

家族性乳がんにおける *BRCA 1/2* 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 25 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し、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。その他の散発性乳がんにも、*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。

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。

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。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った (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。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年後は、前年度まで検討された抗体・条件設定を用い、*BRCA1/2* 遺伝子検索が行われた 73 例の

γ -tubulin の蛍光免疫染色を行った。BZ-9000 (Keyence)を用いて、 $\times 100$ 倍の油浸レンズで $4\mu\text{m}$ の薄切切片を $0.4\mu\text{m}$ ずつ Z 軸方向の撮影し、これを 1 症例あたり 4~6 視野において行い、すべてデータとして保存した。画像データは Hybrid Cell Count (Keyence)を用いて、細胞あたりの foci の数を定量的に計測した。

最終的に 70 症例検討し、BRCA1 変異 6 例、BRCA2 変異 18 例、BRCA1/2 共に変異が 1 例であった。

細胞あたりの γ -tubulin の foci 数は、BRCA1 and/or 2 変異で 1.7 (95%; CI, 1.3–2.2) BRCA 変異なしで 0.7 (95%; CI, 0.4–1.0) で、明らかに BRCA 変異群で γ -tubulin (中心体) foci の増加を認めた ($p < 0.001$)。BRCA1 変異 1.3 (95%; CI 0.3–2.3)、BRCA2 変異 2.1 (95%; CI 1.6–2.6) もそれぞれで BRCA 変異なしと比較し有意差を認めた ($p = 0.004$, $p < 0.0001$)。BRCA 変異では γ -tubulin の数が増加し、BRCA 遺伝子診断の前検査として有用なことが示唆された。

この結果は第 10 回 AACR-JCA 国際学会 (2016 年 2 月マウイ) で発表した。

また既存の BRCA 遺伝子変異予測ツール、BRCAPRO、Myriad Table、KOHcal とも本研究を比較し、最も優れた BRCA 変異予測診断である可能性を示した (AUC 0.86, sensitivity 93%, specificity 95%, positive predictive value 90%)。この結果は今年 4 月の外科学会 WS で発表予定である。また現在論文投稿準備中である。

研究目的 2 に関しては、研究目的 1 のめどがつき次第、研究開始予定としている。

(3-2) 波及効果と発展性など

研究目的 1 では、臨床検体を用い、細胞内微小構造物を蛍光免疫染色で染色・評価することができた。これらは現在までの免疫染色ではわからなかったもので、同様の細胞内微小構造物の蛍光免疫染色が、その他の機能評価判定等の発展に繋がることが期待される。

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

学会発表

第 10 回 AACR-JCA 国際学会 (2016 年 2 月マウイ)

