

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。次いで散発性乳がん発症リスク因子として、パーキンソン病原遺伝子のひとつである UCH-L1 と乳がん増殖因子である HER2 の遺伝子多型と乳がん発症リスクについてケース・コントロールスタディを行なった結果、これらがリスク因子となることが判明した。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	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
(班長協力者)	
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

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、散発性乳がんに関しては、新しい乳がんリスク因子として、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指した。

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

研究報告

1 研究目的

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)

2 研究方法

I. 遺伝性乳がん

遺伝性乳がん原遺伝子 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を同定する目的で、乳がんの発生および進展に関与すると思われる種々の遺伝子における遺伝子多型と乳がん発症リスクの関係についてケース・コントロールスタディを用いて検討した。

まず Parkinson 病患者では乳がん発生率が低いとの報告があり、パーキンソン病原遺伝子 (UCHL-1) に注目した。この遺伝子の Codon 18 における Ser/Tyr の多型を RT-PCR 法を用いて解析した。

次に乳がんの増殖因子として知られる HER2 遺伝子の遺伝子多型が報告されており、この Codon 655 における Ile/Val の多型を同様に RT-PCR 法により解析した。

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た。すなわちマンモグラフィー (MLO) をフィルム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面積を測定し、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て、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) 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 L1) の Codon 18 における Ser/Tyr 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では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。

次に、乳がん組織で過剰発現が見られる HER2 の遺伝子多型と乳がんリスクの関係を調べた。HER2/neu の codon 655 における Ile/Val の多型について、手術を受けた乳がん患者 378 例と検診施設で乳がん検診を受けた健常女性 323 例においてケース・コントロールスタディにより解析した。その結果、全体では Ile/Val 群のみが有意に乳がんリスクが低かったが、閉経前後で層別すると、閉経後女性において Ile/Val と Val/Val の Val carrier は有意に乳がんリスクが低くなることがわかった（相対危険度 0.47、95%信頼区間 0.27-0.83、 $p < 0.01$ ）。さらに、閉経後かつエストロゲンレセプター陰性乳がんのリスクはさらに低くなることがわかった（相対危険度 0.29、95%信頼区間 0.12-0.69、 $p < 0.01$ ）。

2) マンモグラフィーにおける乳腺密度と乳がんリスク

マンモグラフィーは乳腺内部の病変を発見しやすいように、乳房ごとに自動的に撮影条件が補正されている。したがって肉眼上は同様の乳腺密度であっても実際の乳腺量はかなり異なることが多い。このため、昨年 Wolfe の分類に基づいた目視法による乳腺密度分類に基づいたケース・コントロールスタディをおこなったところ、読影者によって乳腺密度分類が異なり、乳腺密度と乳がんリスクの相関が見られなかった。そこで、より客観的に乳腺密度を評価するために、画像処理によりフィルムごとの条件補正を統一し、乳房全体に占める乳腺密度を計測するプログラムを開発した。すなわち MLO フィルムにおける大胸筋濃度を参考として画像処理を行い、フィルムの条件を一致させた。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、これに基づい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。健常者を乳腺密度により均等に 5 群に分け、その乳腺密度に相当する乳がん患者数と比較したところ、最も乳腺密度の低い群に対して、最も乳腺密度の高い群では、Body mass index、閉経後経過年数、家族歴、出産歴による補正をすると乳がん発症相対危険度が 2.94（95%信頼区間 1.53-5.62、

$p < 0.01$ ）と乳腺密度は有意に乳がん発症リスクと相関していた。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判明し、これをリスク診断に応用できる可能性が示された。

4 倫理面への配慮

倫理面での配慮については、本研究を実施するにあたり、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。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Miyoshi Y, Funahashi T, Tanaka S, Taguchi T, Tamaki Y, Shimomura I, Noguchi S. High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer* 118:1414-1419, 2006.
2. Miyoshi Y, Akazawa K, Kamigaki S, Ueda S, Yanagisawa T, Inoue T, Yamamura J, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prognostic significance of intratumoral estradiol level in breast cancer patients. *Cancer Letters* 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 Letters* 210:197-203, 2004.
4. Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, Nagashima N, Hirano S, Okawa K, Ohta T, Yu DS, McHugh PJ, Hickson ID, Venkitaraman AR, Kurumizaka H, Takata M. A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol Cell* 19:841-847, 2005.
5. Nojima K, Hochegger H, Saberi A, Fukushima T, Kikuchi K, Yoshimura M, Orelli BJ, Bishop DK, Hirano S, Ohzeki M, Ishiai M, Yamamoto K, Takata M, Arakawa H, Buerstedde JM, Yamazoe M, Kawamoto Y, Araki K, Takahashi JA, Hashimoto N, Takeda S, Sonoda E. Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agent in vertebrate cells. *Cancer Res* 65:11712-11720, 2005.
6. Takasugi M, Fukutomi T. General aspects and specific issues of informed consent on breast cancer treatment. *Breast Cancer* 12:39-44, 2005
7. Miyamoto K, Fukutomi T. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer* 116:407-414, 2005.
8. Kinoshita Y, Fukutomi T. Prognosis of breast cancer patients with family history classified according to their menopausal status. *Breast J* 10:218-222, 2004.
9. Zhang Y, Yamashita H, Toyama Y, Sugiura H, Ando

Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 94:11-16, 2005.

日本語論文

1. 青儀健二郎. インフォームド・コンセント取得における2段階式乳癌診断用クリニカルパスの有用性. *乳癌の臨床* 19:97-102, 2005.
2. 那須淳一郎, 青儀健二郎. 家族歴調査のシステム化による家族性腫瘍相談室の運営. *家族性腫瘍* 5:57-60, 2005.
3. 岩瀬弘敬. 乳癌のホルモン依存性. *治療学* 39:146-149, 2005.
4. 岩瀬弘敬. 乳癌ホルモン療法の効果予測因子, *日本臨床* 64:555-560, 2006.
5. 大城正邦, 西村敏博, 椿井正義, 玉木康博. マンモグラフィにおける乳腺組織領域の定量化に関する一手法. "A method of quantification of mammary gland on mammograms" *信学技報* 105:25-28, MBE2005-113, 2006.