



|                     |                                                                                                                                            |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 胆道癌に対するPARP阻害薬の効果増強因子に関する研究                                                                                                                |
| Author(s)           | 小田, 総一郎                                                                                                                                    |
| Description         | 配架番号 : 2982                                                                                                                                |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                      |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                                                     |
| Dissertation Number | 甲第16889号                                                                                                                                   |
| Issue Date          | 2026-03-25                                                                                                                                 |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16889">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16889</a>                                            |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/99734">https://hdl.handle.net/2115/99734</a>                                                          |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                            |
| File Information    | ODA_Soichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨 <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名      小田   総一郎

## 学 位 論 文 題 名

胆道癌に対する PARP 阻害薬の効果増強因子に関する研究

(Study on Factors Enhancing the Therapeutic Effect of PARP Inhibitors  
in Biliary Tract Cancer)

### 【背景と目的】

胆道癌は比較的稀な悪性腫瘍であるが、近年世界的に増加傾向にあり、特に東アジア諸国では顕著である。診断時に外科切除不能な進行例が多く、切除例においても高率に再発することから、薬物療法の重要性が高まっている。しかし、胆道癌に対して有効性が確立された分子標的薬や免疫療法は限られており、治療成績の改善には新たな治療戦略の開発が求められている。近年、複数の癌種で相同組み換え関連遺伝子変異を有する症例に対しての PARP (poly ADP-ribose polymerase) 阻害薬の有効性が示され臨床応用されており、胆道癌についても臨床試験が行われている。しかし胆道癌における BRCA1/2、ATM、ARID1A など相同組み換え関連遺伝子変異を有する症例は少なく、PARP 阻害薬の恩恵を受けられる患者は限られている。そのため、遺伝子変異を有さない症例に対しても PARP 阻害薬感受性を誘導しうる治療法の開発が望まれている。

他癌種の基礎研究において、DNA メチル化阻害薬を併用することで、相同組み換え遺伝子変異の無い腫瘍においても PARP 阻害薬の治療効果が増強することが報告され、エピジェネティックな修飾による“BRCAness”誘導の可能性が示唆されている。しかし胆道癌においては基礎研究を含め既報は無く、またその詳細な分子機構については明らかになっていない。

そこで本研究では、*in vitro* の実験手法を用いて DNA メチル化阻害薬および DNMT (DNA methyltransferase) 1/3 の阻害が胆道癌細胞株において PARP 阻害薬であるニラパリブ (NIR) の抗腫瘍効果を増強するかを検討した。さらに、網羅的な遺伝子発現解析および DNA メチル化解析により併用効果の分子機構を探索し、新たなバイオマーカー候補を同定することを目的とした。

### 【材料と方法】

PARP 阻害薬耐性胆道癌細胞株として TFK-1 および RBE を使用し、DNA メチル化阻害薬として 5-アザシチジン (AZA) を使用し、PARP 阻害薬として NIR を使用した。DNMT1/3A/3B それぞれを標的とする siRNA により DNMT 遺伝子のノックダウンを行い、さらに OGFR (Opioid Growth Factor Receptor) の強制発現および shRNA を用いてノックダウンした TFK-1 細胞株の樹立を行った。

上記の各条件や試薬の組み合わせ条件下において、Homologous Recombination Assay Kit を用いた qPCR による相同組み換え頻度測定、Cell Counting Kit-8 を用いた細胞数測定、Cell Cycle Assay Solution を用いた FCM による細胞周期の定量評価、Annexin V および PI の共染色を用いた FCM によるアポトーシス細胞の定量評価を行った。

TFK-1 に対する AZA 投与条件や DNMT3B のノックダウン条件下に全ゲノム RNA sequence 解析を行い、遺伝子発現変動解析を行った。また、TFK-1 に対する DNMT3B ノックダウン条件下に全ゲノム Bisulfite sequence 解析を行い、変動メチル化領域の抽出を行い、OGFR 発現変動に関わるメチル化の変動を観察した。DNMT のノックダウンと OGFR 発現の関連については、Luciferase assay によ

る OGFR プロモーター活性の変動も観察した。

## 【結果】

AZA 投与は TFK-1 および RBE 両細胞株において相同組み換え頻度を低下させ、G2/M 期集積を引き起こした。さらに、AZA 併用は NIR に対する感受性を有意に増強し、アポトーシスの増加と IC<sub>50</sub> 値の著明な低下をもたらした。DNMT ファミリーの siRNA によるノックダウン実験では、特に DNMT3B 抑制時に AZA 投与と同様の効果が再現され、NIR との併用で増殖抑制とアポトーシス誘導が顕著に増強した。

TFK-1 に対する AZA 投与および DNMT3B ノックダウン条件下に行った全ゲノム RNA sequence 解析の結果、DNMT3B ノックダウンにより共通して上方制御される遺伝子として OGFR が同定された。OGFR 強制発現およびノックダウン条件下に行った実験では、OGFR 高発現は相同組み換えの抑制、アポトーシスの増加と IC<sub>50</sub> 低下をもたらし、OGFR ノックダウンでは逆の効果が認められた。DNMT3B ノックダウンによる変化の機序に OGFR 高発現が関与する可能性が示された。

OGFR 高発現の機序を探索すべく行った Bisulfite sequence 解析では OGFR プロモーター領域の有意な脱メチル化は認められず、DNMT3B 依存的な転写制御変化が発現上昇に関与する可能性が示唆された。ルシフェラーゼアッセイでは、DNMT3B ノックダウンにより OGFR プロモーター活性が上昇し、DNMT3B が OGFR 転写を抑制的に制御していることが明らかとなった。

## 【考察】

本研究では、DNMT 阻害および DNA メチル化阻害が胆道癌細胞における相同組み換えを抑制し、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果を増強することを示した。DNMT ファミリーの中でも DNMT3B が最も強く関与しており、DNMT3B 抑制により OGFR 発現が上昇し、これを介して HR 抑制および細胞周期変化が生じる機構が明らかとなった。

DNMT3B は DNA メチル化酵素としてのみならず、転写因子やコリプレッサーとしてクロマチン構造を制御する機能を有することが知られており、本研究結果もこの転写制御的役割を支持する。OGFR は細胞増殖抑制および細胞周期制御に関与する分子であることが知られるが、本研究では DNMT3B 依存的な転写制御によってその発現が上昇し、結果として PARP 阻害薬感受性が高まるという新たな分子経路を提示した。

## 【結論】

本研究により、DNMT3B および OGFR を介するエピジェネティックな制御経路が胆道癌の PARP 阻害薬感受性に関与することが明らかとなった。DNA メチル化阻害薬または DNMT3B 阻害は、相同組み換え修復を抑制し、PARP 阻害薬の抗腫瘍効果を著明に増強する。これらの知見は、相同組み換え関連遺伝子変異を欠く胆道癌に対しても PARP 阻害療法の適応を拡大しうる新たな合成致死的治疗戦略を提示するものであり、さらに OGFR が新規バイオマーカーとして臨床応用可能であることを示唆する。