

図 11 VHL 病における褐色細胞腫の発症年齢分布

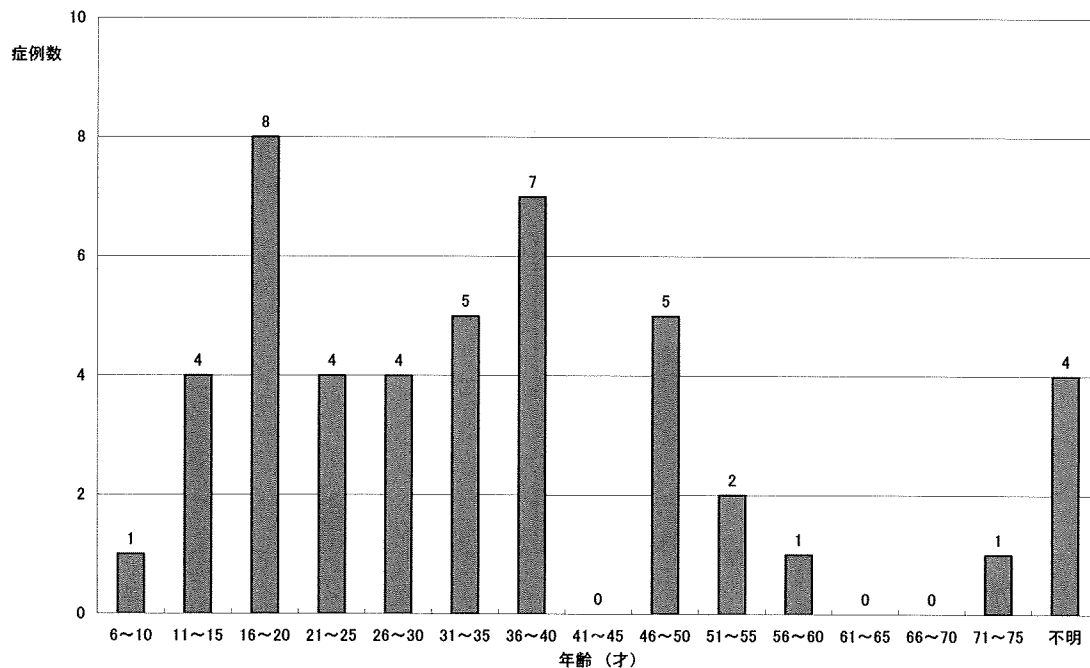


図 12 VHL 病における褐色細胞腫の治療回数

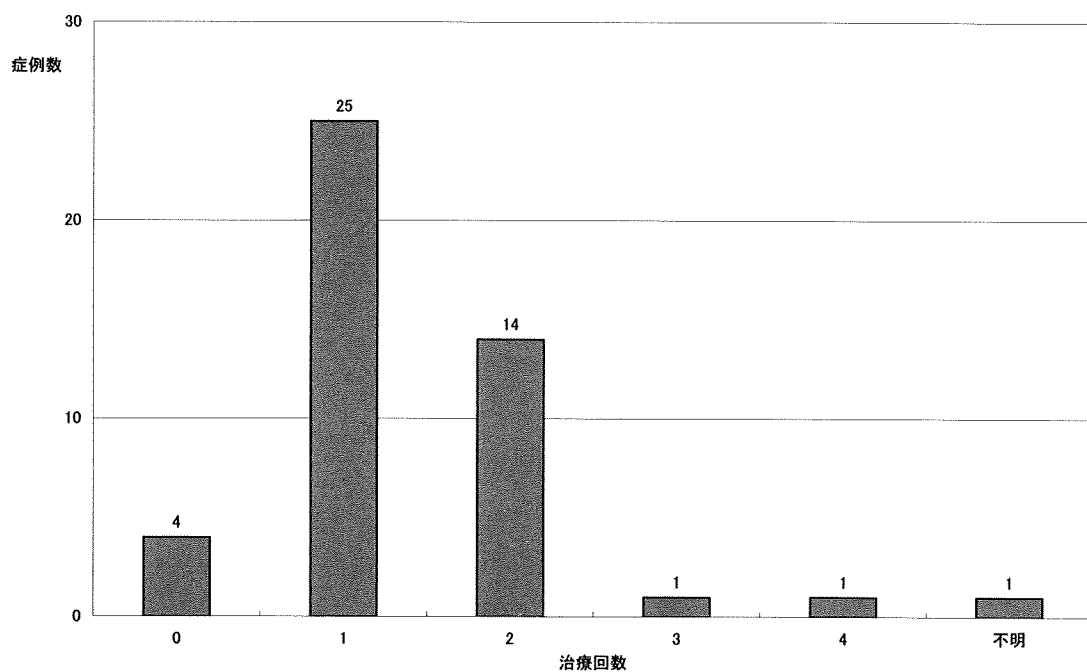
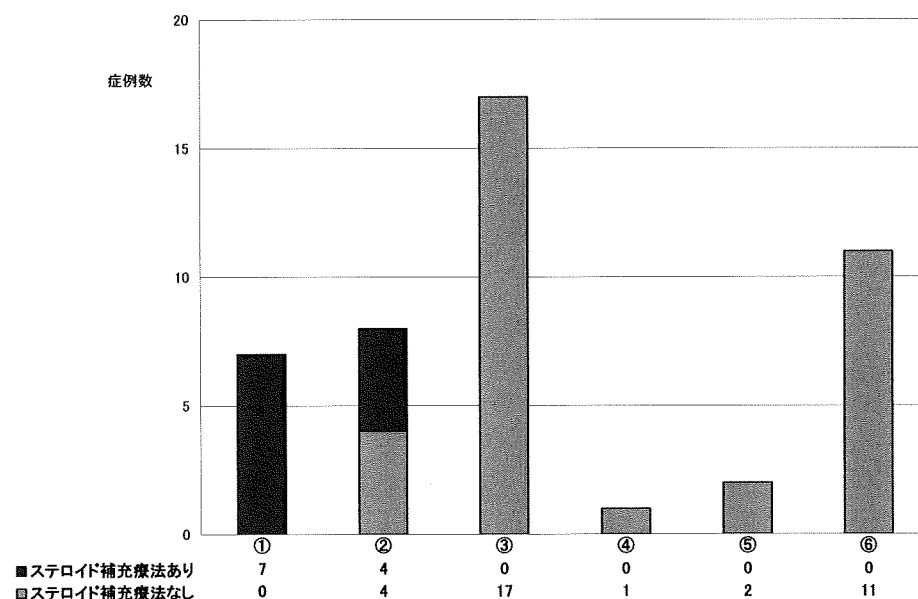


図 13 VHL 病における褐色細胞腫の治療法



- ① 両側副腎摘除
- ② 一侧副腎摘除 + 対側副腎部分切除・腫瘍核出術
- ③ 一侧副腎摘除
- ④ 両側副腎部分切除・腫瘍核出術
- ⑤ 一侧副腎部分切除・腫瘍核出術
- ⑥ 手術なし

図 14 VHL 病における膵嚢胞の発症年齢分布

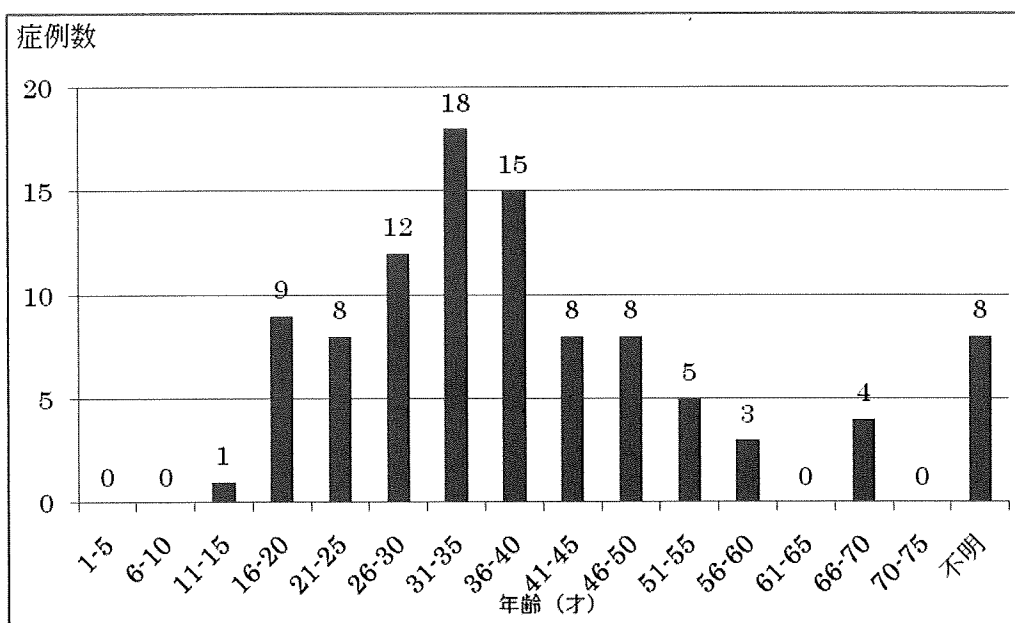


図 15 VHL 病における膵臓神経内分泌腫瘍の発症年齢分布

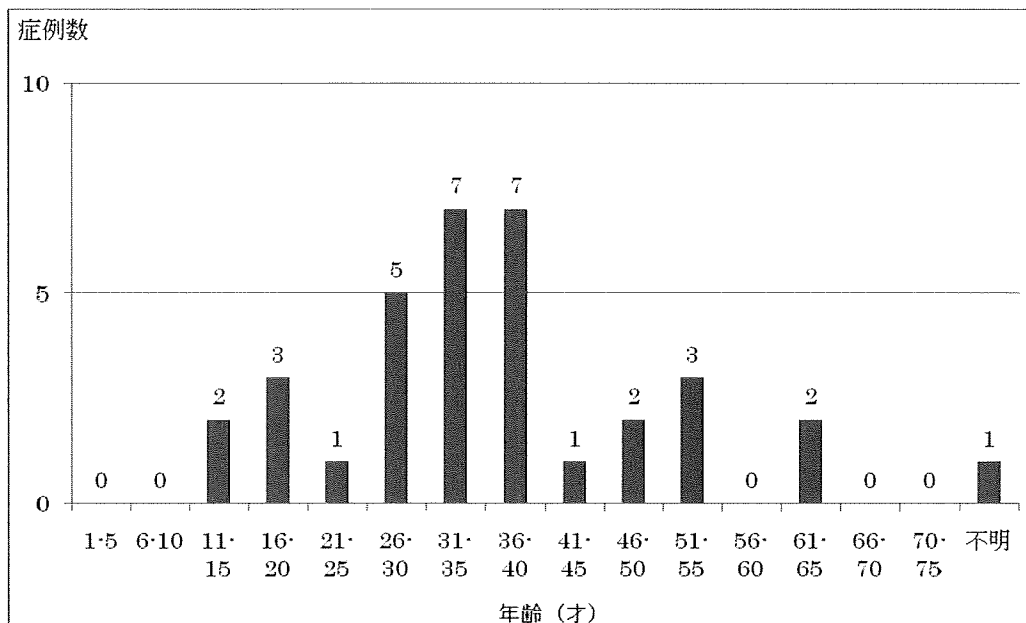
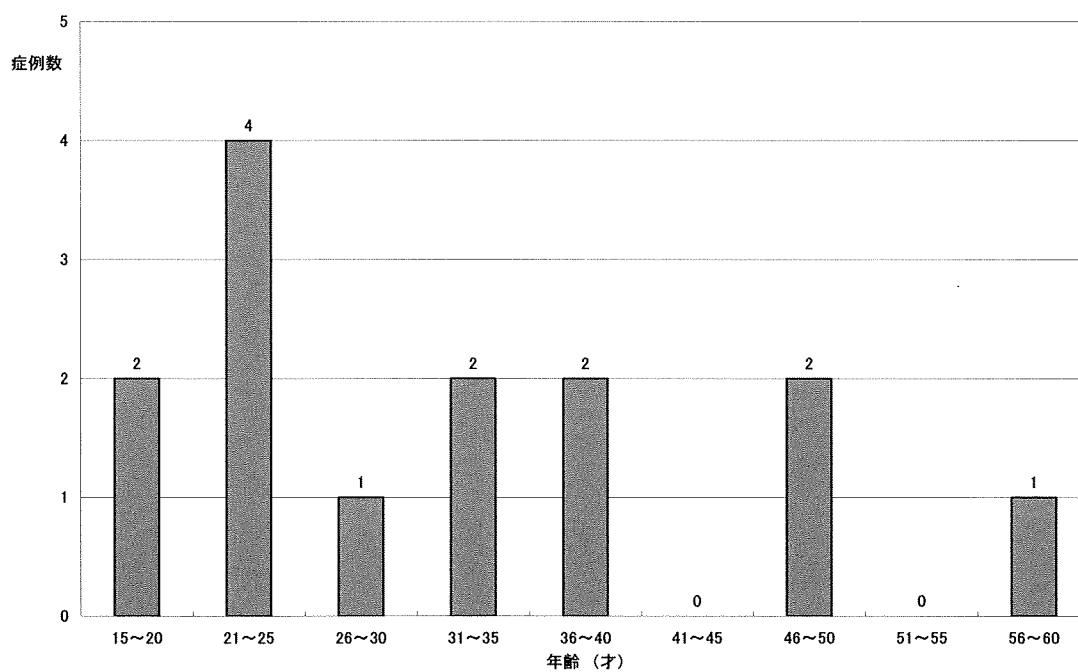


図 16 VHL 病における精巣上体嚢胞の発症年齢分布



〔Ⅲ〕

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## フォン・ヒッペル・リンドー病の診断基準について

研究報告者 菅野 洋 横浜市立大学医学部脳神経外科学教室

### 【研究要旨】

VHL病の診断基準は、家族歴がある場合とない場合で異なり、家族歴がある場合はVHL病で見られる病変が一つでも認められればVHL病と診断できるが、家族歴がない場合はVHL病で見られる腫瘍が中枢神経系とそれ以外の臓器に、あるいは中枢神経系に複数存在すればVHL病と診断される。多発性血管芽腫は従来のVHL病の診断基準を厳密には満たさなかったが、2003年のLonserらの報告以降、多発性血管芽腫があればVHL病と診断するというように変わり、ここでもそれに準じた。

#### A. 研究目的

VHL病は常染色体優性遺伝性で各種の腫瘍が多発する難治性疾患である。主に中枢神経系と網膜血管芽腫、腎細胞癌、副腎褐色細胞腫、膵腫瘍、内耳リンパ嚢腫、精巣上体嚢腫が発症する。発症頻度は欧米では3-4万人に1人とされる。本邦の正確な発症頻度、各腫瘍の好発年齢、発症関連因子の実態は解明されていない。VHL病の診断基準は、欧米の先進国（米国、ドイツ、イギリス、フランス、オランダ）では、作成されているが、本邦では作成されていない。

本研究では全体では診断治療指針の確立を目的するが、この分担領域では、VHL病の診断基準に関する検討を行った。

#### B. 研究方法

VHL病の診断基準として、すでに記載されている内外の文献を参照とした。参照

した文献は以下の参考文献に掲げる。参照した文献に記載されているVHL病の診断基準と調査で収集された本邦のVHL病の実際の症例の症候を比較検討し、整合性があるか検討し、実際に即している診断基準を採用した。

#### C. 研究結果

フォン・ヒッペル・リンドー病の診断基準として、当該研究班として以下のように提案した。

##### 1. 血縁者にVHL病がいる場合

網膜血管腫、中枢神経系血管芽腫、腎臓癌、褐色細胞腫、膵臓の病気（膵嚢胞・膵臓の神経内分泌腫瘍）精巣上体嚢胞腺腫 があることが診断されている方。

##### 2. 血縁者にVHL病がいない場合

① 中枢神経系血管芽腫と網膜血管腫または多発性中枢神経系血管芽腫が過去又は現在ある方

② 中枢神経系血管芽腫または網膜血管腫  
と以下にのべる病気がある方。

腎臓癌・褐色細胞腫

膵臓の病気

(膵嚢胞・膵臓の神経内分泌腫瘍)

精巣上体嚢胞腺腫

#### D. 考察

遺伝性疾患であるVHL病の診断基準は、家族歴がある場合とない場合で異なる。家族歴がある場合はVHL病で見られる病変（網膜血管腫、中枢神経系血管芽腫、腎臓癌、褐色細胞腫、膵臓の嚢胞・腫瘍、精巣上体嚢胞腺腫）が一つでも認められればVHL病と診断できるが、家族歴がない場合はVHL病で見られる腫瘍が中枢神経系（網膜を含む）とそれ以外の臓器に存在すればVHL病と診断される。このような規定では、中枢神経系の多発性血管芽腫はVHL病の診断基準を厳密には満たさなかったが、2003年のLonserらの報告以降、中枢神経系（網膜を含む）に多発性に血管芽腫があれば、他の臓器に病変がなくてもVHL病と診断するというように変わってきている。今回の診断基準もLonserらの報告に準じている。このような診断基準は実際に即しているものと考えられる。

#### E. 結論

VHL病の診断基準は、家族歴がある場合はVHL病で見られる病変が一つでも認められればVHL病と診断できるが、家族歴がない場合はVHL病で見られる腫瘍が中枢神経系とそれ以外の臓器に、あるいは中枢神経系に複数存在すればVHL病と診断される。

#### F. 参考文献

1. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med.* 1964;36:595-617.
2. Neumann HP. Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counselling in von Hippel-Lindau syndrome. *Vasa.* 1987;16:220-6.
3. Glenn GM, Choyke PL, Zwar B. Von Hippel-Lindau disease. *Clinical review and molecular genetics.* *Probl Urol.* 1990;4:312-330.
4. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059-67.
5. Hes FJ, Höppener JW, Lips CJ. Pheochromocytoma in Von Hippel-Lindau disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:969-74.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 外国語論文

1. Kanno H, Yamamoto I, Nishikawa R, et al. Spinal cord hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *Spinal Cord.* 2009;47:447-452.
2. Kanno H, Nakano S, Kubo A, et al. Neuronal differentiation of neural progenitor cells by intracellular delivery of synthetic oligopeptide derived from Von Hippel-Lindau protein. *Protein Pept Lett.* 2009;16:1291-6.

和文書籍

1. 菅野 洋、フォン・ヒッペル・リンドー病 日本脳腫瘍病理学会編 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第3版、医学書院、東京、2009;172-173.

2. 学会発表

1. Kanno H, Murata H, Kawahara N: Surgical management of CNS hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease, 3<sup>rd</sup> World

Federation of Neuro-Oncology, Yokohama, 2009

2. 菅野 洋、村田英俊、川原信隆：脊髄血管芽腫の手術成績 第69回日本脳神経外科学会総会(シンポジウム)、東京、2009

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 中枢神経系血管芽腫 診断と治療

研究報告者 倉津 純一 熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門  
脳・神経科学講座脳神経外科学分野

### 【研究要旨】

フォン・ヒッペルリンドウ病における中枢神経系血管芽腫の治療方針につき自経例および過去の報告から検討し治療指針を作成した。

中枢神経系の血管芽腫は主に小脳、脳幹、脊髄に発生する。MRIにて腫瘍が確認された症候性ものは脳幹部髄内腫瘍の場合を除いて基本的に腫瘍摘出術が推奨される。脊髄腫瘍と脳幹部腫瘍は症状が進行すると摘出を行っても症状の著明な改善が少ないことから、症状が軽度であるうちに摘出手術を考慮する。実質性の腫瘍は全摘出を行い、嚢胞を伴う腫瘍は、壁在結節のみ摘出する。

無症候性の腫瘍に関しては、腫瘍実質・嚢胞ともに一定速度で増大するとは限らず、ある時期に急速に増大する事があるので定期的なMRI検査を継続する事が重要である。また嚢胞は実質腫瘍よりも増大速度が速いため注意が必要である。

小脳の無症候性腫瘍は症候性になってから手術を行う事を原則とするが、1) 直径が2cm以上、2) 画像上腫瘍または嚢胞の急速に拡大をみたものは無症候性であっても手術による摘出が推奨される。

脊髄腫瘍は無症候性でも1) 1cm以上、2) 腫瘍の周辺に浮腫を伴うもの、または3) 定期的なMRIにより腫瘍または嚢胞の増大が見られるものは摘出を行う。

脳幹部腫瘍は、症候性または1cm以上の無症候性のもので、なおかつ脳幹表面に位置するものは早期手術による摘出術を考慮する。脳幹深部に存在するものは手術による摘出が困難なものもあり放射線治療も考慮する

### A. 研究目的

フォン・ヒッペル・リンドウ (von Hippel-Lindau, VHL) 病 (あるいは症候群) (MIM193300) は、常染色体優性遺伝性の疾患で、複数の臓器に腫瘍性あるいは嚢胞性病変を多発する。中枢神経系においても、嚢胞を伴うことの多い血管に富む実質性の腫瘍が小脳、脳幹、脊髄において、時間的

空間的多発性を持って複数発生する。これら多発性の病変を有する患者に対する治療法、その時期、経過観察の方法などにつき治療指針を確立させることを目的とした。

### B. 研究方法

脳神経外科の研究分担者それぞれの経験した症例、および過去の論文を検討し、診



断、治療法などの指針を作成した。

## C. 研究結果

腫瘍の発生部位別に検討した

### 1) 脳幹部腫瘍

1970年代、80年代、90年代と治療成績は向上しつつあるが死亡例も存在していることから外科的摘出のリスクはまだ高い状況である。1cm（あるいは0.7mm）以下の腫瘍で髄外のは手術の危険は低い報告が見られた。

2) 小脳の無症候性腫瘍は症候性になってから手術を行う事を原則とするが、

①直径が2cm以上、②画像上腫瘍または嚢胞の急速に拡大をみたものは無症候性であっても手術による摘出を行うことについては多くの意見がほぼ一致していた。

### 3) 脊髄腫瘍

従来報告では症候性、急速増大例に手術が施行されていたが術前の症状よりも劇的に改善することはなかった。直径1cm以内のものでは手術の安全性が高い傾向にあった。

## D. 考察

小脳の腫瘍の治療方針としては、①症候性または②直径が2cm以上③画像上腫瘍または嚢胞の急速に拡大をみたものは手術による摘出を行うべきであるという方針はほぼコンセンサスが得られる指針であろう。

脊髄腫瘍、脳幹部腫瘍は手術による合併症がひとたび起こると重篤になるリスクが高く、その適応には慎重にならざるを得ない。しかしながらいずれの部位の腫瘍もひとたび症候性となると外科的摘出が安全に行われたにも関わらず多くの報告で症状の著明

な改善が見られず、現状維持にとどまる傾向が強い。これらのことを総合すれば腫瘍がまだ小さく（1cm以下）実質外の部分が多い腫瘍では積極的な外科的摘出を推奨するという方針は正しいものと考えられる。実質内の腫瘍に関しては今回の検討では明確な指針を提示することは困難であり今後の検討が必要であろう。

無症候性の腫瘍に関しては、腫瘍実質・嚢胞ともに一定速度で増大するとは限らず、ある時期に急速に増大する事があるので定期的なMRI検査を継続する事が重要である。また嚢胞は実質腫瘍よりも増大速度が速いため注意が必要である。

## E. 結論

中枢神経系の血管芽腫は症候性のは脳幹部髄内腫瘍を除いて手術摘出を行う。無症候性腫瘍には原則的には症候性となった時に行うが脊髄腫瘍では1cm以上、小脳腫瘍では2cm以上のもの、または増大傾向が有るものは無症状でも手術が推奨される。

## F. 参考文献

1. Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM, et al. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. 2003;98:82-94.
2. Jagannathan J, Lonser RR, Smith R, et al. Surgical management of cerebellar hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease. J Neurosurg. 2008;108:210-22.

3. Lonser RR, Weil RJ, Wanebo JE, et al. Surgical management of spinal cord hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease. J Neurosurg. 2003;98:106-16.
  4. Weil RJ, Lonser RR, DeVroom HL, et al. Surgical management of brainstem hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease. J Neurosurg. 2003;98:95-105.
  5. Ammerman JM, Lonser RR, Dambrosia J, et al. Long-term natural history of hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease: implications for treatment. J Neurosurg. 2006;105:248-55.
  6. Kanno H, Yamamoto I, Nishikawa R, et al. Spinal cord hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. Spinal Cord. 2009;47:447-452.
  7. Van Velthoven V, Reinacher PC, Klisch J, et al. Treatment of intramedullary hemangioblastomas, with special attention to von Hippel-Lindau disease. Neurosurgery. 2003;53:1306-13; discussion 1313-4.
- G. 研究発表
1. 論文発表 該当なし
  2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

脳脊髄血管芽腫の治療指針（案）について  
（特に放射線治療、ガンマナイフ、サイバーナイフなどによる治療）

研究報告者 澤村 豊 北海道大学病院神経外科

【研究要旨】

放射線治療は、症候性となったものあるいは増大傾向を続ける腫瘍に対して、手術摘出リスクが高く適応でないと判断される時に第2選択肢として用いられる。文献上の報告例では定位放射線治療による腫瘍制御率（少なくとも腫瘍が増大しない）は80%以上である。2009年のMossらの報告では、定位放射線治療をされた31例82病変での局所制御率は、3年で85%、5年で82%であったとされる。5例で放射線壊死（平均腫瘍辺縁線量 28.2Gy）が発生し、その内の2例が症候性であった。一方、照射前に症候性であった41病変中の36病変（88%）で臨床症状が改善した。脊髄血管芽腫の治療成績は頭蓋内病変と同様である。拡大するのう胞成分が問題となる例には放射線治療の選択は適切ではない。VHL特有の問題は、定位放射線治療をした腫瘍に近接した部位に新たに腫瘍が増大した場合に、追加の照射では放射線照射野の重複が生じることである。

A. 研究目的

脳脊髄に発生した血管芽腫への放射線治療は、症候性となったものあるいは増大傾向を続ける腫瘍に対して、手術摘出リスクが高く適応でないと判断される時に第2選択肢として用いられる傾向がある。どのような状況において放射線治療の選択肢が考慮されるべきかを検討する。

B. 研究方法

分担研究者自身の臨床経験と文献検索から、脳脊髄に発生する血管芽腫に対する現時点での放射線治療の適応をまとめた。また代表的な放射線治療の治療成績を検索した。

C. 研究結果

治療方法としては現時点において、定位放射線治療が標準治療といえる。定位放射線治療においては一回照射と分割照射があるが、両者ともに有効性は高くどちらが優れているという結論はない。

以下に列記した文献上の報告例では定位放射線治療による腫瘍制御率（少なくとも腫瘍が増大しない）は80%以上であった。代表的な2009年のMossらの報告では、定位放射線治療をされた31例82病変での局所制御率は、3年で85%、5年で82%であったとされる。5例で放射線壊死（平均腫瘍辺縁線量 28.2Gy）が発生し、その内の2例が症候性であった。一方、照射前に症候性であった41病変中の36病変（88%）で臨床症状が改善した。

小脳血管芽腫への定位放射線治療は比較

的に安全性が高い。脳幹部血管芽腫は遅発性放射線障害が生じた場合に重篤な症状を呈することが懸念されたが、定位放射線治療によって遅発性合併症を呈した症例の頻度は極めて低い。脊髄血管芽腫の治療成績は頭蓋内病変と同様であった。

拡大するのう胞成分が問題となる例には単独放射線治療の選択は適切ではない。この様な場合には、外科手術によって拡大するのう胞を縮小せしめて、残った結節性病変へ放射線治療をするという手段が有効であった。

VHL 特有の問題は、定位放射線治療をした腫瘍に近接した部位に新たに腫瘍が増大した場合に、追加の照射では放射線照射野の重複が生じることである。このことから一つの腫瘍を放射線治療するときに、それに隣接する血管芽腫があるとき両者を含めた放射線治療を検討する必要がある。また隣接腫瘍の増大時には放射線治療が治療選択肢にならないことを示している。

#### D-E. 考察と結論

放射線照射技術の進歩により腫瘍制御率は向上している。症候性となり手術リスクが高度あるいは手術不能な脳脊髄血管芽腫に関しては積極的に検討されるべき治療方法である。しかしながら、のう胞性拡大を示すものあるいは腫瘍体積が大きいものに関しては放射線治療を行うことは困難である。

#### F. 参考文献

1. Ammerman JM, Lonser RR, Dambrosia J, et al. Long-term natural history of hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease: implications for treatment. *J Neurosurg.* 2006;105:248-55.
2. Chang SD, Meisel JA, Hancock SL, et al. Treatment of hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease with linear accelerator-based radiosurgery. *Neurosurgery.* 1998;43:28-34; discussion 34-5.
3. Jawahar A, Kondziolka D, Garces YI, et al. Stereotactic radiosurgery for hemangioblastomas of the brain. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142(6):641-4; discussion 644-5.
4. Kano H, Niranjana A, Mongia S, et al. The role of stereotactic radiosurgery for intracranial hemangioblastomas. *Neurosurgery.* 2008;63(3):443-50; discussion 450-1.
5. Koh ES, Nichol A, Millar BA, et al. Role of fractionated external beam radiotherapy in hemangioblastoma of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69:1521-6.
6. Matsunaga S, Shuto T, Inomori S, et al. Gamma knife radiosurgery for intracranial haemangioblastomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2007;149:1007-13; discussion 1013.
7. Moss JM, Choi CY, Adler JR Jr, et al. Stereotactic radiosurgical treatment of cranial and spinal hemangioblastomas. *Neurosurgery.*

- 2009;65:79-85; discussion 85.
8. Niemelä M, Lim YJ, Söderman M, et al. Gamma knife radiosurgery in 11 hemangioblastomas. *J Neurosurg.* 1996;85:591-6.
  9. Park YS, Chang JH, Chang JW, et al. Gamma knife surgery for multiple hemangioblastomas. *J Neurosurg.* 2005;102:97-101.
  10. Patrice SJ, Sneed PK, Flickinger JC, et al. Radiosurgery for hemangioblastoma: results of a multiinstitutional experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;35:493-9.
  11. Smalley SR, Schomberg PJ, Earle JD, et al. Radiotherapeutic considerations in the treatment of hemangioblastomas of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;18:1165-1171.
  12. Tago M, Terahara A, Shin M, et al. Gamma knife surgery for hemangioblastomas. *J Neurosurg.* 2005;102:171-4.
  13. Wang EM, Pan L, Wang BJ, et al. The long-term results of gamma knife radiosurgery for hemangioblastomas of the brain. *J Neurosurg.* 2005;102:225-9.
- G. 研究発表
1. 論文発表 該当なし
  2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし

フォン・ヒッペルリンドウ病に見られる脳脊髄血管芽腫における VHL 遺伝子の  
FISH 法による検出方法の確立

研究報告者 西川 亮 埼玉医科大学国際医療センター脳神経外科

【研究要旨】

フォン・ヒッペルリンドウ (VHL) 病に見られる脳脊髄血管芽腫を用いて VHL 遺伝子の FISH 法による検出方法を確立した。いずれも VHL 病と診断された症例において、2 例の小脳血管芽腫では VHL 遺伝子の欠失が検出されなかったことから、VHL 遺伝子はいずれのアレルにおいても、欠失ではなく小さい範囲の mutation が発病の原因と考えられた。一方 1 例の頸髄結果芽腫においては 3p26-p25 に存在する VHL 遺伝子と 3q12.1 両方の欠失が検出されたことから、この症例においては第 3 染色体の片側のアレルにおいて VHL 遺伝子から centromere を超えて広範囲の欠失が存在するものと推測された。

A. 研究目的

フォン・ヒッペルリンドウ (VHL) 病においては VHL 遺伝子の一方に germ line mutation を有し、発生する腫瘍においてその VHL 遺伝子の他方に somatic mutation が起こることが知られている。VHL 遺伝子の mutation には point mutation から LOH まで様々な種類が存在する。塩基配列を決定することがその mutation の種類を明らかにするための方法であるが、日常の現場において塩基配列はどの施設でも出来る方法というわけではない。Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) 法は比較的簡便に遺伝子の欠失を検出する方法で、種々の臨床診断にも応用されている。そこで、VHL 遺伝子の FISH 法による検出方法の確立と、VHL 病にみられる腫瘍へ応用する意義を解明する為に以下の実験を行った。

B. 研究方法

1. FISH 法

- 1) 手術摘出標本の未染パラフィン切片を以下の順に処理する：キシレン (15 分)、エタノール (5 分)、10mM クエン酸マイクロウェーブ (10 分)、2xSSC (5 分)、4mg/ml pepsin (35 分)、DW (3 分)、乾燥。
- 2) 5 $\mu$ l プローブ (注) を加え、75°C 10 分加熱。
- 3) 37°C 遮光オーバーナイト保温。
- 4) 1M 尿素/0.1xSSC (30 分) → 2xSSC (5 分) → 2xSSC/0.1%NP-40 (5 分) の順に洗浄 (全て 45°C、遮光)
- 5) DAPI/antifade (1 $\mu$ g/ml) で核染色、オリンパス社蛍光顕微鏡 (U-LH100HG) にて蛍光観察した。  
(注) プローブは以下の Dual-color FISH 用プローブを用いた。

TexRed :BAC clone (GSP1419H08), VHL Gene Probe, 170kb length genomic DNA (3p26-p25) 。 FITC:BAC clone (GSP1510G09), CEN3q FISH Probe, 500kb length genomic DNA (3q12.1).

## 2. 標本

症例 1 : 29 歳女性、小脳血管芽腫、症例 2 : 31 歳男性、小脳血管芽腫、症例 3 : 60 歳女性、頸髄血管芽腫。

## C. 研究結果

症例 1, 2 は腫瘍細胞内に染色体 3p26-25 の VHL gene locus を示す red dots が 2 個、反対の arm の centromere 付近である 3q12.1 を示す green dots が 1 個観察されたことから、いずれも腫瘍細胞において VHL 遺伝子の欠失は無いものと考えられた (図 1a, b)。一方症例 3 は腫瘍細胞内で同様のプローブで red dots と green dots が 1 個ずつ観察された (図 1c)。この変化は血管内皮細胞 (正常細胞) でも観察された。従って、この症例は第 3 染色体の片側のアレルにおいて VHL locus から centromere を超えて広範囲の欠失が、おそらく germ line において存在するものと推測された。

## D-E. 考察と結論

今回の研究によって VHL 遺伝子の FISH 法による検出方法が確立された。今後は症例を積み重ね、VHL 遺伝子の欠失のある症例の臨床的特徴の抽出を試みたい。

## F. 参考文献

1. Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 8. Nature. 2006;439:331-5.
2. McPherson JD, Marra M, Hillier L, et al. A physical map of the human genome. Nature. 2001;409:934-41.
3. Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, Kishi N, et al. Human BAC library: construction and rapid screening. Gene. 1997;191:69-79.

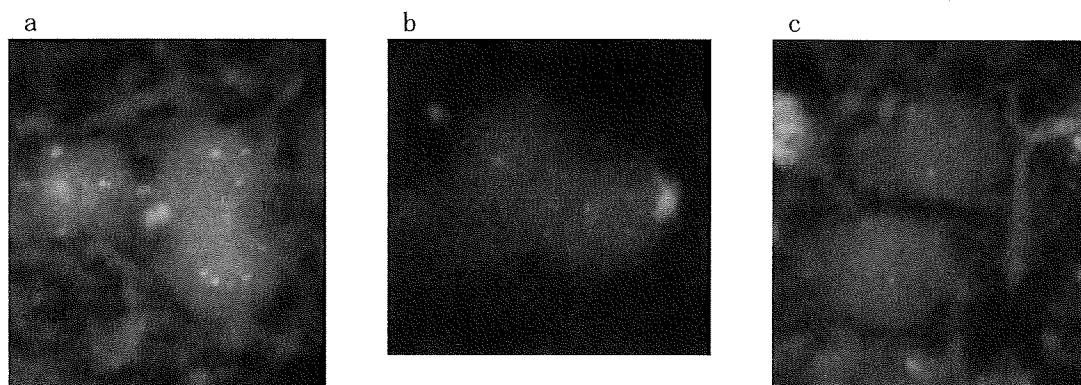
## G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

図1. 小脳および脊髄血管芽腫における FISH。a, b は小脳血管芽腫、c は頸髄血管芽腫。赤い点は VHL 遺伝子 (3p25-p25)、青い点は 3 番染色体 3q12.1。





厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 中枢神経系血管芽腫の血管新生における Akt 結合タンパク Girdin の役割

研究報告者 若林 俊彦 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経病態制御学講座  
脳神経外科

### 【研究要旨】

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白(pVHL)は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン化と分解が抑制され、VEGF (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) 遺伝子の転写を促進する。Girdin は、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、本研究では、Girdin の脳腫瘍幹細胞の幹細胞性の維持と、その役割を検討した。その結果、脳腫瘍幹細胞において分化を誘導させれば、Girdin の発現は低下し、逆に Girdin 遺伝子の発現を抑制すると、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を維持できなくなることが示された。

### A. 研究目的

フォン・ヒッペル・リンドウ (VHL) 病の原因は、染色体の 3p25 領域に存在する von Hippel-Lindau 病 (VHL) 遺伝子の変異であることが分かっている。

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白(pVHL)は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン

化と分解が抑制され、様々な遺伝子の転写を促進する。VEGF (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) もそれらの遺伝子の一つであり、血管の新生・成熟・維持などの作用を持つ。VHL 病で特徴的な血管芽腫や淡明細胞型腎癌では腫瘍血管の造成が顕著であり、VEGF も高発現している。

VEGF は、血管内皮細胞の細胞分裂の促進、血管透過性の亢進に関与するサイトカインで、正常な組織の血管新生にも不可欠な調節因子であるが、一方で、種々の癌細胞でも発現亢進が認められている。癌細胞内では、VEGF が血管新生を促すことで栄養や酸素の供給を高め、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与しているものと考えられている。

VEGF 発現による血管新生と、それに伴う細胞運動は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 経路によるセリンスレオニンキナーゼ AKT (PKB) のリン酸化活性により制御されている。その結果、低酸素誘導性因子 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) などの転写因子の合成促進、様々な下流基質の活性化が認められ、血管新生・細胞運動が促進されることが分かっているが、詳細なメカニズムは未だに不明な点が多い。

近年、新規 Akt 基質として同定された Girdin はアクチン細胞骨格の結合分子であり、アクチン線維と細胞膜との架橋の役割を果たし、Akt によるリン酸化によって細胞運動を制御することが分かっている。更なる研究によって、Girdin が、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、Girdin の機能が悪性腫瘍細胞の血管新生、細胞運動、浸潤性に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされた。

本研究では、Girdin の脳腫瘍幹細胞の幹細胞性の維持と、その役割を検討した。

## B. 研究方法

脳腫瘍の組織検体を特殊な培養培地 (EGF, bFGF, N2, B27 を加えた Neurobasal Medium) と、ノンコーティング培養皿内で、組織培養し、Sphere 形成能、自己複製能、多分化能を有し、Nod-Scid マウスの脳内に 10<sup>3</sup> 個の細胞を移植することで腫瘍生着能を確認できる細胞を brain tumor stem cell (BTSC) として、複数の脳腫瘍幹細胞系を樹立してきた。本研究では、その内の BTSC0222、BTSC0125 の系を用いた。まず BTSC0222、0125 と、BTSCs を血清中で培養し分化させ

た Differentiated Tumor Cells (DTCs) 0222, 0125 を用い、Girdin タンパクの発現、そして、Girdin の上流因子である Akt とリン酸化 Akt のタンパク発現を BTSC と DTC 間で比較した。次に Girdin short hairpin RNA (ShRNA) を含んだレトロウィルスベクターを用いて Girdin 遺伝子の発現をノックダウンさせた Girdin-ShRNA (shGirdin) BTSC を樹立した。PCR、Real Time 定量 PCR を用いて、Control-ShRNA (sh-Cont) BTSC, sh-Girdin BTSC 間で、Nestin, Oct4, Sox2 などの幹細胞マーカー、GFAP, OSP,  $\beta$  III-Tubulin などの分化マーカー、そして BTSCs の分子機構に深く関与している可能性を持つ CD133 遺伝子の発現レベルを比較した。さらに同じく sh-Control BTSC, shGirdin BTSC 間で、scratch-wound-healing アッセイ、modified-Boyden-Chamber アッセイ、brain-slice-invasion アッセイを行い、Girdin の発現レベルが BTSC の細胞運動、浸潤性にどのように関与するかを解析した。

## C. 研究結果

1. BTSCs は DTC に比べ、Akt 活性が高く、Girdin タンパクも高発現していることが示された。(図 1)
2. BTSC において、Girdin 遺伝子をノックダウンさせると、コントロール BTSC に比べて、幹細胞マーカーの遺伝子発現の低下、逆に分化マーカーの発現レベルの上昇が見られた。また CD133 は Girdin のノックダウンによって遺伝子発現が低下することも示された。(図 2)
3. scratch-wound-healing アッセイ、

modified-Boyden-Chamber アッセイ、brain-slice-invasion アッセイを用いて、Girdin遺伝子をノックダウンさせることにより、BTSCの浸潤性、細胞運動能は著しく低下することが示された。(図3)

#### D. 考察

Girdinは、Aktの新基質として血管内皮細胞や、悪性腫瘍の細胞運動のキープクターとして注目を浴びている。これまでの本研究の結果により、脳腫瘍幹細胞において分化を誘導させれば、Girdinの発現は低下し、逆にGirdin遺伝子の発現を抑制すると、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を保てなくなることが示された。そして脳腫瘍幹細胞の細胞運動能、浸潤性、腫瘍形成能に深く関わっていることが示唆された。またGirdinの上流因子AktはVEGFを介した血管新生に深く関与していることから、VHL病においても、Girdinが新たな治療法開発において注目されるべき因子であることは本研究から示唆されることであり、更なるGirdinの分子機構解明を進める予定である。

#### E. 結論

脳腫瘍幹細胞において分化を誘導させれば、Girdinの発現は低下し、逆にGirdin遺伝子の発現を抑制すると、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を保てなくなることが示された。

#### F. 参考文献

1. Yuki K, Natsume A, Yokoyama H, et al. Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by

IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett* 2009; 284: 71-9.

2. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.

3. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15178-83.

4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756-60.

5. Castellino RC, Durden DL. Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node--an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 682-93.

6. Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 2005; 9: 389-402.

7. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 329-37.

8. Enomoto A, Asai N, Namba T, et al. Roles of disrupted-in-schizophrenia interacting protein girdin in postnatal development of the dentate

- gyrus. *Neuron* 2009; 63: 774-87.
9. Kim JY, Duan X, Liu CY, et al. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 2009; 63: 761-73.
  10. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* 2001; 61: 6674-8.
  11. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002; 111: 293-303.
  12. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905-27.
  13. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.
  14. Jiang P, Enomoto A, Jijiwa M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1310-8.
  15. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14720-5.
  16. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 2008; 27: 2897-909.
  17. Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells* 2008; 26: 3027-36.
  18. Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, et al. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res* 2009; 69: 3472-81.
  19. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell* 2006; 9: 391-403.
- G. 研究発表
1. 論文発表
- 外国語論文
1. Wakabayashi T, Fujii M, Kajita Y, et al. Advanced new neurosurgical procedure using integrated system of intraoperative MRI and neuronavigation with multimodal neuroradiological images. *Nagoya J Med Sci* 2009; 71:101-7.
  2. Ohno M, Natsume A, Wakabayashi T, et al. The modulation of MicroRNAs by type I IFN through the activation of