

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 9 月 7 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08557

研究課題名(和文) BRCA2における新しい生殖細胞変異による遺伝性乳癌発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of hereditary breast cancer caused by a novel germline mutation in BRCA2

研究代表者

中村 力也 (NAKAMURA, RIKIYA)

千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：50456026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子BRCA2の変異は乳癌・卵巣癌の発症率を高め、遺伝性乳癌卵巣癌症候群(HBOC)を引き起こす。最近、我々は家族歴を有する乳癌患者から新規のBRCA2変異を発見した。このミスセンス変異は病的意義不明と判定されていたが、変異を持つ姉妹は乳癌を、父は膵癌と前立腺癌を発症していた。この変異はBRCA2のDNA結合に必須なドメイン上に座位していた。この新規変異はBRCA2蛋白の安定性には影響しなかったが、BRCA2の相同組み換え活性は低下させたことを、生化学的に実証した。また、ゲノム編集法を用いて新規変異を持つノックインマウスを作成したところ、1系統で卵巣腫瘍と生殖器異常を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生まれながらにBRCA2の病的変異を有することは遺伝性乳癌卵巣癌症候群の確定診断となり、体質に合った抗がん剤の選択や、将来の癌リスクに対して早期からの精密検診、高リスク臓器の予防的切除といった対処法を選択できる。本研究により、これまで病的意義が不明であったBRCA2ミスセンス変異が病的であるとわかると、本人のみならず、きょうだいや子どもが同じ体質を共有するか診断でき、癌治療の選択肢を増やしたり、将来の癌リスクに対する予防が可能になるため、癌の生存率の改善に寄与し、医療経済にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic variants in the tumor suppressor gene BRCA2 increase the incidence of breast and ovarian cancer and cause hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC). Recently, we discovered a novel BRCA2 missense variant of uncertain significance in a patient with a family history of breast cancer. The variant was inherited within the family, and the sister and father carrying the variant developed breast and pancreatic cancer, respectively. The location of the variant is on an oligonucleotide binding domain of BRCA2 that is essential for DNA binding. In this study, we biochemically verified the reduction of the homologous recombination activity for DNA double strand break. We also used genome editing to generate knock-in mice with the novel variant. As a result, reproductive organ abnormalities and ovarian tumor were observed in one strain.

研究分野：Breast Surgery

キーワード：遺伝性乳癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 BRCA1/2 の病的変異は乳癌・卵巣癌の発症率を高め、遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) を引き起こす。そのため HBOC の家系員は、癌の早期検診や予防的治療が推奨される。実際、BRCA2 の病的変異を生殖細胞系列に持つ女性は 80 歳までに乳癌を発症するリスクが 69%、卵巣癌の発症リスクも 17% と高い (Kuchenbaecker et al., JAMA 2017)。2014 年に BRCA1/2 に病的変異を有する乳癌の薬剤として PARP 阻害剤が米国 FDA で認可され、我が国でも BRCA1/2 に病的変異を有する転移性乳癌に対して PARP 阻害剤 (リムパーザ) が、無増悪生存期間を 2.8 ヶ月改善することが示された (Robson et al., N Engl J Med 2017)。当院も本薬剤を併用する多施設共同臨床試験 (手術不能・再発乳がんに対する Eribulin 併用の Olaparib 第 I/II 相臨床試験)、OlympiA 国際共同試験 (第 III 相試験) に参加し、本研究課題の研究代表者 (中村) は院内の治験責任医師を務めた。これら新しい治療法の恩恵を多くの患者が受けるためにも、BRCA1/2 に検出された変異の病的意義を明らかにすることは重要である。HBOC であると診断された場合、早期検診や予防的治療の選択により、以下 a~d に挙げるような臨床的有益性があることが示されている (乳癌診療ガイドライン 2015 年版、Lord et al., Nat Rev Cancer 2016)。

- a. 卵巣卵管の予防的な切除により乳癌・卵巣癌の発症率を減らし、予後を改善できる
- b. タモキシフェン服用により乳癌発症の予防効果が期待できる
- c. 対側乳房を切除することで、対側乳房からの乳癌発症を 90% 以上抑制できる
- d. 乳癌、卵巣癌の PARP 阻害剤への感受性が高いことが期待される

その他、30 歳以下で BRCA1/2 に病的変異を持つ女性は電離放射線を用いた検査が乳癌の罹患リスクを上昇させるため、乳癌の検診には MRI が推奨されるなど (Pijpe et al., BMJ 2012、乳癌診療ガイドライン 2015 年版)、生殖細胞系列における BRCA 変異の有無は予防、診断、治療の全ての面において最適な医療を受けるために必須な情報となる。

診療における BRCA1/2 の遺伝学的検査は特許を取得していた米国 Myriad 社に委託して行われている。BRCA1/2 に検出された変異の評価は、Myriad 社の有する世界最大の BRCA1/2 データベース (非公開) に照らして病的意義が判定される。病的意義不明 (Variant of Uncertain Significance, VUS) である時には、BRCA1/2 病的変異陰性とされ、HBOC とは診断されず、我が国の保険診療では PARP 阻害薬の適用にはならず、対側乳房や卵巣のサーベイランス、予防的乳房切除、予防的卵管卵巣切除の対象にもならない。

我々は最近、乳癌及び多発癌の家族歴がある乳癌患者から新規の BRCA2 変異を発見した。この変異は Myriad 社の判定では VUS であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は新規に見出した BRCA2 変異の病的意義を分子レベル、個体レベルで明らかにすることである。これまでの BRCA2 変異の解析は家系解析、分子生物学的解析のいずれかを対象としたものがほとんどであり、本研究のように家系データがある BRCA2 変異において詳細な機能解析は限られている。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 変異領域の進化的保存性の評価および機能阻害に関する in silico 予測

新規変異について、公的データベースによりゼブラフィッシュ からヒトまでの脊椎動物間での進化的保存性を評価する。また、当該領域は機能ドメインに座位していることから、SIFT、PolyPhen-2 などの公的データベースを用いた in silico 解析により BRCA2 の機能阻害をきたす可能性を評価する。

### 3-2. 家系解析

患者および患者の第一度近親者に対して詳細な家族歴を聴取し、遺伝カウンセリングを行い、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の疾患概要、病的変異と診断がつくことの利益・不利益、病的意義不明変異の位置づけ、病的意義の評価に必要なことを伝える。病的意義の解明のために家系解析を希望された場合は、個別に生殖細胞系列のゲノム解析の同意を取得し、採血を行う。末梢血リンパ球を回収して培養ののち、一部をピューロマイシンにて処理する。培養したリンパ球を回収し、核酸抽出し、遺伝学的検査を行う。

### 3-3. BRCA2 変異体のタンパク質安定性の解析

この変異は BRCA2 の安定化や相同組替え活性に必要な調節因子である DSS1 の結合領域にアミノ酸置換を引き起こす (Li et al., Oncogene 2006)。そこで、BRCA2 変異体を内在性 DSS1 が発現する 293T 細胞に過剰発現し、Western blotting 法により、野生型 BRCA2 に比較し、

タンパク質発現量が低下するかを調べる。また、サイクロヘキシミド処理によりタンパク質合成を阻害し、野生型に比べ変異体の半減期が短くなるかを調べる。その際、同時に RNA を抽出し、RT-PCR 法により RNA 発現量変化の有無を調べる。

### 3-4. BRCA2 変異体の相同組替え活性の測定

BRCA2 変異体の相同組替え活性を測定する目的で、BRCA2 変異体発現ベクターを細胞株に導入し、相同組替え活性を Direct-repeat GFP 法により検証する。この方法は相同組替えが起こった場合のみ GFP が陽性となり、細胞の GFP 陽性率を計算することで相同組替え率を簡単に調べることができる。

### 3-5. BRCA2 変異ノックインマウスの作出と発癌実験

CRISPR-CAS9 法でのノックインマウスを作製する。マウス受精卵に BRCA2 を標的とする gRNA、CAS9 タンパク質、BRCA2 変異配列の single strand DNA を導入し、受精卵をマウス子宮に戻すことで BRCA2 変異配列を持つノックインマウスを作製し、発癌への影響を調べる。

## 4. 研究成果

### 4-1. 変異の進化的保存性の評価および機能阻害に関する in silico 予測

この新規変異がコードするアミノ酸は、ゼブラフィッシュ からヒトまでの脊椎動物間でよく保存されていた。また、変異についての in silico 解析による機能阻害の予測スコアも全て病的変異であることを示していた。

#### BRCA2の構造変化の予測と進化的保存性

Conservation (0-1)	1
SIFT (0-1)	0.00 (pathogenic)
Grantham (0-215)	194 (radical)
Max cross species difference (0-215)	0
UMD-predictor (0-100)	100 (pathogenic)
PolyPhen-2 (0-1)	1.000 (probably damaging)

### 4-2. 家系解析

患者および父、母、姉妹が当院に来院され、遺伝カウンセリングを受け、疾患概要および病的意義と診断された場合の利益・不利益について情報提供を行った。その結果、当変異の病的意義の解明を目指した研究への参加を希望されたため、末梢血採血を実施した。末梢血リンパ球を用いて遺伝学的検査を行った結果、膵癌、前立腺癌を含む四重癌に罹患している父と、乳癌既発症の姉妹において BRCA2 の新規変異を認め、がん未発症の母には変異は認められなかった。従って、検索した範囲において genotype と phenotype が一致しており、遺伝学的にも病的変異であることが強く疑われた。

### 4-3. BRCA2 変異体のタンパク質安定性の解析

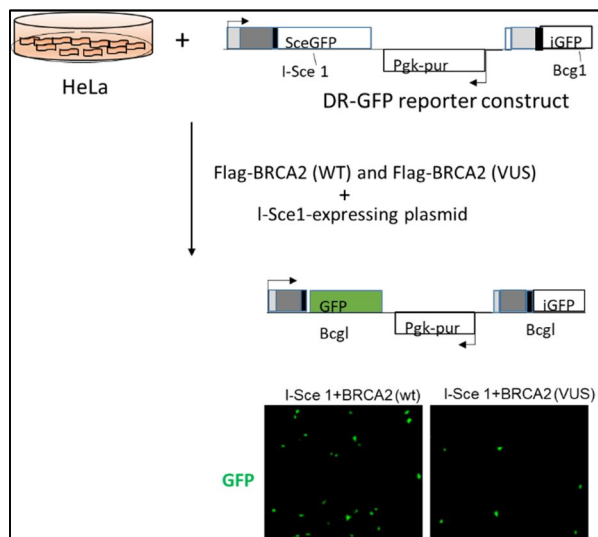
この新規変異を BRCA2 野生型に組み込んだ BRCA2 変異体を作成し、内在性 DSS1 が発現する 293T 細胞に過剰発現した。細胞を回収し、Western blotting 法により BRCA2 タンパク質発現量を、野生型と変異体で比較した。その結果、BRCA2 変異体においてタンパク質発現量の低下は認められなかった。また、細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって BRCA2 の RNA 発現量を野生型と変異体で比較した。その結果も、BRCA2 変異体において RNA 発現量の低下は認められなかった。以上から、この新規変異による、BRCA2 タンパク質の不安定化は生じないと考えられた。

### 4-4. 変異型 BRCA2 による相同組換え修復活性の変化

相同組換え修復活性のリポーター遺伝子である DR-GFP は二つの不完全かつオーバーラップした GFP 遺伝子のタンデムリピートから構成され、片方の GFP 遺伝子は制限酵素 I-SceI の切断配列の挿入によって不活化されている。DR-GFP を染色体上に安定的に 1 コピー組み込んだ HeLa 細胞に、I-SceI 制限酵素を発現するプラスミドと Flag 付きの野生型または変異型 BRCA2 をを一過性に導入した。

この DR-GFP-HeLa 細胞を培養し、I-SceI の発現を誘導し、染色体切断による二重鎖切断 (DSB) を人為的に起こした。この DSB は、もう片方の GFP 遺伝子からの配列情報を用いて相同組み換えにより修復されると、完全な GFP 遺伝子となり発現する。

この GFP 発現をフローサイトメーターにより定量化して相同組み換え活性を調べた結果、



変異型 BRCA2 を導入すると、野生型 BRCA2 を導入した場合と比較して、相同組換え活性の低下が認められた。以上から、この変異により BRCA2 の相同組換え修復能が低下していると考えられた。

#### 4-5. in vivo マウスモデルの作成

C57BL6 系統マウスの受精卵を CRISPR-Cas 9 法によりゲノム編集し、2 種類の変異型 BRCA2 (変異部位の一塩基置換のみ、および、変異部位の一塩基置換と近傍に制限酵素切断配列を形成するサイレント変異を有する) をノックインした。いずれの系統からも複数のファウンダーマウスが出生した。計 8 亜系統のファウンダーマウスを野生型マウスとの交配したのち、片アレルに変異型 BRCA2 を有する同一亜系統のヘテロマウス同士を交配した。8 亜系統のうち 7 系統では両アレルに変異型 BRCA2 を有するホモマウスが出生し、現在までの観察において明らかな表現型を認めない。一方、1 系統では卵巣腫瘍と生殖器異常を認めた。



BRCA2 ノックイン・マウス  
における卵巣腫瘍

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井左奈、山本尚人
2. 発表標題 成人期NF1における乳癌
3. 学会等名 第10回日本レックリングハウゼン病学会 学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原令子、土屋俊一、海保隆、横井左奈
2. 発表標題 HBOC遺伝カウンセリング症例からの考察
3. 学会等名 第24回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井左奈、東川智美
2. 発表標題 BRCA1/2変異予測モデルを用いた遺伝性乳癌卵巣癌症候群のスクリーニング
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井左奈
2. 発表標題 産婦人科医に伝えたい家族性乳がんの臨床・研究の最前線
3. 学会等名 第25回日本産婦人科乳腺医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井左奈
2. 発表標題 県立がん専門病院における地域密着型のバイオバンク
3. 学会等名 JASIS Conference 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤平百絵、小原令子、主原翠、兼松宗太郎、横井左奈
2. 発表標題 遺伝性乳癌卵巣癌症候群におけるBRCA1/2遺伝子変異予測モデルの精度評価 続報
3. 学会等名 第25回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤平百絵、横井左奈、小原令子
2. 発表標題 病的変異に再判定されたBRCA1/2のミスセンス変異の3症例
3. 学会等名 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井左奈
2. 発表標題 遺伝医学の基礎
3. 学会等名 遺伝性乳癌卵巣癌症候群総合診療機構HBOC教育セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sana Yokoi (Editor: Seigo Nakamura, Daisuke Aoki, Yoshio Miki)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 -
3. 書名 Hereditary Breast and Ovarian Cancer - Molecular Mechanism and Clinical Practice: Chapter 3. Genetic Testing	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横井 左奈  (Yokoi Sana)  (30372452)	千葉県がんセンター(研究所)・遺伝子診断部・部長   (82504)	
研究分担者	山本 尚人  (Yamamoto Naoto)  (40506169)	千葉県がんセンター(研究所)・乳腺外科・部長   (82504)	
研究分担者	末永 雄介  (Suenaga Yuusuke)  (80581793)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ 発がん制御研究部・研究員   (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------