

た。各症例の調査票における年齢、疾患分類、偽関節の形態、手術歴、短縮、変形、および最終手術成績について検討を加えた。また術後の状態および合併症について検討した。その結果から症例に応じた適切な治療法について考察した。

## 結果

対象症例は、手術例が 69 名であり、男児 42 名、女児 27 名であった。治療開始時年齢は 0 から 16 歳、平均  $4 \pm 4$  歳（平均±標準偏差）であった。手術回数は合計で 124 件の手術が行われた。これは 1 症例あたり、1 回から 6 回の手術回数であり、平均  $2 \pm 1$  回（平均±標準偏差）であった。35 名は 3 回以上の手術を受けた。原因疾患としては、手術を行った全症例 69 例中、73% に神経皮膚症候群 1 型を伴っていた。線維性異形成症の合併は 14% であった。Boyd の分類では、I 型は 9%、II 型は 52%、III 型は 9%、IV 型は 23%、V 型は 7%、VI 型は 0%、であった。

Boyd 分類別による治療成績を検討すると、骨癒合したのは、I 型は 75%、II 型は 45%、III 型は 75%、IV 型は 86%、V 型は 100% であった。遷延治癒は II 型に 23% あった。骨癒合なしは、I 型は 25%、II 型は 32%、III 型は 25%、IV 型は 14%、V 型は 0% であった。

治療法はイリザロフ法単独が 33%、血管柄付き骨移植が 32% に、イリザロフ法と血管柄付き骨移植の併用が 10% に、髄内釘と遊離骨移植の併用が 8% に、プレートと骨移植が 7% に行われた。骨癒合率は、イリザロフ法単独では 84%、血管柄付き骨移植は 74%、イリザロフ法と血管柄付き骨移植の併用では 86%、髄内釘では 35%、プレートでは 60% であった。骨癒合不全は、血管柄付き骨移植で 14%、髄内釘で 50% であった。

各方法における術後の問題点を列举すると、イリザロフ法では再骨折が 4 名、短縮が 4 名で 2 cm から 7 cm 平均 3.8 cm であった。変形は 2 名に遺残し、遷延治癒は 2 名であった。血管柄付き骨移植は骨癒合不全が 3 名、遷延治癒が 1 名、変形が 8 名、短縮の遺残が 6 名、で 2 cm から 14 cm で平均 6.8 cm であった。再骨折は 2 名にあり、採骨部の変形は 1 名にあった。イリザロフ法と血管柄付き骨移植の併用は、再骨折が 1 名、短縮が 3 名で 1 cm から 3 cm で平均 2.1 cm であった。髄内釘と遊離骨移植では、骨癒合不全が 3 名、骨髄炎が 2 名、再骨折が 1 名、抜釘不可が 1 名、変形が 1 名であった。プレートと遊離骨移植の併用では、短縮が 3 名で 2 cm から 6 cm、平均 3.8 cm であった。変形は 1 名、再骨折は 2 名にあった。

## 考察

イリザロフ法と血管柄付き骨移植は骨癒合率が高く、治療後の問題が少なかった。変形や短縮が著しい症例では、イリザロフ法が優れた成績を収めた。イリザロフ法はリング型の創外固定器を用いる方法であり、ロシアのイリザロフによって創始された方法である。骨に複数本の径 1.5 mm ないしは 1.8 mm の鋼線を刺入し、骨を固定する。プレートのように骨膜を剥離する必要が無く、髄内釘のように骨髄を搔爬することもない、非常に低侵襲な固定法といえる。荷重歩行時には鋼線の適度なしなりが骨再生部分の適度の骨軸方向のマイクロモーションを惹起し、骨形成を促進するという。またイリザロフは distraction osteogenesis という技術を提唱し、新生した幼弱な骨に牽引力を作用させることで、骨を多量に延長・形成させる方法を普及させた。この方法は骨形成を促進・維持することができるばかりでなく、骨内の血管形成

および骨周囲の血管形成をも促進する。この血管形促進は、本症の骨癒合にも促進的に作用し有益であるとされる。

distraction osteogenesis によって多量の骨欠損を補填することが可能になったため、初めて偽関節切除の広範な切除が可能となり、十分に健全な骨の部分で骨接合が可能となった。この技術が導入されるまでは、偽関節部は温存するしかなく、骨癒合率が極めて低かった。特に神経皮膚症候群Ⅰ型に合併率の高い Boyd のⅡ型の骨癒合率は著しく低かった。本調査においても、Ⅱ型は骨癒合率が低い傾向にあったが、イリザロフ法を用いた症例においては特にそのような傾向が無かった。

イリザロフ法の欠点は、創外固定器を使用することと、その装着期間が長期に及ぶことである。創外固定器は年少児には用いにくく、まれには2歳程度の年少児にも使用されるが治療には困難が伴い、普通は5～6歳以降の小児に適応される。治療中は歩行が奨励され、シャワー浴も可能である。両親の治療に対する理解と協力が不可欠であるが、最近では比較的短期間の入院ですむようになり、また主に通院で治療が可能になっている。

血管柄付き骨移植は骨癒合率が高く、再骨折が少なかったが、変形や短縮が無視できない程度に遺残した。イリザロフ法と血管柄付き骨移植の併用は両者の長所を生かせ、治療成績は最も良好であった。ただし血管吻合やイリザロフ法の両者の治療技術を必要とし、必ずしも一般的に広く普及できる治療ではないところに限界があると考えられる。

血管柄付き骨移植では採骨部に変形が生ずることが危惧される。幸いにも本調査では腓骨採骨部の外反変形が1例のみに見られたにすぎなかった。しかし、この点については変形が生じうる可能性

が諸家の報告によってなされている。

治療後の再骨折も問題である。本調査でも治療法によらず、再骨折が生じた。偽関節治療部分の固定期間、治療後の補助固定などには十分留意する必要があると示唆された。再骨折を起こすと、治療も再度反復する必要があるが生ずる。われわれの症例でも再骨折を一例経験しているが、再骨折も保存的治療に反応しない。したがって観血的に治療する必要があるが生じる。これは手術回数の増加に関与したと考えられる。

手術回数は多数回を必要とした。平均回数としては2回程度であったが、3回以上の回数を必要としたものが35名に上ったことは無視できない。本症の重傷度もまちまちであるが、おそらくは神経皮膚症候群Ⅰ型に好発する BoydⅡ型または Andersen の dysplastic type においては、治療が難渋し、多数回の手術を必要としたものと推測される。治療が遷延することで、骨萎縮が重度となり固定性が失われ、骨癒合にはさらに不利に働く。また骨接合部の先細りも再発・増悪する傾向が生ずる。このような状況は治療が遷延するほど増悪し、悪循環に陥るので注意を要する。十分に周到な準備の下に治療法・治療計画を立てる必要がある。

本調査でも、従来から行われている髄内釘やプレートを用いた方法は骨癒合率が低く、また合併症も多く、これらの方法を用いることはもはや容認し難い、と断言しても過言ではない。これは骨癒合部分に比較的大きな侵襲を加えることが原因している。また骨切除も十分できず、骨形成・骨癒合に不利である。通常の骨折の場合にはこれらの骨接合術はむしろ第一選択として用いられるが、本症ではむしろ禁忌といえる。安易にこのような方法をとることは、かえって後の治療条件を悪く

し、治療に難渋する新たな原因を作る。したがってイリザロフ法や血管柄付き骨移植などの技術・経験のない施設において本症の治療は行うべきではないと結論づけられる。今後は本症に対する治療が十分可能な施設について情報公開し、患者が適切な治療を受けられる環境を作ることも検討課題となる。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性

分担研究者 吉田 純 名古屋大学大学院医学系研究科教授

**研究要旨**

本研究は、神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性を探るため、NF2 患者に発生する聴神経腫瘍（シュワン細胞腫）細胞へ遺伝子導入を試みた。遺伝子導入法としては、我々が以前より開発研究を進めている遺伝子治療用リポソームを中心に検討した。すなわちリポソームに EGFP、LacZ 等のマーカー遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を包埋し、患者検体より誘導した初代培養細胞（シュワン細胞腫細胞）に遺伝子導入を行った。その結果、初代培養細胞で遺伝子発現が観察できた。一方、マーカー遺伝子をアデノウイルスに組み込んだアデノウイルスベクターと小型の1枚膜リポソームの複合体や、マーカー遺伝子をアデノ随伴ウイルスに組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを包埋した多重膜リポソーム（これらをハイブリッドベクターと呼ぶ）を使用することで、遺伝子発現効率は飛躍的に向上した。このことは、上記のハイブリッドベクターが神経皮膚症候群に対する分子治療を行う際の有望なマテリアルになることを示唆するものと考えられた。

**A. 研究目的**

リポソームは病原性がなく、抗原性も低いことから分子治療を行う際の遺伝子あるいはその他のマテリアルの運び屋、すなわちベクターとして有望視されている。一方、神経皮膚症候群に合併する様々な腫瘍に対する治療法はまだ確立されておらず、早期に新規治療法の開発が求められている。遺伝子治療をはじめとする分子医療は、新規治療の候補に挙げられている。そこで本研究では、神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性を探るため、NF2 患者に発生する聴神経腫瘍細胞へ遺伝子導入を試みた。ベクターには、カチオン性リポソームを用いた。また、遺伝子発現効率を高めるため、アデ

ノウイルスベクターとカチオン性リポソームの複合体や、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターを考案し、合わせて遺伝子発現効率を検討した。

**B. 研究方法**

1. カチオン性リポソームの調製

カチオン性リポソームとしては、我々が開発した N-( $\alpha$ -trimethylammonio) - acetyl-didodecyl glutamate chloride (TMAG)、dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC)、dioleoyl-phosphatidyl ethanolamine (DOPE)をモル比 1:2:2 で混合し、調製したものを使用した。このリポソームは

すでに悪性脳腫瘍の患者に投与され、臨床で安全性と有効性が確認されている。

## 2. アデノウイルスベクターの調製

アデノウイルスベクターは、組換え型アデノウイルスベクターを 293 細胞に感染して増殖させた後、セシウム密度勾配法を用いて分離精製した。

## 3. アデノ随伴ウイルスベクターの調製

アデノ随伴ウイルスベクターは、アデノウイルスフリーシステムで調製した。従来アデノ随伴ウイルスベクターの調製にはヘルパーウイルスとして野生型アデノウイルスが必要とされた。このため、アデノ随伴ウイルスベクター純化の際にアデノウイルスのコンタミネーションが避けられなかったが、我々は米国 Avigen 社の協力を得てアデノ随伴ウイルスベクターのコンタミネーションのないアデノ随伴ウイルスベクターの調製法を確立した。これはヘルパーウイルスとなるアデノウイルスの構成成分のうちの E2A、E4、VARNAS を発現させるプラスミドを構築し、このプラスミドをアデノウイルスの代わりに用いたシステムである。

## 4. ハイブリッドベクターの調製

アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混合した複合体と、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターをそれぞれ調製した。

## 5. 遺伝子発現

上記のベクターを NF2 患者のシュワン細胞腫より分離した初代培養細胞に添加した後、EGFP あるいは LacZ 遺伝子の発現をもって遺伝子発現効率を評価した。

# C. 研究結果

## 1. 導入遺伝子の発現

マーカー遺伝子包埋リポソーム、アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混合したハイブリッドベクター（複合体）、及びアデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクターの 3 種類のベクターを調製し、その発現を *in vitro* で検討した。その結果、NF2

の患者のシュワン細胞腫より分離した初代培養シュワン細胞で導入遺伝子の発現を確認した。発現効率は、アデノウイルスベクターとカチオン性リポソームを混合したハイブリッドベクター（複合体）が最も高く、次いでアデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋したハイブリッドベクター、プラスミド遺伝子包埋リポソームの順であった(図 1)。

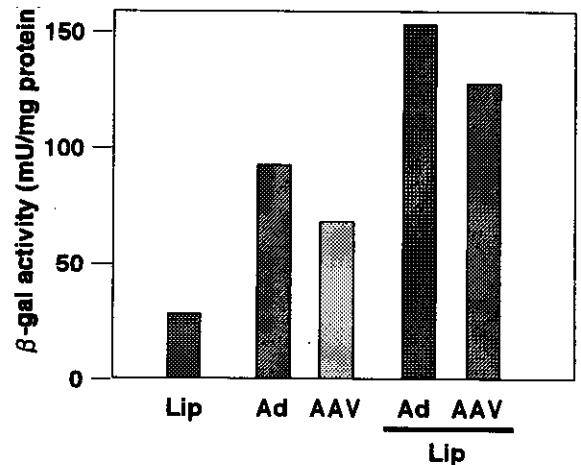


図 1 ハイブリッドベクターのシュワン細胞腫初代培養細胞における遺伝子発現  
Lip: Liposome、Ad: adenovirus vector、AAV: adeno-associated virus vector

## 2. 各種ベクターの特徴

アデノウイルスベクターは、一般に遺伝子発現効率が高いが、免疫原性が高く、これが臨床応用の際の問題になっていた。このアデノウイルスベクターをカチオン性リポソームと混合してハイブリッド化することで、免疫原性が低下することがわかった。

一方、アデノ随伴ウイルスベクターは、生物学的活性を示すウイルス粒子の数が、調製されたウイルス粒子の 1/100-1/1,000 である。この欠点が、アデノ随伴ウイルスベクターをカチオン性リポソームに包埋することで軽減できることがわかった。

## D. 考察

非ウイルスベクターの代表であるリポソームと各種ウイルスベクターを用いてハイブリッドベクターを調製することは、それぞれのウイルスベクターのもつ欠点を補う、またはそれを軽減できる有用な方法であることが証明できた。また、いずれのベクターでも、初代培養のシュワン細胞腫に対し遺伝子導入ならびに発現が確認できたことは、当該システムが、神経皮膚症候群に対する分子医療の開発に十分役立つと考えられた。

## E. 結論

当該システムが、神経皮膚症候群に対する分子治療の開発に十分役立つと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

1. Yoshida J. Basic and Clinical Studies of Cancer Gene Therapy in Central Nervous System. The International Symposium on Drug Delivery to the Central Nervous System: Bridging the Gap between Fundamental and Applied Science (ISDDC). (2003 Jan. 29-31, Tokyo)
2. 水野正明、斉藤 清、吉田 純 神経皮膚症候群に対する分子治療の可能性 厚生労働省班研究 (平成 14 年 12 月 20 日、福岡)
3. 吉田 純 ベクター・コアバンクにおけるリポソームの位置づけ 文部科学省 科学技術振興調整費 知的基盤整備推進 シンポジウム (平成 14 年 11 月 15, 16 日、つくば)
4. 水野正明、吉田 純 メラノーマの遺伝子治療の新しい展開 第 40 回日本癌治療学会総会 (平成 14 年 10 月 16-18 日、東京)
5. 水野正明、斉藤 竜太、波多野 学、吉田

純 悪性グリオーマに対するヒト  $\beta$  型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第 61 回日本癌学会 (平成 14 年 10 月 1-3 日、東京)

7. 水野正明、斉藤 竜太、波多野 学、吉田 純 悪性グリオーマに対するヒト  $\beta$  型インターフェロン遺伝子治療の新しい展開 第 61 回日本脳神経外科学会総会 (平成 14 年 10 月 2-4 日、松本)
  8. Yoshida J, Mizuno M, Kajita Y, Fujii M, Wakabayashi T. Human beta-interferon gene therapy for malignant glioma: clinical trials. The Japan Society of Gene Therapy's 8<sup>th</sup> Annual Meeting. (2002, July 18-20, Tokyo).
  9. Mizuno M, Saito R, Hatano M, Yoshida J. Interferon- $\beta$  gene therapy for human glioma cells by heat-inducible adeno-associated virus vectors and low-temperature hyperthermia. The American Society of Gene Therapy's 5<sup>th</sup> Annual Meeting. (2002, June 5-9, Boston, USA).
- ### 2. 論文発表
1. Fukuhara H, Yamamoto N, Hayashi Y, Fukui T, Nishikawa M, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell line. Oral Oncol, in press.
  2. Nakanishi H, Mizutani Y, Kawachi A, Ukimura O, Shiraishi T, Hatano M, Mizuno M, Yoshida J, Miki T. Significant antitumoral activity of cationic liposomes containing human interferon- $\beta$  gene against human renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res, in press
  3. Ryuke Y, Mizuno M, Natsume A, Suzuki O, Nobayashi M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Growth inhibition

- of subcutaneous mouse melanoma and induction of natural killer cells by liposome-mediated interferon-beta gene therapy. *Melanoma Res*, in press
4. Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N and Colosi P. Antitumor effect of an experimental intracranial human glioma by adeno-associated virus vector containing the human interferon- $\beta$  gene. *Jpn J Cancer Res*, 93: 223-228, 2002
  5. Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, Nagatani N, Mizuno M, Yoshida J, Kadomatsu K, Muramatsu H, Nakao A, Muramatsu T. Reduction of  $\alpha$ -galactosyl xenoantigen by expression of endo- $\beta$ -galactosidase C in pig endothelial cells. *Xeno-transplantation* 9: 290-296, 2002.
  6. Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse subcutaneous glioma model. *Cancer Gene Ther*, 9: 825-829, 2002
  7. Nobayashi M, Mizuno M, Kageshita T, Matsumoto K, Saida T, Yoshida J. Repeated cationic liposome-mediated gene transfer enhanced transduction efficiency against murine melanoma cell lines. *Journal of Dermatological Science*. 29:206-213, 2002

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

分担研究者 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**

結節性硬化症の2つの原因遺伝子は腫瘍抑制遺伝子と考えられている。どちらの遺伝子の欠陥でもほぼ同じ症状を出す背景には、2つの蛋白質は別の蛋白質を含む機能蛋白質複合体として働いている可能性が高い。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、神経細胞の分化と細胞死に関与する NADE (p75NTR associated cell death excutor) と細胞周期進行に関与する MAT1 (méage a trios) と yeast および哺乳細胞内で結合することを明らかにした。内因性の MAT1 と hamartin が結合し、hamartin は MAT1 とは結合するが cyclin-dependent kinase Activating kinase (CAK) サブユニットと結合しないことを見出し、hamartin が細胞周期進行と関係する CAK の活性を制御している可能性が示唆された。この機能の異常が過誤腫形成と関係している可能性があると考えている。

**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、肺のリンパ血管腫症による肺嚢胞の形成などが患者の予後に左右する。結節性硬化症の治療法を開発するためには、大脳神経細胞の分化異常の背景と、分化異常をおこした細胞の特性とその制御、過誤腫発生機構雄解明を目指す必要がある。本班の金田らや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ている。この異常がどのような機構でおこっているか明らかにする目的で、昨年 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、神経細胞の分化と細胞死に関与する NADE (p75NTR associated cell death excutor) と細胞周期進行に関与する MAT1 (méage a trios) と yeast および哺乳細胞内で結合することを明らかにした。MAT1 は cyclin-dependent kinase activating kinase (CAK) サブユニットと結合し、細胞周期進行に関与すると考えられている。hamartin は MAT1 と結合し、どのように細胞周期進行にどのような



役割を果たしているのかを明らかにする目的で、MAT1 と cyclin-dependent kinase activating kinase(CAK)サブユニットの結合について検討した。

## 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、その中で、MAT1 (méage a trios)に注目し、昨年度、N末に GFP を tagging した MAT1 と hamartin 抗体を用いて、COS7 では MAT1 は主に核と細胞質にドット状に存在し、細胞質ではハマルチンの局在と一致することを明らかにした。

今年度、内在性の MAT1 と hamartin が HEK293T 細胞と結合するかどうか？ また、hamartin が、cyclin-dependent kinase activating kinase(CAK)サブユニットの Cdk7、cyclin H と結合するかどうか検討した。

## C. 研究結果

HEK293 細胞での内在性 MAT1 と hamartin の結合。

免疫共沈法で蛋白質の結合を検討した。HEK293 細胞から 1% IGEPAL で抽出した抗 hamartin 抗体で免疫沈降した場合も、抗 MAT1 抗体で免疫沈降した場合も、それぞれ MAT1、hamartin を検出出来なかった。そこで、クロスリンカー-DPDPB を用いて行ったところ、抗 hamartin 抗体で免疫沈降した場合も、抗 MAT1 抗体で免疫沈降した場合も、それぞれ MAT1、hamartin を検出でき、人細胞内でも hamartin と MAT1 が結合することが確認された。

Hamartin-MAT1 複合体は cyclin-dependent kinase

activating kinase(CAK)複合体の構成要素か？

Hamartin-MAT1 複合体が、CAK 複合体の構成要素かどうか知る目的で、HEK293 細胞を用いて、免疫共沈法で検討した。抗 MAT1 抗体で、Cdk7 と cyclin H が沈降された。この所見は Tassan ら(1995)の MAT1 が Cdk7-cyclin H 複合体と結合するという報告と一致している。次いで、抗 hamartin 抗体で、Cdk7 と cyclin H が沈降してくるかどうか検討したが、沈降されなかった。

## D. 考察

結節性硬化症の原因遺伝子産物は TSC1 の hamartin と TSC2 の tuberin の 2 つが存在する。結節性硬化症はこのどちらかの不活性化で発症するが、結節性硬化症の知的障害やてんかんの発症と関係する神経細胞分化異常の背景は不明であり、また、腎臓、皮膚、心臓などに発生する過誤腫の発生機構も明らかではない。

最近の研究で、tuberin と hamartin は phosphoinositide 3-kinase/Akt シグナル伝達系に関与していることが報告されている。Tuberin は Akt によってリン酸化され、tuberin または hamartin を欠失した細胞では、phosphoinositide 3-kinase/Akt シグナルの最初の標的の 1 つである S6 が恒常的にリン酸化されることが知られている。また、tuberin はリン酸化によって、核に移行することが明らかになっている。

我々は、昨年度、イーストの two-hybrid screening で、細胞周期進行と関係する MAT1 と結合する可能性に注目し、今年度、TSC1 の遺伝子産物が哺乳類細胞内でも確かに MAT1 と結合することを確認した。細胞分裂周期進行には、cyclin-dependent kinase (Cdk) 活性化リン酸化酵素(CAK)

が関与し、MAT1 はこの CAK のサブユニットの1つである。Cdk の活性は、サイクリンの結合、Cdk 阻害、蛋白質分解、局在の変化、リン酸化によって制御されている。Cdc2 の活性化には、Cdk7・サイクリン H・MAT1 の結合が関係していることが明らかになり、哺乳類細胞ではこの Cdk7・サイクリン H・MAT1 複合体が、Cdc2/cdk1、Cdk2m、Cdk3、Cdk4、Cdk6 のリン酸化と活性化に関与していると考えられている。蛋白質リン酸化酵素 CK2 によるサイクリン H のリン酸化が Cdk7・サイクリン H・MAT1 複合体の活性化に必要と考えられてきている。

哺乳類細胞での Cdk7・サイクリン H・MAT1 の制御機構は十分解っていない。我々は hamartin は、Cdk7 やサイクリン H とは直接結合せず、種々の細胞で MAT1 と結合することを明らかにした。現在、hamartin は MAT1 を細胞質でつなぎ止め、Cdk7・サイクリン H・MAT1 複合体の形成を制御する、すなわち、機能的 CAK 複合体の量を調整している分子ではないかと考えて、研究を進めている。

結節性硬化症の TSC1 変異の場合、hamartin-MAT1 複合体の形成ができなくなり、MAT1 の CAK 複合体への結合を増加させ、CAK の活性を上昇させることによって、S 期細胞の増加と異常な細胞増殖をおこすのではないかと考えている。

一方、神経系の細胞 PC12 細胞において、p75NTR を介し、結節性硬化症原因遺伝子産物のハマルチンとツベリンが結合する可能性を得られ、さらに NADE とともに神経成長因子の刺激でこれらが増加する可能性を示すデータを得ているが、このことは神経細胞の分化にツベリン、ハマルチン、ツベリン、p75NTR、および NADE 複合体による神経分化への役割は、次年度の課題である。

## E. 結論

結節性硬化症の原因遺伝子の一つ TSC1 がコードするハマルチンは細胞周期進行に関与する cyclin-dependent kinase (Cdk) 活性化リン酸化酵素(CAK)の構成蛋白質である MAT1 に結合し、細胞周期を制御している可能性がある。

## F. 論文発表

### 1. 論文発表

1) Yamamoto T, Pipo JR, Feng JH, Takeda H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Novel TSC1 and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 24:227-30, 2002.

2) 大野耕策. 結節性硬化症 - 2つの原因遺伝子の同定とその後の展開 - 日本小児科学会雑誌 106 : 1556-1565, 2002.

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

なし

**厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書**

**結節性硬化症における細胞周期調節メカニズムの検討**

分担研究者 板見 智 大阪大学大学院医学研究科皮膚科助教授

**研究要旨**

最近、結節性硬化症の2つの原因遺伝子 TSC1, TSC2 およびこれらの遺伝子産物 hamartin, tuberin の細胞周期調節への関与が報告され、これら細胞周期調節部位として、G1/S 移行部及び、G2/M 移行部の二カ所が注目を集めている。細胞周期の調節は、細胞の増殖とも関係しており、そのメカニズムの解明は、本症の特徴である過誤腫の発生メカニズムの解明にも不可欠であると考えられる。Drosophila や Eker rat の homologue を用いた実験より、細胞周期調節のメカニズムが調べられているが、現時点ではよくわかっていない。

一方我々は、以前から本症における細胞周期の異常について研究しており、本症の細胞では、S 期細胞の増加と、G0/G1、G2/M 期細胞の減少傾向及び、アポトーシスの増加が認められる事を報告してきた。さらに、我々は、これら細胞周期の異常にサイクリン A, B, cdc2 レベルの変動が関与している可能性も報告してきた。

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培養細胞（TSC1, TSC2 細胞）を用いて、サイクリン A, B, cdc2 の本症に於ける細胞周期調節メカニズムへの関与をさらに詳しく調べるとともに、cyclin dependent kinase activating kinase や CDK inhibitors の関与についても検討を試みた。

**A. 研究目的**

結節性硬化症は全身の過誤腫を特徴とする常染色体優性遺伝性の疾患で、二つの原因遺伝子 TSC1, TSC2 の遺伝子産物 hamartin と tuberin が細胞周期の調節や細胞の増殖に関与していることがわかってきた。しかしながらそれらのメカニズムに関しては不明な点も多い。最近、細胞の増殖のメカニズムに関しては、tuberin と hamartin

の複合体が insulin signaling pathway, mammalian target of rapamycin (mTOR) -mediated downstream signaling の系を介して細胞の増殖や細胞の大きさの調節に関与していることが報告されてきた<sup>1-13)</sup>。一方細胞周期の調節には、cyclin-cdk や、CAK, cdk inhibitor が関与しており、これら細胞周期調節部位として、G1/S 移行部<sup>14-17)</sup>および、G2/M 移行部<sup>18-20)</sup>の2カ所が

注目を集めている。さらに、最近、細胞周期の調節に関して、Akt による Tuberin のリン酸化が、tuberin- hamartin complex の分解を促進すると共に、p27 の分解も促進し、S 期の増加を引き起こすとの報告もなされた<sup>11,14)</sup>。

一方我々は以前より本症における細胞周期の異常について研究しており、本症の患者病変部由来培養細胞では、S期の増加と G0/G1 期 G2/M 期の減少が認められる事、cdc2 の減少と cyclin A, cyclin B の増加が認められる事を報告してきた<sup>19,20)</sup>。今回我々は、これらに影響を与えるいくつかの cyclins, cdk, CAK, cdk inhibitor, 14-3-3 protein などのファクターの、本症における細胞周期異常への関与の有無について検討を試みることにした。

## B. 研究方法

前回と同様に、臨床的に結節性硬化症の診断基準に基づいて、結節性硬化症と確定診断でき (definite TSC)、遺伝子検査の結果その異常部位が確認できた患者病変部由来培養細胞を<sup>20)</sup>、細胞周期に関与する種々の抗体で染色し、その陽性細胞の割合を統計的に処理した。コントロールとしては、結節性硬化症を伴わないヒト由来の線維芽細胞を用いた。

倫理面への配慮：遺伝子検査に際しては、ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針、および神経皮膚症候群（母斑症）における遺伝子解析研究とこれを応用した診療に関するガイドライン（案）を遵守して、研究対象者に対する利益不利益等を説明理解の上、研究対象者の自由意志に基づいて施行した。

細胞培養法：

それぞれの患者病変部より生検にて採取した小組織片を 20% fetal calf serum 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium を用いて、5% CO<sub>2</sub> 通気下で培養し、放出した細胞を得た。これら細胞を 3 から 4 代継代培養したものを実験に用いた。

細胞染色法：

前述の方法で得た細胞を、4%パラフォルムアルデハイドもしくは 99%メタノール 1%アセテートにて固定し、cyclinA,B, cdc2, p27, cdc7, cyclinH, MAT 1 に対する抗体を一時抗体とし、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、全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陽性細胞の割合を調べて統計処理し、比較検討を行った。

データの解析：

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

今回我々が使用した細胞においても、今までに報告したのと同様の細胞周期の異常が occurring ことを確認するために、まずこれらの細胞を FACS を用いて細胞周期を調べた。その結果、以前報告したのと同様に TSC1, TSC2 いずれにおいても有意な S 期の増加と G0/G1 期の減少及び、TSC1 に著明な G2/M 期の減少が認められた (図 1)。さらに、NHF, TSC1, TSC2 それぞれの BrdU の取り込み量を比較検討した。その結果 TSC1, 2, いずれにおいても NHF 同様に 30%近い取り込みが認められ S 期における異常は認められないことが確認できた。

以前の実験より、結節性硬化症の患者由来培養細胞では、cdc2 が減少し、その結果活性型の cyclinB-cdc2 complex が減少し、結果的に細胞周期に異常をきたす可能性が示唆された<sup>20)</sup>。そこで、cyclinB-cdc2 complex の活性化に関与する種々の因子に関して検討を行った。まず、CAK について検討した。CAK は、cdc7、cyclinH 及び MAT1 からなる。そこで、それぞれについて検討した。その結果、MAT1, cdk 7 については有意差は認められなかった (図 2, 3)。

我々は、今回までの実験で、G1/S 移行に関与する cyclin A が、TSC1, TSC2 いずれにおいても有意に増加していることも報告してきた<sup>20)</sup>。そこで、cyclinA をはじめとする G1 cyclin の inhibitor である p27 についても検討した。しかしながら、TSC1, TSC2 いずれにおいても p27 陽性細胞の割合には、有意差は認められなかった (図 4, 5)。

#### D. 考察

細胞周期は G1/S, G2/M と進行し、TSC 患者由来細胞に認められるような、S 期の著明な増加がおこるためには、S 期そのもの異常、G1/S 移行の促進、あるいは、G2/M 移行の停滞が考えられる。

NHF, TSC1, TSC2 それぞれの BrdU の取り込み量を比較検討した結果、TSC1, 2 いずれにおいても NHF と同様に 30% 近い取り込みが認められ S 期における異常は認められなかった。

まず、G2/M の移行の異常の有無について検討した。M 期進行に重要な役割を果たすのは、MPF すなわち cyclinB-cdc2 complex である。通常 cdc2 の蛋白質の発現量は細胞周期を通じて一定であるが単独では作用をもたず、サイクリン B と結合す

る事によってはじめてその作用を発現する。また、我々は、cdc2 陽性細胞の割合が TSC1 TSC2 いずれにおいても有意に減少していることを報告してきた<sup>20)</sup>。そこで、この cyclinB-cdc2 complex の調節メカニズムについて検討した。cdc2 量は細胞周期を通じて一定であるが、cyclinB 量は細胞周期にしたがって変動し、S 期に出現し、G2/M 期で最大となり、その後急速に消退する。cyclinB が形成されると、cyclinB は即座に、cdc2 と complex を形成する。しかしながら、cyclinB-cdc2 complex は、そのままでは、不活性型で、T14Y15 が脱リン酸化されて T161 がリン酸化されて始めて活性型になる。これら、cyclinB-cdc2 complex の活性化には図 6 に示したように、weel, myt 1, cyclin activating kinase (CAK), cdc 25, 14-3-3 protein 等、種々の因子が関与している (図 6)。そこで、これらの活性化因子に関して検討を行った。まず、CAK について検討した。CAK は、cdc7、cyclinH 及び MAT1 からなる。そこで、それぞれについて検討した。しかしながら、MAT1, cdk 7 については有意な増減は認められなかった (図 2, 3)。

ついで、G1/S 移行について検討した。我々は既に、TSC1 TSC2 患者由来培養細胞では、cyclin A の増加が認められる事を報告してきた<sup>20)</sup>。サイクリン A は G1/S 期では cdk2 と複合体を形成して G1/S 期の進行に関与する。この cyclinA と cdk2 複合体の G1/S 期の進行促進作用は、p27 によって抑制される。最近、細胞周期の調節に関して、Akt による Tuberin のリン酸化が、tuberin-hamartin complex の分解を促進すると共に、p27 の分解も促進し、S 期の増加を引き起こすとの報告がなされた<sup>11, 14)</sup>。そこで、サイクリン A, cdk の inhibitor である p27 について検討した。その結

果、TSC1, TSC2 いずれにおいても、p27 陽性細胞の割合には、有意差は認められなかった (図5) 今回我々が検討した因子に関しては、tuberin や hamartin の細胞周期調節作用への明らかな関与は認められなかった。

現在我々は、これら因子の作用をさらに詳しく検討するために、western blotting を施行して、これらの絶対量の増減を検討するとともに、我々が以前から調べている p40 と同時に、cyclinB1-cdc2 の活性化に重要な役割を占める cdc25 や、cdc 25 や cyclinB1-cdc2 complex の核外移行に関与し、cdc 25 の cyclinB- cdc2 complex の活性化を阻害する、14-3-3 protein についても検討中である。

## E. 参考文献

1. van Slegtenhorst, M., et al., Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet*, 1998. 7(6): p. 1053-7.
2. Aicher, L. D., J. S. Campbell, and R. S. Yeung, Tuberlin phosphorylation regulates its interaction with hamartin. Two proteins involved in tuberous sclerosis. *J Biol Chem*, 2001. 276(24): p. 21017-21.
3. Hodges, A. K., et al., Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(25): p. 2899-905.
4. Nellist, M., et al., TSC2 missense mutations inhibit tuberlin phosphorylation and prevent formation of the tuberlin-hamartin complex. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(25): p. 2889-98.
5. Gao, X. and D. Pan, TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev*, 2001. 15(11): p. 1383-92.
6. Gao, X., et al., Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(9): p. 699-704.
7. Potter, C. J., H. Huang, and T. Xu, Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell*, 2001. 105(3): p. 357-68.
8. Tee, A. R., et al., Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13571-6.
9. Jaeschke, A., et al., Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositol-3-OH kinase is mTOR independent. *J Cell Biol*, 2002. 159(2): p. 217-24.
10. Manning, B. D., et al., Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 2002. 10(1): p. 151-62.
11. Dan, H. C., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberlin. *J Biol Chem*, 2002. 277(38): p. 35364-70.
12. Potter, C. J., L. G. Pedraza, and T. Xu, Akt

- regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(9): p. 658-65.
13. Inoki, K., et al., TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(9): p. 648-57.
14. Soucek, T., R.S. Yeung, and M. Hengstschlager, Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(26): p. 15653-8.
15. Miloloza, A., et al., The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(12): p. 1721-7.
16. Tapon, N., et al., The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell*, 2001. 105(3): p. 345-55.
17. Uhlmann, E.J., et al., Heterozygosity for the tuberous sclerosis complex (TSC) gene products results in increased astrocyte numbers and decreased p27-Kip1 expression in TSC2+/- cells. *Oncogene*, 2002. 21(25): p. 4050-9.
18. Ito, N. and G.M. Rubin, gigas, a *Drosophila* homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell*, 1999. 96(4): p. 529-39.
19. Wataya-Kaneda, M., et al., Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. *Arch Dermatol Res*, 2001. 293(9): p. 460-9.
20. ヒト結節性脳硬化症 TSC1, TSC2 の細胞周期調節のメカニズム. 吉川 邦彦、金田 真理、樋野興夫、足立浩幸. 厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作製に関する研究 平成13年度 研究報告書 63-70。
21. Catania, M.G., P.S. Mischel, and H.V. Vinters, Hamartin and tuberin interaction with the G2/M cyclin-dependent kinase CDK1 and its regulatory cyclins A and B. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001. 60(7): p. 711-23.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 金田真理、今井克美、平山裕子、樋野興夫、板見智、吉川邦彦. 結節性硬化症 (TSC1) の一例: 家族性腫瘍 第3巻 第1号 p48-51 2003
- 2) M. Wataya-Kaneda, K. Yoshikawa and S. Itami. "The role of tuberous sclerosis gene products, tuberin and hamartin, in cell cycle regulation and cell proliferation". *Developments in biophysics and biochemistry.* : Research Signpost in press

### The TSC genes and cell cycle control

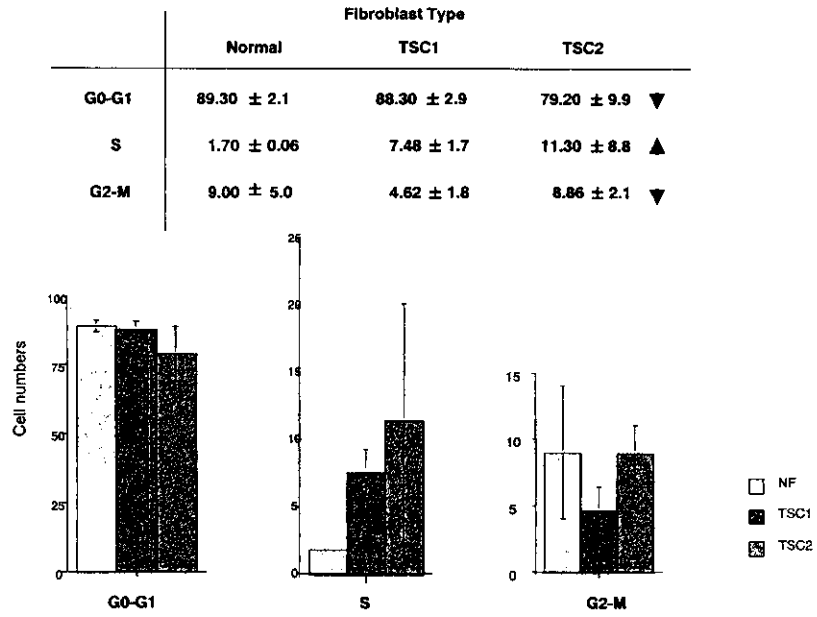


図1 結節性硬化症患者由来培養細胞の細胞周期の解析  
 結節性硬化症 TSC1,TSC2 患者病変部由来培養細胞および、コントロールヒト繊維芽細胞のファックスによる細胞周期。

### Levels of MAT 1 in TSC1 and TSC2 cells

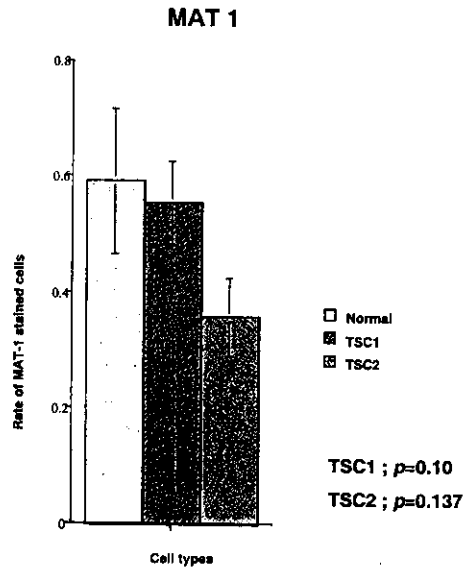


図2 結節性硬化症患者由来培養細胞における MAT1 陽性細胞の割合。  
 結節性硬化症 TSC1,TSC2 患者病変部由来培養細胞および、コントロールヒト繊維芽細胞(normal)を MAT1に対する抗体で染色し、染色陽性細胞の割合をグラフにした。



## Levels of cdk7 in TSC1 and TSC2 cells

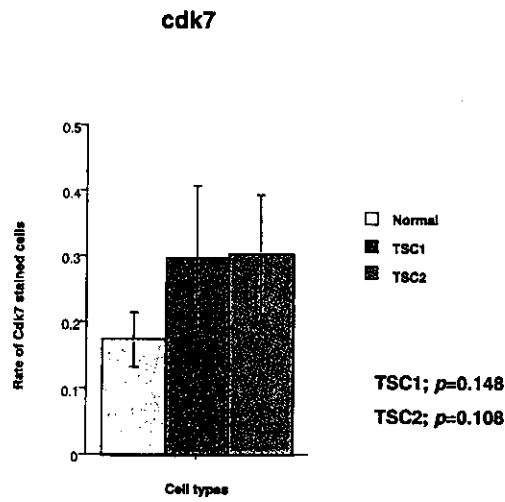


図3 結節性硬化症患者由来培養細胞における cdk 7 陽性細胞の割合。  
 結節性硬化症 TSC1,TSC2 患者病変部由来培養細胞および、コントロールヒト繊維芽細胞(normal)を cdk7に対する抗体で染色し、染色陽性細胞の割合をグラフにした

## Levels of p27 in TSC1 and TSC2 cells

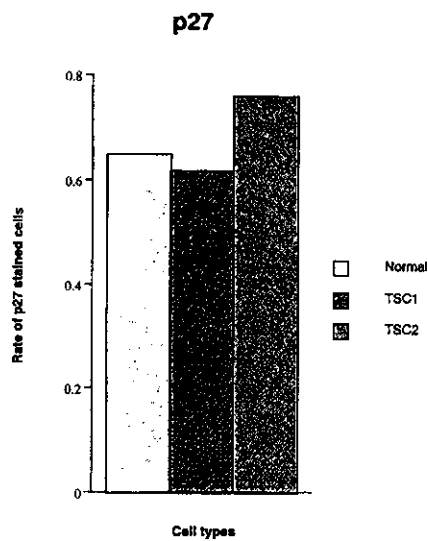


図4 結節性硬化症患者由来培養細胞におけるp27 陽性細胞の割合。  
 結節性硬化症 TSC1,TSC2 患者病変部由来培養細胞および、コントロールヒト繊維芽細胞(normal)を p27 に対する抗体で染色し、染色陽性細胞の割合をグラフにした

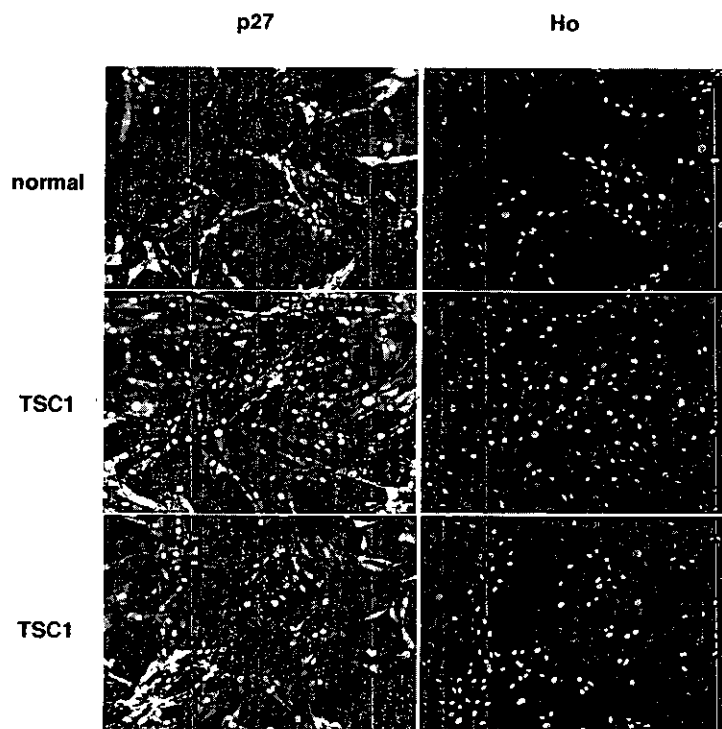


図5 結節性硬化症患者由来培養細胞における p27 染色像。

結節性硬化症 TSC1, TSC2 患者病変部由来培養細胞および、コントロールヒト繊維芽細胞(normal)を p27 に対する間接蛍光抗体法で染色し(p27)、ヘキストを用いて counterstain を行った(Ho)。s

### Regulation of CyclinB-Cdc2 (MPF)

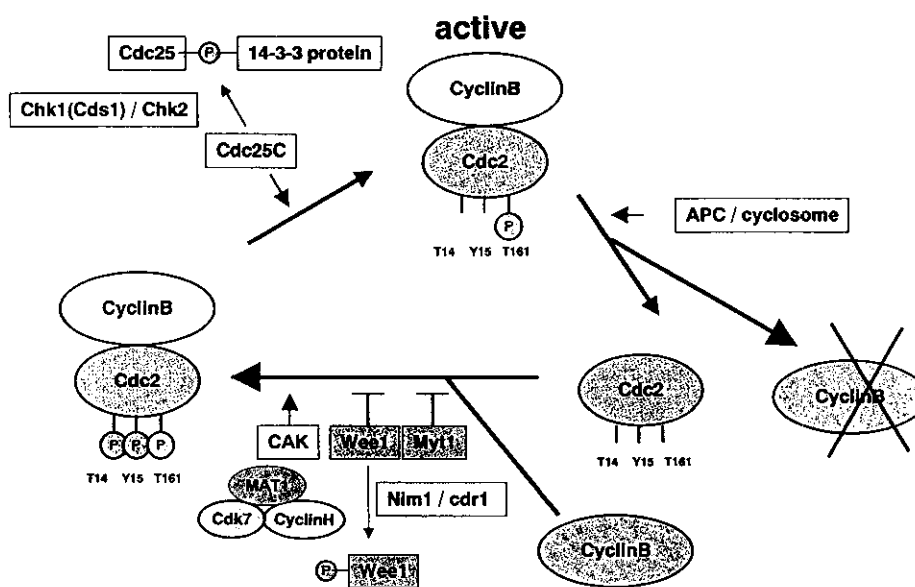


図6 cyclinB- cdc2 complex の活性化調節メカニズム。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

TSC 遺伝子機能と予防・治療戦略

分担研究者 樋野興夫 (財) 癌研究会癌研究所実験病理部部长

**研究要旨**

TSC 遺伝子変異を起点とした発がんの連盟的首位性の解明とそれに基づいたヒト結節硬化症の分子標的治療戦略の展開

**A. 研究目的**

**癌性化境遇**

「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。『初期のわずかな変異で大きな効果』が出るのである。発癌の3ヶ条を提唱している。①It's not automatic. ②It has a process. ③It takes time である。癌の予防・治療の介入が出来る根拠がここにある。癌化の起始遺伝子は『扇の要』に例えられる。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。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、『癌の発生を遅らす』ことであろう。

**癌のドラマタイプ (dramatype)**

癌化細胞は病理学的にも多段階的に成長する。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)」の概念を導入を目指す。何故なら、病気とは、『変えられる表現型』と考えるからである。

「初期条件がある範囲にあると、初期の変異が経時的変化とともに分子の相互作用によって、様々に拡大し、将来予測が不可能になる。これは初期のわずかな変異で大きな効果が出ることを意味する（発がんの連盟的首位性）。非平衡状態にあり外部と相互作用する開かれた複雑系では、初期状態が同じでも、外部から、意識的に適時に介入すれば、ある特異点で分岐し多様性のある制御が可能にな

るはずである。」

「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。

## B. 研究方法

ユニークな疾患モデルを用いることによって腎癌発生機構解明およびヒト結節性硬化症の治療に資する知見を得ようとするものである。

特定の変異を遺伝子型 (genotype) に持つ表現型 (phenotype) に処置を加えると、ドラマが演じられる。この演出型 (dramatype) 発現のメカニズムの解明は、癌の予防・治療法の開発につながる。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし

## C. 研究結果

Hamartin (TSC 1 product) と tuberin (TSC 2 product) はそれぞれのアミノ末端領域を介して直接結合し、協調して機能を発揮すると考えられている。我々は tuberin の欠失変異体を発現させたトランスジェニック・Eker ラットを利用し、生体内における tuberin の腫瘍抑制領域 (興味あることに Hamartin とは結合しない領域) を明らかにした (Human Molecular Genetics, 2002)。さらに、hamartin と tuberin がインシュリン・シグナル伝達系において機能を発揮することを報告した (Nature Cell Biology, 2002)。遺伝学的な解析からその作用点は S6 キナーゼの上流であり、且つ Akt キナーゼの下流に位置するこ

とが予測された。

TSC signalling pathway とその分子標的に基づいた治療の実際を示した (Proc. Japan Acad., 79B, 22-25, 2003)。

## D. 考察

「原因といはれる作用がどんなに強くとも、受入れ態勢がなければ、病気は実現しない。多くの場合、原因の方だけが強く前面にをし出されて、同じ比重をもつ受入れ側の方は、とかく忘れら勝ちである。癌の対策も、目下のところ、できてしまった癌の治療であるが、究極は予防である。そのときに、受入れ側の問題は、小さいものでない」(吉田富三)。

遺伝性癌の「条件発がん」の実体解明は、今後の重要なテーマである。

## E. 結論

我々は、TSC 遺伝子変異を起点とした発がんの連盟的首位性の解明を試み『癌の制御』の根拠を示し、『癌の進展阻止』の実際を示すことに成功した。これらの知見に基づいて、難病であるヒト結節硬化症の治療戦略の構築が具体的に展開されるものと期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (関連論文のみ抜粋)

1. Sato, T., Seyama, K., Fujii, H., Maruyama, H., Setoguchi, Y., Iwakami, S., Fukuchi, Y. and Hino, O.: Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese