

論文の内容の要旨

論文題目 眼窩内海綿状血管奇形における新規関連遺伝子変異の同定と機能解析

氏名 本郷 博貴

眼窩内海綿状血管奇形は血管奇形疾患の一種であり、単層の血管内皮細胞で形成された多数の拡張した血管腔からなり豊富な間質を伴う組織所見を特徴とする。40~50歳代の女性に好発し、眼球突出、視力低下、斜視などの症状を呈した場合には手術摘出による治療が行われる。血管腫・血管奇形には、本疾患以外にも中枢神経・胸腹部臓器・骨・軟部組織や皮膚など全身に生じる様々な疾患があるが、多発性のものや周囲組織へ浸潤するものなど治療抵抗性の症例もあり、また多くは原因不明で根本的な治療法の確立が求められている。

血管腫・血管奇形疾患においては、これまでいくつかの疾患で関連遺伝子が報告されてきた。特に近年、次世代シーケンサーの登場・発達により標的部位を深く読む deep シーケンスが行えるようになり、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、血球細胞など複数の細胞種からなり変異細胞の割合が少なくなるような血管腫・血管奇形病変においても体細胞遺伝子変異の同定が可能となったことで、関連遺伝子の報告が相次いでいる。また、変異が同定された遺伝子の機能に着目すると、その多くが RAS-MAPK および PI3K-mTOR の 2 つのシグナル伝達経路上に存在し、同シグナル経路を活性化する変異であることがわかってきた。これら 2 つのシグナル伝達経路は様々な悪性腫瘍との関連がもともと知られている経路であり、血管腫・血管奇形に悪性腫瘍と類似の分子機構が関連している可能性が示唆され注目されている。これに伴い、血管腫・血管奇形の分類法として最も標準的な分類である ISSVA (International Society for the Study of Vascular Anomalies) 分類においても、最新の 2018 年版においては関連遺伝子が付記されるなど、分子生物学的な観点から血管腫・血管奇形の疾患概念が見直されつつある。しかし、眼窩内眼窩内海綿状血管奇形 (ISSVA 分類では静脈奇形に分類される) においては関連が明らかと言える遺伝子は未だ報告されていない。

そこで本研究では、眼窩内海綿状血管奇形においても、病態に強く関連する体細胞遺伝子異常が存在するという仮説を立てた。低頻度の体細胞遺伝子変異の同定までを目指した遺伝子解析を行うことで新規関連遺伝子変異を同定し、さらに同定された遺伝子変異の機能解析まで行うことを目的とした。

まず discovery 解析として、眼窩内海綿状血管奇形 3 例を含む計 16 例 (眼窩内海綿状血管奇形 3 例、脳海綿状血管奇形 12 例、椎体血管腫 1 例) およびペア血液を対象とした解析を行った。血管腫・血管奇形病変は、凍結保存された病変を使用した (東京大学倫理承認番号 G10026, G10028)。病変及び末梢血リンパ球 DNA を抽出後、SureSelect XT Focused Exome (過去にヒト疾患との関連が報告された多型・変異を含む約 6000 遺伝子

のエクソンを標的としたキャプチャキット)を用いDNAライブラリを作成、HiSeq2500 (Illumina)を用いた deep シークエンス (平均 depth : 血管腫・血管奇形 210±82、血液 194±6) を行った。その結果、非同義変異として、眼窩内海綿状血管奇形では中央値 5 (範囲 3~11)、脳海綿状血管奇形では中央値 1 (範囲 0~9)、椎体血管腫では 1、全体では中央値 1 (範囲 0~11) の体細胞変異が同定されたが、際立った所見として、眼窩内海綿状血管奇形においては全 3 例で *GJA4 (Cx37)* 遺伝子変異が共通して認められ、3 例に認められた変異は全て同一のミスセンス変異 *GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* であった。VAF (variant allele frequency) はそれぞれ、16.8%, 16.8%, 8.7% であり、サンガーシークエンスにより同変異が 50%未滿のシグナル強度で同定されることを確認した。*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* は脳海綿状血管奇形や椎体血管腫には認められなかった。

そこで、眼窩内海綿状血管奇形の追加病変として東京大学脳神経外科の 2 病変、東京医科大学眼科の 23 病変 (凍結標本またはホルマリン固定パラフィン包埋標本) を対象とした validation 解析を行った。(東京大学倫理承認番号 G10026, G10028、東京医科大学倫理承認番号 T2020-0051)。変異解析の方法として、低頻度変異の同定に優れた方法である droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) を用いた。その結果、23 例中 22 例で *GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* が陽性であり (変異陽性例における VAF 中央値 12.7% (範囲 4.8~23.1%))、Discovery cohort を合計すると、眼窩内海綿状血管奇形 26 例中 25 例 (96.2%) において *GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* が同定された。

続いて、眼窩内海綿状血管奇形の中でもいずれの細胞種が *GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* を有するかを判定するため、magnetic-activated cell sorting により血管内皮細胞マーカーである CD31 の陽性細胞、陰性細胞を分離した上で、Sorting を行わずに凍結した標本 (bulk サンプル) DNA、CD31 陽性細胞 DNA、CD31 陰性細胞 DNA のそれぞれに対し ddPCR を行った。その結果、bulk サンプル DNA、CD31 陽性細胞分画 DNA、CD31 陰性細胞分画 DNA で、それぞれ 10.1%, 34.4%, 2.5% の VAF が示され、CD31 陽性細胞分画 DNA において *GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* の VAF が高くなる結果となった。以上の結果より、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)* が眼窩内海綿状血管奇形の病態と深く関連する遺伝子変異である可能性が高く、また眼窩内海綿状血管奇形において血管内皮細胞が同遺伝子変異を有している可能性が高いことが示された。

また、変異を同定した *GJA4 (Cx37)* の眼窩内海綿状血管奇形におけるタンパク発現領域を調べるため、変異陽性の眼窩内海綿状血管奇形病変に対する免疫組織染色 (*GJA4 (Cx37)*, CD31, α SMA (血管平滑筋マーカー)) を行ったところ、*GJA4 (Cx37)* は CD31 陽性細胞にはタンパク発現が検出されず、 α SMA タンパク陽性細胞において発現が認められる所見であった。

GJA4 (Cx37) は膜タンパクとしてヘミチャネルおよびギャップジャンクションを形成することで情報伝達を担うコネキシンファミリーの 1 アイソフォームである。4 回膜貫通タ

ンパクであり、N末端側が pore-forming domain として、残りの C 末端側側がリン酸化を受けチャンネル活性を修飾する部位として機能することが知られている。GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)は、コネキシン分子内でも、pore-forming domain、特に第一膜貫通部の細胞外開口部近くに位置し、生物種間・アイソフォーム間ともに保存性が高く機能的に重要なことが示唆された。そこで、GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)が GJA4 (Cx37)ヘミチャンネルおよびギャップジャンクションの機能に与える影響を調べるために、Xenopus oocyte を用いた whole cell voltage clamp 実験を施行した。野生型 GJA4 (Cx37)、変異型 GJA4 (Cx37)を発現させた oocyte および陰性コントロール oocyte を作成し、各 oocyte におけるヘミチャンネル電流およびギャップジャンクション電流を測定した。その結果、変異型 GJA4 (Cx37) 1ng 注射 oocyte のヘミチャンネル電流は、野生型 GJA4 (Cx37) 1ng 注射 oocyte の場合と比較し有意に高く、さらにコネキシン阻害剤である carbenoxolone (CBX)により阻害された。一方、ギャップジャンクションの解析においては、野生型 GJA4 (Cx37)と変異型 GJA4 (Cx37)の間に有意差は認められなかった。また、GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)が oocyte に与える細胞障害性を評価したところ、変異型 cRNA 1ng 注射 oocyte において注射 36 時間後より oocyte の死が多く観察され、ヘミチャンネル活性の過剰亢進による細胞障害性上昇が示唆された。以上より、GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)がヘミチャンネル活性を上昇させる機能獲得型変異であると考えられた。

以上の結果により、本研究は、GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)が、機能獲得型変異として眼窩内海綿状血管奇形の病態に深く関連している可能性を示した。

コネキシンはヘミチャンネル、ギャップジャンクションを形成し、それぞれ細胞内外、隣接細胞間を連絡しイオンや小分子を通過させることで様々な情報伝達に働くタンパクであり、GJA4 (Cx37)は、コネキシンファミリーがもつ 21 のアイソフォームの中でも血管に特異的に発現するアイソフォームの 1 つであることが知られている。GJA4 (Cx37)のノックダウンにより血管内皮細胞の branching 低下することや、同じく血管内皮細胞に発現が高い GJA5 (Cx40)と GJA4 (Cx37)を同時にノックアウトしたマウスでは全身に血管拡張病変が生じることなどが過去に報告されており、血管形成や血管発達に深く関連していると考えられている。また、GJA4 (Cx37)はセルサイクルの調節に働いているとする報告が多くなされており、GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)が血管内皮細胞の増殖の調整に影響することで眼窩内海綿状血管奇形の病態に関連している可能性があると考えられる。GJA4 (Cx37)以外のコネキシンについては、過去に変異が同定された疾患に様々なものが報告されている（眼歯指異形成症における GJA1 (Cx43)変異、シャルコー・マリー・トゥース病 (Charcot-Marie-Tooth neuropathy)における GJB1 (Cx32)変異など）。しかし GJA4 (Cx37)において一般人口に認められないような変異を疾患患者において同定したものは渉猟しうる限りない。一方、一般人口にも認められる多型としては GJA4 (Cx37) c.955C>T (p.Pro319Ala)が心筋梗塞のリスク因子として報告されている。GJA4 (Cx37) 多

型が心筋梗塞のリスク因子であることから、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*が眼窩内血管奇形の病態に関連する可能性が十分に考えられると言える。また、*GJB2 (Cx26)*においては、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*相当部位のアミノ酸が周囲アミノ酸と疎水性コアを形成することで構造の安定化に働いているとする報告があり、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*が構造の安定化に影響している可能性がある。さらに、*GJA4 (Cx37)*と既報の血管腫・血管奇形関連シグナル伝達経路である RAS-MAPK/PI3K-mTOR 経路の連絡についても少数であるが報告があり、ERK, AKT などとの関連が示唆されている。*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*が RAS-MAPK/PI3K-mTOR シグナル伝達経路を介して血管奇形の形成に関与している可能性が考えられる。ただし、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*が眼窩内血管奇形の病態にどのような機序で関連しているかは未だ示されておらず、今後の研究が必要である。

本研究は、*GJA4 (Cx37) c.121G>T (p.Gly41Cys)*が眼窩内海綿状血管奇形に高頻度に認められることを明らかにし、分子生物学的な知見が急速に蓄積しつつある全身の血管奇形疾患の分野において、新規の血管奇形関連遺伝子の候補としての可能性を示した。血管奇形の病態に関わる新たな分子学的機序として、今後の血管奇形治療における新規治療法の開発にもつながる可能性があることから、本研究は意義が大きいと考えられる。