

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670636

研究課題名(和文) 腫瘍血管新生の機序解明と新規治療開発を目的とした血管芽腫原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of causative genes for hemangioblastoma to elucidate the mechanisms of neovascularization and to develop novel therapeutic strategies

研究代表者

武笠 晃丈 (Mukasa, Akitake)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90463869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、著明な腫瘍血管新生を認める血管芽腫のゲノム解析を通して、その血管新生に関わる原因遺伝子同定などを目標とした。我々が収集した全32例の血管芽腫のVHL遺伝子を中心とした遺伝子変異、メチル化解析の結果、VHL病患者、孤発性患者のいずれの検体においても、VHLの2-hitによる不活化が多い事が判明した。但し、孤発例では、メチル化によるVHL不活化や染色体6番、10番の欠失が多いことが特徴的であった。VHL病の好発腫瘍である腎癌においては、VHLだけでなく、PBRM1やBAP1などの遺伝子異常が多い事が知られているが、我々のHB症例には、これらの遺伝子変異は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify novel genes related to neovascularization through genetic analysis of hemangioblastomas, which have remarkable tumor-related vasculature. We collected 32 hemangioblastomas and subjected them to genetic and methylation analysis, mostly of the VHL gene. As a result, we found that 2-hit inactivation of the VHL gene is frequent in both VHL disease-related and sporadic hemangioblastomas. Of special note was that in sporadic cases, VHL inactivation by promoter region methylation and loss of heterozygosity of chromosomes 6 and 10 were more frequent than in VHL disease-related HB. In renal cell carcinoma, which frequently occurs in VHL disease patients, there is often alteration of the PBRM1 and BAP1 genes in addition to the VHL inactivation. However, these gene mutations were not observed in our HB cases.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：血管芽腫 VHL病 腫瘍血管新生 癌抑制遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

VEGF (Vascular endothelial growth factor) を標的とした Bevacizumab (抗VEGF抗体) は、悪性神経膠腫治療に対して臨床使用されているものの、生存期間延長はほとんどなく、新機軸の血管新生抑制療法の創出が望まれているのが、現状である。そこで、我々は、血管新生が特に旺盛な脳腫瘍である血管芽腫 (hemangioblastoma、以後HBと略) に着目した。HBは小脳に好発する良性腫瘍で、その約20%は遺伝性腫瘍疾患の von Hippel-Lindau (VHL) 病症例において発生する。我々は、VHL病専門外来を有し、比較的多くの症例を経験している。原因遺伝子 *VHL* の異常が、HB形成機序の1つとされるが、本研究前の自験例HBのゲノム解析では、*VHL* 以外の原因遺伝子の存在が強く示唆された。また、HBにおいても、VEGF の発現亢進にもかかわらず、抗VEGF抗体による治療効果がなく、VEGF 以外の血管新生因子や代償経路の存在が強く示唆されている。しかし、機能解析に使用できる適切な細胞株が存在しないことが、それら因子の同定を困難にしている原因のひとつであった。

## 2. 研究の目的

上記の背景に対して、我々は、腫瘍血管新生機序の更なる解明と、それに対する新規の分子標的薬を創出するために、腫瘍血管新生の著明なHB検体を用いた網羅的ゲノム解析、そして、機能解析を行うためのVHL病特異的 iPS細胞の樹立と、それによるHBモデルの作成などを計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) HB 検体の網羅的ゲノム解析

東京大学脳神経外科にて摘出術を施行した、血管芽腫(HB)の検体(全32例、VHL病症例11例、非VHL病症例21例)のDNAを用い、VHL 遺伝子異常の解析(direct sequencing, Ion torrentを用いた target sequencing, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) )、及びコピー数解析のため

の SNP array(Affymetrix)を施行した。VHL 遺伝子promotor領域のメチル化の解析のために、methylation specific PCR, bisulfite sequencing を施行した。VHL病の好発腫瘍である腎癌においては、*VHL*だけでなく、*PBRM1* や *BAP1*, *SETD2* の遺伝子異常が多い事が知られているが、当科のHB検体において、これらの遺伝子に対する target sequence を行った。

### (2) VHL 病特異的 iPS 細胞の樹立、それによる hemangioblast, HB モデルの作成

京都大学の連携研究者(中村・丹羽)の協力により、京都大学 iPS 研究所にて、VHL病特異的 iPS 細胞を樹立し、さらにHB の起源とされる hemangioblast に分化させることとする。分化の培養条件に関しては、iPS 細胞から hemangioblast に分化させた研究報告(Niwa A et al. *PLoS* 2011)を参照する。さらに、この hemangioblast から、遺伝子改変することで、HB モデルの作成を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) HB 検体の DNA 収集

東京大学脳神経外科の VHL 病外来患者や、HB 摘出術施行症例に対して、正常血液検体や、腫瘍検体(凍結検体など)の収集を行った。腫瘍検体については、遺伝子解析のためのDNA抽出を行い、また、VHL病が疑われる患者においては、遺伝カウンセリングを施行後、本人の承諾を得た後、正常血液からDNA抽出を行い、VHL病の遺伝子診断を、主に、direct sequencing と MLPA を用いて行った。

### (2) VHL 遺伝子異常解析

32例のHB検体に対して、VHL 遺伝子の direct sequencing をまず行い、11検体の症例で、VHL 遺伝子変異を認めた。VHL 病症例: 7/11, 64%, 非VHL病症例: 4/21, 19%で、VHL 病症例で有意に多くの変異を認めた ( $p=0.020$ )。

Direct sequencingにてVHL遺伝子変異を認めなかった非VHL病事例17例(コントロールのために、さらにVHL遺伝子変異がある非VHL病事例2例も追加)に対して、target sequencingを行った。これにより、9例に新たに、VHL遺伝子変異を同定することができた。

今回、同定できたVHL遺伝子変異は、すべてCOSMIC(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)に報告されているものであった。

11例のVHL病事例で同定された7例の変異の内訳は以下の通りである。

ミスセンス変異：3症例

スプライシング部位変異：1症例

1塩基欠失：3症例

21例の非VHL病事例で同例された13例(62%)の変異の内訳は以下の通りである。

ミスセンス変異：10症例

塩基欠失：3症例

塩基挿入：1症例

非VHL病事例では、2つのVHL遺伝子変異を認めた症例が2例あった。

今回、direct sequencingでVHL遺伝子変異を認めなかったのに、target sequencingで変異を認めた症例が増加したのは、HBは、血管が非常に発達している腫瘍であり、検体中における腫瘍細胞の割合が少ないことに起因していると考えられた。

#### (3)HB検体のSNPアレイ解析

32例のHB検体すべてに、SNPアレイ解析を行い、VHL遺伝子が存在する3番染色体、あるいは3pのLOH(loss of heterozygosity)を認めたのが、14例(44%)あった。さらに、3番染色体、あるいは3pのcopy-neutral LOHを認めたのが、5例あり、全体として、19例(59%)の3番染色体、あるいは3pのLOHを認めた事になる。3番染色体、あるいは3pのLOHは、VHL病事例で7/11(64%)、非VHL病事例で12/21(57%)に認めており、両群とも

ほぼ同じ割合であった。

今回の検体では、非VHL病事例で、6番、または10番染色体のLOHを9例(43%)認めたが、VHL病事例では1例も認めなかった( $p = 0.013$ )。

#### (4)HB検体のMLPA解析

32例のHB検体すべてに、VHL遺伝子のMLPAを行った。VHL病事例において、direct sequencingでVHL遺伝子変異を認めなかった4例全例に、VHL遺伝子exon 3の欠失を同定できた。これにより、VHL病事例では、全例、VHL遺伝子の異常を認める事がわかった。

非VHL病事例では、先ほどのSNPアレイ解析では、3番染色体のLOHが19例に同定できていたが、MLPAでは5例にしか同定できなかった。これは、HBは、本来は、血管が非常に発達している腫瘍であり、検体中における腫瘍細胞の割合が少ないことに起因していると考えられた。

#### (5)HB検体のメチル化解析

32例のHB検体すべてに、methylation specific PCRとbisulfite sequencingを行った。Methylation specific PCRでは、2例の非VHL病事例でのみ、メチル化を認めた。Bisulfite sequencingでは、7例でメチル化を認め、全例、非VHL病事例であった(7/21, 33%)。VHL病事例では1例もメチル化を認めなかった。

#### (6)HB検体におけるVHL遺伝子不活化

これまでの解析結果を表1に示す。VHL遺伝子変異、3番染色体LOH、VHL遺伝子promotor領域のメチル化、この3つの内、2つがあれば、VHL遺伝子是不活化されていると定義した。そうしたところ、VHL病事例では、64%、非VHL病事例では、52%の症例で不活化を認め、両群ともほぼ同じ割合で、かつ半分以上の症例で、VHL遺伝子不活化を認め

ることがわかった。

表1 HB 検体の網羅的ゲノム解析結果

		VHL									
VHL alterations		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 3 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
VHL promoter methylation		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 6 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 10 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

  

		Sporadic									
VHL alterations		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 3 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
VHL promoter methylation		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 6 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chr. 10 LOH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

(7)VHL 遺伝子以外の target sequencing

Direct sequencing にて VHL 遺伝子変異を認めなかった非 VHL 病事例 17 例に対して、*PBRM1*, *BAP1*, *SETD2* の target sequencing を行ったが、有意な変異は認められなかった。

(8) VHL 病特異的 iPS 細胞の樹立、それによる hemangioblast, HB モデルの作成

本研究において、当科と京都大学 iPS 研究所と連携研究を行っていたが、平成 27 年度には、当科より、2 検体、VHL 病事例の正常皮膚と正常血液を iPS 研究所に提供し、いずれも VHL 病特異的 iPS 細胞の樹立に成功している。また、本研究のもうひとつの連携先である、京都大学中村研究室では、現在、VHL 病特異的 iPS 細胞に対して、VHL 遺伝子異常を導入して、血管芽腫細胞株の樹立を試みているところである。

(9)まとめ

以上より、HB 腫瘍化には、VHL 不活化が、改めて重要である事が判明した。従って、VHL が関与するシグナル回路異常の解明と、その修正を行うことが、腫瘍血管新生抑制による新規癌治療構築につながる可能性があると考えられた。

また、HB 孤発例（非 VHL 病事例）では、VHL 遺伝子 promoter 領域メチル化による VHL 不活化に加え、SNP array にて 6 番と 10 番染色体の LOH を高頻度に認めていた。同部位には、未知の HB 発生関連遺伝子、ひいては血管新生関連遺伝子が存在している可能性が示唆され、今後の exome シークエンスなどによる、そのような分子の同定に期待された。

< 引用文献 >

Takayanagi S, Mukasa A, Tanaka S, Nomura M, Omata M, Yanagisawa S, Yamamoto S, Ichimura K, Nakatomi H, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Differences in genetic and epigenetic alterations between von Hippel-Lindau disease-related and sporadic hemangioblastomas of the central nervous system; Neuro-Oncology. 2017

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)

Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Kanno H, Kuratsu JI, Nishikawa R, Mishima K, Natsume A, Wakabayaashi T, Houkin K, Terasaka S, Yao M, Shinohara N, Shuin T, Saito N. Development of Database and Genomic Medicine for von Hippel-Lindau Disease in Japan. NeuroI.Med.Chir.(Tokyo).査読有 2017(57),59-65 DOI:10.2176/nmc.ra.2016-0206

Takayanagi S, Mukasa A, Tanaka S, Nomura M, Omata M, Yanagisawa S, Yamamoto S, Ichimura K, Nakatomi H, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Differences in genetic and epigenetic alterations between von Hippel-Lindau disease-related

and sporadic hemangioblastomas of the central nervous system. *Neuro-Oncology*. 査読有 2017 Mar 30

DOI:10.1093/neuonc/nox034

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人. 血管芽腫とVHL 遺伝子解、*Clinical Neuroscience*. 査読無 2016(34),1052-1053  
DOI:なし

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人. von Hippel-Lindau 病、*Clinical Neuroscience*. 査読無 2015(33),433-436  
DOI:なし

[学会発表](計 14 件)

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人、次世代シーケンサなどを用いた中枢神経系血管芽腫の統合的解析、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016.12.5、甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

Shunsaku Takayanagi, Akitake Mukasa, Masashi Nomura, Shunsuke Yanagisawa, Shota Tanaka, Hirofumi Nakatomi, Hiroyuki Aburatani, Koichi Ichimura, Keisuke Ueki, Nobuhito Saito, Integrated genomic analysis for von Hippel-Lindau disease-related and sporadic hemangioblastomas of the central nervous system, 21<sup>st</sup> annual meeting of the society for neuro-oncology (SNO)、2016.11.19、Scottsdale, Arizona (USA)

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人、中枢神経系血管芽腫非 VHL 病症例における VHL 遺伝子変異の重要性一次世代シーケンサを用いた検討一、日本脳神経外科学会第 75 回学術総会、2016.9.29、福岡国際会議場(福岡県・博多市)

高柳 俊作、中富 浩文、野村 征司、吉野 正紀、金 太一、武笠 晃丈、辛 正廣、齊藤 延人、von Hippel-Lindau 病症例に対

する多角的・集学的診療の取り組み、第 21 回日本脳腫瘍の外科学会、2016.9.10、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都・港区)

高柳 俊作、武笠 晃丈、野村 昌志、田中 将太、中富 浩文、油谷 浩幸、市村 幸一、齊藤 延人、次世代シーケンサを用いた中枢神経系血管芽腫における VHL 遺伝子解析、第 17 回日本分子脳神経外科学会、2016.8.26、帝京大学板橋キャンパス本部棟臨床大講堂(東京都・板橋区)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、菅野 洋、矢尾 正祐、執印 太郎、齊藤 延人、2VHL 病における厚労省班会議の活動とゲノム医療の展開、第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2016.6.4、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

高柳 俊作、田中 将太、野村 昌志、武笠 晃丈、辛 正廣、中富 浩文、樋渡 光輝、滝田 順子、齊藤 延人、遺伝性腫瘍疾患 Infantile myofibromatosis における新規原因遺伝子 *PDGFRB* の解析、第 33 回日本脳腫瘍学会、2015.12.6、グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、菅野 洋、執印 太郎、齊藤 延人、VHL 病のデータとゲノム医療の展開 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会、2015.10.15、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

高柳 俊作、武笠 晃丈、長谷川 洋敬、田中 将太、相原 功輝、柳澤 俊介、野村 昌志、高橋 長久、滝田 順子、小林 敏之、樋野 興夫、水口 雅、齊藤 延人、結節性硬化症に合併した膠芽腫に対する分子病理学的解析、第 16 回日本分子脳神経外科学会、2015.8.28、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県・浜松市)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人、中枢神経系血管芽腫に対するゲノム医療体制の構築、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014.11.30、セラトン・グラ

ンデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県・浦安市)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人、後藤 順、辻 省次、家族性腫瘍疾患 VHL 病に対するゲノム医療の展開、日本人類遺伝学会第 59 回大会、2014.11.21、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人、VHL 病におけるゲノム医療の展開、日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、2014.10.11、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

高柳 俊作、中富 浩文、花北 俊哉、武笠 晃丈、齊藤 延人、VHL 病に伴う中枢神経系病変の治療戦略 一病変局在と術前後 mRS 変化の相関関係一、第 19 回日本脳腫瘍の外科学会、2014.09.13、東京ドームホテル(東京都・文京区)

高柳 俊作、田中 将太、井上 瑞穂、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人、*PDGFRB* の germline 変異を認めた infantile myofibromatosis の 1 例、第 20 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2014.06.13、コラッセ福島(福島県・福島市)

〔図書〕(計 1 件)

高柳 俊作、武笠 晃丈、中富 浩文、齊藤 延人 *メディカルビュー社 EBM* に基づく脳神経疾患の基本治療指針第 4 版：血管芽腫、von Hippel-Lindau 病 2016 年  
総ページ：4 ページ(807 ページ)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武笠 晃丈 (MUKASA, Akitake)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90463869

### (2) 研究分担者

田中 将太 (TANAKA, Shota)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80643725

### (3) 連携研究者

齊藤 邦昭 (SAITO, Kuniaki)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号：50446564

中村 英二郎 (NAKAMURA, Eijiro)  
京都大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90293878

丹羽 明 (NIWA, Akira)  
京都大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20546999