

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：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390416

研究課題名(和文) 口腔がん細胞で破綻しているARE-mRNAの核外輸送及び安定化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of oral cancer oncogenic mechanism mediate by the export and stabilization of ARE-mRNA

研究代表者

東野 史裕 (Higashino, Fumihiro)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50301891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ARE-mRNAの核外輸送・安定化システムの破綻による発がん機構を解明するために、ARE-mRNAと結合するHuRと相互作用しているTransportin 2(TNP02)、pp32、pp32r1について口腔がん細胞を用いて解析を行った。TNP02は少なくともいくつかのARE-mRNAの安定化に関わり、pp32はARE-mRNAの輸送・安定化を抑制し、pp32r1はHuRの分解を抑制すること等が明らかになった。以上の結果は、これらのタンパクが口腔がんのARE-mRNAの核外輸送・安定化に深く関わり、今後、これらのタンパクを制御する新たながんの治療法が有望視される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of HuR binding protein, Transportin 2 (TNP02), pp32, pp32r1 in order to understand the oncogenic mechanism mediated by the export and stabilization of ARE-mRNA. TNP02 had some relation with the stabilization of ARE-mRNA. pp32 inhibited the export and stabilization of ARE-mRNA, furthermore, pp32r1 suppressed the degradation of HuR in the cytoplasm of cells. These results indicate that TNP02, pp32, pp32r1 are the regulators of the ARE-mRNA stabilization and a new cancer therapy by controlling these proteins is promising.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔がん HuR pp32 pp32r1 Transportin2 ARE-mRNA 結合タンパク

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ががん化する。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明らかになり、注目されている。AU-rich element (ARE) は oncogene や cytokine など、細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA の非翻訳領域に存在し、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 に主に AUF1、TTP を代表とする、RNA 結合タンパクが結合すると分解が促進され、一方で 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 が一時的に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。さらに HuR には核外輸送担体の Transportin 2 (TNPO2) が結合することも証明され、HuR および ARE-mRNA の核外輸送に重要な働きをしていることも突き止められた。

我々は、アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 の研究から、ARE-mRNA の核外輸送及び安定化が細胞がん化に寄与することを見出した。このメカニズムはウイルスによる細胞がん化だけではなく口腔がんを含む多くのがんの発生原因であることもわかり、我々は ARE-mRNA の核外輸送及び安定化システムの破綻による、新たな発がん機構を提唱している。

2. 研究の目的

本研究では、口腔がん細胞で起こっている ARE-mRNA 輸送・安定化のメカニズムを ARE-mRNA と相互作用している RNA 結合タンパク HuR や、pp32 などを介した解析を展開することにより解明し、またそれらを制御す

ることにより新しいがんの治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

口腔がんでの ARE-mRNA の輸送が破綻している原因として一番関わりが深いと考えられるのが、ARE と直接結合して ARE-mRNA を核外輸送している HuR である。本研究では HuR 結合タンパク、TNPO2、pp32 ファミリーに関して検討した。

(1) TNPO2、pp32、CRM1 のノックダウン

それぞれのタンパクの mRNA を細胞に siRNA を導入する RNAi 法によりノックダウンを行い、ARE-mRNA の定量をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。

(2) TNPO2 に関する検討

TNPO2 の発現
がん細胞および正常細胞で発現している TNPO2 mRNA の量をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。

TNPO2 のノックダウン

がん細胞および正常細胞を用いて TNPO2 のノックダウンを行い、細胞に蓄積している ARE-mRNA を定量リアルタイム RT-PCR 法で測定し、それらの蓄積を検討した。

(3) pp32 に関する検討

pp32 と HuR の結合
両タンパクの結合を HuR 抗体を用いた免疫沈降法により解析した。

pp32 ノックダウン

RNAi 法により pp32 をノックダウンし、細胞質の HuR 量、ARE-mRNA の核外輸送および安定化を検討した。

(4) pp32r1 に関する検討

pp32r1 と HuR の結合
両タンパクの結合を pp32r1 抗体を用いた免疫沈降法により解析した。

pp32r1 が足場非依存性増殖に与える影響
pp32r1 発現がん細胞が足場非依存性増殖能を持つ soft-agar colony formation assay で検討した。

HuR 分解に与える pp32r1 の影響
pp32r1 発現がスタウロスポリンの刺激による HuR 分解に与える効果をウエスタン法で確認した。

4. 研究成果

(1) HuR 結合タンパクの解析

ARE-mRNA の輸送及び安定化の破綻解明のた

めに、ARE に直接結合する HuR に associate するタンパク、CRM1、TNPO2、pp32 をノックダウンし、c-myc、COX2 などの ARE-mRNA の定量を行った。その結果、これらのタンパクのノックダウンは ARE-mRNA に影響し(図1) c-myc mRNA の蓄積には TNPO2、pp32 が、COX2 mRNA には TNPO2、pp32、CRM1 が重要であることがわかった。

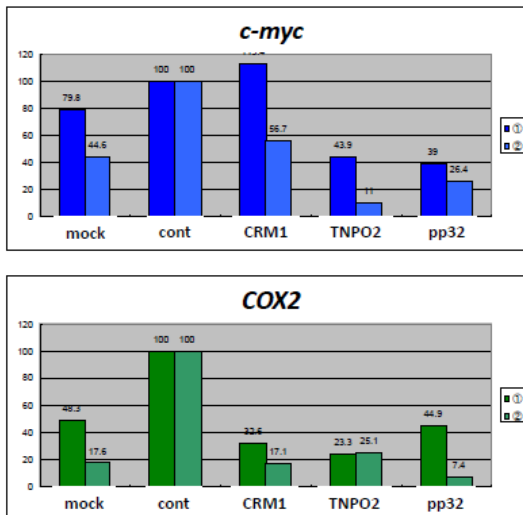


図1

(2)TNPO2 の解析

TNPO2 の発現

TNPO2 mRNA の発現をがん細胞や正常細胞を用いて行った。口腔がん細胞の Ca9.22 や前立腺がんの PC3、乳がんの MCF7、肺がんの H1299 で発現が高く、正常細胞 (BJ、MRC5) やその他のがん細胞では発現が低かった (図2)。

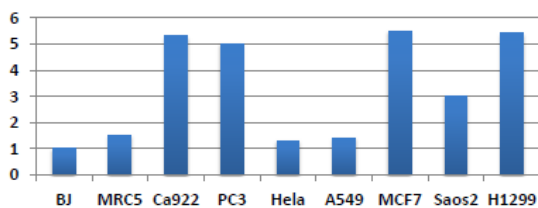


図2

TNPO2 のノックダウン

口腔がん細胞 HSC3 の TNPO2 をノックダウンして ARE-mRNA の定量を行ったところ、COX2 mRNA の量が低下した。一方、正常細胞 BJ を用いて同様の実験を行ったところ、COX2 mRNA の量が増加した (図3)。これらの結果は、口腔がん細胞では TNPO2 により少なくともいくつかの ARE-mRNA が安定化されていることを示している。

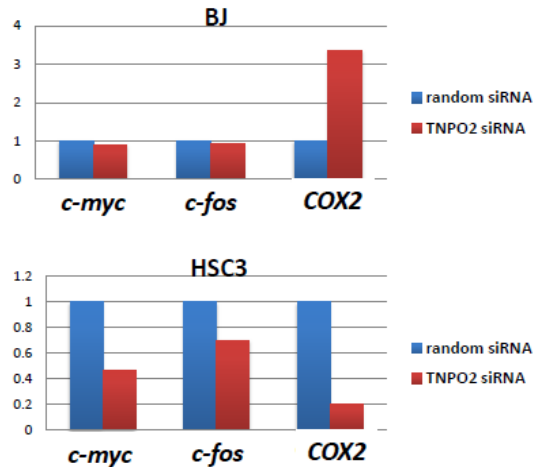


図3

(3)pp32 の解析

pp32 と HuR の結合

これまで HeLa 細胞を用いた実験で、HuR の結合タンパクとしていくつかのタンパクが同定され、pp32 もその一つとして知られている。そこで、293 (ヒト腎細胞がん)、PC3 (前立腺がん)、HT1080 (線維肉腫)、HSC3 (舌がん) を用いて HuR 抗体で免疫沈降を行い、HuR に共沈する pp32 をウエスタン法で確認した (図4)。その結果全てのがん細胞で両タンパクが結合することが明らかになった。

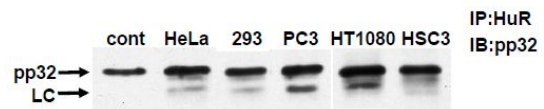


図4

pp32 ノックダウン

pp32 が HuR や ARE-mRNA に与える影響を検討するため、pp32 のノックダウンを行いいくつかの解析を行った。

1)HuR の局在

HeLa 細胞の pp32 をノックダウンするために、pp32 siRNA を導入した。またコントロールとしてランダムな配列を持つ siRNA を導入した。その結果、図5に示すように pp32 をノックダウンした細胞では細胞質側の HuR 量がコントロールに比べて増加した。従って、pp32 の発現は細胞質に発現する HuR 量を減少させることがわかった。

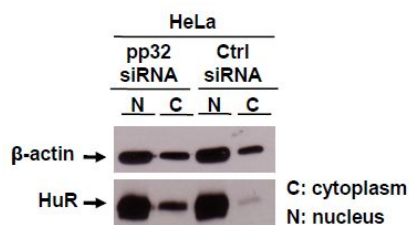


図5

2) ARE-mRNA の局在

同様の細胞を用いて c-fos mRNA の局在を検討した。その結果、pp32 をノックダウンした細胞では c-fos mRNA が細胞質に局在することが明らかになった(図6)。HuR 同様に細胞質に輸送されたと思われる。

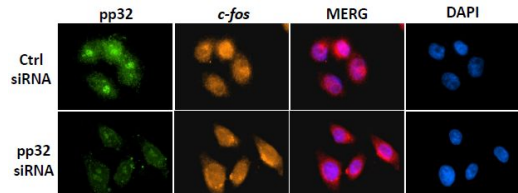


図6

3) ARE-mRNA の安定化

同様のノックダウンを行い、actinomycinD で転写を停止させた後、30分ごとの c-fos mRNA の定量を行い、c-fos mRNA の半減期を検討した。その結果、コントロールでは 25 分だった半減期は、pp32 をノックダウンすることにより 53 分になり(図7)、pp32 のノックダウンが c-fos mRNA を安定化することがわかった。

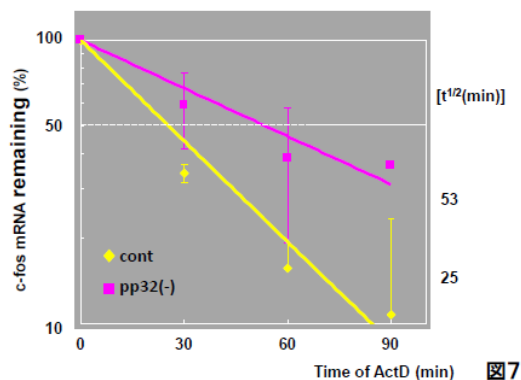


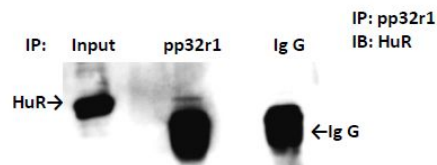
図7

(4) pp32r1 の解析

pp32r1 と HuR の結合

pp32 同様、pp32 と相同性の高い pp32r1 も HuR と結合することが予想される。そこで免疫沈降法により結合を確認した。その結果、pp32r1 抗体で沈降したサンプルの中に HuR も共沈することがわかり(図8A)、両タンパクが結合することが示された。さらに、HuR が pp32 の結合を介して pp32r1 と結合している可能性があるため、pp32 と pp32r1 の結合を確認した。しかし、pp32r1 抗体で免疫沈降しても pp32 が共沈することはなく(図8B)、これらのタンパクは結合しないことが解明された。これらの結果より、HuR と pp32r1 が直接結合することが示唆された。

A



B

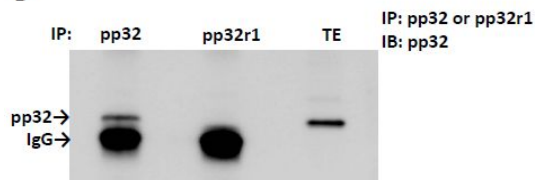


図8

pp32r1 と足場非依存性増殖能 pp32r1 ががん細胞に与える影響を検討するために、pp32r1 を強制発現させ、soft-agar colony formation assay で足場非依存性増殖能を検討した。その結果、コントロールの空ベクターを発現した細胞と比べて、pp32r1 の発現ベクターを導入した細胞は soft-agar 中顕著に大きなコロニーを形成した(図9)。この結果は、pp32r1 ががん細胞を悪性化することを示している。

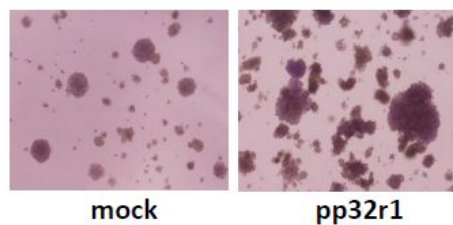


図9

HuR 分解と pp32r1

pp32 は致死性的ストレスが加わると、HuR と共に細胞質に移動し、HuR が casapase の働きにより二つの分子 HuR CP1 と HuR CP2 に分解され、free になった pp32 が apoptosome に移動しアポトーシスが誘導されることが報告されている。そこで、pp32r1 は HuR の分解にどのような影響を持つか検討した。口腔がん細胞の SAS に pp32r1 を発現し、スタウロスポリンの刺激を加え、HuR の分解産物 HuR CP1 の量をウエスタン法で検討した。その結果、pp32r1 を発現した細胞では、pp32 を発現した細胞に比べて HuR CP1 の量が減少し(図10)、pp32r1 の発現は HuR の分解を抑制することが明らかになった。この pp32r1 による HuR の分解制御は、pp32r1 の持っている発がん活性と深く関わっていると思われる。

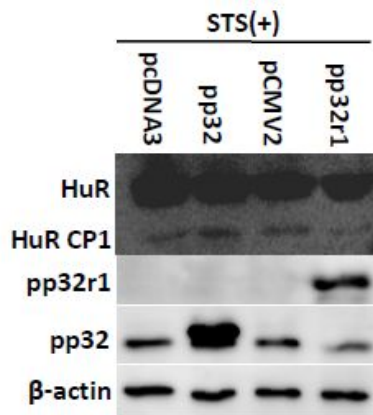


図10

本研究では、HuR に結合する TNPO2、pp32、pp32r1 について解析を行った。pp32 は ARE-mRNA の輸送・安定化を抑制することが解明され、pp32r1 は HuR の分解を抑制することが明らかになった。今後、pp32 の強制発現、pp32r1 ノックダウンなどががんの治療法として有望であると思われる。

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 5 件)

- 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
- 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
- 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

Yanagawa-Matsuda A., Kitamura T., Higashino F., Yamano S., Totsuka Y. and Shindoh M. E1A expression might be controlled by miR-214 in cells with low adenovirus productivity. *Virus Res.*, 査読有, 170, 85-90 (2012). 10.1016/j.virusres.2012.09.001.

東野史裕, 北村哲也, 柳川 - 松田彩, 進藤正信: 新しい口腔がんの発生メカニズムとそのトランスレショナルリサーチ (A new oncogenic mechanism of oral cancer and its translational research) *北海道歯学雑誌*, 査読有, 32: 65-67, 2011

[学会発表](計 15 件)

- 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**, 札幌、北海道大学医学部フラテ会館、2013/10/12
- Habiba U: Overexpression of podoplanin and HuR may predict the development of oral cancer in patients with oral epithelial dysplasia, **第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**, 東京、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、2013/8/28-30
- 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**, 東京、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、2013/8/28-30
- 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 回日本口腔科学会学術大会**, 宇都宮、栃木県総合文化センター、2013/5/22-24
- 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、福岡国際会議場、2012/12/1
- 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**, 札幌、ロイトン札幌、2012/9/21
- 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、東京医科歯科大学、2012/8/31
- 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、東京医科歯科大学、2012/8/31
- 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、2011/12/13-16

Kuroshima T.: Stabilization of AU-rich element containing mRNA mediated by adenovirus gene product contributes to cell transformation. **IUMS 2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress)**, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan, 2011/9/14

Kuroshima T.: Modulation of P bodies and stress granules in adenovirus infected cells. **RNA 2011 (Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society)**, Kyoto International Convention Center, Kyoto, Japan, 2011/6/15

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、4/28-30、2011**
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、4/28-30、2011**

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、2011/4/21-22**

黒嶋雄志: ARE-mRNA を安定化させることは細胞のがん化に寄与する、**第 65 回日本口腔科学会学術総会、東京、タワーホール船堀、2011/4/21-22**

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・名誉教授
研究者番号: 00109456

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