

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 24 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：2008 年度 ~ 2010 年度

課題番号：20592027

研究課題名（和文）頭頸部癌における Galanin 受容体 2 型の役割と情報伝達経路の解明

研究課題名（英文）

Galanin Receptor subtypes 2 as therapeutic targets in Head and Neck Squamous cell Carcinoma

研究代表者

金澤文治 (Takeharu Kanazawa)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336374

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌の治療成績は未だ十分ではなく有効な治療法の開発が必要である。本研究は、頭頸部癌に対する頭頸部癌の発癌に重要な遺伝子を同定し、この機能および情報伝達過程を解明することにより、新たな分子標的治療の開発に役立てようとするのが目的である。これまでの研究で Galanin の受容体の 3 つの受容体 (GALR1-3) のうち GALR1 は細胞周期を停止して細胞増殖を抑制することを見出したがアポトーシスの誘導は認められなかった。しかしながら中枢神経系では外傷後に Galanin の発現が急速に高まり、その後アポトーシスが誘導されることが知られている。このため Galanin のアポトーシスの誘導は GALR2 または GALR3 を介していると思われる。今回、GALR2 を頭頸部癌細胞に遺伝子導入し、GALR2 単独の機能および情報伝達経路を観察し、治療遺伝子としての可能性を検討した。研究代表者らは GALR2 発現プラスミドを作成し、これを頭頸部癌に遺伝子導入し GALR2 発現細胞株を樹立した。これらを Galanin で刺激したところ GALR2 発現細胞株では著明な細胞死が認められ GALR2 は頭頸部癌においてアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

更に、GALR2 の情報伝達経路を確認したところカスパーゼの阻害剤 (DEVD) を前処置することにより GALR2 による細胞死は一部抑制することができた。また、GALR2 発現細胞株を Galanin 刺激すると MAPK の活性化が認められた。更に、GALR2 は cyclin D1 の発現を抑制するが、この抑制反応は MAPK の特異的阻害剤 (U0126) を前処置することにより解除された。しかしながら、U0126 による GALR2 依存性細胞死の抑制は一部にとどまった。以上の結果より、GALR2 は細胞周期停止およびアポトーシス誘導の二つの作用を持つがこれらはそれぞれ異なる情報伝達系を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Purpose: Galanin and its receptors, GALR1 and GALR2, are known as tumor suppressor and focused as therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Previously, we demonstrated that the function of signaling pathways of GALR1 and GALR2. In HNSCC cells with silenced GALR1 and GALR2, we showed that reexpressed GALR1 suppressed tumor cell proliferation via the extracellular-regulated protein kinase-1/2 (ERK1/2)-mediated effects on the cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) and cyclinD1. On the other hands, in the GALR2-transfected HNSCC cells, galanin suppressed proliferation and induced apoptosis. Galanin stimulation also mediated decreased expression of cyclin D1 and increased expression of the CKI, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}. These effects were similar to GALR1, but GALR2 also induced caspase-3-dependent apoptosis, which was confirmed by Annexin-V staining and DNA fragmentation analysis. Thus, we understood the function of GALR1 and GALR2 as tumor suppressor, but the signaling pathway of GALR2 is still unclear. In this study, we investigated the signaling pathway of GALR2 in HNSCC cells that have mutant p53 and do not express GALR1. **Experimental Design:** The HNSCC cell line with a splice site mutation causing a 46-bp p53 off-frame deletion, was stably transfected to express GALR2 and examined the expression of phospho-ERK1/2 by immunoblotting. **Results:** Galanin treatment of the

GALR2-transfected cells caused morphologic changes and a marked decrease in cell number that were not observed in the mock transfected cells. In the GALR2-transfected cells, galanin induced activation of the extracellular-regulated protein kinase-1/2 (ERK1/2) and suppresses cell proliferation, not the mock-transfected cells. Galanin stimulation also mediated decreased expression of cyclin D1. Pretreatment with the ERK1/2-specific inhibitor U0126 prevented the suppression of cyclin D1 expression. **Conclusion:** This study shows that reexpressed GALR2 also suppresses tumor cell proliferation via the almost same pathway for GALR1. However, the ERK1/2-specific inhibitor could not prevent the GALR2 mediated apoptosis. This study suggest that GALR2 uses the different signaling pathways to induce apoptosis or cell cycle arrest, but further investigations are need to understand the GALR2 signaling pathway in detail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：GALR2, G 蛋白共役受容体, 癌抑制遺伝子, 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌を癌抑制遺伝子を利用して治療しようとする試みは、米国では、p53 遺伝子を用いた遺伝子治療として行われており一定の成果が認められている。しかしながら p53 遺伝子治療もすべての症例に有効というわけではなくその作用機所も十分には理解されていない。 Galanin とその受容体は、先に述べたように神経系で重要な働きをしていることが知られているが、癌細胞に対する働きに関しては不明である。研究代表者および協力者のこれまでの研究で Galanin 受容体のうち GALR1 が細胞周期に関連し細胞増殖を抑制することを示したが、 GALR2 や GALR3 に関しては未だ不明である。このため GALR2 の癌細胞における機能解析や情報伝達経路の解析は本研究の独創的な点と言える。また、 GALR1 そのものを治療に用いるばかりでなく、 GPCR の薬理学的重要性から、 GALR2 の

機能・情報伝達系の解析は GALR2 またはその関連遺伝子を調整する薬剤の発見や応用につながり、 GALR1 との関連も含めて、頭頸部癌治療に新たな薬物を参入させる理論的背景となり得る。また、本研究により標準化された知見は、他の GPCR でも応用可能と思われ GPCR 刺激による頭頸部癌治療の可能性を探る良いモデルと思われる。

2. 研究の目的

本研究は、頭頸部癌に対する頭頸部癌の発癌に重要な遺伝子を同定し、この機能および情報伝達過程を解明することにより、新たな分子標的治療の開発に役立てようとするのが目的である。これまでの研究で Galanin の受容体の3つの受容体 (GALR1-3) のうち GALR1 は細胞周期を停止して細胞増殖を抑制することを見出したがアポトーシスの誘導は認められなかつ

た。しかしながら中枢神経系では外傷後に Galanin の発現が急速に高まり、その後アポトーシスが誘導されることが知られている。このため Galanin のアポトーシスの誘導は GALR2 または GALR3 を介していると思われる。今回、GALR2 を頭頸部癌細胞に遺伝子導入し、GALR2 単独の機能および情報伝達経路を観察し、治療遺伝子としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

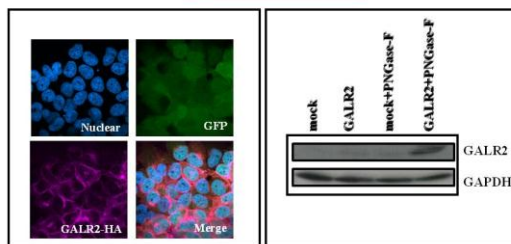
GALR2 は、これまでの研究代表者および共同研究者のデータから GALR1 より強力な癌抑制遺伝子である可能性が指摘されている。本研究では、GALR2 の機能および情報伝達経路の全容を解明するために以下の 3 つの部分からなる研究計画を立案した。

1. GALR2 発現プラスミドの構築と遺伝子導入, 安定発現細胞株の樹立。
2. GALR2 発現細胞株の機能解析。
3. GALR2 のアポトーシス誘導経路の解明。

4. 研究成果

1. GALR2 発現プラスミドの構築と遺伝子導入, 安定発現細胞株の樹立。

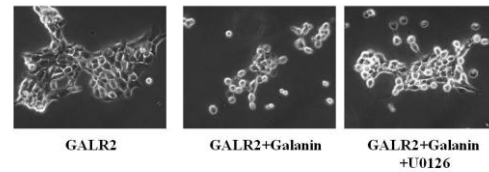
Galanin Receptor type 2 Expression in Transfected Cells



This slide shows GALR2 expression in parental and transfected cells. In right panel, GALR2 expression was seen in the GALR2 expression vector transfected cells, but not mock transfected cells. In left panel, all cells were GFP and GALR1 positive, and GALR1 localized to the cytoplasmic membrane.

2. GALR2 発現細胞株の機能解析。 (GALR2 によるアポトーシスの誘導)

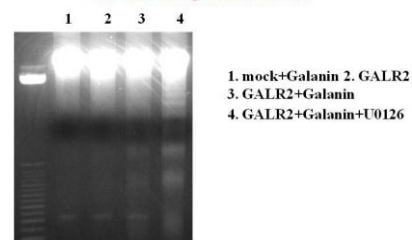
Effect of galanin and signaling inhibitors on Morphologic Changes



This slide shows the effect of inhibitors for the morphologic change of galanin treated cells. After galanin treatment, GALR2 expressing cells underwent obvious morphologic changes, but the effects were not cancelled out by U0126.

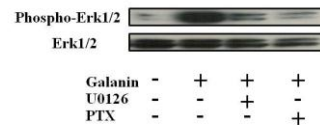
3. GALR2 のアポトーシス誘導経路の解明。

Effect of galanin and signaling inhibitors on DNA Fragmentation



This slide shows the effect of inhibitors for DNA fragmentation of galanin treated cells. After galanin treatment, GALR2 expressing cells induced obvious DNA fragmentation, but the effects were not cancelled out by U0126.

Effect of Galanin and signaling inhibitors on ERK1/2 activation in UM-SCC-1-GALR2



Since GALR2 activates Erk and inhibits cell proliferation, we investigated if Erk activation is required for inhibition of cell proliferation and determined this pathway used for this effect. U0126 and PTX pretreatment each blocked GALR1-induced Erk activation.

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)

Kanazawa T, Misawa K, Carey TE. Galanin receptor subtypes 1 and 2 as therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. **Expert Opin Ther Targets** 14: 289-302, 2010.

[学会発表] (計 1 件)

Kanazawa T, Carey TE. GALR2 has the Different

Signaling Pathway to Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis in p53 Mutant Head and Neck Cancer Cells. 102th Annual Meeting American Association for Cancer Research. Orlando, April 2-6, 2011.

〔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

金澤 丈治 (Takeharu Kanazawa)
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 (Keiichi Ichimura)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：00010471

西野 宏 (Hiroshi Nishino)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50245057

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：