

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659929

研究課題名（和文） ヒトパピローマウイルスによって誘導される新しい口腔がん発生機構

研究課題名（英文） Novel oncogenic mechanism of oral cancer mediated by HPV

研究代表者

佐藤 明 (SATO AKIRA)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：90271684

研究成果の概要（和文）：

ヒトパピローマウイルス（HPV）感染によってがん化された口腔がん細胞で、ARE-mRNA が核外輸送・安定化されているか検討した。HPV のがん遺伝子産物 E6 及び E7 を細胞に導入すると、一部の ARE-mRNA が安定化された。さらに、ARE-mRNA の輸送に関わる HuR をノックダウンすると ARE-mRNA の安定化が阻害された。これらの結果は HPV による口腔がんの発生に ARE-mRNA が関与す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 export and stabilization of ARE-mRNA in oral cancer cells, which is caused by HPV. ARE-mRNA such as *c-fos* was stabilized in cells mediated by HPV oncogene products E6 and E7. The stabilization of ARE-mRNA in HPV positive cancer cells was down-regulated by HuR knockdown. These findings suggest that ARE-mRNA has some effect on the oncogenesis of cancer cells mediated by HPV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、HPV、ARE-mRNA

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス（HPV）はヒトの発がんに関わるウイルスで、子宮頸がんの 90% 以上が HPV が原因であると考えられている。また、口腔領域のがんでも約 30% に HPV のゲノムが存在しており、このウイルスによる発がん機構を解明することは、口腔がんの治療の観点からも重要である。HPV 感染による発がんには、HPV のがん遺伝子産物が、p53 や pRB などの細胞タンパクと結合し、それらの機能を抑制することが重要であるが、東野らはそれ以外の新たな細胞がん化機構を想定している。

最近、東野らは HPV と同様の DNA 型腫瘍ウイ

ルスである、アデノウイルスの発がんタンパク E4orf6 が、AU(アデニン・ウラシル)-rich element (ARE) を持つ mRNA (*c-fos*, *c-myc* など細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA で、通常なら heat shock 等の刺激により一過性に核外輸送・安定化される) を強制的かつ恒常的に核外に輸送・安定化し、細胞をがん化していることを見出し (Higashino et al., J. Cell Biol., 2005)、このメカニズムによる発がん機構を提唱している。その後、ARE-mRNA の輸送・安定化は、ARE と直接結合している HuR を RNAi 法によりノックダウンすることにより阻害できることも証明された (Kakuguchi et al., Mol. Cancer Res., 8,

520-528, 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HPV の持つ E6 と E7 などのがん遺伝子産物により、ARE-mRNA が輸送・安定化され、口腔細胞のがん化に寄与しているか検討することである。また、HuR のノックダウンによる HPV(+) の口腔がんの治療を目標にした基礎研究も目的に含める。

3. 研究の方法

平成 23 年度

(1) ARE-mRNA の核外輸送及び安定化

がん細胞の ARE-mRNA の核外輸送とその安定化を定量性リアルタイム RT-PCR 法等で検討した。

(2) HPV の E6、E7 による ARE-mRNA の核外輸送・安定化

細胞に 16 型 HPV の E6、E7 の発現ベクターを導入し、(1) と同様の方法で ARE-mRNA の輸送・安定化を検討した。

平成 24 年度

(3) HuR をノックダウンしたときの HPV(+) のがん細胞の性質の変化

HuR を RNAi 法によりノックダウンし、(1) と同様の方法で ARE-mRNA の輸送・安定化を検討した。

4. 研究成果

(1) HPV(+) の HeLa 細胞を用いて ARE-mRNA の挙動を検討したところ c-fos、c-myc、COX-2 などの ARE-mRNA が核外輸送され安定化されていた。

(2) HPV(-) の 3Y1、H1299、C33A 細胞に 16 型 HPV の E6、E7 の各発現ベクターを導入し、ARE-mRNA が安定化されるか検討した。3Y1 細胞には E7 の発現ベクターを導入し c-fos、c-myc、COX-2 などの ARE-mRNA の蓄積を解析した。その結果、c-myc、COX-2 ARE-mRNA の量が増加した (図 1)。

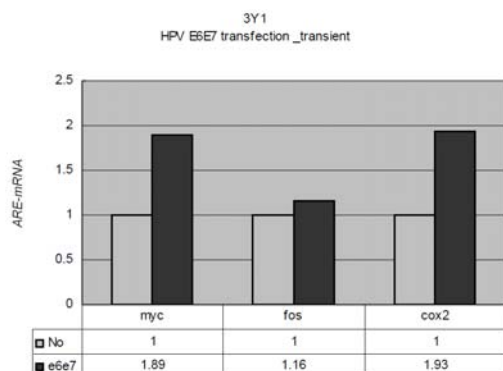


図 1

次に H1299 細胞に E6 の発現ベクター (pEF6 16E6) を導入したところ空ベクター (pEF6) を導入した細胞より c-fos mRNA が 2 倍程度増加した (図 2)。

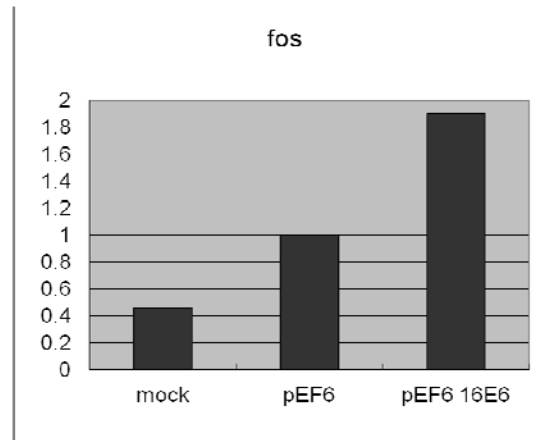


図 2

さらに C33A 細胞に細胞がん化能を欠失した mutant である E6SD を導入し c-fos mRNA を定量した。その結果、空ベクターを導入した細胞より c-fos mRNA が約 1/3 に減少した (図 3)。

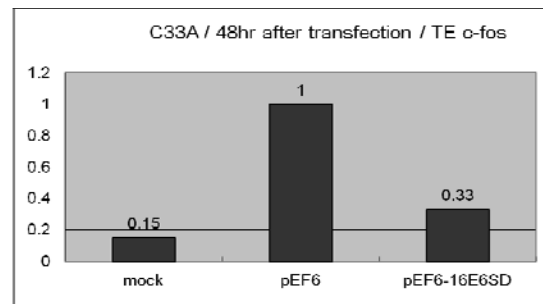


図 3

これらの結果は、高リスク型の HPV の E6 または E7 には少なくとも一部の ARE-mRNA を安定化する活性があることを示唆している。また、この活性は E7 の持つ発がん活性と関連している。

(3) HuR の siRNA を導入することにより HPV(+) の HeLa 細胞の HuR をノックダウンし (図 4)、c-fos mRNA の量を調べた。その結果、ノックダウンした細胞ではしていない細胞に比べて c-fos mRNA が 1/10 程度に減少した (図 4)。

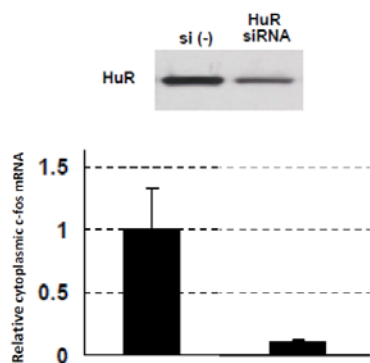


図 4

この結果は、HuR をノックダウンすることにより、HPV (+) の細胞でも ARE-mRNA の安定化を阻害できることを示している。

以上の結果より、HPV のがん遺伝子産物 E6 及び E7 は、一部の ARE-mRNA を安定化する能力を持つこと、さらに ARE-mRNA の輸送に関わる HuR をノックダウンすると ARE-mRNA の安定化が阻害できることが明らかになった。これらの事実は HPV による口腔がんの発生に ARE-mRNA が関与することを示唆していると同時に HuR ノックダウンががんの治療に貢献できることを示している。

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 4 件)

- ① 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). DOI: 10.1016/j.virusres.2012.09.001.
- ② 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 (2012). DOI:10.3892/or.2013.2393.
- ③ 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). DOI: 10.1038/onc.2011.14.

- ④ 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). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412449/>

[学会発表] (計 8 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 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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、4/22, 2011
- ⑦ 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
- ⑧ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 明 (SATO AKIRA)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：90271684

(2) 研究分担者

東野 史裕 (HIGASHINO HUMIHIRO)
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

北村 哲也 (KITAMURA TETUYA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00451451

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

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00109456
(辞退：平成 24 年 4 月 18 日)

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