

荷重機構に関しても、従来はフォースゲージを用いて脛骨に25Nの荷重をかけていたが、圧縮方向が一定でないため再現性誤差が生じる可能性があったため、本年度回転型荷重機構の開発に取り組んだ。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いられる超音波はすでに臨床で用いられているものと周波数・音圧ともにかかわらず安全性は確立されている。また、検査の際に負荷される荷重は被検者が日常生活において常に受けている荷重より充分小さいものでありこの検査による骨への損傷は無く安全である。

検査に際しては対象者および対象者家族に口頭および文書を用いて説明を行い、十分に理解し同意を得られたもののみを対象とする。また、全研究を通して患者の個人情報公開されない。

動物実験に関しては動物試験受託者よりAAALAC Internationalの許可を得た。

C. 研究結果

基礎実験では、経直腸用シングルプローブにおいても金属表面のエコートラッキングが可能でありミクロンの精度で面変化も検出可能であった。このことから新たに骨計測用プローブの開発を行い、小型プローブの音響特性を評価した結果、中心周波数7.47MHz、比帯域74.7%、素子感度-30.7dB、静電容量700pFと骨表面波形を取得するために十分な特性、感度があることが実証された。また、実際の脛骨測定においても既存の電子プローブと遜色のないエコートラッキング測定が可能であった。

新規下肢保持具では近位部と遠位部を既存のものと比較し局所的に保持することに成功し、25N荷重による回旋角度は脛骨骨幹部上に設置したアングルメーターにて0.1度以下の回旋で、十分な保持力を有していることが実証された。また、これらの臨床健常骨測定において測定中・測定後の痛みや不快感を残すことはなく、安全性に問題は全く見られなかった。

これらのプローブ、治具を用いた健常脛骨における測定の結果、5回計測において標準偏差0.007度と既存測定の0.015度に対して2倍程度の測定再現性が実現された。

また、小型マトリックスプローブの測定精度評価にあたり、測定対象物に表面を研磨したアルミニウム平板と軟部組織を除去した兎の脛骨を使用した。結果は横軸にLaser変位計より計測した傾斜

角、縦軸にマトリックスプローブより算出した傾斜角をとり、5回計測した結果を表にプロットし相関関係を評価した。アルミニウム平板の結果はR2乗が0.9966、直線の傾きが1.01で、兎脛骨では、R2乗が0.996、直線の傾きが0.986であった。

先天性脛骨偽関節症の測定において、骨幹部部の狭小した部位での計測を可能にする小型プローブとより高精度な計測を可能とする固定治具が必要であった。新たに開発した骨計測用プローブでは既存のプローブと遜色のない精度で狭小部位での計測が可能であり、下肢固定治具においては支持部位の局所化によっても荷重に対し安定した固定性を有していた。

先天性脛骨偽関節測定用に新たなプローブと下肢固定治具の開発を行い、これらが偽関節部の剛性測定における要求を満たしていることを明らかにした。

今後臨床応用していく。

D. 健康危険情報

(分担研究報告にて記入せず)

E. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J: Treatment of Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia-A Multi-Center Study in Japan- Journal of Pediatric Orthopaedics. 25 (2): 219-24, 2005 Mar-Apr.

Ohnishi I, Kurokawa T: Measurement of the tensile forces during bone lengthening. Clinical Biomechanics, 20 (4), 421-427, 2005

S. Ohashi, I. Ohnishi, T. Kageyama: The Effect of Vascularity on the Canine Distracted Tibial Callus Consolidation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 438, 253-259, 2005

Matsuyama J, Ohnishi I, Kageyama T, Oshida H, Suwabe T, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005

Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005

- Akimitsu Harada, Ryoichi Sakai, Koichi Miyasaka, Toshiki Ohtsuka, Yoshihiro Yoshikawa, Juntaro Matsuyama, **Isao Ohnishi**, Kozo Nakamura: A New Method for Measuring Bone Strength using Echo-Tracking, Proceedings of the IEEE, Vancouver, Canada, October, 2006,13-16.
- Matsuyama J, **Ohnishi I**, Sakai R, Suzuki H, Harada A, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. *Med Eng Phys* 2006;28(6):588-95.
- Ohashi, S., **Ohnishi, I.**, Kageyama, T., Imai, K. and Nakamura, K., 2007. Distraction osteogenesis promotes angiogenesis in the surrounding muscles. *Clin Orthop Relat Res* 454, 223-229.
- Juntaro Matsuyama, **Isao Ohnishi**, Ryoichi Sakai, Masahiko Bessho, Takuya Matsumoto, Koichi Miyasaka, Akimitsu Harada, Satoru Ohashi, Kozo Nakamura. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound in Medicine and Biology* 34(5), 775-783, 2008
- CT・CAD/有限要素法解析を用いた創外固定ピン応力の検討-非対称ピンプロファイルはピンと骨の界面における応力集中を軽減する、大橋 暁、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、松山順太郎、中村耕三、日本創外固定・骨延長学会雑誌 19:175 (2008)
2. 学会発表
- A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking. Matsuyama, J; **Ohnishi, I**; Sakai, R; Miyasaka, K; Harada, A; Bessho, M; Ohashi, S; Matsumoto, T; Nakamura, K. The 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Poster session 2007. San Diego
- 超音波エコートラッキングを用いた骨癒合判定法、松山順太郎・大西五三男・大橋 暁、別所雅彦・松本卓也・中村耕三、第79回日本整形外科学会学術集会 シンポジウム 2006 横浜
- A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking. Matsuyama J, Ohnishi I, Ohashi S, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K: 第32回日本骨折治療学会 シンポジウム 2006 仙台
- A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking: Matsuyama J, Ohnishi I, Ohashi S, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K, 8th EFFORT CONGRESS, FLORENCE, ITALY 2007
- R. Sakai, K. Miyasaka, H. Suzuki, T. Ohtsuka, A. Harada, Y. Yoshikawa, J. Matsuyama, **I. Ohnishi**, K. Nakamura, A Minute Bone Bending Angle Measuring Method using Echo-Tracking for Assessment Bone Strength, Transactions of the IEEE International Ultrasonics Symposium, New York, 2007
- CT有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価—骨強度基準値作成に関する予備的研究：金子雅子・大西五三男・別所雅彦・松本卓也・中村耕三、第10回日本骨粗鬆症学会 2008 大阪
- 3次元CT画像を基にした管骨変形評価法：飛田健治・大西五三男・別所雅彦・松本卓也・大橋 暁・中村耕三、第21回日本創外固定・骨延長学会 2008 横浜
- Echo tracking法を用いた骨強度判定の改良：飛田健治・大西五三男・別所雅彦・松本卓也・大橋 暁・中村耕三、第21回日本創外固定・骨延長学会 2008 横浜
- 超音波エコートラッキング法を用いた骨癒合判定：松山順太郎・大西五三男・大橋 暁・別所雅彦・松本卓也・中村耕三、第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 京都
- Bessho, M.; Ohnishi, I.; Matsumoto, T.; Ohashi, S.; Tobita, K.; Matsuyama, J.; Nakamura, K.; Prediction of strength and fracture location of the proximal femur by a CT-based nonlinear finite element method – Effect of load direction on hip fracture load and fracture site - . 9th EFFORT congress, Transactions P91, Nice, France (29 May – 1 June, 2008)
- CT画像を用いた有限要素法非線形解析による大腿骨近位部の骨強度評価 荷重・拘束条件の相違による予測骨強度の相違について：別所雅彦、大西五三男、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、松山順太郎、中村耕三、日本整形外科学会雑誌 (0021-5325) 82 巻 3号 Page S518 (2008.03)、第81回日本整形外科学会学術総会 札幌
- CT/有限要素法による骨強度評価について—大腿骨近位部の薬剤効果判定への応用に関する予備的研究：別所雅彦、大西五三男、松本卓也、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、第10回骨粗鬆症学会 2008 大阪
- CT/有限要素法による脊椎椎体の強度解析—日常生活における骨強度評価への応用：松本卓也、大西五三男、別所雅彦、大橋 暁、飛田健治、

金子雅子、中村耕三、第10回骨粗鬆症学会
2008 大阪

CT/有限要素法を用いた新鮮死体大腿骨標本の予測
骨折部位の検証：別所雅彦、大西五三男、松
本卓也、大橋 暁、飛田健治、金子雅子、中
村耕三、第17回コンピュータ外科学会 2008
東京

大腿骨変形に対する変形矯正コンピュータシミュ
レーション：松本卓也、大西五三男、別所雅
彦、大橋 暁、飛田健治、金子雅子、中村耕三、
第17回コンピュータ外科学会 2008 東京

Satoru Ohashi, Isao Ohnishi, Juntaro Matsuyama,
Masahiko Bessho, Takuya Matsumoto, Kozo
Nakamura: An asymmetrical thread profile external
fixation pin has higher pullout strength than a
symmetrical thread pin, 54th Annual Meeting of
the Orthopaedic Research Society, San Francisco,
California, 2008.3.2-5

Satoru Ohashi, Isao Ohnishi, Juntaro Matsuyama,
Masahiko Bessho, Takuya Matsumoto, Kozo
Nakamura: Stress analysis of the external fixator
pin clusters with different pin thread profiles using
a patient specific CT-CAD/FEM, 9th EFORT
Congress, Nice, France, 2008.5.29-6.1

Universal-Bar-Link 創外固定器を用いた変形矯正に
おける固定器設置位置・角度の誤差許容範囲
の検討：大橋 暁、大西五三男、別所雅彦、
松本卓也、飛田健治、池邊賢治、佐久間一郎、
中村耕三、第21回日本創外固定・骨延長学会
2008 横浜

CT・CAD/有限要素法解析を用いた創外固定ピン応
力の検討—非対称ピンプロファイルはピンと骨
の界面における応力集中を軽減する：大橋 暁、
大西五三男、別所雅彦、松本卓也、飛田健治、
松山順太郎、中村耕三、第81回日本整形外科学
学会学術総会 2008 札幌

超音波を用いたヒト関節軟骨音速測定値に軟骨変
性度が与える影響についての検討：大橋 暁、
大西五三男、松本卓也、別所雅彦、飛田健治、
中村耕三、第23回日本整形外科学会基礎学術
集会 2008 京都

超音波による骨癒合強度定量評価の新しい計測シス

テムの開発：宮坂好一、酒井亮一、鈴木浩之、
大塚利樹、原田烈光、吉川義博、松山順太郎、
大西五三男、中村耕三、第81回日本超音波医
学会 2008 神戸

R. Sakai, K. Miyasaka, E. Minagawa, T. Ohtsuka,
A. Harada, Y. Yoshikawa, J. Matsuyama, K.
Tobita, K. Nakamura, I. Ohnishi: A Minute Bone
Bending Angle Measurement Method using Echo-
Tracking for Assessment of Bone Strength in Vivo,
Transactions of the IEEE International Ultrasonics
Symposium, Beijing, 2008

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得

「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」

出願国：米国

発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大
西五三男

出願人：アロカ（株）：国立大学法人東京大学
出願番号：11/390,788

出願日：2006年3月28日

「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」

出願国：EP（英、仏、独、伊、スイス）

発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大
西五三男

出願人：アロカ（株）：国立大学法人東京大学
出願番号：'06006394.8

出願日：2006年3月28日

「骨検査システムおよび下腿支持装置」

発明者：中村耕三、大西五三男、松山順太郎、
飛田健治、酒井亮一、小川宏治、宮坂好一、
皆川栄一

出願人：アロカ（株）：国立大学法人東京大学
出願番号：特願 2008-188639 号

出願日：2008年7月22日

「超音波診断装置」

発明者：大西五三男、中村耕三、松山順太郎、
飛田健治、酒井亮一

出願人：アロカ（株）：国立大学法人東京大学
出願番号：特願 2008-294434 号

出願日：2008年11月18日

脳腫瘍幹細胞の起源：エピジェネティクス解析

研究分担者 齋藤 清 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科准教授

研究要旨

（目的）脳腫瘍幹細胞がどのような過程を経て他の腫瘍細胞と異なる形質を獲得しているのか、また腫瘍形成過程においていかなる生物学的意義を有しているのか不明な点が多い。エピジェネティックな遺伝子制御は個体の発生や維持、また細胞のがん化に深く関係している。本研究の目的は、脳腫瘍におけるがん幹細胞の生物学的特性に関与するエピジェネティックな発現制御機構の解明とその標的治療の開発である。（方法と結果）我々は神経膠芽腫の臨床検体から neurosphere 法でグリオーマ幹細胞を樹立し、cDNA array (40K), promoter methylation array, Polycomb complex による ChIP on Chip によって網羅的に解析し、可逆的なエピジェネティクスの変化を検索した。その結果、発生分化に関わる重要な遺伝子発現がエピジェネティックな制御を受けていることが示唆された。また、Polycomb complex を阻害する RNA 干渉法や小分子化合物によって、グリオーマ幹細胞から腫瘍細胞への分化が抑制され、NOD-SCID マウス脳への腫瘍形成能を失った。（結語）腫瘍細胞においてエピジェネティクスによる遺伝子発現制御の破綻が観察され、腫瘍塊を形成する細胞集合の中には異なるエピジェネティックな状態にある細胞が存在することを鑑みると、がん幹細胞の自己複製による維持とがん細胞への分化誘導の制御にはエピジェネティクスが重要な役割を果たしていることが推測される。

夏目敦至、伊藤元一、
結城加奈子、藤井正純、
横山英紀、若林俊彦 名古屋大学大学院医学系研究
科脳神経外科
近藤 豊、関戸好孝 愛知県がんセンター研究所
分子腫瘍学

A. 研究目的と考察

ポストシークエンスを向かえた現在、ゲノム解析を踏まえ、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構が注目されている。細胞内にある DNA はヒストンタンパクに巻きつきヌクレオソームを形成し、ヌクレオソーム構造の集合体によってクロマチン構造が形成され、さらにその集合体によって染色体の基本構造が構築されている（図 1）。エピジェネティクスとは A, G, C, T の塩基配列の変化をともなわず、さまざまな環境因子に対応し、遺伝子の発

現を活性化したり不活化したりする後生的修飾機構である。動物の体細胞のゲノムは、例外を除いて同一であり、細胞の個性は、発現遺伝子や発現のない遺伝子の組み合わせによって決定され、その多くはエピジェネティクスによって制御されている。例えば、胚性幹細胞からの組織への分化はエピジェネティクスにより、極めてダイナミックにしかも繊細に決定されているし、エピジェネティクスの破綻は奇形、癌、老化、代謝異常、精神疾患などの疾病につながる。エピジェネティクスの大きな特徴は可塑性があり、人為的に再プログラムさせることが可能である点であり、発生・分化・疾病などの生命現象におけるエピジェネティクスの解明は、医療への応用を考えるうえでの重要課題である。本稿では、癌におけるエピジェネティクスの中心的分子機構である DNA メチル化とヒストン修飾について解説し、グリオーマにおけるエピジェネティクスマーカー

と、治療への応用を紹介する。

癌におけるエピジェネティクスの中心的分子機構— DNA メチル化とヒストン修飾

DNA メチル化はエピジェネティクス機構の一つとしてよく知られている。多くの真核生物ではゲノム中に存在するシトシンの約4%がメチル化されている。そしてゲノム中の全 CpG ジヌクレオチドの60-90%がメチル化されている。したがってゲノム中の CpG ジヌクレオチドの多くはメチル化されていることになるが、メチル化されていないジヌクレオチドがゲノム上にランダムに散らばっているわけではなく、ドメインを形成して存在している。このような CpG が豊富なドメインを CpG アイランドという。CpG アイランドは全ゲノム上の1-2%を占め、多くはエクソンの上流プロモーター領域に存在する。数少ない例外（インプリンティング遺伝子、不活化 X 染色体）を除いて、CpG アイランドは通常、非メチル化状態である¹。DNA メチル化により遺伝子発現が制御されている機構には大きく2つある。①転写調節因子結合障害による制御、② DNA メチル化パターンを認識するメチル化 CpG 結合タンパクの結合による発現抑制である。前者の場合、転写因子の認識する領域がメチル化されていると、メチル化に感受性のある転写因子の結合が阻害される。



図1 染色体の基本構造

このような転写因子として AP-2、c-Myc、E2F、NF κ B が知られている。後者の場合は、DNA メチル化結合タンパクとヒストン修飾が密接に関連しているのでより複雑である。DNA は8量体を形成するコアヒストンタンパクに巻きついていてヌクレオソームを形成する。コアヒストンから立体構造に乏しいアミノ酸残基からなる正に電荷されたヒストンテールが出ていて、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など多岐にわたるヒストンの翻訳後化学修飾を受ける。例えば、アセチル化されると正電荷がなくなり、負電荷の DNA との相互作用が変化したり、隣接したヌクレオソームとの位置関係が変化したりする（図2A）。一般にヒストン H3 Lys9（H3-K9）および H3-K27 のメチル化は遺伝子の転写を抑制し、H3-K4 のメチル化は遺伝子の転写を活性化する。（図2B）。DNA メチル化結合タンパクがメチル化 CpG に結合すると転写抑制に働く。例えばメチル化 CpG に結合する MccP2 はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）および転写コリプレッサー Sin3a と複合体を形成し、メチル化依存的に遺伝子発現を抑制する。さらに DNA メチル化とヒストン修飾とくにヒストンのメチル化や脱アセチル化が機能的に関連して転写抑制を起こしている。癌ではヒストン H3 の Lys9（H3-K9）のメチル化と DNA メチル化が密接に関連し、遺伝子の不活性化のループを形成している^{2,3}（図3左）。このように不活性化される遺伝子には p16、hMLH1、RASSF1、BRCA1 などがある。一方、ポリコム（PcG）タンパク複合体と H3-K27 メチル化に依存した遺伝子不活性化機構も明らかになっている。PcG はショウジョウバエで最初に記述され、

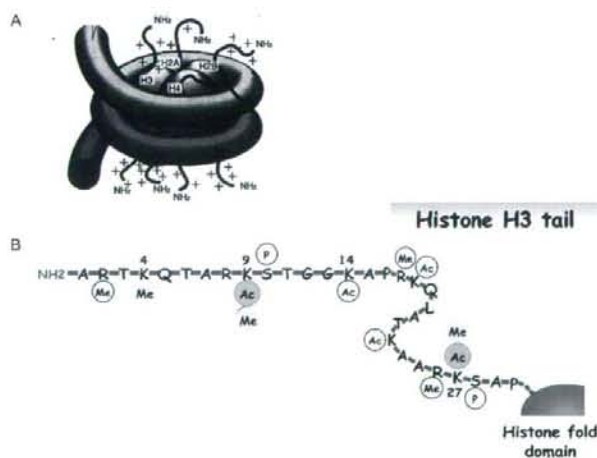


図2 ヒストン修飾

ふつう第1肢のみに見られる櫛状 (comb) 構造をしている sex comb が、この遺伝子変異によって第2肢、第3肢にも見られることに由来している。ヒトの癌の初期段階や胚性幹細胞からの分化過程ではヒストンメチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素を含む PcG タンパク複合体 (Polycomb repressive complex2) のリクルートが H3-K27 のメチル化を誘導し、さらに Polycomb Repressive complex1 のリクルートによって遺伝子の不活化が起こることが報告されている^{4,5} (図3右、図4)。このようにヌクレオソームを基本単位として連なった高次構造体のクロマチンのリモデリングが主要なエピジェネティックなメカニズムである。

エピジェネティクス治療への応用

メチル化阻害剤 5-aza-cytidine, 5-aza-deoxycytidine の臨床応用の歴史は古く、1960年代に既に抗白血病剤としての治療研究がなされている。しかし、高濃度の薬剤投与による毒性が問題となり実用化には至らなかった。最近、副作用のより少ない低濃度での抗腫瘍効果が報告され、今後、他の抗癌剤と

の併用により、より強い効果が期待される。MD アンダーソン癌センターのグループは低濃度の 5-aza-deoxycytidine を繰り返し投与することによって骨髄異形成症候群に高い有効率をあげ、FDA で承認薬になった¹¹。また、我々の研究室では、グリオーマに対するエピジェネティクス腫瘍ワクチン療法への可能性を示唆している。グリオーマは免疫原性が低いために、抗腫瘍免疫にとっては不利な環境にあると考えられている。癌—精巣抗原 (cancer-testis antigens (CTAs)) は精巣以外の正常組織には発現がなく、癌のみに発現する有望な癌関連抗原であるが、グリオーマではその発現はほとんど皆無である。我々は DNA のメチル化などのエピジェネティクスが CTAs の発現調節にも関与していることを見出し、5-aza--deoxycytidine をグリオーマに作用させると CTAs の発現が活性化することを認めた。そして CTA 特異的 CTL によって HLA 拘束性に傷害される。以上により、メチル化阻害剤と癌ワクチン療法の組み合わせで強力な免疫療法の開発の展望を示した¹⁰。一方、HDAC 阻害剤のうち、SAHA, MS-

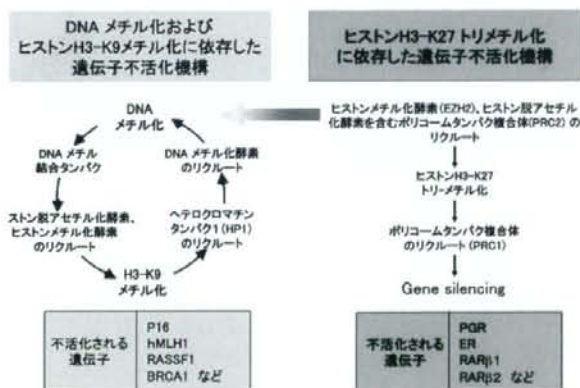


図3 ヒストン修飾による遺伝子不活化

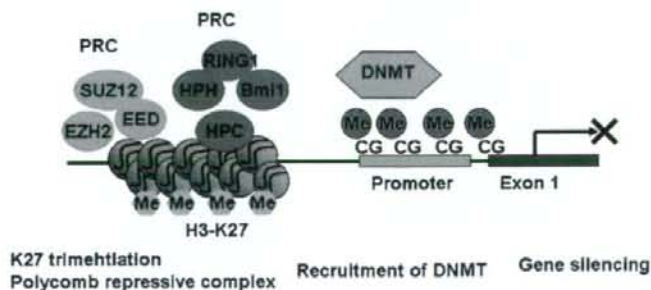


図4 遺伝子不活化のエピジェネティクス機構

275, FK-288 は米国において白血病における臨床試験が行われている。また、脳神経外科領域でなじみのある抗てんかん薬のバルプロ酸がHDAC阻害活性を有しているのも興味深い⁴。現在、エピジェネティクス異常を標的とする治療薬の開発が急速に進んできており、グリオーマにおいて適応になるのも近い将来可能になると期待される。

B. 結論

グリオーマをはじめとする悪性腫瘍のエピジェネティクス異常の役割と診断、治療への応用について概説した。治療への応用に関しては、さらに検討を要する。エピジェネティクス異常を標的とする場合、多くの遺伝子が再発現することによる副作用などを十分にモニターし、安全かつ有効な手段を開発する必要がある。

参考文献

1. Larsen F, Gundersen G, et al: CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13:1095-1107, 1992.
2. Kondo Y, Shen L, et al: Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 23:206-215, 2003.
3. Kondo Y, Shen L, et al: Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7398-7403, 2004.
4. Oi S, Natsume A, et al: Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells. *J Neurooncol*, 2008.
5. Widschwendter M, Fiegl H, et al: Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39:157-158, 2007.
6. Herman JG, Graff JR, et al: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821-9826, 1996.
7. Natsume A, Ishii D, et al: IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res* 65:7573-7579, 2005.
8. Stupp R, Mason WP, et al: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for

glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996, 2005.

9. Hegi ME, Diserens AC, et al: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003, 2005.
10. Natsume A, Wakabayashi T, et al: The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 122:2542-2553, 2008.
11. Kantarjian H, Issa JP, et al: Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 106:1794-1803, 2006.

C. 研究論文発表

- Gao W, Kondo Y, Shen L, et al. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2008;29(10):1901-1910.
- Natsume A, In M, Takamura H, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer research* 2008;68(10):3863-3872.
- Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, et al. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(4):653-659.
- Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *International journal of cancer* 2008;122(11):2542-2553.
- Oi S, Natsume A, Ito M, et al. Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells. *Journal of neuro-oncology* 2008.
- Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, et al. Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor alpha2 chain, a glioma-associated antigen. *Journal of neurosurgery* 2008;109(1):117-122.
- Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, et al. A multicenter phase I trial of interferon-beta and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study). *Japanese journal of*

clinical oncology 2008;38(10):715-718.

Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y, et al. A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. The journal of

gene medicine 2008;10(4):329-339.

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

脳室拡大を伴わない脳脊髄液吸収障害のために 視力障害を来したNF2の1例

研究分担者 齋藤 清 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科准教授

研究要旨

10年前に左聴力障害で発症した家族歴のない23歳女性。4年前に左聴神経鞘腫を、2年前に左三叉神経鞘腫を、昨年右三叉神経鞘腫を各々ガンマナイフで治療している。また、末梢神経鞘腫の摘出術も行っている。昨年末より右視力が悪化、さらに左視力も悪化した。両側にうっ血乳頭がみられたが、MRIでは脳室拡大はみられなかった。本年4月にステロイドパルス治療を行ったが視力の改善なく、5月26日入院。入院時、右は光覚弁なく、左視力は0.3で、聴力は左 deaf、右 72.5dBであった。原因検索のために5月28日に右視神経管開放術を行ったが、視神経の圧迫は確認できなかった。視神経障害の原因は不明であったが、家族がネットでセカンドオピニオンを求めたところ、脳室拡大を伴わない水頭症の可能性を指摘されたため、6月17日に脳室腹腔シャント術を行ったところ視力障害の進行は停止した。通常、うっ血乳頭を引き起こすような髄液循環障害では脳室が拡大し水頭症を呈する。しかし、上矢状洞周囲に多発性髄膜腫をとまなう神経線維腫症2型症例では、脳室が拡大せず、髄液吸収障害のために水頭症と同様の頭蓋内圧亢進症状を引き起こすことがある。報告例が少なく、一般に知られていないために注意が必要である。

伊藤英治、竹林成典、
永谷哲也、齋藤 清 名古屋大学大学院医学系研究
科脳神経外科

A. 研究目的

神経線維腫症2型（NF2）に伴う眼病変として若年性白内障がよく知られているが、うっ血乳頭も約10%に伴うといわれている。うっ血乳頭は何らかの原因による頭蓋内圧亢進を示唆する所見であり、放置すれば視神経萎縮から失明に至る。水頭症が原因である場合には通常脳室拡大を呈するが、今回脳室拡大を認めない症例を経験したので報告する。

B. 症例報告

症例は23歳女性。家族歴はない。13歳時に左聴力障害で発症、19歳時に左聴神経鞘腫をガンマナイフで治療、21歳時に左三叉神経鞘腫をガンマナイフで治療、22歳時に右三叉神経鞘腫をガンマ

ナイフで治療している。また、末梢神経鞘腫の摘出術も行っている。2007年末より右視力が悪化、さらに左視力も悪化した。両側にうっ血乳頭がみられ2008年4月にステロイドパルス治療を行ったが視力の改善なく、5月26日入院となった。入院時、右は光覚弁もなく、左視力は0.3で、聴力は左 deaf、右 72.5dBであった（図1）。また、造影MRIでは両側の三叉神経鞘腫と聴神経鞘腫および脊髄神経鞘腫、脳室内髄膜腫、脳表に多発性髄膜腫を認めたが、脳室は小さく水頭症はみられなかった（図2）。MRIでも視神経浮腫を認めたため（図3）、原因検索のために5月28日に右視神経管開放術を行ったが、視神経の圧迫は確認できなかった。

視神経障害の原因は不明であったが、家族がインターネットでセカンドオピニオンを求めたところ、脳室拡大を伴わない水頭症の可能性があると指摘をいただいた。治療には通常の水頭症同様にシャント手術が必要であったが、脳室が小さいため6月

17日に定位脳手術を用いて脳室を穿刺して脳室腹腔シャント術を行った。随液圧は高くなく、術後には低随液圧症状を呈したが、シャント圧を高く設定

し低随液圧症状の改善を待つて徐々に設定圧を下げたところ、うっ血乳頭は軽快し、右視力は30cm手動弁に左視野もやや改善した(図4)。

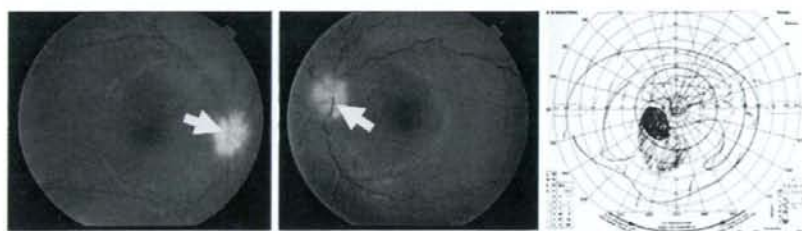


図1 術前の眼底所見と左視野

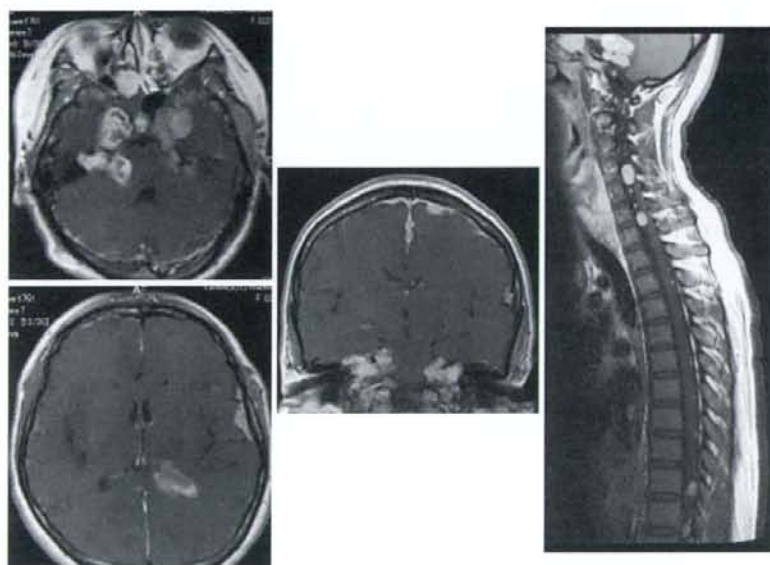


図2 術前造影MRI: 多発する神経鞘腫と脳室内および脳表の髄膜腫



図3 両側視神経浮腫

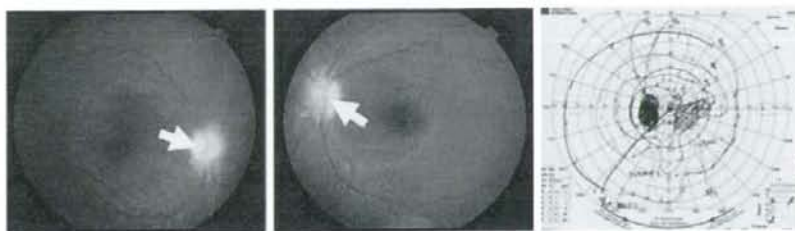


図4 術後の眼底所見と左視野

C. 考察

NF2 症例におけるうっ血乳頭（頭蓋内圧亢進）の原因としては、頭蓋内腫瘍の増大、脳脊髄液通過障害、脳脊髄液吸収障害が考えられる。脳脊髄液通過障害の原因は両側聴神経鞘腫による第四脳室圧迫が一般的であり、脳脊髄液吸収障害の原因には多発神経鞘腫による髄液蛋白の上昇と多発髄膜腫によるクモ膜顆粒閉塞が考えられる。脳脊髄液通過障害も脳脊髄液吸収障害も通常は脳室拡大を呈するが、この症例では脳室はむしろ小さく、また頭蓋内腫瘍の増大は軽度であった。一方、脳室拡大を伴わない水頭症の NF2 症例が報告されている [1, 2]。脳室が拡大しない機序は明らかでないが、慢性的な脳脊髄液通過障害または吸収障害のために脳のコンプライアンスが低下していると考えられる。この症例では図2 脳 MRI 冠状断が示すように、上矢状洞周囲の多発髄膜腫がクモ膜顆粒を閉塞して長期にわたり脳脊髄液の吸収が障害されていたと推測される。

D. 結論

脳室拡大を伴わない脳脊髄液吸収障害のために視

力障害を来した NF2 症例を経験した。この症例では脳室腹腔シャント術により視力障害が改善したが、同様な報告例は少なく、今後も類似症例の蓄積によって病態解明や治療方針の確立が必要である。

参考文献

1. Harada T, Sawamura Y, Ohashi T, et al. Severe optic disc edema without hydrocephalus in neurofibromatosis type 2. *Jpn J Ophthalmol* 42:381-384, 1998
2. Thomas DA, Trobe JD, Cornblath WT, et al. Visual loss secondary to increased intracranial pressure in neurofibromatosis type 2. *Arch Ophthalmol* 117:1650-1653, 1999

E. 研究発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

聴神経腫瘍症例に占める 神経線維腫症症例に関する調査研究

研究協力者 原 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

研究要旨

一側性聴神経腫瘍症例に小脳橋角部以外の検索を進めるべきかについては未だコンセンサスが得られていない。一側の聴神経腫瘍が先に診断され、その後に神経線維腫症と診断がつく症例は稀ではあるが、聴神経腫瘍が神経線維腫症の部分症状である可能性に留意する必要があると考えられた。

A. 研究目的

神経線維腫症症例に聴神経腫瘍の発生が多いことは良く知られているが、一側性聴神経腫瘍症例を診たときに神経線維腫症の可能性を疑って小脳橋角部以外の検索を進めるべきかについては未だコンセンサスが得られていない。そこで、当院を受診した聴神経腫瘍症例について検討を行う。

B. 研究方法

1988年4月から2008年3月までに筑波大耳鼻科を受診した聴神経腫瘍症例について、当初初診時における神経線維腫症の診断の有無、診断に至った経緯をretrospectiveに検討した。

(倫理面への配慮)

データは全て匿名とし、個人のプライバシーに十分配慮した。

C. 研究結果

聴神経腫瘍144例中、神経線維腫症Ⅰ型は0例、神経線維腫症Ⅱ型が10例含まれていた。発症年齢は聴神経腫瘍全体では平均 51.8 ± 14.4 歳であったが、神経線維腫症10例については平均 40.6 ± 18.4 歳であった。家族発症は1家系3名であり、その他は全て孤発例であった。10例中8例は、初回治療時に頭部MRIにて両側聴神経腫瘍を認め、神経線維腫症Ⅱ型と診断された。残り2例中1例は、一側性の聴神経腫瘍と考えられた症例で術後の経過観察

中に対側の聴神経腫瘍が明らかとなり、神経線維腫症Ⅱ型の診断に至った。他の1例は、一側性の聴神経腫瘍に対する治療の11年後に坐骨神経痛が出現し、精査の結果、多発性馬尾神経腫瘍および頸髄腫瘍等が認められ神経線維腫症Ⅱ型の診断に至った。

神経線維腫症症例では、聴神経腫瘍の診断時に両側性であることより神経線維腫症の診断が確定した例が殆どであった。しかし、一側性の聴神経腫瘍として治療を施行したが、その後の経過観察中に他の腫瘍が発見され神経線維腫症Ⅱ型の診断に至る症例の存在も明らかとなった。

一側の聴神経腫瘍が先に診断され、その後に神経線維腫症と診断がつく症例は稀ではあるが、聴神経腫瘍が神経線維腫症の部分症状である可能性を心に留める必要があると考えられた。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

- 論文発表
耳鼻咽喉科臨床に投稿予定
- 学会発表
平成21年聴神経腫瘍研究会にて発表予定

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

特になし。

神経皮膚症候群に関する調査研究

研究分担者 樋野興夫 順天堂大学医学部病理・腫瘍学教授

研究要旨

結節性硬化症の原因遺伝子産物である tuberin (Tsc2 産物) は、ラパマイシン感受性 mTOR 経路を抑制する機能を持つ。この経路の遮断を結節性硬化症やヒトの癌治療に利用しようと臨床治験が試みられているが、これまでのところ著効を示す結果は得られていない。我々はこれまでに報告されているヒト TSC2 変異の中で、mTOR 抑制への影響と症状の重篤性が対応しないアミノ酸置換型変異を持つ tuberin の機能が、病態発生に関わる新たなシグナル伝達系を解明するための手がかりとなり、新規の治療薬のターゲットの開発に寄与するものと考えている。本年度は新たな標的を同定するためのツールとなる安定発現培養細胞株の樹立を行った。

樋野興夫 順天堂大学医学部病理・腫瘍学 教授

A. 研究目的

結節性硬化症の原因遺伝子産物である tuberin (Tsc2 産物) は、ラパマイシン感受性 mTOR 経路を抑制する機能を持つ。この経路の遮断を結節性硬化症やヒトの癌治療に利用しようと臨床治験が試みられているが、これまでのところ著効を示す結果は得られていない。我々はこれまでに報告されているヒト TSC2 変異の中で、mTOR 抑制への影響と症状の重篤性が対応しないアミノ酸置換型変異を持つ tuberin の機能が、病態発生に関わる新たなシグナル伝達系を解明するための手がかりとなり、新規の治療薬のターゲットの開発に寄与するものと考えている。昨年度我々は mTOR 抑制能が損なわれている G1556S 型変異体を発現するトランスジェニック Eker ラットにおける発現依存的な腫瘍抑制、および mTOR 抑制能を保持する N525S 変異による胎生致死の誘発の可能性について報告した。本年度はこれらの変異体の機能解析をさらに詳細に進めることを目的として、安定発現細胞株の樹立を進めた。

B. 研究方法 & 研究成果

これまで我々は Tsc2 欠失マウス腎腫瘍細胞株に野生型 tuberin の発現系を導入することにより、mTOR 経路が抑制されること、ヌードマウスにおける造腫瘍能が著しく抑制されることを見出している。そこで、野生型との表現型との比較から機能的差異の手がかりを得ることを目的として、G1556S 変異、N525S 変異を導入した Tsc2 欠失腎腫瘍細胞の樹立を試みた。G1556S 型変異 tuberin 発現細胞は樹立に成功したものの、これまでのところ N525S 型変異については安定に発現する細胞株を得ることに成功していない。このことは昨年報告した N525S 変異による胎生致死と関連するものと考えられる。現在、発現誘導システムを利用し低レベルで N525S 変異を発現する細胞株を樹立すべく実験を進めている。G1556S 変異に関しては、昨年報告したリン酸化の低下が再確認された。通常の培養条件下ではこれまでのところ野生型 tuberin 発現細胞と G1556S 型 tuberin 発現細胞の間で著しい増殖速度の変化等を見出していない。しかしながら、血清飢餓条件下で長期間培養した場合に細胞塊の形態に差が認められることから、その本体を明らかにするために解析を進めている。さらに、ヌードマウスへの移植実験を進めている。

C. 結語

新たに樹立した細胞株を利用した培養系、ヌードマウス移植系の実験から、ラバマイシン感受性経路に関連しない tuberin の機能的側面を明らかにしていく。さらにトランスジェニック・Eker ラットの組織等を用いて検討を進めることにより、その機能が *in vivo* の病態発生にどのように関わっているのか解明を進める。N525S 型についても安定発現株の樹立を行い、同様に進める予定である。

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ないと予想される。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の解明が目下の急務である。

D. 健康危機情報

特記すべきことなし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki T., Das S.K., Inoue H., Kazami M., **Hino O.**, Kobayashi T., Yeung R.S., Kobayashi K., Tadokoro T. and Yamamoto Y.: Tuberosclerosis complex 2 loss-of-function mutation regulates reactive oxygen species production through Rac1 activation. *BBRC*, 368: 132-137, 2008
2. Kouchi M., Okimoto K., Matsumoto I., Michimae Y., Yamada T., Inoue T, Kimura T, Seki T., Yasuba M., and **Hino O.**: Postoperative fibromatosis-type fibromas in the Bhdgene mutant (Nihon) rat. *Exp. Toxicologic Pathology* 59: 273-279, 2008

3. Imamura O., Okada H., Takashima Y., Zhang D., Kobayashi T. and **Hino O.**: siRNA-mediated *Erc* gene silencing suppresses tumor growth in *Tsc2* mutant renal carcinoma model. *Cancer Letters*, 268: 278-285, 2008
4. Takagi Y., Kobayashi, T., Shiono M., Wang L., Piao X., Sun G., Zhang D., Abe M., Hagiwara Y., Takahashi K. and Hino O.: Interaction of folliculin (Birt-Hogg-Dubé gene product) with a novel Fnip1-like (FnipL/Fnip2) protein. *Oncogene*, 27: 5339-5347, 2008
5. Hagiwara Y., Hamada Y., Kuwahara M., Maeda M., Segawa T., Ishikawa K. and **Hino O.**: Establishment of a Novel Specific ELISA system for rat N- and C-ERC/Mesothelin.-Rat ERC/Mesothelin in the Body Fluids of mice bearing Mesothelioma-. *Cancer Science*, in press.
6. Shigeyama Y., Kobayashi T., Kido Y., Hashimoto N., Asahara S., Matsuda T., Takeda A., Inoue T., Shibutani Y., Koyanagi M., Uchida T., Inoue M., **Hino O.**, Kasuga M. and Noda T.: Biphasic response of pancreatic β cell mass to ablation of TSC2 mice. *Mol. Cell. Biology* in press.
7. Shiono M., Kobayashi T., Takahashi R., Sun G., Abe M., Zhang D., Wang L., Piao X., Takagi Y., Mineki R., Taka H., Tada N., Sonobe S., Momose S., Ueda M. and Hino O.: The G1556S-type tuberin variant suppresses tumor formation in tuberous sclerosis 2 mutant (Eker) rats despite its deficiency in mTOR inhibition. *Oncogene*, in press.
8. Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M., Hino O.: Establishment of novel monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* in press

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

結節性硬化症における皮質結節形成機序 —モデル動物を用いた研究—

研究分担者 水口 雅 東京大学大学院医学系研究科発達医学教授

研究要旨

結節性硬化症の大脳皮質結節の形成機序を解明する目的で、*Tsc1/Tsc2* トランスヘテロ接合体マウスを作成し、18月齢で脳の病理を観察した。結節性硬化症類似の脳病変は形成されなかった。体細胞変異により *Tsc1+/-Tsc2+/-* となった神経系細胞が皮質結節の異常巨大細胞になるという仮説は立証されなかった。

水口 雅 東京大学大学院医学系研究科
発達医学教授
大澤麻記 東京大学大学院医学系研究科
小児医学大学院生
樋野興夫 順天堂大学順天堂大学医学部
病理・腫瘍学教授
小林敏之 順天堂大学順天堂大学医学部
病理・腫瘍学准教授
張 丹青 順天堂大学順天堂大学医学部
病理・腫瘍学大学院生

A. 研究目的

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, 以下 TSC) では種々の臓器に形成異常 (過誤組織) と腫瘍 (過誤腫) が生じる。そのうち皮質結節 (大脳の過誤組織) はしばしば難治性てんかんの原因となるし、知的障害との関連も疑われている。すなわち皮質結節は TSC 患者の QOL を低下させる重要な病変であり、分子病態の理解にもとづくその予防・治療の開発が強く求められる。

TSC の原因遺伝子として、*TSC1* と *TSC2* がある。*TSC1* 変異と *TSC2* 変異の表現型は、微妙な差異があるものの、ほぼ同一である。従来の研究により、TSC 関連腫瘍 (上衣下巨細胞星細胞腫など) は Knudson の two hit メカニズムに従って生じること、すなわち loss of heterozygosity (LOH) を中心とする体細胞変異により *TSC1* 欠損または *TSC2* 欠損となつた

細胞が腫瘍化することが、判明している。いっぽう TSC 関連過誤組織 (大脳の皮質結節) では second hit としての LOH は生じておらず、その形成機序は依然として不明である。

皮質結節形成に関する仮説として、下記の諸説が考えられる。

1. 体細胞変異 :TSC 遺伝子の intragenic mutation による second hit
2. 体細胞変異 :他の遺伝子の変異によるトランスヘテロ接合体細胞の形成
3. 環境因子による TSC 遺伝子または関連因子遺伝子の epigenetic な変化
4. TSC 遺伝子産物の上流に位置し、これに拮抗する因子 (Akt など) の恒常的活性化

本年度の研究は、仮説 2 についての検証を目的として行った。われわれは体細胞変異の生じる「他の遺伝子」の有力候補として、生殖細胞変異が *TSC1* 変異である症例では *TSC2*、生殖細胞変異が *TSC2* 変異である症例では *TSC1* を推測した。すなわち、体細胞変異の結果、*TSC1/TSC2* トランスヘテロ接合体となつた細胞が皮質結節の異常巨大細胞となる可能性を想定した。

もしこの仮説が正しければ、生殖細胞レベルで *TSC1/TSC2* トランスヘテロ接合体である個体において、皮質結節の形成が高度に促進される現象が予想される。本研究ではわれわれが従来作成した *TSC1* ノックアウトマウスと *TSC2* ノックアウトマ

ウスを交配することにより、*Tsc1/Tsc2* トランスヘテロ接合体マウスを作成し、大脳の病理学的所見を観察することにより、この予想が的中しているか否かを検証した。

B. 研究方法

TSC1 ノックアウトマウスのヘテロ接合体 (*Tsc1*^{+/-}) と *TSC2* ノックアウトマウスのヘテロ接合体 (*Tsc2*^{+/-}) とを交配し、*Tsc1/Tsc2* トランスヘテロ接合体マウスを作成した。野生型マウス (*Tsc1*^{+/+} *Tsc2*^{+/+}) 5 個体、*TSC1* ヘテロ接合体マウス (*Tsc1*^{+/-} *Tsc2*^{+/+}) 6 個体、*TSC2* ヘテロ接合体マウス (*Tsc1*^{+/+} *Tsc2*^{+/-}) 9 個体、*Tsc1/Tsc2* トランスヘテロ接合体 (*Tsc1*^{+/-} *Tsc2*^{+/-}) 13 個体を 18 月齢で sacrifice し、脳を摘出、ホルマリン固定パラフィン包埋標本として組織切片を作成、hematoxylin eosin (HE) 染色と Kluver-Barrera (KB) 染色して、組織学的所見を観察した。

以上の実験は、順天堂大学医学部の動物実験に関する規則に則り、動物実験委員会の承認を得て施行した。

C. 研究結果

野生型マウス (*Tsc1*^{+/+} *Tsc2*^{+/+})、*TSC1* ヘテロ接合体マウス (*Tsc1*^{+/-} *Tsc2*^{+/+})、*TSC2* ヘテロ接合体マウス (*Tsc1*^{+/+} *Tsc2*^{+/-})、*Tsc1/Tsc2* トランスヘテロ接合体 (*Tsc1*^{+/-} *Tsc2*^{+/-}) のいずれの群においても、皮質結節を含む大脳病変は認められなかった。

すなわち本年度の研究結果は、「*TSC1* 生殖細胞変異と *TSC2* 体細胞変異、または *TSC2* 生殖細胞変異と *TSC1* 体細胞変異の組み合わせにより皮質結節な

いし異常巨大細胞が生じる」という仮説を支持するものではなかった。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Peng L, Wen Y, Han Y, Wei A, Shi G, Mizuguchi M, Lee P, Hernando E, Mittal K, Wei JJ. Expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF signaling: molecular complexity in uterine leiomyomas. *Fertility and Sterility*. 2008 in press.
2. 水口 雅：てんかんの原因：結節性硬化症。五十嵐隆、岡 明（編）小児科臨床ピクシス3：小児てんかんの最新医療、中山書店、東京、2008、pp.40-41.

2. 学会発表

1. 佐藤敦志、高橋 寛、三牧正和、斉藤真木子、岡 明、水口 雅：大脳基底核原発の ganglioglioma の 1 例。第 50 回日本小児神経学会総会、東京、2008 年 5 月 29 日
2. 西田裕哉、佐藤敦志、高橋 寛、三牧正和、岡 明、五十嵐隆、関 正史、水口 雅：けいれん重積型脳症を呈した滑脳症の 1 男児例。第 560 回日本小児科学会東京都地方会、東京、2008 年 10 月 11 日

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

結節性硬化症と神経細胞の分化異常について

研究分担者 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と MAT1 の相互作用について、培養神経細胞を用い細胞周期と神経分化における機能解析を行った。培養神経細胞はレチノイン酸刺激により細胞周期を G1 期で停止し、細胞分裂を停止し、神経分化が誘導された。この時 MAT1 は CAK 複合体から解離し、ユビキチン化により分解された。一方、TSC1 siRNA でハマルチンの発現を抑制した細胞では、レチノイン酸刺激による細胞分裂、細胞周期の停止、MAT1 のユビキチン化がそれぞれ抑制された。以上の結果より、ハマルチンは MAT1 のユビキチン化を介した CAK 複合体の細胞周期および神経分化の制御に重要な機能を持つことを示唆する。

A. 研究目的

結節性硬化症 (TSC) 原因遺伝子 TSC1、TSC2 の機能は、PI3K-Akt-mTOR シグナルを介した細胞増殖、細胞周期、蛋白質合成など多岐にわたり、TSC はシグナル伝達異常症と言える。TSC 遺伝子の生理機能を明らかにすることは、TSC の分子病態の解明および TSC 分子治療のための新たな標的の探索にもつながると考える。これまで、私たちはハマルチン結合蛋白質の検索を行い、MAT1 (ménage a trios 1, cyclin H assembly factor) を同定してきた。今回、その機能解析を行ったので報告する。

B. 研究方法および結果

1) 培養神経細胞と神経分化誘導

培養ヒト神経芽細胞株 SK-N-SH は培地にレチノイン酸 (ATRA) を加えるにより細胞増殖が抑制され、細胞周期が G1 期で停止し、神経突起が伸長し、神経分化が誘導された。この過程で SK-N-SH 細胞より蛋白質を抽出し、抗体 CDK7 (Cyclin dependent kinase 7) 抗体で免疫沈降後、抗 RARα (Retinoic acid receptor α)、抗 MAT1 抗体で免疫プロットした結果、ATRA 刺激後時間依存的に CDK7 と共免疫沈した RARα と MAT1 は減少した。一方、抗 Rb (Retinoblastoma)、抗リン酸化 Rb 抗体で免疫プロット

した結果、それぞれ発現は上昇した。同様に、抗 MAT1 抗体で免疫沈降後、抗ユビキチン抗体で免疫プロットした結果、ATRA 刺激後 MAT1 のユビキチン化が時間依存的に上昇し、また、MAT1 蛋白質の分解はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。

2) ハマルチンノックダウン細胞における細胞周期、細胞増殖制御の異常

SK-N-SH 細胞におけるハマルチン-MAT1 相互作用の機能を解析するために、ヒト TSC1 に対する siRNA を用い、ハマルチンの発現を抑制した細胞を用いた。SK-N-SH 細胞は TSC1 siRNA により、MAT1 の発現が上昇し、ATRA 刺激による細胞増殖抑制と細胞周期停止を有意に抑制した。また、免疫プロットを行った結果、TSC1 siRNA は ATRA 刺激による MAT1 のユビキチン化を抑制し、CDK7 に結合する MAT1 を上昇させた。

C. 考察

これまで私たちは、TSC 遺伝子の発現を抑制した培養神経細胞株 PC12 細胞において神経分化、神経突起伸長の異常を示し、その分子基盤に低分子 G 蛋白質 Rho が関与していることを示し、TSC 遺伝子が神経分化に重要な役割を果たす事を示してき

た。また、TSC 患者皮膚病変部細胞は細胞周期の異常を示すことも明らかになっている。今回の結果から、正常細胞においてハマルチンは MAT1 と相互作用することで、MAT1 のユビキチン化を促進し、細胞増殖および細胞周期即促進に負に働いていることが考えられた。一方、ハマルチンを欠損した細胞では MAT1 の分解が抑制され、CAK 複合体が活性化することでレチノイン酸刺激による神経分化を抑制し、細胞増殖が促進していた。TSC の脳病変の過誤性の神経細胞増殖はてんかんや自閉症、知能発達不全などの原因と考えられている。TSC 遺伝子欠損マウスホモ個体は胎生致死を示すが、外胚葉の発生異常による神経幹細胞の分節化や遊走に障害があることも示されている。今後、ハマルチン-MAT1 複合体の神経分化における詳細な機能解析を行い、TSC 脳病態との関連性を明らかにすると共に、レチノイン酸シグナルを標的とした TSC 分

子治療法の可能性について検討を行いたいと思う。

D. 結論

培養神経細胞において、ハマルチンの欠失は MAT1 のユビキチン化を抑制し、レチノイン酸による神経細胞分化誘導の制御に関わる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiura C, Miyata H, Ueda M, Ohama E, Vinters H, Ohno K, Immunohistochemical expression of fibroblast growthfactor (FGF) -2 in epilepsy-associated malformations of cortical development (MCDs). *Neuropathology*, 28, 372-381, 2008

2. 学会発表

阪大病院皮膚科でフォロー中の結節性硬化症の患者 100 人の特徴 —新しい治療法の必要性の検討—

研究分担者 片山一朗 大阪大学医学部皮膚科教授

研究要旨

結節性硬化症は 100 年以上前から知られ、古くは、精神発達遅滞、てんかん発作、顔面の血管線維腫を 3 主徴と称し、効果的な治療法のない疾患であった。しかしながら、1990 年代に入って本症の原因遺伝子 *TSC1*, *TSC2* が同定され、本症の病態、特に腫瘍発生のメカニズムが解明されるに及んで、種々の新しい治療方法の開発が試みられてきた。特に最近では、海外において、m-TOR の阻害剤であるラパマイシン等を使用したシグナル療法が本症の脳、腎腫瘍や肺病変に対して試みられ、良好な結果が得られている。従って、今後これらの治療法の利用を本邦においても考えていく必要があると思われる。ところで、これら本症の病因病態の解明や、急速な検査技術や検査機器の進歩によって、新しい治療法が可能になったのと同時に、一方では患者数の増加、特に軽症例の急速な増加を引き起こした。それに伴い結節性硬化症の臨床症状にも大きな変化が認められるようになってきた。その結果、新しい治療法を検討する前に、まず、結節性硬化症の現状を正確にフォローする必要があると思われた。そこで、2003 年から 2008 年の 5 年間に阪大皮膚科でフォローされた結節性硬化症の患者 131 人のうち、種々の検査が施行されている患者 100 名について、痙攣発作、精神発達遅滞、皮膚症状、肺症状 腎症状の頻度、及び遺伝子型について調べ、その特徴を分析した。その結果以前言われていたのに比して、痙攣発作や精神発達遅滞の頻度は減少しており、逆に、腎症状や肺症状の割合が増加している事。さらにこれらの症状が患者の予後決定に重要な要因であることが示唆された。

金田眞理、田中まり 大阪大学医学部 皮膚科

A. 研究目的

結節性硬化症の病態解明は飛躍的に進んできており、それに伴って新しい治療法が開発が進むと同時に、一方では軽症例が増加し、結節性硬化症の症状にも大きな変化が認められるようになってきた。そこで、新しい治療法を試みる為の第一歩として、まず最近の本症における症状を検討し、その特徴や問題点を整理した。

B. 研究方法

2003 年から 2008 年の 5 年間に阪大皮膚科でフォローされた結節性硬化症の患者 131 人のうち、種々

の検査が施行されている患者 100 人について、痙攣発作、精神発達遅滞、皮膚症状、肺症状 腎症状の頻度、及び遺伝子型について調べ、その特徴を分析した。

(倫理面への配慮)

患者の症状を解析するにあたって、患者の個人情報と同定できないように注意を払った。遺伝子検査に関しては、あくまで患者の希望に基づいて施行し、患者の同意を得た上で、患者個人が特定できないように注意した。

C. 研究結果

患者 100 人の内訳は、女性 60 人、男性 40 人で (図 1)、年齢別患者数は図 2 に示した。患者 100 人