

論文の内容の要旨

論文題目 中枢神経系血管芽腫の統合的ゲノム解析

氏名 高柳 俊作

【序文】

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る。症例の 25% が、家族性腫瘍疾患の 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、散発性の症例であるとされている。

VHL 病は、常染色体優性遺伝性と言われており、HB だけでなく、腎細胞癌 (以下、RCC と略)、網膜血管腫、褐色細胞腫など、多臓器に腫瘍が好発する。この疾患の原因遺伝子は、1993 年に、3 番染色体上にある遺伝子として同定され、VHL 遺伝子(VHL)と名付けられた。

2013 年の Sato らの報告では、RCC 検体では、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%の症例で認めたとされている。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。つまり、RCC においては、大半の症例において VHL の異常と 2hit による不活化を認めており、腫瘍形成機序に重要である可能性が高いと言える。

しかし、2001 年の Glasker らの報告では、HB においては、VHL の 2 hit による不活化が、VHL 病症例で 60%、散発性症例では 10%程度にしか認められないとされている。

そこで、VHL 病群と散発性群の 2 群の HB において、VHL の異常と 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、本研究の目的とした。

【方法】

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。VHL 病の診断は、2011 年に策定された VHL 病診療ガイドラインにある臨床的診断基準に則り施行した。

方法: 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。

- 1) VHL の変異解析 (ダイレクトシーケンシング法) : 通常のサンガー法を施行した。
- 2) VHL 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 :

Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) 法を施行した。

3)VHL プロモーター領域のメチル化解析：MSP法とバイサルファイトシーケンシング法の2つの方法を施行した。

4)網羅的コピー数解析(SNPアレイ)とゲノム定量的 real time PCR：本研究では、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（油谷浩幸教授）との共同研究にて SNP アレイ解析 (Genome-wide Human SNP array 6.0 ,Affymetrix 社を使用) を施行した。また、本研究の SNP アレイ解析にて、duplication が疑われた検体がいくつか認められたために、ゲノムコピー数定量的のために、ゲノム定量的 real time PCR も施行した。

【結果】

対象の内訳: 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。平均年齢は、VHL病群が 30.1 ± 10.6 、散发性群が 47.5 ± 15.6 であり、VHL病群で有意に低い結果となった。 ($p=0.0004$) それ以外に、2群間に異なる臨床的特徴は認めなかった。

ダイレクトシーケンシング法：VHL病群では、7検体にVHLの変異を認めた。散发性群では4検体のみに変異を認めた。

MLPA法：VHL病群では、検体で、VHL exon3の欠失を認めたが、それ以外の異常は、全く認めなかった。散发性群は、今回のMLPAの結果では、明らかな異常を同定する事はできなかった。

メチル化解析：MSP法では2検体、バイサルファイトシーケンシング法では7検体に、メチル化が有ると判断した。また、メチル化の有る検体は、全部散发性群であり、1検体もVHL病群は認めなかった。前述したGlaskerの報告では、42例の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た。本研究では、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)の症例で、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シング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。このような症例で、VHLの発現が、本当に抑制されているのかどうかは、不明瞭であり、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。

SNPアレイ解析とゲノム定量的 real time PCR：3番染色体 LOH を、VHL 病群、散发性群ともに、50%以上の症例で認めた。さらに、3番染色体の copy number neutral LOH を複数認めた。また、3番染色体以外の染色体コピー数異常に関しては、VHL 病群では、ほとんど認めていないのに対して、散发性群では、様々な染色体欠失、増幅を認めた。特に、6 または 10 番染色体 LOH が多く認められた。また、14 番染色体の特定部位に duplication が疑われる所見が、VHL 病群で 5 検体、散发性症例で 2 検体認めた。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考え、この 7 検体の増幅部位のうち、最も重複した部位にある遺伝子のゲノム定量

的 real time PCR を施行した。しかし、いずれの遺伝子においても、明らかな増幅を証明する事は出来なかった。

ゲノム解析結果のまとめ：*VHL*の病的変異、または部分欠失と、*VHL*を含んだ3番染色体LOHを、同一検体で認められた検体は、*VHL*病群では63.6%、散発性群では 4.76%となり、散発性群で有意に頻度が低い結果となった。 $(p=0.003)$ 次に、*VHL*異常、*VHL*プロモーター領域のメチル化、3番染色体LOH、これらの3つのうち、どれか2つが、同一検体で認めた検体は、散発性群において、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。 $(p=0.0551)$ さらに、散発性群では、*VHL*異常を認めないが、3番染色体LOHを認める検体を、多数認めた。また、散発性群では、*VHL*異常を認めず、3番染色体LOHも認めない検体に、6番または10番染色体LOHを多く認めていた。

【考察】

本研究の解析によって、HB 検体において、*VHL* プロモーター領域のメチル化を認める症例が存在する事と、SNPアレイ解析にて、3番染色体の copy number neutral LOHをもつ症例が存在する事を示せた。そして、解析データを統合したところ、*VHL* 病群においては、*VHL* 変異と3番染色体 LOH 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、散発性群においては、*VHL* プロモーター領域のメチル化を多く認めたが、*VHL* の 2 hit による不活化は 30%以下しかなく、3番、6番、10番染色体の LOHが多い事が判明した。以上より、*VHL* 病群と散発性群の2群では、*VHL* の異常の組成やその割合、そして、2 hit を起こす機序が異なっている事がわかった。また、*VHL* 病群では、*VHL* の 2 hit による不活化は、腫瘍形成機序に重要であると推察されたが、散発性の一部の症例においては、必ずしも、そうであるとは断定できず、3番、6番、10番染色体 LOH が、腫瘍形成機序に関与している事が推察された。