

## Abstract

The highest incidence of cholangiocarcinoma (CCA) has been reported in the northeastern region of Thailand. Most patients are diagnosed at an advanced stage of disease in which the current medical treatments are ineffective. Therefore, the survival rate of CCA patients is relative poor. Thus, the discovery of new prognostic markers as well as the therapeutic targets are urgently needed. Previous studies have been reported that LAT1 and its associating protein 4F2hc were upregulated and associated with poor prognosis in various human cancers, suggesting their prognostic values in tumors. However, the information on LAT1 and 4F2hc expressions in Thai CCA tissues as well as their roles in CCA are limited. We, therefore, evaluated the prognostic significance of LAT1 and 4F2hc in 127 Thai ICC patients by using immunohistochemistry analysis. We found that LAT1 expression pattern was similar to that of 4F2hc. Interestingly, co-expression of LAT1 together with 4F2hc was significantly correlated with various clinicopathological factors compared to either the expression LAT1 or 4F2hc. Moreover, co-expression of LAT1 and 4F2hc was significantly related with shorter survival time of patients. However, from multivariate analysis, only TNM stage exhibited independent prognostic value. Therefore, to use LAT1 and 4F2hc as prognostic markers for CCA patient, the expression of LAT1 and 4F2hc together with other clinicopathological parameters are suggested. Roles of LAT1 was examined by using lentiviral shRNA mediating LAT1 knockdown in KKU-M213 cells, a cell line-derived from Thai CCA patient. Stable LAT1 knockdown suppressed the proliferative indefinitely properties, but did not alter cell proliferation as demonstrated by clonogenic assay and BrdU staining, respectively. In consistent, transient silencing LAT1 had no effect on cell proliferation but significantly suppressed cell invasion and migration. Most interestingly, LAT1 knockdown resulted in reduction the expression of its associating protein, 4F2hc, however, the expression of 4F2hc associating proteins, xCT, GLUT1 and  $\beta$ 1-integrin was not altered. In addition, the expression of the negative 4F2hc regulator gene, miRNA-7 was significantly increased in transient LAT1 knockdown CCA cells. Lastly, the phosphorylation levels of Akt, p70S6K and ERK1/2 were inhibited in LAT1 knockdown KKU-M213 cells. Taken together, our results indicate that suppression of CCA cell survival and motility may be partly through the miRNA-7-related signaling pathways. Based on this finding, LAT1 and 4F2hc has a potential to be develop as prognostic biomarkers and therapeutic targets for CCA.

## บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ ซึ่งอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้พบมากที่สุดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนใหญ่คนไข้จะถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิดนี้เมื่อโรครอยู่ในระยะที่รุนแรง ซึ่งจะต้องรักษาด้วยยาฆ่ามะเร็ง ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ การค้นคว้าหาตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคและเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษาจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวขนส่งกรดอะมิโนแอลเอที 1 (LAT1) และโปรตีนที่ทำงานร่วม 4F2hc สูง ระดับการแสดงออกของ LAT1 และ 4F2hc ที่สูงจะมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ระดับการแสดงออกของ LAT1 และ 4F2hc เป็นตัวพยากรณ์โรคมะเร็ง แต่ปัจจุบันยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนทั้งตัวนี้ในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทย ตลอดจนบทบาทและกลไกที่เกี่ยวข้องในการดำเนินโรคของมะเร็งท่อน้ำดี จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน LAT1 และ 4F2hc ในชิ้นเนื้อของมะเร็งท่อน้ำดีชนิด intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) จากคนไข้คนไทยจำนวน 127 ราย ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าระดับการแสดงออกของ LAT1 มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ 4F2hc การแสดงออกร่วมกันของ LAT1 และ 4F2hc มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกมากกว่าการแสดงออกของ LAT1 หรือ 4F2hc เพียงอย่างเดียว ที่สำคัญการแสดงออกร่วมกันของทั้ง LAT1 และ 4F2hc มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการมีชีวิตรอดที่สั้นของคนไข้ จากการวิเคราะห์แบบ multivariate analysis พบว่าระดับการแสดงออกของ LAT1 และ 4F2hc เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้เป็นตัวพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีได้ จึงเสนอแนะให้ใช้ร่วมกับปัจจัยทางคลินิกอื่น บทบาทของ LAT1 ต่อการดำเนินโรคของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีศึกษาโดยลดการแสดงออกของ LAT1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่พัฒนามาจากคนไข้คนไทย การลดการแสดงออกของ LAT1 แบบถาวรยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างไร้ขีดจำกัดหรือความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ สอดคล้องกับผลการทดลองจากการลดการแสดงออกของ LAT1 แบบชั่วคราว ซึ่งไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่มีผลยับยั้งการบุกรุกและการแพร่กระจายของเซลล์ KKU-M213 ที่สำคัญยังพบว่าระดับการแสดงออกของ 4F2hc ลดลงในเซลล์ที่ลดการแสดงออกของ LAT1 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนที่อาศัยการทำงานร่วมกับโปรตีน 4F2hc คือ xCT, GLUT1 และ  $\beta$ 1-integrin นอกจากนี้ยังพบว่าการลดการแสดงออกของ 4F2hc พบร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของ miRNA-7 ซึ่งปกติทำหน้าที่ลดการแสดงออกของ 4F2hc การลดการแสดงออกของ LAT1 ลดการทำงานของ Akt, p70S6K และ ERK1/2 จากผลการศึกษาทั้งหมดอาจกล่าวได้ว่า LAT1 ยับยั้งคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในการเจริญเติบโตอย่างไร้ขีดจำกัด การบุกรุกและแพร่กระจาย อย่างน้อยอาจผ่านการยับยั้งการทำงานของกลไกที่เกี่ยวข้องกับ miRNA-7 ดังนั้นการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้โปรตีนตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT1 เป็นตัวพยากรณ์และเป้าหมายของการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี