

学位論文（博士）

Exosomal miR-141-3p Induces Gemcitabine  
Resistance in Biliary Tract Cancer Cells  
(胆道癌細胞におけるエクソソーム miR-141-3p  
によるゲムシタビン耐性の誘導)

氏名 徳久 晃弘

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和6年4月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	7
5. 考察	8
6. 謝辞	11
7. 参考文献	11
8. 図表	19

## 1. 要旨

背景：ゲムシタビン（GEM）は胆道癌に対する多剤併用化学療法において中心的な役割を果たしている。しかしながら、GEM 耐性化により胆道癌の予後は不良である。エクソソームは腫瘍増殖、転移、免疫異常に加え、化学療法抵抗性においても重要な働きを担っていると考えられている。本研究では胆道癌におけるエクソソームの GEM 耐性に対する影響について検討した。

材料と方法：ヒト肝内胆管癌細胞株（CC-LP-1）とその GEM 耐性誘導細胞株（CC-LP-1-GR）、ヒト肝内胆管癌細胞株（HuCCA-1 と HuCCT1）を用いた。GEM 耐性は GEM 存在下での細胞生存率を、MTS アッセイを用いて解析した。エクソソームは超遠心法で分離し、ELISA 法を用いて定量した。包括的な遺伝子発現を、RNA シーケンスを用いて解析した。microRNA (miRNA) mimic RNA をリポフェクションした細胞株を用いて miRNA の影響について解析した。

結果：GEM 耐性株 CC-LP-1-GR 由来の培養上清を添加することで、親株 CC-LP-1 の GEM 耐性が亢進した。GEM 存在下において、CC-LP-1-GR と CC-LP-1-GR 由来のエクソソームを添加した CC-LP-1 では、CC-LP-1 と比較し、P53 経路の遺伝子セットの発現が負にエンリッチした。CC-LP-1 と CC-LP-1-GR のエクソソーム内の miRNA 発現を比較したところ、CC-LP-1-GR 由来のエクソソーム内の miR141-3p は CC-LP-1 に比べて高発現していた。GEM 存在下において CC-LP-1 に miR141-3p の mimic RNA をトランスフェクションすると CC-LP-1 の GEM 耐性が亢進した。

結論：ヒト胆道癌細胞株 CC-LP-1 由来の GEM 耐性株 CC-LP-1-GR はエクソソーム内の miR-141-3p によって GEM 耐性を獲得している可能性が示された。

## 2. 背景

胆道癌（Biliary tract cancer; BTC）は胆道上皮に発生する原発性悪性腫瘍であり、その発生率は世界的に増加している（1）。外科的切除は BTC に対する唯一の根治的治療法であるが（2）、多くの患者は診断時に局所進行および/または転移を認めるために切除不能である（3）。5年生存率は R0 切除が可能であっても 30-50%に過ぎず（4, 5）、ほとんどの患者は外科的切除後に再発を認める（1）。

切除不能または再発 BTC の治療には、ゲムシタビン（GEM）を基本とした化学療法がしばしば行われている。近年、術前化学療法の有効性も報告されている（6, 7）。標準的な化学療法は GEM とシスプラチンの併用である。しかしながら、抗腫瘍効果は不十分であり、生存期間中央値はわずか 11.6 ヶ月である（8-10）。これらは BTC が GEM に対して本質的に化学療法抵抗性であることを示唆している。しかしながら、GEM を基本とした化学療法の効果が不十分であることの根底にある機序は依然として不明である。GEM を基本とした治療を行った BTC が進行した後の二次治療が検討されているが、未だに確立されてはいない（11, 12）。したがって、GEM 耐性のメカニズムを解明することは、BTC 患者の予後改善に役立つ可能性

がある。

エクソソームは、がん細胞を含む様々な細胞から分泌されるナノサイズの膜結合小胞であり、細胞間コミュニケーションを媒介する機能を有する (13, 14)。近年、がんにおけるエクソソームの様々な機能が注目され、研究が進められている。エクソソームは、腫瘍進行、転移、免疫異常に加えて、化学療法抵抗性の制御に重要な役割を果たしていると考えられている (15-18)。我々は以前、エクソソームとエクソソーム放出を担う Rab 遺伝子が、がん幹様細胞における抗癌剤治療抵抗性のメカニズムに関与していることを明らかにした (19)。

エクソソームは、mRNA、DNA、タンパク質、マイクロ RNA (miRNA) などの様々な種類の機能的因子を含んでおり、それらが受容細胞に移行し機能する (20-22)。これまでに非コード型低分子 RNA である miRNA が、化学療法抵抗性の制御に重要な役割を果たしていることが報告されている (23, 24)。GEM 耐性に関しては、エクソソームと GEM 耐性に関与するエクソソーム中の miRNA の関与が膵癌においても報告されている (25)。しかしながら、エクソソームと miRNA が BTC の GEM 抵抗性に寄与するメカニズムは、いまだ解明されていない。

本研究では、GEM 感受性胆道癌細胞株 CC-LP-1 および CC-LP-1 株に GEM を継続的投与することで樹立された GEM 耐性株 CC-LP-1-GR (26) を用いて、胆道癌における GEM 耐性とエクソソームの関連を検討した。さらに、これらの細胞株から抽出したエクソソームの miRNA を解析し、GEM 耐性の原因となる miRNA を同定し、GEM 耐性への形質転換における miRNA の役割を検討した。

### 3. 方法

#### 【細胞株】

ヒト肝内胆管癌細胞株 CC-LP-1 (27); (Gregory J. Gores (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) のご厚意により提供して頂いた) およびその GEM 耐性細胞株、CC-LP-1-GR (26); (S. Nakashima により樹立) を使用した。BTC 細胞株 HuCCA-1 (JCRB1657) および HuCCT1 (JCRB0425) を JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) から購入し、使用した。細胞は 10% 熱不活化ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan)、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、1.5 g/l 炭酸水素ナトリウムを含んだ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; 日水製薬, Tokyo, Japan) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤環境下で培養した。CC-LP-1 のショート・タンデム・リピート・プロファイルは、Cellosaurus データベースにおける CC-LP-1 (CVCL\_0205; 評価値=0.98) と同一であることを示した。

#### 【細胞生存率試験】

細胞生存率の評価に、テトラゾリウム化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] を含む CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Tokyo, Japan)

を使用した。0-800nM 濃度の GEM (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を含んだ培地で 72 時間培養した。MTS を加えた後、EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて 492nm および 650nm で吸光度を測定した。細胞培養上清や抽出されたエクソソームの影響を調べるために、細胞を播種する際に、DMEM の代わりにコンディション培地もしくは通常培地に抽出したエクソソームを加えたものを使用した。抗癌剤存在下での細胞生存率は、抗がん剤非存在下での細胞生存率との比で表した。それぞれの条件下で 3 回解析を行った。

#### 【エクソソーム抽出】

GEM を含まない培地で細胞を培養した。70-80%コンフルエントに達した後、GEM を含まない無血清培地に交換した。交換から 24 時間培養後の細胞培養上清を回収し、500×g で 3 分間遠心し細胞除去を行い、上清を 10,000×g で 20 分間遠心した。上清を回収し、Ultracentrifuge Hitachi Himac CP-80α (Hitachi Koki, Tokyo, Japan) を用いて 100,000×g で 70 分間の超遠心を行い、エクソソームを回収し、PBS で再懸濁した。

#### 【エクソソーム定量】

細胞を 24 時間培養後、培地交換を行った。同時に MTS アッセイを用いて細胞生存率を測定し、エクソソーム定量の標準化に用いた。エクソソームの定量は CD9/CD63 Exosome ELISA Kit, Human (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を使用した。吸光度測定には EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用した。

#### 【RNA シーケンス】

細胞からの RNA および miRNA の抽出は miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を使用した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina, Tokyo, Japan) を用いてライブラリー調整を行った。NextSeq 500 (Illumina) を用いてペアエンドにてシーケンスを実施した。

クオリティチェックの後、STAR (version 2.5.1b) (28) にてショートリードをリファレンスゲノム (hg38) にマッピングした。鎖特異的なリードのカウントは RSEM (version 1.3.3.) (29) を用いて取得し、TCC package (31, 32) を用いて Trimmed mean of M-values 法で正規化した。Differentially expressed genes (DEGs) は edgeR (version 3.28.1) (33, 34) で解析した。Gene set enrichment 解析は GSEA2 (version 2.2.1) と Molecular Signatures Database v7.4. (35) を使用して行った。

miRNA シーケンスに供するエクソソーム miRNA の抽出は miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用した。ライブラリー調製とシーケンスは、それぞれ NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs Japan, Tokyo, Japan) と NovaSeq 6000 sequencing platform (Illumina) を用いて、Rhelixa 社 (Tokyo, Japan) が解析を

行った。ショートリードをリファレンスゲノム (hg38) にマッピングし、カウントは miRge3.0 (36) を使用した。mRNA と miRNA の RNA シーケンスの統合解析は、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェア (Qiagen) と GSEA を使用した。

#### 【RNA トランスフェクション】

トランスフェクション複合体は、mirVana miRNA Mimic for has-miR-141-3p (MC10860; Thermo Fisher Scientific)、mirVana miRNA Mimic Negative Control (4464058; Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fisher Scientific) を無血清 Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific) 中で混合して調製した。10%FBS を含む DMEM に懸濁した等容量の細胞を加えた (最終濃度:30 nM miRNA mimic、0.1% Lipofectamine RNAiMAX reagent、5% FBS)。

#### 【逆転写定量 PCR 解析】

mRNA と miRNA の発現は、RT-qPCR を用いて測定した (37)。細胞からの全 RNA 抽出は miRNeasy (Qiagen) を使用した。定量 PCR 解析には、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて total RNA を cDNA に逆転写を行い、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) とプライマーセット (CCND2-S 5' -CTCTGTGTGCCACCGACTTT-3' , CCND2-AS 5' -CCTCAATCTGCTCCTGGCAA-3' , GAPDH-S 5' -CTCCTGTTCGACAGTCAGCC-3' , GAPDH-AS 5' -CCCAATACGACCAAATCCGTTG-3' ) を使用し、LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics) を用いて行った。miRNA の定量には、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) と TaqMan MicroRNA Assays (miR-141-3p;000463、RNU48;001006 ; Thermo Fisher Scientific) を使用した。増幅は 3 段階 (95°C で 10 秒間の変性、60°C で 10 秒間のアニーリング、72°C で 10 秒間の伸長) で行い、mRNA 量は  $\Delta\Delta C_q$  法 (38) を用いて定量的に測定した。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) または small nucleolar RNA, C/D box 48 (RNU48) をそれぞれ mRNA または miRNA の内在性コントロールとして使用した。それぞれの条件下で 3 回解析を行った。

#### 【統計解析】

各実験はそれぞれ最低 3 回施行した。数値は平均値±標準偏差で表記した。検定は R version 3.6.3 ソフトウェア (the R project website) にて Turkey-Kramer の多重検定および Welch の *t* 検定を行った。*P* 値 < 0.05 を統計学的有意とした。

## 4. 結果

### 【GEM 存在下での細胞生存率に対する培養上清の影響】

CC-LP-1 と CC-LP-1-GR 細胞の GEM に対する感受性を調べるために、異なる濃度の GEM (0-800nM) に暴露した後の各細胞株の生存率を、MTS アッセイを用いて測定した。CC-LP-1-GR 細胞は、0 nM を除くすべての濃度の GEM において、CC-LP-1 細胞よりも有意に高い生存率を示した ( $P < 0.05$ ; 図 1)。親株の CC-LP-1 細胞は、200 nM の GEM 存在下で約 50% の生存率を示した。したがって、以降の解析では、200 nM の GEM 存在下での細胞生存率に基づいて GEM 耐性を評価した。

細胞からの分泌物の GEM 耐性に対する影響を調べるために、コンディション培地 (CM) を調製し、GEM 感受性 CC-LP-1 細胞に CM を添加した後の GEM 耐性を解析した。CC-LP-1-GR 細胞由来の CM (rCM) で処理した CC-LP-1 は、CC-LP-1 細胞由来の CM (sCM) で処理した CC-LP-1 および未処理の CC-LP-1 と比較して、50 nM の GEM 存在下で生存率の増加を認めたが ( $P < 0.05$ ; 図 2A)、200 nM の GEM 存在下では生存率の増加は認めなかった。さらに、rCM は、別のヒト BTC 細胞株 HuCCT1 の GEM 存在下での生存率を著しく増加させた ( $P < 0.05$ ; 図 2B)。

### 【GEM 存在下での細胞生存率に対するエクソソームの影響】

CC-LP-1-GR から分泌されたエクソソームの GEM 耐性への影響を検証するために、sCM と rCM からエクソソームを抽出し、それぞれを sExo と rExo とした。sExo と rExo に含まれるエクソソーム量に有意な差は認められなかった ( $43.57 \pm 7.12$  pg/ml vs.  $35.58 \pm 4.91$  pg/ml)。CC-LP-1 細胞への rExo の添加は、GEM 存在下で用量依存的に細胞生存率を増加させた (図 3A)。さらに、HuCCA-1 および HuCCT1 細胞のどちらにおいても、GEM 存在下での rExo 添加後に生存率の有意な増加を示した ( $P < 0.05$ ; 図 3B)。

### 【GEM 耐性細胞における遺伝子発現プロファイルの変動】

RNA シーケンスから得られたリードカウントから極端に低い値を除いて行った GSEA 解析では、200 nM の GEM 存在下で CC-LP-1 細胞に比べて、CC-LP-1-GR 細胞では p53 経路のシグナルが有意にネガティブエンリッチであった ( $q < 0.01$ ; 図 4A)。同様に、200 nM GEM 存在下では、rExo を添加した CC-LP-1 細胞では、rExo を添加しない CC-LP-1 細胞と比較して、p53 経路のシグナルが有意にネガティブエンリッチであった ( $q < 0.01$ ; 図 4B)。対照的に、p53 経路は、GEM 非存在下での CC-LP-1 細胞と比較して、200 nM GEM 存在下の CC-LP-1 細胞で有意に亢進していた ( $q < 0.01$ ; 図 4C)。

### 【GEM 耐性と相関するエクソソーム miRNA のスクリーニング。】

GEM 耐性に関連する miRNA を同定するために、CC-LP-1 と CC-LP-1-GR のエクソソーム miRNA を抽出し、miRNA シーケンスを行った。RPM が 500 以上であり、CC-LP-1 に比べて CC-LP-1-GR で 2 倍以上高発現している 19 のエクソソーム miRNA を同定した。IPA ソフトウ

エアを用いて、CC-LP-1-GR 細胞で発現が上昇した miRNA のうち、標的 mRNA の発現と逆相関する miRNA を抽出した。miRNA 標的 mRNA は、GEM 存在下で CC-LP-1-GR 細胞における発現が CC-LP-1 細胞と比較して 2 倍以上 ( $q < 0.05$ ) 低値である mRNA を対象とした。さらに、GEM 存在下で、rExo を添加した CC-LP-1 細胞における発現が rExo を添加していない CC-LP-1 細胞と比べて 2 倍以上 ( $q < 0.05$ ) 低値である miRNA 標的 mRNA を対象とした。上記の条件を満たす逆相関の標的遺伝子のうち、*CCND2* だけが p53 経路に関与していた。CC-LP-1 に比べて CC-LP-1-GR において最も発現が低下した遺伝子 ( $\log_2\text{Ratio} = -3.81$ ) である *CCND2* を標的とする miRNA のうち、sExos に比べて rExos で最も高発現 ( $\log_2\text{Ratio} = 3.58$ ) していた miR-141-3p に注目した (図 5)。

#### 【GEM 存在下での細胞生存率に対する miR-141-3p の影響】

CC-LP-1-GR 細胞のエクソソームで高発現している miR-141-3p の影響を検証するために、CC-LP-1 細胞を miRNA mimics を用いてトランスフェクションを行った。miR-141-3p mimics をトランスフェクションした細胞は、ネガティブコントロール RNA (NC) をトランスフェクションした細胞と比較して、200 nM GEM 存在下で有意に *CCND2* 発現の減少、細胞生存率の増加を示した ( $P < 0.05$ ; 図 6A, B)。さらに、GEM 非存在下では、miR-141-3p mimics をトランスフェクトした CC-LP-1 細胞から分泌されたエクソソーム量は、NC をトランスフェクションした細胞から分泌された量よりも有意に多かった (図 6c)。

## 5. 考察

GEM 耐性は BTC の予後に影響を及ぼす主要な因子である。これまで、腫瘍における GEM 耐性は、薬物代謝に関与する酵素活性の変化、シグナル伝達経路、癌幹細胞、miRNA の発現、グルコース代謝などに関連していることが報告されている (25, 39-41)。近年、薬剤耐性ががん細胞が、エクソソームを介して薬剤感受性がん細胞に化学療法抵抗性の表現型を伝達することが実証されている (42)。本研究では、GEM 耐性 BTC 細胞株 (CC-LP-1-GR) の CM が、親株の GEM 感受性 CC-LP-1 細胞株の GEM 耐性を亢進することを見いだした (図 2A)。一般に、CM にはサイトカイン、成長因子、細胞外小胞など様々な細胞分泌因子が含まれており、これらはレシピエント細胞に伝達され、細胞動態や微小環境に影響を与える。これらの細胞分泌因子のうち、我々はエクソソームが化学療法抵抗性に関与するという過去の報告に基づいて、エクソソームに着目した (19, 25)。

エクソソームが重要な分子を腫瘍細胞に伝達することにより、化学療法抵抗性を誘導することもいくつかの研究で報告されている (43, 44)。実際に、CC-LP-1-GR の CM から抽出したエクソソームは、GEM 感受性の CC-LP-1、HuCCA-1、HuCCT1 細胞の GEM 耐性を亢進した (図 3A, B)。これらの結果は、BTC における GEM 耐性へのエクソソームの寄与を示唆している。



さらに、エクソソームによる GEM 抵抗性のメカニズムをより明らかにするために、遺伝子発現プロファイルに対するエクソソームの影響も調べた。注目すべきことに、CC-LP-1-GR 細胞の CM から抽出したエクソソームを添加すると、p53 経路はネガティブエンリッチとなり、GEM 存在下の CC-LP-1 細胞と比較して、CC-LP-1-GR 細胞でもネガティブにエンリッチされた (図 4)。p53 経路は DNA 損傷やストレスに応答して細胞増殖とアポトーシスを制御する (45)。この経路が不活性化すると、細胞死やアポトーシスに対する感受性が低下し、化学療法抵抗性の獲得につながる可能性がある。全エクソンシーケンス解析により、CC-LP-1 は *TP53* 突然変異 (p. Arg306\*; NM\_000546.5) を保有していることが示され (data not shown)、p53 経路の下流が GEM 耐性の獲得に重要である可能性が示唆された。

エクソソームは、miRNA、mRNA、あるいはタンパク質を受容細胞に移行させることにより、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。最近の研究では、薬剤耐性腫瘍細胞から薬剤感受性腫瘍細胞に移行したエクソソーム miRNA が化学療法抵抗性に関与していることが報告されている (46, 47)。例えば、miR-155-5p は乳癌や膵癌において化学療法抵抗性の表現型の伝達を媒介することが報告されている (25, 48, 49)。上記の miR-155-5p と一致して、CC-LP-1-GR のエクソソームでは CC-LP-1 のエクソソームと比較してエクソソーム miR-155-5p 発現が高値であったが、RPM は 500 以下であった (data not shown)。一方で、miR-451a と miR-206 は胆嚢癌と胆管癌の GEM 耐性表現型を減少させるエクソソーム miRNA として同定された (50-52)。特定のエクソソーム miRNA を同定することで、BTC の GEM 耐性におけるエクソソームの機能とメカニズムがより明らかになる可能性がある。そこで、我々は miRNA シークエンスを行い、CC-LP-1 と CC-LP-1-GR のエクソソーム miRNA を調べた。細胞内 mRNA とエクソソーム miRNA 発現の統合解析により、GEM 耐性に関連するエクソソーム miRNA の候補が 5 つ同定された。この 5 つの miRNA のうち、発現が p53 経路に属しており、GEM 耐性細胞でネガティブエンリッチされている *CCND2* の発現と逆相関している miR-141-3p に着目した。

miR-141-3p は、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429 を含む miR-200 ファミリーの一つである (53)。miR-141-3p は、がんの発生、進展、薬剤耐性において重要な役割を果たしている (54, 55)。miR-141 の発現はがん種により異なり、miR-141 はがんを活性化あるいは抑制する作用を持つことを示している。大腸癌では、miR-141-3p が EGFR を標的とすることでセツキシマブ感受性を亢進し (56)、TP53 を直接標的とすることでテモゾロミド耐性を亢進することが報告されている (57)。BTC に関しては、最近、胆汁および血清由来のエクソソーム miR-141-3p が胆管癌の診断バイオマーカーとなる可能性が報告されている (58)。胆管癌細胞株では、非悪性の胆管細胞由来の細胞株と比較して miR-141 が過剰発現していた (59)。興味深いことに、非悪性の細胞株では、miR-141 前駆体をトランスフェクションすることで、GEM 耐性が誘導された (59)。本研究では、miR-141-3p は CC-LP-1 細胞と比較し CC-LP-1-GR 細胞のエクソソームにおいて豊富であった (図 5A)。さらに、miR-141-3p mimic は CC-LP-1 細胞の GEM 耐性とエクソソーム分泌を亢進した (図 6)。

GEM 存在下での細胞の RNA シークエンスデータにおいて、CC-LP-1-GR 細胞と rExo を添加した CC-LP-1 細胞では、いずれも CC-LP-1 細胞に比べて CCND2 と SG1 の発現が有意に低下していた (図 5B)。miR141 の標的として予測される GSG1 は、rExo で処理した CC-LP-1-GR 細胞と CC-LP-1 細胞で発現が低値であり、p53 経路との関連は報告されてはいないが、germ cell associated1 をコードする GSG1 は膵臓癌の転移と関連している (60)。我々は、CCND2 が p53 経路に関与していることから、サイクリン D2 をコードする *CCND2* に注目した。サイクリン D2 はサイクリン D 型ファミリータンパク質で、G1/S 期転換の細胞周期制御に必須である (61)。*CCND2* の発現上昇により、G1/S 細胞周期停止を克服することで化学療法抵抗性が生じることがいくつかの研究で報告されている (62)。がん幹細胞は休眠することで化学療法抵抗性を獲得することが知られている (63)。ヒト肝癌細胞株由来のがん幹様細胞では、複数の抗癌剤に対して抵抗性を示し、G0/G1 期で細胞周期停止を起こすことが以前に我々は報告した (64)。がん幹細胞様細胞では、*RAB3B* をノックダウンすることで、エクソソームの分泌と化学療法抵抗性のいずれも低下し、さらに細胞周期が G1/S 期ではなく G2/M 期に停止する (19)。さらに、プロモーター領域のメチル化による *CCND2* の発現低下は、乳癌や肺癌の予後不良と関連しており (65, 66)、肺癌細胞株において *CCND2* をノックダウンすることで細胞の増殖と運動性が亢進する (66)。miR-141-3p に加えて、let-7d-5p、miR-191-5p、miR-423-5p、miR-1-3p、miR-10b-5p が rExos において *CCND2* を標的とし、発現が上昇した miRNA であった。let-7d の過剰発現は、*CCND2* の発現を抑制し、G0/G1 期の細胞を増加させ、抗癌剤存在下および血清欠乏条件下で細胞生存率を高める (67)。エクソソーム miR-141-3p と細胞の *CCND2* 発現との逆相関は、p53 経路の抑制と GEM 耐性に関係している可能性がある。

細胞内 miRNA として、miR-29b、miR-205、miR-221、miR-130a-3p、miR-210 が胆管癌細胞の GEM 耐性に関与することが報告されている (68-70)。miR-29b、miR-205、miR-221 は GEM 耐性細胞において発現が低下しており、miR-29b、miR-205、miR-221 mimic をトランスフェクションすると GEM 耐性が低下し、下流の標的遺伝子として PIK3R1 と MMP2 が提唱された (68)。miR-130a-3p は CC-LP-1-GR 細胞で発現が上昇しており、miR-130-3p mimic のトランスフェクションは PPARG の発現を制御することにより GEM 耐性を亢進させた (69)。miR-210 は HIF-1 $\alpha$  の安定化に寄与することで GEM 耐性を亢進することが報告されている (70)。上記の細胞内における GEM 耐性を亢進させる miRNA と一致して、エクソソームの miR-130-3p と miR-210-3p の発現は、CC-LP-1-GR 由来のエクソソームでは CC-LP-1 細胞由来のエクソソームと比較して高値であったが、RPM は 500 以下であった (data not shown)。

我々の知る限り、本研究は初めて、エクソソーム miR-141-3p が BTC における GEM 耐性メカニズムに関与している可能性を示唆した。しかしながら、miR-141-3p、*CCND2*、エクソソーム分泌、および p53 経路間の詳細な分子間相互作用の解明には至っていない。さらに、本研究は CM 内容物のうちエクソソームに焦点を当てたが、サイトカインやタンパク質など、他の CM 構成の可能性についてはまだ検討の余地がある。*in vivo* や臨床サンプルを用いた

更なる研究が必要である。

結論として、本研究は、CC-LP-1-GR 由来のエクソソームは GEM 抵抗性を引き起こし、エクソソーム miR141-3p が豊富であることを示した。エクソソーム miR141-3p は、*CCND2* の抑制を介して p53 経路を抑制することにより、GEM 耐性を誘導する可能性がある。これは、BTC における GEM 抵抗性の重要な新たなメカニズムの可能性がある。

## 6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂いた永野浩昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました恒富亮一先生に心より拝謝申し上げます。

## 7. 参考文献

- 1 Zhu AX, Hezel AF: Development of molecularly targeted therapies in biliary tract cancers: Reassessing the challenges and opportunities. *Hepatology* 53(2): 695-704, 2011. DOI: 10.1002/hep.24145
- 2 Matsuyama R, Yabusita Y, Homma Y, Kumamoto T, Endo I: Essential updates 2019/2020: Surgical treatment of gallbladder cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 5(2): 152-161, 2021. DOI: 10.1002/ags3.12434
- 3 Nakamura I, Hatano E, Baba H, Kamei K, Wada H, Shimizu J, Kanai M, Yoshimura K, Nagano H, Ioka T: Impact of conversion surgery after chemotherapy in patients with initially unresectable and recurrent biliary tract cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 7(6): 1009-1020, 2023. DOI: 10.1002/ags3.12713
- 4 Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M: Treatment of borderline cases for curative resection of biliary tract cancer. *J Surg Oncol* 104(5): 499-503, 2011. DOI: 10.1002/jso.21971
- 5 Miyakawa S, Ishihara S, Horiguchi A, Takada T, Miyazaki M, Nagakawa T: Biliary tract cancer treatment: 5,584 results from the biliary tract cancer statistics registry from 1998 to 2004 in japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16(1): 1-7, 2009. DOI: 10.1007/s00534-008-0015-0
- 6 Ioka T, Kanai M, Kobayashi S, Sakai D, Eguchi H, Baba H, Seo S, Taketomi A, Takayama T, Yamaue H, Takahashi M, Sho M, Kamei K, Fujimoto J, Toyoda M, Shimizu J, Goto T, Shindo Y, Yoshimura K, Hatano E, Nagano H, (KHBO) KHOG: Randomized phase III study of gemcitabine, cisplatin plus s-1 versus gemcitabine, cisplatin for advanced biliary tract cancer (khbo1401- mitsuba). *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 30(1): 102-110, 2023. DOI: 10.1002/jhbp.1219

- 7 Ioka T, Shindo Y, Ueno M, Nagano H: Current progress in perioperative chemotherapy for biliary tract cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 7(4): 565-571, 2023. DOI: 10.1002/ags3.12691
- 8 Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, Mizuno N, Ohkawa S, Funakoshi A, Nagino M, Kondo S, Nagaoka S, Funai J, Koshiji M, Nambu Y, Furuse J, Miyazaki M, Nimura Y: Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: A comparative multicentre study in japan. *Br J Cancer* 103(4): 469-474, 2010. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605779
- 9 Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Beare S, Mizuno N, Wasan H, Bridgewater J, Okusaka T: Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: A meta-analysis of two randomised trials. *Ann Oncol* 25(2): 391-398, 2014. DOI: 10.1093/annonc/mdt540
- 10 Valle JW, Wasan H, Johnson P, Jones E, Dixon L, Swindell R, Baka S, Maraveyas A, Corrie P, Falk S, Gollins S, Lofts F, Evans L, Meyer T, Anthony A, Iveson T, Highley M, Osborne R, Bridgewater J: Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: A multicentre randomised phase II study - the uk abc-01 study. *Br J Cancer* 101(4): 621-627, 2009. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605211
- 11 Okano N, Kasuga A, Kawai K, Kobayashi T, Naruge D, Nagashima F, Furuse J: Axitinib for gemcitabine-refractory advanced biliary tract cancer: Report of 5 cases. *Anticancer Res* 37(7): 3711-3715, 2017. DOI: 10.21873/anticancerres.14282
- 12 Rizzo A, Ricci AD, Tober N, Nigro MC, Mosca M, Palloni A, Abbati F, Frega G, DE Lorenzo S, Tavolari S, Brandi G: Second-line treatment in advanced biliary tract cancer: Today and tomorrow. *Anticancer Res* 40(6): 3013-3030, 2020. DOI: 10.21873/anticancerres.11743
- 13 Colombo M, Raposo G, Théry C: Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 255-289, 2014. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- 14 Tkach M, Théry C: Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell* 164(6): 1226-1232, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043
- 15 Hood JL, San RS, Wickline SA: Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 71(11): 3792-3801, 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
- 16 Mao L, Li J, Chen WX, Cai YQ, Yu DD, Zhong SL, Zhao JH, Zhou JW, Tang JH: Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering micrnas. *Tumour Biol* 37(4): 5247-5256, 2016. DOI: 10.1007/s13277-015-4402-2
- 17 Martins VR, Dias MS, Hainaut P: Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of

- molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol* 25(1): 66-75, 2013. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b7c81
- 18 Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP: Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through pi3k/akt and mapk/erk activation. *Dig Liver Dis* 41(12): 875-880, 2009. DOI: 10.1016/j.dld.2009.04.006
- 19 Tsunedomi R, Yoshimura K, Kimura Y, Nishiyama M, Fujiwara N, Matsukuma S, Kanekiyo S, Matsui H, Shindo Y, Watanabe Y, Tokumitsu Y, Yoshida S, Iida M, Suzuki N, Takeda S, Ioka T, Hazama S, Nagano H: Elevated expression of rab3b plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells. *BMC Cancer* 22(1): 260, 2022. DOI: 10.1186/s12885-022-09370-1
- 20 Eichelmann AK, Matuszcak C, Hummel R, Haier J: Role of mirnas in cell signaling of cancer associated fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 101: 94-102, 2018. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.05.015
- 21 Fang T, Lv H, Lv G, Li T, Wang C, Han Q, Yu L, Su B, Guo L, Huang S, Cao D, Tang L, Tang S, Wu M, Yang W, Wang H: Tumor-derived exosomal mir-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat Commun* 9(1): 191, 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02583-0
- 22 Lai X, Wang M, McElyea SD, Sherman S, House M, Korc M: A microrna signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett* 393: 86-93, 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.02.019
- 23 Azmi AS, Bao B, Sarkar FH: Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32(3-4): 623-642, 2013. DOI: 10.1007/s10555-013-9441-9
- 24 Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Sarkar FH: Pancreatic cancer: Understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8(1): 27-33, 2011. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.188
- 25 Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Mori M, Doki Y: Microrna-155 controls exosome synthesis and promotes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 7: 42339, 2017. DOI: 10.1038/srep42339
- 26 Nakashima S, Kobayashi S, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M: Braa/fanconi anemia pathway implicates chemoresistance to gemcitabine in biliary tract cancer. *Cancer Sci* 106(5): 584-591, 2015. DOI: 10.1111/cas.12652
- 27 Shimizu Y, Demetris AJ, Gollin SM, Storto PD, Bedford HM, Altarac S, Iwatsuki

S, Herberman RB, Whiteside TL: Two new human cholangiocarcinoma cell lines and their cytogenetics and responses to growth factors, hormones, cytokines or immunologic effector cells. *Int J Cancer* 52(2): 252-260, 1992. DOI: 10.1002/ijc.2910520217

28 Wang T, Liu J, Shen L, Tonti-Filippini J, Zhu Y, Jia H, Lister R, Whitaker JW, Ecker JR, Millar AH, Ren B, Wang W: Star: An integrated solution to management and visualization of sequencing data. *Bioinformatics* 29(24): 3204-3210, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt558

29 Li B and Dewey CN: Rsem: Accurate transcript quantification from rna-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12: 323, 2011. DOI: 10.1186/1471-2105-12-323

30 Robinson MD and Oshlack A: A scaling normalization method for differential expression analysis of rna-seq data. *Genome Biol* 11(3): R25, 2010. DOI: 10.1186/gb-2010-11-3-r25

31 Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K: Tcc: An r package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* 14: 219, 2013. DOI: 10.1186/1471-2105-14-219

32 Tang M, Sun J, Shimizu K, Kadota K: Evaluation of methods for differential expression analysis on multi-group rna-seq count data. *BMC Bioinformatics* 16: 361, 2015. DOI: 10.1186/s12859-015-0794-7

33 Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK: Edger: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1): 139-140, 2010. DOI: 10.1186/s12864-022-08869-y

34 McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK: Differential expression analysis of multifactor rna-seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 40(10): 4288-4297, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks042

35 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15545-15550, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0506580102

36 Patil AH and Halushka MK: Mirge3.0: A comprehensive microrna and trf sequencing analysis pipeline. *NAR Genom Bioinform* 3(3): lqab068, 2021. DOI: 10.1093/nargab/lqab068

37 Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Somura H, Yamada M, Oka M: Decreased id2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 14(4):

- 1025-1031, 2008. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1116
- 38 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 25(4): 402-408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 39 Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ: Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* 5(1): 19-33, 2002. DOI: 10.1016/s1368-7646(02)00002-x
- 40 Iwagami Y, Eguchi H, Nagano H, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Tomokuni A, Tomimaru Y, Mori M, Doki Y: Mir-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via smarcc1. *Br J Cancer* 109(2): 502-511, 2013. DOI: 10.1038/bjc.2013.320
- 41 Yamada D, Kobayashi S, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Ishii H, Nagano H, Doki Y, Mori M: Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer. *Eur J Cancer* 49(7): 1725-1740, 2013. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.002
- 42 Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Nishida N, Koseki J, Nishimura T, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H: MicroRNA-1246 expression associated with ccng2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 111(8): 1572-1580, 2014. DOI: 10.1038/bjc.2014.454
- 43 Soldevilla B, Rodríguez M, San Millán C, García V, Fernández-Periañez R, Gil-Calderón B, Martín P, García-Grande A, Silva J, Bonilla F, Domínguez G: Tumor-derived exosomes are enriched in  $\delta np73$ , which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet* 23(2): 467-478, 2014. DOI: 10.1093/hmg/ddt437
- 44 Zeng AL, Yan W, Liu YW, Wang Z, Hu Q, Nie E, Zhou X, Li R, Wang XF, Jiang T, You YP: Tumour exosomes from cells harbouring ptpnz1-met fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma. *Oncogene* 36(38): 5369-5381, 2017. DOI: 10.1038/onc.2017.134
- 45 Shen Y and White E: P53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 82(55-84), 2001. DOI: 10.1016/s0065-230x(01)82002-9
- 46 Bach DH, Hong JY, Park HJ, Lee SK: The role of exosomes and mirnas in drug-resistance of cancer cells. *Int J Cancer* 141(2): 220-230, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30669
- 47 Zhao L, Liu W, Xiao J, Cao B: The role of exosomes and "Exosomal shuttle

- microrna" In tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Lett* 356(2 Pt B): 339–346, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.027
- 48 Patel GK, Khan MA, Bhardwaj A, Srivastava SK, Zubair H, Patton MC, Singh S, Khushman M, Singh AP: Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and mir-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, dck. *Br J Cancer* 116(5): 609–619, 2017. DOI: 10.1038/bjc.2017.18
- 49 Santos JC, Lima NDS, Sarian LO, Matheu A, Ribeiro ML, Derchain SFM: Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via mir-155 transfer. *Sci Rep* 8(1): 829, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20785-4
- 50 Ueta E, Tsutsumi K, Kato H, Matsushita H, Shiraha H, Fujii M, Matsumoto K, Horiguchi S, Okada H: Extracellular vesicle-shuttled mirnas as a diagnostic and prognostic biomarker and their potential roles in gallbladder cancer patients. *Sci Rep* 11(1): 12298, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-91804-0
- 51 Obata T, Tsutsumi K, Ueta E, Oda T, Kikuchi T, Ako S, Fujii Y, Yamazaki T, Uchida D, Matsumoto K, Horiguchi S, Kato H, Okada H, Otsuka M: MicroRNA-451a inhibits gemcitabine-refractory biliary tract cancer progression by suppressing the mif-mediated pi3k/akt pathway. *Mol Ther Nucleic Acids* 34: 102054, 2023. DOI: 10.1016/j.omtn.2023.102054
- 52 Yang R, Wang D, Han S, Gu Y, Li Z, Deng L, Yin A, Gao Y, Li X, Yu Y, Wang X: Mir-206 suppresses the deterioration of intrahepatic cholangiocarcinoma and promotes sensitivity to chemotherapy by inhibiting interactions with stromal cdfs. *Int J Biol Sci* 18(1): 43–64, 2022. DOI: 10.7150/ijbs.62602
- 53 Cavallari I, Ciccarese F, Sharova E, Urso L, Raimondi V, Silic-Benussi M, D'Agostino DM, Ciminale V: The mir-200 family of microRNAs: Fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers. *Cancers (Basel)* 13(23): 5874, 2021. DOI: 10.3390/cancers13235874
- 54 Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, Xu X: Mir-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of bmi-1. *Am J Pathol* 181(5): 1823–1835, 2012. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.009
- 55 Senfter D, Holzner S, Kalipcian M, Staribacher A, Walzl A, Huttary N, Krieger S, Brenner S, Jäger W, Krupitza G, Dolznig H, Mader RM: Loss of mir-200 family in 5-fluorouracil resistant colon cancer drives lymphendothelial invasiveness in vitro. *Hum Mol Genet* 24(13): 3689–3698, 2015. DOI: 10.1093/hmg/ddv113
- 56 Xing Y, Jing H, Zhang Y, Suo J, Qian M: MicroRNA-141-3p affected proliferation, chemosensitivity, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting



egfr. *Int J Biochem Cell Biol* 118: 105643, 2020. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.105643

57 Zhou X, Wu W, Zeng A, Nie E, Jin X, Yu T, Zhi T, Jiang K, Wang Y, Zhang J and You Y: MicroRNA-141-3p promotes glioma cell growth and temozolomide resistance by directly targeting p53. *Oncotarget* 8(41): 71080-71094, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.20528

58 Pan Y, Shao S, Sun H, Zhu H and Fang H: Bile-derived exosome noncoding RNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers for cholangiocarcinoma. *Front Oncol* 12: 985089, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.985089

59 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T: Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130(7): 2113-2129, 2006. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.02.057

60 Le Large TYS, Bijlsma MF, Kazemier G, van Laarhoven HWM, Giovannetti E, Jimenez CR: Key biological processes driving metastatic spread of pancreatic cancer as identified by multi-omics studies. *Semin Cancer Biol* 44: 153-169, 2017. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.03.008

61 Ando K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Griffin JD: Regulation of G1/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9571-9575, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.20.9571

62 Hu W, Liu Q, Pan J, Sui Z: Mir-373-3p enhances the chemosensitivity of gemcitabine through cell cycle pathway by targeting CCND2 in pancreatic carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 105: 887-898, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.091

63 Steinbichler TB, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova II: Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Semin Cancer Biol* 53: 156-167, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.11.006

64 Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, Watanabe Y, Hazama S, Oka M: Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer* 14: 722, 2014. DOI: 10.1186/1471-2407-14-722

65 Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J, Sukumar S: Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 61(6): 2782-2787, 2001.

66 Hung CS, Wang SC, Yen YT, Lee TH, Wen WC, Lin RK: Hypermethylation of CCND2 in lung and breast cancer is a potential biomarker and drug target. *Int J Mol Sci* 19(10): 3096, 2018. DOI: 10.3390/ijms19103096

- 67 Di Fiore R, Drago-Ferrante R, Pentimalli F, Di Marzo D, Forte IM, Carlisi D, De Blasio A, Tesoriere G, Giordano A, Vento R: Let-7d mirna shows both antioncogenic and oncogenic functions in osteosarcoma-derived 3ab-os cancer stem cells. *J Cell Physiol* 231(8): 1832-1841, 2016. DOI: 10.1002/jcp.25291
- 68 Okamoto K, Miyoshi K, Murawaki Y: Mir-29b, mir-205 and mir-221 enhance chemosensitivity to gemcitabine in huh28 human cholangiocarcinoma cells. *PLoS One* 8(10): e77623, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077623
- 69 Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Asai A, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Noda T, Wada H, Gotoh K, Nishida N, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H: Micro-rna-130a-3p regulates gemcitabine resistance via pparg in cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 24(8): 2344-2352, 2017. DOI: 10.1245/s10434-017-5871-x
- 70 Silakit R, Kitirat Y, Thongchot S, Loilome W, Techasen A, Ungarreevittaya P, Khuntikeo N, Yongvanit P, Yang JH, Kim NH, Yook JI, Namwat N: Potential role of hif-1-responsive microrna210/hif3 axis on gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma cells. *PLoS One* 13(6): e0199827, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0199827

## 8. 図表

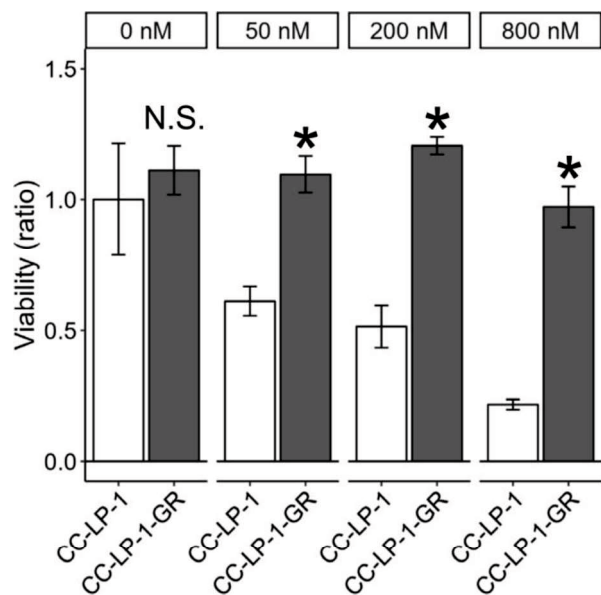


図 1 CC-LP-1 とその誘導体 CC-LP-1-GR 細胞のゲムシタビン耐性

濃度の異なるゲムシタビン (GEM) 存在下で、72 時間後における CC-LP-1 および CC-LP-1-GR 細胞の生存率を、MTS アッセイを用いて評価した。Tukey-Kramer による多重比較検定を行った。\* $P < 0.05$  (各条件は CC-LP-1-GR vs. CC-LP-1)。

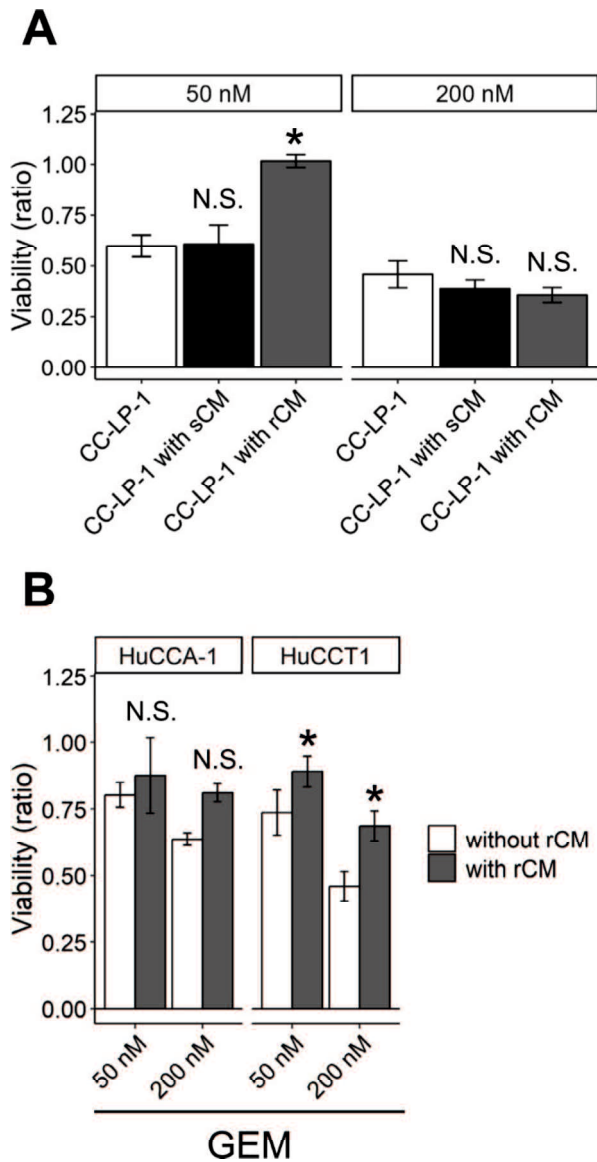


図2 ゲムシタビン (GEM) 存在下での細胞生存率に対する培養上清の影響

CC-LP-1 細胞を、通常培地 (10%FBS 含有 DMEM) の代わりに CC-LP-1 細胞 (sCM) または CC-LP-1-GR 細胞 (rCM) の培養上清と 0-200 nM GEM で 72 時間培養した後、MTS アッセイを用いて細胞生存率を測定した (A)。GEM 存在下での rCM の有無による HuCCA-1 および HuCCT1 細胞の生存率を、MTS アッセイを用いて測定した (B)。Tukey-Kramer による多重比較を行った。\* $P < 0.05$  (各条件は培養上清無の CC-LP-1 との比較)。

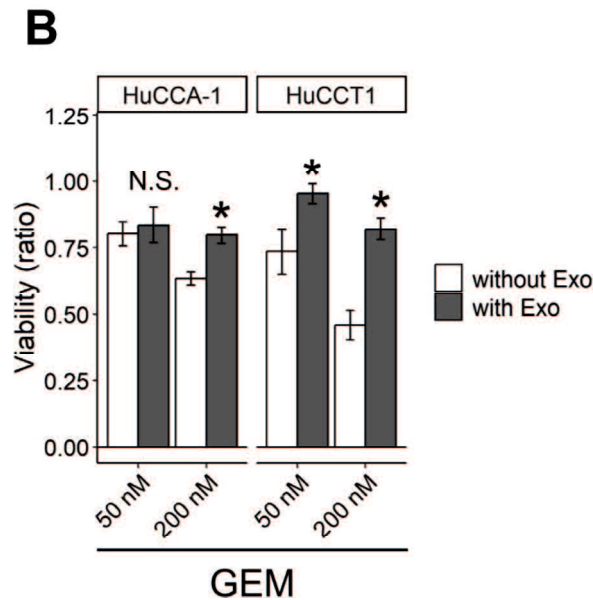
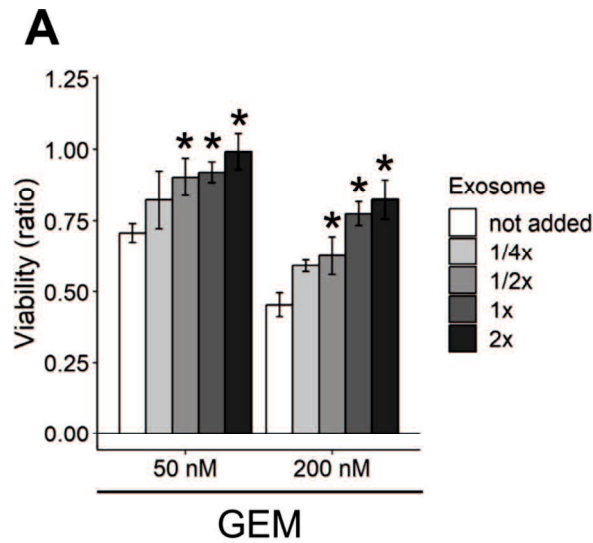


図3 ゲムシタピン (GEM) 存在下での細胞生存率に対するエクソソームの影響

A) GEM 存在下で、rCM から精製した異なる濃度のエクソソーム (1/4×-2× : rCM に含まれるエクソソーム量の 1/4~2 倍相当) を添加した通常培地 (10%FBS 含有 DMEM) で培養した CC-LP-1 細胞の生存率を、MTS アッセイを用いて評価した。B) GEM 存在下で、エクソソーム (×1) を添加または無添加で処理した HuCCA-1 および HuCCT1 細胞の生存率を MTS アッセイを用いて評価した。 Tukey-Kramer 多重比較検定を行った。 \* $P < 0.05$  (各条件はエクソソームなしの CC-LP-1 との比較)。

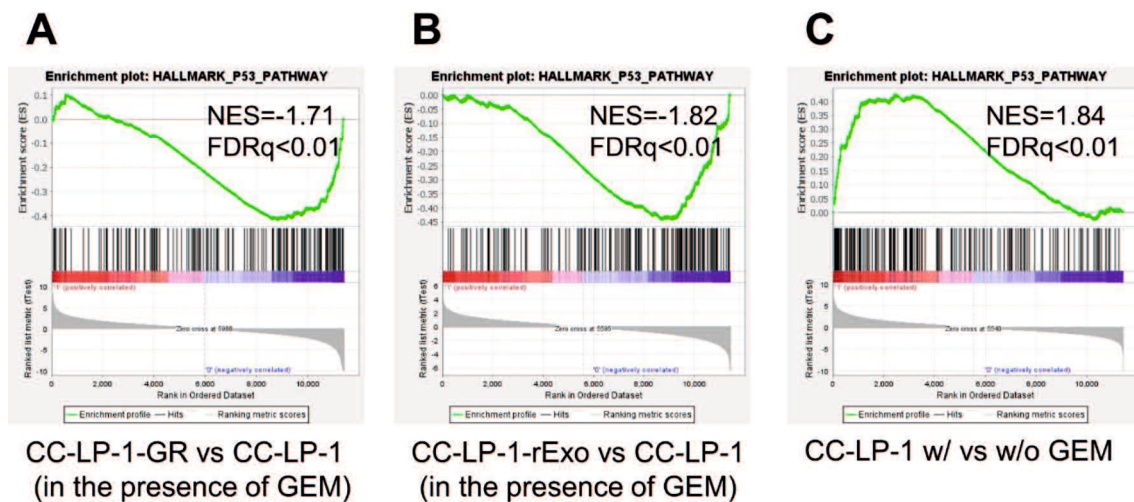


図4 ゲムシタビン (GEM) 耐性細胞における Enrichment 分子シグナル

RNA シーケンスデータを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) で解析した。GSEA データからのエンリッチメントプロットは p53 経路が有意なエンリッチされている。A) CC-LP-1-GR 細胞と GEM 存在下の CC-LP-1 細胞の RNA 発現を比較した。B) rExo を添加した CC-LP-1 細胞における RNA 発現を、rExo を添加していない CC-LP-1 細胞における発現と比較した。C) GEM 存在下の CC-LP-1 細胞における RNA 発現を、GEM 非存在下の CC-LP-1 細胞における発現と比較した。NES : 正規化エンリッチメントスコア, FDR-q : Benjamini-Hochberg 法を用いて調整した P 値, rExo : CC-LP-1-GR の条件培地から精製したエクソソーム, w/ vs. w/o : with vs. without).

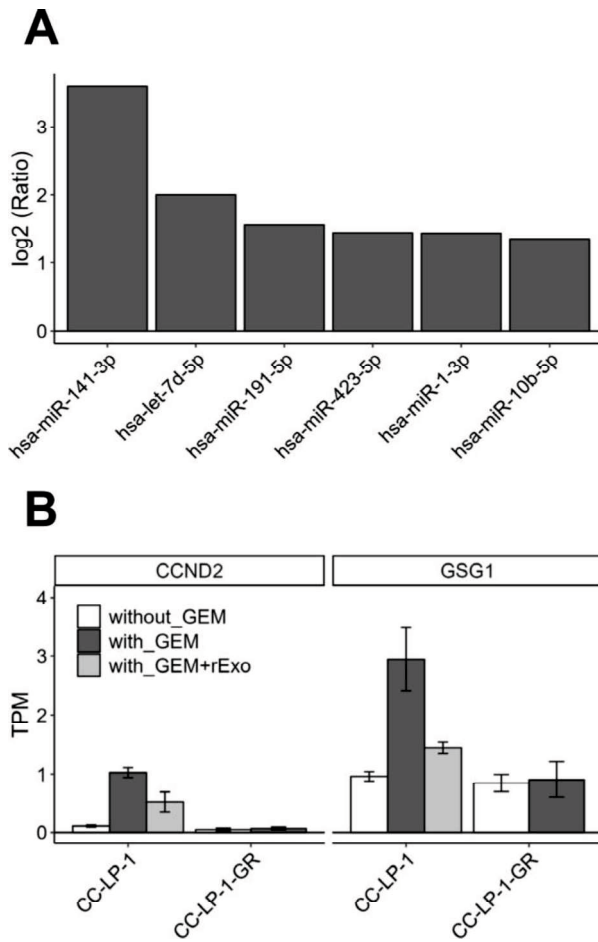
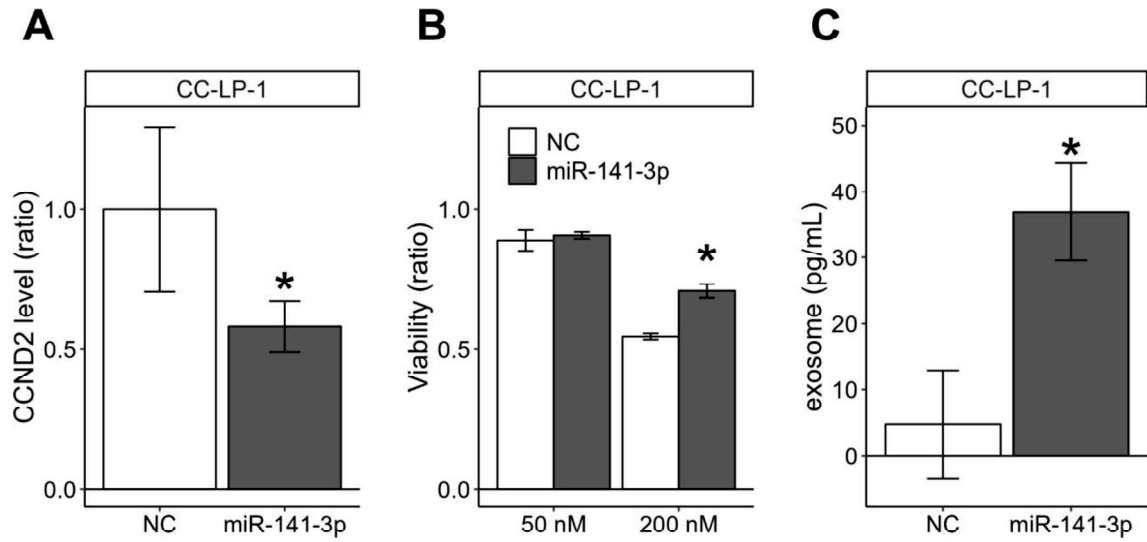


図5 RNA 発現

エクソソーム miRNA と細胞 mRNA の発現は、それぞれ miRNA-sequencing と RNA-sequencing を用いて測定した (A および B)。IPA ソフトウェアを用いて *CCND2* を標的として予測される 6 つの発現量の高いエクソソーム miRNA (A)。IPA ソフトウェアを用いて miR-141-3p の標的として予測される *CCND2* と *GSG1* の発現 (B)。TPM: transcripts per million, GEM: 200 nM ゲムシタビン, rExo: CC-LP-1-GR から精製したエクソソーム。



**図 6** ゲムシタビン (GEM) 存在下での BTC 細胞株の生存率への miR-141-3p mimic の影響。miR-141-3p をトランスフェクションした CC-LP-1 細胞における CCND2 の発現レベル (A)。GEM 存在下での miR141-3p mimic をトランスフェクションした CC-LP-1 の生存率を、MTS アッセイを用いて評価した (B)。値は GEM 非存在下での値との比で示した。CC-LP-1 から放出されたエクソソーム量を定量した (C)。値はネガティブコントロール RNA (白色列) と miR-141-3p mimicRNA (灰色列) でトランスフェクトした細胞間で比較した。\* $P < 0.05$  (Welch の  $t$  検定)。