

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16574

研究課題名(和文)全エクソーム解析とターゲット遺伝子の検索による海綿状血管腫の病因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of causative genes of cavernous angiomas by whole exome sequencing and targeted sequencing

研究代表者

広田 健吾 (Kengo, Hirota)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：家族性海綿状血管腫は、常染色体優性遺伝の形をとり、CCM1、CCM2、CCM3の3つの遺伝子の関与が指摘されている。今回、家族性海綿状血管腫5例、多発性海綿状血管腫3例を対象に次世代シーケンサーを用いたCCM遺伝子の解析を行った。結果、家族性海綿状血管腫2例にCCM2変異を認め、1つは新規の変異であった。多発例では、2例にCCM1変異を認めた。多発性海綿状血管腫の症例では、潜在的に遺伝要因を含んでいる可能性があり遺伝解析は重要である。またCCM変異がない症例では、次世代シーケンサーで検出できない大きな領域の欠失、重複変異がある可能性があり、今後遺伝解析方法について検討していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿状血管腫の治療方法については、症候性であれば外科的な治療法しか方策がなく、出血前診断や予防治療などはない。これまで本邦での海綿状血管腫の遺伝解析の報告は、少数である。今回の研究で本邦での遺伝解析のデータを蓄積しただけでなく、多発性海綿状血管腫においても、遺伝子変異が同定されていることから潜在的に遺伝要因がある海綿状血管腫の症例は多いのではないかと考える。海外において創薬研究も進んでおり、本邦での海綿状血管腫の遺伝解析データの蓄積は、今後の新たな治療法の確立するうえで必要な基礎データであり今後も研究の継続が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Familial cerebral cavernous malformation (CCM) of this condition are autosomal-dominantly inherited via CCM1, CCM2, and CCM3 mutations. We performed targeted resequencing of CCM1,2,3 using next-generation sequencer in 5 cases of familial CCM, 3 cases of multiple CCM. As a result, CCM2 mutations was identified in 2 cases of familial CCM, and CCM1 mutations was identified in 2 cases of multiple CCM. One of the CCM2 mutations was a novel nonsense mutation that had never been reported. In the case of multiple CCM, it may be possible that genetic factors are potentially involved. Therefore, it is important to genetic screening in the case of multiple CCM. In addition, genetic analysis using a next-generation sequencer targets point mutations and small indels, improving the analysis method are needed to identify for other causes such as large deletion and copy number variant.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：海綿状血管腫 次世代シーケンサー 遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海綿状血管腫は、脳と脊髄の血管奇形で、成熟した血管壁要素のない単一の内皮層または正常な介在脳実質のない密集し拡大した毛細血管の集合からなる。海綿状血管腫の有病率は、およそ0.3%から0.5%と報告がある。本邦においても近年、脳ドックの普及に伴い無症候性海綿状血管腫の有病率も増加傾向であり、従来考えられてきたより高い頻度と推測する。発症形式は、頭痛、てんかん、出血による局所神経症状でみつきり、時に難治性てんかん、出血により重大な後遺症を遺す。海綿状血管腫には孤発性と家族性がある。家族性海綿状血管腫の頻度は、ヒスパニック系アメリカ人において海綿状血管腫全体の50%、白人では10-20%と報告されており決してまれではない。家族性海綿状血管腫は、孤発例と比較して、80-90%が多発性であり、より若年発症で症候性も多いのが特徴である。その遺伝形式は、常染色体優性遺伝の形をとり、これまでの遺伝解析により第7染色体長腕(7q21.2)にある *CCM1*、第7染色体短腕(7p13)にある *CCM2*、3番染色体長腕(3q25.2-q27)にある *CCM3* の3つの遺伝子座の関与が同定されている (図1)。*CCM1* は、その遺伝子として Krev Interaction Trapped 1 (*KRIT1*) が同定され、血管内皮細胞の形態と機能に関与している。また integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (*ICAP1*) と相互作用し、integrin シグナル伝達経路を介する細胞接着と遊走に影響を与えることで海綿状血管腫を誘導することが考えられている。*CCM2* は、その遺伝子として *MGC4607* が同定されており、P38 シグナルパスウェイを活性化させ細胞増殖に関与、また RhoA を活性化させ、細胞骨格に関与している。*CCM3* は、その遺伝子として programmed cell death 10 gene (*PDCD10*) が同定され、主にアポトーシスに関与している。これらの3つの遺伝子は、お互い相互作用し、さまざまなシグナルパスウェイに関与しており、どれか1つの遺伝子を欠失させることで海綿状血管腫が発生することが動物実験でわかっている (図2)。しかしながら人での海綿状血管腫の発生は、未知な点も多い。海綿状血管腫は、従来先天性の血管奇形と考えられてきたが、近年その増大、新生(*de novo formation*)に関する報告が相次ぎ、はるかに動的な後天性病変であるとも考えられている。また家族性海綿状血管腫であっても、発症年齢は20-40歳であり、画像経過観察中に *de novo formation* を認めることから、海綿状血管腫の発生には生殖細胞の段階での変異に加えてその後の経過における体細胞変異の2つの変異が関与しているのではないかと推測がされている (two-hit mechanism 説)。

上記のように海綿状血管腫は、遺伝要因は明らかではあるが、既知の病因遺伝子以外の病因遺伝子が存在している可能性や *de novo formation* から考える発生機序についてもまだ明らかになっていない点が多い。

2. 研究の目的

これまで本邦での海綿状血管腫の遺伝解析は数例の報告しかない。本研究は、日本人における海綿状血管腫の遺伝解析を行い本邦での遺伝背景を明らかにするとともに、*CCM* 遺伝子異常のない症例については、第4の病因遺伝子を探索し、発症メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

対象は、日本人の家族性海綿状血管腫5家系、多発性海綿状血管腫3例、脊髄海綿状血管腫5例とした。*CCM1*、*CCM2*、*CCM3* にあわせた領域に対し、Ion AmpliSeq™ Designer (Life Technologies 社) を用いてターゲットライブラリー作成に必要なプライマープールを使用した。作成したプライマープールを使用しマルチプレックス PCR 反応を行い、シーケンスで使用するプライマーアダプターとバーコードアダプターをライゲーションし、ターゲットライブラリーを作成した。Low throughput NGS である Ion PGM™ シーケンサー (Life Technologies 社) を用いて *CCM1*、*CCM2*、*CCM3* 遺伝子の全てのエクソンをリシーケンスした。Variant Caller 4.0 (Life Technologies) を用いて変異を抽出し、抽出された変異をサンガー法にて確認した。抽出された変異を CCM Mutation Database (<http://www.angiomaalliance.org/pages.aspx?content=345&id=289>), NCBI ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) のデータベースと照合し変異について解析を行った。*CCM1*、*2*、*3* の変異が同定されなかった症例に対しては、全エクソーム・シーケンシングを行った。

4. 研究成果

家族性海綿状血管腫5家系中2家系に関して、*CCM2* p.Q157X と *CCM2* p.K145K を同定した。*CCM2* p.K145K の変異例について、発端者の母、弟、親族に2人海綿状血管腫を認め濃厚な家族歴があった。今回、発端者と発端者の父親と母親に解析を行い、発端者と母親に *CCM2* p.K145K を認めた。*CCM2* p.K145K は過去に報告のない新規のスプライシング変異であった。多発性海綿状血管腫2例に関して、*CCM1* 遺伝子異常 (*CCM1* p.E283X, p.Q574X) を認めた。*CCM1* p.Q574X の症例は、小児例で、脳幹出血で発症、胸髄にも海綿状血管腫を認めた。父親と母親も遺伝子解析を行い父親からも同じ変異を認めた。父親は、これまで頭蓋内病変の精査は行われていないため海綿状血管腫の罹患について確認できていないが、無症候の海綿状血管腫をもっている可能性はある。脊髄海綿状血管腫の5例については、*CCM1*、*2*、*3* 遺伝

子異常はなかった。

これまで海外での海綿状血管腫遺伝解析では、*CCM1* の変異が 1 番多く約 40%、*CCM2* 15-20%、*CCM3* 10-40% と報告されている。本邦において大規模解析はないが、日本人 8 症例による家族性海綿状血管腫の遺伝解析では、*CCM1* 20%、*CCM2* 30%、*CCM3* 10% と報告があり、これまでの報告と違いがあった。一方で我々の過去に解析した 3 家系 (*Hum Genome Var.* 2016;3:16032 doi:10.1038/hgv.2016.32) を含めた結果では、*CCM1* 変異が 3 家系、*CCM2* 変異が 2 家系であった。近年、人種間によって病因遺伝子の違いや頻度に違いがあることが報告されており、今後も本邦でのデータ蓄積の継続が必要であると考えられる。また今回の検討で家族性、多発性ともに *CCM1*, 2, 3 の変異がない症例があった。これらの中に次世代シーケンサーで検出できないエクソン欠失など大きな領域の欠失、重複変異をもっている可能性がある。点変異がなかった症例については、*CCM1*, 2, 3 以外の病因遺伝子を全エクソームシーケンスで解析するとともに Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いた解析など海綿状血管腫の遺伝解析方法についても改良が必要であり研究を継続している。

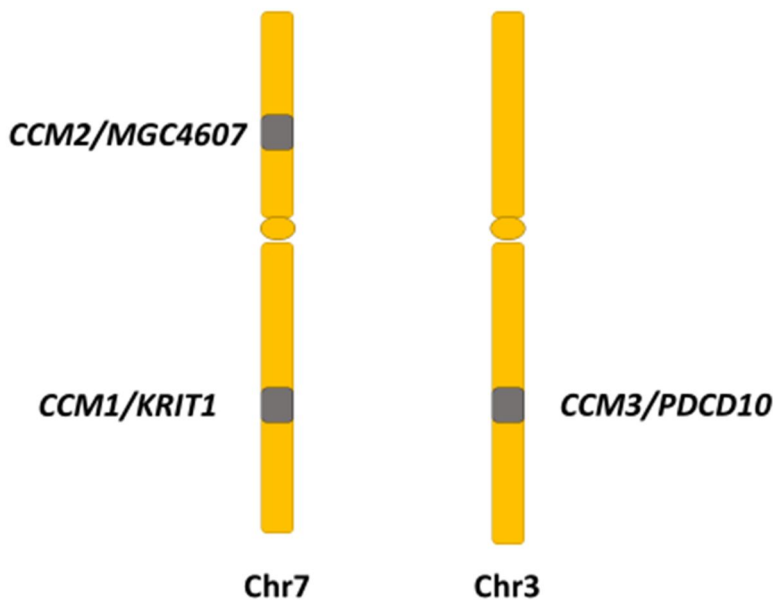


図1 海綿状血管腫の遺伝子座と遺伝子

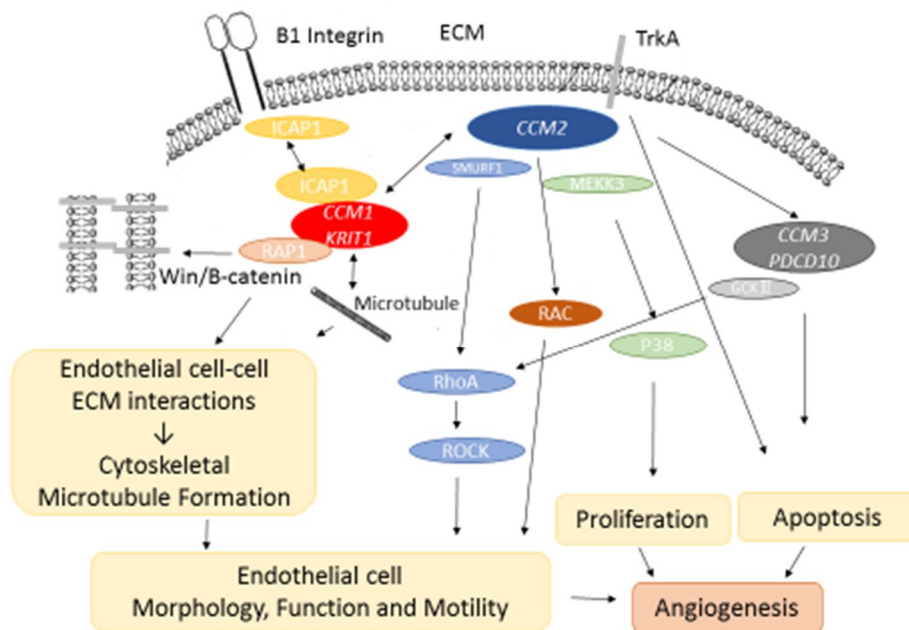


図2 内皮細胞でのCCM proteinsのシグナル伝達経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----