

令和元年9月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11064

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞を制御する網羅的遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of comprehensive gene regulation systems in oral cancer stem cells

研究代表者

安田 元昭 (YASUDA, MOTOAKI)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：90239765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HuRはARE mRNAを特異的に安定化させ、その発現が腫瘍の悪性度と相関することが報告されている。網羅的遺伝子検索の結果からHuRの活性化因子候補と考えられたHuBに注目し、口腔扁平上皮がんの分化度との関連性を検討した。低分化型口腔扁平上皮がん細胞株SASのHuB mRNA発現量は高分化型口腔扁平上皮がん細胞株HSC2に比較して圧倒的に高いことが示された。HSC2にHuBを導入したHSC2-HuBでは、HuBがHuRを核外輸送していることが確認された。また、ヌードマウスへの移植実験により、HSC2-HuBでは、親株に比較して、角化傾向が抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ELAVL1/HuRはARE mRNAを特異的に安定化させ、その細胞質局在が悪性腫瘍症例の予後と相関することが報告されている。今回、悪性型がん細胞株では神経特異的なELAVL2/HuBが発現しており、HuBとHuRが複合体を形成して核外移行することによりがん幹細胞性が維持されている可能性が示された。このメカニズムは口腔扁平上皮がんのがん幹細胞制御の新たな標的になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：HuR has been shown to stabilize ARE mRNA. Clinicopathological reports have demonstrated that the higher expression of HuR is one of the important prognostic factors of malignant tumor cases. In the present study, we found the novel functions of HuB, a neuron specific ELAV member, in oral squamous-cell carcinoma cell lines. The lower differentiated squamous-cell carcinoma cell (SAS) expressed a higher amount of HuB mRNA whereas the highly differentiated squamous-cell carcinoma cell (HSC2) expressed only a small amount of HuB mRNA. On the other hand, HuB transfected HSC2 (HSC2-HuB) showed an obvious nuclear export of HuR in the HuB dependent manner. The higher expressions of ARE mRNAs were observed in HSC2-HuB cells which expressed exogenous HuB. We also demonstrated that HSC2-HuB showed a modest keratinization morphology compared with parental HSC2 cells.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：口腔がん 非翻訳領域 Hu タンパク質

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞が最も重要な治療対象であることは近年の医学的合意事項の一つであり、口腔扁平上皮がんにおいても同様のがん幹細胞が存在すると考えられる。がん幹細胞の形質維持は他の正常幹細胞同様、転写因子による遺伝子スイッチの ON/OFF (エピゲノム変異も含めて) によって制御されていると考えられるが、未だ詳細な分子機構は明らかではない。

一方、4つの転写因子(山中4因子)の強制発現が体細胞の初期化(iPS細胞化)に必要十分であるという驚くべき事実は、がん幹細胞を含めた幹細胞の形質維持には複数の転写因子の発現量調節が重要であることを示唆している。

我々はこれまでの放射線耐性がん細胞株の検討から、高転移性がん細胞株は“がん幹細胞に近い形質を持つ”、あるいは高転移性がん細胞株では“全体に占めるがん幹細胞の割合が高い”と考えている。この仮説が正しければ、我々が見出した、高転移株にみられる一群の転写因子の UTR を介した網羅的調節機構は、がん幹細胞性維持において重要な“上位の”調節メカニズムである可能性は高い。

2. 研究の目的

上述のごとく、幹細胞性維持に関与する転写因子の一群においては、その mRNA UTR に RNA 結合性タンパク質が結合し、そのタンパク質発現は正または負に制御されている。これら転写因子群 mRNA の UTR に特異的に結合するタンパク質は、より“上位”の網羅的調節因子とみなすことができる。本研究計画ではこれらタンパク質候補のクローニングを到達目標とする。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞(様)細胞からの候補遺伝子検索(安田・東野): 樹立済みのがん幹細胞(様)

細胞候補と親株の間でマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを行い、候補遺伝子の絞り込みを行う。候補の選別には RNA 結合性を第一の指標としていく。他の ES 細胞の遺伝子発現データベースとの比較も行う。

(2) 候補遺伝子の強制発現による形質発現変化の解析(安田): (1)にて生物活性が確認された候補遺伝子を高分化型扁平上皮がん、あるいは低転移性が証明されているがん細胞株に導入し、どのような形質発現変化が起こるかを詳細に解析する。また候補遺伝子の下流にある幹細胞制御因子のクローニングも行う。

(3) 候補遺伝子の強制発現による病理組織学的変化の解析(東野):(2)にて得られた細胞株をヌードマウス皮下移植し、親株に比較してどのような組織学的発現変化が起こるかを検討する。

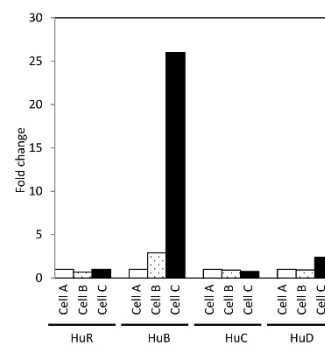
4. 研究成果

(1) HuB は悪性腫瘍にて特異的に発現が亢進している。

生物学的悪性度が異なることが明らかな三種のがん培養細胞をマイクロアレイにて解析したところ HuR のホモログである HuB は生物学的に悪性度の高い Cell C において有意に発現が高いことが網羅的遺伝子発現解析により明らかとなった。

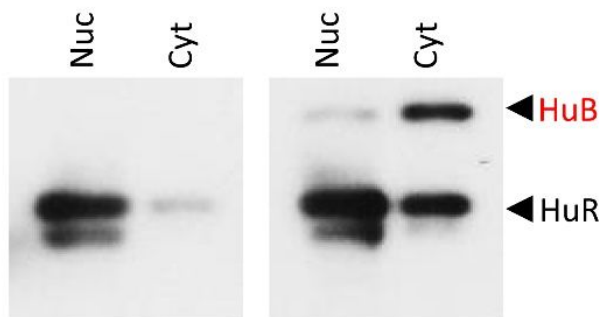
(2) HuB は HuR を核外輸送することができる。

多くの論文において、正常細胞や悪性度の低い腫瘍では HuR が核に局限し、悪性度が高い腫瘍では HuR が細胞質へと輸送されていることが報告されている。今回 HuB には HuR と

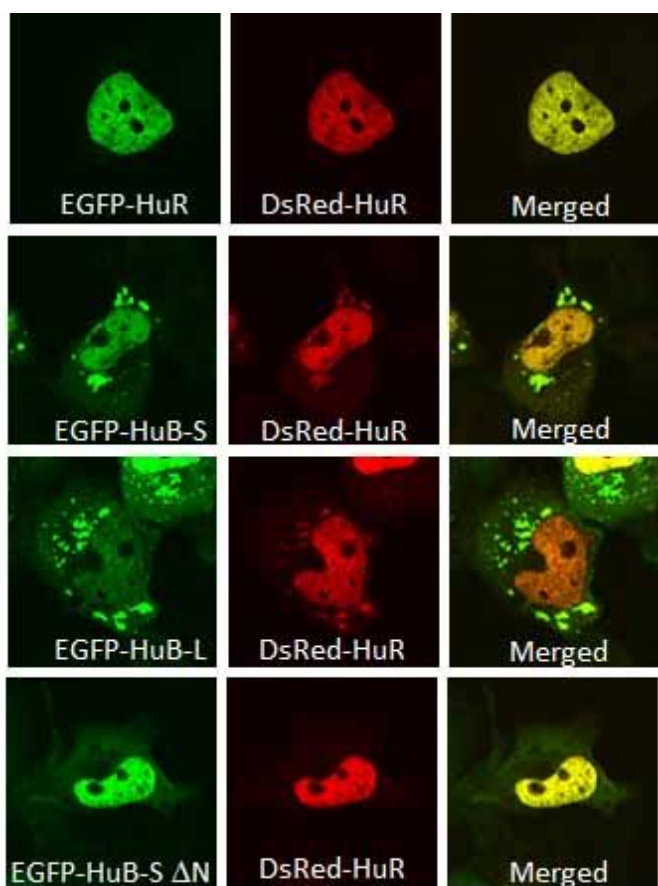


種のがん培養細胞をマイクロアレイにて解析したところ HuR のホモログである HuB は生物学的に悪性度の

結合し、HuR を核外輸送する能力があることが示された。

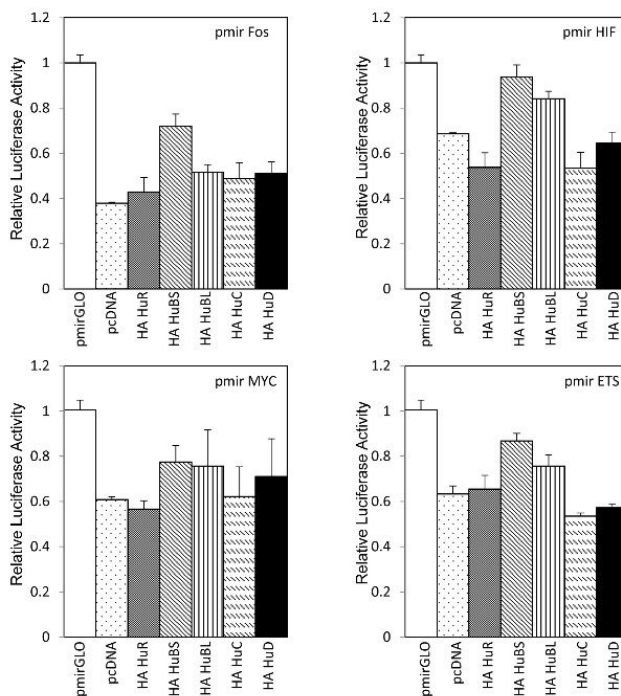


※Nuc:核画分 Cyt:細胞質画分



また、興味深いことに同じく HuR のホモログである HuC や HuD には HuB と同等の活性がみられず、HuB は特異な能力を持つ分子であることが推測された(下図)。

この図は Hu ファミリーをそれぞれ発現した場合の ARE mRNA の安定化を定量化したものである。HuB にのみ有意な活性が見られる。

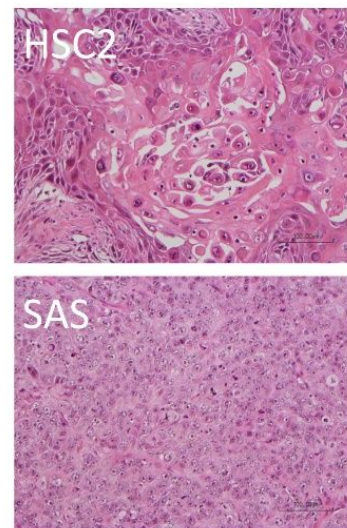
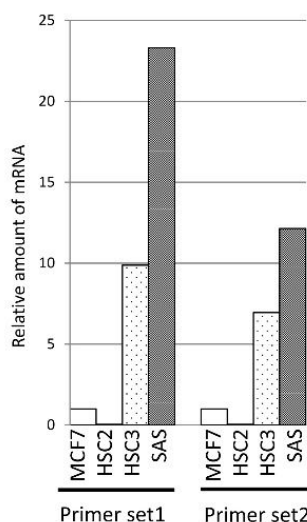


(3) 低分化型口腔扁平上皮がんでは高分化型口腔扁平上皮がんよりも HuB の発現が亢進している。

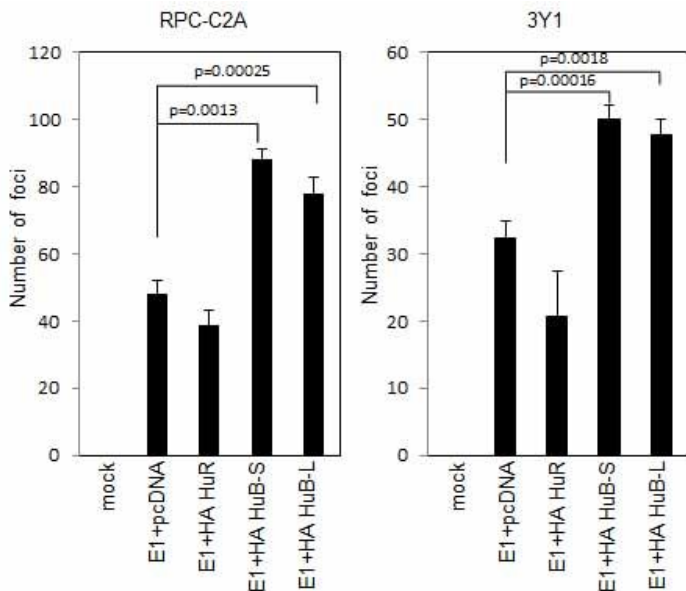
Real Time PCR による HuB 発現と腫瘍の病理組織学的分化度を図に示す。

HE 染色像に見られるごとく、HSC2 は高度の角化を伴う高分化型であり、SAS はほとんど角化のみられない低分化型扁平上皮がんである。両者の HuB mRNA 発現量比は数百倍に達している。

RealTime PCR for HuB



(4) HuB による HuR 核外移行はアデノウイルス E1 がん遺伝子による正常細胞のがん化を助長した。



正常ラット線維芽細胞 RPC-C2A および 3Y1 のトランスフォーム実験の結果を図に示す。

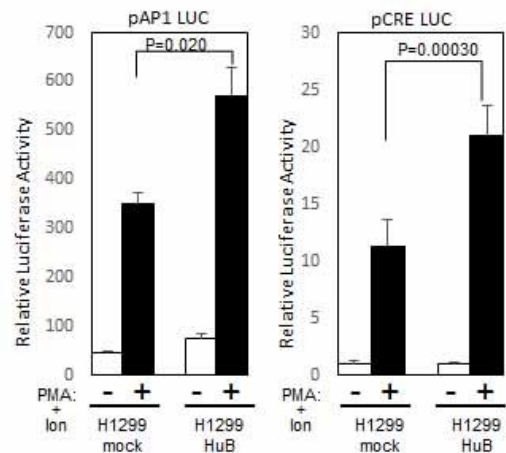
図のごとく、アデノウイルス E1 による正常ラット細胞の形質転換効率は HuB 添加により優位に上昇していたが、HuR 添加は相乗効果を示さなかった。アデノウイルス E1A は多様ながん遺伝子の転写を活性化することが知られているが、HuR の核外移行により 3' UTR に ARE を有する発がん遺伝子 mRNA (c-Fos, c-Myc など) が安定化したことによると考えられた。

(5) mRNA 安定化による発がん遺伝子カスケードの活性化

mRNA 安定化がレポーターシステムの活性化に反映されるか否かを Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) による刺激前後のレポータールシフェラーゼ活性の比較により確認した。

使用した細胞はヒト肺がん細胞 H1299 と同細胞に HuB を強制発現させた H1299 HuB 株である。これら細胞に AP1, CRE ルシフェラーゼリポーターを導入し、PMA で刺激後にアッセ

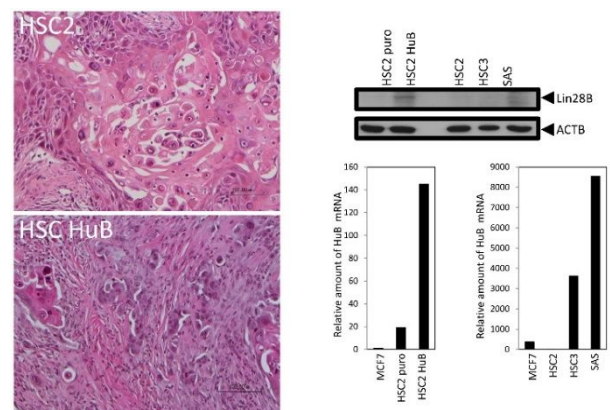
イを行った。図に示すように、H1299 HuB にお



ける発光量は優位に上昇しており、HuB の異所的発現は、細胞内のがん遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。

(6) HuB の導入により、高分化型扁平上皮癌の分化度が変化する。

図は親株 HSC2 と HuB を導入した HSC-HuB をそれぞれ、ヌードマウス皮下に移植して形成された腫瘍塊の病理組織像である。 ELAVL2

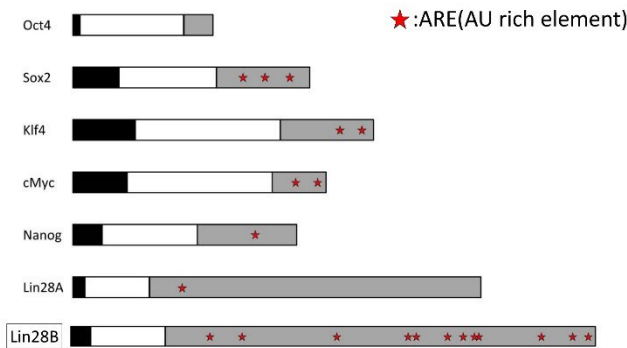


を強制発現した HSC-HuB では、ARE 配列を有する遺伝子の発現亢進が認められ、中でも幹細胞性の制御に関わり 3' UTR に ARE を有する Lin28B は HuB の強制発現により発現が上昇していた。ヌードマウスに移植した HSC-HuB では、角化傾向の低い腫瘍胞巣が多数認められ、HuB が口腔扁平上皮癌の分化に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

(7) 幹細胞制御因子群は 3' UTR を介して発現調節されている可能性が高い。

下図は山中/トムソン因子及び我々が見出し

た Lin28B の塩基配列の模式図である。



図に示すごとく山中/トムソン因子は Oct3/4 を除くすべてが 3' UTR に ARE 配列を有している。興味深いことに、LIN28 のホモログである Lin28B はこれらよりも多くの ARE を有しており、HuB の導入によりその発現は有意に上昇した。Lin28(Lin28A)は、線虫で発見されたタンパク質で、CSDD1 と呼ばれる。ヒトにおいては Lin28 は胚性幹細胞で発現しており、分化の際は発現レベルが減少することから、ヒト胚性幹細胞の未分化マーカーとして用いられる。Hao Zhu は恒常的に Lin28A を発現する遺伝学的改変マウスを作製した。Lin28A は、通常、発生中の胚でしか発現していながこのマウスは、常に少量の Lin28A を発現している。Lin28A は、幹細胞機能およびがんに関与することから、これまでも注目を集めてきた。今回、この Lin28A が、胎仔だけでなく成体になった後でさえも、組織修復能を向上させることが示され、2013 年 11 月 7 日に Cell に発表された 1。生涯にわたって Lin28A を産生するよう遺伝学的改変されたこのマウスは、野生型マウスよりも毛の成長が速く、耳にパンチで開けた穴に至ってはほぼ完全にふさがった。Lin28A と Lin28B のアミノ酸配列を比較すると、約 80% のアミノ酸配列が保存されていることがわかる。

(8) HuB は口腔がん幹細胞における新たな標的分子である。

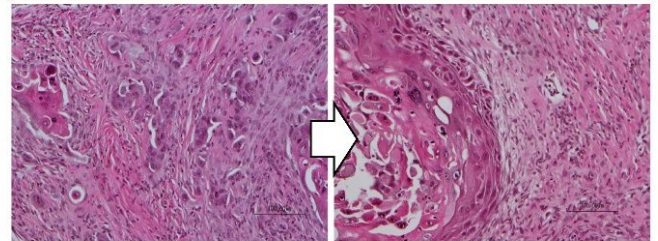
HuB は ARE mRNA を安定化する。今回の研究により、このような安定化を受ける分子の一つに Lin28B が含まれることが明らかとなっ

た。下の模式図に示すごとく、がん幹細胞の形質維持には多くの遺伝子が関与していることが報告されているが Lin28B はこの中の有望な標的分子であることが示唆された。今後は特異的に Lin28B を介したがん幹細胞性維持機構をさらに詳細に検討しより効果的な口腔がん幹細胞の制御法を模索していくことが有望な研究の方向性であると考えられた。

より効率的ながん幹細胞の制御



より上流の因子を抑制することは標的分子数の減少を意味する



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 4 件)

Hatanaka T, Higashino F, Tei K, Yasuda M. The neural ELAVL protein HuB enhances endogenous proto-oncogene activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2019 Sep 17;517(2):330-337. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.089.

Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, Ohiro Y, Totsuka Y, Shindoh M. ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. *Oncol Lett.*、査読有、2017 Jan;13(1):321-328.

Ishihara S, Yasuda M, Ishizu A, Ishikawa M, Shirato H, Haga H. Activating transcription factor 5 enhances

radioresistance and malignancy in cancer cells. Oncotarget. 、 査 読 有 、 2015 Mar 10;6(7):4602-14. PMID: 25682872 PMCID: PMC4467102 DOI: 10.18632/oncotarget.2912
Yasuda M, Hatanaka T, Shirato H, Nishioka T. Involvement of UTR-dependent gene expression in the maintenance of cancer stem cell like phenotypes. Oncol Lett. 、 査 読 有 、 2015 Nov;10(5):3171-3176. PMID: 26722307

〔学会発表〕(計 4 件)

畑中知之、安田元昭 HuB による HuR 核外輸送と腫瘍悪性化 北大・部局横断シンポジウム 2016 年

安田元昭、畑中知之、東野史裕 アデノウイルス E4 orf4 による後期遺伝子の新規翻訳活性化機構 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年

温田 晃弘、安田 元昭、芳賀 永 様々ながん細胞株の浸潤における転写 因子 ATF5 の役割 第 75 回 日本癌学会学術総会 2016 年

畑中知之、安田元昭、三河洋平、東野 史裕、進藤正信、鄭 漢忠 RNA 結合タンパク質 HuB による口腔 扁平上皮がんの分化制御 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2015 年

〔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

安田元昭 (YASUDA, Motoaki)

北海道大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：90239765

(2)研究分担者

東野史裕 (HIGASHINO, Fumihiro)

北海道大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：50301891

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()