

神経線維腫症2型 (NF2) 遺伝子の機能と病態の関連

研究協力者 佐谷秀行, 荒木令江, 中尾光善, 徳王 宏
(熊本大学医学部腫瘍医学)

はじめに

神経線維腫症2型 (NF2) は、出生35,000~40,000人に1人の割合で見られる常染色体性優性遺伝の疾患である。NF2は多彩な神経皮膚組織の異常に加え、多発性頭蓋内良性腫瘍をほぼ必発することで特徴づけられる疾患である。NF2における頭蓋内腫瘍は良性ではあるが、再発・多発を繰り返すため患者の生命予後は神経皮膚症候群の中でも最も悪い。NF2の責任遺伝子は22番染色体長腕上 (22q12) に存在し、コードされるタンパク質 (マーリン) はそのアミノ末端約半分の構造がエズリン、ラディキシン、モエシン (ERMファミリー蛋白とよぶ) など細胞膜裏打ち蛋白と極めて高い相同性を示す事が見いだされた^{1,2)}。

NF2遺伝子の欠失・変異は、NF2患者のみならず、非NF2患者における散発性の腫瘍でも高い頻度で起こっており、そのほとんどがタンパク質の合成を途中で中断するタイプであることから、マーリンが細胞内で腫瘍抑制分子として機能していることが示唆される。しかし、マーリンの構造と機能の如何なる変化が、どの様に腫瘍発現に関わっているかに関しては全く不明である。本研究はNF2遺伝子の変異の特徴、その遺伝子産物マーリンの細胞内における発現・局在様式、及び細胞内機能を分子レベルで解析することにより、NF2の病態発症機構解明と新たな診断法・治療法開発の基礎を築くことを目的として行なった。

対象および方法

[1] NF2タンパク質 (マーリン) の細胞内局在の解析:

哺乳類発現ベクターに正常及びNF2患者から得られたexonを欠いた変異型NF2 cDNAを組み込み、VA13 cells及びCOS cellsに発現させ、その動態をウエスタンブロット法と共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) で観察した。CLSMにおいてはさらに経時的な変化を捉えるために、発現プラスミドを核内に注入し、正常及び変異NF2遺伝子産物の詳細な細胞内分布を観察した。又、正常NF2プラスミドに種々の部位特異的変異を導入し、その細胞内での発現パターンを解析することによって、NF2タンパク質上の細胞内局在を決定する部位を同定した。

[2] マーリン結合タンパク質の同定、及びそれらの相互作用の解析:

我々は既に5種類の細胞タンパクがマーリンに特異的に結合することを確認・報告している³⁾。これらのタンパクを同定することを目的として、大腸菌発現GST-マーリン融合蛋白を固相化させたアフィニティカラムを用い、牛脳抽出液よりマーリンに特異的に結合する細胞内タンパクの精製を行なった。これら単離結合タンパク質をペプチダーゼにより消化し、HPLCにて精製した断片のペプチド配列を決定した。決定した配列に基づきデータベースによる検索を行い、候補となるタンパク質の同定を行った。同定されたタンパク質の抗体、及び抗マーリン抗体を調製し、免疫沈降実験、及びWestern-Blottingにより、in vitro, in vivoにおけるこれらのタンパク質間相互会合性の解析を行った。又、マーリン会合性タンパク質の細胞内分布と、相互機能の変化を解析した。

[3] NF2タンパク質の翻訳後分解機構の解析:

NF2患者由来の髄膜腫 (3例)、散発性の髄膜腫 (6例)、NF2患者由来の聴神経鞘腫 (13例)、散発性の聴神経鞘腫 (2例)、陰性対照として悪性グリオーマ細胞を用いて、in vitroの転写および翻訳システムを用いたタンパク質翻訳停止テスト (PTT) で、そのcDNAシーケンス上にNF2遺伝子変異が認められなかったものについて、タンパク質翻訳後分解の有無を解析した。種々のタンパク質分解酵素阻害剤やカルシウムイオノフォアをNF2発現細胞に処理し、

NF2タンパク質マーリンの翻訳後のタンパクレベルの分解機構をWestern-Blottingにより解析した。又、GST-NF2リコンビナントタンパク質をin vitroでカルパインで限定分解し、その分解産物のカルボキシル基末端のアミノ酸シーケンスを施行することによって、限定分解部位の決定を行った。次に、生理的な細胞内カルシウム濃度で反応するm-カルパインの活性化状態を髄膜腫の腫瘍組織を活性化型m-カルパイン特異的抗体を用いて免疫組織化学染色により解析した。

結 果

[1] 正常型および変異型マーリンの細胞内局在：

NF2遺伝子の変異と翻訳後のNF2タンパク質マーリンの解析を24例の髄膜腫・聴神経鞘腫でPTT法により行ったところ、解析した腫瘍の24例中の15例に N末端側においてexon欠失やフレームシフトによる翻訳停止した変異マーリンが検出された⁴⁾。これらの変異NF2cDNA、及び正常NF2cDNAを緑色蛍光性をもつpEGFP哺乳類発現ベクターに挿入し、トランスフェクションにより細胞内にGFP-マーリンを発現させ、その細胞内局在を解析したところ、正常マーリンは細胞膜および細胞質全体に顆粒状に発現していることが判った。一方、高変異部位であるアミノ末端側が変異しているマーリンは、核内・及び核周囲に蓄積した形で発現することが判明した⁴⁾。これらの所見は正常培養細胞中の正常マーリンが細胞質や膜に、またNF2患者の腫瘍細胞中の変異マーリンが核に検出される所見と一致する。なぜマーリンは変異すると核に蓄積するのであろうか？我々はマーリンの一次構造を解析し、核移行や核外輸送に関わる配列を検出することにした。その結果、マーリンには1カ所の核移行シグナル (NES) 配列、及び4カ所の核外輸送シグナル (NES) 配列 (Exon3, 8, 9, 15; NES3, NES8, NES9, NES15) に類似する部位が存在することが判明した。そこで、NESに特異的に作用してタンパク質の核外輸送を阻害する試薬であるレプトマイシンB (LMB) を細胞に処理して、正常のマーリンの細胞内局在を観察したところ、LMB処理後12時間でマーリンは完全に核内に蓄積するようになることが判明した (図1)。正確なマーリン上のNES部位を決定するため、4カ所のNESをそれぞれ部位特異的に変異させ、各種の変異NES-GFP-マーリンを細胞内に発現させてそれぞれの細胞内局在を観察したところ、アミノ末端側上にあるNES3, NES8, NES9はそれぞれ単独の変異で核内及び核周囲に蓄積するようになることが判明した。一方C末端側のNES15変異マーリンは逆に細胞膜移行性が正常よりも増強されることが判った。これらのことから、正常マーリンは細胞内で細胞膜～細胞質～核～細胞質へとシャトルするタンパク質であり、変異によるマーリン上のNES近傍の構造変化によってこのシャトル機構が阻害されることが推測された。

[2] マーリン結合タンパク質の同定、及びこれらの相互作用

ヒトニューロblastoma (SH-SY5Y) 細胞、及び牛脳灰白質可溶性蛋白画分を用いてGST-マーリンアフィニティーカラムに結合する蛋白質を解析したところ、コントロールであるGSTカラムには結合しないが、GST-マーリンカラムにのみ結合する5種の蛋白質 (125KD, 90KD, 85KD, 40KD, 35KD) を検出した³⁾。この中で結合活性の著しい125KD (p125) および85KD (p85) の部分アミノ酸配列を決定したところ、p125より得られたペプチドのアミノ酸配列全てがpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の部分配列と一致することが、またp85は全てKu85蛋白と一致することが判明した。又、GST-マーリンカラムに結合したp125、p85がウエスタンブロッティングにより抗PARP抗体および抗Ku85抗体陽性であったことから、それぞれp125がPARP、p85がKu85であると断定した。

U251細胞可溶性蛋白質に抗PARP抗体および抗Ku85抗体を反応させて得た免疫沈降物中に抗マーリン抗体陽性のバンドが検出されたことより、細胞内でマーリンとPARPならびKu85が結合することが確認された。又、同時に抗Ku70抗体に反応するバンドが検出されたことから、NF2結合タンパク質中のP70はKu-antigen p70 (Ku70) であることが判明した。これらの結合タンパク質のマーリン分子上の結合部位を同定したところ、PARPの結合には19から339番目のアミノ酸配列が、又、Ku85及びKu70では、19から400番までの配列が重要であることがわかった。これらの結合部位はNF2の高変異部位であり、マーリンの変異によってこれらの結合タンパク質と相互作用できなくなることが判明した。又、PARPの酵素活性をGST-マーリンの共存下で測定したところ、マーリンの濃度依存的にPARP活性が上昇し、その結果マーリンのN末端側がpoly ADP-ribosyl化されることが判った。

[3] マーリンの翻訳後分解機構の解析：

解析した約半数の散発性の髄膜腫・神経鞘腫にはNF2変異が見い出されなかった。にもかかわらず、マーリンタンパク分子がこれらの組織でほとんど検出されなかった。このことからマーリンの翻訳後調節、特にタンパク質分解が、マーリンの不活性化に関与すると考えられた。そこで、我々は種々のタンパク分解酵素阻害剤、及び活性化剤を用いて、ヒト線維芽細胞、及びCOS細胞過剰発現マーリン分子の動態を解析したところ、システインプロテアーゼ阻害剤 (E64d) とカルパイン阻害剤 (carbobenzoxyl-leucyl-leucinal ; Z-LLal) の処理で完全長のマーリンが蓄積することが判った。更に、マーリンは細胞内においてカルパイン依存性にN末端側約35Kdの限定分解フラグメントを生じ、その後速やかに分解消失することが判明した。このマーリンの35Kd分解産物のC末端アミノ酸解析の結果、マーリンのERMドメインと α -ヘリックス領域間の境界部2カ所；294K-295Lと298Q-299L間が切断部位であった。更に、NF2遺伝子変異が検出されない髄膜腫及び聴神経鞘腫において、カルパインが恒常的に活性化されており、この状態においてマーリンのカルパインによる分解が過剰に活性化されていることが判った。これらの事実から、NF2遺伝子に変異が無くとも、細胞内で過剰に活性化されたカルパインによって、マーリンがタンパク分解を受けて不活性化されることが腫瘍化の原因となる可能性が有ることが示唆された⁵⁾。

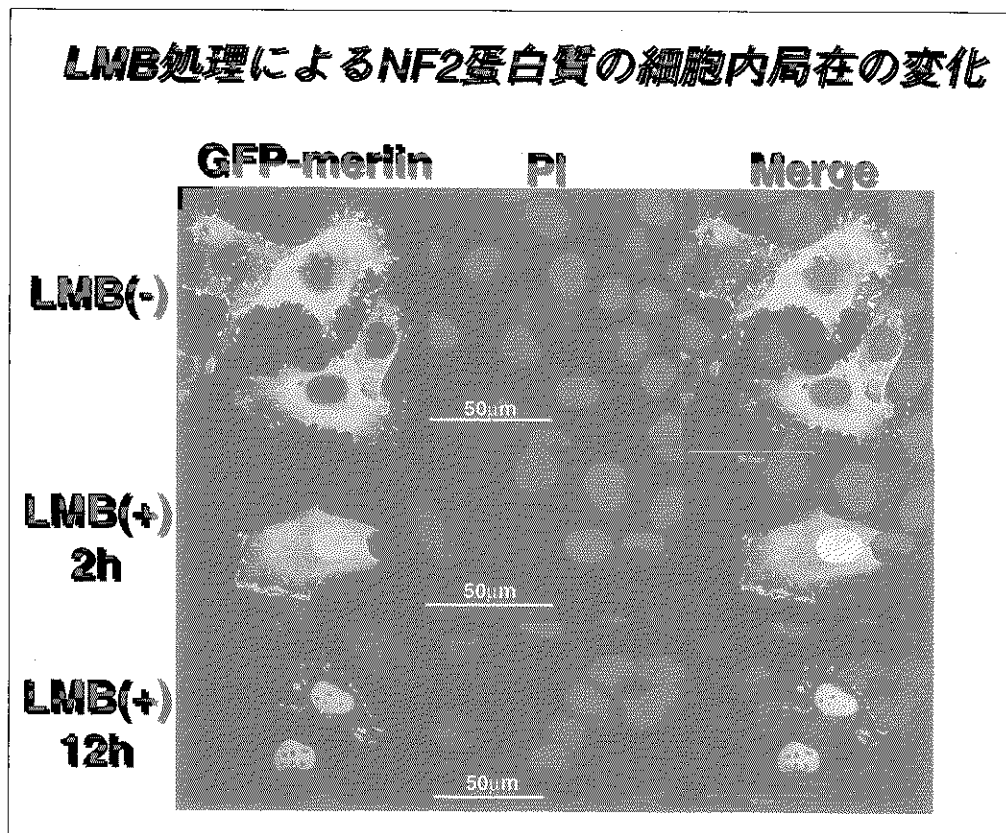


図1；正常型NF2タンパク質（マーリン）の核外輸送シグナル（NES）を介した細胞内シャトル機構----Leptomycin B(LMB)存在下におけるマーリンの細胞内発現の経時的変化
正常型NF2 cDNA (pEGFP-NF2) 核内注入後12時間 (上)、LMB添加後2時間 (中)、LMB添加後12時間 (下)。

考察・結論

NF2遺伝子産物マーリンは、その構造上の類似性からERMファミリータンパク質の一つとして細胞骨格系との相互作用がある腫瘍抑制因子と考えられているが、その細胞内局在はもとより、腫瘍抑制因子としての細胞内機能は全く明らかにされていない。我々はNF2遺伝子の変異は、その90%以上がtruncational typeの異常であること、さらに多くの異常がERM相同ドメイン内で生じるexonの欠如によることを明らかにした。そこでNF2遺伝子産物の細胞内局在と機能を明確にする目的で、ERM相同ドメインにexon欠如を持つ変異型マーリンと正常型マーリンの細胞内局在を詳細に検討した。その結果、正常では主に細胞質辺縁部と細胞質に発現するマーリンが、変異によって全て核に蓄積するようになることを明らかにした。又、マーリンのERM相同部の3カ所に核外輸送シグナル（NES）配列を同定したことから、我々はNF2タンパク質は本来、核内を通過して細胞質や細胞膜にシャトルする分子として機能していることを示唆した。次に我々は、マーリンが関わる細胞内でのシグナルを明らかにし、その異常と脳神経系腫瘍発生の関連性を解析するために、マーリンと会合する細胞内蛋白質（p180, p165, p125, p85, p70）の同定を試み、少なくともp125はPARP、p85はKu85、p70はKu70であることを明らかにした。PARPおよびKuは、DNA修復、細胞周期、細胞死（アポトーシス）に関連するタンパク質として知られており、マーリンがこれらの制御を介して腫瘍形成抑制に働いているという可能性が示唆された。事実、PARPおよびKuのマーリン分子上の結合部位は、NF2遺伝子の高変異部位であるN末端部であり、この部位を介して、PARPの酵素活性上昇とそれに伴うpoly ADP-ribosylationがマーリン分子上に起こることなどから、細胞内でこれらの相互作用が、マーリンを介するシグナル（増殖抑制や生理的アポトーシスなど）のスイッチ機構になっている可能性があると考えられる。又、正常に翻訳されたマーリン分子でも、細胞内にて何らかの機構で活性化したカルパイン等のタンパク質分解酵素依存性の過剰な分解によって、その腫瘍抑制分子としての機能が失活する可能性があることを見出した。このことは、タンパク質翻訳後の分解機構によってマーリンの腫瘍抑制シグナルが停止し、その結果腫瘍発生を導く可能性があることを示唆する。我々は、この現象にタンパク質分解変異（proteolysis mutation）という名称を提唱している。

NF2に関連した腫瘍は病理学的には良性であるが、臨床医学的には、外科手術が困難であったり再発を繰り返すために極めて重篤な疾患である。その原因因子と考えられるNF2タンパク質マーリンの腫瘍抑制機能は、マーリンを介する細胞内シグナルによる細胞増殖抑制と、脱落すべき細胞の生理的アポトーシスの誘導であると考えられる。我々のこれまでの結果は、例えばカルシウムブロッカーやカルパイン阻害薬剤や、マーリン結合タンパク質を介した細胞内シグナルを回復させるような薬剤が、細胞増殖の抑制や再発の防止などの治療目的に応用できる可能性を示唆している。

参考文献

- 1) Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL et al. : A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72 : 791-800, 1993
- 2) Rouleau GA, Merel P, Lutchman M et al. : Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363 : 515-521, 1993
- 3) Takeshima, H., Izawa, I., Lee, P.S. et al. : Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene* 9 : 2135-2144, 1994
- 4) Koga H, Araki N, Takeshima H, Nishi T, Hirota T, Kimura Y, Nakao M, and Saya H : Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17 : 801-810, 1998
- 5) Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashima T, Saido T.C., Yamasaki T, Moritake K, Saya H, and Nakao M : The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Medicine* 4 : 915-922, 1998

NF2に伴う聴神経鞘腫の再発に関する検討

研究協力者 吉田 純, 大塚吾郎, 斎藤 清
(名古屋大学脳神経外科)

【研究要旨】

神経線維腫症2型(NF2)に伴う聴神経鞘腫における自然経過中及び術後の増大に関わる因子につき検討を行った。自然経過中腫瘍の増大を予測する因子は指摘できなかった。治療後の腫瘍の増大を予測する因子としては発症年齢が低いことが挙げられた。治療法に手術が選択された場合、全摘出により腫瘍の再増大を防ぐことが期待された。これらの結果をふまえ、適切な治療戦略の確立を目指していく予定である。

【研究目的】

神経線維腫症2型(NF2)は多発性の中樞神経系腫瘍、特に両側聴神経鞘腫を主徴とする常染色体優性遺伝疾患であるが、術後の腫瘍の再発が重大な問題となる。我々はNF2症例25例につきretrospectiveに検討し、聴神経鞘腫における自然経過中及び術後の増大に関わる因子につき検討を行った。

【研究方法】

1991年より1998年までの8年間に於いて名古屋大学脳神経外科及びその関連施設において診断又は治療されたNF2症例は25例であり、全例両側聴神経鞘腫を伴っていたためこれら50個の聴神経鞘腫を対象とした。これらの聴神経腫瘍の自然経過中、あるいは治療前後に腫瘍の大きさを造影MRIまたはCTにて評価し、腫瘍が増大したか、否かで2群(増大群、非増大群)に分けた。これらの2群間で次に挙げる因子についての差を統計学的に解析し、腫瘍の増大に関わる因子につき検討した。検討した因子は、性別、発症年齢、腫瘍の体積(初診時、術前)、他の腫瘍の存在(聴神経以外の神経鞘腫、頭蓋内髄膜腫、脊髄髄外腫瘍、脊髄髄内腫瘍)、皮膚症状の有無、眼症状の有無、治療方法(手術またはガンマナイフ)である。

【結果と考察】

50個の聴神経鞘腫のうち、治療を行わず少なくとも12か月以上自然経過を追跡できたものは24個であった。このうち経過中に腫瘍の増大を認めたものは15例、増大を認めなかったのは9例であった。これら24個の自然経過群に関しては、腫瘍の増大を予測する因子は認められなかった。50個の聴神経鞘腫のうち、28個に対し延36回の治療を行った。このうち21例において術後腫瘍の増大が認められ、15例においては腫瘍の増大は認められなかった。術後の増大群と非増大群において有意差が認められたのは、発症年齢であった($p<0.005$)。つまり増大群においては若年発症の症例(平均年齢15歳)が多く、非増大群においては高齢発症(平均年齢33歳)が多い傾向にあった。治療方法による比較においては手術群に比しガンマナイフ群では有意に術後の再発が少なかった($p<0.05$)。しかしこの2群の術前の腫瘍のvolumeには明らかに差があり、単純に比較することは困難と思われた。手術群においては全摘出群が非全摘出群に比し術後の再発が有意に少なかった($p<0.005$)。

【結 論】

NF2に合併する聴神経腫瘍において、自然経過中腫瘍の増大を予見する因子は今回の検討では指摘できなかった。造影MRIなどによる注意深い観察が必要であると思われた。治療後の腫瘍の増大を予見する因子としては発症年齢が低いことが挙げられた。ガンマナイフは比較的volumeの少ない腫瘍に対しては、一定の効果が得られるものと期待された。治療法に手術が選択された場合、全摘出により腫瘍の再増大を防ぐことが期待された。これらの結果をふまえ、さらにdataを蓄積し、適切な治療戦略の確立を目指していく予定である。

参考文献

1. Abaza, M. M., Makariou, E., Armstrong, M., and Lalwani, A.K., Growth rate characteristics of acoustic neuromas associated with neurofibromatosis type 2. *Laryngoscope*, 106 : 694-9, 1996.
2. Anonymous, National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Acoustic Neuroma, December 11-13, 1991. The Consensus Development Panel. [Review]. *Archives of Neurology*, 51 : 201-7, 1994.
3. Gutmann, D.H., Aylsworth, A., Carey, J.C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R.E., Rubenstein, A., and Viskochil, D., The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. [Review]. *JAMA*, 278 : 51-7, 1997.
4. Linskey, M.E., Lunsford, L.D., and Flickinger, J.C., Tumor control after stereotactic radiosurgery in neurofibromatosis patients with bilateral acoustic tumors. *Neurosurgery*, 31 : 829-38, 1992.
5. Parry, D.M., Eldridge, R., Kaiser, K.M., Bouzas, E.A., Pikus, A., and Patronas, N., Neurofibromatosis 2 (NF2) : clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet*, 52 : 450-61, 1994.
6. Samii, M., Matthies, C., and Tatagiba, M., Management of vestibular schwannomas (acoustic neuromas) : auditory and facial nerve function after resection of 120 vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis 2. *Neurosurgery*, 40 : 696-705, 1997.

結節性硬化症の長期予後 —生活実態調査とQOLの視点から—

研究協力者 大野耕策（鳥取大学医学部生命科学科神経生物学）
矢倉紀子（鳥取大学医療技術短期大学部看護学科）

はじめに

画像診断の進歩に伴い新しい診断基準で患者の捕捉がより確実に行われるようになり、また、結節性硬化症の原因遺伝子が単離、同定され、本疾患の山陰地区における疫学再調査を行い、有病率、出生率、突然変異率および遺伝子変異について本研究班会で報告した。しかし、重度の知的障害や難治性てんかんを持つ例がいるにもかかわらず、重症化予防に決め手はまだまだなく、厳しい生活を余儀無く送っている例もかなりいると推測される。これまでに、患者の長期予後について生活実態から検討したものはほとんどない。そこで、患者のQOL向上に向けた支援について検討するための資料を得る目的で、生活実態調査を行ったので報告する。

対象と方法

山陰地区に於いて、私達が捕捉している結節性硬化症患者58名に対して、郵送法によるアンケート調査を行ない、回答の得られた24名について分析を行った。調査内容は、教育、就職、結婚、ADLなど患者のQOLに関するもの、症状、受療状況などに関するもの、社会資源の活用などの療養上の支援に関するものである。24名の内訳は、年齢は3歳から75歳にまでわたり平均年齢 29.5 ± 19.5 歳であり、18歳未満7名、18歳以上17名であった。なお、性別は男女とも12名ずつであった。

結果および考察

1. 患者のQOLに関する実態：調査時の患者の居住地は自宅15名、病院に入院中のもの5名、施設入所4名であった。次に義務教育の就学方法は、普通学校が24名中10名、特殊学級、養護学校がそれぞれ4名、全く受けていないものが2名いた。義務教育以降の教育では、高校、大学、専門学校がそれぞれ1名ずつの17名中3名のみが上級学校へ進学していた。

結婚についてみると、既婚者3名以外は結婚歴はなく、このうち2名は実子をもうけていたが、残りの1名は意識的につくらないようにしていた。就職状況は、6名が就職していたが、11名は就職経験はなかった。職業の内容は、工員、農業、店員、音楽講師等であった。

日常生活動作別に、自立度をみると最も自立度が低いのは外出で、約6割のものが程度の差はあるが困難と回答していた。最も自立度の高いものは食事で、困難者は2割弱であった。外出するためには色々な要素が関連するために、外出の自立度が低くなったものとする。

2. 症状・受療状況の実態

結節硬化症の3主徴であるてんかん、知的障害、顔面血管線維腫の発現率はそれぞれ83%、67%、78%とこれまでの調査結果と大差なかった。てんかん発作のある20名についてその発作頻度をみると、年に1回以下のものが12名と半分以上を占め、月に数回が4名、日に数回が2名とコントロールの悪いものは比較的少数であった。

通院頻度は1か月に1回の頻度で受診しているものが1/3の8名、年に数回は7名で、通院していないものは1名のみだった。服薬状況は医師の指示で中止をしている1名を除いて、すべての患者が服薬しており、治療状況はきわ

めて良好であった。

てんかんの有無が、またその発症が早期であればあるほど知的予後に関連し、ひいては患者のQOLを左右するといわれているが、本調査でもそのことについて検討した。てんかんの有無とADL障害の有無をみると、てんかんのある群にADL障害が多い。さらに、ADL障害を持つもの15名、ないもの5名について、初発発作の平均年齢をみると障害有り群は1.5±2.1歳、障害無し群は3.6±4.1歳と明らかな有意差 ($P<0.1$)はないものの初発年齢が小さい程重症化傾向が推測される。

次に義務教育の就学方法との関係を見ると、てんかんのないものは何れも普通学校で、てんかんのあるものは20名中8名のみが普通学校であった。結婚との関係は、何れの群も既婚者は少なかった。就職との関係はてんかんのない2名は何れも就職しており、てんかんのある群では15名中4名のみが就職できていた。

3. 療育上の支援

患者・家族が療育上の支援者として、医者が一番頼りにしており、それ以外には保母、教師、知人をあげているものが数名いたが、看護婦、保健婦などの看護職を頼りにしているものはほとんどなかった。本疾患は長期にわたり生活上の支援を必要とすることを考えれば、その支援にもっと看護職が参加できるような取り組みが必要と考える。

患者・家族が最も頼りにしている医師の患者家族への説明について、不十分と回答したものが18名中4名いたが、あとはほぼ満足していた。

社会資源の活用状況では、最も活用されていたのは、通院医療費公費負担制度で、3/4のものが利用しており、次いで、特別障害者手当、税金の障害者控除等が1/4のものに利用されていた。その他はホームヘルパー、保健婦、訪問看護がわずかにあったが、経済的・社会的資源の活用が中心で、人的な社会資源の活用はあまりなく、今後は人的な支援が受けられるようなシステムの構築が必要と考える。

まとめ

1. 義務教育を普通学校で受けたものは、約4割に過ぎず、高校以上の上級学校への進学者は、17人中3名であった。
2. 就職できたものは17名中6名、既婚者は3名に過ぎなかった。
3. 日常生活動作における障害では、外出困難が最も多く半数以上であったが、食事動作の自立度は高く、8割以上のものが自立していた。
4. 治療は定期的に継続しているものがほとんどで、てんかんのコントロールもごく一部を除いて良好であった。
5. てんかんの有無が、患者のQOLに与える影響は大きく、コントロールすることの重要性が、あらためて示唆された。
6. 患者・家族が療育上最も頼りにしていたのは医師であった。
7. 社会資源の活用状況は経済的資源が主で、人的資源の活用は少なかった。

日本人結節性硬化症患者におけるTSC1、TSC2遺伝子異常の解析

研究協力者 樋野興夫 (癌研・実験病理)
小野次朗 (大阪大学医学部小児科)
金田真理, 吉川邦彦 (大阪大学医学部皮膚科)

【要 旨】

日本人結節性硬化症 (以下TSC) 患者31例について、TSC1およびTSC2の遺伝子解析を行った。TSC1遺伝子解析では、frameshift 3例、nonsense mutation 2例、missense mutation 5例、silent mutation 4例を認めた。両親の検索も含め、polymorphismの可能性をできる限り除外し、TSC発症に意義を有すると考えられた異常は、現在検索中の1例を除くと、frameshift 3例、nonsense mutation 2例、missense mutation 1例であった。この6例中3例 (50%) が家族歴を有する例であり、また5例 (83%) では生成される蛋白 (hamartin) がtruncationを起こすことが予想された。TSC2遺伝子解析では、frameshift 3例、missense mutation 5例、silent mutation 2例であり、polymorphismの可能性を除外すると、検索中の1例を除き、frameshift 3例、missense mutation 4例であった。7例中明らかな家族歴を有する症例は無く、生成蛋白 (tuberin) のtruncationが予想される症例は2例 (29%) であった。これらの結果は、TSC1遺伝子変異は家族歴を有する症例に多く、hamartinのtruncationを予測させる症例が多いという、諸外国からの報告に矛盾しなかった。

【はじめに】

結節性硬化症 (TSC) は、かつては痙攣、精神運動発達遅滞、顔面血管線維腫を3主徴とした、常染色体優性遺伝性疾患である。Gomezらのまとめによると、これら3主徴をそろえて有する症例は全体の29%に過ぎず、また3主徴を一つも有しない症例が6%存在すると報告されている (Gomezら, 1988) このように臨床表現型が非常に多彩であることが、本疾患の特徴でもある。近年、家族歴を有する家系の検索から、少なくとも2カ所の異なる責任遺伝子座が存在することが確認され、それぞれTSC1 (9q34に局在)、TSC2 (16p13に局在) と名付けられた。TSC2遺伝子は1993年に単離され、塩基配列も決定された。41個のエクソンからなる遺伝子で生成される蛋白をtuberinと呼ぶ (European Consortium, 1993)。一方、TSC1遺伝子は1997年に単離され、塩基配列も決定された。23個のエクソンからなる遺伝子で、生成蛋白をhamartinと呼ぶ (van Slechtenhorstら, 1997)。今回、私達は本邦におけるTSC患者の遺伝子変異を検討するため、TSC1およびTSC2の全エクソンについて解析を行った。

【対 象】

大阪大学医学部皮膚科および小児科に通院中のTSC患者31例 (男性14例、女性17例、年齢2歳から53歳、平均19.2歳) を対象とした。家族歴を有する症例は7例で、そのうち同胞例が2組4人であった。診断にあたっては、Gomezら (1988) の診断基準に従った。患者本人あるいは保護者から書面による承諾を得た後に、採血を行った。またpolymorphismの可能性を否定できない遺伝子変異を認めた場合、できる限り両親の変異の検討も行った。

【方 法】

血液サンプルからリンパ球分離後DNAを抽出した。TSC1およびTSC2遺伝子の各エクソンの配列とスプライシング

ドナー、アクセプター配列を含むプライマーセットを用いて、PCR-SSCPを行った。シフトバンドが認められた場合、ゲルから直接シフトしたバンドを切り出し、DNAを抽出し、direct sequenceを行い、変異の有無を検索した。polymorphismが否定できない症例では、できる限り両親の検索も行った。

【結 果】

(1) 臨床症状

31症例の臨床症状は、精神発達遅滞は23例（74%）に認められた。一般には精神発達遅滞は50%前後で認められているといわれており、大学病院通院例ということから重症な例が含まれていると考えられた。痙攣は25例（81%）に認められた。この中で本疾患に特徴的であるといわれている点頭てんかんは12例（39%）に認められた。顔面の血管線維腫は28例（90%）に認めた。白斑は27例（87%）で認められ、血管線維腫とはほぼ同じ割合で出現しており、診断に重要な項目と考えられた。家族歴を有する症例は5家系7症例であった。

(2) TSC1遺伝子変異を有する症例

PCR-SSCPの結果、31例中12例において14個のシフトバンドが認められた。これら14個のシフトバンドについて塩基配列を解析した結果では、frameshift 3例、nonsense mutation 2例、missense mutation 5例、silent mutation 4例が確認された。この中でpolymorphismと考えられる症例および両親の検索からpolymorphismが判明した例を除くと、frameshift 3例、nonsense mutation 2例、missense mutation 1例であった（但し現在検索中の1例は除く）。家族歴は2家系3症例で認められた。6例中5例（87%）で生成蛋白hamartinのtruncationが起こることが予測された。精神発達遅滞は、1例で重度、3例で軽度、2例では発達は正常であった。痙攣は全例で認めたが、点頭てんかんを示したのは重度の精神発達遅滞を有する1例のみであった。症例21と症例24は同胞例であり、この遺伝子変異は父親由来であった。父親は精神発達遅滞はないが、20歳を過ぎた頃に痙攣があったということであるが、詳細は不明である。症例25では、61番目のアミノ酸がstop codonになっており、hamartinの欠失としては9割以上であるにもかかわらず、精神発達遅滞はなく表現型としては非常に軽かった。

(3) TSC2遺伝子変異を有する症例

PCR-SSCPの結果、31例中10例において10個のシフトバンドが認められた。これら10個のシフトバンドについて塩基配列を解析した。結果ではframeshift 3例、missense mutation 5例、silent mutation 2例が確認された。この中でpolymorphismと考えられる症例および両親の検索からpolymorphismが判明した例を除くと、frameshift 3例、missense mutation 4例であった（但し現在検索中の1例は除く）。家族歴を有している症例はなかった。精製蛋白tuberinのtruncationが予測された症例は7例中2例（29%）に過ぎなかった。精神発達遅滞は、2例で中等度、2例で軽度、2例では認めなかった。1例はnear-miss後遺症のため寝たきりの状態であり判定不能であった。痙攣は全例で認めており、点頭てんかんは3例で認めた。

【考 察】

日本人結節性硬化症患者31例におけるTSC1およびTSC2遺伝子変異を、全エクソンを対象としてPCR-SSCPおよびdirect sequence法を用いて検討した。現在polymorphismを検索中の1例を除く30例の検討では、本疾患発症に関与したと考えられる変異は、TSC1で6例、TSC2で7例であった。TSC1遺伝子に関しては、frameshift 3例、nonsense mutation 2例、missense mutation 1例であった。一方、TSC2遺伝子に関しては、frameshift 3例、missense mutation 4例であった。

1993年に単離され塩基配列が決定されたTSC2遺伝子では、大きなDNA欠失は全体の2-3%に過ぎず（Auら, 1997; Brook-Carterら, 1997; European Consortium, 1993）、より小さな変異が一般的であると報告されている。これまでにWilsonら（1996）、van Bakelら（1997）、Beauchampら（1998）、Auら（1998）が、TSC2遺伝子の全エクソンについて解析を行った。Wilsonらは30例のTSC患者のうち、frameshift 3例、nonsense mutation 1例、missense mutation 5例を報告した。van BakelらはPTT（protein truncating test）法を用いて、18例のTSC患者を検討し、5例に蛋白（tuberin）にtruncatingを起こすと考えられる異常を認めている。Auらは90例のTSC患者の検討で、frameshift 12例（2例はtandem

duplication)、nonsense mutation 2例、missense mutation 10例を認めた。Beauchampらは40例のTSC患者で、frameshift 6例、nonsense mutation 6例、missense mutation 6例、splicing異常3例を認めた。これらのデータとの比較により、私達の症例11で認めた18bpのin-frame deletionは、Auら(1998)の報告した症例と同じ変異であったが、残る6例ではこれまでに発表のない変異であった。

1997年に単離され塩基配列が決定されたTSC1遺伝子の全エクソンを解析した報告は、これまでにvan Slegtenhorstら(1997)およびJonesら(1997)によって行われている。van Slegtenhorstらによると、600例以上のTSC患者の検索を行い、32例で変異を認めている。そのうちhamartinのtruncationが予測される例が30例であったと述べている。その内訳は、frameshift 22例、nonsense mutation 8例、missense mutation 1例、splicing異常1例であった。Jonesらは171例のTSC患者を解析し、22例で変異を認めた。frameshift 12例、nonsense mutation 7例、missense mutation 1例、splicing異常2例であり、hamartinのtruncationが19例で予測された。今回私達が検出した変異はこれらの報告とは異なっており、すべて新しい変異であった。truncationが予測される症例が6例中5例(83%)であったことは、これらTSC1遺伝子に関する報告と合致していた。

今回検討した30例中、家族歴を有する7例(5家系)のうち、TSC1異常が認められたものは3例(2家系)であり、TSC2異常を認めた例はなかった。家族歴を有さない孤発例23例中、TSC1異常を認めた症例は3例であり、TSC2異常は7例で認められた。これらの結果は家族歴を有する症例においてTSC1異常が多いことを示しており、これまでの報告でいわれている、TSC1異常は家族歴を有する症例に多く、孤発例では少ないという結果と同じ傾向を示した。一方、TSC2遺伝子に関しては、これまでの報告では家族例よりも孤発例に多い傾向であるとされている。今回の私達の症例では家族歴を有する患者にはTSC2異常を全く検出できていないが、さらに症例を増やす必要があると考えられる。

臨床症状と遺伝子異常の関連については、これまでに明らかな相関はないとする報告が多い。JonesらはTSC1遺伝子に変異を有する患者の方がTSC2遺伝子変異を有する患者よりも精神発達遅滞を示す傾向が少なかったと述べている。私達の症例では、精神発達遅滞に関しては両遺伝子変異群間に明らかな差は無いように思われた。但し、TSCに特徴的な病態である点頭てんかんは、TSC1群では6例中1例(17%)のみであったのに対し、TSC2群では7例中3例(43%)であり、TSC2群で高い傾向にあった。生成蛋白(hamartin, tuberin)の予想されるtruncationの程度と臨床症状について検討する。TSC1変異群では、最も蛋白が短いと予想されるのは症例25であるが、精神発達遅滞はなく、点頭てんかんも発症せず、痙攣発作はコントロールされていた。現在、社会人として勤めており、生成蛋白の長さや臨床表現型には明らかな相関はなさそうである。TSC2変異群でも、truncationを起こすと予想される2症例で、精神発達遅滞は無いが軽度であり、発作のコントロールも良好であった。TSC1とTSC2遺伝子がコードする蛋白であるhamartinとtuberinが相互にinteractionするという報告もあり、それぞれの蛋白の異常のみでは臨床表現型を予想するのは困難かもしれない(van Slegtenhorstら, 1998)。

今後、hamartinとtuberinの機能が明らかにされ、さらに症例が蓄積されれば、genotypeとphenotypeの関連も明らかにされるのではないかと期待される。

山陰地方を中心とした結節性硬化症の遺伝子変異と臨床症状

研究協力者 大野耕策, 張 海弟 (鳥取大学医学部神経生物学講座)
難波栄二 (鳥取大学遺伝子実験施設)

はじめに

研究協力者らの研究課題は、地域内での結節性硬化症患者を補足し、日本人全体の患者数を推計すると同時に、その重症度とQOLを支配する臨床症状や遺伝子変異を明らかにし、その軽減や重症化予防を目的としている。昨年度までに、鳥取県米子市での有病率は人口10,416人に1人(39歳以下7,092人に1人)で、これら結節性硬化症患者は小児期にてんかんや知的障害などなんらかの小児神経学的問題を持つ子供が中心の頻度で、小児期から医療・福祉的援助を必要とする結節性硬化症患者は少なく見積もって、日本に1万2千人存在することを報告した。さらに、25例の結節性硬化症患者について2つの原因遺伝子、TSC1とTSC2、の遺伝子解析を行い、15例(60%)に異常を認めることを報告した。

今年度はさらに患者の解析をすすめると同時に、同定された変異のうち塩基置換が正常集団にはない結節性硬化症の原因変異であることを明らかにするとともに、遺伝子解析が結節性硬化症の予後推定に役立ち、また特有の変異が診断に有効であるかどうかを明らかにすることを1つの目的とした。

方 法

山陰地方の結節性硬化症患者に加え、自治医科大学(水口先生)、東京大学(榑原先生)で診療を受けている結節性硬化症患者で、遺伝子診断の承諾を得られた39例を対象とした。末梢リンパ球から染色体DNAを分離し、TSC1およびTSC2遺伝子の全エクソンを増幅可能なプライマーを作成し、PCR-SSCP法により変異をスクリーニングした。異常なバンドを認めた場合、そのエクソンの塩基配列決定を行い、変異の同定を行った。

ミスセンス変異については、多型(polymorphism)である可能性を否定するため、正常人DNAを50-80人分を用い解析した。

TSC1とTSC2に変異を持つ例に分類し、家族例の頻度、知的障害の重症度、皮膚症状との関係について解析した。

結 果

1. TSC1およびTSC2遺伝子に認められた変異

1) TSC1遺伝子

TSC1遺伝子について11例に変異を認めた。Frame-shiftを2例(866delTT, 1210insT)、nonsense変異を3例(W676X, R509X)、missense変異を6例に認めた。3例に認めたmissense変異M322Tは一般集団80例を検索した結果、6例に認められ、日本人に多い多型と考えられた。Q654EとT889Sはそれぞれ正常日本人60例と50例を検索した結果では認められず、TSC1の原因遺伝子変異と考えられた。1例はnonsense(W676X)とmissense(T417I)の2つの変異を有していたがこのT417Iの正常日本人での頻度は現在検索中で、疾患原因遺伝子と決定できていない。以上から認められた変異のうち7人の患者での6変異(866delTT, 1210insT, W676X, R509X, Q654E, T889S)が、TSC1のTSC原因遺伝子変異と考えられた。このうちR509Xは2例に認め、すでに報告のある変異で比較的頻度の高い変異である可能性がある。また

866delTTもすでに知られた変異であった。

2) TSC2遺伝子

TSC2遺伝子について17例に変異を認めた。Frame-shiftを3例(725insT, 1029delGATCinsCATGGCAT, 1808delACTAC), splicing mutationを2例(2760+1G>A, 5179-1G>T), nonsense mutationを2例(R1459X), missenseを9例に認めた。また、1例に5178+5G>Aの変異を認めた。Splicing mutationおよびmissense変異について、正常日本人での頻度を調べた。60人の正常日本人を検索した限りでは、2760+1GtoAと5179-1GtoAのsplicing変異は認めず、また、H137R, F320L, R611Q, L717R, V963M, P1657Lのmissense変異は正常集団には認めず、TSC2のTSC原因遺伝子変異と考えられた。また、1例ではH137RとD647Nの2つのmissense変異を認め、V769Eを2人に認めたが、これらの変異が多型か疾患原因遺伝子変異か確定できていない。また5178+5GtoAの変異も疾患原因遺伝子か確定できていない。以上から認めた変異のうち、13人に認めた12変異がTSC原因遺伝子変異と考えられた。このうち、R1459X変異は異なる患者で認められ、R611QとP1657Lはすでに報告のある変異であった。

2. 遺伝子変異と臨床症状

1) 同じ変異を持つ患者の臨床症状

同じ変異を持つ患者の臨床症状疾患原因遺伝子変異と考えられたTSC1R509X変異と、TSC2R1459Xは日本人二人に認められた。TSC1とTSC2変異にgenotype-phenotype correlationがあるか否かを検討する1つとして二人の臨床症状を比較した(下の表)。同じ変異を持つ患者の臨床症状を比較することはきわめて重要である。TSC1のR509X変異を見る限り、知的障害についてはこの変異が決定しているのではない可能性を示しているが、この2つの変異を持つ4例からは決定的なことは言えず、さらに同じ変異を持つ患者で比較する必要がある。

TSC1 R509X

年齢	性	家族歴	知的障害	顔面血管線維腫	白斑	皮質結節	痙攣
32	女	なし	重度	?	あり	あり	あり
21	男	あり	境界	なし	あり	あり	あり

TSC2 R1459X

年齢	性	家族歴	知的障害	顔面血管線維腫	白斑	皮質結節	痙攣
8	男	なし	重度	?	あり	あり	あり
9	女	なし	重度	なし	あり	あり	あり

2) TSC1とTSC2変異と臨床症状

TSC1とTSC2の遺伝子変異による臨床症状の違いを比較したのが下の表である。TSC1の方が家族例にやや多く、知能が正常～境界の例の頻度は変わらないものの、重度知的障害の頻度が少ない傾向にあった。

変異	患者数	男女比	家族例	正常知能	重度知的障害	皮質結節	痙攣
TSC1	7	3:4	3/7	2/7(29%)	1/7(14%)	100%	86%
TSC2	13	8:5	3/13	4/13(30%)	6/13(46%)	92%	100%

3) 特有な臨床症状と関係する変異

繰り返す肺気腫をきっかけに肺嚢胞によって結節性硬化症が疑われ、頭蓋内石灰化によって診断が確定された女児は2168T>G, L717Rを有し、この変異が肺嚢胞と関係する可能性がある。

考 察

現時点で結節性硬化症患者の39例中、51% (20人) に正常集団にはみられない、疾患原因変異と強く疑われる変異を同定した。これら遺伝子検索が患者の再発予防に役立ち、予後を推定するのに役立つためには、日本人集団に多い変異が存在し、遺伝子変異と臨床症状に相関がある必要がある。

現時点では同一変異を持つ患者の頻度は極めて低く、特定の変異によって診断を行うことは不可能で、PCR-SSCPによる遺伝子変異のスクリーニングも50%と低く、遺伝子診断が臨床診断より、確実に正確な診断法になるとは言いがたい。また、50%の確率で遺伝子異常が見つかるとしても診断の労力（変異の検出とそれが一般集団にはない塩基置換であることの確認）を考えると効率の良い診断法ではない。しかし、変異が同定された場合、再発予防が可能になり、家族のニーズにあわせて出生前診断に対応することができることを考えると、日本のどこかが遺伝子診断を継続的に行う必要があると考える。

また、遺伝子変異と臨床症状の関係については現時点では、決定的なものはない。しかし、患者の予後推定と多彩な症状の出現を予測できない現在、1つでも臨床症状と関係した変異が見つければ患者QOLの改善に有用であり、今後も遺伝子診断の要請に応じて、変異の解析と臨床症状との関係を明らかにしていく必要があると考えている。

結節性硬化症の病態生理の研究

研究協力者 水口 雅 (自治医科大学小児科)

研究要旨

結節性硬化症の2つの原因遺伝子の遺伝子産物であるhamartinとtuberinの発現を検討した。正常および結節性硬化症の組織における両者の分布は酷似しており、生体内での共存が示唆された。結節性硬化症の脳や腎・心の過誤腫では、両者が同時に発現低下していることが判明した。

研究目的

結節性硬化症 (TS) には少なくとも2つの原因遺伝子があり、その一方 (*TSC2*) は染色体16p13に、他方 (*TSC1*) は染色体9q34にある。*TSC2*は1993年にクローニングされ(1)、1997年には*TSC1*もクローニングされた(2)。*TSC1*と*TSC2*の遺伝子産物はそれぞれhamartin、tuberinと命名された蛋白であるが、両遺伝子の塩基配列から推測されるこれらの蛋白の塩基配列にhomologyはない。しかし奇妙なことに、*TSC1*と*TSC2*の間に臨床症状の差異はほとんどない(3)。われわれはこれまでtuberinの発現状況、とくにTS病変における発現低下について観察し、報告した(4,5)。本年度はhamartinの正常組織、TS病変における発現を観察し、tuberinのdataと比較することにより、*TSC1*と*TSC2*の関係につき検討した。

研究方法

症例：TSの13症例（9剖検例と4手術例、2か月～31歳）および同年齢の対照例10例の脳、腎、心をホルマリン固定、パラフィン包埋して組織切片を作製し、免疫染色を行った。3症例では組織の一部を凍結保存し、homogenateを作製してWestern blottingに供した。抗体：Hamartinの推定アミノ酸配列の一部に相同の合成ペプチド（2種）を抗原として家兎を免疫し抗血清を得た。Tuberinに対する抗体は、昨年度報告したものをを用いた(4)。

結果と考察

Western blot：抗hamartin（C末端部）抗体は対照脳homogenate中の分子量約150kのhamartin蛋白を特異的に認識した。TSの3症例の脳ではtuberinとhamartinが同時に著減していた。免疫染色：抗hamartin（中間部）抗体を用いた対照組織の染色では、脳、腎、心のいずれにおいてもhamartinの分布はtuberinに酷似していた(5)。TS脳組織の染色ではtuberinとhamartinの免疫反応性が同時に低下していた。腎、心の過誤腫でも両者の発現低下が明らかであった。

結論

われわれの研究によりtuberinとhamartinとのin vivoでの共存が明らかになった。これは*TSC1*と*TSC2*が共同作用するというin vitroの研究データ(6)とも一致し、両者の密接な関係を示している。今回対象とした症例には遺伝子検査により原因が*TSC1*と*TSC2*のいずれであるか判明した症例がない。しかし、いずれの遺伝子に一次的原因があるにせよ、もう一方の遺伝子産物の発現も二次的に低下するというdataは興味深く、*TSC1*変異と*TSC2*変異の臨床症状の類似を蛋白レベルで説明できる事実として注目される。

参考文献

- 1) The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium : Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993 ; 75 : 1305-1315.
- 2) van Stegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali J BM, Ward S, Green AJ, Yates JR W, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ : Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science* 1997 ; 277 : 805-808.
- 3) Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah SJ, Franklin D, Gillet G, Malas S, Robson EB, Tippett P, Edwards JH, Kwiatkowski DJ, Super M, Mueller R, Fryer A, Clarke A, Webb D, and Osborne J : Two loci for tuberous sclerosis : one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet* 1994 ; 58 : 107-127.
- 4) Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, Ikeda K, Takashima S : Loss of tuberin from cerebral tissues with tuberous sclerosis and astrocytoma. *Ann Neurol* 1996 ; 40 : 941-944.
- 5) Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, IKeda K, Takashima S : Tuberin immunohistochemistry in brain, kidneys and heart with or without tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 1997 ; 94 : 525-531.
- 6) van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkeklen B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, Sampson J, Halley D., van der Sluijs P : Interaction between hamartin and tuberin, the *TSC1* and *TSC2* products. *Hum Molec Genet* 1998 ; 7 : 1053-1057.

結節性硬化症の死因 —日本病理剖検輯報を用いた解析—

研究協力者 大塚藤男, 石井良征 (筑波大学皮膚科)
 梅林芳弘 (日立総合病院皮膚科)
 藍沢茂雄 (慈恵医大病理)

はじめに

今回我々は、結節性硬化症について日本病理剖検輯報を用いて剖検例を抽出し、統計的観察を試みた。主に死因について検討したので報告する。

対 象

日本病理剖検輯報の19年間 (1974年～92年) に記載されている結節性硬化症の38例。

結 果

- (1) 頻度：結節性硬化症38例は当該期間の全剖検例 (465,642例) の0.0082%に相当した。
- (2) 性：男性21例 (55%), 女性17例 (45%) であった。
- (3) 年齢：年齢分布を図1に示す。平均は 21.9 ± 16.1 歳であった。これは他の剖検例の平均61.7歳に比べ、若年であった。死亡時年齢を性別で見ると、男性 17.8 ± 16.7 歳, 女性 26.9 ± 14.3 歳であった。
- (4) 診療科：内科12例, 小児科9例, 脳外科3例, 新生児科2例, 精神科2例, 皮膚科1例, 外科1例, 産婦人科1例, 泌尿器科1例, その他6例であった。
- (5) 死因 (表1)：肺炎5例, 脳腫瘍5例, 心横紋筋腫4例, 腎不全2例, その他各1例であった。1歳以下の死因 (表2) に限ってみると、その割合は38例中7例 (18.4%) で、心横紋筋腫が4例と大部分を占めていた。
- (6) 各病変の割合 (表3)：心横紋筋腫7例 (18.4%), 腎血管筋脂肪腫16例 (42.1%), 嚢胞腎5例 (13.1%), 脳腫瘍8例 (21.1%) に記載があった。

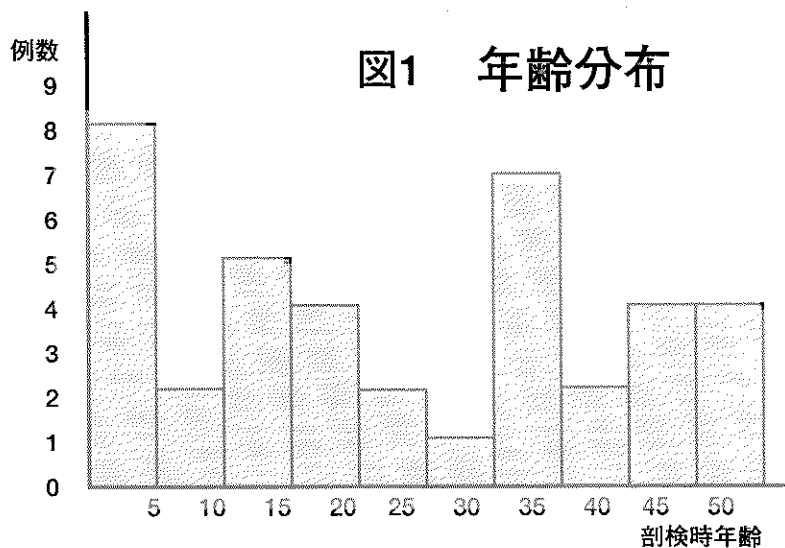


表1	死因	
	肺炎	5
	脳腫瘍	5
	心横紋筋腫	4
	腎不全	2
	心内膜線維弾性症	1
	種痘後脳炎	1
	腎悪性中胚葉腫瘍	1
	膵癌, 甲状腺癌	1
	大腸癌	1
	多発性過誤腫	1
	穿孔性潰瘍	1
	腸閉塞	1
	合計	24

表2 1歳以下の死因

心横紋筋腫	4
心内膜線維弾性症	1
肺炎	1
不明	1
合計	7

7/38 (18.4%)

表3 各病変の割合

心横紋筋腫	7(4)/38 (18.4%)
腎血管筋脂肪腫	16(0)/38 (42.1%)
嚢胞腎	5(2)/38 (13.1%)
脳腫瘍	8(5)/38 (21.1%)

()内は死因となったもの

まとめ

結節性硬化症（剖検例）38例の統計的観察を行った。死亡年齢の平均は21.9歳で、若年例が多かった。主な死因として肺炎、脳腫瘍、心横紋筋腫、腎不全が挙げられた。乳児死亡例が18.4%を占め、その6割は心横紋筋腫で死亡していた。

TSC2遺伝子変異腫瘍細胞に発現している新規遺伝子の 単離・同定

研究協力者 樋野興夫, 真嶋州一, 梶野一徳
(癌研・実験病理)

要旨と目的

Eker ratは遺伝性腎癌のモデルラットである。我々は本ラット腎癌の原因遺伝子が、ヒト結節性硬化症原因遺伝子である癌抑制遺伝子TSC2のrat homologueであることは既に報告した。

最近我々は両側に腎癌を発症した1匹のEker ratから、それぞれ細胞株を樹立し、LK9d (R), LK9d (L),と命名した。この2つの細胞株は、いくつかの点で性状を大きく異にしている。まず、培養に際し、collagen coated plateを用いれば、ともに培養可能であるが、non-collagen coated plateを用いた場合はLK9d (R)のみ培養可能で、LK9d (L)は培養できない。細胞形態についてもLK9d (R)は類円形でflatな細胞形態をとるのに対し、LK9d (L)は紡錘形態をとる。増殖速度は、LK9d (R)のほうが速い。Southern blot法では、rat染色体5番に存在するp16/15領域が、LK9d (L)では欠失が見られないが、LK9d (R)では欠失していた。northern blot法では、最近我々が別の系のcDNA subtractionで単離した細胞接着に関与すると思われる新規の遺伝子ERC (rat 染色体10番)の発現が、LK9d (L)ではなく、LK9d (R)では認められた。

我々は、rat染色体5番p16/15領域近傍で欠失している遺伝子群を含め、増殖能(悪性度の指標)の差異に関与する遺伝子群の単離、同定を目的とし、今回興味ある遺伝子を単離したので報告する。

方法と結果

LK9d (R)とLK9d (L)の2細胞間でAmplified restriction Fragment Length Polymorphism (AFLP)法によるcDNA (mRNA)のdifferential displayを施行した。両者で差があるバンドを数箇所切り出し、切り出した部位より抽出したDNAをRe-amplificationし、pGEM-T vectorでsubcloningした。

その後、両方向からsequenceし、各々をA-1~2, N-1~3と命名した。

この5個をprobeとして、LK9d (R), LK9d (L)だけでなく、ERC33, S-LK9d-SLM-1, 8, 19, 23の7の細胞を用いて、northern blottingを施行した。(S-LK9d-SLM-1, 8, 19, 23はLK9d (L)より樹立した高転移株。ERC33はEker rat腎癌より樹立された極めて増殖能、接着能の高いCell Lineである)。

A-1及びN-3については、LK9d (R), LK9d (L)間で発現に差が確認されたので、さらに詳しい解析を施行した。

N-3がatrial natriuretic peptideであることはhomology searchからほぼ間違いはないと思われる。また、atrial natriuretic peptide (N-3)がp15/16の存在するrat染色体5番に局在することは、既に報告されており、今回のdataはそれを支持するものである。

A-1はhomology searchの結果一致するものはなかった。open reading frameが取れることより未知の遺伝子と考えられる。増殖の良いCell-lineであるERC33, Lk9d (R)では発現はなく、低悪性度のLk9d (L)では強発現であった。さらに、興味あることにS-Lk9d (L)-SLMでは中等度発現であった。このように、本遺伝子の発現は、細胞の悪性増殖に反比例していた。各臓器(rat poly-A)の発現は脳、肺、脾、骨格筋で強発現が見られ、腎・下垂体・心・子宮・卵巣・肝では発現ほとんど認められなかった。そこで、A-1の発現の高いLK9d (L)からSTRATAGENEのZAP-cDNA Synthesis Kitを用いて、cDNA-libraryを作製し、現在全長を含むクローンを単離中である。

染色体は、rat染色体13番、human染色体1番に局在していた。

考 察

A-1遺伝子は、悪性度の低い培養腎癌細胞だけでなく、primaryな小さな腎腫瘍でも発現がみられる。正常腎では発現が認められないので、腎発がんの早期のマーカーになる可能性がある。現在、全構造の解析とともに抗体作製を計画中である。さらに、本遺伝子の発現制御機構を解明し、TSC2遺伝子産物の作用との関わりを追求する。