

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462620

研究課題名(和文) GALR2を介する頭頸部癌分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Molecular Targeted Therapy Utilizing Galanin receptor type 2 signaling for Head and Neck Cancer

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なG蛋白共役受容体であるGalanin受容体2型(GALR2)を標的とする頭頸部癌の新規分子標的治療薬の開発のため、GALR2の頭頸部癌細胞への遺伝子導入を行い治療効果を検討した。GALR2アンタゴニスト別の殺細胞効果の実験では、GALPにおいて強力な殺細胞効果を示した。アンタゴニスト別の情報伝達経路の検討では、GALPにおいてPI3K/Aktの抑制効果が強かった。何れのアンタゴニストでもGALR2は差細胞周期停止作用とアポトーシス誘導作用が認められた。セツキシマブの存在下では、GALR2の殺細胞効果に対するセツキシマブの増強効果が認められた。GALPは有用な頭頸部癌治療薬となり得る。

研究成果の概要(英文)：To develop of the novel agents targeted for Galanin receptor type 2, the GALR2 was transfected and transduced into several head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. The established stably GALR2 expressing HNSCC cells and adeno-associated virus vectors harboring GALR2 gene transduced cells were investigated the killing effect and signaling pathway after various GALR2 agonists. Galanin-like peptide (GALP) was the most powerful stimulator for GALR2 induced killing effect among some GALR2 agonists. All GALR2 agonists induced both cell cycle arrest and apoptosis, and GALP was the strongest apoptosis inducer. GALP and Galanin suppressed both MAP kinase pathway and PI3K/Akt pathway, but PI3K/Akt pathway suppression was observed in lower dose of GALP compared with Galanin. The killing effect was not observed after cetuximab alone, but the additional effects was observed in GALR2 stably expressing HNSCC cells. GALP would be potential agents for HNSCC therapy.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 分子標的治療 GPCR アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療は、現在、外科的治療を中心に放射線治療・化学療法が行われているが、進行例や再発例も多いため十分な治療効果を挙げるに至ってはいない。このため新たな治療法の開発が望まれている。このような治療法の1つとして分子標的治療薬の開発が著しい。分子標的治療薬は乳癌に対するトラスツズマブや悪性リンパ腫に対するリツキシマブのように著明な効果が認められるものもある一方で、頭頸部癌においては、セツキシマブが保険適応となったものの未だ主要な治療とはなっていない。このように分子標的治療薬が十分な効果を上げにくい理由の1つとして、頭頸部癌の発癌が主に飲酒や喫煙といった外因によるものであり、ゲノムの障害部位が多いことが挙げられる。これまでの分子標的薬は主に受容体型チロシンキナーゼおよびその情報伝達経路を標的とするものであるが、頭頸部癌に対しては、更なる分子標的の解明が必要である。

G蛋白共役受容体 (GPCR) は、700種類からなる大きなファミリーを形成する7回細胞膜貫通型の受容体で外からの刺激を受けて、細胞機能の調整に重要な働きをしている。これまでGPCRを分子標的とする治療薬の開発は、GPCRの構造の複雑さから十分ではなかったが、近年、徐々に発展している。本研究は、代表的なGPCRであるGalanin受容体2型 (GALR2) を標的とした頭頸部癌治療のための新規分子標的治療薬の開発を目的とする。

これは、私達が、頭頸部癌での代表的なGPCRであるGalanin受容体1型 (GALR1) および2型 (GALR2) につき検討を行い、これらが頭頸部癌に対して癌抑制遺伝子として働くことを見出したことが発端である。私達のこれまでの研究ではGALR1は細胞周期停止 (Kanazawa T. et al., *Oncogene*, 2007)

(Misawa K, Kanazawa T. et al., *Clin Cancer Res*, 2008) により、GALR2はアポトーシスの誘導 (Kanazawa T. et al., *Clin Cancer Res*, 2009) により細胞死をもたらすことを見出した。GALR1とGALR2の作用を比較するとGALR2の方が殺細胞効果が強い。ため治療標的としてはGALR2の方が適している (Kanazawa T. et al., *Expert Opin Ther Targets*, 2010)。このため臨床応用のために、GALR2をウイルスベクターで導入し生体内で頭頸部癌を細胞死に導く技術も樹立しつつある。

GALR2は、細胞死誘導のためにいくつかの異なる情報伝達系を持っている。このことは、外因性発癌のため遺伝子変異が多く認められる頭頸部癌には適した治療標的と考えられる。しかしながら、これらの作用を誘導するためには高濃度のGalaninを必要とし、Galaninそのものを治療薬とすることは難しい。近年、GALR2に対する多数のアゴニストおよびアンタゴニストが発見されているが、このなかには受容体選択性の高い物質も知られており治療薬としての有用性も高い。実際に、神経学や内分泌学の分野では臨床応用を目指した研究も行われ、抗肥満治療や神経因性および炎症性の痛みの治療薬としての開発が進んでいる。このようにGalanin受容体を初めてするGPCR研究は、現在のゲノム創薬の分野で最も注目されている領域の一つであり、頭頸部癌の対する新たな分子標的治療研究においても主要な位置を占めるものと思われる。

このような背景をもとに以下の研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、Galanin受容体2型 (GALR2) を標的分子とする頭頸部癌への新規治療薬の開発を目的とする。私達はこれまで、GALR2が頭頸部癌では癌抑制に働き治療標的とし

て有用であることを確認した。更に、ウイルスベクターによる生体への遺伝子導入法も確立した。現在の分子標的治療薬はセツキシマブのように受容体型チロシンキナーゼを標的とするものであるが、近年、GALR2のようなG蛋白共役受容体(GPCR)を標的とする分子標的治療薬も開発されるようになった。GALR2は、情報伝達経路が多彩で、遺伝子変異が多い頭頸部癌治療に適した分子標的である。また、セツキシマブ耐性を克服する機序に関連することが示唆されている。このためGALR2を標的とする治療薬の開発は新たな頭頸部癌分子標的治療の進歩に大きく寄与するものと思われる。

これら新規に開発されたGALR2の受容体特異的なアゴニストを用いて頭頸部癌での殺細胞を検討し、それらに特有な情報伝達系を同定し、頭頸部癌の治療薬となり得るかを検討する。更に、GPCRの情報伝達経路は、受容体型チロシンキナーゼの情報伝達系とは異なるものの密接な関係にある。分子標的治療薬の短所の1つは耐性化を生じやすいことであり、高い治療効果を得るためには、異なる情報伝達系を標的とする分子標的薬との多剤併用治療が必要とされている。このため受容体型チロシンキナーゼ阻害薬とGALR2アゴニストの併用効果についても検討する。

### 3. 研究の方法

**細胞培養および試薬：**実験にはヒト頭頸部癌由来の細胞株である UMSCC-1, UMSCC-2, UMSCC-6 を用いた。これらの細胞株は米国ミシガン大学耳鼻咽喉科で樹立されたものである。細胞は、10%の仔牛血清および100U/ml ペニシリンおよび100ug/ml のストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて培養した。Galanin および Galanin-like peptide など GALR2 アゴニストは 24 時間、細胞を培養した後、無血清培地に変更後 24 時間静置した

後に添加した。

プラスミドおよび AAV ベクターの作成：pcDNA をバックボーンとする GALR2 発現プラスミドを構築した。具体的には、サイトメガロウイルスプロモーターの下流に HA タグを 3' 側に付加した GALR2 を配置し、更に、Internal Ribosome Entry Site (IRES) の下流に green fluorescent protein (GFP) を配置した (pCMV-HALR2HA-IRES-GFP)。GALR2 安定細胞株は、各頭頸部癌細胞株に、リポフェクタミン法により遺伝子導入を行い、ネオマイシン存在下に培養した後、FACS Vantage SE を用いたフローサイトメトリー法により GFP 陽性細胞を選択した。

AAV ベクタープラスミドは、pCMV-HALR2HA-IRES-GFP の遺伝子発現部分を AAV-MCS ベクタープラスミドにサブクロニングし作成した。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 時間後に細胞を粉砕することによりウイルス溶液を回収した。次に、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。

**ウエスタンブロット解析：**細胞を protease inhibitor を加えた 1% Nonidet-P 40 溶解剤で溶解した。溶解液の上清を採取した後、総蛋白量を Bio-Rad アッセイで計測した。等量の蛋白を 10% SDS-PAGE gel で電気泳動し Hybond-P メンブレンにトランスファーした。このメンブレンを ERK, pERK, AKT, pAKT などの一次抗体に反応させた後、発色性の二次抗体に反応させ明視化した。膜蛋白である GALR2 を検出する場合には、蛋白の凝集反応を防ぐために *N*-Glycosidase F の反応と低温操作によりサンプルの抽出

を行った。GAPDHは、内部コントロールとして用い、特異的抗GAPDHモノクローナル抗体により抽出した。

Immunocytochemistry: 細胞をカバーガラス上で24時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、抗HAタグ抗体およびHoechst 33342で培養した。更に、Alexa Fluor 546 ヒツジ抗マウスIgG<sub>1</sub>で培養した。GALR2の局在は、オリンパスFV-500コンフォーカル顕微鏡を用いて行った。

殺細胞効果: 通常培地で細胞を培養後、無血清培地に変更し、24時間培養した。ここでGALR2のアゴニストを添加し、更に、24時間培養した。この状態で、10 μmol/LのBrdUと45分間接触させた後、70%のエタノールで固定した。更に、2NのHClでDNAを変性させた。細胞は、マウス抗BrdUモノクローナル抗体を1次抗体として、Alexa Fluor 546 ヒツジ抗マウスIgG<sub>1</sub>抗体を2次抗体として培養した。その後、3000個の細胞をカウントし、BrdU陽性細胞を計測した。

アポトーシス解析: アポトーシス解析は、活性化カスパーゼ3染色、アネキシン-V染色およびDNA断片化により計測した。細胞を無血清培地で計測後、GalaninおよびGALR2アゴニストと培養後、GALR2遺伝子導入細胞とmock細胞に発現する活性化カスパーゼ3およびアネキシン-VをそれぞれActive Caspase-3 PE MAb Apoptosis KitおよびAnnexin V-PE Apoptosis Detection Kit Iを用いて染色し、フローサイトメーターにより計測した。DNAの断片化は、DNAeasy Tissue Kitを用いて、ゲノムDNAを抽出し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動しエチレンブロマイド染色により確認

した。

#### 4. 研究成果

##### 1. GALR2 プラスミドベクターの作成および rAAVGALR2 の作成と遺伝子導入

pGALR2HAiresGFPをUMSCC-1にリポフェクション法により遺伝子導入し、GFP陽性細胞を選択したところウエスタンブロット法およびImmunocytochemistryにより発現が確認でき、更に、GALR2が細胞膜に局在することが確認できた。更に、GalaninおよびGALR2アゴニストによる刺激の前後でのGALR2の発現量および局在の変化は認めなかった。また、GALR2をコードするAAVベクター(rAAVGALR2iresGFP)をUMSCC-1、UMSCC-2、UMSCC-6に感染させたところUMSCC-1が最も感染効率が高く1x10<sup>5</sup> vectors/cellでほぼ100%の感染効率をしました。このため以下の実験はUMSCC-1を用いて行った。

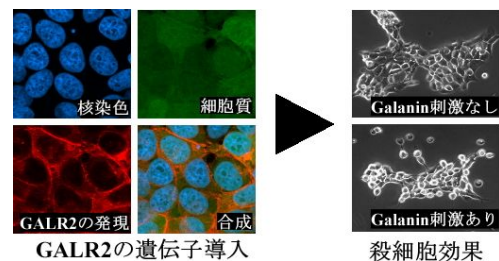


図1. GALR2 + Galaninによる細胞死

##### 2. リガンド別の殺細胞効果の検討.

GALR2安定細胞株を用いた実験では、GALR2特異的リガンドであるGalanin-Like-Peptide (GALP)は、Galaninと比較して明らかな殺細胞効果を増強することが認められた。更に、GALPの殺細胞効果は濃度および時間依存性に増加し、Galaninと比較すると約1/10の濃度で同等の効果が認められた。更に、1x10<sup>5</sup> v/cellのrAAVGALR2iresGFPをUMSCC-1に感染させたところGalanin

および GALP はどちらも強力な殺細胞効果を示し、安定発現の場合と同じように GALP の方が強力な殺細胞効果を示した。M1145, M1153 などの他の GALR2 アゴニストについても検討を行ったが、GALP を凌駕するような殺細胞効果は得られなかった。

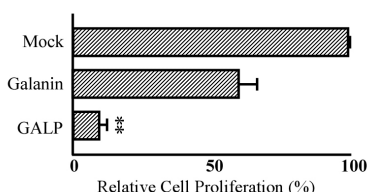


図2. GALR2特異的リガンドであるGALPは殺細胞効果を増強する。

### 3. アンタゴニスト別の情報伝達経路の解明.

情報伝達経路の検討は、GALR2 安定発現細胞株を用いて行った。UMSCC-1-GALR2 を Galanin で刺激したところウエスタンブロット法により MAP キナーゼ経路および PI3K/Akt の抑制が認められた。更に、GALP で刺激した場合には Galanin 刺激と同様に MAP キナーゼ経路の抑制と PI3K/Akt の抑制が認められたが、PI3K/Akt の抑制は Galanin より低濃度から認められた。JAK-STAT 経路については有意な変化を認めることができなかった。

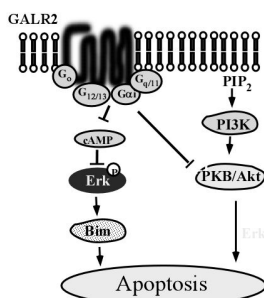


図 3. GALR2のアポトーシス誘導経路

### 4. GALR2 の細胞周期停止およびアポトーシス誘導効果.

細胞周期停止を BrdU の取り込みで検討した。安定細胞株による検討でも AAV ベク

ターを用いた一過性発現による検討でも GALR2 が発現した細胞に Galanin 刺激を行うと有意に BrdU の取り込みが減少した。更に、GALP で刺激した場合でも BrdU の取り込みが有意に減少した。この一方で、細胞周期関連蛋白の変化では AAV ベクターで遺伝子導入した際にも p27 の発現上昇および Cyclin D1 の発現減少が認められた。更に、rAAVGALR2HAiresGFP による PI3K/Akt の抑制はアネキシン-V および活性化カスパーゼ-3 の上昇を認めた。GALP 刺激した際にも同様の効果を認めた。このため GALP 刺激は細胞周期停止およびアポトーシス誘導効果の両方をもつことが示された。

### 4. セツキシマブ存在下の GALR2 の細胞増殖抑制効果と情報伝達経路の解明.

頭頸部癌に対する唯一の分子標的治療薬であるセツキシマブの存在下で UMSCC-1, UMSCC-2, UMSCC-6 の細胞培養を行ったが増殖能に関して有意な変化を認めることができなかった。このため GALR2 安定発現細胞株に対して、セツキシマブ存在下に Galanin 刺激および GALP 刺激を行ったところ両者とも単独の刺激と比較して有意な殺細胞効果の上昇が認められた。このためセツキシマブは GALR2 の殺細胞効果に対して何らかの効果を持つものと思われるがその機序に関しては不明である。更に、セツキシマブ存在下に MAP キナーゼ系および PI3K/Akt の GALR2 刺激後のウエスタン解析を行うと PI3K/Akt において発現抑制の増強効果が認められた。

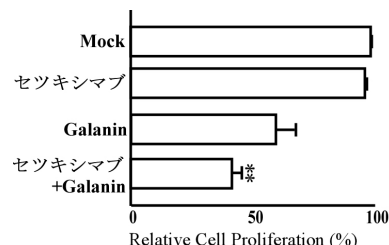


図 4. GALR2はセツキシマブの効果を増強する。

## 5. 研究成果のまとめ

1. リポフェクション法およびアデノ随伴ウイルスベクターを用いてGALR2の頭頸部癌細胞に対する遺伝子導入を行った。
2. GALR2 アンタゴニスト別の殺細胞効果の実験では、GALPにおいて強力な殺細胞効果を示した。
3. アンタゴニスト別の検討では、GALPにおいてPI3K/Aktの抑制効果が強かった。
4. 何れのアンタゴニストでもGALR2は差細胞周期停止作用とアポトーシス誘導作用が認められた。
5. セツキシマブの存在下では、GALR2の殺細胞効果に対するセツキシマブの増強効果が認められた。

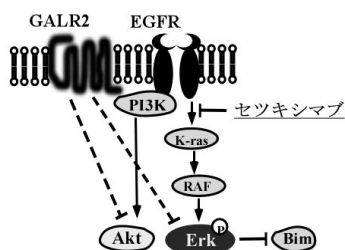


図5. 予想されるセツキシマブとGALR2の相互作用

### 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 1 件)

1. Kanazawa T, Misawa K, Misawa Y, Uehara T, Fukushima H, Kusaka G, Maruta M, Carey TE. G-Protein Coupled Receptors: Next Generation Therapeutic Targets in Head and Neck Cancer? *Toxins*. 7: 2959-84, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kanazawa T, Misawa K, Galanin Receptor 2 Utilizes Distinct Signaling Pathways to Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis in HNSCC. 9th International Conference on Head and Neck Cancer. Seattle, July 16-20, 2016.
2. Kanazawa T, Uehara T, Misawa K,

Mizukami H, Suicide gene therapy using AAV/GALR for head and neck cancer cells. ESGCT and FSGT Collaborative Congress. Helsinki, September 17-20, 2015.

〔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

金澤文治 (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

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

三澤 清 (Misawa, Kiyoshi)  
浜松医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90334979

#### (4) 研究協力者

( )