

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390505

研究課題名（和文）

RNA結合タンパクのノックダウンによる口腔がん治療のための基礎研究

研究課題名（英文）

Basic research for cancer therapy by knockdown of RNA binding protein

研究代表者

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50301891

研究成果の概要（和文）：

HuRは細胞増殖などに関連するARE-mRNAを核外輸送及び安定化するRNA結合タンパクである。本研究では、口腔がん細胞のHuRをノックダウンすることにより、ARE-mRNAの核外輸送及び安定化が抑制され、細胞周期を促進するタンパクの発現が減少し、足場非依存的な細胞増殖能などの悪性形質も減弱することが明らかになった。これらの結果はHuRノックダウンが口腔がんの治療に応用可能であることを示している。

研究成果の概要（英文）：

HuR is RNA binding protein which can protect ARE-mRNA from rapid degradation. In this study, we show that HuR-knockdown can change the malignant features of oral cancer cell. The findings show the potential of HuR-knockdown as an effective therapeutic approach.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

HuRはショウジョウバエが持つELAV familyに属するタンパクのうちの一つで、AU（アデニン、ウラシル）-rich element (ARE) を持つmRNAに特異的に結合する。AREは細胞の増殖に関わる遺伝子のmRNAに存在し、AREを持つmRNAは通常合成後すぐに分解されるが、heat shockなどの刺激が細胞に加わると、AREにHuRタンパクがpp32や核外輸送タンパクCRM1を伴って特異的に結合し、ARE-mRNAをCRM1依存的に核外輸送し安定化する。

申請者らはアデノウイルスのE4orf6と呼ばれる発がんタンパクが、ARE-mRNAをCRM1非依存的に、強制的かつ恒常的に核外輸送・安定化し、しかもE4orf6の発がんに必要な領域がこの輸送・安定化に必要であることを明らかにした(Higashino et al., J. Cell Biol., 2005)。E4orf6はラットの細胞などを

がん化できるがん遺伝子産物で、がん細胞の悪性化にも関与することが知られている。従って申請者らの研究は、ARE-mRNAやそれに関わるRNA結合タンパクのHuRなどが、細胞のがん化やがん細胞の悪性化と強い関連を持つことを示唆している。

実際、大腸がんなどでHuRが恒常的に細胞質側に輸送されており、悪性度が高いほど輸送されているHuRの量が多いという報告があり(de Silanes et al., Oncogene, 2003)、これらの事実を総合して考えるとARE-mRNAに結合しているHuRタンパクが、細胞のがん化やがん細胞の悪性化に重要な役割を果たしているといえる。ARE-mRNAに直接結合しているのは、HuRのみで、他のタンパクはHuRを介してARE-mRNAとassociateしているにすぎない。従ってHuRを人工的に消失できれば、ARE-mRNAの輸送・安定化も停止でき、がん形

質が消失する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は口腔がん細胞で HuR の発現を RNAi 法でノックダウンし、その手法を口腔がんの治療に利用するための基礎的研究を行うことである。ノックダウンのために、RNAi 法用の siRNA の設計を行い、細胞に siRNA を導入して HuR の mRNA やタンパクの減少を確認し、さらに ARE-mRNA の核外輸送や安定化が阻害されるかどうか検討する。次に HuR がノックダウンされた細胞の性質、特にがんに関わる形質を様々な角度から検討する。また開発した RNAi の技術を最終的にはヒトへのがん治療への応用ができるように、shRNA を組み込んだアデノウイルスの開発も目的に含める。

3. 研究の方法

平成20年度

(1) RNAi法の確立

初年度はHuRのノックダウンに必要なsiRNAを設計・作成し、実際に口腔がん細胞に導入してみてHuRがノックダウンされるかどうか基礎的検討を行う。

① siRNAの設定

NCBIのデータベース等を検索し、HuRのノックダウンのためのsiRNAの設計を行う。

② siRNAの細胞への導入

設定したsiRNAが細胞中で実際にHuRの発現をノックダウンするかどうかを調べるために、口腔がん細胞 (HSC3、Ca9.22等) や口腔正常細胞 (HGF、PDL細胞等) にsiRNAを導入する。その後RT-PCR法でHuRのmRNAの有無を確認し、さらにウエスタン法でHuRタンパクの増減も検討する。

平成21年度

(2) HuRノックダウン細胞の性質検討

RNAiの技術で作成したHuRノックダウン細胞の性質を以下のように検討する。

① ARE-mRNAの輸送・安定化の確認

in situ hybridization法を用いて*c-fos*などのARE-mRNAを染色したり、ARE-mRNAの細胞質への蓄積を検討することにより核外輸送を確認する。また各細胞に蓄積したARE-mRNAの量を決めたり、各mRNAの半減期を検討することにより安定化を確認する。

② 細胞増殖活性の検討

HuRをノックダウンした細胞としていない細胞で、増殖速度等を決定する。

③ Cell cycleの検討

HuRをノックダウンした細胞が、細胞周期を停止しているかどうか、フローサイトメトリー (FACS) を用いて検討する。

④ コロニー形成能の検討

ソフトアガー中でコロニーを形成するかどうか検討し、足場非依存性増殖能を確認する。

⑤ ノードマウスで腫瘍形成能の確認

HuRをノックダウンした細胞をノードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討する。

平成22年度

(3) ベクターの開発

siRNAをデリバリーするアデノウイルスを構築する。

① アデノウイルスベクターの作成

Stratagene社製のアデノウイルスベクターpShuttle-H1に、設定したsiRNAをヘアピンループ構造で発現するような遺伝子を組み込み目的のベクターを構築する。

② アデノウイルスベクターの検証

口腔がん細胞に作成したアデノウイルスベクターを感染させ、HuRの発現がノックダウンされるか確認する。

③ ノードマウスを用いてアデノウイルスベクターの検証

ノードマウスに腫瘍を形成し、作成したアデノウイルスを投与し、その腫瘍にたいする効果を検討する。

4. 研究成果

(1) HuRノックダウン

HuRノックダウン用のsiRNA (5' -UUA CCA GUU UCA AUG GUC ATT-3') の設計を行い、口腔がん細胞のHSC-3、Ca9.22や正常細胞HGF (Human gingival fibroblast) にsiRNAを導入し、HuRタンパクのウエスタン法を行うことにより、HuRノックダウンを検討した。その結果、導入後少なくとも96時間はノックダウンの効果が持続し (Fig. 1)、この方

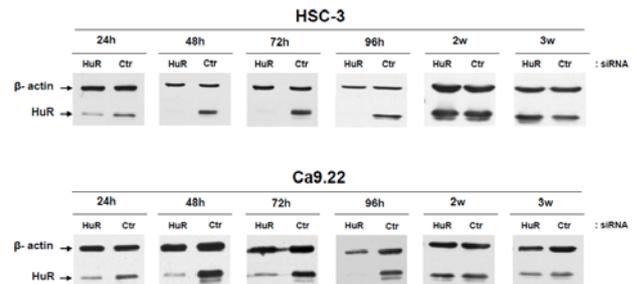


Fig. 1 HuRノックダウン

法が有用であることが明らかになった。

(2) HuRノックダウン細胞のARE-mRNAの核外輸送および安定化

HuRをノックダウンしたがん細胞を用いて、*c-fos*、*c-myc*、*COX-2*などのARE-mRNAの細胞質での発現を調べた。各細胞を核と細胞質に分離し、細胞質側のARE-mRNAの量を定量性real-time RT-PCR法で検討した。その結果、

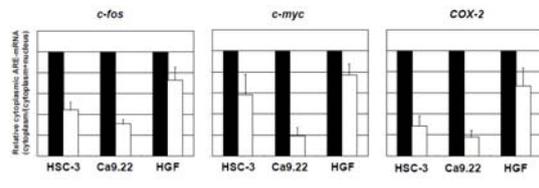


Fig. 2 HuRノックダウンによる細胞質のARE-mRNA量の変化

HSC-3やCa9.22などの口腔がん細胞ではHuRノックダウンにより各ARE-mRNAの量が顕著に減少し、正常細胞のHGFではあまり減少しなかった (Fig. 2)。また、同様の細胞を用いて *in situ* hybridization法により各mRNAの局在を検討した。HuRをノックダウンした細胞では、コントロールのsiRNAを導入した

細胞で観察できるような ARE-mRNA の細胞質への局在は見られず、主に核およびその周辺に各 mRNA は存在していた (Fig. 3)。これら

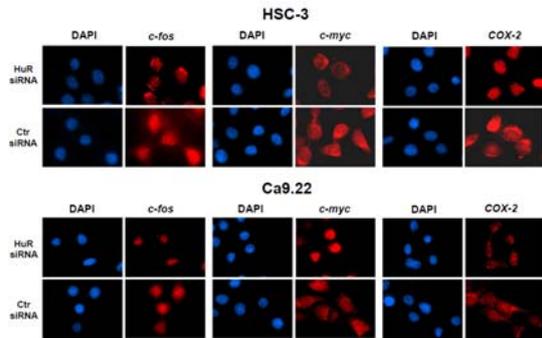


Fig. 3 HuRノックダウンによる細胞質のARE-mRNA量の変化の結果は、HuR をノックダウンすることにより口腔がん細胞の ARE-mRNA の核外輸送が阻害されることを示唆している。

次に、同様の HuR ノックダウン細胞を用いて、ARE-mRNA の安定化を検討した。細胞をアクチノマイシンDで処理して、全ての遺伝子の転写を停止した後、時間を追って各 ARE-mRNA の定量を行い、それぞれの半減期を求めた。その結果、HuR ノックダウンした HSC-3 と Ca9.22 細胞の *c-myc*、*COX-2* の半減期 (それぞれ 27.8、20.01、22.8、28.0 min)

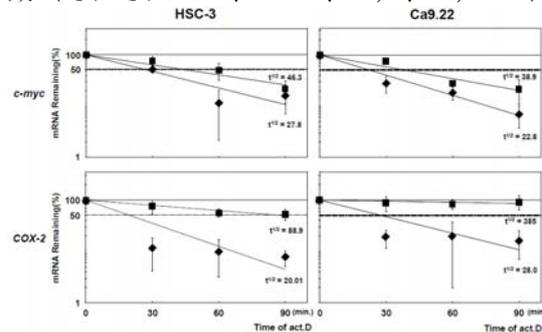


Fig. 4 HuRノックダウンによるARE-mRNA安定化の変化は、コントロール siRNA を導入した細胞のそれ (それぞれ 46.3、88.9、38.9、38.5 min) より短くなることが明らかになった (Fig. 4)。この結果は、HuR をノックダウンすることにより口腔がん細胞の ARE-mRNA の安定化が阻害されることを示している。

(3) HuR ノックダウン細胞の性質検討
①足場非依存性増殖能に対する影響

HuR をノックダウンした口腔がん細胞の性

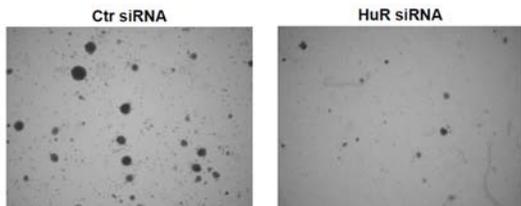


Fig. 5 HuRノックダウンによる足場非依存性増殖能の変化を調べるため、ソフトアガーを用いて各細

胞のコロニー形成能を検討した。コントロールの siRNA を導入した HSC-3 細胞は多くのコロニーを形成したが、それと比べて HuR をノックダウンした HSC-3 を使った実験ではコロニー数が激減し、しかもそれぞれより小さなコロニーしか形成できなかった (Fig. 5)。この結果は、HuR をノックダウンすることにより口腔がん細胞の足場非依存性増殖能が低下することを意味している。

次に、この増殖能低下の原因を探る目的で、HuR ノックダウン細胞で発現している細胞周期調節タンパク、サイクリン (Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1) と Cyclin dependent kinase (Cdk1) を量を検討した。各タンパク量は、コントロール細胞に比べて HuR ノックダウン細胞では減少していた (Fig. 6)。こ

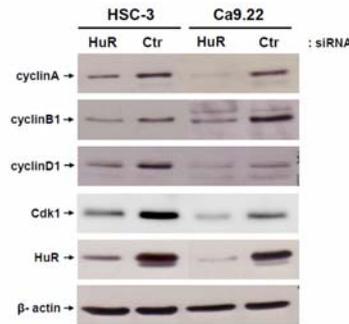


Fig. 6 HuRノックダウンによる細胞周期調節タンパクの変化これらのタンパクの中で Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1 は、その mRNA に ARE を所持しているため、HuR ノックダウンにより Fig. 3 に示したようにそれら mRNA の安定化が阻害されタンパク量も減少することが予想されるが、Cdk1 に関しては mRNA に ARE がないため、タンパク量が低下した理由が不明である。そこ

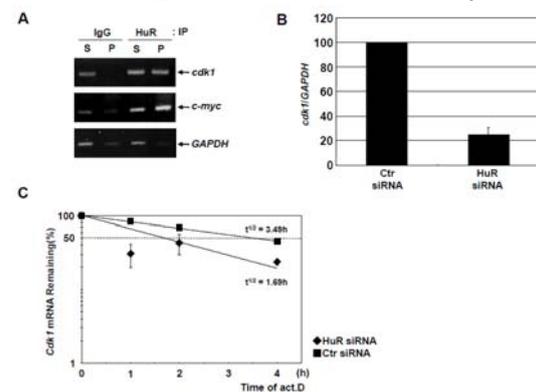


Fig. 7 Cdk1 mRNAとHuRとの結合および安定化で、*Cdk1* mRNA に HuR が結合しているかどうかを RNP-IP 法 (RIP 法) によって解析した。Fig. 7A に示すように、HuR 抗体で免疫沈降したサンプル (P のレーン) の中には *Cdk1* mRNA のバンドが確認され、ARE-mRNA である *c-myc* 同様 *Cdk1* mRNA にも HuR が結合していることが明らかになった。さらに、HuR ノッ

クダウンによる *Cdk1* mRNA の安定化を検討したところ、その蓄積量は HuR ノックダウンにより低下し (Fig. 7B)、さらに半減期も短くなった (Fig. 7C)。これらの結果は、HuR ノックダウンにより本来なら安定化される細胞周期調節関連遺伝子の mRNA の発現が抑制されることにより、口腔がん細胞が持つ足場非依存性増殖能が減弱することを示唆している。

②運動能・浸潤能に対する影響

HuR をノックダウンした口腔がん細胞の運動能を検討した。スクラッチアッセイにより、Ca9.22 細胞の運動能を調べたところ、コントロール siRNA を導入した細胞では 36 時間後にはほぼスクラッチ部が閉じていたが、HuR ノックダウン細胞ではまだ 50%程度しか閉じていなかった (Fig. 8A, B)。この結果は、

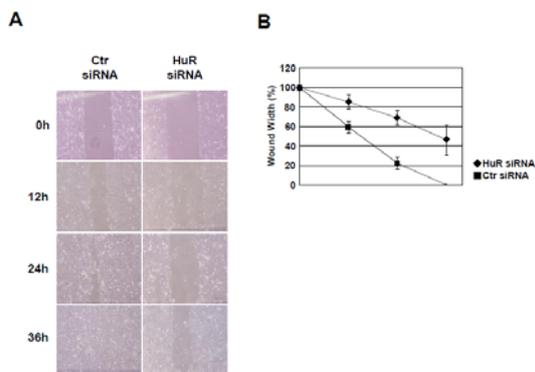


Fig. 8 HuRノックダウンによる運動能の変化

HuR をノックダウンすることにより口腔がん細胞の運動能が低下することを示している。

次に、HuR ノックダウン細胞の浸潤能を解析した。マトリゲルチャンバーを用いて浸潤能を検討したところ、ポジティブコントロール

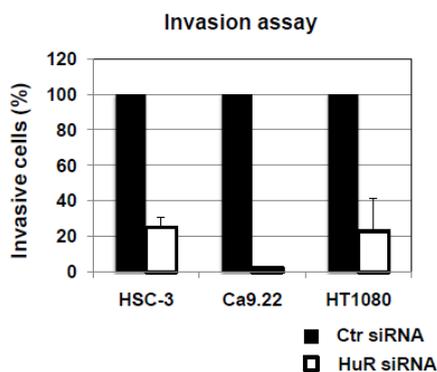


Fig. 9 HuRノックダウンによる浸潤能の変化

ルの HT1080 細胞同様、口腔がん細胞も HuR のノックダウンにより浸潤能が大幅に低下した (Fig. 9)。この浸潤能低下の原因を解析するために、がん細胞の浸潤活性に重要な役割を果たす、マトリクスメタロプロテアーゼの一種 MMP1 の転写を検討した。MMP1 の転

写調節領域を持つルシフェラーゼリポーターを各細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより MMP1 の転写活性を調べた。その結果、HuR をノックダウンしたがん細胞では MMP1 の転写活性が落ちていることがわかった (Fig. 10)。さらに、MMP1 の転写活性を調

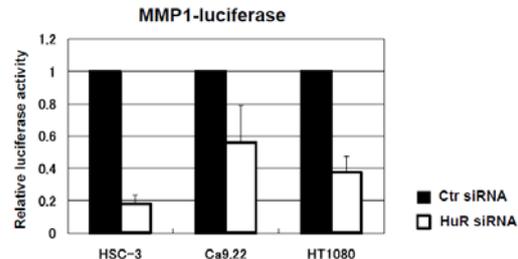


Fig. 10 HuRノックダウンによるMMP1転写の変化

節することが知られている転写因子 AP-1 (*c-fos*, *c-jun*)、Ets family (*Ets-1*, *ELI1*) の HuR ノックダウンがん細胞での発現を調べるために、それらの mRNA の量を定量性 real-time RT-PCR 法で検討した。各 mRNA は HuR ノックダウン細胞でその蓄積が減少していることが解明された (Fig. 11)。これらの

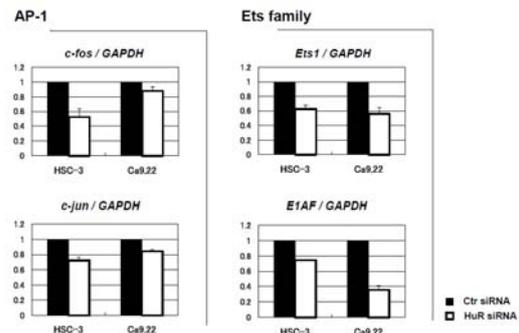


Fig. 11 HuRノックダウンによる転写因子AP-1、Ets family 転写因子のmRNA量の変化

結果は、HuR ノックダウンにより AP-1 や Ets family などの転写因子の発現レベルが下がることにより、MMP1 の転写レベルが下がり、さらに浸潤能が低下していることを示唆し

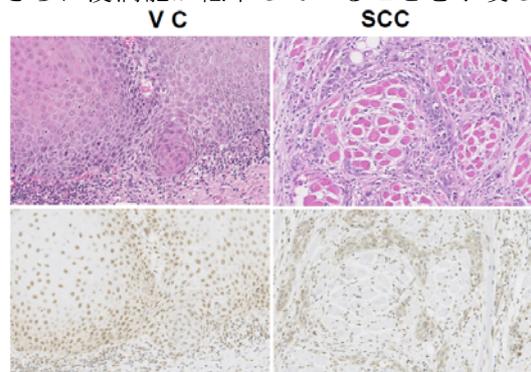


Fig. 12 浸潤能の低いゆうぜい性がん(VC)と高い扁平上皮がん(SCC)組織のHuR局在

ている。

HuR の局在とがん細胞の悪性度に相関があ

るか調べるため、浸潤能の低いゆうぜい性がん (verrucous carcinoma ; VC) と浸潤活性の高い扁平上皮がん (squamous cell carcinoma ; SCC) の組織を HuR 抗体を用いて染色した。VC ではほぼ核のみに HuR が局限して存在しているのに対して、SCC では細胞質にも多くの HuR が認められた (Fig. 12)。この結果は、がん細胞の浸潤活性と HuR の局在には相関があることを示している。

(4) HuR ノックダウン用のベクター作成

当初の計画では、HuR ノックダウン用のアデノウイルスベクターを作成することを目的としていたが、アデノウイルスに HuR ノックダウン用の shRNA を挿入することができず、代わりに shRNA 発現用の pSUPER プラスミドを用いて、HuR ノックダウン用の発現ベクターを作成した。この発現ベクターをウイルスがん遺伝子 (アデノウイルス E4orf6) でがん化したラット細胞に導入し、恒常的に HuR ノックダウン用の shRNA が発現される細胞が構築できた (Fig. 13A)。この細胞の *c-fos* mRNA

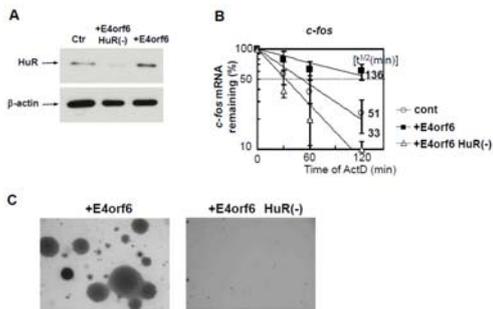


Fig. 13 HuRノックダウン用のベクターを導入したがん細胞の性質の半減期を検討したところ、親ベクターを導入したコントロールでは136分であったのに対して、HuR をノックダウンした細胞では33分になり、半減期が非常に短くなることがわかった (Fig. 13B)。さらに、ソフトアガーを用いて同細胞のコロニー形成能を解析した。E4orf6 の発現により盛んに形成されていたコロニーが、HuR をノックダウンした細胞ではほとんど見られず (Fig. 13C)、Fig. 5の結果と同様、HuR のノックダウンにより足場非依存性増殖能が低下することが明らかになった。

本研究より、HuR をノックダウンすることにより、口腔がん細胞の ARE-mRNA の核外輸送および安定化が阻害され、足場非依存性増殖能や運動・浸潤能など口腔がん細胞の悪性形質が減弱することが明らかになった。これまでも、HuR をノックダウンしたがん細胞はヌードマウスに腫瘍が形成できないことなどが示され、HuR ノックダウンのがん細胞に及ぼす効果がいくつか報告されているが、口

腔がん細胞の足場非依存性増殖能や運動・浸潤能と HuR が関連していることを示したのは本研究が最初である。以前より、我々は HuR の局在変化を調べることにより口腔がんの診断が可能であることを示唆したが、本研究で HuR ノックダウンが口腔がんの新たな治療法に応用できる可能性も示せた (Fig. 14)。



口腔がんではHuRが局在変化→がんの診断
口腔がんのHuRをノックダウンし悪性形質が減弱→がんの治療

RNA結合タンパクを利用したがんのトランスレショナルリサーチ

Fig. 14 総括

今後、HuR ノックダウン用のベクターの改良や、ARE-mRNA に関わる他の RNA 結合タンパクの解析も進め、RNA 結合タンパクを利用した新たながんのトランスレショナルリサーチが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kuroshima T., Aoyagi M., Yasuda M., Kitamura T., Jehung J.P., Ishikawa M., Kitagawa Y., Totsuka Y., Shindoh M. and Higashino F. Viral mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. *Oncogene*, 査読有, in press, (2011).
- ② Kurosu T., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Akiyama K., Kakuguchi W., Kuroshima T., Kondo M., Akino T., Totsuka Y., Shindoh M., Higashino F. and Hida K. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium. *Br. J. Cancer*, 査読有, 104, 819-829 (2011).
- ③ Nitta Y., Hida K., Kitamura T., Ohga N., Higashino F., Fukushima K. and Shindoh M. The phenotype of tumor lymphatic vessels could be a prognostic factor in human tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.*, 査読有, 2, 79-84 (2011).
- ④ Kakuguchi W., Kitamura T., Kuroshima T., Ishikawa M., Kitagawa Y., Totsuka Y., Shindoh M. and Higashino F. HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 査読有, 8, 520-528 (2010).
- ⑤ Hasegawa H., Kakuguchi W., Kuroshima T., Kitamura T., Tanaka S., Kitagawa Y., Totsuka Y., Shindoh M. and Higashino F. HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells via the different manner from normal cells. *Br. J. Cancer*, 査読有, 100, 1943-1948 (2009).

- ⑥ Tanaka S., Kitamura T., Higashino F., Hida K., Ohiro Y., Ono M., Kobayashi M., Totsuka Y and Shindoh M. Pim-1 activation of cell motility induces the malignant phenotype of tongue carcinoma *Mol. Med. Rep.* 査読有, 2, 313-318 (2009).
- ⑦ Hata H., Kitamura T., Higashino F., Hida K., Yoshida K., Ohiro Y., Totsuka Y., Kitagawa Y. and Shindoh M. Expression of E1AF, an ets-oncogene transcription factor, highly correlates with malignant phenotype of malignant melanoma through up-regulation of the membrane-type-1 matrix metalloproteinase gene. *Oncol Rep.* 査読有, 19, 1093-1098 (2008).

[学会発表] (計 15 件)

- ① Kakuguchi W.: Relevance of RNA binding protein HuR to invasion activity of oral cancer cells, **第 69 回日本癌学会学術総会**、大阪、大阪国際会議場、9/24、2010
- ② Higashino F.: Role of RNA binding protein and its target mRNAs in oral carcinogenesis. **2010 IAOP (International Association of Oral Pathologists) Meeting**, Seoul, KOREA, 8/18, 2010
- ③ 黒嶋雄志: 口腔がんにおける HuR を介した ARE-mRNA の核外輸送と安定化、**第 64 回日本口腔科学会学術集会**、札幌、札幌プリンスホテル、6/25、2010
- ④ 格口渉: RNA 結合タンパク HuR のノックダウンは口腔がんの増殖能や浸潤能を低下させる、**第 64 回日本口腔科学会学術集会**、札幌、札幌プリンスホテル、6/24、2010
- ⑤ 黒嶋雄志: ARE-mRNA の核外輸送と口腔がんとの関連、**第 99 回日本病理学会総会**、東京、京王プラザホテル、4/28、2010
- ⑥ Kakuguchi W.: Suppression of growth and invasive phenotype of cancer cells by knockdown of RNA binding protein HuR, **第 32 回日本分子生物学会年会**、横浜、パシフィコ横浜、12/12、2009
- ⑦ 格口渉: RNA 結合タンパク HuR のノックダウンが口腔がんに及ぼす影響、**第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会**、札幌、札幌プリンスホテル、10/11、2009
- ⑧ 黒嶋雄志: HuR タンパクの核外輸送と口腔がんとの関連、**第 20 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、札幌、ロイトン札幌、7/31、2009
- ⑨ 格口渉: RNA 結合タンパク HuR のノックダウンによるがん治療の可能性、**第 98 回日本病理学会総会**、京都、京都国際会館、5/3、2009
- ⑩ 格口渉: RNA 結合タンパク HuR のノックダウンによるがん細胞の性質の変化、**BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会、合同大会)**、神戸、神戸国際会議場、12/12、2008
- ⑪ Kakuguchi W.: Knockdown of RNA binding protein changes the character of oral cancer cells., **67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 名古屋、名古屋国際会議場、10/29、2008
- ⑫ 格口渉: RNA 結合タンパクのノックダウンによるがん細胞の増殖抑制、**第 10 回 RNA ミーティング(日本 RNA 学会年会)**、札幌、札幌コンベンションセンター、7/24、2008
- ⑬ 格口渉: RNA 結合タンパクのノックダウンによる口腔がん細胞の形質変化、**日本分子生物学会第 8 回春期シンポジウム**、札幌、京王プラザホテル札幌、5/27、2008
- ⑭ 格口渉: RNA 結合タンパク HuR のノックダウンによる口腔がん細胞の性質の変化、**第 97 回日本病理学会総会**、金沢、金沢日航ホテル、5/15、2008

[その他]

- ① 北海道大学プレスリリース 2010/03/29 「RNA 結合タンパクのノックダウンによるがんの沈静化」
- ② 北海道大学プレスリリース(英語版) 2010/05/10 「Cancer remission by RNA-binding protein knockdown」
- ③ 日本歯科新聞 (2010 年 4 月 6 日号) 「がん細胞を減弱—治療法開発に期待—」
- ④ 北海道医療新聞 (2010 年 4 月 2 日号) 「HuR ノックダウンで口腔がん細胞減弱」
- ⑤ 北海道医療新聞 (2010 年 5 月 21 日、5 月 28 日、6 月 4 日) 連載「RNA 結合タンパクのノックダウンによるがんの沈静化」
- ⑥ 2011/02/23 北海道大学プレスリリース 「ARE-RNA の安定化による細胞がん化を証明」
- ⑦ 日経プレスリリース (2011 年 2 月 23 日) 北海道大学、ARE-mRNA の安定化による細胞がん化を証明

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 50301891

(2) 研究分担者

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 20162802
戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 00109456
樋田 京子 (HIDA KYOUKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号: 40399952
北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 00451451

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

格口 渉 (KAKUGUCHI WATARU)
北海道大学・大学院歯学研究科・日本学術振興会特別研究員
黒嶋 雄志 (KUROSHIMA TAKESHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生