

*In vitro* and *in vivo* studies on the association of long non-coding RNAs H19 and urothelial cancer associated 1 with the susceptibility to 5-fluorouracil in rectal cancer

直腸癌における long non-coding RNA H19 および urothelial cancer associated 1 の発現と 5-fluorouracil に対する感受性の関連についての *in vitro* および *in vivo* 研究

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 横山 康行

International Journal of Oncology (2019) 掲載予定

局所進行直腸癌に対して5-Fluorouracil (5FU)やそのプロドラッグを用いた術前化学療法(NAC)が行われている。しかしながら、その感受性の予測は困難である。近年、200塩基以上からなる、蛋白質をコードしない long non-coding RNA (lncRNA)と癌の抗癌剤に対する感受性の関連が報告されている。しかし、直腸癌の5FUに対する感受性を予測する有用な lncRNA は見出されていない。本研究では、大腸癌細胞株を用いて5FUの感受性と関連する lncRNA の網羅的探索を行い、さらに NAC を行った局所進行直腸癌の症例を用いて lncRNA の有用性について検討した。

検討には、大腸癌細胞の親株 (HCT116/p、DLD-1/p、SW480/p) を用いた。これらの細胞に5FUを反復して負荷することにより、HCT116/5fu、DLD-1/5fu、SW480/5fuを作成した。各細胞株の5FUの50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)と、5FUが細胞増殖に与える影響を調べた。DLD-1/pとDLD-1/5fuのlncRNAの発現について網羅的解析とバイオインフォマテック解析から、5FUに対する感受性に関連する lncRNA の探索を試みた。探索された lncRNA の細胞株における発現量を RT-qPCR で定量した。探索された lncRNA の標的蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した。

次に、術前に NAC を行った直腸癌症例について lncRNA の発現と感受性について検討した。NACの組織学的効果は大腸癌取扱い規約に従って判定し、Grade 0と1aを poor response、Grade 1bと2を favorable response とした。NAC前の生検組織とNAC後の切除組織のパラフィン包埋ブロックから RNA を抽出し、lncRNA の発現量を RT-qPCR で定量した。切除組織の lncRNA の発現量(resection)を生検組織の発現量(biopsy)で除した値を Resection/biopsy ratio と定義し、階層分析により、NACの感受性と ratio の関連を検討した。

その結果、5FUのIC<sub>50</sub>は、HCT116/pが4.5 μM、DLD-1/pが6.4 μM、SW480/pが3.5 μMで、HCT116/5fuが2.0 μM、DLD-1/5fuが103.8 μM、SW480/5fuが26.2 μMであり、DLD-1/5fuとSW480/5fuのIC<sub>50</sub>は高値であった。また、5FU負荷により親株とHCT116/5fuの細胞増殖は抑制されたが、DLD-1/5fuとSW480/5fuでは抑制されなかった。これらのことから、DLD-1/5fuとSW480/5fuは5FU耐性と考えられた。

DLD-1/p と DLD-1/5fu における 84 種類の lncRNA の発現を解析したところ、DLD-1/p と比較して DLD-1/5fu で H19 と urothelial cancer associated 1 (UCA1)、TERC の発現量が半分以下であった。Ingenuity Pathway Analysis を用いると、H19 と UCA1 が直腸癌の 5FU 感受性と関連する lncRNA の候補と考えられた。

各細胞の H19 と UCA1 の発現量を定量したところ、発現量と 5FU に対する感受性との関連は認めなかった。一方、5FU 負荷前と負荷後の H19 と UCA1 の発現量の比率 (5FU-treated/untreated ratio) は、5FU 耐性の DLD-1/5fu と SW480/5fu ではいずれも低かったが、5FU 感受性の 3 つの親株と HCT116/5fu ではいずれかの 5FU-treated/untreated ratio が高かった。つまり、5FU 耐性株では 5FU 負荷前後で H19 と UCA1 の発現の変化が少なかった。

H19 と UCA1 の標的蛋白である Rb と p27kip1 の発現をウエスタンブロット法で解析したところ、5FU 耐性の DLD-1/5fu と SW480/5fu では 5FU 負荷により変化しなかったが、5FU 感受性の親株と HCT116/5fu では 5FU 負荷により抑制された。

NAC を行った直腸癌症例 31 例で H19 と UCA1 の発現量を定量した。切除組織と生検組織における H19 と UCA1 の発現量の比率 (Resection/biopsy ratio) を用いて階層分析を行ったところ直腸癌症例は 3 つの cluster に分けられた。H19 と UCA1 のいずれの Resection/biopsy ratio も低い cluster では、poor response が 17 例中 11 例(65%)であったが、H19 または UCA1 の Resection/biopsy ratio が高い cluster では、14 例中 4 例(29%)であった(p=0.045)。

本研究は、大腸癌において 5FU 負荷前の H19 と UCA1 の発現量ではなく、5FU 負荷前と後の発現の変化率が 5FU に対する感受性と密接に関連することを *in vitro* と *in vivo* で初めて明らかにした。今回、大腸癌細胞株において、5FU 負荷 48 時間後に、H19 と UCA1 の発現の変化を認めたことから、ヒト直腸癌症例においても NAC 後早期に発現が変化している可能性がある。NAC 後早期に生検を行い、H19 と UCA1 の発現の変化を確認することで、NAC 後早期の効果予測が可能と思われるため、更なる検討を行ってきたい。