

HuR タンパクの細胞質発現と形質転換との関連

学位論文内容の要旨

[本研究の意義]

がんは遺伝子の病気で、遺伝子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と考えられている。口腔領域でも、いくつかのがん遺伝子の活性化や、p53 などがん抑制遺伝子の不活化が、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。ポストゲノム時代を向え mRNA の解析が進む中、最近、*c-fos*、*c-myc* などの mRNA には、それらの運命を左右する領域が存在することが明らかになってきた。

AU (アデニン・ウラシル)-rich element (ARE) は、*c-fos*、*c-myc* などがん遺伝子や、*IL-3* のようなサイトカインなど細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA に存在し、AUUUA を代表とするコア配列が繰り返されている領域である。ARE を持つ mRNA (ARE-mRNA) は、通常、合成後すぐに分解されるというサイクルを繰り返しているが、細胞に血清や熱ショック等の刺激が加わると、一時的に ARE-mRNA は安定化され、細胞が増殖の方向に向かうことが知られている。すなわち ARE はこれら mRNA の分解と安定化の制御に関する領域で、ARE 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 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。

HuR は、embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family に属する RNA 結合タンパクで、分子内に 3 つの RNA recognition motifs (RRM) を持ち、各々の RRM 間にはヒンジ領域が存在している。HuR は通常、核に局在しており、核と細胞質の間をシャトルすることが可能である。その移動にはヒンジ領域が重要な役割を果たしており、それを介して二つの pathway で HuR が輸送されることがこれまでに報告されている。一つは、ヒンジ領域に含まれる HNS (HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence) に核外輸送タンパクである Transportin 1 (Trn 1) や Trn 2 が結合して輸送される pathway で、もう一つは、同様にヒンジ領域に pp32 が結合し、さらに核外輸送タンパクである CRM1 が pp32 内に存在する NES (nuclear export signal) を認識して結合し、HuR を核外輸送させる pathway である。

東野らは以前、アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 でトランスフォームしたがん細胞では、HuR、pp32 などのタンパクと共に、ARE-mRNA が強制的かつ恒常的に、核から細胞質へ輸送され、安定化されることを見出した (Higashino *et al.*, 2005)。このことより、ARE-mRNA の輸送・安定化が細胞がん化に関与するという、新たな発がん機構が提唱されており、またウイルス

によらないヒトのがんでも、同様の発がん機構が存在するのかに興味を持たれている。

[目的および方法]

本研究の目的は、口腔がん細胞および口腔がん組織で、HuR および ARE-mRNA が核から細胞質へ輸送されているか、また ARE-mRNA については安定化されているかについて検討することである。これらのことが明らかになれば、HuR の局在を調べることにより、口腔がんの診断ができる可能性がある。

本研究では、口腔がん細胞であるヒト舌扁平上皮がん細胞(HSC-3)とヒト歯肉扁平上皮がん細胞(Ca9.22)、ならびに正常細胞であるヒト歯肉線維芽細胞(HGF)と歯周靭帯(PDL)細胞を用いた。まず、各細胞における HuR の細胞内局在を免疫組織学的に検索した。次いで、舌扁平上皮がん組織ならびに正常粘膜組織における HuR の細胞内局在を同様に免疫組織学的に検索した。さらに、各細胞を核と細胞質に分離し、細胞質分画中の HuR タンパクをウエスタンブロット法で検出し、がん細胞と正常細胞の細胞質中の HuR 量を比較した。次に、ARE-mRNA の核外輸送を調べるために、各細胞の *c-fos*, *c-myc* mRNA の細胞内局在を *in situ* hybridization 法で検討した。さらに、ARE-mRNA の安定化を検討するため、定量性リアルタイム RT-PCR 法を用いて、その総量を測定した。

[結果および考察]

HSC-3, Ca9.22ならびにHGF細胞を用いて、酵素抗体法によりHuRタンパクの存在を免疫染色で調べたところ、HGFでは主に核にHuR陽性所見が認められたのに対し、HSC-3, Ca9.22では細胞質にもHuR陽性所見が認められた。このことは、口腔がん細胞ではHuRは核ならびに細胞質に存在しているが、正常細胞では核のみに存在していることを示している。

次いで、口腔正常組織ならび舌扁平上皮がん組織を用いて、同様の染色を行ったところ、培養細胞の結果と同様に、正常細胞では核のみにHuR陽性所見がみられたが、口腔がん細胞では核ならびに細胞質にHuR陽性所見が認められた。この結果は、舌扁平上皮がん組織においてもHuRは細胞質に存在していることを示している。

さらに、細胞を分画しウエスタンブロットを行った結果、HGF, PDLなどの正常細胞と比較して、HSC-3, Ca9.22などのがん細胞では、細胞質側のHuR量が著明に多かった。この結果からも、口腔がん細胞では、HuRが細胞質に多く存在していることが確認された。

以上三つの実験結果より、口腔がん細胞ではHuRタンパクが核外に輸送されていることが示唆された。

一方、*in situ* hybridization法の結果をみると、HGF細胞では*c-fos*ならびに*c-myc* mRNAは核およびその周辺のみに局在していたが、HSC-3, Ca9.22などのがん細胞では核だけではなく細胞質側にも広く分布していた。この結果は、口腔がん細胞では、ARE-mRNAが細胞質へ輸送されていることを示唆している。

さらに、定量性リアルタイムRT-PCR法の結果でも、正常細胞であるHGFに比べて、HSC-3とCa9.22細胞の方が、*c-fos*ならびに*c-myc*などのARE-mRNA量が著しく多かった。同様の細胞を用いて、actinomycinDによりRNA polymerase IIによる転写を停止させた実験系でも、口腔がん細胞の方が*c-fos* mRNAの量が多かったことから、本結果で認められたmRNAの増加は、転写の活性化によるものではないことは明らかである。従って、この結果は口腔がん細胞では、正常細胞

よりARE-mRNAが多く蓄積されていることを示しており、このことは口腔がん細胞ではARE-mRNAが安定化されていることを示唆するものと考えられる。

本研究により、口腔扁平上皮がん細胞では、HuRとARE-mRNAが細胞質へ輸送されていること、また同細胞でARE-mRNAが安定化されていることが明らかになった。この結果は、HuRの細胞質局在を検討することにより、口腔がんの診断ができる可能性を示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学位論文題名

HuR タンパクの細胞質発現と形質転換との関連

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

AU (アデニン・ウラシル)-rich element (ARE) は、*c-fos*, *c-myc*などのがん遺伝子や、*IL-3*の様なサイトカインなど、細胞の増殖に関わる遺伝子のmRNAに存在し、mRNAの分解と安定化を制御する領域で、HuRが結合すると安定化することが明らかにされている。HuRは通常、核に局在しているが、二つのpathwayで核と細胞質の間をシャトルすることが可能である。

本研究は、口腔がんの発生における ARE-mRNA の輸送・安定化の関わりを明らかにする目的で、口腔がんを対象に HuR および ARE-mRNA の細胞質への輸送ならびに ARE-mRNA の安定化について検索したものである。

最初に、ヒト舌扁平上皮がん細胞(HSC-3)とヒト歯肉扁平上皮がん細胞(Ca9.22), ならびに正常細胞であるヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を用いて、酵素抗体法により HuR タンパクの細胞内局在を免疫染色で検索し、HGF では主に核に HuR 陽性所見が認められたのに対し、HSC-3, Ca9.22 では細胞質にも HuR 陽性所見が認められることを明らかにした。次に、舌扁平上皮がん組織ならびに正常粘膜組織における HuR の細胞内局在を同様に免疫組織学的に検索し、培養細胞の結果と同様に、正常細胞では核のみに HuR 陽性所見がみられるのに対し、口腔がん細胞では核ならびに細胞質の両者に HuR 陽性所見が認められることを確認した。さらに、各細胞を核と細胞質に分離し、細胞質分画中の HuR タンパクをウエスタンブロット法で検出して、がん細胞と正常細胞の細胞質の HuR 量を比較し、HGF, 歯周靭帯(PDL)などの正常細胞と比較して、HSC-3, Ca9.22 などのがん細胞では、細胞質側の HuR 量が顕著に多いことを示した。これらの結果は、HuR は正常細胞では核のみに存在しているが、口腔がん細胞では核のみならず細胞質にも存在していることを示しており、口腔がん細胞では HuR タンパクが核外に輸送されていることを示唆している。

次に、ARE-mRNA の核外輸送を調べるために、各細胞の *c-fos*, *c-myc* mRNA の細胞内

局在を *in situ* hybridization 法で検索し、*c-fos* ならびに *c-myc* mRNA は HGF 細胞では核およびその周辺のみで局在しているのに比べ、HSC-3, Ca9.22 などのがん細胞では核だけではなく細胞質側にも広く分布していることを確認した。この結果は、口腔がん細胞では、ARE-mRNA が細胞質へ輸送されていることを示唆している。

さらに、ARE-mRNA の安定化を検討するため、定量性リアルタイム RT-PCR 法を用いて、その総量を測定し、HSC-3 と Ca9.22 細胞では、正常口腔細胞である HGF に比べて、*c-fos* ならびに *c-myc* などの ARE-mRNA 量が著しく多いことを明らかにした。同様の細胞を用いて、actinomycin D により RNA polymerase II による転写を停止させた実験でも、口腔がん細胞において *c-fos* mRNA 量がより多く認められたことは、本実験における mRNA の増加は転写の活性化によるものではなく、口腔がん細胞において ARE-mRNA が正常細胞に比べてより多く蓄積されている、すなわち ARE-mRNA が安定化されていることを示している。

本研究により、口腔扁平上皮がん細胞では、HuR と ARE-mRNA が細胞質へ輸送されていること、また同細胞で ARE-mRNA が安定化されていることが明らかになった。さらに、このことは、HuR の細胞質局在の有無の検索が口腔がんの診断に有用である可能性を示している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) 血清刺激などの際に、ARE-mRNA が AUF 1 ではなく HuR と結合する機序は、
 - 2) HuR に 3 つの ARE 結合 motif がある意義は、
 - 3) 蛍光免疫染色における merge とは、
 - 4) 核外輸送蛋白について、
 - 5) CRM-1 inhibitor について、
 - 6) mRNA が翻訳される際、HuR は ARE-mRNA と結合したままなのか、
 - 7) 白板症において、HuR はどの程度、核外輸送されているのか、
- 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、口腔扁平上皮がん細胞において HuR と ARE-mRNA が核から細胞質に輸送されていること、また同細胞において ARE-mRNA が安定化されていることを明らかにし、HuR の細胞質局在の有無の検索が口腔がんの診断に有用である可能性を示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。