

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591903

研究課題名(和文) BRCA1 / BRCA2 変異保因者に対する乳がん早期発見・発症予防に関する研究

研究課題名(英文) Management of breast cancer patients with BRCA1 or BRCA2 mutations.

研究代表者

下村 淳 (Shimomura, Atsushi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10625841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. 家族歴のある乳癌術後症例に対しBRCA1/BRCA2遺伝子検査を費用補填により進めた。また、変異保因者3例に対しリスク低減卵巣卵管切除(RRSO)選択可能な乳癌及び卵巣癌予防検診プログラムを開始し、2例がRRSOを受けた。

2. 散発性乳癌の腫瘍部と正常乳腺組織におけるBRCA1遺伝子のメチル化の検索により、正常乳腺組織でのBRCA1のメチル化が乳癌発生に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：1. Four breast cancer patients with family history screened with HBOC, one BRCA1 mutation and two BRCA2 mutations were identified. Two of three patients underwent risk-reducing salpingo-oophorectomy (RRSO) during surveillance program for HBOC. 2. We showed that a significant proportion of patients with BRCA1-methylated tumors harbored BRCA1 promoter methylation in normal breast tissues but those with BRCA1-unmethylated tumors did not. This suggests a possibility that a small proportion of the epithelial cells with BRCA1 promoter methylation can be precursor cells from which BRCA1-methylated breast tumors originate.

研究分野：外科学

キーワード：乳癌 家族性乳癌 BRCA1 BRCA2 変異保因者

1. 研究開始当初の背景

日本人女性は欧米女性に比べ乳癌の発症率は低いものの、女性の癌の中では最も多く、約 20 人に 1 人の女性が生涯に乳癌を経験する。その約 10% は何らかの遺伝性背景を有し、BRCA1 および BRCA2 が遺伝性乳がん・卵巣がん症候群 (hereditary breast and ovarian cancer syndrome: HBOC) の原因遺伝子として特定されている。本邦では欧米にこの分野の研究や実臨床への応用で遅れをとっているものの、BRCA1/BRCA2 変異保因者の乳癌発症リスクと、BRCA1/BRCA2 変異保因乳癌患者における対側乳癌発症リスクは欧米の報告とほぼ同等であることが判明している。その変異保因者は若年乳癌、両側乳癌、卵巣癌の発症リスクの上昇を呈する。欧米では BRCA1/BRCA2 変異乳癌に関する疫学データが数多く積み上げられており、これらに対するマネジメントガイドラインが存在し、積極的な乳癌検診プログラム、タモキシフェン (エストロゲン阻害剤) 投与による化学的発症予防プログラム、ならびに皮下乳腺全摘術と同時乳房再建による外科的発症予防プログラムが提供され、患者の希望により選択できるようになっている。また、スクリーニング検査も多くの保険でカバーされている。しかし、本邦では社会通念や宗教、死生観など欧米とは異なるため、これらをそのまま適用する事はできず、日本独自のガイドラインが必要と考えられる。その作成には BRCA1/BRCA2 変異保因者および家系に関する本邦の疫学的データや、乳癌患者やその家族について長期の観察研究が必要であるが、まだまだ少ない。そこで遺伝性乳癌に関する研究には研究の持続のために情報のデータベース化と、それを維持する組織構築が必要であると考えられる。日本における BRCA1/BRCA2 変異スクリーニングが進まない理由は、遺伝性乳癌に関する啓蒙が十分でないこと、スクリーニング検査は自費となり、高額の負担を強いられる。変異保因が明らかとなっても確立されたマネジメントのプログラムがない。といった 3 点が考えられたが、過去のスクリーニングに関する経験から遺伝子検査費用の経済的負担から検査を断念するケースが多く、これを解決することにより保因者診断を進めることができると考えられた。

また、BRCA1 遺伝子がメチル化により発現が抑制されているものがある事がわかっており、このような散発性乳癌は BRCA1 遺伝子変異を持つ BRCA1 乳癌と生物学的にも臨床病理学上も類似性があると考えられている。散発性乳癌における BRCA1 のメチル化を調査することも BRCA1 乳癌の臨床病理学的因子の解析に利するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は日本人の BRCA1/BRCA2 遺伝子のデータベースを構築し、変異保因者に対す

る乳癌の早期診断プログラム作成と、予防的治療に関する研究を行う。また、散発性乳癌における BRCA1 遺伝子のメチル化を検索し BRCA1 乳癌の臨床病理学的因子解析の一助とする。

3. 研究の方法

(1) BRCA1/BRCA2 変異保因者の解析

遠隔転移を認めない原発性乳癌症例のうち、以下の条件に該当する症例を対象とした。

第 1 度、第 2 度近親者に本人を含めて 3 名以上の乳癌患者がいる。

第 1 度、第 2 度近親者に本人を含めて 2 名の乳癌患者がおり、そのうちのひとりが「一方が 40 歳未満の若年性乳癌」「卵巣癌」「男性乳癌」のいずれかに該当する。

条件に一致する症例に対し、主治医を通じて遺伝子検索に関するインフォームド・コンセントを行い、検索希望者に対して遺伝子診療カウンセリングを行い希望者に対し遺伝子検査を施行。(検査費用約 20 万円は研究費にて全額補填。) 変異補因症例の血縁者で検査希望者には、同様にカウンセリングの上で、検査を施行する。(検査費用約 3 万円は全額本人負担) 遺伝子解析で変異有りの場合は臨床病理学的因子とともにデータベースに登録し、乳癌については術後の定期的な検診に加え 6 ヶ月毎に交互にマンモグラフィと乳房 MRI を行う綿密な定期検診を行い、また、卵巣がんについては産婦人科医師の協力を得て定期的な検診を行うとともに、リスク低減予卵巣卵管切除術 (risk-reducing salpingo-oophorectomy: RRSO) が選択できるようにした。

(2) 散発性乳癌の BRCA1 メチル化の解析

原発性乳癌の手術摘出標本の乳癌組織 (パラフィンブロック) と周囲の正常乳腺組織から micro-dissection 法によって DNA を抽出し、real-time methylation-specific PCR 法にて乳癌組織にてよく報告されている BRCA1 遺伝子と GSTP1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無について解析した。また、magnetic-activated sorting 法にて正常乳腺上皮細胞を単離することにより、正常乳腺組織でのメチル化を受けているのが正常乳腺上皮細胞に由来しているものかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) BRCA1/BRCA2 変異保因者の解析

過去 3 年間の手術症例で適応基準を満たす症例は 16 例であった。これらに対して主治医を通じて研究参加を呼びかけ 4 例が研究参加に同意した。遺伝カウンセリングの上 BRCA1/2 遺伝子検査を施行し、1 例に BRCA1 変異 (IVS2-1G>A)、2 例に BRCA2 変異 (6744 del, 983 del 4) の計 3 例に病的変異が判明した。BRCA1 変異の症例は 40 歳代でステージの乳癌 (ER 陽性、PgR 陽性、

HER2 陰性)と診断されており母およびおば(母の妹)に乳癌の家族歴があった。乳房温存術施行後に術後放射線療法と内分泌療法を受けていた。BRCA2 変異(6744 del)の症例は40歳代で順に右乳癌、左乳癌の診断を受けていた(ともにステージ)症例で父方のおば2人に乳癌の家族歴があった。それぞれの乳癌の診断の間隔は8年であった。右乳癌はER陽性、PgR陽性(HER2は不明)であったが、左乳癌はER陽性PgR陰性HER2陰性であった。両側ともに乳房切除術を受け、術後に化学療法と内分泌療法を受けていた。もう1例のBRCA2変異症例(983 del 4)は非浸潤性乳管癌(ステージ0、ER陽性、PgR陽性)の症例で全乳房切除を施行していたが、母とおば(母の妹)に乳癌の家族歴があった。両側乳房切除施行例を除く2例に乳癌検診プログラム(マンモグラフィとMRIを6ヶ月毎交互)を開始し、3例全例に卵巣癌検診プログラム(経膈エコーとCA125腫瘍マーカーを3ヶ月毎)を開始した。また、卵巣については3例ともにRRSOでの卵巣癌の予防法を希望により選択できることを提示した。BRCA1変異の症例は遺伝子検査より10ヶ月後(乳癌手術より16ヶ月後)にRRSOを受けた。BRCA2遺伝子陽性例のうち1例(983 del 4)は非浸潤癌であったために変異の判明と同時に対側乳癌の発症予防目的でタモキシフェンの内服を開始し、遺伝子検査より9ヶ月後(乳癌手術より12ヶ月後)にRRSOを受けた。

もう1例のBRCA2変異の症例(6744 del)は卵巣癌検診プログラムを行っているものの、RRSOについては将来的に受ける事を検討している。現在のところ全例において卵巣癌の発生や乳癌の再発または原発性乳癌の新発生は認めない(遺伝子検査より9ヶ月~1年7ヶ月経過)。

HBOCは本邦報告でも欧米と同程度にはあるとされており、本研究でも高い確率(4例中3例)で変異を認めた。一般にBRCA1乳癌はホルモンレセプター陰性のタイプの方が多くとされるが、本研究のBRCA1変異症例はホルモンレセプター陽性であった。これに対しBRCA2乳癌はホルモンレセプター陽性のタイプの方が多くとされており、本研究の2例ともホルモンレセプター陽性であった。

3例中2例は既にRRSOを受けたが、卵巣に悪性所見はなかった。残る1例も将来的に受ける事を検討していることから、いずれの症例もRRSOに対しては積極的な姿勢が認められた。最近では卵巣癌の予防だけでなく、乳癌の予後も改善する報告が相次いでいることから、HBOCの乳癌の術後治療として検討すべき選択肢となる可能性がある。

また、1例は予防的乳房切除(RRM)を受けたいという希望があったが、本研究でのプロトコールにはないため、RRMの臨床研究を行っている他の施設へ紹介することとな

った。今後HBOCの症例の増加に伴い予防的乳房切除(RRM)を希望する患者の増加も見込まれ、将来的な検討課題と考える。

家系解析についても本人を通じて検査対象を募ったが、候補者が本人の子の場合は検査対象とするには十分な年齢に達していなかったり、親戚でも本人との関係により積極的な協力が得られなかったため、研究期間中に家系内で受検したものはなかった。

(2) 散発性乳癌のBRCA1メチル化の解析
 原発性乳癌に対し手術を行った147症例の乳癌腫瘍部のパラフィンブロックにおいて、BRCA1遺伝子のプロモーター領域でメチル化をreal-time methylation-specific PCR法で調べたところ、15例にメチル化を認めた。残り132例の非メチル化症例から対照として年齢、腫瘍径、リンパ節転移の個数をマッチングさせた15例を選択して検討した。また同様に45症例においてGSTP1のプロモーター領域のメチル化を調べたところ9例にメチル化が認められ、残り36例から対照として11例を選択して検討した。

次にそれぞれの症例のパラフィンブロックで腫瘍近傍・遠位の正常乳腺組織を用手的microdissection法で採取してDNAを抽出し、BRCA1とGSTP1のプロモーター領域のメチル化を調べた。その結果、腫瘍部でBRCA1のプロモーター領域のメチル化が陽性の乳癌症例では15例中9例に正常乳腺組織でもメチル化が認められた。これに対し腫瘍部でメチル化が陰性の乳癌では、正常乳腺組織でメチル化が認められた症例はなかった。GSTP1においては腫瘍部でメチル化が陽性の9例及び陰性の11例すべてにおいて正常乳腺組織でのメチル化は認められなかった。

		BRCA1メチル化	
		陽性	陰性
正常部の	有り	9	0
メチル化	無し	6	15

免疫染色でメチル化とタンパク発現との関係を調べたところ、BRCA1のプロモーター領域のメチル化はBRCA1タンパクの発現低下と有意な相関が認められた。(非メチル化症例15例中、BRCA1免疫染色陽性は11例に対し、メチル化症例15例中、免疫染色陽性例は4例。)

BRCA1のプロモーターのメチル化が正常乳腺組織のうち腺上皮細胞に存在することを確認するため、上記正常乳腺組織でメチル化を認めた症例の中から3症例をピックアップして、正常乳腺組織部からmagnetic-activated cell sorting法にて腺上皮細胞を単離した。サイトケラチン染色を行い、確かに腺上皮細胞が単離されていることを確認したのち、これらの検体でBRCA1のプロモーター領域のメチル化を調べたと

ころメチル化を認め、正常組織のうち腺上皮細胞にメチル化が存在することを確認した。

以上から、正常乳腺組織での BRCA1 プロモーターのメチル化が、乳癌の発生に関わっていると推察された。この結果は Cancer Science 誌に投稿し掲載された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

2014 Oct;105(10):1369-76.

BRCA1 promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor for BRCA1-methylated breast cancer.

Otani Y¹, Miyake T, Kagara N, Shimoda M, Naoi Y, Maruyama N, Shimomura A, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S.

[学会発表](計 1 件)

発表者名:大谷陽子

発表演題:正常乳腺上皮細胞における BRCA1・GSTP1 遺伝子のメチル化解析

学会等名:第 22 回 日本乳癌学会総会 発表

年月日:2014 年 7 月 10 日

発表場所:大阪国際会議場(大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

下村 淳 (SHIMOMURA ATSUSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 1 0 6 2 5 8 4 1

(2)研究分担者

金 昇晋 (KIM SEUNG JIN)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 9 0 3 4 6 2 1 3