

胆管細胞癌におけるゲムシタビンによる癌細胞増殖抑制のメカニズム

かがわ総合リハビリテーション病院 診療部 医師 豊田 由花
香川大学医学部消化器神経内科 医師 正木 勉

キーワード：胆管細胞癌、ゲムシタビン、マイクロ RNA

要 旨

胆管細胞癌 (cholangiocellular carcinoma(CCC)) の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な疾患である。

今回我々は CCC の代表的な抗癌剤であるゲムシタビンについて、CCC 細胞増殖抑制効果と抑制機構について検討し、ゲムシタビンの抗腫瘍効果を示すターゲットマイクロ RNA を同定することを目的とした。

3 種類の CCC 細胞株のうち、ゲムシタビン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。ゲムシタビン投与後、HuCCT-1 では G1 アレストが引き起こされており、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、ゲムシタビン耐性の細胞株 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、ゲムシタビンは HuCCT-1 において血管新生分子の angiogenin の活性を低下させ、IL-6、IL-8、MCP-1 を上昇させた。さらに HuCCT-1 において、ゲムシタビン投与群は非投与群と比較して、異なるマイクロ RNA プロファイルを形成していた。ゲムシタビン投与 48 時間後の癌細胞と非投与の癌細胞のマイクロ RNA を比較すると、投与群で有意な差($p < 0.05$)を持って 1.5 倍以上上昇したマイクロ RNA は 95 分子であり、有意な差を持って 0.67 倍以下に減少したマイクロ RNA は 11 分子であった。

ゲムシタビンは治療効果のある胆管細胞癌において CyclinD1 を減弱させることにより細胞周期の停止を引き起こすと考えられ、G1 アレストを引き起こす分子をターゲット遺伝子とするマイクロ RNA が関与していることが示唆された。

1. はじめに

胆管細胞癌 (cholangiocellular carcinoma(CCC)) は肝内胆管癌とも呼ばれ、発生率、死亡率ともに世界的に増加傾向にある。本邦でも人口 10 万人あたりの死亡率は年々増加しており、ここ 15 年で 2 倍以上の増加がみられる。癌取扱規約上、原発性肝癌に分類され、肝細胞癌について 2 番目に多く、原発性肝癌の 4~5% を占める。非常に化学療法抵抗性が高く、外科的切除のみが根治を期待できる治療法であるが、胆管細胞癌の 30~40% は診断時にすでに切除不能な進行癌として発見される他、根治切除後でもその 50~80% が再発することから、化学療法に寄与する部分大きい。

今回我々は高い化学療法抵抗性のために予後不良

な疾患である胆管細胞癌に対し、胆管細胞癌の代表的な抗癌剤であるゲムシタビンについて、胆管細胞癌における細胞増殖抑制効果と抑制機構について検討し、ゲムシタビンの抗腫瘍効果を示すターゲットマイクロ RNA を同定することを目的とした。

2. 方法

① 3 種類の胆管細胞癌株 (HuCCT-1, Huh28, TKKK) に対し、0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 μ g/ml のゲムシタビン投与後、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。

② 胆管細胞株に 0.1 μ g/ml のゲムシタビンを投与後、細胞周期動態を Flow cytometry で解析し、細胞周期への影響を検討した。

③ 胆管細胞株に 0.1 μ g/ml のゲムシタビンを投与後、細胞周期関連分子の発現動態を Western blot 法で検討した。

④ 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についてメンブレンレイを用いて解析した。

⑤ ゲムシタビン投与により誘導される癌細胞内のマイクロ RNA を 2555 分子が搭載されたチップを用い網羅的に解析し、ゲムシタビン投与の有無によるマイクロ RNA の差異を検討した。

3. 結果

① Cell proliferation assay

3 種類の胆管細胞癌株のうち、ゲムシタビン投与で濃度依存的に細胞増殖抑制を認めたのは HuCCT1 のみであり、Huh28、TKKK では増殖抑制効果は示さなかった (図 1)。

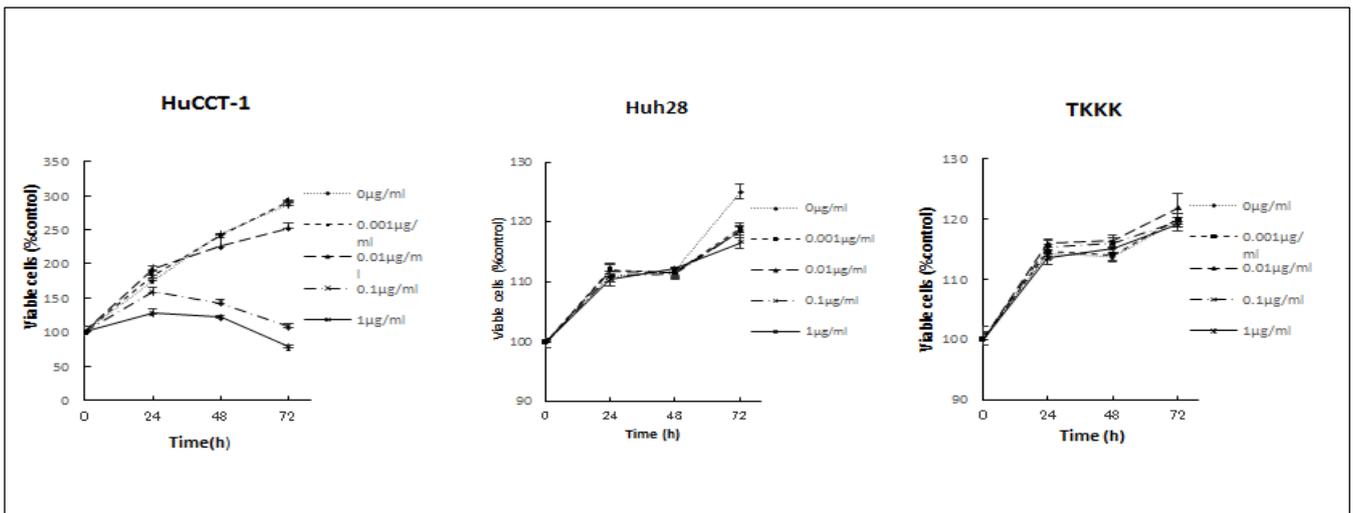


図 1

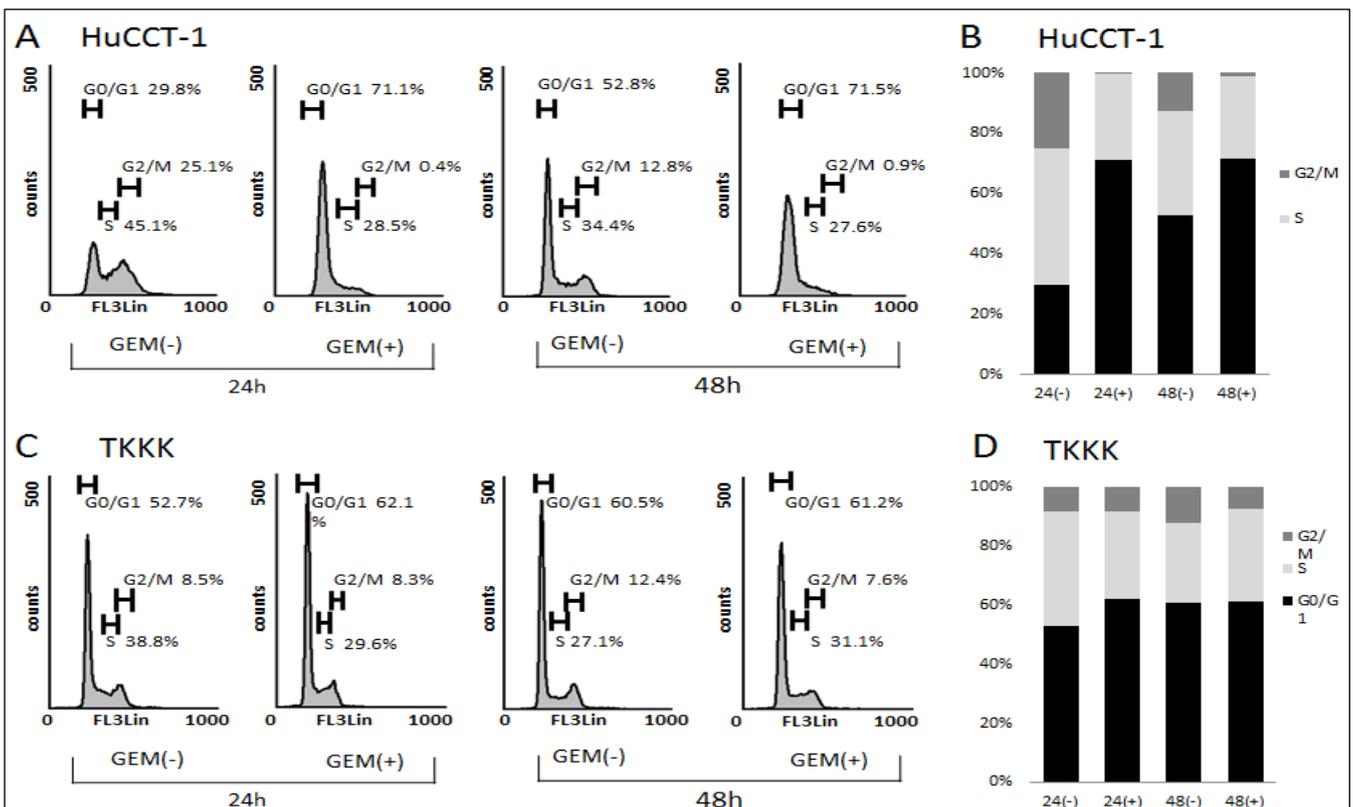


図 2

② Flow cytometry analysis

ゲムシタビンに感受性のあった HuCCT-1 では、24 時間後において、コントロール群で 29.8%であった G0/G1 期が、ゲムシタビン投与群では 71.1%に上昇、コントロール群で 45.1%であった S 期が、ゲムシタビン投与群では 28.5%に減少しており、ゲムシタビン投与により、G1 アレストが引き起こされていた (図 2AB)。

一方、ゲムシタビン耐性の TKKK では、ゲムシタビン投与による細胞周期の変化はみられなかった (図 2CD)。

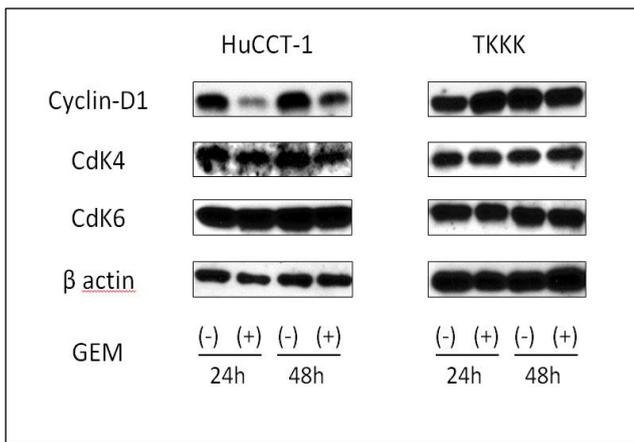


図 3

③ Western blotting

ゲムシタビンに感受性のあった HuCCT-1 において、ゲムシタビン投与は、細胞周期関連タンパク質である CyclinD1 を減弱させた。その catalytic subunit である Cdk4、Cdk6 では変化が見られなかった。

一方、ゲムシタビン耐性の TKKK では、Cyclin D1 のみならず、Cdk4、Cdk6 のゲムシタビン投与による変化は見られなかった (図 3)。

④Angiogenesis-related protein and p-RTK expression

ゲムシタビンに感受性のある HuCCT-1 において、ゲムシタビン投与後、20 の血管新生関連タンパク質のうち、IL-6、IL-8、MCP-1、および ENA-78 が著明に増加した。一方、ゲムシタビン耐性の TKKK ではゲムシタビンの投与の有無で、血管新生分子に変化は見られなかった (図 4)。

p-RTK (リン酸化レセプター型チロシンキナーゼ)群では、HuCCT-1 と TKKK のいずれにおいてもゲムシタビン投与による変化は見られなかった (図 5)。

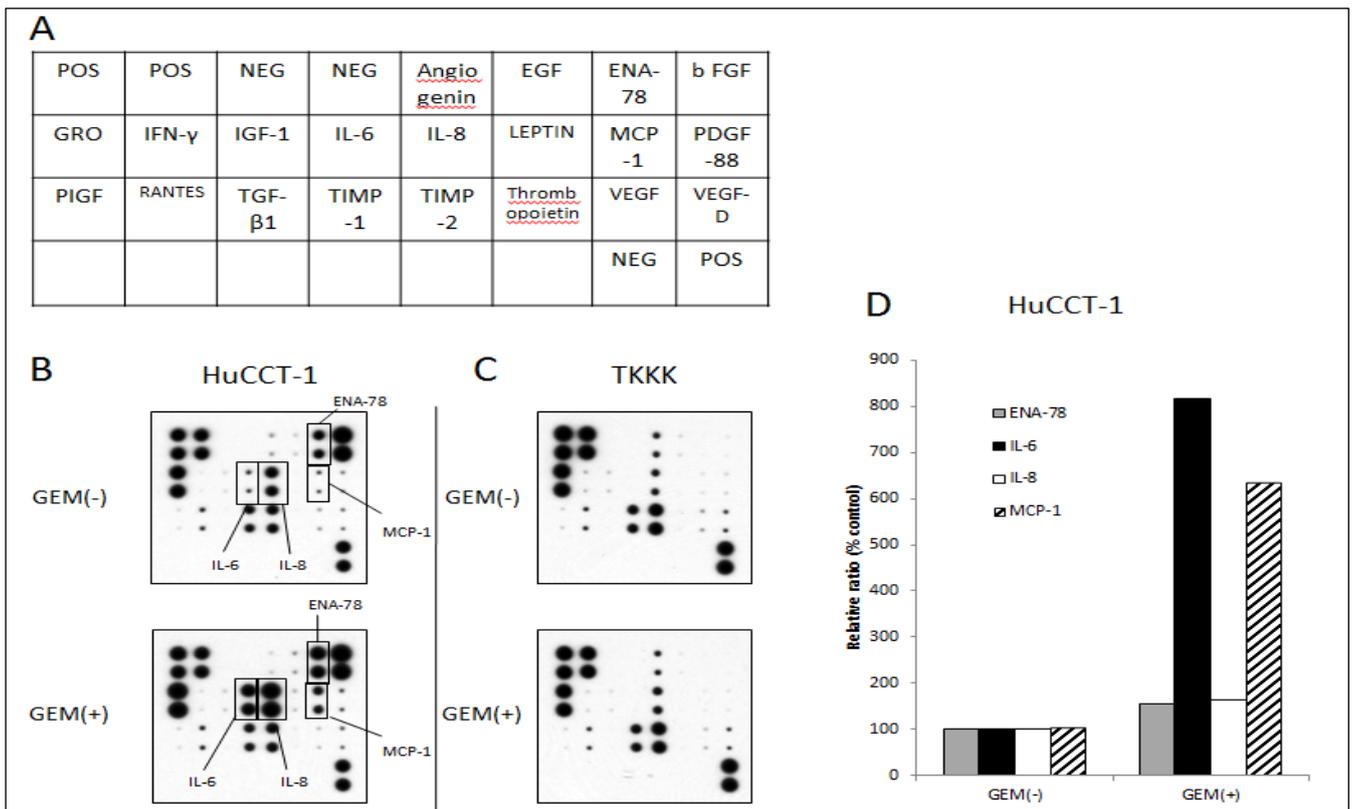


図 4

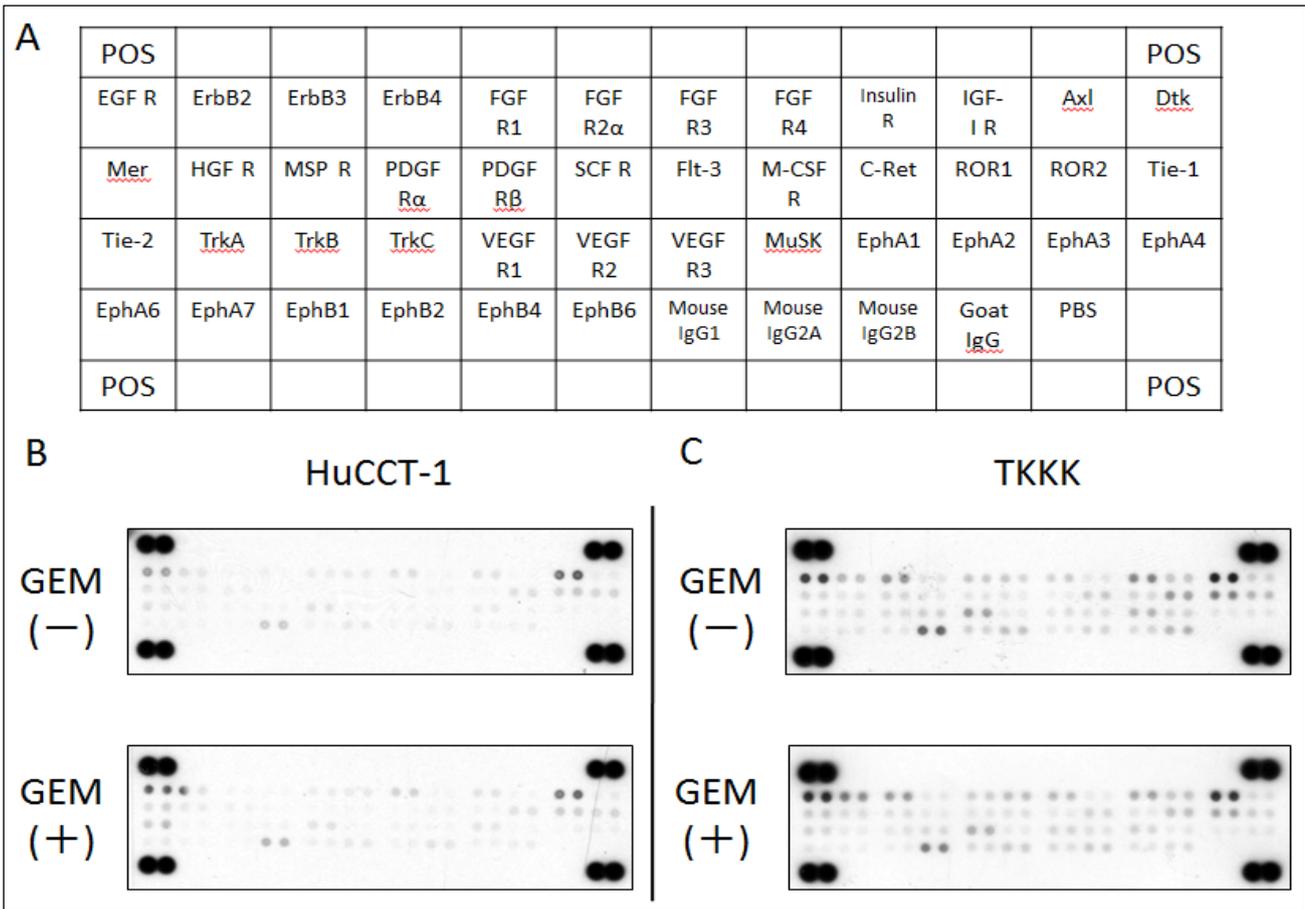


図5

⑤ microRNA

HuCCT-1において、2555分子のmiRNAのうち、ゲムシタビン投与 48 時間後に、優位な差を持って ($p < 0.05$) 1.5 倍以上 up regulation したマイクロ RNA は 95 分子、0.67 倍以下に down regulation したマイクロ RNA は 11 分子であった。

HuCCT-1 において、ゲムシタビン投与群は非投与群と比較して、異なるマイクロ RNA プロファイルを形成していた (図 6)。

4. 考察

細胞周期において、CyclinD1 は G1 期から S 期に誘導する機能を有する重要な分子である。ゲムシタビンは HuCCT-1 において、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ることが示唆された。

ゲムシタビン投与によって増加を示した血管新生分子 IL-6、IL-8、MCP-1 は血管新生に関連するだけでなく、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とが報告されている。さらに、これらの分子の過剰発現は様々な癌において予後を悪化させるという報告もある。以上のことから、ゲムシタビンに対する耐性の獲得は、ゲムシタビン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。

マイクロ RNA とは、21 から 25 塩基ほどの短いノンコーディング RNA の一種であり、特定のメッセージンジャー RNA と結合し、このメッセージンジャー RNA を分解に導いたり、タンパクへの翻訳を阻害したりする、抑制的な機能を持っていると考えられている。マイクロ RNA を調べることは遺伝子発現を理解するうえで、極めて重要である。

ゲムシタビン投与で up regulation したマイクロ RNA 95 分子のうち、表 1 に示すマイクロ RNA は種々の癌で down regulate されることが知られており、腫瘍サプレッサーとして機能するという報告がある。これらの up regulation したマイクロ RNA は Cell cycle arrest を引き起こすと考えられ、特に let-7a、miR-214、miR-34a は cyclin D1 に関与す

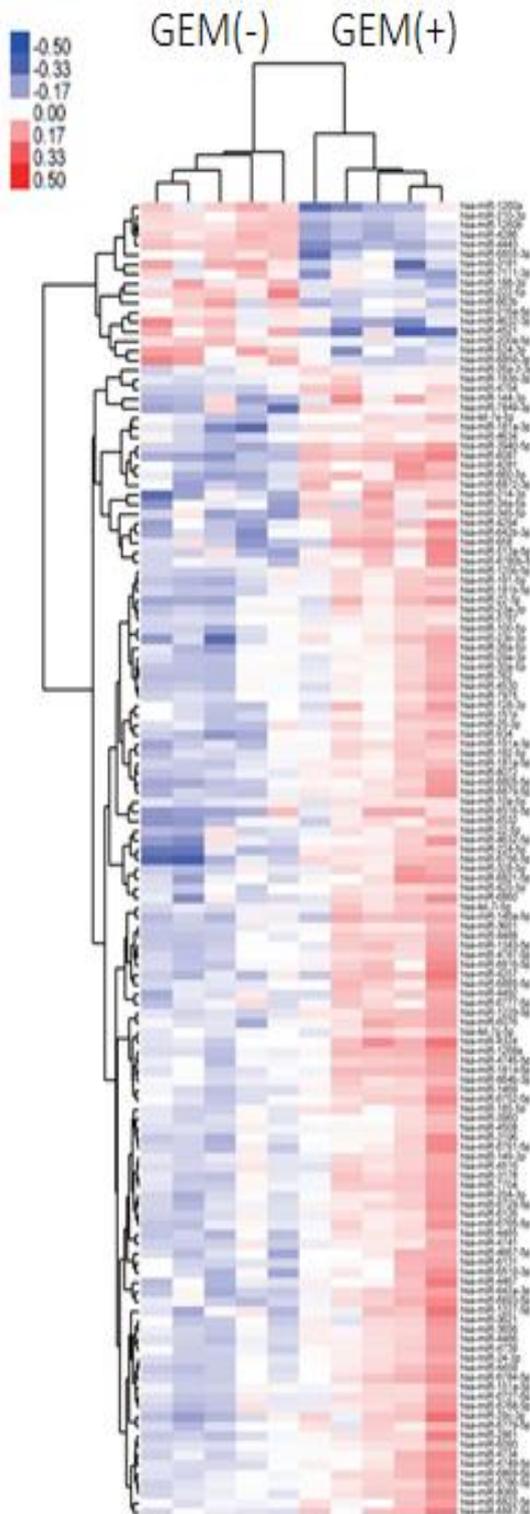


図6

る遺伝子を target とするという報告がある。ゲムシタピン投与によりこれらのマイクロ RNA が増加すれば、cyclinD1 は減少することを示しており、当研究において western blotting で証明されたゲムシタ

ピン投与による cyclinD1 減少のイベントと合致する。

逆に、ゲムシタピン投与で down regulation したマイクロ RNA11 分子のうち、表2に示すマイクロ RNA は種々の癌で up regulate される。特に miR-222 はオンコミアとして認識されており、cell cycle のアレストを引き起こす Cyclin-dependent kinase inhibitor、p27、p57 を target 遺伝子とするという報告がある。すなわち、miR-222 の down regulation により、p27、p57 が増加し、細胞周期を G1 アレストへ導く可能性が推測される。ゲムシタピン投与で up regulation したマイクロ RNA のうち、let-7a, miR-214, miR-34a は Cyclin D1 に関与する遺伝子を標的とするという報告があることから、ゲムシタピンの投与によるこれらのマイクロ RNA の up regulation 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示唆された (図7)。

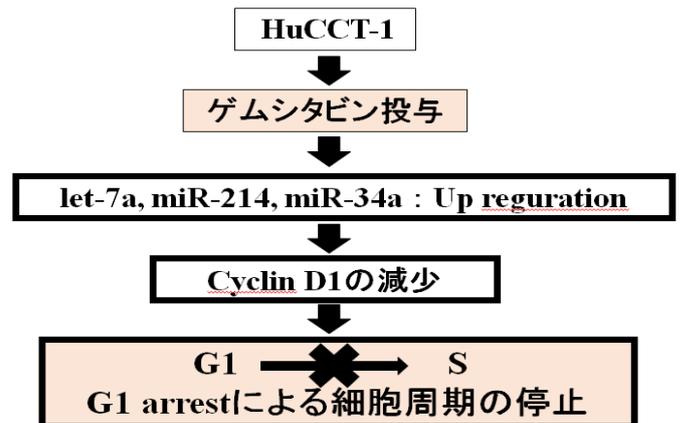


図7

さらに、ゲムシタピン投与により優位に HuCCT1 で上昇し、TKKK で低下する3つのマイクロ RNA (miR-6087, miR-3651, miR664b) が同定され、これらのマイクロ RNA の変化はゲムシタピン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 (表3)。

近年の研究で、血清中にもマイクロ RNA が存在することが判明しており、ゲムシタピン投与後の血清マイクロ RNA を検討することにより、治療効果予測マーカーとなり得る可能性が考えられる。

Name	平均 T/N	Target gene
miR-23b	2.74	HMGA2, Cyclin A2
miR-22	2.33	C-Myc
miR-29c	1.92	GNA13, PTP4A
Let-7a	1.85	Cyclin D1, c-Myc
miR-146a	1.84	EGFR, IRAK1
miR-214	1.78	Cyclin D1, c-Myc
miR-204	1.76	RAB22A, SIRT1
miR-100	1.72	FGFR3, PLK1
miR-29a	1.67	HSP47
miR-24	1.64	FOXM1, RegIV
miR-34a	1.54	Cyclin D1, Cdk6

表 1



- 種々の癌で
down regulation

- 腫瘍抑制剤として機能する

- Upにより
Arrest of cell cycle

Name	平均 T/N	Target gene
miR-1260b	0.37	SFRP1, Smad4
miR-222	0.62	p27, p57
miR-210	0.66	

表 2



- 種々の癌で
up regulation

- OncomiR
として機能する

- Downにより
Arrest of cell cycle

Name	平均 (Treated / untreated)	
	HuCCT-1	TKKK
miR-6087	3.66 ↑	0.54 ↓
miR-3651	1.53 ↑	0.64 ↓
miR-664b	1.50 ↑	0.47 ↓

表 3

5. 結語

ゲムシタビンは治療効果のある胆管細胞癌において、細胞周期関連タンパク質 Cyclin D1 を抑制することにより G1 アレストを引き起こし、細胞増殖を阻害する。

細胞周期の停止には、CyclinD1 に関連する遺伝子を標的とするマイクロ RNA (let-7a, miR-214, miR-34a) が関与する可能性が示唆された。

【出典先】

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY
47: 1293-1302, 2015