

学 位 論 文 要 旨

氏 名

蓼原 将良



論 文 題 目

「Clinicopathological significance of BRCAness in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and its association with anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer cells」

(膵管癌における BRCAness の臨床病理学的背景と膵癌細胞株を用いた BRCAness と抗腫瘍薬剤感受性の解析)

指 導 教 授 承 認 印

村 雲 芳 樹



Clinicopathological significance of BRCAness in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and its association with anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer cells

(膵管癌における BRCAness の臨床病理学的背景と
膵癌細胞株を用いた BRCAness と抗腫瘍薬剤感受性の解析)

氏 名 蓼原 将良

(以下要旨本文)

【背景】

膵癌は約 80% の患者が切除不能な状態で診断され、切除可能な場合にも術後早期にしばしば再発する。切除不能進行膵癌に対する化学療法の奏効率は不十分であり、生存期間の向上には、早期発見に加え化学療法や放射線療法などの非手術療法の発展が重要である。膵癌の発症リスクを上げる遺伝子のなかに、相同組換え修復に関連する **breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)** や **BRCA2** 遺伝子がある。**BRCA1/2** 遺伝子変異の有無に関わらず、何らかの因子によって相同組換え修復が抑えられている状態を **BRCAness** という。膵癌においても **BRCAness** を認める症例が存在し、白金製剤への高い感受性を示すことが明らかになった。また、**BRCAness** を標的とした治療薬として **poly ADP-ribose polymerase (PARP)** 阻害剤が研究されている。**BRCAness** の解析方法として、**multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)** がある。**MLPA** は、標的配列の欠失・重複を部位特異的、定量的に捉えることができる遺伝子解析技術で、短時間、低コストで解析できるという利点がある。膵癌では **BRCAness** の大規模な解析が未だ行われておらず、過去の報告は *in vivo* での報告であり *in vitro* での研究報告は行われていない。

以上のような背景から、私は手術検体を用いた膵癌における **BRCAness** の解析を後ろ向きに検討した。また、膵癌細胞株を用いて **BRCAness** の膵癌治療における有効性について検討した。

【対象・方法】

北里大学病院および北里大学東病院で膵癌の手術を受け、(1) 病理学的診断で膵管癌と診断された症例、(2) 新しく作成した **HE** 標本で腫瘍組織が確認出来る症例を対象とした。除外基準は、(1) 術前化学療法が行われた症例、(2) 根治目的でない手術が行われた症例とした。

膵管癌と診断された **HE** 標本の腫瘍領域を含む **FFPE** 標本を、**10 μm** で薄切した。薄切切片から **DNA** を抽出し、**MLPA** 法によって **BRCAness** を解析した。**MLPA** 解析によってスコアが **0.5** 以上の場合を **BRCAness** 陽性、**0.5** 未満の場合を **BRCAness** 陰性として分類した。

ヒト膵癌細胞株の **AsPC-1**、**BxPC-3**、**HPAF-II**、**KP-4**、**MIA PaCa-2**、**PANC-1**、**SUIT-2**、**KP-2**、**TYPK-1**、**TYPK-2**、**Capan-2** を用いた。

【結果】

患者背景

適格基準と除外基準に基づき、**92** 例が登録された。患者年齢の中央値は **69 歳 (39～82 歳)** であり、

男性 57 例、女性 35 例であった。58 例(63.0%)で再発した。

BRCAness の有無と臨床病理学的特徴

92 例の手術検体において、まず FFPE 標本の薄切切片から DNA を抽出し、MLPA により解析したが、BRCAness を示す症例は検出されなかった。次に、FFPE 標本の薄切切片から周囲の非腫瘍組織をメスで除去して腫瘍組織を分離し、DNA を抽出したところ、MLPA により BRCAness を 2 例認めた。さらに、BRCAness スコアが高かった患者について、マイクロダイセクションを用いてより選択的に腫瘍細胞を分離したところ、MLPA により BRCAness を 4 例認めた。最終的に、92 例の膵管癌患者のうち、6 例で BRCAness が検出された(6.5%)。

BRCAness の有無と臨床病理学的因子との間に相関関係は認められなかった。70 歳以上の患者では、BRCAness の発現が多い傾向がみられた($P = 0.0670$)。

予後解析

Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を用いて BRCAness の有無による予後を解析したところ、BRCAness 陽性群と陰性群の間で全生存期間と無増悪生存期間において有意差はみられなかった(OS, $P = 0.5868$; PFS, $P = 0.7138$)。全生存期間においては、BRCAness 陽性群の中央値が 21.8 カ月、BRCAness 陰性群の中央値が 41.8 カ月と、BRCAness 陽性群の方が予後の悪い傾向にあった。

多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて予後に寄与する因子を解析したが、単変量解析と多変量解析のいずれにおいても、BRCAness の有無は全生存期間の有意な予後因子ではなかった。

膵癌細胞株の BRCAness の有無

11 種類のヒト膵癌細胞株を用いて BRCAness を解析し、KP-2 細胞株で BRCAness 陽性が検出され(9.1%)、BRCA2 の重複を認めた。

BRCAness の有無による膵癌細胞株の抗腫瘍薬剤感受性

BRCAness 陽性膵癌細胞株 KP-2 と BRCAness 陰性膵癌細胞株 PANC-1、KP-4、MIA PaCa-2 を用いて、BRCAness の有無と抗腫瘍薬剤感受性との関連を調べた。シスプラチンと PARP 阻害剤のオラパリブに対する感受性は、コロニーフォーメーションアッセイを用いて分析した。2 元配置分散分析およびチューキーHSD 検定を用いて解析した結果、KP-2 は他の細胞株よりもシスプラチンとオラパリブに対する感受性が高いことが判明した。

【考察】

膵管癌患者 92 例中 6 例(6.5%)で BRCAness が検出された。BRCA-FANC 遺伝子ファミリーの遺伝子配列解析による膵管癌での BRCAness の頻度は 14%と報告されており、本研究では少なかった。理由として、膵癌は間質が豊富で非腫瘍細胞が多く混在したこと、点変異や短い欠失・挿入が MLPA 法で検出困難なことがあげられる。BRCAness と全生存期間、無増悪生存期間との関連性はみられなかったが、過去の報告でも一定の見解は得られておらず同様の結果であった。

膵癌細胞株の *in vitro* 試験で、MLPA による BRCAness の有無を評価したことは私の知る限り今回が初めてで、KP-2 が BRCAness を示すことを実証した。BRCAness 陽性の KP-2 がシスプラチンやオラパリブに対して感受性が高いという今回の *in vitro* の研究結果は、白金製剤と PARP 阻害剤が BRCA 遺伝子変異を有する膵管癌に有効であるという臨床の報告と一致していた。

膵管癌の BRCAness を評価することは、白金製剤に対する感受性を予測し、薬物療法を選択す

ることに有用である。治療法を適切に選択することで、切除不能または再発した膵管癌の予後を改善することが期待される。

【結語】

本研究では、膵管癌患者 92 例中 6 例で BRCAness が検出された。KP-2 細胞株は BRCAness 陽性であり、BRCAness 陰性胞株に比べてシスプラチンとオラパリブに対する感受性が高いことが判明した。MLPA による BRCAness の解析は、時間やコストにおいて利点があり、膵管癌の治療法を選択するための指標の 1 つとなり得る。