

学位論文審査の結果の要旨

平成 27 年 6 月 18 日

審査委員	主 査	辻 晃 仁		
	副 主 査	金井田 克己		
	副 主 査	河野 雅和		
願 出 者	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			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			
<p>〔 要 旨 〕</p> <p>【背景・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。</p> <p>【方法】3 種類の CCC 細胞株（HuCCT-1, Huh28, TKKK）に、0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 μg/ml の GEM 投与後、24, 48, 72 時間後に MTT assay を行い癌細胞増殖について検討した。HuCCT-1 および TKKK に 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。血管新生分子群、レセプター型チロシンキナーゼ群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。</p> <p>【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。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。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。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。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。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。</p> <p>【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</p>				

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, miR-664b) 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、腫瘍抑制剤として機能するという報告があり、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。

平成 27 年 6 月 18 日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

- 1) 採用した胆管細胞癌の細胞株は購入したものか？→購入したもの。
- 2) 3 種類の細胞株の特徴は？→HuCCT-1 は中分化腺癌、Huh28 と TKKK は低分化。
- 3) 細胞株の継代は 6 ヶ月と長期間に渡るようだが、何回も継代するとシグナリングに変化が起きたりしないのか？→Normal cell と cancer cell では異なる。癌細胞は不死化細胞であり、継代は問題ないとする。Normal cell line は継代を繰り返すと遺伝子に変化が起きることがあるが、cancer cell では継代を多く経たものが多い。
- 4) up regulation と down regulation のスペルミスについて
- 5) HuCCT-1 は中分化、Huh28 と TKKK は低分化であり、MTT の結果では中分化の細胞株で感受性があったようだが、臨床ではどうか？→臨床でも分化度が高いほど効果がある印象。
- 6) 高分化の細胞株ではどうか？→今回使用した細胞株の中に高分化のものはない。高分化の細胞株は手に入れられなかった。
- 7) BSC(Best supportive care)とは具体的に？→積極的な治療を行わず、対症療法のみ。
- 8) MTT は何の略？→MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- 9) 印刷業での胆管癌発症のニュースがあるが、ゲムシタビンの効果など関連性について何かかわっていることはあるか？
- 10) 化学療法でゲムシタビンを選択する割合は？→最近ではゲムシタビン+シスプラチンがファーストライン。ほぼ 100%に近いと考える。
- 11) ゲムシタビンは DNA 合成阻害し、アポトーシスを起こすというのが一般的。アポトーシスについては検討したか？→今回 in vitro でアポトーシスの実験を行ったが、HuCCT-1 においてはゲムシタビン投与でアポトーシスは起こさず、細胞周期における G1 アレストが起きていた。癌腫、あるいは細胞株によって抗腫瘍効果の機序が異なる可能性が考えられた。
- 12) 臨床実験を予定しているとのことだが、具体的には？→HuCCT-1 において、miR-6087、miR-3651 及び miR-664b はゲムシタビン投与後に優位にアップレギュレートされたが、TKKK では対照的に、これらの miRNA は優位にダウンレギュレートされた。この結果は、ゲムシタビン投与後のこれら 3 つの miRNA の変化は、癌細胞はゲムシタビンに感受性があるかどうかを決定する重要な要因であるかもしれないことを示唆している。miRNA は血清でも測定することが可能なため、今後の研究で血清中でも同様の結果が得られれば、GEM 投与前後での miRNA を解析することにより、投与初期においてゲムシタビンの感受性を予測するマーカーとなりうるのではないかと考えている。
- 13) ゲムシタビンは実際の臨床では胆管細胞癌に対して1割程度しか効果が無く、+シスプラチンになると、効果があがる。今回、HuCCT-1はゲムシタビン感受性の細胞株であり、その他の細胞株は非感受性であったが、+シスプラチンでは実験結果が異なる可能性があり、検討が待たれる。

掲 載 誌 名	International Journal of Oncology			第	巻, 第	号
(公表予定) 掲 載 年 月	H27年5月 掲載受理	出版社 (等) 名	Spandidos publications			

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。