

氏名	吉川清次
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2147号
学位授与の日付	平成11年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Reduction of BRCA 1 Protein Expression in Japanese Sporadic Breast Carcinomas and its Frequent Loss in BRCA 1-Associated Cases. (日本人散発性乳癌における BRCA 1 蛋白発現の減少と, BRCA 1 変異乳癌における高頻度の BRCA 1 蛋白発現消失)

論文調査委員 (主査) 教授 野田 亮 教授 日合 弘 教授 山岡 義生

### 論文内容の要旨

家族性乳癌の責任遺伝子としてクローニングされた BRCA 1 遺伝子は, 散発性乳癌において Loss of heterozygosity が高頻度に認める領域に存在すること, BRCA 1 遺伝子の体細胞変異の報告は無いが, mRNA レベルの減弱が報告されたことより, 散発性乳癌における重要性が示唆されていた。一方 BRCA 1 蛋白は, そのサイズや細胞内の局在・機能・日本人女性の遺伝性及び散発性乳癌への関与など不明な点は多い。日本人乳癌における BRCA 1 の重要性を検討すべく, 以下の4点で研究を進めた。

1. 議論になっている BRCA 1 蛋白のサイズと局在を同定すること。
2. BRCA 1 欠損細胞・腫瘍組織を使って抗体の特異性を検定すること。
3. 特異性の高い抗体を用いて正常乳腺と乳癌細胞の蛋白発現レベルを比べることで日本人女性の乳癌における BRCA 1 蛋白の発現異常を調べ, 臨床病理学的にその意義を検討する。
4. BRCA 1 変異腫瘍における BRCA 1 蛋白の発現異常を同定することで, 従来の遺伝子診断の補助的役割りを担い得るかどうかが調べる。

BRCA 1 蛋白について, 複数の研究室がそれぞれの抗体を用いて異なる蛋白のサイズ (190 kDa, 220 kDa) と細胞内局在 (核, 細胞質と細胞膜) を報告した。この相違の原因の1つには抗体の特異性に問題があること, そして各研究室が異なる蛋白固定方法を用いていることに起因していると考えられる。これを解決するため, 7種類の培養乳癌細胞と日本人女性162症例の乳癌 [散発性108例・遺伝性35例 (BRCA1 遺伝子の変異は不明)・BRCA1 関連症例19例] を用いて, 抗 BRCA 抗体12種によるウエスタンブロット・免疫沈降を行った結果, BRCA 1 蛋白のサイズは, 全長220 kDaで, 120 kDaの splice variant が存在すること, 細胞内分画法では全長 BRCA 1 蛋白は核に, splice variant は細胞質に存在すること判った。8種類の固定によって免疫染色のパターンが異なり, 細胞内分画法の結果に基づいて至適条件を決定した。BRCA 1 欠損細胞・ヒトの胸腺・精巣・肝臓などの臓器切片と BRCA 1 変異腫瘍を用いて, 抗体の特異性を慎重に評価した。パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学的解析に使用可能なモノクローナル抗体を用いた結果, 正常乳腺上皮では BRCA 1 蛋白が高発現であり, 乳癌細胞では種々の程度にその発現が減少していることが判った。BRCA 1 関連乳癌19例中, 15例 (79%) で BRCA 1 蛋白の核での発現が, 減少 (8例) 或いは完全消失 (7例) していた。散発性乳癌では108例中30例 (28%)・遺伝性乳癌では35例中6例 (17%) で, BRCA 1 蛋白発現の減少を認めた。散発性乳癌における BRCA 1 蛋白発現の減少と, 充実腺管型・腺管の低分化・乳癌の予後因子の1つである c-erbB-2 蛋白の過剰発現との相関が認められた。これらのデータは, BRCA 1 関連乳癌のみならず散発性乳癌においても, BRCA 1 蛋白発現の減少が癌発症において重要な役割を担っていることを示すと同時に, 遺伝子変異以外のメカニズムがその蛋白発現減少に関わっていることを示唆している (以上 Clinical

Cancer Research 掲載)。

さらに乳癌における BRCA 1 関連蛋白を含む癌関連分子の重要性を検討すべく、乳癌組織における Rad 51・BARD 1 (BRCA 1-Associated Ring Domain)・p 53 蛋白と hMSH 2・hMLH 1 の発現レベルの解析を進めこれまでの解析では Rad 51 は約半数の乳癌症例で、p 53 は約 30% で発現の減弱がある事が判った。これとは対照的にミスマッチ修復遺伝子産物である hMSH 2・hMLH 1 蛋白や BARD 1 の発現異常は極小数であった。このことは乳癌の発症に、二重鎖切断 DNA 修復の経路の異常が関与している可能性を示唆するものである。

#### 論文審査の結果の要旨

BRCA 1 遺伝子は家族性乳癌の責任遺伝子であるが、散発性乳癌における役割については、不明な点が多い。体細胞変異は無いものの、高頻度の LOH, mRNA 低下, 蛋白の異常な細胞内局在等の報告がある一方、BRCA 1 蛋白の局在やサイズについては議論が多い。そこで本研究では、(1) まず蛋白の局在及びサイズについて、12 種の抗 BRCA 1 抗体と、BRCA 1 欠損株を含む 5 種の培養細胞を用いて、免疫沈降、ウェスタンブロット及び、8 種の固定法を採用した免疫染色により検討した。その結果、BRCA 1 蛋白は 220 kDa の核蛋白であることが確認された。(2) 次に、乳癌組織の免疫染色による検索を行ったところ、BRCA 1 遺伝子に変異を持つ事が知られている腫瘍では予想通り、BRCA 1 蛋白の発現が低く (15/19, 79%), 全く認められない症例もあること (7/19, 37%) が確認された。一方、散発性乳癌では 108 例中 30 例 (28%), 遺伝性乳癌では 35 例中 6 例 (17%) において、BRCA 1 蛋白発現の減少が認められた。興味深いことに、散発性乳癌における BRCA 1 蛋白発現の減少は、充実腺管型、腺管低分化型において、より高頻度であり、乳癌の予後因子の 1 つである c-erbB-2 蛋白の過剰発現とも相関することが示唆された。

以上の研究は乳癌発生の分子機構の解明に貢献し、新たな乳癌の診断・治療・予防法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 6 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。