

2019年3月度がんサードボード特別講演トピックス

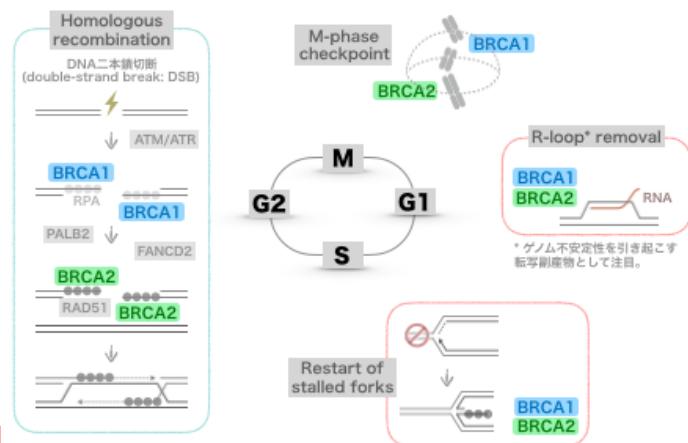
特別講演 基礎医学系 分子生命科学 渡邊 孝明 先生
BRCAness と癌ゲノム不安定性

BRCAness について

BRCAness の解釈として、BRCA1/2 という癌抑制遺伝子の変異や発現低下、BRCA が関わる DNA の相同組換え修復の機能不全を包括的に指す場合と、BRCA 変異を伴わずに相同組換え異常を示すものを指す場合が混在している。

BRCA1/BRCA2

BRCA の変異が乳がんや卵巣癌を含む多くの癌に関係している。BRCA タンパク質の主な機能は相同組換えで、DNA 二本鎖切断 (DSB) を修復する。これには BRCA の他にも RAD51 等、多くのタンパク質が関わっており、これらの異常でも BRCAness な状態になる。また BRCA は停止した複製フォークの再開や、R-loop というゲノム不安定性を引き起こす転写副産物を取り除く役割を果たしている。



PARP 阻害薬

PARP 阻害薬は BRCAness を利用した癌治療薬である。癌細胞では化学療法や過剰な代謝によってしばしば DNA 一本鎖切断を生じるが、これは PARP という酵素で修復される。PARP 阻害剤“オラパリブ”で処理すると DNA 複製の過程で DNA 二本鎖切断にプロセシングされ、正常細胞では相同組換えによって修復される一方、BRCA 変異細胞では修復できずに細胞死に至る。

多くの場合、キャリアの細胞では変異によって truncated な BRCA タンパク質が作られ、LOH によって正常アリルが失われることで癌化に繋がる。この細胞は PARP 阻害剤に感受性を示すが、さらに復帰変異が生じた細胞は耐性を獲得する。

基礎研究では

実は BRCA2 変異癌の約半数は LOH を伴わないまま癌化し、PARP 阻害剤耐性を得た BRCAness を示す。しかしその分子機構は不明であり、BRCA2 変異癌で癌遺伝子 MYC のコピー数増加が見られることが一つの手がかりであった。これに対し、当初 MYC の増幅を調べるために用いていた大腸癌細胞株 Colo320DM が一方のアリルに BRCA2 変異をもつことが判明した。この細胞株では MYC を含む領域が double minute chromosomes (DMs) と呼ばれる環状のミニ染色体として増幅しており、その構造を調べると 8.5-kb の領域が 1.6-Mb の DMs に ectopic に挿入されていた。そこでこの 8.5-kb の領域の機能に注目し解析を進めると、この領域が DNA 複製フォークの進行を阻害していること、その原因が非コード RNA の転写や上述の R-loop

2019年3月度がんサージカルボード教育講演トピックス

の蓄積であることが分かった。

さらに 8.5-kb の領域から複製を再開したフォークは鋳型を次々に乗り換えながらゲノム再編成を起こし、上述の癌細胞株での DMs の構造的な進化やマウスモデルでの DMs の *de novo* 形成の分子基盤となっていた。

また正常細胞では複製が停滞した際に BRCA2 が組換えタンパク質 RAD51 をリクルートして正確な複製を再開させるが、BRCA2 変異をもつ上述の癌細胞株では RAD51 の集積がみられず、代わりに DNA 損傷を乗り越えて誤りがちな複製を行う Polη が複製阻害領域で検出された。

誤りがちな複製を担う Polη や PolD3 は多くの癌組織で高発現しており、これらの発現を上述の癌細胞株で抑制すると DMs のコピー数が低下した。今後、変異 BRCA2 がどのようにして RAD51 非依存性の複製再開に関わるのか、その知見が BRCA2 変異癌で増幅した MYC を標的とした新たな治療戦略に繋がるか、研究の進展が期待される。

教育講演 外科学系 乳腺・内分泌外科学 津田 万里 先生

Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment
リキッドバイオプシーの現状について

N Engl J Med 2018; 379:1754-1765

血漿中の遊離 DNA (cfDNA) を分析する技術の進歩と、癌治療に応用した場合の有用性や、改善すべき課題の現状を述べる。

“リキッドバイオプシー” は、血液または他の体液から、腫瘍由来のあらゆる素材（腫瘍細胞、エクソソームなど）を分離して調べることを指す。この論文は末梢血中の cfDNA を分析する技術に焦点を当てている。

■cfDNA

cfDNA は、細胞構造に包まれていない血液中に遊離している DNA 断片を指す。アポトーシスやネクロシスなどにより血液中に放出されると考えられ、典型的なものは 150~200 塩基程度の二重鎖 DNA である。循環血液中の半減期は 1 時間以内であり、健常人の血漿濃度は 10~15ng/mL 程度である。癌患者の場合は、cfDNA の中に腫瘍細胞由来の遊離 DNA (ctDNA) が含まれる。

■cfDNA 中の分離と解析

血中に含まれる量が少ないことと、半減期が短いことから、分離と分析には特別なアプローチが必要であるため、特殊な採取用チューブが開発された。遺伝子の突然変異や多型に関する分析は、基本的に PCR でサンプルの DNA を増幅して検出するが、cfDNA 向けに開発

2019年3月度がんサーボード教育講演トピックス

された次世代型シーケンサーを用いれば、特定の標的遺伝子からホールゲノムシーケンスまで対応できる。

■臨床応用

生検の代わりに cfDNA 分析が利用できるようになれば画期的であり、合併症を引き起こすリスクなしに継続的に監視できる。腫瘍が複数ある場合、生検が危険な部位の場合は価値が高い。術後患者の残存病変の検出にも有用で、術後補助療法が必要な患者の選別を容易にする。転移性の患者も、ctDNA プロファイリングの結果に基づく最適な治療薬の選択と、治療に対する反応の監視が可能になり、進行が見られた場合には治療抵抗性の獲得機序を知ることもできる。

■癌の不均一性の検出

ctDNA は、癌が発生した当初はクローナルな増殖が進行していることを示す。しかし、全身治療を受けていた患者に治療抵抗性が見られた場合、治療抵抗性を付与する変異を持つサブクローンが増殖し、腫瘍の不均一性が高まっていると考えられる。転移病巣があれば、それぞれを構成するサブクローンの組成が異なっている可能性が高く、1 カ所に対する生検で得られる情報は他の転移病巣の状態を反映しないと予想される。治療抵抗性となった患者には、多くの場合、異なる抵抗性変異を有するサブクローンが複数存在する。ctDNA を調べれば、患者の全身にどのようなサブクローンが存在するかを推定できる。

■ctDNA の量の変化

ctDNA の量は一般に、体内に存在する腫瘍の量を反映する。癌発生から手術までの期間は徐々に増加し、切除後には急激に低値となる。

残存病変があれば、再増殖が始まり、全身性の治療が始まると低値になる。抵抗性を持つサブクローンの増殖が始まると、それまでとは異なる変異が ctDNA 中に出現する。患者間では ctDNA の量には大きな差がある。しかし、個々の患者においては、ctDNA の量は腫瘍の量や治療の反応とよく相関する。しかし再発や転移が起きても、ctDNA の量が少なすぎて分析できない患者がいることが明らかになっている。

■cfDNA の課題

検診スクリーニングに利用できるレベルの精度を持つ技術は確立されていない。多種類の癌に認められる KRAS、BRAF、TP53 のような変異が ctDNA に認められた場合、原発巣の同定には至らない。良性腫瘍の一部も、悪性腫瘍に多く見られる変異を保有しているため、cfDNA 解析では陽性となる可能性がある。たとえば一部の母斑には、悪性腫瘍と全く同じ BRAF 変異が認められる。

■新たな試み

特定の癌を発生させるウイルスを cfDNA から検出し、陽性者に対して癌の検査を行う試みや、ctDNA から DNA メチル化の変化を検出する試み、また、血中の ctDNA と蛋白質マーカーを同時に調べることにより、癌を早期に検出する試みなどが進められている。

■まとめ

さらに前向き研究が必要だが、cfDNA の分析は、癌の領域で幅広い臨床適用の可能性を持つ有望な技術である。これを臨床に取り入れ、有効利用するためには、この技術の長所と欠点を十分に理解した上で、結果の解釈を慎重に行う必要がある。