

先天性肺嚢胞性疾患における 体細胞変異による発症機序の解明

神戸大学大学院医学研究科 小児科

池田 真理子

1. 研究目的 先天性嚢胞性腺腫様形成異常 (Congenital cystic adenomatous malformation : CCAM) は胎生期より発症する肺の先天性の形成異常である。胎生期のある時点で細気管支上皮が腺腫様増殖を来し、罹患範囲が小さければ新生児期より呼吸困難、肺炎を繰り返し最終的には罹患肺葉切除が必要となり、大きければ胎内で心臓など正常器官の形成を阻害・圧排し胎児期に致命的となる重篤な疾患である。また罹患組織は一部で悪性化の報告がある一方、自然消褪もありその病態は未知である。申請者はこの先天性疾患の病態解明を目的に、CCAMの病理標本組織よりDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行い (図1)、腺腫様増殖の原因となる体細胞変異由来の遺伝子変異をNGSやMALDI-TOF Mass spectrometryを用い同定する (図2)。またCCAMの腺腫様増殖から癌化を導く新たな変異遺伝子の同定や、自然消褪に関与する他の要因、例えば罹患部位でのメチル化異常などのエピジェネティックな病態の検討も行う。これにより先天性疾患と体細胞モザイク型変異の新しい知見の発見につながるだけでなく先天性肺嚢胞症の病態生理や疾患発症の分子基盤の解明に役立ち、その診断、予後、治療に役立つ。

2. 方法

①CCAM罹患組織における体細胞変異の検出

②体細胞変異の変異率の検討

③多数の疾患由来検体標本におけるCCAM体細胞遺伝子変異の検討

④気管支腺がん (Bronchial Adenocarcinoma, BAC) における体細胞変異と発癌に関与するツーヒット遺伝子変異の検出

⑤CCAM組織の網羅的な遺伝子発現解析及びメチレーションの解析

①CCAM罹患組織及び非罹患組織よりゲノムDNAを また罹患児及び両親の胚細胞由来 (リンパ球) のゲノムを抽出し、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行う。この際にホルマリン固定以前の標本を使用し、質の高いDNAを用いて次世代シーケンサー (NGS) (HiSeqイルミナ社) による全エクソーム解析を行い、疾患に関連のある遺伝子や未知の遺伝子群を対照に標的遺伝子を絞り込む。シーケンスの正当性の評価にはサンガー法、あるいは以下に述べる計画②を用いる。

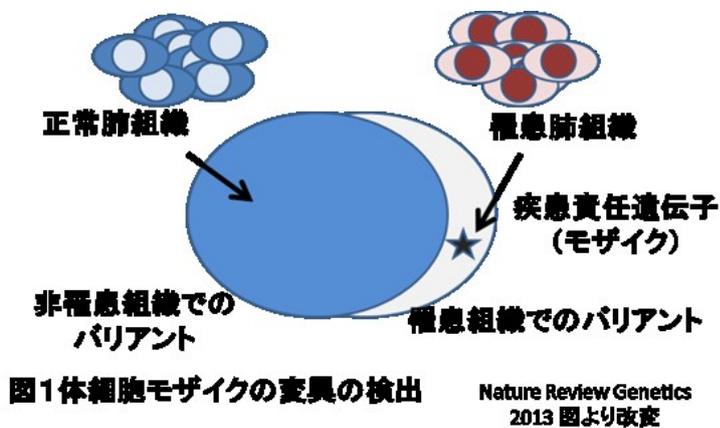
②MALDI-TOF mass spectrometry (Sequenom社) を用いて、遺伝子候補群より体細胞変異率を測定し正当性を検討する。MALDI-TOF mass spectrometry を使用することで0.1%程度の体細胞変異も検出可能となり (NGSでは5%が限度)、その精度・感度ともに高い。具体的には、一塩基の差が出るように標的DNA断片を一度PCR法により増幅してから調整し、標的となる変異箇所で一塩基の伸長反応法を行い、塩基の違いを質量で識別し、定量的に体細胞モザイクを検出する方法である。この方法により、①で絞り込んだ多数の標的遺伝子より、体細胞モザイクを同定することが可能となる。

③同定した遺伝子変異が他の多数のCCAM組織でも同様に確認できるか、過去にCCAMと診断された組織標本を用い解析する。illumina社のTruSight Tumorパネルをもちい、KRASをはじめとした癌遺伝子の体細胞変異を検出する。CCAMは重症度や型がさまざまであり、この重症度と変異率、遺伝子変異の関連を解析・検討する。また組織による変異率の差も②の方法を用いて検討する。正常肺組織や、患者ゲノム、

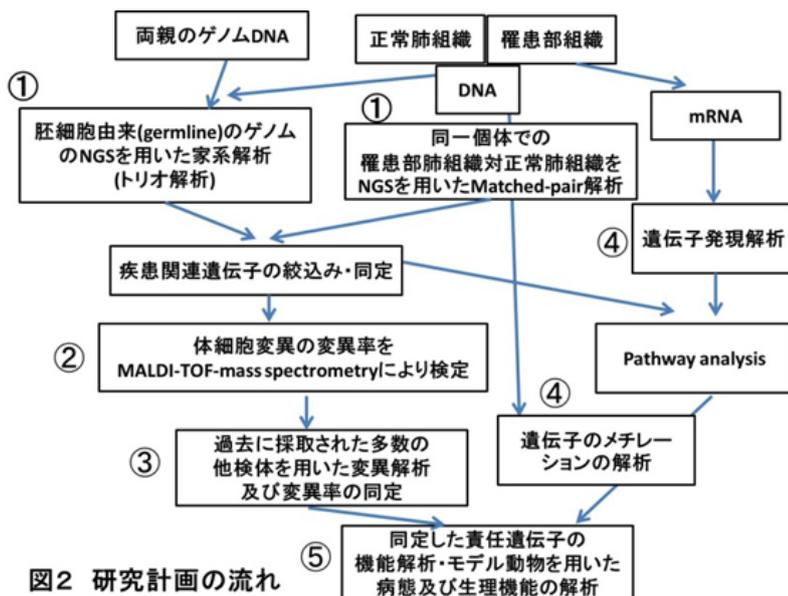
両親の胚細胞由来のゲノムには変異がないことも同時に確認することで、体細胞レベルでの変異が疾患の直接の原因であることを示す。これにより、CCAMの原因となる標的遺伝子を最終的に同定する。

④BACにおける癌組織での体細胞変異を①から③の方法を用いて再検討する。

⑤CCCAM罹患部組織よりRNAを抽出し、マイクロアレイ法(Affymetrix社 Human Transcriptome array、2.0)により正常・罹患組織での遺伝子発現を比較・解析する。また 同定した遺伝子群をKEGGなどの情報を参考にパスウェイ分析をバイオインフォマティクスの手法を用いて解析を行う。解析にはGenespring (Agilent 社) やIngenuity Pathway analysis (Ingenuity社)、Transcriptome Analysis Console (TAC) Software (Affymetrix社)を用いる。これらにより、発症に関わる遺伝子・遺伝子群のシグナル経路を明らかにすることができる。また、この発現解析では選択的スプライシングの変化も同時に解析ができ、プロテオーム研究にも役立つデータとなる。またエピジェネティックな遺伝子発現変化の検討のために、疾患組織をMethylation Beads Cap (イルミナ社)を用い網羅的に解析し、さらに標的遺伝子のメチル化解析も行う。またヒストンアセチル化・メチル化に対する解析も行う。標的遺伝子群をさらに絞り込むために、メチレーションシーケンス法も行う。これらのエピジェネティックな機構に関する研究は体細胞変異だけでなく、他の機序も加わり発症や自然消滅につながる病態機序の解明につながる。



に関して、またメチル化解析に関して検討予定である。



3. 結果

①、③、⑤について研究を実施した。正常組織との比較を行うことで、20症例中の8例において遺伝子Xのモザイク型変異を同定した。この変異はすでに別の組織での癌発症に関わることが知られているが、germlineでの変異の報告はない。⑤においてその遺伝子周辺のパスウェイ解析を行い詳細な解析を行っている。今後BAC

4. 考察

計20症例において、先天性肺嚢胞症の網羅的遺伝子解析を行うことができた。現時点で1ヒット目に関与している遺伝子Xを同定したが、それ以外のモザイク変異は現時点では解明できていない。現時点ではホルマリン固定サンプルからの次世代解析方法の限界や、サンプル採取の困難さなどが律速段階であるが、今後さらに症例数を増やし、あるいは個々の症例での詳細なdeep sequencingから新たな疾患メカニズムの解明を目指したい。

5. 参考文献

Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. Nat Rev Genet. 14:307-20, 2013.