

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659883

研究課題名(和文) 口腔がんで発現しているARE-mRNAを制御するための試み

研究課題名(英文) Attempt to control ARE-mRNA expressed in oral cancer cells

研究代表者

佐藤 千晴 (Sato, Chiharu)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50222013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、pp32の性質を検討し、口腔がん細胞でpp32の発現を調節することにより、口腔がんの治療を行うための基礎的研究を行った。口腔がん細胞にpp32を強制発現させると細胞の足場非依存性増殖能が低下した。pp32をノックダウンすると、ARE-mRNAの核外輸送・安定化が停止し、足場非依存性増殖能が上昇した。これらの結果は、pp32の発現ががん細胞の悪性を減弱することを示しており、pp32の発現によるがんの治療の可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the features of pp32 in order to develop the cancer therapy utilizing the control of pp32 expression in oral cancer cells. Over-expression of pp32 down-regulated the anchorage-independent growth activity of oral cancer cells. On the other hand, the knock-down of pp32 inhibited the export and stabilization of ARE-mRNA and conferred the anchorage-independent growth ability for oral cancer cells. These results indicate that the pp32 expression changes the features of oral cancer cells and that the possibility of the cancer therapy using pp32 over-expression.

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：口腔がん ARE-mRNA pp32

1. 研究開始当初の背景

近年、ポストゲノム時代を向え、mRNAの輸送・安定化に関して重要な役割を果たすタンパクが数多く見出されている。AU(アデニン・ウラシル)-rich element (ARE)は*c-fos*、*c-myc*など細胞の増殖に関わる遺伝子のmRNAに存在するAU-richな領域で、AREを持つmRNAは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、pp32及び核外輸送タンパクCRM1が結合し、ARE-mRNAをCRM1依存的に、一過性に、核外に輸送し安定化する。最近、アデノウイルスの発がんタンパクE4orf6が、ARE-mRNAを強制的かつ恒常的に核外に輸送・安定化し、細胞がん化に寄与していることが明らかになった。また、口腔がん細胞でもARE-mRNAが核外に輸送・安定化していることが突き止められ、HuRの核外輸送が口腔がんのマーカーになりうることも示された。

その後、pp32についても解析を進められた。当初、我々は pp32 が ARE-mRNA の核外輸送を促進すると考え、予備実験で pp32 をノックダウンしたが、ARE-mRNA の核外輸送はむしろ促進され、pp32 が ARE-mRNA を核内に閉じ込めた。従って、pp32 は ARE-mRNA や HuR などを核内に留めるのが本来の機能であり、pp32 を強発現させるとがん形質が消失すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、pp32 の性質を検討し、口腔がん細胞で pp32 を強発現させることにより、口腔がんの治療を行うための基礎的研究を行うことである。

3. 研究の方法

pp32 を発現またはノックダウンした口腔がん細胞が、soft-agar でコロニーを形成するか、また ARE-mRNA の核外輸送や安定化が影響を受けるか検討した。

(1) pp32 発現ベクターの構築

pp32 および pp32r1 遺伝子を Ori-gene 者から購入し、それぞれの遺伝子を PCR 法で増幅し、pcDNA3 プラスミドに挿入し、それぞれの発現ベクターを作成した。

(2) 発現ベクターの細胞への導入

(1) で作成したプラスミドベクターをトランスフェクション試薬 (Hyl1Max) を用いて各細胞に導入した。

(3) コロニー形成能の検討

pp32 の発現が確認された細胞のがん形質を確認する目的で、soft-agar 中でコロニーを形成するかどうか検討した。この方法により、pp32 を強発現した細胞の足場依存性増殖を確認した。

(4) ARE-mRNA の輸送・安定化の確認

pp32 のノックダウンを行い、ARE-mRNA の輸送や安定化を確認した。まず、in situ hybridization 法を用いて ARE-mRNA を染色することにより、細胞質側に輸送されているか確認した。また ARE-mRNA の安定化に関しては、ARE-mRNA の蓄積量を定量性 real-time RT-PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) pp32 ファミリーの発現ベクターの作成

作成した発現ベクターを HSC-3 などの口腔がん細胞に導入し、実際に各タンパクが発現されるかウエスタン法で確認した。

(2) pp32 の口腔がんにおける役割

pp32 ががん細胞の形質に影響するか検討するため、口腔がん細胞である SAS 細胞に発現ベクターを導入し、それぞれの細胞を軟寒天中で培養しそれらの変化を検討した。その結果、pp32 を発現した細胞は、空ベクターを導入したコントロール細胞に比べて軟寒天中でのコロニーが顕著に小さくなり (図 1)、pp32 はがん細胞の持つ足場非依存性増殖能を減弱する機能を持つことが証明された。

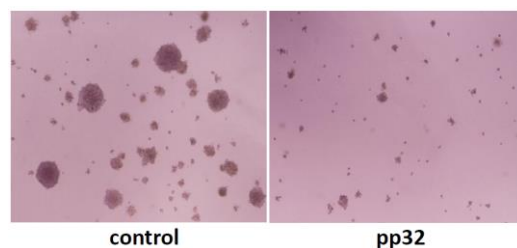


図 1

(3) pp32 ノックダウン

pp32 の機能をさらに詳細に検討するために、pp32 の siRNA を導入しノックダウン (pp32 KD) を行い、そのがん細胞の性質を確認した。その結果、pp32 KD 細胞では細胞質で発現する HuR 量が増加した (図 2)。

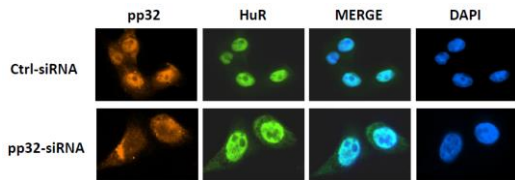


図 2

また、pp32 KD 細胞では ARE-mRNA が核外に輸送され (図 3)、HeLa、PC3 細胞などを用いた検討では、c-fos、c-myc、COX2 などの ARE-mRNA の蓄積が増加した (図 4)。さらに、pp32 KD 細胞は、軟寒天中でコントロールより多くのコロニーを形成することがわかった (図 5)。これらの結果は、pp32 のノックダウンはがん細胞の悪性形質を増強することを示唆している。

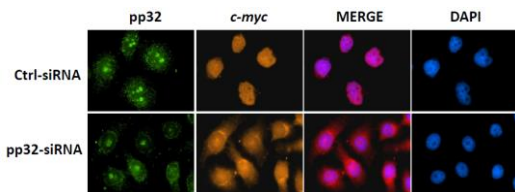


図 3

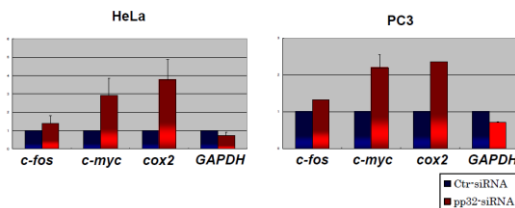


図 4

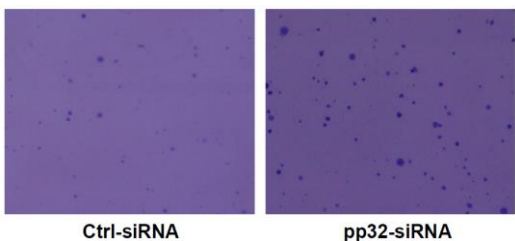


図 5

以上の検討より pp32 はがん細胞の悪性形質に深く関わっていることが明らかになった。pp32 の発現量が少ない場合はがん細胞の悪性形質は増強することが考えられ、従って、pp32 の強発現はがんの性質を減弱させることに重要で、pp32 はがん治療のための良好な標的であると結論づけられる。

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 3 件)

- ① Habiba U., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Hida K., Higashino F., Ohiro Y., Totsuka Y. and Shindoh M. Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions. *Oncology Reports*, 査読有, 31, 1547-1554 (2014). 10.3892/or.2014.3017
- ② Imamachi K., Higashino F., Kitamura T., Kakuguchi W., Yanagawa-Matsuda A., Ishikawa M., Kitagawa Y., Totsuka Y. and Shindoh M. pp32r1 controls the decay of the RNA-binding protein HuR. *Oncology Reports*, 査読有, 31, 1103-1108 (2014). 10.3892/or.2013.2956
- ③ Nagamine K., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Ohiro Y., Tei K., Hida K., Higashino F., Totsuka Y. and Shindoh M. Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma. *Oncology Reports*, 査読有, 29, 2114-2118 (2013). 10.3892/or.2013.2393

[学会発表] (計 7 件)

- ① 東野史裕：発がんを促進する RNA 結合タンパク HuR の分解制御、第 93 回北海道医学大会病理分科会、第 46 回北海道病理談話会、北海道大学医学部フラテ会館 (札幌市)、2013/10/12
- ② 東野史裕：発がんに関わる RNA 結合タンパク HuR の分解制御、第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール (東京)、2013/8/28-30
- ③ 今待賢治：pp32r1 は HuR と結合しクリベージを抑制することで細胞がん化誘導にはたらく、第 67 回日本口腔科学学会学術大会、栃木県総合文化センター (宇都宮市)、2013/5/22-24
- ④ 今待賢治：発がん活性をもつ pp32r1 は HuR と結合しその分解を抑制する、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 (福岡市)、2012/12/1
- ⑤ 今待賢治：pp32r1 は RNA 結合タンパク HuR と結合しその分解を抑制する、第 71 回日本癌学会総会、ロイトン札幌 (札幌市)、2012/9/21
- ⑥ 今待賢治：発がん活性をもつ pp32r1 は RNA 結合タンパク HuR の分解を抑制する、第 23 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、東京医科歯科大学 (東京)、2012/8/31

- ⑦ **Habiba U** : Cytoplasmic expression of HuR could be a useful diagnostic tool to determine malignant transformation of oral verrucous borderline lesions.
第23回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、東京医科歯科大学（東京）、2012/8/31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 千晴 (SATO CHIHARU)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：50222013

(2) 研究分担者

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

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

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