

氏名	長井 宏樹		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8713号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	MicroRNA-205-5p suppresses invasiveness in oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression (MicroRNA-205-5p は TIMP-2 の発現抑制を介して口腔扁平上皮癌の浸潤能を抑制する)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 豊実
副査	筑波大学教授	医学博士	長田 道夫
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	大久保 英樹
副査	筑波大学講師	博士（医学）	森戸 直紀

## 論文の内容の要旨

長井宏樹氏の博士学位論文は、口腔扁平上皮癌を対象とし、MicroRNA-205-5p (miR-205-5p) は TIMP-2 の発現抑制を介して浸潤能を抑制する事を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

研究背景は次の通りである。口腔扁平上皮癌(OSCC)の生命予後は頸部リンパ節転移の有無が規定し、その向上にはリンパ節転移すなわち、がん細胞の浸潤制御が必要となる。浸潤能には細胞外基質の分解酵素である Matrix metalloproteinase(MMPs)とその制御因子の Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMPs)が影響する。MMP-2の活性はTIMP-2が細胞膜上のMT1-MMPと形成する複合体を介して制御しているためTIMP-2の発現制御がMMP-2の活性化を制御できる可能性がある。microRNA(miRNA)はターゲット遺伝子の発現制御を介して、様々な疾患の発症や進行に関与している。miR-205-5pは口腔がんではTumor suppressorとして作用する。しかし、miR-205-5pのがん抑制作用機序は不明確である。

このため著者は研究目的をOSCCにおけるmiR-205-5pの機能と作用機序の解明とした。

著者が選択した対象と方法は以下の通りである。(1)OSCCの組織(71検体)および口腔扁平上皮癌由来細胞株(HSC3とSAS)よりRNAを抽出し、qRT-PCRによりmiR-205-5pの発現量を測定。同様に正常口腔粘膜組織における発現量を測定し比較した。(2)Cell Lineを用い、リポフェクション法でmiR-205-5p mimic / miR-205-5p inhibitor / miRNA negative controlを細胞内に導入、24時間後にproliferation assay, migration assay, invasion assayでmiR-205-5pの機能評価を行った。(3)miR-205-5pのターゲット遺伝子はTargetScanアルゴリズムを用いて候補をリストアップ、MMPとTIMPに関連する遺伝子

を選定した。(4)選定した遺伝子の OSCC 組織中での発現量を qRT-PCR で測定、miR-205-5p 発現との相関を評価した。有意な相関を認めた遺伝子をターゲット遺伝子とし miR-205-5p mimic を導入した Cell Line での発現変動を qRT-PCR および Western Blot で測定した。(5)ターゲット遺伝子の miR-205-5p による直接制御を luciferase reporter assay (LRA) で評価、ターゲット遺伝子の機能は siRNA を用いたノックダウン実験 (invasion assay) で評価した。(6)ターゲット遺伝子を介したコラーゲン分解活性をゼラチンザイモグラフィで測定した。

著者が得た結果は次の通りである。(1)OSCC 組織中の miR-205-5p の発現量は正常口腔粘膜組織中と比較し有意に低下、Cell Line での発現レベルは OSCC 組織中と同程度。(2)miR-205-5p mimic 導入細胞は浸潤能がコントロール群より有意に低下。一方、miR-205-5p inhibitor 導入細胞は浸潤能が有意に亢進。(3)ターゲット遺伝子は、TIMP-2, MMP-16, MMP-19 を選定。(4) mRNA レベルと miR-205-5p の発現量は TIMP-2 のみ有意な負の相関を確認。miR-205-5p mimic 導入がん細胞は mRNA とタンパク質の両レベルで TIMP-2 遺伝子の発現量が有意に低下。(5)LRA でも mimic 導入細胞でシグナルが有意に低下。TIMP-2 ノックダウンがん細胞は浸潤能が有意に低下。(6)miR-205-5p mimic 導入細胞は MMP-2 の活性が有意に低下。

著者はこれらの結果から以下の様に考察している。miR-205-5p の発現量は正常組織と比較して OSCC 組織中で有意に低下、miR-205-5p mimic の導入でがん細胞の浸潤能も有意に低下した。この結果から miR-205-5p は OSCC の浸潤を抑制する Tumor suppressor miRNA としての機能を持つと考えられる。一方、miR-205-5p の Target gene として TIMP-2 を見だし、LRA により TIMP-2 が miR-205-5p の直接のターゲット遺伝子になることを初めて明らかにした。本研究では TIMP-2 のノックダウンによりがん細胞の浸潤能が抑制され、TIMP-2 はがんの浸潤を増強する機能を有すると考えられる。さらに miR-205-5p mimic を導入したがん細胞は si-TIMP-2 を導入した場合と同等程度の MMP-2 活性の有意な低下を認め、miR-205-5p は TIMP-2 の発現を抑制し MMP-2 の活性化を低下させ、がん細胞の浸潤能を抑制したと考えられる。

著者は研究結果と考察から、口腔扁平上皮癌において miR-205-5p は TIMP-2 を直接のターゲット遺伝子として発現制御し、MT1-MMP を介した MMP-2 の活性化を抑制することでがん細胞の浸潤能を抑制すると結論づけた。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

著者は miR-205-5p は OSCC の浸潤を抑制する Tumor suppressor miRNA としての機能を明らかにする共に、Target gene として TIMP-2 を見だし、LRA により TIMP-2 が miR-205-5p の直接のターゲット遺伝子になることを初めて明らかにするなど、特筆すべき研究結果をまとめ、質疑応答により本分野の深い見識と、将来の研究の方向性を示した。

平成 29 年 12 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。