

学 位 論 文 要 旨

氏 名 横田 和子



論 文 題 目

「WiNTRLINC1/Ascl2/c-myc axis characteristics of colon cancer with
differentiated histology at young onset and essential for cell viability.」

(WiNTRLINC1/Ascl2/c-myc 分子経路は若年発症の分化型結腸癌において特有のもので
あり細胞生存に必須である.)

指 導 教 授 承 認 印

比企直樹



WiNTRLINC1/Ascl2/c-myc axis characteristics of colon cancer with differentiated histology at young onset and essential for cell viability.

(WiNTRLINC1 / Ascl2 / c-myc 分子経路は若年発症の分化型結腸癌において特有のものであり細胞生存に必須である.)

氏名 横田 和子

【背景】

大腸癌は最も罹患率の高い癌の一つであり、リンパ節や遠隔臓器に転移すると予後不良となる。したがって放射線治療を含む集学的な抗癌療法が進行再発大腸癌に対して行われるが、症例によっては治療抵抗性や重篤な有害事象を示すことがあり、治療法の選択に有用なバイオマーカーの開発や、治療抵抗性に関与する分子メカニズムの解明が求められている。

最近我々は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるフェニルブチレートを用いて薬剤耐性に関与する遺伝子を同定するための包括的探索モデルを開発した。乳癌においてこのモデルを用いて *Zeb1* 遺伝子を同定し薬剤耐性に関与することが確認された。同様のモデルで大腸癌においては *Achaete-scute complex homolog 2 (Ascl2)* 遺伝子が薬剤耐性に関与していることが示された。

Ascl2 遺伝子は腸粘膜の陰窩における動的幹細胞マーカーであり、大腸癌において Wnt 経路増幅の中心分子である。さらに大腸癌において新しく同定された長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) である *WiNTRLINC1* が、*Ascl2* 遺伝子発現を誘導し 2 分子の positive feedback が Wnt 経路増強の中心的役割を果たすことが報告された。

一方で大腸癌における *WiNTRLINC1* 遺伝子発現とその臨床的意義を証明する報告は未だなく、本研究では原発性結腸癌における *WiNTRLINC1* 遺伝子発現に加え *Ascl2* 遺伝子やその他の Wnt 経路関連遺伝子 (*c-myc*, *PRL-3*) 及び大腸癌の進展に重要と報告されている lncRNA (*HOTAIR*, *MALAT1*, *H19*) 遺伝子発現について、それらの臨床的関連とその意義について調べ報告する。

【対象・方法】

・患者と検体の収集, RNA 抽出

2018 年 2 月から 2019 年 3 月に北里大学病院外科で結腸切除を受けた 40 人の連続した原発性結腸癌患者から癌組織と非癌組織を手術中速やかに採取し, RNA を抽出した。8 種類の大腸癌細胞株からも同様に RNA を抽出した。

・Wnt 経路関連遺伝子と lncRNA の発現

WiNTRLINC1 遺伝子, *Ascl2* 遺伝子に加え, Wnt 経路の活性化に特に重要と報告されている *c-myc* 遺伝子, *PRL-3* 遺伝子, さらに lncRNA である *H19* 遺伝子, *MALAT1* 遺伝子, *HOTAIR* 遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR 法, TaqMan probe を用いた定量的 RT-PCR (Q-PCR) 法で調べ, 臨床病理学的因子との関係を比較した。

・SiRNA を用いた *WiNTRLINC1* 発現抑制と化学療法感受性の変化についての検討

2 種類の siRNA を大腸癌細胞株にそれぞれ導入し, *WiNTRLINC1* 発現レベルを測定した。またノックダウン後の細胞を 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 5-FU または CPT-11 に 48 時間曝露し, 細胞生存率を測定した。

【結果】

・ *WNTRLINC1* 発現と臨床的意義

臨床検体での発現を Q-PCR 法で調べると、対応する非癌粘膜よりも癌粘膜で有意に高かった ($p = 0.0005$)。臨床病理学的因子である pT、pN、pM、及び pStage では *WNTRLINC1* 発現に有意な差は認めなかったが、pStage III の患者では、pStage II の患者に比較してわずかに高かった。

・ *Ascl2* 発現と臨床的意義

大腸癌細胞株において *Ascl2* 発現は *WNTRLINC1* 発現と有意に相関し、臨床検体においては対応する非癌粘膜よりも癌粘膜で有意に高かった ($p < 0.0001$)。 *Ascl2* 発現は、癌粘膜と非癌粘膜の両方で *WNTRLINC1* 発現と強く相関しており ($r = 0.72$, $p < 0.0001$)、さらに臨床病理学的因子では若年発症 ($p = 0.038$) および組織学的分化度 ($p = 0.031$) と有意に相関していた。 *WNTRLINC1* 発現はこれら 2 つの因子と有意な相関は認めなかったが、傾向は同様であった。

・ Wnt 関連遺伝子 (*c-myc*, *PRL-3*) 発現と臨床的意義

WNTRLINC1 / *Ascl2* 経路は大腸癌の Wnt 経路活性化に関与し、*c-myc* と *PRL-3* は代表的な Wnt 関連遺伝子である。 *c-myc* 遺伝子は β -catenin により活性化され、*PRL-3* 遺伝子は β -catenin と結合してその転写活性を高めることが報告されている。いずれもその発現は対応する非癌粘膜よりも癌粘膜で有意に高く、臨床病理学的因子において *c-myc* 発現は若年発症と有意に相関していた ($p = 0.0003$)。組織学的分化度と有意な相関は認めなかったが傾向は *Ascl2* と類似し、癌と非癌粘膜の両方で *Ascl2* ($r = 0.72$, $p < 0.0001$) または *WNTRLINC1* と強く相関していた ($r = 0.50$, $p < 0.0001$)。またリンパ管侵襲とも有意に相関していた。したがって *WNTRLINC1* によって活性化される *WNTRLINC1* / *Ascl2* / *c-myc* 経路は、若年発症の分化型結腸癌の初期腫瘍形成で高率に活性化されていると考えられた。

臨床病理学的因子における *PRL-3* 発現に有意差は認めなかったが、*PRL-3* 発現と *WNTRLINC1* / *Ascl2* / *c-myc* 経路の発現には密接な関連を認めた。

・ lncRNA の発現と臨床的意義

大腸癌細胞株において、RT-PCR 法にて *H19* 発現は DLD1 細胞でのみ発現が認められたが、*MALAT1* 発現は 8 種類すべてで同程度の発現を認めた。 *HOTAIR* 発現は Colo320 細胞で最も高く、臨床検体では癌粘膜での発現はわずかであり有意差を示さず、臨床病理学的因子との関連も認めなかった。 *H19* 発現は、癌粘膜において対応する非癌粘膜よりも有意に高かった ($p = 0.023$)。発現が最も高かった症例は巨大な未分化腫瘍であった。未分化な組織型 ($p = 0.016$) および腫瘍サイズ ($p = 0.0048$) と有意な相関を認め、最も高発現を示した 3 例はすべて右側結腸の女性であった。

・ Colo320 細胞における *WNTRLINC1* 遺伝子発現ノックダウンと下流遺伝子変化

Q-PCR 法で 2 種類の SiRNA による Colo320 細胞での *WNTRLINC1* 発現の有意な阻害を確認

した．発現の変化は *Ascl2* / *c-myc* 発現低下を伴い，*WiNTRLINC1* は結腸癌細胞の *Ascl2* / *c-myc* 過剰発現の上流にあることを示唆し，*c-myc* では低下の程度が中程度であったことから，*Ascl2* が *WiNTRLINC1* の強い関係を有する標的であり，*c-myc* は他の因子にも影響されることを示唆している．一方 *PRL-3* 発現は有意に増強し，*PRL-3* は結腸癌において *WiNTRLINC1* / *Ascl2* 経路を抑制していると考えられた．

・ Colo320 細胞における *WiNTRLINC1* 遺伝子発現ノックダウンと細胞生存率

WiNTRLINC1 をノックダウンした Colo320 細胞の化学療法感受性を調べた．細胞を 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 5-FU および CPT-11 に 48 時間暴露し *WiNTRLINC1* 発現を調べるとノックダウンのみでもいずれの濃度でも，それぞれの scr と比較してほぼすべての濃度で細胞生存率を強力に抑制した．

【考察】

大腸癌細胞において lncRNA である *WiNTRLINC1* は，*TCF4* / β -*catenin* と相互作用し，*WiNTRLINC1* 遺伝子と 60kb 離れた位置に存在し腸管幹細胞の運命決定転写因子として知られる *Ascl2* 遺伝子の空間的配置を近接させ，両者の遺伝子発現の positive feedback をもたらしことで Wnt 経路活性化を増幅することが分かっている．しかし大腸癌における *WiNTRLINC1* 発現の臨床的関連性を説明する報告はなく，我々の研究は臨床検体において *WiNTRLINC1* の過剰発現を示し，さらに若年発症の分化型結腸癌に特有であることを見出した．

Ascl2 発現は *WiNTRLINC1*，*c-myc* と強く関連し，*Ascl2* 遺伝子の上流と下流で直接関連していることが考えられたが，*WiNTRLINC1* 遺伝子ノックダウン実験で *Ascl2* は著明に発現が抑制され *c-myc* は弱く発現が抑制されており，臨床検体の相関から予想される結果であった．

Ascl2，*c-myc*，*PRL-3*，*H19* および *HOTAIR* 発現については，リンパ節転移と有意な相関を示す報告があるが本研究では証明できなかった．*Ascl2* に関しては以前の報告で転移リンパ節と癌組織を比較し転移部位での発現上昇が示されたが，本研究では原発組織における発現とリンパ節転移との関係を調べたにとどまる．また症例数が少ないことが有意差を得られなかった説明の一つと考えられる．

Ascl2 過剰発現の原因として遺伝子増幅が理由の一つとしてあるが我々は先行研究で *Ascl2* 遺伝子と薬剤耐性の強い相関を証明し，遺伝子増幅は少なかったことから *Ascl2* 遺伝子発現の上流シグナルイベントの探索が求められていた．*WiNTRLINC1* はその重要な候補遺伝子であり，本研究は *WiNTRLINC1* / *Ascl2* / *c-myc* 分子経路が高齢の分化型結腸癌では比較的低い結果であった．これは高齢患者に化学療法の可能性を示している．

lncRNA は腫瘍の悪性度との関連が注目され，本研究では *H19* 遺伝子の過剰発現が未分化型結腸癌に特有であり，この相関については以前の報告と一致していた．

以上より原発結腸癌において *WiNTRLINC1* / *Ascl2* / *c-myc* 分子経路活性化は，若年発症の分化型結腸癌形成において重要な役割を果たし，結腸癌の細胞生存に不可欠であることが示唆された．これらの発見は，高齢大腸癌患者においてはより少ない用量で化学療法が有効であることを提案するかもしれない．