

口腔扁平上皮癌におけるmiR-205の発現と機能に関する研究：特にΔNp63との関連について

橋口, 有真

<https://hdl.handle.net/2324/1806952>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 橋口 有真

論 文 名 : 口腔扁平上皮癌における miR-205 の発現と機能に関する研究
～特に $\Delta Np63$ との関連について～

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

近年、癌の浸潤・転移に上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与していることが明らかとなってきた。これまでにわれわれは、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) 細胞において、p53 のホモログである $\Delta Np63$ のスプライシングバリエントの1つである $\Delta Np63\beta$ が、EMT の誘導に関与していることを示してきた。しかし、その詳細な分子機構は未だ不明である。最近の研究により、microRNA (miRNA) が癌における EMT のプロセスにも関与していることが示唆されているが、 $\Delta Np63\beta$ と miRNA との関連については明らかにされていない。そこで本研究では、 $\Delta Np63\beta$ を介した EMT に関与する miRNA を miRNA マイクロアレイ解析により同定し、OSCC における発現と機能を検討した。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. OSCC 細胞株における miR-205 の発現と機能に関する研究

$\Delta Np63$ の発現を認めず、EMT 形質を有する OSCC 高転移株 SQUU-B 細胞に、 $\Delta Np63\beta$ 発現ベクターを導入した $\Delta Np63\beta$ 強制発現細胞株 (SQUU-BO) とコントロールベクターを導入した陰性対照細胞株 (SQUU-BC) を用いて miRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、 $\Delta Np63\beta$ の強制発現により最も発現上昇の変動幅が大きかった miR-205 を、 $\Delta Np63\beta$ を介した EMT に関与する miRNA として着目し、OSCC 細胞株における発現と機能を検討した。OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) における miR-205 の発現量を real-time PCR 法により検索したところ、miR-205 の発現は $\Delta Np63$ の発現と正の相関を示し、ほとんどの OSCC 細胞で高い発現を認めたが、SQUU-B 細胞で最も発現が低かった。また、 $\Delta Np63$ を高発現している低転移株 SQUU-A 細胞に $\Delta Np63$ のノックダウンを行うと、miR-205 の発現低下を認めた。次に、miR-205 の標的遺伝子として、E-cadherin の発現抑制に関わる転写因子である zinc-finger E-box binding homeobox (ZEB) 1 および ZEB2 に着目し、OSCC 細胞株における発現を real-time PCR

法、western blotting 法および免疫細胞化学染色法にて検索した。その結果、ZEB1 と ZEB2 はともに SQUU-B 細胞で最も発現が高く、他の OSCC 細胞ではほとんど発現が認められず、miR-205 の発現と逆相関していた。免疫細胞化学染色法では、ZEB1 と ZEB2 は、主に SQUU-B 細胞の核に発現していたが、E-cadherin の発現は認められなかった。一方、SQUU-A 細胞では、細胞膜に E-cadherin の発現を認めるものの、ZEB1 と ZEB2 の発現はほとんど認められなかった。さらに、SQUU-B 細胞へ miR-205 mimic を遺伝子導入し、miR-205 を強制発現させると、ZEB1 と ZEB2 の発現低下と、E-cadherin を含む上皮系マーカーの発現亢進、間葉系マーカーの発現低下、遊走能および浸潤能の低下を認めた。一方、miR-205 を高発現している SQUU-A 細胞に miR-205 inhibitor を遺伝子導入し、miR-205 のノックダウンを行うと、ZEB1 と ZEB2 の発現の増加と、E-cadherin の発現低下、間葉系マーカーの発現亢進および遊走能の亢進が認められた。また、SQUU-B 細胞に miR-205 mimic と ZEB1 または ZEB2 の target protector を共導入し、miR-205 が ZEB1 と ZEB2 の発現を直接的に制御しているのかについて検討を行った結果、ZEB1 と ZEB2 ともに miR-205 強制発現による発現量の減少が抑制されていた。

2. OSCC 生検標本における ZEB1 および ZEB2 の免疫組織化学的検討

OSCC 組織における ZEB1 と ZEB2 の発現を検索するため、OSCC 患者 94 名の生検標本を用いて免疫組織化学的染色を行った。ZEB1 および ZEB2 ともに正常口腔粘膜上皮では発現が認められなかったが、OSCC では主に腫瘍浸潤先端部の癌細胞の核に強い発現を認めた。腫瘍浸潤先端部の癌細胞の核における ZEB1 と ZEB2 の陽性細胞率 (labeling index: LI) を算出した後、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いた解析によりカットオフ値 (cut-off value: COV) を設定し、症例を $LI \geq COV$ 群と $LI < COV$ 群の 2 群に分け、臨床病理学的所見および予後との関連について検討した。その結果、ZEB1 ($LI \geq COV$) 群 (60 例) は、ZEB1 ($LI < COV$) 群 (34 例) と比較して局所再発およびリンパ節転移の発生頻度が高く、疾患特異的累積 5 年生存率が有意に低かった。また、ZEB2 ($LI \geq COV$) 群 (22 例) も同様に、ZEB2 ($LI < COV$) 群 (72 例) と比較して局所再発の頻度が高く、疾患特異的累積 5 年生存率が有意に低かった。

以上の結果より、 $\Delta Np63\beta$ は、miR-205 を介して ZEB1 および ZEB2 の発現を制御することで、OSCC の EMT の誘導に関与していることが示唆された。また、OSCC 浸潤先端部における ZEB1 および ZEB2 の発現上昇は、癌細胞の遊走能および浸潤能の亢進に関与し、その結果、癌の進展に寄与しているものと推察された。