

主 論 文

Loss of Runt-related transcription factor 3 induces resistance to 5-fluorouracil and cisplatin in hepatocellular carcinoma

(RUNX3 の欠失は、肝細胞癌において 5-FU とシスプラチンの抵抗性を誘導する)

【諸言】

HCC は世界で 6 番目に多い癌であり、早期の HCC 患者は治癒出来るが、進行期の HCC の予後は相対的に不良である。抗癌剤の耐性が一因となっており、抗癌剤の分子機構の解明がより効果的な治療戦略の開発を容易にすると考える。

薬剤の排出は、HCC 患者における薬剤耐性に影響を及ぼすと考えられる主要な分子機構である。増加した薬物の排出は、抗癌剤の蓄積を減少させることが出来る。多剤耐性関連蛋白質 (MRP) は、ABC トランスポータースーパーファミリーのメンバーの 1 つであり、HCC 患者において認め薬剤耐性に寄与すると報告されている。MRP は 5-FU 耐性癌細胞でアップレギュレートされ、MRP5 発現が膀胱癌細胞での 5-FU 耐性に影響を与える事が報告されている。更に、様々な研究において MRP と 5-FU 感受性との間に有意な関連があると言われている。HCC に使用するもう一つの抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) の薬剤耐性も、MRP によって媒介される。

癌抑制遺伝子の runt-related transcription factor 3 (RUNX3) は、胃癌において発現しており、TGF- β シグナル伝達系の下流で細胞の成長とアポトーシスを制御している。RUNX3 は、元々は胃癌の癌抑制遺伝子として報告され、HCC においても癌抑制遺伝子としての機能が示されてきた。我々や他の研究者達は、RUNX3 の蛋白と mRNA が HCC において減少しており、RUNX3 の発現低下は HCC においてアポトーシスの防止、癌幹細胞様変化への誘導、EMT (上皮間葉移行) の促進といった様々な効果をもたらす事を報告してきた。加えて RUNX3 は膀胱癌での MRP を調整していることが報告された。しかしながら、HCC の薬剤耐性を取り持つかも知れない RUNX3 と MRP は、完全に解明された訳ではない。

それ故に本研究では HCC における RUNX3 と MRP の関係性を検証した。また HCC の 5-FU と CDDP の耐性における RUNX3 の発現効果も評価した。

【材料と方法】

細胞株と細胞培養

ヒトの HCC 細胞株 (Hep3B, Huh7, HLF) を用いて、DMEM 内で培養した。37°C の 5% の二酸化炭素と 95% の空気を含む大気中で培養した。

異所性の RUNX3 発現

Hep3B, Huh7, HLF 細胞へ FuGENE6 トランスフェクション試薬を使って、RUNX3 または CAT をトランスフェクションした。それぞれの細胞株に少なくとも 2 回は施行した。

免疫ブロッティング分析

メンブレンは PVDF を用いて、一次抗体は RUNX3, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, β アクチンを 4℃ でオーバーナイトした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体でウェスタンブロットした。

MTT アッセイ

細胞増殖は、MTT assay にて評価した。培養した細胞を DMSO で溶解し 570nm のマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

siRNA での RUNX3 遺伝子抑制

RUNX3 発現している Hep3B, Huh7 に RNAiFect トランスフェクション試薬で siRNA もしくは RUNX3 siRNA をトランスフェクションした。

HCC 組織と免疫組織化学

当院の HCC 患者 23 名、内訳として男性 18 名 (52-78 歳、平均 65.1 歳)、女性 5 名 (55-74 歳、平均 65.8 歳) の HCC 組織を用いて RUNX3, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 の発現を、それぞれ免疫組織化学で評価した。それらの HCC 組織における MRP 発現の程度を、染色の程度で 4 段階に分類した。MRP 発現が 0%、すなわち陰性の場合を Grade0 とし、0-20% の弱発現を Grade1、20-50% を Grade2、50% 以上の強発現を Grade3 とした。これを MRP expression score と名付けた。RUNX3 発現の程度も同様に 4 段階で分類した。臨床的な背景の予備知識を持たない 2 人の医師でそれぞれを分類した。MRP と RUNX3 の expression score をプロットし JMP ソフトウェアで統計学的解析を行った。

HCC における遺伝子発現プロファイリング分析

HCC 組織の RUNX3 発現と MRP 発現を HCC 組織の microarray データベースである Oncomine を用いて、相関性について JMP ソフトウェアで統計学的解析を行った。

【結果】

HCC 細胞株において異所性の RUNX3 発現は MRP 発現を減少させる

異所性の RUNX3 蛋白発現は 3 つの HCC 細胞株 (Hep3B, Huh7, HLF 細胞) における MRP の発現レベルを減少させた。RUNX3 蛋白発現は RUNX3 プラスミドをトランスフ

エクシオン後に免疫ブロッティング分析により検出した。Hep3B, Huh7, HLF 細胞は MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 を発現していた。異所性の RUNX3 蛋白発現は、3 つ全ての細胞株で MRP 発現レベルを減少した。RUNX3 発現している Hep3B、Huh7、HLF 細胞の MRP1、MRP2、MRP3 および MRP5 の発現は、対照 CAT 発現細胞よりも弱かった (図 1)。

異所性の RUNX3 発現は細胞増殖を抑制し、5-FU と CDDP 感受性を高める

異所性の RUNX3 発現は、対照の Hep3B, Huh7 細胞と比較してトランスフェクション 3 日後の Hep3B, Huh7 細胞で細胞増殖を抑制した (図 2)。

次に RUNX3 もしくは CAT をトランスフェクトした Hep3B, Huh7 の抗癌剤の感受性の RUNX3 の効果を分析した。5-FU の IC50 は Hep3B では 8.16nM から 4.84 nM に、Huh7 では 9.81 nM から 4.76 nM に低下した (図 2A)。CDDP の IC50 も、Hep3B では 6.76 nM から 4.58 nM に、Huh7 では 9.28 nM から 4.57 nM に低下した (図 2B)。

HCC 組織において MRP 発現は RUNX3 発現と負の相関にある

23 の HCC 組織が、免疫組織化学による MRP 発現と RUNX3 発現のために使用された。発現のレベルで分類した MRP が陰性の場合を score0、弱発現を score 1、中発現を score 2、強発現を score 3 として、図 3A-D に示した。MRP の高い発現 score は、一般的に RUNX3 発現が低い組織で見られる相関関係が示された (図 4)。

HCC における遺伝子発現プロファイリング分析

RUNX3 と MRP の関係性を Oncomine で解析した。RUNX3 mRNA 発現と MRP2, MRP3, MRP5 mRNA 発現の間は、各々、統計学的有意差をもって負の相関を示した。なお RUNX3 mRNA 発現と MRP1 mRNA 発現の間には統計学的有意差はない ($P=0.1538$) が、負の相関傾向が見られた。

【考察】

抗癌剤の抵抗性は HCC の治療において大きな課題である。本研究では、HCC における RUNX3 発現と抗癌剤感受性の関係性を評価した。RUNX3 は HCC で癌抑制遺伝子として発見され、それは以前の研究で示す RUNX3 が HCC で頻繁に欠失する事、そして RUNX3 の欠失が HCC の悪性形質転換に寄与する事と一致した。

以前の我々の膵癌の研究において、RUNX3 発現が MRP 発現を減衰させることでゲムシタビンの感度に影響を与える事を報告した。それ故に RUNX3 発現が HCC においても抗癌剤感受性に影響するのではないかと仮説を立てた。抗癌剤の耐性化はいくつかの細胞過程によって誘導される。例えば、MRP は薬物の排泄を媒介し、癌細胞内の薬物の蓄積を減少させる。本研究では、調べた 3 つの HCC 細胞株全てで MRP 発現が異所性の RUNX3 発現

を減少させることを認めた。更にこれらの細胞は対照細胞よりも 5-FU と CDDP の感受性を高めて、抗癌剤耐性における MRP の役割を支持する。

膵癌での以前の研究と一致して、我々は RUNX3 が HCC 細胞において MRP 発現を阻正在している事を発見した。今回の研究では HCC 組織数が少ないため、追加として MRP 発現と RUNX3 発現の関係を Oncomine で調べた結果、RUNX3 発現が MRP 発現を調節していることを示していた。RUNX3 発現は MRP1 プロモーター活性の阻害を介して MRP1 をダウンレギュレーションして胃癌細胞の抗癌剤への感作を行うことが示されている。このように我々の発見は、RUNX3 が HCC 細胞でプロモーター活性を阻害する事で MRP 発現を調節していることを示している。

今回の研究で MRP と RUNX 発現の関係性に関して検証したが、その他の因子も 5-FU と CDDP 耐性に関与している。MDR1/ABCB1 とその他の ABCB トランスポーターも 5-FU に対する耐性に関与していると報告されている。CDDP 耐性は薬剤の排泄や不活性化を含む多因子機構を介して確立されている。今研究では、そのような機構における RUNX3 蛋白発現の効果を評価出来ていないので、今後、より詳細な研究が必要であろう。

【結論】

RUNX3 発現の欠失は MRP 発現をアップレギュレートし、それによって HCC 患者の 5-FU や CDDP への抵抗性に寄与する。また RUNX3 の再発現は MRP 発現をダウンレギュレートし、5-FU と CDDP への HCC 細胞を再感作する。