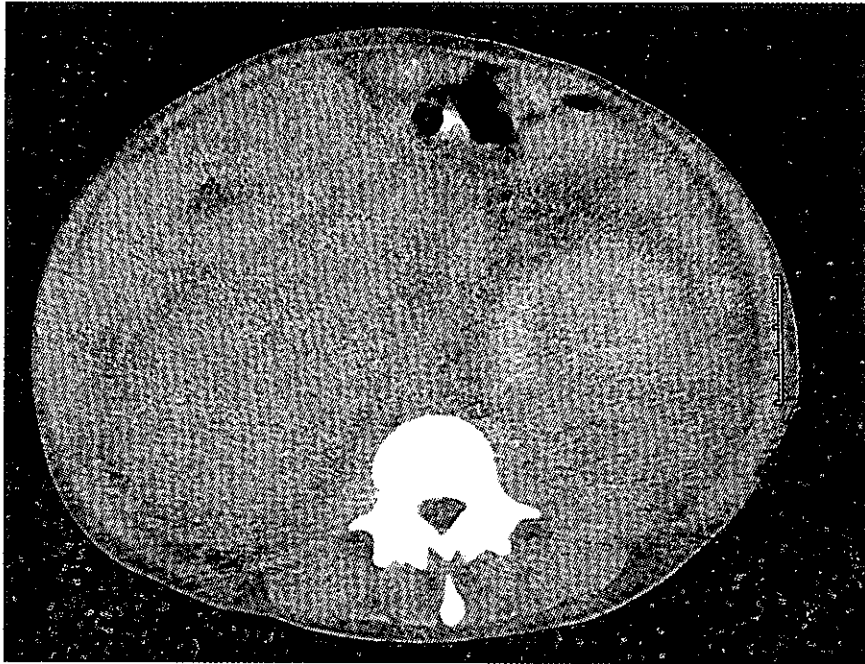
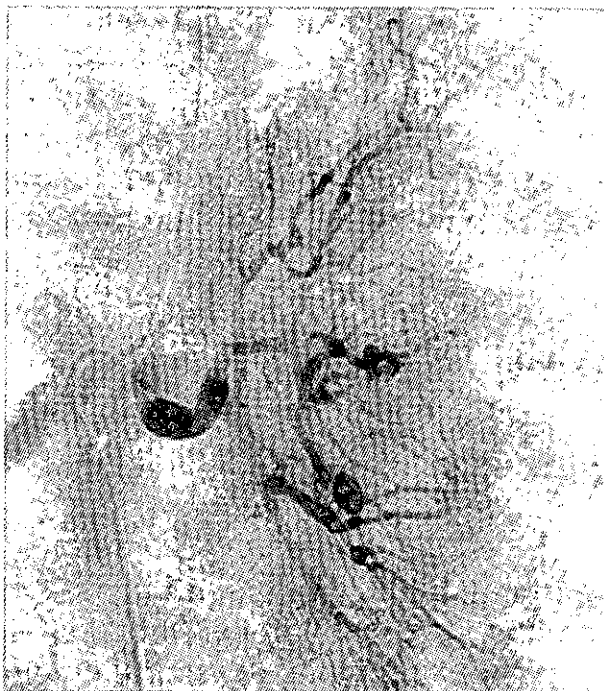


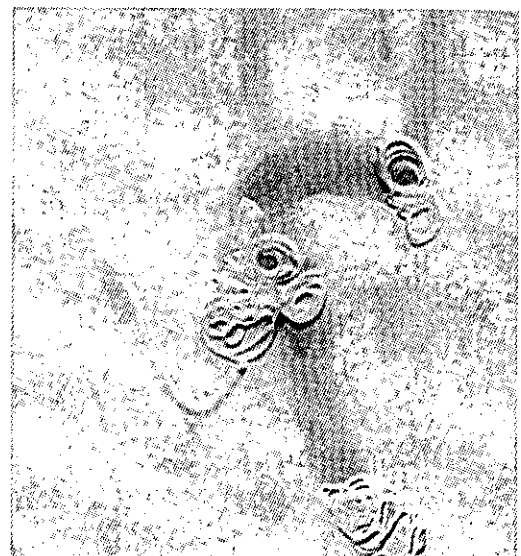
強く感じるようになったため、また結婚等の将来的事情を考慮し、平成11年11月に右腫瘍に対し動脈塞栓術を施行した。塞栓術後約1週間ほど軽度の側腹部痛を認めたが、現在は軽快し、経過観察中である。



左腎動脈塞栓術前CT



塞栓術前



塞栓術後 (coil)

症例 1

左腎動脈造影



右腎動脈塞栓術前CT



塞栓術前



塞栓術後 (gelatin sponge)

症例 2

右腎動脈造影

【考 察】

腎血管筋脂肪腫は、腎実質に限局される小結節から、腎周囲の脂肪組織に拡がる大腫瘤形成と多岐に渡る。結節性硬化症で見られる血管筋脂肪腫では、両側性、多発性が多く、腫瘍の大きさも大きいことが多く、Dickinsonの報告¹⁾では、8 cm以上を示す血管筋脂肪腫が結節性硬化症の50%に見られたとしている。また、腫瘍が大きくなると腫瘍内出血や破裂をきたし、突然の出血性ショックを初発症状とする報告も散見される。結節性硬化症においては嚢胞性変化が腎不全を来す要因であると考えられているが、本症例のように、血管筋脂肪腫に対する外科的治療、特に腎摘出術にて腎不全となる可能性がある。

血管筋脂肪腫の治療方針については、諸家の報告^{2) 3)}があるが、腫瘍の大きさと症状の有無により分けるものが多く、腫瘍内出血や後腹膜出血の可能性の高いもの（小さくても症状のあるもの）には選択的動脈塞栓術を、大きな腫瘍には選択的動脈塞栓術を含めた腎保存を目指した外科的治療を選択しているようである。また、選択的動脈塞栓術は、脂肪成分が多いものにはあまり効果がなく、血管新生が豊富なほど効果的であると言われており、小さい腫瘍でも動脈瘤や血管新生が豊富な腫瘍には有効と考えられる。

Dickinsonらは、腫瘍が8 cmをこえた腫瘍全例に症状を認めたと報告しているように大きな腫瘍では、まず症状を伴うので、症状の緩和のため、および将来的な出血を予防するという目的では動脈塞栓術がFirst line therapyであると考えられる。今回の症例2のように腫瘍が大きくても症状が顕著でなければ、経過観察してしまいがちである。特に精神遅滞を伴う症例では、その傾向があると思われる。よって経過観察を続けた結果症例1のように最終的に透析に至ったように、腫瘍が増大しはじめた、または巨大な腫瘍に対しては、腫瘍の増大する前に塞栓術などの早急な出血対策が必要であると痛感した。また、症例2は、圧迫症状は軽度であったが、結婚の予定があるとのことから、将来的事象を考え、腫瘍縮小の目的で、動脈塞栓術を行った。以後の経過をおわなければ明らかな治療効果はわからないが、この症例のように、若い女性であれば妊娠、出産といったことも考慮した治療法及び治療施行時期の選択も必要と思われた。

【結 論】

結節性硬化症においては、巨大または、増大傾向にある腎血管筋脂肪腫は、出血、破裂の危険性が高いため、塞栓術などの早急な対策が必要である。

参考文献

- 1) Dickinson M, Ruckle H, Beagler M, Hadley CA : Renal angiomyolipoma: optimal treatment based on size and symptoms. Clin Nephrol 49 : 281-286,1998.
- 2) Oesterling JE, Fishman EK, Goldman SM, et al : The management of renal angiomyolipoma. J Urol 235 : 1121-1124. 1986.
- 3) Rosen RJ, Schlossberg P, Roven SJ, Rothberg M : Management of symptomatic renal angiomyolipoma by embolization. Urol Radiol. 6 : 196-200, 1984.

結節性硬化症の脳病変の病態生理に関する研究

研究協力者 水口 雅 自治医科大学小児科

【研究要旨】

結節性硬化症の動物モデルであるEkerラットの脳病変を病理学的に研究した。その結果、Ekerラットの脳には従来より記載のある皮質下・上衣下の結節に加え、皮質結節も存在することを発見した。これらの脳病変はヒト結節性硬化症で見られるものとよく類似していることから、Ekerラットは結節性硬化症の脳病変の分子病理学的研究に好適な実験モデルであることが判明した。

【研究目的】

ヒト結節性硬化症（TS）の脳病変の研究は患者QOL向上の見地から最も重要である。しかしTS症例における変異の同定には多大の労力を要し、分子病理学的解析はしばしば困難である。

いっぽうEkerラットはラットTsc2遺伝子の変異に起因することが最近判明し、ヒトTSのモデル動物として新たに注目を浴びた。しかし従来、Ekerラットでは神経症状は認められておらず、脳病変についても皮質下・上衣下の過誤腫しか記載されていなかった。

本研究では多数のEkerラットの脳を病理学的に観察し、ヒトTSの脳病変と比較検討した。

【研究方法】

Ekerラット19個体（月齢17-24）と正常対照6個体の脳は樋野興夫博士（癌研究所実験病理部）より提供された。動物の取り扱い、同研究所の倫理規定に則った。脳組織のホルマリン固定、パラフィン包埋標本作製し、組織病理学的に観察した。発見された病変に対し神経細胞、グリアのマーカーならびにtuberinの発現に関する免疫組織化学的検討を加えた。

【研究結果】

1個体の運動野に皮質結節（径1.5mm）が見られた。結節内では皮質の層構造が失われており、neurofilament強陽性のcytomegalic neuronが多数あった。GFAP、tuberin陽性の巨細胞はなかった。結節外の皮質におけるtuberin発現についてはEkerラットと正常対照の間に差がなかった。

皮質下・上衣下の過誤腫（径0.2-0.7mm）が各2個体に見られ、うち1つには石灰化があった。これらを構成する巨細胞にはballoon cellが多かったが、一部の過誤腫には神経細胞に似た細胞もあった。巨細胞の多くがGFAPを、少数がneurofilamentを発現していた。Tuberinは陰性であった。

【考 察】

Ekerラット脳には皮質下・上衣下の過誤腫に加え、皮質結節も低頻度ながら存在した。したがってEkerラットには、ヒトTSの各種の脳病変（皮質結節、皮質下白質病変、上衣下結節）に相当するものがすべて見られたことに

なる。

Ekerラットの皮質結節は周囲の正常皮質より隆起しないこと、巨細胞のすべてが神経細胞の性質を示すことなど、ヒトTSと異なる点も若干あったが、その他の特徴については概ね一致していた。

皮質結節の形成がtwo hit仮説に従うものか否かの解析を含め、TSに関する今後の分子病理学的研究においては、Ekerラットは格好の材料と思われる。

【結 論】

ヒトTSのモデル動物Ekerラットの大脳に、皮質結節の存在を初めて見いだした。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuguchi, M., Ikeda, K., Takashima, S. Simultaneous loss of hamartin and tuberin from the cerebrum, kidney and heart with tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* in press.
- 2) Mizuguchi, M., Takashima, S., Yamanouchi, H., Nakazato, Y., Mitani, H., Hino, O. Novel cerebral lesions in the Eker rat model of tuberous sclerosis : cortical tuber and anaplastic ganglioglioma. *J Neuropathol Exp Neurol* in press.

2. 学会発表

- 1) 水口雅、高嶋幸男：Tuberinとhamartinの共存および結節性硬化症の病変における発現低下。第41回日本小児神経学会総会、東京、1999年5月15日。
- 2) 水口雅、高嶋幸男、三谷弘明、樋野興夫：結節性硬化症の動物モデルEker ratの脳病変。第9回Medical Genetics研究会、東京、1999年6月19日。

知的所有権の取得状況

なし。

結節性硬化症皮膚病変部細胞の特徴と増殖阻害剤の開発に関する研究

分担研究者 大野耕策, 檜垣克美, 牧 広利, 二宮治明
鳥取大学医学部神経生物学

【研究目的】

結節性硬化症の原因遺伝子の機能は十分明らかではないが、細胞内シグナル伝達と関与している可能性が示唆されている。一方、患者の顔面血管線維種由来の皮膚病変部細胞は、大型で二核細胞が多く、細胞質分裂に異常がある。また、金田らは、この病変部細胞は細胞周期の進行に異常があり、S期への集積とアポトーシスが起りやすいことを示している（平成11年度第1回本学会議）。さらに、Ito and Rubin (Cell 96, 529, 1999) はショウジョウバエのTSC2変異体では細胞が大型化し、S期を繰り返し、M期への進行に異常があることを報告している。これらのことはTSC遺伝子の変異が、細胞周期あるいは細胞質分裂と深く関わっている可能性を示唆している。

結節性硬化症TSC2遺伝子は、Rap-1 Rab5に対するGAP活性を持つことが示されているが、これらの病変部細胞の特性と低分子量G蛋白質の関係は明らかではない。細胞周期の進行と細胞質分裂にはRhoファミリーが関係しているが、現時点ではRhoの関与は否定的である。結節性硬化症の病変部の形成機構を明らかにし、発症予防法を開発するためには、病変部細胞のTSC1およびTSC2遺伝子産物の発現量と表現型との関係（細胞周期進行、細胞質分裂、二核細胞、アポトーシス、種々の増殖因子に対する反応性）を明らかにし、この表現型と関係するシグナル伝達異常を明らかにする必要があると考え、本研究を開始している。

【研究方法】

ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞、ラット3Y1細胞、患者病変部細胞および培養線維芽細胞は、研究者の教室に保存されている細胞株を用いた。ツペリンの抗体はサンタクルズ社より購入した。TSC2の（FITC標識）アンチセンスオリゴヌクレオチドはグライナージャパンに作成依頼した。増殖中の結節性硬化症患者由来の細胞のツペリン蛋白質をウエスタンブロットおよび免疫組織学的に調べた。ラット3Y1細胞にアンチセンスDNAを導入後のDNA含量を調べた。さらに、PC12細胞の分化に伴うツペリン量の変化とアンチセンス導入後の神経突起の形成について調べた。

【結 果】

- 1) ヒト線維芽細胞では免疫組織化学的にツペリンは細胞質全体に分布していた。患者病変部細胞では免疫組織化学ではツペリンの分布には明らかな変化はなかったが、ウエスタンブロットでのツペリンの量は明らかに低下していた。さらにサイトフローによるDNA含量の検索では、2nピークが幅広くなり、金田ら（平成11年度本研究会議）により報告された所見に近く、S期進行に異常のある可能性が示唆された。
- 2) ラット3Y1細胞にTSC2アンチセンスDNAを投与すると、ツペリンの発現量は顕著に低下し、細胞周期の解析では2nピークが幅広くなり、患者病変部と同様の所見を得た。
- 3) PC12細胞をNGF刺激によって分化を誘導すると、免疫組織学的にもウエスタンブロット上も一過性にツペリンの発現が増加した。一方、TSC2アンチセンスDNAを投与したPC12細胞では神経突起の形成が障害された。

【考 察】

結節性硬化症の原因遺伝子の1つであるTSC2遺伝子産物は、平成11年度班会議で金田らにより報告された様に、細胞周期のS期からM期の進行に関与している可能性がある。これは、我々が結節性硬化症の病変部細胞は細胞質分裂に欠陥があり、細胞として老化していると言う所見（研究発表3）とどの様に関係しているか今のところ明らかではない。神経系細胞株であるPC12細胞では、神経成長因子による分化誘導でツペリンの発現量が増加し、TSC2アンチセンスDNAの投与で神経分化が障害されることは、ツペリンは神経細胞の分化にも深く関わっていることが示された。これは結節性硬化症の脳病変部形成を考える上で重要で、今後ツペリンとハマルチンがどの様に細胞周期進行と神経細胞分化に関与するか明らかにしていくことで、これら病変部の治療法の開発が出来ると考えている。

【結 論】

結節性硬化症の原因遺伝子産物TSC2は細胞周期進行と神経系細胞の分化誘導と深く関わっている可能性が示された。今後これらの現象をさらに解析することで、治療法の開発を行って行く。

研究発表

1. Ohno K, Yakura N, Zhang H, Ninomiya H and Nanba E. Molecular Epidemiology of Tuberous Sclerosis. In : Phacomatosis in Japan: Epidemiology, Clinical Picture and Molecular Biology (Niimura M, Hino O and Ohtsuka F eds. Japan Scientific Societies Press, Karger 1999, pp53-59)
2. Zhang H, Yamamoto T, Nanba E, Kitamura Y, Terada T, Akaboshi S, Yuasa I, Ohtani K, Nakamoto S, Takeshita K and Ohno K. Novel TSC2 gene mutation in a patient with pulmonary tuberous sclerosis : lack of loss of heterozygosity in a lung cyst. American Journal of Medical Genetics 82 : 368-370, 1999
3. Toyoshima M, Ohno K, Katsumoto T, Maki H and Takshita K. Cellular senescence of angiofibroma cells from patients with tuberous sclerosis. Brain & Development 21 : 181-191, 1999
4. Zhang H, Nanba E, Yomamoto T, Ninomiya H, Ohno K, Mizuguchi M, Takashita K. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. Journal of Human Genetics 44 : 391-396, 1999
5. 大野耕策「プリングル病の臨床と病態」マルホ皮膚科セミナー 放送内容集No.142 : 21-23, 1999

結節性硬化症の治療の為の基礎的検究 —p40の関与—

分担研究者 吉川邦彦, 金田真理 大阪大学医学部皮膚科
金田安史 大阪大学医学部遺伝子治療

【研究目的】

我々は以前より結節性硬化症 (TSC) の病態解明の為に、本症で特異的減少を呈する蛋白p40を同定し、その役割を検討してきた。その結果、正常細胞におけるp40は、細胞質、核、染色体に存在し、核マトリックスに染色体をつなぎとめる働きをするとともに、蛋白合成や、細胞の分裂、増殖、さらに細胞周期にも関与することを示した¹⁻⁷。ところで、1) TSC患者由来培養細胞 (TSCcells) は、アンチセンスp40 (AS-p40) 導入細胞と同様に、細胞増殖能の低下と細胞周期の異常を示し、さらに 2) AS-p40導入細胞の異常はp40の遺伝子導入により回復する^{3,10}。従って、本症において減少が認められる蛋白p40の遺伝子をTSC cellsに導入することにより、AS-p40導入細胞と同様に、これら細胞の異常の回復、ひいては本症の症状の緩和が期待できるのではないかと考えた。今回我々は、その第一段階として、p40の遺伝子をTSC cellsに導入することにより、細胞レベルにおけるp40の治療応用の可能性を検討した。

【材料及び方法】

遺伝子型の決定

遺伝子型の決定方法に関しては、既に報告した¹¹。前述の方法で遺伝子型が確定できた患者由来培養細胞及び組織を用いて以下の実験を施行した。

遺伝子導入

TSC1 cells, TSC2 cells それぞれにリポフェクチンでp40の遺伝子を導入し、導入後3日目の細胞を集めて以下の実験を施行した。normal control としては、PCDNA3を導入した細胞を用いた。

細胞の増殖状態の観察

p40の遺伝子導入後4日目のTSC1 cells, TSC2 cellsの細胞数を数え、位相差顕微鏡を用いて細胞の増殖状態を観察した。

間接蛍光抗体法

p40の遺伝子導入後4日目のTSC1 cells, TSC2 cells 及び正常ヒト線維芽細胞を99%メタノール1%酢酸を用いて固定し、p40に対するモノクロナル抗体M108を一次抗体、FITC結合抗マウスIgMを二次抗体として間接蛍光抗体法を施行し、p40の細胞内局在をPCDNA3導入のコントロール細胞と比較検討した。counterstainingとして、ヘキスト33258を用いた。

FACS analysis

p40の遺伝子導入後3日目のTSC1 cells, TSC2 cellsを通常の方法でフローサイトメトリーにより解析し細胞周期の異常の回復の有無を検討した。

【結果と考察】

今回我々は、細胞レベルにおけるp40の治療応用の可能性を検討する為に、本症において減少が認められる蛋白p40の遺伝子をTSC cellsに導入することにより、TSC cellsの異常回復の有無を検討した。

ところで、TSCにはTSC1とTSC2の2タイプがあることが知られている。TSC1は9番の、TSC2は16番の染色体上に

あり、遺伝子産物として、各々hamartinとtuberinを作り出す。これら2つの病型は原因遺伝子は異なっているが、現在のところ、臨床的には区別がつかない。そこで、我々は、遺伝子検査の結果がわかった患者¹¹の組織や培養細胞を用いて、TSC1 cells, TSC2 cells 各々について、細胞の増殖能、細胞周期及び、p40の分布をp40の遺伝子導入細胞と、control細胞と比較検討した。その結果、p40の遺伝子導入細胞の増殖能は位相差顕微鏡を用いた観察では、TSC1, TSC2 いずれにおいてもcontrol細胞に比して低下が認められた(図1)。

FACSを用いた細胞周期の検討では、TSC cellsで認められた細胞周期の異常—S期の増加とG2-Mの減少—は、p40遺伝子の導入によりさらなる増悪が認められた。これは、S/G2-M比をとると明らかである(表1、2)。

p40の遺伝子導入によってもTSC1cells, TSC2 cellsの細胞周期異常の回復が認められず、むしろ増悪を認めた。そこで、p40に対するモノクローナル抗体M108を用いて各々の細胞を染色し、p40の遺伝子導入細胞における、p40の分布を検討した。その結果、TSC1, TSC2いずれにおいてもp40の遺伝子導入細胞ではcontrol細胞に比して、軽度の核染色像の増加と著明な細胞質顆粒の増加が認められた(図2)。

さらに、正常ヒト線維芽細胞にp40の遺伝子を導入し、TSC1, TSC2と同様にFACSによる細胞周期と抗体M108を用いた間接蛍光抗体法によるp40の細胞内分布の変化を検討した。その結果TSC cellsに比して軽度ではあるが、正常細胞においても、p40の遺伝子導入により、細胞の増殖能の低下と細胞周期の異常(表3)、及び細胞質顆粒の増加(図3)を認めた。

p40の遺伝子導入だけではTSC cellsの異常は回復できず、さらに、p40遺伝子の強発現によっても、異常が助長された。以上より、細胞内p40量は一定範囲に保たれており、その量より少なくても多くても細胞周期の異常が起こるのではないかと考えた。実際myelin proteolipid protein (PLP)の異常で起こるPerizaeus-Merzbacher diseaseでは、PLPの量が多くても少なくてもhypomyelinationやdysmyelinationを引き起こしPLPの量が一定の値の時にのみ正常になる事が知られている¹²。

そこで、相対的なp40の導入量を変化させた。すなわち、p40量の異なるTSC1 cells, TSC 2 cellsに等量のp40遺伝子を導入した。その結果内因性p40が多い細胞ではp40遺伝子導入により細胞周期の異常が増悪するのに対し、内因性p40が少ない細胞では細胞周期の異常がむしろ回復した(表4、5)。また、細胞質のp40の増加等のp40の細胞内局在に変化が起こることより、TSCではp40のみならず、p40の正常な作用の発現に不可欠な別の要素も同時に欠損しており、その結果p40の微量の変化にも過大な反応を示す可能性が示唆された。

Growth of the p40 transfected cells

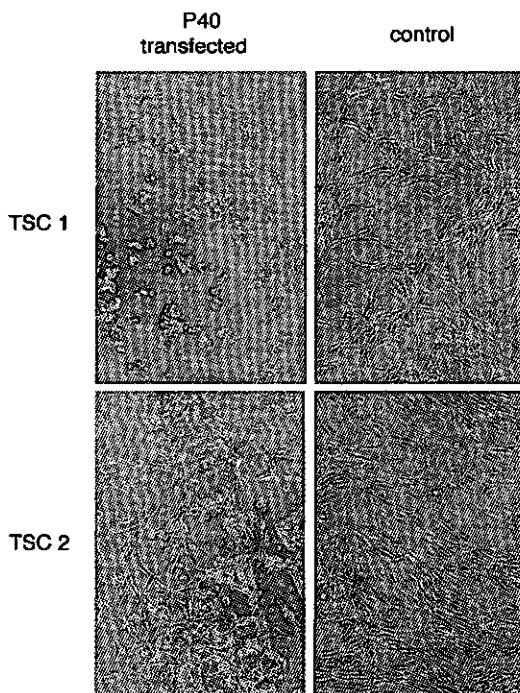


図1 位相差顕微鏡を用いた p40の遺伝子導入細胞の増殖能の観察。

p40遺伝子を導入したTSC1 cells (左上)、TSC2 cells (左下) 及びPCDNA3を導入したcontrol細胞 (右)

Localization of p40

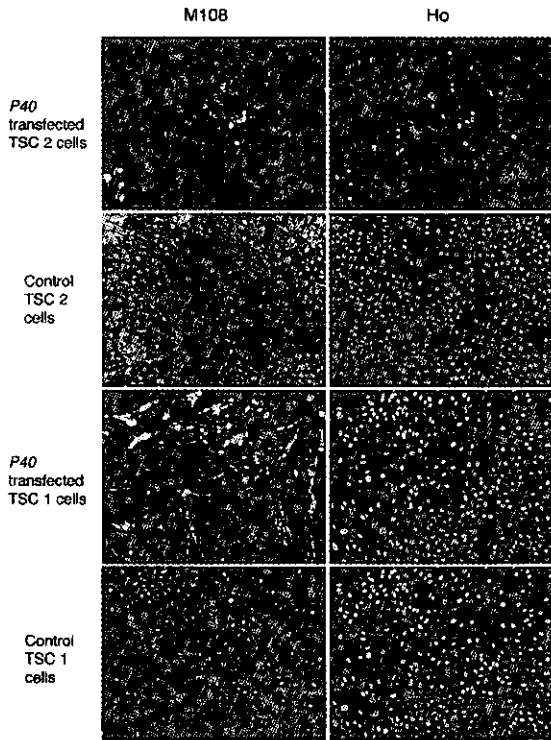


図2 p40の遺伝子導入細胞における、p40の分布。p40遺伝子を導入したTSC1 cells (上)、TSC2 cells (中下) 及び、PCDNA3を導入したTSC1 cells (下)、TSC2 cells (中上) の抗体M108による染色像 (左) 及びヘキストによるcounter staining (右)

Localization of p40

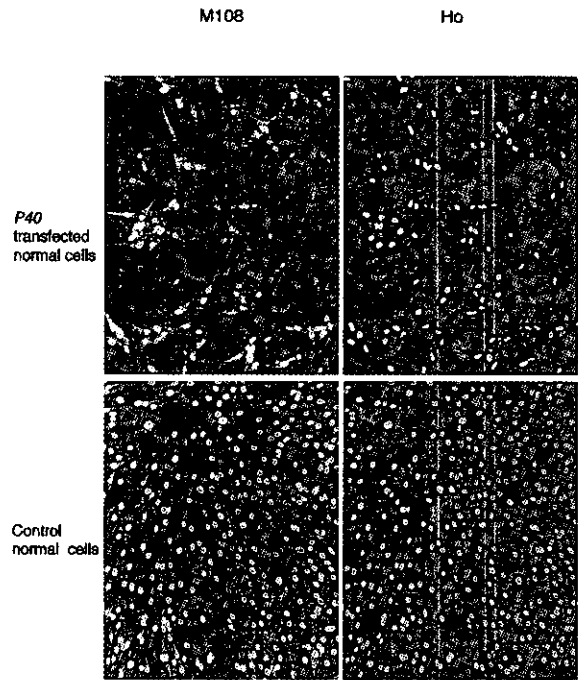


図3 p40の遺伝子導入細胞における、p40の分布。p40遺伝子を導入した正常ヒト線維芽細胞 (上) 及び、PCDNA3を導入した正常ヒト線維芽細胞 (下) の抗体M108による染色像 (左) 及びヘキストによるcounter staining (右)

表1 FACS による細胞周期の解析

	Normal		TSC 2		TSC 1		TSC	
G0-G1	89.28	93.53	81.2	84.21	86.22	90.37	88.68	79.45
S	1.69	0.9	15.3	5.75	8.69	6.27	3.41	16.34
G2-M	9.03	5.57	3.5	10.04	5.88	3.36	7.9	4.22
Apoptosis	0.43	0.48	0.81	0.53	0.33	0.24	1.6	4.35
S/G2-M	0.19	0.16	4.37	0.57	1.48	1.87	0.43	3.87

TSC2 : 遺伝子検査の結果 TSC2 に変異が認められた患者由来細胞
 TSC1 : 遺伝子検査の結果 TSC1 に変異が認められた患者由来細胞
 TSC : 遺伝子検査の結果 TSC1, TSC2 いずれにも変異が認められなかった患者由来細胞
 Normal: 正常ヒト線維芽細胞

表 2 FACS による細胞周期の解析

	TSC 2	TSC 2+p40	TSC 1	TSC 1+p40
G0-G1	87.54	35.41	83.50	37.69
S	5.4	64.59	7.94	48.37
G2-M	7.85	0.00	8.56	13.95
Apoptosis	0.05	11.18	0.10	3.77
S/G2-M	0.69		0.93	3.47

TSC2 : 遺伝子検査の結果 *TSC2* に変異が認められた患者由来細胞
TSC1 : 遺伝子検査の結果 *TSC1* に変異が認められた患者由来細胞
TSC2+p40 : p40の遺伝子を導入したTSC2患者由来細胞
TSC1+p40 : p40の遺伝子を導入したTSC1患者由来細胞

表 3 FACS による細胞周期の解析

	Normal	Normal+p40
G0-G1	81.45	71.95
S	11.33	20.06
G2-M	7.22	7.99
Apoptosis	0.12	0.34
S/G2-M	1.57	2.51

Normal : 正常ヒト線維芽細胞
Normal+p40 : p40の遺伝子を導入した正常ヒト線維芽細胞

表 4 FACS による細胞周期の解析

	TSC 2	TSC 2+p40	TSC 2'	TSC 2'+p40
G0-G1	87.54	35.41	83.65	72.41
S	5.4	64.59	9.85	17.99
G2-M	7.85	0.00	6.50	9.68
Apoptosis	0.05	11.18	0.53	2.76
S/G2-M	0.69		1.55	1.86

TSC2 : 遺伝子検査の結果 *TSC2* に変異が認められた患者由来細胞
TSC2' : 遺伝子検査の結果 *TSC2* に変異が認められた異なった患者由来細胞
TSC2+p40 : p40の遺伝子を導入したTSC2患者由来細胞
TSC2'+p40 : p40の遺伝子を導入したTSC2'患者由来細胞

表5 FACSによる細胞周期の解析

	TSC 1	TSC 1+p40	TSC 1'	TSC 1'+p40
G0-G1	83.50	37.69	78.30	76.66
S	7.94	48.37	18.87	14.41
G2-M	8.56	13.95	2.83	8.93
Apoptosis	0.10	3.77	0.31	0.30
S/G2-M	0.93	3.47	6.67	1.61

TSC1：遺伝子検査の結果 *TSC1* に変異が認められた患者由来細胞
TSC1'：遺伝子検査の結果 *TSC1* に変異が認められた異なった患者由来細胞
TSC1+p40：p40の遺伝子を導入したTSC1患者由来細胞
TSC1'+p40：p40の遺伝子を導入したTSC1'患者由来細胞

【結 論】

以上の結果より、p40の遺伝子導入によるTSC cellsの機能回復には、導入するp40量の検討とp40の正常な作用の発現に不可欠な第二の要素とp40の両方の遺伝子導入が必要であると思われた。

参考文献

- 1) Wataya-kaneda, M., Kaneda, Y., Sakurai, T., Sugawa, H. and Uchida, T.
A monoclonal Antibody against the Nucleus Reveals the Presence of a Common Protein in the Nuclear Envelope, the Perichromosomal region and cytoplasmic Vesicles J cell biol 104, 1-7, 1987
- 2) Wataya-Kaneda, M., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Kaneda, Y.
The loss of 40-KDa chromosomal protein in Tuberous sclerosis lesions BBRC 217, 599-607, 1995
- 3) Yasufumi Kaneda., Kaneda, Y., Kinoshita k., sato M., Saeki Y., Yamada R., Wataya-Kaneda M., amd Tanaka K.
The induction of apoptosis in Hela cells by the loss of LBP-p40 Cell Death and Differentiation 5, 20-28, 1998
- 4) 結節性脳硬化症患者由来培養細胞の抗核、抗染色体抗体による形態学的観察
吉川 邦彦、金田 真理 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成3年度報告書 71-75, 1993
- 5) 結節性脳硬化症患者由来培養細胞の核と染色体に対する抗体 (M-08) を用いた検索
吉川 邦彦、金田 真理、橋本 公二、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成4年度報告書 63-68, 1993
- 6) 結節性脳硬化症患者由来培養細胞の核と染色体に対する抗体 (M-08) を用いた検索
吉川 邦彦、金田 真理、橋本 公二、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成5年度報告書 82-87, 1994
- 7) 結節性脳硬化症において減少がみとめられた蛋白p40の解析
吉川 邦彦、金田 真理、橋本 公二、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成6年度報告書 69-73, 1995
- 8) 結節性脳硬化症において減少がみとめられた蛋白p40の解析
吉川 邦彦、金田 真理、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成7年度報告書 85-88, 1996

- 9) 結節性脳硬化症において減少がみとめられた蛋白p40の同定
吉川 邦彦、金田 真理、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成 8 年度報告書 32-37, 1997
- 10) 結節性脳硬化症で減少している蛋白p40の機能解析—p40とアポトーシス—
吉川 邦彦、金田 真理、金田 安史 厚生省特定疾患 神経皮膚症候群調査研究班 平成 9 年度報告書 44-48, 1998
- 11) Yamashita, Y., Ono, J., Okada, S., Wataya-Kaneda, M., Yoshikawa, K., Nishizawa, M., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Seyama, K., and Hino, O.
Analysis of all Exons of TSC1 and TSC2 Genes for Germline Mutations in Japanese Patients with Tuberous Sclerosis : Report of 10 Mutations American Journal of Medical Genetics 90 : 123-126, 2000
- 12) Kagawa, T., Ikenaka, K., Inoue, Y., Kuriyama, S., Tsujii, T., Nakao, J., Nakajima, K., Aruga, J., Okano, H. and Mikoshiba, K.
Glial Cell Degeneration and Hypomyelination Caused by Overexpression of Myelin Proteolipid Protein Gene Neuron 13 : 427-442, 1994

結節性硬化症モデルラットの腎腫瘍に特異的に発現してくる新規遺伝子の単離・同定

分担研究者 樋野興夫, 眞嶋州一 癌研究所実験病理部

【研究目的】

我々は、疾患モデルを用い（１）起始遺伝子（Tsc）を起点とした多段階発癌機序、および（２）治療法開発に資する知見を得て、ヒト結節性硬化症研究に貢献しようとするものである。多段階発癌では、単なる変異の蓄積ではなく、変異の順番が重要になってくる。ヒト多段階発癌を考慮に入れば、どのステップに介入しても発癌の進行を遅らせることができることが予想される。また、癌は、その発生には個人差が非常に大きい。我々は、起始遺伝子を起点とし、遺伝子発現病（gene expression disease）の観点から多彩なヒト結節性硬化症の発症機構を解明しようとするものである。

【研究方法と研究成果】

両側に腎腫瘍を発症した同一の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、相違点がある。まず、① 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。② 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。③ 増殖速度は、LK9d(R)のほうが速い。④ 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。⑤ 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連する新規の遺伝子ERC（投稿中）の発現は、LK9d(R)では認められた。今回 LK9d(R)とLK9d(L)の２細胞間で発現に差異のある遺伝子を調べ、興味ある遺伝子が単離されてきた。

この遺伝子（A-1）のNorthern blottingから予想されるmRNAサイズはrat、humanとも約6.5kである。染色体局在はrat chromosome NO.13、及び、human chromosome NO.1であった。この遺伝子は、正常腎組織では発現は認められず、primary 腎癌組織で特異的に発現するようになる。興味あることに、増殖能および悪性度の強い癌細胞では、発現がむしろ弱い。また、ヒト腎癌細胞でも発現してくる。正常組織では、骨格筋に強発現する遺伝子である。この遺伝子のhomology searchの結果一致するものはなく、機能は不明である。

そこで、発現の高いLK9d(L)からcDNA-libraryを作り、全長の単離を試みた。最初に構築したランダムプライムによるLK9d(L)-cDNA-libraryはタイターが低かった。このため、STRATAGENEのuni-ZAP cDNA Synthesis Kitを用いて、再度LK9d(L)のmRNAからpolyA プライムによるcDNA-libraryを作製した。任意の20個をEcoR IとXho Iで切り出したところ、ベクター（約2.9kb）の他に約2kbと0.4kbのバンドを得た。バンドの位置は、20個全て一致した。この約2.4kのシーケンスを施行した。プライマーはM13(as Foward)とReverseから開始し、primer walking法を用いた。

つぎに、ファルマシアのランダムプライム-libraryのキットを用いた。タイター約60万強のランダムプライムLK9d(L)-cDNA-libraryを作成することができた。最初の0.5kbpをProbeにして、スクリーニングを施行した。clone No.2,10,11,13,16,18,20の計7個のクローンが、スクリーニングで候補となった。プラスミドより切り出し、切り出したものをチェックゲルに泳動するとともに、A-1をProbeにSouthern blottingを施行した。同時に、切り出す前の7個のクローンをM13(as Foward)とReverse及び、前回決定した約2.4kのシーケンスをもとに設計したprimerでシーケンスを開始し、primer walking法でシーケンスを完了した。特にclone No.11は有用で、前回に得られたシーケンスと十分な

長さがオーバーラップし、更に、open reading frame が取れる新規の配列が得られ、既読シーケンスは3500bp以上となった。新しく得られた領域から、RT-PCR法を用いて新規のProbeを作成し、cDNA-libraryをスクリーニング施行した。現在、全 coding 領域の構造決定が終了したところである。さらにペプチド抗体の作製を進めている。

ヒトホモログについては当研究室で樹立したhuman Renal Carcinoma.Cellで、STRATAGENEのuni-ZAP cDNA Synthesis Kitを用いてcDNA-libraryを作製を行い、この遺伝子のhuman homologueの単離を計画中である。

【考察と結論】

癌の場合、他の遺伝病との違いは、たとえ一つの病因遺伝子によって癌化が起始されても、多段階的に成長するということである（単因子病でありながらかつ多因子病である特徴をもつ）。我々は、多彩なヒト結節性硬化症の発症の本態は、「TSC2 遺伝子不活性化に基づくカスケード的な且つ確率的な遺伝子発現制御の異常にある」（「癌は遺伝子発現病 (gene expression disease) である」）との作業仮説を立て研究を進めている。つまり、ヒト結節性硬化症の「complexity から simplifying and unifying rules へ」の追求である。具体的には、Tsc2 変異体モデルを用いTSC2 遺伝子機能の解明とともに、TSC2 遺伝子異常によって初期に誘導される遺伝子の単離、同定を行い、発症機序の解明と治療の分子標的を探ろうとするものである。

今回、ヒト結節性硬化症モデルラットから、全く新規の遺伝子が単離され、且つ本遺伝子がヒト腎癌でも特異的に発現されていることが判明したことは、大変重要な大きな成果と考える。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文課題	雑誌名	巻：頁、西暦年号.
橋本 功, 大塚藤男, 三橋善比古, 清水 宏, 玉井克人	遺伝性皮膚疾患の治療と予防.	C PLUS ONE	5 (1) : 4-13, 1998.
Yasuhiro Kawachi, Takenobu Hibi, Soji Yamazaki, Fujio Otsuka	A novel donor splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type 1 hereditary angioneurotic edema.	J Invest Dermatol	110 : 837-839, 1998.
Yasuhiro Kawachi, Kyoko Matsuura, Hitoshi Sakuraba, Fujio Otsuka	Angiokeratoma corporis diffusum associated with galactosialidosis.	Dermatology	197 : 52-54, 1998.
Fujio Otsuka	Recent progress and treatment of neurofibromatosis 1.	Intl Med News	370 : 2-3, 1999.
大塚藤男	カフェオレ斑とレックリングハウゼン病.	ドクターサロン	43 (4) : 306-310, 1999.
大塚藤男	神経線維腫症 (NF1、NF2)	現代医療	31 (9) : 2364-2368, 1999.
吉川邦彦, 大塚藤男	神経線維腫症の遺伝子研究をめぐって.	日本皮膚科学会雑誌	109 (12) : 1925, 1999.
小辻智恵, 藤澤裕志, 今門純久, 岩崎信明, 大塚藤男	ダウン症候群に伴う稗粒腫様特発性石灰沈着症.	日本小児皮膚科学会雑誌	18 (2) : 145-148, 1999.
Zhang H, Yamamoto T, Nanba E, Kitamura Y, Terada T, Akaboshi S, Yuasa I, Ohtani K, Nakamoto S, Takeshita K and Ohno K.	Novel TSC2 gene mutation in a patient with pulmonary tuberous sclerosis: lack of loss of heterozygosity in a lung cyst.	American Journal of Medical Genetics	82 : 368-370, 1999.
Toyoshima M, Ohno K, Katsumoto T, Maki H and Takeshita K.	Cellular senescence of angiofibroma stroma cells from patients with tuberous sclerosis.	Brain & Development	21 : 184-191, 1999.
Zhang H, Nanba E, Yomamoto T, Ninomiya H, Ohno K, Mizuguchi M, Takashita K.	Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with tuberous sclerosis complex.	Journal of Human Genetics	44 : 391-396, 1999.
荒木令江, 中尾光善, 古閑比佐志, 徳王宏, 木村麗新, 佐谷秀行	NF2遺伝子の変異特性とNF2蛋白マーリンの機能解析	日本皮膚科学会雑誌	109(12):1938-1941, 1999.
荒木令江, 佐谷秀行	特集：遺伝性癌の分子医学—基礎と臨床 NF2遺伝子の機能	現代医療	31 (9) : 2315-2321, 1999.
新村真人	神経線維腫症 1 (neurofibromatosis1) —上—	日本醫事新報	No.3939, 65-68, 1999.
新村真人	神経線維腫症 1 (neurofibromatosis1) —下—	日本醫事新報	No.3947, 33-36, 1999.

著者名	論文課題	雑誌名	巻：頁、西暦年号.
David A. Stevenson, Patricia H. Birch, J.M. Friedman, David H. Viskochil, Paolo Balestrazzi, Stefania Boni, Annegret Buske, Bruce R. Korf, <u>Michihito Nimura</u> , Eiko K. Pivnick, Elizabeth K. Schorry, M. Priscilla Short, Romano Tenconi, James H. Tongsgard and John C. Carey	Descriptive Analysis of Tibial Pseudarthrosis in Patients With Neurofibromatosis 1	American Journal of Medical Genetics	84 : 413-419, 1999.
本田まりこ, 新村真人	NF2遺伝子の同定と遺伝子変異	日本皮膚科学会雑誌	109(12):1935-1937, 1999.
澤田俊一	母斑症の原因遺伝子	Pharma Medica	17 : 75-82, 1999.
澤田俊一	FN1 遺伝子の同定と遺伝子変異	日本皮膚科学会雑誌	109(12):1926-1929, 1999.
澤田俊一	母斑症の原因遺伝子	日本皮膚科学会雑誌	109(12):1982-1983, 1999.
Fukuda, T., Kobayashi, T., Yasui, H., Tsutsumi, M., Konishi, Y. and <u>Hino, O.</u>	Distribution of Tsc2 protein in various normal rat tissues and renal tumors of Tsc2 mutant (Eker) rat detected by immunohistochemistry.	Virchows Archiv	434 : 341-350, 1999.
Satake, N., Kobayashi, T., Kobayashi, E., Izumi, K. and <u>Hino, O.</u>	Isolation and characterization of a rat homologue of the human tuberous sclerosis 1 gene (TSC1) and analysis of its mutations in rat renal carcinomas.	Cancer Res	59 : 849-855, 1999.
Kobayashi, T., Minowa, O., Kuno, J., Mitani, H., <u>Hino, O.</u> and Noda, T.	Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germline Tsc 2 mutation in mice.	Cancer Res	59 : 1206-1211, 1999.
Yamashita, Y., Ono, J., Okada, S., Wataya-Kaneda, M., <u>Yoshikawa, K.</u> , Nishizawa, M., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Seyama, K. and <u>Hino, O.</u>	Analysis of the entire TSC1 and TSC2 genes for germline mutations in Japanese cases of tuberous sclerosis : Reports of ten mutations.	Am. J. Med. Genet	90 : 123-126, 2000.
<u>Mizuguchi, M.</u> , Takashima, S., Yamanouchi, H., Nakazato, Y., Mitani, H. and <u>Hino, O.</u>	Novel cerebral lesions in the Eker rat model of tuberous sclerosis. Cortical tuber and anaplastic ganglioglioma.	J. Neuropathol. Exp. Neurol.	in press
小野次朗, 金田真理, 樋野興夫	結節性硬化症 (TSC 1、TSC 2)	現代医療	31 (9) : 127-132, 1999.
<u>Sumihisa Imakado</u> , Eiko Ichikawa, Tomoko Kawashima, Yasuhiro Kawachi, <u>Fujio Otsuka</u>	Effects of roxithromycin on the growth of neurofibroma-derived cultured cells from patients of neurofibromatosis type 1	J Invest Dermatol	112 : 606, 1999. (abstract)
渋谷和治, 倉持 朗, 土田哲也, 池田重雄	毛母腫を双方に生じた神経線維腫症 1 の一卵性双生児例	皮膚科の臨床	41(2) : 343-347, 1999.
Goro Otsuka, Takashi Nagaya, Kiyoshi Saito, Masaaki Mizuno, <u>Jun Yoshida</u> , Hisao Seo	Inhibition of nuclear factor- κ B activation confers sensitivity to tumor necrosis factor- α by impairment of cell cycle progression in human glioma cells	Cancer Research	59:4446-1152, 1999.

単行本

著者名	題名		編集者名	発行社名(発行地名)	発行西暦年号頁
<u>大塚藤男</u>	血管線維腫. 皮膚科診療プラクティス.	3、皮膚病理を読む	熊切正信, 宮地良樹, 瀧川雅浩	文光堂 東京	1998 p. 237
<u>Fujio Otsuka</u>	Epidemiology of neurofibromatosis in Japan.	Phacomatosis in Japan. Epidemiology, clinical feature, and molecular biology	Michihito Niimura, Fujio Otsuka, Okio Hino.	Japan Sci. Soc Press, and Karger, Tokyo and Basel	1999 pp.125-133
<u>Ohno K.</u> , <u>Yakura N.</u> , <u>Zhang H.</u> , <u>Ninomiya H</u> and <u>Nanba E.</u>	Molecluar Epidemiology of Tuberous Sclerosis.	Phacomatosis in Japan : Epidemiology, Clinical Picture and Molecular Biology	Niimura M, Hino O and Ohtsuka F.	Japan Scientific Societies Press, Karger	1999 pp.53-59
<u>大野耕策</u>	「プリングル病の臨床と病態」	マルホ皮膚科セミナー 放送内容集			1999 No.142:21-23
<u>澤田俊一</u>	NF1/NF2	KEY WORD 1999-2000 皮膚疾患	竹原和彦, 島田眞路 相馬良直	先端医学社	1999 pp.186-187
<u>Hino, O.</u> , <u>Satake, N.</u> , <u>Kobayashi, T.</u> and <u>Kajino, K.</u>	Carcinogenesis in tuberous sclerosis.	Gann Monograph on Cancer Research No.46	Ohtuka, F., Hino, O. and Niimura, M.	Japan Scientific Societies Press, Tokyo	1999 pp.101-111
<u>Hino, O.</u> , <u>Fukuda, T.</u> , <u>Satake, N.</u> , <u>Kobayashi, T.</u> , <u>Honda, S.</u> , <u>Orimoto, K.</u> , <u>Yamashita, Y.</u> and <u>Kikuchi, Y.</u>	TSC2 gene mutant (Eker) rat model of a mendelian dominantly inherited cancer	Prog. Exp. Tumor Res.	Hiai, H. and Hino, O.	Karger, Basel	1999 35:95-108
<u>Hino, O.</u> , <u>Kobayashi, T.</u> , <u>Orimoto, K.</u> , <u>Urakami, S.</u> , <u>Fukuda, T.</u> , <u>Satake, N.</u> and <u>Yamashita, Y.</u>	Cancer genetics of the tuberous sclerosis (TSC2) gene mutant.	Familal Cancer and Prevention	Utsunomiya, J., Mulvihill, J.J. and Weber, W.	A Jone Wiley & Sons, Inc., New York	1999 pp.475-480
<u>Kajino, K.</u> and <u>Hino, O.</u>	TSC1 and TSC2 genes mutations in Human Kidney tumors.	"Kidney Cancer" (Recent Results of Basic and Clinical Research) In Contribution to Nephrology	Hino, O.	Karger, Basel	1999 128:45-50
<u>清原祥夫</u> <u>鈴木 正</u> <u>土田哲也</u> <u>池田重雄</u>	皮膚・粘膜移行部の色素性病変	特集/悪性黒色腫のデルマトスコープ入門		全日本病院 出版	1999 pp.61-64

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業

神経皮膚症候群研究班

平成11年度 第1回総会プログラム

日 時 : 1999年10月22日 (金) 10:00~15:00
 会 場 : 学士会館 本館 320号室 (東京都千代田区神田錦町3-28)
 連 絡 先 : 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系皮膚科 TEL: 0298-53-3128

開 会 の 辞 10:00 大塚 藤 男

厚生省ご挨拶 10:05 保健医療局エイズ疾病対策課

研 究 発 表 12分 (口演8分, 討論4分) 35mmスライド一面映写

(10:10~11:10 NF1) (座長:大塚 藤男)

1. NF1患者の炭酸ガスレーザー治療

市川栄子, 小辻智恵, 今門純久, 大塚藤男 (筑波大学臨床医学系皮膚科)

2. 多発性小神経線維腫に対するエタノール局注療法

佐藤典子, 久保田由美子, 古賀哲也, 中山樹一郎 (福岡大学医学部皮膚科)

3. 特異な臨床像を呈したレックリングハウゼン病の2例

渡辺亜紀, 高橋 聡, 久保田由美子, 古賀哲也, 中山樹一郎 (福岡大学医学部皮膚科)

4. 非NF1患者の悪性末梢神経鞘腫瘍 MPNST

谷戸克己, 太田真由美, 澤田俊一, 太田有史, 本田まりこ,
 新村真人 (東京慈恵会医科大学皮膚科)

5. 右腋窩皮下の Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) に腹部腫瘍を追発したNF-1の1例

中山文子, 立川 直, 緒方克己, 井上勝平 (宮崎医科大学皮膚科)
 田中英子 (宮崎医科大学第1外科)

(11:10~12:10 NF1) (座長:新村 真人)

6. Reovirus による MPNST 治療の可能性

太田有史, 澤田俊一, 本田まりこ, 新村真人 (東京慈恵会医科大学皮膚科)

7. 高度頸椎変型を来したNF1患者の前縦靱帯の組織所見

野沢大輔, 会田育男, 落合直之 (筑波大学臨床医学系整形外科)

8. イリザロフ法を用いた先天性脛骨偽関節症の治療

大西五三男, 岡崎裕司, 小崎慶介, 佐藤和強, 中村耕三 (東京大学医学部整形外科)

9. ナビゲーションシステムを用いた脊髄腫瘍摘除術および脊椎固定術

北川知明, 大西五三男, 星地亜都司, 川口 浩, 阿久根徹, 穴水依人
 岩崎元重, 中村耕三 (東京大学医学部整形外科)

10. 神経線維腫症に伴う多発性脊髄腫瘍の手術 —その病態と治療方針の一考察—

岩崎元重, 大西五三男, 星地亜都司, 川口 浩, 阿久根徹, 穴水依人
北川知明, 中村耕三 (東京大学医学部整形外科)

事務連絡・昼食 (12:10~12:50)

(12:50~13:25 NF1)

(座長:佐谷 秀行)

11. Neurofibromatosis の脳 MRI 所見 —特にいわゆる unidentified bright objects について—

西川 亮, 松谷雅生 (埼玉医科大学脳神経外科)
倉持 朗, 土田哲也 (埼玉医科大学皮膚科)

12. 神経線維腫における VEGF の発現

小辻智恵, 今門純久, 市川栄子, 大塚藤男 (筑波大学臨床医学系皮膚科)

13. NF1 蛋白 Neurofibromin の細胞内 RAS-GAP 活性の制御機構と病態との関連

徳王 宏, 湯之上俊二, 荒木令江, 佐谷秀行 (熊本大学医学部腫瘍医学)

(13:25~14:00 TS)

(座長:吉川 邦彦)

14. TSC1 & TSC2 蛋白の組織および細胞内局在

福田智一, 小林敏之, 樋野興夫 (癌研究所実験病理部)

15. 結節性硬化症、病変部細胞の特性と選択的増殖阻害剤の開発

大野耕策, 牧 広利, 檜垣克美, 二宮治明 (鳥取大学医学部神経生物学)

16. 結節性硬化症の治療の為に基礎的検討 —P40の関与とその意義—

金田真理, 吉川邦彦 (大阪大学医学部皮膚科)
金田安史 (大阪大学医学部遺伝子治療)

Tea Time (14:00~14:20)

(14:20~15:00 TS)

(座長:樋野 興夫)

17. 結節性硬化症の動物モデル Eker rat の大脳に見いだされた皮質結節様病変

水口 雅, 野崎靖之 (自治医科大学小児科)
伊藤雅之, 高嶋幸男 (国立精神神経センター)
三谷弘明, 樋野興夫 (癌研究所実験病理部)

18. TSC1 knock out mice の作成と解析

小林敏之, 樋野興夫 (癌研究所実験病理部)
野田哲生 (癌研究所細胞生物部)

19. TSC1 mutant モデルを用いた腫瘍発生の制御・予防

樋野興夫, 真嶋州一, 小林敏之, 百瀬修二 (癌研究所実験病理部)

閉会の辞 15:00

大塚 藤 男