

脳神経外科領域の血管奇形疾患の遺伝子解析研究

医療法人啓清会 関東脳神経外科病院

研究責任者 清水暢裕

1. 研究課題名

脳神経外科領域の血管奇形疾患の遺伝子解析研究

2. 研究実施体制

【主任研究施設・責任者】

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学分野脳神経外科学・教授 齊藤延人

【分担研究施設・責任者（役割）】

医療法人啓清会関東脳神経外科病院・院長 清水暢裕（サンプル収集）

3. 研究の背景・目的

脳神経外科領域の血管奇形疾患には、脳動静脈奇形・動静脈瘻・海綿状血管奇形をはじめ様々な種類があり、疾患毎に手術、血管内治療、放射線治療などを組み合わせた集学的治療が行われるものの、脳機能障害、脳神経障害や四肢運動/感覚神経障害などを後遺する例も未だ多く存在する。そのため、血管奇形疾患の発症・進展や出血に関連する遺伝子変異を同定しその意義を解明することは重要な課題である。

遺伝性出血性毛細血管拡張症（Hereditary hemorrhagic telangiectasia; HHT）や家族性海綿状血管奇形（familial cerebral cavernous malformations; familial CCM）は脳血管奇形を生じる遺伝性疾患であり、これまで原因遺伝子の同定が進められてきた。HHT においては *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4*, familial CCM においては *CCM1*, *CCM2*, *CCM3* のいずれかの遺伝子に生殖細胞変異が同定される例が多いことが明らかとなっており、各遺伝子の機能も盛んに調べられている（McDonald et al. *Front Genet* 2015, Spiegler et al. *Mol Syndromol* 2018）。

また、非遺伝性（孤発性）例についても、脳動静脈奇形や海綿状血管奇形において *KRAS*, *PIK3CA*, *MAP3K3* 体細胞変異の報告が相次いでおり（Nikolaev et al. *N engl J Med* 2018, Hong et al. *Brain*. 2021）、より詳細な発症メカニズムの解明、正確な診断や予後予測、新規治療法開発に対する期待が高まっている。

本研究では、脳神経外科領域の血管奇形疾患に対する遺伝子解析を行うことで疾患の発症や重症化に関連する遺伝的要因を解明することを目的とする。

引用文献：

1. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet.* 6;1, 2015.
2. Spiegler S, Rath M, Paperlein C, Felbor U. et al. Cerebral Cavernous Malformations: An Update on Prevalence, Molecular Genetic Analyses, and Genetic Counselling. *Mol Syndromol.*

9;60-69, 2018.

3. Nikolaev SI, Vetiska S, Bonilla X, Boudreau E, Jauhainen S, Rezai Jahromi B, Khyzha N, DiStefano PV, Suutarinen S, Kiehl TR, Mendes Pereira V, Herman AM, Krings T, Andrade-Barazarte H, Tung T, Valiante T, Zadeh G, Tymianski M, Rauramaa T, Ylä-Herttuala S, Wythe JD, Antonarakis SE, Frösen J, Fish JE, Radovanovic I. Somatic Activating KRAS Mutations in Arteriovenous Malformations of the Brain. *N Engl J Med.* 387;250-261, 2018.

4. Hong T, Xiao X, Ren J, Cui B, Zong Y, Zou J, Kou Z, Jiang N, Meng G, Zeng G, Shan Y, Wu H, Chen Z, Liang J, Xiao X, Tang J, Wei Y, Ye M, Sun L, Li G, Hu P, Hui R, Zhang H, Wang Y. Somatic MAP3K3 and PIK3CA mutations in sporadic cerebral and spinal cord cavernous malformations. *Brain.* 144;2648-2658, 2021.

4. 研究対象

遺伝性出血性毛細血管拡張症、脳動静脈奇形、頭蓋内動静脈瘻、脳海綿状血管奇形、脊髄動静脈奇形、脊髄動静脈瘻、脊髄海綿状血管奇形、眼窩内海綿状血管奇形の症例を対象とする。これらの症例において、インフォームド・コンセントを得て末梢血液 5~20mL 程度を採取する。診断時の生検組織・手術の際に病変摘出のために取り出された組織（血管奇形および脳・脊髄組織、周囲支持組織（硬膜、くも膜、筋、脂肪など）を含む）、もしくは病理組織標本の一部も得る。これらの組織より DNA・RNA・タンパク質を抽出する。また、過去に、診断時の生検組織・手術の際に病変摘出のために取り出された血管奇形組織についても、同意獲得または拒否機会の提供を行った上で研究対象とする。新規症例と同様、組織より DNA・RNA・タンパク質を抽出する。

5. 研究方法

Genome 解析、epigenome 解析を行う。genome 解析の対象には、遺伝子内の変異・欠失、遺伝子範囲を含んだ大型の欠失 (loss of heterozygosity)、コピー数変化などが、epigenome 解析の対象には、遺伝子 promoter 領域やヒストンタンパクのメチル化およびアセチル化が含まれる。具体的な解析方法は、Sanger 法、droplet digital PCR 法、MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) 法、Microsatellite marker を利用した LOH (loss of heterozygosity) 解析、Methylation specific PCR 法を利用したメチル化解析および次世代シーケンサーを用いた大規模塩基配列解析などである。これらの解析は、必要に応じ外部委託で行う。

続いて、病態に関与する遺伝子やその変異、発現異常、エピゲノム変化が見出された場合、患者由来の血液・診断時の生検組織・手術の際に病変摘出のために取り出された組織（血管奇形及び脳・脊髄組織、周囲支持組織（硬膜、くも膜、筋、脂肪など）を含む）、もしくは病理組織標本ブロックの一部を用いた機能解析（細胞生物学的・生化学的・病理学的解析）を行う。具体的には、マイクロアレイ解析、リアルタイム PCR 解析および次世代シーケン

ンサーを用いた大規模 RNA シーケンス解析等による RNA 発現解析、免疫組織化学染色、in-situ hybridization, ELISA, SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis) 法、免疫ブロッティング法等によるタンパク発現・局在解析などを行う予定である。さらに、得られたゲノムデータについて、発症様式、重症度、手術成績、予後などとの関連を解析することにより、臨床との関連上の意義を明らかにすることを旨とする。

6. 研究期間

承認日～2026 年 11 月 30 日まで

7. 研究対象者の実体験

外来受診時または入院時に、担当医により、説明文書を使用した研究内容の説明を受けた後、同意を表明する。血液の採取を、通常の方法にて受ける。回数は 1 回のみ、量は 5～20mL 程度で、侵襲は注射針刺入時の痛みがある。拘束時間は最大 10 分程度である。採取は外来診察時または入院時、同意を表明したタイミングで行われる。手術の予定がある場合には、可能な限り手術中（血管奇形摘出術など）に、麻酔管理のために留置されている動脈ラインより採血を受ける。この場合には新たな拘束時間はないと言える。

血管奇形病変組織の採取については、通常診療における生検あるいは摘出手術の際に取り出された組織の一部が使用される。新たな拘束時間はないと言える。

8. 研究対象者への負担やリスク・利益および対応

身体的・心理的負担：

本研究においては血液および診断時の生検組織・手術の際に病変摘出のために取り出された組織（血管奇形および脳・脊髄組織、周囲支持組織（硬膜、くも膜、筋、脂肪など）を含む）、もしくは病理組織標本ブロックの一部を使用する試料として用いるため、患者には実際に各疾患の通常の診断・治療にあたって必要となる検査・手術操作以上の負担は極めて少ないと考えられる。採血は通常の診療に必要な分に加え 5～20mL 程度を採取するが、これによる身体への負担は非常に少ないと考えられる。

情報漏えいの危険：

本研究はゲノムシーケンシングを含む遺伝情報を取得する研究である。第三者に知られる危険を回避するために個人のゲノム、遺伝子情報の秘守管理体制を構築し患者に不利益が生じることのないようにする。

変異・新たな疾患への罹患・今後罹患しやすい疾患名が判明する危険：

本研究ではゲノムシーケンシングを含み患者の疾患リスクに関する情報が判明する危険がある。本研究では予防・治療上極めて重要になる情報を主治医に知らせる場合以外には、基

本的に取得した遺伝情報は患者に戻さないものとする。また第三者に知られる危険を回避するための対応策として匿名化を行うものとする。

研究対象者の利益がある場合：

偶然に重大な疾患との関連が見つかり、患者および家族、血縁者がその結果を知ることが有益であると判断された場合に、各採取臨床施設の担当医・倫理審査委員会らと協議の上、遺伝カウンセリングが実施される。

9. 同意取得・撤回の詳細

担当医師は対象者に対して、説明文書に基づき十分に説明した上で、本研究の参加について患者本人もしくは代諾者の自由意思による同意を、添付した同意書で得る。またその際には可能な範囲において家族内の血縁者との話し合いを促す。撤回の自由も同時に説明する。過去の症例についても、今後外来診療などが行われる場合には同意を得、今後診療がない場合にはオプトアウトにより拒否機会の提供を行う。

10. 個人情報等の取扱いと匿名化の方法

本研究で取り扱う試料・情報等は、各施設管理責任者が匿名化した上で研究・解析に使用する。匿名化の方法については、誰のものか一見して判別できないよう、本研究で取り扱う情報から個人を識別できる情報を削除し独自の符号を付す作業を行う。個人情報と符号の対応表は、個人情報管理者が厳重に保管する。また、本研究の成果を学会発表及び論文発表する際には、研究対象者の個人を特定できる情報は一切使用しない。

11. 共同研究施設間での試料・情報の授受

採取した試料について、DNA・RNAの抽出や変異・発現解析、情報解析を行うため、共同研究機関間での試料・情報の授受を行う。授受の際には、DNA・RNA・組織検体資料は実験に用いる通常の容器に入れ、臨床情報・ゲノムデータについてはパスワード付きのファイルとしてハードディスクに保存し、専門業者による輸送により行う。

12. 試料・情報の保管および廃棄の方法

試料は、鍵のかかる試料室に保存する。残検体は、研究終了後5年間保存した後に廃棄することを原則とするが、患者からの同意が採取時に得られている場合には、新たに計画・実施される研究のために長期保存される（この場合、新たな研究に関し再度倫理委員会の承認を得る）。各施設管理責任者が責任をもって対応する。情報は、鍵のかかる資料室のスタンドアローンのパソコンに保存する。研究終了後5年間保存した後に、速やかにパソコンより消去する。各施設管理責任者が責任をもって対応する。

13. 研究の資金源等、研究機関の研究に係る利益相反及び個人の収益等、研究者等研究に係る利益相反に関する状況

資金：

基盤研究（B）Grant-in-Aid for Scientific Research（B），外科系臨床医学，脳神経外科学，新規血管奇形原因遺伝子による疾患発症メカニズムの解明

利益相反：

利益相反はない。

14. 関する情報公開の方法

本研究の成果は今後学会および論文にて発表される。公共データベースへの登録によりゲノムデータの公開を行う場合もある。公共データベースへの登録については、多くの症例のデータをまとめた結果はインターネットで公開し、公開されることによって個人識別が可能となるデータについては、一般公開せず、審査を受けて承認された研究者にのみ利用を許可する。

15. 研究対象者及びその関係者からの相談等への対応

研究対象者等及びその関係者からの相談については、以下の相談窓口にて対応する。

各共同研究機関においては、責任者又は分担者が対応する。

【相談窓口】

研究責任者

関東脳神経外科病院 院長 清水暢裕

〒360-0804

埼玉県熊谷市代 1120

Tel：048-522-3133