

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591916

研究課題名（和文） アデノ随伴ウイルスベクターとギャラニン受容体 1 型による
頭頸部癌遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene Therapy for Head and Neck Cancer using Adeno-Associated Virus Vector
Harboring Galanin Receptor type 1

研究代表者

金沢弘美 (KANAZAWA, Hiromi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：40570643

研究成果の概要(和文):頭頸部癌は難治であり新たな治療法の開発が必要である。このため癌抑制遺伝子として注目されるギャラニン受容体 1 型(GALR1)をアデノ随伴ウイルスベクター(AAV ベクター)に組み込み、頭頸部癌細胞に対する治療実験を行った。結果は、導入に用いる AAV ベクターの血清型は AAV2 型が最も効率がよく、AAV ベクターにより GALR1 を頭頸部癌細胞に高頻度に発現させることが可能であった。更に、遺伝子導入による殺細胞効果は、安定発現系では GALR1 の作用が細胞増殖抑制効果は認められるもののアポトーシスは認めないという特性があり、一過性発現系での殺細胞効果は限定的であった。このため細胞周期非依存性の抗癌剤に対する増強効果が期待された。

研究成果の概要(英文): The invention of new therapeutic approaches against HNSCC were eagerly anticipated. In this study, we first transduced Head and Neck Cancer cell lines using a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-GFP vector and confirmed a high GFP expression rate in HNSCC lines at the standard vector dose. Next, we demonstrated that GALR1 stable expression in the presence of galanin observed the killing effect cell, but not transient transfection because GALR1 induced cell proliferation but not apoptosis. Galanin/GALR1 system is expected to augment the killing effect by the cell cycle independent chemotherapeutics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1300000	390000	1690000
2011 年度	1000000	300000	1300000
2012 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：AAV, GALR1, 癌抑制遺伝子, 遺伝子治療, 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

現在、頭頸部癌の治療成績は十分ではなく新規治療戦略の構築が必須である。近

年、分子標的治療の進歩に伴い、様々な薬剤の開発がすすめられているが、新規標的遺伝子の解明とともに新たな投与

方法・投与経路の開発も重要と考えられている。

2. 研究の目的

頭頸部癌における GALR1 の役割は、MAPK を介して細胞周期関連蛋白を調整し癌細胞の増殖を抑制することであり、頭頸部癌における癌抑制遺伝子としての働きが指摘されている。今回の研究では、GALR1 の治療用遺伝子としての有用性を検討するため GALR1 を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) を作成し、頭頸部癌に対する新規治療戦略の構築を目指した。

3. 研究の方法

GALR1 を組み込んだ AAV ベクターを作成し、頭頸部癌細胞に導入し殺細胞効果を確認した。

4. 研究成果

導入にもちいた AAV ベクターの血清型は AAV2 型が最も効率がよく、GALR1 を頭頸部癌細胞に高頻度に発現させることが可能であった。更に、遺伝子導入による殺細胞効果は、安定発現系で示されるように、GALR1 の作用が細胞増殖抑制効果は認められるもののアポトーシスは認めないという特性があるため、一過性発現系での効果は限定的であった。このため細胞周期非依存性の抗癌剤に対する増強効果が期待された。以下に、データを示す。

Endogenous galanin and its receptors mRNA expression by RT-quantitative PCR analysis

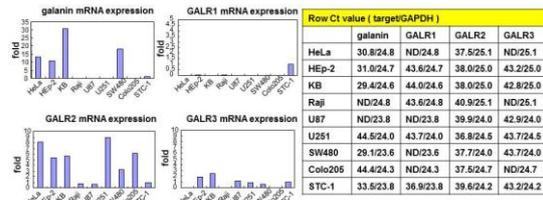


Figure 1 The mRNA expression of galanin and GALRs in various carcinoma cell-lines. Real-time PCR quantification was performed for detection of mRNA levels of galanin and its receptors. The amount of target gene was normalized to GAPDH. The relative increase was equal to $2^{-\Delta\Delta Ct} \text{target} / \Delta\Delta Ct \text{control}$. STC-1 cell was used as control sample.

Efficacy of rAAV mediated GFP protein expression

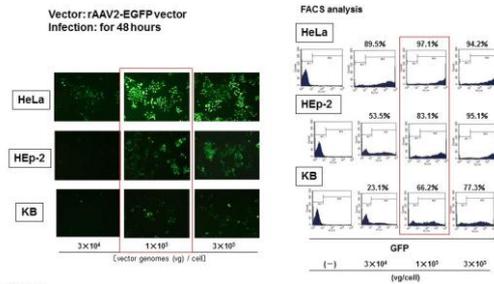


Figure 2 We examined efficacy of rAAV mediated gene expression in each our used cell-lines, cervical cancer cell-line, HeLa and HNSCC lines HEP-2, KB, by using rAAV2-EGFP vector. We decided 1×10^5 vg/cell as appropriated infection titer.

Expression of galanin receptors after AAV mediated GALR gene transduction

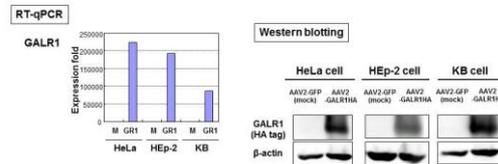


Figure 3 To confirm the transductional efficiency of rAAV-mediated GALRs gene, we examined the expression of GALR1 at mRNA and protein level by RT-quantitative PCR (ΔΔCt method) and western blotting. Each cell-line was infected respective rAAV for 48hr, then RNA and whole cell lysate was collected for using these assay.

WST-1 assay

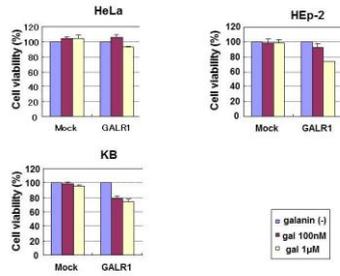


Figure 4
To examine the effect of AAV mediated GALR1 transduction against cell viability, we used WST-1 assay. Cell was plated on 96 well plate, then each rAAV vector and galatin at a various concentration concurrently added. After incubated for 48hr, wst-1 reagent added and measured absorbance by microplate-reader.

Annexin V assay

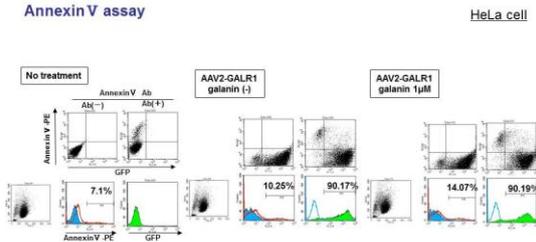


Figure5
To analysis induction of apoptosis by AAV-mediated GALR1 gene transduction, we tested annexin V assay using flow cytometry. In addition to measure Annexin V positive cell population, we checked GFP positive cell rate.

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

金沢弘美 (自治医科大学・医学部・助教)

研究者番号 : 40570643

(2)研究分担者

金澤丈治 (自治医科大学・医学部・准教授)

研究者番号 : 20336374

(3)連携研究者

水上浩明 (自治医科大学・医学部・准教授)

研究者番号 : 20311938