

图1

Western blot analysis of Apo-2L/TRAIL, DR5 expression and caspase8 fragmentation after treatment with IFN  $\gamma$  (1000U/ml) and /or 2ME2 (1  $\mu$  M)

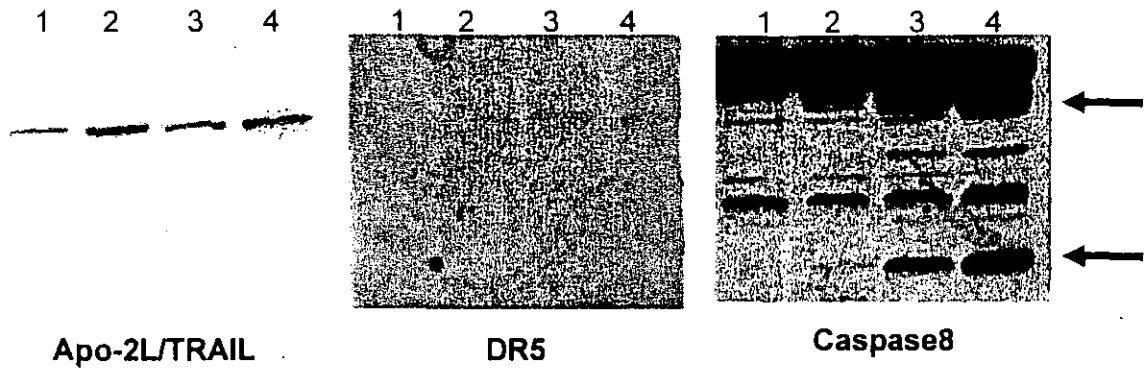


图2

Proliferation assay (BrdU incorporation ELISA)

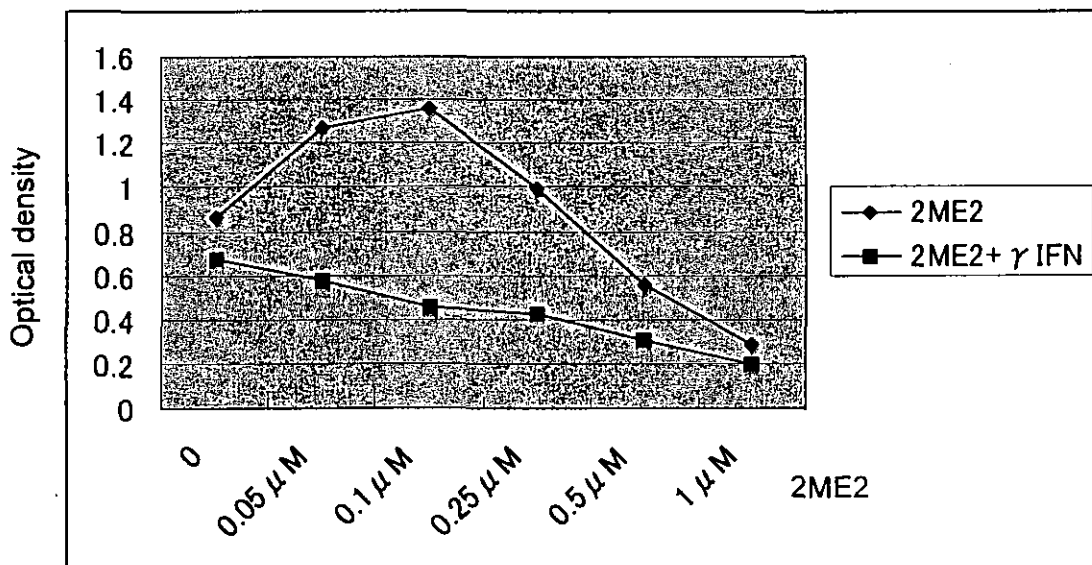
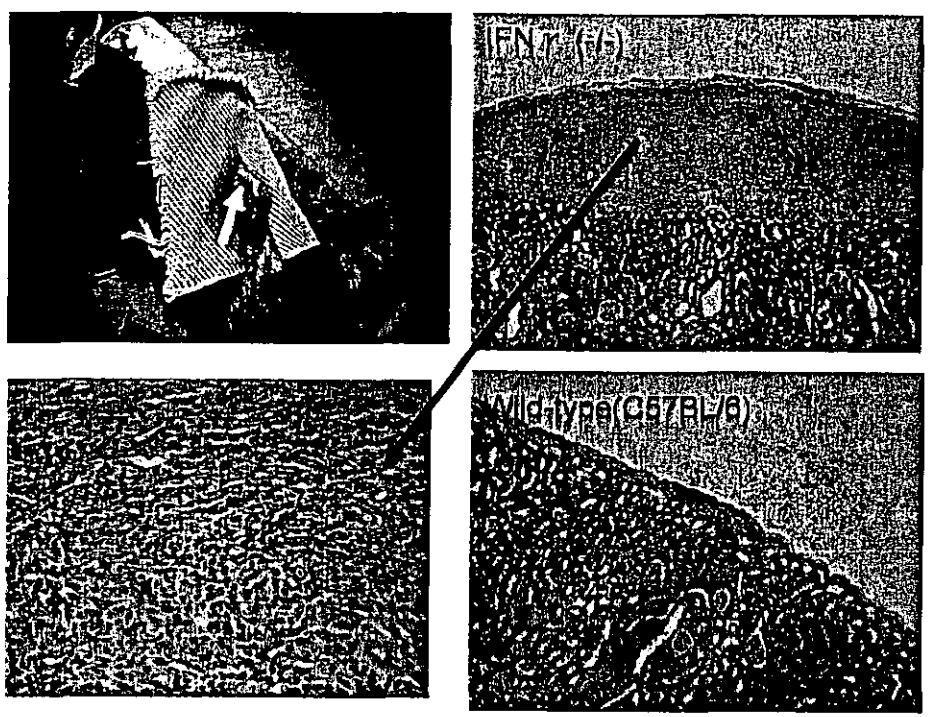


图3 Prolongation of NF cell xenograft survival under the kidney capsule of  $\gamma$  IFN-deficient mice



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

活性型ビタミンD3外用療法によるカフェオレ斑淡色化の機序の解明

主任研究者 中山樹一郎 福岡大学医学部皮膚科教授

**研究要旨**

活性型ビタミンD3 (vitD3) 軟膏の長期外用によりカフェオレ斑は淡色化する。我々は、vitD3軟膏の外用によって表皮メラノサイトが減少すること、および vitD3の培養メラノサイトに対する増殖抑制作用を確認している。しかし、真皮線維芽細胞への vitD3の作用によるメラノサイト増殖因子分泌の抑制等は確認されていない。今回、SiRNAによりヒト培養線維芽細胞で NF-1 をノックダウンしたところ、hepatocyte growth factor(HGF)発現の有意な増加がみられた。さらに、ノックダウン細胞に vitD3を添加すると HGF 発現は著明に抑制された。この所見は、カフェオレ斑の原因とされる真皮線維芽細胞からの HGF 過剰分泌による表皮メラノサイト増殖が vitD3により抑制され色素斑が淡色化する機序を示唆する所見と考えられる。さらに、このノックダウン細胞系においてリン酸化カスードや転写因子などのシグナル伝達経路を調べ vitD3が HGF 発現を抑制するメカニズムについて検討した。

古村南夫

福岡大学皮膚科

**A. 研究目的**

NF1 に生じるカフェオレ斑に関する有効な治療法として、vitD3軟膏の長期外用が色素斑の淡色化を引き起こすこと。Q スイッチルビーレーザー照射を併用するとさらに淡色化し、色素斑の再発もほとんど見られないことを昨年度報告した。

最近、カフェオレ斑の発症機序として、NF1 の皮膚真皮線維芽細胞からの HGF や stem cell

factor(SCF)の分泌亢進が表皮メラノサイトの増殖を引き起こしている可能性が報告された。今回は、ヒト正常皮膚真皮由来の培養線維芽細胞の NF1 を SiRNA でノックダウンすることによって、NF1 の線維芽細胞における HGF や SCF の発現について検討するとともに、vitD3 が線維芽細胞に作用し色素斑が淡色化するメカニズムについて検討した。

**B. 研究方法**

1) 正常ヒトメラノサイト (NHEM) はクラボウよ

り購入し、専用の培養液で培養した。

- 2) SiRNA 導入：NF1 mRNA 特異的構造(シークエンスは本研究班分担研究者の熊本大学腫瘍医学教室より提供)を持つヒト特異的 SiRNA を合成し、培養ヒト線維芽細胞に TransMessenger Transfection Reagent(QIAGEN)による細胞内導入を行うことによって、NF1 mRNA のノックダウンを行った。NF1 の発現はコントロールのランダム配列の SiRNA 導入細胞に比べて 80-90% mRNA レベルで低下していることがリアルタイム RT-PCR で確認された。
- 3) SiRNA 導入による NF1 ノックダウン細胞の HGF、SCF 遺伝子の vitD3 による発現変化の検討：SiRNA 導入 48 時間後に vitD3 である 22-oxacalcitriol ( $1 \times 10^{-7}$  M、中外製薬より提供)を 12 時間作用させ、HGF、SCF 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量的に分析した。
- 4) NF1 のノックダウンにより RAS-GTP の活性が上昇するが、その下流で HGF の発現に関与し、vitD3 のシグナリングにも関係すると考えられる経路 (PI3K, adenylylase/cAMP, Raf1/ERK) のそれぞれについてリン酸化特異抗体やリアルタイム RT-PCR の手法を用いてノックダウン細胞での活性化の有無と vitD3 の影響を検討した。

### C. 研究結果と考察

NF1 ノックダウン培養ヒト線維芽細胞ではランダムシークエンスの SiRNA を導入したコントロール細胞に比べて、HGF の発現が有意に増加した。これは、カフェオレ斑部の真皮線維芽細胞の HGF 分泌亢進と一致する所見であった。VitD3 を添加

したところコントロール細胞では HGF 発現が増加したが、NF1 ノックダウン細胞では反対に HGF の発現が著明に低下した(図1)。これは、カフェオレ斑に vitD3 を外用した場合に、NF1(-/-) の真皮線維芽細胞での HGF 分泌を低下させる可能性を示唆した所見であると考えられる。

SCF については、ノックダウン細胞とコントロールの発現に有意差は見られず、両者とも vitD3 によって発現が上昇したが、ノックダウン細胞では発現の変化が少なかった(図2)。

NF1 ノックダウン線維芽細胞では、RAS-GTP 活性が上昇するため、従来報告されている activated RAS oncogene と同様のシグナル経路の活性化がみられるとされ、その下流で HGF の遺伝子発現が誘導される可能性がある。今回は、シグナル経路の構成蛋白に対するリン酸化特異抗体を用いて活性化の検討をしたが、PI3K/AKT および Raf1/ERK 系の活性化は確認できなかった。また adenylylase/cAMP の活性化の可能性もあるが、これまでの研究で HGF の発現は抑制されるとされ検討対象からは除外した。

今後、検討すべき HGF 発現上昇の機序として、HGF のレセプターである Met の遺伝子発現が NF1 のノックダウンによる RAS-GTP 活性化により増加することによって、元々 HGF を比較的高発現し分泌している細胞が HGF-Met の autocrine により優位に増殖する selection が起こり、HGF を高発現する線維芽細胞の割合が相対的に増加するプロセスが考えられる。Ras の発現異常による tumorigenesis/metastasis で一般に見られる現象であるが、多発し徐々に増加する色素斑の臨床像を考えると興味深く今後検討する必要がある。

#### D. 結論

NF1 ノックダウン細胞の利用により、カフェオレ斑形成の機序が細胞内シグナルレベルで解明できる手がかりがえられた。

活性化ビタミン D3 の作用点を明らかにすることで、新しい分子治療の標的も見出すことができると期待される。

图1 Real-time quantitative RT-PCR of hepatocyte growth factor (HGF) transcripts in cultured human fibroblasts.

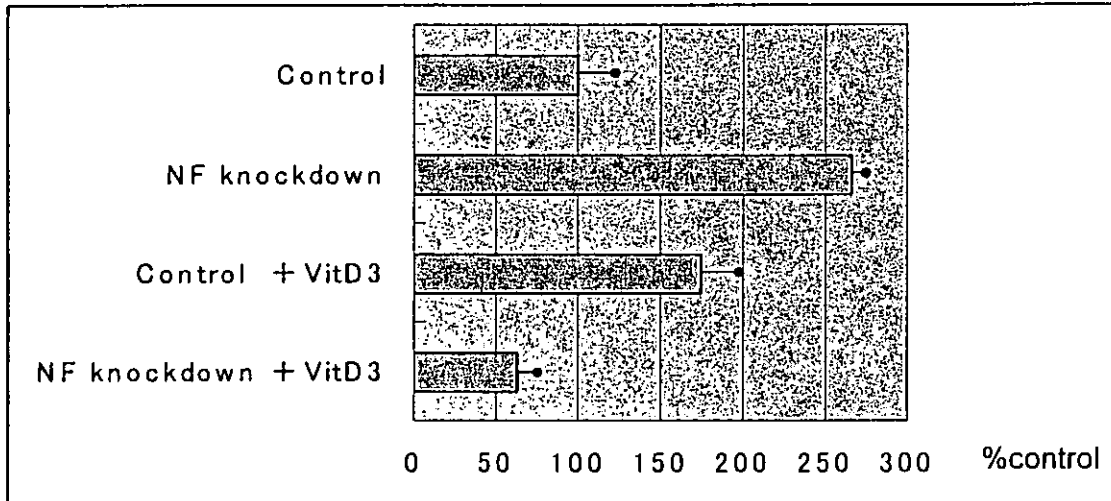
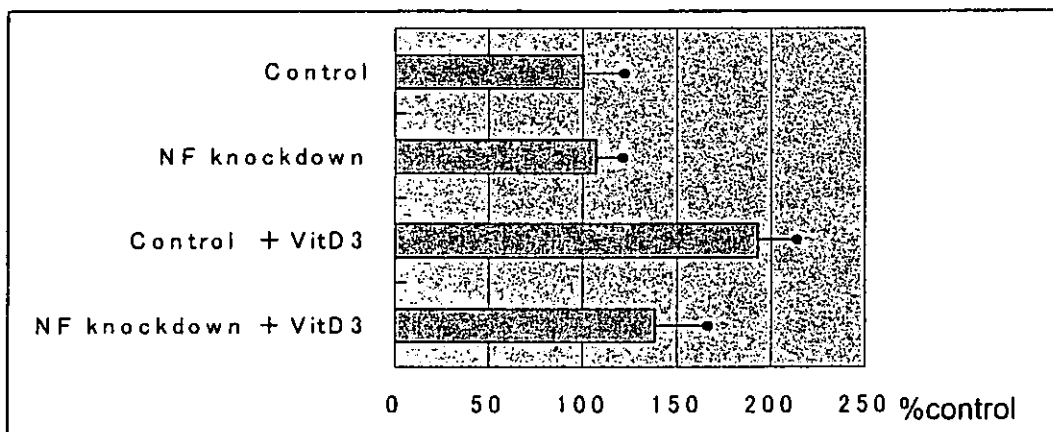


图2 Real-time quantitative RT-PCR of stem cell factor (SCF) transcripts in cultured human fibroblasts.



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

NF1 色素斑に対するフォト RF 照射及びビタミン D3 軟膏外用治療の効果

主任研究者 中山 樹 一 郎 福岡大学医学部皮膚科教授

**研究要旨**

NF1 色素斑に対する治療剤として、ビタミン D3 軟膏の有用性については前回の本学会議で報告した。NF1 色素斑に対する他の治療方法として、レーザー治療は有効ではあるが、色素斑再発や、照射後の痂皮形成や一過性の色素沈着をきたし、却って色調が増強する等の問題があった。レーザー治療に代替する新しい治療法として、フォト RF (IPL (intense pulsed light) と RF (radio frequency) を同時に照射する装置) 及びビタミン D3 (マキサカルシトール) 軟膏外用の併用療法を患者の同意を得て行い、色素斑に対する効果を検討した。

佐藤典子 福岡大学皮膚科  
中園亜矢子 福岡大学皮膚科  
古村南夫 福岡大学皮膚科  
久保田由美子 福岡大学皮膚科

この、腹部の同程度の小レックリングハウゼン斑を (①フォト RF+ビタミン D3 軟膏外用併用②フォト RF③ビタミン D3 軟膏外用④コントロール) に 4 分割し加療した (図 1)。フォト RF を 6 回照射後に以下の方法で効果を判定した。1) 4 名以上の複数の医師による臨床的効果の判定。2) 臨床写真における治療前後の比較 (図 2)。3) 治療前の臨床写真と比較して、明らかに淡色化した①領域の色素斑 1 カ所の皮膚生検、及び、コントロールとして未治療の領域の色素斑 1 ヶ所の皮膚生検。各々 HE 染色とフォンタナマッソン染色を施行 (図 3, 4)。4) 色彩計の計測 (①から④まで各 10 カ所計測)。5) 本人の満足度を聴取。

**B. 研究方法**

症例：27 歳女性。出生時に、顔面、軀幹、上肢を中心に小レックリングハウゼン斑を多数認め、成長に従って色調が濃くなり増数してきた。右上腕の小レックリングハウゼン斑に対し Q スイッチルビーレーザーを照射したが、疼痛があり、照射後色素沈着を認め、患者の満足度は低かった。この患者の腹部には、全体に広く淡いカフェオレ斑があり、その中に小レックリングハウゼン斑が播種性に存在した。

### C. 研究結果

臨床的に、①②③の順に淡色化し、④は不変であった(図1,2)。

臨床写真では、①の治療領域が小レックリングハウゼン斑を最も淡色化した。②の領域では、照射後の紅斑と色素沈着が①の領域より目立っていた。③の領域では、小レックリングハウゼン斑は不変であったが、全体の皮膚の色調が明るくなった。④の領域は不変であった。

病理組織学的所見では未治療部ではHE染色において、表皮メラノサイトは増数しており、メラニン顆粒の沈着を多数認めた。真皮浅層では血管周囲性のメラノファージの著明なメラニン顆粒の貪食を認めた。フォンタナマッソン染色でも同様の所見が認められた(図3)。治療後の①部では、表皮メラノサイトの数は変わらなかったが、メラニン顆粒の沈着は明らかに減少していた。真皮浅層の血管周囲性のメラノファージは、フォトRFの深達可能領域の4mmの深さまでは明らかに減少していた。フォンタナマッソン染色においてもIPLの深達可能領域の4mmの深さまでは表皮メラニン顆粒の減少と真皮浅層の血管周囲性のメラノファージの減少を認めた(図4)。

また色彩計による測定では、L\*a\*b\*表色系による評価を行った。L\*は明度、a\*(赤-緑)とb\*(黄-青)は色度とされる。L\*値の平均は①67.92②62.86③68.74④64.8 明度差を認めた。①と④は  $p < 0.01$  で有意差を認めた。a\*値の平均では①9.75②12.22③8.6④11.01であった。

治療施行中、疼痛がないため前処置が不要であり、治療後の痂皮形成が軽度で消毒も要しないため患者の満足度も高かった。また、色素斑の色調の変化に対しても満足度は高かった。

### D. 考察

我々が今回用いたフォトRFは580nm~980nmのスペクトラムを有し、可視光線とラジオ波が作用する深さは4mmとされている。また、1回の照射範囲は12×25cmである。先端には冷却装置がある。

フォトRF照射+ビタミンD3軟膏外用療法により、臨床的に小レックリングハウゼン斑の淡色化が認められ、病理組織学的所見で表皮メラニン顆粒と真皮浅層血管周囲性のメラノファージの破壊を証明した。色彩計による測定では、L\*a\*b\*表色系による評価で、L\*値の有意な上昇を認めた。活性型ビタミンD3軟膏外用療法の併用で、メラノサイトに対する増殖抑制効果のためと思われるが、臨床的にフォトRF照射のみの群より淡色化した。

フォトRF照射のみの場合ではフォトRF+ビタミンD3軟膏外用療法の併用よりも照射後紅斑と色素沈着が遷延化していた。そのため、a\*値が上昇し、結果的にL\*値が上昇しなかった可能性が考えられた。

活性型ビタミンD3軟膏外用療法のみでの群では、小レックリングハウゼン斑には変化がなかったが、全体の広範囲のカフェオレ斑の色調は淡色化していた。

フォトRFは、痛みが殆ど無く熱による組織損傷が限られた領域であるため全身状態への影響が殆ど無い。無麻酔で広範囲照射が可能である。また、照射後の痂皮形成が目立たず、治療中の患者のQOLに影響しないという利点がある。

現在、同症例に頸部、上肢にも同様の治療を施行中で、色素斑の淡色化をみている。今回の研究では、本併用療法が特に小レックリングハウゼン斑に有用で、レーザー治療に代替する新しい治療法と考えられ、治療期間の短縮等の可能性が示唆された。



## 参考文献

NF1 カフェオレ斑に対する活性型ビタミン D3 の治療効果の研究. 中山樹一郎, 古村南夫, 吉田雄一, 久保田由美子, 清水昭彦, 田中俊裕: 平成14年度神経皮膚症候群に関する研究

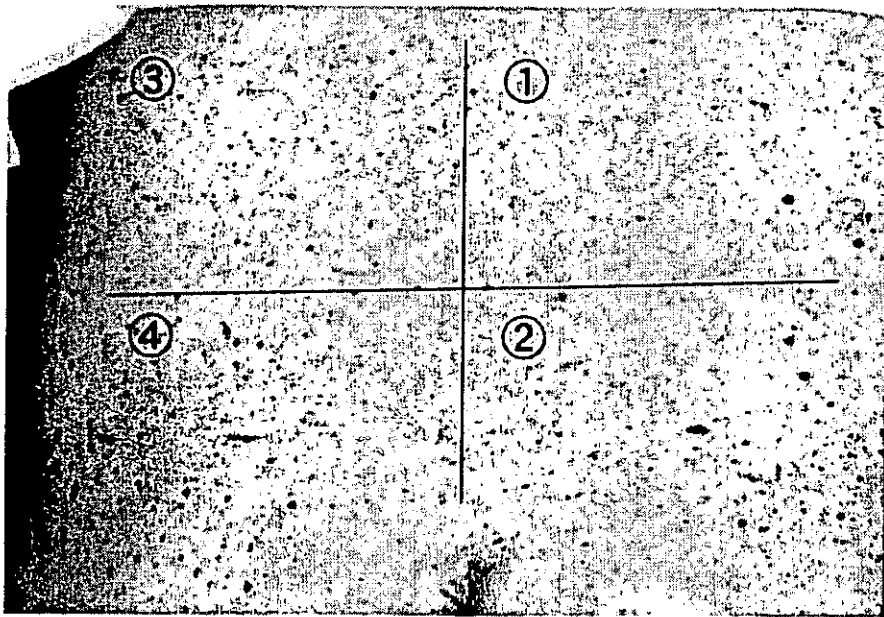


図 1 治療前臨床像

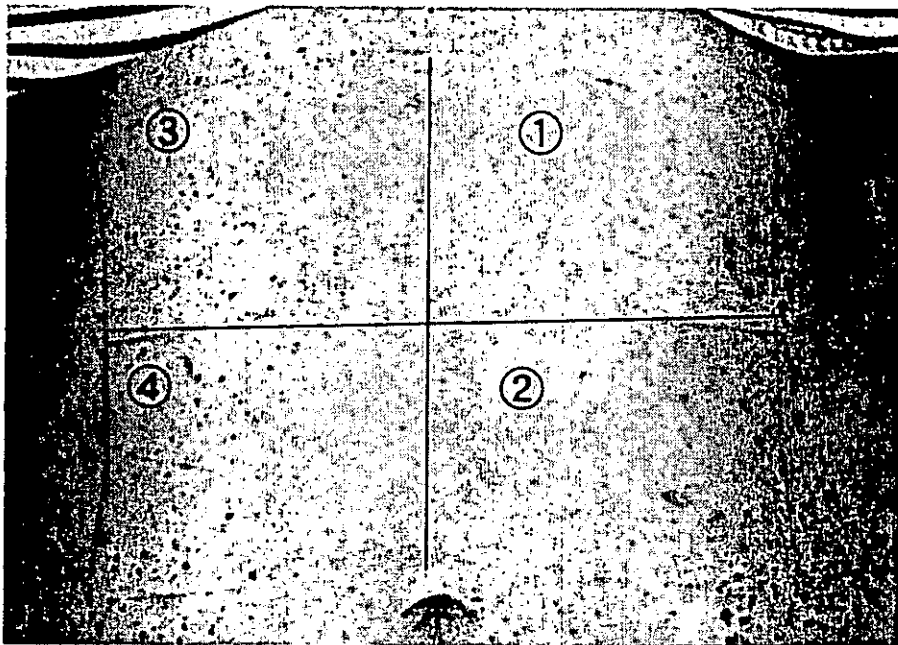


図 2 治療後臨床像



図 3 未治療部  
フォンタナマッソン染色

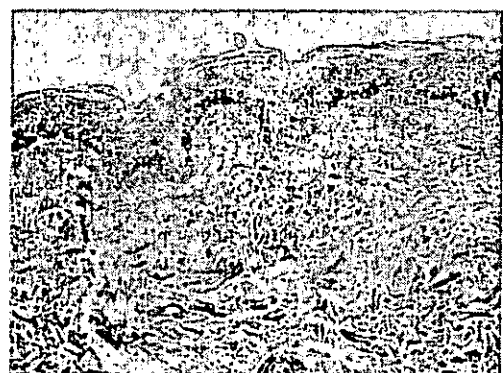


図 4 フォトRF+マキサカルシトール軟膏  
フォンタナマッソン染色

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Eker ラット大脳皮質結節の巨大神経細胞における LOH (loss of heterozygosity) の検討

分担研究者 水口 雅 自治医科大学小児科助教授

**研究要旨**

結節性硬化症の大脳皮質結節の形成機序を分子病理学的に解明する目的で、そのモデル動物 Eker ラットの皮質結節における loss of heterozygosity (LOH) を検討した。個々の巨大神経細胞をマイクロダイセクションにより採取し、その DNA を PCR 法により解析したところ、巨大神経細胞における正常 Tsc2 遺伝子アレルの残存が確認された。免疫染色でも巨大神経細胞には tuberin 免疫反応が残存しており、DNA 解析の結果と一致した。皮質結節の形成過程では、腎細胞癌の場合と異なり、LOH の生じていないことが、明確に示された。

森 雅人、野崎 靖之、桃井真里子  
自治医科大学小児科  
樋野 興夫 癌研究所実験病理部

性遺伝疾患である。TSC 患者は 2 つの TSC 遺伝子のいずれかの対立遺伝子の一方に生殖細胞変異 (germline mutation) を有する (first hit)。TSC に合併する腎・心臓の過誤腫では、second hit すなわち体細胞変異による正常 TSC 遺伝子 allele の喪失 (loss of heterozygosity、以下 LOH) が高率に証明され、その蛋白産物の発現は失われる。これに反し TSC 大脳の皮質結節では LOH の頻度は低く、成因は不明である。

**A. 研究目的**

結節性硬化症 (tuberous sclerosis、以下 TSC) 患者の大脳に多発する皮質結節は、てんかんや知的障害をひきおこし、QOL を著しく低下させる、臨床的に最も重要な病変である。したがってその成因を解明し、病態に立脚した新しい治療法を開発する必要性は大である。

TSC は、TSC1 (染色体 9q34) ないし TSC2 (染色体 16p13.3) 遺伝子変異に起因する常染色体性優

いっぽう Eker ラットは Tsc2 遺伝子変異にもとづく TSC のモデル動物であり、LOH に起因する腎細胞癌を高率に生じる。われわれは従来の研究により、Eker ラットの大脳皮質に、低頻度ではあるが、皮質結節の発生を見いだした。本年度の研究

では、Eker ラット皮質結節の成因を分子病理学的に解明する目的で、結節内の巨大神経細胞における Tsc2 遺伝子座の LOH の有無をマイクロダイセクション (laser-assisted microdissection) を用いた DNA 解析により、また Tsc2 遺伝子産物 tuberin の発現を免疫染色により検討した。

## B. 研究方法

### 1. マイクロダイセクションと PCR

Eker ラット大脳ホルマリン固定組織切片 (6  $\mu\text{m}$  厚) を hematoxylin で染色し、microdissection システム (Olympus LM200) を用いて、皮質結節から個々の巨大神経細胞 (約 15 細胞) を切り取った。レーザーのビーム径は 7.5  $\mu\text{m}$  とした。対照として、正常ラット大脳皮質の神経細胞、Eker ラット皮質結節の正常大神経細胞、Eker ラット腎臓の腎細胞癌細胞を、各々約 50 細胞ずつ採取した。

これらのサンプルから、アルカリ法により DNA を抽出し、Tsc2 遺伝子の野生型、Eker 変異型 allele の有無を、nested PCR 法により調べた。第 2 回 PCR により野生型 allele が 141bp、Eker 変異型 allele が 119bp のバンドとして検出されるよう、primer を設計した。

### 2. 免疫染色

マイクロダイセクションに用いたのと同じ Eker 個体、および正常ラット個体の脳・腎臓組織における tuberin 免疫反応の有無を、免疫染色により検討検討した。自家作製した抗 tuberin 合成ペプチド抗体を 1 次抗体として biotin-streptavidin-HRP 法により染色した。

### 3. 倫理面への配慮

動物実験は、癌研究所の定めた倫理規定に則り、動物愛護に配慮しつつ行われた。

## C. 研究結果

### 1. マイクロダイセクションと PCR

Eker ラットの皮質結節の巨大神経細胞には野生型、変異型 allele の両者が存在しており、正常大神経細胞と同様の結果であった。

正常ラットの神経細胞には野生型 allele のみ、Eker ラットの腎細胞癌細胞には変異型 allele のみが存在した。

### 2. 免疫染色

Eker ラットの皮質結節の巨大神経細胞には、弱いながらも tuberin 免疫反応性が残存していた。正常な大脳皮質神経細胞のうち tuberin 陽性を示すものの割合は、Eker 皮質結節で数%、同じ個体の対側半球 (結節でない部位) で約 30%、正常個体の大脳皮質で 30~70% であった。

Eker ラットの腎細胞癌は tuberin 陰性であった。その周囲、組織学的に正常な腎臓組織においては、尿細管、集合管に tuberin 免疫反応が見られたが、陽性細胞の数、染色強度は正常ラットの腎臓に比し減弱していた。

## D. 考察

ヒト TSC 皮質結節における LOH を検討した従来の研究では、組織から直接 DNA を抽出していたため、正常神経・グリア細胞の DNA の混入が避けられなかった。したがって、かりに異常巨細胞で LOH が生じていたとしても、技術的理由により LOH 偽陰性となる危険性があった。今回の Eker ラット皮質結節の研究では、巨大神経細胞のみを切り取って DNA 解析したので、上記の結果から、これらの細胞で LOH の生じていないことを明確に示すことができた。これは Eker ラット腎細胞癌 (LOH 陽性) とは明らかに異なる所見であった。

免疫染色の結果も、Eker ラット巨大神経細胞における tuberin 蛋白の残存を示唆しており、上記の PCR の結果と一致した。脳の染色結果は、LOH 陽性腎細胞癌における tuberin 陰性所見と対照的であった。

今回の研究から、Eker ラット皮質結節では腎細胞癌と異なり、正常 Tsc2 アレルの欠失による second hit は生じていないことが示された。ただし Tsc2 遺伝子内変異（点変異、小規模な欠失など）による second hit の可能性は、今回の実験結果からは否定できない。TSC における皮質結節形成の機序として、以下の可能性が挙げられる。

1. Tsc2 遺伝子内変異 (intragenic mutation)
2. 他の遺伝子 (modifier gene) の関与
3. 環境要因の関与

## E. 参考文献

- 1) Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, Ikeda K, Takashima S. Loss of tuberin from cerebral tissues with tuberous sclerosis and astrocytoma. *Ann Neurol* 40(6):941-944, 1996.
- 2) Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, Ikeda K, Takashima S. Tuberin immunohistochemistry in brain, kidneys and heart with or without tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 94(6):525-531, 1997.
- 3) 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* 59(3):188-196, 2000.
- 4) Mizuguchi M, Mori M, Nozaki Y, Momoi MY, Itoh

M, Takashima S, Hino O. Absence of allelic loss in cytomegalic neurons of cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 107(1):47-52, 2004.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

lymphangiomyomatosis を伴った Tuberous sclerosis の患者の肺および皮膚病変部における tuberin hamartin の発現

分担研究者 板見 智 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科助教授

**研究要旨**

Lymphangiomyomatosis (LAM) は HMB45 陽性の abnormal smooth muscle cells (LAM cells) の増殖よりなる疾患で、sporadic LAM はきわめてまれな疾患であるが、結節性硬化症患者では高頻度に出現し、TSC1 遺伝子、TSC2 遺伝子が LAM の原因遺伝子の一つであると考えられている。一方、結節性硬化症患者皮膚病変においても、分化異常を思わせる、GFAP 陽性の abnormal fibroblasts がしばしば認められる。

今回我々は、LAM を伴った結節性硬化症の一例を経験したので、肺と皮膚の病変部である、肺 LAM と顔面皮膚血管線維腫のパラフィン切片を用いて、tuberin, hamartin の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、HMB45,  $\alpha$ -smooth muscle actin, estrogen receptor- $\alpha$  陽性の肺 LAM 病変部では、tuberin の染色が陽性で hamartin の染色像は認められなかった。一方、皮膚病変においては、tuberin 染色も hamartin 染色も陽性であった。

金田 真理

大阪大学大学院医学検究科分子病態医学皮膚科

**A. 研究目的**

結節性硬化症は全身の過誤腫を本態とする疾患で、全身の種々の臓器に病変をひきおこす。しかしながら、各臓器の病変部における LOH の頻度にはおおきな開きがある。従って、異なった病変における tuberin, hamartin の発現を調べることは、本症各症状の原因ひいては治療法を考えるに

当たって、重要な事であると考えられる。

Lymphangiomyomatosis (LAM)、は、肺胞の平滑筋様細胞 (LAM cells) の増殖を本態として、肺実質の破壊と嚢胞の形成を引き起こす嚢胞性肺疾患で、sporadic LAM は 1/1,000,000 の頻度で認められる極めてまれな疾患である。しかしながら、女性の結節性硬化症患者においては、約 4% と高率に認められ<sup>1)</sup>、以前から、LAM と TSC の関係が注目されていた。最近になって、TSC1 遺伝子、TSC2 遺伝子 いずれもが LAM の原因遺伝子の一つであり、TSC1 遺伝子や、TSC2 遺伝子の LOH がおこる

事により LAM が発症すると考えられるようになってきた<sup>2,3,4,5,6,7,8)</sup>。

ところで、顔面の血管線維腫、シャグリンパッチ、爪下線維腫などの TSC の皮膚病変においても真皮における結合織と血管成分の増加および血管の拡張以外に、GFAP 陽性のグリア様の大きな星状の線維芽細胞や多核巨細胞がしばしば認められる。しかしながら、皮膚病変は肺病変部と異なり、LOH が認められにくいと考えられている。今回我々は、TSC-LAM の一例を経験したので、TSC-LAM の肺組織における Tuberin、Hamartin の発現を調べるとともに皮膚病変における tuberin、hamartin、の発現を調べ、肺病変と皮膚病変を比較検討を行った。

## B. 研究方法

TSC-LAM 患者の肺生検による肺病変部および、患者皮膚病変部のパラフィン切片を a-smooth muscle actin, HMB45、エストロゲンレセプターアルファ、ベータ、tuberin、hamartin に対する抗体で染色し、免疫組織化学的に各々の抗原の発現を調べ、LAM の確定診断を行うとともに肺病変と皮膚病変の特徴について、検討した。倫理面への配慮として、患者由来組織の使用に関しては、患者に使用目的を説明し使用許可を得た上使用。また患者個人を特定できるデータは全て排除した。

## C. 研究結果

### a. 結節性硬化症の診断

症例は 25 歳の女性で、4 歳頃より顔面の血管線維腫、白斑、脳 MRI の cortical tuber, より結節性硬化症としてフォロー。12 歳時、腎の

血管筋脂肪腫を指摘されるも、全経過を通じて、痙攣発作、精神発達遅滞 呼吸器症状は認めなかった。2001 年 11 月、突然胸痛が出現し、近医にて両側気胸と診断され入院。

入院時現症では顔面の血管線維腫(図 1 a)、シャグリンパッチ(図 1 b)、白斑(図 1 c)、爪囲線維腫(図 1 d)、歯肉線維腫(図 1 e)を認め、検査では脳 CT で側脳室の石灰化(図 2 a)を、頭部 MRI で cortical tuber, を、腹部 CT で両側腎の多発性の血管筋脂肪腫(図 2 b)を認めた

以上より、患者は肺の lymphangiomyomatosi を除いても、結節性硬化症の診断基準の大症状を 6 つと小症状を 1 つ認め、結節性硬化症と確定診断できた。

### b. Lymphangiomyomatosis (LAM) の診断

術後の HRCT では、全肺野にわたり、壁の薄い 1 cm 程度の嚢胞の多発を認めた(図 3)。さらに、肺病変の特殊染色より a-smooth muscle actin, HMB45 陽性の LAM 細胞を確認できた(図 4)。

### c. 肺の病変部における各種抗原の発現

肺病変部においては、組織学的に、HE で、拡張した肺胞の周囲に、紡錘形の smooth muscle cells の集簇よりなる細胞の集塊を認めた(図 4)。これら細胞は a-smooth muscle actin, HMB45、エストロゲンレセプターアルファ陽性で(図 4)、LAM 細胞であることが診断できた。そこで、これらの組織の tuberin、hamartin の発現を検討した。その結果 tuberin 染色像陽性で、hamartin 染色像陰性であった(図 5)。

d. 皮膚病変部における tuberin、hamartin の発現

皮膚病変部である顔面の血管線維腫における、tuberin、hamartinの染色をおこなった。その結果、患者の皮膚病変においては、肺病変部と異なり、正常皮膚結節性硬化症を有しないコントロール皮膚と同様に、tuberin、hamartinいずれも陽性であった(図6)。

#### D. 考察

Lymphangiomyomatosis (LAM) は、肺胞の平滑筋様細胞(LAM cells)の増殖を本態として、肺実質の破壊と嚢胞の形成を引き起こす進行性予後不良の嚢胞性肺疾患で、LAM細胞では、免疫組織化学的にはHMB-45、 $\alpha$ -smooth muscle actin、エストロゲンレセプター陽性であることが知られている。本症例においても、HMB-45、 $\alpha$ -smooth muscle actin、エストロゲンレセプターアルファ陽性(図4)でLAM細胞が確認でき、TSC-LAMの確定診断ができた。LAMの病変部では、TSC遺伝子のLOHが報告されている。そこでこれらの組織のtuberin、hamartinの発現を検討した。その結果tuberin染色像陽性で、hamartin染色像陰性であった(図5)。一方、患者の皮膚病変においては、tuberinのみならず、hamartin染色も陽性であった(図6)。

TSC-LAMはTSC遺伝子のgermline mutationをもっており、LOHがおこる事により発症する。一方sporadic LAMはTSC2遺伝子の2つのsomatic mutationによりおこる。と考えられており、いずれにおいても肺LAM病変部ではLOHがおこっていると考えられている。一方皮膚病変はLOHの報告もあるが少なく、我々の検査でも、調べたなかでは、皮膚病変部ではLOHが確認できなかった。従って、肺病変と皮膚病変におけるhamartinの発現の違いは、LOHの有無による可能性が考えら

れた。

本患者の場合遺伝子検査を施行したが、TSC1 TSC2の何れに於いても異常は認められなかった。しかしながら、肺病変部の染色結果より、本患者はTSC1である可能性が示唆された。

#### E. 参考文献

1. Hancock E, Osborne J. Lymphangiomyomatosis: a review of the literature. *Respir Med* 2002; 96: 1-6.
2. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6085-90.
3. Sato T, Seyama K, Fujii H et al. Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J Hum Genet* 2002; 47: 20-8.
4. Yu J, Astrinidis A, Henske EP. Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1537-40.
5. McCormack F, Brody A, Meyer C et al. Pulmonary cysts consistent with lymphangiomyomatosis are common in women with tuberous sclerosis: genetic and radiographic analysis. *Chest* 2002; 121: 61S.
6. Bonetti F, Chiodera PL, Pea M et al. Transbronchial biopsy in lymphangiomyomatosis of the lung. HMB45 for diagnosis. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:



1092-102.

7. Pacheco-Rodriguez G, Kristof AS, Stevens LA et al. Giles F. Filley Lecture. Genetics and gene expression in lymphangiomyomatosis. *Chest* 2002; 121: 56S-60S.
8. Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J et al. Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 327-36.

## G 研究発表

### 学会発表

肺生検にて Lymphangiomyomatosis の確定診断ができた結節性硬化症の一例  
 金田真理 (大阪大)、中谷守一、西山典利 (大阪  
 市立北市民病院)、板見智 (大阪大)  
 第 54 回日皮会中部支部学術大会

### 論文発表

1. Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Inoue T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T. Keratinocyte-specific Pten deficiency in mice results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res* 63(3):674-681, 2003
2. Tadokoro T, Rouzaud F, Itami S, Yoshikawa K, Hearing V. The inhibitory effect of androgen and sex hormone-binding globulin on the intracellular cAMP level and tyrosinase

activity of normal human melanocytes. *Pigment Cell Res* 16(3): 190-197, 2003

3. Umeda J, Sano S, Kogawa K, Motoyama N, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T, Takeda J. In vivo cooperation between Bcl-xL and the phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis. *FASEB J* 17(6): 610-620, 2003.
4. Wataya-Kaneda M, Yoshikawa K, Itami S: The role of tuberous sclerosis gene products, tuberin and hamartin, in cell cycle regulation and cell proliferation. In *Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry. Recent Res. Devel. Biophys. Biochem.* 3: 703-710, 2003.
5. 井上多恵、真鍋求、板見智、佐々木雄彦、仲野徹、鈴木聡：がん抑制遺伝子 PTEN と皮膚疾患、*日本皮膚科学会雑誌*、113: 1641-1650, 2003.

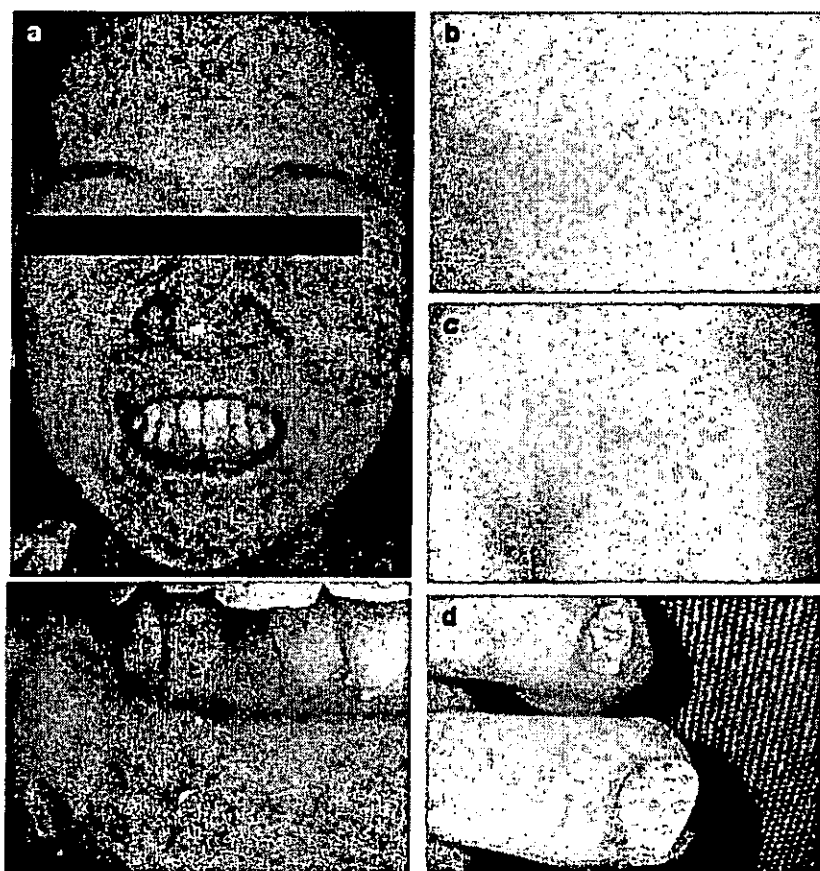
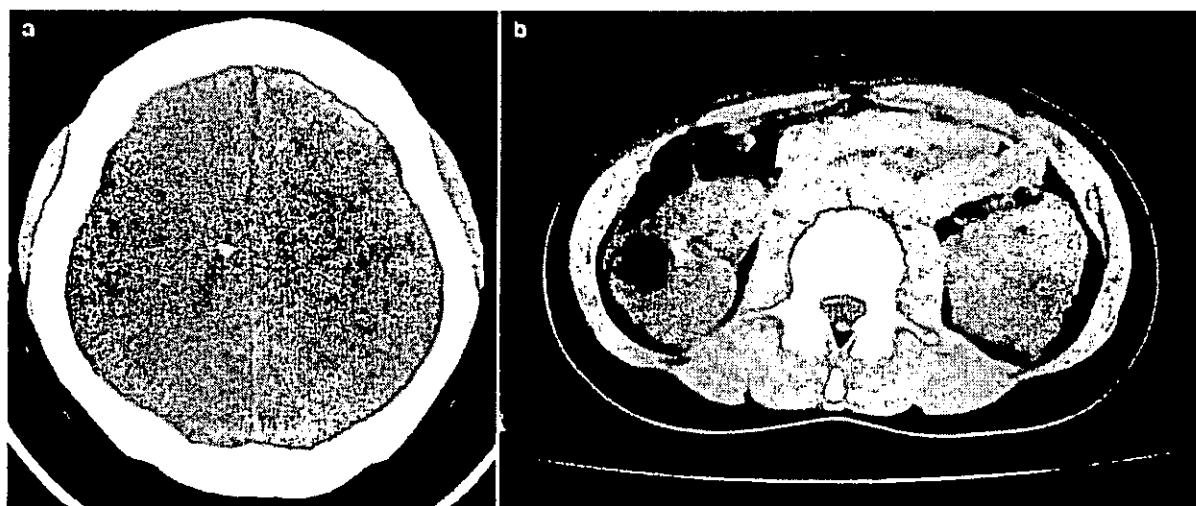


图 1



Brain

Kidney

图 2

# Chest HRCT scanning

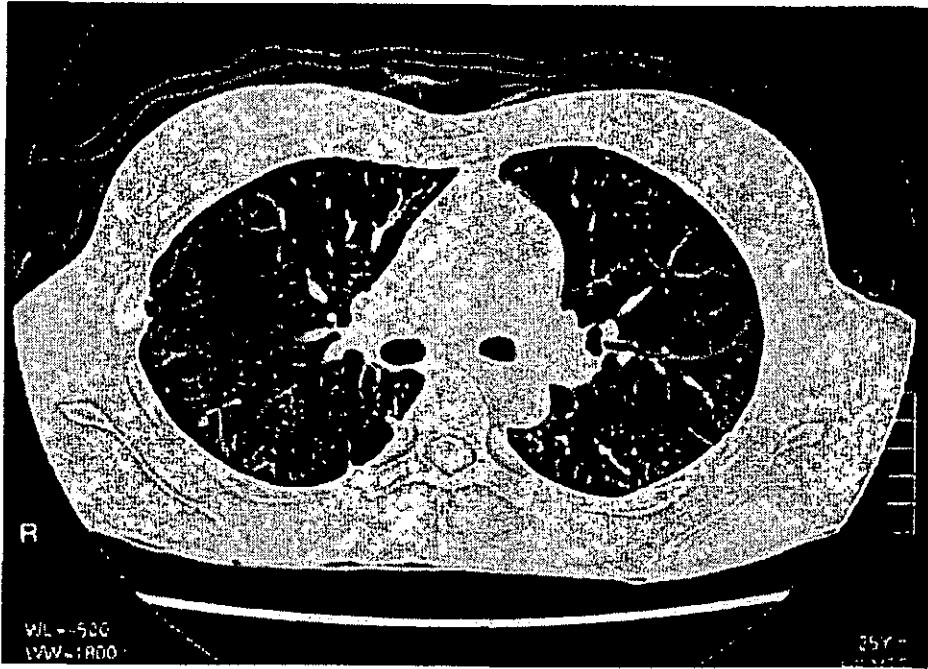
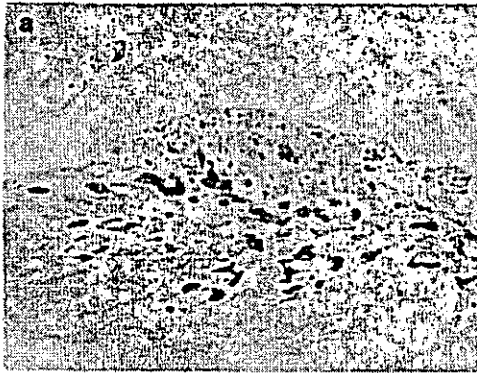
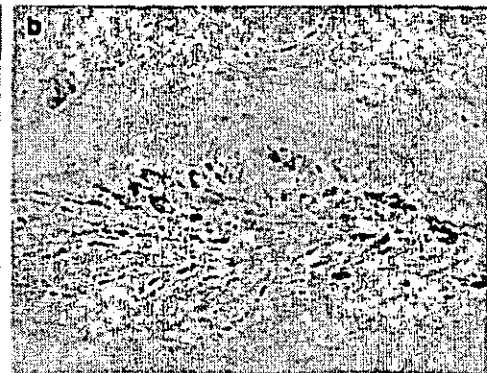


图 3

HMB-45



$\alpha$ -SMA



Est-re  $\alpha$



HE



图 4

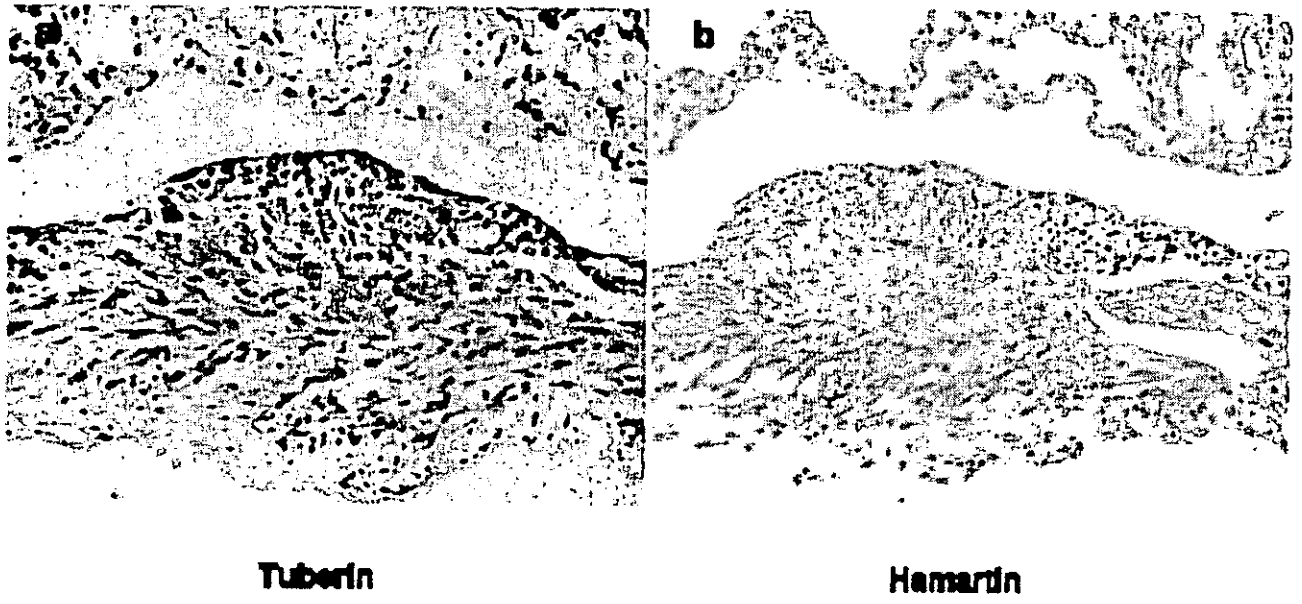


图 5

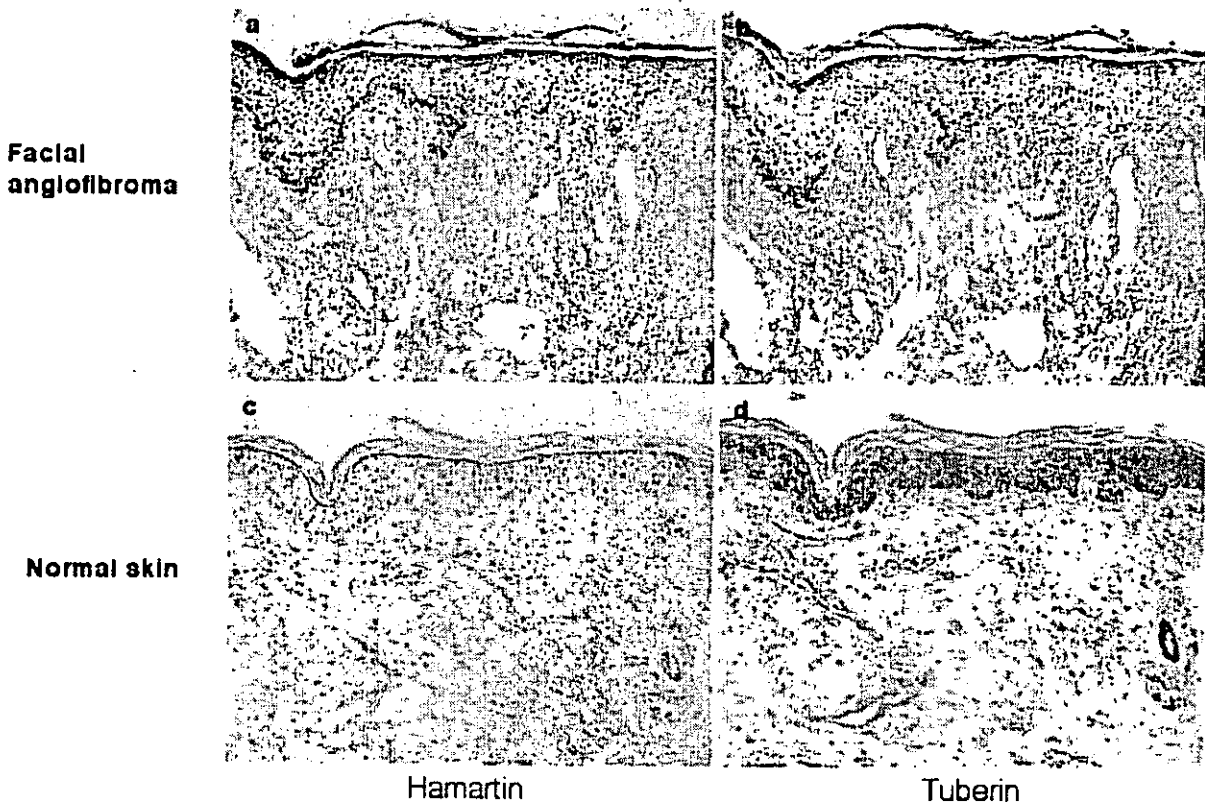


图 6