

学位論文題名

Roles of HuR in oral carcinogenesis and
changes of oncogenic potential by HuR knockdown

(HuR の口腔がん発生における役割と HuR ノックダウンによる
がん細胞の悪性形質の変化)

学位論文内容の要旨

HuR は、embryonic lethal abnormal vision(Elav)-like protein family に属する RNA 結合タンパクで、RNA recognition motif (RRM) を有しており、AU-rich element (ARE) に特異的に結合する。ARE は AUUUA をコア配列としたモチーフで、癌遺伝子、細胞周期調節遺伝子、およびサイトカインなどの、細胞増殖や生存に関連する遺伝子などから転写される mRNA の主に 3' 側非翻訳領域に存在する。ARE を持つ mRNA (ARE-mRNA) は現在約 4000 種類が知られており、全 mRNA の約 1/5 を占める。細胞刺激のない状態では、ARE-mRNA は、AUF1 などの分解に関わる RNA 結合タンパクと結合し、RNA 分解酵素エキソソームにより mRNA 合成後すぐに分解される。一方、細胞に heat shock などのストレスが加わると、HuR は ARE に結合し、核外輸送タンパクである CRM1 依存的に核外輸送され、ARE-mRNA の細胞質局在が一時的に増加し、かつ安定化される。HuR は全身の細胞に発現し、正常細胞では主に核に局在している。これに対して、大腸がんなどでは、HuR が恒常的に核外輸送されており、また ARE-mRNA の安定化も認められ、HuR の細胞質への局在変化とがんの悪性度は相関すると考えられている。

本研究では、RNA 結合タンパクを標的とした口腔がんの診断および治療のための基礎研究として、口腔がん細胞における HuR と ARE-mRNA の挙動、および HuR をノックダウンすることによる口腔がん細胞の性質変化を検討した。

口腔がん細胞と正常歯肉細胞を用いて、HuR の発現量と局在を免疫染色と Western 法で検索したところ、口腔がん細胞では正常細胞に比べて、HuR の発現量が増加していた。次に ARE-mRNA の蓄積量と局在を real-time RT-PCR 法と *in situ* hybridization 法で検索した。その結果、口腔がん細胞では、HuR と ARE-mRNA の細胞質局在の亢進が認められ、核外輸送が促進していることが示唆された。口腔がん細胞では、ARE-mRNA の蓄積量が増加していたため、mRNA の合成を阻害する actinomycin D で処理後、経時的に ARE-mRNA を定量し半減期を求めた。口腔がん細胞では正常細胞に比べて、ARE-mRNA の

半減期が長くなっており、口腔がん細胞では ARE-mRNA が安定化されていることが示された。さらに、正常細胞では HuR は CRM1 依存的に核外輸送されていたが、口腔がん細胞では CRM1 非依存的に、CRM1 とは異なった経路で核外輸送されていることも明らかになった。

次に、口腔がん細胞株を用いて HuR ノックダウンが、がん細胞の性質に及ぼす影響について検討した。HuR siRNA を導入した口腔がん細胞では、control siRNA を導入した細胞に比べて、HuR タンパクの発現抑制が効果的に行われていた。細胞質側の ARE-mRNA の変化を検討するため、HuR をノックダウンした細胞を核と細胞質に分離し、細胞質 ARE-mRNA (*c-fos*, *c-myc*, ならびに *COX2*) を real-time RT-PCR 法で測定した。HuR ノックダウンにより、細胞質の ARE-mRNA 量は口腔がん細胞と正常細胞のいずれにおいても低下したが、口腔がん細胞でより顕著で、HuR ノックダウンの影響は口腔がん細胞でより強いことが明らかになった。同様の結果は、*in situ* hybridization 法を用いて、ARE-mRNA を可視化することによっても確認できた。

HuR をノックダウンすると、口腔がん細胞の ARE-mRNA の安定化がどのように変化するか検討した。HuR をノックダウンした細胞では、*c-myc* や *COX2* の半減期が短くなり、安定化が阻害されていた。次に、足場非依存性増殖能、運動能、ならびに浸潤能の検索を行い、HuR のノックダウンが、がんの悪性形質にどのような影響を与えるかについて検討した。足場非依存性増殖能の検討は、soft-agar colony formation assay を用いて行った。HuR をノックダウンした細胞では、コロニー数は少なく大きさも減少しており、足場非依存性増殖能が抑制されていた。細胞運動能の検討には wound healing assay を、細胞浸潤能の検討には Matrigel invasion assay を用いた。HuR をノックダウンした細胞は、有意に細胞の移動度が低下し、浸潤能の低下も認められた。これらの結果より、HuR をノックダウンすることにより、口腔がん細胞の悪性形質を著しく減弱できることが明らかとなった。

悪性形質を減弱させるメカニズムについて解析した。細胞周期を進行させるタンパクである cyclin A、cyclin B、ならびに cyclin D は ARE-mRNA であることが知られている。HuR をノックダウンした細胞で cyclin A、cyclin B1、ならびに cyclin D1 の発現について検討したところ、HuR をノックダウンしたがん細胞では、これらのタンパクの発現量が低下していた。さらに、M 期の進行に重要な CDK1 の発現量も低下していた。*cdk1* mRNA と HuR の関連についてはこれまで報告が全くないため、*cdk1* mRNA と HuR の結合を RNP-IP 法を用いて検索した。その結果、両者は結合していることが証明され、さらに、HuR をノックダウンした口腔がん細胞では、*cdk1* mRNA の蓄積が低下し、半減期も短くなっていることが明らかとなった。これらの所見は、口腔がん細胞では、HuR が *cdk1* mRNA に結合することで、*cdk1* mRNA の安定化とタンパク発現を亢進し、細胞分裂活性を増強させることを示している。

以上の結果より、HuR は口腔がんで過剰発現し、ARE-mRNA は HuR と共に核外輸送および安定化されていることが明らかとなった。さらに、HuR をノックダウンすることにより、口腔がん細胞における HuR と ARE-mRNA 複合体の核外輸送と ARE-mRNA の安定化を妨げ、悪性形質を減弱できることも明らかとなった。この研究により、HuR や ARE-mRNA の局在変化の検索を行うことで、口腔扁平上皮境界病変

における悪性化の有無や、がん細胞の悪性度を予測できる可能性が示された。また本研究は、RNA 結合タンパクが、がん治療のためのトランスレーショナルリサーチに応用可能であることを示している。

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

Roles of HuR in oral carcinogenesis and changes of oncogenic potential by HuR knockdown

(HuR の口腔がん発生における役割と HuR ノックダウンによるがん細胞の悪性形質の変化)

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。

HuR は全身の細胞に発現し、正常細胞では主に核に局在している。これに対して、がん細胞では、HuR が核から細胞質へ恒常的に輸送されており、また HuR と特異的に結合している ARE-mRNA の安定化も認められることから、HuR の細胞質への局在変化は細胞の悪性化やがんの悪性度と相関すると考えられている。

本研究は、HuR を標的とした口腔がんの診断と治療への応用に向けた基礎的研究として、口腔がん細胞における HuR と ARE-mRNA の挙動、および HuR ノックダウンによる口腔がん細胞の性質変化について検討したものである。

最初に、口腔がん細胞と正常歯肉細胞を用いて HuR の発現量と局在を免疫染色法とウエスタンブロット法で検索し、口腔がん細胞では HuR の発現量が増加していることを確認した。次に ARE-mRNA である *c-fos* と *c-myc* の細胞質における蓄積量と局在を real-time RT-PCR と *in situ* hybridization 法で検索し、口腔がん細胞では、HuR と ARE-mRNA の細胞質局在が亢進していたことから、核外輸送が促進していると推論した。また、細胞を mRNA 合成阻害薬 actinomycin D で処理後、経時的に ARE-mRNA を定量し、口腔がん細胞では ARE-mRNA 半減期の延長がみられたことから、ARE-mRNA が安定化していると推論した。さらに、核から細胞質への輸送タンパク CRM1 の選択的阻害剤である MG132 で処理しても、HuR と ARE-mRNA が核外に認められることを明らかにし、口腔がん細胞では、HuR は CRM1 非依存的に、CRM1 とは異なった経路で核外輸送されていると推論した。

次に、口腔がん細胞株を用いて、HuR ノックダウンががん細胞の性質に及ぼす影響について検討し、HuR siRNA を導入した口腔がん細胞では、control siRNA を導入した細胞

に比べて、HuR タンパクの発現が強く抑制されることを明らかにした。また、HuR をノックダウンした細胞を核と細胞質とに分離後、細胞質側の ARE-mRNA (*c-fos*, *c-myc*, *COX2*) の変化を real-time RT-PCR 法を用いて検討し、HuR ノックダウンの影響は口腔がん細胞でより強いことを明らかにし、*in situ* hybridization 法による ARE-mRNA の可視化でも、同様の結果が得られることを確認した。さらに、HuR をノックダウンした細胞では、*c-myc* や *COX2* の半減期が短縮していることから、ARE-mRNA の安定化が阻害されていると推論した。

次に、がんの悪性形質に対する HuR ノックダウンの影響について検討し、HuR ノックダウン細胞では、足場非依存性増殖能や運動能、浸潤能が低下していることを明らかにし、HuR ノックダウンにより口腔がん細胞の悪性形質は著しく減弱すると推論した。

最後に、細胞増殖活性との関連について検索した。HuR ノックダウン細胞では、cyclin A や cyclin B1, cyclin D1 の発現量が低下し、M 期の進行に重要な CDK1 の発現量も低下していることを明らかにした。そこで、*cdk1* mRNA と HuR の結合を RIP-Chip 法で検討し、*cdk1* mRNA は HuR と結合することを確認した。さらに、HuR ノックダウン口腔がん細胞では、*cdk1* mRNA の蓄積が低下し、半減期も短くなっていることを明らかにし、口腔がん細胞では、HuR が *cdk1* mRNA に結合することにより、*cdk1* mRNA の安定化とタンパク発現を亢進し、細胞分裂活性を増強していると推論した。

本研究により、HuR や ARE-mRNA の局在を検索することで、口腔扁平上皮病変における悪性化の有無、ならびにがん細胞の悪性度を予測できる可能性が示された。また、RNA 結合タンパクである HuR をターゲットとした分子標的治療の可能性が示唆された。

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、以下の通りである。

- 1) ARE-mRNA の核外輸送における HuR と CRM1 の働きについて、
- 2) actinomycin D が mRNA の合成を阻害する機序について、
- 3) 現在知られている ARE-mRNA の数・種類について、
- 4) mRNA の半減期延長によりタンパク質は増加したのか、
- 5) HuR ノックダウンにより細胞質側の ARE-mRNA が減少したことは、臨床的にどのような意味を持つか、
- 6) 細胞質側 ARE-mRNA の変化を検索する際、*COX1* ではなく *COX2* を選んだのは何故か、
- 7) HuR をターゲットとした分子標的治療を臨床応用する際に解決すべき問題は何か、

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な回答が得られた。本研究は、HuR が口腔扁平上皮がん細胞の悪性化ならびに悪性形質の発現に重要な役割を担っていることを明らかにし、さらに HuR が口腔癌の分子標的治療において有力な標的分子とな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。