9 h after X-ray irradiation, photon generations emitted out of each tumor tissue were recorded for the bioluminescent image data and they were calculated for changes in luciferase expressions. Error bars represent the standard deviations (n = 3 ~ 8). Statistically significant differences were indicated with asterisks (*: p<0.05, **: p<0.01).

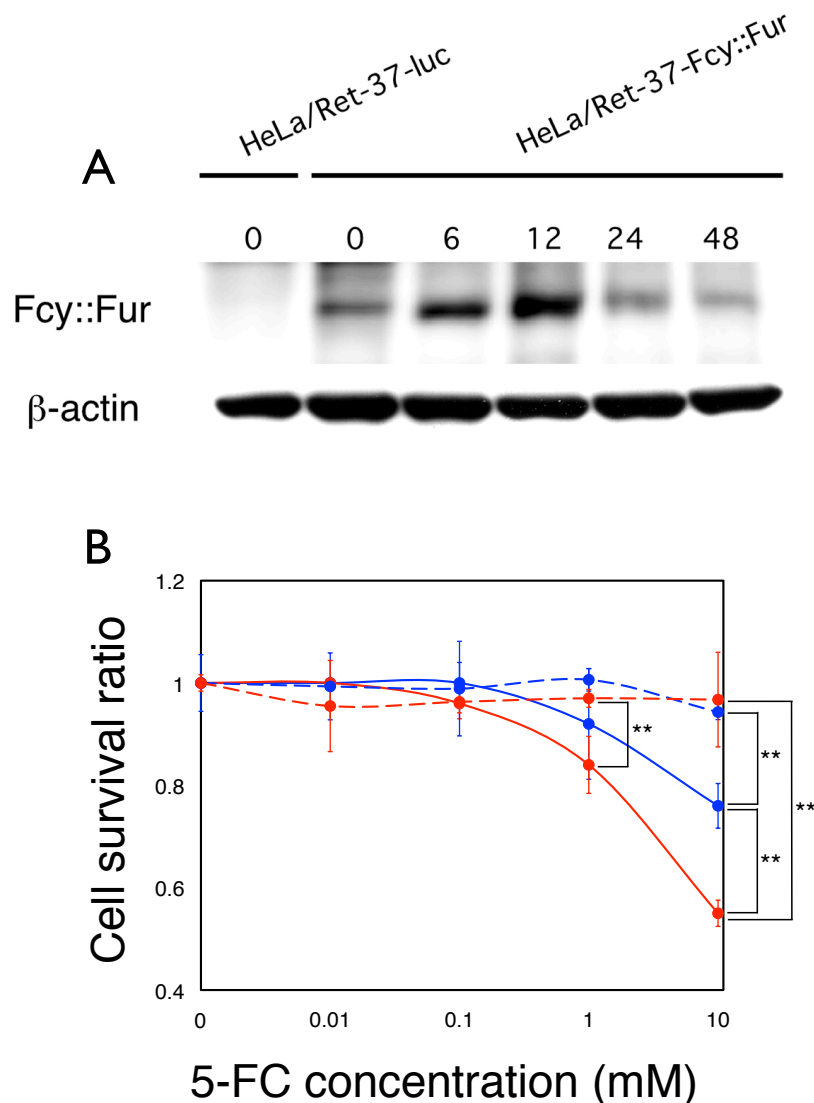


Figure15 Increase of *fcy::fur* gene expression and reduction of cell survival by 5-FC after X-ray irradiation.

A. Expression change of the Fcy::Fur proteins in HeLa/Ret-37-Fcy::Fur cells at 0, 6, 12, 24 and 48 h after X-irradiation was detected. HeLa/Ret-37-luc cells without radiation were loaded in the leftmost lane as a negative control. b-actin served as a loading reference. B. Cytotoxicity of 5-FC to HeLa/Ret-37-Fcy::Fur cells was enhanced after X-irradiation at 10 Gy. The mean cell survivals of HeLa/Ret-37-Fcy::Fur were evaluated by WST-1 assay. The data are expressed as cell survival ratio that is calculated by dividing surviving cell fractions after treatment with 5-FC by that of the identically treated cells without 5-FC. The solid lines are for HeLa/Ret-37-Fcy::Fur and the dotted lines are for HeLa/Ret-37-luc. The red lines are for X-ray irradiated cells and the blue lines are for non-irradiated cells. Error bars represent the standard deviations (n = 4). Statistically significant differences were indicated with asterisks (**: p<0.01).

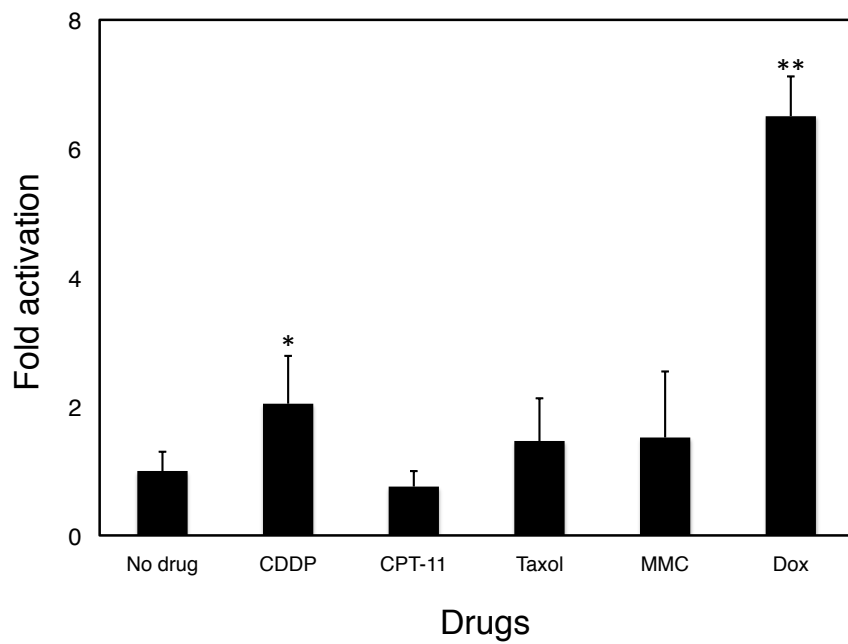


Figure 16 Responses of clone 11-9-37 promoter to anti-cancer drugs in stably transfected HeLa cells.

Luciferase gene expression of HeLa/Ret-37-luc cells was evaluated 6 h after exposure to anti-cancer drugs. CDDP: cis-platin, CPT-11: camptothecin 11, Taxol: paclitaxel, MMC: mitomycin C, Dox: doxorubicin. Error bars represent the standard deviations (n = 3). Statistically significant differences were indicated with asterisks (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).