

論文内容の要旨

論文題目 乳癌の遺伝子変異

—特に Rad51 遺伝子との関連について—

指導教官 名川 弘一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士過程

外科学専攻

氏名 加藤 昌弘

研究目的

癌は遺伝子の変化による病気であり、癌の発生、進展の過程は、増殖、分化やゲノムの統合性維持に重要な遺伝子の変化が積み重なって、多段階の過程を経て生じた結果である。しかし乳癌においては多段階発癌モデルが、未だ確立していない。その理由として、乳癌では前癌病変の判別および上皮細胞から癌細胞までの過程を段階的に判定することが困難なこと、また、乳癌で変異が生じる遺伝子がほとんど明らかになっていないことがあげられる。乳癌発症機構を解明するために乳癌発症に直接関与している遺伝子を同定することは現在の最重要課題であると考えられる。

乳癌には同一家系内で高頻度に発生する家族性乳癌が存在し、全乳癌のうちの約 5% が遺伝的素因を有する遺伝性乳癌とされる。遺伝性乳癌に関して、BRCA1 および BRCA2 の乳癌原因遺伝子がクローニングされ、遺伝性乳癌、遺伝性卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌の原因遺伝子であるとされている。遺伝性乳癌患者の約 60% に BRCA1 もしくは BRCA2 の遺伝子異常が認められる。BRCA1、BRCA2 の胚細胞変異が乳癌を引き起こす機構は明らかでない。約 40% 前後の遺伝性乳癌の原因となる遺伝子が未だ同定されておらず、未知の遺伝性乳癌原因遺伝子の存在が示唆される。

最近、BRCA1、BRCA2 遺伝子と HsRad51 遺伝子との相互作用が報告された。Brca1、Brca2 と Rad51 のノックアウトマウスはともに胎生致死で、組み換え修復機構に異常

があるなど非常に類似した表現型を持っている。またノザンブロットティングのパターンからも、HsRad51 遺伝子の各組織における発現は、ヒト BRCA1、BRCA2 各遺伝子の発現パターンと非常に類似している。これらの事から、BRCA1、BRCA2、Rad51 はともに協調的に働いて DNA 損傷時の組み換え修復において機能し、遺伝的安定性の維持に関与し、遺伝子異常が組み換え修復の異常を引き起こし、その結果、ゲノムの安定性が維持されなくなり、最終的に癌化へつなぐと推測される。このように HsRad51 遺伝子の遺伝子変化が遺伝性乳癌の発育に関与している可能性が示唆される。

一般乳癌に関する遺伝子変化として遺伝子増幅、過剰発現 (erbB2、c-myc など)、遺伝子変異、欠損 (p53、FHIT、PTEN など)、染色体欠損などが少数報告されているのみで原因遺伝子というべきものはまだ同定されていない。BRCA1、BRCA2 の体細胞変異も極めて稀である。乳癌発症機構の解明のために乳癌発症に直接関与している遺伝子を同定することは現在最重要課題であると考えられる。

本研究において

- ①ヒト Rad51 遺伝子が第3の遺伝性乳癌原因遺伝子であるか
- ②ヒト Rad51 遺伝子が一般乳癌で変異を生じる遺伝子であるかを検討するために HsRad51 遺伝子変異をスクリーニングした。

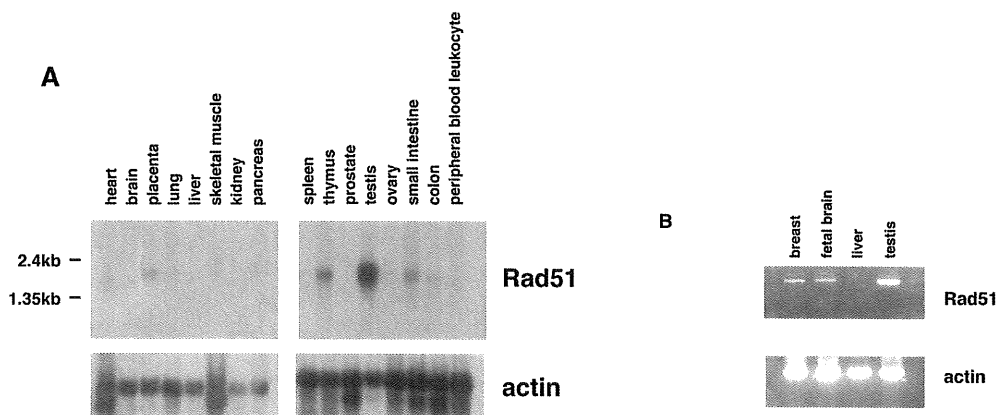
対象

遺伝性乳癌家系 20 家系さらに若年発症、両側性乳癌、多臓器癌の既往を有する乳癌患者 25 例を対象とした。乳癌組織における体細胞変異を検討するために、一般乳癌 200 例、一般大腸癌 100 例を対象として、それぞれ組織より DNA を抽出し、検討を加えた。

方法および結果

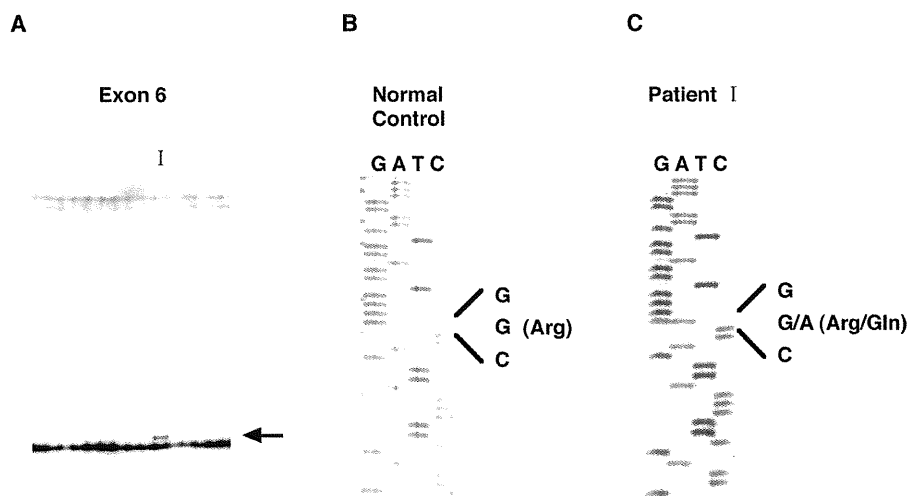
ノザンブロットティング

ノザンブロットティングでヒト正常組織での HsRad51 の発現を検討した。HsRad51 は精巣、胸腺に豊富であり、ついで小腸、胎盤、大腸、脾臓、卵巣に発現していた (A)。RT-PCR によると乳癌組織にも発現がみられた (B)。HsRad51 の発現パターンは BRCA1、BRCA2 の発現パターンときわめて類似していた。



PCR-SSCP

ヒト Rad51 遺伝子の全コーディング領域ならびに関連するエクソンとイントロンの境界領域に関して、genomic DNA を材料とし、PCR-SSCP 法を用いてその配列を調べた。その結果、2 例の両側性乳癌患者において、エクソン 6 に単一の胚細胞遺伝子変異を同定した。



2 症例の内訳は、52 歳、同時性両側性乳癌の女性（病理組織；非浸潤性乳管癌）と 44 歳、同時性両側性多発乳癌の女性（病理組織；浸潤性乳管癌）であった。ともに家族歴はなかった。両患者の DNA は Rad51 の codon 150 の第 2 ヌクレオチドが G から A へと変化し、アミノ酸がアルギニンからグルタミンへと変化した。両者とも正常アレルも残存しており、heterozygous であった。2 例ともは正常アレルに欠失はなかった。

機能解析

HsRad51 遺伝子は組み換え修復の際に、HsRad51 自身重合し、Rad52、Rad54 と結合することが報告されている。また BRCA1、BRCA2、p53 などの遺伝子蛋白との結合が知られている。HsRad51 codon 150 の胚細胞変化がこれらの蛋白との結合に影響を与えるのか酵母 two-hybrid 法で相互作用を検討したが、有意な差は認められなかった。HsRad51 の相同遺伝子である E.Coli. の RecA を参考とし、立体構造を調べたが、codon 150 に相当する部位は常に外側に位置し、他の蛋白との結合に影響を与える可能性が推測された。また GFP 蛋白との融合蛋白を作製し、その細胞内局在を検討したが codon150 の変化による細胞内の局在の差は認めなかった。

考察

組み換え修復機構に異常が起こると発癌に至ることは未だはっきりと証明されてはいない。しかし、組み換えに関与し Nijmegen breakage 症候群の原因遺伝子 NBS1 は遺伝子異常が起こると、発癌の可能性が増加し、イオン化放射線に対する感受性が増加することが知られている。このことから、組み換えの過程に異常が起こると、発癌をもたらす可能性が示唆される。HsRad51 は乳癌原因遺伝子である BRCA1、BRCA2 と蛋白複合体を形成し、これら 3 遺伝子の組織発現のパターンも非常に類似していることから、これらの遺伝子産物は共通の DNA 損傷に対する修復過程の一因子であると考えられる。DNA 損傷に対する修復過程は遺伝情報が安定して存在するためには非常に重要であり、もしこの機能が損なわれると遺伝子変異の割合が増加し、DNA 損傷が蓄積され、その結果、発癌の危険性が増すと想定される。この想定に基づき、HsRad51 が乳癌関連遺伝子である可能性を検討した。そして、両側性乳癌の二人の患者に HsRad51 の Arg が Gln へと変わる codon150 の一塩基置換を発見した。この胚細胞変異は HsRad51 の翻訳領域にあり、Rad51 と乳癌との関連を示す初めての遺伝子変化であった。ところが、非常に稀な構造多型である可能性は否定できず、これを検討するために、HsRad51 遺伝子の機能解析を行った。結果として codon150 遺伝子変化に伴う機能の変化は検出できなかった。相同組み換えに関与する Rad52 遺伝子群にはほとんど遺伝子変異が存在しないとされ、わずかに Rad54 遺伝子の異常が報告されるのみである。これは細胞が生存していくためには、組み換え修復機能が極めて重要、必須であり、機能異常は細胞死に直結することを意味すると考えられる。HsRad51 遺伝子の変化も機能には大きな変化を与えず、なんらかの他の形で乳癌発症に影響する可能性が考えられる。現在、一塩基置換のような遺伝子変化と発癌のリスクに重要な関連があるとの考え方から、遺伝子多型の検討が重要視されている。HsRad51 の 5'非翻訳領域の一塩基置換 135C は乳癌の危険性を増加し、BRCA2 浸透率に影響を与えるとされる。このように HsRad51 と乳癌の間には密接な関連が有り、Rad51 の遺伝子異常は乳癌の原因となりうると考えられる。HsRad51 の codon150 一塩基置換が非常に稀な構造多型であるとしても、この変化が乳癌の発症と関連している可能性が考えられる。さらにこの HsRad51 の遺伝子変化を有する 2 人の患者がいずれも遺伝子の関与が示唆される同時性両側性乳癌の患者であった。他の一般乳癌、一般大腸癌の患者を 300 人以上検索したが、この遺伝子変化を有する患者は存在しなかった。この遺伝子変化は乳癌に関連した変異を示していると判断した。

本研究で、HsRad51 遺伝子の胚細胞変異が乳癌発症の原因である可能性を提示した。しかし、まだ第三の遺伝性乳癌原因遺伝子と言うべき遺伝子は不明のままであり、一般乳癌の関連遺伝子の同定も十分で無い。これを同定するためにさらなる研究が必要であろう。