

論文の内容の要旨

氏名：正 岡 直

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Analysis of functional-RNA network starting from exosomal microRNAs in oral squamous cell carcinoma cells

（口腔扁平上皮癌細胞におけるエクソソーム由来マイクロ RNA を起点とした機能性 RNA ネットワークの解析）

口腔癌罹患数は年々増加傾向にあり、診断時には頸部リンパ節転移や遠隔転移をきたし、進行例も珍しくなく、予後も極めて不良である。口腔扁平上皮癌の治療は手術、化学放射線療法、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬などの集学的な治療が行われている。また、CT、MRI、エコー、PET といった画像解析機器の進歩も目覚ましく、術前診断、術後経過の診断精度も向上している。しかしながら、5年生存率は、ここ10年間向上していない。予後を向上させるためには発癌メカニズムの解明が必要であるが、未だに十分に解明されていないのが現状である。最新の癌ゲノム研究から、口腔扁平上皮癌の発癌に関わる分子ネットワークを探索し、診断や治療の基礎となる知見を得ることの重要性が指摘されている。近年、機能性 RNA 研究から、がん細胞は様々な大きさの細胞外小胞を分泌し、がんの微小環境を構築していることが明らかとなってきた。エクソソームは、50-150 nm の大きさの細胞外小胞であり、その中には、機能性 RNA が封入されている。エクソソーム中の機能性 RNA は、周囲の細胞に取り込まれ、細胞間のコミュニケーションに重要な役割を担っていることが明らかとなってきており、その生物学的意義を明らかにすることで口腔癌の発癌メカニズムの解明につながることを期待されている。その中でもエクソソームに封入されている microRNA（以下 miRNA）は、がんの診断・治療の分子マーカーとして注目され、研究が進んでいる。また、エクソソームは培養細胞の上清液にも存在することが知られ、培養細胞上清液の miRNA を網羅的に解析した基盤研究は胃癌などでは行われているが、口腔癌では報告がない。そこで本研究では、新たな診断・治療法を開発するため、口腔扁平上皮癌細胞株におけるエクソソームを介して細胞外に放出される miRNA に着目し、口腔癌において活性化している分子ネットワークを明らかにすることを目的とした。

始めに、口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-2, HSC-3, Ca9-22, Ho-1-N1）とヒト正常口腔粘膜細胞（Human normal oral keratinocytes, 以下 HNOKs）の培養上清液中に含まれるエクソソームを回収し、エクソソームに含まれる miRNA を抽出した。腫瘍マーカーの候補となる miRNA を解析するために、ヒト 752 種類に対する miRNA プライマーが含まれている miRNA マイクロアレイ解析（miRCURY LNA miRNA PCR System）を用いて、抽出した培養上清中の miRNA の発現状態を網羅的に解析した。発現状態について、HNOKs と比較して口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類すべてに共通して発現増強もしくは減弱している miRNA を検索した。さらに選定した miRNA とその標的遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis（以下 IPA）software を用いて、パスウェイ解析を行い、miRNA を起点とした機能性 RNA ネットワークの探索を行った。

miRNA マイクロアレイ解析の結果、口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類すべてについて、HNOKs と比較して、1.5 倍以上の発現が亢進された miRNA は 8 種類であった。一方で、1.5 倍以上の発現が減弱された miRNA は 12 種類であった。このように、癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される合計 20 種類の miRNA を同定した。さらに同定した miRNA 20 種類とその標的遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、6 つのネットワークが形成された。その中で最もスコアが高く、同定した標的遺伝子を有意に含むネットワークは、miR-125b を中心としたパスウェイが形成されていた。さらに、選び出された miRNA とその標的遺伝子について、Gene ontology 解析を行い、遺伝子機能の重要性の高い順に分類した結果、疾患別には癌に最も関連しており、細胞分子機能別にみると cell death and survival, cellular development, cellular growth and proliferation, cell cycle など癌に関連する機能が上位を占めていた。細胞内プロセスとの関連を調べるため、標的遺伝子と既知の細胞内生体反応経路を比較する Canonical pathway 解析を行った結果、molecular mechanisms of cancer や cell cycle: G1/S checkpoint regulation に強く関連を認めた。遺伝子群を調節する発現変動分子の上流調

整因子候補を探索する Upstream regulator 解析を行った結果、4 つの upstream miRNAs (miR-125b-5p, miR-17-5p, miR-200b-3p, miR-23a-3p) を同定した。この 4 つの upstream miRNAs は固形癌の発生、癌の進行・浸潤・転移にかかわる上皮間葉転換に影響を与える分子であることが分かった。選定された miRNA やその標的遺伝子の変動がどのような下流の生物学的プロセスを調べる Downstream effector 解析を行った結果、tree map 上にて、選定された miRNA やその標的遺伝子は、癌を制御するプロセスが多く関与している一方で、cell death や apoptosis への関連も予測された。

本研究により、エクソソーム由来 miRNA を起点とした分子ネットワークの解析を行ったところ、癌細胞株で著明な発現変動を示す 20 種類の miRNA を同定した。このうち、4 つの upstream miRNAs は口腔扁平上皮癌の新たな診断および腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。