

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670402

研究課題名(和文) BHD症候群の新規診断指標の開発

研究課題名(英文) To develop a novel method to establish the diagnosis of BHD syndrome

研究代表者

瀬山 邦明 (SEYAMA, KUNIAKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10226681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝性疾患であるBirt-Hogg-Dube症候群(BHDS)の診断にはFLCN遺伝子診断を必要とするが、患者末梢血を用いた遺伝子診断以外の簡便な診断法の開発に取り組んだ。BHDSの病因となる胚細胞遺伝子変異は欠失・挿入・フレームシフト等の変異がほとんどであるため、細胞内の野生型フォリクリン蛋白質量を定量することによりBHDSの診断が可能ではないかと考えた。細胞は入手が容易な患者末梢血単核球(PBMC)を用いた。結果は、PBMCでのFLCN遺伝子発現量、野生型フォリクリン蛋白質量について、正常対照者と有意な変化がなく、また同一遺伝子変異をもつ個体間でも一定の傾向を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Birt-Hogg-Dube syndrome (BHDS) is a hereditary genodermatosis and characterized by fibrofolliculomas of the skin, pulmonary cysts with/without pneumothorax, and renal tumors. FLCN genetic testing is required to establish the diagnosis. In this project, we examined the expression of the FLCN gene and the amount of folliculin protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from BHDS patients to see whether these analyses have a diagnostic significance. Real-time PCR revealed no significant difference in the FLCN expression by PBMC between normal subjects and BHDS patients. Furthermore, no significant difference in the amount of wild-type folliculin protein was found in PBMC between normal subjects and BHDS patients. Interestingly, the amount of wild-type folliculin protein in PBMC varied among unrelated BHDS patients who had the identical germline FLCN mutation.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：BHD症候群 FLCN遺伝子 生殖細胞系列変異 folliculin ウェスタンブロット法

1. 研究開始当初の背景

Birt-Hogg-Dubé (バート・ホッグ・デューブ) 症候群 (BHDS) は第 17 染色体上のフォリクリン (*FLCN*) 遺伝子の胚細胞変異により生じる疾患で、顔面を中心に認める線維毛嚢腫 (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、多発性肺嚢胞 / 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 *FLCN* 遺伝子が同定された (Nickerson et al, Cancer Cell 2:157-164, 2002)。*FLCN* 遺伝子は、14 個のエクソンから構成され、染色体 17p11.2 に位置する。申請者は、気胸を反復し、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 *FLCN* 胚細胞遺伝子変異を同定し、1) 肺病変のみの BHDS 症例があり得ること、2) BHDS は、家族性気胸や原因不明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 (Gunji et al. J Med Genet 44:588, 2007; Kunogi M et al. J Med Genet 47:281, 2010)。

呼吸器専門医内での疾患認識の広がりにより、全国から BHDS 疑い症例の遺伝子検査による診断依頼を受け、現時点で 160 家系を越える BHDS の診断に係わってきた。世界的に見ても有病率に関する疫学調査結果は乏しいが、“見過ごされてきた比較的多い遺伝病”であると感じている。申請者は、胸部 CT 画像における嚢胞の性状を評価することが診断や類似する他の嚢胞性肺疾患との鑑別に有用であることを明らかにした (Tobino K et al. Eur J Radiol 2011;77:403; Eur J Radiol 2012;81:1340)。しかし、確定診断には末梢血白血球のゲノム DNA を材料とした *FLCN* 遺伝子検査により *FLCN* 胚細胞遺伝子変異を証明することが必要であり、コスト・労力・時間がかかることが現在の診断における問題点である。

European BHD Consortium は 2009 年に

BHDS の診断基準を発表した (Menko FH, et al. Lancet Oncology 10:1199, 2009)。BHDS では、皮膚、肺、腎に病変が生じるが、各病変の病理診断のうち BHDS に診断根拠となるものは皮膚の fibrofolliculoma のみであることを示している。すなわち、主に顔面であるが、顔面や上半身に 5 個以上の皮膚色の小丘疹があり、うち 1 つは病理学的に fibrofolliculoma と診断されていれば、BHD 症候群と診断してよいとした。すなわち、fibrofolliculoma が個体に多数認められることは BHDS の診断特異性が非常に高いことをみとめている、一方、腎腫瘍は oncocytic hybrid tumor, chromophobe renal cell carcinoma などの特徴的腫瘍を合併することが報告されているが、これらの病理診断のみで BHDS と診断可能とはしておらず、minor criteria に留まっている。肺病変については、BHDS に特異的な肺嚢胞の病理学的所見はない。すなわち、病理診断の観点からは、顔面の皮膚の生検、そして fibrofolliculoma の病理診断を得ることで診断可能であるが、日本人の気胸を契機に BHDS と診断された症例では皮膚病変の合併頻度が 20~30%程度と少ないこと、皮膚は患者本人も意識していないような軽微なものが多いこと、顔面皮膚の生検は患者からも好まれない場合があること、等の課題がある。

以上の背景から、末梢血のような非侵襲的で簡便に採取可能な検体を用いて BHDS の診断を確定できる指標があれば、実用的である。*FLCN* 遺伝子はリンパ球で発現しており、*FLCN* ノックアウトマウスではリンパ系の分化障害が生じる (Baba et al. Blood. 2012;120:1254)。申請者は、BHDS 症例の末梢血リンパ球に EB ウイルスを感染させ、B リンパ芽球様細胞株 (EBV-LCL) を樹立して *FLCN* 遺伝子発現量を real time PCR 法で検討したところ、*FLCN* 遺伝子検査で診断確定した BHDS 症例では正常対照より減少していた。そのため、BHDS 症例の末梢血を利用して

FLCN 遺伝子検査にかわる診断法の開発が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

BHDS 患者の末梢血を利用して、*FLCN* 遺伝子検査に代わる、簡便で迅速な BHDS の新規診断指標を開発することが目的である。EBV-LCL を樹立するには約 4 週間程度の期間を必要とするため、EBV-LCL を利用して診断指標を開発することは臨床的ニーズに合致しない。そのため、BHDS 症例の末梢血単核球での *FLCN* 遺伝子発現量を定量的に評価することが有用と思われるが、血清中の circulating miRNA (マイクロ RNA) プロファイルの網羅的解析も並行して実施し、BHDS の診断マーカーとなりうる指標を開発する。

検討する候補としては、末梢血単核球中の *FLCN* 遺伝子発現の定量的解析、血清中の circulating miRNA の解析、血清蛋白質のプロテオミクス解析、の 3 種類の検討により、*FLCN* 遺伝子検査に代わる診断マーカーを開発することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) BHDS 症例の *FLCN* 遺伝子解析による診断確定

気胸・多発性肺嚢胞を契機に BHDS が疑われる症例について、*FLCN* 遺伝子診断を継続する。既報に準じ、DHPLC 法によるスクリーニングと autosequencer による核酸配列決定、定量的 PCR 法によるゲノム欠失の有無を検討し、BHDS の遺伝子診断を行う (Gunji et al. J Med Genet 44:588, 2007; Kunogi M et al. J Med Genet 47:281, 2010)。

(2) 末梢血単核球中における *FLCN* 遺伝子発現の定量的評価および発現するフォリクリン蛋白量の定量的評価

BHDS 診断確定例、病因不明の嚢胞性肺疾患 (*FLCN* 遺伝子検査正常)、年齢・性別を一致させた正常対照症例、の 3 群の被

験者より静脈血 10 ml を採取し、リンフォプレップ®により単核球を分離する。Total RNA を分離した後に cDNA を作製し、real-time PCR 法により *FLCN* 遺伝子発現を定量的に評価する。遺伝子発現量を校正するための対照遺伝子は GAPDH、アクチンを用いる。一方、*FLCN* 遺伝子産物であるフォリクリンタンパク質の量をウェスタンブロット法で定量的に評価する。リンフォプレップ®により分離した単核球の cell lysate を調整後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) でタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写後、抗フォリクリン抗体 (N-末端ペプチドに対する抗体、C-末端ペプチドに対する抗体) を用いてフォリクリン発現を評価する。フォリクリン発現量はアクチン量に対する割合で評価し、蛋白発現量の定量は RAS3000 を用いて行う。

(3) BHDS 症例の血清中 miRNA の網羅的解析 (発現プロファイリング)

血清 500 μ l から高純度に small RNA 画分を抽出する (mirVana™ miRNA Isolation kit)、‘TORAY’の 3D-Gene® miRNA チップにより血清中に存在する miRNA 分子種を網羅的に解析する。網羅的解析は‘TORAY’に委託して実施する。2) に記載した の 3 群の血清を利用する。発現プロファイルの解析から、対照や他の嚢胞性肺疾患に比べて異なる発現レベルを示す miRNA (以下、BHDS バイオマーカー-miRNA と呼ぶ) を同定する。3 群間のプロファイリングにより得られた候補 miRNA は、既存のデータベース miRBase (<http://www.mirbase.org/>) と照合して BHDS 病態との生物学的関連性を評価し、ならびに real time PCR 法により患者血清中の BHDS バイオマーカー-miRNA 量を定量して網羅的解析結果の validation を行う。

4. 研究成果

(1) BHDS 症例の *FLCN* 遺伝子解析による診

断確定

従来の方法を用いて *FLCN* 遺伝子診断を継続した。2016 年 4 月の時点までに BHDS と診断した発端者は累積で約 250 家系に達した。*FLCN* 遺伝子は 14 個のエクソンより構成されるが、各エクソンの両端のイントロンのスプライシング信号の変異も当該エクソンの変異に含めると、遺伝子変異は以下の 4 つのエクソンに高頻度で検出され、約 80%以上を占めていた(エクソン 11>エクソン 12>エクソン 13>エクソン 7)。

(2) 末梢血単核球中における *FLCN* 遺伝子発現の定量的評価および発現するフォリクリン蛋白量の定量的評価

FLCN 遺伝子発現量の real time PCR 法による定量評価

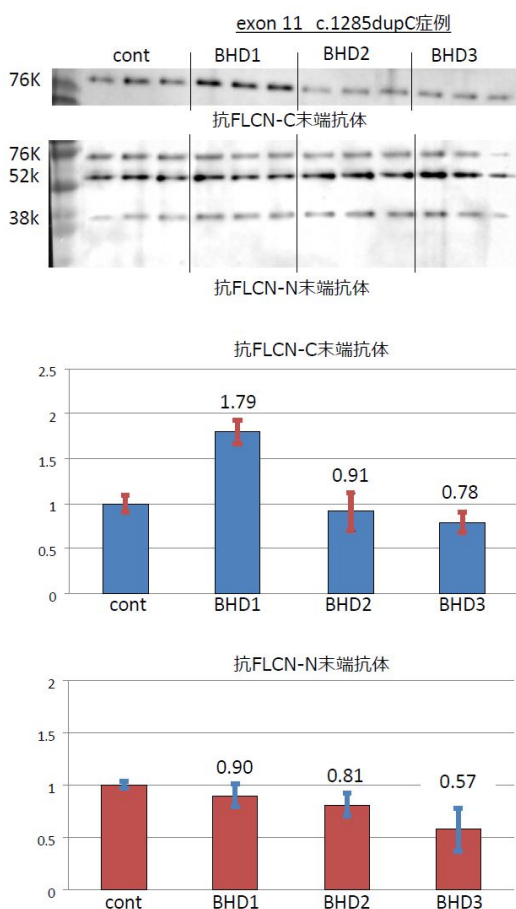
FLCN 遺伝子発現は B 細胞分化に関与し、また、予備実験では EB ウイルスで樹立した EBV-LCL (B 細胞系の細胞株) で *FLCN* 遺伝子発現の差が認められていたため、以下の 4 種類の細胞集団で検討した：末梢血単核球成分(PBMC)、PBMC を Pokeweed mitogen(PWM) で刺激して増殖させた細胞 (PWM-MC) (主に B リンパ芽球集団)、PBMC を LPS で刺激して増殖させた細胞 (LPS-MC) (主として B リンパ芽球集団)、PBMC を phytohemagglutinin (PHA) で刺激して増殖させた細胞 (PHA-MC) (主として T リンパ芽球集団)。各種のマイトジェンで細胞を刺激して 1 週間培養した後、total RNA を抽出し、real time PCR 法で *FLCN* 発現量を定量評価した。PBMC のみ、末梢血から分離直後に total RNA を抽出した。GAPDH やアクチン、ribosomal RNA などを house-keeping 遺伝子として選択し *FLCN* 発現量を校正した。しかし、real time PCR の結果は、BHDS 患者の *FLCN* 発現量が低いという結果は得られず、また、BHDS 患者に特徴的な一定の発現パターンは

認めなかった。

フォリクリン蛋白量の定量的評価

10ml の BHDS 患者末梢血から SDS-PAGE + ウェスタンブロット法に十分なタンパク質を確保する目的で、各種のマイトジェンで細胞を刺激して 1 週間培養した後、PWM-MC、LPS-MC、PHA-MC からタンパク質を抽出した。しかし、芽球化した細胞が培養ウェルから剥がれにくくなり、かえってタンパク質回収量は減少してしまった。また、B 細胞系の刺激剤として OK432 刺激による培養も新たに試みたが、同様に蛋白回収量の増加にはつながらなかった。結局、PBMC を分離直後にタンパク質を分離する方がかえって回収蛋白量は良好であるとの結論に至り、PBMC を SDS-PAGE + ウェスタンブロット法の細胞源として使用した。

ウェスタンブロット法に使用する抗フォリクリン抗体は、複数の市販品を検討したが、順天堂大学実験腫瘍病理学講座の小林敏夫博士の作成した抗 N 末端抗体と抗 C 末端抗体が感度・特異度ともに最も優れていたため、小林敏夫博士から供与いただいた抗体を使用することとした。コントロールとして健常成人の PBMC を分離し、3 ~ 5 人の PBMC cell lysate を調整して個人間の変動による影響を抑える工夫をした。BHDS 症例で最も高頻度に認める *FLCN* 遺伝子変異の症例 (エクソン 11, c.1285dupC ; エクソン 12, c.1347_1353dupCCACCCT ; エクソン 13, c.1533_1536delGATA) から各々 3 例ずつで検討した。結果の実例として、エクソン 11, c.1285dupC による BHDS 3 例の結果を示す (抗 C 末端抗体によるウェスタンブロット、抗 N 末端抗体によるウェスタンブロット、各々の RAS3000 による定量評価結果)。



c.1285dupC は、フレームシフトにより C 末端は本来のタンパク質とは異なる変異蛋白となり抗 C 末端抗体では認識されず、ウェスタンブロット法で検出されるのは野生型遺伝子から産生されるフォリクリン（約 76kDa）のみと考えられる。一方、抗 N 末端抗体は、論理的には野生型フォリクリン、変異型フォリクリン（分子量は野生型より小さい）の両者がウェスタンブロット法で検出されるはずである。抗 N 末端抗体によるウェスタンブロット法の図中で認める 52kDa と 38kDa のバンドは control も含めて全例で検出されているため、抗体の非特異的結合によるバンドと理解される。野生型 *FLCN* および変異型 *FLCN* に由来する mRNA が各々同量発現し、かつ同量のフォリクリン蛋白に翻訳されていると仮定すれば、抗 C 末端抗体、抗 N 末端抗体によって検出される 76kDa のバンドは control に比べて約 1/2 となるはずであるが、結果は

異なっていた。また、同一遺伝子変異を有する異なる BHDS 症例間でも測定値はばらついていた。エクソン 12、（c.1347_1353dupCCACCCT）、エクソン 13（c.1533_1536delGATA）の症例も各々 3 例ずつ検討したが、結果は提示したエクソン 11 の症例と同様であった。

これらの末梢血 PBMC を用いた研究成果の解釈として、以下の 2 点が示唆された。1) BHDS 症例の PBMC における *FLCN* 遺伝子発現は正常対照者と有意な相違を認めない。2) BHDS 症例の PBMC で発現しているフォリクリン蛋白量は、正常対照者と比較して必ずしも有意な減少は認めない。また、同一の *FLCN* 肺細胞遺伝子変異を有する症例でも、症例ごとに野生型フォリクリン蛋白の発現量は異なっている。

(3) BHDS 症例の血清中 miRNA の網羅的解析

正常対照者と BHDS 症例の各 3 例ずつで血清中に存在する miRNA 分子種を網羅的に解析したが、発現する miRNA 分子種で正常対照者に比べて 2 倍以上の変動を認める分子種は検出しなかった。

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 5 件)

1. Ebana H, Otsuji M, Mizobuchi T, Kurihara M, Takahashi K, Seyama K. Pleural Covering Application for Recurrent Pneumothorax in a Patient with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 Sep 11. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. 福岡 みずき, 江花 弘基, 岩淵 千雅子, 栗原 正利, 瀬山 邦明. Birt-Hogg-Dube syndrome(バート・ホッグ・デュベ症候群). *日本臨床* 73 巻増刊 6 家族性腫瘍学 ;

- 64-69, 2015. (査読なし)
3. Kumasaka T, Hayashi T, Mitani K, Kataoka H, Kikkawa M, Tobino K, Kobayashi E, Gunji Y, Kunogi M, Kurihara M, Seyama K. Characterization of pulmonary cysts in Birt-Hogg-Dubé syndrome: histopathological and morphometric analysis of 229 pulmonary cysts from 50 unrelated patients. *Histopathology*. 2014; 65:100-10. doi: 10.1111/his.12368. (査読あり)
 4. 江花 弘基, 溝淵 輝明, 岩淵 千雅子, 熊坂 利夫, 瀬山 邦明, 栗原 正利. Bedside Teaching 呼吸器科医が遭遇する Birt-Hogg-Dube 症候群. *呼吸と循環* 62; 1087-1094, 2014. (査読なし)
 5. Gupta N, Seyama K, McCormack FX. Pulmonary manifestations of Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Fam Cancer*. 2013;12:387-96. doi: 10.1007/s10689-013-9660-9. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 江花 弘基, 溝淵 輝明, 星加 義人, 小林悦子, 熊坂 利夫, 安藤 克利, 芳賀 高浩, 福岡 みずき, 高橋 和久, 瀬山 邦明, 栗原 正利. Birt-Hogg-Dube Syndrome を考慮すべき臨床指標の検討. 第 19 回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会、2015 年 9 月 4 日、川崎
2. 岩淵 千雅子, 根岸 亜津佐, 江花 弘基, 溝淵 輝明, 熊坂 利夫, 瀬山 邦明, 栗原 正利. 肺病変で Birt-Hogg-Dube 症候群が疑われた 31 例における皮膚病変と病理学的検討. 第 19 回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会、2015 年 9 月 4 日、川崎
3. 溝淵 輝明, 江花 弘基, 肥塚 智, 高橋 亮, 瀬山 邦明, 栗原 正利. Birt-Hogg-Dube 症候群に対する胸膜カパーリング術の範囲と気胸再発率に関する

- る検討. 第 19 回日本気胸・嚢胞性肺疾患学会、2015 年 9 月 4 日、川崎
4. 江花 弘基, 安藤 克利, 溝淵 輝明, 栗原 正利, 瀬山 邦明, 高橋 和久. Birt-Hogg-Dube Syndrome による気胸と原発性自然気胸の臨床的特徴の検討. 第 54 回日本呼吸器学会、2015 年 4 月 17 日、東京.

〔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:なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
瀬山 邦明 (SEYAMA Kuniaki)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 10226681
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし