

日本財団補助金による 2000年度日中医学学术交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

- (8) 口腔・顎・顔面領域における静脈奇形の遺伝子診断システムを第二軍医大学に構築するための共同研究

口腔・顎・顔面領域における静脈奇形 (Vascular Malformations: VMs)
の遺伝子診断システムを第二軍医大学に構築するための共同研究

研究代表者氏名：岡本哲治

所属：広島大学歯学部口腔外科学第一講座

役職：教授

住所：〒734-8553

広島市南区霞1-2-3

要 旨

第二軍医大学および広島大学歯学部附属病院で臨床的及び病理組織学的に確定診断された散在性静脈奇形 (VMs) 37 例 (男性 21 例, 女性 16例) における Tie-2 チロシンキナーゼ領域の遺伝子変異を PCR-SSCP, direct sequenceにて検討した。その結果, 8症例に G2646A の変異による Glyの Asp への置換が, 1 症例に A2659T の変異による Glu の His への置換が存在することが示唆された。さらに, その組織像, Tie-2 及び VEGF 蛋白の発現を検討し遺伝子変異との関連性について考察し, 遺伝子変異の質的相違と臨床症状には密接な関係があることが明らかとなり, 遺伝子診断の有用性が強く示唆された。

Key Words; 静脈奇形 (VMs); Tie-2, Angiopoietin, VEGF, チロシンキナーゼ型受容体, 遺伝子診断, 血管形成, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 血管周皮細胞

目的

VMsはヒトの血管奇形のうち最も頻度が高く、頭頸部の皮膚、粘膜および脳、肝臓、脾臓、膵臓などの臓器に好発し、この疾患を放置すると重大な合併症を引き起こす。早期はほとんど無症状で、症状発現までに数十年かかることもあり、特に脳等の深部臓器で発症した例では症状が出るまで診断は出来ない。血管腫よりも大きく、辺縁は不規則で境界は不明瞭なことが多く、自然退縮することはない。さらにVMsの血管腔は拡大し、全体として海綿様構造をとり、海綿様血管腫と呼ばれることもある¹⁾。組織学的には、不規則な形をした大小の血管腫と種々の量の線維性間質により構成される。血栓及びその石灰化、結石形成などをみることもあり、血管壁は一般に薄く、平滑筋細胞を欠損していることが多い。発病早期ではほとんど無症状で、発症までに数十年かかる事もあるが、放置すると重大な合併症を引き起こすことから、早期診断システムの確立が必須である。

1994年Boonら^{2,3)}は常染色体優性遺伝を示し、皮膚や粘膜に多発性の静脈異形成症を有する2家系のVMsの連鎖解析を行い、9q21に責任遺伝子が存在することを示した。さらに、1996年Vikkulaら⁴⁾は、独立した2家系の静脈異形成性症においてEndothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie-2のチロシンキナーゼ領域にArg 849 (CGG) → Trp (TGG)の変異を同定し、Tie-2はVMsの責任遺伝子であることを明らかにした。

中国におけるVMsの発生頻度は高く、第二軍医大学口腔外科では年間数10例の同患者の診断・治療を行っている。しかし、確定診断の困難さに加えて、同病変は境界が不明瞭で浸潤性であるため外科的切除後も局所再発しやすくその予後は極めて悪い。従って、Tie-2遺伝子を標的としたVMsの遺伝子診断システムを第二軍医大学で構築する事はその早期診断・治療を行う上で重要である。そこで本研究においては、第二軍医大学においてVMsの早期遺伝子診断システムを構築することを目指して、第二軍医大学および広島大学歯学部附属病院で過去に治療した37症例のVMsの組織像、Tie-2、VEGF蛋白の発現およびTie-2-TKの変異を解析し、VMsの遺伝子変異の質的相違と臨床症状や病理組織像との関係を明らかにし、さらにTie-2遺伝子変異のVMsにおける機能の解明を行った。

方法

対象：臨床的及び病理学的に確定診断された散在性静脈異形成症 37 例（男性 21 例，女性 16 例）。

方法：組織パラフィンブロックから DNA を抽出し，Tie-2 チロシンキナーゼ領域に設計した PCR プライマーを用いて PCR 及び PCR-SSCP を行った。PCR-SSCP にて変異の存在が示唆された症例について direct sequence を行い，変異の部位を同定した。さらにリンタングステン酸ヘマトキシリン染色及び免疫組織染色を行い，その組織像，Tie-2 及び VEGF 蛋白の発現を解析した。次に，変異型 Tie-2 遺伝子 (Tie-2Q837H, Tie-2G833D) および野生型 (WT) Tie-2 遺伝子をマウス由来内皮細胞株 MSS31MA に導入し，コラーゲンゲル内での三次元構築能，増殖能を検討した。また，pGEX 発現系を用いて Tie-2 のリガンド Angiopoietin-1 の遺伝子組換え蛋白 (ANG-1) を作成し，これら細胞における MAP キナーゼおよび STAT 系シグナルを検討した。

結果

PCR-SSCP の結果， 9 症例に Tie-2-TK 領域の遺伝子変異が示唆された。 Direct sequenceを行った結果， 8症例に G2646A の変異による Gly の Asp への置換 (G833D)が， 1 症例に A2659T の変異による Glu の His への置換 (Q 837H) が示唆された (表 1)。

これら症例のなかで， 症例 1 及び症例 2 を詳細に解析した。

症例 1 ; 男性， 15才， 生下時に下唇及び頬部皮下あるいは粘膜下に境界不明瞭な弾性軟の腫脹を認め， 徐々に増大傾向を示したが， 受診までに治療を受けたことはなかった。 圧迫によって赤紫色の腫脹を認め， 搏動は触知しなかった。 頭低位によって腫脹の増大を認めた。 海綿様血管腫の臨床診断下， 入院手術を受けた。

病理組織診断の結果， VMsであった。 術後約 1 年経過後に同じ部位に再発したため再手術を行い現在経過良好である (図 1)。

本症例を含め他の 7 症例いずれにおいても， G2646A の変異による Gly の Asp への置換 G833D が示唆された。 リンタングステン酸ヘマトキシリン染色にて， 平滑筋細胞数は少ないものの， 内皮細胞は比較的正常であった。 免疫組織染色にて， 血管内皮細胞に Tie-2 の高発現を認め， 血管内皮細胞， 平滑筋細胞及び周皮細胞には VEGF 蛋白の高発現を認めた。

症例 2 ; 男性， 21才， 生下時に左頬部皮下に境界不明瞭な弾性軟の腫脹を認め， 臨床症状は症例 1 に類似していた。 海綿様血管腫の臨床診断下， 入院手術を受けた。 摘出組織の病理

表 1 散在性静脈異形成症における Tie-2 チロシンキナーゼ領域の変異

症例	年齢	変異
1	15	GGC→GAC G833D
2	21	CAA→CAT Q837H
3	3	GGC→GAC G833D
4	8	GGC→GAC G833D
5	3	GGC→GAC G833D
6	7	GGC→GAC G833D
7	15	GGC→GAC G833D
8	12	GGC→GAC G833D
9	50	GGC→GAC G833D

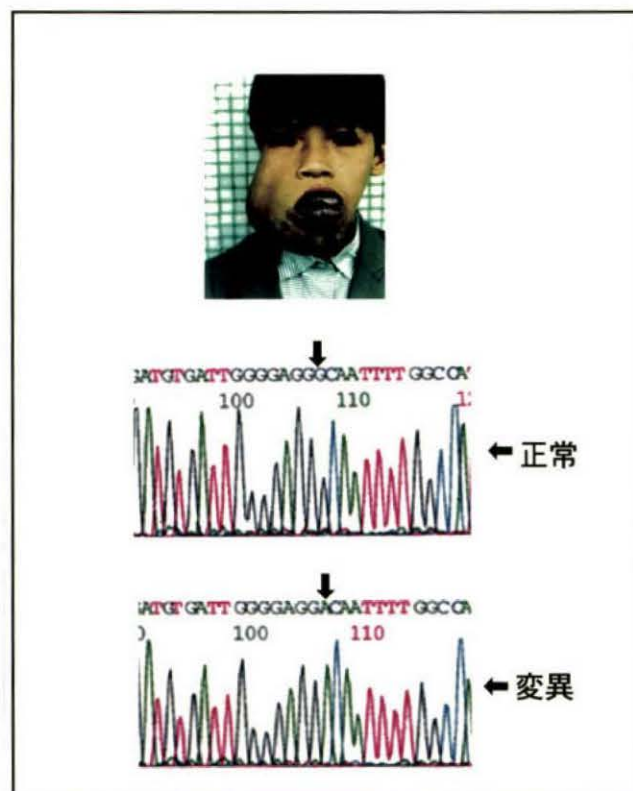


図 1 症例 1 初診時顔貌と Tie-2 チロシンキナーゼ領域の G2646A 変異

組織検査で VMs と診断された。術後再発など認めず経過良好である。Direct Sequence 及び PCR-RFLP の結果、A2659T の変異による Glu の His への置換 Q837H が示唆された（図 2）。リンタングステン酸ヘマトキシリン染色にて、円形をした平滑筋細胞及び周皮細胞が認められた。また、免疫組織染色では、血管内皮細胞及び周囲の間葉系細胞に Tie-2 の発現を認めたが VEGF の発現は全く認めなかった。

変異 Tie-2 遺伝子の機能解析

Tie-2Q837H 細胞は、コラーゲンゲル内培養系において、内皮細胞数は比較的正常なものの拡張した管腔様構造を形成した。Tie-2G833D 細胞は、内皮細胞数は極めて少なく、薄く拡張した管腔様構造を示した。

これら組織像はそれぞれの変異を有する VMs の病理組織像と類似していた。一方、Tie-2wt 細胞は、多数に枝分かれした樹枝状で、多層な内皮細胞で裏打ちされた管腔を形成した。Tie-2Q837H および Tie-2G833D 細胞は Tie-2wt 細胞に比べ Tie-2-TK の恒常的自己リン酸化の上昇を認めた。ANG-1 刺激により、変異遺伝子導入細胞では速やかな MEK および STAT3 の活性化を認め、Tie-2Q837H 細胞では p38 MAP キナーゼ活性を、Tie-2G833D 細胞では STAT1 の自己リン酸化活性を認めた。

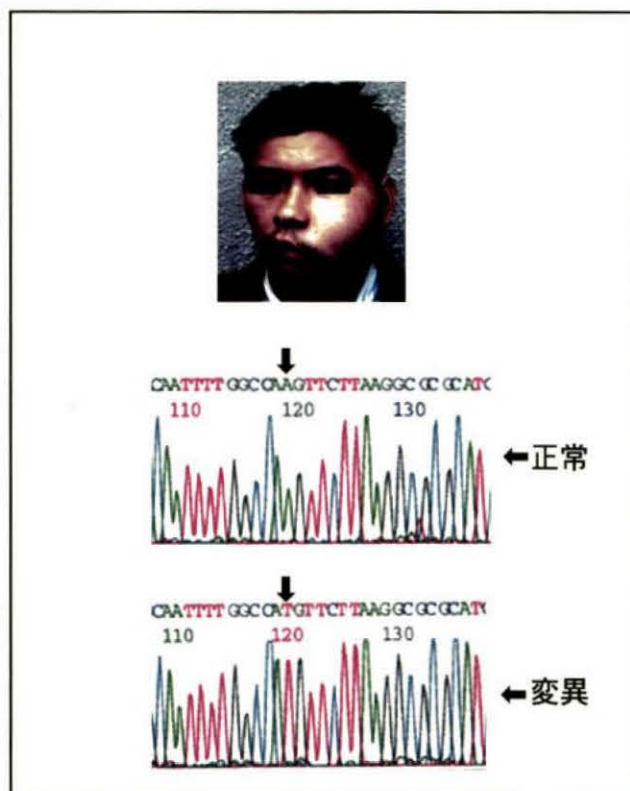


図 2 症例 2 初診時顔貌と Tie-2 チロシンキナーゼ領域の A2659T 変異

考 察

チロシンキナーゼ型受容体 Tie-2 とそのリガンド angiopoietin (ANG) は、胎生中期、後期の内皮細胞と平滑筋細胞（及び周皮細胞）の相互作用に重要と考えられている¹¹⁾。ANG-1 または Tie-2 ノックアウトマウスでは周皮細胞の遊走や細胞外マトリックス (ECM) の産生が認められないために、壁の薄い内腔の拡張した血管が形成され、胎生 10.5 日目で死亡する¹²⁾。

Tie-2 シグナルは、PDGF-BB、IGF、PDGF-AA 及び HB-EGF の分泌を促進し、周皮細胞や平滑筋細胞を血管内皮の周囲に引き寄せる^{9,10,11)}。その後、Tie-2 シグナルは抑制され、内皮細胞と間葉系細胞の接触により活性化された TGF- β は内皮細胞の増殖を抑制し、ECM の蓄積を促し、間葉系細胞の動員と遊走、周皮細胞や平滑筋前駆細胞の分化を誘導して、血管構築を終了する¹²⁾。間葉系細胞の動員及び遊走、周皮細胞や平滑筋前駆細胞の分化誘導が障害されると、VMs に見られるような血管壁の薄い内腔の拡張した異常血管が形成されるものと考えられている。

我々は、37 症例の VMs における、Tie-2-TK 領域の変異を検討し 9 症例において現在までに報告されていない変異を 2 種類同定した。Tie-2-TK 領域の変異は野生型に比べ、自己リン酸化活性が上昇していた。この活性化型遺伝子は、JAK/STAT1 系シグナル経路を活性化する¹³⁾。TGF- β は ECM の蓄積及び間葉系細胞の周皮細胞や平滑筋細胞への分化を促進することから、血管壁に平滑筋細胞が欠損する原因として、JAK/STAT1 系による TGF- β シグナルの抑制が考えられる。VEGF は内皮細胞の遊走、増殖と ECM の消化を促進し、angiogenic に作用すると考えられている^{6,12)}。我々が今回報告した G833D 変異症例における緩慢な増殖及び術後の再発は、VEGF 蛋白の高発現が関与している可能性が考えられた。一方、Q837H 変異症例では VEGF の発現はほとんど認めず、平滑筋細胞及び周皮細胞は円形を呈したことから、平滑筋細胞の分化が阻害されていることが考えられた。さらに、3 次元ゲル内培養系から、Tie-2 シグナルは stroma 細胞の血管周囲への動員と周皮細胞や平滑筋細胞への分化に関与しているのみならず、内皮腔形態の構築にも重要な働きをしていることが示唆された。また、Q837H 変異を伴う VMs で極端に内皮細胞数が少なかったのは、p38 MAPK シグナルが内皮細胞の遊走を阻害することに起因すると考えられた。

以上の結果から、Tie-2 チロシンキナーゼ領域の変異の質的差異はその臨床像、組織像や臨床経過にも強く反映することが明らかとなり、遺伝

子診断や分子診断の有用性が示唆された。従来、VMs患者では臨床症状に乏しいため、若年期から診断する事は困難であったが、本遺伝子診断により早期に発見することが可能となった。今後さらに、日中共同でVMsの治療及び遺伝子診断さらにその発症機序の解明を進める必要がある。

文 献

- 1) Mulliken J.B. et al: *Surgery* 92: 348-353, 1982
- 2) Berthelsen B. et al: *Acta Radiologica Diagnosis* 27:149-155, 1986
- 3) Boon, L.M. et al: *Hum. Mol. Genet.* 3: 1583-1587, 1994
- 4) Dument,D.J. et al: *Genomics* 23: 512-513, 1994
- 5) Vikkula M. et al: *Cell* 87: 1181-1190, 1996
- 6) Hanahan D. et al: *Science* 277: 48-50, 1997
- 7) Dumont D.J et al: *Genes Dev.* 8: 1897-1909, 1994
- 8) Suri C. et al: *Cell* 87: 11, 1996
- 9) Carmeliet P. et al: *Nature* 380: 435-439, 1996
- 10) Lindahl P. et al: *Science* 277: 242-245, 1997
- 11) Bornfeldt K.E. et al: *J. Clin. Invest* 93: 1266-1274, 1994
- 12) Folkman J. and D'Amore P. et al: *Cell* 87: 1153-1155, 1996
- 13) Korpelainen E.I. et al: *Oncogene* 18: 1-8, 1999