

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 小川 妃弥呼

論 文 名 口腔扁平上皮癌における microRNA-361-3p の発現・機能解析と  
治療標的としての有用性の検討

---

### 学位論文要旨

#### 【目的】

口腔扁平上皮癌(OSCC)は、頭頸部癌の中で最もよく見られる癌であり、全世界的に見ると推定 300,000 人の新規症例と 145,000 人の死亡症例があるとされている。しかしながら、OSCC 患者の 5 年生存率は、病因解明と治療法の進歩に関わらず過去数十年間でほとんど改善が見られず、新規治療薬の開発が望まれている。われわれはこれまでマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を用いて OSCC の治療に有用となる microRNA(miR)を探索してきた。本研究では標的分子として miRNA-361-3p に着目し、OSCC におけるその発現および機能を解析し、治療標的としての有用性について検討を行った。

#### 【方法】

網羅的 miR 機能阻害解析には、Exiqon 社の LNATM microRNA Knockdown Library を用いた。緑色蛍光蛋白質 GFP を発現するヒト OSCC 細胞株 (GFP-SAS) に、918 種類のヒト成熟 miR に対する人工核酸アンチセンスオリゴ (LNA-ASO) をトランスフェクションし、細胞増殖を WST-8 アッセイで評価した。miR の過剰発現効果については、リポフェクタミン法を用いて miR を GFP-SAS 細胞に導入し、細胞増殖への影響を評価した。アレイ解析には Affymetrix® Human Genome U219 Array Strips を用い、Ingenuity Pathway Analysis (Core Analysis) により miR の標的遺伝子の同定を行った。標的遺伝子の評価には、標的遺伝子の RNA 発現へ対する LNA-ASO の影響をルシフェラーゼアッセイとリアルタイム定量化 PCR (qRT-PCR) 法で、標的遺伝子の蛋白質発現へ対する miR と LNA-ASO の影響をウェスタンブロット法で評価した。

*in vivo* における miR の腫瘍抑制効果については、GFP-SAS 細胞 ( $2 \times 10^6$  個) をヌードマウスの背部皮下に移植し、1 週間後に LNA-ASO を腫瘍周囲へ局所投与し、腫瘍抑制効果を評価した。その後、ヌードマウスを犠牲死させた後に、形成された腫瘍を取り出し、total RNA を抽出し、qRT-PCR 法にて miR とその標的遺伝子の発現について検討した。OSCC 患者検体における miR の発現については、患者由来の OSCC 組織および隣接正常粘膜から total RNA を抽出し、miR の発現量を qRT-PCR 法にて検討した。

なお、この動物実験は愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

#### 【結果】

OSCC の癌遺伝子様 miR (oncomiR) を同定するために、網羅的 miR 機能阻害解析を行った結果、miR-361-3p に対する LNA-ASO (LNA-miR-361-3p) がコントロール群と比較し、特に顕著な癌細胞増殖抑制効果を示した。LNA-ASO のノックダウン効果は、LNA-miR-361-3p を GFP-SAS 細胞に導入し、標的である miR-361-3p の発現が抑制されることで確認した。次に、miR-361-3p を GFP-SAS 細胞に導入して増殖能について評価した結果、miR-361-3p の過剰発現が細胞増殖を促進させることがわかった。さらに、miR-361-3p の標的遺伝子の探索を行うためにアレイ解析を行い、Core Analysis により標的遺伝子として Odd-skipped-related 2 (OSR2) を同定した。OSR2 と miR-361-3p の発現の相関を検討したところ、miR-361-3p を過剰発現すると OSR2 の発現は低下し、LNA-ASO で miR-361-3p の発現を低下させると、OSR2 の発現は上昇した。この結果から、miR-361-3p は OSR2 を介して細胞増殖に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

*in vivo* においても、LNA-miR-361-3p 投与群はコントロール群と比較し、有意な腫瘍抑制効果を認めた。さらに、LNA-miR-361-3p で処理した腫瘍では、miR-361-3p の発現低下および OSR2 の遺伝子発現上昇を認めた。OSCC 患者由来の OSCC 組織では正常口腔粘膜と比較し、miR-361-3p の発現亢進を認めた。このことから、miR-361-3p の発現亢進は培養細胞に特異的ではなく、生体におけるヒト悪性腫瘍の増殖に重要な機能を担っていることが示唆された。

#### 【考察】

miR-361-3p は OSCC 患者癌組織と癌細胞株において発現が亢進しており、その発現阻害は *in vitro* と *in vivo* で OSCC 細胞株の細胞増殖および腫瘍増殖を抑制する。よって miR-361-3p は OSCC の新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

キーワード (3~5)	口腔扁平上皮癌 (OSCC) microRNA (miR) 人工核酸アンチセンスオリゴ (LNA-ASO) miR-361-3p Odd-skipped-related 2 (OSR2)
-------------	---