

学位論文題名

HuR and AU-rich element containing mRNA are necessary for angiogenic phenotypes in tumor endothelial cells

(腫瘍血管内皮細胞における HuR を介した VEGF-AmRNA の発現亢進は腫瘍血管新生を促進する)

学位論文内容の要旨

生体に生じるがんは様々な細胞から構成されている。実質には腫瘍細胞が、間質には線維芽細胞、免疫細胞や血管内皮細胞が存在する。これまで、腫瘍細胞には種々の異常があることが知られていたのに対して、間質細胞は正常であると考えられてきた。しかし、近年、間質細胞も正常と異なる性質をもっていることが報告され始めている。Hidaらはこれまでに、がん間質に存在する腫瘍血管内皮細胞 (tumor endothelial cell:TEC) が様々な点で正常血管内皮細胞 (normal endothelial cell:NEC) とは異なることを報告してきた。例えば、TECはNECと比較してTumor endothelial markers (TEMs) や Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (VEGFR-2) などの遺伝子発現が亢進している。

VEGFは強力な血管新生因子の一つで、その中でもVEGF-Aは量的にも活性の強さからも血管新生および血管発生において主要な役割を果たしている。VEGF-A mRNAは非翻訳領域にAU(アデニン、ウラシル)-rich element (ARE)をもつARE-mRNAである。ARE-mRNAには、c-mycやc-fosなど、腫瘍細胞の悪性化に重要な役割を果たす遺伝子から転写されたものが多く、Hu antigen R (HuR)によって安定化されることが知られている。通常、HuRは細胞の核に局在しているが、低血清や熱ショック等の刺激が細胞に加わると、AREに特異的に結合し、ARE-mRNAを核外輸送し、細胞質において安定化することが知られている。HuRのmRNA核外輸送のメカニズムについて未だその詳細は不明であるが、腫瘍細胞では正常な細胞とは異なる機序によりARE-mRNAを核外輸送していることが知られている。また、がんの悪性度が高いほど細胞質のHuRのタンパクレベルが高いことも報告されている。これまで、腫瘍細胞におけるVEGF-Aの発現とHuRによる核外輸送との関連についての報告は散見されるが、血管内皮細胞においてこの関連を検討した報告はない。そこで、本研究では、TECを用いてVEGF-A mRNAの発現亢進とHuRによる核外輸送・安定化との関連について検討し、さらに、TECの生物学的性質に対してHuRノックダウンの及ぼす作用を解析した。

実験には、ヒト口腔がん細胞移植マウスから分離培養したTEC (oral carcinoma EC) と、正常マウス皮膚から分離培養したNEC (skin EC) を用いた。定量的real-time RT-PCR

法を用いて解析したところ、TECはNECに比べてVEGF-A mRNAの発現を著明に亢進していた。これまでに、TECでは、NECに比較して増殖が早いことやVEGF receptor (VEGFR)-1、VEGFR-2の発現がNECに比べ数倍から十数倍ほど高いことが報告されている。今回の結果では、TECが自身でVEGF-Aを発現していることが示され、その高い増殖能にはVEGF-Aのオートクライン機構が関与している可能性が示唆された。蛍光免疫染色法により細胞内におけるHuRタンパクの局在を検討したところ、NECでは、正常な細胞であるHMVECと同様にHuRは核のみに局限していた。一方、TECでは、腫瘍細胞であるoral carcinoma cellと同様に核と細胞質の双方にHuRが存在していたことから、TECにおいてはHuRが細胞質へ核外輸送されている可能性が示唆された。そこで、TECにおけるVEGF-A mRNAの発現亢進とHuRによる核外輸送ならびに安定化との関連を検討するため、siRNAによるHuRノックダウン実験を行った。TECを核と細胞質とに分画し、細胞質におけるVEGF-A mRNAの変化を解析したところ、HuRをノックダウンしたTECでは、細胞質におけるVEGF-A mRNA量が明らかに減少したことから、HuRはVEGF-A mRNAの核外輸送と安定化を介してmRNAの発現亢進に関与していることが示唆された。次に、HuRノックダウンに伴うVEGF-A発現量の減少が、TECの生物学的な性質に及ぼす影響を検討した。低血清環境におけるTECの生存能を検討したところ、HuRをノックダウンした細胞群では未処理群やコントロールsiRNAを導入した群に比べて、生細胞数が有意に減少した。また、HuRノックダウンに伴い、低血清環境におけるTECの自由運動能も著明に抑制された。そこで、血管内皮細胞の生存や運動に関わるシグナル分子であるAktに注目し、HuRノックダウンがAktのリン酸化に及ぼす影響をウエスタンブロッティング法で検討した。HuRをノックダウンした細胞群ではAktのリン酸化が抑制されており、HuRノックダウンによるTECでのVEGF-Aの発現低下、さらにはVEGF-Aのオートクライン機構の抑制には、Akt/PI3K経路のシグナル伝達の抑制が関与していることが示唆された。血管内皮細胞の生物学的な性質の一つである管腔形成能も、HuRノックダウンに伴って著明に抑制された。

HuRノックダウンによりTECの生存能、運動能、管腔形成能、ならびにこれらに関与するシグナル分子であるAktのリン酸化が抑制された。これらの結果は、TECにおいて発現亢進していた血管新生因子、VEGF-A mRNAが、HuRノックダウンにより発現が低下し、TECにおけるVEGF-Aのオートクライン機構が機能しなくなったことを示すものと考えられた。HuRをノックダウンしたTECに対してVEGF-Aを添加することにより、生存能や運動能、管腔形成能がコントロールとほぼ同程度に回復したこともこの考え方を支持している（データ非公開）。

以上の結果より、TECにおいてHuRはVEGF-A mRNAの核外輸送および安定化を介してその発現亢進に関与し、TECの生存や運動、管腔形成を促進することで腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしていることが示された。このことは、HuRをターゲットにした血管新生阻害療法をがんの治療に応用できる可能性を示唆している。

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 特任准教授 樋 田 京 子

学 位 論 文 題 名

HuR and AU-rich element containing mRNA are necessary for angiogenic phenotypes in tumor endothelial cells

(腫瘍血管内皮細胞における HuR を介した VEGF-AmRNA の発現亢進は腫瘍血管新生を促進する)

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とおりである。

本研究は、腫瘍血管内皮細胞 (tumor endothelial cell: TEC) における VEGF-A mRNA の発現亢進と HuR による核外輸送・安定化との関連、ならびに TEC の生物学的性質に対する HuR ノックダウンの影響を解析したものである。実験には、ヒト口腔がん細胞移植マウスから分離培養した TEC (oral carcinoma EC) と、正常マウス皮膚から分離培養した正常血管内皮細胞 (skinEC; normal endothelial cell: NEC) を用いた。

まず、定量的 real-time RT-PCR 法を用いて、TEC は NEC に比べて VEGF-A mRNA の発現を著明に亢進していることを明らかにし、TEC の高い増殖能には VEGF-A のオートクライン機構が強く関与している可能性を示した。

蛍光免疫染色法により細胞内における HuR タンパクの局在を検討し、NEC では HuR は核のみに認められる一方、TEC では核と細胞質の双方に存在することを明らかにし、TEC においては HuR が細胞質へ核外輸送されている可能性を示した。

次に、siRNA によって HuR のノックダウンを行い、TEC における VEGF-A mRNA の発現亢進と HuR による核外輸送ならびに安定化との関連を検討した。HuR をノックダウンした TEC では、細胞質における VEGF-A mRNA 量が著しく減少していることを示し、HuR が VEGF-A mRNA の核外輸送と安定化を介して mRNA の発現亢進に関与していることを明らかにした。また、HuR ノックダウンに伴う VEGF-A 発現量の減少が TEC の生物学的な性質に及ぼす影響について検討し、HuR をノックダウンした細胞群では、未処理群やコントロール siRNA を導入した群に比べて、低血清環境における TEC の生存能は有意に減

少し、TECの自由運動能も著明に抑制されること、また血管内皮細胞の生物学的な性質の一つである管腔形成能も著明に抑制されることを明らかにした。

さらにHuRノックダウンがAktのリン酸化に及ぼす影響についてウエスタンブロッティング法を用いて検討し、HuRをノックダウンした細胞群ではAktのリン酸化が抑制されていることを示し、HuRノックダウンによるTECでのVEGF-Aの発現低下や生物学的性質の変化には、Akt/PI3K経路のシグナル伝達の抑制が関与していることを明らかにした。

これらの結果から、TECにおいて、HuRはVEGF-A mRNAの核外輸送および安定化を介してその発現を亢進し、TECの生存能や運動能を高め、さらに管腔形成を促進することにより、腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしていると考えた。

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. 蛍光免疫染色で細胞質内にHuRの局在が認められた腫瘍血管内皮細胞の比率はどのくらいであったか、
 2. 本研究で用いた細胞分画法の詳細とその精度について、
 3. Tube formationを生じる際、血管内皮細胞の中でp38MAPKが活性化する遺伝子は何か、
 4. VEGF/VEGFRの下流でp38MAPKの活性化を直接誘導するMAPKKK、MAPKKは何か、
 5. HuRをノックダウンした際、腫瘍血管内皮細胞の細胞質におけるVEGF-A mRNAの発現減少がみられているが、細胞全体での発現レベルの低下はなかったのか、
 6. HuRがmRNAを安定化する機序について、
 7. RNA干渉法の原理について、
 8. 分離した血管内皮細胞の品質管理について、
 9. Tumor associated macrophage, Cancer associated fibroblastについて、
- 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、TECにおいて、HuRはVEGF-A mRNAの核外輸送および安定化を介してその発現亢進に関与し、TECの生存や運動、管腔形成を促進することにより、腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしていることを明らかにし、HuRをターゲットにした血管新生阻害療法はがんに対して有効な治療法になりうる可能性があること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。