

学位論文題名

Novel variations and loss of heterozygosity of *BRCA2* identified in a dog with mammary tumors

(イヌ乳腺腫瘍において認められた癌抑制遺伝子 *BRCA2* の新規変異とヘテロ接合性の消失)

学位論文内容の要旨

【背景】

最近の統計によると、日本人女性の部位別癌罹患率で乳癌は第1位であり、極めて重要な癌に位置づけられている。また、日本人女性の19人に1人は一生のうちに乳癌に罹患すると報告されており、年々増加傾向にある。癌抑制遺伝子である *BRCA2* は、その変異が乳癌の発症と強く相関している。変異 *BRCA2* をもつ人が一生のうちに乳癌に罹患する確率は60-85%になると報告されており、乳癌を研究する上で重要な位置を占めている。

BRCA2 の変異により癌化した細胞では、他の癌抑制遺伝子と同様に両方のアレルに変異が生じていると考えられている。変異 *BRCA2* をもつ個体において、癌化していない細胞では変異型および正常型アレルからなるヘテロ接合体であるが、癌化した細胞では組換えや欠失などにより正常型アレルが消失して変異型アレルのみが残り、ホモまたはヘミ接合体となる。このような変化をヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity, LOH) と呼ぶが、変異 *BRCA2* による遺伝性乳癌においてこの LOH が多数報告されている。

BRCA2 は3000個以上のアミノ酸からなる巨大分子で、DNA損傷修復に関与する。DNA損傷修復系のひとつである相同組換え修復において、RAD51タンパク質が中心的な役割を果たすことが知られているが、*BRCA2* はその中央に存在する8つのBRC repeatsとC末端に存在するRAD51結合領域を介してRAD51に結合する。そして、RAD51をDNA損傷部位にリクルートすることで、DNAの安定化に寄与する。

現在、変異 *BRCA2* による乳癌のモデル動物として10系統以上の遺伝子改変マウスが作出されているが、胎生致死である報告や乳腺腫瘍以外の腫瘍発症頻度が高いという報告が多く、乳癌発症のモデル動物としてこれらは不十分であると考えられる。そこで我々は、他の動物種で変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデルを確立しようと考え、乳腺腫瘍の発症頻度が極めて高いイヌに注目した。イヌの乳腺腫瘍と *BRCA2* の変異との関係は不明であるが、我々はイヌ乳腺腫瘍においても *BRCA2* の変異が関係していると考えた。そこで、イヌにおいて腫瘍発症に関係する *BRCA2* の変異を発見し、イヌが変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデル動物になり得るか検証した。

【材料と方法】

イヌの乳腺腫瘍発症例、あるいは非発症例由来の血液および乳腺腫瘍組織は、北海道大学および岩手大学の附属動物病院から提供を受けた。

イヌ乳腺腫瘍において *BRCA2* の腫瘍発症に関係する変異を発見するために、*BRCA2* の翻訳領域全長の塩基配列を調べることを考えた。しかし、*BRCA2* の翻訳領域全長は約10kbp

と非常に長いので、全症例について塩基配列を調べることは費用と時間がかかりすぎると判断し、塩基配列を調べる前にLOH解析を利用したスクリーニングを行うことにした。イヌ *BRCA2* の遺伝子領域には、LOH解析に適した多型マーカーが存在しなかったため、4種類のマーカーを新規に確立し、これを使用してLOH解析を行った。

血液および乳腺腫瘍組織から得られたゲノムDNAおよびcDNAの塩基配列をDNAシーケンサーにより解析した。また、乳腺腫瘍組織における *BRCA2* の mRNA の発現量を SYBR green を用いたリアルタイムPCRにより測定した。

【結果】

BRCA2 遺伝子のイントロンに存在する3種類のマイクロサテライト配列を利用して新規の多型マーカーを確立した。また、以前報告したエキソン27に存在する挿入・欠失多型マーカーの検出方法を改善した。この4種類の多型マーカーについて11個体のアレル型を調べたところ、いずれのマーカーでもヘテロ接合体の頻度が高いことが判明し、4種類すべてのマーカーのアレル型がホモ接合体である個体は見つからなかった。

乳腺腫瘍発症イヌ3例において、この4種類の多型マーカーを利用したLOH解析を行った。その結果、*BRCA2* 遺伝子領域においてLOHを示す1例を発見した。この検体の乳腺腫瘍組織では両方のアレルで *BRCA2* が発現していることがわかった。乳腺腫瘍組織で発現している *BRCA2* の翻訳領域全長の塩基配列を調べたところ、*BRCA2* の機能ドメインをコードする領域に4種類のミスセンス変異、1種類の挿入・欠失変異、1種類のサイレント変異を発見した。これらの変異のうち、正常組織ではヘテロ接合体であり腫瘍組織ではホモ接合体となった変異は、BRC repeat 3 のアミノ酸配列を変化させるミスセンス変異 (K1435R) であった。

次に、LOHを示した検体の乳腺腫瘍細胞において、組換えまたは欠失のどちらの変異が起こったのかを調べるために、血液と乳腺腫瘍組織のゲノムDNAからBRC repeat 3を含む領域をクローニングしてシーケンシング解析を行った。その結果、この検体では組換えによりLOHを示したことがわかった。

【考察】

イヌ *BRCA2* の遺伝子領域で確立した新規多型マーカーは、ヘテロ接合体の頻度が高いことからLOH解析に適しており、実際に、乳腺腫瘍症例におけるLOHの発見に利用できたことから有用なマーカーであると言える。

LOHを示した検体の乳腺腫瘍組織で発現していた *BRCA2* には腫瘍発症と関係する変異が存在していたはずである。ゆえに、この検体で発見した4種類のミスセンス変異と1種類の挿入・欠失変異の中には、腫瘍発症と関係する変異が含まれると予想される。特にBRC repeat 3 のアミノ酸配列を変化させるミスセンス変異 (K1435R) は、正常組織ではヘテロ接合体であったが腫瘍組織ではホモ接合体になっており、この検体で乳腺腫瘍の発症と関係する変異である可能性が高い。このBRC repeat 3はRAD51を結合するドメインであり、K1435Rの変異はこれらの結合に影響を与える可能性が考えられた。ヒト乳癌患者において同定されたものの発癌に対する影響がわかっていないミスセンス変異がデータベースに多数報告されている。それらの中にイヌのK1435Rと対応するヒトの変異 (K1440R) がある。ヒトにおいてもBRC repeat 3のアミノ酸配列を変化させる変異 (K1440R) は腫瘍発症と関係する変異である可能性が考えられた。

【結論】

イヌ *BRCA2* 遺伝子領域において多型マーカーを利用したLOH解析法を確立し、乳腺腫瘍組織でLOHを示す例を初めて発見した。このLOHを示す検体から乳腺腫瘍発症と関係する可能性のある変異を特定した。変異のひとつはヒト乳癌患者において発癌に対する影響がわかっていないミスセンス変異と同様の変異であり、ヒトにおいてもこの変異は

腫瘍発症に関係する変異である可能性が考えられた。以上のことからイヌは変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデル動物になる可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

Novel variations and loss of heterozygosity of *BRCA2* identified in a dog with mammary tumors

(イヌ乳腺腫瘍において認められた癌抑制遺伝子 *BRCA2* の新規変異とヘテロ接合性の消失)

癌抑制遺伝子である *BRCA2* は、その変異が乳癌の発症と強く相関している。*BRCA2* は DNA 損傷修復系のひとつである相同組換え修復において、*RAD51* を DNA 損傷部位にリクルートすることで、DNA の安定化に寄与する。変異 *BRCA2* による遺伝性乳癌においてこのヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity, LOH) が多数報告されている。申請者は、マウス以外の動物種で変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデルを確立しようと考え、乳腺腫瘍の発症頻度が極めて高いイヌにおいて *BRCA2* の変異を発見し、イヌが変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデル動物になり得るかを検証した。

研究では、*BRCA2* 遺伝子のイントロンに存在する 3 種類のマイクロサテライト配列を利用して新規の多型マーカーを確立した。また、以前報告したエキソン 27 に存在する挿入・決失多型マーカーの検出法を改善した。乳腺腫瘍発症イヌ 3 例において、この 4 種類の多型マーカーを利用した LOH 解析を行い、*BRCA2* 遺伝子領域において LOH を示す 1 例を発見した。この検体の乳腺腫瘍では欠失ではなく組換えにより LOH を示し、両方のアレルで *BRCA2* が発現していることがわかった。乳腺腫瘍組織で発現している *BRCA2* では、機能ドメインをコードする領域に 4 種類のミスセンス変異、1 種類の挿入・欠失変異、1 種類のサイレント変異を発見した。これらの変異のうち、正常組織ではヘテロ接合体であり腫瘍組織ではホモ接合体となった変異は、*BRC repeat 3* のアミノ酸配列を変化させるミスセンス変異 (K1435R) であった。

イヌ *BRCA2* の遺伝子領域で確立した新規多型マーカーは、ヘテロ接合性の頻度が高いことから LOH 解析に適しており、実際に、乳腺腫瘍症例における LOH の発見に利用できたことから有用なマーカーであると言える。*RAD51* を結合するドメインのアミノ酸配列を変化させるミスセンス変異 (K1435R) は、正常組織ではヘテロ接合体であったが腫瘍組織ではホモ接合体になっており、乳腺腫瘍の発症と関係する変異である可能性が高い。ヒト乳癌患者のミスセンス変異の中にこれと同じ変異 (K1440R) があることから、ヒトにおいてもこの変異は腫瘍発症に関係する変異である可能性が考えられた。以上のことからイヌは、変異 *BRCA2* による乳癌発症の新規モデル動物になる可能性が考えられた。

論文審査と平行して公開発表は、平成 21 年 2 月 2 日午後 4 時 30 分より医学部臨床大

講堂において行われた(出席者 26 名)。申請者はスライドを用いながら約 18 分にわたって学位論文の発表を行った。その後、畠山教授より、①実験にはどのような系統(品種)のイヌを用いていたのか、また遺伝的背景は均一であるのか、②Mammalian two hybrid 以外の結合性実験は行っているのか、③BRCA2 はどのくらい下等な動物から存在する遺伝子なのか、について質問があった。次いで、主査(渡辺)より、①BRCA2 は DNA 修復に関与する遺伝子であるが、どのような機序で乳腺腫瘍の発症に関与するのか、②BRCA2 には核へ RAD51 を運ぶ以外の機能があると考えられるのか、③核に移行するタンパクとしては巨大であると思われるがその点支障はないか、④イヌが新規モデルになる可能性とは具体的にどういうことか。モデル動物というには不十分であると考えられないか、などについて質問があった。最後に、岩永教授より、①乳腺の状態によって BRCA2 の発現に変化は認められるのか、②モデルマウスが胎生致死に陥る時期とその原因はわかっているのか、について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の研究成果を元に、過去の文献および未発表所見を加えて、おおむね適切に回答した。

この論文は、イヌが変異 BRCA2 による乳癌発症の新規モデル動物になる可能性を示した点で高く評価され、今後の乳癌発症の機序を解明することに貢献するものとして期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。