

## 16-4 乳癌の易罹患性の診断とそれに基づく予防に関する研究

主任研究者 大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学専攻機能制御外科学 玉木康博

### 研究成果の要旨

家族性乳がん遺伝子 BRCA1、BRCA2 の機能解析を行ない、そのがん発症抑制の機構に関係する nucleophosmin を同定した。散発性乳がんにおいて、脂肪代謝に關与するアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体の遺伝子発現と乳癌リスクの関係を解析した結果、アディポネクチンは正常乳腺細胞や乳がん細胞に抑制的に作用することが示唆された。散発性乳がんの易罹患性に關与する新たな遺伝子多型として家族性パーキンソン病原遺伝子である UCHL-1 の解析を行なった。その結果、UCHL-1 の codon 18 における Ser Tyr の多型が乳がんリスクと關与することがわかった。転移關連遺伝子 MTA1 の機能解析を行ない、MTA1 が細胞の増殖能の維持に關与している可能性をつきとめた。また MTA1 ノックアウトマウスではエストロゲン機能の低下が見られステロイド代謝に影響することが判明した。日本人において、マンモグラフィーにおける脂肪密度と乳がんリスクの関係を探るために、コンピューターを用いた自動計測プログラムの開発を試み、プロトタイプを作製した。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
玉木康博	大阪大学大学院医学系研究科 助教授	乳がん易罹患性の遺伝子診断および画像診断
福富隆志	国立がんセンター中央病院 医長	乳がんの家族内集積と BRCA1/2 に関する研究
青儀健二郎	四国がんセンター 医員	乳がん關連遺伝子発現の臨床的意義の検討
岩瀬弘敬	*1名古屋市立大学大学院 助教授 *2熊本大学大学院医学系研究科 教授	乳がんにおけるエストロゲン合成・代謝酵素とホルモン環境
高田穰	川崎医科大学 教授	家族性乳がん発症に關わる FA/BRCA 経路の機能解析
西村敏博	早稲田大学大学院情報生産システム 研究科 助教授	マンモグラフィー画像解析による乳がんリスク診断
瀧口総一	九州がんセンター	乳がんの易罹患性診断への Metastasis-associated gene 1 (MTA1)の有効性

\*1：平成16年4月1日～平成16年11月30日

\*2：平成16年12月1日～平成17年3月31日

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

本研究の目的は、乳がん罹患ハイリスク女性の同

定法を確立し、その発症予防や早期診断および治療のためのシステムを構築することである。家族性乳がんに関しては、原因遺伝子であるBRCA1、BRCA2が同定

されているが、その機能や遺伝子変異による乳がん発症経路はまだ明らかでない。そこで、これらの遺伝子と密接に関連するファンコニ貧血原遺伝子(FA)に注目し、これらの遺伝子修復に関する経路と機能の解析を行なうことにより、これらの遺伝子変異保因者の乳がん発症機構の解析を行なった。一方、散発性乳がんに関しては欧米ではGail modelなどの疫学的因子によるリスク診断が行なわれているが、日本人は欧米人より乳がん発症リスクが低く、欧米のモデルをそのまま用いることはできない。そこで、乳がん易罹患性の新たな因子の同定を行なうことを計画した。欧米ではBody Mass Indexと乳がんリスクは相関するとされており、この脂肪代謝に関する諸因子が乳がん発症リスクに与する可能性は高い。脂肪代謝に関連するアディポネクチン、レプチンのmRNA発現また、その受容体の発現が乳がん発症リスクにどのような影響を及ぼすのかを検討した。さらに新たな乳がんリスクにつながる遺伝子多型として、パーキンソン病原遺伝子(UCHL-1)に注目した。この遺伝子多型を解析し、乳がんリスクとの関係を検討した。一方、乳がんはエストロゲン依存性に増殖し、この作用はエストロゲンが核内でエストロゲン受容体(ER)と結合し、さらに転写共役因子との相互的に働くことで機能する。この転写共役因子であるAIB1とNCoR1の乳がん組織内での発現を解析した。また、転移関連遺伝子(MTA1)の機能を解析することで乳がん発症の機構の解析を行なった。さらに近年、わが国においてもマンモグラフィー検診が急速に普及しつつあることを背景に、欧米で報告されているマンモグラフィーにおける乳腺密度と乳がんリスクに関して、日本人においても同様の相関があるのかどうかを解析し、これを客観的に評価するためのコンピュータ解析システムの開発を行なうことを目指した。

## 2 研究成果

### 1. 家族性乳がん

1) 家族性乳がん発症に関わる FA/BRCA 経路の機能解析  
ファンコニ症候群(FA)の原因遺伝子群と家族性乳がん遺伝子 BRCA1、BRCA2 とは密接に関連しネットワークを形成する。BRCA2 の BRC3 リピート変異と FA 原因遺伝子のひとつ FANCC 変異とのダブルノックアウト細胞を用いて解析した結果、BRCA2 に依存的な DNA 修復と FANCC に依存する DNA 修復が独立に機能することがわかった。これとは別に、BRCA1 と BARD1 の RING ドメインの構造解析を行なった結果、家族性乳がんの原因となる RING フィン

ガードメインのミスセンス変異がこのユビキチンリガーゼ活性を死活させることから、この活性が BRCA1 の癌抑制機能にきわめて重要な役割を果たしていることがわかった。さらに、BRCA1-BARD1 の基質として Nucleophosmin を同定し、BRCA1 が Nucleophosmin を介して中心体の過剰複製を抑制し、染色体の安定性に重要な役割を持つ可能性が示された。また、BRACR2 と FA 遺伝子のダブル変異細胞を作製して両者の関係を解析した結果、DNA 2 重鎖切断の修復には FA 遺伝子は BRCA2-Rad51 と共に作用し、クロスリンク修復には、これ以外の修復経路にも関与していることが示唆された。

### 11. 散発性乳がん

1) 正常乳腺と乳がん組織におけるアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体の発現の検討

血清中のアディポネクチンレベルが低い女性では、乳がんの易罹患性が上昇することを明らかにしているが、そのメカニズムは不明である。今回我々は、正常乳腺組織および乳がん組織で、アディポネクチンとアディポネクチンの受容体の発現を検討した。Laser Microdissection 法で採取した正常乳腺組織、乳がん組織でアディポネクチン mRNA の発現を検討した結果、いずれの組織においてもアディポネクチンの発現は認められなかった。一方、アディポネクチン受容体(receptor 1、receptor 2) mRNA の発現を検討した結果、正常乳腺組織および乳がん組織では、receptor 1、receptor 2 ともに発現していた。これらの結果から、血清中のアディポネクチンが受容体を介して正常乳腺細胞および乳がん細胞の増殖に影響している可能性が示唆された。さらにアディポネクチンノックアウトマウスの乳腺を組織学的に検討した結果、腫瘍の発生は認められなかったが、ワイルドタイプに比べ、乳管上皮の過形成が著明であった。以上の結果から、アディポネクチンは、正常乳腺細胞や乳がん細胞に抑制的に作用し、アディポネクチンレベルが低下する結果、正常乳腺細胞や乳がん細胞の増殖が促進され、乳がんの易罹患性が上昇するメカニズムが推測された。

2) パーキンソン病原遺伝子(UCHL-1)の遺伝子多型と乳がん易罹患性

乳がんの易罹患性に関連する新たな遺伝子多型として、家族性パーキンソン病の原因遺伝子 Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 (UCHL-1)に着目した。UCHL-1 は脳で多く発現している脱ユビキチン酵素であり、ポリ

ユビキチン化によって分解を受けた蛋白からユビキチンを解離することで、ユビキチンのリサイクルに関与しており、細胞内の蛋白量の調整に重要な働きをしていると考えられている。肺がんや大腸がん、膵がんでは UCHL-1 が過剰発現していることから、UCHL-1 の機能亢進が腫瘍の発生や進展に関与している可能性が示唆される。UCHL-1 のコドン 18 には、Ser あるいは Tyr の遺伝子多型が存在し、Tyr carrier ではパーキンソン病のリスクが減少することから、この多型は蛋白の機能に影響していると推測される。そこで、この遺伝子多型が乳がんの易罹患性に関与するかどうかを case-control study によって検討した。乳がん患者、健常女性それぞれ 391 人、385 人で解析した結果、Tyr / Tyr の女性は、有意に乳がんの易罹患性が上昇していた（調整 odds 比 1.67、95%信頼区間 1.06-2.65、 $P < 0.05$ ）。サブセット解析の結果、乳がんのリスクとの相関は、閉経後（調整 odds 比 2.51、95%信頼区間 1.31-4.78、 $P < 0.01$ ）あるいはエストロゲン受容体陰性乳がん（調整 odds 比 2.11、95%信頼区間 1.18-3.78、 $P < 0.05$ ）であることが明らかとなった。多変量解析の結果、従来の古典的なリスクファクター（乳がん家族歴、初潮年齢、出産歴、Body mass index (BMI)）とは独立しており、UCHL-1 の遺伝子多型は、閉経後でエストロゲン受容体陰性乳がんのリスクファクターとして有用であると考えられた。

### 3) 乳がんにおけるエストロゲン合成・代謝酵素とホルモン環境

乳がんの増殖にはエストロゲンが関与しており、このエストロゲンは乳がん細胞のエストロゲン受容体 (ER) と結合し、転写共役因子との相互作用により機能することがわかっている。この転写共役因子の発現状況や遺伝子多型が乳がん発症に関連する可能性を探るために、乳がん組織における発現を解析した。転写共役因子である AIB1 と NCoR1 に着目し、その乳がん組織での発現を免疫組織化学法と、RT-PCR 法による mRNA 定量法により検討した。その結果、AIB1 mRNA 高発現の乳がんは ER 陽性で腫瘍径の小さい傾向にあった。一方、NCoR1 では ER 陽性、リンパ節転移陰性、組織学的悪性度の低い予後良好な乳がん mRNA の高発現が見られた。

### 4) MTA1 遺伝子の機能解析

転移関連遺伝子 (MTA1) は、ラット乳がん高転移細胞で高発現している遺伝子として、Differential screening により選択されてきた新規遺伝子である。こ

の蛋白質のがん転移や細胞機能における役割については不明な点が多い。ヒトの乳癌以外にも食道癌、胃癌、大腸癌で悪性度と対応して MTA1 が高発現していることが示された。さらに、強制的に MTA1 を高発現させた細胞は、運動能、浸潤能、足場非依存性の増殖能が、亢進していることが報告されている。本研究では、乳がんの易罹患性の診断に MTA1 遺伝子が応用できるのか、MTA1 遺伝子の乳がんの進展における意義を探ることを目的とした。

MTA1 蛋白質の生体内での機能解析を 2 つのアプローチにより行った。まず、Yeast Two Hybrid 法により MTA1 との相互作用を行う新規蛋白質をスクリーニングしたところ、EGFR 等のエンドサイトーシスに関与する Endophilin を単離した。MTA1 は、Endophilin による増殖因子レセプターのエンドサイトーシスを阻害することにより、細胞の増殖能の維持に関与している可能性が示唆された。一方のアプローチでは、マウス MTA1 遺伝子をクローン化し、ES 細胞を用いて同遺伝子のノックアウトを行った。その結果、Mta1 の発現量が多い睾丸、卵巣での異常が見られた。睾丸、卵巣、副腎等のステロイド代謝に関与する臓器の重量が有意に低下していた。また、睾丸での遺伝子発現の網羅的解析の結果、estrogen の下流遺伝子群が影響を受けていた。さらに MTA1 ノックアウトマウスを長期に飼育すると、骨粗鬆症の症状が発現した。骨粗鬆症の程度は、雌において顕著であり、エストロゲン機能の低下が示唆された。MTA1 は、がん組織での機能のみでなく、正常組織においても機能すると考えられた。

### 5) マンモグラフィーにおける脂肪密度のデジタル解析と乳癌リスク

欧米では、マンモグラフィーにおける乳腺密度が乳がん発症リスクに相関するとされており、今後急速に普及と思われるわが国におけるマンモグラフィー検診での乳がんリスク診断への応用につき検討した。乳がん手術症例の健常側マンモグラフィー (MLO) 77 枚と、乳がん検診受診者のマンモグラフィーの左右いずれかをランダムに選択したもの (MLO) 100 枚を混合し、マンモグラフィー読影資格者 3 名により、Wolfe の分類を行なった。その結果、読影者によって分類にかなりのばらつきがあることがわかった。また、ケース/コントロールスタディでは、読影者によっては乳腺密度と出産歴との相関が見られたものの、乳がんリスクとの相関は見られなかった。そこで、読影者によるばらつきをなくすために、フィルムをスキャナーで取り込んでデジタル化し、コンピュー

ターで乳腺密度を解析するソフトウェアの開発を目指した。マンモグラフィーのデジタル画像から、乳房全体をマニュアル操作で切り出し、閾値を変化させて2値化画像から最適と思われる画像を作製し、そこに含まれる乳腺組織の乳房全体に対する面積比率を計算するプログラムを開発した。今年度は、インターフェースを改良して操作性をより高めるようにする。また、画像処理を2値化だけではなく、tophat変換を用いたパターン分類でも行なう予定である。

### 3 倫理面への配慮

本研究を実施するにあたっては、それぞれの施設における倫理委員会の承認を得た上で、ヒト細胞の遺伝子解析を行なう場合は「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って研究を遂行している。指針に基づいた説明および同意書を準備し、自由意志による研究参加としている。資料、臨床データおよび研究解析データの保管に関しては連結匿名化を行い、個人情報保護法に従って、個人情報や遺伝子解析情報の漏洩が無いように厳重に管理している。

### 研究成果の刊行発表

#### 外国語論文

1. Miyoshi Y, Kim SJ, Akazawa K, Kamigaki S, Ueda S, Yanagisawa T, Inoue T, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Down-regulation of intratumoral aromatase messenger RNA Levels by docetaxel in human breast cancers. Clin Cancer Res 10:8163-8169, 2004.
2. Miyoshi Y, Akazawa K, Kamigaki S, Ueda S, Yanagisawa T, Inoue T, Yamamura J, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prognostic significance of intra-tumoral estradiol level in breast cancer patients. Cancer Lett 216:115-121, 2004.
3. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. Cancer Lett 210:197-203, 2004.
4. Yamamura J, Miyoshi Y, Tamaki Y, Taguchi T, Iwao K, Monden M, Noguchi S. mRNA expression level of estrogen-inducible gene, 1-antichymotrypsin, is a predictor of early tumor recurrence in patients with invasive breast cancers. Cancer Sci 95(11):887-892, 2004
5. Aritake N, Tamaki Y, Masuda N, Nakano Y, Monden T, Noguchi S, Monden M. High expression of two genes selected by iAFLP: a new prognostic factor of estrogen receptor-positive breast cancer. Oncol Rep 381-387, 2004.
6. Inoue T, Yutani K, Taguchi T, Tamaki Y, Shiba E, Noguchi S. Preoperative evaluation of prognosis in breast cancer patients by [18F]2-deoxy-2-fluoro-D-glucose-positron emission tomography. J Cancer Res Clin Oncol 130 :273-278, 2004.
7. Kinoshita T, Fukutomi T, Iwamoto E, Akashi-Tanaka S. Prognosis of breast cancer patients with family history classified according to their menopausal status. Breast J 10:218-222, 2004.
8. Yamamoto K, Hirao S, Ishiai M, Morishima K, Kitao H, Mamikoshi K, Kimura M, Matsushita N, Arakawa H, Buerstedde JM, Komatsu K, Thompson LH, Takata M. Fanconi anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination. Mol Cell Biol,

25(1):34-43, 2005.

9. Hatanaka A, Yamazoe M, Sale JE, Takata M, Yamamoto K, Kitao H, Sonoda E, Kikuchi K, Yonetani Y, Takeda S. Similar effects of Brca2 truncation and Rad51 paralog deficiency on immunoglobulin V gene diversification in DT40 cells support an early role for Rad51 paralogs in homologous recombination. *Mol Cell Biol*, 25(3):1124-34, 2005.

10. Miyasaka K, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Sato N, Nagata A, Matsui T, Noda T, Jimi A, Takiguchi S, Takata Y, Kawanami T, Funakoshi A. Enhanced gastric emptying of a liquid gastric load in mice lacking cholecystokinin-B receptor: a study of CCK-A, B, and AB receptor gene knockout mice. *J Gastroenterol* 39(4): 319-23, 2004.

12. Ishida S, Funakoshi A, Miyasaka K, Iguchi H, Takiguchi S. Sp family of transcription factors regulates human SHIP2 gene expression. *GENE* 2005, in press.

#### 日本語論文

1. 西村敏博、玉木康博 . マンモグラフィー像からの乳腺組織領域の自動抽出法の検討 . 日本エム・イー学会誌 生体医工学、42 suppl. 2 : p190、2004 .