

家族性乳がんにおける BRCA1/2 遺伝子変異と BRCA1 結合分子の発現の相関

[1] 組織

代表者：渡部 剛
(東北大学乳腺内分泌外科)
対応者：千葉 奈津子
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：石田 孝宣
(東北大学乳腺内分泌外科)
大内 憲明
(東北大学乳腺内分泌外科)
古田 昭彦
(石巻赤十字病院)
野水 整
(星総合病院)

研究費：物件費40万円，旅費0円

[2] 研究経過

全乳がんの5-7%が家族性乳がんとなされ、その25%が *BRCA1* または *BRCA2* の遺伝子変異が原因となる遺伝性乳がん・卵巣がん症候群である。その他の散発性がんにも、*BRCA1/2* の機能が低下しているがんが存在すると考えられている。また、*BRCA1/2* 遺伝子変異・機能不全は、DNA 障害性抗癌剤や、poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 阻害剤に対し高感受性を示し、*BRCA1/2* の評価による個別化医療も期待されている。

BRCA1 は DNA 修復、中心体制御に関与する。共同研究者の千葉は、*BRCA1* の家族性乳がん由来の多くの変異体が DNA 修復と中心体制御能の両機能に異常を来すこと (Kais et al. *Oncogene* 2012) を明らかにし、また、プロテオミクス解析により *BRCA1* に結合する新規分子である Obg-like ATPase 1 (OLA1) の同定に成功し、OLA1 が中心体や紡錘体極に局在し、*BRCA1*、中心体の主要構成因子である γ -tubulin と直接結合し、中心体の数や活性を制御することを明らかにした (Matsuzawa et al. *Mol. Cell* 2014)。がん由来の

OLA1 変異体では、*BRCA1* との結合能が消失し、中心体制御能が障害されており、家族性乳がん由来で中心体制御能に異常がある *BRCA1* の変異体では、OLA1 との結合能が著しく低下していた。また、OLA1 は *BRCA2* とも相互作用し、OLA1 が関与する中心体制御能が、*BRCA1* と *BRCA2* のがん抑制能に関与する可能性が示唆された。

本研究では、*BRCA1/2* 遺伝子検査が行われている乳がんを用いて、*BRCA1/2* の遺伝子変異の有無と、中心体の数の異常との関連、OLA1 やその新規結合分子での局在や発現との関連を検討し、これらをバイオマーカーとした乳がんの個別化医療を開発することを目的として研究を行った。

具体的には以下の2つを研究目的とする。

1. *BRCA1/2* 遺伝子変異の有無と中心体数の増加との相関を解析する。
2. *BRCA1/2* 遺伝子変異の有無と OLA1、OLA1 の新規結合分子の局在や発現量との相関を解析する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本研究では、共同研究者の施設 (星総合病院、石巻赤十字病院) から家族性乳がん患者の組織標本を、東北大学に送付してもらい、免疫染色を行う。まず東北大学倫理委員会で本研究承認を得た後、各施設でも倫理委員会に申請し、承認を得た。各施設の倫理委員会提出資料作成について定期的にメールで打ち合わせを行った。

承認を得た後、*BRCA1/2* 遺伝子検索を行った 73 例 (星総合病院から 63 例、石巻赤十字病院から 10 例) の未染色スライド 6 枚を送付してもらった。また平行して目的 1 の中心体の免疫染色をするため抗体薬の選定から、条件設定までを行った。条件設定を行った後、上記 *BRCA1/2* 遺伝子検索を行った 73 例の中心体の免疫染色を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

研究目的 1 の中心体の免疫染色は抗 γ -tubulin 抗体を用いて、各種条件検討をした。まず染色方法であるが、一般的な DAB 染色では細胞質に均質に染まり、中心体の foci をみることはできなかつた（東北大学病理検査学分野の協力にて確認）。そのため蛍光免疫染色を用いる方針とし、当院での乳癌症例で γ -tubulin の蛍光免疫染色条件設定をした。また陽性コントロールを作成するため BRCA 変異のある HCC1937 と陰性コントロールとして MCF7 細胞と HeLa 細胞のセルブロックを作成し、最適な免疫染色の条件設定を行った。当院の乳癌症例、細胞株においても BRCA 変異で中心体の増加を示唆する foci の数が増加しているのが確認された。

次に *BRCA1/2* 遺伝子検索が行われた 73 例の γ -tubulin の蛍光免疫染色も行い、データとして保存終了した。明らかに *BRCA1/2* 変異で中心体数 (γ -tubulin) の増加傾向はあったが、4 μ m の薄切切片であり 3 次元で細胞に対する中心体数を評価しなければならず、現在キーエンス社のハイブリッドセルカウント (BZ-H2C) を用いて自動解析の設定を行っているところである。

(3-2) 波及効果と発展性など

一般的な DAB 染色は、細胞内局在などまで明らかにすることは難しい。一方、蛍光免疫染色は細胞実験で広く用いられており、詳細な細胞内局在までわかる。しかし臨床病理では、細胞内局在を明らかにする有効性も不明であるし、退色、煩雑性、コストなどが問題とされ使用されていない。これらの問題は、デジタル媒体での保存やカウントの自動化、蛍光顕微鏡の低コスト化などで解決可能である。本研究で臨床組織の細胞内微小器官を評価することの意義が明らかにされれば、その他の細胞内微小器官を評価する蛍光免疫染色が日常臨床で活用される可能性がある。

研究目的 1 で、簡便な蛍光免疫染色で *BRCA1/2* 変異が予測できれば、様々な問題を内包した遺伝子検査（遺伝情報の取り扱い、カウンセリング、コストなど）を実施する前の、スクリーニング検査として用いることができる。また *BRCA1/2* 変異を認めなくとも、BRCA 機能が低下していれば *BRCA1/2* 変異と同様、白金製剤や PARP 阻害剤に高感受性であることが報告されている。中心体の増加が *BRCA1/2* 変異のみならず、BRCA 機能不全でも増加しているようであれば、上記薬剤のより良いバイオマーカーにもなりうる。

研究目的 2 では OLA1 と OLA1 の新規結合分子とも中心体制御に関わることが明らかになっており、BRCA 変異の有無と OLA1 と OLA1 の新規結合分子の発現・局在、中心体の数などの関連を詳細に検討することにより、タンパク質の新たな相互作用やメカニズムが明らかになる可能性がある。また予後と、上記の BRCA 関連タンパク質の相関も検討する予定である。

[4] 成果資料

1. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 53,101-104, 2014
2. Kais Z, Chiba N, Ishioka C, Parvin J D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene*, 31(6):799-804 2012
3. Ransburgh D*, Chiba N*, Ishioka C, Toland A, and Parvin J D. (*co-first author) Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Research* 70(3):988-95, 2010