

## 論文審査の要旨

報告番号	甲 第 3148 号	氏名	筑田 洵一郎
論文審査担当者	主査 教授	高見 正道	
	副査 教授	上條 竜太郎	
	副査 教授	美島 健二	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文 CD44s Induces miR-629-3p Expression in Association with Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cells について上記の主査 1 名、副査 2 名が審査を行った。</p> <p>本論文は、CD44s 陽性扁平上皮癌細胞が抗がん薬シスプラチン (CDDP) に対して抵抗性を示すメカニズムを解明することを目的とした。方法として DNA マイクロアレイ法を用い、抵抗性に関与する miRNA の網羅的解析をおこなうことでがん細胞発現レベルの高い miRNA の同定を試みた。その結果、miR-629-3p が 12 種類の遺伝子発現を抑制することにより、がん細胞におけるアポトーシスの抑制と細胞遊走の促進を制御することを発見した。また、マウスを用いたがん細胞移植実験では、miR-629-3p がシスプラチン抵抗性の発現を担うことを確認した。以上より、miR-629-3p はシスプラチンに対する扁平上皮癌の抵抗性に関与する重要な遺伝子であると考察し、この遺伝子が抗がん薬開発の治療標的になりうる点で当該分野の発展に寄与すると結論した。</p> <p>本論文の審査において、副査の上條委員および美島委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p><b>上條委員の質問とそれらへの回答</b></p> <p>1. CD44s の強制発現で、microRNA の発現が変動するメカニズムは何か。  回答：CD44 はヒアルロン酸をリガンドとする膜タンパク質で、CD44 の細胞質内ドメインが切断されゲノムに組み込まれることで、転写を促進し microRNA の発現を変化させたと考える。</p> <p>2. 今回は SAS/CD44s 細胞で発現が高い microRNA に注目しているが、発現が低い microRNA ではどうなのか。  回答：CD44s は、ZEB1 遺伝子が miR-200c-3p の発現を抑制することにより、EMT を介してシスプラチン耐性に関与することが先行研究により報告されている。</p> <p>3. miR-629-3p の標的遺伝子が、アポトーシスの抑制と細胞遊走の促進に関わっていない可能性はないのか。  回答：miR-629-3p の標的遺伝子を介して、別の遺伝子の発現変動が起こり、その結果アポトーシスの抑制と細胞遊走の促進に関与している可能性も考えられる。しかし、現状は miR-629-3p の標的遺伝子を特定できていないため、それが今後の課題だと考える。</p> <p>4. miR-629-3p は今までどのような報告があるのか。  回答：miR-629-3p は、肺腺癌において SFTPC の発現を低下させ、細胞増殖の促進と、生存率の低下に寄与することが報告されている。また子宮頸癌においては、RSU1 の調節を介してアポトーシスを抑制し、細胞増殖を促進することが明らかになった。</p> <p><b>美島委員の質問とそれらへの回答</b></p> <p>1. 今回の研究で、CD44s をターゲットとした理由は何か。  回答：新たな治療標的の候補として、癌幹細胞に注目した。癌幹細胞は薬剤耐性と関連しており、CD44 というマーカーがある。CD44 は CD44s と CD44v といった複数の splicing variant</p>			

(主査が記載)

をもつが、先行研究によりシスプラチンの耐性化に伴い CD44s の発現が亢進することが報告されている。以上のことから、本研究では CD44s をターゲットとした。

2. Caspase3/7 活性のみでアポトーシスを評価できるのか。

回答：カスパーゼは、シグナルを受けてから上流で働く開始カスパーゼ（Caspase 8、9）と、それらにより分解され活性化しアポトーシスに働く実行カスパーゼ（Caspase 3、7）に分けられる。Caspase3/7 はアポトーシス経路の最終段階に作用するので、Caspase3/7 活性の測定は、アポトーシスを評価できるものとする。

3. miR-629-3p の標的因子は何か。

回答：microRNA は標的となる mRNA の 3' -UTR に結合することにより遺伝子発現を抑制する。本研究では、定量的 PCR の結果より、12 個の遺伝子の発現低下が確認され、miR-629-3p は複数の遺伝子に影響を及ぼしていることが確認された。さらに文献ベースで薬剤耐性と関連する遺伝子を探索した結果、FBX032 は CDDP 耐性および 5-FU 耐性と深く関係していることが分かり、本研究においても FBX032 の発現低下を認めた。しかし、miR-629-3p が FBX032 に結合するかは確認できておらず、それが課題だと考えている。従って、今後はルシフェラーゼをはじめとしたレポーターベクターシステムを利用した検証を考えている。

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

### 主査 高見委員の質問とそれらへの回答

1. CD44s によって制御される microRNA は 14 種類あるが、miR-629-3p 以外に EMT 促進やシスプラチン耐性に関与する microRNA は無いのか、microRNA と癌の形質との関係性について考察せよ。

回答：肝細胞癌において、miR-30e-3p は MDM2/TP53 経路を介してソラフェニブ耐性に寄与するという報告があった。しかし、その他の 12 種の microRNA において EMT 促進や薬剤耐性に関与する文献はなかった。miR-629-3p と miR-30e-3p における塩基配列や seed 配列における塩基比率、また、本研究で解析した miR-629-3p のマイクロアレイのデータにおける MDM2 遺伝子の発現を比較しても明らかな類似点はないといえる。

2. miR-629-3p は癌細胞以外の細胞において、どのような発現や機能を担っているのか。

回答：癌細胞以外では、喘息患者の気道上皮細胞において miR-629-3p の過剰発現が認められた。過去の文献によると、健康者と喘息患者の痰を採取し、microRNA の発現量を比較した結果、特に好中球性喘息の患者において miR-629-3p の有意な発現上昇を認める。miR-629-3p は気道の上皮細胞に限局しており、IL-1 $\beta$  や IL-8 のタンパク質レベルの発現誘導に関連していることが明らかになった。

3. in vivo で用いた統計方法の妥当性について説明せよ。

回答：本研究では、5 週齢の雄の BALB/c-nu マウスに SAS 細胞を接種し、PBS 投与群 (n=6) と CDDP 投与群 (n=7) に分けて評価した。両側検定および非等分散で評価した結果、p 値が 0.03 であったため、本研究においては統計的に妥当であると考えている。より妥当性を高めるために、症例数の増加、異なった細胞株や異なった薬剤における検討も今後必要であると考えている。

4. 本研究が歯科医学にいかなる点で資するか述べよ。

回答：核酸は血液診断におけるバイオマーカーとして注目されている。また、血液だけでなく、唾液、尿などの体液中の microRNA が癌の診断に応用されており、本研究によって明らかになった miR-629-3p も口腔癌における新たなバイオマーカーの一つとして期待されている。また、C 型肝炎ウイルスは自己を複製する際に miR-122 を利用することから、新たな治療薬の開発が現在進められている。同様に、本研究により明らかになった miR-629-3p を標的とした創薬化のために、今後より詳しい薬剤耐性メカニズムおよび標的遺伝子の同定が急務であると考えられる。

主査の高見委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。

（主査が記載）