

論文内容要旨

口腔癌における miR-203 の標的遺伝子の同定と
その機能解析

基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学

(主指導教員：高田 隆 教授)

応用生命科学部門口腔外科学

(副指導教員：武知 正晃 准教授)

基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学

(副指導教員：宮内 睦美 准教授)

大林 真理子

論文内容要旨

論文題目

口腔癌における miR-203 の標的遺伝子の同定とその機能解析

学位申請者 大林 真理子

転移の有無は口腔癌の予後を規定する最も重要な因子の1つである。近年、癌の浸潤・転移過程において、癌細胞の上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) が非常に重要なステップとして考えられている。EMTとは上皮細胞が上皮としての特徴を喪失し、間葉系の形質を獲得することで、運動能、浸潤能を亢進させる機構である。以前、我々の研究室では口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移巣からMSCC-1細胞を樹立し、そこからin vitro invasion assay法を応用し、高浸潤能株MSCC-inv1細胞を分離した。MSCC-inv1細胞は、親株であるMSCC-1細胞と比較し、紡錘形の形態と上皮性マーカーであるE-cadherinの発現低下を示し、EMT様の表現型を呈していた。近年、EMTの誘導には、種々の遺伝子の転写後調節に関与するsmall non-coding RNAであるmicroRNA(miRNA)が重要な働きをすることが報告された。miRNAは標的mRNAに結合することで、標的遺伝子の発現抑制を行うRNAとして知られている。そこで、本研究では、上記2つの細胞株におけるmiRNA発現プロファイルの比較による口腔癌のEMTに関与するmiRNAの同定と、その標的遺伝子の探索を含む機能解析を目的とした。

2つの細胞株が発現するmiRNAをマイクロアレイを用いて比較したところ、親株であるMSCC-1細胞と比べ、MSCC-inv1細胞において発現が低下しているmiRNAには、miR-203が含まれていた。そこでmiR-203の発現の有無が口腔癌の浸潤に与える影響を検討した。miR-203の過剰発現は口腔癌の浸潤能を抑制し、逆に、miR-203のinhibitor処理は浸潤能を亢進させることを見出し、miR-203が口腔癌の浸潤を抑制するmiRNAであることを明らかにした。さらに、詳細な作用機序を検討するため、miR-203の標的遺伝子の同定を試みた。miRNAは機能する際、標的遺伝子のmRNAとともにmiRNA-induced Silencing Complex(miRISC)を形成するが、この複合体にArgonauto(Ago)2と呼ばれるタンパク質が含まれることを利用し、control細胞とmiR-203を過剰発現させた細胞で抗Ago2抗体を用いて免疫沈降し、miRISC中に含まれるmRNAをマイクロアレイで網羅的に比較した。この結果と、miRNAのonline databaseであるTargetScanHumanで予測されるmiR-203の標的遺伝子候補群を用いて、口腔癌細胞におけるmiR-203の標的遺伝子候補の絞り込みを行った。絞り込んだ標的遺伝子候補について、miR-203を過剰発現、あるいは発現抑制した場合の標的候補遺伝子の発現変化をリアルタイムPCRにて解析した。miR-203の過剰発現により発現が低下し、反対にmiR-203の発現抑制により発現上昇を示す遺伝子がmiR-203の標的遺伝子であると考え、解析を行ったところ、標的遺伝子候補としてNUAK1を見出した。NUAK1はAMPK-related kinaseの1つで、近年細胞増殖や浸潤・転移との関連が報告されている。miRNAは標的遺伝子mRNAの3'-UTR領域に結合することが報告されていることから、NUAK1 mRNAの3'-UTR領域を組み込んだreporter plasmidを作製し、luciferase reporter assayにて解析を行った。miR-203の過剰発現により、luciferase活性が有意に低下したことから、

miR-203がNUAK1 mRNAの3' -UTR領域への結合を介し、その発現を抑制することを明らかにした。口腔癌でNUAK1が浸潤能に影響を与えるかを検討するため、NUAK1過剰発現を行ったところ、浸潤能の亢進を認め、口腔扁平上皮癌症例のNUAK1の発現を免疫組織化学的に検討したところ、NUAK1の発現が浸潤様式や転移の有無などの臨床病理学的悪性度と相関することを見出した。従って、NUAK1は口腔癌の浸潤・転移に深く関わる分子であることが明らかとなった。加えて、TGF- β によるEMT誘導モデルにおいてNUAK1の発現上昇を認め、このTGF- β によるEMT誘導及びNUAK1発現上昇はmiR-203の過剰発現により抑制されることから、miR-203およびNUAK1はEMT誘導時にも関与することが明らかとなった。以上より、miR-203はNUAK1の発現調節を介してEMTと密接な関わりを持ち、口腔癌におけるその発現低下は浸潤能を促進し、予後に関わる重要なmiRNAであることが示唆された。