

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592539

研究課題名(和文)ギャラニン受容体2型導入による頭頸部癌遺伝子治療の前臨床研究

研究課題名(英文)Preclinical study for Head and Neck Cancer using rAAV-GALR2

研究代表者

金澤 丈治 (Kanazawa, Takeharu)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌は、予後不良な疾患であり新たな治療法の開発が必要である。GALR2は頭頸部癌では癌抑制遺伝子考えられている。GALR2を頭頸部癌細胞にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて頭頸部癌由来の細胞株に導入したところ90%以上の細胞に遺伝子発現を認めリガンド刺激により強力な殺細胞効果を得た。更に、Annexin-Vおよびsub-G0/G1期の有意な増加が認められ、殺細胞効果はcaspase非依存性にERK1/2を抑制し、アポトーシス促進蛋白であるBimの活性化によることが認められた。以上の結果は、頭頸部癌遺伝子治療にGALR2発現AAVベクターが有用であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Galanin and its receptors, GALR1 and GALR2, are known tumor suppressors and potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). In this study, we first transduced HEP-2 and KB cell lines using a recombinant adeno-associated virus (rAAV)-green fluorescent protein (GFP) vector and confirmed a high GFP expression rate (>90%) in both cell lines. Next, we demonstrated that GALR2 expression in the presence of galanin suppressed cell viability to 40-60% after 72 h in both cell lines. Additionally, the annexin V-positive rate and sub-G0/G1 phase population were significantly elevated in HEP-2 cells (mock vs GALR2: 12.3 vs 25.0% (P < 0.01) and 9.1 vs 32.0% (P < 0.05), respectively) after 48 h. These changes were also observed in KB cells, although to a lesser extent. Furthermore, in HEP-2 cells, GALR2-mediated apoptosis was caspase-independent, involving downregulation of ERK1/2, followed by induction of the pro-apoptotic Bcl-2 protein, Bim.

研究分野：外科

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科

キーワード：遺伝子治療 GALR2 癌抑制遺伝子 頭頸部癌 AAV

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、全悪性腫瘍のうち約 5% を占めるとされており、決して稀な疾患ではない。

これまで様々な集学的治療が行われてきたが、進行した頭頸部癌に対する治療成績は必ずしも改善していない。このため遺伝子治療や分子標的治療のような新たな治療法の開発がすすめられている。しかしながら、典型的な頭頸部癌においては、多くの情報伝達経路に障害をもつため、このような新たな治療法でも治療効果は未だ不十分である。このため、更に効果的な drug delivery system (DDS) や分子標的治療薬などの開発を進める必要がある。

2. 研究の目的

これまで受容体型チロシンキナーゼやサイトカインレセプターに関しては癌化に関わる重要性が指摘され、これらに対する分子標的治療薬も開発されてきたが、生体内で重要な働きを持つ G 蛋白共役受容体 (GPCR) と頭頸部癌の癌化については十分な研究がなされていなかった。

私達は、これまで代表的な GPCR である Galanin 受容体に関して研究を行ってきた。ニューロペプチドである Galanin は、中枢および末梢神経に広く分布し、主に神経伝達物質として働いているが、近年、様々な腫瘍細胞において、細胞増殖の抑制に関与することが知られるようになってきた。私達の研究では Galanin 受容体 1 型 (GALR1) は mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化により細胞周期関連蛋白が調整することにより、2 型 (GALR2) はアポトーシスを誘導することにより頭頸部癌において癌抑制遺伝子として働くことが明らかになった。このように GALR の研究は進歩をとげているが、今後の臨床応用を考えた場合、更に詳細な情報伝達機構の解明と DDS の開発が必要と思われる。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、非病原性ウイルス由来のベクターであること、免疫原性が低いこと、長期発現が望めること、そして感染ホストが広範囲であることなど、臨床応用に好ましい条件をもつウイルスベクターである。既に、パーキンソン病や血友病 B に対する臨床応用も広く行われており頭頸部癌の臨床応用にも有用なベクターである。加えて、痙攣発作に対する Galanin をコードする AAV ベクターを用いた臨床試験も行われているため Galanin - GALR システムに適したベクターであると考えられる。このような知見を背景に、今回、AAV ベクターを用いた GALR の頭頸部癌に対する治療実験を行った。

3. 研究の方法

細胞培養および試薬: 実験にはヒト喉頭癌由来の細胞株である HEP-2 細胞および口腔癌由来の細胞株である KB 細胞を用いた。これらの細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。細胞は 10% の仔牛血清および 100 U/ml のペニシリン、100 ug/ml のストレプトマイシンを含む α MEM 培養液で培養した。

プラスミドおよび AAV ベクターの作成: 以前の実験で使用した HA タグ付きの GALR1HA-Ires-GFP フラグメントおよび GALR2HA-Ires-GFP フラグメントを AAV-MCS ベクタープラスミドにサブクローニングし、GALR1 発現 AAV プラスミドおよび GALR2 発現 AAV プラスミドを作成した。AAV ベクターの作成は、アデノウイルスフリーシステムを用いて行った。AAV ベクタープラスミド、AAV-RC プラスミド、ヘルパープラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入し、72 時間後に細胞を破碎することによりウイルス溶液を回収した。更に、このウイルス溶液を CsCl 密度勾配法により精製した。ウイルス濃度は定量的 PCR 法により決定した。

定量的 PCR: トータル RNA は RNeasy mini kit により抽出した。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse transcription Kit を用いて行い、cDNA の増幅は TaqMan Expression Assays を用いて行った。

ウェスタンブロット: 細胞を 62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 6% mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue を含む溶液で溶解した。また、ミトコンドリア分画および細胞質分画は Mitochondrial Isolation Kit を用いて行った。これらのサンプルを電気泳動した後、PVDF メンブレンにトランスファーした。これを様々な一時抗体と反応させた後、バンドを明視化した。

Immunocytochemistry: 細胞をカバーグラス上で 1 晩培養した。その後、それぞれの AAV ベクターを感染させた。完成後 48 時間経過した時点で、細胞を固定し、HA タグに対するマウスモノクローナル抗体を反応させた。更に、二次抗体として Alexa Fluor 555 をラベルした抗マウス IgG ヤギ抗体を反応させた。また、DAPI を用いて核染色を行った。GALR の局在は BIOREVO BZ-9000 microscope または Olympus FV-500 Confocal Microscope を用いて観察した。

更に、遺伝子導入効率を観察するために、GFP 陽性細胞を、AAV ベクター感染 4 週間後にフローサイトメトリーを用いて計測した。

殺細胞効果: 細胞増殖における GALR の情報

伝達経路の関与を明らかにするために細胞活性を WST-1 を用いて検討した。細胞を 96 穴プレートで一晩培養し、その後、無血清培地に交換した。細胞をそれぞれの AAV ベクターに感染させ、その後、Galanin に 24-72 時間接触させた。WST-1 試薬を 1-2 時間加え、450nm の吸光度を測定した。

アポトーシスおよび細胞周期解析：アポトーシス細胞は PE-アネキシン V をフローサイトメトリー法により計測した。また、細胞周期解析は Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit を用いて行った。アポトーシスによる DNA の断片化は sub-G0/G1 期の比率を計測して決定した。

4. 研究成果

AAV ベクターの頭頸部癌細胞への遺伝子導入効率の検討と最適化：AAV ベクターの血清型別に頭頸部癌細胞に対する感染効率を比較したところ AAV2 型の感染効率が最も高く、頭頸部癌細胞に対するベクターとしては最適と考えられた。

Figure1.

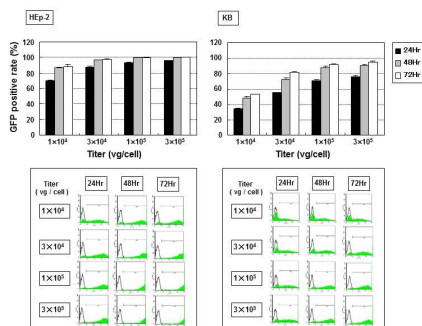


Figure 1

頭頸部癌に対する AAV ベクターの遺伝子導入効率：頭頸部癌細胞株 Hep-2 および KB 細胞に様々な濃度で遺伝子導入を行ったところ 1×10^5 vp/cell で遺伝子導入効率が 90% 以上となった。このため以下の実験は、 1×10^5 vp/cell の濃度で行った。上段は、遺伝子導入効率をグラフ化したものを示す。下段は、フローサイトメトリーの生データを示す。

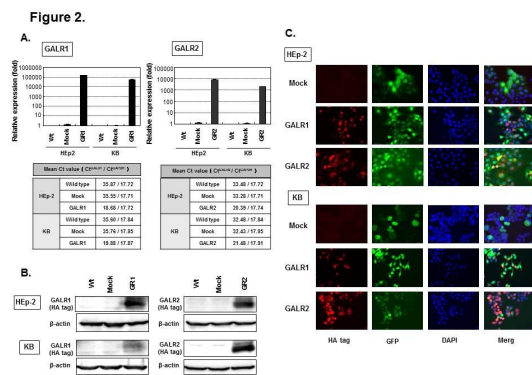


Figure 2

頭頸部癌細胞に対する AAV ベクターを用いた GALR の遺伝子導入：A. 定量的 RT-PCR による GALR の発現状況。Hep-2 および KB の両方の細胞で GALR1 を導入した際には GALR1 が、GALR2 を導入した際には GALR2 が増加していることがわかる。B. HA タグに対するウエスタンブロット。AAV で遺伝子導入を行った場合、蛋白レベルでの GALR の発現が Hep-2 および KB 細胞の療法の細胞で認められる。C. Immunocytochemistry による GALR 蛋白の局在。GFP 陽性の細胞には、GALR の発現が認められ、細胞質および細胞膜に発現を認めた。

Figure 3.

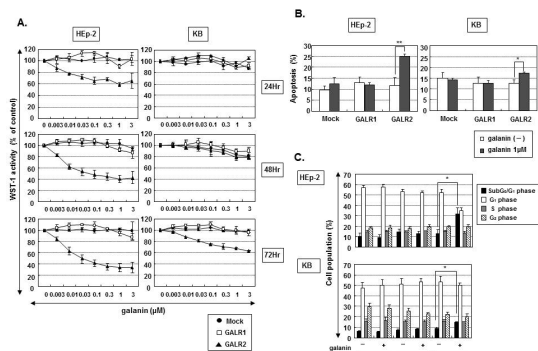


Figure 3

AAV ベクター感染および Galanin 刺激による頭頸部癌に対する細胞増殖抑制効果ならびに殺細胞効果：A. 頭頸部癌細胞に GALR を発現する AAV ベクターを感染させ、Galanin 刺激を行った場合、GALR1 では Hep-2 および KB の両方の頭頸部癌細胞で細胞増殖抑制効果は認めないが、GALR2 ではウイルス濃度および時間依存性に細胞増殖抑制効果を認めた。B. フローサイトメトリーを用いたアポトーシスの検討。GALR1 を導入した場合には Hep-2 および KB のいずれの細胞にもアポトーシスを誘導しないが、GALR2 を導入した場合には、どちらの細胞にもアポトーシ

スを誘導した。

C. フローサイトメトリーを用いた細胞周期の検討. Sub-G0/G1 は GALR2 を導入した際には HEP-2 および KB の両方の細胞で増加するものの、細胞周期の分布には GALR1 および GALR2 のどちらを導入した際も変化を与えなかった。したがって、GALR2 はアポトーシスを誘導するものの細胞周期には影響を与えないことが示された。更に、GALR1 はアポトーシスの誘導および細胞周期のいづれにも影響を与えなかった。

Figure 4.

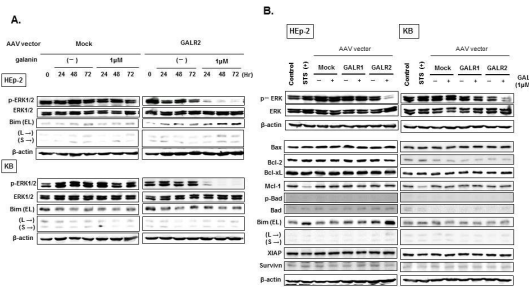


Figure 4

AAV ベクターを用いた GALR の導入による ERK1/2・Bad のリン酸化およびアポトーシス関連因子の発現調整: GALR2 の誘導するアポトーシスの情報伝達経路を確定するために ERK1/2, Bad のリン酸化および Bim, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-1, Survivin の発現を検討した。A. AAV ベクターを用いて GALR を遺伝子導入した場合、HEP-2 において ERK1/2 リン酸化の抑制および Bim の発現増加が認められるものの、KB においては ERK1/2 リン酸化の抑制が認められるものの Bim の発現上昇は認められなかった。B. GALR2 の更なるアポトーシス誘導経路を確かめるために代表的なアポトーシス関連蛋白の発現を確認したが Bim を除く他の因子に変化は認めなかった。

以上の結果より、GALR2 のアポトーシスの誘導作用は ERK1/2 のリン酸化を抑制することによりもたらされ、その経路には Bim の発現が関与するものと関与しないものの両者があることが示された。

Figure 5.

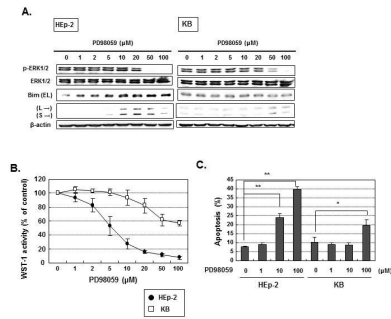


Figure 5

ERK1/2 リン酸化の抑制による Bim の発現上昇および細胞増殖抑制効果の再現実験: 頭頸部癌細胞において ERK1/2 の抑制は Bim の発現上昇および殺細胞効果と関連するかどうかを確認するために MEK の抑制薬である PD98059 処理を行った。A. HEP-2 において PD98059 処理により濃度依存性に ERK のリン酸化が抑制されると同時に Bim の発現が上昇した。一方、KB では、ERK のリン酸化は濃度依存性に抑制されるものの Bim の発現上昇は見られなかった。B. WST-1 による細胞増殖抑制は PD98059 濃度依存性に、HEP-2, KB の両方の細胞株で認められた。また、フローサイトメトリーを用いたアポトーシスの観察でも両方の細胞で濃度依存性にアポトーシスの誘導が認められた。この結果は、GALR2 を遺伝子導入した場合と同様の結果であり PD98059 の作用機序と GALR2 の作用機序の類似性を示唆するものである。

Figure 6.

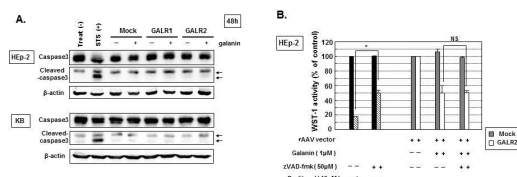


Figure 6

GALR の遺伝子導入がカスパーゼ経路に与える影響: A. GALR1 および GALR2 のどちらを遺伝子導入した場合でも HEP-2 細胞および KB 細胞のどちらの細胞でもカスパーゼ 3 の活性化は認めなかった。B. また、カスパーゼ阻害薬である z-VAD-fmk を前処理した場合でも GALR2 の効果を抑制することはできな

かった。このため GALR2 のアポトーシス誘導作用はカスパーゼ非依存性であることが示唆された。

以上のまとめを下記に記す。

AAV ベクターの頭頸部癌細胞への遺伝子導入効率の検討と最適化: AAV ベクターの血清型別に頭頸部癌細胞に対する感染効率を比較したところ AAV2 型の感染効率が最も高く、頭頸部癌細胞に対するベクターとしては最適と考えられた。

GALR2 発現 AAV ベクターの構築と遺伝子導入、殺細胞効果の検討: GALR2 発現 AAV ベクターを構築し、2 種類の頭頸部癌由来の細胞株に導入したところ 90% 以上の細胞に遺伝子発現を認め、リガンド刺激により強力な殺細胞効果を得た。

GALR2 発現 AAV ベクターによる殺細胞効果の発現機序の検討: GALR2 を導入後にリガンド刺激を行うと Annexin-V および sub-G0/G1 期の有意な増加が認められ、殺細胞効果はアポトーシスの誘導によるものであることが認められた。更に、情報伝達経路の解析から、GALR2 発現 AAV ベクターによる細胞死は、カスパーゼ非依存性に ERK1/2 を抑制し、アポトーシス促進蛋白である Bim の活性化によりもたらされることが示された。

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 2 件)

Kanazawa T, Misawa K, Misawa Y, Maruta M, Uehara T, Kawada K, Nagatomo T, Ichimura K: Galanin Receptor 2 Utilizes Distinct Signaling Pathways to Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis in HNSCC. **Mol Med Rep** *in press*

Uehara T, Kanazawa T, Mizukami H, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Misawa K, Carey TE, Suzuki M, Ichimura K, Ozawa K. Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Cancer Sci** 105: 72-80, 2014.

[学会発表](計 3 件)

金澤丈治, 上原貴行, 三澤 清, 鈴木幹男, 市村恵一. Galanin 受容体 2 型導入による頭頸部癌遺伝子治療研究. 第 36 回日本頭頸部癌学会総会・学術講演会. 松江, 2012 年 6 月 7-8 日.

上原貴行, 金澤丈治, 市村恵一, 鈴木 幹男. アデノ随伴ウイルスベクターを用いたガラニン受容体 2 型遺伝子導入による抗腫瘍効果の検討. 第 113 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 新潟, 2012 年 5 月 10-12 日.

上原貴行, 金澤丈治, 水上浩明, 内堀亮介, 塚原智典, 卜部匡司, 久米晃啓, 三澤 清, 小澤敬也. 頭頸部扁平上皮癌におけるガラニン受容体 2 型を介する新たな抗腫瘍機構の解明. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日-21 日.

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

金澤丈治 (KANAZAWA, Takeharu)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20336374

(2) 研究分担者

市村恵一 (ICHIMUR, Keiichi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00010471

水上浩明 (MIZUKAMI, Hiroaki)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20311938

上原貴行 (UEHARA, Takayuki)
琉球大学・医学部・助教
研究者番号: 00644402

(3)連携研究者 ()

研究者番号：