

ましい。待機することにより、患肢の廃用性萎縮が進行し、後の手術を困難にする。また長期の廃用により足部の成長発達を阻害する可能性が高い。

2. 5～6歳未満の小児の治療方針

手術方法について

年少のために治療に際しては困難な点がある。まず年少であるほど偽関節部の癒合が困難であり、特に移植骨の骨吸収が起こりやすくまた癒合しにくい。イリザロフ法は創外固定器を使用するので協力を得られにくい年少児には使いにくい。血管柄付き骨移植が年少児には良いと思われる。しかし健側の採骨部の変形が生ずる可能性があるので留意する必要がある。

保存療法について

腓骨の偽関節や骨折のない場合には成長に伴う変形も少なく、保存的に待機することもよい方法である。その場合、骨癒合は期待できず、成長後に手術的治療に移行することが前提である。保存療法は短下肢装具を用いて患肢の下腿を外固定する方法を用いる。患肢に荷重しまた歩行しやすくすることを目的とする。これによって廃用性の骨萎縮を可及的に予防し、将来の手術的治療に移行できるよう図る。運動機能が著しく障害されており、変形が著しい場合には、早期の手術的治療に踏み切るのが良い。さもなければ患肢を使用できず廃用性萎縮が進行し、将来の治療に悪影響を及ぼす。

3. 切断の適応について

McCarthyらは先天性脛骨偽関節症の治療において1. 3回以上の手術によっても骨癒合が得られないもの、2. 5 cm以上の骨短縮、3. 偽関節より遠位部分の重度の変形、4. 治療の遷延化および長期入院による運動機能の障害などがある場合には切断術を考慮する必要があると提唱した (McCarthy, 1982)。しかし、現在では血管柄付き骨移植およびイリザロフ法などを用いることにより、骨癒合率ははるかに向上し、また骨短縮に対しても対応できるようになっている。5 cmの短縮は切断術の適応にはならないし、また重度の変形も矯正が可能である。今日の治療指針においては、切断術の適応は極力制限すべきであり、最終治療後も患肢の運動機能が改善せず、歩行能力に著しい制限があり、切断によって運動機能が改善される場合にのみ適応が考慮されるとしたほうが良い。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

NF1に合併した先天性尺骨偽関節症の治療経験

研究協力者 会 田 育 男 筑波大学臨床医学系整形外科講師

研究要旨

症例は4歳の男児で、尺骨遠位1/3の骨欠損と橈骨頭の前方脱臼を認めた。治療は骨癒合を第一目的とし、尺骨偽関節部に血管柄付腓骨移植術を施行した。移植骨は術後約3ヶ月で骨癒合したが、1年後に橈骨頭の再脱臼が生じてきた。5年後に創外固定による仮骨延長法によって、彎曲を矯正するとともに骨延長を行った。先天性偽関節症に対して血管柄付骨移植術が最も信頼のおける手術法とされているが、われわれの症例においても早期に骨癒合が得られ有効であった。しかし、相対的な短縮と彎曲の異常によって橈骨頭が再脱臼してきた。その治療法として、変形矯正と骨延長を同時におこなえる仮骨延長法を施行し、良好な経過であった。血管柄付骨移植術や仮骨延長法を利用することによって、治療の難しい先天性偽関節症に対しても十分な治療成績が得られると考えられた。

A. 研究目的

NF1に合併した先天性尺骨偽関節症の治療を行った。血管柄付骨移植術および仮骨延長法を施行したので、その治療成績について報告する。

B. 研究方法

症例は4歳の男児で、主訴は右肘の変形であった。両親が変形に気づき近医を受診した。そこで尺骨の異常を指摘され、当科に紹介された。その後経過とともに変形は顕著となり、3ヶ月後に手術目的で入院となった。初診時単純X線像(図1)では、尺骨は遠位1/3で偽関節となっており、尺骨頭には骨萎縮と形成不全が認められた。肘関節では橈骨頭が前方に脱臼していた。全身にカフェオレ斑が存在し、NF1に合併した先天性尺骨偽関節症と診断した。MRIで偽関節部に腫瘍は認められなかった。治療は偽関節部の骨癒合を優先すべきであると考え、血管柄付骨移植術を選択した。

C. 研究成果

偽関節部を展開したところ、かたい線維性組織が介在していたが、両骨片の断端を軽度切除するだけで良好な出血が認められた。近位骨片の操作により橈骨頭を整復し、橈骨と尺骨間を創外固定器で固定した。次

に、反対側下腿より血管柄付き腓骨を採取し、近位をscrew 2本で、遠位はK-wire 1本で固定、更に移植骨の遠位側と橈骨の間をK-wireで固定した(図2)。腓骨動脈は、尺骨動脈、皮下静脈とそれぞれ縫合した。術中採取した偽関節部の結合組織と尺骨近位端髓腔内にあった軟部組織は病理組織学的には線維性結合組織であり、神経線維腫症などの所見は認められなかった。近位、遠位とも約3ヶ月で骨癒合が得られ、創外固定器およびK-wireを抜去した。術後6ヶ月の時点で骨癒合は良好で橈骨頭も整復位にあった。尺骨の遠位部の骨萎縮も改善し、remodelingが見られた。ところが、経過とともに橈骨頭の再脱臼が進行し、術後1年の単純X線像では再脱臼が明らかとなった。術後5年に再手術を施行した。X線(図3)では尺骨の短縮と彎曲の異常が認められ、橈骨頭再脱臼の原因と考えられた。創外固定による仮骨延長法によって彎曲を矯正するとともに骨延長を行った。血管柄付腓骨移植の近位部で骨切りし、1週後から1日0.5mmで骨延長を開始した。25日後に透視下に橈骨頭の整復を施行し(図4)、さらに尺骨の相対的な短縮がなくなるまで骨延長を行った。5ヶ月後に創外固定を抜去した。(図4)

D. 考 察

神経線維腫症にともなう先天性前腕骨偽関節症は尺骨、橈骨、および両者の報告例があるが、非常に希で

ある。偽関節部の組織所見はfibrous dysplasiaに類似していると報告されており、神経線維腫が偽関節の原因とは考えられていない。本症例の組織所見も同様であった。

治療法に関しては、種々の遊離骨移植による治療が行われてきたが、成功率は低い。顕微鏡視下の微小血管吻合技術を利用した血管柄付骨移植術は、first choiceとして多く用いられ良好な成績を挙げている。本症例の場合も早期に骨癒合が得られ有効であった。しかし、変形矯正には不向きであると考えられる。

Hizarov法、つまり仮骨延長法は、創外固定を利用して骨延長を行うが、延長部での変形矯正も同時に可能である。本症例においても、橈骨の再脱臼の原因と考えられた尺骨の短縮、変形に対して有効な治療法であった。また、初回手術時に、仮骨延長法を利用することも可能と考えられる。

E. 結 論

血管柄付骨移植術や仮骨延長法を利用することによって、治療の難しい先天性偽関節症に対しても良好な治療成績が得られると考えられた。

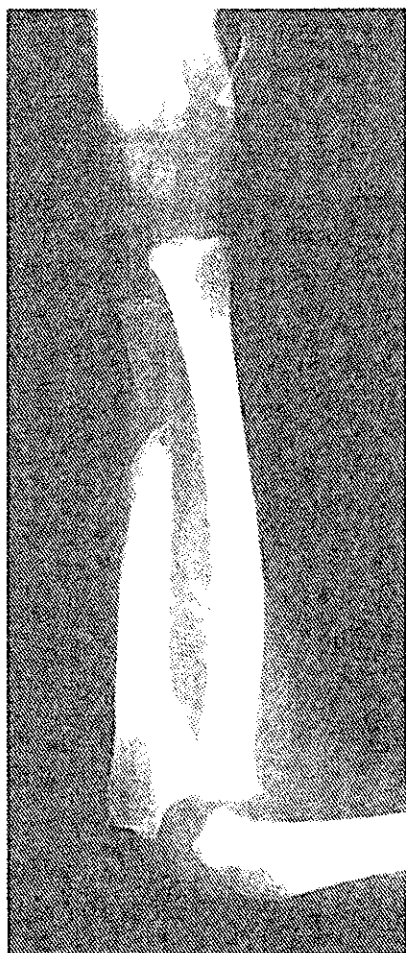


図1 前腕単純X線
尺骨遠位1/3に偽関節を認めた。

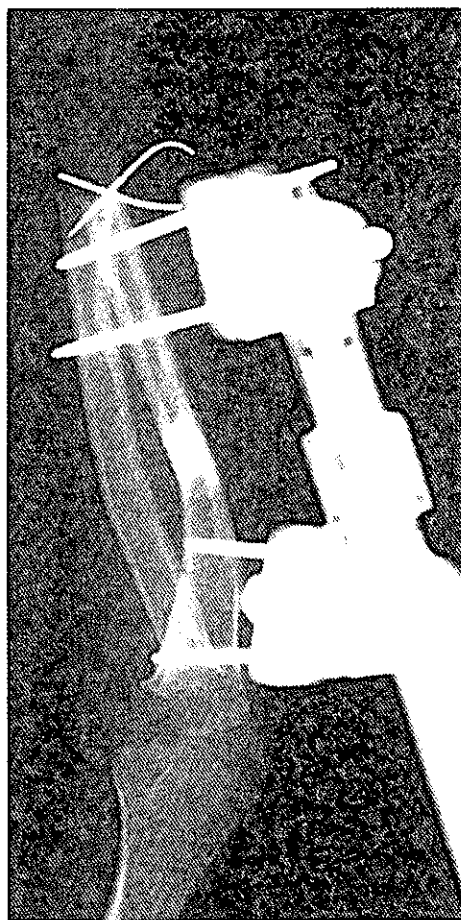


図2 血管柄付骨移植術後

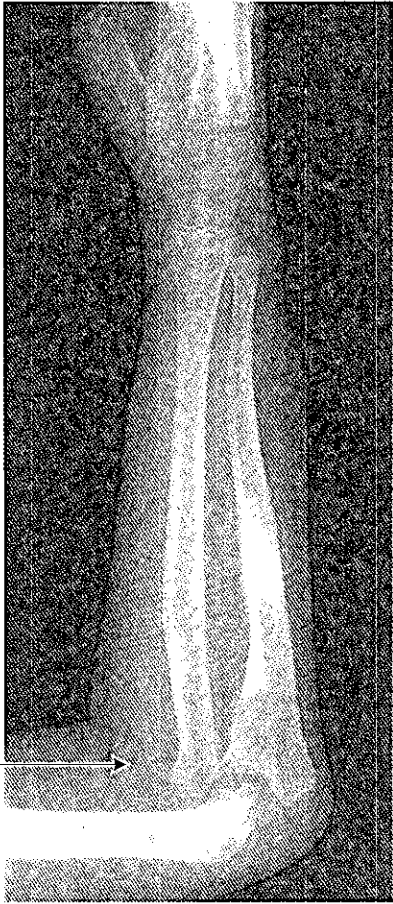


図3 初回手術の5年後
尺骨の短縮と彎曲の異常、および橈
骨頭の脱臼(矢印)を認めた。

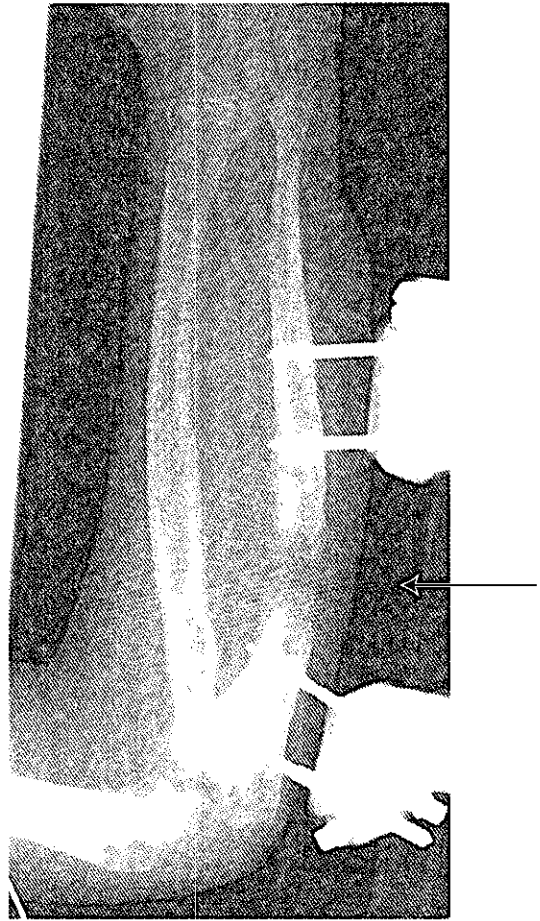


図4 創外固定器を装着し、骨延長(矢印)
しながら彎曲の矯正を行った。

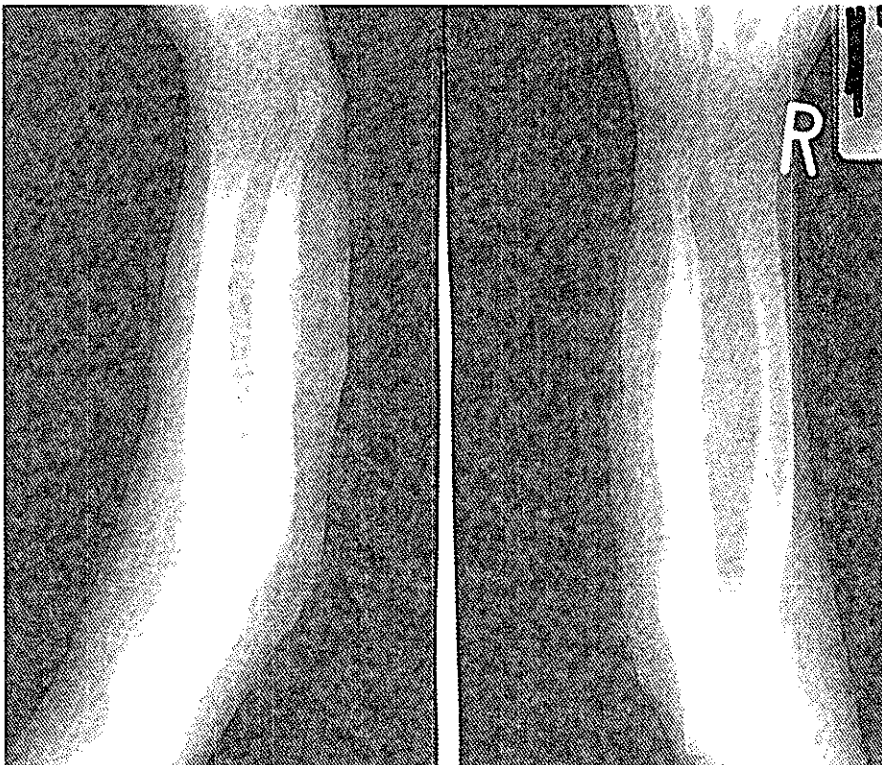


図5 創外固定器抜去後

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

NF2患者へのアンケート調査：患者の求める治療について

分担研究者 吉田 純 名古屋大学脳神経外科教授

研究要旨

神経線維腫症2型患者の皆様の考えを治療に活かすためにアンケート調査を行い、26名から回答を頂いた。症状では、聴力障害23名・顔面神経麻痺11名（前庭神経鞘腫症状）、歩行障害12名・四肢の痛みしびれ7名・上肢運動麻痺5名・排尿排便障害4名（脊髄腫瘍症状）、顔面のしびれ7名（三叉神経鞘腫症状）、その他、視力障害9名、嚥下障害7名、言語障害5名などがみられた。治療歴では、特に前庭神経鞘腫の治療歴が多様であり、この腫瘍治療の困難さが示唆された。これに伴い、前庭神経鞘腫の治療指針に対する意見も分かれた。聴力障害出現後または腫瘍成長があれば治療との意見が比較的多いものの、聴力障害出現前の治療も選択されており、我々も一側は早期に治療すべきと考える。脊髄腫瘍と末梢神経腫瘍については症状の出現または腫瘍の成長があれば摘出術との意見が比較的多く、我々も同意見である。一方、頭蓋内髄膜腫の治療指針については意見が分かれているが、症状出現前の治療も後遺症なく行える場合には選択できると考える。今回の調査では、予後についての不安、精神的サポートの希望、医師との信頼関係の重要性について意見が多くみられた。医療関係者は患者の方々との信頼関係を築き、治療を進めることが重要である。

齋藤 清 名古屋大学脳神経外科

A. 研究目的

我々は、これまでに神経線維腫症2型の治療成績を検討し、昨年度には全国の医療機関にアンケート調査を行って治療指針を作成した。今回は、患者の皆様の考えを治療に活かすために、神経線維腫症2型の患者様にアンケート調査を行った。回答の内容から、患者の方々が求める治療について検討し報告する。

B. 研究方法

調査内容は、病状、今までの治療、治療方針についての意見、予後についての考え、新しい診断治療について、医療関係者への意見、福祉制度についてなどである。患者間のネットワークやあせび会を介して、協力可能と申し出ていただいた方にアンケート用紙を送付した。

C. 研究結果

26名から回答を頂いた。女性17名、男性9名、年齢は16～58（平均33）歳で、家族歴は10名の方にみられた（親7名、兄弟姉妹4名）。現在の状態は、家庭外で社会生活可能な方が17名、家庭内での生活が自力で可能な方が7名、家庭内での生活が介助で可能な方が2名であり、病院や施設での生活または床上生活の方はおられなかった。

診断されている腫瘍と症状は以下のようであった。

1. 前庭神経鞘腫：右25名（96%）、左23名（88%）
聴力障害：23名（88%）、一側6名、両側17名
顔面神経麻痺：11名（42%）、一側9名、両側2名
2. 脊髄腫瘍：22名（85%）（同定された腫瘍：神経鞘腫6、髄膜腫1、上衣腫1）
歩行障害：12名（46%）、四肢の痛み・しびれ：7名（27%）、上肢運動麻痺：5名（19%）、
排尿排便障害：4名（15%）
3. 三叉神経鞘腫：右5名（19%）、左6名（23%）
・側顔面のしびれ：7名（27%）、両側顔面のしびれ：1名（4%）

4. 頭蓋内髄膜腫：10名（38%）
けいれん発作：2名（8%）

5. その他の症状

視力障害：9名（35%）、嚙下障害：7名（27%）、
言語障害：5名（19%）

これらの症状のうち特に困っている症状として多かったのは、聴力障害（15名）、歩行障害（10名）、嚙下障害（5名）、痛み（5名）、手足の知覚低下（4名）、上肢麻痺（3名）、構音障害（3名）、視力障害（3名）、平衡障害（3名）、排尿排便障害（2名）などであった。

治療歴として前庭神経鞘腫に対しては、両側未治療の方が8名、一側を治療された方が6名（摘出術4名、摘出術＋放射線手術2名）、両側治療された方が12名（摘出術＋放射線手術と摘出術3名、摘出術＋放射線手術と放射線手術2名、両側摘出術3名、摘出術と放射線手術2名、両側放射線手術2名）であった。また、髄膜腫などその他の頭蓋内腫瘍に対しては8名が摘出術（1回3名、2回2名、5回1名、6回2名）、3名が放射線手術を、脊髄腫瘍に対しては14名が摘出術（1回10名、2回3名、5回1名）を、末梢神経鞘腫に対しては13名が摘出術（1回6名、2回3名、3回3名、5回1名）を受けておられた。

治療方針についての意見は次のようであった。

1. 前庭神経鞘腫

両側ともに経過観察する： 5名
一側は治療する： 10名
両側ともに治療する： 10名

治療時期と方法について

聴力障害出現前に摘出手術： 2名
聴力障害出現前に放射線手術： 8名
聴力障害出現したら摘出手術： 6名
聴力障害出現したら放射線手術： 6名
腫瘍が成長したら摘出手術： 8名
腫瘍が成長したら放射線手術： 5名

2. 脊髄腫瘍

経過観察のみ： 3名
症状出現前に摘出手術： 5名
症状出現したら摘出手術： 8名
腫瘍が成長したら摘出手術： 9名

3. 髄膜腫などその他の頭蓋内腫瘍

経過観察のみ： 4名
症状出現前に摘出手術： 3名
症状出現前に放射線手術： 7名
症状出現したら摘出手術： 5名

症状出現したら放射線手術： 4名
腫瘍が成長したら摘出手術： 7名
腫瘍が成長したら放射線手術： 6名

4. 末梢神経鞘腫

経過観察のみ： 6名
症状出現前に摘出手術： 3名
症状出現したら摘出手術： 7名
腫瘍が成長したら摘出手術： 10名

予後については、非常に不安ありが15名、多少不安ありが9名、どちらかといえば不安なしが2名で、不安の内容として多かったのは歩行障害（19名）、四肢麻痺（17名）、生命の危険（16名）、難聴（15名）、子供への遺伝（15名）、失明（4名）、新たな腫瘍の出現（2名）であった。また、予後について知りたい点として、歩行できなくなる可能性と時期（18名）、寝たきりになる可能性と時期（18名）、寿命（17名）、難聴の出現時期（8名）などがあげられた。

新しい医療として、聴覚脳幹インプラント（auditory brainstem implant）にていては、行いたくない（6名）、一般的になれば行いたい（3名）、保健診療になれば行いたい（3名）、研究段階でも行いたい（3名）、高額でも行いたい（2名）、今は分からない（13名）、また遺伝子診断については、自分には行いたくない（2名）すぐに行いたい（6名）一般的になったら行いたい（8名）、家族には行いたくない（2名）兄弟に行いたい（3名）子供に行いたい（8名）、今は分からない（9名）であった。

医療関係者への意見としては、難聴者への無理解や不親切の訴えが多く、手話のできる看護婦や医師の希望が述べられていた。また、医師との関係として、医師の説明不足や不適切な対応に対する不満がある一方、信頼関係が築かれている場合には感謝の意見もみられ、多くの方が精神的サポートを希望しておられた。

福祉については、医療制度についての不満（手続の複雑さ、この病気にあった制度がないこと、障害年金が少ないこと、介護保険の適応になりにくいことなど）が多く、相談できる機関の設置を求めておられた。また、社会的には、手話読解術の講座が少ないこと、就職が困難であること、交通機関などバリアフリーになっていないこと、テレビの字幕の希望がみられた。

その他の希望として、治療法の開発、病気についての情報公開、遺伝疾患についての啓蒙の促進、神経線維腫I型との病名の区別などの記載がみられた。

D. 考 察

症状に関しては、今回の調査でも前庭神経鞘腫による症状が最多で、次いで脊髄神経鞘腫の症状が多く、これらの腫瘍の治療が重要課題であることが示された。また、視力障害と嚥下障害も多くみられ、治療の上で考慮すべきと考えられた。

前庭神経鞘腫に対する治療歴では、一側治療（6名）両側治療（12名）ともに、摘出術とガンマナイフなどの放射線手術が種々の組み合わせで行われていた。神経線維腫症2型に伴う前庭神経鞘腫の治療が困難であり、種々の治療が試みられているためと考えられる。

治療歴の多様さに伴い、前庭神経鞘腫の治療指針に対する意見も様々に分かれた。聴力障害出現後または腫瘍成長があれば治療との意見が多いものの、聴力障害出現前の治療を選ばれた方も10名（摘出術2名、放射線手術8名）おられた。摘出術も放射線手術も聴力温存率は低いですが、我々も一側は早期に治療すべきと考えている。治療のうち摘出術と放射線手術は選択が分かれているが、一般に、小さな腫瘍は放射線手術または摘出術で治療し、3 cm以上の大きな腫瘍には摘出術と残存腫瘍に放射線手術が薦められる。

その他の腫瘍についても意見は分かれている。脊髄腫瘍と末梢神経腫瘍については症状の出現または腫瘍の成長があれば摘出術との意見が比較的多く、我々も同意見である。一方、頭蓋内髄膜腫については、症状の出現または腫瘍の成長があれば治療（摘出術または放射線手術）が必要であるが、症状出現前の治療も後遺症なく行える場合には薦められる。

今回の調査では、ほとんどの方が予後について不安であり、また、精神的サポートの希望と医師との信頼関係の重要性についての意見が多くみられた。神経線維腫症2型の治療は容易でない。我々は患者の方々の不安をできる限り減らすために、この病気について情報を公開し、意見交換を密にして、信頼関係を築き、患者様と協力して今後も治療を進める必要がある。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ヒト結節性硬化症TSC1, TSC2,の細胞周期調節のメカニズム

分担研究者 吉川 邦彦 大阪大学医学部皮膚科教授

研究要旨

最近、結節性硬化症の2つの原因遺伝子TSC1, TSC2及びこれらの遺伝子産物tuberin, hamartinが細胞周期の調節に関与する事が、DrosophilaやEker ratのhomologueを用いた実験よりわかってきた^{1,2,3,4)}。しかしながら、そのメカニズムについては不明である。今回我々は、遺伝子検査の結果がわかった結節性硬化症患者由来組織および培養細胞を用いて、これらの細胞周期の異常の有無を調べるとともに、サイクリンやサイクリン依存性キナーゼのレベルを検討し、TSC1, TSC2遺伝子の細胞周期調節のメカニズムの解明を試みた。その結果、ヒトのTSC1, TSC2いずれの細胞においてもS期の延長とアポトーシスの増加が認められた。さらに、これら細胞周期の異常は、活性型のサイクリンB-cdc2レベルの低下による可能性が示唆された。

金田 真理 大阪大学医学部皮膚科
樋野 興夫 癌研究所実験病理部
足立 浩幸 癌研究所実験病理部

常のメカニズムを検討した。

細胞及び組織

臨床的に結節性硬化症の診断基準を満足し、遺伝子検査の結果TSC1, TSC2のいずれかに異常が同定できた7歳から25歳までの7名の結節性硬化症の患者病変部由来培養細胞及び組織を用いた。コントロールとしては、結節性硬化症を伴わない異なった5例のヒト由来の皮膚サンプルを用いた。今回我々が実験に用いた患者サンプルの特徴を表1にまとめた。

細胞培養

それぞれの患者病変部由来細胞及びコントロール細胞を15% fetal calf serumを加えたDulbecco's modified Eagle's mediumで培養し、3～4代継代培養したものを本実験に用いた。

遺伝子型及びLOHの決定

遺伝子型の決定方法に関しては既に報告した⁵⁾。LOHの有無の検索には、9q34に関しては、2つのpolymorphic microsatellite markers (D9S149, D9s150) を、16p13.3に関しては、3つのpolymorphic microsatellite markers (D16S423, D16S663, D16S665) を用いた。genomic DNAを増幅したPCR産物を2 mg/ml ethidium bromide入りの3% agarose gel上で分離し、uv-trans illuminatorを用いて検索した。

A. 研究目的

病気の治療法の研究には、病因と発症機序の解明が不可欠である。そこでまず、本症の原因遺伝子や病因蛋白質の細胞レベルにおける機能の解明を試みた。最近、結節性硬化症の原因遺伝子TSC1, TSC2およびその遺伝子産物であるhamartin, tuberinの細胞周期への関与が、モデル動物であるエッカーラット由来細胞やドロソフィラを用いた実験より報告された^{1,2,3,4)}。しかしながら、そのメカニズムについては不明である。そこで、我々は、遺伝子検査の結果、異常が確定できた患者病変部由来組織と培養細胞（TSC1細胞, TSC2細胞）を用いて、細胞周期の異常を調べるとともに、そのメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

遺伝子検査で異常が確定できた患者病変部由来組織と培養細胞（TSC1細胞, TSC2細胞）を、FACSを用いて細胞周期の異常を調べると同時に、細胞周期の調節に関与する種々の抗体で染色し、その割合を調べ、それらを統計処理する事により本症における細胞周期異

組織染色法

生検にて採取したコントロールヒトおよびTSC1、TSC2患者の皮膚のパラフィン標本より連続切片を作製し、一次抗体として抗PCNA抗体(CALBIOCHEN)と抗MPP2抗体(ROYOBO)を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合抗マウスあるいは抗ラビット抗体(DAKOPATTS)を用いて染色し、フクシンで発色した。それぞれ、一視野あたりの染色陽性細胞の数を調べ統計処理した。

細胞染色法

生検にて採取したコントロールヒトおよびTSC1、TSC2患者の病変部由来培養細胞を、抗PCNA抗体、抗MPP2抗体、抗phospho-histone H3抗体および、細胞周期調節に関与する各cyclin、cdc2に対する抗体を一次抗体とし、FITCを結合した抗マウスあるいは抗ウサギ抗体を二次抗体として染色した。細胞はHoechst 33258を用いてcounterstainし、すべてのサンプルについて、1000個の細胞のうちそれぞれの抗体染色陽性細胞の割合を調べて統計処理し、比較検討を行った。

BrdU ラベル

BrdU ラベルは既に報告された方法に従って4,32 BrdU detection kit2 (Boehringer Mannheim, Germany)を用いて行った。

アポトーシスの検出

TSC1、TSC2患者病変部由来組織と細胞をapoptosis detection kit (TaKaRa, Japan)を用いてタンネル法で染色し、アポトーシス細胞を検出した。細胞はHoechst 33258を用いてcounterstainし、すべてのサンプルについて、1000個の細胞のうちのアポトーシス細胞の割合を調べて統計処理を行った。

FACS analysis

TSC1細胞、TSC2細胞、コントロール細胞をトリプシン処理にてはがし、70%エタノールで固定し、propidium iodideで染色後、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有無を検討した。

データの解析

FACSの結果の解析には、Cell Quest program (Becton dickinson)を用いた。データはStudent's t-testを用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

まず、今回我々が実験に用いた患者サンプルの特徴を表1にまとめた(表1)。

結節性硬化症における細胞周期の異常の有無を調べるために、全てのTSC1、TSC2患者病変部由来組織とコントロール組織をS期のマーカーである抗PCNA抗体、M期のマーカーである抗MPP2抗体で染色し、各抗体について一視野あたりの染色陽性細胞数の平均を示した。その結果、結節性硬化症患者病変部組織ではコントロール組織に比して、M期の細胞数の減少とS期の細胞数の増加が認められた(表2)。

組織における細胞周期の異常を確認するために、全てのTSC1細胞、TSC2細胞とコントロール細胞を、S期のマーカーである抗PCNA抗体、M期のマーカーである抗MPP2抗体および、抗phospho-histone H3抗体で染色し(図1)、それぞれの抗体陽性細胞の割合を比較検討した。その結果、TSC1細胞、TSC2細胞いずれにおいても、コントロール細胞に比してM期の細胞数の減少傾向と有意なS期の増加が認められた(図2)。

そこで、S期におけるDNAの複製が正常におこなわれているかどうかを調べるために、TSC1細胞、TSC2細胞とコントロール細胞を用いてBrdUの取り込み量を比較検討した。その結果、TSC1細胞、TSC2細胞いずれにおいても、コントロール細胞と同様にDNAの複製が正常におこなわれていることが確認できた(図3、表3)。

以上の結果をFACSを用いて確認した。その結果、TSC1細胞、TSC2細胞におけるS期の延長がFACSにおいても確認された(表4)。

ついで、結節性硬化症におけるアポトーシスの増加の有無を調べるために、結節性硬化症患者由来組織とコントロール組織及び細胞をタンネル法で染色しアポトーシスの増加の有無を検討した。その結果、TSC1、TSC2患者由来組織いずれにおいてもアポトーシスの増加が認められた(図4)。さらに、細胞レベルにおいても、TSC1細胞、TSC2細胞ではコントロール細胞に比して、有意にアポトーシスの割合が増加していることが確認できた(図5)。

以上より、TSC1細胞、TSC2細胞のいずれにおいてもS期の延長とアポトーシスの増加が確認された。そこで、次に、この細胞周期の異常のメカニズムを検討した。

細胞周期は、種々のサイクリンとサイクリン依存性キナーゼによって調節されている。そこで、これらサ

イクリンやcdc2に対する抗体を用いてTSC1細胞、TSC2細胞、コントロール細胞を染色し(図6)、各抗体の染色陽性細胞の割合を比較検討した。その結果、TSC1細胞、TSC2細胞いずれにおいても、コントロール細胞に比して有意なサイクリンA、Bの染色像の増加と、逆に、cdc2染色細胞像の減少を認めた(図7)。

D. 考 察

サイクリンAは、通常G1/S遷移期から発現し始め、S期の進行に伴って増大し、M期の分裂中期から後期に急速に分解される。サイクリンBも、G1期には存在せず、サイクリンAに遅れてS期から合成がはじまり、M期をピークとし、サイクリンAに引き続いてM期で急速に分解される。従って今回認められたサイクリンA、Bの増加はS期の延長の為に二次的におこってきた可能性が考えられた。一方cdc2蛋白質の発現量は細胞周期を通じて一定であり、細胞周期に従って変動するサイクリンBと結合することにより、その活性を調節している。細胞周期に従って、周期的に合成されたサイクリンBはただちにcdc2と複合体を形成し、まず不活性型のサイクリンB-cdc2 complexを形成する。M期の開始にともなってCDK活性化キナーゼ的作用により活性型に変化する。その後M期の終了時にサイクリンBがAPC/サイクロソーム依存性にユビキチン化されて蛋白質分解されるに従ってサイクリンB-cdc2 complexもその活性を失う。従って、cdc2量が少なければ、サイクリンBがいくら形成されてもサイクリンB-cdc2 complexは形成されず、核膜崩壊、染色体凝集、分裂装置形成など、M期の制御が不完全になる。その結果、結節性硬化症で見られる細胞分裂の異常がおこるのかもしれない。また、cdc2量が少なければ、サイクリンA-cdc2 complexの形成も減少し、S期におけるDNAの再複製の抑制も不完全になるであろう。その結果、結節性硬化症にみられる、4倍体等の異常細胞ができるのかもしれない。

E. 結 論

今回の結果より、

1) TSC1, TSC2遺伝子の減少により、S期の延長およびアポトーシスの増加が認められた。しかも、2) この細胞周期の異常はcdc2レベルの減少による可能性が示唆された。また、3) これら細胞周期の異常は、TSC1細胞、TSC2細胞のいずれにおいても認められ、違い

は認められなかった。さらに、4) これら細胞周期の異常は、TSC1, TSC2遺伝子のhalf lossにより起こる可能性も示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Wataya-Kaneda M, Kaneda Y, Hino H, Adachi H, Hirayama Y, Seyama K, Satou T, Yosikawa K: Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. Arch Dermatol Res 293:460-469, 2001

2. 学会発表

金田 真理、金田 安史、植野興夫、吉川邦彦
結節性硬化症における2つの細胞周期調節のメカニズム
第26回日本研究皮膚科学会 愛媛 2001年9月

G. 参考文献

1. Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, Hengstschlager M: Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. *J Biol Chem* 46:29301-29308, 1997
2. Soucek T, Yeung RS, Hengstschlager M: Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc Natl Acad Sci* 95:15653-15658, 1998
3. Ito N, Rubin GM: Gigas, a drosophila homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell* 96:529-539, 1999
4. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK: Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologous restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 105:345-355, 2001
5. Catanina MG, Mischel PS, Vinters HV: Hamartin and tuberin interaction with the G2/M cyclin-dependent kinase CDK1 and its regulatory cyclins A and B: *J Neuropathol Exp Neurol* 7:711-723, 2001
6. Yamashita Y, Ono J, Okada S, et al: Analysis of all exons of TSC1 and TSC2 genes for germline mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis: Report of 10 mutations. *Am J Med Genet* 90:123-126, 2000

図1 TSC2患者病変部由来培養細胞及び正常ヒト線維芽細胞の染色像。

TSC2患者病変部由来培養細胞 (a,b,c,d) と正常ヒト線維芽細胞 (e,f,g,h) の抗PCNA抗体 (a,e) と抗MPP2抗体 (c,g) による染色像。Hoechst 33258 によるcounter staining (b,d,f,h)。Scale bar: 25 μ m.

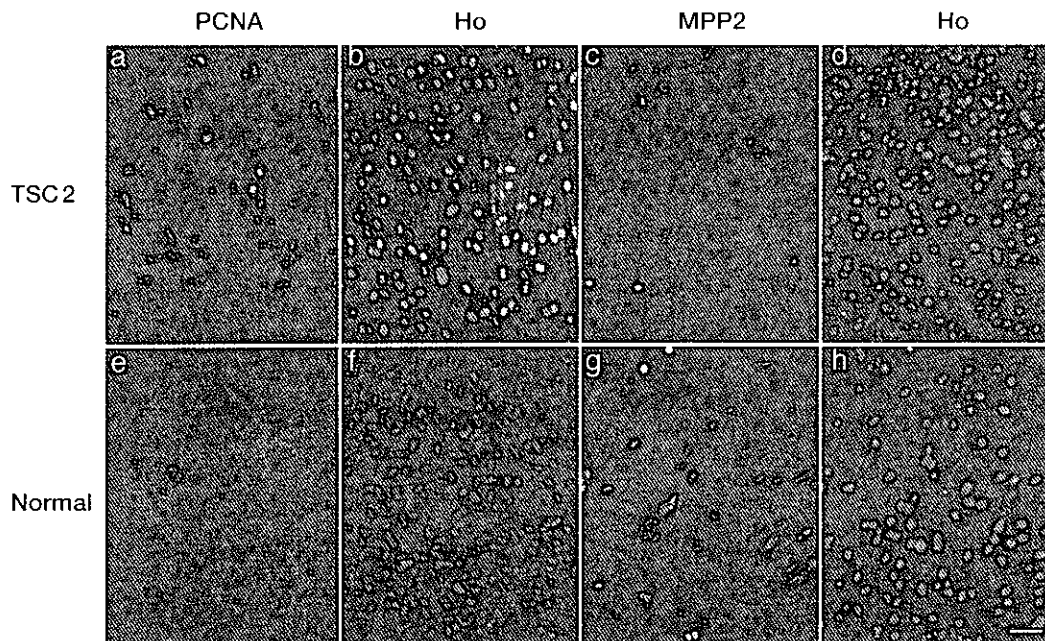


図2 TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞と正常ヒト線維芽細胞における抗PCNA抗体、抗MPP2抗体、抗phospho-histone H3 抗体陽性細胞の割合。

TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞では正常ヒト線維芽細胞に比して有意にPCNA陽性細胞の増加が認められた。

Positive staining rates of cultured cells

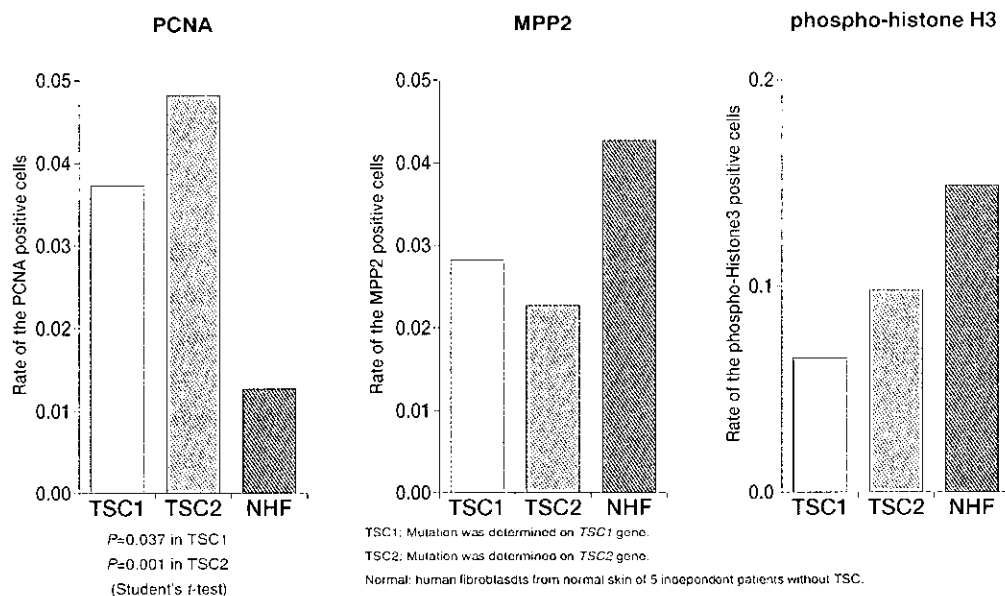


図3 TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞と正常ヒト線維芽細胞のBrdU取り込み像

TSC1 (a)、TSC2患者病変部由来培養細胞 (b) と正常ヒト線維芽細胞 (c) のS期細胞がチミジンのアナログであるBrdUで茶色に染色されている。Scale bar: 25 μ m.

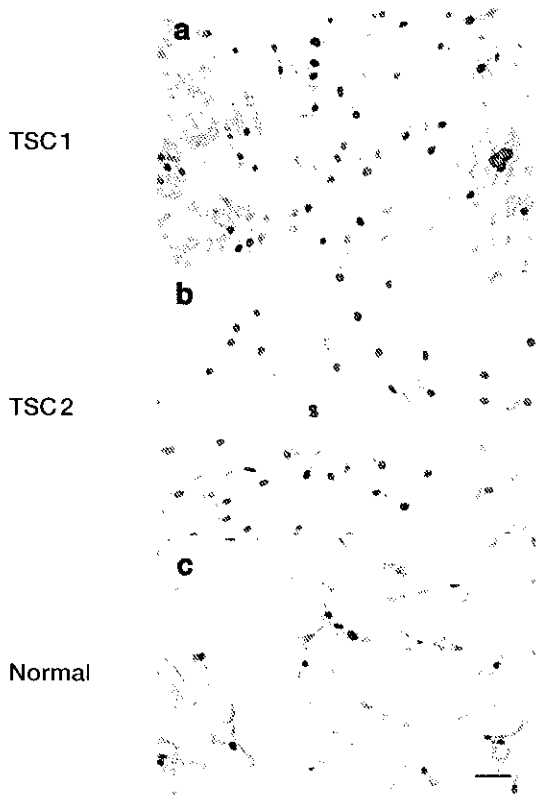


図4 TSC1, TSC2患者病変部組織と正常ヒト皮膚におけるアポトーシス細胞の分布

TSC1 (a)、TSC2患者病変部組織 (b) と正常ヒト皮膚 (c) を Apoptosis Detection Kit (TaKaRa) を用いて染色し、アポトーシス細胞の分布を比較した。基底層の褐色顆粒はメラニン顆粒である。

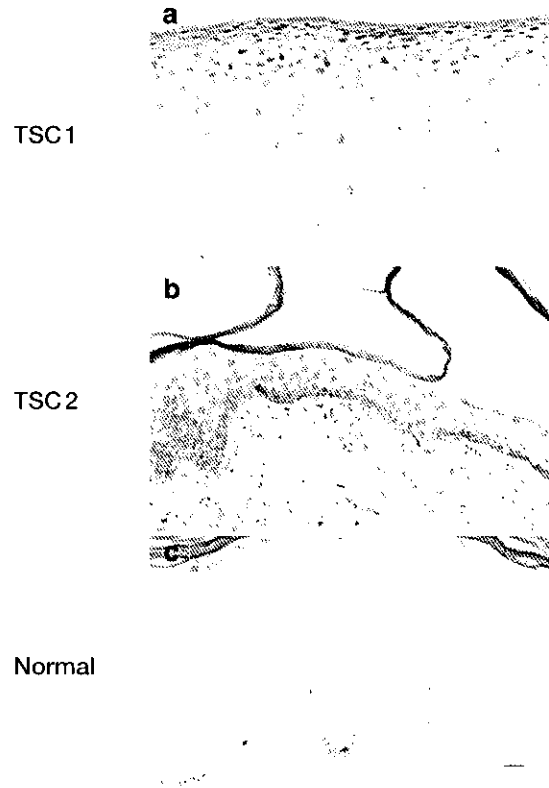


図5 患者病変部由来培養細胞と正常ヒト線維芽細胞におけるアポトーシス細胞の割合。

TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞においては、正常ヒト線維芽細胞に比較して、有意にアポトーシスの増加が認められた。

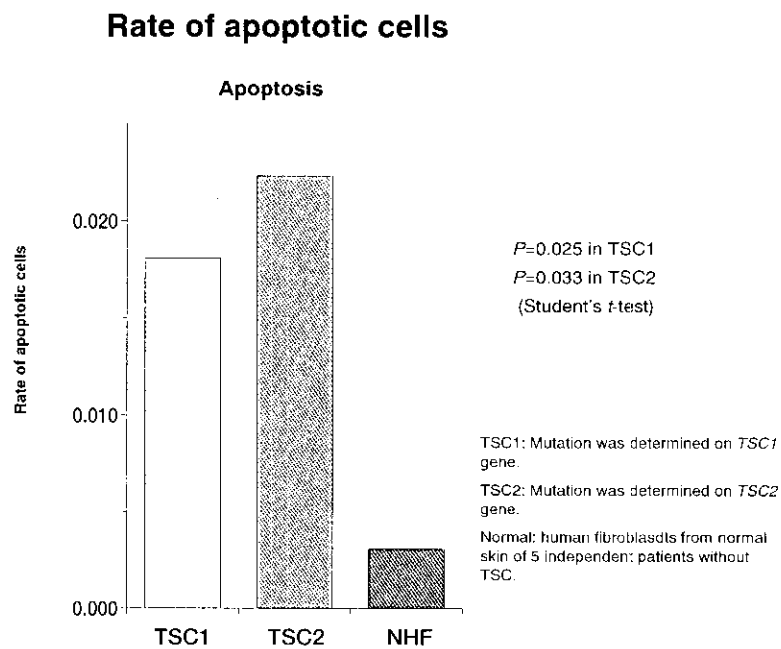


図6 TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞と正常ヒト線維芽細胞のサイクリンA、サイクリンB、cdc2 に対する抗体による染色像。

TSC1 (a, d, g, j, m, p) TSC2 患者病変部由来培養細胞 (b, e, h, k, n, q) と正常ヒト線維芽細胞 (e, f, i, l, o, r) をそれぞれサイクリンA (a, b, c) サイクリンB (g, h, i) 及びcdc2 (m, n, o) に対する抗体で染色した。Hoechst 33258による counter staining (d, e, f, j, k, l, p, q, r)。

Scale bar: 25µm.

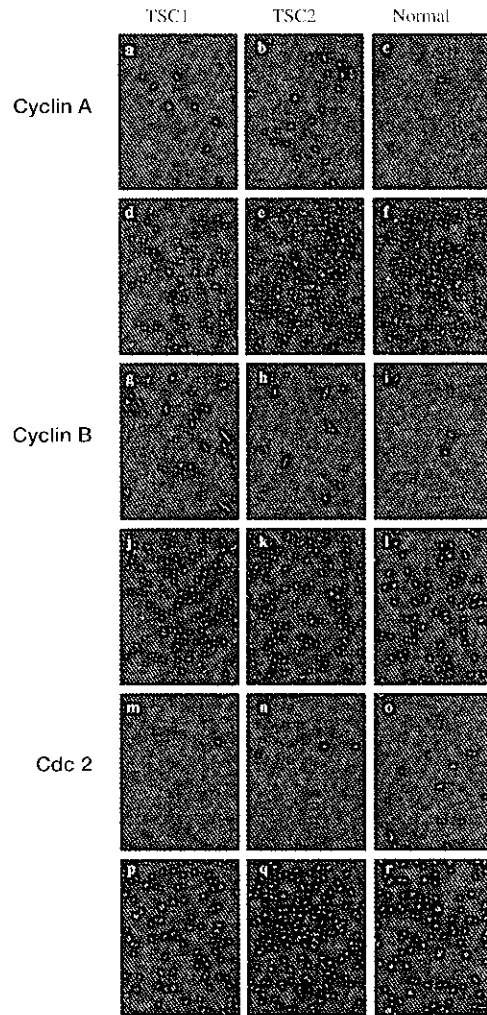
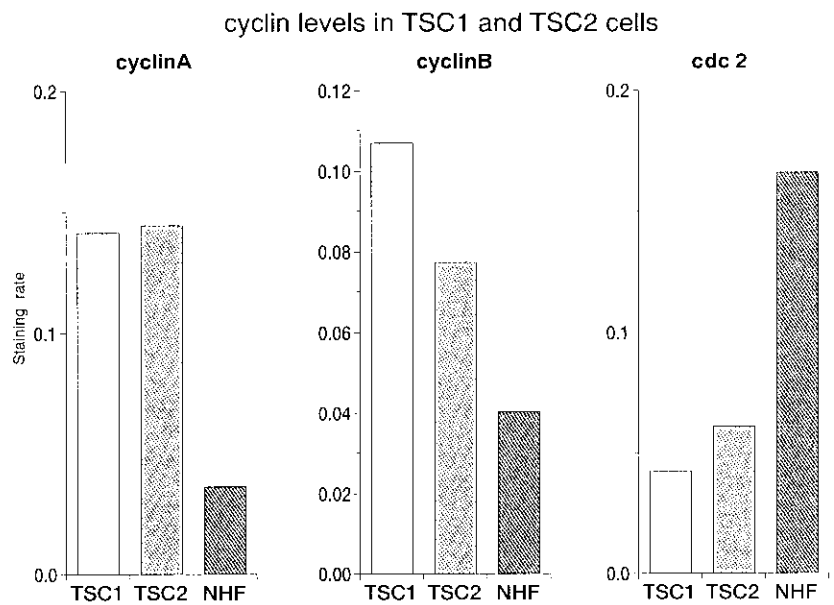


図7 病変部由来培養細胞と正常ヒト線維芽細胞におけるサイクリンA、サイクリンB、cdc2陽性細胞の割合。

TSC1, TSC2患者病変部由来培養細胞では正常ヒト線維芽細胞に比して、サイクリンA、サイクリンB陽性細胞の増加と、cdc2陽性細胞の低下が認められた。



TSC1: Mutation was determined on TSC1 gene.

TSC2: Mutation was determined on TSC2 gene.

Normal: human fibroblasts from normal skin of 5 independent patients without TSC.

Table 1 Characteristics of the samples

Case No	Sex	Age	lesion	genetic diagnosis	Mutationh	LOH
100	F	53	Shagreen patches	TSC1	del 1605N5	*
20	M	25	Ungual fibroma	TSC1	del 1918C	neg
15	F	18	Facial angiofibroma	TSC2	1831C→T	neg
1	F	22	Facial angiofibroma	TSC2	2713C→T	neg
3	F	17	Facial angiofibroma	TSC2	del 4111CT	neg
13	F	22	Facial angiofibroma	TSC2	del 4475N4	neg
11	M	7	Shagreen patches	TSC2	del 5169N18	neg

Neg : No LOH was shown

* :Analysis of LOH had not been performed.

Table 2 Average numbers of PCNA and MPP2 stained cells per microscope field

	PCNA	MPP2
TSC1	88	16
TSC2	68	32
Normal	26	112

TSC1: Mutation was determined on *TSC1* gene.

TSC2: Mutation was determined on *TSC2* gene.

Normal: Normal human fibroblasts from control skins of 5 independent patients without TSC.

Table 3 BrdU labering

	BrdU
TSC1	0.30 ± 0.025
TSC2	0.28 ± 0.006
Normal	0.31 ± 0.055

TSC1: Mutation was determined on *TSC1* gene. Values are the average ± standard deviation of the positive staining rates among all TSC1 cells.

TSC2: Mutation was determined on *TSC2* gene. Values are the average ± standard deviation of the positive staining rates among all TSC2 cells.

Normal: Values are the average ± standard deviation of the positive staining rates among fibroblasts from normal skin of five patients without TSC.

**Table 4 FACS analyses of TSC1, TSC2,
and normal human fibroblasts cell cycle**

	Fibroblast Type		
	Normal	TSC1	TSC2
G0-G1	89.30 ± 2.1	88.30 ± 2.9	79.20 ± 9.9
S	1.70 ± 0.06	7.48 ± 1.7	11.30 ± 8.8
G2-M	9.00 ± 5.0	4.62 ± 1.8	8.86 ± 2.1

TSC1: Mutation was determined on the *TSC1* gene. Values are the average ± standard deviation. FACS analyses results from TSC1 cells from two patients.

TSC2: Mutation was determined on the *TSC2* gene. Values are the average ± standard deviation. FACS analyses results from TSC2 cells from three patients.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

結節性硬化症と局所性皮質異形成の免疫病理学的鑑別

分担研究者 水 口 雅 自治医科大学小児科助教授

研究要旨

結節性硬化症と局所性皮質異形成の大脳病変の異同を免疫病理学的に検討した。結節性硬化症では hamartin、tuberin の発現低下を示す例が多いのに対し、局所性皮質異形成の異常巨細胞には発現亢進を示すものが多く、両者間に差があった。また結節性硬化症では doublecortin 陽性の異常巨細胞が局所性皮質異形成より多い傾向があった。しかしいずれのマーカーについても症例・病変により発現レベルのばらつきが大きく、個々の症例の確実な診断は不可能だった。

A. 研究目的

結節性硬化症（TS）の皮質結節と局所性皮質異形成（FCD）の両者は局在関連性でんかの焦点となる。TS と FCD は組織病理学的にも皮質層構造の乱れ、異常巨細胞の存在など共通の特徴を有するため、その異同がしばしば議論の対象となる。われわれは免疫病理学的手法による両者の明瞭な鑑別を目的として、TS の原因遺伝子の産物 hamartin、tuberin および移動中の神経細胞のマーカーである doublecortin の発現が TS と FCD でどう違うかを、免疫染色と Western ブロッキングにより検討した。

B. 研究方法

TS の 8 症例（年齢 0-31 歳）、FCD grade II（Palmini 分類）の 5 症例（年齢 2-23 歳）、grade III の 8 症例（年齢 0-33 歳）を対象とした。手術ないし剖検で採取された大脳皮質病変の組織をホルマリン固定、パラフィン包埋標本とし、自家作製した hamartin、tuberin、および doublecortin に対する家兎ポリクローナル抗体を用い、biotin-streptavidin-peroxidase 法で免疫染色した。一部の症例では凍結保存組織を用い、同じ抗体を使って Western ブロッキングを行った。

C. 研究結果

Hamartin、tuberin 免疫染色の結果、TS では正常サイズの神経細胞、グリア細胞の免疫反応性が低下してい

た。異常巨細胞はより強い染色性を示したが、強陽性のものは少なかった。一方、FCD における正常サイズの神経細胞、グリア細胞の免疫反応性は対照例と同等であった。また FCD の異常巨細胞には tuberin 強陽性のものが多かった。Western ブロッキングでも TS 病変には hamartin、tuberin 発現レベルの低下したものが多く、FCD 病変では正常に保たれていた。しかし TS の中でも症例・病変により発現レベルのばらつきが大きく、免疫染色のみで個々の症例につき、TS と FCD を確実に鑑別することは困難だった。

つぎに doublecortin 発現を免疫染色で検討した結果、TS では doublecortin 陽性の巨細胞が FCD より多い傾向があった。しかし TS でも組織学的構築異常の乏しい病変では陽性細胞数が少なく、逆に FCD（grade III）で組織学的異常の強い例は陽性細胞が多いなど、例外もあり、免疫染色のみで TS か FCD かを確実に診断できなかった。

D. 考 察

TS は hamartin をコードする TSC1 遺伝子、ないし tuberin をコードする TSC2 遺伝子の変異に起因する。変異の種類は多彩であるが、その一部は hamartin または tuberin の蛋白質量の減少を招く。さらに hamartin、tuberin は分子間の相互作用により互いの安定性に寄与している可能性が指摘されており、事実、多くの TS 症例の脳において両蛋白が同時に減少していることは、われわれの従来の研究により証明されている。これに対し FCD 症例のほとんどでは TSC1、TSC2 遺伝子の変異はない

め、hamartin、tuberinの蛋白量は減少しないものと予想された。いっぽうTSでは皮質のみでなく上皮下、白質にも病変を生じやすいなど、FCDに比し神経細胞移動異常がより顕著に現れている。Doublecortinは移動中の神経細胞に局在する胎児脳に特異的な抗原であり、その発現の異常はFCDに比しTSにおいてより高度となりやすいことが予想された。

TSとFCDを群全体として比較した場合、今回の研究の結果はこれらの予想に合致するものだった。しかしhamartin、tuberin、doublecortinのいずれについても症例間、病変間のばらつきが大きく、個々の症例の免疫組織学的所見のみにもとづいてTSとFCDを確実に識別することはできなかった。その原因としてTSにおいてはTSC1、TSC2遺伝子変異が多彩なこと、FCDにおいては病因が雑多であることが考えられた。

E. 結 論

TS皮質結節では、FCD皮質病変に比しhamartin、tuberin発現が低下しやすく、巨細胞のdoublecortin免疫反応性が強い傾向がある。しかし免疫染色所見のみでTSとFCDを鑑別することは不可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Becker, A. J., Lobach, M., Klein, H., Normann, S., Nothen, M. M., von Deimling, A., Mizuguchi, M., Elger, C. E., Schramm, J., Wiestler, O. D., Blumcke, I.: Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in gangliogliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27(2):105-114, 2001.
- 2) 高石康子、橋本清、藤野修、新井信隆、水口雅、前原健寿、清水弘之：病理組織所見およびhamartin、tuberin発現の免疫組織化学的検索より結節性硬化症と診断した難治性てんかんの1例。脳と発達 34(1): 49-54, 2002.
- 3) 水口雅：原因遺伝子の発見とその意義—結節性硬化症—。有馬正高、太田昌孝（編）発達障害医学の進歩13、診断と治療社、p. 77-84, 2001.
- 4) Mizuguchi, M., Takashima, S.: Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev.* 23(7):508-515, 2001.

2. 学会発表

- 1) 水口雅、高嶋幸男：小児神経疾患の画像と病理。

第42回日本神経病理学会総会、東京、2001年5月26日。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

ヒト結節性硬化症モデルの癌性化境遇の解明

分担研究者 樋野 興夫 財団法人癌研究会癌研究所実験病理部部長

研究要旨

ヒト結節性硬化症の疾患モデルを用いて研究を進めている。特定の変異を遺伝子型 (genotype) に持つ疾患モデルの表現型 (phenotype) に実験処置を加えてその演出型 (dramatype) の発現メカニズムを解析することは、ヒトの病気の予防・治療法の開発につながるものと考えられる。ゲノム時代においてヒトの病気の架橋である疾患モデルを用いた研究は、人類の福祉に貢献するとともに、生命そのものに対する理解をも深めてくれるものと考えられる。具体的に、今回、ヒト結節性硬化症遺伝子 (Tsc2) mutant mice (遺伝子型) の腎腫瘍発生 (表現型) の抑制・予防 (演出型) に成功した。これは、難病であるヒト遺伝性疾患の予防・治療法に資する知見を提示するものである。

A. 研究目的

「癌は開いた扇の様である」。つまり、小さく始まって着実に広がって行く。しかし、It's not automatic, It is a process, It takes timeである (発癌の3箇条)。故に、遺伝性癌といえども、予防、治療の介入が出来る。ゲノム時代の発癌研究は、「始まり (起始遺伝子) を起点として、多段階発癌の方向を定め、臨床癌を意味づけ、予防、治療を予告する」ことであると考えられる。その目的は、『癌の原因論』を明確にし、『癌の制御』の根拠を示し、『癌の進展阻止』の実際を示すことであり、当面する最大の目標の一つは、『ある年齢以前の癌死をなくす』ことであろう。「遺伝性癌」でも「単因子病でありながら多因子病」の特徴を持つ。起始遺伝子を起点とした多段階発癌研究を展開し、「段階を越える原理」の解明を目指す。

本研究では、具体的には、起始遺伝子に変異を持つ、遺伝学的にリファインされたユニークな疾患モデルを用いることによってヒト結節性硬化症発生機構解明および治療に資する知見を得ようとするものである。

B. 研究方法

Tsc2 knockout mice (ヘテロ接合体) (Cancer Res., 59:1206-1211, 1999) と IFN γ -transgenic mice (ヘミ接合体) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:614-618, 1994) を交配した。生後8-12ヵ月観察した。

C. 研究結果

IFN γ -(+) vs IFN γ -(-) : 0/9 vs 15/15で肉眼的および顕微鏡的に腎腫瘍の発生の抑制が、IFN γ (+) mice で確認された。

D. 考察

癌化の起始細胞の進展には、境遇が大切である (癌性化境遇)。「リスクがある」と「病気である」とは違う。「遺伝子型 (genotype)」&「表現型 (phenotype)」に、さらに「変えられる、いじれる表現型・演出型 (dramatype)」の概念を導入することによって、難病である遺伝性のヒト結節性硬化症の予防・治療戦略の展望が、具体的に開けたものと考えられる。

E. 結論

「遺伝子型 (genotype)」、「表現型 (phenotype)」、「演出型 (dramatype)」の観点に立脚し独自に「起始遺伝子」を提唱し「起始遺伝子であるTSC gene」変異を起点とした癌性化境遇の解明をめざした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 樋野興夫、百瀬修三：Phacomatosis。

- 医学のあゆみ 197:1148-1152, 2001
2. 植野興夫、沖本一夫:腎癌モデル - Eker Rat & Nihon Rat-, 病理と臨床 19:1245-1250, 2001
 3. 植野興夫、福田智一:腎癌の動物モデル (Eker) - ポストゲノム時代への視座: 遺伝子型、表現型、演出型 -。Annual Review 腎臓 207-213, 2001
 4. 植野興夫: ポストゲノム時代への視座 - 遺伝性癌に学ぶ -。家族性腫瘍 1: 6-8, 2001
 5. 植野興夫: 日米がんセミナー (母斑症) (ボストン) に出席して: 母斑症の温故知新。家族性腫瘍 1: 40-41, 2001
 6. 植野興夫: エカーラット (Eker rat) を用いた腎癌発症の初期過程の解析 - 遺伝子型 (genotype)、表現型 (phenotype)、演出型 (dramatype) -。環境と健康 14: 40-48, 2001
 7. 植野興夫: 癌の臓器特異性。Molecular Medicine 39: 92-95, 2002
 8. Hino, O., Majima, S., Kobayashi, T., Honda, S., Momose, S., Kikuchi, Y. and Mitani, H.: Multistep-renalcarcinogenesis as gene expression disease in tumor suppressor TSC2 gene mutant model-genotype, phenotype and environment. Mutation Res. 477: 155-164, 2001.
 9. Kobayashi, T., Minowa, O., Sugitani, Y., Takai, S., Mitani, H., Kobayashi, E., Noda, T. and Hino, O.: A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 8762-8767, 2001.
 10. Okamoto, T., Momose, S. and Hino, O.: Suppression of cytochrome P450 1A1 and 4A1 gene expression in renal carcinomas of TSC2 gene mutant (Eker) rats. Int. J. Oncology, 18: 147-149, 2001.
 11. Maruyama, H., Oobayashi, C., Hino, O., Tsutsumi, M. and Konishi, Y.: Pathogenesis of multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia and lymphangioliomyomatosis in tuberous sclerosis and association with tuberous sclerosis genes TSC 1 and TSC 2. Pathology International 51: 585-594, 2001.
 12. Maruyama, H., Seyama, K., Sobajima, J., Kitamura, K., Sobajima, T., Fukuda, T., Hamada, K., Tsutsumi, M., Hino, O. and Konishi, Y.: Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia and lymphangiomyomatosis in tuberous sclerosis with a TSC 2. Mode. Pathol. 14: 609-614, 2001.
 13. Wataya-kaneda, M., Kaneda, Y., Hino, O., Adachi, H., Hirayama, Y., Seyama, K., Satou, T. and Yoshikawa, K.: Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. Arch. Dermatol. Res. 293: 460-469, 2001.
 14. Sato, T., Seyama, K., Fujii, H., Maruyama, H., Iwakami, S., Fukuchi, Y. and Hino, O.: Mutation analysis of the TSC 1 and TSC 2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangioliomyomatosis. J. Human genetics, 47: 20-28, 2002.
 15. Hino, O., Kobayashi, T. and Mitani, H.: Prevention of hereditary carcinogenesis. Proc. Japan. Acad. 78(B): 30-32, 2002.
 16. Hino, O., Mitani, H. and Sakurai, J.: "2nd hit" of Tsc 2 gene in radiation induced renal tumors of Eker rat model. (International Symposium on Radiation and Homeostasis: Ed. Sugawara T.) (in press).
2. 学会発表
省略
- G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

結節性硬化症の原因蛋白質ハマルチンと結合する蛋白質群の同定と解析

研究協力者 大野 耕 策

鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経小児科部門教授

研究要旨

結節性硬化症は神経細胞の部分的分化異常と脳・腎臓など特定臓器の腫瘍化を特徴とする。単離された2つの原因遺伝子には直接この異常に結びつく機能が存在するか明かではなく、むしろ結節性硬化症の原因遺伝子産物の消失によって、これらの蛋白質と結合する蛋白質の機能が異常になるのではないかと考えた。この仮説に基づき、TSC1遺伝子ハマルチンと結合する分子をyeast two hybrid法でスクリーニングを行い、ハマルチンが神経細胞の分化と細胞死に関与するNADE (p75NTR associated cell death executor) と細胞周期進行に関与するMAT1 (ménage a trios) と、yeastおよび哺乳類の細胞内で結合することを明らかにした。今後、神経細胞の分化および細胞腫瘍化過程でのハマルチンとこれらの蛋白質の相互作用を明らかにしていく。

A. 研究目的

結節性硬化症は神経細胞が分化する時期の異常による大脳の結節の形成とそれに伴うてんかんの発症と知的障害の重症度が患者QOLを左右し、さらに、年長になってからの脳腫瘍、腎の血管平滑筋脂肪腫、肺のリンパ血管腫による肺嚢胞の形成などが患者の子後に左右する。結節性硬化症の2つの原因遺伝子が単離され、モデルラットと分子レベルでの解析が進んでいる。我々は患者病変部細胞の解析で、細胞が大型化し、細胞質分裂に異常があり、S期が増加することを見いだした。また、神経系のPC1細胞は神経成長因子NGFの刺激による神経細胞の分化に伴って、ハマルチンが核内から細胞質に移行することを見いだした。しかしハマルチンには核移行のシグナルはなく、細胞内のハマルチンと結合してその核-細胞質間の移行に関係するcofactorが存在すると考えた。ハマルチンと結合して働く蛋白質群を同定し、神経細胞分化異常と腫瘍化の背景を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

TSC1遺伝子のcoiled-coiledドメインをベイトに、この領域に結合する分子をyeast two hybrid法により、ヒト胎盤cDNAライブラリーおよびヒト脳cDNAライブ

ラリーからスクリーニングした。両方のcDNAライブラリーの中で結合することが示唆された分子の中から、興味ある分子を選択した。その分子について、抗体を用いて、免疫組織化学的にハマルチンとの局在部位、免疫沈降法とウエスタンブロット法によって蛋白質レベルでの結合を検討した。

C. 研究結果

1) Yeast Two Hybrid 法によって、結合が確認された分子。ヒト胎盤cDNAライブラリーおよびヒト脳cDNAライブラリーの両方で、ハマルチンのcoiled-coiled domainと結合する分子群の中から、p75NTR associated cell death executor (NADE) とmenage a trios 1 (MAT1) に注目した。TNF受容体ファミリーに属するp75NTRは神経成長因子NGFが結語することで神経細胞の死と生存を制御している。NADEはこのp75NTRの細胞死を誘導するdomainに結合し、NGFによる神経細胞のアポトーシスを誘導する分子として同定された。また、核外移行シグナルを持つことから、我々が観察したNGFによる神経細胞分化に伴うハマルチンの核外移行と関係している可能性があると考え、この分子との結合をさらに検討することとした。MAT1はサイクリン依存性キナーゼCDK7とサイクリンHとともにCDK活性化キナーゼのサブユニットを構成し、