

第 8 号様式

論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	大林 真理子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
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			
論文審査担当者			
主 査	教授	内田 隆	印
審査委員	教授	兼松 隆	
審査委員	教授	吉子 裕二	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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 つであり、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) は非常に重要なステップであると考えられている。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、細胞の運動能、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 <i>in vitro</i> 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、種々の標的遺伝子の mRNA に結合し、発現抑制を行う 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てきている。そこで、上記 2 つの細胞株における miRNA 発現プロファイルをマイクロアレイを用いて比較することにより、口腔癌の EMT と浸潤に関与する miRNA の同定を試みたところ、親株である MSCC-1 細胞と比較して、MSCC-inv1 細胞における miR-203 の発現低下を認めた。miR-203 の発現の有無が口腔癌の浸潤に与える影響を検討すると、miR-203 の過剰発現が口腔癌の浸潤能を抑制し、反対に、miR-203 の発現抑制が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。</p>			

そこで、本研究では、miR-203 の口腔癌の浸潤抑制に関して詳細な作用機序を検討するため、miR-203 の標的遺伝子の探索を含む機能解析を目的とした。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、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 NUA1 を見出した。NUAK1 は AMPK-related kinase の 1 つで、近年細胞増殖やがんの浸潤・転移との関連が報告されてきている。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 repoter plasmid を作成し、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 NUA1 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。口腔癌において NUA1 の過剰発現を行ったところ、浸潤能の亢進を認め、さらに口腔扁平上皮癌症例の NUA1 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正の相関を示すことを見出した。従って、NUAK1 が口腔癌の浸潤・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 NUA1 の発現上昇を認め、この TGF- β による EMT 誘導及び NUA1 の発現上昇は miR-203 の過剰発現により抑制されることから、miR-203 および NUA1 は EMT 誘導時にも関与することが明らかとなった。

以上の結果から、本論文は miR-203 が標的遺伝子である NUA1 の発現抑制や EMT の部分的な抑制により口腔癌の浸潤を抑制しており、EMT を起こす過程において miR-203 の発現低下と NUA1 の発現上昇が生じ、浸潤能が亢進することを明らかにした。従って、miR-203 とその標的遺伝子である NUA1 の発現が口腔癌の予後に関わる重要な因子であることが示唆された。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。