



Title	胆道癌に対するPARP阻害薬の効果増強因子に関する研究
Author(s)	小田, 総一郎
Description	配架番号 : 2982
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16889号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16889
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99734
Type	doctoral thesis
File Information	ODA_Soichiro.pdf, 全文



学位論文

胆道癌に対する

PARP 阻害薬の効果増強因子に

関する研究

(Study on Factors Enhancing the Therapeutic Effect
of PARP Inhibitors in Biliary Tract Cancer)

2026年3月

北海道大学

小田 総一郎

学位論文

胆道癌に対する

PARP 阻害薬の効果増強因子に

関する研究

(Study on Factors Enhancing the Therapeutic Effect
of PARP Inhibitors in Biliary Tract Cancer)

2026年3月

北海道大学

小田 総一郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
材料と方法	9 頁
結果	17 頁
考察	53 頁
総括及び結論	55 頁
謝辞	56 頁
利益相反	57 頁
引用文献	58 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に掲載。

1. Soichiro Oda, Kazumichi Kawakubo, Masaki Kuwatani, Shugo Tanaka, Katsuma Nakajima, Shoya Shiratori, Hiroki Yonemura, Shunichiro Nozawa, Koji Hirata, Ryo Sugiura, Naoya Sakamoto

DNMT3B Knockdown Enhances PARP Inhibitor Sensitivity in Biliary Tract Cancer Cells via Opioid Growth Factor Receptor-Mediated Homologous Recombination Impairment
Cancers 2025; 17(24):3936-3956.

要旨

【背景と目的】

胆道癌は比較的稀な悪性腫瘍であるが、近年世界的に増加傾向にあり、特に東アジア諸国では顕著である。診断時に外科切除不能な進行例が多く、切除例においても高率に再発することから、薬物療法の重要性が高まっている。しかし、胆道癌に対して有効性が確立された分子標的薬や免疫療法は限られており、治療成績の改善には新たな治療戦略の開発が求められている。近年、複数の癌種で相同組み換え関連遺伝子変異を有する症例に対しての PARP(poly ADP-ribose polymerase)阻害薬の有効性が示され臨床応用されており、胆道癌についても臨床試験が行われている。しかし胆道癌における BRCA1/2、ATM、ARID1A など相同組み換え関連遺伝子変異を有する症例は少なく、PARP 阻害薬の恩恵を受けられる患者は限られている。そのため、遺伝子変異を有さない症例に対しても PARP 阻害薬感受性を誘導しうる治療法の開発が望まれている。

他癌種の基礎研究において、DNA メチル化阻害薬を併用することで、相同組み換え遺伝子変異の無い腫瘍においても PARP 阻害薬の治療効果が増強することが報告され、エピジェネティックな修飾による“BRCAness”誘導の可能性が示唆されている。しかし胆道癌においては基礎研究を含め既報は無く、またその詳細な分子機構については明らかになっていない。

そこで本研究では、*in vitro* の実験手法を用いて DNA メチル化阻害薬および DNMT(DNA methyltransferase)1/3 の阻害が胆道癌細胞株において PARP 阻害薬であるニラパリブ(NIR)の抗腫瘍効果を増強するかを検討した。さらに、網羅的な遺伝子発現解析および DNA メチル化解析により併用効果の分子機構を探索し、新たなバイオマーカー候補を同定することを目的とした。

【材料と方法】

PARP 阻害薬耐性胆道癌細胞株として TFK-1 および RBE を使用し、DNA メチル化阻害薬として 5-アザシチジン(AZA)を使用し、PARP 阻害薬として NIR を使用した。DNMT1/3A/3B それぞれを標的とする siRNA により DNMT 遺伝子のノックダウンを行い、さらに OGFR(Opioid Growth Factor Receptor)の強制発現および shRNA を用いてノックダウンした TFK-1 細胞株の樹立を行った。

上記の各条件や試薬の組み合わせ条件下において、Homologous Recombination Assay Kit を用いた qPCR による相同組み換え頻度測定、Cell Counting Kit-8 を用いた細胞数測定、Cell Cycle Assay Solution を用いた FCM による細胞周期の定量評価、AnnexinV および PI の共染色を用いた FCM によるアポトーシス細胞の定量評価を行った。

TFK-1 に対する AZA 投与条件や DNMT3B のノックダウン条件下に全ゲノム RNA

sequence 解析を行い、遺伝子発現変動解析を行った。また、TFK-1 に対する DNMT3B ノックダウン条件下に Reduced representation bisulfite sequence 解析を行い、変動メチル化領域の抽出を行い、OGFR 発現変動に関わるメチル化の変動を観察した。DNMT のノックダウンと OGFR 発現の関連については、Luciferase assay による OGFR プロモーター活性の変動も観察した。

【結果】

AZA 投与は TFK-1 および RBE 両細胞株において相同組み換え頻度を低下させ、G2/M 期集積を引き起こした。さらに、AZA 併用は NIR に対する感受性を有意に増強し、アポトーシスの増加と IC₅₀ 値の著明な低下をもたらした。DNMT ファミリーの siRNA によるノックダウン実験では、特に DNMT3B 抑制時に AZA 投与と同様の効果が再現され、NIR との併用で増殖抑制とアポトーシス誘導が顕著に増強した。

TFK-1 に対する AZA 投与および DNMT3B ノックダウン条件下に行った全ゲノム RNA sequence 解析の結果、DNMT3B ノックダウンにより共通して上方制御される遺伝子として OGFR が同定された。OGFR 強制発現およびノックダウン条件下に行った実験では、OGFR 高発現は相同組み換えの抑制、アポトーシスの増加と IC₅₀ 低下をもたらした。OGFR ノックダウンでは逆の効果が認められた。DNMT3B ノックダウンによる変化の機序に OGFR 高発現が関与する可能性が示された。

OGFR 高発現の機序を探索すべく行った Bisulfite sequence 解析では OGFR プロモーター領域の有意な脱メチル化は認められず、DNMT3B 依存的な転写制御変化が発現上昇に関与する可能性が示唆された。ルシフェラーゼアッセイでは、DNMT3B ノックダウンにより OGFR プロモーター活性が上昇し、DNMT3B が OGFR 転写を抑制的に制御していることが明らかとなった。

【考察】

本研究では、DNMT 阻害および DNA メチル化阻害が胆道癌細胞における相同組み換えを抑制し、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果を増強することを示した。DNMT ファミリーの中でも DNMT3B が最も強く関与しており、DNMT3B 抑制により OGFR 発現が上昇し、これを介して HR 抑制および細胞周期変化が生じる機構が明らかとなった。

DNMT3B は DNA メチル化酵素としてのみならず、転写因子やコリプレッサーとしてクロマチン構造を制御する機能を有することが知られており、本研究結果もこの転写制御的役割を支持する。OGFR は細胞増殖抑制および細胞周期制御に関与する分子であることが知られるが、本研究では DNMT3B 依存的な転写制御によってその発現が上昇し、結果として PARP 阻害薬感受性が高まるという新たな分子経路を提示した。

【結論】

本研究により、DNMT3B および OGFR を介するエピジェネティックな制御経路が胆道癌の PARP 阻害薬感受性に関与することが明らかとなった。DNA メチル化阻害薬または DNMT3B 阻害は、相同組み換え修復を抑制し、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果を著明に増強する。これらの知見は、相同組み換え関連遺伝子変異を欠く胆道癌に対しても PARP 阻害療法の適応を拡大しうる新たな合成致死的治疗戦略を提示するものであり、さらに OGFR が新規バイオマーカーとして臨床応用可能であることを示唆する。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AZA:	5-Azacytidine
BTC:	Biliary Tract Cancer
CCLE:	Cancer Cell Line Encyclopedia
CCK-8:	Cell Counting Kit-8
cDNA:	complementary DNA
CI:	Confidence Interval
DIO2:	Type II Deiodinase
DMC:	Differentially Methylated Cytosine
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMR:	Differentially Methylated Region
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
DNMT:	DNA Methyltransferase
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
DEG:	Differentially Expressed Gene
edgeR:	Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS:	Fetal Bovine Serum
FC:	Fold Change
FCM:	Flow Cytometry
FDR:	False Discovery Rate
FGFR2:	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
HR:	Homologous Recombination
HRR:	Homologous Recombination Repair
IC ₅₀ :	50% Inhibitory Concentration
KD:	Knockdown
mRNA:	Messenger RNA
NIR:	Niraparib
NTC:	Negative Control
OE:	Overexpression
OGFR:	Opioid Growth Factor Receptor
OLA:	Olaparib
PARP:	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS:	Phosphate-Buffered Saline

PI: Propidium Iodide

PST: Penicillin-Streptomycin

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonucleic Acid

RNA-seq: RNA Sequencing

SD: Standard Deviation

shRNA: Small Hairpin RNA

siRNA: Small Interfering RNA

TAL: Talazoparib

緒言

胆道癌 (biliary tract cancer; BTC) は、肝内および肝外胆管の上皮細胞 (胆管細胞) に由来する比較的稀な悪性腫瘍である。しかし近年、その罹患率は世界的に増加しており、特に東アジア諸国で顕著である。(Florino, 2020.)(Banales, 2020.) 世界では年間約 21 万例(Sun, 2024.)、日本では年間約 2 万 2 千例の新規診断と約 1 万 8 千例の死亡が報告されている。(Kudo, 2022.)

胆道癌の診療上の大きな課題は、診断時に外科切除不能例が多く、予後が極めて不良である点にある。(Elvevi, 2022.) 外科切除を施行しても再発率は高く、特に切除不能例では 5 年生存率は依然として低迷している。(Koay, 2017.)(Renteria, 2024.) そのため、より有効な全身治療の確立が急務である。

近年、切除不能胆道癌に対して FGFR2(Fibroblast Growth Factor Receptor-2)遺伝子融合に対する分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬など新規治療法が臨床応用されてきた。(Vogel, 2024.)(Oh, 2022.) しかし全生存率の改善は依然として限定的であり、多くの患者がこれらの標的変異を欠く、あるいは持続的な治療効果を得られないという現実がある。(Qurashi, 2025.)

一方、PARP(poly ADP-ribose polymerase)阻害薬は相同組み換え修復(HRR; Homologous Recombination Repair)欠損を有する複数の癌種において有効性を示している。(Brown, 2021.)(Shao, 2021.)(Iannantuono, 2023.) 胆道癌においても BRCA1/2、BAP1、ARID1A、ATM など HRR 関連遺伝子の変異が 30~60%に報告されており、そのような胆道癌症例に対する PARP 阻害薬の臨床試験が行われている。(Ricci, 2020.) しかし、病的意義のある BRCA1/2 変異は 1~7%程度と稀であり、PARP 阻害薬の恩恵を受ける患者は限られている。(Lord, 2016.)(Wardell, 2018.) より多くの患者に PARP 阻害薬を応用するために、相同組み換え欠損を誘導あるいは模倣し、合成致死を成立させる戦略が求められている。

前臨床研究では、DNA メチル化阻害薬と PARP 阻害薬の併用により治療効果が増強されることが他腫瘍で示されている。その作用機序として、DNA メチル化阻害が細胞周期停止や DNA 修復経路の障害を誘導し、PARP 阻害薬感受性を高めることが示唆されているが、詳細な分子機構は十分には解明されていない。(Muvarak, 2016.)(Abbotts, 2019)

DNA メチル化阻害薬は薬剤により標的分子が異なるが、DNA メチル化阻害薬の一つである 5-アザシチジンやデシタビンなどは DNA メチル基転移酵素(DNMT)を主な標的とする薬剤である。(Stresemann, 2006.) DNMT は DNA のメチル化の維持を行う DNMT1 ファミリーと(Ishiyama, 2017.)、DNA に新たなメチル化を付与する DNMT3 ファミリーが主に機能を担っており、これらの阻害によって DNA のメチル化の変化を通じて様々な遺伝子の機能・発現の調節が行われる。(Yagi, 2020.)

以上を背景に、本研究では *in vitro* の実験手法を用いて DNMT 阻害薬および DNMT1/3 の阻害が胆道癌細胞株において PARP 阻害薬であるニラパリブの抗腫瘍効果を増強するかを検討した。さらに網羅的な遺伝子発現解析を行うことで併用効果の分子機構の解明を試み、新たなバイオマーカー候補の探索を行った。

材料と方法

細胞株

ヒト由来胆道癌細胞株である TFK-1(肝外胆管癌)、HuCCCT-1(肝内胆管癌)、YSCC(肝内胆管癌)、RBE(肝内胆管癌)を使用し、理化学研究所バイオリソースセンター（京都、日本）より購入した。KMCH-1(肝内胆管癌)は、北海道大学医学医学研究院消化器内科学分野の平田甫氏より提供を受けた。

すべての細胞株は高グルコース濃度の Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM ; Gibco, Life Technologies, Cergy Pontoise, France)に、10%胎牛血清(FBS)および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン(PST; Penicillin-Streptomycin)を添加した培地を用い、標準条件(37 °C、5% CO₂)下で培養した。

試薬

5-アザシチジン(AZA, HY-10586)は MedChemExpress(Monmouth Junction, NJ, USA)から、ニラパリブ (NIR; MK-4827)、オラパリブ(OLA; AZD2281)、タラゾパリブ(TAL; BMN673)は Selleckchem(Houston, TX, USA)から購入した。ストック溶液(10⁻²M)は滅菌 Dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解して調製し、分注後に-20°Cで保存し、使用直前に培地で新たに希釈した。 DNA methyltransferase (DNMT) 遺伝子を標的とする small interfering RNA (siRNA) は Qiagen (Courtaboeuf, France) より購入し、使用まで-20°Cで保存した。使用した siRNA は以下の通りである：

siDNMT3B-3(Cat. No. SI04346668)、siDNMT3B-10(Cat. No. SI04292673)、siDNMT3A-11(Cat. No. SI04197437)、siDNMT3A-15(Cat. No. SI04194654)、siDNMT1-1(Cat. No. SI02654418)、siDNMT1-6(Cat. No. SI02654425)。コントロールには siNTC(Qiagen Cat. No. 1027280)を用いた。

オピオイド成長因子受容体(OGFR ; Opioid Growth Factor Receptor)を標的とする short hairpin RNA(shRNA)は、SIGMA-Aldrich(Mission shRNA, St. Louis, MO, USA)より入手し、-80°Cで保存した。使用したクローンは shOGFR#1(Clone ID: TRCN0000415480)および shOGFR#2(Clone ID: TRCN0000415278)である。コントロールには shNTC(Sigma-Aldrich Cat. No. SHC016)を用いた。

OGFR 強制発現には、VectorBuilder Inc.(Chicago, IL, USA)製のレンチウイルスベクター(NM_007346)を用いた。コントロールには同ベクター付属のレンチウイルスベクター(VectorBuilder, Cat. No. VB010000-9492agg)を用いた。

Western Blot による OGFR 発現確認には、SIGMA-Aldrich 製の抗 OGFR 抗体(Cat. No. NP_0313722)を使用し、-20°Cで保存した。

ルシフェラーゼアッセイには、VectorBuilder 社製の OGFR プロモーターベクター(VB250902-1501adj)を用いた。コントロールベクター (VB250902-1511ghr) も使用

した。各ベクターは-20℃で保存した。

1. 細胞株選定

1-1. 分光光度計による PARP 阻害薬投与後の細胞生存率評価

それぞれの胆道癌細胞株(TFK-1、HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1、RBE)を 1.0×10^6 個 / 35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS(Phosphate-buffered saline)で洗浄後、細胞を回収し PBS に懸濁したのち、 1.0×10^4 個/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに再播種した。追加で 24 時間培養後、PARP 阻害薬(NIR,OLA,TAL)を種々の濃度 (0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μM) で添加した。対照群には対応する濃度の DMSO を添加した。

さらに 24 時間培養後、CCK-8; Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所, 京都, 日本)を用いて細胞生存率を評価し、吸光度を 450 nm でマイクロプレート分光光度計 (SpectraMax iD3; 和研薬, 京都, 日本) にて測定した。得られたデータは 4 パラメータロジスティック回帰モデルを用いて解析し、 IC_{50} 値および 95%信頼区間を算出した。

なお、RBE 細胞株は他実験を進めた後に追加実験目的に購入した細胞株であり、本検討では他の実験にも用いた NIR に対する実験のみを行った。

1-2. qPCR による相同組み換え頻度評価

それぞれの胆道癌細胞株(TFK-1、HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1、RBE)を 1.0×10^6 個 / 35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。その後 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の dl プラスミドまたは 0.5 $\mu\text{g/mL}$ のポジティブコントロールプラスミド (Homologous Recombination Assay Kit; NORGEN Biotek, Canada) をトランスフェクションした。追加で 24 時間培養後、QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Germany) を用いてゲノム DNA(Deoxyribonucleic Acid)を抽出した。得られた DNA は、アッセイプライマーミクス (同キット) 2 μL と混合し、QuantStudio™ 3 Real Time PCR 装置 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により定量 PCR (qPCR; quantitative Polymerase Chain Reaction) を行った。

qPCR は以下の条件で実施した: 95 °C で 3 分間の初期変性に続き、95 °C で 15 秒、61 °C で 15 秒、72 °C で 15 秒のサイクルを 40 回繰り返した。その後、融解曲線解析を実施した。

1-3. 公開データセット照合による遺伝子変異検索

今回使用したそれぞれの胆道癌細胞株(TFK-1、HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1、RBE)について、CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia; <https://sites.broadinstitute.org/ccle/datasets>) で公開されているデータセットを参照し、相同組み換え関連遺伝子変異の有無につい

て検索した。

2. TFK-1 および RBE に対する AZA 投与後変化の観察

2-1. qPCR による AZA 投与後の相同組み換え頻度の定量評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養後に control と 5 μ M AZA 投与群を作成した。さらに 24 時間培養後、1-2 と同様の方法で相同組換え頻度を測定した。

2-2. FCM による AZA 投与後の細胞周期分布解析

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養後に 0,2,5,10 μ M の AZA を投与した。さらに 24 時間培養後、細胞を回収し、PBS に懸濁したのち、0.05 mg/mL の Cell Cycle Assay Solution(同仁化学研究所, 京都, 日本)で 37 °Cにて 15 分間染色した。

フローサイトメトリー(Flow Cytometry; FCM)解析は FACSVerse フローサイトメーター(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を用い、励起波長 633–647 nm、蛍光検出波長 695 nm で行った。データ取得および解析は BD FACSuite ソフトウェア(BD Biosciences)を用いて実施した。

2-3. FCM による AZA および NIR 投与後のアポトーシス細胞解析

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS で洗浄後、培地を新しいものに交換し、5 μ M の AZA および/または 5 μ M の NIR を添加した。対照群には同濃度の DMSO を添加した。さらに 48 時間培養後、細胞を回収し PBS に懸濁したのち、0.05 mg/mL のヨウ化プロピジウム(PI; Propidium iodide) (ナカライテスク, 京都, 日本) および 0.05 mg/mL の AnnexinVで室温 (20–25 °C) にて 15 分間染色した。

アポトーシス細胞は FCM により検出した。励起波長は 480–550 nm、蛍光検出波長は 590 nm とした。データの取得および解析は前述と同様に実施した。

2-4. 分光光度計による AZA および NIR 投与後の細胞増殖能評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS で洗浄後、培地を新しいものに交換し、5 μ M の AZA および/または 5 μ M の NIR を添加した。対照群には同濃度の DMSO を添加した。

細胞の生存率は CCK-8 を用いて評価し、450 nm における吸光度を SpectraMax iD3 で測定した。測定は day 0 から day 4 まで、24 時間ごとに実施した。

2-5. 分光光度計による AZA および NIR 投与後の細胞生存率評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS で洗浄後、培地を新しいものに交換し、 $5 \mu\text{M}$ を添加した。対照群には同濃度の DMSO を添加した。さらに 24 時間培養後、細胞を回収し PBS に懸濁したのち、 1.0×10^4 個/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに再播種した。1-1 と同様のプロトコルで NIR を投与し day1 に吸光度測定による細胞生存率評価を行い各条件下における NIR の IC50 測定を行った。

3. DNMT 遺伝子のノックダウン

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。PBS で洗浄後、1%PST を含まない培地に交換した。トランスフェクション用混合液は、Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) $9 \mu\text{L}$ と、DNMT 遺伝子各種(DNMT3B-3/3 B-10/3A-11/3A-15/1-1/1-6)、および control 遺伝子(NTC; negative control)を標的とする $10 \mu\text{M}$ siRNA $3 \mu\text{L}$ を Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) $150 \mu\text{L}$ で調製し、室温で 5 分間静置後、滴下した。ノックダウン効率は qPCR により確認した。

3-1. qPCR による DNMT ノックダウン後の相同組み換え頻度の定量評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。各 DNMT をノックダウンし、対照には siNTC をトランスフェクションした。24 時間後、1-2 と同様のプロトコルで相同組換え頻度を測定した。

3-2. FCM による DNMT ノックダウン後の細胞周期分布解析

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。各 DNMT をノックダウンし、対照には siNTC を用いた。48 時間培養後、2-2 と同様のプロトコルで細胞周期評価を行った。

3-3. FCM による DNMT ノックダウンおよび NIR 投与後のアポトーシス解析

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュの密度で播種し、24 時間培養した。各 DNMT をノックダウンし、対照には siNTC を用いた。24 時間後、PBS で洗浄して培地を交換し、 $5 \mu\text{M}$ の NIR を添加した。対照群には同濃度の DMSO を添加した。48 時間後、2-3 と同様のプロトコルでアポトーシス細胞の定量評価を行った。

3-4. DNMT ノックダウンおよび NIR 投与後の細胞増殖能評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養した。各 DNMT をノックダウンし、対照には siNTC を用いた。24 時間後、細胞を回収して PBS に懸濁し、 1.0×10^4 個/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに再播種した。さらに 24

時間後、5 μ M の NIR を添加し、対照群には同濃度の DMSO を添加した。2-4 と同様に Day0-4 までの細胞数定量評価を行った。

3-5. DNMT ノックダウンおよび NIR 処理後の細胞生存率評価

TFK-1 および RBE 細胞を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養した。各 DNMT をノックダウンし、対照には siNTC を用いた。24 時間後、細胞を回収して PBS に懸濁し、 1.0×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに再播種した。さらに 24 時間後、NIR0-50 μ M で投与し 2-5 と同様に細胞生存率評価を行った。

4. AZA 投与または DNMT3B ノックダウン後の全ゲノム RNAsequence 解析

TFK-1 に対して、AZA 処理または DNMT3B ノックダウン (3B-3 および 3B-10) を上述の方法により実施した。対照群として、AZA 実験では DMSO 処理細胞、DNMT3B 実験では siNTC 処理細胞を用いた。

全 RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出した。RNA サンプルは株式会社 Rhelixa (東京, 日本) に提出し、全ゲノム RNA sequencing を行った。

Poly(A)+ RNA は NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) で精製し、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてライブラリを作製した。シーケンスは Illumina NovaSeq X Plus (Illumina) で 150 bp ペアエンドリードとし行われ、得られたリードは STAR でヒトリファレンスゲノム

(GRCh38) にマッピングした。遺伝子発現変動解析(DEG; differentially expressed gene)はソフトウェア edgeR を用いて、リードカウントの値をもとに Trimmed mean of M values 正規化を行い、 $\log_2(\text{FC}(\text{Fold Change}))$ を求めた。(Wagner, 2012.)(Robinson, 2010.) サンプル間で $\log_2\text{FC}$ に有意な差を認める DEG を抽出し、多重検定で FDR(False Discovery Rate)を算出した。(McCarthy, 2012.)

上記解析で同定された遺伝子変動のうち、OGFR の遺伝子発現について、TFK-1 および RBE で control と AZA 5 μ M 投与群の比較、および siNTC と siDNMT3B-3/siDNMT3B-10 群の比較をそれぞれ qPCR により行った。siRNA 投与や qPCR の条件はいずれも上記実験と同様である。

5. OGFR の強制発現(OE; overexpression)およびノックダウン(KD; knocked down)

TFK-1 細胞においてレンチウイルスベクターを用いて OGFR 遺伝子の強制発現およびノックダウンを行った。強制発現については、ヒト OGFR 全長 cDNA(complementary DNA)を搭載したレンチウイルスベクター (VectorBuilder, 神奈川, 日本) を製造元のプロトコールに従い導入した。トランスダクション効率はポリブレン 5 $\mu\text{g/mL}$ により増強し、ピューロマイシン (0.5 $\mu\text{g/mL}$) による 7 日間の選択を行って安定発現株を樹立

した。強制発現は qPCR およびウエスタンブロットにより確認した。

ノックダウンについては、OGFR を標的とする shRNA(small hairpin RNA)レンチウイルス粒子をトランスダクションし、48 時間後にピューロマイシン (0.5 $\mu\text{g/mL}$) による 5-7 日間の選択を行った。ノックダウン効率は qPCR およびウエスタンブロットにより確認した。

ウェスタンブロッティングについては、まず RIPA lysis buffer(ATTO corporation, 東京、日本)を使用して、control/OGFR OE/shNTC/shOGFR それぞれの TFK-1 細胞を溶解した。その後にサンプルバッファーを添加し、100 度で 5 分間加熱した。続いて SDS-PAGE 電気泳動を行い、電気泳動後のゲルをメンブレンに転写し、室温でスキムミルクを用いて 1 時間ブロッキングを行った。その後 OGFR の 1 次抗体溶液でメンブレンを 1 時間振盪し、HRP 標識 2 次抗体で 1 時間反応を行った。洗浄後に、Quantity One v.4.6.9(Bio-Rad)を使用して、バンドの検出を行った。

5-1. qPCR による OGFR OE/KD 細胞の相同組み換え頻度の定量評価

TFK-1 細胞の OGFR OE 株、KD 株、対照株を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養した。1-2 と同様のプロトコルで相同組換え頻度測定を行った。

5-2. FCM による OGFR OE/KD 細胞の細胞周期分布解析

TFK-1 細胞の OGFR OE 株、KD 株、対照株を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養した。48 時間後、2-2 と同様のプロトコルで細胞周期測定を行った。

5-3. FCM による OGFR OE/KD 細胞の NIR 投与後のアポトーシス解析

TFK-1 細胞の OGFR OE 株、KD 株、対照株を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養した。0.5 μM の NIR 投与を行い、48 時間後に 2-3 と同様のプロトコルでアポトーシス細胞の測定を行った。

5-4. 分光光度計による OGFR OE/KD 細胞の NIR 投与後の細胞増殖能評価

TFK-1 細胞の OGFR 強制発現株、KD 株、対照株を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養後、 1.0×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに再播種し、さらに 24 時間後、0.5 μM の NIR を添加し、2-4 と同様に day0-4 の細胞数測定を行った。

5-5. 分光光度計による OGFR OE/KD 細胞の NIR 投与後の細胞生存率評価

TFK-1 細胞の OGFR 強制発現株、KD 株、対照株を 1.0×10^6 個/35 mm ディッシュで播種し、24 時間培養後、 1.0×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに再播種し、さらに 24 時間後、0-50 μM の NIR を投与し 2-5 と同様に細胞生存率評価を行った。

6. DNMT3B ノックダウン後の Reduced representation bisulfite sequence 解析

TFK-1 に対して、DNMT3B ノックダウン(3B-3 および 3B-10) を上述の方法により実施した。対照群として、siNTC 処理細胞を用いた。

全 DNA は QIAamp DNA Kit(QIAGEN, Germany)を用いて抽出した。高品質の DNA サンプルは 株式会社 Rhelixa(東京, 日本) に提出し、Reduced representation bisulfite sequencing を実施した。ライブラリーの作製は標準的な Bisulfite 変換およびシーケンス手法により行われ、シーケンスは Illumina NovaSeq X Plus(Illumina, San Diego, CA, USA) を用いたペアエンド 150 bp リード (150 bp × 2) で実施された。バイオインフォマティクス解析は Rhelixa 社により行われ、methylKit ソフトウェア (Akalin, 2012) を用いてリードカウントの正規化を行い、変動メチル化シトシン (DMC; differentially methylated cytosine) および 変動メチル化領域 (DMR; differentially methylated region) を抽出した。(Akalin, 2012.) 全ゲノムを 1000base pair ごとに区画し、各領域のメチル化率 DMC/DMR を算出し、mapping を行った。遺伝子発現変動解析(DEG; differentially expressed gene) はソフトウェア edgeR(ver 3.26.8)を用いて、DMC/DMR に基づくリードカウント値を Trimmed Mean of M values (TMM) 法 により正規化して $\log_2(\text{FC}(\text{Fold Change}))$ を求めた。サンプル間で $\log_2\text{FC}$ に有意な差を認める DEG を抽出し、多重検定で FDR(False Discovery Rate)を算出した。

7. DNMT3B ノックダウン後の OGFR プロモーターに対するルシフェラーゼアッセイ

DNMT3B ノックダウンによる OGFR プロモーター活性の変化を評価するため、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてプロモーター活性の評価を行った。

TFK-1 に対して、siNTC、siDNMT3B-3/siDNMT3B-10 投与群の 3 群を作成した。24 時間後、それぞれ 1×10^4 個/well の密度で 96 ウェルプレートに再播種した。24 時間後に OGFR プロモーター領域を有するベクター(VB250902-1501adj)およびコントロールベクター(VB250902-1511ghr)(VectorBuilder, 神奈川, 日本)を Lipofectamine™ 3000(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)のアッセイプロトコールに準拠して導入した。

導入時の DNA 量は Firefly:Renilla=20:1 とし、各ウェルに同時導入した。導入 24 時間後に GloMax-Multi Detection System (Promega) で発光を測定し、各ウェルでの Firefly および Renilla 発光比 (Firefly/Renilla) を算出し、トランスフェクション効率のばらつきを補正した。

各 siRNA 群内で、OGFR プロモーターベクターの値を対応する空ベクターの値で除し (Target/EV 比)、さらに siNTC 群の平均値を 1.0 として正規化した。

8.統計解析

データは実験 ($n > 3$) から得られた平均値 $\pm$ 標準偏差 (mean $\pm$ SD) として表記した。統計解析は GraphPad Prism version 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) および EZR version 1.63 (自治医科大学さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を用いて行った。EZR は R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) の統計ソフトウェアに基づいたグラフィカルユーザーインターフェースである。(Kanda, 2013.)

群間比較は、2 群間では Student's t 検定を、多群間では one-way ANOVA を用い、有意差が認められた場合には Tukey の事後検定を実施した。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判定した。

結果

1. 細胞株選定

本研究では PARP 阻害薬不応の腫瘍細胞に対する治療効果増強を確認したいと考えており、まず最初に実験に適した細胞株の選択を目的として、購入した 5 種の胆道癌細胞株(TFK-1、HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1、RBE)それぞれについて PARP 阻害薬耐性・相同組み換え頻度を確認するための各種実験、および公開データセットとの照合にて実験に不適な遺伝子変異の有無を検索した。

1-1. 分光光度計による PARP 阻害薬投与後の細胞生存率評価

TFK-1、HuCCT-1、YSCCC、KMCH-1、RBE それぞれの培養後に NIR、OLA、TAL を 0–100 μM で濃度勾配的に投与し、CCK-8 アッセイにより生存率を評価した。IC₅₀ は非線形回帰により算出した。(図 1)

それぞれの細胞株および条件での IC₅₀ を図中に示す。

上記結果から、各種 PARP 阻害薬に対し IC₅₀ の高い TFK-1、NIR および YSCCC が PARP 阻害薬耐性細胞株として適切と考え、また PARP 阻害薬については全ての細胞株で IC₅₀ を求めることが可能であった NIR を用いることとした。

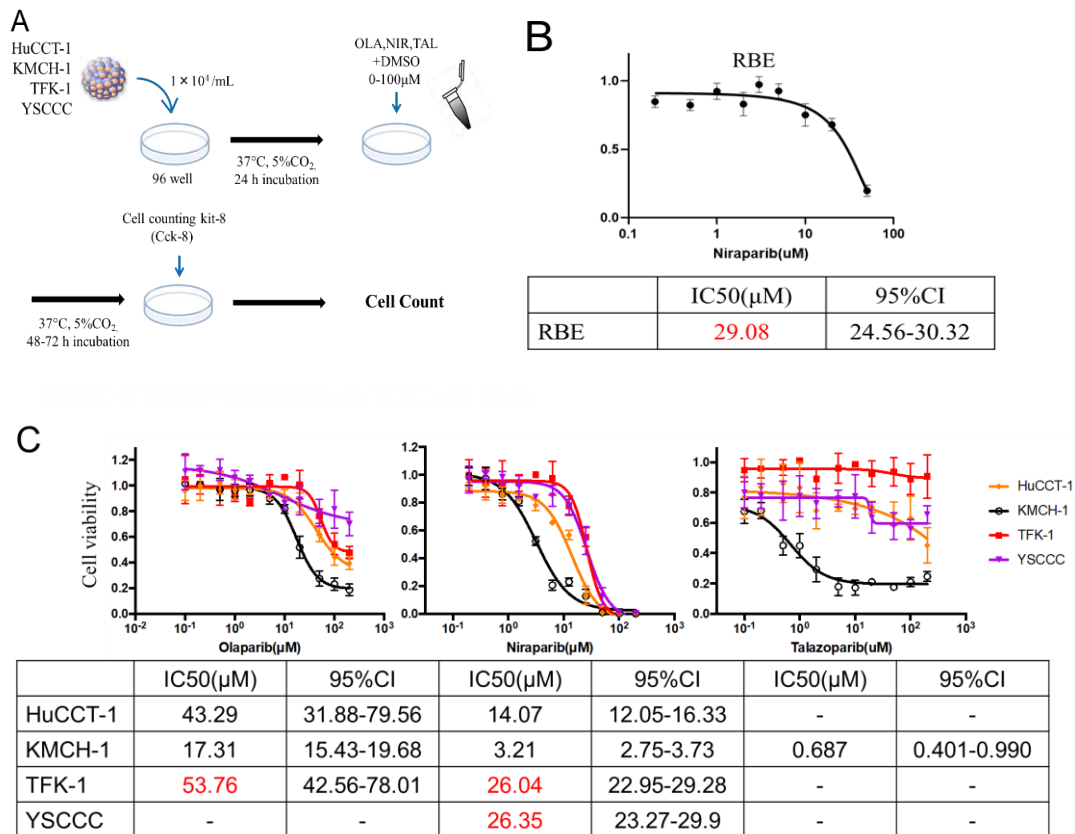


図 1. A: 実験概念図。96well プレートに各細胞株を 1×10^4 個/well で播種し 24 時間培養。各 PARP 阻害薬および対照群の DMSO を 0-100 μM で投与。24 時間後に吸光度測定器で細胞数を定量化した。 B: RBE 細胞株における実験結果。 C: HuCCT-1, KMCH-1, TFK-1, YSCC 各細胞株における実験結果。

1-2. qPCR による相同組み換え頻度評価

各細胞株における相同組み換え頻度を qPCR により定量評価した。HuCCT-1 細胞株の相同組み換え頻度を 1.00 とした場合、KMCH-1 細胞株では 3.64 ± 0.66 %、TFK-1 細胞株では 7.45 ± 0.92 %、YSCCC 細胞株では 1.32 ± 0.22 %であった(mean $\pm$ SD,n=4; 図 2)

TFK-1 細胞株で相同組み換え頻度が比較的高いことについては PARP 阻害薬耐性から予想された結果であったが、同じく PARP 阻害薬耐性である YSCCC 細胞株で相同組み換え頻度が比較的低いことは相反する結果であった。

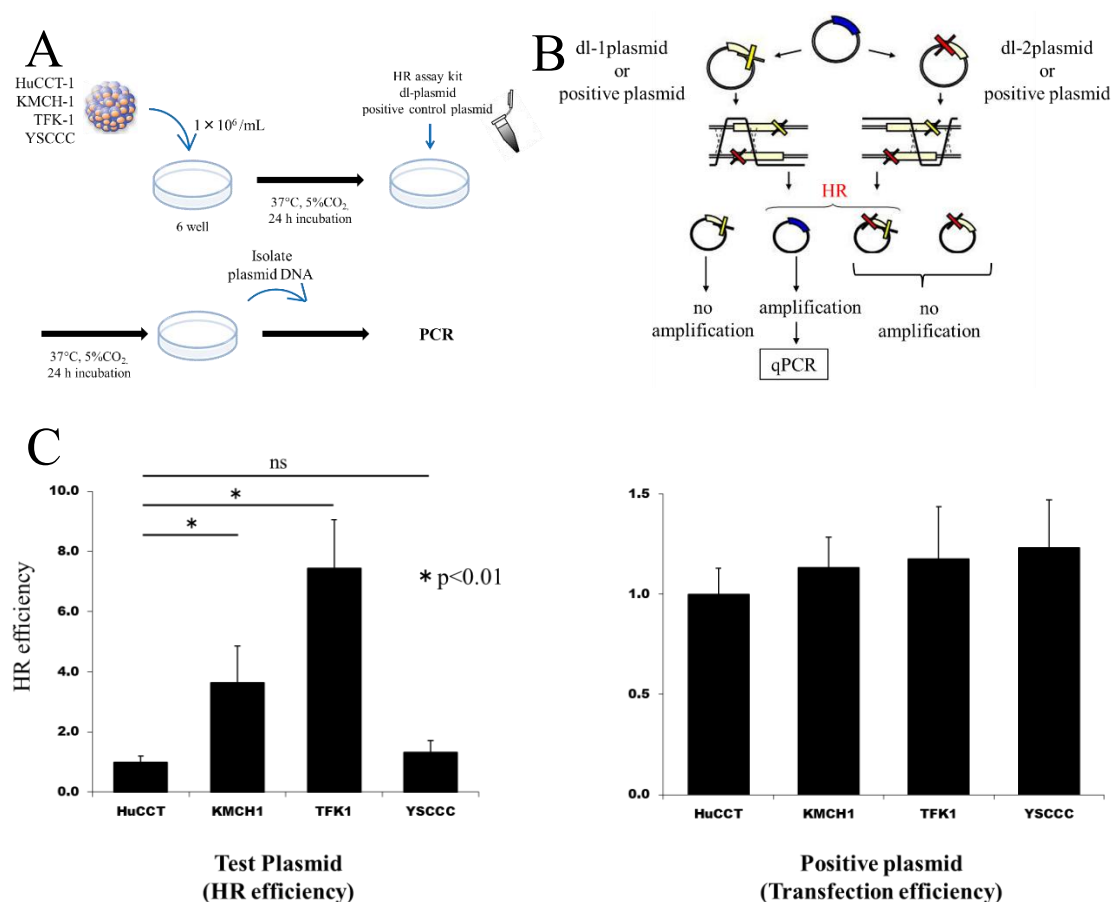


図 2. A: 実験概念図。6well プレートに各細胞株を 1×10^6 個/well で播種し 24 時間培養。相同組み換えアッセイキットのプラスミドを投与。24 時間後に DNA を抽出し、qPCR で測定した。 B: 相同組み換えアッセイキットの概念図。相同組み換え末端に位置し、DNA 増幅を抑制するよう設計された 2 種類のプラスミドが腫瘍 DNA に組み込まれ、相同組み換えが生じると両者ともが組み込まれた DNA、両者ともが組み込まれない DNA に分かれる。増幅した DNA の qPCR により、相同組み換え頻度を定量化する。 C: HuCCT-1, KMCH-1, TFK-1, YSCCC 各細胞株における実験結果。

1-3. 公開データセット照合による遺伝子変異検索

CCLE データセットで各細胞株の遺伝子変異について検索を行い、相同組み換え関連遺伝子変異検索を行った。(図 3)

TFK-1 細胞株や RBE 細胞株は相同組み換え関連変異を有さない一方で、他の細胞株は相同組み換え関連変異を有しており、PARP 阻害薬耐性が TFK-1 細胞株と比較して弱いことの原因であると考えられた。また、相同組み換え頻度が低いにも関わらず PARP 阻害薬に高い耐性を示した YSCC 細胞株に関しては、PARP1 変異を有しており、相同組み換えと別の機序による PARP 阻害薬耐性であることが示唆された。

上記の結果から、以降の実験に適した細胞株として TFK-1 細胞株、RBE 細胞株を用いることとした。

Cell lines	Mutations
HuCCT-1	K-Ras (G12D), TP53 (R175H) BRCA2(G2044V), RAD51(G32V)
KMCH-1	IDH1 (M1L), BRCA1(V1378V) BARD1(R661T), FANCD2(K867E), POLQ(L2158L), ARID1A(Y1055fs), PTEN(Y346C)
TFK-1	TP53(W91*), FGFR3(G145V)
YSCC	TP53 (V272M), IDH1 (R100Q), CDK12(P1267L), RAD51D(K91fs), PARP1(D788Y)
RBE	K-Ras (G12D), IDH1(R132S)

図 3. 各細胞株の公開データベースによる代表的遺伝子変異。赤字で相同組み換え関連遺伝子変異を示す。

2. TFK-1 および RBE に対する AZA 投与後変化の観察

2-1. qPCR による AZA 投与後の相同組み換え頻度の定量評価

control 群および AZA 処理群における相同組み換え頻度を qPCR により定量評価した。(mean±SD, n=4; 図 4)

いずれの細胞株でも、AZA 投与によって相同組換え頻度は有意に低下を認めた。

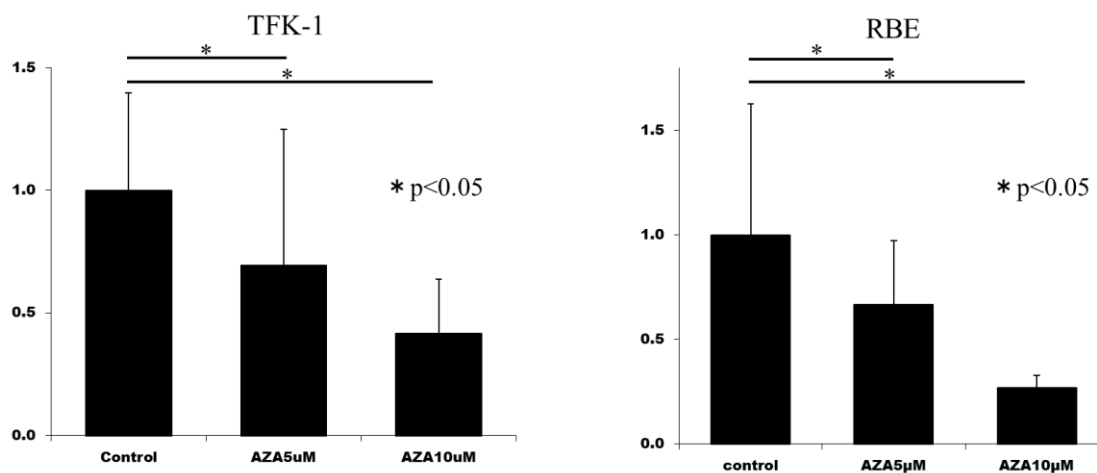


図 4. 相同組み換えアッセイを用いた qPCR による各条件における相同組み換え頻度の定量化の結果を示す。

2-2. FCM による AZA 投与後の細胞周期分布解析

AZA が細胞周期分布に及ぼす影響を評価するため、TFK-1 および RBE 細胞に AZA を 2、5、10 μM で投与し、FCM により解析した。(図 5)

TFK-1、RBE ともに AZA 投与で有意な G2/M 期細胞割合の増加を認め、特に AZA 5 μM 投与群において顕著な結果であった。

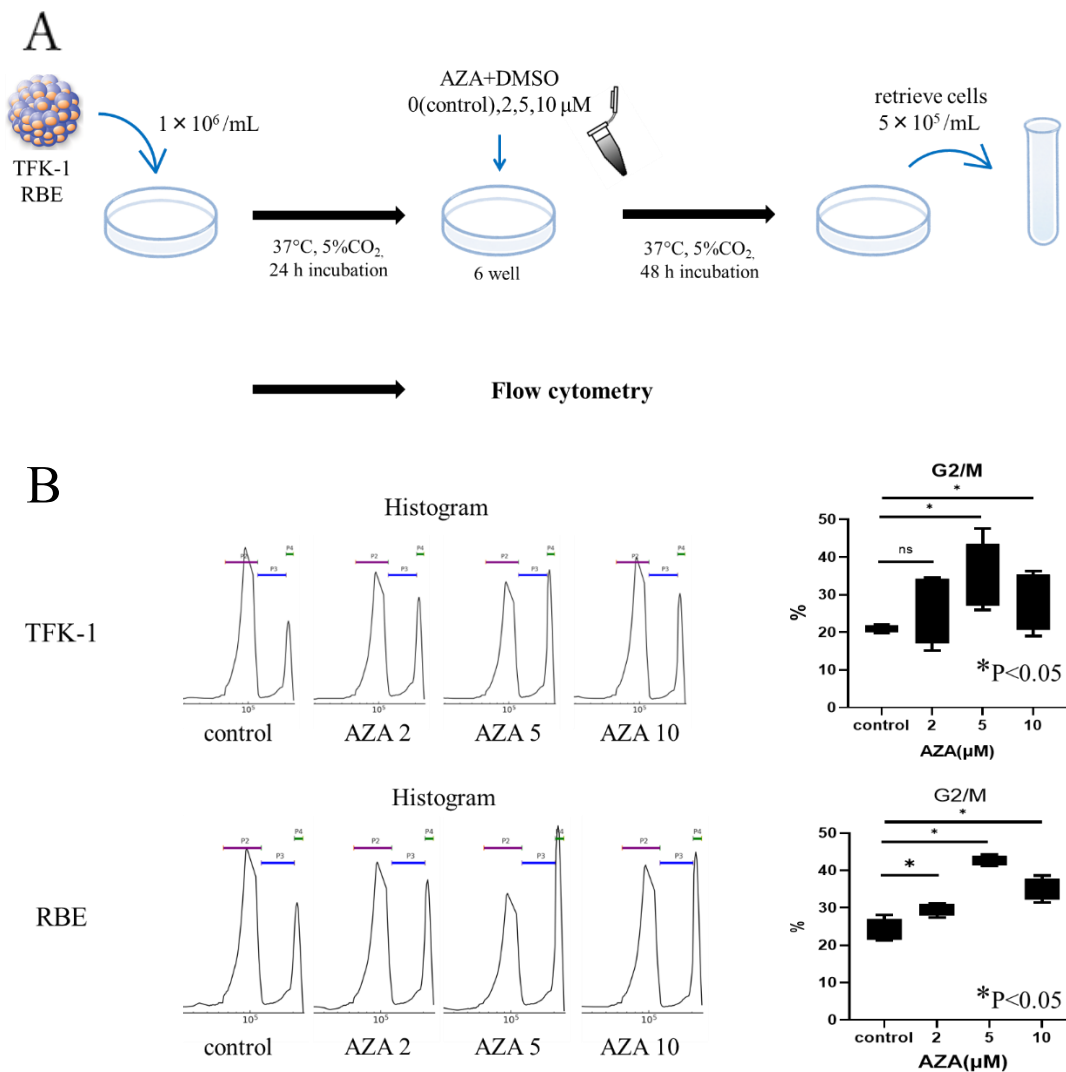
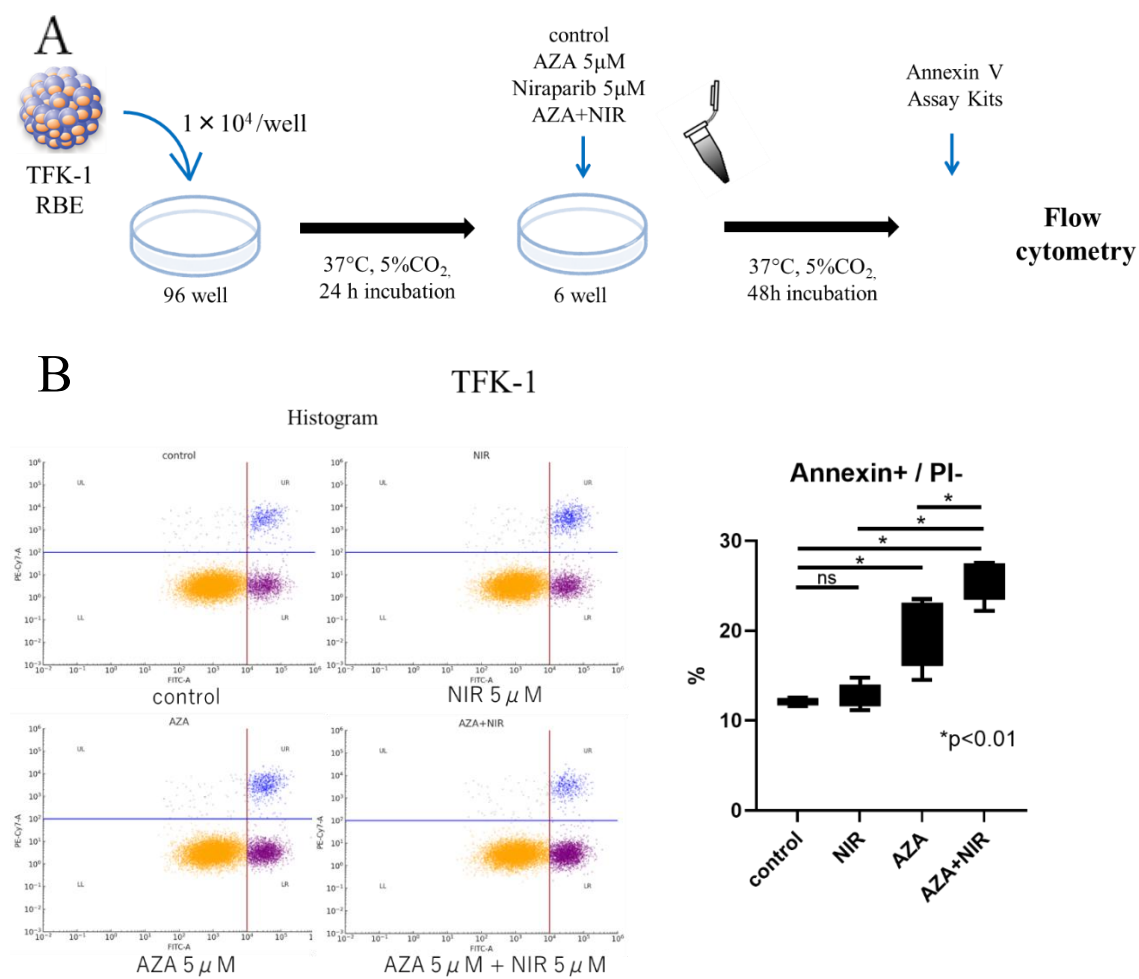


図 5. A: 実験概念図。6well プレートに各細胞株を 1×10^6 個/well で播種し 24 時間培養。AZA あるいは対照群の DMSO を投与。さらに 24 時間培養し、細胞を回収。Cell Cycle Assay Solution による染色後に FCM で細胞周期を測定した。 B: TFK-1、RBE における AZA 投与量ごとの代表的なヒストグラム、および G2/M 期細胞割合の定量化の結果を示す。

2-3. FCM による AZA および NIR 投与後のアポトーシス細胞解析

AZA と NIR の併用によるアポトーシス細胞増加効果を評価するため、TFK-1 および RBE 細胞を 4 群(control、NIR(5 μ M)、AZA(5 μ M)、AZA + NIR(各 5 μ M))に分け、Annexin V/PI 二重染色後、FCM で解析した。Annexin V 陽性かつ PI 陰性の細胞をアポトーシス細胞と定義し、その割合を算出した。(mean $\pm$ SD, n=4; 図 6)

TFK-1、RBE 両細胞株ともに、AZA+NIR 併用群は最もアポトーシス細胞割合を高く認めた。



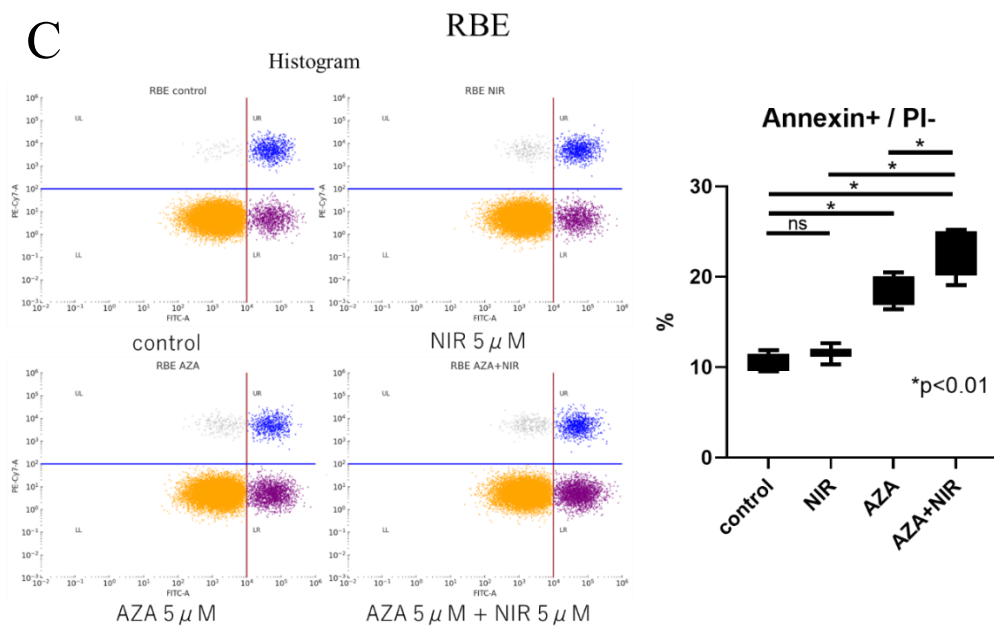


図 6. A: 実験概念図。6well プレートに各細胞株を 1×10^6 個/well で播種し 24 時間培養。AZA、NIR、AZA+NIR、あるいは対照群の DMSO をそれぞれ投与。さらに 24 時間培養し、細胞を回収。AnnexinV および PI による共染色後に FCM で測定した。Annexin+/PI-細胞をアポトーシス細胞と定義した。 B: TFK-1 における代表的なヒストグラム、およびアポトーシス細胞の割合の定量化の結果を示す。 C: RBE における代表的なヒストグラム、およびアポトーシス細胞の割合の定量化の結果を示す。

2-4. 分光光度計による AZA および NIR 投与後の細胞増殖能評価

NIR(5 μ M)投与による細胞増殖の経時的变化を評価するため、control、AZA 5 μ M、NIR 5 μ M、AZA+NIR(各 5 μ M)の 4 群に分け、day 0～day 4 の細胞増殖を CCK-8 アッセイで評価した。各群の増殖比は day 0 の吸光度を 1 として正規化した。(図 7)

NIR 単独投与群と AZA+NIR 群の対比において、TFK-1 細胞株では day1-4 までの全ての時点で有意に細胞増殖が抑制され、RBE 細胞株では day2-4 で有意に細胞増殖が抑制された。

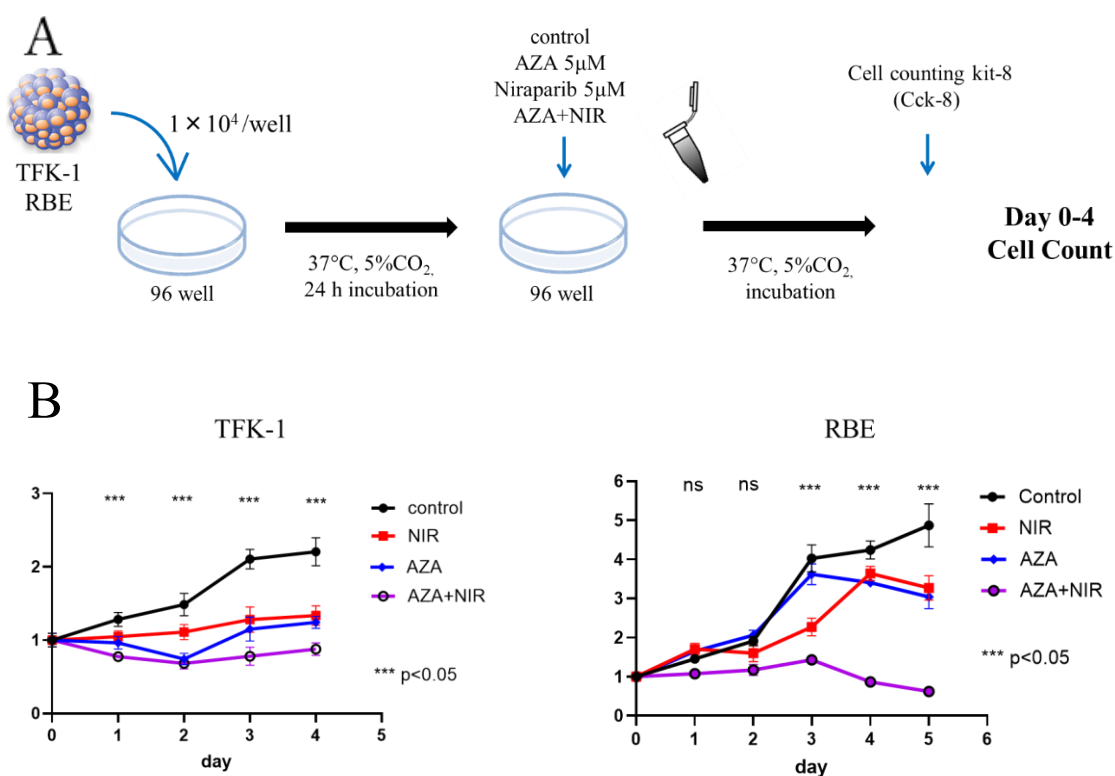


図 7. A: 実験概念図。96well プレートに各細胞株を 1×10^4 個/well で播種し 24 時間培養。AZA、NIR、AZA+NIR、あるいは対照群の DMSO をそれぞれ投与。直後を day0 とし、24 時間ごとに CCK-8 を用いた吸光度測定で細胞数を定量化した。 B: TFK-1 および RBE における細胞数の経時的变化を示す。

2-5. 分光光度計による AZA および NIR 投与後の細胞生存率評価

AZA 前投与が NIR 感受性を増強するかを評価するため、NIR を 0–50 μM で濃度勾配的に投与し、CCK-8 アッセイにより生存率を評価した。IC₅₀ は非線形回帰により算出した。(図 8)

TFK-1、RBE ともに AZA 投与によって NIR の IC₅₀ は低下を認めた。

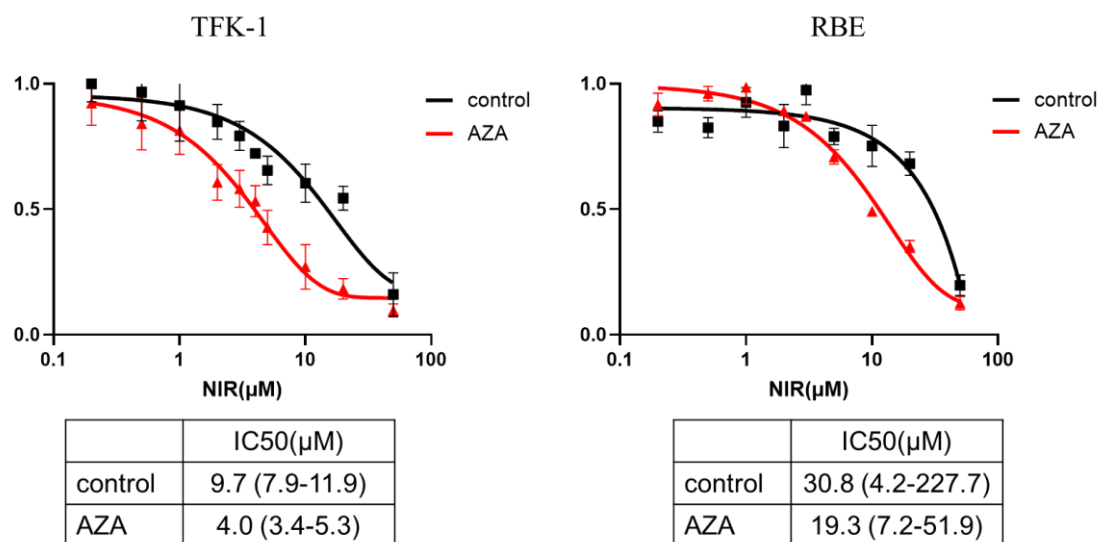


図 8. TFK-1 および RBE 細胞株に対し AZA、または対照群の DMSO 投与状態に対し濃度別に NIR を投与した細胞数の定量化の結果を示す。

3. DNMT 遺伝子のノックダウン

siRNA を用いた DNMT ファミリーのノックダウン効率を検証するため、TFK-1 細胞株および RBE 細胞株に各種 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に mRNA 発現量を siNTC 群と比較して qPCR で定量した。

TFK-1、RBE 細胞株ともにいずれの siRNA でも対象となる DNMT のノックダウンは有意な RNA 発現量の低下を認めた。(図 9)

両細胞株ともに、ノックダウン効率は DNMT3B で特に顕著であった。

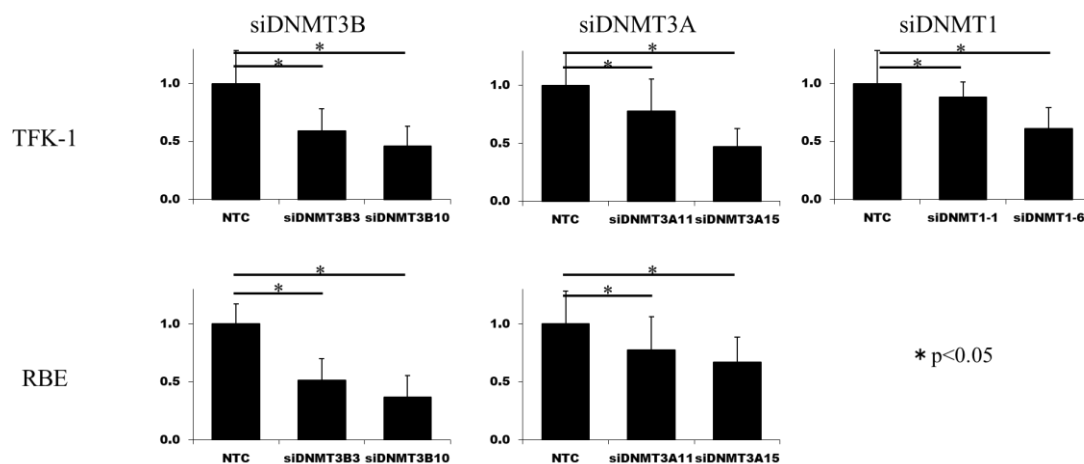


図 9. TFK-1、RBE それぞれに対し siRNA による各 DNMT サブタイプの knockdown を行い、48 時間後に抽出した RNA に対する qPCR の結果を示す。RBE では先行して実験を行った TFK-1 での結果から、siDNMT1 の knockdown は行っていない。

3-1. qPCR による DNMT ノックダウン後の相同組み換え頻度の定量評価

DNMT ノックダウンが相同組み換え修復活性に影響を及ぼすかを評価するため、siRNA トランスフェクション後に相同組み換え頻度を qPCR で定量した。(図 10)

DNMT3B3 のノックダウンは両細胞株で有意に相同組換え頻度の低下をもたらした。

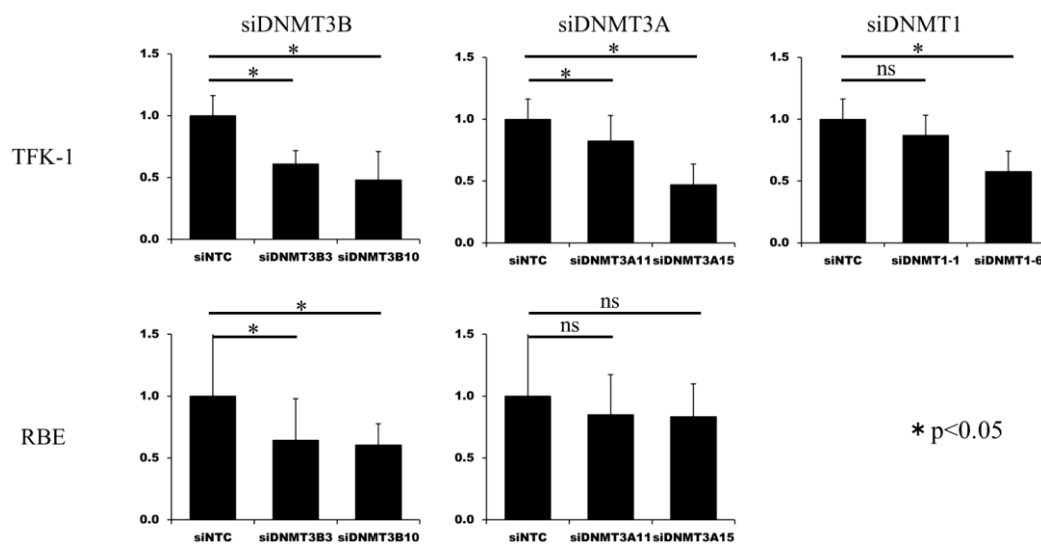


図 10. 相同組み換えアッセイを用いた qPCR による各条件における相同組み換え頻度の定量化の結果を示す。

3-2. FCM による DNMT ノックダウン後の細胞周期分布解析

DNMT ノックダウンが細胞周期進行に与える影響を検討するため、FCM により G2/M 期細胞の割合を定量した。(図 11)

TFK-1、RBE ともに DNMT3B3 のノックダウンは有意な G2/M 期細胞割合の増加をもたらし、他の DNMT サブタイプのノックダウンでは細胞周期変化は限定的な効果であった。

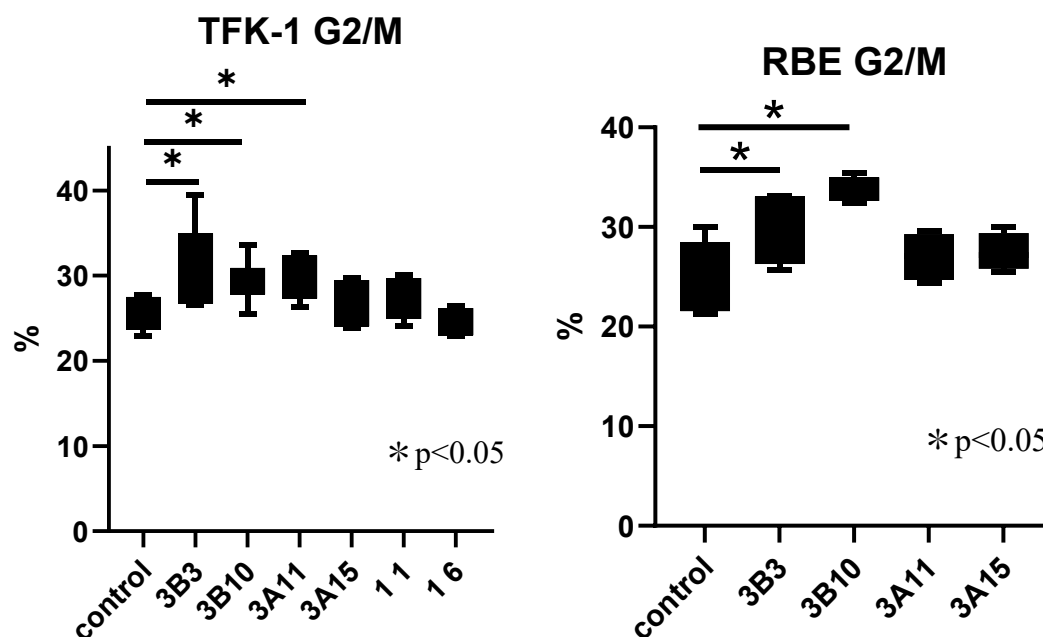


図 11. TFK-1、RBE における knockdown した DNMT サブタイプごとの G2/M 期細胞割合の定量化の結果を示す。

3-3. FCM による DNMT ノックダウンおよび NIR 投与後のアポトーシス解析

DNMT ノックダウンと NIR 投与によるアポトーシス細胞の増加を評価するため、TFK-1 細胞株および RBE 細胞株を siNTC または各種 DNMT 標的 siRNA で処理したのち、control(DMSO)および NIR(5 μ M)群に分け、Annexin V/PI 共染色により FCM で解析した。(図 12)

TFK-1、RBE ともに、DNMT3B ノックダウンは NIR 投与との併用によりアポトーシスを著明に増強させたが、DNMT3A ノックダウンでは中等度の増強にとどまり、DNMT1 のノックダウンでは明らかな効果は認められなかった。

A

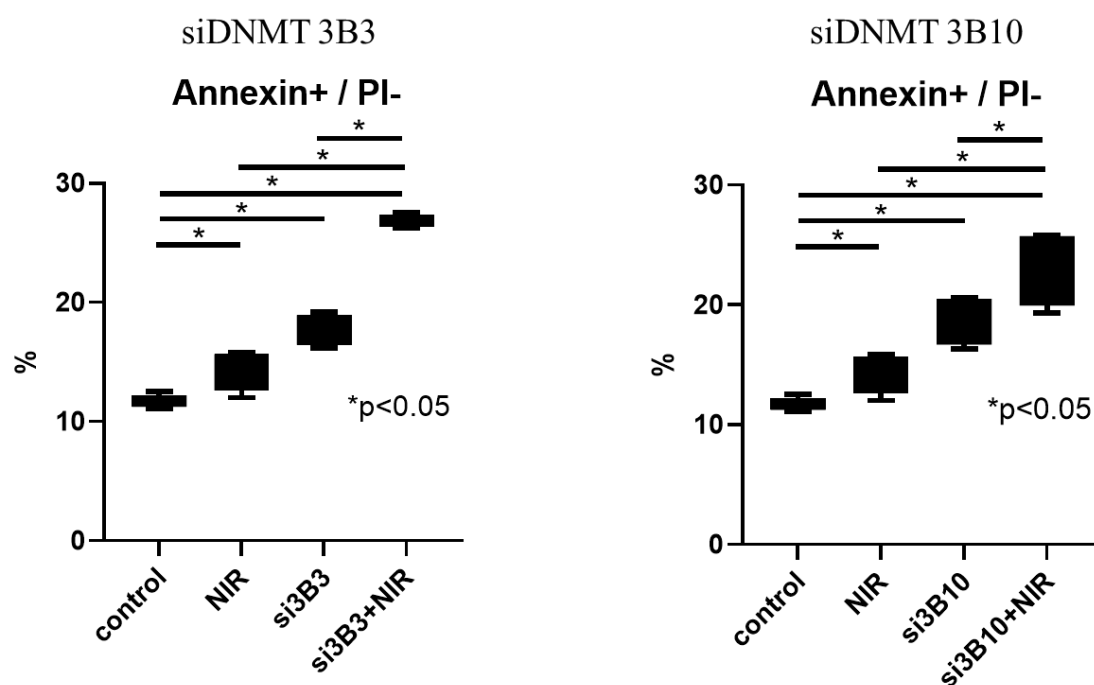


図 12. A: TFK-1 細胞株における DNMT3B の knockdown 有無と NIR 投与有無のそれぞれの条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM において、Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

B

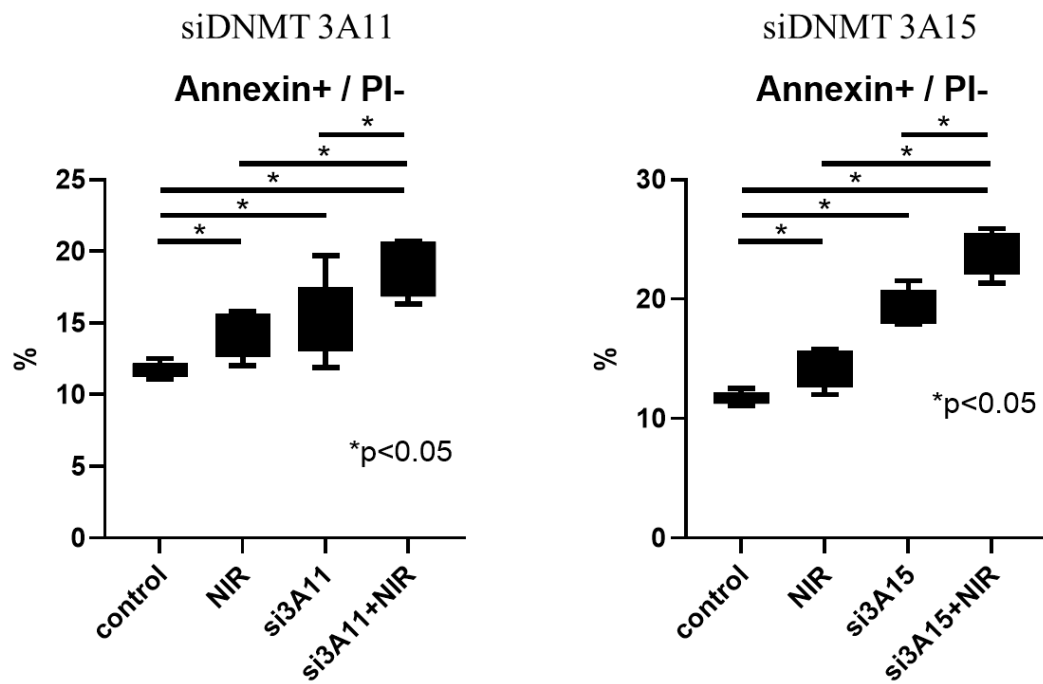


図 12. B: TFK-1 細胞株における DNMT3A の knockdown 有無と NIR 投与有無のそれぞれの条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM における Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

C

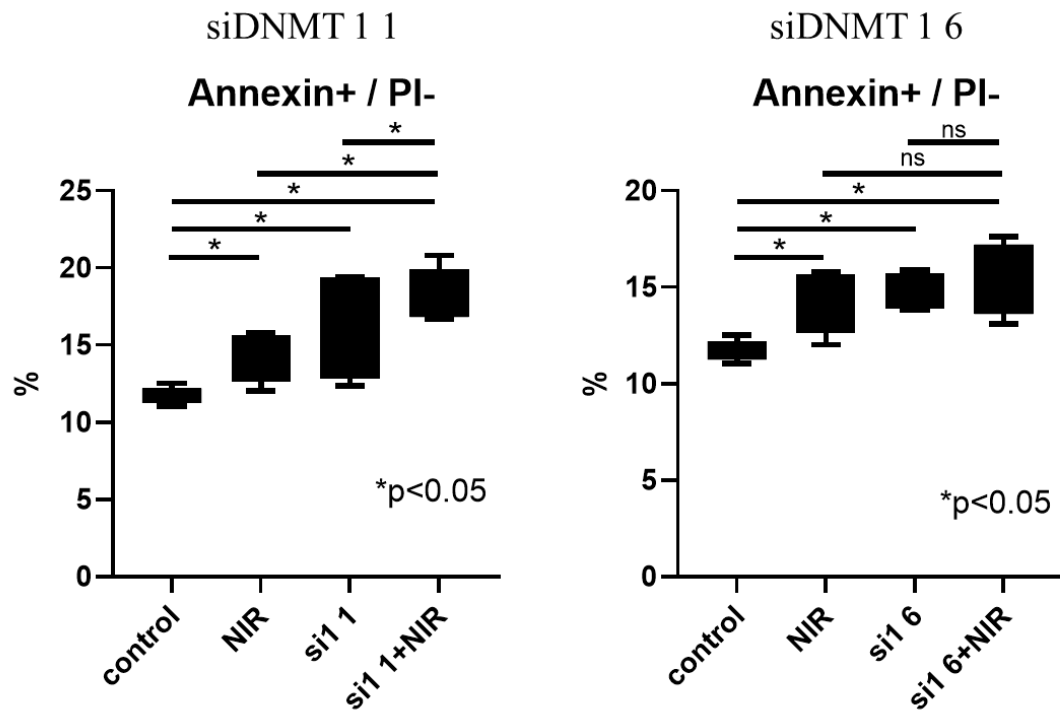


図 12. C: TFK-1 細胞株における DNMT1 の knockdown 有無と NIR 投与有無のそれぞれの条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM における Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

D

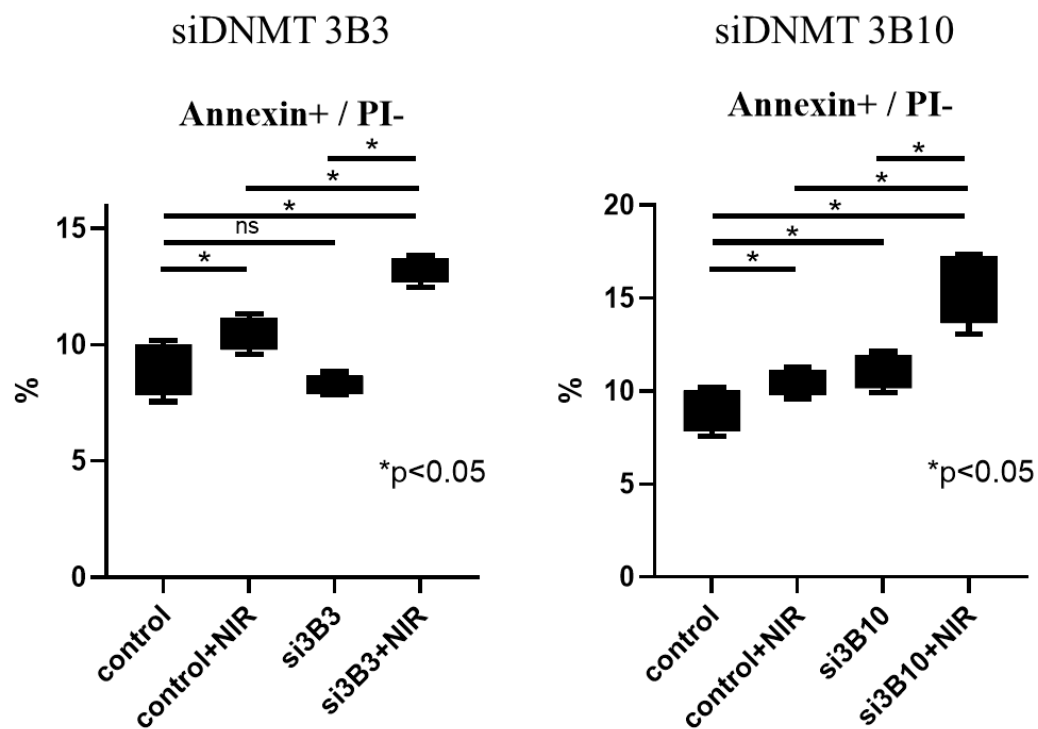


図 12. D: RBE 細胞株における DNMT3B の knockdown 有無と NIR 投与有無のそれぞれの条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM における Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

E

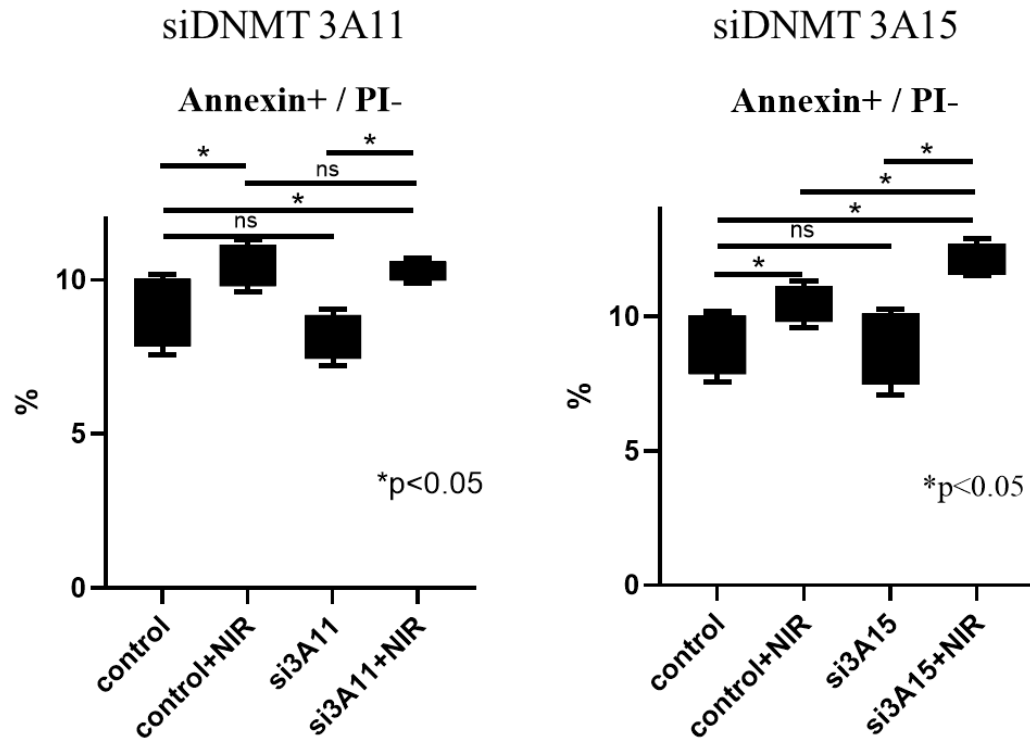


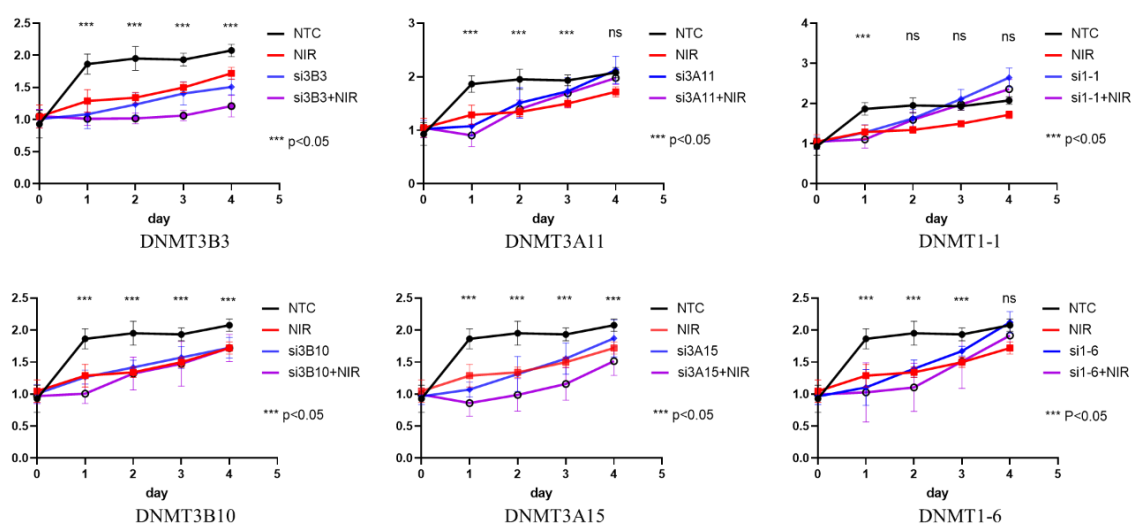
図 12. E: RBE 細胞株における DNMT3A の knockdown 有無と NIR 投与有無のそれぞれの条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM における Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

3-4. DNMT ノックダウンおよび NIR 投与後の細胞増殖能評価

DNMT ノックダウンと NIR 投与が細胞増殖に及ぼす影響を評価するため、TFK-1 細胞株および RBE 細胞株を siNTC 群または各 DNMT ノックダウン群に分け、それぞれに control または NIR(5 μ M)を投与した。細胞の生存率は day 0～day 4 に CCK-8 アッセイで測定した。(図 13)

この結果から、DNMT3B ノックダウンは TFK-1 細胞株および RBE 細胞株において NIR の増殖抑制効果を顕著に増強し、DNMT3A ノックダウンは中等度、DNMT1 ノックダウンは少ない効果しか示さないことが明らかとなった。

A



B

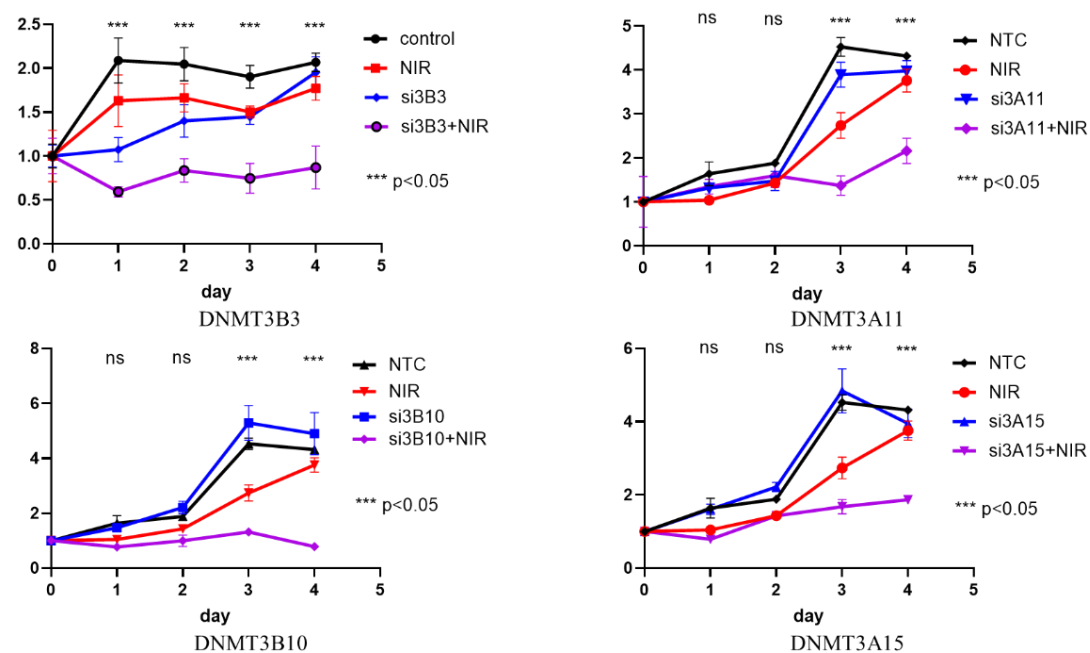


図 13. A: TFK-1 における細胞数の経時的変化を示す。各 DNMT の knockdown 条件下に、NIR または対照群の DMSO 投与直後を day0 とし、24 時間ごとに CCK-8 を用いた吸光度測定で細胞数を定量化した。 B: RBE における細胞数の経時的変化を示す。

3-5. DNMT ノックダウンおよび NIR 処理後の細胞生存率評価

DNMT ノックダウンにより NIR 感受性が高まるかを検討するため、NIR を段階的濃度(0-50 μ M)で投与し、CCK-8 アッセイにより細胞生存率を評価した。IC₅₀ は非線形回帰分析により算出し、95%信頼区間を併記した。(図 14)

これらの結果は、特に DNMT3B ノックダウンにより、TFK-1 細胞株および RBE 細胞株の双方で NIR 感受性が著明に高まり、control 群に比べて IC₅₀ が大きく低下することを示している。

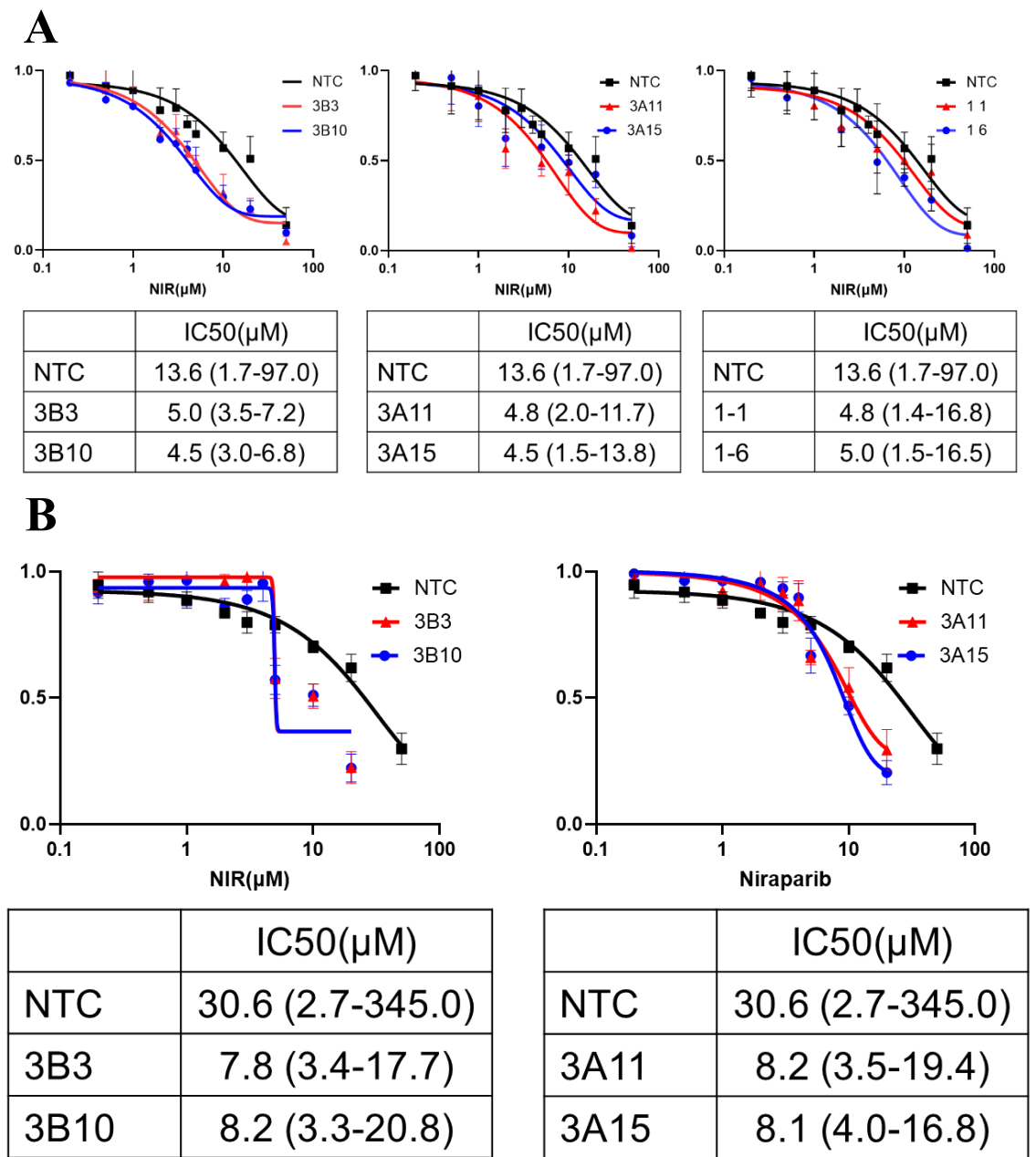


図 14. A: TFK-1 細胞株に対し各 DNMT サブタイプの knockdown 後に濃度別に NIR を投与した 24 時間後の細胞数の定量化の結果、および導出された IC_{50} を示す B: RBE 細胞株についての細胞数の定量化の結果および導出された IC_{50} を示す。

4. AZA 投与または DNMT3B ノックダウン後の全ゲノム RNAsequence 解析

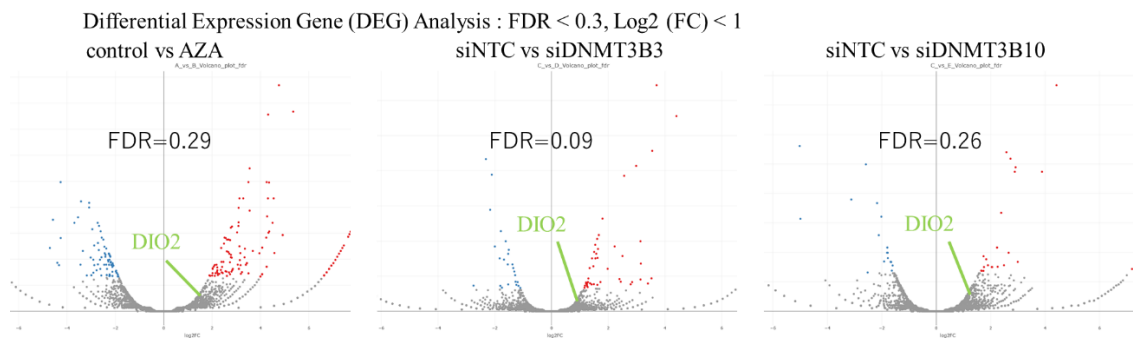
RNA シーケンスおよび DEG 解析の結果、AZA 投与群では control 群と比較して 216 遺伝子が有意に変動していた ($FDR < 0.05$)。一方、siDNMT3B-3 群および siDNMT3B-10 群では、それぞれ 70 遺伝子および 44 遺伝子が有意に変動していた。AZA 投与群と siDNMT3B 両群の 3 群間で共通する有意遺伝子は認められなかったが、有意水準を緩和し $FDR < 0.3$ とした場合、DIO2 が全ての群において共通に変動した遺伝子として抽出された。しかし、この所見は qPCR では検証できなかった。TFK-1 細胞株に対する AZA の 5 μ M 投与および DNMT3B の knockdown 後に、qPCR で OGFR 発現の定量評価を行ったところ、control の DIO2 発現を 1 として AZA 投与で 0.87 ± 0.38 であった。siNTC の DIO2 発現を 1 として DNMT3B-3 のノックダウンで 1.54 ± 0.19 、DNMT3B-10 で 4.31 ± 0.33 であった。 (mean $\pm$ SD, n=3; 図 15)

しかし、siDNMT3B-3 群と siDNMT3B-10 群の間では 5 つの共通 DEG (OGFR, COL4A6, CFL2, LRRC37A2, LOC102724594) が検出され、OGFR は一貫して上方制御されていた。なお、control vs AZA 投与群の DEG では $FDR=0.87$ と有意な OGFR の発現変動を認めなかった。TFK-1 細胞株に対する AZA の 5 μ M 投与および DNMT3B の knockdown 後に、qPCR で OGFR 発現の定量評価を行った。

control の OGFR 発現を 1 として AZA 投与で 0.55 ± 0.25 であった。siNTC の OGFR 発現を 1 として DNMT3B-3 のノックダウンで 3.10 ± 0.45 、DNMT3B-10 で 2.35 ± 0.19 であった。AZA 投与では OGFR の有意な変化が見られなかったが、DNMT3B のノックダウンでは OGFR はいずれも発現が上昇していることが確認された。 (mean $\pm$ SD, n=3; 図 16)

OGFR は細胞周期制御に関与することが知られているため、3-2 で示した DNMT knockdown 後の細胞周期変化の機序の一つである可能性があると考え、機能解析の対象として選択した。

A



B

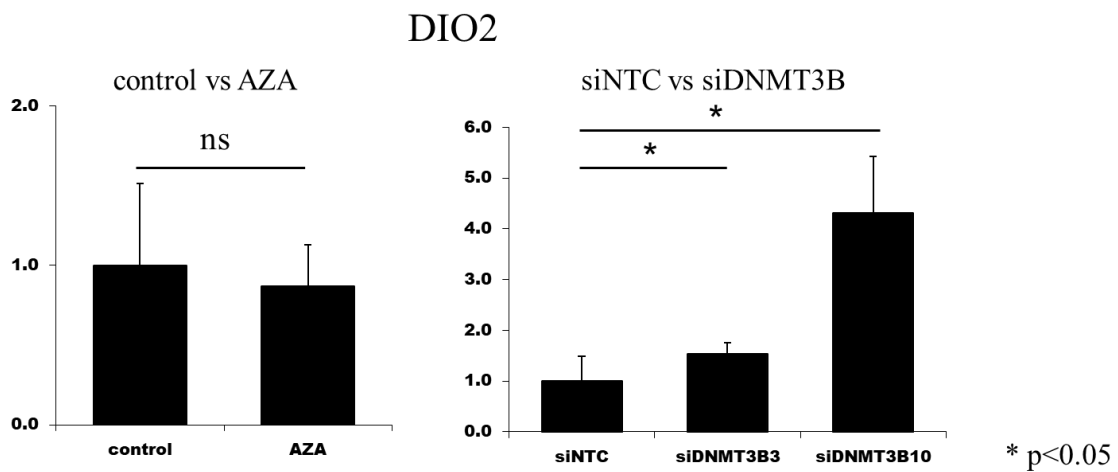
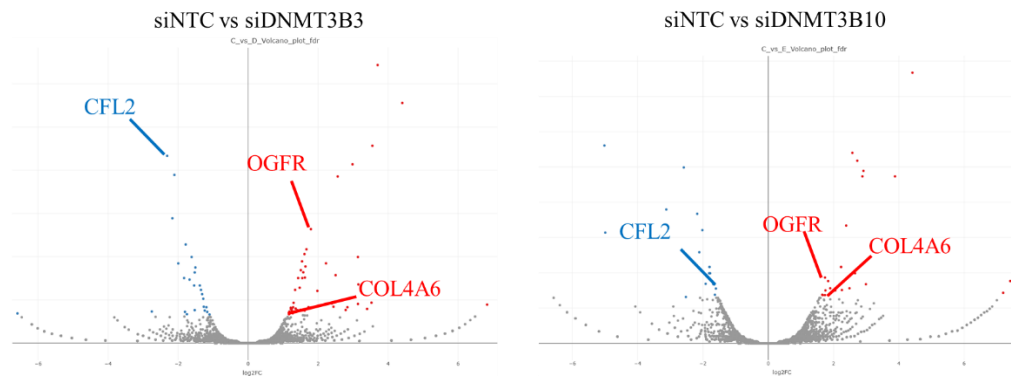


図 15. A: TFK-1 に対する AZA 投与あるいは DNMT3B の knockdown 条件下に行った全ゲノム RNA シークエンスにおける DEG 解析結果の volcano plot を示す。FDR < 0.3 の条件下に共通して DIO2 発現の上方制御を認めた。 B: DIO2 遺伝子に対する qPCR 結果を示す。AZA 投与や DNMT3B-3 の knockdown では DIO2 発現上昇は認められなかった。

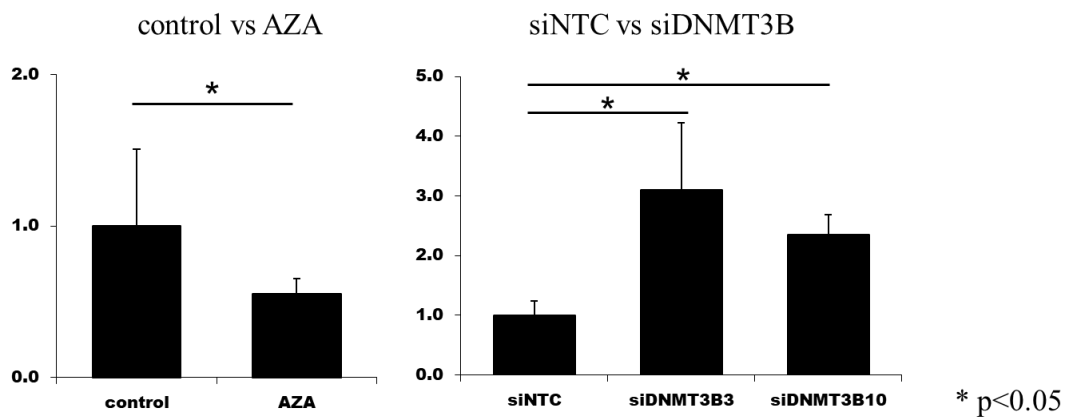
A

Differential Expression Gene (DEG) Analysis : FDR < 0.05, Log₂ (FC) < 0.5



B

TFK-1



RBE

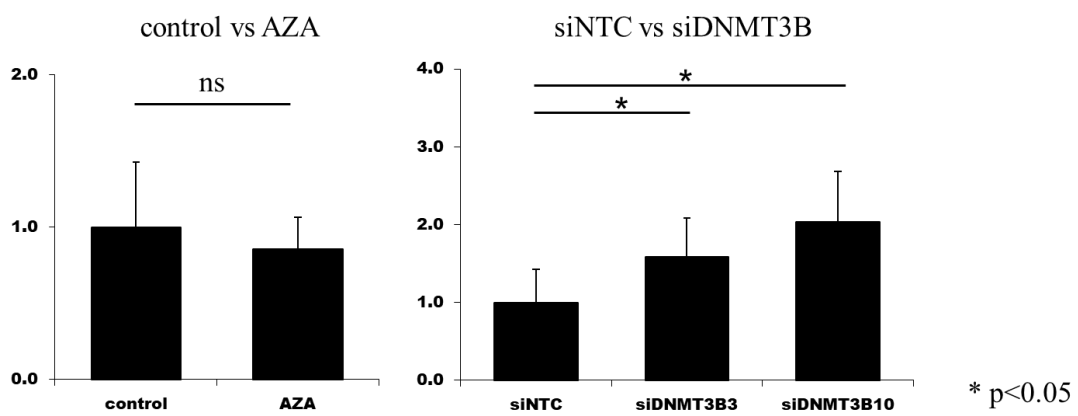


図 16. A: TFK-1 に対する DNMT3B の knockdown 条件下に行った全ゲノム RNA シークエンスにおける DEG 解析結果の volcano plot を示す。FDR < 0.05 の条件下に共通して OGFR 発現の上方制御を認めた。 B: OGFR 遺伝子に対する qPCR 結果を示す。TFK-1 と RBE とともに、AZA 投与では OGFR は下方制御されている一方、DNMT3B の knockdown では共通して OGFR の有意な発現上昇を認め、RNA シークエンス結果と一致した。

5. OGFR の強制発現(OE; overexpression)およびノックダウン(KD; knocked down)

RNA シーケンスにより、siDNMT3B-3 および siDNMT3B-10 群で共通して上方制御された遺伝子として OGFR が同定されたため、その機能的意義を検討するために、OGFR の強制発現および shRNA によるノックダウンを導入した TFK-1 細胞株(以下、OGFR OE 株/shOGFR 株と表現する)を樹立した。

安定株作製の過程で、標準的なピューロマイシン濃度(1–2 $\mu\text{g/mL}$)では TFK-1 細胞株において強い細胞死が生じ、十分な細胞増殖が得られなかった。1.0 $\mu\text{g/mL}$ あるいは 0.7 $\mu\text{g/mL}$ においても細胞生存は不十分であったため、強制発現株およびノックダウン株ともに 0.5 $\mu\text{g/mL}$ に減量して選択を行った。

qPCR の結果、OGFR OE 株では OGFR mRNA 発現は control 細胞と比較して 2.53 ± 0.13 倍であり、一方、shOGFR 株では shNTC 群と比較して 0.63 ± 0.13 倍に低下した (mean $\pm$ SD, n=3; 図 17)。これらの結果はウエスタンブロットにおいても確認できた (図 18)。

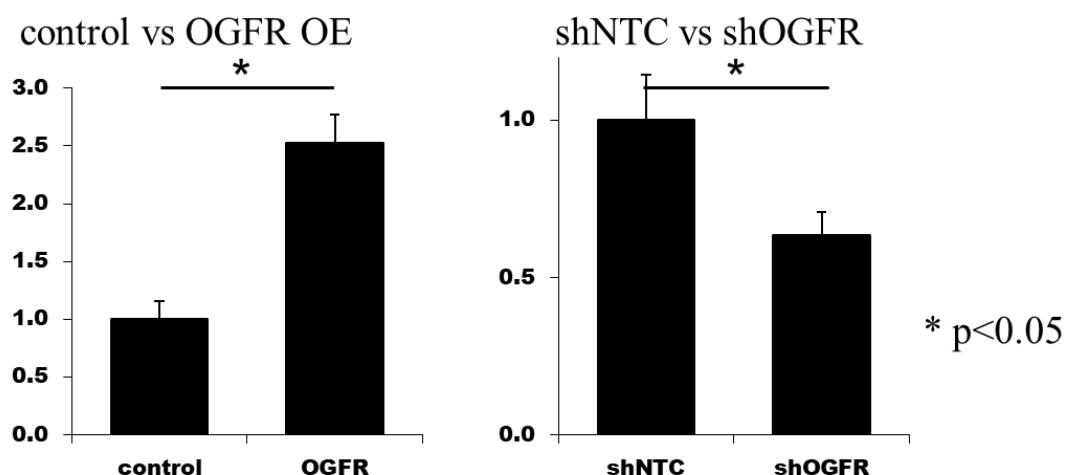


図 17. OGFR 強制発現あるいは shOGFR による knockdown 後にそれぞれの細胞株から RNA を抽出し行った qPCR 結果を示す。OGFR 遺伝子はいずれも発現上昇あるいは低下を認めた。

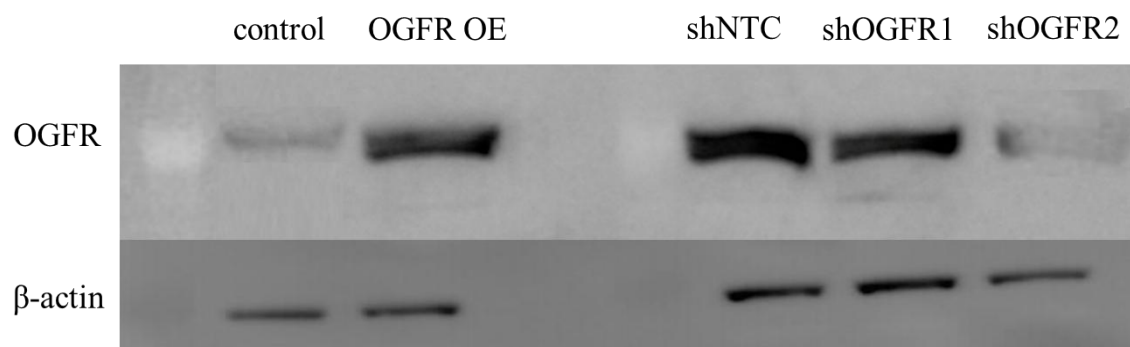


図 18. OGFR 強制発現あるいは shOGFR による knockdown 後にそれぞれの細胞株からタンパク抽出を行い、OGFR 遺伝子に対して β -actin を control として western blot による蛋白発現評価を行った。OGFR 強制発現による OGFR 発現の増加、knockdown による OGFR 発現低下をそれぞれ認めた。なお、shOGFR2 が図 17 で示した shOGFR と一致している。

5-1. qPCR による OGFR OE/KD 細胞の相同組み換え頻度の定量評価

OGFR が相同組み換え頻度に与える影響を評価するため、qPCR を用いた相同組み換えアッセイを行った。OGFR OE 株では、相同組み換え頻度は control 細胞と比較して 0.58 ± 0.26 に低下した (control=1.0)。一方、shOGFR 株では shNTC 群と比較して 2.78 ± 3.55 に増加した (shNTC=1.0)。

これらの結果は、OGFR が TFK-1 細胞株において相同組み換え活性を負に制御することを示唆している (mean $\pm$ SD, n=3; 図 19)。

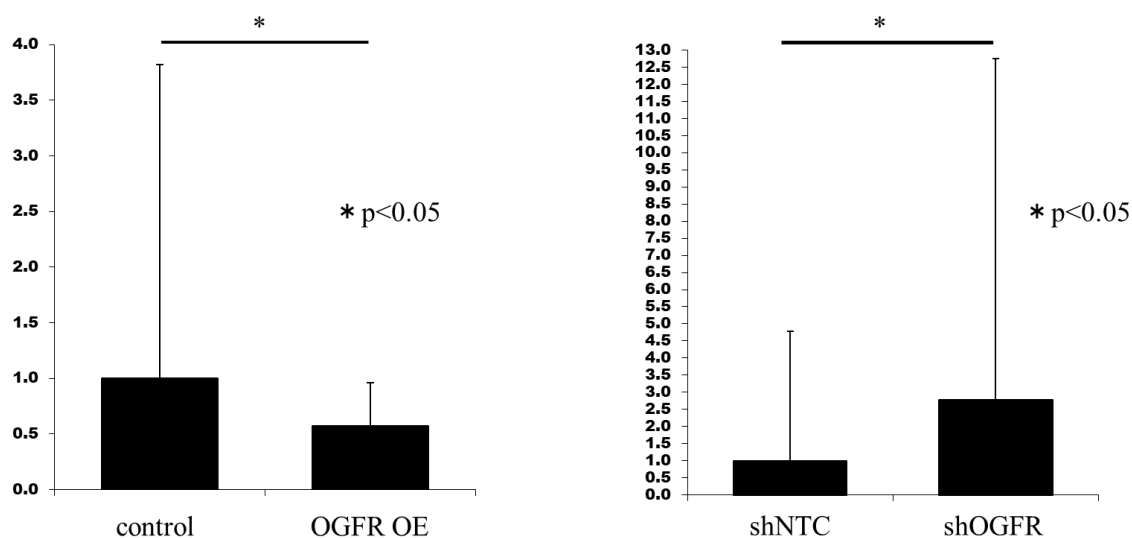


図 19. 相同組み換えアッセイを用いた qPCR による、TFK-1 細胞株における OGFR OE または knocked down の各条件における相同組み換え頻度の定量化の結果を示す。

5-2. FCM による OGFR OE/KD 細胞の細胞周期分布解析

FCM により細胞周期分布を解析した。それぞれの control と比較して、G2/M 期細胞割合は OGFR OE 株で有意に増加し、shOGFR 株では変動を認めなかった。(図 20)

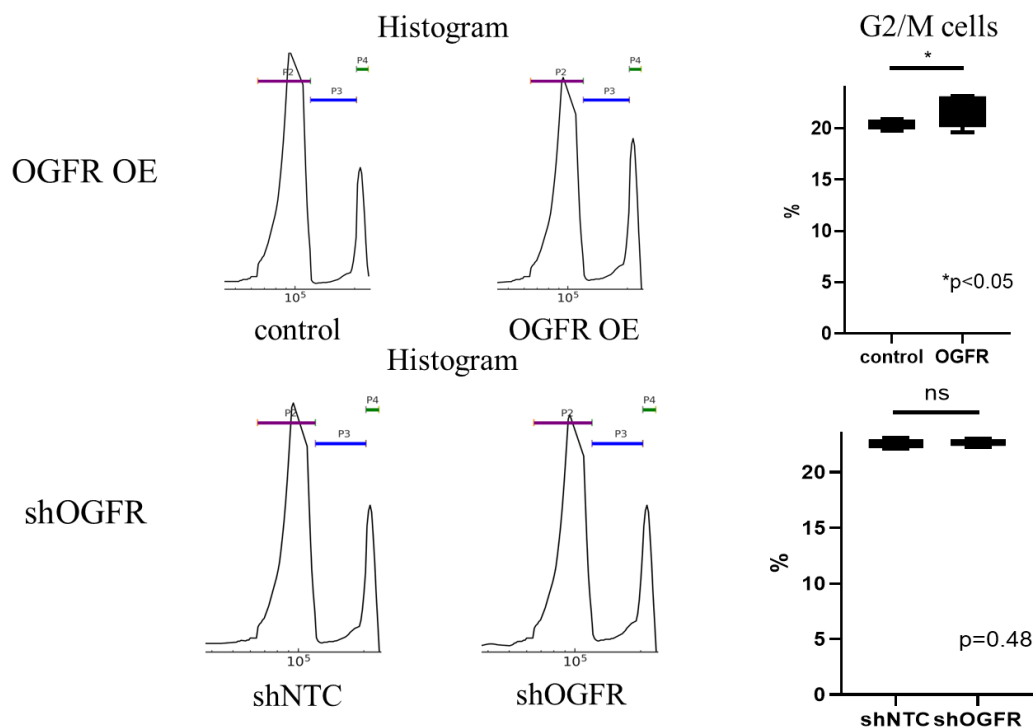


図 20. TFK-1 細胞株における OGFR OE または knocked down の各条件における代表的なヒストグラム、および G2/M 期細胞割合の定量化の結果を示す。

5-3. FCM による OGFR OE/KD 細胞の NIR 投与後のアポトーシス解析

FCM によりアポトーシス細胞の割合を評価した。(図 21)

これらの結果は、OGFR 強制発現が特に NIR 投与下でアポトーシスを促進する一方、OGFR ノックダウンは基礎的アポトーシスを低下させ、NIR のアポトーシス誘導効果を減弱させることを示している。

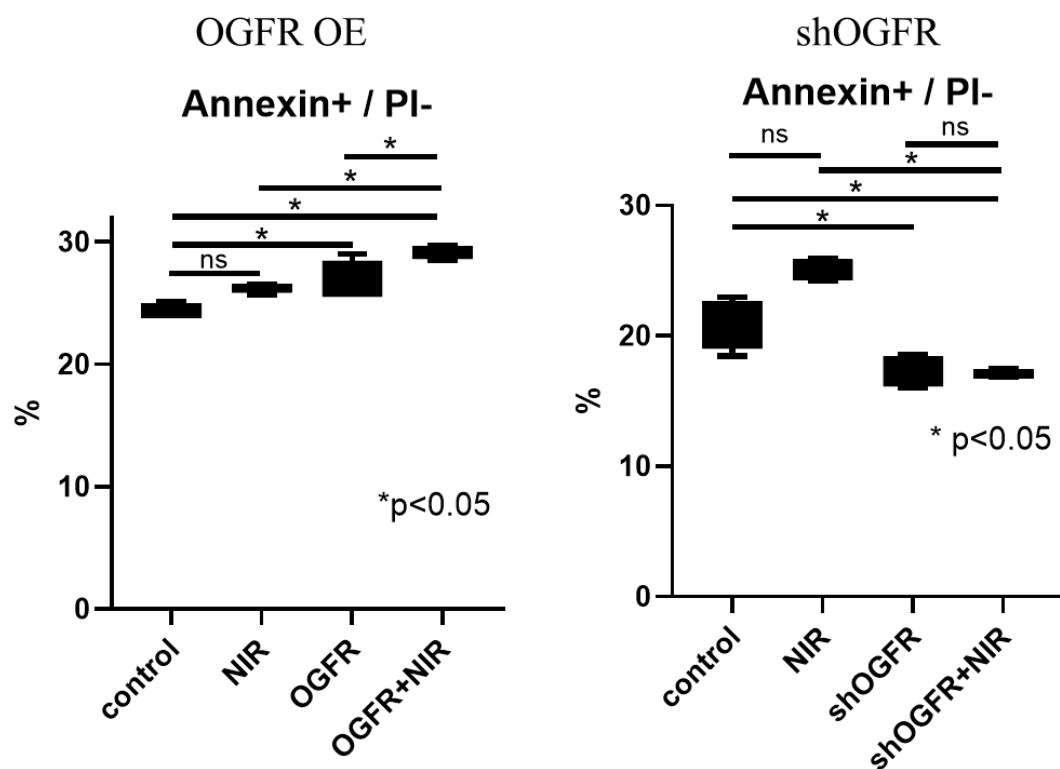


図 21. TFK-1 細胞株における OGFR OE または knocked down の各条件で AnnexinV/PI 共染色後の FCM における Annexin+/PI-のアポトーシス細胞の割合を定量化したグラフを示す。

5-4. 分光光度計による OGFR OE/KO 細胞の NIR 投与後の細胞増殖能評価

NIR 投与の有無で OGFR 操作が細胞増殖に与える影響を検討するため、day 0～day 4 にかけて CCK-8 アッセイを用いて生存率を測定し、day 0 の値を 1 として正規化した。各時点でコントロールに対する NIR 投与と OGFR 操作+NIR 群の比較で検定を行った。(図 22)

OGFR 強制発現は特に NIR 投与下で細胞増殖を抑制する一方、OGFR ノックダウンは shNTC 群と比べて大きな影響を及ぼさないことが示された。

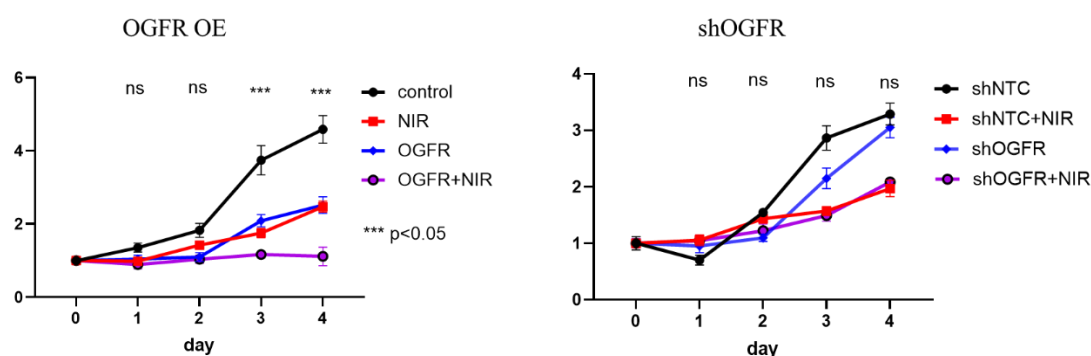


図 22. TFK-1 細胞株における OGFR OE または knocked down の各条件における細胞数の経時的変化を示す。各条件下に、NIR または対照群の DMSO 投与直後を day0 とし、24 時間ごとに CCK-8 を用いた吸光度測定で細胞数を定量化した。

5-5. 分光光度計による OGFR OE/KD 細胞の NIR 投与後の細胞生存率評価

OGFR 発現が NIR 感受性に与える影響を検討するため、濃度依存的な NIR 投与を行い、IC₅₀を算出した。(図 23)

OGFR 強制発現が NIR 感受性を増強し、逆に OGFR ノックダウンは抵抗性を付与することを示す結果であった。

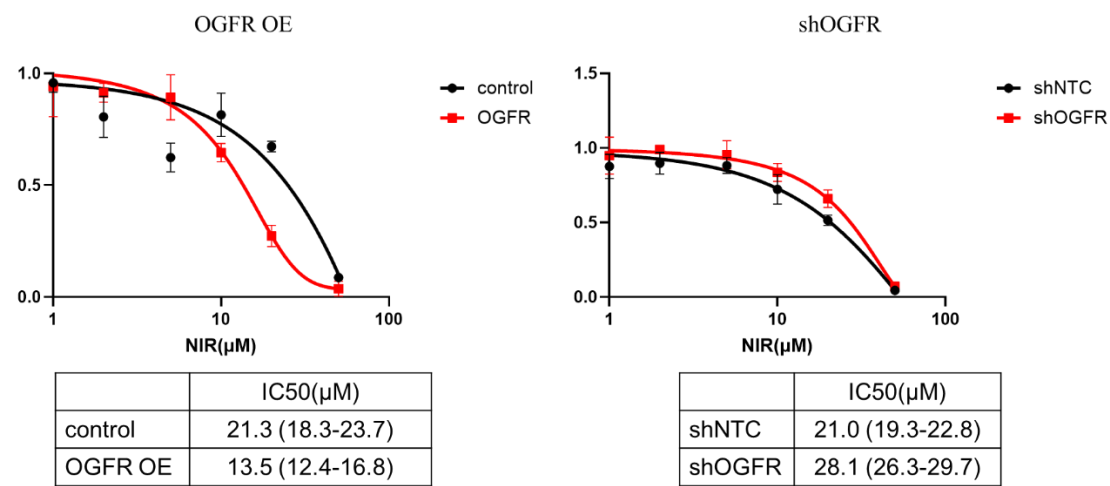


図 23. TFK-1 細胞株における OGFR OE または knocked down の各条件において、濃度別に NIR を投与した 24 時間後の細胞数の定量化の結果、および導出された IC₅₀を示す。

6. DNMT3B ノックダウン後の Reduced representation of bisulfite sequence 解析

前項までに OGFR 高発現が DNMT3B の knockdown によって生じ、さらに細胞周期や相同組み換え頻度、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果増強をもたらすことが判明した。DNA メチル化調節因子である DNMT3B の knockdown による OGFR 高発現の機序を解明するため、TFK-1 に対する DNMT3B knockdown 後の DNA を抽出し、Reduced representation of bisulfite sequencing を行った。

今回の実験では siDNMT3B-3 と siDNMT3B-10 の両者に共通する $FDR < 0.05$ の有意な DMR(Differentially Methylated Region)が少なく、相同組み換え関連および細胞周期調節因子関連のパスウェイ解析を試みたが困難であった。

OGFR 遺伝子の promoter 領域における CpG island のメチル化頻度を比較し、提示する。(図 24)

結果、OGFR の promoter と考えられる chromosome 20 の 62.80M base pair 周辺領域において、siDNMT3B-3 では siNTC と比較し僅かにメチル化の低下が認められるものの、siDNMT3B-10 ではメチル化の低下は認められなかった。

上記結果から、DNMT3B の knockdown による OGFR 高発現の機序は OGFR promoter のメチル化低下作用によるものではないと考えられた。

OGFR – Comprehensive DMR Analysis

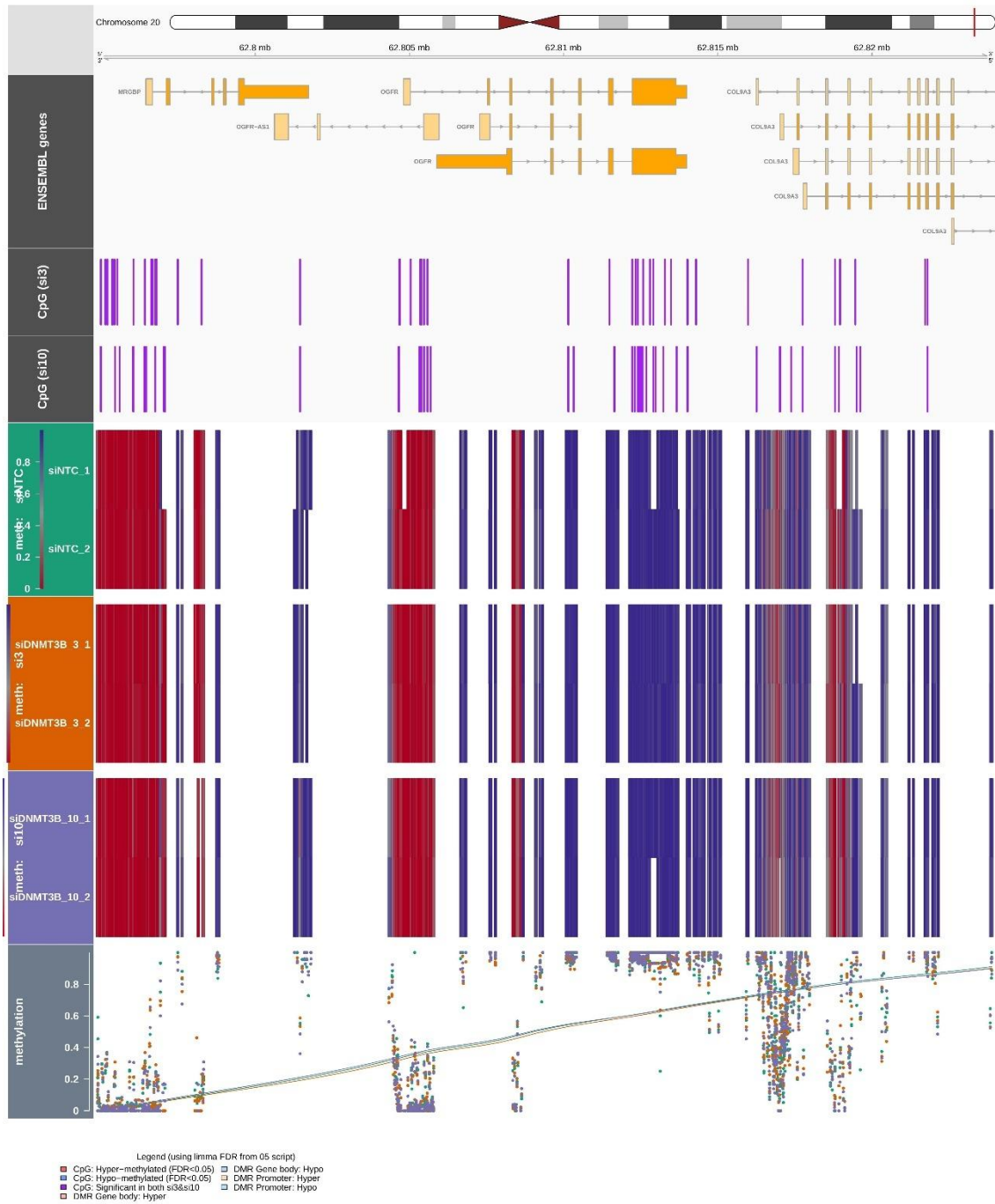


図 24. siDNMT3B(3B-3/3B-10)と siNTC における、chromosome 20 の 62.80M base pair 周辺領域における 5-メチルシトシン量の plot 図。DNMT3B-3/3B-10 に共通する有意な DMR は認められない。

7. DNMT3B ノックダウン後の OGFR プロモーターに対するルシフェラーゼアッセイ

Bisulfite sequence で DNMT3B のノックダウンによる OGFR promoter のメチル化には有意な変動が見られず、DNMT3 の転写調節因子の機能に着目する必要があると考えた。DNMT3B ノックダウン下にルシフェラーゼアッセイを用い、OGFR promoter 活性を評価することとした。各条件の細胞に、OGFR プロモーター領域を有するベクターと空のベクターを投与し、ルシフェラーゼによる蛍光強度を定量評価した。

Dual-Luciferase アッセイの結果、siNTC 群の相対プロモーター活性を 1.0 とした場合、siDNMT3B-3 群では 1.70 ± 1.27 倍、siDNMT3B-10 群では 2.12 ± 1.35 倍に上昇した (mean $\pm$ SD, n=10 図 25)。

両群とも one-way ANOVA および Tukey 多重比較検定で $p < 0.05$ と有意に promoter 活性の上昇を認めた。

以上より、DNMT3B ノックダウンにより OGFR プロモーター活性は上昇し、DNMT3B が OGFR 転写を抑制的に制御している可能性が示唆された。

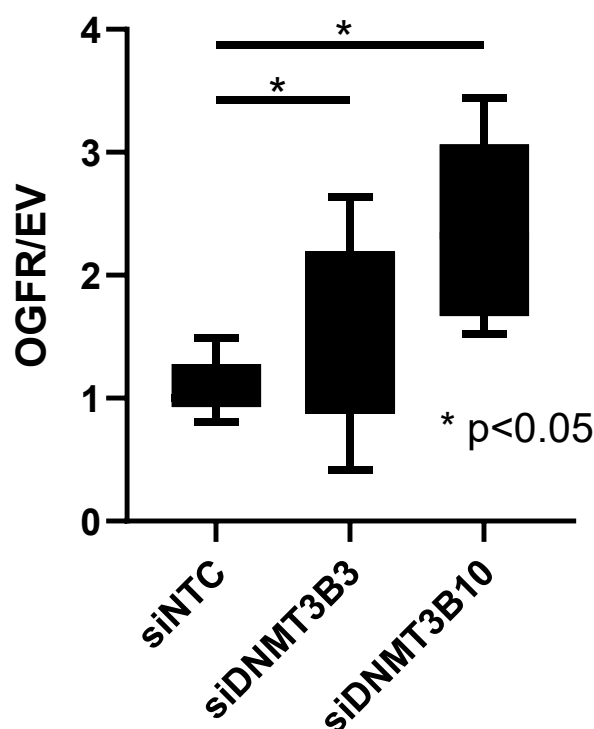


図 25. siDNMT3B(3B3/3B10)と siNTC における、OGFR ベクター/コントロールベクターにおける、ルシフェラーゼの蛍光強度比。siNTC と比較し、siDNMT3B3/siDNMT3B10 とともに有意に OGFR promoter の活性が上昇している。

考察

本研究では、DNMT3B 阻害が、PARP 阻害薬耐性胆道癌細胞株において、OGFR 高発現を介在することで PARP 阻害薬の一つである NIR の抗腫瘍効果を著明に増強することを明らかにした。本研究結果は将来的に胆道癌の新規薬物治療の一つとなり得るものである。

第一に、AZA 単独投与により相同組換え頻度が低下し、NIR 併用時には IC50 の有意な低下およびアポトーシスの増強が認められた。これらの結果は、非小細胞肺癌や血液悪性腫瘍などの基礎研究において、DNA メチル化阻害剤が「BRCAness」表現型を誘導し、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果を高めると報告されている先行研究と整合するものである。(Leone, 2008.)(Jin, 2013.)

第二に、DNMT3B のノックダウンは AZA 処理による表現型を再現し、DNA メチル化抑制と相同組換え機能低下との因果関係を支持した。DNMT3B ノックダウンが最も顕著に相同組換え活性を抑制し、NIR 曝露下でのアポトーシス増強および IC50 低下を引き起こした。一方、DNMT3A や DNMT1 のノックダウンではこれらの効果は軽微であったが、これは siRNA によるノックダウン効率の差に起因する可能性がある。加えて、DNMT3B がクロマチン構造や DNA 修復能の制御において中心的役割を果たすことを示した先行報告とも整合する結果である。(Okano, 1999.)(Baubec, 2015.)さらに DNMT3B は、DNA メチル化酵素としての機能に加え、クロマチン修飾複合体や転写因子との相互作用を介して転写調節因子としても機能することが知られている。(Hervouet, 2009.)このことから、本研究で観察された OGFR 転写変動の一部は、DNMT3B の転写制御機能に起因する可能性が考えられる。

第三に、G2/M 期では Cyclin B-CDK1 活性の上昇や染色体凝縮により BRCA1 や RAD51 の機能が抑制され、HR 修復が能動的かつ構造的に制限されることが報告されている。(Chapman, 2012) 本研究でも、AZA 投与や DNMT3B ノックダウンにより G2/M 期細胞の増加が認められ、こうした細胞周期変化を介した機能的な相同組換え低下が、遺伝子変異を伴わずに PARP 阻害薬感受性を亢進させた可能性が示唆される。

AZA は DNMT 阻害作用に加え、RNA へ直接取り込まれることで翻訳や蛋白合成を阻害することが知られており、DNA メチル化抑制以外にも複数の作用を有する薬剤である。このため、AZA 投与や DNMT3B ノックダウンで PARP 阻害薬感受性増強という表現型が共通していた一方、分子レベルでは必ずしも完全に一致しない可能性が考えられる。実際、本研究では AZA 処理により OGFR の有意な発現上昇は認められず、AZA と DNMT3B ノックダウンが部分的に異なる分子機序を介して HR 低下および PARP 阻害薬感受性増強をもたらしている可能性が示唆された。

第四に、全ゲノム RNA sequencing 解析により、DNMT3B ノックダウン後に共通して発現上昇する遺伝子として OGFR が同定された。機能解析の結果、OGFR 過剰発現

は HR 活性を抑制し、アポトーシスを促進し、NIR 感受性を増強した。一方、OGFR ノックダウンでは逆の効果が認められ、OGFR が胆道癌における HR 機能および PARP 阻害薬感受性の新たな調節因子として機能する可能性が示された。OGFR は従来、G0/G1 期チェックポイントの制御因子として知られているが、本研究では軽度の G2/M 期集積も観察されており、DNA 損傷応答の変化を介した間接的な細胞周期制御の関与が示唆される。(Zagon, 2009.) (Zagon, 2000.)

さらに、OGFR 遺伝子座の Bisulfite sequencing では有意な CpG メチル化変化は認められず、OGFR 発現上昇はプロモーター領域の直接的脱メチル化によるものではないと考えられた。DNMT3B の転写共制御機能およびルシフェラーゼアッセイの結果を総合すると、DNMT3B は OGFR プロモーター活性に抑制的に作用しており、DNMT3B 喪失後の OGFR 発現上昇は、非典型的な DNMT3B 依存性転写調節機構を介して生じた可能性が高い。

本研究で観察された細胞死は、HR 低下と PARP 阻害薬併用による合成致死が主因と考えられるが、G2/M 期細胞増加を介することから、有糸分裂破綻 (mitotic catastrophe) を介した細胞死も一部関与している可能性がある。Mitotic catastrophe は必ずしも即時のアポトーシスに至るとは限らず、ネクローシスや細胞老化といった表現型を呈することも知られている。このため、本研究で用いたアポトーシス評価のみでは細胞死様式を完全に評価できていない可能性があり、今後は他の評価系を用いた詳細な解析が必要である。

臨床的観点から、本研究の成果は重要な意義を有する。PARP 阻害薬は相同組換え関連遺伝子変異を有する胆道癌患者において有効性が期待されるが、BRCA1/2 変異は稀であり、治療対象は限定的である。(Qurashi, 2025.)本研究は、DNMT3B 阻害および OGFR 発現上昇が遺伝子変異を伴わずに HR 機能低下をもたらすことを示しており、相同組換え欠損を有さない胆道癌に対しても PARP 阻害療法の適応拡大につながる可能性を示唆する。

一方、本研究にはいくつかの限界が存在する。全ての実験は 2 種類の胆道癌細胞株を用いた in vitro 系で実施しており、腫瘍微小環境を完全に反映したものではない。また、RNA sequencing 解析では有意な発現変動遺伝子数が限られており、DNMT3B 喪失後の分子変化を体系的に捉えるには至っていない。OGFR 高発現における表現型は DNMT3B ノックダウンには劣り、OGFR 以外の候補遺伝子も機能の検討が必要である。さらに、本研究では PARP 阻害薬以外の DNA 損傷応答関連薬剤との併用効果を評価しておらず、今後さらなる合成致死的相互作用の解明が求められる。

今後は、DNMT 阻害と PARP 阻害薬の併用効果を in vivo モデルで検証するとともに、OGFR 発現を治療効果予測バイオマーカーとして応用する可能性を検討する必要がある。最終的には、DNMT 阻害薬と PARP 阻害薬併用療法が胆道癌患者の治療選択肢を拡大し得るかを、臨床試験を通じて明らかにすることが期待される。

総括及び結論

本研究において、以下の知見が得られた。

- ・ PARP 阻害薬耐性胆道癌細胞株において、DNA メチル化阻害薬である 5-アザシチジンを併用することで、PARP 阻害薬であるニラパリブ投与における細胞周期変化、相同組み換え頻度の低下、および抗腫瘍効果増強が確認された。
- ・ DNMT3B のノックダウンによって、5-アザシチジン投与と同様に、ニラパリブ投与における細胞周期変化、相同組み換え頻度の低下、および抗腫瘍効果増強が確認された。
- ・ 全ゲノム RNA sequencing によって、DNMT3B ノックダウンに共通して OGFR の発現上昇が確認された。
- ・ OGFR の強制発現によって、5-アザシチジン投与や DNMT3B ノックダウンと同様に、ニラパリブ投与における細胞周期変化、相同組み換え頻度の低下、および抗腫瘍効果増強が確認された。
- ・ DNMT3B ノックダウン下の Bisulfite sequencing では OGFR 遺伝子座の promoter 領域の有意なメチル化変動は認めなかった。
- ・ DNMT3B ノックダウン下の OGFR promoter に対するルシフェラーゼアッセイにより、DNMT3B が OGFR 転写調節に抑制的に働くことが確認された。

上記は全て、本研究において新たに発見された知見である。

他癌種の基礎研究結果で認めた DNA メチル化阻害薬と PARP 阻害薬の相乗的な治療効果増強が胆道癌細胞株でも確認できたことから、あらたな薬物治療開発の可能性が示唆された。

また、DNMT3B のノックダウンにおいて DNA メチル化阻害薬と同様の効果が確認され、さらに関連する因子として OGFR 高発現が同定されたことから、相同組み換え阻害薬治療のあらたな機序解明や治療効果予測のための新規バイオマーカー開発に繋がる可能性がある。

今後は PARP 阻害薬耐性胆道癌のマウスモデルの開発、およびそれに対する DNMT 阻害薬と PARP 阻害薬併用療法の治療効果についての実験、また OGFR 発現調整による治療効果変動についても実験を行い、臨床応用を目指す方針である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：川久保和道助教には、本研究の発案から完成までの全期間にわたり、基礎研究における実験手技指導、データ解析指導、論文作成指導と多大なる御指導を頂きました。深謝いたします。

同教室：田中秀五先生には、RNA sequencing および Bisulfite sequencing における大規模データの解析において多大な御助力を頂きました。深謝いたします。

同教室：栗谷将城講師、杉浦諒助教、米村洋輝先生、野澤俊一郎先生、白鳥翔也先生、中嶋克磨先生には、日常診療業務と本研究に関する実験において技術指導や、論文作成の御指導にご尽力いただきました。深謝いたします。

2026 年 3 月

小田 総一郎

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abbotts R, Topper MJ, Biondi C, et al. DNA methyltransferase inhibitors induce a BRCAness phenotype that sensitizes NSCLC to PARP inhibitor and ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(45):22609–18.
- Akalin A, Kormaksson M, Li S, et al. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol* 2012;13(10):R87.
- Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020;17(9):557–88.
- Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, et al. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature* 2015;520(7546):243–7.
- Brown TJ, Reiss KA. PARP inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer J* 2021;27(6):465–75.
- Chapman JR, Sossick AJ, Boulton SJ, Jackson SP. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J Cell Sci.* 2012 Aug 1;125(Pt 15):3529-34.
- Elvevi A, Laffusa A, Scaravaglio M, et al. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: an updated comprehensive review. *Ann Hepatol* 2022;27(5):100737.
- Florio AA, Ferlay J, Znaor A, et al. Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012. *Cancer* 2020;126(11):2666–78.
- Hervouet E, Vallette FM, Cartron P-F. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 2009;4(7):487–99.
- Iannantuono GM, Chandran E, Floudas CS, et al. Efficacy and safety of PARP inhibitors in metastatic castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Cancer Treat Rev* 2023;120(102623):102623.

- Ishiyama S, Nishiyama A, Saeki Y, et al. Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin Mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance. *Mol Cell* 2017;68(2):350-360.e7.
- Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013;754:3–29.
- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(3):452–8.
- Koay EJ, Odisio BC, Javle M, Vauthey J-N, Crane CH. Management of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: how do we decide among the various liver-directed treatments? *Hepatobiliary Surg Nutr* 2017;6(2):105–16.
- Kubo S, Shinkawa H, Asaoka Y, et al. Liver Cancer Study Group of Japan clinical practice guidelines for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Liver Cancer* 2022;11(4):290–314.
- Leone G, D’Alò F, Zardo G, Voso MT, Nervi C. Epigenetic treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Curr Med Chem* 2008;15(13):1274–87.
- Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016;16(2):110–20.
- McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40(10):4288–97.
- Muvarak NE, Chowdhury K, Xia L, et al. Enhancing the cytotoxic effects of PARP inhibitors with DNA demethylating agents - A potential therapy for cancer. *Cancer Cell* 2016;30(4):637–50.
- Oh D-Y, Lee K-H, Lee D-W, et al. Gemcitabine and cisplatin plus durvalumab with or without tremelimumab in chemotherapy-naïve patients with advanced biliary tract cancer: an open-label, single-centre, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2022;7(6):522–32.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*

- 1999;99(3):247–57.
- Qurashi M, Vithayathil M, Khan SA. Epidemiology of cholangiocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2025;51(2):107064.
- Renteria Ramirez DE, Knøfler LA, Kirkegård J, et al. Prognosis related to treatment plan in patients with biliary tract cancer: A nationwide database study. *Cancer Epidemiol* 2024;93(102688):102688.
- Ricci AD, Rizzo A, Bonucci C, et al. PARP inhibitors in biliary tract cancer: A new kid on the block? *Medicines (Basel)* 2020;7(9):54.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26(1):139–40.
- Shao F, Duan Y, Zhao Y, et al. PARP inhibitors in breast and ovarian cancer with BRCA mutations: a meta-analysis of survival. *Aging (Albany NY)* 2021;13(6):8975–88.
- Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66(5):2794–800.
- Sun X, Liu J, Zhang W, et al. Disease burden of biliary tract cancer in 204 countries and territories, 1990–2021: A comprehensive demographic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Chin Med J (Engl)* 2024;137(24):3117–25.
- Vogel A, Sahai V, Hollebecque A, et al. An open-label study of pemigatinib in cholangiocarcinoma: final results from FIGHT-202. *ESMO Open* 2024;9(6):103488.
- Wagner GP, Kin K, Lynch VJ. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci* 2012;131(4):281–5.
- Wardell CP, Fujita M, Yamada T, et al. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *J Hepatol* 2018;68(5):959–69.
- Yagi M, Kabata M, Tanaka A, et al. Identification of distinct loci for de novo DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B during mammalian development. *Nat Commun* 2020;11(1):3199.

Zagon IS, Donahue RN, McLaughlin PJ. Opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis is a physiological determinant of cell proliferation in diverse human cancers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297(4):R1154-61.

Zagon IS, Roesener CD, Verderame MF, Ohlsson-Wilhelm BM, Levin RJ, McLaughlin PJ. Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 2000;17(5):1053–61.