

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591177

研究課題名(和文) Birt-Hogg-Dube症候群のFLCN遺伝子解析と肺嚢胞形成分子機構の解明

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

研究代表者

吉川 美加 (KIKAWA, MIKA)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90327792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：気胸・多発性肺嚢胞を契機にBHDSが疑われた日本人Birt-Hogg-Dube症候群(BHDS)患者のFLCN遺伝子診断を継続して行い、診断症例数は200例を超えた。日本人に多い変異はexon11のc.1285dupC、exon12のc.1347\_1353dupCCACCCT、exon13のc.1533\_1536delGATGであった。本邦初の変異、ゲノム欠失の症例も複数確認した。BHDS患者とコントロールの肺線維芽細胞を比較したところ、増殖能は差はなかったが、BHDS線維芽細胞の遊走能は低下していた。フォリキュリン遺伝子発現量には差はなかったが、蛋白量はコントロールに比べ有意に減少していた。

研究成果の概要(英文)：Pneumothorax, multiple lung cysts to opportunity was carried out to continue the FLCN gene diagnosis of Japanese BHDS was suspected Birt-Hogg-Dube syndrome (BHDS) patients, diagnostic number of cases has exceeded the 200 cases.

Many mutations in Japanese exon 11 of c.1285dupC, of exon 12 c.1347\_1353dupCCACCCT, was c.1533\_1536delGATG of exon 13. Japan's first mutation, genomic deletion cases were also confirmed multiple cases.

A comparison of lung fibroblasts BHDS patients and controls, but proliferation ability was no difference, migratory ability of BHDS fibroblasts was decreased. FLCN gene expression level was not different, FLCN protein level of BHDS fibroblasts was decreased.

研究分野：分子生物学

キーワード：BHD症候群 気胸 嚢胞性肺疾患 遺伝子検査 肺嚢胞

## 1. 研究開始当初の背景

Birt-Hogg-Dubé(バート・ホッグ・デュベ)症候群(BHDS)は、鼻を中心とした顔面、頸部、上胸部の毛孔に一致した線維毛嚢腫(毛嚢付属器の良性腫瘍)を生じる常染色体優性皮膚遺伝性疾患として1977年に初めて報告された。その後、内臓疾患として肺嚢胞と気胸、腎腫瘍を合併することが明らかとなり、2002年には原因遺伝子として腫瘍抑制遺伝子であるフォリキュリン(*Folliculin/FLCN*)遺伝子が同定された。フォリキュリン遺伝子は、14個のエクソンから構成され、17番染色体上(17p11.2)に位置する。我々は、気胸を反復し原因不明の多発肺嚢胞を有するが、線維毛嚢腫や腎腫瘍を認めない症例にフォリキュリン胚細胞遺伝子変異を同定し、2007年に肺病変のみのBHDS症例があり得ること、多発性の嚢胞性肺疾患の基礎疾患として重要であることを報告した。

フォリキュリン遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であり、細胞増殖や栄養素シグナル伝達系で機能するフォリキュリンをコードする。BHDSに合併する腎腫瘍では、野生型フォリキュリン遺伝子にloss-of-function type変異が生じKunudson's 2-hit理論が成立していることが明らかになっている。しかし、肺病変では皮膚や腎臓と異なり腫瘍の発生は認めず、その表現型は肺嚢胞やそれに基づく反復性の気胸に限られている。我々は、BHDS症例の肺嚢胞の数、大きさ、形、および分布を解析し、数は少ないが、大きさの不揃いで不整形の嚢胞が肺底部・縦隔側よりに分布する特徴があることを明らかにし、これらの点が他の嚢胞性肺疾患との鑑別に有用であることも明らかにした。しかし、肺には腫瘍ではなく嚢胞が生じるメカニズムについては未解決である。

以上の学術的背景と従来の研究成果から、BHDS症例に肺嚢胞が生じる分子機構として「フォリキュリン遺伝子のhaploinsufficiency(ハプロ不全)により肺線維芽細胞(およびその他の肺構成細胞)に機能異常が生じ、組織障害時の修復能あるいは生存に問題があり嚢胞形成に至る。嚢胞の分布から、障害が起こりやすい部位は呼吸に伴う肺の伸展や心拍動による力学的ストレスを受けやすい肺底部や縦隔領域に生じやすい」という仮説をたて、上記仮説を検証し、BHDS症例の肺嚢胞形成の分子機構を明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、Birt-Hogg-Dubé(バート・ホッグ・デュベ)症候群(BHDS)における肺嚢胞形成の分子機構を明らかにしようと試みた。

これまでに取り組んできたフォリキュリン(*Folliculin/FLCN*)遺伝子解析、胸部レント

ゲン画像及びCT画像、皮膚・腎臓病変の有無や肺嚢胞の分布状態やその数など臨床像の解析結果を基盤とし、本研究ではBHDS患者の肺線維芽細胞の機能(遊走能やコラーゲンゲル収縮能)や遺伝子発現プロファイルを解析し、健常人肺線維芽細胞(以下、コントロール肺線維芽細胞と呼ぶ)と比較する。さらに、分子生物学的手法を駆使してコントロール肺線維芽細胞のフォリキュリン遺伝子発現をノックダウンする、BHDS患者から同定した変異フォリキュリン遺伝子をコントロール肺線維芽細胞に遺伝子導入する、等の方法によりBHDS患者の肺線維芽細胞で得られた結果を再現できるかどうか検討する。

同時に、2005年より行っているBHD症候群原因遺伝子フォリキュリンの変異解析も継続し、症例の蓄積もすすめ、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も継続して行う。

DHPLC法で変異が見つからない症例については定量リアルタイムPCR法を用いて広範囲なゲノム欠失が起きていることを明らかにしているが、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

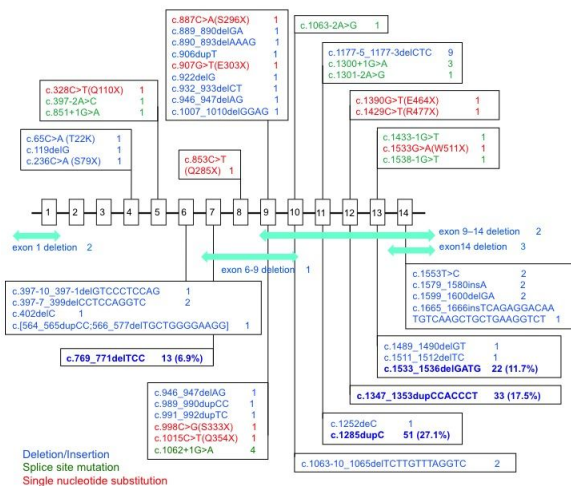
気胸・嚢胞性肺疾患症例のフォリキュリン遺伝子診断を継続し、BHDS症例を集積する。手術時に得られる肺組織から肺線維芽細胞を培養し、機能(増殖能、遊走能、ゲル収縮能)や遺伝子発現プロファイルを調査し、BHDS患者と健常対照を比較検討する。対照肺線維芽細胞のフォリキュリン遺伝子発現をノックダウンした場合、あるいはBHDS患者で高頻度に検出される変異型フォリキュリン遺伝子を対照肺線維芽細胞に強制発現させた場合、BHDS患者肺線維芽細胞と同様の機能異常や遺伝子発現プロファイルに変化するかどうか検討する。最後に、肺線維芽細胞を力学的ストレス環境下(伸展培養)で培養した際の、生着、アポトーシス、遺伝子発現プロファイル等への影響を、BHDS患者肺線維芽細胞、対照肺線維芽細胞、フォリキュリン遺伝子発現をノックダウンした肺線維芽細胞、変異型フォリキュリン遺伝子を強制発現させた対照肺線維芽細胞、で検討して比較する。

## 4. 研究成果

1) DHPLC法(温度変性高速液体クロマトグラフィー法)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フォリキュリン遺伝子変異解析では、188例の症例を蓄積した。

変異の内訳は、挿入欠失変異158例、スプライスサイト変異13例、塩基置換9例、ゲノム欠失8例であった。

FLCN mutations found in 188 families with BHDs



蓄積した個々のフォリキュリン遺伝子変異型のうち例数の多い変異型4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、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。

Correlation between genotype and clinical features

exon	FLCN変異	n	M/F	BHD診断時年齢	気胸	皮膚疾患	腎疾患
exon 11	c.1258dupC	26	8M/18F	45.3±11.6 (42.5)	26 (100)	4 (15.4)	0
exon 12	c.1347_1353dupCCACCCT	24	3M/21F	46.9±12.3 (46)	17 (77.3)	10 (41.7)	3 (12.5)
exon 13	c.1533_1526delGATG	13	7M/6F	46.2±12.7 (48)	12 (92.3)	4 (30.8)	1 (7.7)
exon 7	c.769_771delTCC	7	3M/4F	56.0±19.6 (52)	7 (100)	2 (28.6)	0

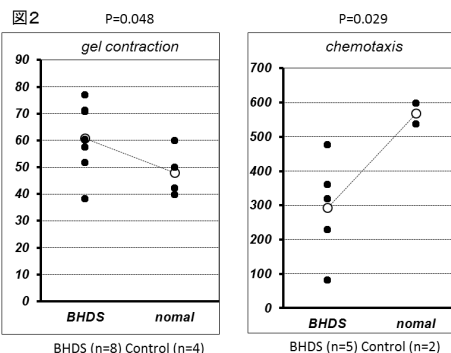
初回気胸時年齢	初回気胸側	右気胸合計回数	左気胸合計回数	総気胸回数
35.9±13.5 (34)	14R/11L/1RL	2.2±2.1 (1.5)	1.3±1.3 (1)	3.7±2.8 (3)
33.6±10.8 (32)	8R/8L/2RL	1.8±1.2 (2)	1.3±1.3 (1)	3.2±1.9 (3)
33.6±14.1 (26)	6R/6L	1.5±1.3 (2)	1.6±1.1 (2)	3.7±2.4 (3)
36.4±20.0 (29)	5R/2L	2.7±1.7 (2)	1.1±0.9 (1)	3.9±2.0 (3)

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。解析手法を複数用いて微細な領域にコピー数変化が起きている可能性も検討したが、明らかな変化は見られなかった。疾患関連SNPデータベースの更新により何らかの結果が見いだせる可能性を考え、データは今後も定期的に検討していきたいと考えている。

3) BHDs症例の気胸手術時に切除される肺組織の一部から11例、原発性肺癌により肺葉切除術を受ける症例の非癌部肺組織の一部から

9例(コントロールとした)、肺線維芽細胞を培養した。これらの肺線維芽細胞を用いて増殖能、遊走能とゲル収縮能について比較検討した。その結果、増殖能はBHD症例とコントロールで差はなかったが、コントロールに比べBHDs線維芽細胞の遊走能は有意に低下していることがわかった。BHDs症例の肺線維芽細胞におけるフォリキュリンの発現を検討したところ、リアルタイムPCR法による遺伝子発現解析ではコントロールとの間に有意差を認めなかったが、ウエスタンブロット法によりフォリキュリン蛋白量を検討した結果ではコントロールに比べて有意に減少していた。一方、TGF-β、Fibronectin1、COL1A2(type collagen)などの細胞遊走能や接着に關する遺伝子についてBHDs肺線維芽細胞で有意な発現量の低下を認め、さらにTGF-β、Fibronectinについては培養上清中の蛋白量の減少も確認できた。



これらの結果を確認するため、ヒト胎児肺線維芽細胞株HLF-1を用いてshRNAによるフォリキュリン遺伝子ノックダウンして機能変化を検討した。その結果、増殖能には影響はなかったが遊走能が有意に低下する事を確認し、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。一方、HLF-1に野生型フォリキュリンを過剰発現させると遊走能が亢進したが、変異型フォリキュリンを過剰発現させても変化はなかった。

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4件)

Characterization of pulmonary cysts in Birt-Hogg-Dubé syndrome: histopathological and morphometric analysis of 229 pulmonary cysts from 50 unrelated patients. Kumasaka T, Hayashi T, Mitani K, Kataoka H, Kikkawa M, Tobino K, Kobayashi E, Gunji Y, Kunogi M, Kurihara M, Seyama K. Histopathology. 2014 Jul;65(1):100-10. doi: 10.1111/his.12368. Epub 2014 Mar 4.

PMID:24393238

The discovery of a Persian family with a form of Birt-Hogg-Dubé syndrome lacking the typical cutaneous stigmata of the syndrome.

Babaei Jandaghi A, Daliri S, Kikkawa M, Khaledi M, Soleimanifar N, Alizadeh A, Habibzadeh M, Haghi-Ashtiani MT, Seyama K, Rezaei N.

Clin Imaging. 2013 Jan-Feb;37(1):111-5. doi: 10.1016/j.clinimag.2012.03.003.

Epub 2012 Jun 8.

PMID:23206616

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

J Med Genet. 2010 Apr;47(4):281-7. doi: 10.1136/jmg.2009.070565.

PMID:20413710

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 N, Johkoh T, Kodama Y, Iwakami S, Kikkawa M, Takahashi K, Seyama K.

Eur J Radiol. 2011 Mar;77(3):403-9. doi: 10.1016/j.ejrad.2009.09.004. Epub 2009 Sep 25.

PMID:19782489

〔学会発表〕(計0件)

〔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

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・大学院医学研究科・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・専任准教授

研究者番号: 10226681