

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月4日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10600

研究課題名(和文) 本邦のバート・ホッグ・デュベ症候群の分子遺伝学的解析および疾患病態関連解析研究

研究課題名(英文) Molecular Genetic analysis and Tumorigenesis of Birt-Hogg-Dube syndrome in Japan

研究代表者

矢尾 正祐 (YAO, Masahiro)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00260787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バート・ホッグ・デュベ(BHD)症候群120家系、312名のFLCN遺伝子解析と臨床病理解析を行った。31種類のgermline sequence variantと、3ヶのhotspotがみいだされた。本邦患者では腎癌の合併は40歳以上では34.8%で、皮膚病変は軽症であった。BHD関連腎癌の全エキソン解析では、FLCN遺伝子以外に共通して変異している遺伝子は稀な一方、複数のクロマチン再構成遺伝子群が個々の腫瘍で変異しており、散発性腎癌とは異なる変異特性を示していた。腎癌のメタボライト解析では、解糖系・ペントースリン酸経路・脂質代謝経路のシフト、グルタチオン生成の亢進等が観察された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed germline mutation and clinicopathologic characteristics of 312 patients from 120 Birt-Hogg-Dube syndrome (BHD) families. A total of 31 different FLCN sequence variants, including 3 hotspots, were identified. Almost all patients presented with pulmonary cysts, however, cutaneous manifestations were relatively weak. The incidence of RCCs in over the age of 40 was 34.8%. We conducted whole-exome sequencing analysis as well as metabolite analysis in BHD associated kidney cancers. Copy number variations (CNV) are considerably different from those in sporadic cases. Very few somatic variants were commonly observed, however, variants in chromatin remodeling genes were frequently observed. Metabolite analysis revealed metabolic reprogramming towards upregulated redox regulation which may neutralize reactive oxygen species potentially produced from mitochondria with increased respiratory capacity under FLCN-deficiency.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：バート・ホッグ・デュベ 症候群 遺伝性腎腫瘍 FLCN遺伝子 BHD症候群

1. 研究開始当初の背景

バート・ホッグ・デュベ (Birt-Hogg-Dubé, BHD) 症候群は、常染色体優性遺伝性の稀な腫瘍性疾患で、顔や頸部の皮膚良性腫瘍、肺の多発嚢胞と反復性の気胸、さらに腎腫瘍を発症することが知られている。欧米例の報告では、皮膚および肺病変は良性の経過をたどるが、80%程度と高頻度で、一方、腎腫瘍は20~30%の患者に合併し、50歳前後に診断されることが多く、がんの性質を持ち本疾患の生命予後因子となっている。興味深いことに、腎腫瘍の病理組織型としては、嫌色素型腎癌やオンコサイトーマ/嫌色素の混合型腫瘍 (hybrid oncocytic/chromophobe tumor, HOCT) といった遠位尿細管系のもが多く見られるが、それ以外に乳頭状や淡明細胞型も頻度は低いが発症する。疾患の原因遺伝子であるフォリクリン (FLCN) ががん抑制遺伝子が2002年に染色体17p11.2領域より単離された。その後、欧米の中核的な疾患集積グループより、数十例程度のまとまった患者での FLCN 遺伝子の胚細胞系列変異の解析や合併疾患の臨床病態解析が報告され、遺伝子変異型の特徴や mutation hotspot の存在、また腎癌発症と関連する遺伝子変異型の存在などが報告されている。さらにオランダのライデン大学で遺伝子変異データの登録サイトが運営され、ヨーロッパのグループからは本疾患の診断基準案なども最近提唱されている。一方本邦ではこれまで本疾患の認識度は非常に低く、腎癌あるいは肺疾患合併例が学会発表や症例報告として散見されるにとどまり、日本人の患者群における分子遺伝学的解析はもとより、合併疾患や臨床病態の解析もほとんど行われていなかった。我々は2010年頃より、BHD 症候群患者についてカウンセリング・診療・病理組織診断及び遺伝子診断を開始してきた。2011年からはBHD 症候群の診療情報ウェブサイト“BHD ネット” (<http://www.bhd-net.jp/>) を開設し、医療関係者のみならず家系患者にも本疾患に関する情報を広く配信してきた。その後あまり顧みられていなかった本症候群に関して、全国の診療医や病理医などから、遺伝子診断や診療相談が急速に寄せられるようになり、比較的短期間のうちに、その総数は70家系、200名を超えるまでになった。

2. 研究の目的

先行するBHD患者の診療及び研究実績に基づいて本研究では、1)本邦のBHD 症候群患者をさらに継続的に集積し、その疫学や臨床病態の特徴の詳細を明らかにするとともに、家系患者の最適な診断法・治療・フォロー法の確立を目指す、2)本症候群に発症する病変のうち、特に腎癌に着目しその発症機構の詳細を明らかにし、新たな治療法の開発を目指す、ことを目的に本研究を遂行した。

3. 研究の方法

1) 本邦 BHD 症候群の分子遺伝学および疾患病態の解析

我々に相談依頼があった本邦の BHD 症候群およびその疑い患者の臨床病理学的情報を集積した。病理病態のスクリーニングとカウンセリングの後、責任遺伝子である *FLCN* の germline 変異検出による遺伝子診断を実施し確定診断を行った。

確定診断された家系患者における腎、肺、皮膚を含む合併病変に関する臨床病理学的解析を行った。

2) BHD 関連腎癌の腫瘍化機構の解析

腎癌組織を検体として、SV40 large T antigen を感染させ、BHD 関連腎癌の不死化細胞株の作成を試みた。

我々のグループで以前に作成した腎臓特異的な *flcn* knockout マウスあるいは heterozygous *flcn* knockout マウスに *flcn* の sequence variant を BAC clone を用いて導入しマウスの病態変化を観察することで sequence variant が phenotype に影響を及ぼす病的なものか否かの確認を行った。

BHD 関連腎癌および対となる正常腎検体の次世代シーケンサー (NGS) による全エクソン解析を行い、癌における遺伝子の網羅的変異検出を行った。同様に BHD 関連腎癌検体でのメタボライトプロファイリング解析を液体クロマトグラフィー/質量分析およびガスクロマトグラフィー/質量分析で行った。

4. 研究成果

1) 本邦 BHD 症候群の分子遺伝学および疾患病態の解析

本研究終了時点までに研究開始以前のものも含め、全体では本邦の BHD 症候群約 190 家系、490 名を集積し得た。このうちの 157 家系で病理病態のスクリーニングとカウンセリングの後、137 家系例について *FLCN* 遺伝子診断を実施し、120 例で変異を確認し確定診断にまで至った。120 例の germline 変異はエクソン (ex) 4~14 までの coding 領域の ex 8 を除いた全体に幅広く分布し、変異型の内訳は、挿入 58 (48%)、欠失 45 (38%)、ナンセンス 8 (6.7%)、スプライスサイト点変異 4 (3.3%)、スプライスサイト欠失 3 (2.5%)、ミスセンス 2 (1.7%) で、フレームシフト変異が 86% と大部分を占め、さらにナンセンス、スプライス変異も合わせると *FLCN* タンパク質が大きく破壊されるような変異がほとんどであった。また c.1285dupC (ex11)、c.1347_1353dupCCACCCT (ex12)、c.1533_1536 delGATG (ex13) の変異型が各 34、19、24 家系例に見られた。c.1285dupC は欧米例でも高頻度に検出されている変異型であるが、それ以外の 2 型は欧米例での報告はそれほど多くなく本邦例で特徴的と考えられ、本邦例では 3 ヶの hotspot が存在することが明らかとなった (発表論文)。

確定診断された家系患者 312 名における合併病変の解析では、腎癌の発症頻度は全体

では 19%で、欧米報告とほぼ同程度であったが、40 歳以上の群では 35%に達していた。診断年齢は中央値 56 歳(範囲:29~87 歳)で、VHL 病など他の遺伝性腎腫瘍症候群と比較して明らかに高年齢側にシフトしていた。腎癌の病理組織型では、嫌色素型腎癌ないしは HOCT が合わせて 78%と多く、他に乳頭状 2 型、淡明細胞型も頻度は低いが発症しており欧米例と同様な傾向であった。肺病変では CT で検出された嚢胞の合併は 98%、気胸の罹患は 74%と高率であったが、皮膚病変の合併は 50%未満で、皮膚病変がきっかけで診断に至った症例は全く見られず、本邦患者では欧米例で言われているよりも皮膚病変が軽症傾向であることが明らかとなった(発表論文)。また本研究期間内に当施設で新たに腎腫瘍が診断された BHD 患者は 5 例、8 腎で、全例腎部分切除術が行われ腎機能の温存がはかれた(発表論文)。以上より、本邦の BHD 症候群では欧米例と共通する部分とともに、明らかに異なる特徴的な臨床病態(phenotype)、遺伝子型(genotype)を持つことが確認された。また早期に本疾患を確定診断することにより、適切なフォローと治療介入が期待できると考えられた。

2) BHD 関連腎癌の腫瘍化機構の解析

BHD 関連腎癌の腫瘍化機構の研究に供する目的で、当科で手術を行った BHD 患者由来の嫌色素型腎癌を検体として不死化細胞株(BHD-F59RSVT)を新たに樹立し得た。本細胞株の特性は以下のようで、もとの *FLCN* germline mutation を保持しており、*FLCN* の somatic mutation あるいは LOH ははっきりと確認できなかった。16 番染色体 1 本の loss がみられた。*FLCN* タンパク質の発現は著名に抑制されていた。本細胞株は今後の基礎的な実験解析に有用と考えられる(発表論文)。

BHD 家系で見つかっている *FLCN* 遺伝子の H255Y, K508R という 2 つの germline ミスセンス sequence variant が病的な変異であるか否かの解析を行った。腎臓特異的な *flcn* knockout マウスは両腎の多発嚢胞を発症し、生後約 3 週で腎不全に陥り死亡するが、このマウスに *flcn* の H255Y あるいは K508R の mutant をそれぞれ導入したところ、H255Y では腎嚢胞の改善が全くみられず、また K508R では嚢胞発症時期の遅延がみられた。K508R を heterozygous *flcn* knockout マウスに導入した場合、両腎多発嚢胞と心筋肥大が観察された。以上の結果より H255Y は機能消失変異、K508R は dominant negative な機能を持つ、いずれも病的な変異である可能性が高いと考えられた(発表論文)。

我々が集積した BHD 関連腎癌 29 検体および対となる正常腎検体について遺伝子の網羅的変異検出を行った。BHD 関連腎癌では *FLCN* 遺伝子の germline mutation とともに 2nd-hit としての somatic mutation あるいは LOH が高頻度(合計 86%)にみられた。*FLCN*

遺伝子以外では複数の腫瘍で共通に変異している遺伝子としては、3 遺伝子が 3 腫瘍検体で、また 18 遺伝子が 2 腫瘍検体で変異がみられ、全体として共通に変異している遺伝子は少なかった。一方、相当数のクロマチン再構成に関わる遺伝子群や DNA 複製に関わる遺伝子群が個々の腫瘍で散発的に変異を起こしていた。散発性腎癌の各病理組織型で既に報告されている特徴的な遺伝子変異や遺伝子コピー数多型(CNV)のパターンと BHD 関連腎癌のそれとでは共通性は全くみられなかった。我々は BHD 関連腎癌の嫌色素型を中心に全染色体の CNV のプロファイリング解析を施行しており、その結果でも散発例の嫌色素型腎癌とは全く異なる CNV プロファイリングを既に見出していたが、遺伝子変異および CNV のプロファイリングからもこの結果をより強く支持するような知見であった(発表論文)。BHD 関連腎癌は、病理組織型と遺伝子型の関係が、散発例腎癌とは全く異なる特性を持つことが確認された。また BHD 関連腎癌 18 検体でのメタボライトプロファイリング解析では、解糖経路でのグルコース、ピルビン酸の増加、ペントースリン酸経路では、ribulose 5-phosphate, ribulose, ribose 5-phosphate, ribose, sedoheptulose 7-phosphate の増加、ribitol の低下、脂質代謝経路での fatty acid, monoacylglycerol の増加、TCA サイクルでは fumarate, malate の著名な減少、またグルタチオンの還元型および酸化型, cysteine-glutathione disulfate, ophthalmate の著名な増加が観察された。BHD 関連腎癌では腫瘍化に伴い特徴的な細胞内エネルギー代謝系のシフトと抗酸化ストレスに対する抵抗性の亢進が観察された(発表論文)。これらの研究をさらに進め BHD 関連腎癌の詳細を明らかにすることで、腎癌および BHD 症候群の合併疾患の新たな治療法の開発に結びつくことが期待される。

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 16 件)

Hasumi H, Furuya M, Tatsuno K, Yamamoto S, Baba M, Hasumi Y, Isono Y, Suzuki K, Jikuya R, Otake S, Muraoka K, Osaka K, Hayashi N, Makiyama K, Miyoshi Y, Kondo K, Nakaigawa N, Kawahara T, Izumi K, Teranishi J, Yumura Y, Uemura H, Nagashima Y, Metwalli AR, Schmidt LS, Aburatani H, Linehan WM, Yao M.BHD-associated kidney cancer exhibits unique molecular characteristics and a wide variety of variants in chromatin remodeling genes. Hum Mol Genet. (査読あり) 2018 May 14. doi: 10.1093/hmg/ddy181.

Iwashita H, Okudela K, Matsumura M, Yamanaka S, Sawazumi T, Enaka M, Uda N, Miyake A, Hibiya T, Miyake N, Matsumoto N, Makiyama K, Yao M, Nagashima Y, Ohashi K. Succinate dehydrogenase B-deficient renal cell carcinoma: A case report with novel germline mutation. *Pathol Int.* (査読あり) 2017 Sep 28. doi: 10.1111/pin.12587.

逢坂公人, 横溝 由美子, 蓮見壽史, 林 成彦, 槇山和秀, 近藤慶一, 中井川 昇, 矢尾正祐. 家族性腎癌に対する手術治療. *臨床泌尿器科* (査読あり) 70 巻 8. 565-572(2016.07)

Hasumi H, Hasumi Y, Baba M, Nishi H, Furuya M, Vocke CD, Lang M, Irie N, Esumi C, Merino MJ, Kawahara T, Isono Y, Makiyama K, Warner AC, Haines DC, Wei MH, Zbar B, Hagenau H, Feigenbaum L, Kondo K, Nakai gawa N, Yao M, Metwalli AR, Marston Linehan W, Schmidt LS. H255Y and K508R missense mutations in tumour suppressor folliculin (FLCN) promote kidney cell proliferation. *Hum Mol Genet.* (査読あり) 2016 Dec 22. pii: ddw392. doi: 10.1093/hmg/ddw392. 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.* (査読あり) 2016 Dec 19. doi: 10.1038/labinvest.2016.137.

Tanegashima T, Yamaguchi Y, Hamanoue H, Yao M, Furuya M, Aihara M. Clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome: A Japanese case with pulmonary cysts, fibrofolliculomas and renal cell carcinoma. *J Dermatol.* (査読あり) 2016 Dec 10. doi: 10.1111/1346-8138.13711.

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.* (査読あり) 2016 Nov;90 (5):403-412. doi:10.1111/cge.12807.

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.*

(査読あり) 2016 Jun;52:74-82. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004.

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.* (査読あり) 2016 Feb;186(2):337-46. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.013.

Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Lang M, Huang Y, Oh HF, Matsuo M, Merino MJ, Yao M, Ito Y, Furuya M, Iribe Y, Kodama T, Southon E, Tessarollo L, Nagashima K, Haines DC, Linehan WM, Schmidt LS. Folliculin-interacting proteins Fnip1 and Fnip2 play critical roles in kidney tumor suppression in cooperation with FLCN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (査読あり) 2015 Mar 31;112(13):E1624-31. doi:10.1073/pnas.1419502112.

矢尾正祐, 蓮見壽史, 近藤慶一, 中井川 昇. 遺伝性腎がん. *最新医学* (査読なし) 73 巻 3 号 Page398-404(2018.03)(総説)

Hasumi H, Yao M. Hereditary kidney cancer syndromes: Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation. *Cancer Sci.* (査読なし) 2018 Jan 11. doi: 10.1111/cas.13503. (総説)

Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Furuya M, Yao M. Birt-Hogg-Dubé syndrome: Clinical and molecular aspects of recently identified kidney cancer syndrome. *Int J Urol.* (査読なし) 2016 Mar;23(3):204-10. doi:10.1111/iju.13015. (総説)

蓮見壽史, 矢尾正祐. 家族性腫瘍症候群と腎細胞癌. *病理と臨床* (査読なし) 35 巻 10 号 Page910-914(2017.10)(総説)

蓮見壽史, 矢尾正祐. 腎癌 腎癌の分子生物学と発癌機序 癌遺伝子・癌抑制遺伝子. *日本臨床* (査読なし) 75 巻増刊 6 新腎・泌尿器癌(上) Page47-52(2017.08)(総説)

蓮見壽史, 馬場理也, 古屋充子, 矢尾正祐. Birt-Hogg-Dubé(BHD)症候群. *泌尿器外科* (査読なし) 28 巻 10 号 Page1607-1612(2015.10)(総説)

[学会発表](計 14 件)

松元加奈, 加藤生真, 入部康弘, 長嶋洋治, 中谷行雄, 蓮見壽史, 矢尾正祐, 古屋充子. VHL 遺伝子に対する FISH は Birt-Hogg-Dubé 症候群の淡明細胞型腎細胞癌診断において有用と期待される. 第 76 回日本癌学会総会, 2017/9/28, 横浜市

古屋充子, 蓮見壽史, 加藤生真, 馬場理

也,長嶋洋治,入部康弘,中谷行雄,矢尾正祐 .Birt-Hogg-Dube 症候群における腎癌の分子病理学的特徴 .第 76 回日本癌学会総会,2017/9/28,横浜市
蓮見壽史,古屋充子,辰野健二,馬場理也,横溝 由美子,逢坂公人,林 成彦,榎山和秀,近藤慶一,中井川 昇,山本尚吾,油谷浩幸,矢尾正祐 .BHD 関連腎癌の発癌機構解析 .第 105 回日本泌尿器科学会総会,2017/4/21,鹿児島市
古屋充子,加藤生真,田中玲子,長嶋洋治,黒田直人,蓮見壽史,矢尾正祐,中谷行雄 .Birt-Hogg-Dube 症候群を背景に発症する腎腫瘍の分子病理学的特徴 (Molecular pathologic analyses of renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dube syndrome) .第 106 回日本病理学会総会,2017/4/27,東京
小嶋 結,宇高直子,荒木あずみ,奥寺康司,古屋充子,山中正二,矢尾正祐,長嶋洋治,大橋健一 .腎臓に発生した Fumarate hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma の 1 例 .第 106 回日本病理学会総会,2017/4/27,東京
古屋充子,加藤生真,田中玲子,長嶋洋治,黒田直人,蓮見壽史,矢尾正祐,中谷行雄 .Birt-Hogg-Dube 症候群を背景に発症する腎腫瘍の分子病理学的特徴 (Molecular pathologic analyses of renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dube syndrome) .第 106 回日本病理学会総会,2017/4/27,東京
Yao M,Hasumi H,Osaka K,Makiyama K,Kondo K,Nakaiigawa N,Hamanoue H,Furuya M .Genetic Analyses and Management of Hereditary Kidney Cancer Syndromes in Yokohama, Japan, 2017 East Asia UroOncology Group Symposium (EAUOG), 2017/4/6,ソウル市,(招請シンポジウム)
蓮見壽史,馬場理也,古屋充子,矢尾正祐 .腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性 .第 81 回泌尿器科学会東部総会,2016/10/7,青森市
新堀萌香,蓮見壽史,荒木あずみ,横溝由美子,逢坂公人,林 成彦,榎山和秀,近藤慶一,中井川 昇,古屋充子,長嶋洋治,矢尾正祐 .Birt-Hogg-Dube(BHD) 症候群に発症した腎腫瘍に対する腎温存手術の検討 .第 81 回泌尿器科学会東部総会,2016/10/7,青森市
加藤生真,入部康弘,長嶋洋治,中谷行雄,蓮見壽史,矢尾正祐,古屋充子 .CEN17q プローブによる FISH/CISH 法 Birt-Hogg-Dube 症候群関連腎癌の診断マーカーとしての有用性 .第 75 回日本癌学会総会,2016/10/6,横浜市
古屋充子,中谷行雄,蓮見壽史,長嶋洋治,黒田直人,野村文夫,馬場理也,田中玲子,矢尾正祐 .本邦における

Birt-Hogg-Dube 症候群 130 家系の疫学解析:家族性腎がんケアに向けた BHD ネット情報 .第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会,2016/6/3,松山市
蓮見壽史,馬場理也,古屋充子,矢尾正祐 .癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性についての検討 .第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会,2016/6/3,松山市
川上兼堂,入部康弘,加藤生真,黒田直人,長嶋洋治,矢尾正祐,中谷行雄,古屋充子 .Birt-Hogg-Dube 症候群に随伴する腎癌における mTOR シグナル経路の免疫組織化学的検討 .第 105 回日本病理学会総会,2016/5/12,仙台市
佐藤元己,蓮見壽史,福井沙知,新堀萌香,逢坂公人,榎山和秀,中井川 昇,矢尾正祐 .Bird-Hugg-Dube 症候群の三徴を伴った腎腫瘍下大静脈腫瘍塞栓の 1 例 .第 80 回泌尿器科学会東部総会,2015/9/25,東京

〔その他〕

ホームページ

“BHD ネット” (<http://www.bhd-net.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾正祐 (YAO Masahiro)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号:00260787

(2) 研究分担者

中井川 昇 (NAKAIGAWA Noboru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号:00237207

古屋充子 (FURUYA Mitsuko)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号:10361445

蓮見壽史 (HASUMI Hisashi)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号:40749876