

本邦における von Hippel-Lindau (VHL) 病 患者における原因遺伝子異常の概要: 欧米の VHL 病との比較

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 穂坂正彦教授)

執印 太郎, 近藤 慶一, 金子 茂樹

酒井 直樹, 矢尾 正祐, 穂坂 正彦

横浜市立大学医学部脳神経外科学教室 (主任: 山本勇夫教授)

菅野 洋, 伊藤 進, 山本 勇夫

RESULTS OF MUTATION ANALYSES OF VON HIPPEL-LINDAU DISEASE GENE IN JAPANESE PATIENTS: COMPARISON WITH RESULTS IN UNITED STATES AND UNITED KINGDOM

Taro Shuin, Keiichi Kondo, Shigeki Kaneko, Naoki Sakai,
Masahiro Yao and Masahiko Hosaka

From the Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine

Hiroshi Kanno, Susumu Ito and Isao Yamamoto

From the Department of Neurosurgery, Yokohama City University School of Medicine

Recently the gene responsible for the von Hippel-Lindau (VHL) disease was identified as a tumor suppressor gene. Our ongoing studies on the mutation of the VHL gene in Japanese 28 VHL families with single strand conformational analyses of DNA and Southern blot analyses revealed 6 cases of insertion or deletion, 1 cases of splice site mutation and 9 cases of missense mutation, and 3 possible intragenic deletions. Our analytical findings are essentially similar to those observed in the western countries. The VHL families associated with pheochromocytoma had the same mutational hot spot as those in the western countries. Molecular analyses of the VHL gene in the Japanese VHL disease substantially improved the understanding of this disease and its inheritance character.

(Acta Urol. Jpn. 41: 703-707, 1995)

Key words: Germline mutation, von Hippel-Lindau disease

緒 言

ヒト悪性腫瘍は多段階の遺伝子異常の蓄積により発生するといわれる。異常を起こす遺伝子は癌遺伝子と癌抑制遺伝子の2つに大別される。癌遺伝子はその異常と機能亢進により癌化を促進し、癌抑制遺伝子は癌化を抑制する機能の喪失の結果として癌の発生や進展がさらに進行する結果を引き起こす。現在までに遺伝性の腫瘍性疾患を手がかりに約10種類の癌抑制遺伝子が単離された。遺伝性の疾患と、その遺伝性疾患で発

生する腫瘍と同じ病理型の散発性腫瘍で、同じ遺伝子の異常が発見されることが多い。

von Hippel-Lindau (VHL) 病は3番染色体 P25-26 に原因遺伝子座位をもつ優性遺伝性の疾患である。この疾患で発生するおもな病態は、中枢神経系の血管芽腫、網膜の血管腫、腎細胞癌、副腎の褐色細胞腫、精巣上体の嚢腫、腎および膵臓の嚢胞および嚢腫などである。この疾患では40%以上の症例で両腎に多発性の嚢胞と、その嚢胞壁から腎細胞癌が発生し、その結果40歳代で死亡する¹⁾。この疾患の原因遺伝子は

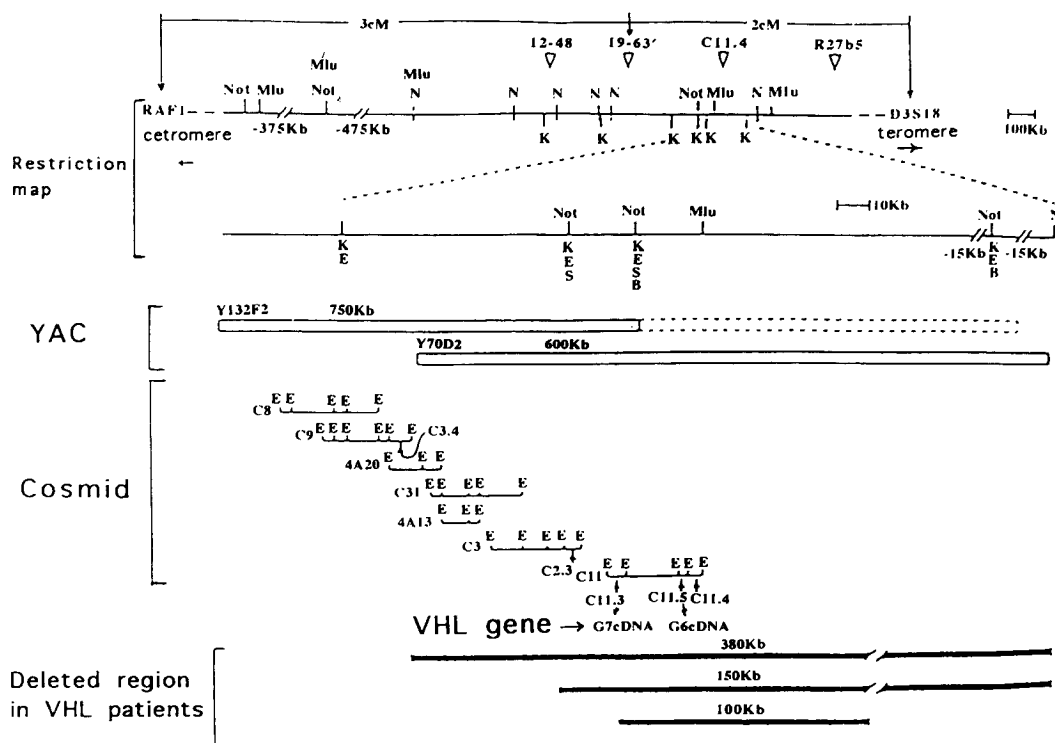


Fig. 1. The locus of the von Hippel-Lindau disease gene and its relation to polymorphic DNA markers.

癌抑制遺伝子であり、約5年をかけて米国のNCIでpositional cloningを用いてZbar, Latif, 矢尾らにより単離された²⁾(Fig. 1)。この遺伝子の単離された部分的なcDNAは約1.8kbであり、その中に3つのexonからなる852 base (284アミノ酸)のopen reading frameを含んでいる。VHL遺伝子は他の癌抑制遺伝子との間に相同性はなく、まったく新しいタイプの癌抑制遺伝子である。また面白いことに、1番目のexonの中間部にGly-X-Glu-Glu-Xを8回繰り返した特異的な構造がみられ、この部分はtrypanozoma bruceiのグリカンアンカー蛋白と48%の相同性を示している。そのmessenger RNAは約6kbであり、腎臓を含む多くの組織に発現が認められる。これまで日本国内のVHL病家系の体系的な解析はまったくなされていなかった。われわれは現在進行中である日本国内のVHL病の家系の原因遺伝子(VHL遺伝子)変異の解析結果を世界のVHL病の解析結果と対比して解説する。

材料および方法

全国各地の医療機関の協力により28家系のVHL病患者の血液を集めた。血液より通常のDNA抽出

の方法で核内のDNAの抽出を行った³⁾。それらのDNAを用いて、かつて報告した方法により6setのPCR primerを用いてsingle-strand conformational polymorphism (SSCP)解析を行った³⁾。またVHL遺伝子の部分的なcDNAであるg7-11を用いて、サザンブロット解析を行い、VHL遺伝子周辺の大きなDNAの変異や欠失の有無を検討した。

結 果

われわれのSSCP解析とDNAの配列で異常を認めた典型例を示す(Fig. 2)。また28家系のVHL病の解析結果とアメリカとイギリスのVHL病の解析結果と対比したものをTable 1に示す。表のごとくわれわれは16家系についてVHL遺伝子の配列の異常を発見した。3つのexon内の塩基配列異常の分布、遺伝子変異の内容、すなわち、塩基の挿入欠失と点突然変異の頻度は、世界中の結果と幾分の違いを認めるが、全体的には同じ傾向であった。またわれわれの結果と、アメリカ、イギリスの家系の解析によりVHL遺伝子上の突然変異の遺伝子上の位置が明らかとなっている。それらをまとめてFig. 3に示す⁴⁻⁶⁾。これでわかるように、遺伝子変異はexon 1の後半3

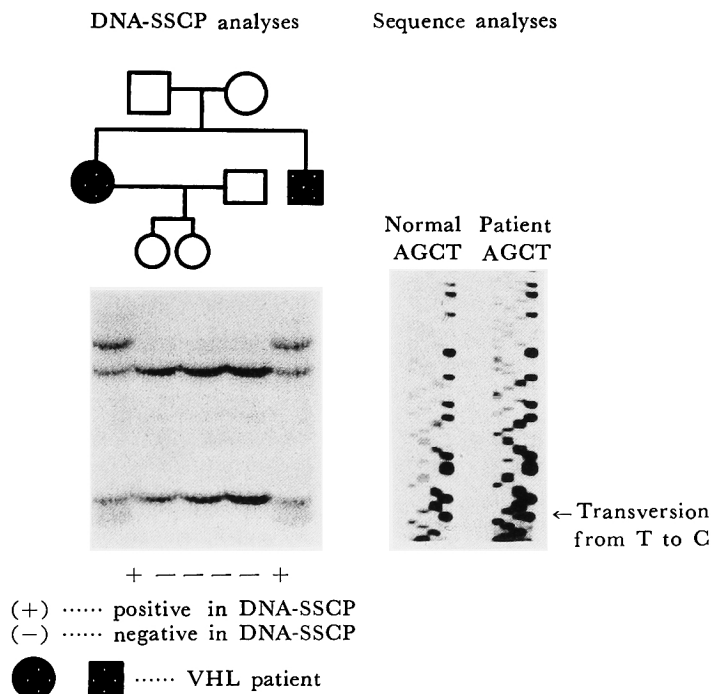


Fig. 2. Single strand conformational analysis of DNA in a patient with VHL disease and its DNA sequence.

Table 1. The mutations in the von Hippel-Lindau gene in the VHL disease; in USA, United Kingdom and Japan.

Country	Point mutation		Frameshift mutation		Splice-site mutation	Total
	Missense	Nonsense	Deletion	Insertion		
US and UK	74 (61%)	14 (12%)	19 (16%)	12 (10%)	1 (0.8%)	120
Japan	9 (56%)	0 (0%)	5 (31%)	1 (6%)	1 (6%)	16

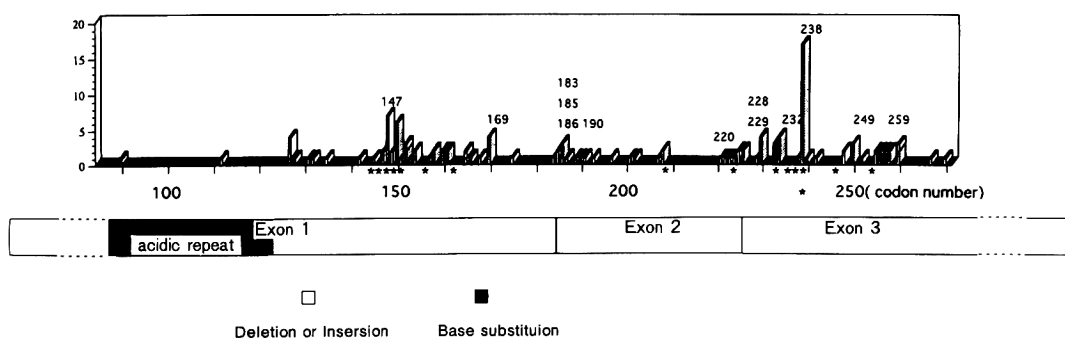


Fig. 3. Sites of mutations in the von Hippel-Lindau disease gene in the VHL patients; summary of the published reports

The sites of the mutations in the type 2 disease are indicated as codon numbers in the figure. The mark (*) shows the sites of mutations detected in Japan.

Table 2. Classification of the von Hippel-Lindau disease

Type of VHL	Major clinical manifestation	Frequency
Type 1	Hemangioma of the retina, hemangioblastoma in the CNS, renal cell carcinoma	20%
Type 2	Hemangioma of the retina, hemangioblastoma in the CNS, renal cell carcinoma + pheochromocytoma	80%

分の1と exon 2, exon 3 に広く分布している。われわれの結果もアメリカ、イギリスの解析の結果と類似した傾向であった。その他、サザンブロットで異常を認める遺伝子内の比較的大きな欠失を3例認めた。

考 察

VHL 癌抑制遺伝子の単離により常染色体優性遺伝の VHL 病のみならず、一般に発生する腎細胞癌、中枢神経系の血管芽腫が、この遺伝子の機能喪失により発生することが明らかとなった。現在のところ、幾つかのグループより VHL 家系の原因遺伝子解析の報告がなされている。その結果では遺伝子内の点突然変異、塩基の欠失、挿入がおもなものであり、サザンブロット解析で VHL 遺伝子を含んだ比較的大きな領域の欠失も認められ、pulsed field gel electrophoresis で数百 kb 以上の広範囲の欠失が発見されている⁷⁾

VHL 病はいろいろな病態があり、病態と遺伝子異常の関係の解析が今後の研究課題の1つと考えられる。Zbar らは遺伝子内の突然変異と患者の病態から VHL 病を2つの病型に分類して疾患の病態と、遺伝子変異の関係を明確に説明することを試みた⁶⁾。かれらは網膜の血管腫、中枢神経系の血管芽腫、実はこれら2つの腫瘍は病的にはほぼ同じものであるが、腎細胞癌を病態として示すものを VHL 病1型と分類した。この病型では VHL 遺伝子の塩基変異は、塩基の欠失、挿入、アミノ酸の置換 (missense mutation) や停止 codon を起こす塩基置換 (nonsense mutation) を示す。これと比べて、さらに、1型の病態に加えて副腎の褐色細胞腫が家系内に発生するものを VHL 病2型と分類した。2型では VHL 遺伝子上の塩基の変異はアミノ酸の置換を起こすもの (missense mutation) がほとんどであり、VHL 遺伝子上で塩基の変異を起こす部位も codon 238 をピークとしており VHL 遺伝子の後半部に局在する傾向がある。しかし、まだ、この分類で病像と DNA 異常の関係を説明しえる段階ではない。

これまでの結果から考えると腎細胞癌や中枢神経系

の血管芽腫では VHL 遺伝子の変異はおもに塩基の欠失や挿入である。その結果、VHL 遺伝子を作る蛋白は短くなり機能を喪失していると考えられる。VHL 1型の示す病態は腎細胞癌や中枢神経系の血管芽腫、網膜の血管腫がおもなものであるため、VHL 1型ではこれらの散発性の腫瘍と同様に VHL 遺伝子を作る蛋白 (VHL 蛋白) が機能を失っていることが病態の原因ではないかと推測される。VHL 2型では現在までの解析結果では、アミノ酸の置換 (missense mutation) がほとんどを占め、VHL 遺伝子上で、コドン238を中心とする変異の中心 (hot spot) の部位もあるため、アミノ酸の置換の結果、VHL 蛋白が何か別の機能的変化を持ち、副腎で褐色細胞腫を起こすことが推定される (Fig. 3)。

この遺伝子の細胞内での局在や機能はまだ不明であり、この遺伝子の異常がどのような機序で癌化につながっているかは明らかになっていない。今後、この方面での解析が進むことが望まれる。また遺伝子の全長が明らかになっていないが、何らかの形で、将来、遺伝子治療に応用できれば多くの癌患者の治療への貢献が可能と考えられる。

われわれは現在、日本国内の各地の医療機関の協力の下に、日本国内の VHL 病の家系解析を進行中である。国内に全部で約100家系の患者がいると推定されるが、その内、約50家系について血液 DNA を用いて遺伝子異常の解析を進行中である。VHL 病のおもな合併症は早期の診断治療で解決できる部分が多い。日本国内の von Hippel-Lindau 病の疾患の概要を明らかにし、近い将来、わが国で体系的に診断治療が行われるようにすることが、われわれの大きな目標である。しかし、この疾患は医療関係者の間でもまだ正確な理解をえているとはいえない。また遺伝病であるため、VHL 病患者からも、早期診断早期治療の重要性を理解されにくいことが度々ある。実際、彼らに接触してみると多くの場合、自分の病気が理解しがたく、悲嘆にくれている状態である。われわれの検討に対して各方面からのご理解、ご協力をいただけるようお願いする次第である。

結 語

われわれが進行中の日本国内における von Hippel-Lindau 病患者の原因遺伝子 (VHL 遺伝子) の異常の解析について説明し、併せて世界の VHL 病の遺伝子異常の結果と病態との関係について考察を加えた。われわれは28家系中19家系 (68%) に遺伝子異常か、サザンブロット解析による異常を認めている。そ

の遺伝子異常はアメリカ, イギリスにおける結果と類似する傾向が認められた。

本邦のVHL病の貴重な症例の血液をお送りいただいた下記の施設の方々に深く感謝いたします。

日本大学医学部駿河台病院脳神経外科, 都立駒込病院脳神経外科, 弘前大学医学部泌尿器科, 北海道大学医学部泌尿器科, 千葉大学医学部泌尿器科, 群馬大学医学部泌尿器科, 館林厚生病院泌尿器科, 熊谷中央病院泌尿器科, 名古屋大学医学部脳神経外科, 奈良県立医科大学泌尿器科, 新潟大学医学部泌尿器科, 横浜 労災病院 脳神経外科, 聖路加病院 泌尿器科, 徳島大学医学部泌尿器科, 金沢大学医学部脳神経外科, 岡山大学医学部脳神経外科, 沖縄共同病院内科

文 献

- 1) Maher ER, Yates RW, Harris R, et al.: Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 77: 1-13, 1990
- 2) Latif F, Tory K, Gnarr J, et al.: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317-1320, 1993
- 3) Shuin T, Kondo K, Torigoe S, et al.: Frequent somatic mutation and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 54: 2852-2854, 1994
- 4) Crossey PA, Richards FM, Foster K, et al.: Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 3: 1303-1308 1994
- 5) Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, et al.: Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene are similar to somatic von-Hippel-Lindau aberration in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet* 55: 1092-1102 1994
- 6) Chen F, Kishida K, Yao M, et al.: Germ line mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mut*; in press, 1995
- 7) Yao M, Latif F, Orchutt ML, et al.: von Hippel-Lindau disease: identification of deletion mutations by pulsed-field gel electrophoresis. *Hum Genet* 92: 604-615, 1994

(Received on April 22, 1995)

(Accepted on June 11, 1995)

(迅速掲載)