

称号及び氏名	博士（獣医学）杉浦 方亮
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「イヌの正常組織および乳腺腫瘍における癌抑制遺伝子 BRCA1 variant mRNA の発現」
論文審査委員	主査 久保 喜平 副査 大橋 文人 副査 小森 雅之 副査 松山 聡

論文要旨

緒言

BRCA1 は 1863 個のアミノ酸をコードする 24 の exon からなる大きな遺伝子である。哺乳動物間で、BRCA1 遺伝子のアミノ酸の同一性は 60%以下であるが、重要な機能ドメインは保存されていると考えられている。BRCA1 は転写制御、細胞周期管理、そして DNA の修復に関与していると考えられている。

ヒト家族性乳癌の約 50%は BRCA1 の生殖細胞系における変異が原因で発生するとされている。体細胞変異に関する報告はほとんどなされていないが、ヒト染色体 17q21 の BRCA1 領域は散発性の乳癌と卵巣癌の約 50%において LOH (loss of heterozygosity)を示している。さらに、乳腺上皮と比較してこれらの腫瘍において、mRNA および蛋白の量が減少していることが報告されている。しかし、腫瘍抑制遺伝子としての BRCA1 の役割は完全には分かっていない。

いくつかの BRCA1 splicing variant が異なる組織で多様な発現パターンを示していることが報告されている。全長型と splicing variant の delta11b は多くの細胞で高発現している。delta11b は open reading frame(以下、ORF) の約 60%を占める exon11 の大部分を欠いたものである。Cre-lox 法によりマウスの BRCA1 exon11 を欠損させると乳腺のアポトーシスが増加し、腫瘍形成に至る。またマウスの胎児期に、exon11 欠損 BRCA1 は全長型の役割を部分的に担うと考えられている。また、2004 年にヒト BRCA1 IRIS(以下、IRIS) の mRNA 及び翻訳産物が同定された。IRIS は全長型の ORF のコドン 1 から開始し、

intron11 の 34 番目のコドンで停止する mRNA であり、DNA の複製や細胞の増殖に関与していることなどが報告されている。しかし、delta11b や IRIS を含め種々の splicing variant の機能はほとんど分かっていない。

最近イヌ BRCA1 の全長型 mRNA の配列が報告されたが、その variant は知られていない。本研究はヒトにおいて主要な BRCA1 splicing variant mRNA(以下、variant mRNA) がイヌ正常組織および乳腺腫瘍組織において発現しているか、また variant mRNA の発現量の変化が乳腺腫瘍の発生と進行に何らかの関わり合いがあるかについて明らかにすることを目的として行った。

第一章 イヌの正常組織における BRCA1 variant mRNA の発現

本章では、まず、イヌ正常組織においてどのような variant mRNA が発現をしているのかを調べるためにノーザンブロット法を行った。使用したプローブは、それぞれ exon5-10 領域 423bp、exon11 領域 2270bp および exon15-22 領域 849bp の cDNA を鋳型にランダムプライミング法により 3 種類構築した。イヌの正常精巣において、全てのプローブで 28S のリボソームを超える大きさの全長型と考えられる mRNA と 18S と 28S の間の大きさの mRNA を検出した。exon5-10、exon15-22 を認識するプローブでの結果は、ヒト mRNA の長さから全長型と delta11b と推定された。そして exon11 を認識するプローブでは、全長型以外に exon11 を持つ variant mRNA の存在が考えられた。

次に、イヌの正常組織における variant mRNA の発現を RT-PCR 法により比較検討した。正常組織標本として、卵巣 3 例、精巣 3 例および乳腺組織 2 例を用いた。ノーザンブロット法の結果を参考にし、exon11 の有無に主眼を置いてイヌ variant mRNA の発現を調べるために、4 組のプライマーセット(b-1、b-2、b-3 および b-4)を構築した。b-1 と b-2 は exon11 内の異なる部分を、b-3 は exon14 から 15 を、b-4 は exon10 から 13 を含む領域を検出できるように設計した。以前に報告されたイヌ BRCA1 配列から、各プライマーセットの増幅産物長は、b-1 が 291bp、b-2 が 273bp、b-3 が 277bp そしてヒト BRCA1 配列から b-4 は delta11b が増幅された場合、約 280bp と期待された。α-tubulin は mRNA の量を調べるための対照として用いた。

各 PCR 産物は全ての正常組織で検出された。b-1、b-2 および b-3 産物の配列は報告されているイヌ BRCA1 と一致した。b-4 産物の配列はヒト delta11b と塩基配列が 86%、アミノ酸配列が 77%の相同性を示し、イヌ delta11b であると考えられる。いずれの正常組織標本でも各 PCR 産物のα-tubulin に対する相対量は、exon11 を示す b-1 および b-2 産物の量が b-3 産物量より少なかった。このことは exon14-15 の領域を含む mRNA が exon11 を有するものより多いことを示している。

第二章 イヌの乳腺腫瘍における BRCA1 variant mRNA の発現

イヌの自然発生乳腺腫瘍において BRCA1 の発現の変化の有無を調べるために、前章と同様の方法でイヌの乳腺腫瘍 16 例における variant mRNA の発現を調べた。乳腺腫瘍標本は本学家畜病院に来院した患畜より採取した。その病理組織学的検査の結果は、Simple carcinoma 9 例、Complex carcinoma 6 例、Complex adenoma 1 例であった。正常乳腺組織と異なり乳腺腫瘍標本においては、variant mRNA の多様な発現パターンを示唆する結果が得られた。b-1 と b-2 産物は調べた全ての標本で検出された。しかし、2 例の腫瘍では、b-3 と b-4 の両方の産物が検出されなかった。そして、b-4 産物は 5 例の腫瘍で検出されなかった。腫瘍標本における b-4 産物の減少は著しく、これらの腫瘍で delta11b のように exon11 を欠く variant mRNA の発現が減少していると考えられた。さらに、正常乳腺標本と異なり、b-3 産物量が b-2 産物の量よりも少ないものが多く存在した (8/16)。このことは、正常組織に多く存在する variant mRNA の発現の減少を示唆し、exon11 を持つが exon14-15 を持たない variant mRNA が存在することを示唆すると考えられる。また、mRNA 発現パターンと病理組織学的検査結果との間に、明らかな相関は認められなかった。これらの結果はイヌの自然発生乳腺腫瘍に伴って variant mRNA の発現量の変化が頻繁に発生していることを示す。

第三章 イヌの組織における IRIS mRNA の発現

正常精巣におけるノーザンブロット法の結果および腫瘍標本における RT-PCR 法の結果から、exon11 を持つが exon14-15 を持たない variant mRNA の存在が考えられた。

その未知の variant mRNA の候補として IRIS が考えられたため、イヌ IRIS mRNA の存在を確かめた。イヌの exon11 と intron11 の接合部を挟む様にプライマーセット(b-5)を構築し RT-PCR を行った。その結果、正常の乳腺、精巣および卵巣で予想長の増幅産物が検出された。乳腺組織の b-5 産物の塩基配列を確認したところ、ヒト IRIS と塩基配列が 81.1%、アミノ酸配列が 69.7%の相同性を示し、ヒト IRIS 様 mRNA がイヌ正常組織においても発現していると考えられた。

イヌの自然発生乳腺腫瘍において IRIS 様 mRNA の発現の変化の有無を調べるために、前章と同様の方法でイヌの正常 2 例および乳腺腫瘍 6 例における variant mRNA の発現を調べた。IRIS 様 mRNA は全ての腫瘍標本で検出された。

総括

1. イヌ正常精巣においてノーザンブロット法により少なくとも 3 種の variant mRNA の存在を確認した。RT-PCR 法による結果では、イヌの正常卵巣、精巣、乳腺組織の全てにおいて、exon11 を持つものと、イヌで報告されていない exon11 を欠く variant mRNA の両方が検出され、特徴的な発現パターンを示した。そして、その

exon11 を欠く mRNA は exon11 の最初の 120bp を含む delta11b の相同体と考えられる。一方、他の哺乳類で観察された完全に exon11 を欠く delta11 は、イヌにおいては観察されなかった。

2. 乳腺腫瘍組織においても、delta11b 様 mRNA を検出し、variant mRNA の発現に多様な変化が認められた。これらの結果はイヌの乳腺組織において variant mRNA の発現の変化がイヌ腫瘍発生に関連している可能性を示唆している。したがって、今後、散発性乳腺腫瘍の発生や進行への BRCA1 の発現動態の関わりを考える場合、その variant の発現を考慮に入れる必要があると考えられる。
3. イヌ正常および乳腺腫瘍において、exon11 と intron11 の一部を連続して持つ mRNA を検出し、イヌで報告されていないヒト IRIS の相同体と考えられる。

審査結果の要旨

BRCA1 遺伝子は 1863 個のアミノ酸をコードする 24 の exon からなる大きな遺伝子で、その産物は転写制御、細胞周期管理、そして DNA の修復に関与していると考えられている。ヒト家族性乳癌の約 50% は BRCA1 の生殖細胞系における同遺伝子の変異が原因で発生するとされている。散発性乳癌における変異に関する報告はほとんどなされていないが、ヒト染色体 17q21 の BRCA1 領域は散発性の乳癌と卵巣癌の約 50% において異型接合性の喪失 (LOH) を示している。また、散発性乳癌の約半数にコピー数減少、プロモーターのメチル化などに起因する haploinsufficiency が報告されている。いくつかの BRCA1 splicing variant が知られているが、その中で exon11 の大部分を欠く delta11b および exon12 以降を欠く IRIS は、翻訳産物が同定されており、正常乳腺組織においても何らかの機能を担っている predominant variant と考えられる。最近、イヌ BRCA1 全長型の mRNA の塩基配列が報告されたが、その variant は知られていない。イヌにおいても乳腺腫瘍は高頻度にみられる疾患であるので、その発生に伴う BRCA1 の発現動態解明は重要な課題と考えられる。本研究は、イヌ正常組織および乳腺腫瘍におけるこれら predominant variant の発現および乳腺腫瘍におけるその発現の異常について解明することを目的として行った。本研究により以下に示す成果が得られた。

第 1 章では、まず、イヌ BRCA1 mRNA を検出するための認識領域の異なる 3 種のプローブを作製した。これらを用いたノーザンブロット法により、イヌ正常精巣において少なくとも 3 種の variant mRNA の存在を確認した。さらに、4 種のプライマーセットを用いた RT-PCR 法により、イヌの正常卵巣、精巣および乳腺組織において、exon11 を持つ mRNA、exon14 から exon15 を含む mRNA、および exon11 を欠く variant が検出され、各臓器に特徴

的な発現パターンが観察された。このうち、exon11 を欠く variant mRNA は、塩基配列から exon11 の最初の 120bp を含む delta11b の相同体と考えられる。一方、完全に exon11 を欠く delta11 は、以上のイヌ正常組織では観察されなかった。

第 2 章では、本学家畜病院に来院した患畜より採取した乳腺腫瘍標本、simple carcinoma 9 例、complex carcinoma 6 例、complex adenoma 1 例を対象に、これらにおける BRCA1 variant mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。この結果、乳腺腫瘍組織においても、イヌ delta11b 型 mRNA が検出されるものの、約半数の腫瘍でこの mRNA の著しい発現低下が認められた。また、これに次いで、exon14-15 を含む mRNA の発現低下が多く認められた。このことは BRCA1 および delta11b の発現低下を示唆する。これらの結果は、イヌの乳腺組織における腫瘍発生に伴って variant mRNA 発現の変化が起こることを示している。したがって、今後、散発性乳腺腫瘍の発生や進行への BRCA1 の発現動態の関わりを考える場合、その variant の発現変化を考慮に入れる必要があると考えられる。

第 3 章では、exon11 を持つが exon14-15 を持たない variant mRNA の候補として IRIS が考えられたため、その存在の確認を行った。イヌの exon11 と intron11 の接合部を挟む様にプライマーセットを構築し RT-PCR を行った結果、正常の乳腺、精巣および卵巣で予想長の増幅産物が検出された。そこで、乳腺組織の産物の塩基配列を調べたところ、ヒト IRIS の塩基配列と 81.1%、アミノ酸配列と 69.7%の相同性を示し、イヌ IRIS 様 mRNA が正常組織において発現していると考えられた。次に、イヌの正常乳腺 2 例および乳腺腫瘍 6 例における variant mRNA の発現を調べたところ、IRIS 型 mRNA は全ての正常乳腺および腫瘍標本で検出された。これらの正常標本と腫瘍標本における IRIS 型 mRNA 発現に大きな差は認められなかった。

以上のように、本研究では、イヌ正常組織および乳腺腫瘍組織における BRCA1 variant mRNA の発現をはじめて解析し、predominant variant のうち、IRIS 型 mRNA と delta11b 型 mRNA の発現を示す結果を得た。さらに、乳腺腫瘍の一部において BRCA1 および delta11b 型 mRNA の発現低下が起こっていることを明らかにした。これらの研究成果は、イヌ乳腺腫瘍研究において、BRCA1 遺伝子の発現の解明が重要な位置を占めることを示唆するものであり、獣医腫瘍学のみならず、病態解析学の発展に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、申請者に対し、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。