

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20日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890010

研究課題名（和文） 口腔がん発生の原因となる ARE-mRNA 制御機構破綻の機序解明

研究課題名（英文） Failure of ARE-mRNA control causes oncogenesis of oral cancer

研究代表者

黒嶋 雄志（KUROSHIMA TAKESHI）

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号：00610669

研究成果の概要（和文）：

本研究は、口腔がんの発生原因となる ARE-mRNA の核外輸送・安定化の機序を解明することを目的としている。ARE に結合し ARE-mRNA の輸送・安定化に関わる HuR と、HuR に結合する pp32 および pp32r1 との相互作用を検討した。その結果、HuR-pp32r1 の複合体は核外に輸送され、pp32r1 がカスパーゼを抑制することにより HuR の分解が制御されていた。これらの結果により、pp32r1 の持つ発がん活性が解明された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the mechanism of the export and stabilization of ARE-mRNA in oral cancer cells. We explored the role of pp32r1, a member of the pp32 family that has oncogenic properties, in the decay of HuR. HuR-pp32r1 complex was exported to the cytoplasm and the caspase-mediated decay of HuR was inhibited by pp32r1. We suggest that this function contributes to the oncogenic activity of pp32r1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：口腔がん、ARE-mRNA、pp32、pp32r1、HuR

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子の病気であり、遺伝子（DNA）が何らかの影響で変異をきたすことで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ことが以前から知られている。そして、DNA の解析が多く研究者によって成されてきた現在では、RNA とが

んの関連性が指摘され始め、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。一方、ある特定の mRNA には、その運命を左右するシス因子としての配列領域が存在することが明らかになり、注目されている。その中で、AU-rich element (ARE) はがん遺伝子やサイトカイン、増殖因子など、細胞の

増殖に関わる遺伝子の mRNA の非翻訳領域に存在し、これを持つ mRNA は合成後すぐに分解される特徴を持つ。ARE-mRNA は、ARE に特異的に結合するタンパクによってその代謝が調節されている。そのうち、AUF1 や TTP などは ARE に結合して ARE-mRNA の分解を促進し、一方で HuR が結合すると安定化に向かう。最近、ARE-mRNA の安定化についてさらに解析が進み、heat shock 時には、HuR、pp32、核外輸送担体 CRM1 が複合体を形成し、CRM1 依存的に 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。我々はアデノウイルスのがん遺伝子産物により恒常的に ARE-mRNA を安定化し、細胞がん化に寄与することを解明した。この ARE-mRNA の輸送・安定化による細胞がん化機構は、ウイルスによるがんだけでなく、口腔がんを含む多くのがんの発生原因であり、しかも悪性度と核外輸送・安定化の程度は相関することを我々を含む多くの研究グループが報告した。

2. 研究の目的

本研究は、口腔がん細胞における ARE-mRNA の核外輸送及び安定化の機序を解明し、ARE-mRNA 制御システムを標的とした新しいがんの治療法を開発することを目的としている。そのために口腔がん細胞において、ARE-mRNA と相互作用している HuR タンパクの多角的な機能解析を進め、HuR を介した ARE-mRNA 制御のメカニズムを明らかにし、これを治療法のための基礎研究につなげたいと考えている。

3. 研究の方法

平成 23 年度

(1) HuR に結合するタンパクの解析

HuR 結合タンパクの候補を考え、いくつかのタンパクと HuR との結合を確認した。その中でも、HuR には pp32 が結合することが知られているので、pp32 のファミリーの pp32r1 も結合するか解析した。

(2) pp32r1 の発現及び局在の解析

pp32r1 の発現と局在をがん細胞と正常細胞で確認した。

平成 24 年度

(3) pp32r1 による HuR の分解

pp32 は HuR の分解を促進するので、pp32r1 が HuR の分解に及ぼす影響を検討した。

(4) pp32r1 の発がん活性確認

pp32r1 が持つ発がん活性を軟寒天コロニー形成法で検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔がん細胞 SAS を用いて HuR と pp32r1 の結合を検討したところ、HuR は図 1 に示すように pp32r1 と強く結合することが

わかった。

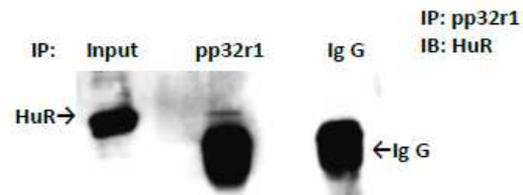


図 1 免疫沈降法により pp32r1 に結合する HuR を検討した。

(2) 各種がん細胞と正常細胞を用いて pp32r1 の発現と局在を検討した。その結果、pp32r1 は pp32 とは異なりがん細胞で強い発現が認められた (図 2)。

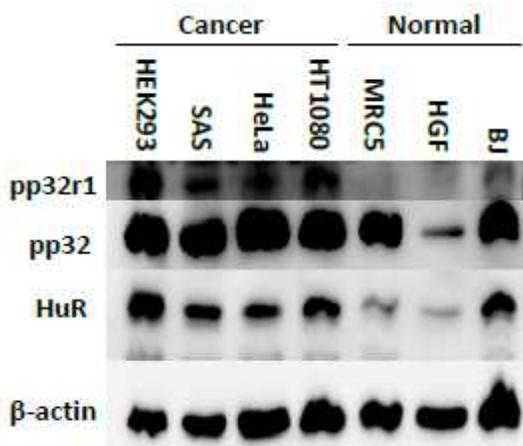


図 2 ウェスタン法により各細胞の pp32r1、pp32、HuR タンパクの発現を検討した。

次に口腔がん細胞 SAS に pp32 と pp32r1 の発現ベクターを導入し、蛍光免疫染色法でそれらの局在を確認した。その結果、pp32 はほとんど核のみに局在したが、pp32r1 は細胞質にも多く存在することがわかった (図 3)。

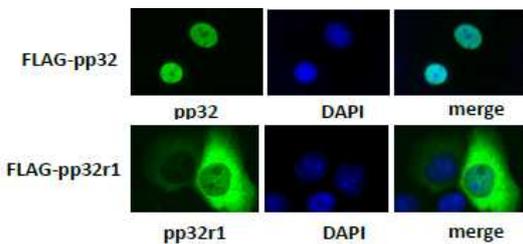


図 3 蛍光免疫染色法で pp32 と pp32r1 の局在を確認した。

(3) 以前より HuR と pp32 の複合体は細胞質に輸送され、カスパーゼの働きにより HuR が分解されることが報告されていた。そこで本実験では HuR が pp32r1 によって分解されるか検討した。その結果、pp32r1 を発現させた細胞では HuR が細胞質に多く発現すること

が蛍光免疫法でも（図4）、ウェスタン法でも（図5）確認できた。

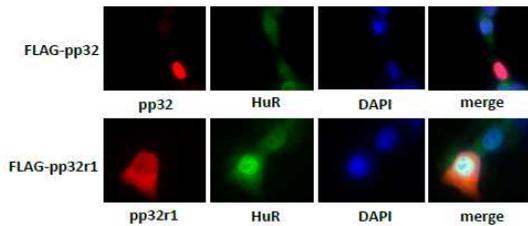


図4 SAS細胞に pp32 と pp32r1 の発現ベクターを導入し、蛍光免疫染色法で HuR の分解を確認した。

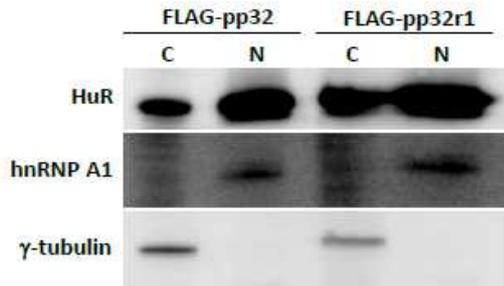
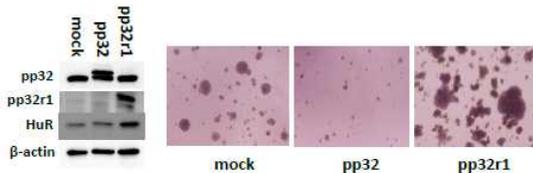


図5 図4で用いたを核と細胞質に分離しそれぞれに存在する HuR をウェスタン法で検討した。

これらの結果は、pp32r1 は HuR の分解が抑制されることを示している。

(4) pp32r1 が持つ発がん活性を調べるために、SAS細胞に pp32 と pp32r1 の発現ベクターを導入し、軟寒天コロニー形成法で足場非依存性増殖能を検討した。その結果 pp32 導



入細胞はコロニーが減少し、逆に pp32r1 導入細胞では増加した（図6）。

図6 SAS細胞に pp32 と pp32r1 の発現ベクターを導入し、その発現と軟寒天中でのコロニーを検討した。

この結果は pp32r1 が SAS細胞の持つ足場非依存性増殖能を促進したことを示している。

本研究により、pp32r1 は HuR に結合しその分解を抑制することが明らかになった。Pp32r1 はこの機能を介して発がん活性を発揮すると考えられる。

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1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). DOI: 10.1038/onc.2011.14.

〔学会発表〕（計9件）

- ① 柳川-松田 彩、黒嶋雄志、安田元昭、北村哲也、進藤正信、東野史裕：アデノウイルス感染による P-bodies の変化は ARE-mRNA の分解に影響する、**第35回日本分子生物学会年会**、福岡、福岡国際会議場、2012/12/11-14
- ② 柳川-松田 彩、東野史裕、黒嶋雄志、安田元昭、北村哲也、進藤正信：アデノウイルス感染は宿主細胞の P-Bodies に特異的な変化をもたらす、**第92回北海道医学大会病理分科会**、札幌、札幌医大、2012/10/13
- ③ 柳川-松田 彩、黒嶋雄志、北村哲也、東野史裕、進藤正信：アデノウイルス感染がもたらす宿主細胞 P-body の変化、**第101回日本病理学会総会**、東京、京王プラザホテル、2012/4/26-28
- ④ Kuroshima T., Yasuda M., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Shindoh M. and Higashino F. 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, JAPAN, 9/14, 2011
- ⑤ 東野史裕、黒嶋雄志、北村哲也、柳川-松田彩、進藤正信：アデノウイルス感染細胞での RNP 顆粒構造の挙動、**第63回日本細胞生物学会大会**、札幌、北海道大学、6/28、2011
- ⑥ Kuroshima T., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Shindoh M. and Higashino F. Modulation of P bodies and stress granules in adenovirus infected cells. *RNA 2011 (Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society)*, Kyoto, Japan, 6/15, 2011
- ⑦ 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
- ⑧ 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

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒嶋雄志 (KUROSHIMA TAKESHI)

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号：00610669

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：