

脳海綿状血管奇形の発症に関わる新規関連遺伝子の同定

宮脇 哲

東京大学医学部 脳神経外科

【研究の背景】

脳海綿状血管奇形(cerebral cavernous malformations, CCM)は出血性脳卒中の原因として重要な脳血管疾患である。CCM は異常に拡張した洞様血管が密に集合した脳内の血管奇形で、中枢神経系に生じる血管病変で脳動脈瘤に次いで 2 番目に多い。CCM では *CCM1*, *CCM2*, *CCM3* の 3 つの遺伝子が関連遺伝子として過去に同定され、様々な機能解析もなされてきた。しかし原因遺伝子が同定されない例も依然多く存在し、CCM 発症に関わる *CCM1,2,3* 以外の原因遺伝子の存在が疑われる。

自験例としても、当院通院中の多発 CCM 症例 5 例を対象とした予備的な解析を行い、1 例において過去に報告のない *CCM1* nonsense 変異(p.Tyr252*)を同定する一方、残り 4 例においては原因遺伝子変異を指摘し得ていなかった。

【目 的】

上記多発例の詳細な解析を追加し、さらに単発例の解析も今回新たに行うことで、多発例・単発例を含めた CCM 全体における遺伝子変異の有無を検討することとした。解析対象遺伝子を網羅的にすることにより、*CCM1,2,3* 変異の有無を検討したうえで、さらに *CCM1,2,3* 以外の疾患関連遺伝子を同定することまでを目的とした。

【方 法】

多発 CCM 5 例の解析に加え、今回単発 CCM 11 例を対象とした解析を施行した。各症例において末梢血リンパ球から genomic DNA を採取し、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを施行した。多発例については Illumina Genome Analyzer Iix を用いた全エクソン解析を施行しており、今回単発例 11 例について Illumina HiSeq2500 を用い *CCM1, 2, 3* を含む 6000 遺伝子をターゲットとしたパネルである SureSelect XT Focused Exome (Agilent) を使用したターゲットシーケンスを行った。単発例においてシーケンスデータをえた後、多発・単発の各群においてゲノムシーケンスデータの解析を行った。第一に *CCM1,2,3* における変異を検索し、第二に、*CCM1,2,3* 以外の関連遺伝子を抽出した。*CCM1,2,3* 以外の関連遺伝子の抽出においては、多発、単発の各群において、*CCM1,2,3* のいずれにも病原性変異が認めれない例において、レアバリエントであること、産生されるタンパク構造に影響する非同義変異であること、*CCM1,2,3* に類似した機能を有すると予測される遺伝子であること、2 例以上に重複して認められることを条件とした絞り込みを行った。レアバリエントの定義は、gnomAD データベースにおける minor allele frequency が 0.01 以下の変異とし、予測される遺伝子機能の検索には Gene Ontology database を用いた。

【結 果】

多発例においては、すでに 1 例に指摘していた *CCM1* p.Tyr252*に加え、詳細な情報解析を追加した結果、残り 4 例中 2 例において *CCM2* 変異(p.Ile139Thrfs*18,p.Arg57Cysfs*2)を同定した。2 変異とも frameshift 変異であり原因変異であると考えられ、いずれも過去に報告のない新規のレアバリエントであった。単発例 11 例においては、詳細なゲノム情報解析に

においても、いずれの症例にも *CCMI,2,3* 変異は認められなかった。*CCMI,2,3* 以外の遺伝子変異の検索については、多発例 4 例中 *CCMI,2,3* 変異陰性の 2 例において変異が共通した遺伝子として *LFNG*, *USP42* の 2 つが抽出された。変異は、*LFNG* p.Glu56Glyfs*2, *LFNG* p.Gly52Valfs*6 および *USP42* p.Leu1298G*(2 例で同一)であり、いずれも nonsense または frameshift となるレアバリエントであった。単発例 11 例においては変異が共通する遺伝子は同定されなかったが、2 種の遺伝子変異、*AUTS2* c.3374_3375insCCACCA and *SOBP* c.2231_2232insGCCGCCGCC が、非同義のレアバリエントとして各 1 例に同定された。

【考 察】

多発例においては、5 例中 3 例(60%)が *CCMI,2,3* のいずれかに原因変異を有していた(*CCMI* p.Tyr252*, *CCM2* p.Ile139Thrfs*18, *CCM2* p.Arg57Cysfs*2)。これは過去報告と近い頻度であったが、同定された変異 3 種はいずれも過去に報告のない新規の変異であった。一方、単発例 11 例の解析においては *CCMI,2,3* のいずれにも原因遺伝子変異は同定されず、多発例とは異なる遺伝的背景、発症要因を考え検討する必要があると考えられた。

また、*CCMI,2,3* 陰性例における検討の結果、多発例においては 2 種の遺伝子(*LFNG*, *USP42*)が疾患関連遺伝子の候補として同定された。単発例においては、2 種の遺伝子(*AUTS2*, *SOBP*)において非同義レアバリエントが同定される結果をえた。疾患関連遺伝子の候補としての意義は现阶段では判然とせず、追加の検討が必要である。

全ゲノム領域などをターゲットとした網羅的な原因遺伝子の検索はこれまで世界的にも報告が少なく、今回の結果から原因不明 CCM 例の遺伝子変異検索における網羅的解析の有用性が示された。ただし、次世代シーケンサーを用いた解析は現在一般的に点変異および small indel を対象としており、解析手法の改良により Large deletion や copy number variant などその他の原因検索も今後行っていく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CCM に対する治療としては、病変部位や発症様式などに応じた様々な手術アプローチによる手術が発達し行われてきたが、特に脳幹などの深部病変や多発症例など現在の治療では根治できないものも未だ多く存在し、分子生物学的な発症機構解明とそれに基づいた根治療法が求められている。本研究では、網羅的な遺伝子変異の検索を行うことにより、新規の *CCMI,2* 変異の同定、*CCMI,2,3* 以外の疾患関連遺伝子の候補の抽出を行うことができた。今後、より多くの症例を対象とした検証や動物実験などによる機能解析を追加することにより、CCM の発症や重症化に関わるメカニズムの解明、さらには新たな根本的治療法開発につなげていくことが可能と考えられる。