

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5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592383

研究課題名（和文） RNA-タンパク複合体の核外輸送と細胞のがん化との関連

研究課題名（英文） Export of RNA-protein complex and oncogenesis

研究代表者

石川 誠（ISHIKAWA MAKOTO）

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：10202970

研究成果の概要（和文）：

本研究では ARE-mRNA 及びそれに結合する pp32 や HuR などのタンパクの複合体の挙動が、細胞のがん化に寄与しているかを解析した。ARE-mRNA や HuR は口腔がん細胞で核外輸送されていた。pp32 は細胞質で HuR を分解する機能を持つが、口腔がん細胞で多く発現する pp32r1 は HuR を分解しなかった。これらの結果は、がん細胞では RNA 結合タンパクにより ARE-mRNA が制御されることを示している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined whether RNA binding proteins such as pp32 and HuR have oncogenic activity. AU-rich element (ARE) containing mRNA and HuR were exported to the cytoplasm of oral cancer cells. Although pp32 has potential to degrade HuR in the cytoplasm of cells, pp32r1 failed to do it. These results indicate that pp32r1 inhibits the degradation of HuR to stabilize ARE-mRNA and to transform cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔がん、ARE-mRNA、HuR、pp32、pp32r1

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子の病気として知られており、遺伝子（DNA）が何らかの影響で変異を受けることにより活性化または不活化され、それらの変異が蓄積して細胞のがん化する。しかしポストゲノム時代を向えた現在、様々な RNA と発がんとの関わりが指摘され始めており、例えば miRNA などの non-coding RNA が発がんと密接な関係を持っていることなどが明らかになった。

このような背景の中、ある特定の mRNA

に、それらの運命を左右するようなシグナルが存在することが最近明らかになり、注目されている。AU-rich element (ARE) は、細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA のに存在し、それを持つ mRNA は合成後すぐに分解されるが、細胞に heat shock 等の刺激が加わると、一時的にそれらが安定化される。ARE はこれらの分解と安定化を制御するシグナルで、ARE に HuR が結合すると安定化に向かう。最近 ARE-mRNA の安定化についてはさらに解析が進み、heat shock 時

には、HuR に pp32 と核外輸送を担うタンパク CRM1 が結合し、CRM1 依存的にこれらのタンパク複合体と共に ARE-mRNA が核から細胞質側に輸送され安定化されることが解明された。

アデノウイルス E4orf6 は、宿主細胞やウイルスの mRNA の輸送を制御し、最近発がん活性も明らかにされたウイルスがん遺伝子産物である。我々は E4orf6 の細胞がん化機構の解析を目指し、細胞中で E4orf6 に結合するタンパクを質量分析法で解析し pp32 を同定した。そこで ARE-mRNA の核外輸送に対する E4orf6 の効果を調べたところ、本来なら CRM1 依存的に輸送される ARE-mRNA が、E4orf6 により CRM1 非依存的に、強制的かつ恒常的に核外輸送され、正常な遺伝情報システムが破壊されることがわかった (Higashino et al., J. Cell Biol., 2005)。

その後の解析で、E4orf6 により核外輸送された ARE-mRNA は安定化されること、また pp32 は E4orf6 の "oncodomain" (発がんドメイン) に結合することも判明し、oncodomain は ARE-mRNA の核外輸送・安定化にも必要な領域であった。さらに HuR をノックダウンすると、たとえ E4orf6 が細胞に存在しても、ソフトアガー中にコロニーを形成できなくなることが明らかになった。これらの結果は、E4orf6 が pp32 との結合を介して、ARE-mRNA を輸送・安定化し、発がん活性に寄与していることを示している。現在はこの発がん機構が、ウイルスによらない一般のがんでも重要かどうか検討中である。

一方、ARE-mRNA の輸送機構の解析も現在行っている。当初、pp32 が ARE-mRNA の核輸送を促進していると予想し、pp32 をノックダウンする実験を行ったが、予期に反して ARE-mRNA や HuR の核外輸送が促進され、pp32 がむしろこれらを核内に閉じ込めることを示唆するデータが得られた。pp32 は以前より tumor suppressor として知られているので、pp32 は ARE-mRNA や HuR など、核外輸送されると発がんに関わるものを核内に留めるのが本来の機能で、その機能により tumor suppressor 効果を発揮するのではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ARE-mRNA 及びそれに結合する pp32 や HuR などのタンパクの複合体の挙動が、どのように細胞のがん化に寄与しているかを解析し、それらを制御することにより新しいがんの治療法を開発することである。具体的には以下の三つの目標を立てている。

(1) 一般のがんと、ARE-mRNA-タンパク複合体の核外輸送・安定化との関連を検討する。

(2) pp32 が、どのように ARE-mRNA や HuR の核外輸送に関わっているか検討する。

(3) HuR や pp32 などをノックダウンすることによる、がん治療法のための基礎的検討をする。

3. 研究の方法

平成 21 年度

(1) 一般のがんと、ARE-mRNA-タンパク複合体の核外輸送・安定化との関連を検討する。

① ARE-mRNA の核外輸送

(a) ARE-mRNA の細胞質への蓄積を確認する。

(b) 各細胞の細胞質側の HuR および pp32 タンパクを免疫染色法で観察する。

(c) RIP (RNP-immunoprecipitation) 法により ARE-mRNA が HuR、pp32 などの RNA 結合タンパク (RNP) と結合して輸送されているか検討する。

(d) *in situ* hybridization 法により ARE-mRNA ががん細胞の細胞質に輸送されているか観察する。

② ARE-mRNA の安定化

(a) ARE-mRNA の蓄積を確認する。

(b) ARE-mRNA の半減期の測定。

(c) Luciferase-ARE mRNA の安定化を検討する。

平成 22 年度

(2) pp32 が、どのように ARE-mRNA や HuR の核外輸送に関わっているか検討する。

① pp32 をノックダウンし、HuR 及び ARE-mRNA の細胞内局在を検討する。

② pp32 を over expression させ、HuR や ARE-mRNA の局在を検討する。

③ pp32 の mutant (r1, r2) を over expression させ、HuR や ARE-mRNA の局在を検討する。

④ pp32 の mutant (r1, r2) と HuR との結合を検討する。

⑤ 前立腺がんや乳がんの細胞を用いて、pp32 を over expression させ、がん細胞の性質を検討する。

平成 23 年度

(3) HuR や pp32 などをノックダウンすることによる、がん治療法のための基礎的検討をする。

① アデノウイルスベクターの作成

② アデノウイルスベクターの確認

③ 腫瘍を形成させたヌードマウスに、1 で作成したアデノウイルスベクターを投与し、腫瘍に対する影響を評価する。

4. 研究成果

(1) ARE-mRNA の核外輸送

口腔がん細胞と正常細胞を用いて、HuR の抗

体により免疫染色を行った。その結果、Fig. 1 に示すように、HSC3 や Ca9.22 などのがん細胞では、核とともに細胞質に HuR が存在し、一方、正常細胞である HGF と PDL では、がん

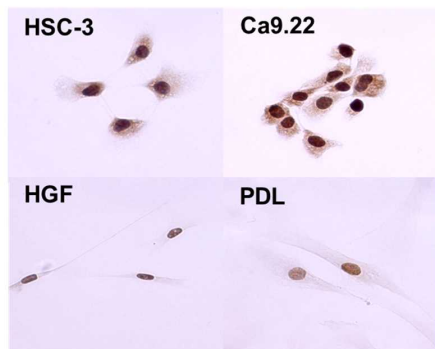


Fig. 1

細胞ほど HuR が細胞質に輸送されておらず、主に核に局在していることがわかった。次に、口腔がん組織を用いて、HuR の局在を検討した。Fig. 2 に示すように、正常組織では HuR が主に核のみに局在しているのに対し、口腔がん組織では、HuR が核および細胞質(矢

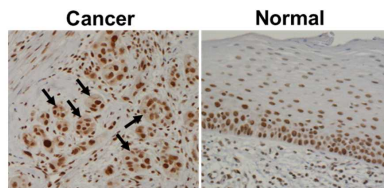


Fig. 2

印) の両方に局在していることが確認できた。これらの結果は、口腔がん細胞では HuR が細胞質に輸送されていることを示唆している。

次に、口腔がん細胞を用いて、ARE-mRNA の核外輸送を *in situ* hybridization 法で検討した。その結果、HSC3、Ca9.22 では *c-fos*、*c-myc* mRNA が細胞質にも存在しているのに対し、HGF では核に限局して存在していること

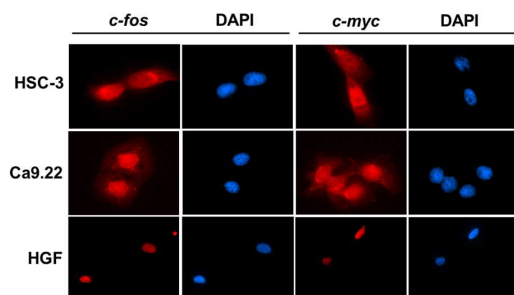


Fig. 3

が明らかになった (Fig. 3)。

以上の結果は口腔がん細胞では ARE-mRNA が細胞質側に輸送されていることを示しており、口腔がん細胞では ARE-mRNA が恒常的に細胞質に輸送されていることを示唆している。

(2) ARE-mRNA の安定化

各細胞から mRNA を抽出し、定量性 real-time RT-PCR 法で *c-myc* mRNA の定量を行った。その結果、*c-myc* mRNA は、HGF 正常細胞に比べ

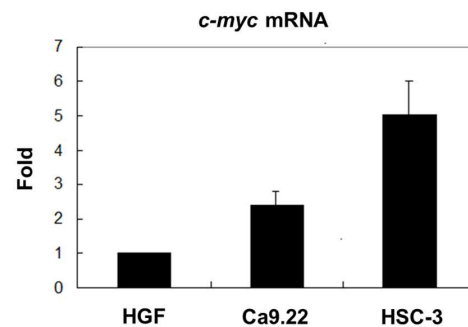


Fig. 4

て、HSC3 や Ca9.22 などの口腔がん細胞において蓄積されていることがわかった (Fig. 4)。

口腔がん細胞と正常細胞を RNA ポリメラーゼの阻害剤 actinomycin D (Act. D) で処理し、全ての mRNA の転写 (合成) を阻害させた後、時間ごとに *c-myc* ARE-mRNA の量をリアルタイム RT-PCR 法で行い、半減期を求めた。その結果、口腔がん細胞では、*c-myc*

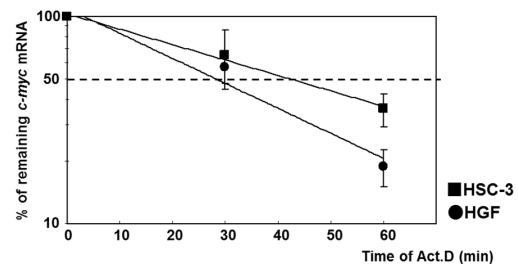


Fig. 5

mRNA の半減期が正常細胞に比べて長かった (Fig. 5)。

(3) pp32r1 の役割

ARE に直接結合する HuR に結合している pp32 のファミリー pp32r1 の解析を行った。これまでの研究で、pp32 はある条件下では細胞をアポトーシスに導き、発がん抑制活性を持つ。pp32r1 は逆に細胞をがん化する能力を有する。最初に様々ながん細胞と正常細胞での pp32r1 の発現を検討した。pp32r1 は HSC-3、HeLa、PC-3 などのがん細胞で発現し、MRC5、HGF などの正常細胞では発現していないこと

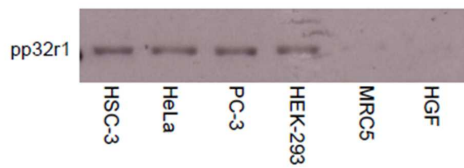


Fig. 6

がわかった (Fig. 6)。次に口腔がん細胞 SAS に FLAG タグのついた pp32、pp32r1 の発現ベクターを導入し、両タンパクの局在を検討した。その結果、pp32 は

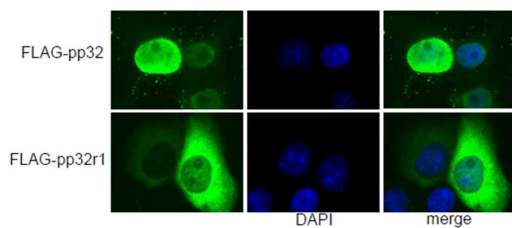


Fig. 7

主に核に、pp32r1 は核と細胞質の両方に局在した (Fig. 7)。pp32 と HuR の複合体は通常核に存在しているが、細胞にダメージが加わると複合体は細胞質に輸送され、HuR は細胞質で caspase により分解され、フリーになった pp32 がアポトーシスを誘導することが報告されている。しかし、pp32r1 が HuR の分解に対してどのような効果を持つかはまだ解析されていない。そこで pp32 と pp32r1 を口腔がん細胞 SAS に発現させ HuR の分解を検討した。pp32 を発現した細胞では細胞質に存在する HuR の量が減少し、それに対して pp32r1 を発現した細胞では HuR 量に変化はなかった (Fig. 8A ; C は細胞質、N は核を示す)。次に同様の細胞の各タンパクの局在を観察した。pp32 を発現した場

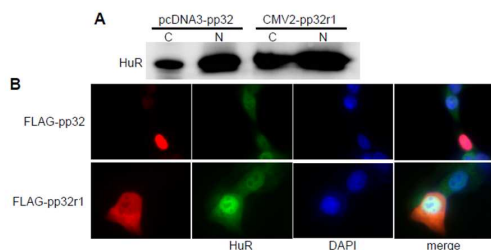


Fig. 8

合、細胞質の HuR はほとんど見られなかったが、それに対して pp32r1 を発現させた細胞では HuR が細胞質に多く局在していた (Fig. 8B)。これらの結果は、pp32r1 は細胞質中で HuR を分解しないことを示している。

以上の結果は、がん細胞では pp32r1 の発現が高くなることにより、RNA 結合タンパク HuR が細胞質で分解されず、その結果 ARE-mRNA が安定化され細胞がん化に寄与していることを示唆している。

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 6 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, 30, 2912-2920 (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).

[学会発表] (計 13 件)

- ① 今待賢治: pp32 ファミリーによる RNA 結合タンパク HuR の制御、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、

- 12/14, 2011
- ② 黒嶋雄志：ARE-mRNA の安定化は細胞がん化を誘導する、第 100 回日本病理学会総会、横浜、パシフィコ横浜、4/28, 2011
 - ③ 格口渉：RNA 結合タンパクのノックダウンによる口腔がんの悪性形質の変化、第 100 回日本病理学会総会、横浜、パシフィコ横浜、4/28, 2011
 - ④ 格口 渉：RNA 結合タンパク HuR の発現を介した口腔がん細胞の浸潤能の亢進、第 65 回日本口腔科学会総会、東京、タワーホール船堀、4/21, 2011
 - ⑤ 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
 - ⑥ 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
 - ⑦ 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
 - ⑧ 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
 - ⑨ 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
 - ⑩ 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
 - ⑪ 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
 - ⑫ 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
 - ⑬ 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

[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

石川 誠 (ISHIKAWA MAKOTO)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：10202970

(2) 研究分担者

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

進藤 正信 (SHINNDU MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20162802

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