

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 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659360

研究課題名（和文） HuRの核外輸送を指標とした口腔がん悪性度診断の基礎検討

研究課題名（英文） Basic research for oral cancer diagnosis estimated by HuR export

研究代表者

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任教授

研究者番号：00109456

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、口腔がんの HuR の局在、細胞質の HuR 量と悪性度との関連、前がん病変の HuR の局在と予後との関連を調べることである。口腔がんでは HuR および ARE-mRNA は細胞質に輸送されていた。さらに悪性度の高いがんや、予後の悪い前がん病変ほど細胞質の HuR 量は増加することが明らかになった。これらの結果は、HuR の局在を調べることにより前がん病変の予後を予測できることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the localization of HuR in oral cancer cells, the cytoplasmic expression of HuR and malignancy, the relation between cytoplasmic HuR and precancerous change. HuR and AU-rich containing mRNA were exported to the cytoplasm of oral cancer cells. Cytoplasmic HuR expression increased in the cancer which had high malignancy and in the precancerous change which showed poor diagnosis. These findings suggest that the localization of HuR is available for diagnostic tool of precancerous change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

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、HuR、ARE-mRNA

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は通常合成後すぐに分解される。しかし、

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、我々は、発がん活性を持つウイルスタンパクによりがん化した細胞では、HuRやARE-mRNAがCRM1非依存的に、恒常的に、核外に輸送・安定化していることを突き止め

(Higashino et al., J. Cell Biol., 2005)、HuRの核外輸送ががん化のマーカーになりうることを示した。なお、これまでに、大腸がんなどでは、細胞質におけるHuR量とがん細胞の悪性度は関連するとの報告がある (de Silanes et al., Oncogene, 2003)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔がんにおけるHuRの局在、細胞質におけるHuR量と悪性度との関連、ならびに白板症におけるHuRの局在と癌化の関連を調べ、それらの関係を明らかにすることである。具体的には、悪性度の異なる口腔がん細胞を用いてHuRの局在を検索し、またこれまでに治療した白板症の標本におけるHuRの局在を検討し、HuRの局在と口腔がんの悪性度ならびに白板症の臨床経過との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

初年度は、口腔がん細胞 (HSC-3、Ca9.22細胞など) や正常細胞 (HGF、PDL細胞など) を用いて、免疫染色法、生化学的手法でHuRおよびARE-mRNAの局在を検討した。次年度は、手術材料等を用いて実際の口腔がんのHuRおよびARE-mRNAの局在を検討した。

(1) 細胞染色

口腔がんのライン化された培養細胞を用いてHuRタンパクの細胞内局在を検討する。

① 細胞

口腔がん細胞として、HSC3、CA922などを用い、コントロールの正常細胞としてHGF、PDLを用いる。

② 上記口腔がん細胞でHuRの局在を免疫染色法で確認。

細胞をカバーガラス上で培養後、ホルムアルデヒドで固定し、HuRの抗体で免疫染色を行う。

(2) 生化学的検討

HuRタンパク及びそれと共に移動するARE-mRNAの細胞内局在を生化学的手法を用いて検討する。

① ウェスタン法

上述した各細胞をまず核と細胞質に分離し、それぞれの分画中のHuRタンパクの量をウェスタン法で解析する。各分画の β -actinも同時にウェスタン法で検出し、HuR及び β -actinのバンドの濃さを測定後、 β -actinの量でHuRのタンパク量を補正する。

② ①で作成した細胞分画を用いてc-fosなどのARE-mRNAが実際に細胞質に輸送されているかどうか確認する。

③ in situ hybridization法でc-fosなどのARE-mRNAを染色することにより、それらのARE-mRNAが細胞質に輸送されているか確認する。

(3) 組織学的検討

手術材料等を用いて実際の口腔がんの悪性度とHuRの局在を検討する。

① 組織を用いて検討する前に、まず細胞をパラフィンに包埋して切片を作成し固定法や抗体の条件などを検討する。

② 上述で確立した染色法で、手術材料から得られた切片を用いてHuRの免疫染色を行う。HuRの細胞質局在と患者の予後との関連を検討する。

③ 手術材料から得られた切片を用いて、c-fosなどのARE-mRNAの局在をII-3)同様のin situ hybridization法で確認する。ARE-mRNAが実際にがんでも細胞質に輸送されているかどうか確認する。

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。

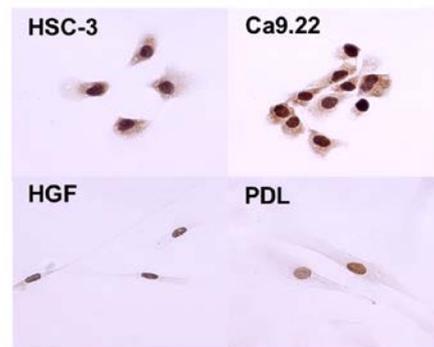


Fig. 1

さらに、HSC3およびCa9.22と正常細胞のHGFを核と細胞質に分離し、それぞれの分画中のHuRタンパクの量をウェスタン法により検出し、生化学的にHuRの核外輸送を検討した。その結果、口腔がん細胞では細胞質側にHuRが蓄積しているのに対して、正常細胞では細胞質側にあまりHuRが存在しないことがわかった (Fig. 2)。その差は9.2倍と11.2

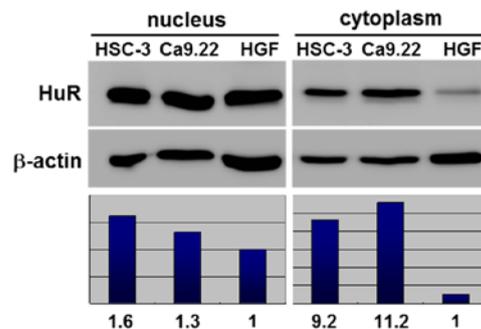


Fig. 2

倍で、10倍近くがん細胞の方が細胞質のHuR量が多かった。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が明らかになった (Fig. 3)。

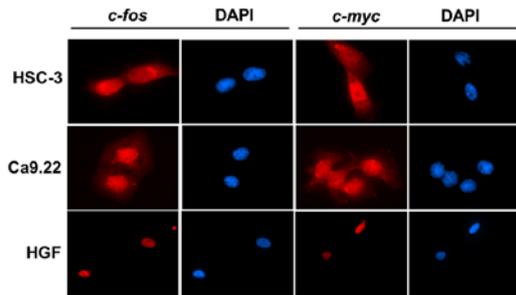


Fig. 3

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、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) 口腔がんの悪性度と HuR の局在

次に、口腔がん組織を用いて、HuR の局在を検討した。Fig. 4 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 (矢印) の両方に局在していることが確認できた。

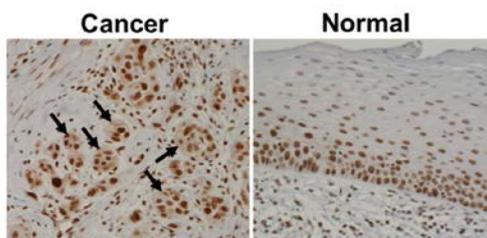


Fig. 4

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。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 が限局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. 5)。こ

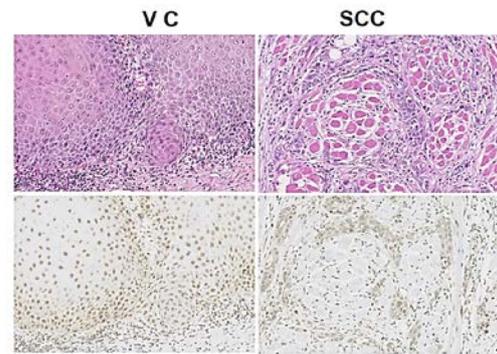


Fig. 5

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。

最後に白板症に発現する HuR を解析した。北海道大学病院を受診した白板症患者から得た材料を用いて、予後が不良だった検体と予後が良かった検体とに分けて染色した。その結果、予後不良の白板症組織では細胞質に HuR が認められ、予後に変化のなかった組織では核のみに HuR が発現していた (Fig. 6)。

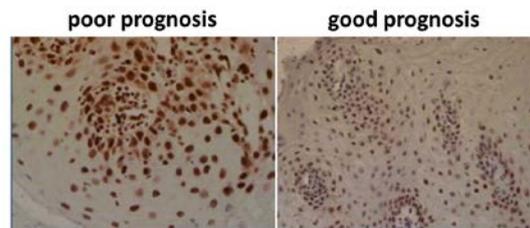


Fig. 6

この結果から、はがん化に移行する可能性の高い前がん病変では、がん細胞同様 HuR が核外に輸送されることを示している。

本研究より、口腔がんでは HuR および ARE-mRNA は細胞質に輸送されていること、さらにはがんの悪性度と HuR の局在は相関することが明らかになった。さらに HuR の局在を調べることにより前がん病変の予後を予測できる可能性が示された。

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)

- 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).

[学会発表] (計9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

[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◇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]

- ① 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」
- ② 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—」
- ③ 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」
- ④ 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」
- ⑤ 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」
- ⑥ 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

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任教授
研究者番号: 00109456

(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

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

研究分担者
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

研究分担者
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