

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
学籍番号	08D742	氏名	豊田由花
論文題目	Mechanism of gemcitabine-induced suppression of human cholangiocellular carcinoma cell growth		

(論文要旨)

【目的】

胆管細胞癌 (CCC) は二番目に多い原発性肝癌であり、発生率と死亡率は世界的に増加傾向にあるが、高い化学療法抵抗性のために予後不良である。CCC の代表的な抗癌剤である Gemcitabine (GEM) について、CCC 細胞増殖抑制効果と抑制機構について検討し、GEM の抗腫瘍効果を示すターゲット miRNA を同定することを目的とした。

【方法】

3 種類の CCC 細胞株 (HuCCT-1, Huh28, TKKK) に、0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 μ g/ml の GEM 投与後、24, 48, 72 時間後に cell proliferation assay を行い癌細胞増殖について検討した。HuCCT-1 および TKKK に 0.1 μ g/ml の GEM 投与後、24, 48 時間後の細胞周期パターンをフローサイトメトリーで解析し、細胞周期への影響を検討した。細胞周期関連分子の発現動態は HuCCT-1 および TKKK に GEM 投与 24, 48 時間後に Western blot 法を用いて検討した。また、血管新生分子群 (20 分子)、レセプター型チロシンキナーゼ群 (42 分子) の関与をメンブレンアレイを用いて解析した。GEM 投与により誘導される癌細胞内の miRNA を 2555 分子が搭載されたアレイチップを用い網羅的に解析し、GEM 投与の有無による miRNA の差異を検討した。

【結果】

3 種類の CCC 細胞株のうち、GEM 投与で濃度依存的に細胞増殖抑制を認めたのは HuCCT-1 のみであり、Huh28, TKKK では増殖抑制効果は示さなかった (Fig.1)。またフローサイトメトリーの結果、HuCCT-1 では G1 アレストが引き起こされていた (Fig.2)。さらに Western blot 解析の結果、細胞周期の G1 期から S 期の誘導に必要な分子である Cyclin D1 を減弱させていた (Fig.3)。一方、GEM 耐性の細胞株 TKKK では、細胞周期の G1 アレストも Cyclin D1 の減弱も見られなかった。また、GEM は HuCCT-1 において血管新生分子 IL-6, IL-8, MCP-1 を上昇させた (Fig.4)。一方 TKKK では、GEM 投与による血管新生分子やリン酸化レセプターチロシンキナーゼ群の変化は見られなかった。さらに HuCCT-1 において、GEM 投与群は非投与群と比較して、異なる miRNA プロファイルを形成していた (Fig.5)。GEM 投与 48 時間後の癌細胞と非投与の癌細胞の miRNA を比較すると、投与群で有意な差 ($p < 0.05$) を持って 1.5 倍以上上昇した miRNA は 95 分子であった。一方、投与群で 0.67 倍以下に減少した miRNA は 11 分子であった。

【考察・結語】

GEM は HuCCT-1 において細胞周期関連分子 CyclinD1 を減弱させ、G1 アレストに導くことで細胞増殖を抑制していた。また、HuCCT-1 において GEM 投与後著明に増加した血管新生分子 IL-6, IL-8, MCP-1 は、細胞増殖の促進に関与し、胆管癌を含む様々な癌で増加する。これらの過剰発現が様々な癌における予後を悪化させるという報告もある。従って、GEM に

対する耐性の獲得は、GEM 投与によって誘導される IL-6, IL-8, MCP-1 の発現増加に起因する可能性が示唆された。また GEM 投与により、優位に HuCCT-1 で上昇し、TKKK で低下する 3 つの miRNA (miR-6087, miR-3651, miR664b) が同定され、これらの miRNA の変化が GEM 投与の効果の有無を決定する重要な要因になる可能性が示唆された。さらに、GEM 投与で上昇した miRNA のうち、let-7a, miR-214, miR-34a は Cyclin D1 に関与する遺伝子を標的とし、腫瘍サプレッサーとして機能するという報告がある。従って、これらの miRNA の発現増加が Cyclin D1 を抑制し、細胞周期での G1 アレストを引き起こす一因となる可能性が考えられた。

Fig.1)

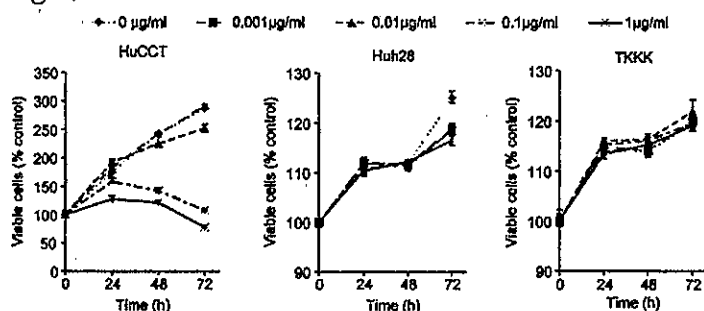


Fig.2)

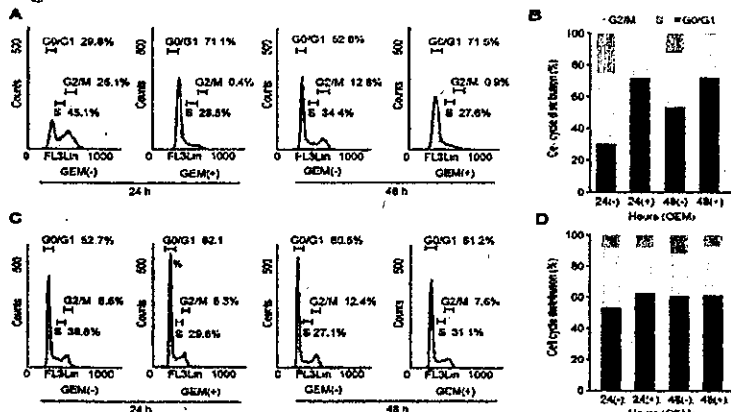


Fig.4)

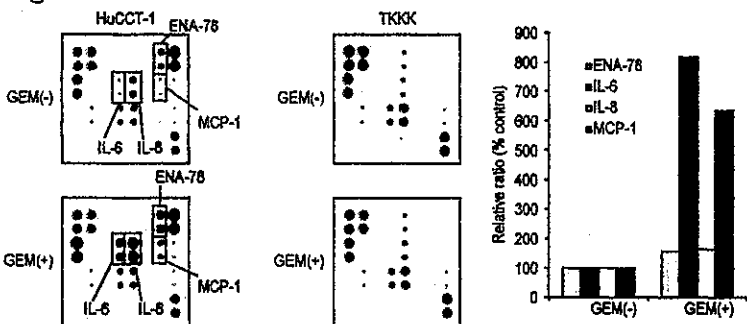


Fig.3)

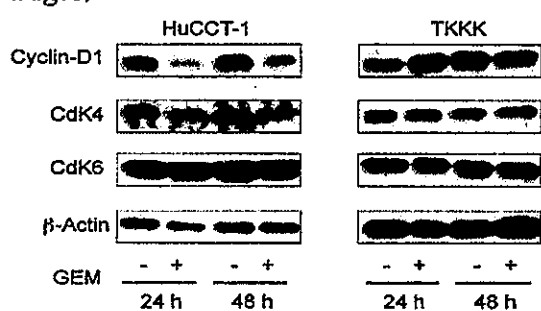
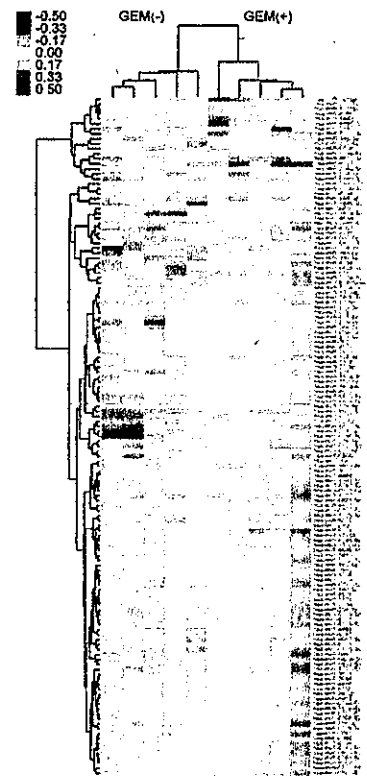


Fig.5)



掲載誌名	International Journal of Oncology			第 巻, 第 号
(公表予定) 掲載年月	平成27年5月 掲載受理	出版社(等)名	Spandidos publications	
Peer Review		有 . 無		

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。