

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）		氏名	檜垣 美雷
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当			
論文題目				
活性型ビタミンD ₃ 誘導体 ED-71 による exosomal microRNA を介した扁平上皮癌細胞の増殖制御				
論文審査担当者				
主査	教授	柿本 直也	印	
審査委員	教授	藤井 万紀子		
審査委員	准教授	虎谷 茂昭		
〔論文審査の結果の要旨〕				
<p>【目的】</p> <p>Heparin binding protein17/fibroblast growth factor binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) は、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 の conditioned medium (CM) より分離精製された 17kDa の分泌タンパクで、扁平上皮細胞で特異的に発現し、FGF-1, -2 と可逆的に結合することで、FGFs のスイッチ分子として FGFs の安定性・遊離・活性化に深く関与している。さらに、同分子は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) で高発現し、その増殖や血管新生に密接に関与していることが明らかとなっている。</p> <p>活性型ビタミンD₃ (1α,25(OH)₂D₃) (VD₃) は骨代謝において重要な働きをするとともに、心臓病や癌の予防効果も報告されている。また、VD₃ は、NF-κB シグナル伝達経路を抑制することで上皮細胞の増殖を制御していることが知られている。著者の所属する研究室の先行研究で、VD₃ およびその誘導体 ED-71 (中外製薬より供与) は、ビタミンD レセプター (VDR)-NF-κB 経路を介し HBp17/FGFBP-1 の発現を抑制することで <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で SCC の増殖を抑制することを明らかにしてきた。</p> <p>近年、細胞が細胞外に分泌する exosome や exosome に含まれる microRNA は離れた細胞や自己細胞に作用することで、正常細胞の paracrine および autocrine factor として機能する regulatory chemical messenger (RCM) としての役割を担っていることが明らかにされつつある。</p> <p>そこで本研究では、ED-71 の扁平上皮癌に対する治療薬としての有用性をさらに明らかにすることを目指して、ED-71 による SCC/OSCC 細胞における HBp17/FGFBP-1 の発現低下や増殖抑制における exosomal microRNAs (exo-miRs) の発現とその機能解析を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>細胞株は OSCC 由来細胞株 HO-1-N-1 (NA) 、KO、Ca9-22 および A431 を用</p>				

いた。細胞培養は DMEM と Ham-F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 培地に、insulin (10 μ g/ml), transferrin (5 μ g/ml), 2-mercaptoethanol (10 μ M), 2-aminoethanol (10 μ M), sodium selenite (10nM), oleic acid (4.7 μ g/ml) の 6 因子を加えた無血清培地 DF6F を用いた。

各細胞の conditioned medium (CM)の採取および CM からの exosome の精製は以下の方法で行なった。70%コンフルエントまで DF6F で A431 を培養し、DF 培地のみでさらに 48 時間培養後、CM を採取し、限外濾過法にて 50 倍に濃縮した。A431-CM 中の exosome は、phosphatidylserine アフィニティー法で精製し、western blotting 法および走査型電子顕微鏡で exosome を評価した。

ED-71 の exo-miRs の発現に及ぼす影響を検討するため、ED-71 処理腫瘍細胞の CM 由来 exosome より miRs を抽出後、miR マイクロアレイにて網羅的解析を行ない、ED-71 により A431 および Ca9-22 で発現上昇する exo-miRs を同定した。

HBp17/FGFBP-1 mRNA の 3'-untranslated region (UTR) の配列を導入した reporter plasmid と、同定した miR mimic を SCC/OSCC 細胞に共導入し、HBp17/FGFBP-1 発現に及ぼす影響を reporter アッセイで評価した。次に、同 miR の各細胞における発現量を定量 RT-qPCR 法 (qPCR) で検討した。また、miR-mimic および対照として scramble RNA-mimic を SCC/OSCC 細胞に導入し、細胞増殖能、コロニー形成能、HBp17/FGFBP-1 および FGF-2 の遺伝子・蛋白発現に及ぼす影響を検討した。

【結果】

1. ED-71 は、A431 細胞に対して exo-miR-451a および exo-miR-6887-5p の発現を特異的に亢進した。
2. MiR-6887-5p は、HBp17/FGFBP-1mRNA の 3'UTR 配列に結合し、HBp17/FGFBP-1 の直接的な標的となることが reporter アッセイの結果明らかとなった。
3. MiR-6887-5p は、SCC/OSCC 細胞における HBp17/FGFBP-1 の mRNA・蛋白発現を抑制したが、FGF-2 の mRNA・蛋白発現には影響を示さなかった。
4. MiR-6887-5p は、SCC/OSCC 細胞の細胞増殖およびコロニー形成能を有意に抑制した。

【考察】

VD₃ および ED-71 は、SCC/OSCC 細胞に対して、VDR-NF- κ B 経路を介した増殖抑制機構に加えて、regulatory chemical messenger として exosomal miR-6887-5p の CM 中への分泌を上昇させ、paracrine および autocrine factor として腫瘍細胞自身および周囲細胞に働き、HBp17/FGFBP-1 の発現を制御することで増殖を抑制していることが考えられた。したがって、ED-71 の扁平上皮癌に対する治療薬としての有用性が強く考えられた。

本論文は癌研究および口腔外科学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。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があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	檜垣 美雷
学位授与の条件	学位規則第4条第1、2項該当		
論文題目			
<p>活性型ビタミンD₃誘導体ED-71による exosomal microRNA を介した扁平上皮癌細胞の増殖制御</p>			
最終試験担当者			
主査	教授	柿本 直也	印
審査委員	教授	藤井 万紀子	
審査委員	准教授	虎谷 茂昭	
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判定合格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年12月20日の第8回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年2月7日に開催した本委員会での最終試験では主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培養上清からの exosome の精製法の特徴とそれぞれで精製される exosome の性状について 2. Exosomal micro RNA の一般的な特徴と機能について 3. ED-71により腫瘍細胞で発現上昇する exosomal micro RNA について 4. ED-71により腫瘍細胞で発現される exosomal-micro RNA の時間依存的変動について 5. Micro RNA の腫瘍細胞への導入効率とその影響について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			