

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-217899

(P2006-217899A)

(43) 公開日 平成18年8月24日(2006.8.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	4B024
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2005-36700 (P2005-36700)	(71) 出願人	301032942 独立行政法人放射線医学総合研究所 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(22) 出願日	平成17年2月14日 (2005.2.14)	(74) 代理人	100100181 弁理士 阿部 正博
		(72) 発明者	小池 学 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
		(72) 発明者	小池 亜紀 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
		(72) 発明者	潮見 友江 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

最終頁に続く

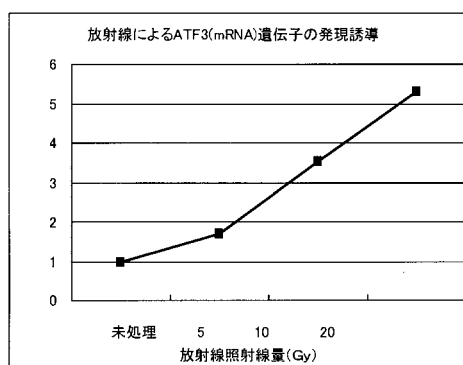
(54) 【発明の名称】放射線皮膚障害誘導遺伝子の発現に基づく測定方法

(57) 【要約】

【課題】放射線被爆後のヒト表皮角化細胞において発現が変動する遺伝子を同定し、それに基づき、被爆量又は皮膚障害の予後等の推定又は予測に役立つ各種の方法、及び放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質のスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】転写促進因子3(ATF3)遺伝子の発現の変動に基づき、該放射線の吸収線量を推定したり、該細胞のアポトーシスへの誘導を予測する方法、及び、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を測定することにより、該放射線の吸収線量を推定する方法。

【請求項 2】

放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を測定することにより、該細胞のアポトーシスへの誘導を予測する方法。

【請求項 3】

(1) 被検物質との共存下で表皮角化細胞に放射線を照射する工程、及び (2) 該表皮角化細胞における転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を測定する工程を含む、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法。

10

【請求項 4】

(1) 放射線を照射された表皮角化細胞に被検物質を接触させる工程、及び (2) 該表皮角化細胞における転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を測定する工程を含む、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 5】

表皮角化細胞が被爆した生体組織由来である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 6】

表皮角化細胞が樹立細胞株である、請求項 3 又は 4 記載の方法。

【請求項 7】

表皮角化細胞が哺乳動物由来である、請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を該遺伝子の m R N A の発現量に基づき測定することを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の m R N A の発現量を逆転写 P C R (R T - P C R) で測定することを特徴とする、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動を転写促進因子 3 (A T F 3) 蛋白質の発現量に基づき測定することを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

転写促進因子 3 (A T F 3) 蛋白質の発現量をウェスタンブロット法で測定することを特徴とする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

転写促進因子 3 (A T F 3) 蛋白質の発現量を固相酵素免疫測定法 (E L I S A) で測定することを特徴とする、請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に高線量の放射線被爆後の表皮角化細胞における放射線皮膚障害誘導遺伝子、特に、転写促進因子 3 (A T F 3) 遺伝子の発現の変動に基づき、該放射線の吸収線量を推定したり、該細胞のアポトーシスへの誘導を予測する方法、及び、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法等に関する。

40

【背景技術】

【0002】

電離放射線 (以下、単に「放射線」ともいう) は、癌化、アポトーシス、老化、及び免疫抑制等を生起ないし促進させることが知られている。皮膚は外部環境から刺激やストレスから体内を防御するために重要な組織であって、主に表皮角化細胞 (ケラチノサイト) からなる表皮層と線維芽細胞からなる真皮層等から構成されている。放射線による全身

50

被曝などによって、皮膚組織においては、皮膚癌、及び、アポトーシスによる幹細胞の枯渇が一因と思われる放射線障害が引き起こされ促進される。

【0003】

これまでに、マウス皮膚及びヒト培養ケラチノサイトをヒト皮膚のモデルとして用いて、放射線照射による影響が研究されてきた。その結果、5グレイ(Gy)の放射線を吸収したヒト培養ケラチノサイトの生存率は非照射細胞の5%未満であることが示されている(非特許文献1)。

【0004】

これまでに、放射線照射によるストレスに対する細胞の応答は複雑で多様であることが様々な文献で指摘されており、転写応答は組織又は器官によって著しく異なる可能性が報告されている(非特許文献2)。例えば、ML-1ヒト骨髄細胞及びジャーカットT細胞に対するガンマ線照射による遺伝子発現パターンがDNAマイクロアレイを用いて調べられている(非特許文献2、非特許文献3)。これらのアッセイにおいて、発現パターンが影響を受けた遺伝子は、細胞周期調節、アポトーシス、及び発癌等の様々な細胞プロセスに参与していることが判明した。

【0005】

【非特許文献1】Parkinson, E.K., Hume, W.J., and Potten, C.S. (1986) The radiosensitivity of cultured human and mouse keratinocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 50: 717-726.

【非特許文献2】Amundson, S.A., Bittner, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., and Fornace Jr., A.J. (1999) Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18: 3666-3672.

【非特許文献3】Park, W.Y., Hwang, C.I., Im, C.N., Kang, M.J., Woo, J.H., Kim, J.H., Kim, Y.S., Kim, H., Kim, J.H., Kim, K.A., Yu, H.J., Lee, S.J., Lee, Y.S., and Seo, J.S. (2002) Identification of radiation-specific responses from gene expression profile. *Oncogene* 21: 8521-8528

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

皮膚に対する高線量放射線の照射の影響を分子レベルで研究することは、放射線皮膚障害を理解し、且つ、それに対する治療方法を確立する上で大変重要である。即ち、皮膚は全身を覆っており且つ身体の外層にあることから、局所被曝の際には被曝量の推定に使用しやすい組織である。そこで、放射線被曝後の皮膚障害の予後を推定できれば、適切な初期治療が可能となる。又、高線量被曝による皮膚損傷による体内の他の部位への影響を最小限に防ぐには、一時的に放射線による皮膚障害を阻害することが重要である。

【0007】

しかしながら、例えば、ケラチノサイトヒトのようなヒト表皮角化細胞において、放射線照射に応答して発現調節され、かつ、放射線皮膚障害を誘導する遺伝子は未だ同定されておらず、放射線照射に因る障害のメカニズムも解明されていない。

【0008】

従って、本発明の目的は上記の課題を解決することであり、具体的には、高線量放射線被曝後のヒト表皮角化細胞において発現が変動する遺伝子を同定し、それに基づき、被曝量又は皮膚障害の予後等の推定に役立つ各種の方法、及び放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニング方法等を提供することである。

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究の結果、高線量放射線被曝後のヒト表皮角化細胞で発現変動する遺伝子をDNAチップ法によりスクリーニングした結果、ATF3(LRG-21)遺伝子を同定された。次いで、ヒト表皮角化細胞において、該遺伝子の発現が線量依存的に誘導されることを明らかになった。次いで、マウスの全身にマウスの皮膚

10

20

30

40

50

に細胞死を誘導する線量の放射線照射を行い免疫組織化学法で解析を行った結果、該遺伝子がマウスの皮膚角化細胞で発現誘導されていることが明らかになった。更に、該遺伝子をヒト表皮角化細胞に導入し、強制発現後の細胞死の誘導の有無を解析した結果、アポトーシスによる細胞死が誘導されることが明らかになった。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、上記知見に基づきなされたものである。

即ち、本発明は第一の態様として、放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子3 (ATF3) 遺伝子の発現の変動を測定することにより、該放射線の吸収線量を推定する方法に係る。

10

【0011】

本発明は第二の態様として、放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子3 (ATF3) 遺伝子の発現の変動を測定することにより、該細胞のアポトーシスへの誘導を予測する方法に係る。

本発明は第三の態様として、(1)被検物質との共存下で表皮角化細胞に放射線を照射する工程、及び(2)該表皮角化細胞における転写促進因子3 (ATF3) 遺伝子の発現の変動を測定する工程を含む、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法に係る。

本発明は四の態様として、(1)放射線を照射された表皮角化細胞に被検物質を接触させる工程、及び(2)該表皮角化細胞における転写促進因子3 (ATF3) 遺伝子の発現の変動を測定する工程を含む、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングする方法に係る。

20

【発明の効果】

【0012】

本発明によって、高線量被爆後の比較的短い時間内に、線量依存的な転写促進因子3 (ATF3) 遺伝子の発現の変動を半定量的又は定量的に測定することにより、放射線被爆量、及び、被爆した組織の細胞のアポトーシスへの誘導を予測することが可能となる。更に、放射線誘導性細胞死を阻害することが出来る物質を迅速且つ簡便にスクリーニングすることが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0013】

放射線には、物質に電離作用を及ぼす電離放射線と非電離放射線があり、更に電離放射線は、エックス線及びガンマ線等の電磁放射線と線及び線などの粒子線とに大別される。このうち、エックス線は1 pm ~ 100 nm程度の波長を有する電磁波であり、波長範囲はガンマ線と一部重なるが、加速した電子を原子にぶつけることにより人工的に得られる放射線である。エックス線の有する透過、吸収、散乱、電離、及び励起等多様な相互作用を利用して、医療分野におけるエックス線撮影及びエックス線CTに代表される各種診断、各種材料の非破壊検査、結晶構造解析等に利用されている。又、医療器具・装置、放射光利用施設、又は原子力発電所等の産業施設等における不慮の事故によって発生する恐れがある。

40

【0014】

本発明方法において、放射線の種類に特に制限はないが、放射線被爆後の細胞における遺伝子発現の変動を測定する目的からすると、エックス線のような電磁放射線、特に、上記のような各種医療器具・装置、及び産業施設における事故によって発生したエックス線を代表的な例として挙げる事ができる。

【0015】

尚、放射線の吸収線量とは、実際に人体等の被爆対象物質に吸収された放射線のエネルギーを示す物理量であり、電離放射線の照射による物質1 kg当り1ジュールの吸収エネルギーを単位にとり、これを1グレイ (Gy) と呼ぶ。尚、かかる放射線の吸収線量は当業者に公知の任意の方法、例えば、放射線の測定にはGM管 (ガイガーミュラー計数管)

50

を被爆対象物質の横に置くことにより測定することができる。因みに、GM管には円筒形の内部にヘリウム、アルゴン等の不活性ガスが詰められており、高電圧をかけておくと、放射線が入射するとGM管内部のある原子が励起され、壁材と反応して内部に電子を放出させ、電子は内部のガスに電離を引き起こす。電離によって生じたイオンがきっかけとなって管内に放電が起き、放電によるパルスを計測することにより測定が行われる。

【0016】

本発明方法において、表皮角化細胞に対する放射線の照射は、例えば、本明細書中の実施例に引用されているような、当業者に公知の適当な方法で実施することが出来る。例えば、エックス線を用いる場合には、放射線発生源として、PANTAC-320S型X線発生装置（島津）等の当業者に公知の任意の市販の装置を用いて、適当な培地で培養されている表皮角化細胞に適当な量の放射線を照射することが出来る。尚、使用する細胞は、生体内の増殖中の細胞に近い条件とするために指数増殖期にあることが好ましい。

10

【0017】

本発明方法において、数グレイ～数十グレイという高線量の放射線被爆により、数時間という比較的短時間の間に、表皮角化細胞における転写促進因子3（ATF3）遺伝子の発現が増大することが確認された。従って、本発明において該遺伝子の発現の変動とは、通常、発現の増大を意味するが、それに限定されず、より広義に、減少等も含めて発現量の任意の変化を意味する。

【0018】

転写促進因子3（ATF3）はCREB/ATFファミリーに属する蛋白質である。又、ATF3 mRNAが誘導されるときには遺伝子損傷ストレスを引き起こすことが示しているが（Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E., and Sivaprasad, U. (1999) ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* 7: 321-335.）、標的遺伝子は未だ同定されていない。更に、ATF3には生理的に保護効果と有害な効果の両方の効果があると報告されているけれども、これについてはまだ議論がある。他方、正常ヒトケラチノサイトや皮膚でのATF3の機能はまだ明らかになっていない。

20

【0019】

本発明の各種方法で使用される表皮角化細胞の種類及び由来等に特に制限はない。本発明の放射線の吸収線量又は細胞のアポトーシスへの誘導を予測する方法において使用する表皮角化細胞は、被爆した皮膚等の生体組織から適切な方法により採取した細胞であることが好ましい。一方、本発明のスクリーニング方法で使用する表皮角化細胞としては、経済的及び効率的観点からは市販されている入手容易な適当な樹立細胞株を使用することが好ましい。

30

【0020】

これらの表皮角化細胞は、ヒト及びマウス等の齧歯類を含む哺乳動物由来であることが好ましい。例えば、表皮角化細胞の樹立細胞株としては、例えば、ヒトケラチノサイト等の当業者に公知の任意の市販品を使用することが出来る。

【0021】

本発明方法において、転写促進因子3（ATF3）遺伝子の発現の変動は、例えば、該遺伝子のmRNA又はその蛋白質の発現量に基づき、当業者に公知の任意の方法で半定量的又は定量的に測定することが出来る。又、発現変動の影響が十分に現れ、信頼度の高い結果を得るには、mRNAの発現量を測定する場合には放射線被爆後の約2～4時間内に、又、蛋白質の発現量を測定する場合には放射線被爆後の4～8時間内に測定を行うことが好ましい。

40

【0022】

例えば、該遺伝子の塩基配列は公知（Chen, B.P., Liang, G., Whelan, J. and Hai, T. ATF3 and ATF3 delta Zip. *Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms.* *J. Biol. Chem.* 269 (22), 15819-15826 (1994)であるので、それに基づき設計したプライマーを用いる逆転写PCR（RT-PCR）、リアルタイムRT-PCR、又は競合的PCR等の定量的方法で該遺伝子のmRNAの発現量を定量的に

50

測定することが出来る。或いは、電気泳動後に染色等の適当な手段で可視化したcDNAを検出すること、又はノーザンブロット法によっても半定量的に測定することが可能である。一方、該遺伝子の蛋白質の発現は、例えば、その蛋白質に対する抗体を用いるウェスタンブロット法又は固相酵素免疫測定法(ELISA)で定量的に測定することが出来る。

【0023】

以上の各測定に使用する材料及び器具・装置などは当業者に容易に入手可能であり、各測定操作の手順・条件等は、使用する器具・装置に添付のマニュアルに従うか、又は、使用する細胞の種類等のその他条件に応じて適宜設定することが出来る。

【0024】

本発明のスクリーニング方法は、放射線被爆した表皮角化細胞において転写促進因子3(ATF3)遺伝子の発現の増大が関与してアポトーシスが誘導されることを利用し、放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する物質をスクリーニングするものである。従って、スクリーニングの対象となる被検物質の表皮角化細胞に対する影響は、それらが何等かの態様で互いに作用することが出来る状態を設けることによって観察することが可能であり、その具体的な方法に特に制限はない。例えば、被検物質と表皮角化細胞を共培養すること等によって共存せしめ、そこに放射線を照射する工程、又は、表皮角化細胞に放射線を照射した後に、該被爆細胞の培養培地に被検物質を添加すること等によって、該被爆細胞に被検物質を接触させる工程などがある。従って、被検物質が放射線誘導性の細胞アポトーシスを阻害する活性を有する場合には、放射線被爆した表皮角化細胞において転写促進因子3(ATF3)遺伝子の発現の増大が抑制されることが予想される。

10

20

【0025】

以下、実施例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の技術的範囲を何等限定するものではない。当業者であれば、本明細書の記載に基づき、本発明の技術的範囲を逸脱せずに、多くの変形及び修飾を実施することが可能である。

【実施例1】

【0026】

細胞とその培養法

正常ヒトケラチノサイト(以下、単に「ケラチノサイト」ともいう)は、Sanko Junyaku Coporation (Osaka, Japan) あるいはKurabo Industries Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。細胞は、牛下垂体抽出物(BPE)不含のサプリメントと抗生物質を添加したEpiLife Extended Life Span 血清不含培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いて、37、5% CO₂の条件で培養した。

30

【0027】

X線照射

指数増殖期にあるケラチノサイト、及び、マウス(C57 BL/6J、雄、独立行政法人放射線医学総合研究所で系統維持)は室温で3時間X線照射した(Koike, M., Kuroiwa, A., Koike, A., Shiomi, T., and Matsuda, Y. (2001) Expression and chromosome location of hamster Ku70 and Ku80. Cytogenet. Cell. Genet. 93: 52-56.;及びKoike, M., and Koike, A. (2004) Establishment and characterization of stable cell Lines expressing human Ku80 tagged with enhanced green fluorescent protein. J. Radiat. Res. 45: 119-125)。尚、照射したX線の吸収線量は、上記文献で致死量として示された5 Gyとなるように設定した。

40

尚、X線照射には、PANTAC-320S型X線発生装置(島津)を用いた。

【0028】

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、既知のヒト遺伝子が約1000遺伝子(cDNA)がスポットされているIntelliGene Human CHIP 1K Set 1 version 1.0 (Takara Biomedicals, Shiga, Japan)を使用して行った。総RNAは、細胞からトリゾール(Life Technologies, Rockville, MD)で抽出し、それをoligo-dT column (Oligotex-dT30, Takara)にかけてmRNAを精製した。

50

蛍光プローブは、約1 μ g mRNAを鋳型として、50 U AMVの逆転写酵素を用いて、Cy3-dUTP 又はCy5-dUTP を取り込ませて合成した。Cy3-dUTP と Cy5-dUTPでラベルしたプローブは、それぞれ、コントロール細胞とX線照射した細胞から得た。マイクロアレイのハイブリダイゼーションと洗浄は製造者の推奨する方法で行った。ハイブリダイズしたチップは、Affymetrix (Woburn, MA) 428 アレイスキャナーで可視化した。蛍光強度は、ImaGene software Ver.4 (BioDiscovery, Los Angeles, CA) で測定・解析した。各蛍光強度の補正は、コントロールシグナル以外の総蛍光シグナルのグローバルノーマライゼーションによって行った。

【0029】

その結果、コントロール細胞と比較して、X線照射した細胞において16種類の遺伝子の発現が増加し、59種類の遺伝子の発現が減少したことが判明した。これらの中には、放射線照射によって発現誘導されることが既に知られているHDM2及びIL-1遺伝子、並びに、放射線照射によって発現が抑制されることが既に知られているトポイソメラーゼI及びII遺伝子が含まれていた。

10

【0030】

コントロール細胞と比較して、X線照射した細胞において最も強く発現が誘導された遺伝子はATF3遺伝子(コントロール細胞に対して3.31倍の蛍光強度を示した)であった。

【実施例2】

【0031】

20

RNA抽出とRT-PCR

次に、上記のマイクロアレイの結果を確認するために、RT-PCR解析によって照射した細胞におけるATF3の誘導を確認すべく、更なる解析として、より高線量のX線(5~20 Gy)を用いて高線量域でのmRNAの誘導の比較を行った。ATF3の誘導プロファイルの比較に加えて、他のATFファミリーの遺伝子、すなわち、ATF1, ATF2,及びATF4についても解析を行った。ATFファミリーに属するこれら3つの遺伝子についてはヒトのケラチノサイトでのX線へ反応はまだ示されていないが、ストレスや細胞外からのシグナルにより誘導されることが示されている。

【0032】

総RNAは処理後3時間で回収して、製造者のプロトコールに従って、SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI) を用いて調製した。RT-PCRは、同様に、Qiagen One-Step RT-PCR キット(QIAGEN Inc, Chatworth, CA)で行った。RT-PCRにおけるプライマー配列として以下の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用した。生成物は、トリス-酢酸-EDTA 緩衝液を用いた2% アガロースゲルで分離し、エチレンブロマイドで染色・可視化した。

30

【0033】

ヒトATF1遺伝子(450bp) :

センス鎖 : 5'-CAACCTGGTTCAGCAGTTCA-3' (配列番号1)、
アンチセンス鎖 : 5'-CTGATTGCTGGGCACAAGTA-3' (配列番号2) ;

ヒトATF2遺伝子(1591 bp) :

センス鎖 : 5'-ATGAAATTC AAGTTACATGTG-3' (配列番号3)、
アンチセンス鎖 : 5'-GAAACTGGTCTTTCCTTGATT-3' (配列番号4) ;

40

ヒトATF3遺伝子(429bp) :

センス鎖 : 5'-CTTTGTCAAGGAAGAGCTGAG-3' (配列番号5)、
アンチセンス鎖 : 5'-TTAGCTCTGCAATGTTCTTC-3' (配列番号6) ;

ヒトATF4遺伝子(415bp) :

センス鎖 : 5'-AACCGACAAAGACACCTTCG-3' (配列番号7)、
アンチセンス鎖 : 5'-GTGTCATCCAACGTGGTCAG-3' (配列番号8) ;

ヒトp21遺伝子(306bp) :

センス鎖 : 5'-GCTGAGCCGCGACTGTGATG-3' (配列番号9)

50

アンチセンス鎖：5'-CCTGAGCGAGGCACAAGGGT-3' (配列番号 10) ;

ヒトGAPDH)遺伝子(982 bp) :

センス鎖：5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (配列番号 11) 、

アンチセンス鎖：5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (配列番号 12) 。

【0034】

その結果、ATF3 mRNAは、コントロールとして使用したp21と同様に、5 Gy照射したケラチノサイトで誘導された。p21は、5 Gyの照射に検討した遺伝子の中で最も誘導された。他方、以下の表1に示すように、ATF3 mRNAは、X線によって線量依存的に誘導されることが判明した。これに対して、他のATF family 遺伝子は、これらの線量では、ほとんど変化しなかった。以上の結果は図1、Aに示されている。かかるATF3 mRNA発現の線量依存性を示す折れ線グラフを図2に示す。この結果から、放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子3(ATF3)遺伝子の発現の変動を測定することにより、該放射線の吸収線量を推定することが可能であることが示された。

【実施例3】

【0035】

次に、ウェスタンブロット法によって、高線量のX線(20 Gy)を照射したケラチノサイトにおけるATF3蛋白の誘導を確認した。ケラチノサイトは、処理後4時間と8時間でサンプリングを行い、ATF3蛋白質の発現を調べた。その結果、X線を照射した細胞は、未照射の細胞に較べてATF3蛋白質を強く誘導していることが判明した(図1、B)。

【0036】

ウェスタンブロット法

尚、ウェスタンブロット法は、文献記載の方法で行った(Koike, M., Ikuta, T., Miyasaka, T., Shiomi, T. (1999) Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of Ku70 using its own nuclear localization signal. *Oncogene* 18: 7495-7505.; 及びKoike, M., Shiomi, T., and Koike, A. (2001) Dimerization and nuclear localization of Ku proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 11167-11173)。即ち、細胞からの全溶解物を加熱沸騰させて遠心にかけた。その上清を5-15% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。分離された生成物をImmunobilon-Pメンブラン(Milipore, Bedford, MA)に写した。1%ウシ血清アルブミンで非特異的部位をブロッキングした後、該メンブランをウサギ抗ATF3ポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)と反応させた。その後、ProtoBlot ウェスタンブロットAPシステム(Promega)を用いて蛋白質を可視化した。

【0037】

免疫蛍光染色法

培養硝子スライド(Falcon, Lincoln Park, NJ)上で培養した細胞をPBSで洗浄後、室温で固定した。固定した細胞は、最初に30分間、非特異的な結合を防ぐためにブロッキングした。それから、上記ウサギ抗ATF3ポリクローナル抗体、ウサギ抗PARP p85フラグメント抗体(Promega製)、ウサギ抗活性化型Caspase-3ポリクローナル抗体(Promega製)、及び、マウス抗M30 CytoDEATHモノクローナル抗体(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)と室温で30分間反応させた。PBSで洗浄後、抗体結合はAlexa fluor 568-conjugated 2次抗体(Molecular Probes, OR, USA)で検出した。DNAは0.025 µg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) 蛍光色素(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)で染色した。細胞内の局在は、オリンパスIX70 蛍光顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)で調べた。イメージは、IP Lab (Signal Analytics Corp., Vienna, VA) イメージングソフトウェアを使用してHamamatsu chilled 3-chip color charge-coupled-device camera (C5810-01)で取り込んだ。

【実施例4】

【0038】

このように高線量X線によって強く誘導されたATF3蛋白質が、転写因子としての機能に一致してケラチノサイトの核の中に蓄積するかどうか調べるために、照射4時間後に抗AT

10

20

30

40

50

F3抗体を用いた蛍光免疫染色によってヒト正常ケラチノサイトで調べた。未照射のケラチノサイトでは、ATF3は低いレベルがあるいは発現していなかった。高線量X線(20 Gy)を照射したケラチノサイトでは、核内において増加したATF3レベルを示した。即ち、ATF3蛋白質は、これらの細胞で主に核の中に局在していることが確認された。核はDAPIによるDNA染色により可視化した。

【実施例5】

【0039】

更に、ヒト正常ケラチノサイトでのATF3の核局在を確認するために、ヒトサイトメガロウイルスのプロモーターの制御下にEYFP(黄色蛍光蛋白)とヒト全長ATF3の融合遺伝子を構築し(図3)、正常ヒトケラチノサイトの中に導入した。融合蛋白の細胞内局在は、遺伝子導入2日後に蛍光顕微鏡で調べた。

10

【0040】

プラスミドの構築と正常ヒトケラチノサイトへのDNAの導入

全長ヒトATF3 cDNAは、pEYFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA) ベクターに導入した(Koike, M., Shiomi, T., and Koike, A. (2001) Dimerization and nuclear localization of Ku proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 11167-11173)。構築物のジャンクションの配列は、配列決定によって確認した。ケラチノサイトは 2×10^5 cells/well の細胞密度で遺伝子導入前日に35-mm 培養皿(Falcon)に蒔いた。遺伝子導入は、Effectene (QIAGEN Inc)で行った(Koike, M., 等同上)。遺伝子導入した細胞の中の蛍光は文献記載の方法で可視化した(Koike, M., Ikuta, T., Miyasaka, T., and Shiomi, T. (1999) The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Exp. Cell Res.* 250: 401-413)。即ち、細胞は、4% paraformaldehyde (PFA)を含む0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.4)で固定した。DNAはDAPI 蛍光色素で染色した。それから、細胞内の局在をオリンパスIX 70 蛍光顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)で調べた。画像は、IP lab (Signal Analytics Corp., Vienna, VA) イメージングソフトウェアを使用してHamamatsu chilled 3-cc hip color charge-coupled-device camera (C5810-01)で取り込んだ。

20

【0041】

また細胞は、ATF3 抗体を用いて、EYFPにより可視化した蛋白がEYFP-ATF3融合蛋白であることを確認するために、免疫蛍光法により解析した結果、EYFP-ATF3 を発現する形質転換細胞においてATF3を検出した。他方、EYFPのみを発現する形質転換細胞においてはATF3を検出できなかった。これらの結果は、EYFP-ATF3融合蛋白は正常ヒトケラチノサイトで発現させることができることを示す。又、EYFP-ATF3融合蛋白は核で検出されたが、EYFP単独ではケラチノサイトの細胞全体に局在していた。これらの結果は、ATF3蛋白は正常ヒトケラチノサイトの核の中に蓄積することを示唆した。これは、実施例4の免疫染色法で得られた結果と一致していた。

30

【実施例6】

【0042】

ATF3蛋白質がインビボで高線量X線によって誘導されるかどうかを調べるために、ATF3蛋白質の発現を抗ATF3抗体を用いた免疫蛍光染色によってマウス皮膚の凍結切片で調べた。

40

【0043】

免疫組織染色法

免疫組織染色のために、新鮮な状態でC57BL/6J マウスから得た全皮膚は、O.C.T. compound (Sakura Fine Technical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 内で液体窒素で凍結した。そして、凍結ミクロトームで切片をつくった。免疫染色は、抗ATF3 あるいは、抗p53 抗体(NovaCastra, Newcastle upon Tyne, UK)とDAKO Envision Plus HRP system (DAKO, Ely, Cambridgeshire, UK)で行った。PFA (4%)固定したマウス皮膚組織切片は、ペルオキシダーゼブロッキング(3%, v/v hydrogen peroxide)の前にクエン酸緩衝液で15分間、電子レンジで熱による抗原賦活化を行った。1次抗体とhorseradish peroxidaseラベルしたポリ

50

マーは DAKO Envision kitでDAB発色処理し、封入前にヘマトキシリン染色を行った。

【0044】

その結果、未照射皮膚において、コントロールとして用いたp53と同様にATF3は、未検出あるいは検出されても低いレベルであった。これに対して、高線量X線 (40 Gy) を照射した皮膚サンプルは、ATF3とP53 レベルが増加した。X線に被ばく後5時間と8時間に表皮層のケラチノサイトと真皮層の線維芽細胞の両方で、ATF3は陽性であった。これらの細胞の核の中に主に局在していた。これらの結果は、インビボでATF3が高線量X線で誘導されること、及び、ATF3が照射マウス皮膚の核の中に蓄積することを示す。以上の結果を図4に示す。

【実施例7】

【0045】

上記に記述したように、ATF3機能は正常ヒトケラチノサイトと皮膚での機能は、不明瞭なものである。他方、これまでにATF3発現の保護効果及び有害効果が他の細胞で報告されている。ラットATF3は、初代培養細胞を部分的に形質転換するので、潜在的にガン源性を持つことが示唆される (Perez, S., Vial, E., van Dam, H., and Castellazzi, M. (2001) Transcription factor ATF3 partially transforms chick embryo fibroblasts by promoting growth factor independent proliferation. *Oncogene* 20: 1135-1141)。HeLa細胞では、ATF3の過剰発現はエトポシドやカンプトテシンのアポトーシス誘導能を促進する (Mashima, T., Udagawa, S., and Tsuruo, T., (2001) Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 188: 352-358)。他方、ATF3蛋白の過剰発現はHeLa細胞に細胞増殖を抑制することが報告されている (Fan, F., Jin, S., Amundson, S.A., Tong, T., Fan, W., Zhao, H., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Fornace Jr., A.J., Rajasekaran, B., and Zhan, Q. (2002) ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* 21: 7488-7496.)。又、cardiac monocytesでのATF3の抗アポトーシスな役割が示されている (Nobori, K., Ito, H., Tamamori-Adachi, M., Adachi, S., Ono, Y., Kawachi, J., Kitajima, S., Marumo, F., and Isobe, M. (2002) ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 1387-1397.)。最近、beta細胞でATF3蛋白が明らかにプロアポトーシスな役割を持つことが示された (Hartman, M.G., Lu, D., Kim, M.L., Kociba, G.J., Shukri, T., Buteau, J., Wang, X., Frankel, W.L., Guttridge, D., Prentki, M., Grey, S.T., Ron, D., Hai, T. (2004) Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5721-5732.)。

【0046】

このように、これまでにATF3蛋白質の機能に関して得られている結果は、互いに矛盾するようなものである。そこで、正常ヒトケラチノサイトを材料に、ATF3の持続した発現が細胞増殖に影響するか、また、細胞死を生じるかどうかを明らかにすべく、実施例5で作成したEYFPとATF3との融合遺伝子 (EYFP-ATF3) を含む発現ベクターを用いて、以下の一過性遺伝子発現アッセイ法を実施した。

【0047】

一過性遺伝子発現アッセイ法によるATF3の細胞増殖への影響解析

細胞増殖アッセイは、文献記載の方法に従って行った (Mo, X., and Dynan, W.S. (2002) Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8088-8099)。ケラチノサイトは 2×10^5 cells/wellの細胞密度で遺伝子導入前日に35-mm培養皿 (Falcon) に蒔いた。遺伝子導入は、上記したようにEffectene (QIAGEN Inc)で行った。EYFP-ATF3ベクターあるいはEYFPベクターは、Effectene (QIAGEN Inc)を用いて導入した。翌日、細胞は、硝子スライド (Falcon) 上に蒔いて継代培養した。その1日あるいは2日後、黄色のコロニーをカウントし

10

20

30

40

50

、1つ、2つ、3つ以上に分類した。各分類のコロニーの割合は、コロニーの総数の割合で決定した。各実験で200蛍光集団をカウントした。

【0048】

得られた結果を図5に示す。それによると、遺伝子導入2日後にEYFP-ATF3を発現する細胞は、約40%が2細胞の蛍光クラスターからなっており、ATF3の発現がヒト正常ケラチノサイトの細胞増殖を促進する可能性が示唆された。対照的に、EYFP単独発現細胞は、約30%が2細胞の蛍光クラスターであった。他方、遺伝子導入3日後には、EYFP-ATF3を発現する細胞は、蛍光クラスターの約75%が1細胞からなり、3細胞以上はほとんどなかったことから、EYFP-ATF3は2-3日の間に細胞死を誘導したことが示唆された。更に、EYFP-ATF3細胞は、4日後に凝縮し、丸くなり培養皿からはがれた(データしめさず)。対照的に、EYFP単独では約50%のクラスターは、2、あるいは3細胞以上だった。以上の結果をまとめると、ATF3発現は正常ヒトケラチノサイトに細胞死を引き起こすことが示唆された。更に、DAPI染色したEYFP-ATF3導入細胞の核は、典型的なアポトーシス細胞の特徴であるクロマチン凝縮を示したことから、EYFP-ATF3が誘導する正常ヒトケラチノサイトの細胞死はアポトーシスであることが示唆された。

【0049】

そこで、EYFP-ATF3が誘導する正常ヒトケラチノサイトの細胞死がアポトーシスを確認するための以下のテストを行った。活性型カスパーゼ3はアポトーシスマーカーであることが知られている。更に、PARPのアポトーシス特異的な85-kDa断片化とサイトケラチン18の断片化も、上皮細胞のアポトーシスの過程でおこる特徴として良く解析されている。そこで、これらに対する抗体で染色した細胞を蛍光顕微鏡によって調べた。活性型カスパーゼ3の特異抗体を用いた実施例3で示した免疫蛍光染色法で解析した結果、活性型カスパーゼ3はEYFP-ATF3発現細胞の核の中で検出されたが、EYFP発現細胞では検出されなかった。加えて、陽性シグナルはDAPI染色で検出される核の断片化や凝縮の様な形態変化が起こる前に細胞で検出された。活性型PARPの特異抗体及びサイトケラチン18の特異抗体(M30 CytoDEATH抗体)を用いた免疫蛍光法によって、これらの活性型が、EYFP-ATF3発現細胞の核の中で検出されたが、EYFP-ATF3発現細胞では検出されなかった。これらの結果は、ATF3が正常ヒトケラチノサイトにカスパーゼ3依存的なアポトーシスを誘導することを示すものである。従って、放射線被爆後の表皮角化細胞における転写促進因子3(ATF3)遺伝子の発現の変動を測定することにより、該細胞のアポトーシスへの誘導を予測することが可能であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0050】

ATF3遺伝子がヒト表皮角化細胞に細胞死を誘導することに加えて、この蛋白質が線量依存的に誘導されることから、この蛋白質は、例えば、これに対する特異モノクローナル抗体を用いたELISAで使用することができ、放射線被爆後のヒト皮膚の予後を診断するためのバイオマーカーとなる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】Aは、ヒトケラチノサイトでの電離放射線によるATF3 mRNAと蛋白質の誘導の結果を示す電気泳動。(A)ヒトケラチノサイトでの電離放射線によるATF3とそのファミリー遺伝子mRNAの誘導の結果を示すアガロースゲル上での電気泳動の写真である。Bは、未処理(0時間)、あるいは20 Gyの電離放射線で処理した正ヒトケラチノサイトから、処理後4と8 hで回収した総細胞蛋白質をウェスタンブロット解析して得られた電気泳動の写真である。

【図2】図1Aの結果を折れ線グラフで表したものである。

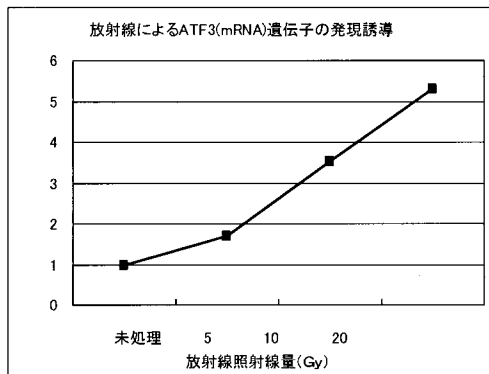
【図3】ヒトサイトメガロウイルスのプロモーターの制御下にEYFP(黄色蛍光蛋白)とヒト全長ATF3の融合遺伝子を組み込まれた発現ベクターの概略図である。

【図4】X線照射(40 Gy)したマウス皮膚(5時間, 8時間)とコントロール同腹マウス皮膚(未処理)切片を、P53あるいはATF3に対する特異抗体を用いる免疫化学染色法によ

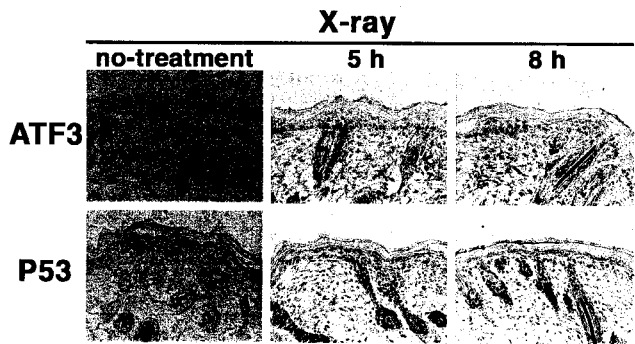
て調べた結果得られた蛍光顕微鏡写真 (× 4 0) である。尚、核は封入前にヘマトキシリンで対比染色により可視化した。

【 図 5 】 一過性遺伝子発現アッセイ法によるATF3の細胞増殖への影響解析の結果を示すグラフである。グラフは、1、2、又は3細胞あるいはそれ以上の蛍光クラスターの割合を示す。独立の2回の実験を示す。

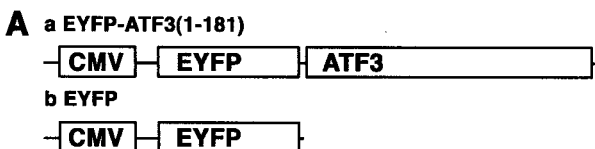
【 図 2 】



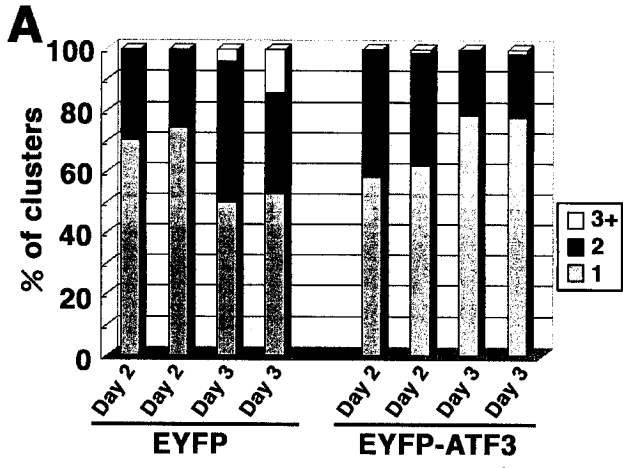
【 図 4 】



【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 1 】

A

0 Gy
5 Gy
10Gy
20Gy

ATF1



ATF2



ATF3



0 Gy
5 Gy
10Gy
20Gy

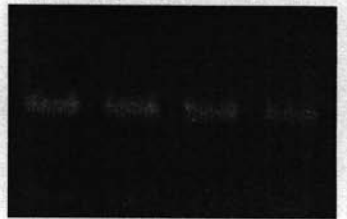
ATF4



p21



GAPDH

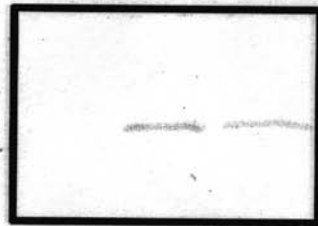


B

NHK

X-ray 0 4 8 (h)

ATF3



【 配列表 】

2006217899000001.app

フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB20 BB24 CB01 DA13 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 AA12 CA11 HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62
QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	基于辐射皮肤诱导基因表达的测量方法		
公开(公告)号	JP2006217899A	公开(公告)日	2006-08-24
申请号	JP2005036700	申请日	2005-02-14
申请(专利权)人(译)	独立行政法人放射线医学総合研究所		
[标]发明人	小池学 小池亜紀 潮見友江		
发明人	小池 学 小池 亜紀 潮見 友江		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	阿部正弘		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：鉴定在暴露于辐射后改变其在人表皮角质形成细胞中的表达的基因，并基于此，提供用于估计或预测皮肤病的辐射剂量或预后等的各种方法，和用于筛选抑制辐射诱导的细胞凋亡等的物质的方法。
 解决方案：该方法用于估计辐射吸收剂量或预测细胞对细胞凋亡的诱导，以及筛选抑制辐射诱导的细胞凋亡的物质的方法是基于激活转录因子3 (ATF3) 基因表达的变化提供。 ㄐ

見
ま
の
見
該
汝
リ

