

課題番号 65

## 遺伝性乳がん卵巣がんマウスを用いたエストロゲンと 乳癌発がんの関連

### [1] 組織

代表者：渡部 剛

(東北医科薬科大学 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)

研究費：物件費 15 万

### [2] 研究経過

乳癌は 1990 年代から罹患率トップとなり増加を続け、わずか 20 年で罹患リスクが約 4 倍となり、欧米の罹患率に近づいてきた。疫学的調査などから、生活スタイルの欧米化により高脂肪食摂取・肥満となり、それによる過度の組織エストロゲン暴露が乳癌罹患率増加につながっていると考えられるが、その関連・発癌機構を科学的に証明し、広くリスクを啓蒙しなければ我が国の乳癌罹患率増加を止めることができない。しかし自然発癌は長期間の観察が必要で、食事、生活環境などで変動する内因性エストロゲンとの関連を科学的に明らかにするのは困難である。

一方、乳癌の究極のハイリスク群として家族性乳がん卵巣がん症候群(HBOC)がある。*BRCA1*もしくは*BRCA2*の胚細胞性変異を有し、浸透度は乳癌で 60~80%、卵巣癌で 20~50%とされる。HBOCは個体の全細胞で*BRCA1*もしくは*BRCA2*の片アレル変異を持っているが、発がん部位は乳腺、卵巣(卵管)が主で、臓器特異性が非常に強い。乳腺・卵巣(卵管)はエストロゲン濃度やエストロゲンレセプターの発現が高く、これらの臓器環境が DNA 二重鎖切断の亢進(Haffner, Clin Cancer Res. 2011、Williamson, Carcinogenesis. 2011、Savage, Cancer Res. 2014)や、*BRCA* 変異細胞の Reactive Oxygen Species 依存性のアポトーシス回避(Gorrini, Proc Natl Acad Sci. 2014)をきたし、臓器特異的発癌につながっていると考える。このように HBOC でもエストロゲン暴露が

乳癌発がんを惹起することは疑いのないところであるが、*in vivo* で明らかにしたデータは少ない。

本研究では、究極の乳癌ハイリスクである HBOC マウス(*BRCA1*+)を用いてエストロゲン投与、もしくは高脂肪食などの介入を行いその発がん頻度の変化を検討し、将来的に HBOC や散発性乳癌の一次予防につなげることを目標とした。また *BRCA1*+/+における臓器特異的発がん(乳腺、卵巣)のメカニズムを明らかにするため各臓器の *BRCA* 機能を調べ、また将来のために各臓器を凍結保存し tissue bank を作成する。

本研究は継続課題で、昨年度は主に介入研究を行うための準備を行った。

遺伝子組換え実験・動物実験を含み、東北医科薬科大学動物実験規程を遵守し、遺伝子組み換え動物実験に関する動物実験計画申請書を東北医科薬科大学動物実験委員会に提出し、2020/7/9 実験承認を得た(研究課題：HBOC モデルマウスの臓器特異的乳癌発がんエストロゲンの関連、承認番号：第 A20041 号、遺伝子組み換え承認番号：2020-39)。Frederick National Laboratory から *Bracl* null, *Bracl* KO (Strain Number 01XC4) の凍結受精卵を分与してもらい、その後日本チャールズリバーで個体作成し 2020/7/15 東北医科薬科大学小松島キャンパス動物実験センターに搬入され検疫を行ったのち、2020/9/3 東北医科薬科大学福室キャンパス動物実験室に♂10 匹♀10 匹が搬送された。その後繁殖を行っていたが、*BRCA1*+/+は胎生致死をきたすためか、形成不全が混入した産仔に対する食殺、育児放棄などが頻発し、環境エンリッチメント製品(紙製のドーム、床敷きなど)などの使用で飼育環境を改善し、現在は第 3 世代のマウスまで飼育している。

本研究の遂行にあたっては、定期的に電子メールによる意見交換を行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

*BRCA1* mt/wt とコントロールである *BRCA1* wt/wt は安定的に繁殖することができるようになったが、

現在介入試験中であり、高脂肪食や、エストロゲンが、どの程度 HBOC マウスの発がんに関連するかは示せていない。しかし BRCA の機能予測に関する Flowcytometry の研究は進んでいる。*BRCA1 wt/mt*, *BRCA1wt/wt* マウスの末梢血有核細胞（心臓、尾静脈採血）に対し、 $\gamma$ -tubulin（中心体の蛋白質）で免疫染色を行い、LSR Rortessa で Flowcytometry を行った。40 週雌マウス心臓採血の Flowcytometry 結果を A 1) 2) に示す、*BRCA1wt/mt* で *wt/wt* に比較し蛍光強度が高くなり、実際に中心体数が増えているのも蛍光顕微鏡で確認した (B)。また 90 週の老齢雌マウス *BRCA1wt/mt* ではさらに中心体蛍光強度が高くなっていった (A3)。次に継続的な評価を可能とするため 40 週雌マウス (*wt/wt* 4 匹、*wt/mt* 5 匹) を用いて 150ul の尾静脈採血で同様に検討し、蛍光強度の高い分画が有意に *BRCA1wt/mt* で多かった (C) ( $p=0.0156$ )。HBOC モデルマウスは加齢、照射で中心体数が増えることを確認できており、発がんまでの段階的な中心体数変化していく。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究を通じ、東北医科薬科大学と東北大学加齢医学研究所の間で研究者間の交流を深め、共同研究体制を確立することができた。

本研究により乳癌発がん、エストロゲン暴露の関連・メカニズムが明らかになれば、HBOC、散発性乳がんの発症を予防する一次予防が可能となり、本邦の乳癌罹患率を一世代前まで減少させることは十分に可

能である。それに伴う乳癌の高額な医療費削減効果は莫大なものとなる。また発がんメカニズムが明らかになれば、HBOC や乳癌ハイリスク群に対する発症予防の創薬につながる可能性もある。

HBOC マウスの tissue bank に関しては、BRCA 胚細胞変異における臓器特異的発がんメカニズム解明の重要な試料となるため、様々な研究者に提供し共同で研究していきたい。

### [4] 成果資料

(1) RACK1 regulates centriole duplication through the activation of polo-like kinase 1 by Aurora A. Yoshino Y., Kobayashi A., Qi H., Endo S., Fang Z., Shindo K., Kanazawa R. and Chiba N. *J Cell Science*, 2020; 133 (17) ;jcs238931.

(2) Increased centrosome number in BRCA-related breast cancer specimens determined by immunofluorescence analysis. Watanabe G, Chiba N, Nomizu T, Furuta A, Sato K, Miyashita M, Tada H, Suzuki A, Ohuchi N, Ishida T. *Cancer Sci*. 2018 Jun;109(6):2027-2035.

(3) Evaluation of site-specific homologous recombination activity of BRCA1 by direct quantitation of gene editing efficiency. Yoshino Y, Endo S, Chen Z, Qi H, Watanabe G, Chiba N. *Sci Rep*. 2019 Feb 7;9(1):1644.

(4) BRCA1/ATF1-Mediated Transactivation is Involved in Resistance to PARP Inhibitors and Cisplatin Endo S, Yoshino Y, Matsuyuki S, Watanabe G, Chiba N. *Cancer Res Commun*. 2021 Nov 12;1(2):90.

