

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	小川 妃弥呼
審査委員	主査 今村 健志 副査 渡部 祐司 副査 藤岡 徹 副査 加藤 英政 副査 武森 信暁

### 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

### 審査結果の要旨

頭頸部癌の中で最も頻度が高い口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma; OSCC) は、進行癌になると治療抵抗性で死亡率が高く、新たな治療戦略が期待されている。申請者らは、OSCC の病因に関係する分子として microRNA (miR) に着目し、治療標的分子になりうる miR を探索する目的で網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNA-361-3p を候補として同定し、その発現および機能解析を行うとともに治療標的としての有用性について検討を行った。

まず申請者は、OSCC の治療に有用な癌遺伝子様 miR (oncomiR) を同定するために、Exiqon 社の LNATM microRNA Knockdown Library を用いた網羅的 miR 機能阻害解析を行った。緑色蛍光蛋白質 (green Fluorescent protein; GFP) を発現するヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (GFP-SAS 細胞) に 918 種類の人工核酸アンチセンスオリゴ (LNA-ASO) を導入し、WST-8 アッセイで細胞増殖を評価した。その結果、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、顕著な細胞増殖抑制効果を示した。さらに、GFP-SAS 細胞に miR-361-3p を強制発現すると、細胞増殖を促進した。

次に、miR-361-3p の標的遺伝子の探索のためにアレイ解析を行い、Ingenuity Pathway Analysis (Core Analysis) により、Odd-skipped-related 2 (OSR2) を同定した。GFP-SAS 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイとリアルタイム定量化 PCR (qRT-PCR) 法で検討したところ、OS

R2 は、miR-361-3p を強制発現するとその発現は低下し、逆に LNA-miR-361-3p によって miR-361-3p の発現を抑制するとその発現は上昇した。

さらに、*in vivo* における miR-361-3p の腫瘍抑制効果を検討するために、GFP-SAS 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、1 週間後に LNA-miR-361-3p を腫瘍周囲の局所に投与し、継時的に腫瘍の大きさを評価したところ、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。その後、形成された腫瘍から total RNA を抽出し、qRT-PCR 法にて検討したところ、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。

最後に、患者検体における miR-361-3p の発現を検討するために、OSCC 患者由来の癌組織および隣接正常粘膜から total RNA を抽出し、miR-361-3p の発現量を qRT-PCR 法にて比較検討したところ、癌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。

以上、miR-361-3p は OSCC 患者癌組織と OSCC 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 細胞の増殖を抑制する。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。

本論文は、口腔扁平上皮癌の病態の一端を解明するとともに、miR-361-3p を標的にした治療薬が新たな治療戦略となりうる可能性を初めて明らかにしたものであり、明瞭な結果と十分な考察が提示されている。公開審査会は、令和 2 年 7 月 2 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、その後、1) LNATM microRNA Knockdown Library の原理について、2) 実験に用いた細胞株の位置づけや他の細胞株での評価について、3) OSCC の悪性度と miR-361-3p 発現の関係について、4) OSR2 の機能について、5) miRNA の成熟度について、6) miR-361-3p の浸潤や遊走など増殖以外の細胞機能に対する影響について、7) 公開データとの比較について、8) 臨床検体における OSR2 の発現について、9) 唾液のエクソソームとの関係、診断応用について、10) 原発巣と転移巣の検体間での発現の比較について、11) EGFR 阻害剤など他の治療との関係について、12) アンチセンスオリゴによる治療における DDS についてなど、実験方法、分子の機能から臨床応用に関してまで幅広く多くの質問に対し、日本語での的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。