

表 2. 定点モニタリング調査、年次別診療科別返送機関数

年次 診療科(送付数)	1997	1998	2000	2003
眼科(8)	5	5	3	2
形成外科(13)	9	10	8	2
耳鼻科(1)	0	0	0	1
小児科(7)	3	4	2	1
整形外科(6)	3	4	3	2
脳外科(2)	2	1	1	0
皮膚科(35)	27	31	29	17
合計(72)	49	55	46	25

表 3. 定点モニタリング調査、年次別診療科別報告患者数

年次 診療科	1997	1998	2000	2003
眼科	55	56	56	2
形成外科	45	59	40	7
耳鼻科	0	0	0	0
小児科	23	46	10	2
整形外科	34	38	24	4
脳外科	7	3	6	0
皮膚科	305	342	320	129
合計	469	544	456	144

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

結節性硬化症原因遺伝子産物ハマルチンの神経細胞における機能について

分担研究者 大野 耕 策 鳥取大学医学部脳神経小児科教授

研究要旨

結節性硬化症原因遺伝子産物ハマルチンの培養神経細胞における機能について解析した。培養神経細胞 PC12h は神経栄養因子（NGF）刺激による神経分化誘導に伴い、ハマルチンの発現がごくわずかに増加したのに対し、ツベリンは NGF 刺激 1 分後から顕著な発現増加が見られた。NGF による神経分化により PC12 細胞のアクチンは神経突起に集積したが、ハマルチンノックダウン細胞ではアクチン集積が亢進し、ツベリンノックダウン細胞では抑制された。また、ハマルチンの神経細胞内の結合蛋白質として同定した NADE（p75NTR-associated cell death executor）は、ハマルチンノックダウン細胞では発現が減少し、NGF 刺激によるアポトーシスが抑制された。これらの結果は結節性硬化症脳病変における神経細胞の分化異常との関連性を示唆する。

檜垣 克美、フロリン・フロリチェル、難波 栄二、二宮 治明
鳥取大学生命機能研究支援センター、鳥取大学医学部

A. 研究目的

結節性硬化症原因遺伝子 TSC1、TSC2 は複合体を形成し、mTOR シグナルの抑制に働き、この複合体の機能的欠損による過剰な mTOR シグナルが細胞分化の異常、細胞の大きさの異常と関係していると考えられている。我々は脳病変の過誤性の神経細胞増殖の発症機序を解明する目的で、培養神経細胞 PC12h を用い TSC1、TSC2 の機能解析を行ってきた。これまでの解析より、TSC1 遺伝子の抑制は神経突起伸長を促進し、TSC2 遺伝子の抑制は突起伸長を抑制することを明らかにしてきた。今回、NGF による分化誘導過程の培養神経細胞における TSC

遺伝子産物の発現およびアクチンの発現動態について検討を行った。また、ハマルチン結合蛋白質 NADE の機能についても検討した。

C. 結果

- 1) PC12h 細胞の神経分化誘導とハマルチン、ツベリンの発現
培養神経細胞株 PC12h を神経栄養因子（NGF）による神経分化誘導刺激後 0, 1, 5, 15, 30 分および 24, 48, 72 時間の細胞より蛋白質を抽出し、抗ハマルチン、抗ツベリン抗体にてウェスタンブロー

ットおよび免疫蛍光染色を行った。結果、ハマルチンの発現は神経分化誘導に伴いごく僅か増加したのに対し、ツベリンは NGF 刺激 1 分後から急激に増加し、72 時間後まで高いレベルを保った。

2) ハマルチン、ツベリン欠失 PC12h 細胞におけるアクチンの細胞内局在

蛍光標識ファロイジン染色により PC12h 細胞内アクチンの局在を検討した。通常培養条件下の PC12h 細胞において NGF 刺激後アクチンは神経突起末端に強く集積した。一方、ラット TSC1 遺伝子に対するアンチセンスオリゴ DNA のトランスフェクションにより、TSC1 をノックダウンした PC12h 細胞では、神経突起に非常に強いアクチン重合の促進が見られたのに対し、TSC2 ノックダウン細胞ではアクチンは抑制された。

3) ハマルチン欠失 PC12h 細胞における NADE を介したアポトーシスの抑制

PC12h 細胞のアポトーシスは FITC 標識アネキシン V により検出した。NADE を一過性に過剰発現させた PC12h 細胞に NGF を投与すると、p75NTR-NADE 経路を介したアポトーシスが誘導された。これに対し、ラット TSC1 siRNA トランスフェクションによりハマルチンの発現を抑制した PC12h 細胞では NADE の発現が減少し、NGF 刺激によるアポトーシスの誘導が有為に抑制された。

D. 考察

1) PC12h 細胞神経分化におけるハマルチン、ツベリンの機能の違いについて

現在、Tuberin/Hamartin は複合体を形成し、この複合体はお互いを安定化させ、ヒトの mammalian

target of rapamycin (mTOR) を活性化する Rheb (Ras homolog enriched in brains) 特異的な GAP 活性を持つことが知られている。TSC1 または TSC2 遺伝子の欠陥により mTOR シグナルが活性化することで、結節性硬化症に見られる細胞学的な異常—過誤腫性病変の形成、細胞の巨大化、細胞の移動障害—などを説明できると考えられている。実際、これまでの結果からアンチセンス DNA で TSC1、TSC2 を抑制した PC12h 細胞はともに DNA 合成が促進される (Floricel et al., 2007)。ところが、NGF 刺激後の PC12h 細胞では Hamartin と Tuberin の発現動態が異なり、神経突起に局在するアクチンの集積が異なっていた。これらの結果は 2 つの遺伝子の機能的な差異を示し、TSC1 がアクチン結合蛋白質を制御する Rho の活性化という独自の機能を有することによる可能性を示唆する。

2) ハマルチン-NADE 複合体と神経細胞死の制御機能について

酵母ツーハイブリッド法を用いハマルチンと相互作用する分子として NADE を同定した。プルダウンアッセイ、免疫蛍光染色、免疫沈降により、培養神経細胞およびマウス脳可溶化液において Hamartin と NADE が相互作用していることが確認された (Yasui et al., 2007)。NADE は神経栄養因子受容体 p75NTR の細内 cell death domain に結合し、NGF 依存的に神経細胞死を誘導する分子として同定された (Mukai et al., 2000)。ハマルチンを欠失した PC12h 細胞において NADE が減少し、NGF 誘導性のアポトーシスが抑制されたという結果は、ハマルチンと NADE の結合が神経細胞死の制御に重要な役割を担っており、この結合の低下が結節性硬化症脳病変の形成と関わっていることを強く示す。

E. 結論

培養神経細胞 PC12h の NGF 刺激による神経分化誘導過程において、ハマルチン、ツベリンは異なる発現制御を受け、Rho の活性化に関与していた。また、ハマルチンと NADE 複合体の欠失は NGF 誘導神経細胞死に抑制的に働いた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Florin F, Higaki K, Maki H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K: Antisense suppression of TSC1 gene product, hamartin, enhances neurite outgrowth in NGF-treated PC12h cells. Brain Dev 2007 (in press)
- 2) Yasui S, Tsuzaki K, Ninomiya H, Floricel F, Asano Y, Maki H, Takamura A, Nanba E, Higaki K, Ohno K: The TSC1 gene product hamartin interacts with NADE. Mol Cell Neurosci 2007 (in press)
- 3) Kamimura T, Tohyama J, Oishi M, Akasaka N, Kanazawa O, Sasagawa M, Kato M, Ohno K, Masuda H, Kameyama S, Uchiyama M. Magnetoencephalography in patients with tuberous sclerosis and localization-related epilepsy. Epilepsia 47:99-997, 2006

2. 学会発表

- 1) 大野耕策 「発達障害と分子遺伝学」 シンポジウム 自閉症スペクトラムを理解し分子解明をめざそう 第 28 回日本生物学精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学学会大会 合同年会 名古屋 平成 18 年 9 月 14 日

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 ラットの脳・腎病変における tuberin の上・下流の信号伝達（第2報）： Western ブロットニングによる検討

分担研究者 水口 雅 東京大学医学部附属病院小児科助教授

研究要旨

結節性硬化症のモデル動物である Eker ラットの脳・腎病変における tuberin の上・下流の信号伝達を、リン酸化特異的抗体を用いた Western ブロットニングにより検討した。Eker ラットの非癌部腎皮質と大脳では Akt、tuberin、mTOR、p70S6K、S6 の発現、リン酸化の変動は認められなかった。Eker ラット腎癌では Akt リン酸化低下、tuberin 発現低下、mTOR 発現上昇、S6 リン酸化上昇が見られたが、p70S6K リン酸化は増えておらず、tuberin 下流から上流への negative feedback、および p70S6K 以外の因子による S6 活性化が示唆された。

伊藤雅之、後藤雄一

国立精神・神経センター神経研究所

疾病研究第2部

高嶋幸男

柳川療育センター

小林敏之、樋野興夫

順天堂大学医学部第二病理学、

癌研究所実験病理部

り、ヒト TSC の病変（腫瘍、過誤組織）では tuberin 機能低下のため下流経路が異常に活性化し、S6 リン酸化が亢進することが示された。このうち腫瘍は two hit メカニズムにより生じ、上流経路（PI3K/Akt）の活性は negative feedback 機構により低下する可能性が指摘されている。いっぽう、脳の皮質結節（過誤組織）では second hit は無く、PI3K/Akt 経路の活性化により tuberin のリン酸化を介した恒常的不活性化が生じるとの仮説が提唱されている。

Eker ラットは *Tsc2* 機能喪失変異に起因する TSC モデル動物である。今回われわれは、in vivo でこれらの仮説があてはまるかどうかを検証する目的で、Eker ラットの脳・腎病変における insulin 情報伝達系の亢進・低下を、リン酸化蛋白特異的

A. 研究目的

結節性硬化症 (TSC) の原因遺伝子 *TSC2* の蛋白産物 tuberin は細胞内で *TSC1* の産物 hamartin と複合体を形成する。この複合体は insulin 情報伝達系の中流に位置し、この系を negative に制御する。複合体の上流には insulin/ PI3K/ Akt、下流には Rheb/ mTOR/ p70S6K/ S6 がある。従来の研究によ

抗体を用いて Western ブロットニングにより観察した。特に腫瘍と過誤組織の異同に注目し、両者の比較検討を行った。

B. 研究方法

2 歳齢の Eker ラットの腎細胞癌（悪性腫瘍）、非癌部腎皮質、大脳皮質（肉眼的に正常な部分）、および正常対照ラットの腎皮質、大脳皮質から組織 homogenate を作成し、蛋白濃度を測定した。蛋白を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で展開した後、PVDF 膜にブロットし、Akt (Ser473)、tuberin (Thr1462)、mTOR (Ser2448)、p70S6K (Thr389)、S6 (Ser235/236) のリン酸化特異的抗体（Cell Signaling Technology 社製）および各々の全蛋白を認識する抗体（tuberin 抗体は自家作製、他は Cell Signaling Technology 社製）を用いて免疫染色し、horseradish peroxidase と diaminobenzidine を用いて発色した。

動物の取扱いは癌研究所の取り扱い規約に則って行った。

C. 研究結果

1. 腎臓（図1）

Akt タンパク量に関して、正常対照と Eker ラットの間、非癌部腎皮質と腎癌の間で差は認められなかった。リン酸化 Akt に関して、正常対照と Eker ラット非癌部腎皮質の間に差は認められなかったが、腎癌は非癌部腎皮質に比し低下していた。

Tuberin およびリン酸化 tuberin に関して、正常対照と Eker ラット非癌部腎皮質の間に差は認められなかったが、腎癌は非癌部腎皮質に比し低下していた。

mTOR およびリン酸化 mTOR に関して、正常対照と Eker ラット非癌部腎皮質ではバンドが検出されなかったが、腎癌では検出可能なレベルまで増加していた。

p70S6K タンパク量に関して正常対照と Eker ラットの間、非癌部腎皮質と腎癌の間で差は認められなかった。リン酸化 p70S6K は、正常対照と Eker ラット非癌部腎皮質の間で差を認めなかったが、Eker ラット腎癌は非癌部腎皮質に比し低下していた。

S6 蛋白は doublet として検出され、リン酸化の有無を反映すると考えられた。高分子の S6 およびリン酸化 S6 抗体で認識される蛋白は Eker ラット腎癌で正常対照および Eker ラット非癌部に比し著増していた。

2. 脳（図2）

Akt タンパク量、リン酸化 Akt、tuberin タンパク量、リン酸化 tuberin、mTOR タンパク量、p70S6K タンパク量、リン酸化 p70S6K、S6 タンパク量に関して、正常対照と Eker ラットの間で差は認められなかった。

リン酸化 mTOR とリン酸化 S6 に関しては、正常対照の間、Eker ラットの間でそれぞれ個体差があったが、正常対照と Eker ラットの差は明らかでなかった。

D. 考察

本年度の Western ブロットニングによる研究結果は、昨年度までの免疫組織化学による研究結果とほぼ一致した。すなわち腎癌組織では tuberin 量が著しく低下しており、second hit の結果 tuberin 発現が失われたためと理解された。また

下流の mTOR と S6 が予想どおり活性化していた。しかし両者の間に介在すると予想された p70S6K の活性はむしろ低下しており、S6 活性化は p70S6K 以外の因子によると考えられた。Tuberin 上流の Akt 活性は腎癌で低下しており、これは下流から上流に向かっての negative feedback によるものと考えられた。

今回の研究では Eker ラット脳の皮質結節を材料とした検討ができず、大脳の非病変部と思われる部位の検討にとどまった。このような脳組織においては tuberin の発現とリン酸化、および tuberin 上流・下流のシグナルに有意な変化はいつさい認められなかった。ヒトの TSC における tuberin 発現は controversial であるが、われわれは一部の症例でその発現低下を認めている。Eker ラットがヒト TSC 患者と異なり、てんかんや知的障害などの神経症状を呈さない理由として、このことが関与しているかも知れない。

E. 結論

Eker ラットの脳・腎臓の非病変部では、tuberin 上流・下流のシグナルに顕著な変化は生じていない。

腎癌では上流 (Akt) の活性低下、下流 (mTOR、S6) の活性化が生じており、下流から上流に向かっての negative feedback を示唆した。p70S6K 活性は腎癌で低下しており、S6 活性化に p70S6K 以外の因子の関与が推測された。

F. 研究発表

1) Mizuguchi M. Abnormal giant cells in the cerebral lesions of tuberous sclerosis

complex. *Congenital Anomalies* in press.

2) 水口雅: [小児疾患の診断治療基準第 3 版] 結節性硬化症. *小児内科* 2006;38(Suppl): 664-665.

図 1. 正常対照(Control)および Eker ラット腎における各因子の発現とリン酸化

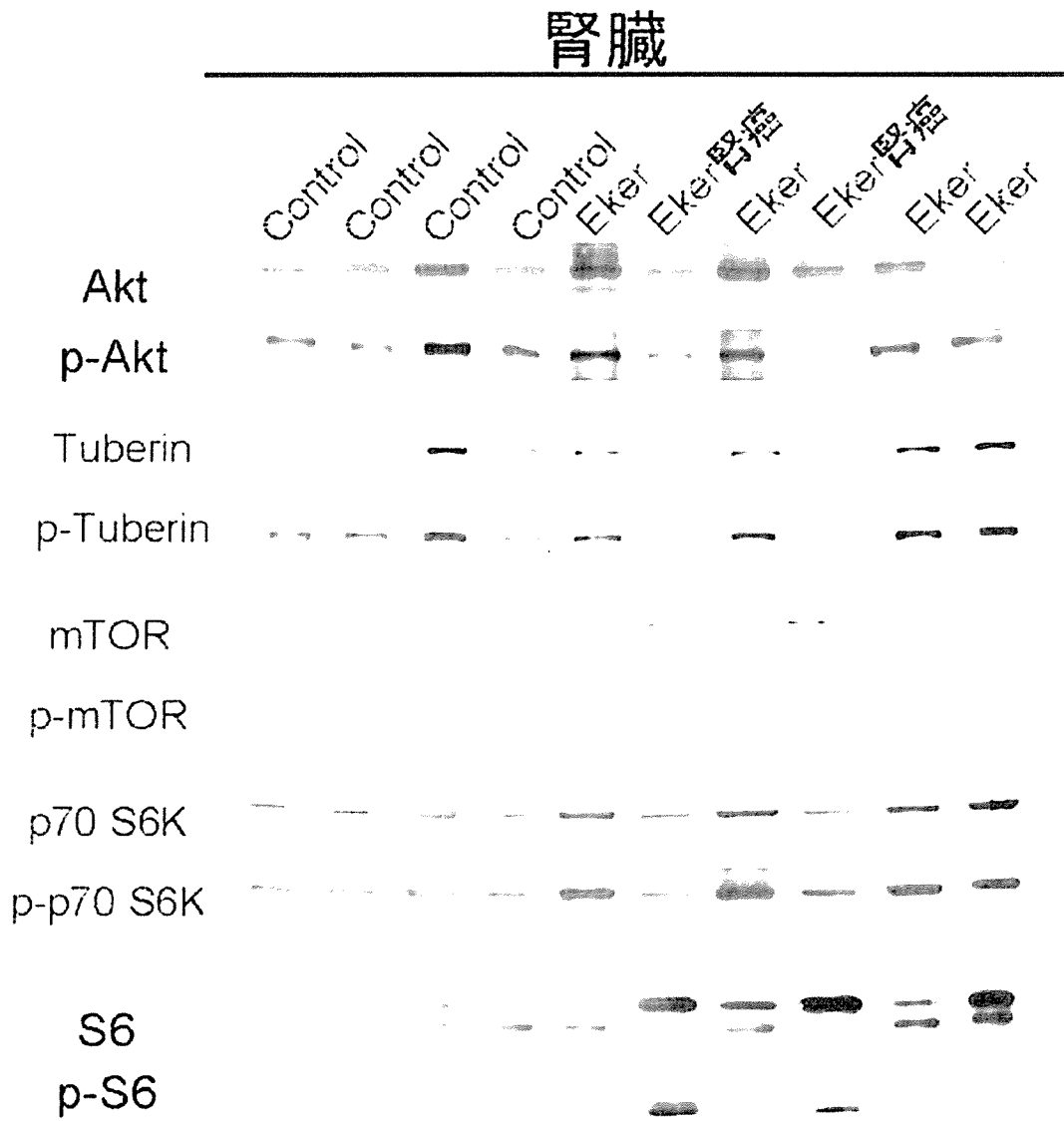
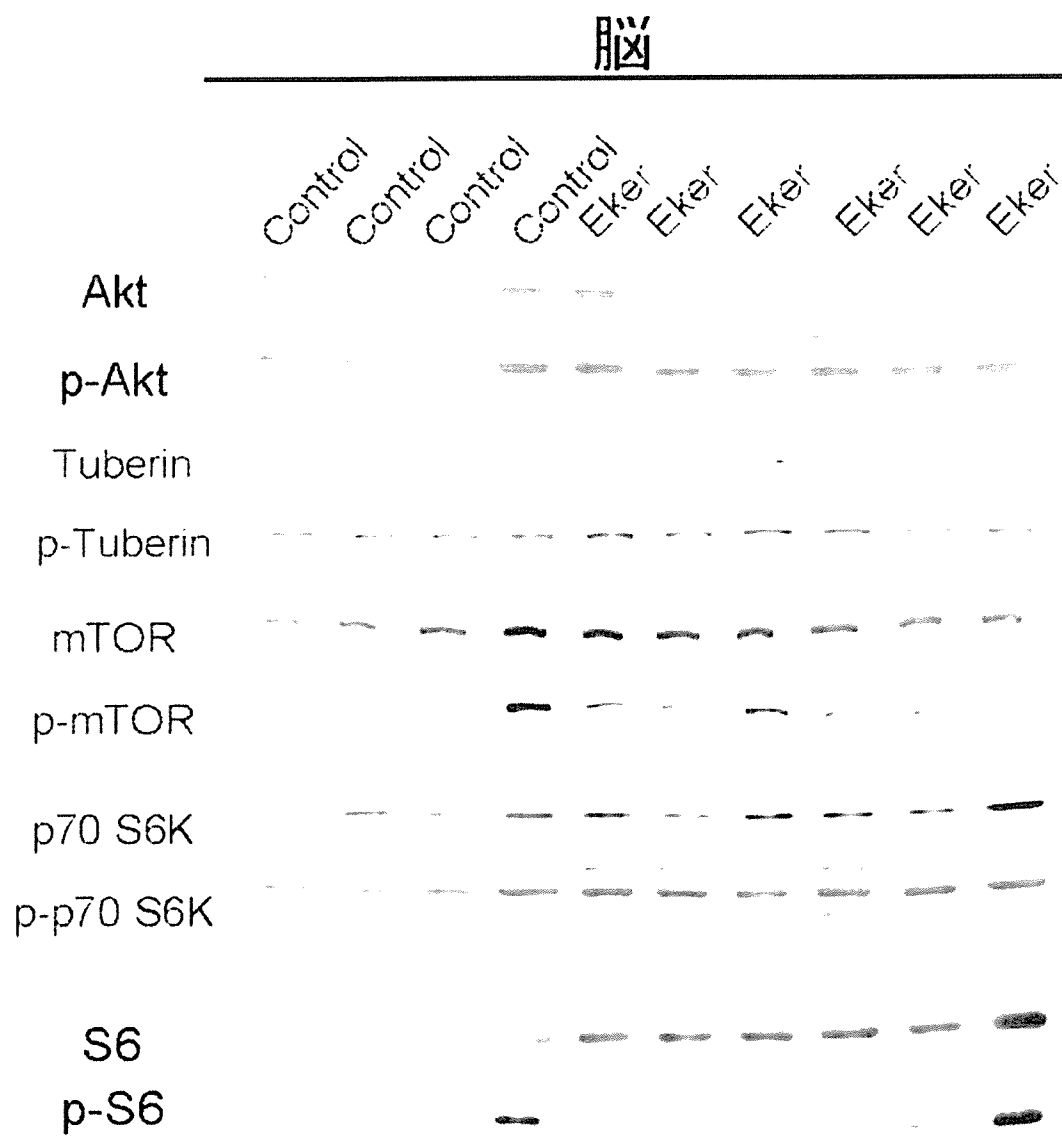


図 2. 正常対照(Control)および Eker ラット大脳における各因子の発現とリン酸化



結節性硬化症：疾患モデルからヒト疾患への掛け橋

分担研究者 樋野興夫 順天堂大学医学部 病理・腫瘍学教授

研究要旨

昨年度に引き続き、結節性硬化症（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進め、ヒト結節性硬化症の分子標的治療戦略の新たな展開が見られた。また、新規の遺伝性「皮膚症候群」のモデルの起始遺伝子(Bhd)の解明を TSC 遺伝子機能との関連において進めた。

A. 研究目的

「遺伝性がん」でも「単因子病でありながら多因子病」の特徴を持つ。

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ある発がん過程は、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。浸透率の高い遺伝性がんでも予防・治療の介入が出来る根拠がここにある。

がん化細胞は病理学的には多段階的に成長する。がん化の起始細胞の進展には、境遇が大切である（癌性化境遇）。「病気のリスクがある」とことと実際に「病気が発症する」とは違う。我々は、「遺伝子型（genotype）」と「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を提唱するものである。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。この演出型（dramatype）発現のメカニズムの解明は、遺伝性がんの予防・治療法の開発にもつながるものと考ええる。

本研究の目的は、リファインされた疾患モデルを用いて、その特異点の分子（分子標的）を明らかにし、最終的にはヒト結節性硬化症の治療に資するものである。

B. 研究方法

結節性硬化症（TSC）の二つの原因遺伝子産物（Tsc1:hamartin、Tsc2:tuberin）は複合体を形成し、Rheb/mTOR/S6Kの経路（mTOR経路）を抑制する。遺伝性腎癌モデルである Eker(Tsc2変異)ラット、Tsc2ノックアウトマウスや、TSC患者の病変部では、mTOR経路の恒常的な活性化が生じている。このmTOR経路の遮断がTSCの治療の方策と期待

されており、我々の研究結果からも病態抑制に mTOR 経路の遮断が効果を示すことが予知された。しかしながら一方で、mTOR が予想外に様々な要因からの制御を受けていることや、その機能が多岐にわたることが報告されてきており、長期的な mTOR の機能抑制が個体に及ぼす影響は少なくともと予想される。我々は tuberin の機能の全体像を明らかにすることを目指しており、mTOR に関連しない経路、すなわち新たな治療・予防法の標的となる経路との関連にも注目している。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし

C. 研究結果及び考察

(1) トランスジェニック (Tg)・Eker ラットを用いた解析

ヒト TSC2 変異には数多くのアミノ酸置換型変異が報告されているが、それらは TSC2 産物の機能を明らかにするための重要な手がかりと言える。我々は tuberin の機能を個体レベルで調べるシステムの一つとして、トランスジェニック (Tg)・Eker ラットを用い、様々な Tsc2 の欠失変異体や点突然変異体を導入し、mTOR 経路の遮断とは異なる tuberin の機能的側面を見出そうとするものである。

N525S 変異はパートナーである TSC1 産物との結合や mTOR 経路を抑制する活性を保持する変異であるにも関わらず、発症に関わっていると考えられている。一方、G1556S 変異に関しては、mTOR 経路を抑制する能力を失う変異であるにも関わらず、患者の症状が軽度であることが示唆されてい

る。これらの変異を持つ導入遺伝子 (Tg) のトランスジェニック・ラットの作製を進めたところ、G1556S 型変異の Tg ラットは複数個体得ることができたが、N525S 型変異に関しては胎生致死の誘発により Tg ラットを得ることができなかった。このことから、N525S 変異体は何らかの優性的な活性を示すことが予想され、その優性的な活性が TSC 発症に関わっている可能性が考えられた。

(2) Bhd 欠失腎腫瘍における分子標的の探索；
mTOR 経路の検討

TSC と同様に hamartoma を起こすヒト Birt-Hogg-Dube 症候群の原因遺伝子であるホモログ (Bhd) を変異に持つ新たな遺伝性腎癌モデルを解明した。Nihon ラット由来の Bhd 欠失腎腫瘍細胞株を用い、mTOR 経路遮断の効果を調べた。まず、培養条件下において、mTOR 阻害剤であるラパマイシン処理を行ったところ、S6K1 の Thr389 のリン酸化がほぼ完全に抑制されることを確認した。ヌードマウス皮下移植の実験系において造腫瘍能を示したことから、ラパマイシン投与の効果を調べた。その結果同時に進めた Tsc2 欠失腎腫瘍株の移植系ではほぼ完全に腫瘍が退縮したが、増殖は抑制されるものの、退縮傾向は顕著ではなかった。更に、Bhd 発現腎腫瘍細胞株を樹立し、培養条件下でラパマイシン処理を行ったところ、S6K1 の Thr389 のリン酸化に大きな変化は認めなかった。Tsc2 欠失腎腫瘍の場合と異なり、Bhd 欠失腎腫瘍の場合は mTOR~S6K 経路が細胞の増殖には重要な役割を果たしているものの、生存には必須の経路ではない可能性が考えられた。今後、Bhd 発現細胞株を利用し、Bhd 産物の機能に関する解析を進め、BHD 症候群に対する治療・発症予防の分子標的と

なる新たなシグナル伝達系の特定を進めていく。

D. 結論

「結節性硬化症の制御」の根拠を示し、「結節性硬化症の進展阻止」の実際を示すことにある (Intentional delay)。これまで我々は、結節性硬化症 (TSC) 遺伝子ホモログ (Tsc2) に変異を持つ遺伝性腎癌モデル動物を用い、mTOR 経路の遮断による腫瘍抑制と TSC に対する新たな分子標的経路の可能性を示してきた。

これらの知見に基づいて、難病であるヒト結節性硬化症の治療戦略の構築が具体的に、今後、展開されるものと期待される。

E. 研究発表

1. Hino O., Kobayashi T. and Okimoto K.: Genetic and environmental factors in hereditary predisposition to tumors: a conceptual overview. Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability. Edited by Leon P. Bignold. Birkh 隔 ser Verlag. 269-292, 2006
2. Togashi Y, Kobayashi T, Momose S, Ueda M, Okimoto K, and Hino O.: Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Nihon rat model by introduction of a wild-type Bhd gene. Oncogene 25: 2885-2889, 2006
3. Fujii H, Jiang W, Matsumoto T, Miyai K, Sasahara K, Ohtsuji N. and Hino O.: Birt-Hogg-Dubé gene mutations in human endometrial carcinomas with microsatellite instability. J. Pathology 209: 328-335, 2006
4. Kouchi M., Okimoto K., Matsumoto I., Tanaka K., Yasuba M. and Hino O.: Natural history of the Nihon (*Bhd* gene mutant) rat, a novel model for human Birt-Hogg-Dubé syndrome. Virchow Archives 448: 463-471, 2006
5. Tobita H., Kajino K., Inami K., Kano S., Yasen M., Imamura O., Kinoshita Y. and Hino O.: Gene Expression Profile of dbpA (DNA Binding Protein A) transgenic mice. Int. J. Oncology, 29:673-679, 2006.
6. Shiomi K., Miyamoto H., Segawa T., Hagiwara Y., Ota A., Maeda M., Takahashi K., Masuda K., Sakao Y. and Hino O.: Novel ELISA system for detection of "N-ERC/mesothelin" in the sera of mesothelioma patients. Cancer Sci, 97: 928-932, 2006
7. Matsumoto F., Fujii H., Abe M., Kajino K., Kobayashi T., Matsumoto T., Ikeda K. and Hino O.: A novel tumor marker, Niban, is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto's thyroiditis. Human Pathology, 37: 1592-1600, 2006
8. Maeda M. and Hino O.: Molecular tumor markers for Asbestos-related mesothelioma; Serum diagnostic markers. Pathology International, 56: 649-654, 2006
9. Hino O.: Models for genitourinary cancer-hereditary renal carcinogenesis-The Cancer Handbook Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd. 2006
10. Chao T., Saji M., Inoue H., Minami K., Kobayashi T., Hino O. and Okabe H.: Neuromuscular abundance of RB1CC1

- contributes to the non-proliferating enlarged cell phenotype through both RB1 maintenance and TSC1 degradation. *Int. J. Molecular Medicine* 18: 425-432, 2006
11. Cao Y., Kamioka Y., Yokoi N., Kobayashi T., Hino O., Onodera M., Mochizuki N. and Nakae J.: Intraction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of the mammalian target of rapamycin/p70 S6K pathway. *J. Biological Chemistry* 281: 40242-40251, 2006
 12. Watanabe R., Tambe Y., Inoue H., Isono T., Haneda M., Isobe K., Kobayashi T., Hino O., Okabe H. and Chano T.: GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling via tuberous sclerosis complex and controls cell survival under bioenergetic stress. *Int. J. Molecular Medicine* 19: 475-483, 2007
 13. Hino O., Wakabayashi K., Tatematsu M. and Tajima K.: 'On Environmental carcinogens: from an era of Risk evaluation to an era of risk management' Tokyo, Japan, 29 July 2006. *Cancer Sci.* in press.
 14. Jiang W., Fujii H., Matsumoto T., Ohtsuji N., Tsurumaru M. and Hino O.: Birt-Hogg-Dubé (BHD) gene mutations in human gastric cancer with high frequency microsatellite instability. *Cancer Letter*, in press
 15. Nakanishi M., Kajino K., Ikesue M., Hagiwara Y., Kuwahara M., Mitani H., Horikoshi Y., Segawa T., Kon S., Maeda M., Baiyin T., Abe M., Yokoyama M. and Hino O.: Establishment of the ELISA system to detect the amino terminal secretory form of rat Erc/Mesothelin *Cancer Science*, in press
 16. Maeda M., and Hino O.: Blood tests for Asbestos-related mesothelioma. *Oncology* (in press)
1. 樋野興夫：遺伝性がんラットからヒト疾患へ—Translational Research の具体例—。第3回日本癌学会カンファレンス「動物モデルによる新時代のがん研究—発症機構から治療まで」。平成18年3月9日～11日、蓼科
 2. 塩野雅俊、小林敏之、高橋利一、孫 国東、阿部雅明、小橋（張）丹青、王、朴 香花、高木裕美子、百瀬修二、上田正次、樋野興夫：トランスジェニック Eker ラットを用いたヒト結節性硬化症に関わるアミノ酸置換型 Tsc 2 変異の解析。第3回日本癌学会カンファレンス「動物モデルによる新時代のがん研究—発症機構から治療まで」。平成18年3月9日～11日、蓼科（ポスター）
 3. 高木裕美子、小林敏之、小橋（張）丹青、多田昇弘、樋野興夫：Bhd 欠損腎腫瘍における mTOR 経路の解析。第25回分子病理学研究会「広々とした病理学—地境を広げて—」、平成18年8月4日～5日、東京（ポスター）
 4. 樋野興夫：ラット遺伝性腎発がんの本態解明へ。第23回日本疾患モデル学会総会、平成18年11月30日～12月1日、伊香保（シンポジウム講演）
 5. 塩野雅俊、小林敏之、高橋利一、孫 国東、阿部雅明、小橋（張）丹青、王、朴 香花、高木裕美子、百瀬修二、上田正次、樋野興夫：トランスジェニック Eker ラットを用いたヒト結節性硬化症に関わるアミノ酸置換型 Tsc 2 変異の解析。第3回日本癌学会カンファレンス

ス「動物モデルによる新時代のがん研究—発症機構から治療まで」。平成18年3月9日～11日、蓼科（ポスター）

6. 高木裕美子、小林敏之、小橋（張）丹青、多田昇弘、樋野興夫：Bhd 欠損腎腫瘍におけるmTOR 経路の解析。第25回分子病理学研究会「広々とした病理学—地境を広げて—」、平成18年8月4日～5日、東京（ポスター）
7. 樋野興夫：ラット遺伝性腎発がんの本態解明へ。第23回日本疾患モデル学会総会、平成18年11月30日～12月1日、伊香保（シンポジウム講演）

F. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許取得： 特許申請中
- 2) 実用新案登録： 特になし
- 3) その他

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

結節性硬化症における p40
—p40 の治療薬としての可能性—

分担研究者 片山 一朗 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科教授

研究要旨

我々は以前より結節性硬化症において特異的に減少している蛋白 P40 について検討してきた。P40 は結節性硬化症患者病変部由来培養細胞において減少しているのみならず、患者リンパ球においても著明に減少していた。今回我々が調べた結果では患者 59 人中 30 人にリンパ球 P40 の著明な減少が認められ、これは、正常人における減少 19 人中の 2 人に比して優位に多かった。

そこで、P40 と tuberin、hamartin との関係を調べる為に、P40 と tuberin、hamartin の抗体を用いて共沈実験を試行するとともに、P40 と tuberin をそれぞれをノックダウンし、P40 と tuberin hamartin のタンパク量の変化を検討した。その結果、P40 と hamartin は結合しており、P40 をノックダウンすることにより、tuberin 特に非リン酸化の tuberin が増加することがわかった。

金田眞理 大阪大学医学部皮膚科

A. 研究目的

我々は以前より結節性硬化症において特異的に減少している蛋白 P40 について検討してきた。以前より報告しているように P40 は結節性硬化症患者病変部由来培養細胞において、減少しており（図 1）、また患者リンパ球においても著明に減少していた（図 2）。今回我々が調べた結果では患者 59 人中 30 人にリンパ球 P40 の著明な減少が認められ、これは、正常人における減少 19 人中の 2 人に比して優位に多かった。そこで、P40

の結節性硬化症における作用を検討するために、P40 と tuberin hamartin との関係を調べた。

B. 研究方法

まず、P40 と tuberin hamartin の抗体を用いて共沈実験を試行するとともに、P40 と tuberin それぞれをノックダウンし、P40 と tuberin、hamartin のタンパク量の変化を検討した。

immune precipitation : 6cm デイッシュに培養した HeLa 細胞を EDTA trypsin ではがして、RIPA 処理したものの上清にそれぞれ P40、tuberin、hamartin の抗体を加えて、セファロース G で沈殿させたものにサンプルバッファーを加えて溶かした上清をそれぞれのサンプルとした。

Western blotting : それぞれのサンプルをポリアクリルアミドゲル上で分離して通常の方法でトランスファーを行い、P40 と tuberin hamartin、リン酸化 tuberin に対する抗体を用いて Western blotting を施行した。発色は ECL 法で行った。

Knocked down : P40, tuberin, hamartin の SiRNA を SiFECTOR を用いて HeLa 細胞に導入し、導入後 72 時間後の細胞を集めてきて RIPA 処理したものの上清にサンプルバッファーを加えたものを Western blotting のサンプルとした。

(倫理面への配慮)

患者サンプルを使用する場合は、患者の同意を得た上で、切除標本の一部を使用し、さらに、患者個人が特定できないように注意した。

C. 研究結果

共沈実験 抗 P40 抗体の沈殿物の中に P40 と hamartin が認められ、逆に抗 hamartin 抗体の沈殿物の中に hamartin と同時に P40 が認められ、P40 と hamartin が蛋白レベルで結合している可能性が示唆された(図 1)。

Knocked down : p40 の SiRNA でノックダウンした HeLa 細胞では tuberin が著明に増加していた

(図 2)。Hamartin は軽度増加か不変であった。そこで、増加している tuberin がリン酸化した tuberin, か非リン酸化 tuberin, かを調べるために、phospho-tuberin(Thr1462) に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行した。その結果リン酸化した tuberin, は増加しておらず、非リン酸化 tuberin が増加していることが確認された。

Facs analysis : 遊離の pP40 の作用を調べるために、正常の線維芽細胞、結節性硬化症患者病変部由来培養細胞で P40 を強発現させて細胞周期に及ぼす影響を検討した。その結果正常細胞で P40 を強発現させてもアポトーシスに大きな変化は認められなかったが、結節性硬化症患者由来細胞で P40 を強発現させるとアポトーシスの著明な増加を認めた(表 1)。従って、遊離の P40 はアポトーシスを誘導し、P40 を結合させる hamartin 欠損細胞ではその変化が著明に現れるものと考えられた。一方 tuberin をノックダウンすると hamartin の発現量も減少する(図 4)。従って、tuberin 欠損細胞も hamartin 欠損細胞と同様にアポトーシスの増加が著明におこったものと考えられた。

D. 考察および結論

今回我々は共沈実験より p40 と hamartin が蛋白レベルで結合して、遊離の p40 の作用を抑制している可能性を報告した。すなわち、一つの仮説として、

P40 は hamartin と結合している状態では、遊離の P40 の作用が抑制されている。P40 が減少すると、遊離の hamartin が増加し、tuberin と

hamartin の結合が増加する。その結果非リン酸化 tuberin が相対的に増加する。いっぽう hamartin との結合がはずれた遊離の P40 は細胞にアポトーシスを誘導する (図 5)。従って結節性硬化症のように hamartin が少ない細胞では p40 を強発現させると著明なアポトーシスの増加が認められ、アポトーシスに陥った細胞は取り除かれてしまうために、結果的に、p40 が少ない細胞のみが残ってくるのではないかと、考えられた。従って、結節性硬化症の患者細胞に p40 を過剰投与する事により、腫瘍細胞にアポトーシスを引き起こし、本症の腫瘍の治療薬として利用できる可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 金田眞理、片山一朗 血管線維腫. 皮膚病診療 28(4);443-446, 2006
2. 田崎典子、金田眞理、片山一朗 デルマトームに沿って広範囲な皮疹を認めた先天性 dermal melanocytosis. 皮膚病診療 28 (10); 1209-1212, 2006

Coprecipitation

methods

HeLa



IP : anti-Tuberin Ab
 anti-Hamartin Ab
 anti p40 Ab
 nonimmune rabbit IgG

Western: anti-tuberin Ab
 anti-hamartin Ab
 anti-p40 Ab

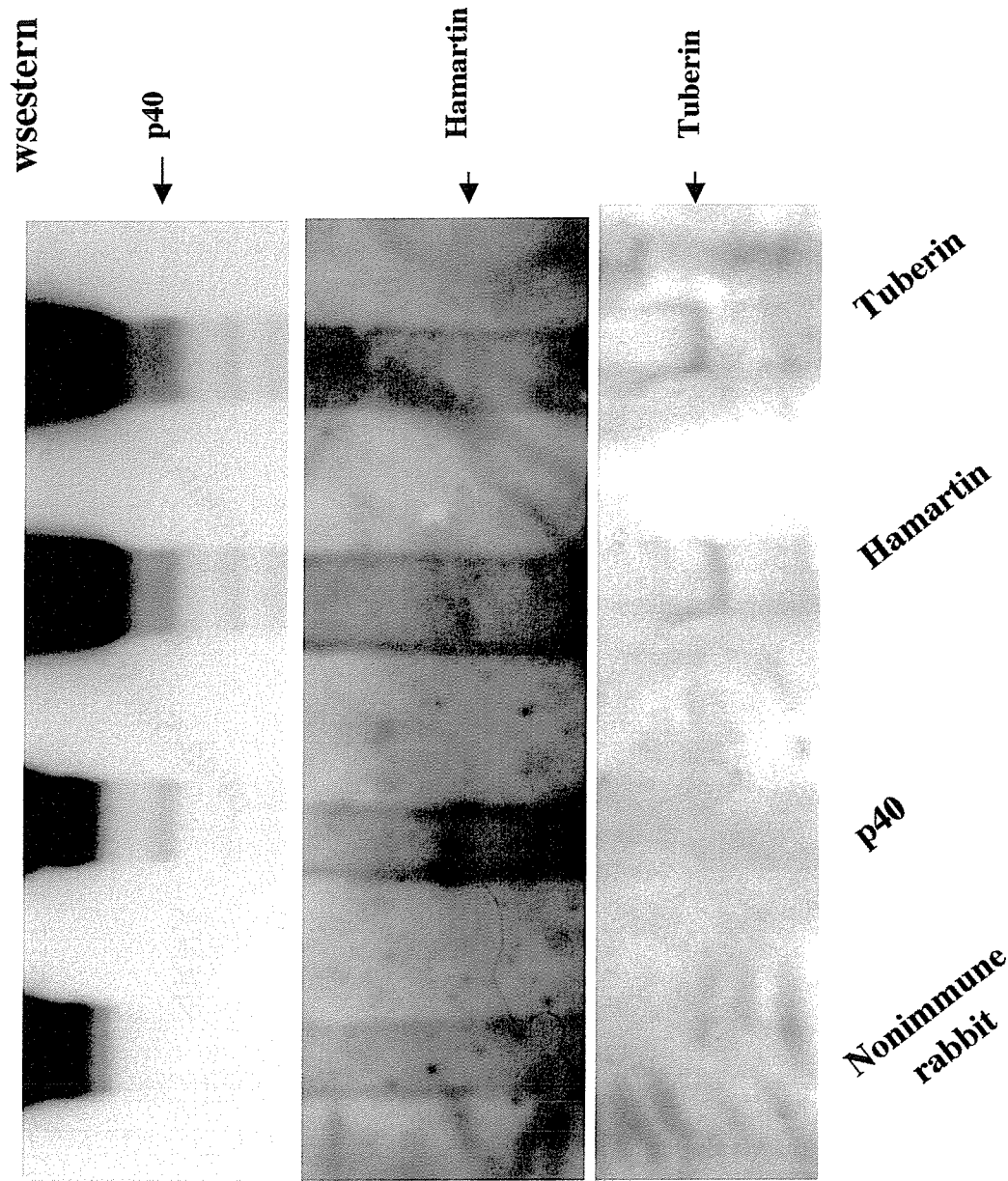


図1 Coprecipitation : HeLa 細胞をp40, hamartin , tuberin に対する抗体及びnon-immune rabbit IgGを用いて免疫沈降したサンプルをそれぞれp40, hamartin , tuberin に対する抗体を用いて western blotting を施行した。p40,の沈殿物にhamartin が認められ、 hamartin の沈殿物の中に p40が認められる。

Knocked down of p40

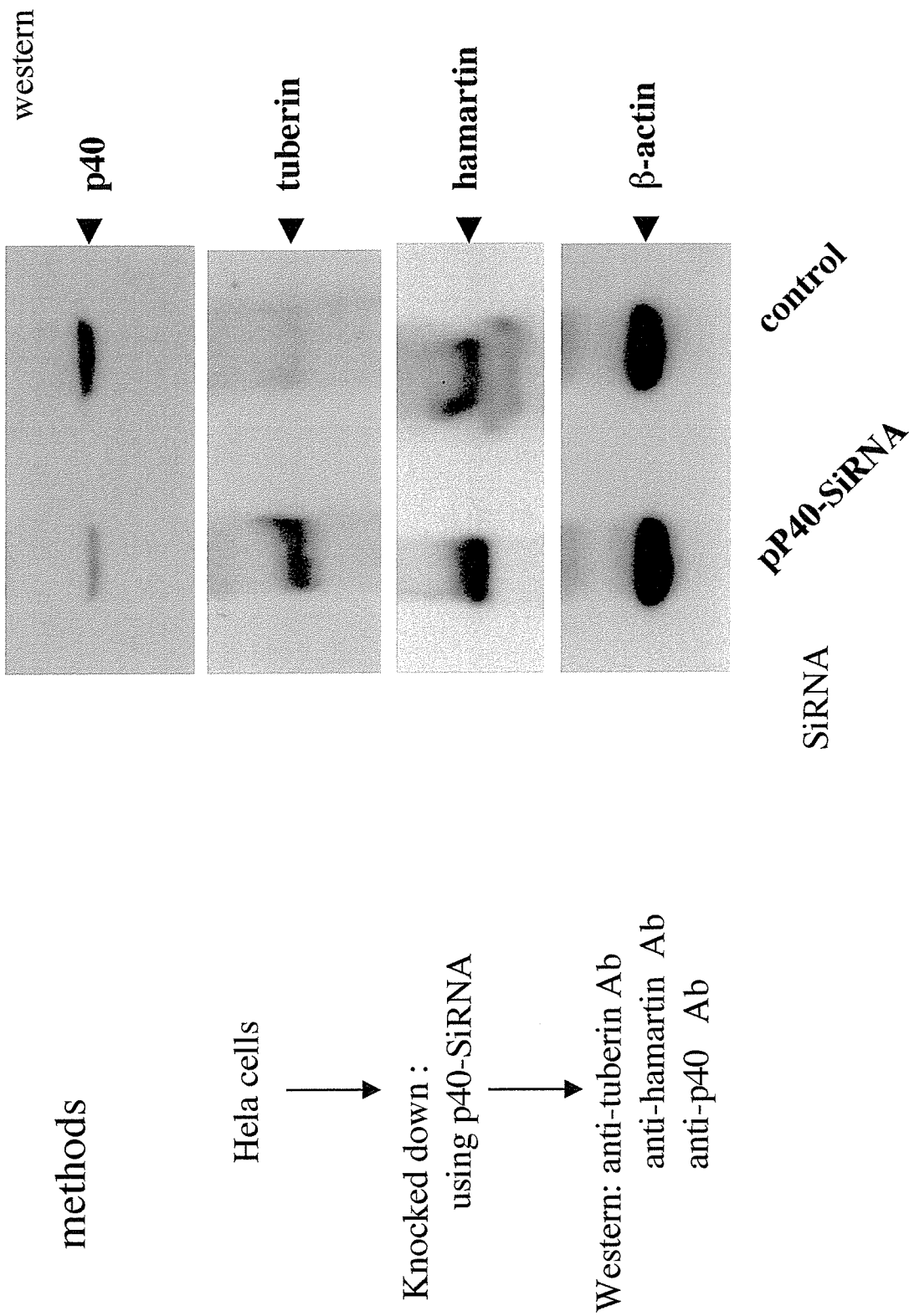


図2 Knocked down : p40-SiRNAをHeLa細胞に導入してp40, をノックダウンした細胞をそれぞれ、p40, hamartin, tuberin に対する抗体を用いてウエスタンブロットティングを施行した。p40をノックダウンした細胞では、tuberinの著明な増加 hamartin の軽度増加を認められた。

Knocked down of p40

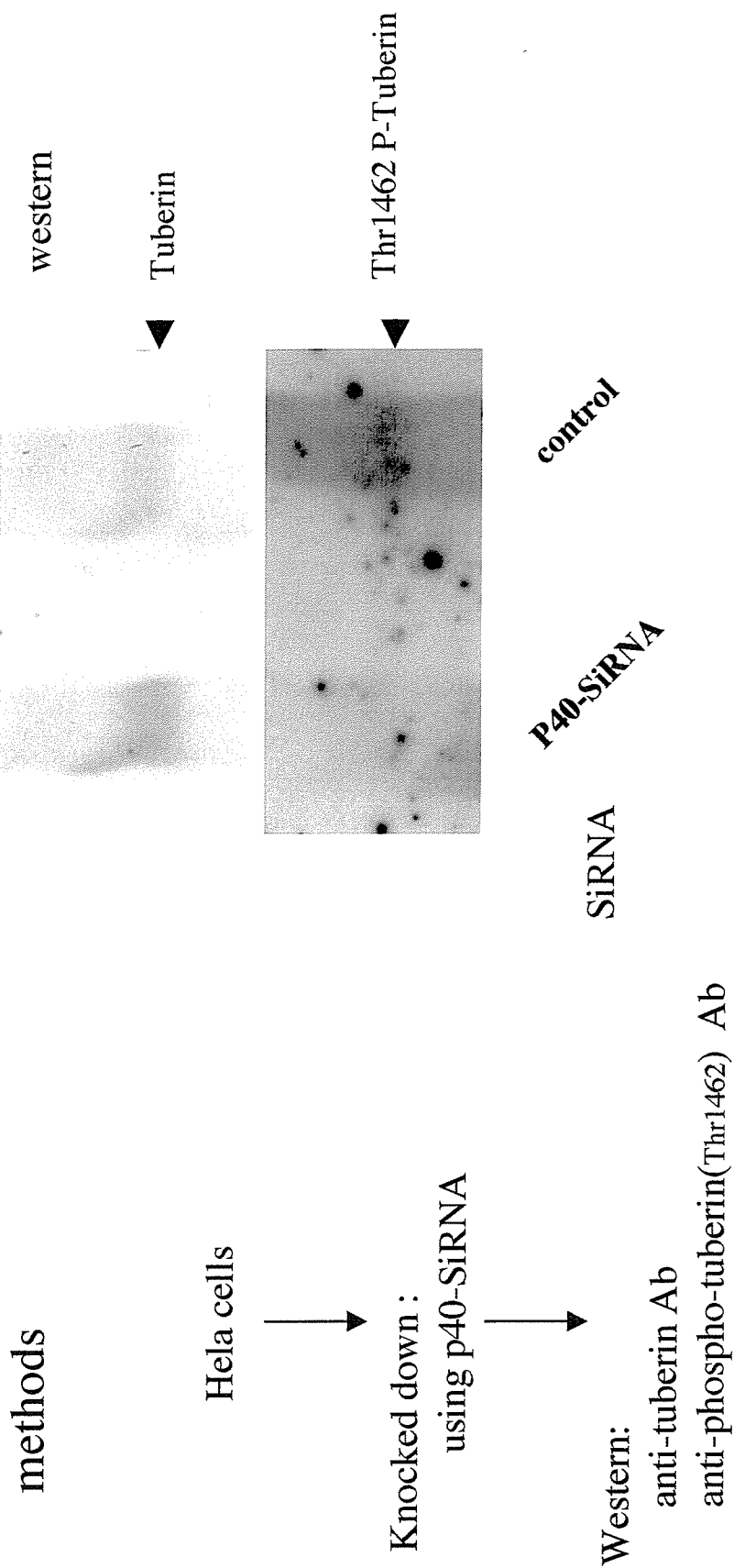


図3 Knocked down : p40-SiRNAをHeLa細胞に導入してp40をノックダウンした細胞をそれぞれ tuberin phosph-tuberin に対する抗体を用いてウエスタンブロットングを施行した。p40, をノックダウンした細胞では、tuberinの増加 phosph-tuberin の減少が認められた。