

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25年 5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592081

研究課題名（和文） 口腔自然免疫応答と口腔発がんのクロストーク

研究課題名（英文） Cross-talk between innate-immunological responses and oral oncogenesis.

研究代表者 安田元昭 (YASUDA MOTOAKI)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：90239765

研究成果の概要（和文）：ヒト遺伝子発現において、3' UTR 中に AUUUA 配列を有するいわゆる ARE-mRNA は RNA の半減期が厳密に制御されていることが知られている。我々は種々の ARE-mRNA の中で HIF-1 α の 3' UTR が、他の c-myc, c-fos などの ARE-mRNA とは異なった制御を受けている可能性を見出した。同じ乳がん細胞株でも MCF7 に比較して悪性度が高いとされる MDA-MB-453 では特に HIF-1 α の 3' UTR を介した RNA 安定化が亢進しており、これには悪性度と関連していると考えられた。また、一部の口腔がん細胞においても同様の現象が確認された。HIF-1 α の mRNA が安定化し、タンパク質発現が亢進することにより血管誘導・浸潤能亢進・上皮間葉移行などの悪性化につながるシグナル伝達が正に制御されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Approximately 50% decreased protein expression was observed for 3' UTR of HIF-1 containing constructs compared to the control vector. In particular, a highly-aggressive breast cancer cell line MDA-MB-453 demonstrated a higher protein expression compared to a less-aggressive breast cancer cell line MCF7. It is plausible that 3' UTR dependent degradation of HIF-1 α mRNA is repressed in several cancer cells which indicate malignant phenotypes. We also found the same phenotype in oral squamous cell carcinoma cells. Thus, 3' UTR dependent regulation of mRNA degradation might play an important role in the progression (vascular induction, invasion or epithelial-mesenchymal transition) of oral cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：実験腫瘍学

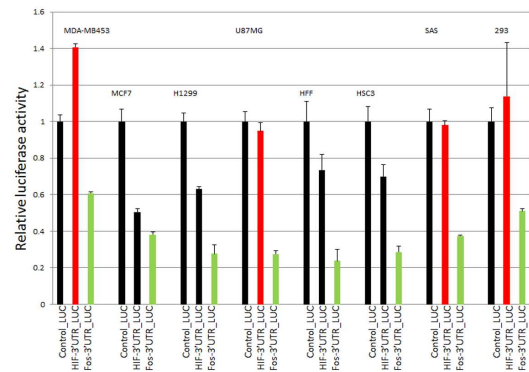
1. 研究開始当初の背景

口腔がんの発生過程における炎症反応の重要性は多くの臨床知見により支持されている。舌がんや歯肉がん症例の多くが不良補綴物を有する症例であることが知られている。また実験発がんにおける知見からも、発癌剤の単独投与に比べて発癌剤投与と機械刺激を併用した場合の方が短時間で発がんすることが明らかになっている。一方、がんは遺伝子の病気として知られており、遺伝子が何らかの原因により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ががん化する。口腔領域でも *c-fos*、*c-myc*、*cox-2* などの ARE (AU rich element) を有するがん遺伝子の活性化が口腔がんの発症に大きく関わっていることが示されているがその詳細は不明である。

2. 研究の目的

ポストゲノム時代を迎え mRNA の解析が進む中、最近 *c-fos*、*c-myc*、*COX-2* などのある特定の mRNA には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明らかになった。AU (アデニン-ウラシル)-rich element (ARE) は *c-fos*、*c-myc*、*COX-2* などの oncogene や IL-3 の様な cytokine など、細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA に存在し、AUUUU をコアとする繰り返し配列から成る領域である。ARE を持つ mRNA は合成後すぐに分解されるというサイクルを通常繰り返しているが、細胞に血清や heat shock 等の刺激が加わると一時的にそれら ARE-mRNA が安定化され、細胞が増殖の方向に向かうことが知られている。ARE はこれらの分解と安定化を制御するシグナルで、ARE に主に AUF1 を代表とするいくつかの RNA 結合タンパクが結合すると分解が促進され、一方で HuR というタンパクが結合すると安定化に向かうことが明

らかにされている。最近 ARE-mRNA の安定化についてはさらに解析が進み、血清刺激時や 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。pp32 は細胞中の多くのタンパクと結合する酸性シャペロンで、がん抑制遺伝子活性も示されており前立腺がんや乳がんでは pp32 の mutant form が多量に発現している。pp32 は刺激がない時には HuR と共に核内に存在するため、pp32 はおそらく緊急時にのみ ARE-mRNA を核外に輸送することにより安定化することが予想されている。我々は、アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 の発がん機構を研究しており、がん細胞中で E4orf6 に結合するタンパクを MALDI-TOF/MS による質量分析で解析し pp32 を同定した。本研究の目的は、E4orf6 による発がんに見られた ARE-mRNA の輸送・安定化が実際の口腔がん細胞中でも起こっているかどうか検討することである。

3. 研究の方法

(1) Luciferase 遺伝子の下流にこれまで報告されている ARE (AU rich element) mRNA の 3' UTR をクローニングし、種々のがん細胞に導入・比較検討する。

(2) 上記にて特に発現に差があった細胞を対象にしてマイクロアレイ解析を行い、この

ような差をもたらしている可能性のある遺伝子を絞り込む。

(3) 上記候補遺伝子による ARE-mRNA の安定化が自然免疫応答と関連するかを検討する。

4. 研究成果

pmir-GLO vector の Luciferase 遺伝子の下流に HIF-1 α , cMyc, c-fos, ets2 の 3' UTR を組み込み、種々の

がん細胞に導入し、Luciferase の発現強度を比較検討した。

これらの内 cMyc, c-fos, ets2 では同一傾向の発現が認められたが、HIF-1 α の 3' UTR を組み込んだ

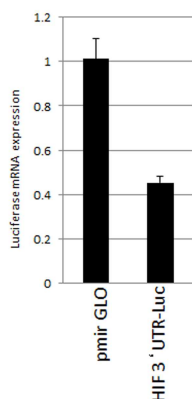
コンストラクト (HIF3' UTR- Luc) は異なる発現傾向を示した。

すなわち、実験に供した十数種類のがん細胞の内いくつかの細胞では HIF3' UTR-Luc は control vector (pmir-GLO) と同程度の

Luciferase 活性を示した。一方 cMyc 3' UTR-Luc, c-fos 3' UTR-Luc, ets2 3' UTR-Luc は全てのがん細胞で7割程度の減弱がみられた。

また、RT-PCR による解析で、HIF3' UTR-Luc の mRNA 発現量は control vector (pmir-GLO) から発現するものより有意に減少していることも確認した。またこの差は、HIF-1 α のタンパク質量ともよく関連していた。

これらの結果より HIF-1 α の 3' UTR は mRNA の不安定化をもたらすが、他の ARE-mRNA とは異なり、口腔がんを含むいくつかの悪性腫



瘍では安定化されていることがわかった。また、この傾向は悪性度が高いとの報告のある細胞株で (MDAMB451, U87MG, B16F10 など) でより顕著であった。

上記の結果を受けて、我々は Luciferase mRNA が不安定であった MCF7 と、対照的に Luciferase mRNA が安定化されていた

	MCF7	HEK293	MD453
CELF1	1	0.61426	0.52715
CELF2	1	88.8108	0.81845
CELF3	1	0.29844	0.39111
CELF4	1	1.37689	0.5864
CELF5	1	0.75483	0.69499
CELF6	1	0.49843	0.74112
ELAVL1	1	1.83359	1.1957
ELAVL2	1	20.8237	7.24837
ELAVL3	1	0.57999	0.84554
ELAVL4	1	0.28229	0.20381

MDAMB453, HEK293 細胞の mRNA を出発材料としたマイクロアレイ解析を行った。数値データは、Agilent Technologies 製 Microarray Scanner から出力された数値生データを用いた。各遺伝子の発現を MCF7 における値を 1 として、Fold change として比較検討した。これらデータの中から、これまで ARE mRNA を安定化することが報告されている ELAV(embryonic lethal, abnormal vision) family を抽出したところ、MDAMB453, HEK293 の両細胞で ELAVL2 の発現が顕著に上昇していた。また、このような現象は NF- κ B サブユニット RelA/p50 の核移行により活性化されること、さらにはがん抑制遺伝子 p53 の発現によっても影響を受けること、すなわち自然免疫応答により活性化あるいは抑制される転写因子群が HIF-1 α 発現制御にも関わっていることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① HIF-1 α post transcriptional mRNA regulation under normoxia: the significance of UTRs.

Takeshi Nishioka, Motoaki Yasuda, Hiroki Shirato 2012 7/23-7/24 国際がんセミナー
北海道大学医学部 フラテ会館

② HIF-1 α post transcriptional regulation by means of 5' UTR. Takeshi Nishioka, Motoaki Yasuda, Hiroki Shirato 2012 9/19-9/21 日本癌学会総会 ロイトン札幌

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 元昭 (YASUDA MOTOAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・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・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50301891

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：