

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

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、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 (IC50) 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。

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、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 後の切除組織から RNA を抽出し、切除組織の lncRNA の発現量を生検組織の発現量で除した値を Resection/ biopsy ratio と定義し、NAC の感受性と ratio の関連を検討した。

その結果、5FU の IC50 は、HCT116/p が 4.5 μ M、DLD-1/p が 6.4 μ M、SW480/p が 3.5 μ M で、HCT116/5fu が 2.0 μ M、DLD-1/5fu が 103.8 μ M、SW480/5fu が 26.2 μ M であり、DLD-1/5fu と SW480/5fu の IC50 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。

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。また 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 の発現は、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 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) を用いると、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)。

二次審査においては、今後、生検よりも低侵襲の検査方法の展望についての質問があり、現在、血液による検査法を研究中であると回答した。また Resection/ biopsy ratio の値と効果に関する質問があったが、細胞レベルでは ratio が高い場合、効果的であったが、ヒトでは一定の傾向は見いだせなかったとの回答であった。さらに H19 と UCA1 が共に高発現している例が無いことを質問されたが、両者は排他的関係と予測しているとの回答であった。何れの質問に対しても簡潔明瞭的確に回答された。

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 で初めて証明した重要な研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。