

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790767

研究課題名（和文）Birt-Hogg-Dubé 症候群の網羅的遺伝子診断と肺嚢胞形成機序解明の試み

研究課題名（英文）Study on the germline *FLCN* mutations and the mechanism of pulmonary cyst formation in Birt-Hogg-Dubé syndrome

研究代表者

吉川美加（KIKKAWA MIKA）

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：90327792

研究成果の概要（和文）：肺嚢胞を形成し自然気胸を繰り返す Birt-Hogg-Dubé（BHD）症候群の肺嚢胞形成機序の手がかりを得るため、BHD 患者肺由来線維芽細胞と正常肺線維芽細胞の遊走能及びゲル収縮能について比較した。その結果、患者肺由来線維芽細胞では遊走能の低下、細胞接着や増殖に関係する分子である *TGFβ1*、*fibronectin*、*type I collagen* などの発現量低下を認めた。また、数年前より行っている BHD 症候群原因遺伝子フォリキュリン（*FLCN*）の変異解析は現在までに約 120 例の症例を蓄積しており、遺伝子変異型と臨床症状の相関関係について精査を行っている。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the mechanism of pulmonary cyst formation in Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome, I examined the germline *FLCN* mutation in patients with BHDS and functional assay of lung fibroblasts isolated from patients with BHDS. Germline *FLCN* mutations I identified distributed all exons of the *FLCN* gene, but four mutations were frequently demonstrated in our Japanese BHDS patients. Genotype-phenotype correlation is currently under investigation. As for functional analysis of BHDS lung fibroblasts, I examined proliferation and the ability of migration and gel contraction. As compared with human fetal lung fibroblasts (HFL), lung fibroblasts from BHDS showed decreased migration toward fibronectin while proliferation and gel contraction ability was similar to those with HFL. In addition, the expression of *TGF beta 1*, *fibronectin*, *type I collagen* was decreased in BHDS lung fibroblasts when determined by real-time PCR.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学・遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：Birt-Hogg-Dubé 症候群 (BHD 症候群)・嚢胞性肺疾患・気胸・遺伝子検査・フォリキュリン (Folliculin/FLCN)

## 1. 研究開始当初の背景

Birt-Hogg-Dubé (BHD) 症候群は肺嚢胞と気胸、腎腫瘍を3大症状とする常染色体優勢遺伝性疾患であり、その原因遺伝子は17番染色体上(17p11.2)にあるフォリキュリン(*Folliculin/FLCN*)であることがわかっている。*FLCN*は腫瘍抑制遺伝子であるが、BHD症候群患者の肺病変部には腫瘍の発生を認めず、症状は肺嚢胞形成と反復気胸に限られる。我々のグループはBHD症候群患者の肺嚢胞の数、大きさ、分布などを解析し、BHD症候群患者の肺嚢胞は数が少なく大きさが不揃いで不整形であり肺底部・縦隔側に分布することを明らかとした。この領域は呼吸に伴う肺の伸展や心臓の拍動による力学的ストレスを受けやすい部分であり、*FLCN*遺伝子の変異が細胞に力学的脆弱性をもたらし、肺嚢胞形成へとつながっているのではないかという仮説をたて、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、BHD症候群患者の主要な症状である肺嚢胞の形成機序について、*FLCN*遺伝子変異肺細胞は力学的に脆弱であり心臓の拍動などにより力学的負荷がかかった結果、細胞がアポトーシスを起こし肺嚢胞を形成するという新しい仮説を提案し、その立証を試みた。

同時に、2005年より行っているBHD症候群原因遺伝子*FLCN*の変異解析を継続し、地区制した症例をもとに、遺伝子変異型と臨床症状の間に何らかの相関関係が成り立つのではないかと検討した。DHPLC法で変異が見つからない症例について定量リアルタイムPCR法を用い広範囲なゲノム欠失が起きていることを明らかとしているが、更に詳細な検討のため高密度マイクロアレイを用いて染色体コピー数解析も試みた。

## 3. 研究の方法

1) DHPLC法とによる*FLCN*遺伝子変異解析を続行し症例を蓄積して臨床症状と遺伝子変異型に相関関係があるかを確認する。同時に、DHPLC法で解析できない変異に対しては定量リアルタイムPCR及び高密度マイクロアレイ解析を行う

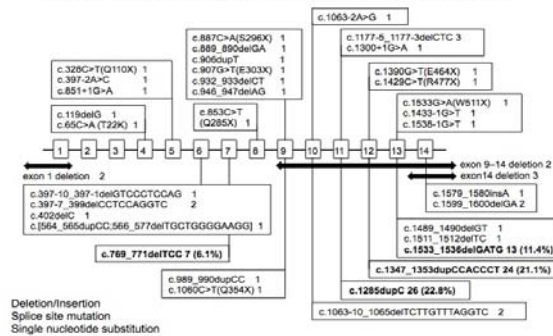
2) *FLCN*変異肺細胞が力学的に脆弱であることを証明するため、BHD患者由来肺線維芽細胞と正常肺線維芽細胞を用いて遊走能及びゲル収縮能の比較と、細胞接着分子や各種細胞増殖因子などの発現量比較を行う

## 4. 研究成果

1) DHPLC法と定量リアルタイムPCR(Q-PCR)法を用いた多発性肺嚢胞を持つ患者

の*FLCN*遺伝子変異解析では、現在までに120例ほどの症例を蓄積した。

### FLCN mutations found in 113 families with BHDs

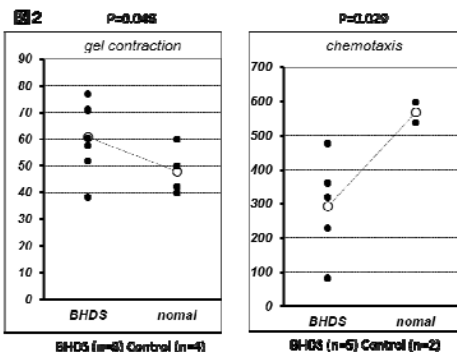


蓄積した個々の*FLCN*遺伝子変異型のうち例数の多い変異型3種類と肺・皮膚・腎に生じるBHD症候群3大臨床症状の関連性を検討したが明らかな差は認められなかった。皮膚疾患は約20-30%に認め、腎腫瘍は5%前後に認めた。気胸発症年齢は30歳代から40歳代にピークがあり、その後発症頻度は減少していた。気胸の家族歴を約70%前後に認め、両側同時気胸を発症する事例を約10%に認めた。今後も症例を集積し、検討を継続する予定である。

また、DHPLC法よりもハイスループットな解析法を求めてHRM(High Resolution Melting)法を試みたが、変異検出の正確性に劣っており思ったほどの高速化も行えなかったため、HRM法への移行は見送った。

2) DHPLC法により変異を同定できない症例についてDNAマイクロアレイ解析を行ったが、コピー数異常は検出できなかった。プローブが配置されていない微細な領域にコピー数変化が起きている可能性と、疾患関連SNPの有無の可能性について検討中である。

3) BHD患者肺組織から単離した線維芽細胞と肺癌手術例の非癌部から単離した線維芽細胞(コントロール線維芽細胞)の遊走能及びゲル収縮能について比較した結果、患者肺由来線維芽細胞は遊走能が有意に低下していることがわかった。また、Q-PCRを行った結果*TGFβ1*, *fibronectin*, *type I collagen*の発現量が低下していることが示された。



これらの結果を確認するため、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 (HLF) を siRNA により *FLCN* をノックダウンして機能変化を検討した。その結果、遊走能が低下し、患者由来肺線維芽細胞を用いた実験結果と合致していた。

本研究において siRNA を用いた *FLCN* ノックダウン実験により BHD 症候群肺線維芽細胞では遊走能が低下していることを示すことができ、BHD 症候群発症原因への手がかりを得ることができた。引き続き基盤研究 (C) の助成を得られたので、次のステップでは、伸展培養による機能評価を行いたい。また、今後は頻度の多い変異型 4 種類を組み込んだベクターを作成、それぞれ肺線維芽細胞に導入し、細胞機能の解析及び遺伝子発現の違いを検討したい。

一方、*FLCN* 遺伝子変異検査については従来からの DHPLC 法に何らかの工夫を行う、あるいは全く別の新規解析法を検討するなどして、ハイスループット化をはかっていくことが重要であると考えている。

## 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 2 件)

① Characteristics of pulmonary cysts in Birt-Hogg-Dubé syndrome: Thin-Section CT findings of the chest in 12 patients.

Tobino, K., Gunji, Y., Kurihara, M., Kunogi, M., Koike, K., Tomiyama, T., Johkoh, T., Kodama, Y., Sasaki, S., Kikkawa, M., Takahashi, K., Seyama, K.

Eur J Radiol. 77(3) 403-9 2011 査読有

② Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dubé syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature.

Kunogi, M., Kurihara, M., Shigihara Ikegami, T., Kobayashi, T., Shindo, N., Kumasaka, T., Gunji, Y., Kikkawa, M., Iwakami, S., Hino, O., Takahashi, K., Seyama, K.

Journal of Medical Genetics. 47(4) 281-7 2010 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 吉川美加、米国胸部学会 2011 (ATS2011)、*FLCN* mutation and clinical manifestations of patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome whose presenting feature was pneumothorax and/or multiple lung cysts、2011.5.15、Denver, USA

[その他]

ホームページ等

気胸・肺嚢胞スタディグループ

<http://www.lungcare.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川美加 (KIKKAWA MIKA)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：90327792

### (2) 研究協力者

瀬山邦明 (SEYAMA KUNIAKI)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10226681