

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 樋野 裕則

題 目 : Role of Hypoxia-Regulated Non-Coding RNA Molecules in Canine Oral Melanoma  
(犬のメラノーマにおける低酸素環境下で調節される非コード RNA 分子の役割)

### 論文要旨 :

Canine oral melanoma (COM) is an aggressive malignancy characterized by rapid progression and a high propensity for metastasis. The hypoxic tumor microenvironment is critical to COM's invasive behavior, influencing gene expression and cellular signaling pathways. Non-coding RNA molecules, including microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs), are known to play pivotal roles in tumor adaptation to hypoxia. However, their specific regulatory mechanisms in COM remain poorly understood. This dissertation investigates the roles of hypoxia-regulated non-coding RNA molecules, elucidating their contributions to COM progression and their potential as diagnostic biomarkers and therapeutic targets.

In the first chapter, I studied the dysregulated hypoxia-related micro RNA in cCOM. Hypoxia contributes significantly to the progression and metastasis of COM by inducing miRNA expression changes that regulate critical oncogenic pathways. This chapter explores the expression profiles of hypoxia-regulated microRNAs (HRMs) in canine oral melanoma using primary-site (KMeC) and metastatic (LMeC) COM cell lines cultured under normoxic (21% O<sub>2</sub>) and hypoxic (2% O<sub>2</sub>) conditions. Next-generation sequencing (NGS) and subsequent qPCR validation identified a set of hypoxia-regulated miRNAs, including miR-21, miR-210, and miR-301a, all exhibiting significant upregulation under hypoxic conditions.

Notably, miR-210, a well-known hypoxia marker, showed progressive upregulation, confirming its role in hypoxia-induced signaling. miR-21, identified as a central hub in the miRNA regulatory network, targeted vital oncogenes such as VEGF, PTEN, and TGFBR2, promoting angiogenesis, metastasis, and cell survival. miR-301a, uniquely active in metastatic cell lines, was implicated in aggressive cancer phenotypes by regulating pathways like MAPK1 and cyclin-dependent kinases. Network analyses using KEGG pathways and miRNet highlighted the complex interplay between these HRMs and critical oncogenic signaling cascades.

In this chapter, I concluded that hypoxia-induced miRNA dysregulation drives tumor progression by influencing cell survival, angiogenesis, and metastasis pathways. These HRMs serve as potential biomarkers for hypoxic adaptation and targets for therapeutic

intervention.

In my second chapter, building on the findings from Chapter 1, I studied the dysregulated hypoxia-related lncRNAs in cCOM. Using transcriptomic profiling via NGS, numerous lncRNAs were found to be dysregulated under hypoxic conditions in both primary and metastatic COM cell lines and in clinical tumor tissues. Among these, a novel lncRNA fragment, ENSCAFT00000084705.1, emerged as a significant molecule of interest.

ENSCAFT00000084705.1 was consistently downregulated under hypoxic conditions in both primary-site (KMeC) and metastatic (LMeC) COM cells and in COM clinical tissue samples compared to normal oral tissue. This downregulation was validated through qPCR, demonstrating progressive suppression of ENSCAFT00000084705.1 expression with increased hypoxic exposure. Interestingly, its absence in plasma and extracellular vesicles indicated that this lncRNA is tumor-specific and unsuitable as a circulating biomarker.

Functional exploration suggested that ENSCAFT00000084705.1 may play a role in regulating hypoxia-induced metastasis and tumor aggression. While its exact molecular function remains to be elucidated, its consistent expression pattern highlights its potential significance in COM biology. The findings emphasize the need for further research into lncRNAs as contributors to hypoxia-driven tumor adaptation and as targets for novel therapeutic strategies.

In conclusion, I elucidate the critical roles of hypoxia-regulated non-coding RNA molecules in canine oral melanoma, emphasizing both microRNAs and long non-coding RNAs. The identification of miR-21, miR-210, and miR-301a as critical players in hypoxia-induced oncogenic pathways and the discovery of the lncRNA ENSCAFT00000084705.1 as a hypoxia-specific regulator provide valuable insights into COM biology. These findings highlight the complex interplay between the tumor microenvironment and non-coding RNA-mediated gene regulation. Collectively, this research contributes to the understanding of hypoxia-driven mechanisms in COM progression and underscores the potential of non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets for this aggressive cancer.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	樋野 裕則
審 査 委 員	主 査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副 査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副 査：山口大学 教授 高木 光博
	副 査：鹿児島大学 特任教授 安藤 貴朗
	副 査：鹿児島大学 准教授 高橋 雅
題 目	Role of Hypoxia-Regulated Non-Coding RNA Molecules in Canine Oral Melanoma (犬のメラノーマにおける低酸素環境下で調節される非コード RNA 分子の役割)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>犬の口腔悪性黒色腫 (canine oral melanoma, COM) は、進行が速く、高い転移性を有する侵襲的な悪性腫瘍である。低酸素腫瘍微小環境は、COM の浸潤性挙動において重要な役割を果たしており、遺伝子発現や細胞シグナル伝達経路に影響を及ぼす。マイクロ RNA (miRNA) や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) を含むノンコーディング RNA 分子は、腫瘍の低酸素環境への適応において中心的な役割を果たすことが知られているが、COM におけるそれらの具体的な調節メカニズムは十分に解明されていない。本研究では、低酸素により調節されるノンコーディング RNA 分子の役割を調査し、それらが COM の進行に与える影響、ならびに診断バイオマーカーおよび治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。</p> <p>第一章では、COM における低酸素関連マイクロ RNA (hypoxia-related microRNA, HRM) の発現異常について研究を行った。低酸素は miRNA の発現を変化させ、腫瘍形成に重要なオンコジェニック経路を調節することで、COM の進行と転移に大きく寄与する。本章では、原発部位 (KMeC) および転移部位 (LMeC) の COM 細胞株を用い、通常酸素 (21% O<sub>2</sub>) および低酸素 (2% O<sub>2</sub>) 条件下で培養し、HRM の発現プロファイルを調査した。次世代シーケンシング (NGS) と qPCR による検証を通じて、低酸素条件下で有意に上方制御される miRNA (miR-21、miR-210、miR-301a など) のセットを特定した。</p> <p>特に、低酸素マーカーとして知られる miR-210 は、段階的な上昇を示し、低酸素誘導性シグナル伝達におけるその役割を裏付けた。また、miR-21 は miRNA 調節ネットワークの中心的な役割を果たし、VEGF、PTEN、TGFB2 などの主要なオンコジンを標的化して、血管新生、転移、および細胞生存を促進することが確認された。さらに、miR-301a は特に転移性細胞株において活性が高く、MAPK1 やサイクリン依存性キナーゼを調節することで、侵襲的な癌</p>	

表現型に関与することが示唆された。KEGG 経路および miRNet を用いたネットワーク解析により、これらの HRM と主要なオンコジェニックシグナル伝達カスケードとの複雑な相互作用が明らかにされた。

本章の結論として、低酸素誘導性の miRNA 発現異常が細胞生存、血管新生、および転移経路に影響を与え、腫瘍進行を促進することを示した。これらの HRM は、低酸素適応のバイオマーカーおよび治療介入の標的としての可能性を持つ。

第二章では、第一章の知見を基に、COM における低酸素関連 lncRNA の発現異常を研究した。NGS によるトランスクリプトーム解析を用い、原発部位および転移部位の COM 細胞株、ならびに臨床腫瘍組織において、低酸素条件下で発現異常を示す複数の lncRNA を特定した。その中で、新規 lncRNA フラグメント ENSCAFT00000084705.1 が重要な分子として注目された。

ENSCAFT00000084705.1 は、原発部位および転移部位の COM 細胞株、ならびに正常な口腔組織と比較した COM 臨床組織サンプルにおいて、低酸素条件下で一貫して発現が低下した。この発現抑制は qPCR によって検証され、低酸素曝露の増加に伴う段階的な発現低下が観察された。また、この lncRNA は血漿および細胞外小胞には存在せず、腫瘍特異的であることが示唆されたため、循環バイオマーカーとしては不適であると考えられる。

機能解析の結果、ENSCAFT00000084705.1 は低酸素誘導性転移および腫瘍侵襲性の調節に関与する可能性が示唆された。分子レベルでの正確な機能は未解明であるが、その一貫した発現パターンは COM の生物学における重要性を示唆している。本研究は、低酸素誘導性腫瘍適応の要因としての lncRNA の役割と、新規治療戦略の標的としての可能性を強調している。

本研究では、犬の口腔悪性黒色腫における低酸素調節性ノンコーディング RNA 分子の重要な役割を解明した。特に、miR-21、miR-210、miR-301a が低酸素誘導性オンコジゲン経路における重要な役割を果たしていること、ならびに lncRNA ENSCAFT00000084705.1 が低酸素特異的な調節因子であることを発見した。これらの知見は、腫瘍微小環境とノンコーディング RNA を介した遺伝子調節との複雑な相互作用を強調している。本研究は、COM の進行における低酸素駆動メカニズムの理解に貢献するとともに、ノンコーディング RNA をバイオマーカーおよび治療標的として活用する可能性を示唆している。

これら一連の研究は、適正な手法で実験を行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。本研究の成果は獣医臨床領域と人医療領域の診断と病態解明に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位に十分に値すると判断された。