

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域顎口腔腫瘍病態学教育研究分野 氏名 今 敬生
<p>(論文題目)</p> <p>Role of type I - and type II -interferon in expression of melanoma differentiation-associated gene-5 in HSC-3 oral squamous carcinoma cells (口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の MDA-5 発現における I 型、II 型インターフェロンの役割について)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><u>目的</u></p> <p>口腔は病原性微生物の侵入門戸であることから、口腔粘膜では自然免疫応答が非常に発達しているものと考えられている。近年、ウイルス感染のメカニズムにおいて、RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) や MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene-5) が注目されているが、口腔領域の免疫応答における RIG-I の役割に関する報告は散見されるものの、MDA-5 に関する報告は見当たらない。MDA-5 は RIG-I と同様、DEXD/H box ファミリーに属する細胞内ウイルスセンサーとして知られており、メラノーマ細胞の増殖抑制因子として報告されている。しかし、ウイルスセンサーとしての RIG-I の機能に関する研究報告に比べ、MDA-5 の機能に関する研究報告は少なく、完全に解明されていないのが現状である。</p> <p>今回、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の MDA-5 発現におけるインターフェロンの役割について検討した。</p> <p><u>方法</u></p> <p>通法に従って HSC-3 を培養し、80%コンフルエントの時点でインターフェロン刺激を加えるようにした。I 型インターフェロンとして IFN-α 2b (0.008-5 ng/mL) を、II 型インターフェロンとして IFN-γ (0.04-25 ng/mL) を用い、各々 5 段階の濃度で HSC-3 培養系に添加した。培養細胞を試料とし、MDA-5 と RIG-I の mRNA 発現を RT-qPCR 法により、タンパク産生を Western blot 法により解析した。</p> <p>次に、インターフェロン刺激による MDA-5 と RIG-I の時間依存性について検討するため、HSC-3 培養系に IFN-α 2b (1 ng/mL)、IFN-γ (5 ng/mL) を添加し、添加後 2、4、8、24、48 時間の時点で回収した培養細胞を試料とし、同様の方法により mRNA 発現ならびにタンパク産生を解析した。</p> <p>更に、HSC-3 の細胞増殖に対するインターフェロンの効果を検討するために、IFN-α 2b あるいは IFN-γ で刺激後、倒立型位相差顕微鏡を用いて 24 時間観察した。また、HSC-3 に MDA-5 遺伝子を導入し、同様に細胞増殖に対する効果を検討した。</p> <p><u>結果</u></p> <p>口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の培養系を用いて、以下の結果が得られた。</p> <p>1) IFN-α 2b および IFN-γ の刺激により、MDA-5 および RIG-I mRNA の発現ならびに</p>	

タンパク産生は濃度依存的に増加した。

- 2) IFN- α 2b の刺激により、MDA-5 の mRNA 発現は刺激 2 時間後、RIG-I の mRNA の発現は刺激 4 時間後に増加した。
- 3) IFN- γ の刺激により、MDA-5 と RIG-I のタンパク産生は刺激 8 時間後に最大値となり、24 時間後に再び上昇し始めた。
- 4) IFN- α 2b の刺激により、細胞増殖は顕著に抑制された。対照的に、IFN- γ の刺激では細胞増殖抑制効果は認められなかった。
- 5) MDA-5 を遺伝子導入したところ、細胞増殖は抑制されなかった。

考察

従来の研究において、MDA-5 の発現はインターフェロン依存性であることが解明されている。I 型と II 型インターフェロンは、個々の細胞内シグナル伝達経路を活性化するための細胞表面レセプターに特異的に結合する。I 型インターフェロンでは、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)、STAT2、Interferon regulatory factor 9 (IRF9) で構成される IFN-stimulated genes factor 3 (ISGF3) 複合体が、II 型インターフェロンでは、STAT1 のホモ二量体が主として活性化される。活性化されたこれらの転写因子は、特定の IFN stimulated genes (ISGs) を誘導し、ウイルス増殖の様々なステップを抑制するものと考えられている。従って、これら二つの Type のインターフェロンは、免疫応答において全く異なった機能をもっていることが知られている。

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の培養系を用いて、I 型インターフェロン (IFN- α 2b) あるいは II 型インターフェロン (IFN- γ) 刺激により MDA-5 が誘導されるか否かを検討した。結果として、いずれのインターフェロンも、MDA-5 の発現を誘導することが確認された。MDA-5 の発現動態に関しては、II 型インターフェロンは I 型インターフェロンと比較し、遅延性の動態を示すことが明らかとなった。これらの結果は、II 型インターフェロンが MDA-5 の遅延性発現に関与しつつ、I 型インターフェロンによる MDA-5 の早期発現に関連している可能性があることが推測された。

一方、I 型インターフェロンは HSC-3 の細胞増殖を顕著に抑制したのに対し、II 型インターフェロンは細胞増殖を抑制しなかった。このことは、これまで報告されてきたメラノーマ細胞を用いた研究結果と矛盾していたが、口腔扁平上皮癌細胞においては、I 型インターフェロンによる細胞増殖抑制の機序に未知の分子が関与していることが示唆された。また、今回、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 において、I 型と II 型インターフェロンが、MDA-5 の発現を誘導すること、MDA-5 誘導は細胞増殖とは関連性がないことが明らかとなった。

本研究により、口腔粘膜上皮細胞における MDA-5 の発現は、抗ウイルス免疫応答に特異的に関与している可能性が示唆された。