

ヒト生殖細胞系列BRCA1あるいはBRCA2変異のある可逆的不死化卵巢上皮細胞株を用いたPARP阻害剤耐性機序解明

— 新規不死化技術を用いた卵巢、卵管采、卵巢腫瘍および子宮内膜細胞株樹立の試み —

Elucidation of PARP inhibitor resistance mechanisms using reversibly immortalized ovarian epithelial cell lines with human germline BRCA1 or BRCA2 mutation
— Try to establish ovarian, tubal, ovarian tumor, and endometrial cell lines using novel immortalized techniques —

鳥取大学医学部附属病院 女性診療科群 講師 小松 宏彰

要 約

生殖器由来の各種細胞に不死化遺伝子を搭載したセンダイウイルスを感染させることで不死化株樹立を行い、研究資材として有効活用することを目的に本研究を行った。正常卵巢、BRCA1あるいはBRCA2の病的バリエーションを保持した症例より採取した卵巢、また右卵巢チョコレート嚢胞を有する患者より、右卵巢チョコレート嚢胞、および左正常卵巢より卵巢上皮を、また両側卵管采から上皮細胞を採取した。さらに月経を有する正常患者および子宮体癌患者より子宮内膜細胞を採取した。卵巢および卵巢腫瘍、卵管采から採取した細胞を不死化は長期継代可能であり、各種細胞株において染色体解析、次世代シーケンス解析、RT-PCRを行い、BRCA1およびBRCA2の病的バリエーションのある卵巢上皮細胞は正常卵巢に比してMMP1が優位に発現していることがわかった。また、チョコレート嚢胞細胞株においても同一患者の対側正常卵巢に比してMMP1が高発現していた。MMP1が腫瘍化にどのように関与しているかは今後、凍結検体や血清を用いて検討を行っていく予定である。また、子宮内膜において、子宮内膜上皮細胞の不死化を先行し、フローサイトメトリーにより間質細胞と分離した後に長期継代を行う、あるいは上皮細胞を間質細胞から分離後に不死化を行ったが、いずれの手法でも子宮内膜上皮細胞の長期継代は困難であった。子宮内膜上皮細胞樹立は今後、スフェロイドあるいはオルガノイドによる不死化細胞株樹立を試みることにしている。

緒 言

卵巢癌の発生機序は、組織学的、臨床病理学的背景の観点から明らかにされつつあるが、一方で分子レベルでの解析は不明な点が多い。その最も大きな理由の一つとして正常卵巢上皮や良性病変および境界悪性病変由来の細胞株が十分に存在しないため、悪性化に至る機序を詳細に解析できない。卵巢がんに関与する遺伝子としてBRCA1およびBRCA2がある。生殖細胞系列としてこの遺伝子変異を認めた場合、高頻度で乳がんおよび卵巢がんを発症することが報告されている。しかしながら、BRCA1、2変異

がある患者がどのタイミングで発癌するか予測因子あるいは適切な診断マーカーなどの報告はなく、定期的な診察や腫瘍マーカーの測定を行うことが求められている。乳腺上皮細胞のBRCA変異が遺伝的不安定性を引き起こすことが報告されているが、BRCAに関する不死化細胞による研究は非常に興味深い¹。

正常卵巢上皮細胞およびBRCA1,2変異がある細胞株が樹立すれば、発癌機序に加えて発癌に関与する遺伝子、さらには発癌を抑制する因子の解析など研究の幅が大きく広がる。そのためには十分に使用できる臨床検体が必須となるが、卵巢上皮細胞は長期

継代が出来ず、研究資材としてその都度採取、培養が必要となるが、腹腔内臓器であることから採取は困難となる。

センダイウイルスベクターは、一本鎖のマイナス鎖RNAからなるベクターゲノムを有し、分裂細胞のみならず非分裂細胞への導入も可能であり、高い外来遺伝子発現能を有する。ベクターゲノムは細胞質に留まるため、宿主染色体に影響することなく染色体の構造変化や変異の挿入を誘発しないため、希少疾患の原因検索や治療開発のための研究資材作成のために用いられてきている。今回、我々はセンダイウイルスを用いて正常卵巣上皮細胞およびgBRCA1あるいはgBRCA2変異がある患者検体から採取した卵巣上皮細胞の不死化細胞の樹立を試みるとともに、各細胞の性状解析が可能かを確認することを目的に検討を行った。さらに、同一患者から得られた生殖器由来の細胞株の同時解析を行うことで遺伝子異常の状態、発がん機構解明の一助となることを目的に、同一患者由来の両側卵管采および卵巣（片側はチョコレート嚢胞）の細胞株樹立および性状解析に加えて、子宮内膜細胞株樹立を試みた。

方法

患者Aは子宮内膜異型増殖症に対して子宮全摘手術、両側卵巣・卵管切除術を施行した症例より卵巣表層上皮をメスにて細切して採取した。患者Bは乳がんを発症し遺伝学的検査を行ったところBRCA1の変異(C.405_406 del (P.Arg 136 Thrfs*5))を認め、HBOCと診断された。患者Cは乳がんを発症し、遺伝学的検査によりBRCA2変異(C.1813 del (P.Ile 605 Thrfs*9))を認めたため、HBOCと診断された。患者B、C両名とともに、リスク低減卵巣卵管切除(RRSO)を施行した際の手術検体より卵巣上皮を擦過して採取した。すべての症例において、肉眼的および病理組織学的(パラフィンブロック包埋によるHE標本で観察)に漿液性卵管上皮内癌(STIC)を含めた卵巣癌・卵管癌は認めなかった。

さらに、右卵巣チョコレート嚢胞を有する患者より、両側卵管采(STICなし)および右卵巣チョコレート嚢胞および左正常卵巣より卵巣上皮を擦過して採取した。また、月経を有する正常患者および子宮体癌患者より子宮内膜細胞を採取した。

初代細胞株の樹立

1. 摘出した卵巣組織の表面をメスにて細切し、10mLの1%コラゲナーゼ+D-MEM/Ham's F-12 with L-Glutamine and Sodium Pyruvate (Product Number : 045-30665) を15mLチューブに入れる
2. チューブを水平にして37°Cのインキュベーター(100rpm)で24時間程度静置する
3. 70 μ m (Product Number : 352350) ストレーナーを用いて50mLチューブに濾過する(2回繰り返す)
4. 1300rpmで8分間遠心分離する。
5. 上清を破棄し、2mLのDMEM/Ham's F12でペッピングする
6. 8mLのDMEM/F12を追加して、15mLチューブに移す
7. 40 μ m (Product Number : 352340) のストレーナーを用いて50mLチューブに濾過する
8. 60mm dishに播種する。培地はDMEM/Ham'sF12+20%PBS+1.0P.S
9. 37°CのCO2インキュベーターで静置
10. 翌日、血球除去(PBSで洗浄)
11. 2.0×10^5 cell/wellを24well plateに播種
12. 翌日、3つの不死化遺伝子(hTERT、Bmi1、SV40T)を搭載したセンダイウイルスベクター(SeV)を感染。なお、SeVは株式会社ID pharmaで遺伝子搭載およびベクター製造を行ったものを使用した。

センダイウイルスベクター感染

24well plateに 2×10^5 cellsを播種する。翌日に安全キャビネット内でSeV-hTERT(EGFP同時搭載)、SeV-Bmi1(OFP同時搭載)、SeV-SV40Tをそれぞれ感染させる(ウイルス感染量は特許出願中のため非公開)。翌日に感染の有無をオールインワン顕微鏡で確認する。

感染の操作は安全キャビネット内で実施する。

FCM

細胞数(2.5×10^5 cells/100 ml PBS + 1% FBS/well)
ヒト組織由来不死化細胞(Ovn P+20, Ov BRCA1 P+5, Ov BRCA1 P+20, Ov BRCA2 P+20)
ポジティブコントロール細胞(大腸がん細胞株; HCT116, 卵巣明細胞癌細胞株; TU-OC-1, & 卵巣漿液性腺癌細胞株; TU-OS-6)

本実験では、全細胞株のコンフルエンス率が約70%に達した際、1-3分間 accutase 処理を行い、FCM を実施した。全細胞株において生存率は約90%であった。

1次抗体 (1 mg/100 ml/well)

抗EpCAM抗体 (hZAK3A101; Original Stock: 1.105 mg/ml; 20210505)

ネガコン抗体 (hIgG; Original Stock: 1 mg/ml; Invitrogen; 12000C; S1257958)

インキュベーション : 4 °C for 1 hr

洗浄 (200 ml/well) : PBS + 1% FBS 2回

2次抗体 (0.075 mg/30 ml/well)

抗hIgG抗体-Alexa 488 (Original Stock: 1.5 mg/ml; Jackson ImmunoResearch; 109-545-190)

インキュベーション : 4 °C for 1 hr

洗浄 (200 ml/well) : PBS + 1% FBS 2回

Cloningの方法

樹立した細胞株を100mm dishに低濃度で播種する。連日細胞を観察し、単一細胞からコロニーを形成した部位をオールインワン顕微鏡で観察し、GFPおよびOFP両方が蛍光発色していることを確認する。顕微鏡下にピッキングを行い、96well plateに播種した。これを複数回繰り返して実施し、50以上のクローン細胞を継代する。96well plateから順に24well plate、12well plate、6well plate、60mm dish、100mm dishにスケールアップを行い、継代できたものをCloning細胞とした。

染色体解析

各細胞を60mm dishに播種し、MAS (Genial Genetic Solutions) を用いて同調処理後、カルノア固定を行った。スライド上に固定細胞を撒き、QH (quinacrine mustard; Sigma-Aldrich, Hoechst 33258; Sigma-Aldrich) 染色、ならびにMulticolour FISH (mFISH) (24XCyte; MetaSystems, Altlusheim, Germany) 染色を製造元の説明書 (MetaSystems) に従って行った。いずれもMetaphase画像は、AxioImagerZ2蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) で撮影、取り込みを行い、Ikaros software program (MetaSystems)、ISIS software program (MetaSystems) を用いて解析した。Metaphaseの

染色体核型解析を行い、染色体数、核型構造異常型を調べた。

Human Transcriptome Sequencing解析

Total RNA (Qiagen; RNeasy Mini kit Cat. No. 74104, 74106) の抽出を行った後にAgilent 2200 TapeStationを用い品質管理を行い、RNA量が2.0 μ g以上あることを確認した。解析はNovaSeq 6000 (イルミナ社) を用いて実施した。TruSeq Straded mRNA Library Prep Kitを用いてライブラリの作成、ライブラリ長を332-346bpとした。リード長は101bpとし、Multiplex法で解析した。クラスター解析は発現変動比の傾きに応じて5つに分類し、k-means法で実施した。

Real time-PCR

各細胞からTotal RNA (Qiagen; RNeasy Mini kit Cat. No. 74104, 74106) の抽出を行った。DNase処理はDeoxyribonuclease (RT Grade) Cat. No. 313-03161 およびRNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor Cat. No. 10777019を用いた。cDNA合成はHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™ Cat. No. 4368814) を使用した。Real-time -PCRにはStepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) とTaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™) を用い、製造元のprotocolに従って実施した。

Transcript levelsはACTB (Actin Beta) を基準として正規化した。PCR条件は、50°C 2分、95°C 20秒、その後、95°C 1秒、60°C 20秒のサイクルを40回行った。各反応は3重で行った。

Ethics statements

本研究は厚労省科学研究費ならびに鳥取大学附属病院研究支援事業、神澤医学研究振興財団2022年度(第26回) 研究助成よりサポート頂き行った。また、鳥取大学倫理委員会で承認され、患者同意のもとで実施した研究である。(IRBnumber:20A179)

結果

Morphological and growth characteristics

Ovn、Ov BRCA1、Ov BRCA2すべての細胞形態は紡錘形あるいは類円形を呈していた。すべての細胞株でGFPおよびOFPの蛍光発色を示していた。各センダイウイルス感染細胞はいずれも増殖を示し

表 1. 各細胞株における染色体異常

Cell line	Passage SeV No.	Chromosome No.					Aberration					Chromosome rearrangement			
		44	45	46	47	Total	ctg/ictg	ctb/ictb	exh	Total	Ratio	Translocation, deletion, dicentric, etc.	Total	Ratio	
Ovn normal	-	P+1	0	1	24	0	25	0	0	0	0/25	0%		0/25	0%
	+	P+5 (early)	0	0	25	0	25	0	0	0	0/25	0%	46,XX,del(5q)	1/25	4.00%
	+	P+25 (late)	0	1	24	0	25	0	0	0	0/25	0%	46,XX,t(3;16) 46,XX,-22,-22,+2mar	1 2 3/25	12%
Ovn BRCA1	-	P+3	0	1	23	1	25	1	0	0	1/25	4%	47,XX,+mar	1/25	4%
	+	P+6 (early)	0	1	24	0	25	0	0	0	0/25	0%	46,XX,add(11p),-19,+mar	1	36%
													46,XX,t(6;11)	1	
													46,XX,del(7q)	1	
													46,XX,-7,-8,+2mar	1	
													46,XX,add(5p)	1	
46,XX,del(2p),del(3q)	1														
46,XX,add(1q)	1														
46,XX,del(3p),del(5q),del(7p)	1														
46,XX,del(Xq),add(11q)	1														
												9/25			
+	P+25 (late)	0	0	25	0	25	0	4	0	4/25	16%	46,XX,i(7q),i(8q),add(9q)	1	32%	
												46,XX,add(1q),del(1q)	1		
												5			
												1			
												8/25			
-	P+3	0	0	25	0	25	0	1	0	1/25	4%		0/25	0%	
Ovn BRCA2	+	P+5 (early)	0	0	25	0	25	0	0	0	0/25	0%	46,XX,t(4;15)	1	28%
													46,XX,add(4q)	2	
													46,XX,add(14p)	1	
													46,XX,del(18p)	1	
													46,XX,del(2q)	1	
	46,XX,del(17p)	1													
												7/25			
+	P+25 (late)	0	0	25	0	25	0	0	0	0/25	8%	46,XX,t(7;14)	1	28%	
												46,XX,dic(1;21)	1		
												46,XX,dic(1;8)	1		
												46,XX,del(1p)	1		
												46,XX,add(14q)	2		
												46,XX,add(18q)	1		
													7/25		

たが、センダイウイルス非感染細胞では、Ovnは10日、Ov BRCA1は20日、Ov BRCA2は35日まで生存を確認できたが、それ以上は増殖を示さなかった。

Dependence of temperature

Ov BRCA1において、35℃ CO2 incubatorから37℃へ変更した。温度変更10日目の蛍光顕微鏡における観察ではGFPおよびOHP染色強度が著名に低下し、温度変更20日後には増殖を示さなくなった。

Reaction of Anti EpCAM Antibody

HCT116、TUOC1、TUOS6においてはいずれもAnti EpCAM antibodyに対する免疫反応を示したが、OvBRCA P+5細胞では反応は示さなかった。さらに、Ovn P+25、Ov BRCA1 P+25、OvBRCA2 P+25においても同様に抗EpCAM抗体反応はなかった。

Chromosomal analysis and multicolor FISH

・ Ovn/ Ov BRCA1/ Ov BRCA2

SeV-では各細胞間に差はなく、多少の染色体異常

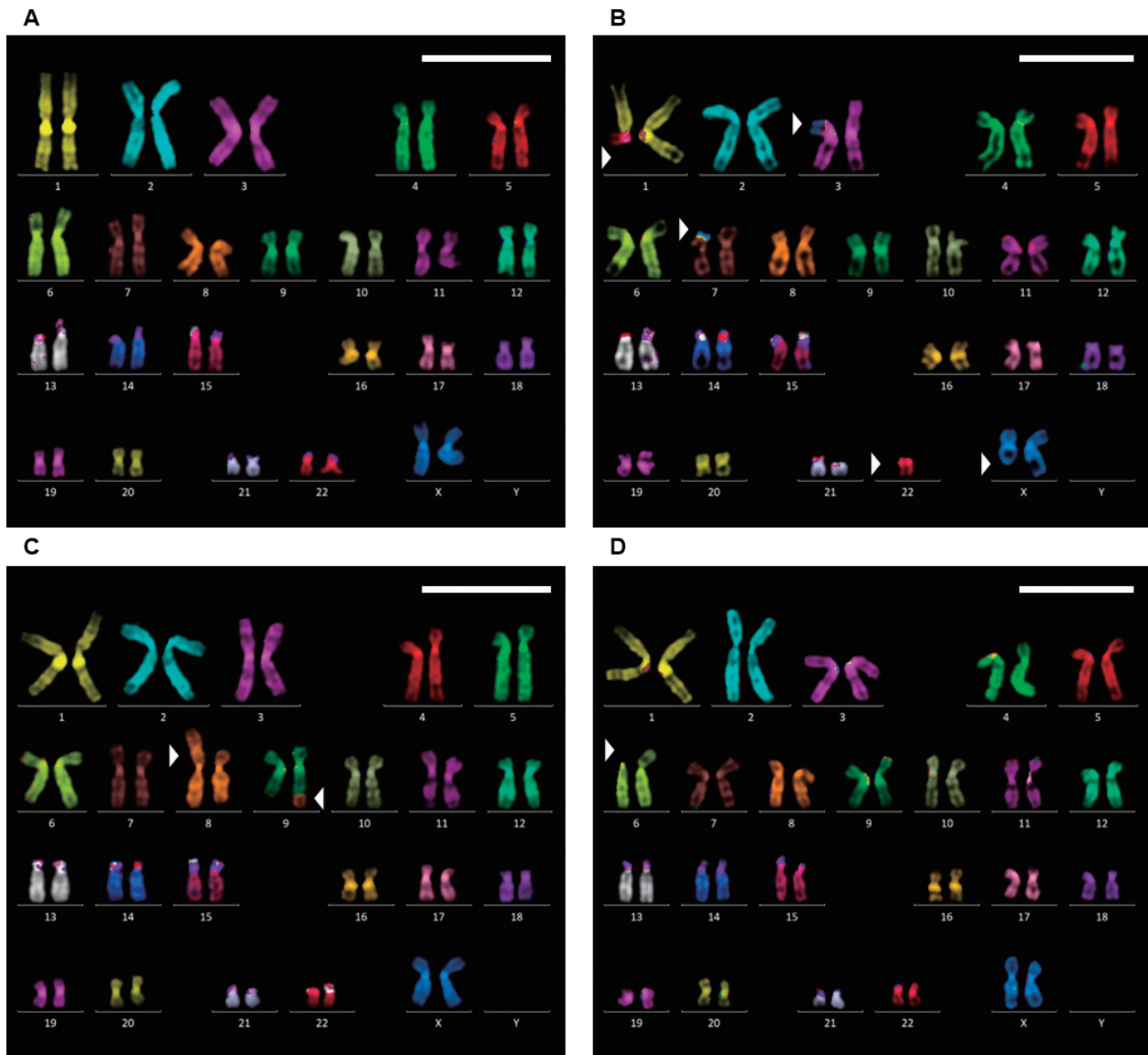


図1. mFISHによる代表的な染色体構造異常

- a) Ovn BRCA1 SeV-P+3, 46,XX, normal
- b) Ovn BRCA1 SeV+ P+6, 46,XX,t(1;22),t(3;X),t(7;X),Chtg(7)(q21)
- c) Ovn BRCA1 SeV+ P+25, 46,XX,i(8q),t(8;9)
- d) Ovn BRCA2 SeV+ P+4, 46,XX,del(6)(p11)

がみられるものの、細胞培養の継代が理由であると考えられる。一方でSeV+ではOvnはほとんど正常細胞であるのに対して、Ov BRCA1、Ov BRCA2では染色体異常が高頻度にみられ、継代数によって増加していた。特にLate phaseではclonalな異常が見受けられた(表1)。

m FISHではOvBRCA1 P+6およびP+25において2番と8番または11番と21番の転座や5番や6番の欠などがみられた(図1)。

・ Lt OVn/Rt OV endo/ Lt FT/ Rt FT

Lt OvnではSeV+ P+7では染色体構造異常はほと

んどみられていなかったが、P+25では60%に数的および構造異常がみられた。一方、Lt FTおよびRt FTはSeV+ P+7およびP+25ではいずれもほぼ正常であった。Rt Ov endoはSeV+ P+6時点で約30%に異常がみられ、P+25ではほぼ100%に異常がみられ、clonalな異常が見受けられた。

Human transcriptome Sequencing analysis

各細胞のリード長およびアセンブリされた転写物数を測定した。また、各サンプル間の発現レベル比較およびクラスタリング解析結果を行った。サンプル間で比較した遺伝子発現頻度を比較したとこ

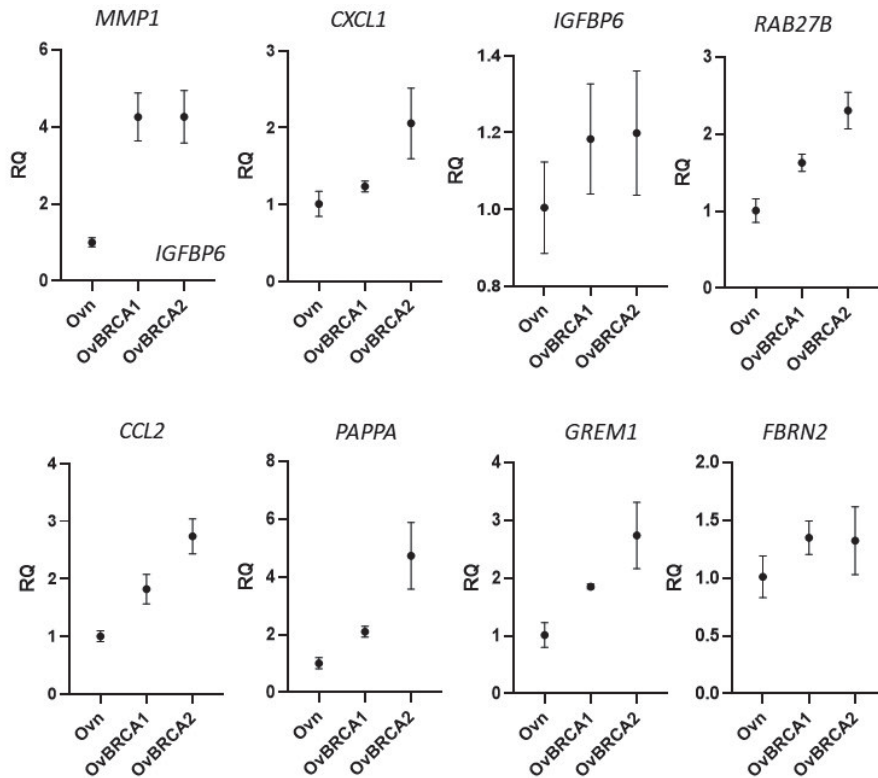


図2. Real time-PCR

Ov BRCA1では、Ovnと比較してMMP1、CXCL1、RAB27B、CCL2、PAPP、GREM1の発現が高く、Ov BRCA2においてはOvnと比較して、MMP1、CXCL1、RAB27B、CCL2、PAPP、GREM1が有意に高発現している。

ろ、Ov BRCA1あるいはOv BRCA2におけるMMP1、CCL2、IGFBP6、GREM1、CFB、CXCL1、CXCL2、PAPP、RAB27B、FBLN2、C3の11の遺伝子はOvnと比較して高発現していた。

また、Rt Ov endoはLt Ovnと比較してMMP1およびPAPPが高発現していた。

Real time-PCR

・ Ovn/ Ov BRCA1/ Ov BRCA2

Ov BRCA1では、Ovnと比較してMMP1、CXCL1、RAB27B、CCL2、PAPP、GREM1の発現が高く、Ov BRCA2においてはOvnと比較して、MMP1、CXCL1、RAB27B、CCL2、PAPP、GREM1が有意に高発現していた (図2)。

・ Lt OVn/Rt OV endo/ Lt FT/ Rt FT

Rt Ov endoにおいて、MMP1およびPAPPはLt Ovnに比して有意に高発現していた。

考 察

今回、3つの不死化遺伝子を搭載したセンダイウイルスを用いて、正常卵巣上皮細胞、gBRCA1あるい

はgBRCA2変異がある患者の卵巣上皮細胞の不死化細胞樹立に世界で初めて成功した。染色体解析において、gBRCA1あるいはgBRCA2変異の存在はSeV不死化作用によってがん化のプロセスが進行している可能性を示唆される。したがって、これらの細胞は卵巣がんのがん化プロセスを解析するための細胞株として有用である。さらに、次世代シーケンス解析により、gBRCA1あるいはgBRCA2細胞株では正常卵巣上皮と比較して、MMP1などの遺伝子発現が有意にみられることがわかった。これらの遺伝子のがん化プロセスにおいて重要な遺伝子となっている可能性を示している。

センダイウイルスを用いた卵巣上皮細胞の不死化において、染色体の構造異常がみられた。特にOvnに比してOv BRCA1、Ov BRCA2でその頻度は多かった。この原因はいくつか考えられる。gBRCA変異は不安定であるが故に、SeV感染による影響に加えて、継代による影響が重ったことが考えられる。また、年齢に起因するものの可能性がある。gBRCA1保因者の年齢は57歳、gBRCA2保因者の年齢は53歳であるが、年齢が上昇するにつれて卵母細

胞は老化し、染色体構造の頻度が高くなると言われている。また、gBRCA1保因者における卵巣癌の年齢別発癌頻度はgBRCA2保因者に比べて若年発症が報告されている。しかしながら、今回の研究は、各1例での検討結果であることから、今後症例を集積して同様の検討を行ったうえで議論したい。我々は血管内皮細胞や幹細胞についても同様の検討を行っており、これらの細胞では染色体の異常はみられていないことから、卵巣独自の変化である可能性もある(Oshimura, et al. Submitted)。小西らはヒト乳腺上皮細胞に*h-TERT*を導入することで不死化細胞を樹立、さらに*BRCA1*欠失細胞を作成し、乳がんの発癌機構の解明を行っている²。この研究によると、*BRCA1*のハプロ不全は、遺伝子変異を促進することにより、遺伝性乳がんの発生を加速させる可能性があるとされている。この研究では正常な細胞に*BRCA*の欠失を加えたことで不安定性を誘導しているが、我々の検討では正常卵巣上皮細胞の不死化細胞とgBRCA1あるいはgBRCA2がみられる患者から得られた卵巣上皮検体より不死化細胞を樹立し、性状解析した。不安定な構造にウイルスを感染させることでさらに染色体異常が引き起こされていると考えられ、これらの細胞株を用いることで癌化プロセス解明に寄与できる可能性を示している。

各細胞株のTranscriptome解析結果およびRealtime PCRの結果から*MMP1*やいくつかの遺伝子が*BRCA1*および*BRCA2*保因者の卵巣表層上皮細胞で有意に発現していた。gBRCA1あるいはgBRCA2保因者は非保因者と比して卵巣癌および乳癌の発症リスクが高いことがすでに分かっているが、本研究ではOvBRCA1およびOvBRCA2においてOvnに比して有意に*MMP1*が高発現していることから、*MMP1*

が癌化に関与している可能性が示唆された。*MMP*は細胞外マトリックスの一種であるが、横井らはこの*MMP1*は卵巣癌の予後不良因子であり、さらにがん患者の腹水中には*MMP1*の mRNAを運ぶ細胞外小胞が存在し、中皮細胞のアポトーシスも誘導することを報告している³。一方で、*MMP*と卵巣癌のリスク因子についてのメタアナリシスにおいて、有意な関連はないと報告されているものの、さらなる検討の余地はある⁴。今後はgBRCA1あるいはgBRCA2保因者の卵巣漿液性癌の凍結組織や細胞株を用いた*MMP1*遺伝子発現の確認を予定している。以上より、我々の研究において、樹立した不死化細胞株を用いることで、同一細胞株における正常cloneと異常cloneの遺伝子発現の確認やエピゲノム解析によって、新たながん化プロセスの解明につながる可能性を秘めていることが分かる。

参考文献

- 1 Konishia H, Mohsenia M, Tamakia A, Garaya J, Croessmanna S, Karnanb S, et al. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. PNAS | October 25, 2011 vol. 108 no. 43 17773-17778.
- 2 Ohira M, Kikuchi E, Mizuta S, Yoshida N, Onodera M, Nakanishi M, Okuyama T, Mashima R. Production of therapeutic iduronate-2-sulfatase enzyme with a novel single-stranded RNA virus vector. Genes Cells. 2021 Nov;26(11):891-904.
- 3 Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. Nat Commun. 2017 Mar 6;8:14470.
- 4 Zhu XM, Sun WF. Association between matrix metalloproteinases polymorphisms and ovarian cancer risk: A meta-analysis and systematic review. PLoS One. 2017 Sep 28;12(9):e0185456.

Abstract

We aimed to elucidate the mechanism underlying carcinogenesis by comparing normal and *BRCA1/2*-mutated ovarian epithelial cells established via Sendai virus-based immortalization. Ovarian epithelial cells (normal epithelium: Ovn; with germline *BRCA1* mutation: OvBRCA1; with germline *BRCA2* mutation: OvBRCA2) were infected with Sendai virus vectors carrying three immortalization genes (*Bmi-1*, *hTERT*, and *SV40T*). The immunoreactivity of anti-epithelial cellular adhesion molecule (EpCAM) antibodies in each cell and cells after 25 passages was confirmed using flow cytometry. Chromosomes were identified and karyotyped to detect numerical and structural abnormalities. Total RNA extracted from the cells was subjected to human transcriptome sequencing. Highly expressed genes in each cell line were confirmed using real-time polymerase chain reaction. Immortalization techniques allowed 25 or more passages of Ovn, OvBRCA1, and OvBRCA2 cells. No anti-EpCAM antibody reactions were observed in primary cultures or after long-term passages of each cell line. Structural abnormalities in the chromosomes were observed in each cell line; however, the abnormal chromosomes were successfully separated from the normal structures via cloning. Only normal cells from each cell line were cloned. *MMP1*, *CCL2*, and *IGFBP6* were more predominantly expressed in OvBRCA1 and OvBRCA2 cells than in Ovn cells. We observed substantially higher expression of *MMP1* in both OvBRCA1 and OvBRCA2 cells. Immortalized ovarian cells derived from patients with germline *BRCA1* or *BRCA2* mutations showed substantially higher *MMP1* expression than normal ovarian cells, suggesting that *MMP1* may be important roles, especially in patients with hereditary breast/ovarian cancer. However, the details need to be validated in the future.