

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

遺伝性腫瘍の遺伝子診断法の開発

分担研究者

石岡千加史

東北大学加齢医学研究所・助教授

研究要旨

SC assay による家族性腫瘍の遺伝子診断を実施するために、これまでに *APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* の SC assay 法を開発している。このうち *BRCA1*, *BRCA2* に関しては、本年度から東北家族性腫瘍研究会との共同研究で日本人家族性乳癌・卵巣癌家系、若年両側乳癌患者の遺伝子診断を開始した。家族性腫瘍のうち、遺伝性大腸癌の原因遺伝子 *hMLH1*、Cowden 病の原因遺伝子 *PTEN* に関しては、SC assay では検出できないミスセンス変異の頻度が高いため、機能診断系の開発を試みている。その結果、(1)遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)家系由来の *hMLH1* ミスセンス変異の大部分をカバーする 58 種類の変異の多くは正常 *hMLH1* 機能を障害していた。(2)*PTEN* ミスセンス変異 42 種類の変異の大部分は正常 *PTEN* 機能を障害していた。機能診断系に関連して、EEC(ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip)症候の原因遺伝子であること判明している *p53* ホモログである *p63/p51* 各遺伝子の変異機能解析により、(4) *p63/p51* 遺伝子の機能について出芽酵母ならびにヒト細胞で解析した結果、転写活性化能について *p63/p51* と *p53* との間に類似性と相違点があることが判明した。(5)ヒト腫瘍由来の *p63/p51* ミスセンス変異は稀であるが、*p53* の場合と同様に *p63/p51* の転写活性化能を障害していた。

分担研究者 石岡千加史・東北大学加齢医学研究所・助教授

A. 研究目的

遺伝性疾患とくに遺伝性腫瘍の遺伝子検査のための技術開発とその臨床応用を目的とする。

B. 研究方法と結果

(1)ナンセンス変異とフレームシフト変異を特異的に検出できる Stop codon assay(SC assay) を独自に開発し、これを *BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, *ATM* 遺伝子の変異検出に応用した。当該遺伝

子の翻訳領域を PCR 法で増幅し、これを SC assay 用ベクターとともに出芽酵母に導入することによりナンセンス変異とフレームシフト変異の存在を酵母の表現型で判定した。

BRCA1, *BRCA2* に関しては日本人家族性乳癌・卵巣癌家系、若年両側乳癌を対象にした遺伝子診断を東北家族性腫瘍研究会との共同研究で実施している（なお、研究計画は東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている）。*ATM* 遺伝子の変異検索は、マサチューセッツ総合病院（Daniel Haber）との共同研究で放射線治療後の乳癌や悪性リンパ腫の発症リ

スクとの関連性について検討したが、有為な関連性は証明できなかった。

(2) 遺伝性非腺腫症性大腸癌 (HNPCC) 由来の *hMLH1* ミスセンス変異 58 種類の変異を出芽酵母発現ベクター上の *hMLH1* cDNA に導入し、独自に開発した出芽酵母の機能診断系に導入・発現した。正常 *hMLH1* が酵母のミスマッチ修復系を障害するのに対して大部分 (75%) の変異は正常 *hMLH1* 機能を障害していた。この系で正常 *hMLH1* と判別できない変異のうち約半分は遺伝子多型であることが判明した。

(3) Cowden 病の原因遺伝子 *PTEN* のミスセンス変異 42 種類の変異を大腸菌発現ベクター上に導入、発現・精製し、*PTEN* 機能を *in vitro* の phosphoinositide phosphatase 活性を指標に機能解析した。大部分 (約 90%) の変異は正常 *PTEN* 機能を障害しており、がん抑制に重要な *PTEN* の機能は phosphoinositide phosphatase 活性であることが明らかにされた。

(4) *p53* ホモログである *p63/p51* 遺伝子の機能について、出芽酵母ならびにヒト細胞を用いて *MDM2*, *BAX*, *WAF1* および *14-3-3sigma* 遺伝子プロモーター領域の *p53* 結合塩基配列を導入したリポーターアッセイにより転写活性化能を解析した。その結果、*p63/p51* は *p53* と類似の転写活性化能を有するが、その転写活性化能は *p53* との間で相違があることが判明した。

(5) これまでヒト腫瘍由来の *p63/p51* ミスセンス変異は僅か 4 種類しか発見されていない。これら全てについて *p63/p51* の転写活性化能に与える影響に付いて出芽酵母を用いて評価

した。その結果、DNA 結合部位上のミスセンス変異は全て (3 種類) 機能を障害していたが、N 末側近傍の 1 変異は正常同様転写活性化能を有していたことから、この変異は遺伝子多型であることが示唆された。

C. 考察

hMLH1 変異のうち原行の出芽酵母アッセイ系ではモニターできない変異が存在している可能性が示唆され、酵母ミスマッチ修復系のヒト化などにより機能相補による新たなアッセイ系の開発が必要である。*PTEN* 変異の解析から、試験管内で行う phosphoinositide phosphatase 活性ではモニターできない *PTEN* 機能がある可能性が示唆された。*p63/p51* の転写機能は *p53* と類似性と相違点を明らかにし、*p63/p51* 下流で転写制御を受ける遺伝子が *p53* とは異なるものが存在する可能性が示唆された。*p63/p51* の活性化機構は *p53* のそれとは異なる可能性が他の研究者により示されており *p63/p51* の生物学的機能を考える上で興味深い。今後は、全翻訳領域上にすべてのミスセンス変異を構築し、機能への影響について系統的に解析する手法、データベースの構築に挑戦したい。

D. 結論

出芽酵母を用いる遺伝性腫瘍関連遺伝子の遺伝子診断方法を開発し、既知の変異の機能評価や変異の検出に応用している。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M.,

- Ikawa, Y., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., Ikawa, S., and Ishioka, C. The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and. *Cancer Res*, 59: 2781-6, 1999.
- 2) Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R., and Ishioka, C. Effects of p51/p63 missense mutations on transcriptional activities of p53 downstream gene promoters. *Cancer Res*, 59: 5908-11, 1999.
- 3) Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, S., Ikawa, Y., and Nakagawara, A. Mutational analysis of p51A/TAp63gamma, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene*, 18: 3761-5, 1999.
- 4) Osada, M., Ishioka, C., Ichinohasama, R., Kadowaki, I., Murakawa, Y., Watanabe, M., Kanamaru, R., and Ikawa, S. Influence of p53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Drug Des*, 14: 107-14, 1999.
- 5) Yamashita, Y., Sagawa, T., Fujimoto, T., Sugawara, T., Yamada, H., Hoshi, N., Sakuragi, N., Ishioka, C., and Fujimoto, S. BRCA1 mutation testing for Japanese patients with ovarian cancer in breast cancer screening. *Breast Cancer Res. Tr.*, 58: 11-17, 1999.
- 6) Bell, D. W., Wahrer, D. C., Kang, D. H., MacMahon, M. S., FitzGerald, M. G., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Krainer, M., and Haber, D. A. Common nonsense mutations in RAD52. *Cancer Res*, 59: 3883-8, 1999.
- 7) Shafman, T. D., Levitz, S., Nixon, A. J., Gibans, L. A., Nichols, K. E., Bell, D. W., Ishioka, C., Isselbacher, K. J., Gelman, R., Garber, J., Harris, J. R., and Haber, D. A. Prevalence of germline truncating mutations in ATM in women with a second breast cancer after radiation therapy for a contralateral tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 27: 124-129, 2000.
- 8) Nichols, K. E., Levitz, S., Shannon, K. E., Wahrer, D. C., Bell, D. W., Chang, G., Hegde, S., Neubergh, D., Shafman, T., Tarbell, N. J., Mauch, P., Ishioka, C., Haber, D. A., and Diller, L. Heterozygous Germline ATM Mutations Do Not Contribute to Radiation- Associated Malignancies After Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol*, 17: 1259-1266, 1999.