

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08374

研究課題名(和文) Folliculin遺伝子異常と諸臓器腫瘍発生に関する分子病理学的研究

研究課題名(英文) MOLECULAR PATHOLOGY ON FOLLICULIN GENE ABNORMALITIES AND TUMORIGENESIS OF VARIOUS ORGANS

研究代表者

中谷 行雄 (NAKATANI, Yukio)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20137037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BHD症候群と遺伝学的検査で確定した発端者185名、BHD症候群関連疾患の既往がある血縁者含めて計477名の解析を行った。FLCN変異は45の異なるパターンを認めた。exon単位で欠失する希少な変異パターンが3件同定された。腎癌発症率は40歳以上では35%と高率で、その他に肺癌、大腸癌、甲状腺癌が3%前後に認められた。肺は腺癌、異型腺腫様過形成や微小結節性肺胞上皮過形成様病変で、しばしばFLCN LOHパターンを認めた。浸潤癌はEGFR、KRAS変異も認めた。甲状腺癌と耳下腺腺腫は嫌色素性腎癌と形態学的に類似し、FLCN LOHを伴っており、腫瘍発生にFLCN遺伝子異常の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genetic, epidemiological and clinicopathological analyses were performed on 185 probands who were confirmed as BHD syndrome by genetic tests and their sibs with BHD syndrome-associated lesions, together forming the cohort of 477 subjects. As a result, forty-five different mutation patterns were detected in FLCN. These included 3 cases of very rare small deletions of exons. Renal carcinomas developed in 35% of patients who were over 40 years old. Lung cancers, colon cancers and thyroid cancers occurred around 3% of patients. Adenocarcinoma, atypical adenomatous hyperplasia and multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia-like lesion were seen as lung neoplasms; they commonly showed LOH of FLCN and invasive adenocarcinomas commonly showed mutations of EGFR and KRAS as well. Thyroid carcinoma and parotid adenoma resembled chromophobe renal cell carcinoma morphologically and harbored LOH of FLCN, suggesting a role of FLCN gene abnormalities in the tumorigenesis of these neoplasms.

研究分野：人体病理学

キーワード：バート・ホッグ・デュベ症候群 フォリキュリン 腎癌 肺癌 遺伝子解析 疫学

1. 研究開始当初の背景

Birt-Hogg-Dube (BHD) 症候群は皮膚線維毛包腫・肺嚢胞・腎腫瘍を高率に発生する常染色体優性遺伝性疾患で、2002年に17p.11に局在する原因遺伝子が同定され folliculin (*FLCN*) と名づけられた (Nickerson ML et al, *Cancer Cell*, 2002)。我々は2007年にBHD症候群の肺嚢胞に初めて遭遇し、その特徴的な病理組織像と胚細胞遺伝子変異パターンなどを報告した (Koga S et al, *Pathol Int*, 2009)。その後肺嚢胞と腎腫瘍を中心にBHD症候群の疫学、臨床、病理、分子発現解析などを精力的に進め発表してきた (Furuya M et al. *Am J Surg Pathol*, 2012; Furuya M and Nakatani Y. *J Clin Pathol*, 2013)。この過程で、BHD症候群患者が腎以外にも甲状腺・結腸・肺などに腫瘍を発生していたが、関連性や腫瘍における *FLCN* の状態に関する情報は殆どなかった。これらの患者は30-40代と比較的若年齢で発症しており、病理学的にも通常の組織型とは異なった。例えば甲状腺癌を合併した一例はミトコンドリアの豊富な非典型的濾胞癌を呈し、形態的に嫌色素性腎細胞癌やオンコサイトーマに類似していた。腎以外の臓器にもBHD症候群関連発癌機構が存在すると想定し、それらが病理所見に反映されうるかを様々な臓器腫瘍で病理学的に検討する必要性が上がった。

2. 研究の目的

本研究ではBHD患者の諸臓器腫瘍発生における *FLCN* 遺伝子異常および病理学的所見を詳細に解析し、腫瘍発生における *FLCN* 異常の意義などを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BHD症候群患者に発生した諸臓器腫瘍における *FLCN* 遺伝子の体細胞変異の検索：自験例及びコンサルト例の甲状腺癌・肺癌などの組織を用い

腫瘍部におけるヘテロ接合性消失性を検討した。

(2) *FLCN* 発現異常のある症例についての形質発現や組織学的特徴、臨床病理像、その他の遺伝子との関連：*FLCN* 異常が腫瘍の組織型に与える影響や *FLCN* の発癌・癌進展に果たす機能的な役割を検討した。

4. 研究成果

(1) BHD症候群患者に発生した肺腫瘍はいずれも浸潤性腺癌あるいは過形成様～前浸潤性腺系細胞病変であったが、そのなかに1例ではあるが結節性硬化症に伴う multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia (MMPH) と類似した病変が存在することを見いだした。MMPH以外の腫瘍組織型は上皮内腺癌(n=2)、微小浸潤腺癌(n=1)、乳頭状腺癌(n=1)、微小乳頭状腺癌(n=1)であった。また8個の異型腺上皮過形成(AAH)が見つかり、うち7つは一人の患者の肺に多発性に発症していた。これらのFFPE組織から腫瘍部を laser capture microdissection 法(LCM)により腫瘍DNAを抽出した。

(2) AAH以外の6病変でDNA抽出に成功したため、*FLCN* と、散発性肺癌に高頻度に見られる *EGFR*、*KRAS* について検討した。6検体中5検体で *FLCN* に LOH が認められた。浸潤腺癌3検体にはいずれも *EGFR* あるいは *KRAS* 変異も認められた。

(3) 2年目は、本邦におけるBHD症候群の診療状況を取りまとめた。まず遺伝学的検査で確定した発端者120名と、BHD症候群関連疾患の既往がある血縁者計312名についての疫学集計を行った。*FLCN* 変異は31の異なるパターンからなり、最も多い変異は exon 11 の polyC 領域における cytosine 挿入であった。その他にも欧米では殆ど見つかっていない exon 12 の 7塩基挿入や

exon 13 の 4 塩基欠失が日本人 BHD 家系のホットスポットであることが明らかになった。Exon 11 の cytosine 挿入は欧米人や中国人家系にも多いことから普遍的なホットスポットで、一方 exon 12, 13 の変異は日本における創始者効果を反映していると考えられた。日本人における 312 名のうち、気胸発症は 230 名(73.7%)と最も多く、肺 CT 検査を受けた患者家族 156 名において 153 名に同定可能な多発嚢胞がみつき、他の 3 名は画像でとらえられない小嚢胞であった。腎腫瘍罹患率は全体では 19.2%であったが、40 歳以上の中高年層のみでは 34.8%であった。

(4) 発端者の(腎癌以外の)全身性腫瘍検索において甲状腺がんと唾液腺腫瘍が 1 例ずつ FFPE 組織から腫瘍部を laser capture microdissection 法(LCM)により腫瘍 DNA を抽出し、*FLCN*について体細胞レベルで検討したところ LOH が認められた。形態的にも腎臓の hybrid oncocytic/chromophobe tumor と類似する像を示しており、BHD 症候群においては低頻度ながら腎以外の内外分泌臓器にも同様の腫瘍を発症する可能性があることが示唆された。

(5) 最終年度は、引き続き本邦における BHD 症候群の診療状況をとりとまとめた。まず遺伝学的検査で確定した発端者 185 名、BHD 症候群関連疾患の既往がある血縁者含めて計 477 名についての疫学集計を行った。*FLCN*変異は 45 の異なるパターンからなり、最も多い変異は exon 11 の polyC 領域における cytosine 挿入であった。その他にもダイレクトシーケンスでは同定できない exon 単位で欠失する極めて希少な変異パターンの家系が次世代シーケンサーによる解析で 3 件同定され、暫定的に陰性とした患者 3 名が新規に登

録された。肺嚢胞の鑑別としては、従来から比較対象となっていたリンパ脈管筋腫症と特発性ブラに加え、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患による嚢胞化、鳩飼病による炎症性嚢胞、低異型度子宮内膜間質肉腫の転移を強く示唆する異所性組織など、さまざまな疾患が数例ずつ集積された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Furuya M, Hasumi H, Baba M, Tanaka R, Iribe Y, Onishi T, Nagashima Y, Nakatani Y, Isono Y, Yao M. Establishment and Characterization of BHD-F59RSVT, an Immortalized Cell Line Derived from a Renal Cell Carcinoma in a Patient with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Lab Invest*, 査読有、2017;97:343-351
2. Furuya M, Yao M, Tanaka R, Nagashima Y, Kuroda N, Hasumi H, Baba M, Matsushima J, Nomura F, Nakatani Y. Genetic, Epidemiologic and Clinicopathologic Studies of Japanese Asian Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Clin Genet*, 査読有、2016: 90: 403-412. doi: 10.1111/cge.12807
3. Furuya M, Tanaka R, Okudela K, Nakamura S, Yoshioka H, Tsuzuki T, Shibuya R, Yatera K, Shirasaki H, Sudo Y, Kimura N, Yamada K, Uematsu S, Kunimura T, Kato I, Nakatani Y. Pulmonary Neoplasms in Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome: Histopathological Features and Genetic and Somatic Events. *PLoS One*, 査読有、2016 e0151476. doi: 10.1371/journal.pone.0151476.
4. Kato I, Iribe Y, Nagashima Y, Kuroda N,

Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M. Fluorescent and Chromogenic in situ Hybridization of CEN17q as a Potent Useful Diagnostic Marker for Birt-Hogg-Dubé Syndrome-associated Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Hum Pathol*、査読有、 2016 52:74-82. pii: S0046-8177(16)00036-8. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004.

5 . Iribe Y, Yao M, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nakatani Y, Furuya M. Genome-wide Uniparental Disomy and Copy Number Variations in Renal Cell Carcinomas Associated with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Am J Pathol*、査読有、 2016;186:337-46. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.01

6 . Iribe Y, Kuroda N, Nagashima Y, Yao M, Tanaka R, Gotoda H, Kawakami F, Imamura Y, Nakamura Y, Ando M, Araki A, Matsushima J, Nakatani Y, Furuya M. Immunohistochemical Characterization of Renal Tumors in Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Pathol Int*、査読有、 2015, 65:126-132.

7 . Furuya M, Hong SB, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nagahama K, Suyama T, Yao M, Nakatani Y. Distinctive Expression Patterns of GPNMB and Folliculin in Renal Tumors in Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Cancer Sci*、査読有、 2015;106:315-323

[学会発表](計 19 件)

1. Nakatani Y, Furuya M. Histopathologic Clues to the Diagnosis of Lung Cysts Associated with Birt-Hogg-Dubé Syndrome (BHDS): An analysis of 57Cases in Comparison with Idiopathic Bullae/Blebs. 107TH Annual meeting of the USCAP 2018. Vancouver, Canada. 2018.3.17 - 24

2. Furuya M, Kato I, Nagashima Y, Hasumi H, Yao

M, Baba M, Tanaka R, Nakatani Y. Clinicopathologic Analysis of Birt-Hogg-Dubé Syndrome associated Renal Cell Carci-nomas. XXIX European Congress of Pathology. Amsterdam, Netherlands. 2017.9.1 - 6

3. Furuya M, Kato I, Iribe Y, Kuroda N, Nagashima Y, Hasumi H, Yao M, Nakatani Y. Histopathological analyses of renal tumors in Birt-Hogg-Dube syndrome. XXXI International Congress of the IAP 2016.Cologne, Germany. 2016.9.25 - 29

4. Nakatani Y, Furuya M. Histopathological Study of Pulmonary Cysts in Birt-Hogg-Dubé Syndrome. XXXI International Congress of the IAP 2016.Cologne, Germany. 2016.9.25 - 29

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
中谷 行雄 (NAKATANI, Yukio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：2 0 1 3 7 0 3 7

(2)研究分担者

古屋 充子 (FURUYA, Mitsuko)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号： 1 0 3 6 1 4 4 5

矢澤 卓也 (YAZAWA, Takuya)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号： 5 0 2 5 1 0 5 4

太田 聡 (OOTA, Satoshi)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 9 0 3 2 4 3 4 2

(3)連携研究者

(4)研究協力者