

博士論文

中枢神経系血管芽腫の統合的ゲノム解析

高柳 俊作

# 中枢神経系血管芽腫の統合的ゲノム解析

脳神経外科学

齊藤 延人

高柳 俊作

# 目次

	頁
I. 要旨-----	1
II. 序文-----	2
A. 中枢神経系血管芽腫-----	2
1. 中枢神経系血管芽腫の臨床的特徴-----	2
2. 中枢神経系血管芽腫の病理学的特徴-----	5
3. 中枢神経系血管芽腫の治療-----	6
B. von Hippel-Lindau (VHL) 病-----	7
1. VHL 病とは-----	7
2. VHL 病の臨床的診断基準-----	8
3. VHL 病の好発腫瘍の特徴-----	9
C. VHL 遺伝子・蛋白と 2 hit theory による不活化-----	10
1. VHL 遺伝子の同定-----	10
2. 2 hit theory による VHL 遺伝子不活化-----	11
3. VHL 蛋白の機能と腫瘍化-----	13
D. 中枢神経系血管芽腫における VHL 遺伝子異常-----	15
III. 目的-----	19

A. 本研究の目的-----	19
B. 使用する解析技術-----	19
IV. 方法-----	20
A. 対象-----	20
B. ゲノム DNA 調製-----	21
C. ダイレクトシーケンシング法-----	21
D. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法-----	24
1. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法とは-----	24
2. 本研究における MLPA 法の手順-----	26
E. メチル化解析-----	27
1. バイサルファイト変換-----	30
2. Methylation-specific PCR(MSP)法-----	30
3. バイサルファイトシーケンシング法-----	31
4. MSP法とバイサルファイトシーケンシング法での標的部位の違い---	33
F. SNPアレイ解析-----	34
1. SNPアレイとは-----	34
2. SNPアレイ解析の概要-----	35
G. ゲノム定量的real time PCR-----	37

H. 統計解析-----	38
V. 結果-----	40
A. 対象の内訳-----	40
B. ゲノムDNA調製-----	43
C. ダイレクトシーケンシング法-----	43
D. MLPA法-----	49
E. メチル化解析-----	52
1. MSP法-----	53
2.バイサルファイトシーケンシング法-----	54
3.メチル化解析のまとめ-----	58
F. SNPアレイ解析-----	60
G. 染色体14q11.2 duplicationとゲノム定量的real time PCR-----	67
H. ゲノム解析結果のまとめ-----	69
VI. 考察-----	75
A. 中枢神経系血管芽腫における VHL 遺伝子異常の重要性-----	75
B. 中枢神経系血管芽腫のコピー数異常と新規原因遺伝子の可能性-----	78
C. 本研究の限界-----	82
D. 今後の研究の展望-----	84

VII. 結語	86
VIII. 謝辞	87
IX. 引用文献	88

## 本論文で使用した略語表

HB: hemangioblastoma

RCC: renal cell carcinoma

VHL: von Hippel-Lindau

HIF: hypoxia inducible factor

LOH: loss of heterozygosity

MLPA: multiplex ligation dependent probe amplification

SNP: single nucleotide polymorphism

PCR: polymerase chain reaction

MSP: methylation specific PCR

Chr: chromosome

DNA: deoxyribonucleic acid

mRNA: messenger ribonucleic acid

## I. 要旨

中枢神経系血管芽腫(HB)は、VHL 病の好発腫瘍の 1 つである。本研究では、HB 手術検体を用いて、VHL 遺伝子(*VHL*)異常の解析と SNP アレイ解析を行い、*VHL* の腫瘍形成機序における重要性の確認を行った。その結果、VHL 病群では、*VHL* 変異と 3 番染色体 LOH による不活化を 60%以上認めた。散发性群では *VHL* プロモーター領域メチル化を認めたが、*VHL* の不活化は 30%以下であった。SNP アレイ解析では、*VHL* の不活化を認めていない散发性群に 3,6,10 番染色体 LOH を多く認めた。以上より、HB では、*VHL* だけでなく、3,6,10 番染色体 LOH も、腫瘍形成機序に関与している可能性が推測された。



## II. 序文

### A. 中枢神経系血管芽腫

本研究の対象疾患である血管芽腫(hemangioblastom、以下 HB と略)は、主に中枢神経系、特に小脳に多く発生する腫瘍であり、WHO 分類の Grade I に分類される良性腫瘍である。<sup>1</sup> HB は、その名前から推測される通り、血管芽細胞(hemangioblast)由来の腫瘍とされているが、いまだ不明瞭のままである。<sup>2</sup>

#### 1. 中枢神経系血管芽腫の臨床的特徴

症例全体の 25%が、遺伝性腫瘍疾患の 1 つである von Hippel-Lindau (以下、VHL と略)病の症例であるが、残りの 75%は、非 VHL 病症例、つまり散発性の症例であるとされる。<sup>3</sup>

発生部位としては、前述した通り、小脳が、症例全体の 63%を占めるが、それ以外に、脳幹(5%)、脊髄(32%)にも発生する。つまり、小脳テントより尾側の部位に好発する腫瘍と言える。小脳テントよりも吻側の部分、例えば、大脳半球や下垂体に発生することもあると言われているが、その数は少ない。<sup>4-6</sup>

発生頻度としては、原発性脳腫瘍全体の 1.5~2.5%、後頭蓋窩腫瘍の 7-12%、成人の脊髄腫瘍の 4%を占めると言われている。<sup>7, 8</sup> 発見される年齢としては、15~75 歳と均等に分布しており、平均すると 40~50 歳台に多い傾向がある。性

別による発生数の違いはないと言われている。<sup>9</sup>

腫瘍による症状は、腫瘍の存在部位により異なる。後頭蓋窩に発生して、第4脳室を閉塞するようなことがあれば、頭痛などの頭蓋内圧亢進症状を呈し、時には重症な意識障害をへて、死亡することも起こりえる。<sup>10-12</sup> 小脳、延髄に発生した場合、それぞれ小脳症状、脳幹症状などの局所症状を呈する。全体でみると、頭痛で発見されることが多いとされる。<sup>7, 13</sup> また、腫瘍から erythropoietin が合成されていることがあり、過去の論文では、164 例中 22 例（13.4%）に多血症を認めている。<sup>14, 15</sup>

画像上の特徴として、52%の症例で嚢胞を伴う事が報告されている。<sup>6</sup> また、大きな嚢胞を伴う事もあり、その場合、腫瘍は、小さい壁在結節（mural nodule）の形で存在する。嚢胞性腫瘍以外の 48%の症例では、充実性腫瘍の形をしており、腫瘍実質部分は、造影剤にて強く造影される。（図 1,2 参照）また、脳血管撮影検査では、血液の流入が非常に多いことを反映し、腫瘍濃染像が認められるのも、この腫瘍の画像的特徴の1つである。（図 3 参照）

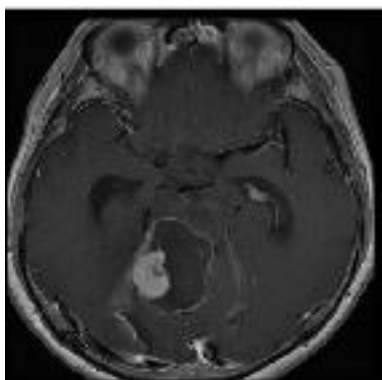


図 1. 血管芽腫の頭部 MRI 画像 (T1WI Gd 造影、axial 画像、当院手術症例)  
小脳に、嚢胞を伴い、一部造影される腫瘍を認める。

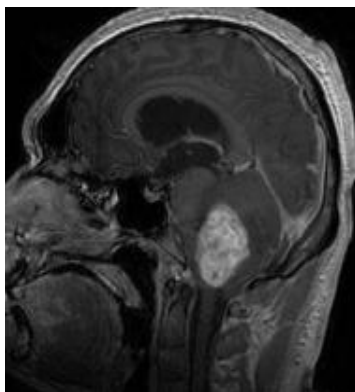


図 2. 血管芽腫の頭部 MRI 画像 (T1WI Gd 造影、sagittal 画像、当院手術症例)  
小脳に、造影良好の腫瘍を認め、延髄を強く圧排している。

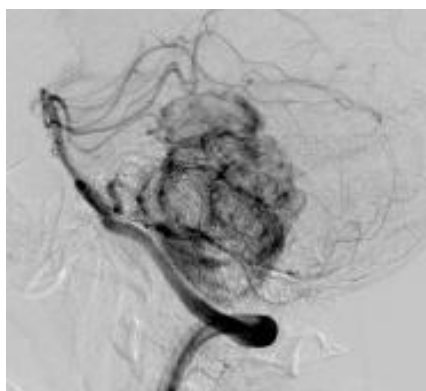


図 3. 血管撮影検査 (椎骨動脈撮影側面像、当院手術症例)  
小脳に、血流豊富な腫瘍が存在し、上小脳動脈などからの流入を認める。

## 2. 中枢神経系血管芽腫の病理学的特徴

病理学的には、無数の毛細血管の増生と、腫瘍細胞とされる **stromal cell** が特徴的である。この **stromal cell** は、明るい細胞質を伴っているのが特徴である。<sup>8</sup>

(図 4 参照) **Stromal cell** では、*in situ* hybridisation にて VEGF (vascular endothelial growth factor、血管内皮成長因子) の発現が高いことが示されており、本腫瘍が非常に血管豊富な原因とも考えられている。<sup>16,17</sup> **HB** には、病理学的に **cellular** 型と **reticular** 型という、2 つの型があるとされている。**Stromal cell** が腫瘍の大部分を占めているのが、**cellular** 型、**stromal cell** が少なく毛細血管が腫瘍の大部分を占めているのが、**reticular** 型とされているが、同じ腫瘍の中でも、この 2 つの病理組織型が混在していることが多く、厳密にどちらであることを示すのは困難である事が多い。<sup>1,8</sup>

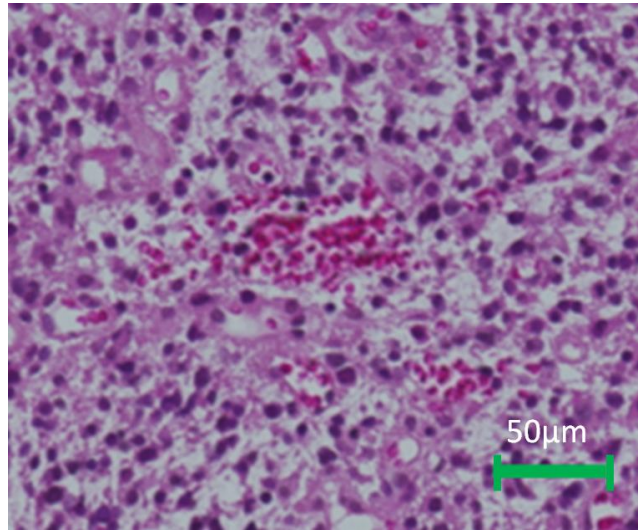


図 4. HB の HE 染色 (当院手術症例 ×200)

毛細血管が豊富であり、さらに、その中に淡明な細胞質を伴う stromal cell を認めるのが、HB の特徴である。

### 3. 中枢神経系血管芽腫の治療

治療方法であるが、外科的摘出術が第一選択であり、摘出術施行例の 98%は、合併症なく全摘ができ、非 VHL 病症例ならば、摘出術後に再発することは 100%ないと報告されている。<sup>5,7</sup> また、最近では、サイズが 2cm より小さい症例に関しては、放射線の局所照射やガンマナイフなどの定位的放射線療法も行われており、当院も含めて、いくつか治療成績が報告されており、腫瘍制御率は治療後 5 年で 8 割ほどである。<sup>18,19</sup> ただ、腫瘍のサイズが大きく血液の流入が非常に多く認める症例、あるいは、脳幹部にある症例は、摘出が非常に困難で、また、放射線治療も施行困難である。

## **B. von Hippel-Lindau (VHL) 病**

### 1. VHL 病とは

VHL 病は、前述したように、神経線維腫症 1、2 型 (NF1,2) などと同様の遺伝性腫瘍疾患の 1 つであり、表 1 のように、HB だけでなく、腎嚢胞、RCC、網膜血管腫、褐色細胞腫、膵嚢胞なども好発する。<sup>20</sup> 1895 年、ドイツの眼科医である Eugen von Hippel が、網膜の多発血管腫例やその家族性があることを報告し<sup>21</sup>、1926 年、スウェーデンの病理医である Arvid Lindau が、網膜のみでなく中枢神経系にも血管腫を多発する家族例の病理検索所見を報告している。<sup>22</sup> このことにより、2 人の名前を取って、von Hippel-Lindau 病と名付けられた。常染色体優性遺伝といわれ、65 歳までにはなんらかの腫瘍が発見されるとされており、浸透率はほぼ 100% である。<sup>20</sup>

	頻度 (%)
中枢神経系血管芽腫	
小脳	<b>44-72%</b>
脳幹	<b>10-25%</b>
脊髄	<b>13-50%</b>
網膜血管腫	<b>25-60%</b>
内耳リンパ管腫	<b>10%</b>
腎細胞癌または嚢胞	<b>25-60%</b>
褐色細胞腫	<b>10-20%</b>
膵臓腫瘍または嚢胞	<b>35-70%</b>
精巣上体嚢胞腺腫	<b>25-60%</b>

表 1. VHL 病で腫瘍が発生する臓器と頻度(文献 20 より引用、改変)

VHL 病では、HB だけでなく、腎細胞癌や網膜血管腫、褐色細胞腫なども好発する。

## 2. VHL 病の臨床的診断基準

2011 年に、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)「フォン・ヒッペルリンドウ病の病態調査と診断治療系確立の研究」班(以後、VHL 班会議と略)にて、診療ガイドラインが作成され、そこでの VHL 病の臨床的診断基準は、以下のようにになっている。<sup>23</sup>

### i) VHL 病の家族歴が明らかである場合

網膜血管腫、中枢神経系血管芽腫、腎癌、褐色細胞腫、膵臓の病気(膵嚢胞、膵臓の神経内分泌腫瘍)、精巣上体嚢胞腺腫があることが診断されている

### ii) VHL 病の家族歴がはっきりしない場合

- ア. 中枢神経系血管芽腫あるいは網膜血管腫を複数個(2 個以上)発症
- イ. 中枢神経系血管芽腫または網膜血管腫と以下に述べる病気がある
  - (a) 腎癌
  - (b) 褐色細胞腫
  - (c) 膵臓の病気(膵嚢胞、膵臓の神経内分泌腫瘍)
  - (d) 精巣上体嚢胞腺腫

### 3. VHL 病の好発腫瘍の特徴

VHL 病症例における HB は、散発性の症例と比較して、若年発症（20~30 歳代）で、かつ多発する特徴がある。<sup>5</sup> また、発生部位も、小脳だけでなく、延髄、脊髄も少なくない。<sup>7</sup> 特に、脊髄病変に HB を認めれば、VHL 病である可能性が高いことを、当科よりの症例解析にて報告している。<sup>24</sup> 病変が多発するために、何回も摘出術をすることになり、かつ、脊髄で多発すると、手術自身も難しく、そのため、有効な化学療法の出現が待たれているのが現状である。

HB の次に、VHL 病で、多いのは腎臓病変である。VHL 病では、腎嚢胞が、若年性、両側性、多発性に発生する。<sup>25</sup> また、その腎嚢胞内、あるいは、周囲実質から、悪性腫瘍である、淡明型（clear cell type）の RCC が発生する。VHL 病症例全体の約 40%に、RCC が発生するといわれ、VHL 病患者の主な死因の 1



つとなっていた。<sup>26</sup> しかし、最近は、VHL 病症例を、遺伝子診断などでなるべく早く診断し、定期的な画像フォローアップを行うことで、RCC を早期に診断し、小さいうちに早期治療を行うことができるようになったために、予後の改善が認められている。<sup>27</sup> また、最近の治療方針としては、腎部分摘出術など、なるべく腎臓を保護する方向となっており、ADL の改善も図られている。<sup>28</sup>

VHL 病のその他の好発病変としては、網膜血管腫と褐色細胞腫、腭病変、そして、内耳に発生する内耳リンパ管腫が挙げられる。網膜血管腫では、小児期に発生する事があり、さらに症状が進行した場合は失明する可能性もある。網膜滲出性の血管腫があれば、網膜光凝固を行うのが標準治療とされる。<sup>29</sup> 腭病変は、腭嚢胞が多いが、まれに、神経内分泌腫瘍が発生し悪性化することあり、注意が必要である。<sup>30</sup> 褐色細胞腫は、副腎にできる腫瘍であり、高血圧で発症することがあるが、無症状の場合もある。<sup>20</sup> 内耳リンパ管腫は、稀な腫瘍ではあるが、内耳に発生し、症状が進行すると、聴力損失することもある腫瘍であり、早期発見、早期治療が望まれる腫瘍である。<sup>31</sup>

## C. VHL 遺伝子・蛋白と 2 hit theory による不活化

### 1. VHL 遺伝子の同定

VHL 病の原因遺伝子は、VHL 病の家族例の連鎖解析を行うことで、1988 年、

3番染色体上にあることが報告され<sup>32</sup>、さらに、positional cloning法という方法を用いて、1993年、Latifらのグループが、3p25-26上にある遺伝子として同定され、これをVHL遺伝子(VHL)と名付けて報告している。<sup>33</sup>

## 2.2 hit theoryによるVHL遺伝子不活化

後述するように、VHL病の好発腫瘍であるRCCでは、VHLの2hitを多く認めるため、Knudsonが1971年に提唱した、2 hit theoryが成立しており、この事より、VHLはがん抑制遺伝子と考えられている。<sup>34,35</sup> この2 hit theoryであるが、各遺伝子に2本ずつある対立遺伝子(アレル)のうち、2本ともに障害がおきた場合に、はじめて、がん抑制遺伝子の機能が完全に不活化されてしまい、腫瘍化が進行するという考え方である。(図5参照)例えば、VHL病のような遺伝性脳腫瘍の患者の場合、一対あるがん抑制遺伝子の片方のアレルの変異を両親いずれかの生殖細胞から受け継いでおり、全身の細胞にあらかじめ片方の遺伝子の変異が存在することになる(first hit)。すると、体細胞レベルで、残った方の正常な遺伝子に、機能消失するような異常が起これば(second hit)、腫瘍化へ進む訳であり、一般の人と比べて腫瘍の発生する確率が高くなるのである。ここで、遺伝子機能喪失の原因となるものは、色々あるが、主なものとして、以下の3つが考えられている。

①遺伝子の塩基配列レベルでの変異 (mutation) 、部分欠失

②目的の遺伝子を含む範囲での染色体レベルでの欠失

(特に、2つあるアレルの内、片側のアレルが欠失した状態をヘテロ接合性の喪失 loss of heterozygosity(LOH)という)

③遺伝子のプロモーター領域のメチル化

①②が、genetic な異常であり、③に関しては、塩基配列の異常を伴わない、epigenetic な異常と言える。これらにより、2つのアレルがともに障害された時、遺伝子の不活化が起こる事になる。

VHL 病の好発腫瘍である RCC において、VHL の異常と、上記のような 2 hit による不活化が、どれぐらいの頻度で認めているのかを調べた報告がいくつかある。<sup>34, 36, 37</sup>Sato らの報告では、VHL 病でない散発性症例においても、VHL 変異、VHL を含んだ範囲での3番染色体LOH、VHLプロモーター領域メチル化が、それぞれ、82.0%、94.0%、10%の症例で認めている。これらの結果を統合すると、2 hit による不活化は、97.8%で起きていることになる。<sup>34</sup>つまり、RCC においては、大半の症例において、VHL の 2 hit による不活化を認めており、VHL の 2 hit による不活化が RCC の腫瘍形成機序に重要である可能性は高いと言える。

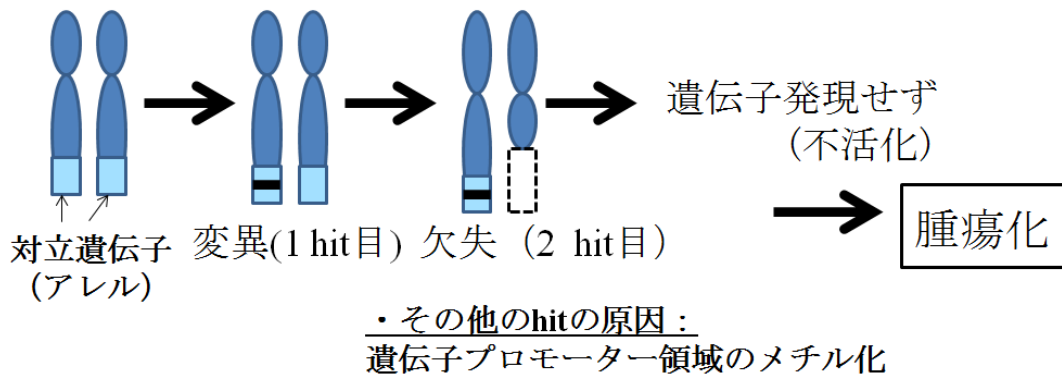


図 5. がん抑制遺伝子の 2 hit theory

2本の染色体上にある2つの対立遺伝子（アレル）に対して、遺伝子自身の変異や部分欠失、遺伝子を含んだ範囲での染色体レベルの欠失、あるいは、プロモーター領域のメチル化などが起きる事で、2つのアレルがともに障害を受けた場合、遺伝子は発現できず、腫瘍化に向かう。

### 3. VHL 蛋白の機能と腫瘍化

VHL が発現して合成される VHL 蛋白は、Elongin B、Elongin C などと図 6 のような複合体を形成し、VBC (VHL-elongin BC complex) と名付けられている。<sup>34,</sup>

<sup>38</sup> この複合体は、ユビキチンリガーゼ E3 として機能しているとされ、主な分解

基質としては、転写因子の 1 つである HIF (hypoxia inducible factor)-1, HIF-2 がよ

く知られている。<sup>39</sup> その分解の機序は次の通りである。通常の酸素濃度下では、

PHD (prolyl-hydroxylase domain proteins) という酵素が HIF の  $\alpha$  サブユニット (以

後 HIF $\alpha$  と略) をリン酸化し、このリン酸化された HIF $\alpha$  に、VBC がユビキチン

を結合させることで、プロテオソームによる分解が起こる。<sup>40</sup> しかし、低酸素

条件下では PHD の酵素活性が著しく低下するために HIF $\alpha$  のリン酸化が行われ

ず、よって VBC がユビキチンを結合できないために、HIF $\alpha$  は分解を免れる。

VHL の変異により、VHL 蛋白に異常をきたし、VBC がユビキチンを正常に付加できなくなった場合においても、低酸素条件下と同様に HIF $\alpha$  は分解を免れることになる。HIF $\alpha$  が分解を免れた場合は、HIF の  $\beta$  サブユニットと結合してヘテロ二量体を形成し、特定の遺伝子の転写調節領域に結合することで、下流遺伝子の転写促進が引き起こされる。この HIF により転写制御される遺伝子として、有名なのが、前述した VEGF、そして、PDGF(platelet derived growth factor、血小板由来成長因子)などの成長因子である。これら以外に、glucose transporter 蛋白である Glut-1、造血に関与する erythropoietin、glycolysis に関与する phosphoglycerate kinase など、多数の因子が下流の遺伝子として報告されており、分子の数としては 100 以上あると言われている。<sup>41</sup> HIF(hypoxia inducible factor) という名前の通り、低酸素条件下でも、細胞が生存・増殖できるようにするための因子を主に誘導していると考えられている。さらに、ケモカイン受容体の一種である CXCR4 も、HIF により転写誘導されると考えられており、これにより、腫瘍細胞の転移が促進されたという報告があり、がんの生存にも強く関与している可能性がある。<sup>42</sup>

以上より、VHL 蛋白に障害が起きると、HIF が分解されないために、VEGF などの発現が促進し、腫瘍化に関与することが想定されている。(図 6 参照)

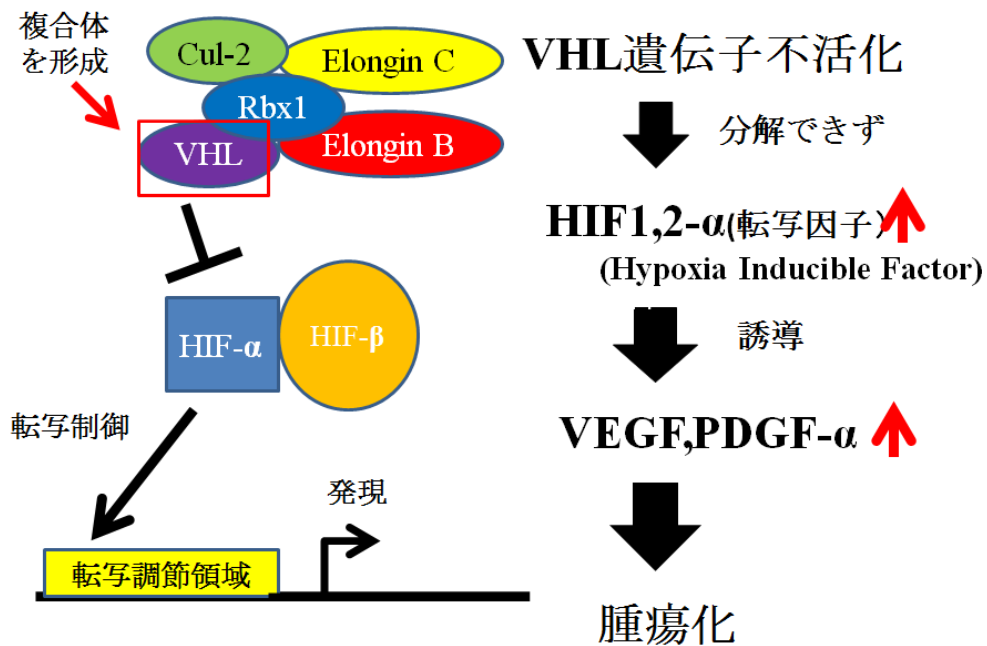


図 6. VHL 蛋白の機能と腫瘍化

VHL 蛋白は、Elongin B や Elongin C などと複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ E3 として機能し、HIF などの蛋白の分解に関与している。VHL 遺伝子不活化で分解されなかった HIF は、VEGF などを誘導し、腫瘍化へ進むとされている。

#### D. 中枢神経系血管芽腫における VHL 遺伝子異常

II-C-2(12 頁参照)でも述べたとおり、VHL 病の好発腫瘍の 1 つである RCC では、VHL 遺伝子異常と、その 2 hit による不活化を 90% 以上の症例で認めている。

しかし、同じ VHL 病の好発腫瘍の 1 つであるにもかかわらず、HB では、その頻度は、RCC とは必ずしも同じではない。過去の文献における、HB の VHL 遺伝子異常解析の結果を表 2 に提示した。<sup>43-49</sup> これらの結果より、VHL 病症例では、ほぼ 100%、VHL 遺伝子異常を認めるが、散发性症例では、10~54%と低い

値を示している事がわかる。過去の文献の中で、VHL 病症例も散発性症例も、ともに相当数、解析しているのは、Glasker らの報告のみである。この報告によると、VHL 病症例においては、VHL 変異、VHL を含んだ範囲での 3 番染色体 LOH、VHL プロモーター領域メチル化が、それぞれ、97%、62%、0%の症例で認めている。<sup>48</sup> 散発性症例では、それぞれ、23%、50%、0%の症例で認めている。これらのデータを統合すると、2 hit による不活化は、VHL 病症例では 62%、そして、散発性症例では 10%にしか認めない事になる。この結果をうけて、Glasker らの論文では、HB、特に散発性の HB に関しては、VHL の 2 hit による不活化以外にも、重要な腫瘍形成機序が存在する可能性があり、VHL 以外の原因遺伝子が存在している可能性もあると結論づけている。この Glasker の報告は 2001 年に発表されたものであり、ここで、2 hit の検索のために使用された技術は、single strand conformational polymorphism(SSCP)解析、microsatellite marker を用いた LOH 解析、さらに、プロモーター領域のメチル化をみるために、メチル化感受性制限酵素を用いた解析を用いている。以上のような方法のみでは、現在の知見から考えると、遺伝子の不活化を調べる方法としては不十分と思われるため、HB において、VHL 異常と 2 hit による不活化の頻度が少ない原因は、当時の解析技術の網羅性が、不足していることによる可能性も考えられる。そこで、現在施行可能となった別の遺伝子解析技術を用いて、HB 検体における、

*VHL* 異常と 2 hit による不活化を再度、調査する必要があると言える。特に、*VHL* 病症例の HB では、原因遺伝子の *VHL* の不活化がやはり重要であるにせよ、散发性症例においては、それ以外の機序も少なからず存在する可能性もあり、これらを別々のものとして検討する必要があると思われる。



報告者/ VHL病or散発性	VHL変異(%) (症例数/全症例) (解析方法)	3番染色体LOH(%) (症例数/全症例) (解析方法)	メチル化(%) (症例数/全症例) (解析方法)	報告年/ 文献番号
Crosseyら/ VHL病	-	14 (1/7) (LOH)	-	1994/44
Prowseら/ VHL病	100 (15/15) (SSCP、サザン)	27 (3/11) (LOH)	26.7 (4/15) (制限酵素)	1997/45
Gijtenbeekら/ VHL病	100 (7/7) (ダイレクトシーケンシング)	14.2 (1/7) (CGH)	-	2002/47
Glaskerら/ VHL病	97 (28/29) (SSCP、サザン)	62 (13/21) (LOH)	0 (29/29) (制限酵素)	2001/48
Kannoら/ 散発性	54 (7/13) (SSCP)	-	-	1994/43
Leeら/ 散発性	10 (2/20) (SSCP)	52.6 (10/19) (LOH)	-	1998/46
Gijtenbeekら/ 散発性	31.2 (5/16) (ダイレクトシーケンシング)	62.5 (10/16) (CGH)	-	2002/47
Glaskerら/ 散発性	23 (3/13) (SSCP、サザン)	50 (5/10) (LOH)	0 (13/13) (制限酵素)	2001/48
Muscarellaら/ 散発性	52 (11/21) (ダイレクトシーケンシング, long PCR)	46 (6/13) (LOH)	0 (15/15) (MSP法)	2014/49

表 2. HB における VHL 遺伝子異常

過去の文献における、HB の VHL 遺伝子異常解析の結果を示した。VHL 病症例では、ほぼ 100%、VHL 遺伝子異常を認めるが、散発性症例では、10~54%と低い値を示している以下、略語の意味を示す。

SSCP : single strand conformational polymorphism 解析

サザン : サザンブロットィング解析

long PCR : ロングテンプレート PCR

LOH : microsatellite marker を用いた LOH 解析

CGH : アレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization)解析

制限酵素 : メチル化感受性制限酵素を用いた解析

MSP 法 : Methylation-specific PCR 法

### Ⅲ. 目的

#### A. 本研究の目的

序文に記載した内容をふまえ、本研究では、VHL 病群と散发性群の 2 群の HB において、VHL 異常と 2 hit による不活化が、それぞれどれくらい認めるのかを、以前の報告とは別の解析技術も含めて検証することを、目的とした。

#### B. 使用する解析技術

上述のことを検証するために、本研究では、対象となる腫瘍検体のゲノム DNA を主に用いて、下記の 4 項目 6 種類の解析を施行した。

- ①VHL の変異解析 (ダイレクトシーケンシング法)
- ②VHL の部分欠失や、VHL を含んだ範囲での染色体レベルの部分欠損をみるための解析 (Mutiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法)
- ③VHL プロモーター領域のメチル化解析  
(Methylation-specific PCR(MSP)法、バイサルファイトシーケンシング法)
- ④網羅的コピー数解析(SNP アレイ)とゲノム定量的 real time PCR

## IV. 方法

### A. 対象

本研究の対象は、1995年から2012年の間に、東京大学医学部附属病院脳神経外科（以下、当科と略）において、腫瘍摘出術を施行した症例計28例と、その摘出術により採取した腫瘍、計32検体である。内訳は、VHL病群が7症例11検体と、非VHL病群（以下、散発性群）が21症例21検体である。すべての腫瘍検体と、ペアとなる正常血液に関しては、摘出術中に採取した。すべての腫瘍検体は、WHO分類に従い、HBと病理学的に診断されている。<sup>1</sup> VHL病の診断は、II-B-2(8-9頁参照)で述べた、VHL班会議の診療ガイドラインにある臨床的診断基準に則り行った。<sup>23</sup> この研究は、東京大学大学院医学研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会から承認された「脳腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」研究に基づいて行っている。（#G3512）すべての対象症例の患者からは、文書による同意を取得している。また、当科では、一部の症例の患者に対しては、VHL病の遺伝子診断を行うために、血液検体を用いて、生殖細胞系列の遺伝子変異を調べている。この遺伝子診断は、東京大学大学院医学研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会から承認された「脳神経外科領域疾患の遺伝子解析研究（遺伝子診断を含む）」に基づいて行っている。（#G10026）遺伝子診断を施行した患者からは、遺伝カウンセリング

を必要に応じて施行した後、文書による同意を取得している。

## B. ゲノム DNA 調製

腫瘍凍結切片と、ペアとなる正常血液から、QIAamp DNA mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、業者の推奨するプロトコールに従い、ゲノムDNAを調製した。ゲノムDNAがきちんと調製されているかを確認するために、1.5%アガロースゲルによる電気泳動と、分光光度計(Nano Vue Plus: GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom)によるDNA濃度測定を行った。

## C. ダイレクトシーケンシング法

*VHL* の全 3exon に対して、下記のように、6 ペアのプライマーを用いて、Polymerase chain reaction(以下、PCR と略)を施行した。プライマーの標的部位は、図 7 に掲載した。このプライマーは、Weil らの論文に掲載されている配列に準拠した。<sup>50</sup> Exon1 に関しては、4 組のプライマーペアを使用した。(1A~1D)

Exon1A Forward: 5'-GACTACGGAGGTCGACTCGG -3'

Exon1A Reverse: 5'-GTCCCAGTTCTCCGCCCTCC-3'

Exon1B Forward: 5'-CCGGCCCGGGTGGTCTGGAT-3'

Exon1B Reverse: 5'-CCTCGGCGCCCGACTCCTCC-3'

Exon1C Forward: 5'-GAGGCAGGCGTCGAAGAGTA -3'

Exon1C Reverse: 5'-CGATTGCAGAAGATGACCTG-3'

Exon1D Forward: 5'-CATCTTCTGCAATCGCAGTC -3'

Exon1D Reverse: 5'-TGGGTCGGGCCTAAGCGCCG-3'

Exon2 Forward: 5'-GTGGCTCTTTAACAACCTTTGC-3'

Exon2 Reverse: 5'-CCTGTACTTACCACAACAACCTTATC-3'

Exon3 Forward: 5'-TTCCTTGTACTGAGACCCTAGT-3'

Exon3 Reverse: 5'-AGCTGAGATGAAACAGTGTAAGT-3'

PCRでは、DNA polymeraseはAmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いた。Thermal cycling はGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いた。PCRのプログラムは、下記の通りである。

熱変性：95°C30秒、アニーリング：60°C30秒、伸長：72°C30秒

このサイクルを計35回施行した。これらのPCR産物に対して、2% アガロースゲルによる電気泳動を行った。目的としたバンドを、塩基サイズが問題ないかをサイズマーカーにて確認後、ゲルごと切り出した。その後、ゲルの精製は、QIAquick Gel extraction Kit(QIAGEN)を用いて、業者が推奨するプロトコール通りに行った。ダイレクトシーケンシングはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit ver3.1 (Applied Biosystems)を使用した後に、Genetic Analyzer

310 (Applied Biosystems)を用いて行った。また、シーケンシングの一部は、FASMAC社 (Atsugi, Japan) に依頼して施行した。その際、シーケンサは、ABI Genetic Analyzer 3130XL か、あるいは、ABI DNA Analyzer 3730xL (Applied Biosystems)を用いており、解析ソフトは、Sequence Scanner version 1.0 (Applied Biosystems)を用いている。これらのデータは、解析ソフト DNADynamo

(BlueTractor Software, North Wales, United Kingdom) で表示して、遺伝子変異の有無と部位を確認した。また、同定された遺伝子変異が、病的な変異と予想されるかどうかを判断するために、以下の事を行った。

- ① 同定された遺伝子変異が、後述するSNP (single nucleotide polymorphism:1塩基多型) でないかを、日本人ゲノムのデータベースであるHuman Genetic Variation Database(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>)における、VHL遺伝子の項目を参照して確認する。
- ②同定された遺伝子変異が、過去に報告されたVHL遺伝子異常であるかどうかを、*Mutation View* version 2.0βのデータベースにおけるVHL遺伝子の項目 ([http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp/mv/search\\_top?kind=Gene&query=VHL&km=&commit=Go](http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp/mv/search_top?kind=Gene&query=VHL&km=&commit=Go)) を参照して確認する。
- ③同定された遺伝子変異の部位が、VHL蛋白のどの機能部位に相当するかを確認し、遺伝子変異によりVHL蛋白の機能障害が起こり得るかどうかを予想する。

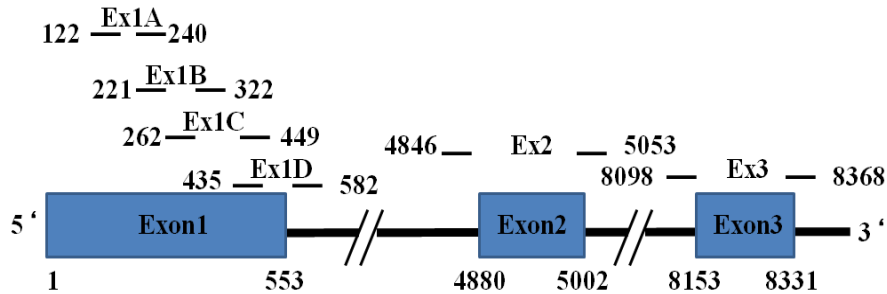


図7.ダイレクトシーケンシング法で使用したプライマーの標的部位  
*VHL* の全 3exon に対して、上記のように、6 ペアのプライマーを用いた。数字は、塩基配列番号を表している。Exon1 に関しては、4 組のプライマーペアを使用した。(1A~1D)

#### D. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法

##### 1. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法とは

Multiplex ligation dependent probe amplification (以下、MLPAと略) 法は、PCR を基本とした解析方法で、1度に50程度のゲノムDNA配列のコピー数の異常を検出することができる。そのために、前述のダイレクトシーケンシング法と異なり、遺伝子exonレベルから染色体レベルまでの欠失、増幅を検出することができる。また、標的部位のLOHも、コピー数が2から1に減少することで、同定することが理論的には可能である。MLPAの解析方法の概要は以下のようなものである。

(図8参照)

まず、コピー数を知りたい標的部位を決定し、その両端に特異的にハイブリダイズされる配列をそれぞれプローブとして設計する。次に、ゲノムDNAの熱

変性を行い、2本鎖DNAから1本鎖DNAにする。その後、プローブを1本鎖DNAにハイブリダイズさせる。(ハイブリダイゼーション) その次に、標的部位の両端にハイブリダイズされているプローブ間を、ライガーゼにて連結し一本化する。(ライゲーション) 設計したプローブの端には、PCR用共通のプライマー配列をつけてあるために、1対のプライマーセットのみで、いくつもあるライゲーション産物に対して、PCRによる増幅を一度に行う事ができる。各PCR産物は、おのおの塩基長が異なるようにプローブにスタッパー配列が付加されているため、キャピラリーシークエンサによる電気泳動にて、各PCR産物を泳動度の違いとして分離して同定することができる。この時、電気泳動結果におけるpeakの高さは、各PCR産物の量と比例しており、図8の右上2段目のグラフのように、標的部位が完全に欠損していれば、peakは消失するし、片側のアレルのみ欠損していれば、右下のグラフのように、peakの高さは1/2になることが予想される。このようにして、多数の標的部位のコピー数を、1度に解析することができる。



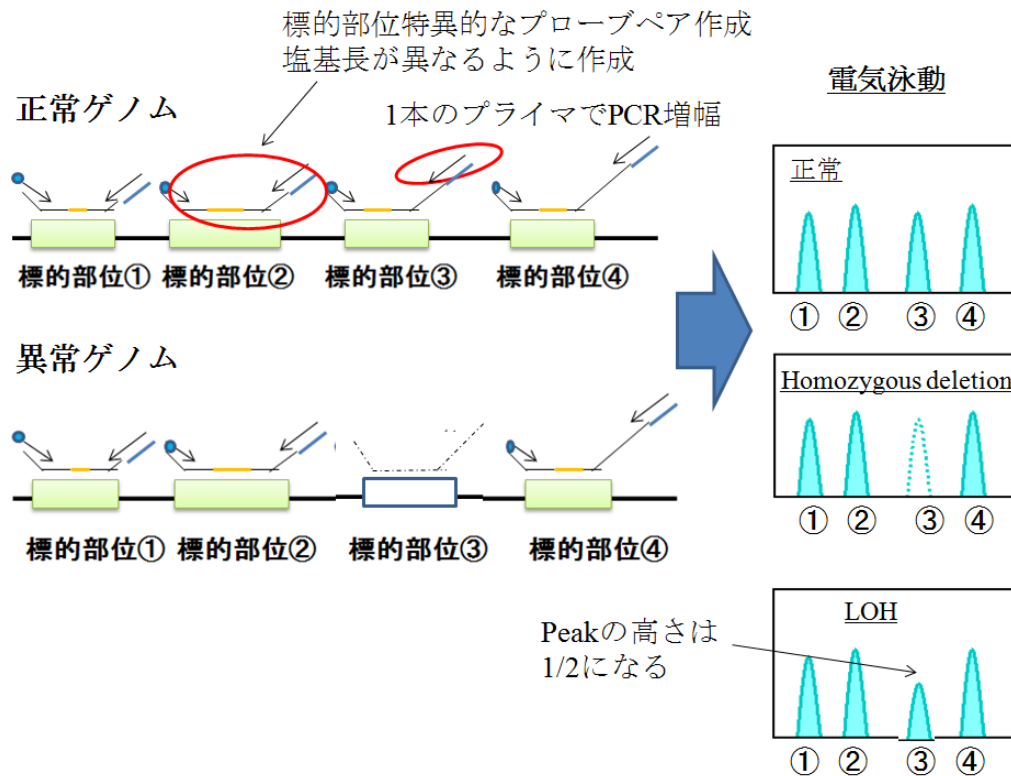


図 8. MLPA 法の概要

まず、標的部位に対し、特異的なプローブを設計する。次に、これを用いて、ゲノムDNAの熱変性⇒ハイブリダイゼーション⇒ライゲーション⇒PCRを行う。出来たPCR産物に対して、キャピラリーシーケンサによる電気泳動を行う。各PCR産物は、泳動度の相違で同定でき、そのpeakの高さを測定することで、標的部位のコピー数を解析することができる。

## 2. 本研究における MLPA 法の手順

本研究では、*VHL* の部分欠失、または *VHL* を含んだ範囲での染色体レベルの LOH を同定することが目的であったが、これに対しては、すでに、プローブセット (SALSA P016-C2 *VHL* probe kit :MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) が作成されていたために、このキットを購入して使用した。業者が推奨するプロトコルに従って、解析を行った。Thermal cycling は GeneAmp PCR System 9700

を用いた。使用した PCR のプログラムは、下記の通りである。

熱変性：95°C30秒、アニーリング：60°C30秒、伸長：72°C30秒

このサイクルを計35回施行した。PCR産物の電気泳動は、Genetic Analyzer 310 を使用して行った。前述したように、各PCR産物の、電気泳動上のpeakの高さを比較定量する事で、標的部位のコピー数が解析できるわけであるが、この手順は、解析ソフトGene Mapper v4.0(Applied Biosystems)を使用した。また、本研究では、MRC-Holland社のプロトコールに則り、コピー数が1.3以下、あるいは2.7以上になっているのが、2つ以上の連続した標的部位で認められた場合、その部分の欠失、あるいは、増幅があると判定した。

## E. メチル化解析

本研究では、*VHL*のプロモーター領域のメチル化の有無を解析するために、調製したゲノムDNAを、バイサルファイト変換した後、以前から解析報告がある methylation-specific PCR(以下、MSPと略)法に加え、今までHBに対しては、施行した報告がないバイサルファイトシーケンシング法も行った。

MSP法では、ある遺伝子のプロモーター領域を標的部位とした場合、CpGサイトが、全てメチル化された場合と、全て非メチル化された場合とで、それぞれ特異的にハイブリダイズするプライマーを、まず設計する。これを用いて、バ

バイサルファイト変換産物のPCRを行い、その増幅産物の有無で、全てメチル化されているのか、全て非メチル化されているのかを判定する事ができる。(図9A参照) それに対して、バイサルファイトシークエンシング法は、バイサルファイト変換産物をPCRにて増幅した後に、サンガー法を用いてシークエンシングを行う方法である。(図9B参照) この2つの解析技術の大きな違いは、プライマーの設定部位にある。MSP法では、前述したように、プライマー内にメチル化を起こすCpGサイトを多く含んでいる。しかし、バイサルファイトシークエンシング法に関しては、メチル化の有無でPCR増幅が変わってしまう事を防ぐために、プライマー内には、可能な限りCpGサイトを含まないように設計することが心がけられる。つまり、MSP法とバイサルファイトシークエンシング法では、同じ遺伝子のプロモーター領域を標的としていても、プライマーの設定部位が異なる可能性が高い。

また、本研究では、解析のpositive controlとして、全てのCpGサイトがメチル化されているCpG Methylated Jurkat Genomic DNA (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)を、negative controlとして、全てのCpGサイトが非メチル化されている5-Aza dc Jurkat Genomic DNA (New England Biolabs)を使用した。

次に、本研究で用いた、実際の手順などについて述べる。

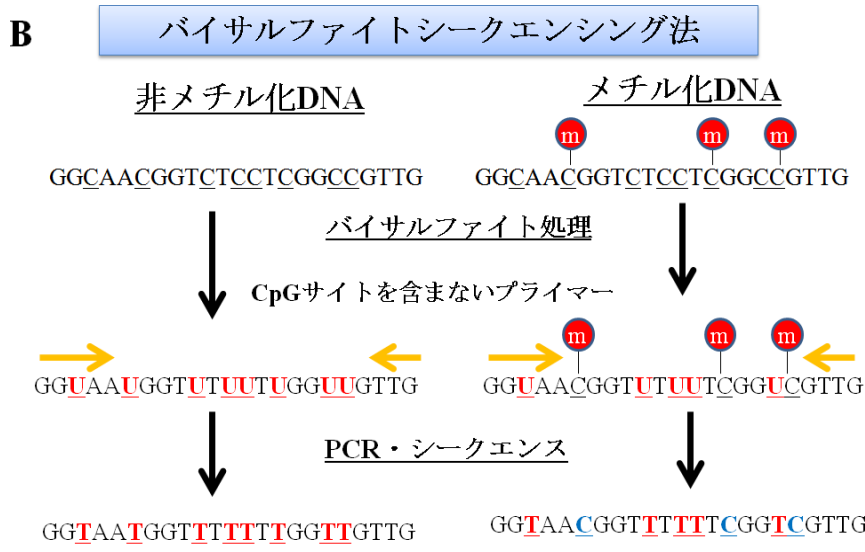
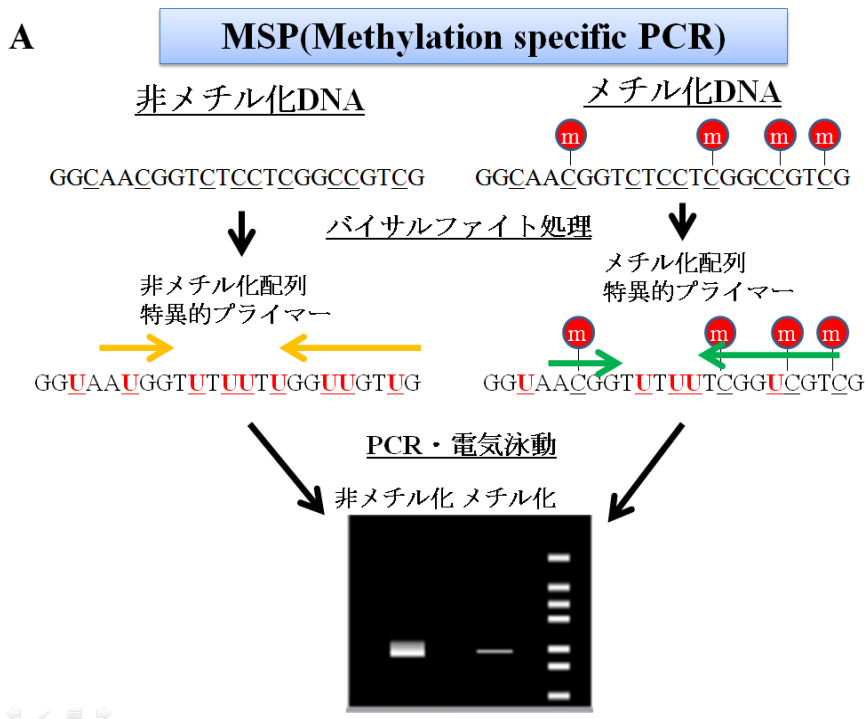


図9. メチル化解析技術の概要

A:MSP法では、メチル化、あるいは、非メチル化されている標的部位に対して、それぞれ別のプライマーを設計し、バイサルファイト変換産物のPCRを行う。その増幅産物の有無をみることで、メチル化の有無を判定する事ができる。

B:バイサルファイトシーケンシング法は、バイサルファイト変換産物をPCRにて増幅した後に、サンガー法を用いてシーケンシングを行う方法である。

## 1. バイサルファイト変換

IV-B (21頁参照)に記載した方法にて調製したゲノムDNAが、各検体、トータル250ngとなるように、分光光度計で測定したDNA濃度に基づいて、DNA溶液を採取し、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA)を使用して、業者が推奨するプロトコールに従い、バイサルファイト変換を行った。

## 2. Methylation-specific PCR(MSP)法

前項の1.にてバイサルファイト変換したDNAに対して、Hermanらの論文で用いられているプライマーにてPCRを行った。<sup>51</sup> 使用したプライマーは、下記の通りである。

メチル化認識プライマー Forward: 5'-TGGAGGATTTTTTTGCGTACGC-3'

Reverse: 5'-GAACCGAACGCCGCGAA-3'

(認識部位塩基サイズ : 158)

非メチル化認識プライマー Forward: 5'-GTTGGAGGATTTTTTTGTGTATGT-3'

Reverse: 5'-CCCAAACCAAACACCACAAA-3'

(認識部位塩基サイズ : 165)

PCRでは、DNA polymeraseはAmpliTaq Goldを用いた。Thermal cycling は GeneAmp PCR System 9700を用いた。PCRのプログラムは、下記の通りである。

熱変性：95°C50秒、アニーリング：59°C50秒、伸長：72°C50秒

このサイクルを計37回施行した。このPCR増幅産物を、1.5%アガロースゲルによる電気泳動を行い、増幅産物の有無により、*VHL*プロモーター領域のメチル化の有無を確認した。

### 3. バイサルファイトシーケンシング法

前々項の1.にてバイサルファイト変換したものに対して、Nickersonらの論文で用いられているプライマーにてPCRを行った。<sup>37</sup> この論文では、1回のPCRでは、増幅産物が少量すぎて、シーケンシングが困難であるために、nested PCRを行っており、本研究でも、これに従った。具体的なプライマーは、以下の通りである。

1回目のPCRで使用するプライマー

Forward: 5'-TTAYGGAGGTYGATTYGGGAG-3'

Reverse: 5'-ACRATTACAAAAATAACCTA-3'

2回目のnested PCRで使用するプライマー

Forward: 5'-YGGGTGGTTTGGATYG-3'

Reverse: 5'-AATTCACCRAACRCAACA-3'

(Yは、本来CpGサイトのCの部位であり、CとTのミックス塩基を示す)

PCRでは、DNA polymeraseはAmpliTaq Goldを用いた。Thermal cycling は GeneAmp PCR System 9700を用いた。PCRのプログラムは、前述したNickersonらの論文に従い、1回目、2回目ともに、同じプログラムを使用した。詳細は下記の通りである。

熱変性：94°C30秒、

アニーリング：50~57°C（タッチダウン方式）30秒

伸長：72°C30秒

ここでは、PCRの増幅効率をあげるために、タッチダウン方式を採用している。つまり、最初のアニーリング温度は57°Cであるが、その後、1サイクルごとに0.3°Cずつ低下して、23サイクル目に50°Cとした。さらに、アニーリング温度が50°Cの条件で、25サイクル施行した。本研究では、バイサルファイト変換産物のDNA濃度は、5~8ng/ $\mu$ L程度であり、その内の1 $\mu$ Lを使用して、トータルで10 $\mu$ Lとなる系で、1回目のPCRを施行した。1回目のPCR産物の内、1 $\mu$ Lを用いて、やはり、トータルで10 $\mu$ Lとなる系で、2回目のPCRを施行した。2回目のPCR産物では、1.5%アガロースゲルによる電気泳動を行った。こうして得たPCR産物を用いて、IV-C（22-23頁参照）の項で述べたのと同様の方法で、シーケンス解析を行った。これらのデータは、最後に、解析ソフトDNADynamoを用いて、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無を確認した。今回のバイサルファイトシ

ークエンシング法の標的部位内には、11箇所のCpGサイトが存在するが、前述したNickersonらの論文に則り、この内、4箇所以上がメチル化されていた場合、そのゲノムDNA検体は、メチル化を起こしていると判定した。メチル化の有無を図式化するために、解析ソフトQUMA(QUantification tool for Methylation Analysis, [http://quma.cdb.riken.jp/top/quma\\_main\\_j.html](http://quma.cdb.riken.jp/top/quma_main_j.html))を使用した。本来なら、PCR施行後、プラスミドと大腸菌を用いたサブクローニングを行い、相当数のコロニーを用いて、シーケンシングを行う事で、全細胞中で、メチル化を起こしている割合（メチル化率）を推定することができる。しかし、本研究で使用したプライマーは、CpGサイトを含んでいるために、ミックス塩基を使用しており、メチル化率を定量することは困難である。元々、このプライマーを使用していたNickersonらの論文でも、サブクローニングまで行っていない事もあり、本研究でも、サブクローニングは行っていない。<sup>37</sup>

#### 4. MSP法とバイサルファイトシーケンシング法での標的部位の違い

本研究で用いた、MSP法とバイサルファイトシーケンシング法のプライマーは、それぞれ、異なる部位を標的としている。その理由としては、IV-Eの最初の部分（27-28頁参照）で述べた様に、それぞれの解析技術に由来する、プライマーの設定方法の違いが挙げられる。実際の標的部位を図10に表示した。MSP



法では、転写制御に最も関与していると思われる部位(minimal promoter)<sup>52</sup>を、標的的部位として含んでいるが、バイサルファイトシーケンシング法の標的的部位は、それよりも3'側に設定されている。これらの標的的部位は、隣接はしているが、重なってはいない。

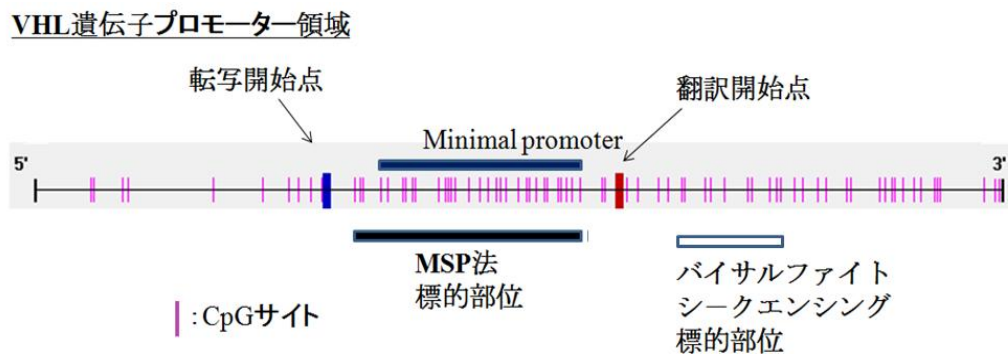


図10. MSP法とバイサルファイトシーケンシング法での標的部位的の違い

MSP法では、発現に関与しているminimal promoterを標的的部位に含んでいるが、バイサルファイトシーケンシング法の標的的部位は、それよりも3'側に設定されている。

## F. SNPアレイ解析

### 1. SNP アレイとは

SNPとは、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism) の事を示す。ある生物種集団のゲノム塩基配列中に1塩基が変異した多様性が見られ、その変異が集団内で1%以上の頻度で見られるとき、これを一塩基多型 (SNP) という。ヒトゲノム中には、だいたい1000塩基に1つの割合で、SNPを認める。SNPアレイとは、

数百万個程度の、各SNPのアレルに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いることで、数十万カ所以上のSNP について、その遺伝子型のタイピングが可能となったアレイである。このタイピングにおける、アレイシグナル強度が、ゲノムコピー数と比例しているという特徴を利用することにより、SNPアレイは、ゲノムコピー数の定量にも用いることができる。本研究で使用した、Genome-wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)では、約90万個のアレル特異的プローブセットの他に、約90万個のCNV (copy number variation、コピー数多型) のプローブも搭載されており、平均して、1000塩基以下の間隔でゲノムコピー数の異常を解析することが可能である。

## 2. SNPアレイ解析の概要

本研究では、Affymetrix社が推奨しているプロトコールに従って、東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス部門（以下、先端研と略）（油谷浩幸教授）との共同研究にてSNPアレイ解析を施行した。ここでは、この解析方法の概要のみを述べる。（図11参照）まず、ゲノムDNA（250ng）をNspI とStyI の制限酵素で消化し、その両端に共通のアダプターを付加する。この為に、1つのプライマーセットによるPCRで増幅ができる。そのPCR産物をDNaseI で断片化した後に、ビオチンを付加する。最後に、各SNPのアレルに特異的なオリゴヌク

レオチドプローブを数百万種類、搭載しているアレイ上でハイブリダイゼーションを行う。ここで、特異的にハイブリダイゼーションした断片をアビチンで認識し、GeneChip<sup>®</sup> Scanner 3000 7G Plusで読み取る。SNPのタイピングは、アレル特異的なプローブのシグナルパターンに基づいて行うわけだが、ゲノムコピー数は、腫瘍と正常対照の2枚のアレイの結果を用いて、対応するシグナル強度の比を用いる事で、定量可能である。

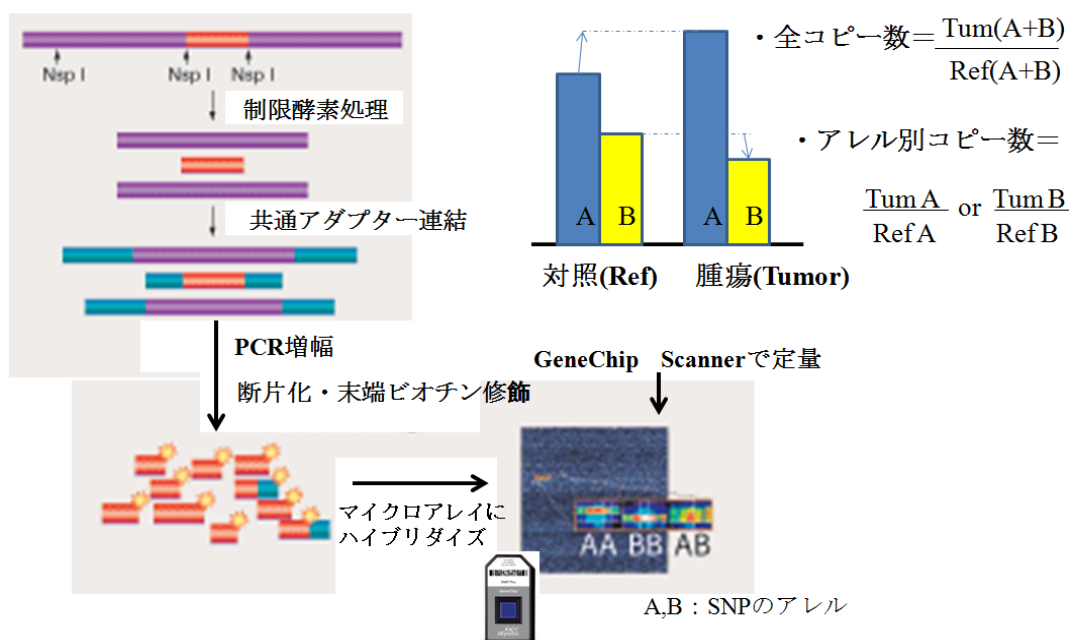


図11. SNPアレイの概要 (Affymetrix社のホームページ

([http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/genomewide\\_snp6\\_datasheet.pdf](http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/genomewide_snp6_datasheet.pdf)) より引用、改変)

まず、ゲノムDNAを制限酵素で消化し、1つのプライマーセットによるPCRを行う。PCR産物を、DNaseIで断片化し、ビオチンを付加した後、アレイ上でハイブリダイゼーションを行う。特異的にハイブリダイゼーションした断片をアビチンで認識し、GeneChip Scanner 3000 7G Plusで読み取る。ゲノムコピー数は、腫瘍と正常対照の2枚のアレイの結果を用いて、対応するシグナル強度の比を測定することで、定量が可能となる。

ただ、上述の解析方法で問題となるのは、腫瘍と正常対照を、別々にPCR増幅しているのに、そのPCR産物のシグナル強度を比べていることである。異なる反応系でPCRを行った場合、PCRの増幅効率は、必ずしも一定でなく、またDNA検体が、どの程度、消化酵素で分解変性しているのか、その度合いによっても、PCRの増幅産物の量にバイアスが生ずる可能性がある。しかし、これらのバイアスは、解析データに対して、一定の補正を施す事で、完全に排除することは困難であるが、バイアスの軽減を図ることが可能である。本研究では、先端研のグループが開発したアレル別コピー数解析プログラムである、Genome Imbalance Map(GIM)を使用した。<sup>53</sup> このプログラムにて補正された解析データにより、コピー数の異常を起こしている部位を視覚的に確認するために、統計ソフトR version2.15.0 (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>)、解析ソフトIGB7.0.4(Integrated Genome Browser, Genoviz project, <http://bioviz.org/igb/download.html>)を用いて、データのグラフ化を行った。

## G. ゲノム定量的 real time PCR

V-F (57頁参照) で述べるが、本研究のSNPアレイ解析にて、14番染色体の特定の部位のduplicationが疑われた症例が、複数存在した。実際の、ゲノムのコピー数を確認するために、そのduplicationが疑われる部位にある、2つの遺伝子、

*CHD8* (*chromodomain helicase DNA binding protein 8*) と *HNRNPC* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*) のゲノムコピー数を、TaqMan<sup>®</sup>プローブによるreal time PCR法を用いて測定した。

使用したTaqMan<sup>®</sup>プローブは、TaqMan<sup>®</sup>Copy Number Assays (Applied Biosystems)の、それぞれの遺伝子に対応するキットを使用した。キット番号は、下記の通りである。

CHD8 : Hs00525857\_cn

HNRNPC : Hs01945190\_cn

Real time PCRでは、TaqMan<sup>®</sup>Genotyping Master Mix(Applied Biosystems)を用いた。Thermal cycling はStep One Plus<sup>™</sup>(Applied Biosystems)を用いた。PCRのプログラムの詳細は下記の通りである。

熱変性 : 95°C10秒、アニーリング+伸長 : 60°C60秒

このサイクルを計40回施行した。

上記により得られたデータから、CopyCaller<sup>®</sup>Software v2.0(Applied Biosystems)を用いて、ゲノムコピー数を測定した。

## H. 統計解析

VHL病症例のHBと、孤発性症例のHBの違いを調査するため、HB検体を、VHL

病群と孤発性群の2群に分けた。この2群間の違いを統計学的に解析するために、Student's t-test、Pearson's chi-square testを適宜、行った。統計学的計算では、JMP 9 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。また、 $p$ 値が0.05より小さい場合を、有意差ありとした。

## V. 結果

### A. 対象の内訳

本研究における対象の内訳は、表3の通りであった。IV-A（20頁参照）で述べた通り、VHL病群が7症例11検体、散发性群が21症例21検体であった。各検体にはIDを付したが、VHL病群では頭文字にVを、散发性群にはSをつけて、その後に番号をつけている。（表4参照）VHL病群では、同一患者、同一家系のものが含まれているため、VHL病群では、Vの後の数字が同じなら、同一患者の検体であることを意味し、さらに、その後にーと数字をつけて、各検体を区別した。本研究では、V1とV6、V2とV3が同一家系の同胞であったため、VHL病群は、今回は全部で、5家系7症例11検体となる。同一患者の各検体は、摘出術の日程も異なり、画像上も違う部位であることを確認した。実際、表4の通り、これらは、お互い異なるゲノム解析結果が出ており、独立した腫瘍であることを示していると思われる。VHL病群と散发性群の臨床的特徴の違いであるが、表3にもあるように、まず性別では、男性がVHL病群では7症例中5例、散发性群では21症例中9例であり、有意差は認めず、II-A-1（2-3頁参照）で述べた過去の報告とも矛盾しない結果であった。（ $p=0.0949$ 、Pearson's chi-square test）<sup>9</sup> また、各群の平均年齢（±標準偏差）では、VHL病群が $30.1\pm 10.6$ 、散发性群が $47.5\pm 15.6$ であり、VHL病群で有意に低い結果となった。（ $p=0.0004$ 、Student's t-test）

これは、遺伝性腫瘍疾患の特徴が、若年発症であることと合致している。次に、腫瘍の発生部位に関しては、小脳・延髄・脊髄が、VHL病群では、それぞれ9検体・2検体・0検体、散発性群では、それぞれ16検体・3検体・2検体であった。腫瘍部位が、小脳であった検体が、VHL病群で76%、散発性群で81%を占めた。小脳とそれ以外の部位にある腫瘍の割合が、VHL病群と散発性群で異なるかを、Pearson's chi-square testで検定し、 $p=0.7145$ となり、VHL病群と散発性群では、腫瘍部位の割合が明らかに異なるとは言えなかった。

	VHL 病群	散発性群	<i>p</i> 値
症例数/検体数	7/11	21/21	
男性/女性	5/2	9/12	0.0949
平均年齢± 標準偏差 (年)	30.1±10.6	47.5±15.6	0.0004*
腫瘍部位 小脳/延髄/脊髄	9/2/0	16/3/2	0.7145

表3. 対象検体の臨床的特徴

\* $p<0.05$  有意差あり

VHL病群が7症例11検体、散発性群が21症例21検体あった。性別の項は、Pearson's chi-square testで検定した。平均年齢は、Student's t-testで検定した。腫瘍部位は、小脳とそれ以外の部位の腫瘍の割合を、Pearson's chi-square testで検定した。平均年齢では、VHL病群が有意に若年であったが、それ以外に、2群間に異なる臨床的特徴は認めなかった。



VHL病 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	VHL 変異	VHL MLPA	SNPアレイ Chr3 LOH	VHL MSP	VHL BSP
V1-1*	22	男	小脳	c.216delC	-	Chr3 LOH	-	-
V1-2*	24	男	小脳	c.216delC	-	-	-	-
V2-1*	29	女	小脳	-	ex3 LOH	Chr3 LOH	-	-
V3-1	23	男	延髄	-	ex3 LOH	Chr3p CNLOH	-	-
V3-2	23	男	小脳	-	ex3 LOH	Chr3 CNLOH	-	-
V3-3	27	男	小脳	-	ex3 LOH	Chr3p LOH	-	-
V4-1*	35	男	小脳	c.329A>C	-	-	-	-
V4-2*	47	男	小脳	c.329A>C	-	-	-	-
V5-1*	52	男	小脳	IVS2-1G>T	-	-	-	-
V6-1*	30	男	延髄	c.216delC	-	Chr3p CNLOH	-	-
V7-1*	19	女	小脳	c.194C>T	-	Chr3 LOH	-	-
散发性 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	VHL 変異	VHL MLPA	SNParray Chr3 LOH	VHL MSP	VHL BSP
S1	50	男	小脳	-	-	-	-	-
S2	40	女	脊髄	-	-	Chr3 LOH	-	-
S3	68	女	小脳	-	-	-	-	-
S4	26	女	小脳	-	-	Chr3 LOH	-	-
S5	57	男	小脳	-	-	-	-	M
S6	20	男	延髄	-	-	Chr3 CNLOH	-	M
S7	65	男	小脳	c402delA	-	-	-	-
S8	60	女	小脳	-	-	-	-	-
S9	52	男	小脳	c.444delT	-	-	M	M
S10	57	女	小脳	-	判定困難	Chr3 LOH	-	-
S11	50	女	小脳	-	-	Chr3 LOH	-	-
S12	42	男	延髄	-	-	Chr3 LOH	-	-
S13	57	女	小脳	c.371-372CA del	-	-	-	M
S14	73	女	小脳	c.551T>C	判定困難	Chr3 LOH	-	-
S15	45	女	小脳	-	判定困難	Chr3 LOH	-	M
S16	37	男	小脳	-	-	Chr3 LOH	-	-
S17	35	女	脊髄	-	-	Chr3p CNLOH	M	M
S18*	32	男	小脳	-	判定困難	Chr3p LOH	-	-
S19	38	女	延髄	-	判定困難	Chr3 LOH	-	-
S20*	23	男	小脳	-	-	-	-	M
S21*	70	女	小脳	-	-	-	-	-

表4. 各検体の臨床的特徴とVHL遺伝子異常の解析結果

全検体の臨床的特徴と、本研究で施行したVHL遺伝子異常の解析結果を示した。

\*：遺伝子診断を施行した症例である。

各列の見方は以下の通りである。

VHL変異：変異がない症例は－、変異があった症例は変異部位を記した

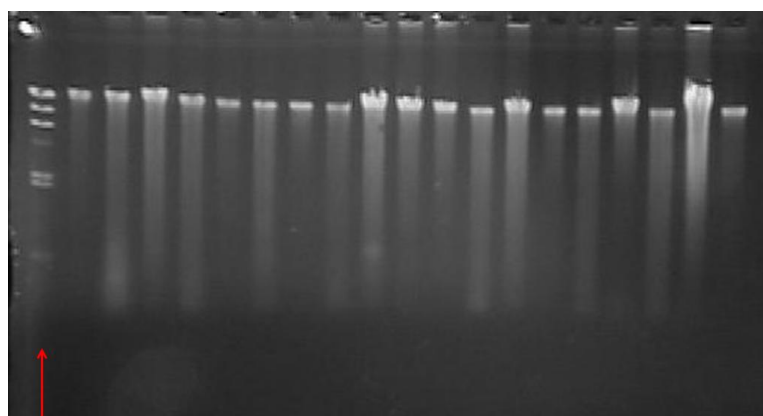
VHL MLPA：MLPA法にて異常がない症例は－、異常があった症例は、異常の種類を記した。判定困難の症例は、『判定困難』とした

SNPアレイ Chr3 LOH：ChrはChromosome（染色体）の略である。3番染色体のLOHがない場合は－、ある場合は、その種類を記した。Chr3p CNLOHとは、この場合、3番短腕のcopy number neutral LOHを表している。

VHL MSP, BSP：BSPはバイサルファイトシークエンシング法の事を指す。メチル化がない場合は－、ある場合はMとした。

## B. ゲノムDNA調製

本研究では、全対象検体において、腫瘍検体とペアとなる正常血液を取得することができ、DNA調製を行った。調整後、アガロースゲルによる電気泳動を行い、DNAがスメア状になってない事を確認した。(図12参照) さらに、何も検体をいれなくて、DNA調製の操作を行ったnegative controlを置き、これも電気泳動を行う事で、外来からのDNAの混入がない事を確認した。さらに、分光光度計による測定も行い、全例、DNA濃度が15~120ng/ $\mu$ Lの間で、かつA260/A280 1.8~2.0である事を確認し、今後のゲノム解析の使用に耐えるDNA検体が調製できたと判断した。



サイズマーカー

図12. DNA調製後のagarose gel電気泳動による確認の1例

電気泳動にて、調整後のDNAがスメア状になっていないことを確認した。

## C. ダイレクトシーケンシング法

ダイレクトシーケンシング法に関しては、全検体、腫瘍検体ゲノムDNAに対して、施行することができた。解析結果は、表4(42頁)の通りである。IV-A (20頁参照) で述べたように、表4で\*がついている症例に対しては、遺伝カウンセリング施行後に、遺伝子診断目的で、正常DNA血液を用いて、ダイレクトシーケンシング法を行っている。

VHL病群では、11検体中、7検体にVHL遺伝子の変異を認めた。内訳は、ミスセンス変異が2種類あり、3検体 (2家系2症例) に認められ、1塩基欠失によるフレームシフト変異が1種類あり、3検体 (1家系2症例) に認められ、1塩基置換によるスプライシング部位変異を1検体で認めた。ここで、1塩基置換によるスプライシング部位変異を認めたのは、検体番号V5-1の検体であり、IVS

(intervening sequence) 2-1G>Tという変異であった。これは、VHL遺伝子のexon 2と3にはさまれたintron 2という部分と、exon 3の境界であるスプライシング部位にある、G (グアニン) がT (チミン) に変化したという変異であり、これにより、exon 3以降が欠損したmRNAが発現してしまう事になる。同一患者、同一家系内では、同じ変異を有していることが確認された。11検体中、8検体で遺伝子診断 (生殖細胞系列の解析) を行い、検体番号V2-1の検体以外の7検体は、腫瘍検体と同じ、VHL遺伝子変異を有している事を確認した。つまり、遺伝子診断をした症例では、腫瘍検体において同定されたVHL遺伝子変異は、全例、生殖

細胞系列の異常であった事がわかった。(表5参照) 検体番号V2-1は、腫瘍検体同様、ダイレクトシーケンシング法では、VHL遺伝子変異は同定できなかった。

次に、散发性群では21検体中、4検体のみに変異を認めた。変異の内訳は、ミスセンス変異が1検体、1塩基欠失によるフレームシフト変異が2検体、2塩基欠失によるフレームシフト変異が1検体であった。散发性群で、遺伝子診断を施行したのは、3例のみであり、いずれも、VHL遺伝子の変異は認めなかった。(表5参照)

また、VHL病群にもかかわらず、ダイレクトシーケンシング法にて、VHL遺伝子の変異を認めなかった症例が4検体存在した。これに対しては、ダイレクトシーケンシング法では同定できない変異があった可能性もあり、次項のMLPAのデータと統合する必要があると考えられた。本研究にて、変異を示したシーケンス結果を全例、図13に示した。

VHL病 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	生殖細胞系列(血液)		腫瘍検体解析結果	
				VHL 変異	VHL MLPA	VHL 変異	VHL MLPA
V1-1	22	男	小脳	c.216delC	-	c.216delC	-
-2	24	男	小脳	c.216delC	-	c.216delC	-
V2-1	29	女	小脳	-	ex3 LOH	-	ex3 LOH
V4-1	35	男	小脳	c.329A>C	-	c.329A>C	-
-2	47	男	小脳	c.329A>C	-	c.329A>C	-
V5-1	52	男	小脳	IVS2-1G>T	-	IVS2-1G>T	-
V6-1	30	男	延髄	c.216delC	-	c.216delC	-
V7-1	19	女	小脳	c.194C>T	-	c.194C>T	-
散発性 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	VHL 変異	VHL MLPA	VHL 変異	VHL MLPA
S18	32	男	小脳	-	-	-	判定困難
S20	23	男	小脳	-	-	-	-
S21	70	女	小脳	-	-	-	-

表5. VHL遺伝子の遺伝子診断（生殖細胞系列の解析）結果

本研究では、VHL病群7症例、散発性群3症例に対して、遺伝子診断（生殖細胞系列の解析）を行った。右の列には、腫瘍検体の解析結果を追加した。今回、VHL病群で同定されたVHL変異は、生殖細胞系列の異常であったことがわかる。

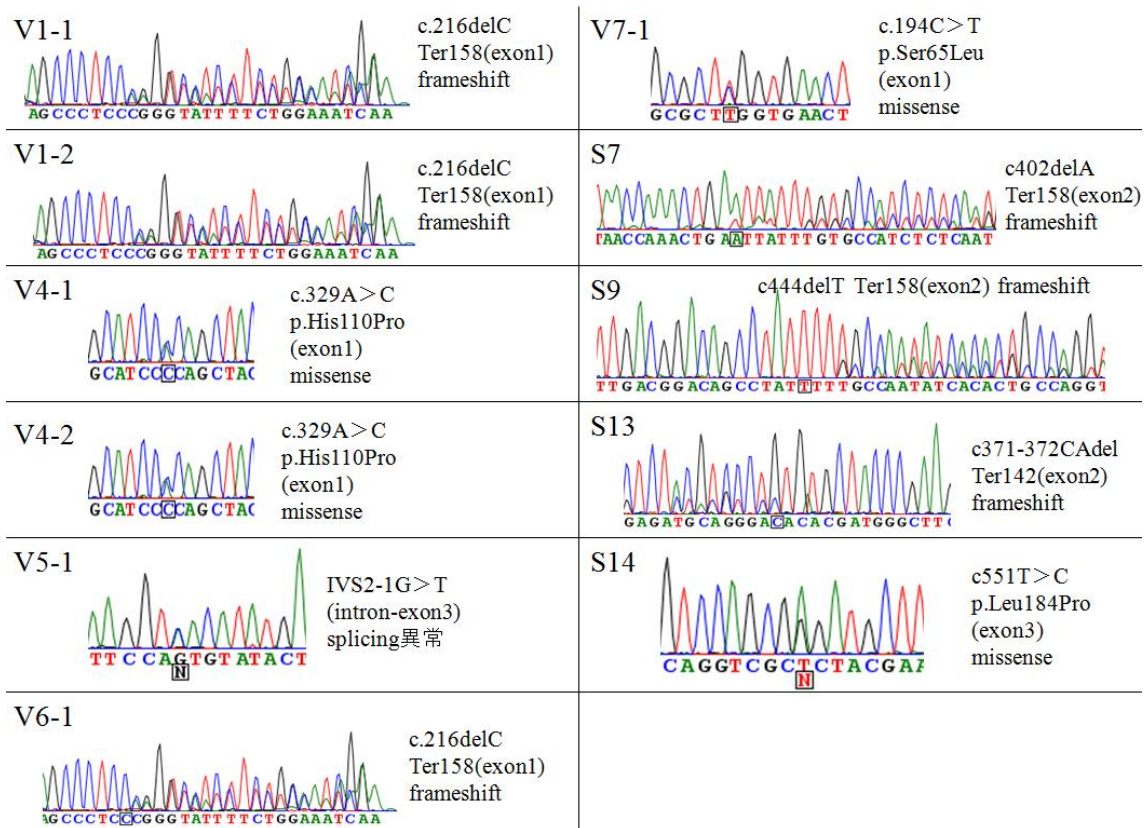


図13. ダイレクトシーケンシング法で変異を認めた症例のシーケンス結果

本研究では、全11検体にVHL遺伝子の変異を認めた。シーケンス結果で特徴的なのは、どの検体も、変異部位では、peakが2つ重なっているということである。例えば、検体番号V7-1では、c194C>Tという変異を認めたが、変異部位ではTのpeakだけでなく、本来正常であるCのpeakも認めている。

次に、同定したVHL遺伝子変異が、病的なものであるかどうかを、IV-C(23頁参照)にて述べた方法により、調査した。

①まず、Human Genetic Variation Databaseにて、同定された遺伝子変異、特にミスセンス変異が、いずれもSNPでないことを確認した。

②次に、Mutation Viewにて、同定された遺伝子変異の内、検体番号V5-1の

IVS2-1G>T、V7-1のc.194C>Tという変異が、過去に報告されたVHL病症例の遺

伝子変異であることが判明した。

③最後に、遺伝子変異の部位と、予想されるVHL蛋白機能異常を調査した。(図14参照) 欠失を認める変異では、II-C-3(13-15頁参照)で述べたように、VHL蛋白の機能として重要なHIFやElongin Cの結合部位などが欠損した蛋白が合成されることになり、VHL蛋白の機能異常を起こすことが考えられた。また、ミスセンス変異に関しては、検体番号V4-1,2のc329A>C(p.His110Pro)は、HIFの結合部位が障害されるために、VHL蛋白の機能異常を起こすことが考えられた。

以上より、本研究で同定されたVHL遺伝子変異は、S14のc551T>C(p.Leu184Pro)変異以外は、全部、病的な変異であると推察された。

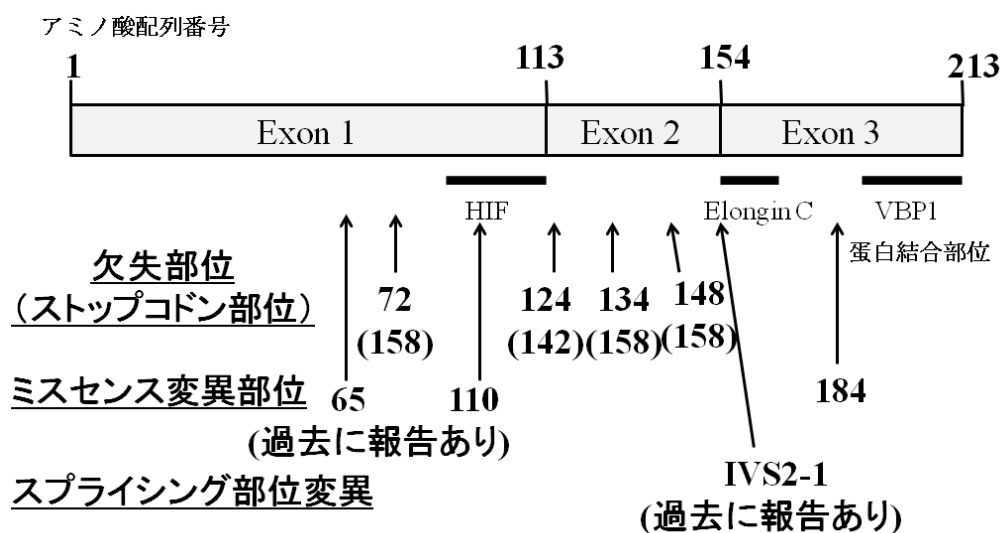


図14. VHL遺伝子変異の部位とVHL蛋白

VHL遺伝子は3つのexonで構成され、VHL蛋白のアミノ酸数は213である。中段では、VHL蛋白における、HIFやElonginCなどの蛋白の結合部位を示している。下段では、今回、同定されたVHL遺伝子の変異部位を示している。

#### D. MLPA法

MLPA法に関しては、全検体、腫瘍検体ゲノムDNAに対して、施行することができた。一部の検体では、ダイレクトシーケンシング法と同様に、遺伝子診断目的で、正常血液DNAのMLPA法を行っている。解析結果は、表4(42頁)、表5(46頁)の通りである。MLPA法の、検体ごとの解析データを、Excel2007を用いてグラフ化した。正常例の解析結果を図15Aに示す。縦軸は、各標的部位のコピー数を表しており、横軸は、各標的部位の名称を示している。左半分にある、最初にRefとついている標的部位は、reference部位を示している。つまり、コピー数が正常と思われる部位を標的としており、これらの部位のコピー数が2とな



っていることが、MLPA法の個々の実験の信頼性の1つの指標となる。右半分にある標的部位では、最初にVHLと記されている部位は、VHL遺伝子の部位を標的としている。(exon 1に4箇所、exon 2に3箇所、exon 3に2箇所、計9箇所ある) 名称にVHLと記されていない部位に関しては、例えば、FACD2、IRAK2などは、3番染色体上にあり、かつVHL遺伝子の周囲にある遺伝子の名称を指している。

次に、実際の腫瘍検体の解析結果を示す。図15Aでは、すべての標的部位のコピー数が2となっている。これは、VHL遺伝子とその周囲の部位のコピー数が、正常の2となっていることを示しており、正常であると判定した。

次に、図15Bでは、VHL遺伝子exon 3の、2つの部位で、正常コピー数である2から0.5程度への、コピー数の減少を認めた。この検体の患者と同胞の関係である患者の解析結果を、図15Cに示した。ここでも、同一部位のコピー数の減少を認めた。この2検体では、いずれも、VHL遺伝子のダイレクトシーケンシング法では明らかな異常を認めておらず、なおかつ、この2検体は、いずれもVHL病群であった。この事を考慮すると、この2検体では、VHL遺伝子exon 3の欠失が起きている事が予想出来る。図15D (検体番号S13) では、VHL遺伝子全体とその周囲の部位のコピー数が、2.0から1.5と、軽度の減少を認めており、VHL遺伝子を含んだ3番染色体のLOHが疑われたが、このデータだけでは、IV-D-2(27頁参照)で述べた、判定基準上の欠失と判定するのは困難であった。このような判定

が困難な症例は、今回は、MLPAにおける『判定困難』症例とし、表4にも記している。このグラフの検体（検体番号S13）は、後述するSNPアレイ解析で、3番染色体のLOHを認めている。従って、MLPAによるLOHの検出力はSNPアレイ法と比較して劣る事が予想された。

本研究において、VHL病群では、11検体中4検体で、VHL遺伝子exon 3の欠失を認めたが、それ以外の異常は、全く認めなかった。今回、VHL遺伝子exon 3の欠失を認めた4検体（3家系3症例）は、前項のダイレクトシーケンシング法においてVHL遺伝子異常を認めなかった4検体である。従って、ダイレクトシーケンシング法とMLPA法により、VHL病群では全検体、VHL遺伝子異常が同定できたことになる。遺伝子診断を施行した7検体では、検体番号V2-1検体でのみ、VHL遺伝子exon 3の欠失を認めたが、それ以外の6例は、いずれも正常であった。

（表5参照）

次に、散发性群では、21検体中、5検体にVHL遺伝子周囲を含んだ部分の欠失が疑われたが、今回のMLPA法の結果では、『判定困難』とした。散发性群において、MLPA法による遺伝子診断を施行した3検体は、いずれも正常であった。（表5参照）

また、後述するSNPアレイ解析のデータと見比べると、SNPアレイ解析では3番染色体のLOHを認めた検体でも、MLPA法では、VHL遺伝子を含んだ3番染色

体上の認識部位において、コピー数異常を全く認めない検体が、VHL病群で2検体、散発性群で5検体存在した。つまり、この結果からも、前述したように、MLPAの方が、SNPアレイ解析よりも、LOHの解析に関しては、検出力が劣っていると予想された。この件に関しては、VI-C『本研究の限界』の項（83頁参照）で、再度、述べていく。（表4の『VHL MLPA』と『SNPアレイ Chr3.LOH』の列を比較）

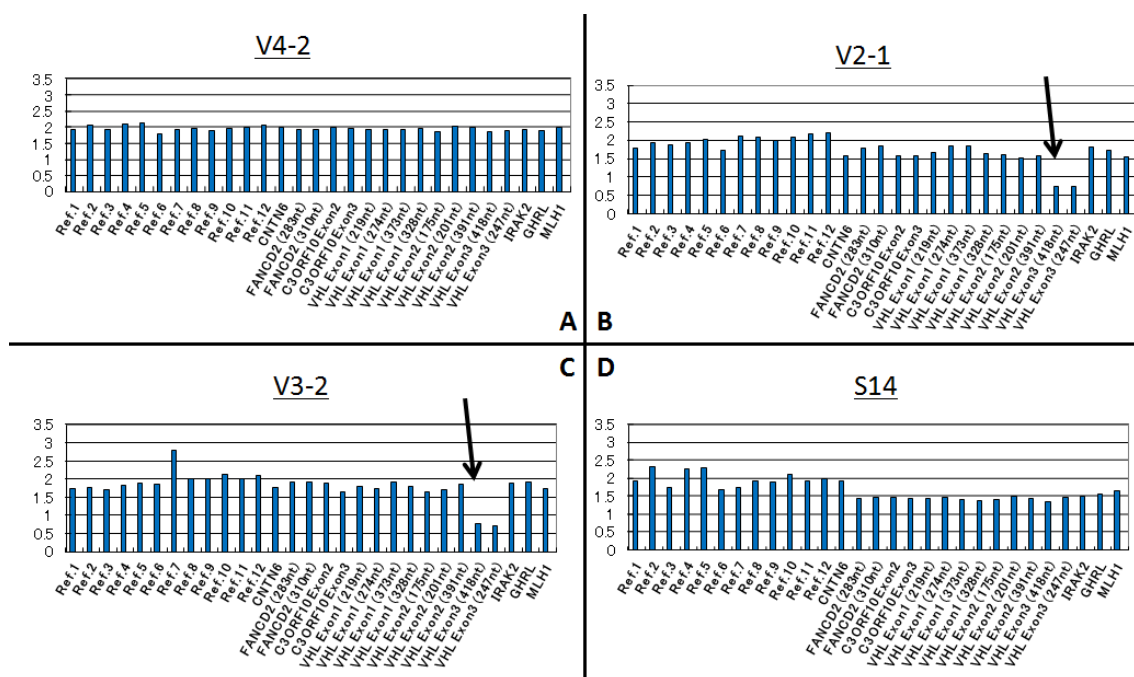


図15. MLPAの代表例の結果

AのV4-2は、正常例のグラフとして提示した。BのV2-1は、VHL遺伝子exon 3の2つのプローブで、コピー数の低下を認め、この部位の欠失が考えられた。Cは、V2-1と同胞の関係にあるV3-1のグラフであり、やはり、同様の部位の欠失が疑われた。DのS14のグラフでは、VHL遺伝子とその周囲の部分のコピー数の低下を認め、3番染色体の欠失が疑われたが、判定困難であった。このような症例を、本研究では、『判定困難』例とした。

## E. メチル化解析

## 1. MSP法

MSP法による解析結果を表4(42頁参照)に示す。電気泳動の結果の代表例を図16に示す。各症例の左側が、メチル化配列認識プライマー（以下、メチル化プライマーと略）によるPCRの結果を、右側は、非メチル化配列認識プライマー（以下、非メチル化プライマーと略）によるPCRの結果を示している。一番右端にある2検体は、全部メチル化されたDNA(positive control)と全部非メチル化されたDNA(negative control)である。メチル化positive control検体にて、メチル化プライマーのみにバンドを認め、negative control 検体で、非メチル化プライマーのみにバンドを認めることで、実験系の信頼性を確認している。例えば、図15における検体番号V1-1,S1,2,では、非メチル化プライマーにのみバンドを認めたために、この検体ではVHL遺伝子プロモーター領域のメチル化はないと判定した。検体番号S9では、非メチル化プライマーでバンドを認めたが、メチル化プライマーでもバンドを認めたために、これらは、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化はあると判定した。非メチル化プライマーでもバンドが認められるのは、腫瘍検体の中に、VHL遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていないと考えられる、正常血管内皮や白血球などの混入があるからと思われる。本研究では、MSP法においては、全32検体中、2検体でのみ、メチル化ありと判定した。いずれも散発性群であった。

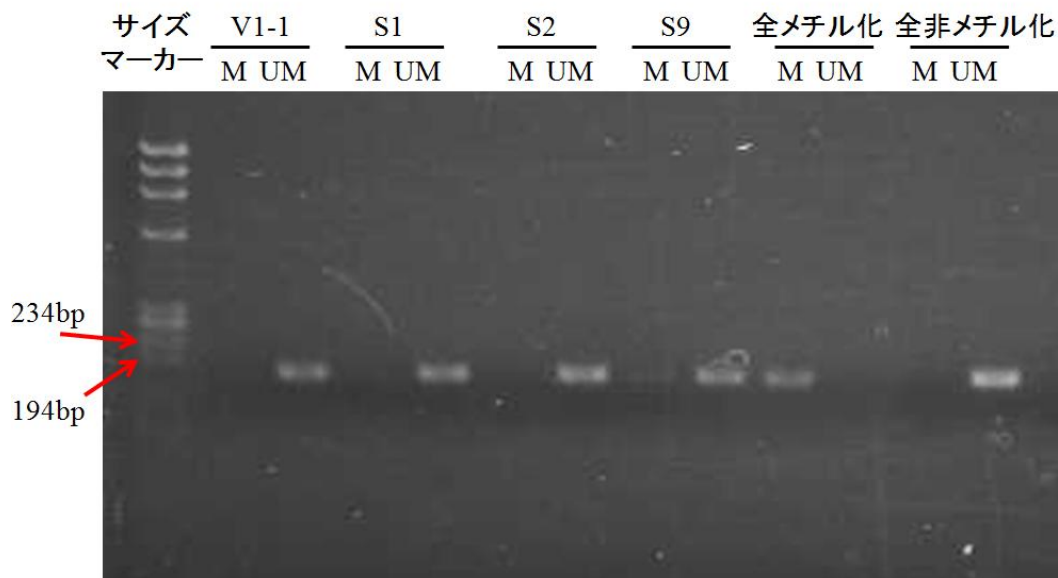


図16. MSP法での電気泳動の結果

各検体の左側が、メチル化配列認識プライマー（Mと略）によるPCRの結果を、右側は、非メチル化配列認識プライマー（UMと略）によるPCRの結果を表示している。一番右端にある2検体は、全部メチル化されたDNA(全メチル化)を用いたPCRの結果と全部非メチル化されたDNA(全非メチル化)を用いたPCRの結果である。S9では、左側の列にも薄いバンドを認め、メチル化はあると判定した。それ以外の検体は、メチル化はないと判定した。

## 2. バイサルファイトシーケンス法

バイサルファイトシーケンス法の解析結果を表4(42頁参照)に示す。シーケンス結果の代表例を図17に示す。上段は、メチル化を起こすと予想されるCpGサイトのC（シトシン）が、3箇所ともにT（チミン）に変換され、この症例は、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化は無しと判定できる。下段は、それに対して、CpGサイトのCは、3箇所ともにCのままであり、これはメチル化

のために、バイサルファイト変換されなかったことを意味するので、この症例は、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化は有りだと判定できる。

本研究の解析で見つかった、メチル化有りの症例を図18に掲載した。さらに、positive control、negative controlとして使用した、100%メチル化されたDNA検体の解析例、50%メチル化された検体(100%メチル化されたDNAと100%非メチル化されたDNAを1:1に混合したもの)、25%(100%メチル化されたDNAと100%非メチル化されたDNAを1:3に混合したもの)、0%（全部非メチル化されたDNA検体）の解析例も、図18に掲載した。ここでは、100%メチル化された検体では、CpGサイトは全箇所Cのままであり、100%非メチル化された検体では、CpGサイトは全箇所Tのままであり、この解析方法の感度・特異度はかなり高い事が予想される。さらに、25%メチル化された検体でも、CpGサイトにはCのpeakを認めており、少なくとも25%以上メチル化された症例ならば、メチル化の有無を判定することができる事が予測された。本研究では、バイサルファイトシーケンシング法にて、32検体中7検体に、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化有りの症例を認めた。この7検体の中には、MSP法でメチル化有りと判定した2例も含まれており、かつ全7検体とも、散发性群であった。

次に、症例の一部で、各CpGサイトにおけるメチル化の結果を、QUMAにて図表化したものを、図19に示した。ここでは、各CpGサイトのシーケンス結果

において、例えば、図18のS17検体のCpGサイトのように、Cの部分に、Tのpeakだけでなく、Cのpeakも同定できたら、そのサイトはメチル化有りと判定した。IV-E-3（32-33頁参照）で述べたように、本研究では、標的部位内の全11箇所のCpGサイトの内、4つ以上のCpGサイトで、メチル化有りならば、その検体は、プロモーター領域のメチル化が有ると判定した。図19をみると、メチル化が無いと判定したものは、全CpGサイトにおいて、メチル化を認めていない傾向があった。

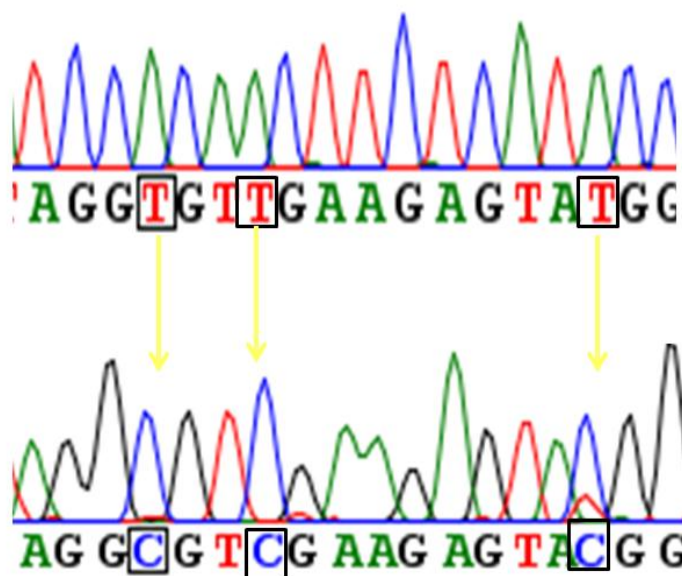


図17. バイサルファイトシーケンシング法の解析例

上段は、CpGサイトのCが、3箇所ともにTに変換され、この症例は、メチル化は無しと判定。下段は、CpGサイトのCは、3箇所ともにCのままであり、メチル化は有りと判定した。

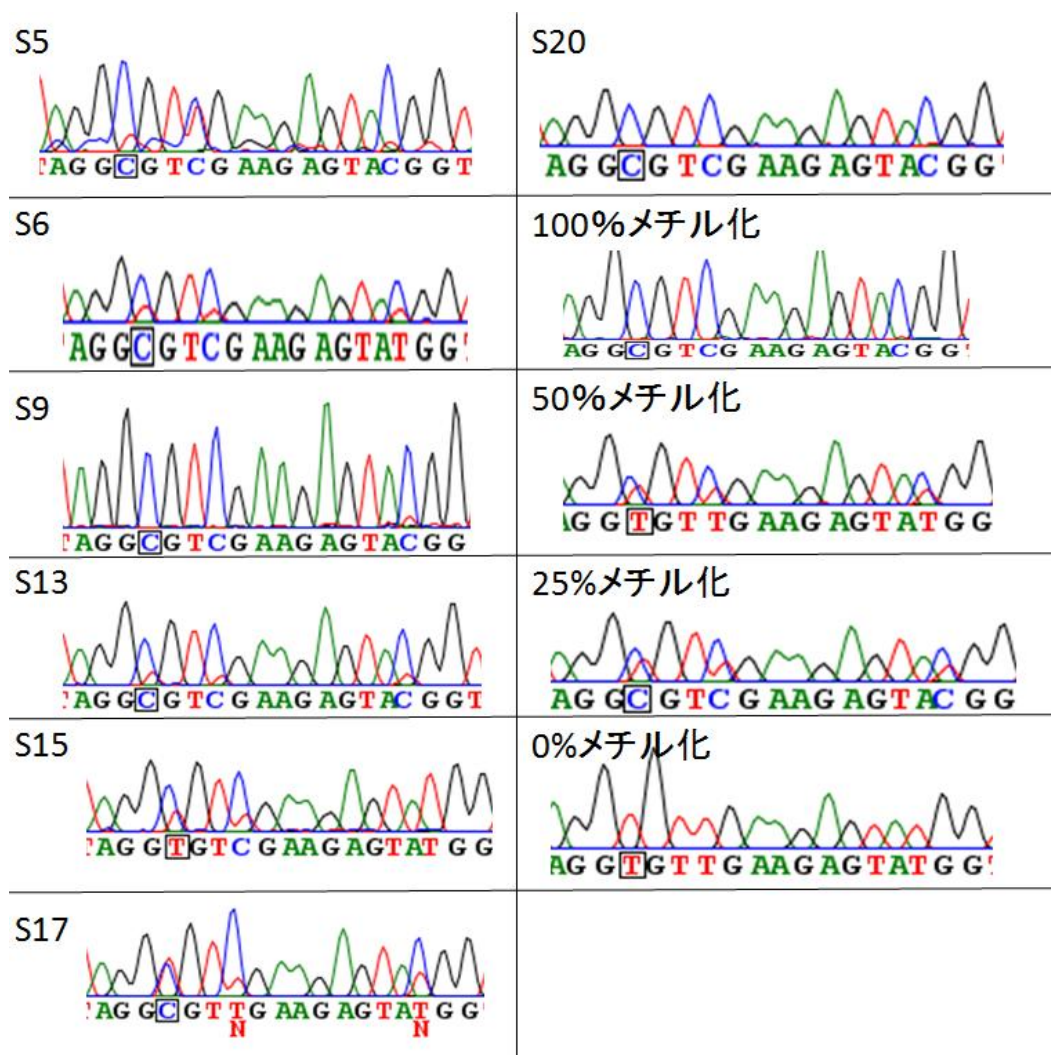


図18. バイサルファイトシーケンシング法でのメチル化検体とpositive control, negative control

本研究の解析で見つかった、メチル化有りの検体を全検体示した。さらに、positive control、negative controlとして使用した、100%メチル化されたDNA検体の解析例、50%メチル化された検体(100%メチル化されたDNAと100%非メチル化されたDNAを1:1に混合したもの)、25%(100%メチル化されたDNAと100%非メチル化されたDNAを1:3に混合したもの)、0% (全部非メチル化されたDNA検体) の解析例も右側の列に示した。



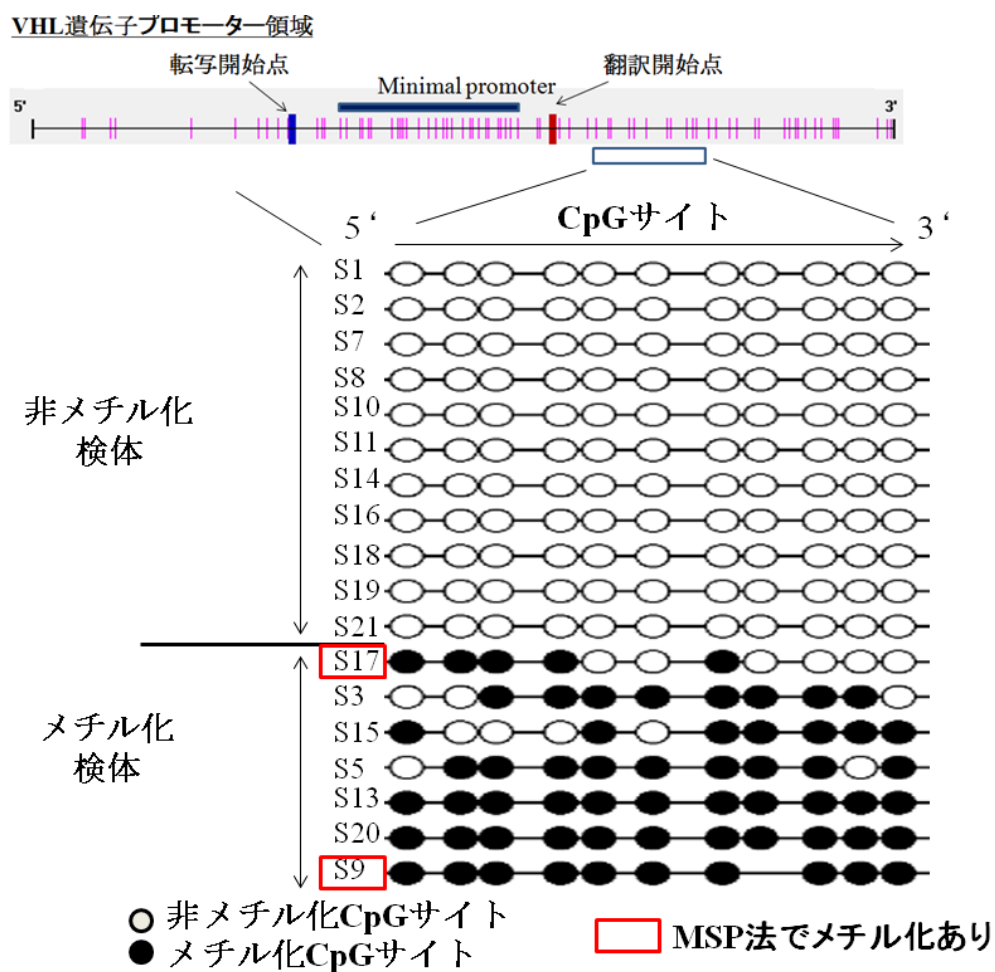


図19. 標的部位の各CpGサイトでのメチル化の結果 (QUMAにて作成)

本研究では、標的部位内の全11箇所のCpGサイトの内、4つ以上のCpGサイトで、メチル化有りならば、その検体は、プロモーター領域のメチル化があると判定した。32検体中7検体に、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化有りを認め、全検体とも、散发性群であった。

### 3. メチル化解析のまとめ

以上より、本研究において、HBの腫瘍検体におけるVHL遺伝子プロモーター領域のメチル化を解析したところ、MSP法では32検体中2検体、バイサルファイトシーケンシング法では32検体中7検体に、メチル化があると判断した。MSP

法でメチル化があった検体2検体は、いずれも、バイサルファイトシーケンス法でもメチル化を認めた。また、メチル化の有る検体は、全検体散发性群であり、VHL病群では1検体も認めなかった。前述したGlaskerの論文では、42検体のHB検体に対して、MSP法を用いたが、1例もメチル化有りの症例はなかったと報告され、HBでは、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化はほとんど無いと思われていた。<sup>48</sup> 今回、バイサルファイトシーケンシング法を行う事で、HBにおいても、21%(7/32)の検体で、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化が存在することが判明した。

しかし、バイサルファイトシーケンス法でメチル化を認めているが、MSP法ではメチル化を認めていない症例が5検体存在していた。IV-E-4(33-34頁参照)で前述したように、MSP法とバイサルファイトシーケンス法では、標的部位は異なっており、MSP法のは、minimal promotorを標的としているが、バイサルファイトシーケンス法のは、それよりもずれた部位を標的としている。従って、バイサルファイトシーケンス法でのみメチル化を認めた症例で、本当にVHL遺伝子の発現が抑制されているのかどうかは、不明瞭であり、本来なら、それを確認する必要がある。しかし、本研究では、その確認実験を行っていない為、VHLの2hitによる不活化が起きているかどうかを考慮する際には、メチル化解析の結果の扱い方を考慮する必要がある。この件に関しては、再度、VI-C

『本研究の限界』(84頁参照)の項で、述べていく。

## F. SNPアレイ解析

本研究では、全症例において、腫瘍検体と正常血液をペアで、SNPアレイ解析を施行し、それらを比較することで、各腫瘍検体特異的なコピー数異常を同定した。解析結果は表6に示す。この表では、3番染色体のLOHの有無と種類をみた列(表6における『Chr3 LOH』の列、ChrはChromosome、染色体の略である)と、3番以外で特に多く認めた6,10番染色体LOHの有無を示した列、そして、その他の染色体コピー数異常の有無と部位を書いた列に分けて、結果を示した。

解析結果の代表例を図20に示した。このグラフは、統計ソフトRで作成した。縦軸は、腫瘍検体/正常血液のシグナル比を、底数2の対数表示しており、腫瘍検体特有のコピー数を表していると言える。通常は、シグナル比は1であり、対数で表しているから0となる。横軸は、SNPの部位を表しており、最大で約100万箇所あるSNP部位のデータを、左端に1番染色体、右端に22番染色体となるように順番に並べている。青と赤は、それぞれのアレルを意味する。本来なら、青のアレルと赤のアレルは、正常なら、0のところで、大部分重なるはずである。しかし、SNPアレイの解析データを、GIMにて補正する際に、青のアレルと赤のアレルのベースラインが異なるように補正されてしまうという問題のために、青

と赤のアレルは、若干離れている。決して、青のアレルと赤のアレルのコピー数が、若干異なる事を表している訳ではない。<sup>54</sup> 例1では、3番染色体のほぼ全域におけるSNPサイトで、青のアレルのシグナル比の低下を認めており、これは、3番染色体のLOHを表している。また、例2では、6番染色体、10番染色体全域におけるSNPサイトで、青のアレルのシグナル比の低下を認めており、6番染色体、10番染色体のLOHを表している事になる。

例3では、3番染色体において、青のアレルのシグナル比の低下だけでなく、赤のアレルのシグナル比の上昇を認めている。これは、3番染色体のcopy number neutral LOHを示している。つまり、青のアレルが欠失し、残りの赤のアレルが2本に増幅した状態と思われ、ヘテロ接合性 (heterozygosity) は確かに喪失している状態であるが、トータルのコピー数は、正常と同じ2となっているので、copy number neutral LOHと言われている。もし、図21にあるように、2本のアレルの内、片側のアレルに変異遺伝子があり、copy number neutral LOHにおいて、その変異のあるアレルの方が増幅した場合、変異遺伝子が2つになったことになるので、2hitによる不活化の原因となりえると思われる。HBの腫瘍検体に対して、我々が渉猟した限りでは、SNPアレイ解析をした報告はなく、今回、SNPアレイ解析をした事で、初めて、HBの腫瘍検体においても、3番染色体のcopy number neutral LOHが起きている事が判明したと言える。

また、例3のグラフの右側に、spike状になっている部分を認めている。これをIRBのソフトを使用して、spike部位を探索し、拡大してみせているのが、右下のグラフである。赤のアレルが、先ほどの3番染色体の部分と同じぐらいの高さまで増加しており、赤のアレルのコピー数が1本から2本に増加している事を示していると思われる。14q11.2のduplicationが疑われる所見である。このような、14q11.2のduplicationが疑われる所見は、VHL病群で5検体、散发性群で2検体認めた。(図22参照) この7検体の、duplicationが疑われる部位は、図23の左側のように、IRBで拡大してみると、ほぼ同様の部位が増幅していることがわかった。さらに、図23の右側のように、拡大してみると、他の増幅や欠失と異なり、境界が不明瞭であった。7検体それぞれにおいて、増幅していると思われる領域を特定し、7検体のなかで、最も重複している領域を同定した。この重複領域に、VHL以外の好発する遺伝子異常の候補が存在する可能性があると考え、後述(67-69頁参照)の、ゲノムのコピー数解析を行った。

本研究では、3番染色体のLOH (VHL遺伝子がある3番染色体短腕(3p)のLOHや、copy number neutral LOHを含む)を、VHL病群では11検体中7検体、散发性群では、21検体中12検体認め、2群ともに、50%以上の検体で認めたことになる。さらに、3番染色体以外の染色体コピー数異常に関しては、VHL病群に関しては、先程述べた、14q11.2のduplicationが疑われる所見以外は、全く認めていないのに

対して、散発性群では、様々な染色体欠失、増幅を認め、特に6番、10番染色体

(10qを含む)のLOHを多く認めた。(表6参照)

VHL病 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	Chr3 LOH	Chr6 LOH	Chr10 LOH	その他
V1-1*	22	男	小脳	Chr3 LOH	-	-	-
V1-2*	24	男	小脳	-	-	-	-
V2-1*	29	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	-
V3-1	23	男	延髄	Chr3p CNLOH	-	-	-
V3-2	23	男	小脳	Chr3 CNLOH	-	-	-
V3-3	27	男	小脳	Chr3p LOH	-	-	-
V4-1*	35	男	小脳	-	-	-	-
V4-2*	47	男	小脳	-	-	-	-
V5-1*	52	男	小脳	-	-	-	-
V6-1*	30	男	延髄	Chr3p CNLOH	-	-	-
V7-1*	19	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	-
散発性 (ID)	年齢	性別	腫瘍部位	Chr3 LOH	Chr6 LOH	Chr10 LOH	その他
S1	50	男	小脳	-	Chr6 LOH	-	-
S2	40	女	脊髄	Chr3 LOH	-	-	-
S3	68	女	小脳	-	Chr6 LOH	Chr10 LOH	4+
S4	26	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	5-18-
S5	57	男	小脳	-	Chr6 LOH	Chr10 LOH	-
S6	20	男	延髄	Chr3 CNLOH	-	-	-
S7	65	男	小脳	-	Chr6 LOH	Chr10 LOH	9-
S8	60	女	小脳	-	-	-	6+
S9	52	男	小脳	-	Chr6 LOH	-	-
S10	57	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	-
S11	50	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	13-18-
S12	42	男	延髄	Chr3 LOH	-	-	-
S13	57	女	小脳	-	-	-	-
S14	73	女	小脳	Chr3 LOH	Chr6 LOH	-	1p-5+
S15	45	女	小脳	Chr3 LOH	-	-	-
S16	37	男	小脳	Chr3 LOH	Chr6 LOH	-	4+
S17	35	女	脊髄	Chr3p CNLOH	-	-	-
S18*	32	男	小脳	Chr3p LOH	-	-	-
S19	38	女	延髄	Chr3 LOH	-	-	-
S20*	23	男	小脳	-	-	-	-
S21*	70	女	小脳	-	-	Chr10q LOH	-

表6. SNPアレイ解析の結果

各列の見方は以下の通りである。

Chr3 LOH : 3番染色体のLOHがない場合は『-』、ある場合は、その種類を記した。Chr3p CNLOHとは、この場合、3番短腕のcopy number neutral LOHを表している。

Chr6,10 LOH : 6,10番染色体のLOHがない場合は『-』、ある場合は、その種類を記した。

その他 : 数字は、染色体番号を示す。LOHがある場合は、『-』、増幅がある場合は『+』と示した。

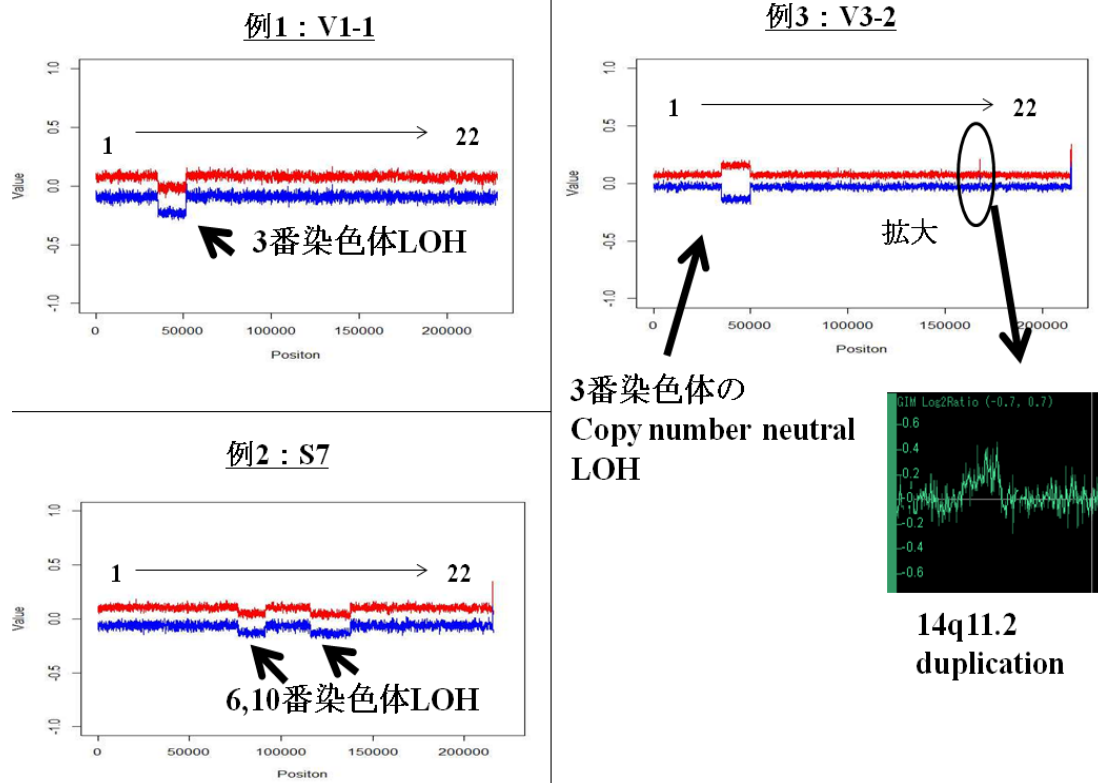


図20. SNPアレイ解析結果の代表例

例1では、3番染色体の、青のアレルのシグナル比の低下を認めており、これは、3番染色体のLOHを表している。例2では、6番染色体、10番染色体のLOHを表している。例3では、3番染色体の部位において、青のアレルのシグナル比の低下だけでなく、赤のアレルのシグナル比の上昇を認めており、3番染色体のcopy number neutral LOHを示している。また、例3のグラフの右側に、spike状になっている部分があり、右下のグラフはIRBで同部位を拡大している。14q11.2のduplicationが疑われる所見である。

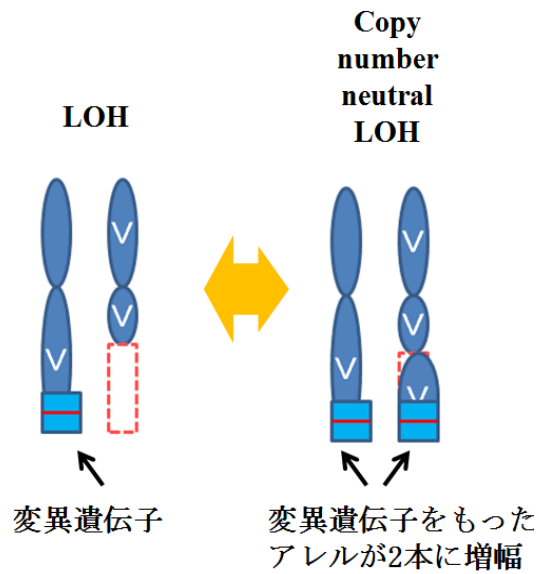


図21. Copy number neutral LOHの説明

片側アレルは欠失し、残りのアレルが2本に増幅するために、ヘテロ接合性は喪失しているが、トータルのコピー数は、正常の2となるので、copy number neutral LOHと言われている。片側のアレルに変異遺伝子があり、copy number neutral LOHで、そのアレルが増幅すれば、変異遺伝子が2つになったことになるので、2hitによる不活化の原因となりえると思われる。



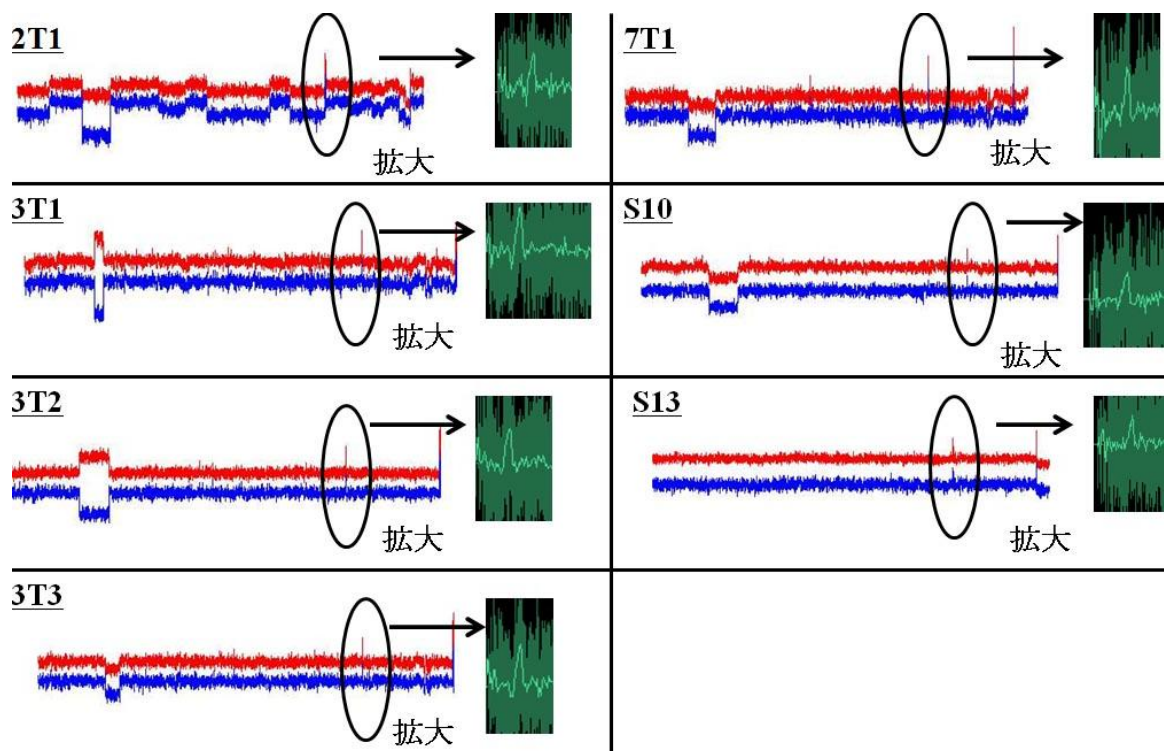


図22. 14q11.2部位のduplicationが疑われた検体のSNPアレイ解析①

本研究にて、14q11.2部位のduplicationが疑われた検体のSNP arrayのデータを全例示している。左側は、統計ソフトRで作成したグラフで、右側は、IGBというソフトで、duplicationが疑われる部位を、拡大してみせている。

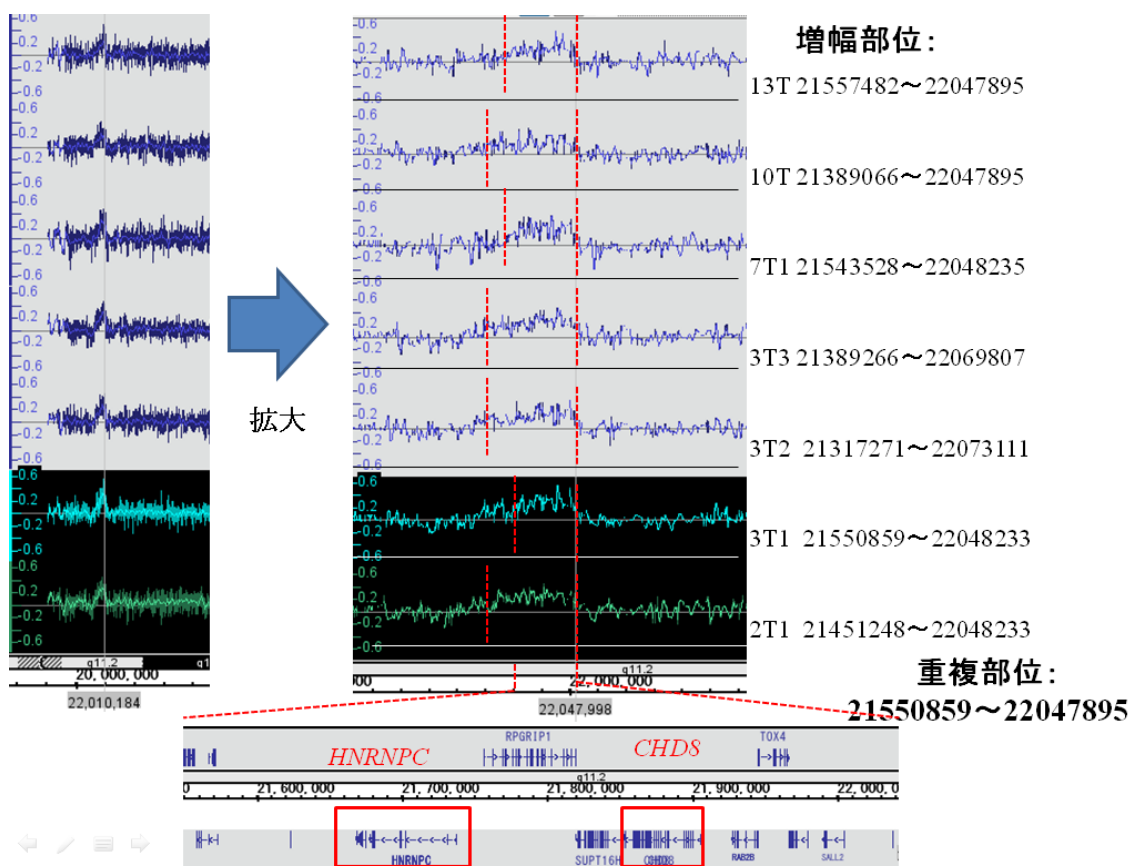


図23. 14q11.2部位のduplicationが疑われた検体のSNP アレイ解析②

Duplicationが疑われる領域は、左側の列のように、IRBで拡大してみると、ほぼ同様の領域が増幅していることがわかる。右側の列のように、さらに拡大してみると、境界が不明瞭であった。7例の、増幅していると思われる領域を特定し、最も重複している領域を同定した。この重複領域にCHD8とHNRNPCが存在する。

### G. 14q11.2のduplicationとゲノム定量的real time PCR

前の項で述べたように、14q11.2のduplicationが疑われる検体を中心に、コピー数解析のための、real time PCRを行った。図23の下段に示しているように、duplicationが疑われる部位の中で、最も重複していた領域であっても、いくつかの遺伝子が含まれていた。この遺伝子のなかで、我々は、VHL以外の好発する遺

伝子異常の候補として、重複領域のほぼ中心部に位置する、*CHD8*と*HNRNPC*の2つをあげ、これらのコピー数解析を行うことにした。候補に挙げた理由は、*CHD8*は、がん抑制遺伝子*TP53*を抑制する機能があると報告されていたからであり、<sup>55</sup> *HNRNPC*は、脳腫瘍の転移に関与しているという報告があったためである。<sup>56</sup>

今回は、14q11.2のduplicationが疑われるHB検体2検体（検体番号V7-1,S13）、そうでないHB検体2検体(検体番号S15,V2-1)の、腫瘍検体と正常血液を使用した。その結果を、図24に示した。いずれの遺伝子においても、全ての検体において、腫瘍、血液ともに、コピー数は正常である2を示しており、増幅を証明する事はできなかった。

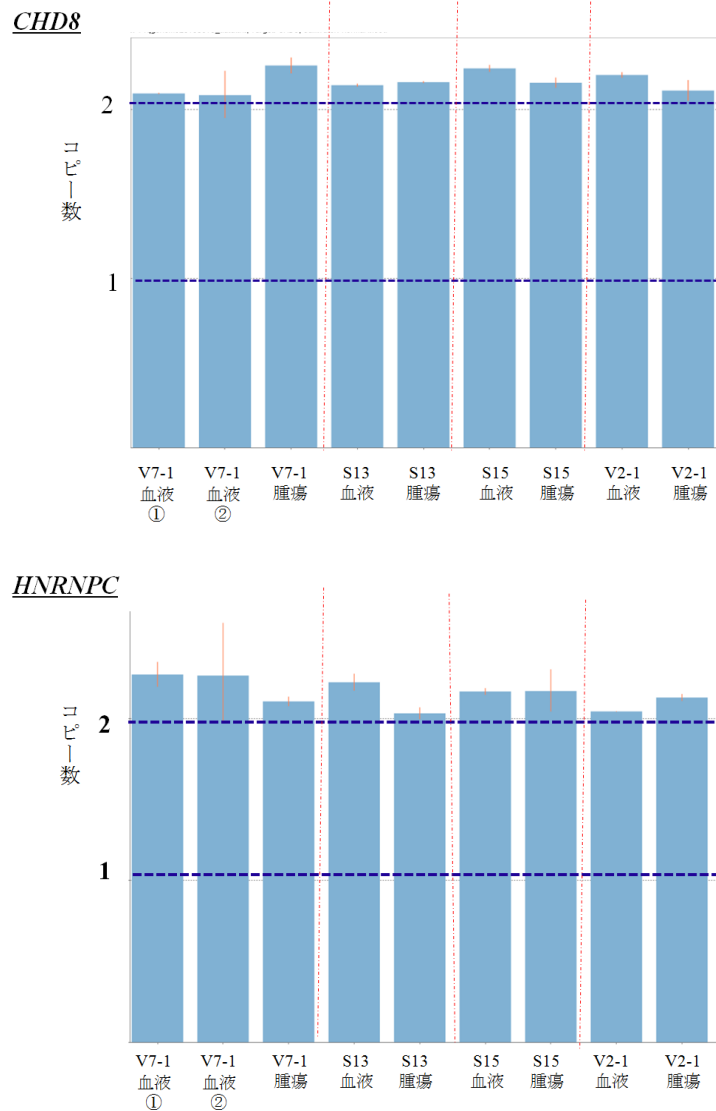


図24. 14q11.2のduplicationとゲノム定量的real time PCRの結果

上段のグラフは、*CHD8*の結果を、下段のグラフは、*HNRNPC*の結果を示した。V7-1とS13は、14q11.2のduplicationを認めた検体で、S15とV2-1は認めていない検体である。各検体とも、腫瘍検体と正常血液のコピー数を定量した。2つの遺伝子とも、いずれの検体においても、コピー数は正常である2を示しており、増幅を証明する事はできなかった。

## H. ゲノム解析結果のまとめ

本研究の、VHL遺伝子異常解析の結果をまとめたものを、表7に掲載した。表

7の1行目の『VHL変異・欠失』は、ダイレクトシーケンシング法とMLPA法のデータを統合したものである。両方の解析で、異常を認めた検体は、本研究では1検体もなかった。VHL病群では、11検体中、ダイレクトシーケンシング法で7検体、MLPA法で4検体、VHL遺伝子変異または部分欠失を認め、結局、全例に、何らかのVHL遺伝子の配列異常を認めた。しかし散発性群では、ダイレクトシーケンシング法で4例にVHL遺伝子変異を認めるのみであった。従って、VHL遺伝子の配列異常に関しては、散発群の方が、VHL病群よりも有意に頻度が低いことがわかった。 $(p<0.001, \text{Pearson's chi-square test})$

SNPアレイなどで判明した3番染色体のLOHに関しては、VHL病群で63.6%、散発性群で57.1%と、いずれも高頻度に認められ、両群間に有意差はなかった。

$(p=0.7224, \text{Pearson's chi-square test})$  VHL遺伝子を含んだ3番染色体のLOHは、VHL病群であっても、散発性群であっても、重要な因子である可能性が高いと言える。

VHL遺伝子の病的変異、または部分欠失と、VHL遺伝子を含んだ3番染色体LOHを、同一検体で認められた場合、その検体は、VHL遺伝子の2hitによる不活化を起こしている可能性が高く、このような状態を、今後、本研究では、definite biallelic inactivationの状態であると定義する。そこで、上記のデータを統合すると、VHL遺伝子の2 hitによる不活化(definite biallelic inactivation)を起こしている

検体は、VHL病群では11例中7例(63.6%)、散发性症例では21例中1例(4.76%)となり、散发性群で有意に頻度が低い結果となった。(p=0.003, Pearson's chi-square test)

VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化に関しては、VHL病群では1検体も認めず、散发性群にのみ7検体認めた。(p =0.0303, Pearson's chi-square test) V-E-3(59頁参照)で述べたように、メチル化があるからといって、VHL遺伝子の発現は抑制されているかは不明瞭である。そこで、VHL遺伝子異常、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化、3番染色体のLOH、これらの3つのうち、どれか2つが、同一検体で認めた場合、2 hitによる不活化を起こしている可能性があるが、やや低いという事で、本研究では、probable biallelic inactivationと定義する。本研究では、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化だけを認めた検体もあり、2つのアレルがともにメチル化を起こして、不活化となっている可能性は少なからずあるが、本研究では、この場合は、不活化を起こしているとは判定しなかった。従って、散发性群において、不活化を起こしている検体(probable biallelic inactivation)の割合は、28.6%となり、それでも、VHL病群(63.6%)よりは、不活化の割合が低い傾向がある事がわかった。(p=0.0551, Pearson's chi-square test) 前述したGlaskerの報告と本研究の結果を比較すると、VHLの2 hitによる不活化がある検体の割合は、VHL病群では各々62%、63.6%とほぼ同様の結果となったのに対して、散发性群では、probable biallelic inactivationの検体の割合でみると、各々

10%、28.6%となり、本研究で、散発性群における不活化の割合が増えている事になる。<sup>48</sup> その原因としては、本研究において、VHL遺伝子プロモーター領域のメチル化を多く認めた事が挙げられる。本研究では、SNPアレイ解析にて、3番染色体のcopy number neutral LOHを初めて同定することができたが、これは、microsatellite markerを用いたLOH解析でも、LOHとして同定する事ができる異常であるため、不活化を認める症例の増加には、直接的には繋がらなかった。

次に、本研究におけるVHL遺伝子異常の解析結果と、SNPアレイ解析の結果を追加して、よりわかりやすくしたのを、表8として掲載した。ここで示した様に、散発性群では、VHL遺伝子の異常や不活化を認めないが、3番染色体のLOHを認める症例を、21例中8例認めた。また、V-F(62-63頁参照)で述べたように、6番または10番染色体のLOHを有する検体は、散発性群で21検体中8検体(38.1%)と、高頻度であり、VHL病群では1検体も認めないことから、散発性群に特異的な染色体異常である可能性が高い。(p=0.0181, Pearson's chi-square test) さらに、表8に示す様に、散発性群では、VHL遺伝子の異常や不活化を認めず、3番染色体のLOHも認めない検体は4検体あるが、その内、3検体に6番または10番染色体のLOHを認めていた。

	VHL病群	散発性群	<i>p</i> 値
<i>VHL</i> 変異,欠失	11/11	4/21	<0.001*
Chr3 LOH	7/11	12/21	0.7224
%	63.60%	57.10%	
<b><i>VHL</i> 2hit (definite biallelic inactivation)</b>	7/11	1/21	0.003*
%	63.60%	4.76%	
<i>VHL</i> メチル化	0/11	7/21	0.0303*
<b><i>VHL</i> 2hit (probable biallelic inactivation)</b>	7/11	6/21	0.0551
%	63.60%	28.57%	

表7. VHL遺伝子異常の解析結果

\*:*p*<0.05 有意差あり

すべて、Pearson's chi-square testで検定した。『*VHL*変異、欠失』は、ダイレクトシーケンシング法とMLPA法のデータを統合したものである。同一検体で、*VHL*変異または部分欠失と、3番染色体LOHを認めた場合、『*VHL* 2hit(definite biallelic inactivation)』とした。同一検体で、*VHL*変異または部分欠失、*VHL*プロモーター領域のメチル化、3番染色体LOHのいずれか2つを認めた場合、『*VHL* 2hit(probale biallelic inactivation)』とした。散発性群では、*VHL*病群と比較して、*VHL*変異、欠失が有意に少なく、*VHL*プロモーター領域のメチル化が有意に多かった。また、*VHL*の2 hitによる不活化は、散発性群では、*VHL*プロモーター領域のメチル化がある検体のデータを加えたとしても、*VHL*病群より少ない傾向であった。



	VHL病群											散発性群																								
症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32				
VHL 変異・欠失	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■																				
Chr3 LOH	■	■														■	■																			
VHL 2hit (definite)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■																									
VHL メチル化												■	■			■	■	■	■	■	■	■														
VHL 2hit (probable)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	■																	
Chr6 LOH												■			■							■											■	■		
Chr10 LOH																																			■	■

表8. ゲノム解析結果一覧表

『VHL変異・欠失』の行では、MLPA法で同定された、VHL exon 3の欠損を認められた検体を赤で示した。『Chr3 LOH』の行では、copy number neutral LOHを認められた検体を赤で示した。VHL病群では、11検体中7検体に、VHLの2 hitを認めたが、逆に4検体は2 hitを認めていない事がわかる。散発性群では、VHLプロモーター領域のメチル化がある検体のデータを加えたとしても、4検体のみにしかVHLの2 hitを認めなかった。また、VHLの異常が全くなく、3番染色体のLOHがある検体を8検体認めた。さらに、VHL異常も3番染色体LOHもない検体が4検体あり、そのうち、3検体には、6番か10番染色体のLOHを認めた。

## VI. 考察

今回の研究の目的は、Ⅲ-A(19頁参照)にある通り、HBにおける、*VHL*の異常と2 hitによる不活化がどれぐらい起きているのかを再検証する事であった。本研究の解析によって、*VHL*遺伝子プロモーター領域のメチル化を認める検体が存在する事と、SNPアレイ解析にて、3番染色体のcopy number neutral LOHをもつ検体が存在する事を示せた。また、解析データを統合したところ、*VHL*病群においては、*VHL*の2 hitによる不活化が60%以上の症例で認めたが、3番染色体以外の特徴的な染色体異常は同定できなかった。しかし、散发性群においては、*VHL*の2 hitによる不活化は必ずしも多くはなかったが、3番、6番、10番染色体のLOHが多い事が判明した。以後、本研究で行った解析の結果に関して考察する。

### A. 中枢神経系血管芽腫における *VHL* 遺伝子異常の重要性

今回の研究では、HBの腫瘍形成機序における*VHL*の異常と2 hitによる不活化の重要性をより明確に理解するために、*VHL*病群と、散发性群に分けて、検討を行った。

まず、*VHL*病群では、表7,8より、全例で*VHL*遺伝子の変異、あるいは部分欠失を認め、このうち63.6%の症例で2 hitを認めた。このように、*VHL*病の検体では、*VHL*遺伝子変異と3番染色体LOHの2 hitによる*VHL*遺伝子不活化が

半数以上を占め、腫瘍形成に重要な役割を果たしている可能性はやはり高いと言える。しかし、今回の研究でも 2 hit を認めない検体が、11 検体中 4 検体、つまり、30%以上存在した。この原因としては、以下の 3 つが考えられる。

①実際は、2hit が存在するのだが、本研究で使用した解析技術では、同定できなかったという、解析技術上の問題

②2 hit による不活化ではなく、片側アレルのみの障害によるハプロ不全が、腫瘍形成に重要である可能性

③本研究で解析した hit (不活化機序) とは別の、VHL 遺伝子の不活化の機序が存在する可能性

①に関しては、II-A-1(2-3 頁参照)でも述べたように、HB は、非常に血管、血液に富んだ腫瘍であり、正常細胞が非常に多く混入して、腫瘍細胞の異常を同定できなかった可能性が考えられる。

②に関しては、例えば、有名ながん抑制遺伝子である *PTEN*(*phosphatase and tensin homolog*)は、2hit による不活化ではなく、片側アレルのみの障害でも腫瘍形成に向かう可能性が示されており、同じがん抑制遺伝子の *VHL* も、同様の可能性が考えられる。<sup>57</sup>

③に関しては、最近、microRNA の 1 種である miR92-1 が、VHL の発現を抑制するという論文が報告されており、今回、解析していない不活化機序が存在す

る可能性はある。<sup>58</sup>

しかし、①②③のいずれが正しいのかは、今後の更なる解析が必要と思われる。

次に、散発性群では、VHL 遺伝子異常も、definite biallelic inactivation を認めた症例の割合も、VHL 病群よりも有意に少なかった。ただし、VHL 遺伝子プロモーター領域のメチル化がある症例は、VHL 病群では 1 検体も認めなかったが、散発性群では有意に多く認めた。つまり、散発性群では、VHL 病群と比較して、VHL 遺伝子異常が少ないが、VHL 遺伝子プロモーター領域のメチル化が多い特徴があると言える。

本研究にて、散発性群で、VHL 病群と比較して、VHL 遺伝子異常が有意に少ない原因としては、下記の 2 つが考えられる。

①実際は、VHL 遺伝子異常があるのだが、同定できないという、解析技術上の問題

②VHL の 2 hit による不活化以外の、腫瘍形成に重要な機序、あるいは遺伝子異常の存在

①に関しては、VHL 病群においても前述したように、HB は、非常に血管、血液に富んだ腫瘍であり、正常細胞が非常に多く混入して、腫瘍細胞の異常を同定できなかった可能性が考えられる。この件に関しては、再度、VI-C『本研究の限界』の項(82 頁参照)で、述べていく。

②に関しては、散発性群では、*VHL* の 2 hit による不活化は、重要な腫瘍形成機序の 1 つであるかもしれないが、すべての散発性の HB において、重要な腫瘍形成機序であるかは、本研究だけでは断定できず、その場合、*VHL* 以外の新規原因遺伝子の異常が、腫瘍形成に関与している可能性もあると言える。この件に関しては、次項にて、SNP アレイのデータを解析することで、考察していく。

以上より、本研究では、*VHL* 病群と散発性群の 2 群では、*VHL* 遺伝子異常の組成やその割合、そして、2 hit による不活化を起こす機序が異なっていることがわかった。また、*VHL* 病群の HB では、*VHL* の 2hit による不活化が、重要な腫瘍形成機序である可能性が高いが、散発性群の HB に関しては、*VHL* 以外の新規原因遺伝子の異常が存在する可能性がある事がわかった。この事より、*VHL* 病群と散発性群では、病理学的には同じ HB であっても、ゲノム異常の内容も、腫瘍形成機序も異なる、別の腫瘍単位である可能性もあると言える。ただ、まだ断定的ではなく、今後も更なる検討を行っていく必要があると思われる。

## **B. 中枢神経系血管芽腫のコピー数異常と新規原因遺伝子の可能性**

本研究では、染色体のコピー数解析のために、SNP アレイ解析を行った。表 6(63 頁参照)にも示した通り、*VHL* 遺伝子を含んだ 3 番染色体の LOH が、*VHL*

病群では、63.6%、孤発性群では 57.1%の検体で認めており、ほぼ同率であった。

II-C-2 (12 頁参照) でも述べたが、RCC では、散発性症例においても、9 割以上の症例で、3 番染色体 LOH を認めるとされるが、本研究では、HB においても、半数以上の割合で認めており、腫瘍形成機序に 3 番染色体 LOH が、重要な役割を持っている可能性が高い。また、2011 年と 2012 年に、RCC の全エクソーム解析により、VHL 以外の、遺伝子異常が好発する遺伝子として同定された *PBRM1* (*polybromo1*) , *BAP1*(*BRCA1 associated protein-1*)は、いずれも 3p 上の遺伝子である。<sup>59, 60</sup> 従って、HB においても、3 番染色体上に、VHL 遺伝子以外の、未だ同定されていない、好発する遺伝子異常が存在する可能性はあると言える。

また、今回、SNP アレイ解析により、散発性群では、6 番、または 10 番染色体異常を有する検体を 38.1%認めた。しかし、VHL 病群では 1 例も認めなかった。この結果は、HB20 検体に対してアレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization)解析を行った、Gijtenbeek らの報告とほぼ一致している。<sup>47</sup> この報告では、最も頻度が高かった染色体異常は、予想される通り、3 番染色体 LOH で 11 検体(55%)であったが、その次に、多かったのが 6 番染色体 LOH で 7 検体(35%)であり、10 番染色体 LOH も 3 検体(15%)認めている。ここでも、6,または 10 番染色体 LOH を認めたのは、全例散発性の検体であった。また、Lemeta ら

の行った、HB に対する CGH 解析では、6 番染色体の LOH が一番多かったとなっている。<sup>61</sup> つまり、6 番、10 番染色体の LOH が、HB の腫瘍形成機序に重要な役割を果たしている可能性があり、6 番、10 番染色体にも、VHL 遺伝子以外の、未だ同定されていない、好発する遺伝子異常が存在する可能性はあると思われる

6 番染色体上にある原因遺伝子として、ZAC1 (または、*PLAGL1* ; *pleiomorphic adenoma gene-like 1*) を、候補の 1 つにあげている論文が、我々が渉猟した限りでは 3 つある。<sup>62, 63, 64</sup> ZAC1 は、*TP53* に似た作用をするとされる、がん抑制遺伝子の 1 種とされ、卵巣癌、乳癌、下垂体腺腫などでの関与が報告されている。<sup>65</sup> Lemeta らの論文では、HB 検体を用いて、microsatellite marker による LOH 解析を詳細に行い、6q24 の部位が LOH を多く認める部位であると報告しており、その部位にある ZAC1 が原因遺伝子の候補と考え、別の論文で、更なる解析を行っている。その論文では、10 例の HB に対して、ZAC1 遺伝子プロモーター領域のメチル化が 9 例に認められ、10 例全例において、免疫染色上の発現低下を認めたとの事である。<sup>63</sup> しかし、ZAC1 異常が、本当に、HB の腫瘍化にかかわっているかどうか、そして、その機序はどのようなものかは、以前、不明瞭のままであり、今後は、HB 検体における ZAC1 の機能を調査する必要があると思われる。

次に、10 番染色体上にある原因遺伝子候補の一つとしては、我々は、*PTEN*

にその可能性があると考えている。その理由としては、今回、1例、3番染色体異常や *VHL* 遺伝子異常がないのに、10q の欠失のみを認めた症例があり、その欠失部分には、*PTEN* が含まれていたからである。実際、RCC の細胞株において、*VHL* と *PTEN* の関連を解析している論文があり、*VHL* 欠損のみでは嚢胞化、腫瘍化を全く起こさないが、そこに *PTEN* 欠損を追加すると、著明に嚢胞が増加するという結果であった。<sup>66</sup> 遺伝性に *PTEN* 変異を認める、遺伝性腫瘍疾患の1つある Cowden 病では、現時点では HB ができたという報告はないので、*PTEN* 異常だけでは、HB はできない。<sup>1</sup> しかし、上記の所見より、がん抑制遺伝子の一種とされる *PTEN* が、HB の腫瘍化においても何らかの関与をしている可能性があると思われる。

以上より、本研究において、HB に対して SNP アレイ解析を行った事で、3番、6番、10番染色体上が、*VHL* 以外で好発する遺伝子異常が存在する可能性が推察された。

今回、SNP アレイ解析を行い、14q11.2 の duplication を疑われた症例が7例あったが、ゲノム定量的 real time PCR 法を行っても、明らかな増幅は証明できなかった。SNP アレイ解析とゲノム定量的 real time PCR 法で、結果が異なってしまった原因は不明である。今回、duplication が疑われた部位と相同性の高い配列が、他に存在したために、一見、duplication に見えていただけなのかもしれない



が、それでは、なぜ、他の 25 例では、この duplication が認めなかったのかを説明できない。また、過去の HB の CGH 解析の論文、RCC の SNP アレイの論文、あるいは他の癌を対象にした SNP アレイの論文でも、14q の欠損を認めたものはあっても、14q の増幅を認めたものはほとんどない。<sup>47, 67, 68</sup> HB において、今回認めた、14q11.2 の duplication が、病的なものなのかどうか、そして、どんな意味があるのは、全く不明であり、今後、さらに、検討する必要があると思われる。

### C. 本研究の限界

II-A(2 頁参照)で述べたように、HB は、血管・血液が、非常に豊富である特徴があるために、検体の中に、血管内皮や白血球などの正常細胞の混入を多く有している可能性がある。例えば、図 13 (47 頁参照) に示した、検体番号 V7-1 では、c194C>T という変異を認めたが、変異部位では T の peak だけでなく、本来正常である C の peak も認めている。この検体は、SNP アレイ解析では、3 番染色体の欠失を認めているので、採取した腫瘍検体が、すべて VHL 遺伝子変異を伴う腫瘍細胞でのみで構成されているならば、本来なら、シーケンス結果では、異常である T の peak のみを認めるはずである。しかし、実際は、正常である C の peak も認めたということは、腫瘍細胞以外の、例えば、血管内皮細

胞、白血球などの混入を多く認めた事が疑われる。

この事は、**MLPA** 法に関しても、同様に言えると思われる。V-D(50-52 頁参照)で述べた事であるが、今回、**SNP** アレイ解析で 3 番染色体 **LOH** を認めたのに、判定困難、あるいは、全く異常が同定できなかった検体が存在する。これらの検体も、正常細胞の混入が多いために、コピー数の低下を認めなかったと思われる。それに比較して、**SNP** アレイ解析は、アレル別のコピー数を定量する事ができるために、**MLPA** 法よりは、鋭敏にコピー数の異常を検出できたと思われる。しかし、腫瘍細胞の割合が、正常細胞と比較して、あまりにも低い検体の場合は、**SNP** アレイ解析であっても、染色体異常を同定できない可能性があると思われる。

以上より、実際は **VHL** 遺伝子の変異があるのに、同定できていない可能性は、本研究でも存在している。今回、**VHL** 病群では、全検体、**VHL** 遺伝子異常が指摘できたのは、全部、生殖細胞系列の遺伝子異常だったからと思われる。V-C

(44-45 頁参照) で述べたことであるが、遺伝子診断をした症例においては、全例、腫瘍検体と正常血液で同じ遺伝子異常が同定された事を確認している。従って、**VHL** 病群では、いくら、正常細胞が混入しても、**VHL** 遺伝子異常は同定できる。しかし、散発性では、**VHL** 遺伝子異常があるとしたら体細胞性のものと考えられるので、正常細胞の混入が多いと、**VHL** 遺伝子異常を同定できない

可能性が高い。従って、本研究においても、散发性群においては、実は VHL 遺伝子異常が多いという可能性は、完全には否定できない。

また、V-E-3(58-60 頁参照)で述べた事であるが、本研究で、VHL 遺伝子プロモーター領域のメチル化があると判定した検体において、本当に VHL 遺伝子の発現が抑制されているかは、本来は、VHL 蛋白の発現をみる免疫染色や VHLmRNA の定量実験をする事で実証すべきである。しかし、これらの発現量を解析するには、解析上の問題がある。II-A (2 頁参照)でも述べた事であるが、HB の腫瘍起源が、未だに不明瞭であるために、発現を比較する control がおけないという問題である。例えば、脳原発の神経膠芽腫において、ある遺伝子の発現が、腫瘍特異的に抑制されているかどうかを解析するには、その腫瘍起源とされている正常神経組織と比較する事は、妥当であると言える。しかし、HB においては、その起源が神経系か、あるいは hemangioblast か不明瞭である現状において、正常の神経組織と発現を比較する事は、妥当であるとは言えない。以上より、HB の遺伝子発現の異常を解析するためには、HB の腫瘍起源を明瞭にする必要があり、今後の課題の 1 つであると言える。

#### **D. 今後の研究の展望**

今回の研究において、SNP アレイ解析を行う事で、特に、散发性群において、

*VHL* 以外に、3 番、6 番、10 番染色体 LOH が腫瘍形成機序に関与する可能性が推察された。しかし、前述した（79 頁参照）RCC における *PBRM1* や *BAP1* のように、HB において好発する、新規の遺伝子異常の同定までには至っていない。今後は、次世代シーケンサなどを用いた、全ゲノム・エクソームシーケンス、あるいは、RNA シーケンスを行うことで、HB の、*VHL* 以外の、好発する遺伝子異常の同定を進めていく予定である。

## VII. 結語

本研究では、当院の HB 検体を用いて、HB における *VHL* の異常と 2 hit による不活化の重要性を、検証した。その結果、HB の *VHL* 病群では、*VHL* 変異と 3 番染色体 LOH の 2hit による不活化を認めた検体が 70% 近くもあり、腫瘍形成において重要な役割をしている可能性が推察された。散発性群では、*VHL* プロモーター領域のメチル化を多く認めたが、2 hit による不活化を認めた検体は 30% 以下と少なく、全ての散発性 HB において重要な腫瘍形成機序である事は示せなかった。ただ、SNP アレイ解析にて、*VHL* の不活化を認めない散発性検体において、3 番、6 番、10 番染色体 LOH を多く認め、この部位に、*VHL* 以外の好発する遺伝子異常が存在する可能性を示す事ができた。

## VIII. 謝辞

本研究のテーマと機会を与えて下さり、ご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学教授・齊藤延人先生に深く感謝いたします。研究の推進から論文執筆に至るまで、研究についての具体的にご指導を賜りました東京大学医学部附属病院特任講師・武笠晃丈先生に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、SNP アレイ解析を行っていただき、かつご指導・ご助言を賜りました東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門教授・油谷浩幸先生に深謝いたします。また、いつも研究のご支援いただいた、東京大学脳神経外科脳腫瘍グループ（齊藤邦昭先生、田中将太先生、大谷亮平先生、相原功輝先生）の皆様、そして、東京大学医学部脳神経外科教室技術補佐員 松浦 令子様

に厚くお礼申し上げます。

## IX. 引用文献

1. Louis DN, Ogaki H, Wiester OD, Cavenee WK, eds. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon: International Agency for Reserch on Cancer; 2007.
2. Park DM, Zhuang Z, Chen L, et al. von Hippel-Lindau disease-associated hemangioblastomas are derived from embryologic multipotent cells. **PLoS Med.**4(2):e60.2007
3. Neumann HP, Bender BU. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. **J Intern Med.**243(6):541-545.1998
4. Glasker S, Bender BU, Apel TW, et al. The impact of molecular genetic analysis of the VHL gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**67(6):758-762.1999
5. Glasker S, Klingler JH, Muller K, et al. Essentials and pitfalls in the treatment of CNS hemangioblastomas and von Hippel-Lindau disease. **Cent Eur Neurosurg.**71(2):80-87.2010
6. Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM, Oldfield EH. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. **J Neurosurg.**98(1):82-94.2003

7. Capitanio JF, Mazza E, Motta M, Mortini P, Reni M. Mechanisms, indications and results of salvage systemic therapy for sporadic and von Hippel-Lindau related hemangioblastomas of the central nervous system. **Crit Rev Oncol Hematol.**86(1):69-84.2013
8. Hussein MR. Central nervous system capillary haemangioblastoma: the pathologist's viewpoint. **Int J Exp Pathol.**88(5):311-324.2007
9. Maher ER, Yates JR, Ferguson-Smith MA. Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. **Journal of medical genetics.**27(5):311-314.1990
10. de la Monte SM, Horowitz SA. Hemangioblastomas: clinical and histopathological factors correlated with recurrence. **Neurosurgery.**25(5):695-698.1989
11. Neumann HP, Eggert HR, Weigel K, Friedburg H, Wiestler OD, Schollmeyer P. Hemangioblastomas of the central nervous system. A 10-year study with special reference to von Hippel-Lindau syndrome. **J Neurosurg.**70(1):24-30.1989
12. Maher ER, Yates JR, Harries R, et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. **Q J Med.**77(283):1151-1163.1990



13. Jagannathan J, Lonser RR, Smith R, DeVroom HL, Oldfield EH. Surgical management of cerebellar hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease. **J Neurosurg.**108(2):210-222.2008
14. Zec N, Cera P, Towfighi J. Extramedullary hematopoiesis in cerebellar hemangioblastoma. **Neurosurgery.**29(1):34-37.1991
15. Glasker S, Kruger MT, Klingler JH, et al. Hemangioblastomas and neurogenic polyglobulia. **Neurosurgery.**72(6):930-935; discussion 935.2013
16. Krieg M, Marti HH, Plate KH. Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. **Blood.**92(9):3388-3393.1998
17. Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. **Cancer research.**55(6):1358-1364.1995
18. Tago M, Terahara A, Shin M, et al. Gamma knife surgery for hemangioblastomas. **J Neurosurg.**102 Suppl:171-174.2005
19. Matsunaga S, Shuto T, Inomori S, Fujino H, Yamamoto I. Gamma knife

- radiosurgery for intracranial haemangioblastomas. **Acta Neurochir (Wien)**.149(10):1007-1013; discussion 1013.2007
20. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. **Lancet**.361(9374):2059-2067.2003
21. Hippel Ev. Vorstellung eines Patienten mit einer sehr ungewöhnlichen Netzhaut. **Ber Detsch Ophthal Ges**.24:269.1895
22. Lindau A. Studien uiber Kleinhirncyten. Bau, Pathogeneseud. Beziehungen fur angiomatosis retinae. **Acta Pathol Microbiol Scand**.3(Suppl1):1-128.1926
23. 「フォン・ヒッペルリンドウ病の病態調査と診断治療系確立の研究」班. フォン・ヒッペルリンドウ (VHL)病診療ガイドライン.7.2011
24. Takai K, Taniguchi M, Takahashi H, Usui M, Saito N. Comparative analysis of spinal hemangioblastomas in sporadic disease and Von Hippel-Lindau syndrome. **Neurol Med Chir (Tokyo)**.50(7):560-567.2010
25. Barontini M, Dahia PL. VHL disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**.24(3):401-413.2010
26. Neumann HP, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. **Lancet**.337(8749):1052-1054.1991

27. Singh AD, Shields CL, Shields JA. von Hippel-Lindau disease. **Surv Ophthalmol.**46(2):117-142.2001
28. Grubb RL, 3rd, Choyke PL, Pinto PA, Linehan WM, Walther MM. Management of von Hippel-Lindau-associated kidney cancer. **Nat Clin Pract Urol.**2(5):248-255.2005
29. Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA, Perez N. Treatment of retinal capillary hemangioma. **Ophthalmology.**109(10):1799-1806.2002
30. Neumann HP, Dinkel E, Brambs H, et al. Pancreatic lesions in the von Hippel-Lindau syndrome. **Gastroenterology.**101(2):465-471.1991
31. Lonser RR, Kim HJ, Butman JA, Vortmeyer AO, Choo DI, Oldfield EH. Tumors of the endolymphatic sac in von Hippel-Lindau disease. **N Engl J Med.**350(24):2481-2486.2004
32. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. **Nature.**332(6161):268-269.1988
33. Latif F, Tory K, Gnarra J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science.**260(5112):1317-1320.1993
34. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of

- clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet.**45(8):860-867.2013
35. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A.**68(4):820-823.1971
36. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. **Cancer Res.**66(4):2000-2011.2006
37. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. **Clin Cancer Res.**14(15):4726-4734.2008
38. Feldman DE, Thulasiraman V, Ferreyra RG, Frydman J. Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. **Molecular cell.**4(6):1051-1061.1999
39. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. **Science.**292(5516):464-468.2001
40. Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. **Genes Dev.**13(14):1822-1833.1999

41. Hsu T. Complex cellular functions of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene: insights from model organisms. **Oncogene**.31(18):2247-2257.2012
42. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. **Nature**.425(6955):307-311.2003
43. Kanno H, Kondo K, Ito S, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. **Cancer research**.54(18):4845-4847.1994
44. Crossey PA, Foster K, Richards FM, et al. Molecular genetic investigations of the mechanism of tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease: analysis of allele loss in VHL tumours. **Human genetics**.93(1):53-58.1994
45. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, et al. Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. **Am J Hum Genet**.60(4):765-771.1997
46. Lee JY, Dong SM, Park WS, et al. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the VHL tumor suppressor gene in sporadic cerebellar hemangioblastomas. **Cancer research**.58(3):504-508.1998
47. Gijtenbeek JM, Jacobs B, Sprenger SH, et al. Analysis of von hippel-lindau

- mutations with comparative genomic hybridization in sporadic and hereditary hemangioblastomas: possible genetic heterogeneity. **J Neurosurg.**97(4):977-982.2002
48. Glasker S, Bender BU, Apel TW, et al. Reconsideration of biallelic inactivation of the VHL tumour suppressor gene in hemangioblastomas of the central nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**70(5):644-648.2001
49. Muscarella LA, la Torre A, Faienza A, et al. Molecular dissection of the VHL gene in solitary capillary hemangioblastoma of the central nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol.**73(1):50-58.2014
50. Weil RJ, Vortmeyer AO, Zhuang Z, et al. Clinical and molecular analysis of disseminated hemangioblastomatosis of the central nervous system in patients without von Hippel-Lindau disease. Report of four cases. **J Neurosurg.**96(4):775-787.2002
51. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A.**93(18):9821-9826.1996
52. Kuzmin I, Duh FM, Latif F, Geil L, Zbar B, Lerman MI. Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene.

- Oncogene**.10(11):2185-2194.1995
53. Ishikawa S, Komura D, Tsuji S, et al. Allelic dosage analysis with genotyping microarrays. **Biochem Biophys Res Commun**.333(4):1309-1314.2005
54. Komura D, Shen F, Ishikawa S, et al. Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. **Genome Res**.16(12):1575-1584.2006
55. Nishiyama M, Oshikawa K, Tsukada Y, et al. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. **Nat Cell Biol**.11(2):172-182.2009
56. Park YM, Hwang SJ, Masuda K, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 controls the metastatic potential of glioblastoma by regulating PDCD4. **Mol Cell Biol**.32(20):4237-4244.2012
57. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. **Nature**.476(7359):163-169.2011
58. Ghosh AK, Shanafelt TD, Cimmino A, et al. Aberrant regulation of pVHL levels by microRNA promotes the HIF/VEGF axis in CLL B cells. **Blood**.113(22):5568-5574.2009
59. Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent

mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma.

**Nature.**469(7331):539-542.2011

60. Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. **Nat Genet.**44(7):751-759.2012

61. Lemeta S, Aalto Y, Niemela M, et al. Recurrent DNA sequence copy losses on chromosomal arm 6q in capillary hemangioblastoma. **Cancer Genet Cytogenet.**133(2):174-178.2002

62. Lemeta S, Pylkkanen L, Sainio M, et al. Loss of heterozygosity at 6q is frequent and concurrent with 3p loss in sporadic and familial capillary hemangioblastomas. **Journal of neuropathology and experimental neurology.**63(10):1072-1079.2004

63. Lemeta S, Jarmalaite S, Pylkkanen L, Bohling T, Husgafvel-Pursiainen K. Preferential loss of the nonimprinted allele for the ZAC1 tumor suppressor gene in human capillary hemangioblastoma. **Journal of neuropathology and experimental neurology.**66(9):860-867.2007

64. Zhou J, Wang J, Li N, et al. Molecularly genetic analysis of von Hippel-Lindau associated central nervous system hemangioblastoma. **Pathol Int.**60(6):452-458.2010



65. Pagotto U, Arzberger T, Theodoropoulou M, et al. The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. **Cancer Res.**60(24):6794-6799.2000
66. Frew IJ, Thoma CR, Georgiev S, et al. pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. **EMBO J.**27(12):1747-1757.2008
67. Sprenger SH, Gijtenbeek JM, Wesseling P, et al. Characteristic chromosomal aberrations in sporadic cerebellar hemangioblastomas revealed by comparative genomic hybridization. **J Neurooncol.**52(3):241-247.2001
68. Toma MI, Grosser M, Herr A, et al. Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array. **Neoplasia.**10(7):634-642.2008