

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592824

研究課題名(和文) 口腔がんの発生にかかわるRNA結合タンパクの分解制御機構解明

研究課題名(英文) Decay of RNA binding protein involved in oral oncogenesis

研究代表者

石川 誠 (ISHIKAWA, MAKOTO)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：10202970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、pp32のファミリーのpp32r1がどのようにHuRの分解を制御し、細胞のがん化に寄与しているかを解明した。pp32r1を強く発現しているがん細胞ではHuRのレベルが高かった。pp32r1はHuR分解に必要なcaspase3の活性を抑制し、pp32r1はpp32より強くHuRに結合した。これらの結果より、pp32r1はHuRと強く結合し、HuRを分解するcaspaseの働きを抑制することによりHuRタンパクを安定化し、細胞をがん化することが示唆できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined how pp32r1 controls the decay of HuR to contribute tumorigenesis. In the cancer cells expressing high level pp32r1, the expression of HuR was up-regulated. pp32r1 inhibited the activity of caspase3, which is required for the HuR degradation. pp32r1 bound to HuR stronger than that of pp32. These findings indicate that pp32r1 plays the important role for transforming cells by inhibit caspase activity.

研究分野：実験病理学

キーワード：口腔外科一般 ARE-mRNA pp32 r 1 HuR caspase3

## 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性化され、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迎えた現在、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 が発がんとの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最近明らかになり、注目されている。AU-rich element (ARE) は c-fos、c-myc 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 の untranslated-region (UTR) 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、一時的にそれらが安定化される。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 (ARE/poly(U)-binding/degradation factor-1)、TTP (tristetraprolin) 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。

近年、アデノウイルス E4orf6 の発がん研究を介して、本来なら CRM1 依存的に輸送される c-fos、c-myc、COX-2 などの ARE-mRNA が、E4orf6 により CRM1 非依存的に、HuR や pp32 等と共に強制的かつ恒常的に核外輸送され、正常な遺伝情報

システムが破壊されることが解明された。この研究に端を発して、ARE-mRNA の安定化が細胞をがん化することが証明され、またウイルスによらない口腔がんなどでも HuR が核外輸送され、ARE-mRNA も核外輸送・安定化されていることが解明された。

pp32 は、核と細胞質を shuttle できる酸性タンパクで、tumor suppressor 活性があることが知られている。pp32 には pp32r1、pp32r2 と呼ばれるファミリーが存在し、これらのファミリータンパクは pp32 とは逆に、様々ながん細胞で発現が高く、細胞がん化活性を持っていることが報告されている。HuR と pp32 との相互作用についても研究が進んでおり、heat shock 以上の致死的な刺激が細胞に加わると、HuR-pp32 複合体は細胞質に輸送された後、HuR がアポトーシス関連酵素の caspase で分解され、フリーになった pp32 が apoptosome に移動し、細胞のアポトーシスに寄与することが解明されている。しかしながら、pp32 ファミリーの pp32r1 や pp32r2 がこの HuR 分解にどのように関わっているのかは不明である。

予備実験では、pp32r1 を強制発現させると、細胞質に存在する HuR の量が増加した。この事実は pp32r1 は HuR の分解を抑制することにより細胞がん化を促進していることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、pp32 のファミリーの pp32r1 がどのように HuR の分解を制御し、細胞のがん化に寄与しているかを解明することである。また、pp32r1 をノックダウンする新しいがんの治療法を開発するための基礎研究も目的に含めることとする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔がん細胞の pp32 ファミリーおよび HuR の発現

細胞の pp32 ファミリーの発現を解析する。がん細胞として HEK293(ヒト胎児腎細胞由来がん細胞)、SAS(ヒト口腔がん細胞)、HeLa(ヒト子宮頸がん細胞)、HT1080(ヒト繊維芽肉腫細胞)など、正常細胞として MRC5(ヒト肺繊維芽細胞)、HGF(ヒト歯根膜細胞)、BJ(ヒト陰茎繊維芽細胞)などを用いて、ウエスタン法で pp32r1、pp32 および HuR の発現を検討した。

#### (2) pp32 ファミリーによる HuR タンパクの分解

①口腔がん細胞 SAS に pp32r1 発現ベクター (FLAG-pp32r1) を導入し、pp32r1 が強制発現された細胞で、HuR とともに pp32r1 が細胞質に輸送されるか蛍光免疫染色法で確認した。②上述の細胞を用いて、スタウロスポリン(STS)刺激後の pp32r1、pp32、HuR、caspase3、cleaved-caspase3、 $\beta$ -actin の発現をウエスタン法で検討した。cleaved-caspase3 の量が caspase3 の活性度を示す。

#### (3) pp32r1 と HuR の結合

pp32r1 と HuR は結合するが、pp32 とどちらが強くと結合するかを決定した。in vitro で作成した pp32、HuR をそれぞれ等量混合し、pp32 抗体を用いた免疫沈降法の後、ウエスタン法で HuR の量を確認し、HuR と pp32 の結合系を構築した。両タンパクを混合した系に、in vitro で作成した pp32r1 の量を変えてさらに添加し、同様に pp32 抗体で免疫沈降法を行い、HuR 量を確認した。pp32r1 の方が強く結合する場合は少ない量の pp32r1 を添加してもウエスタン法で検出される HuR のバンドは消失する。

#### (4) pp32r1 のノックダウン

pp32r1 の siRNA を作成し、RNAi 法により pp32r1 のノックダウンを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 口腔がん細胞の pp32 ファミリーおよび HuR の発現

これまで、様々ながん細胞及び正常細胞で pp32r1 の発現を検討したが、pp32r1 以外に pp32 や HuR の発現も同時に検討した(Fig.1)。その結果、pp32r1 はやはりがん細胞でその発現が高く、BJ を除く正常細胞では低かった。一方、pp32 の発現は HGF 細胞を除いて、がん細胞と正常細胞であまり差はなかった。また、HuR の発現はがん細胞や BJ 細胞で高く、MRC5 と HGF で低かった。これらの結果より、pp32r1 の発現が高い細胞では、それに比例して HuR の発現も高いことが明らかになった。このことは pp32r1 が HuR の安定化に何らかの役割を果たしていることを示唆している。

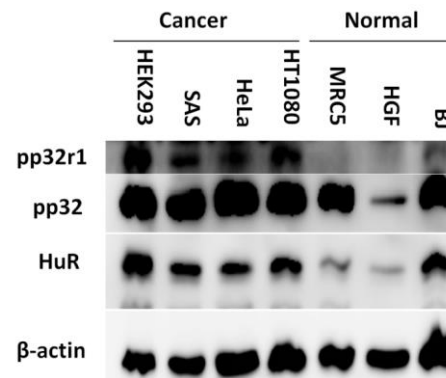


Fig.1

#### (2) pp32 ファミリーによる HuR タンパクの分解

pp32 と HuR の複合体は核外に輸送され、細胞質で caspase により HuR が分解されることが知られている。そこで、pp32r1 の発現により細胞質の HuR の分解が変化するか口腔がん細胞 SAS を用いて検討した(Fig.2)。その結果、pp32 を発現させた細胞では、細胞質の HuR 量は減少しており(Fig.2、上図、矢印)、HuR は pp32 とともに核内で多く存在していた。一方、pp32r1 を発現させた細胞では、細胞質の HuR は減少せず、pp32r1 とともに核及び細胞質に共局在していた。こ

の結果は、pp32r1 の発現により HuR の分解が抑制されていることを示唆しており、Fig.1 の結果と一致する。

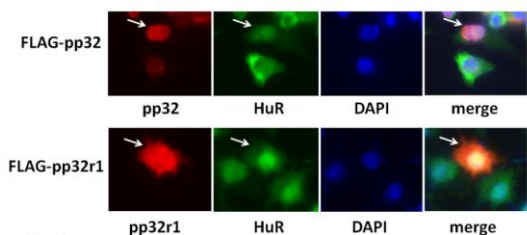


Fig. 2

HuR は caspase3 の働きにより分解されることがこれまでに報告されている。そこで、本研究で用いている実験系では caspase3 の働きがどうなっているのか検討した。STS 刺激を SAS 細胞に加え、pp32r1、pp32、HuR、caspase3、cleaved-caspase3 の発現を確認した。その結果、Fig.3 に示すように、pp32 を発現する細胞では caspase3 の断片 (cleaved-caspase3) の量が増加し、caspase3 の活性が上がることが示された (Fig.3)。それに対して、pp32r1 を発現している細胞では、cleaved-caspase3 の量が減少し、caspase3 の活性が抑制されることが明らかになった。従って、本実験で観察されている HuR 量の増加は、caspase3 の活性化が抑制された結果であることが示唆される。

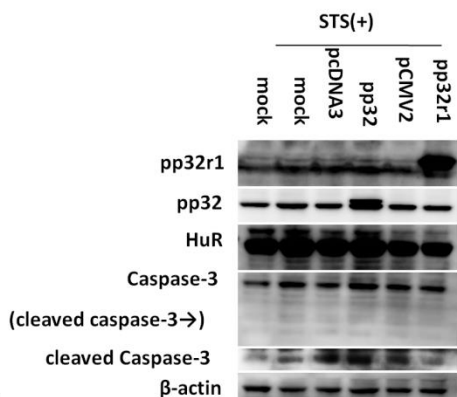


Fig. 3

### (3) pp32r1 と HuR の結合

pp32、pp32r1 はともに HuR と直接結合する

ことがこれまでに分かっている。また、細胞の中では両方のタンパクが共存していることが考えられる。そこで、どちらのタンパクがより強く HuR に結合するか検討した。In vitro で合成した pp32 と HuR を 5 $\mu$ l ずつ混合し、そこに同様に in vitro で合成した pp32r1 を Fig.4 に示すように添加し、pp32 抗体で免疫沈降を行い、HuR タンパクをウェスタン法で解析した。その結果、pp32r1 を 1  $\mu$ l 加えたら HuR のバンドは減少し、5  $\mu$ l 加えたときにはほぼ消失した (Fig.4)。この結果は、pp32、pp32r1 が等量存在するときは、ほぼ pp32r1 の方に HuR が結合することを示しており、pp32 よりも pp32r1 の方がより強く HuR と結合することを示唆している。

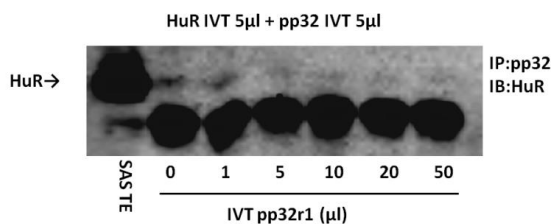


Fig. 4

### (4) pp32r1 のノックダウン

pp32r1 をノックダウンによるがん治療の基礎検討を行うために、pp32r1 の siRNA を作成し、口腔がん細胞 SAS および HSC3 を用いて RNAi 法により pp32r1 のノックダウンを試みた。しかしながら、Fig.5 に示すように、siRNA 導入後 24 時間、48 時間いずれでも pp32r1 は消失せず、pp32r1 のノックダウンは成功しなかった。

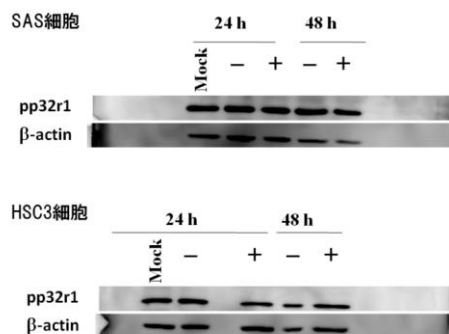


Fig. 5

本研究では、pp32r1 を強く発現している細胞では HuR のレベルが高いこと、pp32r1 の発現は HuR 分解に必要な caspase3 の活性を抑制すること、pp32r1 は pp32 より強く HuR に結合することが明らかになった。これらの結果より、pp32r1 は HuR と強く結合し、HuR を分解する caspase の働きを抑制することにより HuR タンパクを安定化し、細胞をがん化に導くことを示唆できた。

#### 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 3 件)

- ① Habiba U., Hida K., Higashino F., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Totsuka Y. and Shindoh M. HuR and podoplanin expression is correlated with high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions. *Oncol Let*, in press, 2015、査読有
- ② 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*, 31, 1103-1108、2014、査読有
- ③ 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.*, 170, 85-90、2012、査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Habiba U., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F., Totsuka Y, Shindoh M.: Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and podoplanin in oral

leukoplakia and the risk of malignant transformation、第 25 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2014/8/27-29、メディアシップ日報ホール (新潟市)

- ② Habiba U., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Hida K., Higashino F., Totsuka Y., Shindoh M. Overexpression of HuR and Podoplanin predicts the development of oral cancer in patients with preneoplastic lesion. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 2014/5/25-30、Istanbul Military Museum(Istanbul, Turkey)
- ③ 東野史裕、今待賢治、北村哲也、柳川-松田 彩、進藤正信：発がん関連 RNA タンパク HuR の分解抑制機構、第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014/5/8-9、京王プラザホテル (東京都)
- ④ Umma Habiba, 北村哲也、柳川-松田 彩、榎田京子、東野史裕、進藤正信：Podoplanin and HuR expression predict the malignancies in patients with oral epithelial dysplasia、第 103 回日本病理学会、2014/4/24-26、広島国際会議場 (広島市)
- ⑤ 東野史裕、今待賢治、北村哲也、松田 彩、進藤正信：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、2013/10/12、北海道大学医学部フラテ会館(札幌市)
- ⑥ 東野史裕、今待賢治、北村哲也、柳川-松田 彩、進藤正信：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、2013/8/28-30、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール(東京都)
- ⑦ Habiba U., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino

E, Shindoh M: 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、2013/8/28-30、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール(東京都)

- ⑧ 今待賢治、東野史裕、北村哲也、北川善政、進藤正信: pp32r1 は HuR と結合シ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、2013/5/22-24、栃木県総合文化センター(宇都宮市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 誠 (ISHIKAWA MAKOTO)  
北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号：10202970

### (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

進藤 正信 (SHINNDU MASANOBU)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：20162802

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