



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口腔扁平上皮がん細胞におけるELAVL 2の発現
Author(s)	畑中, 知之; 三河, 洋平; 東野, 史裕 他
Citation	北海道歯学雑誌, 40(2), 79-86
Issue Date	2020-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77555
Type	journal article
File Information	40_02_02.pdf



原 著

口腔扁平上皮がん細胞におけるELAVL2の発現

畑中 知之¹⁾ 三河 洋平³⁾ 東野 史裕³⁾
鄭 漢忠¹⁾ 安田 元昭²⁾

抄 録：一群の転写因子やサイトカインのmRNAの3' 非翻訳領域 (UTR) にはAU-rich element (ARE) と呼ばれる配列が存在し、これらのmRNA (ARE mRNA) の半減期は極端に短い。ELAVL1はARE mRNA を特異的に安定化させ、その細胞質局在が悪性腫瘍症例の予後と関連することが報告されている。今回、神経特異的に発現するとされるELAVL2に注目し、口腔扁平上皮がんの分化度との関連性を検討した。Real Time PCR法により、低分化型口腔扁平上皮がん細胞株SASのELAVL2 mRNA 発現量は高分化型口腔扁平上皮がん細胞株HSC2に比較して圧倒的に高いことが示された。HSC2ではELAVL1が核局在性を示したが、SASでは細胞質への移行がみられた。免疫沈降法により細胞質中のELAVL1がELAVL2と結合していることが確認された。さらに、ELAVL2を強制発現したHSC2 ELAVL2では、ARE配列を有する遺伝子の発現亢進が認められ、中でも幹細胞性の制御に関わり3' UTRにAREを有するLin28BはELAVL2の強制発現により発現が上昇していた。ヌードマウスに移植したHSC2 ELAVL2では、角化傾向の低い腫瘍巣が多数認められ、ELAVL2が口腔扁平上皮癌の分化に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

キーワード：口腔扁平上皮がん, ELAV, AU-rich element, がん幹細胞

緒 言

口腔扁平上皮がんは悪性腫瘍の約3%を占め、早期に発見されればその予後は比較的良好な腫瘍であるが、一部の症例は治療に抵抗性を示したり、複数回の再発をきたすものもみられる¹⁾。近年のがん幹細胞仮説²⁾を考慮すると、このような症例の組織中に含まれるがん幹細胞プールは多いことが予想されるが、未だ有力な口腔扁平上皮がん幹細胞マーカーは確定しておらず詳細は不明である。一方、山中博士らにより作製されたiPS細胞が示すように³⁻⁵⁾、上位の少数の遺伝子群が幹細胞性の維持に大きな役割を果たしている可能性は高い。

非翻訳領域 (UTR) を介した遺伝子発現調節はがん細胞の形質発現に大きな影響を与える。一群のサイトカインや転写因子のmRNAの3' UTRにはAU-rich配列 (ARE) と呼ばれる配列が存在する。これらARE mRNAの半減期は極端に短く、外界からの刺激の変化に応答し、速やかにその発現量が調節される⁶⁾。AREのコンセンサス配列は

WWUUAUUUAUUWW (WはAまたはU) であり、この配列にAUF1, TTP, TIA-1などのRNA結合性タンパク質が結合するとARE mRNAはRNA分解が顕著となり不安定化するとされる⁶⁾。AUF1によりP21, cyclin D1, c-fos, c-myc, TNF-alpha, GM-CSF mRNAは発現が減少し、TTPはc-fos, GM-CSF, TNF-alpha, Cox-2, IL-2, IL-3のmRNA発現を低下させる。またTIA-1がTNF-alpha, Cox-2のタンパク質発現を低下させることが報告されている⁶⁾。

ELAVLファミリーはショウジョウバエ*elav* (embryonic lethal abnormal visual system)のヒトホモログで、現在まで異なる遺伝子座に存在する4遺伝子 (*ELAVL1*~*ELAVL4*) が報告されている⁷⁻⁹⁾。いずれのタンパク質もARE配列に結合するRNA結合タンパク質であるがその細胞内局在と組織分布は異なる。ELAVL1は全ての組織で多量に発現しており、正常組織では核に局在する。ELAVL2~4の発現は神経系組織にのみ発現することが報告されている⁸⁾。またELAVL2~4は主に細胞質に局在する⁸⁾。いずれのELAVLタンパク質もストレス環境下ではストレス顆粒

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔顎顔面外科学教室

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔分子微生物学教室

³⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔病理学講座

(stress granule) と呼ばれる細胞内顆粒に mRNA との複合体の形で局在し、mRNA の代謝に関与することが知られている⁷⁻⁹⁾。ELAVL1/ HuR は全ての細胞で ubiquitous に発現し、細胞の維持・増殖に必須である。また c-Fos、MyoD、p21、Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1、NOS II/iNOS、GM-CSF、TNF- α 、Cox-2、IL-3、VEGF、Myogenin などの ARE mRNA を安定化させることが報告されている⁶⁾。我々も、高転移性がん細胞株で、ARE を有する HIF-1 α の発現量が有意に上昇していることを示した¹⁰⁾。しかし ELAVL1 の強制発現のみで HIF-1 α の mRNA 発現量は増加せず、その他の因子が必要であることが示唆された。

臨床病理学的報告によれば、ELAVL1 の細胞質局在は、悪性腫瘍症例の予後不良因子である。Denkert らは、106 例の大腸がん症例を解析し、細胞質 ELAVL1 を免疫組織学的に検出した。この報告によれば DUKES ステージ分類 A ~ D (A: 限局性、B: 大腸内壁を貫通するがリンパ節転移なし、C: B かつリンパ節転移を伴う、D: 遠隔転移を伴う) にてステージが進行したもので有意に ($p=0.028$) ELAVL1 の細胞質陽性率が高い。また、ELAVL1 細胞質陽性症例では有意に ($p=0.015$) Cox-2 の陽性率が高いことも示されている¹¹⁾。Niesporek らは 104 例の正常前立腺と 104 例の前立腺がん組織を免疫染色し、前立腺がんでは有意に ($p<0.0001$) ELAVL1 の細胞質局在率が高いことを報告している¹²⁾。同報告の中でも、やはり ELAVL1 細胞質陽性症例では有意に ($p=0.005$) Cox-2 の陽性率が高いことが示されており、多変量生存分析の結果、ELAVL1 細胞質局在は重要な予後因子であると結論付けられている。

Hasegawa らは、アデノウイルス E4orf6 が ELAVL1 の核外輸送を行うことを報告しており^{13, 14)}、上述した臨床例ではアデノウイルス E4orf6 に代わる何らかの因子が ELAVL1 の細胞質局在に関与し、悪性腫瘍の予後に影響を与えていると思われた。また Kakuguchi らは口腔扁平上皮癌細胞株では細胞質に多くの ELAVL1 が存在していることを報告している¹⁵⁾。

我々は悪性度の高い口腔扁平上皮がんにおいて ELAVL1 の核外輸送を行う分子が存在し、ARE を含む幹細胞性維持に関わる遺伝子 (群) の mRNA が安定化しているのではないかという仮説を設定し今回の実験を企画した。

方 法

すべての遺伝子組み換え実験は国立大学法人北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程、動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

1. 細胞株

口腔扁平上皮がん細胞株 HSC2、HSC3、SAS は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バン

クより購入した。乳がん細胞株 MCF7 は理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室より購入した。29310A1 パッケージング細胞は札幌医科大学がん研分子生物学講座藤永教授より供与を受けた。全ての細胞は 10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) にて培養した。

2. ウエスタンブロットングおよび免疫沈降法

Hypotonic Buffer (10 mM HEPES (pH 7.9) / 10 mM KCl / 0.1 mM EGTA / 0.1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0.5 mM PMSF) にて細胞を膨潤・破裂させたのち核成分を遠心分離し沈殿を核画分、上清を細胞質画分として通常の SDS-PAGE を行った後、抗 ELAVL1 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗マウス HRP 標識ヤギ IgG (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) にてウエスタンブロットングを行った。免疫沈降には ELAVL2 ポリクローナル抗体 (MBL 医学生物学研究所、名古屋、日本)、プロテイン G アガロース (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。検出には Immobilon kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を使用した。

3. プラスミドおよび遺伝子導入

全ての 3' UTR 配列 (HIF1A: NM001530, cFos: NM_010234) は pmir GLO ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。ELAVL1 および ELAVL2 の全長 cDNA は pcDNA ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) あるいは pBabe puro ベクター (セントルイス大学 Chinnadurai 教授より供与を受けた) にクローニングした。トランスフェクションには Lipofectamin2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用した。

4. HSC2-ELAVL2 の樹立

pBabe ELAVL2 を 29310A1 細胞にトランスフェクトし、48 時間後に培養上清をろ過滅菌しウイルス液とした。対数増殖期にある HSC2 に 8 μ g/ml の polybrene (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を含むウイルス液を添加し 24 時間後から 1 μ g/ml 濃度の puromycin (和光純薬、大阪、日本) にて 4 週間選択培養し細胞株を樹立した。

4. Real Time PCR

TriZol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) により抽出した細胞全 RNA から Takara 社製 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit にて cDNA を合成し KAPA SYBR FAST qPCR (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いて得られる増幅反応曲線を Applied Biosystems StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて計測・解析した。

計測結果は付属の $\Delta\Delta CT$ アルゴリズムを用いて解析し内部標準遺伝子は β -Actin (ACTB)とした。プライマー・シーケンスは以下のごとくである。

ELAVL1 fwd : 5' ATGTCTAATGGTTATGAAG 3'
 ELAVL1 rev : 5' TTATTTGTGGGACTTGT 3'
 ELAVL2 fwd : 5' TTGGACAATCTGCTCAATAT 3'
 ELAVL2 rev : 5' TTAGGCTTTGTGCGTTTGT 3'
 ELAVL3 fwd : 5' CTCATCGCCAGGTCTCGC 3'
 ELAVL3 rev : 5' TCATGGTCACGAAGCCGAAA 3'
 ELAVL4 fwd : 5' AATCGGGGGTTTCAGCTCAC 3'
 ELAVL4 rev : 5' TCTGTTGTTGCTGGAGGGTC 3'
 ACTB fwd : 5' AACACCCAGCCATGTACGT 3'
 ACTB rev : 5' AGTACTTGCCTCAGGAGGA 3'

5. ルシフェラーゼアッセイ

各細胞にpmir GLO系のプラスミドをトランスフェクトし、24時間後にDual Luciferase kitおよびATTO社製ルミノメーター AB-2250を用いてルシフェラーゼ比活性を測定した。すべての実験はトリプリケートで行いt検定により統計学的有意差を算出した。

6. ノードマウス移植実験

5週齢期のメスBALB/c nu/nu mice (日本クレア, 東京, 日本)に 1×10^5 個の細胞を注射し、4週間後に腫瘍組織を摘出し、通法に従い包埋・薄切しパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織像を観察した。

結 果

1. 口腔扁平上皮がん細胞株間におけるAREレポーター発現の差

分化傾向の異なる3種類の口腔扁平上皮がん細胞株に、図1の3種類のAREレポータープラスミドを導入しルシフェラーゼ比活性を比較検討した。図1Bに示すごとく、高分化型の細胞(HSC2)では低分化型の細胞株(SAS)に比較して3'UTR依存的なルシフェラーゼ比活性(pmirHIFおよびpmirFOS)が有意に低下していることが明らかとなった。特に悪性度の決定因子の一つとされるHIF1Aの発現低下がSASにおいてほとんど見られなかった。

2. 細胞株によりELAVL1の細胞質局在の傾向は異なる

図2Aは核画分と細胞質画分ライセートを電気泳動し、ELAVL1に対するモノクローナル抗体によるウエスタンブロッティングを行った結果を示す。HSC2では細胞質画分にわずかにELAVL1が検出されるのみであったが、SASでは多くのELAVL1が細胞質に分布していた。

図2Bはノードマウスに移植した両細胞株のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色像であるが、大部分のELAV1

が核に局在するHSC2では高度な角化傾向が認められるが、ELAVL1が細胞質に大量に移行しているSASでは角化傾向はほとんど認められなかった。

3. 口腔がん細胞におけるELAVLファミリーの発現

口腔扁平上皮がんにおける、ELAVL1以外のELAVL familyタンパク質の発現をReal Time PCRにより解析した(図3)。ELAVL1の発現はほぼ同等であったが、他のELAVLはSASにおいて発現が上昇していた。これらの内ELAVL2の発現が最も多かったため、これ以降はELAVL2を対象として解析を進めた。

4. 細胞質に局在するELAVL1はELAVL2と結合している

細胞質におけるELAVL2とELAVL1の複合体形成を免疫沈降法により解析した。SASではELAVL2と結合しているELAVL1の大部分は細胞質に局在していたが、HSC2ではこのような共局在はわずかにみられる程度であった(図4)。

A

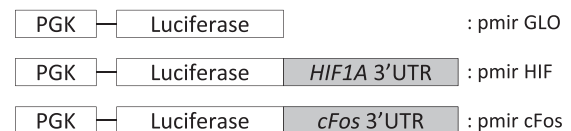


図1 A pmir GLOベクターのプラスミドマップ

ルシフェラーゼ配列の3'UTRに各遺伝子のARE配列をクローニングし、3'UTRレポーターを作製した。同ベクターにはrenilla luciferaseも導入されており、単一プラスミドの導入によりホタル・ルシフェラーゼ比活性を計測することができる。

B

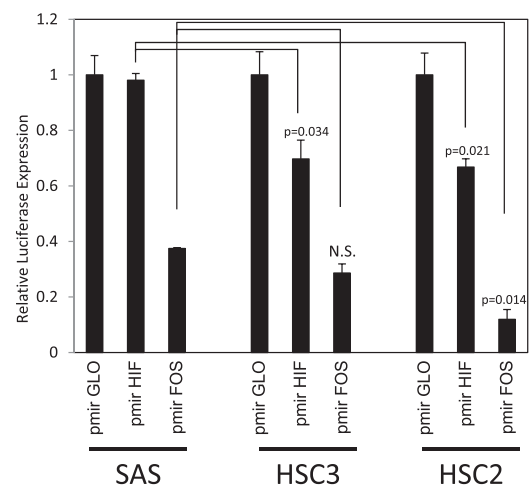


図1 B 口腔扁平上皮がん細胞への3'UTRレポーター導入結果

SAS, HSC2, HSC3に3'UTRレポーター導入し24時間後にDual Luciferase Kitにてホタル・ルシフェラーゼ比活性を計測した。実験はトリプリケートで3回行い、代表的な計測結果を図に示している。エラーバーは標準偏差を示し、数値はt検定の結果を示す。N.S.は有意差なし(not significant)を表している。

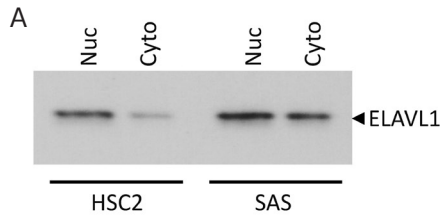


図2 A 核および細胞質画分におけるELAVL1タンパク質の検出結果

HSC2, SASの核および細胞質画分をSDS-PAGE後、抗ELAVL1抗体にてウエスタンブロッティングした結果を示す。HSC2では大部分のELAVL1が核に局在しているが、SASでは細胞質にもELAVL1が大量に存在することが示された。Nuc：核画分、Cyto：細胞質画分

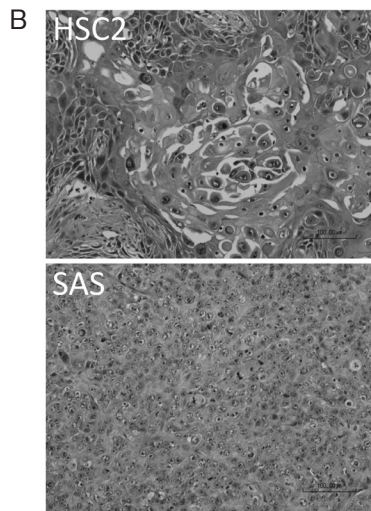


図2 B ノードマウス皮下移植した口腔扁平上皮がん細胞の組織像

HSC2, SAS移植により形成された腫瘍組織のHE染色像を示す。HSCは高度な角化を伴う組織像を示すが、SASは形態学的な角化がほとんど認められない。

5. ELAVL2は3' UTRを介してタンパク質発現量を上昇させる

図5は、ELAVL2との共導入により、AREレポーターの発現変化を検討した結果を示す。SAS, HSC2ともに、ELAVL2との共導入によりルシフェラーゼ比活性は有意に上昇した。特に、HSC2では、SASに比べ、より上昇する傾向にあった。ELAVL2を導入によりHSC2のルシフェラーゼ比活性は、空ベクターを導入したSASと同程度まで回復することが示された。

6. ELAVL2導入による形質変化

ELAVL2の発現によるARE依存的な遺伝子発現変化が口腔扁平上皮がん細胞の形質に与える影響を組織形態学的に評価するため、ノードマウスへの移植を試みた。レトロウイルスを用いて、ELAVL2導入株を作成し、ノードマウスに移植、4週間後に標本作製した。

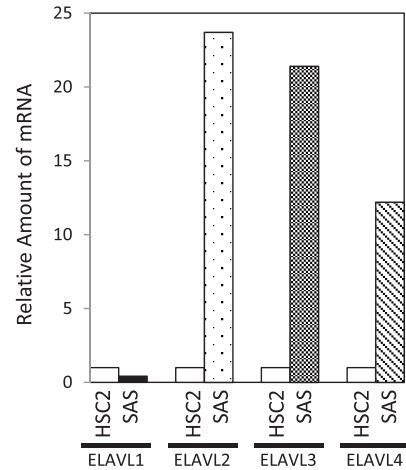


図3 リアルタイムPCRによるELAVファミリーmRNAの比較

HSC2, SASに発現しているELAVL1~ELAVL4のmRNA発現量をリアルタイムPCR法により定量的に比較した。ELAVL1発現はほぼ同等であるが、ELAVL2, 3, 4はSASでの発現が高くなっている。

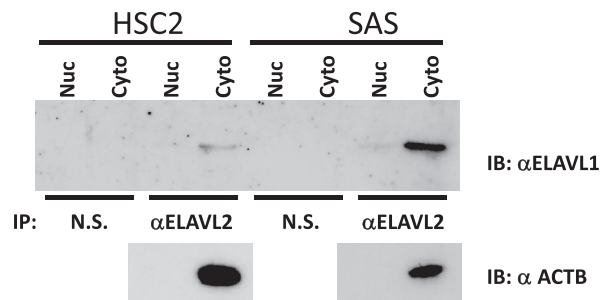


図4 免疫沈降法によるELAVL1とELAVL2の結合性の解析

HSC2, SAS両細胞の核および細胞質画分をそれぞれ抗ELAVL2抗体で免疫沈降し、抗ELAVL1抗体にてウエスタンブロッティングした結果を示す。SASの細胞質画分では抗ELAVL2抗体により多量のELAVL1タンパク質が共沈してきた。Nuc：核画分、Cyto：細胞質画分

図6は、HE染色像を示す。陰性対照としたHSC2-puro(薬剤耐性マーカー遺伝子のみを有するレトロウイルスを感染させたHSC2)を移植したノードマウスでは、角化した胞巣が多く見られた。一方、ELAVL2導入細胞であるHSC2-ELAVL2を移植した腫瘍塊では、HSC-puroと比べ、角化していない胞巣が多くみられた。

7. ELAVL2の標的候補としてのLin28B

ES細胞の遺伝子発現データベースの解析を行う中で、我々はLin28BがAREを多数有しており、ELAVL2の標的分子候補の一つと予想された。そこで、口腔扁平上皮がん細胞株におけるLin28Bの発現をウエスタンブロッティングにて解析した。図7 Aに示すように、HSC2ではLIN28Bはほとんど検出されなかったが、SASではLin28Bが多量に発現していた。また本来Lin28Bが検出されないHSC2

にELAVL2を強制発現させると内在性のLin28Bのタンパク量が検出可能なレベル、つまりSASと同等なレベルまで上昇した。

考 察

臨床病理学的な解析によれば、悪性腫瘍細胞における免疫染色では、特に悪性度の高いがん症例においては、ELAVL1が細胞質に陽性に染色されることが報告されており、有用な悪性度マーカーの一つに挙げられている^{11, 12)}。しかし、ELAVL1の強制発現のみではELAVL1の細胞質移行は顕著ではなく、その他のタンパク質の関与が示唆されている¹⁰⁾。これまでの報告では、アデノウイルス感染やヒートショックなどの因子がELAVL1の細胞質移行に関わることが示されてきたが^{13, 16)}、悪性度の高いがん症例においてELAVL1の細胞質移行が顕著に起こるかについての詳細は明らかではない。以前に、我々が行ったELAVL1の強制発現においてもARE mRNAの安定化が見られず、また、強制発現させたELAVL1は大部分が核に存在して

いた¹⁰⁾。

今回の実験により、我々は口腔がん細胞株においてELAVL1以外のELAVLタンパク質が発現しており、その中の一つであるELAVL2が低分化型の口腔扁平上皮がんにおいて高発現していること、そしてELAVL1がELAVL2と共に細胞質に複合体の形で存在していることを見出した。報告されているELAVL1 (REFSEQ proteins:NP_001410.2) およびELAVL2 (REFSEQ proteins:NP_001164666.1) のアミノ酸配列を比較すると74%のアミノ酸配列が一致し、85%のアミノ酸配列が相同性を示し、配列が特徴的なのはELAVL2のN末端側38アミノ酸であった。RNA結合に必須な3つのドメイン (RRM1, RRM2,

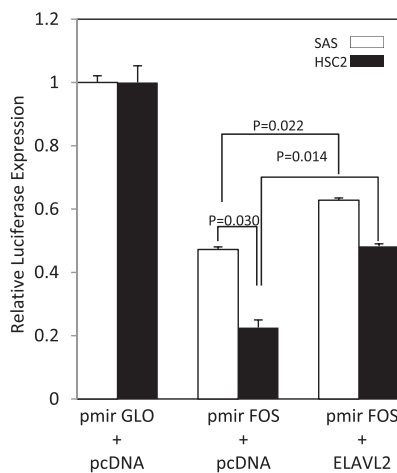


図5 ELAVL2強制発現によるAREレポーター発現変化

ELAVL2との共導入によりHSC2, SASの両細胞において3'UTRレポーターから発現するルシフェラーゼの比活性が有意に増加している (t検定)。

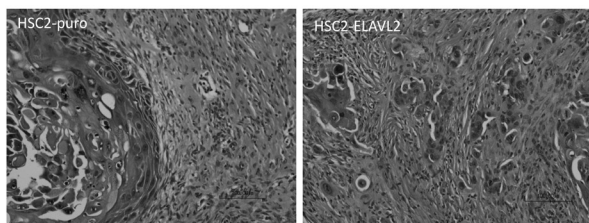


図6 ELAVL2発現によるHSC2腫瘍組織の形態変化

HSC2-puro (空ウイルスを導入したHSC2) とHSC2-ELAVL2を移植して形成された腫瘍組織のHE染色像を示す。HSC2-puroはHSC2親株と同様に高度な角化を伴っている (図2B参照)。一方、HSC2-ELAVL2を移植して形成された腫瘍組織では角化を伴わないがん胞巣が多数みられる。

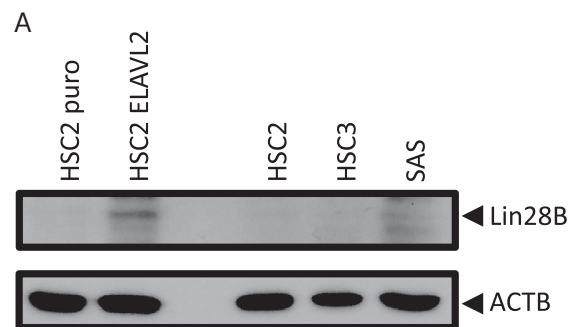


図7A 抗Lin28Bの発現

HSC2 puroではLin28Bは検出されないが、HSC2-ELAVL2 (ELAVL2強制発現株) では明瞭なLin28Bのバンドが検出されている。HSC2, HSC3でもLin28Bは検出されないが、SASではLin28Bが検出できる。

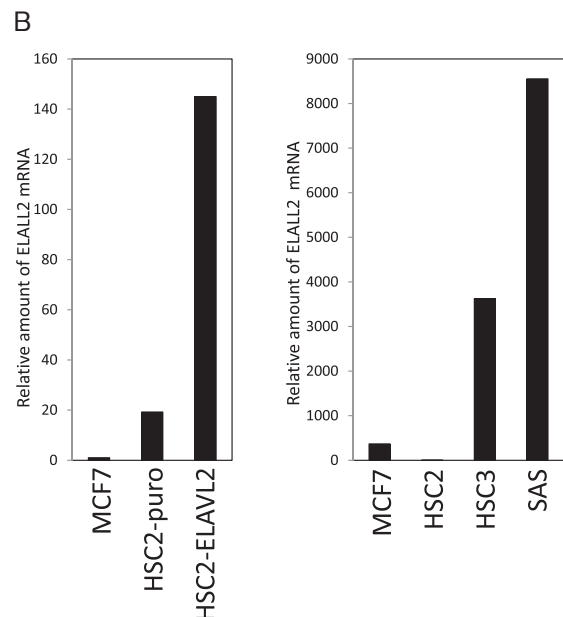


図7B 各口腔扁平上皮がん細胞におけるELAVL2 mRNA発現

各口腔扁平上皮がん細胞に発現しているELAVL2のmRNA発現量をリアルタイムPCR法により定量的に比較した。MCF7を比較のためプロットした。

RRM3) は、ほぼ完全に配列が保存されており、両タンパク質の局在の差はN末端領域のアミノ酸に依存している可能性が示唆された。また、RRM3ドメインはタンパク質どうしの結合に関わることが知られており¹⁷⁾、ELAVL1とELAVL2の結合に関与するのではないかと考えられたが、詳細については今後ELAVL2のRNA結合ドメインや核外輸送シグナル配列の変異体を用いた実験を行う必要があると思われる。

口腔扁平上皮がんは口腔がんの大部分を占める上皮性悪性腫瘍であり、その分化度は症例によって異なり、臨床病理学的には分化度と悪性度の間に一定の関連性があることが知られている^{18, 19)}。今回の実験においてELAVL2の導入により高分化型細胞株であるHSC2の分化傾向(角化の傾向)が抑制されることが明らかとなった。

近年の腫瘍学においては、悪性度の高いがん症例の腫瘍組織内には、多くのがん幹細胞が含まれているとする報告が多く^{20, 21)}、口腔扁平上皮がん組織においてもがん幹細胞は治療対象として考慮すべき細胞集団とみなされている²²⁾。しかしながら口腔扁平上皮がん幹細胞性を維持している遺伝子群については不明な点が多い。Lin28 (Lin28A) はマイクロRNA (miRNA) 結合性のタンパク質であり、let-7 pre-miRNAに結合することによりlet-7 miRNAの成熟を抑制することが報告されている²³⁾。この遺伝子カスケードにより、Lin28は細胞増殖を伴う組織形成や再生、腫瘍形成に関与すると考えられている^{5, 24)}。我々はES細胞特異的な発現を示す遺伝子リスト⁵⁾を検索する中で、iPS細胞を作製するのに使用されている遺伝子(いわゆる山中／Thomson因子)の1つであるLin28のホモログが含まれていることを見出した。Lin28BはLin28とそのアミノ酸配列の約80%に相同性を示すタンパク質であり、Lin28と同様にlet-7 pre-miRNAに結合すること、乳がん細胞MCF7に強制発現させるとその増殖を活性化することが報告されている²⁵⁾。興味深いことにLin28Bの3' UTRにはAUUUA配列が12ヶ所存在していた(NCBI Reference Sequence: NM_001004317.3の解析による)。ELAVL2強制発現により、本来Lin28Bが検出されないHSC2においてLin28Bの発現上昇が観察されたことは、Lin28BがELAVL2の標的分子の一つであること、Lin28Bが口腔扁平上皮がん細胞の分化傾向に大きな役割を果たしていることを示唆している。

今回我々が注目したES細胞特異的な発現を示す遺伝子リスト⁵⁾にはLin28B以外にもがん悪性化に関わると考えられる遺伝子が多数含まれていた。より網羅的にこれら遺伝子の3' UTR領域の解析を行い、口腔扁平上皮がんがん細胞性維持機構を明らかにしていくことが今後の課題である。

結 論

今回の実験で、神経組織系にのみ発現していると考えられてきたELAVL2タンパク質が口腔扁平上皮がんにおいても発現していることが明らかとなり、従来、悪性度の指標として報告されてきたELAVL1の細胞質局在にはELAVL2との複合体形成が必要であることが示唆された。ELAVL1/ELAVL2複合体がARE mRNA群を安定化させていた。これらARE mRNAの一つで幹細胞性制御に関わっていると考えられるLin28Bの発現がELAVL2の発現により誘導されることも明らかとなった。これらによりELAVL2が口腔扁平上皮がん制御、がん幹細胞制御における新たな治療標的であることが予想された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座顎顔面口腔外科学教室ならびに口腔細菌学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

本研究はJSPS科研費15K11064の助成をうけたものです。

参 考 文 献

- 1) Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer statistics. CA : Cancer J Clin 53 : 5-26, 2003.
- 2) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM : Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions : AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res 66:9339-9344, 2006.
- 3) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131 : 861-872, 2007.
- 4) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 : 663-676, 2006.
- 5) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318 : 1917-1920, 2007.
- 6) Barreau C, Paillard L, Osborne HB : AU-rich elements and associated factors : are there unifying principles? Nucleic Acids Res 33 : 7138-7150, 2005.

- 7) Campos AR, Grossman D, White K : Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J Neurogenet* 2 : 197-218, 1985.
- 8) Colombrita C, Silani V, Ratti A : ELAV proteins along evolution : back to the nucleus? *Mol Cell Neurosci* 56 : 447-455, 2013.
- 9) Mansfield KD, Keene JD : Neuron-specific ELAV/Hu proteins suppress HuR mRNA during neuronal differentiation by alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 40 : 2734-2746, 2012.
- 10) Yasuda M, Hatanaka T, Shirato H, Nishioka T : Cell type-specific reciprocal regulation of HIF1A gene expression is dependent on 5'- and 3'-UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* 447 : 638-643, 2014.
- 11) Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, Noske A, Niesporek S, Dietel M, Weichert W : Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer : association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Modern pathology : an official journal of the USCAP, Inc* 19 : 1261-1269, 2006.
- 12) Niesporek S, Kristiansen G, Thoma A, Weichert W, Noske A, Buckendahl AC, Jung K, Stephan C, Dietel M, Denkert C : Expression of the ELAV-like protein HuR in human prostate carcinoma is an indicator of disease relapse and linked to COX-2 expression. *Int J Oncol* 32 : 341-347, 2008.
- 13) Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F : HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *BJC* 100 : 1943-1948, 2009.
- 14) Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Ishino M, Taoka M, Isobe T, Kobayashi M, Totsuka Y, Kohgo T, Shindoh M : Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. *J Cell Biol* 170 : 15-20, 2005.
- 15) Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F : HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Canc Res : MCR* 8 : 520-528, 2010.
- 16) Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA : HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *PNAS* 97 : 3073-3078, 2000.
- 17) Toba G, White K : The third RNA recognition motif of *Drosophila* ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res* 36 : 1390-1399, 2008.
- 18) Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA, Morgan PR : The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. *Cancer* 74 : 789-794, 1994.
- 19) Okamoto M, Ozeki S, Watanabe T, Iida Y, Tashiro H : Cervical lymph node metastasis in carcinoma of the tongue. Correlation between clinical and histopathological findings and metastasis. *J Craniomaxillofac Surg* 16 : 31-34, 1988.
- 20) Jaworska D, Krol W, Szliszka E: Prostate Cancer Stem Cells : Research Advances. *Int J Mol Sci* 16 : 27433-27449, 2015.
- 21) Brungs D, Aghmesheh M, Vine KL, Becker TM, Carolan MG, Ranson M : Gastric cancer stem cells : evidence, potential markers, and clinical implications. *J Gastroenterol* 1-14, 2015.
- 22) Aso T, Matsuo M, Kiyohara H, Taguchi K, Rikimaru F, Shimokawa M, Segawa Y, Higaki Y, Umeno H, Nakashima T, Masuda M : Induction of CD44 variant 9-expressing cancer stem cells might attenuate the efficacy of chemoradiation and Worsens the prognosis of patients with advanced head and neck cancer. *PloS one* 10 : e0116596, 2015.
- 23) Shyh-Chang N, Daley GQ: Lin28 : primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell stem cell* 12 : 395-406, 2013.
- 24) Tanabe K, Nakamura M, Narita M, Takahashi K, Yamanaka S : Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *PNAS* 110 : 12172-12179, 2013.
- 25) Beachy SH, Onozawa M, Chung YJ, Slape C, Bilke S, Francis P, Pineda M, Walker RL, Meltzer P, Aplan PD : Enforced expression of Lin28b leads to impaired T-cell development, release of inflammatory cytokines, and peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 120 : 1048-1059, 2012.

ORIGINAL

ELAVL2 Expression in Oral Squamous-cell Carcinoma Cell Lines

Tomoyuki Hatanaka¹⁾, Youhei Mikawa³⁾, Fumihiro Higashino³⁾, Kanchu Tei¹⁾
and Motoaki Yasuda²⁾

ABSTRACT : A large number of growth factors, cytokines and proto-oncogenes contain the AU-rich element (ARE) in their 3' untranslated region (3' UTR). In addition, the half-life of ARE mRNAs are usually extremely short. Among several ARE binding proteins, ELAVL1 has been shown to stabilize ARE mRNA. Clinicopathological reports have demonstrated that the detection of the cytoplasmic ELAVL1 is an important prognostic factors of malignant tumor cases. In the present study, we demonstrated some novel functions of ELAVL2, a neuron specific ELAV member, in oral squamous-cell carcinoma cell lines. The Real Time PCR experiments revealed that the lower differentiated squamous-cell carcinoma cell line (SAS) expressed a higher amount of ELAVL2 mRNA, whereas the highly differentiated squamous-cell carcinoma cell line (HSC2) expressed only a small amount of ELAVL2 mRNA. It was indicated that a nuclear localization of ELAVL1 is obvious in HSC2 cells; however, a cytoplasmic localization of ELAVL1 was predominant in SAS cells. Those with cytoplasmic distributed ELAVL1 were co-precipitated with endogenous ELAVL2. A stabilized expression of ARE mRNAs was observed in HSC2-ELAVL2 cells which expressed exogenous ELAVL2. We also demonstrated an elevated expression of Lin28B, a candidate of stem-cell regulating genes which contains an ARE consensus sequence, in HSC2-ELAVL2 cells. Transplanted HSC2-ELAVL2 cells exhibited a lower keratinization tendency compared with control HSC2 cells. It is likely that cytoplasmic ELAVL1/ ELAVL2 complex, not ELAVL1 alone, plays a major role in the regulation of oral squamous-cell carcinoma differentiation via 3' UTR dependent ARE mRNA stabilization.

Key Words : oral squamous-cell carcinoma, ELAV, AU-rich element, cancer stem cell

¹⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine Hokkaido University, Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾ Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine Department of Oral Pathobiological Science, laboratory of Oral Molecular Microbiology, Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

³⁾ Graduate School of Dental Medicine Department of Oral Pathological Science, Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan