

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 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590365

研究課題名（和文）肺嚢胞および肺癌発生に関する新たな分子病理学的解析：BHD 遺伝子の果たす役割

研究課題名（英文）Role of BHD gene in the development of pulmonary cysts and cancer: A molecular-pathological analysis

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

研究成果の概要（和文）：Birt-Hogg-Dube (BHD) 症候群 10 家系、13 名の患者につき臨床病理学的解析とフォリキュリン (BHD) 遺伝子変異の解析を施行し、内 9 名の肺嚢胞切除組織の病理組織学的、免疫組織化学的、分子病理学的検索を併せて行い、発生機序の解明を試みた。その結果、BHD 症候群関連肺嚢胞の本態はフォリキュリンの haploinsufficiency による mTOR 経路の緩徐な活性化に関連して発生する、特異な過誤腫様の嚢胞状肺胞形成であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Thirteen patients from 10 families underwent genetic analysis of the *folliculin* gene and were diagnosed as suffering from Birt-Hogg-Dube (BHD) syndrome; of these, pulmonary cysts resected surgically in 9 patients were studied histopathologically, immunohistochemically and molecular-pathologically. The results suggested the BHD syndrome-associated lung cyst may be a hamartoma-like aberrant cystic alveolar formation possibly caused by mild activation of the mTOR pathway under haploinsufficiency of folliculin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：Birt-Hogg-Dube 症候群・フォリキュリン・肺嚢胞・気胸・mTOR 経路

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで様々な肺疾患の病理学的解明を手がけてきた。それらの研究過程で、原因不明の反復性気胸症例に遭遇し、この症例において後述する特定の遺伝子異常が多

発性肺嚢胞形成に関与する現象に着目した。病理組織学的検索からこの肺嚢胞は気腫性嚢胞とは全く異なる新しいタイプであることを見だし、その発生機構の解明と同遺伝子の肺組織での機能解析にむけた基盤研究

を立ち上げた。さらに、同遺伝子が癌抑制遺伝子である可能性が高いことから、肺嚢胞のみならず肺癌発生に関与する可能性があるという新たな仮説を立てるに至った。

Birt-Hogg-Dubé (以下 BHD) 症候群は、多発性肺嚢胞及び自然気胸、皮膚毛嚢性腫瘍、腎腫瘍を高率に発症する常染色体優性遺伝性疾患である。folliculin (以下 FLCN) とよばれる蛋白質をコードする *Folliculin* 遺伝子の変異が関与すると考えられている。腎特異的 BHD ノックアウトマウスにおける研究から、*Folliculin* 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能を有すると推測されているが、肺における *Folliculin* 遺伝子の機能や呼吸器疾患との関連については殆ど分かっていない。

我々は、多発性の肺嚢胞性変化を呈する患者について遺伝子解析を行い、ユニークなシーケンスのリポートからなる *Folliculin* 遺伝子変異を同定した (Koga S et al. *Pathol Int*, 2009)。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究と考察から、反復性肺気胸をきたす呼吸器疾患の中に、*folliculin* 遺伝子変異による嚢胞性病変が少なからず存在するが、その認識が不十分なため自然気胸として対処されていると推測する。そこで本研究は千葉大学および関連施設病院の気胸症例、多発性嚢胞患者のデータ解析を通して、本症候群における肺疾患発症機構の解明を目的とする。また、同遺伝子異常が肺癌発生に関与する可能性につき検討する。

具体的には、

- I) 気胸手術検体の病理学的再検討と潜在性の *folliculin* 遺伝子変異パターン抽出
- II) 肺癌手術検体を用い *folliculin* 遺伝子異常 (変異・LOH・promoter methylation) の検索

III) *folliculin* 遺伝子産物である FLCN の正常肺における発現検討と分子生理学的機能の考察

IV) *folliculin* 遺伝子導入/ノックダウン細胞実験による機能解明—FLCN と相互作用する AMPK, mTOR 経路が細胞周期やアポトーシスおよび影響の検討

3. 研究の方法

I) 千葉大学医学部附属病院および関連施設の気胸による肺嚢胞切除症例を中心に BHD 症候群の疑われる症例の臨床病理学的検索と *folliculin* 遺伝子の germline 変異の解析

II) BHD 症候群患者に発生した肺癌の *folliculin* 遺伝子座に関する LOH 検索と BHD 症候群肺嚢胞の増殖性変化の検索

III) BHD 症候群切除肺および正常肺における *folliculin* の発現と mTOR 経路を中心とした関連タンパクの発現解析

IV) *folliculin* 遺伝子導入培養細胞系の樹立と *folliculin* 強制発現に連動する遺伝子系の解析

4. 研究成果

1) 10家系の Birt-Hogg-Dubé (BHD) 症候群患者 13名について臨床病理学的検討と遺伝子解析を施行した。肺嚢胞の組織学的、免疫組織化学的、分子病理学検索を行い、BHD 症候群関連肺嚢胞の特徴として、①小葉間隔壁や臓側胸膜と密接な関連を有して発達する、肺胞上皮に内腔面を覆われた嚢胞である、②時に内部に複数の肺胞腔様構造を形成する、③嚢胞上皮や嚢胞近傍肺胞上皮に mTOR 経路の活性化を示唆する phospho-S6 リボソームタンパクの発現を認めるが、フォリキュリンの発現は保たれている、④嚢胞壁の線維性肥厚や嚢胞腔の複雑化、ブラないしブラ様変化を二次性変化として認める、を明らかにした。

folliculin 遺伝子変異として、エクソン 5, 11-14、イントロン 5 に新規変異を含む 7 種類の変異を認めた。(Furuya M et al. Am J Surg Pathol 2012;36:589-600. 西井鉄平他. 日本病理学会総会、2012)。遺伝子変異型と表現型の間には明らかな関係を見いだせなかった。しかし、欧米での報告に多い変異型と日本人の変異型には相違のある可能性が示唆された。

BHD 症候群関連肺嚢胞で切除された肺組織の 1 例について western blotting を施行し、正常肺に比して p-mTOR, p-S6, p-Akt, HIF-1 α , VEGF の発現亢進を認めた。

以上の結果は BHD 症候群肺嚢胞がフォリキュリンの haploinsufficiency による mTOR 経路の緩徐な活性化に関連して発達する過誤腫様の嚢胞状肺胞形成であるという仮説を支持するものと考えられた。従来、BHD 症候群関連肺嚢胞の組織学的特徴や発生機序はほとんど不明であったが、今回の上記研究成果により、同肺嚢胞の組織診断精度が向上し、BHD 症候群の早期診断に貢献すると考えられる。また、BHD 症候群関連肺嚢胞の発生機序について新たな仮説を支持する結果を得たことで、今後、再発性気胸を合併しやすい本症候群の治療戦略についての方向性を示すことができた。

2) BHD 症候群肺嚢胞患者で肺腺癌を合併した 1 症例について、腫瘍部分の microdissection を施行して *folliculin* 遺伝子の LOH を解析したが LOH は認めなかった。また、多数例の BHD 症候群関連肺嚢胞には腫瘍発生につながる可能性のある増殖性変化を示唆する像は認められなかった。

3) 培養細胞系

① BHD の発現解析

平成 21 年度に樹立した HEK293 細胞 tetracycline 誘導性 *folliculin* 強制発現系を用いて、tetracycline (tet) 投与後の BHD の mRNA 及びタンパク質の発現確認を行った。Real-time PCR の結果より、tet 投与 24 時間後に、*folliculin* は mRNA レベルで 10~20 倍の BHD の発現誘導を認めた。*folliculin* には N 末端に HA が tag されており、抗 HA 抗体で検出が可能である。ウエスタンブロッティングの結果より、tet 投与後 4 時間後から BHD のバンドを認め、これは 36 時間後まで持続していた。抗 HA 抗体を用いた細胞免疫染色では、BHD は核と細胞質の両方にびまん性に検出され、特に核内に強いシグナルを認めた。

② DNA Microarray 解析

tet 投与 24 時間後の、tet 投与群と非投与群(コントロール)の HEK293 細胞より total RNA を抽出し、DNA Microarray (Agilent Array, Whole Human Genome 4x44K v2) を用いて、*folliculin* 強制発現時に発現が変動する遺伝子を検索した。コントロール群と比較して、2 倍以上発現変動する主要な遺伝子群を表 1 にまとめた。

表1 cDNA Microarray 結果

Gene symbol	Log2 ratio	Possible functions
CTSG	3.60	Lysosomal protease (cathepsin)
PLCZ1	3.59	Phospho lipase C
SPO11	3.31	meiotic protein covalently bound to DSB homolog
PPP2R2B	3.06	Protein phosphatase
GABA R γ 2	2.34	GABA A receptor, γ 2
HSPA1A	2.22	Chaperone
MYBPC1	2.18	myosin binding protein C
FGF12	1.05	fibroblast growth factor 12
ATP2B3	-2.03	ATPase,
RAPGEF3	-2.06	Rap guanine nucleotide exchange factor
ALX3	-2.08	ALX homeobox 3
CIDEB	-2.11	cell death-inducing DFFA-like effector b
LCE3E	-2.42	late cornified envelope 3E
GSTP2	-2.43	glutathione S-transferase
AOX2P	-2.48	aldehyde oxidase 2

③ Real time PCR による発現確認

folliculin 強制発現により DNA Microarray にて 2 倍以上誘導される遺伝子のうち、SPO11

と FGF12 の発現の時間経過を Real time PCR で確認した。SP011 遺伝子は tet 投与 12 時間後に発現ピークがあり、FGF12 は 36 時間後の発現誘導を確認した。
4) BHD 症候群腎腫瘍母娘例について腎腫瘍の組織学的検索と遺伝子変異検索した。それぞれ分類不能型腎腫瘍と hybrid oncocytoma/chromophobe renal cell carcinoma であり、新規生殖細胞系列遺伝子変異、エクソン 5 の 18塩基欠失 (c.332_349del/p.H111_Q116del) を認めた (Nagashima Y et al. Int J Urol 2012;19:468-470)。

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 31 件)

- ① Furuya M, Tanaka R, Koga S, Yatabe Y, Gotoda H, Takagi S, Hsu YH, Fujii T, Okada A, Kuroda N, Moritani S, Mizuno H, Nagashima Y, Nagahama K, Hiroshima K, Yoshino I, Nomura F, Aoki I, Nakatani Y. Pulmonary cysts of Birt-Hogg-Dubé syndrome: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 9 families. Am J Surg Pathol. 査読有 2012;36(4):589-600. doi:10.1097/PAS.0b013e3182475240
- ② Nagashima Y, Furuya M, Gotohda H, Takagi S, Hes O, Michal M, Grossmann P, Tanaka R, Nakatani Y, Kuroda N. FLCN gene-mutated renal cell neoplasms: Mother and daughter cases with a novel germline mutation. Int J Urol. 査読有 2012;19(5):468-470. doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02945.x. Epub 2011 Dec 29.
- ③ 古賀俊輔, 古屋充子, 中谷行雄. Birt-Hogg-Dubé syndrome 症候群. 日本臨床 査読有 2010; 68(2): 361-9.

[学会発表] (計 59 件)

- ① 古屋充子: Birt-Hogg-Dube 症候群と確定

した 10 家系における肺嚢胞の病理学的検討. 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 28 日, 京王プラザホテル (東京)

- ② Koga S. A clinicopathological study of pulmonary cysts in 11 BHD families. The fourth BHD symposium. March 29th, 2012, Cincinnati, Ohio, USA
- ③ Nishii T. Accelerated mTOR signaling in the lung of Birt-Hogg-Dube syndrome. The fourth BHD symposium. March 29th, 2012, Cincinnati, Ohio, USA
- ④ Nakatani Y. Pneumothorax-related lung diseases. In symposium: Newly evolving concepts in non-neoplastic pulmonary diseases. 7th Asia Pacific IAP Congress May 22, 2011, Taipei, Taiwan
- ⑤ 古屋充子: Birt-Hogg-Dube 症候群と確定した 4 家系における多発性肺嚢胞の病理学的特徴. 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 29 日, パシフィコ横浜 (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bhd-net.jp/>

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: 20137037

(2) 研究分担者

古屋 充子 (FURUYA MITSUKO)
横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00336538
山口 淳 (YAMAGUCHI ATSUSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 00314336
廣島 健三 (HIROSHIMA KENZO)
東京女子医科大学八千代医療センター・教授
研究者番号: 80218833
坂入 祐一 (SAKAIRI YUICHI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 30551949

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

古賀 俊輔 (KOGA SHUNSUKE)
千葉大学・医学部附属病院・後期研修医