

## 16-4 乳がん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 玉 木 康 博

### 研究成果の要旨

乳がんの易罹患性診断のために、乳がん発症機構の解析と、乳がん発症リスク因子の同定および解析を行なった。まず乳がん発症のメカニズムを解析するために、遺伝性乳がん遺伝子 BRCA1 および BRCA2 の機能解析を行ない、BRCA1-Rad51 の基質として nucleophosmin を同定した。さらに BRCA2-Rad51 とコア複合体-FANCD2 の DNA 修復機構について解析し、これらが独立して作用することが判明した。次いで乳がん発症リスク因子として、脂肪代謝に関与するアディポネクチンが脂肪組織から分泌され、レセプターを介して乳管上皮に作用する可能性を見出した。またパーキンソン病原遺伝子のひとつである UCH-L1 の多型が乳がん発症リスクと相関していることがわかった。さらに乳がん検診に用いられるマンモグラフィーにおける乳腺密度を、客観的、量的に評価するコンピュータープログラムを開発し、これにより計測された乳腺密度は閉経後女性における乳がんリスクと相関することがわかった。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
玉 木 康 博	大阪大学大学院医学系研究科 助教授
青 儀 健 二 郎	国立病院機構四国がんセンター 外科
岩 瀬 弘 敬	* <sup>1</sup> 名古屋市立大学大学院 助教授 * <sup>2</sup> 熊本大学大学院医学系研究科 教授
高 田 穰	川崎医科大学 免疫学
福 富 隆 志	国立がんセンター中央病院 外科
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
瀧 口 総 一 (班長協力者)	* <sup>3</sup> 国立病院機構九州がんセンター
太 田 智 彦	聖マリアンナ医科大学 助教授
野 水 整	星総合病院 外科
吉 田 輝 彦	国立がんセンター中央病院研究所

\*1：平成16年4月1日～平成16年11月30日

\*2：平成17年12月1日～平成18年3月31日

\*3：平成16年4月1日～平成17年3月31日

### 総合研究報告

#### 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。遺伝性乳がんの原遺伝子としてBRCA1およびBRCA2が同定されているが、これらの異常が乳がん発症につながる機構についてはまだ十分には解明されていない。また欧米においては実地臨床に用いられているこれらの遺伝子診断がわが国でも有用かどうかはわかっていない。そこで家族性乳がん家系におけるBRCA1/2遺伝子異常診断プログラムの開発と、このBRCA1/2の乳がん発症に関わる機能を解析することを目的のひとつとした。一方、散发性乳がんに関しては、脂肪代謝と乳がんリスクについて、また種々の遺伝子多型と乳がんリスクに関して検討した。さらに、乳がん発症ハイリスク女性を同定する方法としてマンモグラフィーにおける乳腺密度を計測するプログラムの開発を目的とした。

#### 分担研究課題

乳がん易罹患性の遺伝子診断および画像診断（玉木）

乳がん患者における家族性腫瘍コンサルティングの効率的な手法の確立（青儀）

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（岩瀬）

家族性乳がん発症に関わる FA/BRCA 経路の機能解析（高田）

乳がんの家族内集積性と BRCA1/2 に関する研究（福富）

マンモグラフィー画像解析による乳がんリスク診断（西村）

乳がん易罹患性診断における MTA1 の有効性（瀧口）

## 2 研究方法

### I. 遺伝性乳がん

家族歴から BRCA1/2 遺伝子異常保因者のスクリーニング法に関するプログラムを検討した。またこれまでに遺伝子異常が確認されている乳がん患者における対側乳がん発症について検討した。さらに BRCA1/BRCA2 の機能や遺伝子変異による乳がん発症経路について、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。

### II. 散発性乳がん

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。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関与する可能性は高い。脂肪代謝に関与するアディポネクチンの 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。また、転移関連遺伝子 (MTA1) の機能を解析し、乳がん発症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客観的に評価するためのコンピューター解析プログラムを開発し、乳がんリスクに関するケース・

コントロールスタディを行なった。

## 3 研究成果

### I. 遺伝性乳がん

#### 1) 家族性乳がんの遺伝子診断プログラム

日本人における BRCA1 および BRCA2 遺伝子検査の臨床的意義を検討するために、乳がんおよび卵巣がんの家族歴をもとにリストアップしてグループ化し、カウンセリングを含む十分なインフォームド・コンセントのもとに、解析対象者の集積を行なった。今後、これらの遺伝子異常解析を施行する予定である。また、より簡便なスクリーニング法として Protein Truncation Test (PTT) 法と Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いる方法の検討を行い、乳がん患者 6 例中 2 例に BRCA2 の遺伝子多型が同定された。

#### 2) BRCA1、BRCA2 の機能解析

ファンコニ症候群 (FA) の原因遺伝子群と遺伝性乳がん遺伝子 BRCA1、BRCA2 とは密接に関連しネットワークを形成する。そこで BRCA2 と FA 原因遺伝子のダブルノックアウト細胞を用いて、BRCA2-Rad51 の経路とコア複合体-FANCD2 の経路の関係を解析した。その結果、BRCA2-Rad51 経路による DNA 修復とコア複合体-FANCD2 経路に依存する DNA 修復はその初期プロセスにおいては独立して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、遺伝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。

### II. 散発性乳がん

#### 1) アディポネクチンとアディポネクチン受容体

血清中アディポネクチンレベルが低い女性では、乳がんリスクが上昇することはすでに報告しているが、そのメカニズムは不明である。そこで正常乳腺組織および乳がん組織でのアディポネクチンとアディポネクチン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 (UCH-L1) の遺伝子多型と乳がんリスク

Parkinson 病では乳がん発症頻度が一般人に比べて低いとの報告がある。そこで、Parkinson 病の原遺伝子のひとつである UCH-L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase 1) の遺伝子多型と乳がんのリスクをケース・コントロールスタディで検討した。手術を受けた原発性乳がん患者 391 例と検診施設で乳がん検診を受けた健常女性 385 例において UCH-L1 の codon 18 における Ser/Tyr の遺伝子多型を PCR-RFLP 法を用いて検索した。その結果、Ser/Ser の多型に対して Tyr/Tyr の多型では乳がんリスクが高いことがわかった (相対危険度 1.67、95%信頼区間 1.06-2.65、 $p < 0.05$ )。次いで、UCH family である UCH-L1 と UCH-L3 の mRNA 発現を乳がん患者 104 例で調べたところ、UCH-L3 は正常部分に比べて乳がん有意に発現が増加しており、また、UCH-L1 高発現群では低発現群に比較して有意に予後が不良であった。このことから、UCH-L3 は乳がんの発症に、UCH-L1 はその悪性度に関係することが示唆された。

3) MTA1 遺伝子の乳がん発症に関わる機構

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。また、MTA1 ノックアウトマウスでは、睾丸、卵巣の発育不良を認め、睾丸においては網羅的遺伝子発現の解析の結果、エストロゲンの下流遺伝子群が影響を受けていた。また雌において骨粗鬆症が顕著で、エストロゲン機能の低下が示唆された。

3) マンモグラフィーにおける乳腺密度と乳がんリスク

1. 目視法によるマンモグラフィーと乳がんリスク

乳がん検診施設においてマンモグラフィー併用乳がん検診を受け、かつ過去 1 年以上乳がん発症の無い健常女

性のマンモグラフィー 205 枚 (左右いずれか一方を無作為に選択) と、原発性乳がん手術を受けた患者の健常側マンモグラフィー 223 枚を用いた。両群のフィルムを無作為に混ぜあわせ、日本乳癌検診学会によるマンモグラフィー読影試験 A 判定の医師 1 名、B 判定の医師 1 名が読影し、Wolfe の分類にしたがって 4 群に分類し、ケース・コントロールスタディを行なった。その結果、1 名の医師では最も乳腺密度の高い群では乳がん発症リスクが有意に高くなったが、他の医師では有意差が出なかった。このように目視では撮影時の露出補正により、読影者間での判定のバラつきが生じることがわかった。

2. デジタル画像処理による乳腺密度と乳がんリスク

マンモグラフィーをスキャナーでコンピューターに取り込み、画像処理を行なって乳房の輪郭を決定し、これに対する乳腺の面積比を求めるプログラムを作成した。フィルム間の条件補正のために、大胸筋濃度を用いた。すなわち健常群、乳がん群それぞれから 30 症例ずつ計 60 症例のフィルムを無作為に選択し、その大胸筋部の輝度値分布より平均輝度値 (大胸筋基準輝度値) を求め、この条件での乳腺部を選択する基準の乳腺選択閾値を決定した。次いで、対象フィルムの大胸筋部の平均輝度値を求め、大胸筋基準輝度値との誤差を求めて、乳腺選択閾値を補正し乳腺部分の乳房に対する面積比を求め乳腺密度とした。

このプログラムをもちいて前述の健常群と乳がん群のマンモグラフィーでの乳腺密度を計測した。その結果、乳腺密度は有意に乳がん発症リスクと相関していた (相対危険度 2.94、95%信頼区間 1.53-5.62、 $p < 0.01$ ) (表)。また、この相関は閉経後経過年数の少ない女性、Body mass index の高い女性、出産歴のある女性において有意に認められた。このことから、日本人閉経後女性においても、マンモグラフィーでの乳腺密度が乳がんリスクに関係することがわかった。

4 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、遺伝子解析に関する倫理指針」に従って研究を遂行した。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た。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た上で研究を行なった。