

図1 NF1患者神経線維腫における Zeb1 発現

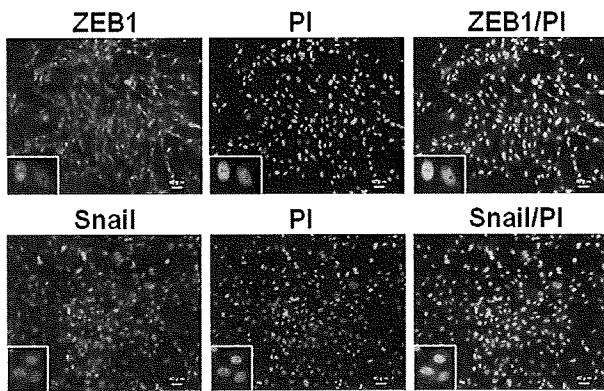


図2 sNF96.2細胞における Snail と Zeb1 の発現

ベルで調べたところ、正常シュワン細胞（HSC）と比べて NF1 欠損シュワン細胞では、Snail、Twist、Zeb1 が高発現していた（図3）。

3. NF1 発現抑制の際の EMT 誘導転写因子の発現

上皮性性質を持つ ARPE-19、MCF7、HeLa において、siRNA によって NF1 を発現抑制した際の EMT 誘導転写因子群の発現を検討した。ARPE-19、MCF7 において、それぞれ Zeb1、Slug が NF1 の発現を抑制することによって上昇した（図4）。

また、正常シュワン細胞（HSC）において NF1 の発現を抑制したところ、Zeb1 と Zeb2 の発現が上昇した（図5）。

D. 考察

神経線維腫は、過剰に蓄積した細胞外マトリックスとシュワン細胞、線維芽細胞、内皮細胞そして肥満細胞のような様々な種類の細胞が凝集した細胞塊の形成を特徴としている。また、マウスモデルを

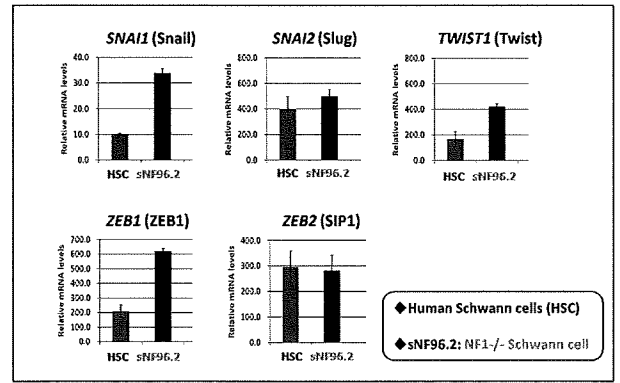


図3 sNF96.2 cell における EMT 誘導転写因子群の発現

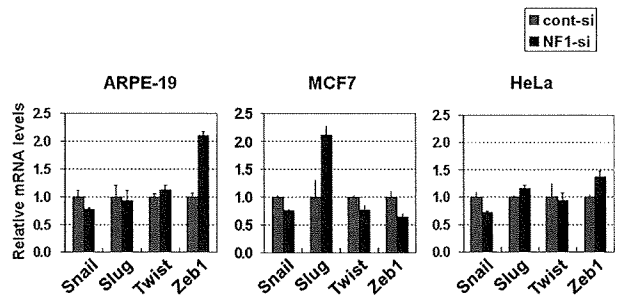


図4 上皮性細胞における NF1 発現抑制時の EMT 因子の動態

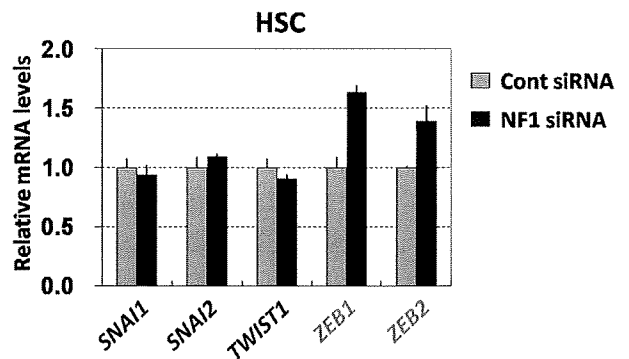


図5 正常シュワン細胞における NF1 発現抑制時の EMT 因子の動態

用いた近年の研究によると、神経線維腫形成の過程において、NF1^{-/-}シュワン細胞は、KitL のような走化性因子を分泌し炎症性細胞を腫瘍微小環境 (tumor microenvironment) 内に誘導させ細胞を集積させるといふ（図6）。つまり、神経線維腫では、1) NF1 +/- 肥満細胞の浸潤、2) NF1 +/- の線維芽細胞、シュワン細胞、血管上皮細胞の増生、3) フィブロネクチンやヒアルロン酸などを中心とした細胞外マトリックスの集積、などの特徴的な病理像が見られ、これらは EMT によって引き起こされる線維性疾患に類似した所見であると考えられることができる。

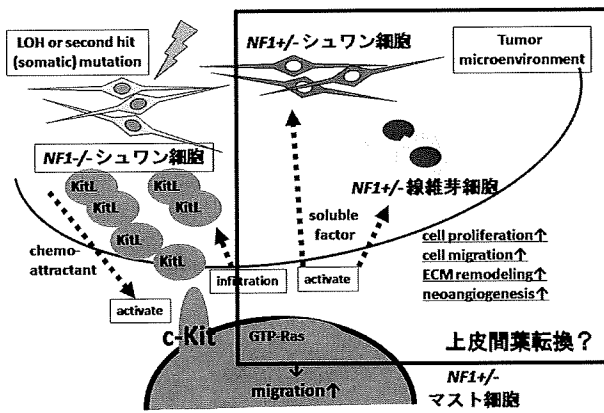


図6 神経線維腫形成機構

私達は2005年に、NF1 siRNAにより上皮系細胞が、細胞集塊形成、紡錘状の細胞形態変化、細胞運動能亢進などの変化を呈したことから、NF1欠損・変異が間葉系転換に関与する可能性について初めて報告した (Ozawa et al., *J Biol Chem* 280: 39524-39533, 2005)。そこで今回、神経線維腫という病態が過剰な間葉系反応によって生じていることを確認するための実験を行った。結果に示すように、臨床サンプルおよびNF1患者から樹立したシュワン細胞を用いた解析により、EMTを誘導する主たる転写因子であるSnailやZeb1の発現が有意に上昇していることを見出した。また、mRNAレベルでもSlug、Snail、Twist、Zeb1、Zeb2などEMT誘導転写因子の発現上昇がみられた。さらに上皮性細胞および正常シュワン細胞においてNF1の発現を抑制することで、これらの転写因子の上昇が確認でき、NF1遺伝子の機能不全とEMTの誘導が直接関連していることを見出した。また、NF1 siRNAによりヒアルロン酸など細胞外マトリクスの産生も増加することも観察されており、EMTシグナルこそが、神経線維腫形成のメカニズムではないかと考えた。これらの内容は論文として発表した (Arima et al., 2009)。

E. 結論

NF1において発生する神経線維腫は上皮間葉転換シグナルの亢進に基づく病態である可能性が示唆

された。現在私達のグループは上皮間葉転換を抑制する薬剤の開発研究を行っており、これらの薬剤が本症候の新たな治療になる可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H and Araki N: NF1 tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, collapsin response mediator protein-2. *J Biol Chem.* 283: 9399-9413, 2008

Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H and Taya Y: Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristics of the epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 68: 5104-5112, 2008

Arima Y, Hayashi H, Kamata K, Goto TM, Sasaki M, Kuramochi A, Saya H: Decreased expression of neurofibromin contributes to epithelial-mesenchymal transition in neurofibromatosis type 1. *Exp Dermatol* [in press], 2009

2. 学会発表

有馬好美. 神経線維腫形成の分子機構. 教育講演. 第一回日本レックリングハウゼン病学会. 2009年11月15日、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号	特願 2009-144145
発明者	片渕秀隆、本田律生、佐谷秀行、有馬好美、丹羽眞一郎、牧野泰孝
発明の名称	月経困難症の予防及び/又は治療薬
出願人	国立大学法人熊本大学、学校法人慶應義塾、リンク・ジェノミクス株式会社
出願日	2009年6月17日

結節性硬化症の顔面血管線維腫に対する ラパマイシン軟膏外用療法に関する研究

研究分担者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教授

研究要旨

結節性硬化症の腎、肺、脳病変に対し、mTORの阻害剤であるラパマイシン内服が有効であることはこれまでに報告されている。これらの治療や免疫抑制剤として内服中に、顔面血管線維腫の縮小も認められており、ラパマイシンは結節性硬化症の皮膚病変に対しても有効であると考えられる。今回我々は、副作用の少ない結節性硬化症の皮膚病変の治療薬として、ラパマイシンの外用薬を作製し結節性硬化症患者の皮膚病変の治療を試みた。ラパマイシン内服錠を主剤、0.03%タクロリムス軟膏を基剤として0.2%ラパマイシン軟膏を作製し、結節性硬化症患者8名に対し、顔面左右の同程度の血管線維腫の一方にラパマイシン軟膏、他方に基剤のみを12週間外用した。12週終了後、ラパマイシン軟膏外用側は、すべての患者で全体評価及び紅色調・平坦化などの各評価項目すべてにおいて、コントロールと比較して有意に改善が認められた。副作用としては、テープストリッピング併用による刺激感が1例あったのみで接触皮膚炎は無く、他、検査値の大きな変化も認められなかった。結節性硬化症の顔面血管線維腫に対し、ラパマイシン軟膏外用療法は副作用の少ない有効な治療法と考えられた。

金田眞理 大阪大学大学院医学系研究科
皮膚科
田中まり 大阪大学大学院医学系研究科
皮膚科

A. 研究目的

結節性硬化症の原因遺伝子TSC1、TSC2の産生蛋白であるhamartin、tuberinは複合体を作り、下流のmTORを抑制して細胞の増殖分化を制御している。結節性硬化症では、この抑制が働かずmTORが活性化することで種々の過誤腫が生じる。mTORの阻害剤であるラパマイシンは、結節性硬化症の腎、肺、脳病変に用いられ有効な報告がある。この内服治療、また移植後の免疫抑制剤としてラパマイシン内服の際に、顔面血管線維腫の縮小が認められており、ラパマイシンは結節性硬化症の他の腫瘍と同様に皮膚の血管線維腫にも有効であると考えられる。一方、外用剤としては、ラパマイシンは、これまで

で結節性硬化症の皮膚腫瘍の動物モデルやヒトの尋常性乾癬に使用が試みられ、有効性が報告されている。

今回我々は、結節性硬化症の皮膚腫瘍に対して、副作用が少なく有効な治療法の開発を目的とし、ラパマイシンの外用療法を試み、有効性及び副作用の有無を検討した。

B. 研究方法

Rapamune[®]2mg錠を主剤、0.03%タクロリムス軟膏（プロトピック[®]0.03%小児用）を基剤とし、錠剤を粉碎して基剤と混和し0.2%ラパマイシン軟膏を調製した。

結節性硬化症患者8名（男3名、女5名）（9～46歳）に対し、顔面の左右同等の血管線維腫に、一方に0.2%ラパマイシン軟膏、他方にコントロールとして基剤のみ（0.03%タクロリムス軟膏）を、テープストリッピングの上1日2回12週間塗布した。

全体の改善度及び、紅色調・丘疹の縮小・平坦化の各項目について評価を行った。評価方法は、医師2名が別々に、効果を5段階（著効2点、有効1点、やや有効0.5点、不変0点、悪化-1点）で判定し、2名の点数を合計して評価とした。試験前及び終了時採血検査を行い、終了時血中ラパマイシン濃度も測定した。

（倫理面への配慮）

本試験は大阪大学医学部附属病院倫理委員会で承認され、患者は本人の自由意志で本試験に参加し、試験開始前には口頭及び文書でインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

0.2%ラパマイシン軟膏及びコントロールの結果を、図1、2に示す。

ラパマイシン軟膏では、全体評価は平均2.8点で、8名全員2点以上（判定医師2名ともに有効以上）であった。各項目の平均点は、紅色調3.3点、平坦化3.5点、丘疹の縮小2.4点であった。コントロールの平均は、全体評価0.9点、紅色調0.8点、平坦

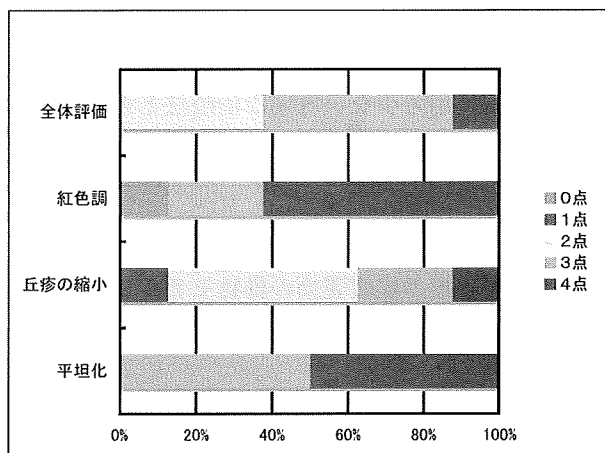


図1 ラパマイシン軟膏側効果評価

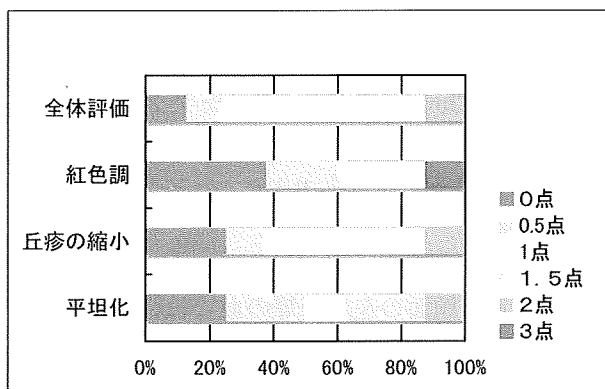


図2 コントロール側効果評価

化0.9点、丘疹の縮小0.8点で、コントロール群も全体としてはやや有効な印象があったが、ラパマイシン軟膏とコントロールでは、全体評価及び各評価項目すべてで、カイ2乗検定で $p < 0.05$ で有意差が認められ、ラパマイシン軟膏の方が、明らかに有効性が高かった。

副作用としては、外用中に刺激感が1名で認められたが、テープストリッピングを中止し単純塗布にて軽快した。

血液学的検査では、末梢血白血球の減少（3030/mm³から2100/mm³）が1名で認められたが、この患者は本試験開始前も白血球が2000~3000台と低値を推移しており、本試験に伴う変化とは言えなかった。他、外用前後で末梢血、肝機能、総コレステロール値に大きな変化は認められなかった。

検査終了時、血中ラパマイシンを測定したが、すべての患者で検出限界以下であった。

D. 考察

今回、結節性硬化症の顔面血管線維腫に対して、0.2%ラパマイシン軟膏外用は紅色調の改善及び、平坦化いずれにも効果が認められた。

ラパマイシンの作用としては、腫瘍細胞増殖抑制だけでなく腫瘍血管新生や血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の発現の抑制も報告されている。Cell lineを用いた実験で、Tsc1-null及びTsc2-null fibroblastではVEGF分泌が増加しており、ラパマイシン投与で本来のfibroblastのレベルまでVEGFの産生の抑制が認められた報告もある。今回の治療では紅色調の改善と平坦化がともに見られたが、紅色調の改善はラパマイシンの血管新生抑制やVEGF抑制を介した作用の可能性も考えられた。

副作用としては、接触皮膚炎や単純塗布での刺激感も無く、血液学的検査の異常も認められず、血中ラパマイシンも検出されなかった。内服治療あるいは他の治療法に比べて、副作用は非常に少ないと考えられた。

今後、外用中止後の皮疹再燃を確認する予定であり、また、今回は基剤として0.03%タクロリムス軟膏を用いたが、タクロリムスの入っていない軟膏を調製してさらに有効性の確認を行う予定である。

E. 結論

結節性硬化症の顔面血管線維腫に対し、ラパマイシン軟膏外用は、紅色調及び平坦化ともに改善が認められ、副作用の少ない有効な治療法と考えられ

る。今後、外用中止後の皮疹再燃の確認や、タクロリムスの入っていない軟膏を調製してさらに有効性
の確認を行う予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- Murakami Y, Wataya-Kaneda M, Myoui A, Sakata Y, Tanaka M, Katayama I. Case of Schwannomatosis. J. Dermatol. 2009 Mar; 36 (3): 1508-511..
- Gunadi, Miura K, Ohta M, Sugano A, Lee MJ, Sato Y, Matsunaga A, Hayashi K, Horikawa T, Miki K, Wataya-Kaneda M, Katayama I, Nishigori C, Matsuo M, Takaoka Y, Nishio H. Two novel mutations in the ED1 gene in Japanese families with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Pediatr Res. 2009 Apr; 65 (4): 453-7.

- Wataya-Kaneda M, Katayama I. Dissociate expression of tuberous sclerosis complex 1 product hamartin in a skin and pulmonary lesion of a tuberous sclerosis complex. Hum Pathol. 2009 Mar; 40 (3): 430-4.

2. 学会発表

- 第 108 回日本皮膚科学会総会 (2009.4) 結節性硬化症の肺病変 田中まり、金田眞理、片山一朗
- 第 60 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (2009.10) 結節性硬化症の血管線維腫に対する CO₂ 治療 田中まり、金田眞理、片山一朗

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

結節性硬化症における神経系分化異常の細胞学的解析

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

マウス胚性腫瘍（EC）細胞株の培養神経細胞分化誘導系を用い、結節性硬化症原因遺伝子の機能について、細胞学的検討を行った。EC細胞をレチノイン酸刺激後、結節性硬化症原因遺伝子産物ハマルチンとツペリンは神経細胞の細胞体と神経突起およびグリア細胞の細胞体に発現が認められた。また、EC細胞にツペリンを一過性に過剰発現させると、神経細胞に分化した。一方、siRNAでハマルチン、ツペリンの発現をノックダウンしたEC細胞ではリン酸化S6蛋白質の発現が上昇し、細胞周期の異常およびMAT1の発現上昇が見られた。ハマルチン、ツペリンの発現ノックダウン細胞を結節性硬化症モデル細胞として、今後さらに詳細な細胞学的な解析を行って行く予定である。

A. 研究目的

結節性硬化症における精神神経学的症状は最も重要な症状の一つで、分子病態解明は治療法の開発のためにも必須である。結節性硬化症患者の脳病変の過誤性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。また、脳病変部細胞の特徴から、神経細胞の発生初期の分節化と遊走に異常を来すことが考えられている。これまで、培養神経細胞モデルとして、末梢由来神経膠細胞株PC12の分化誘導系を用い、結節性硬化症原因遺伝子の機能の解析を行ってきたが、発生初期の神経分化と神経・グリアの分化異常についての解析を行うために、今回、マウス胚性腫瘍（EC）細胞を用い、細胞学的な解析を行った。

B. 研究方法および結果

1) EC細胞の神経分化誘導とハマルチン、ツペリンの発現

マウス胚性腫瘍（EC）細胞株P19をレチノイン酸を含む培養液中で胚様体形成後、神経細胞とグリア細胞系へ分化誘導を行った細胞を用い、免疫蛍光抗体染色によりTSC遺伝子産物ハマルチンとツペリンの発現を調べた。神経分化誘導2日目のP19細胞では、ハマルチンとツペリンはともに β III-

Tubulinとネスチン陽性の幼若神経細胞の細胞体に発現が見られた。また、分化誘導14日目では、ハマルチンとツペリンはMAP2陽性の成熟神経細胞の細胞体と神経突起末端にも発現が見られ、またグリア前駆細胞の細胞体にも発現が認められた。

2) ハマルチン、ツペリンの発現と神経分化異常

P19細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行った。P19細胞にTSC2 cDNAを一過性に過剰発現させた細胞では、レチノイン酸を含まない通常培養条件下にも関わらず、 β III-Tubulin陽性の幼若神経細胞が出現した。一方、siRNA導入によりハマルチンまたはツペリンの発現を抑制した細胞では、mTOR下流のリン酸化S6の発現が亢進した。また、この細胞では、BrdUの取り込み亢進とMAT1の発現上昇を認めた。

C. 考察

結節性硬化症の脳皮質結節や上衣下結節に見られる細胞は、細胞の大型化と神経・グリア細胞マーカーの混在した異常な細胞がみられることから、神経初期分化の異常が原因と考えられている。また、TSC1-TSC2から下流のRheb-mTORシグナル系は、細胞増殖制御、細胞周期制御とともに、最近では胚

性細胞の分化制御に関わる機能が明らかになりつつある。TSC2 過剰発現が EC 細胞の神経分化を誘導した今回の結果も、TSC 遺伝子の神経分化調節に関わる機能を示唆する。

一方、多能性分化能を有する胚性細胞は、細胞分化異常をともなう疾患の病態解析を行うモデル細胞として有用であると考えた。本研究では、レチノイン酸を介した神経細胞分化誘導が可能なマウス EC 細胞を用い、TSC1、TSC2 ノックダウンした細胞を疾患モデル細胞として確立した。この細胞ではリン酸化S6 の発現亢進、細胞周期の異常という TSC 病変部細胞と同様の特徴が確認できた。また、ハマルチンと相互作用する候補分子として解析を進めている MAT1 の発現上昇も認められたことから、神経分化における細胞周期制御に関わるハマルチン-MAT1 複合体の機能を示唆した。今後は、患者脳病変部に見られる細胞の特徴である、細胞の巨大化、または神経- グリア細胞分化異常などについて解析を進めて行く予定である。

D. 結論

マウス EC 細胞を用いた培養神経細胞分化誘導系を用い、TSC 遺伝子ノックダウン細胞を TSC の脳病態を解析する疾患モデル細胞として確立した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野耕策 神経線維腫症 1 型 (von Recklinghausen 病) 日本臨牀 68 (1) : 131-135, 2010
- 2) Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Sakuma H, Komaki H, Sasaki M, Maegaki Y, Ohno K, Sato N, Kaneko Y, Otsuki T. Treatment of epilepsy in severely disabled children with bilateral brain malformations. J Neurol Sci. 277 (1-2): 37-49, 2009.
- 3) Sugiura C, Miyata H, Ueda M, Ohama E, Vinters HV, Ohno K. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor (FGF)-2 in epilepsy-associated malformations of cortical development (MCDs). Neuropathology. 28 (4): 372-81, 2008

2. 学会発表

なし

結節性硬化症とその分子機構に関する研究

研究分担者 水口 雅 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教授

研究要旨

結節性硬化症の原因遺伝子である TSC1 と TSC2 は複合体を形成し、mTOR を抑制することにより mTOR 系シグナル伝達に関与している。mTOR が形成する複合体は mTORC1 と mTORC2 が知られているが、mTORC2 に関してはまだ不明な点が多い。一方、低分子 G タンパク質である Rho ファミリーと TSC の関係を述べている報告がある。また、Rac の GEF (guanine nucleotide exchange factor) として最近同定された分子である 1 (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1) は、主に mTORC2 において mTOR と結合し Rac を制御しているとも言われている。我々は、TSC/mTOR シグナル伝達系の新たな経路としてこの P-Rex1 に注目し、TSC との関連を見出すため解析を行い、P-Rex1 の GEF としての機能が TSC1/2 によって増強されている可能性を示唆する結果を得た。今後この結果の再現性や裏付けの確認し、mTOR pathway の中での役割などの解析をより詳細に行っていく。

水口 雅 東京大学大学院医学系研究科
発達医科学教授
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

同定された分子である P-Rex1 (phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate-dependent Rac exchanger 1) は、主に mTORC2 において mTOR と結合し Rac を制御しているとも言われている。

そこで我々は、TSC/mTOR シグナル伝達系の新たな経路としてこの P-Rex1 に注目し、TSC との関連を見出すため解析を行っている。本年度の研究では、TSC1、TSC2、P-Rex1 の mTOR 系シグナル伝達における関係を解明することを目的として、研究を行った。

A. 研究目的

結節性硬化症は TSC1 ないし TSC2 遺伝子変異に起因する常染色体優性遺伝疾患である。TSC1 (hamartin) と TSC2 (tuberin) は複合体を形成し、mTOR を抑制することにより mTOR 系シグナル伝達に関与している。mTOR が形成する複合体として、mTORC1 と mTORC2 が知られており、mTORC1 の上流のシグナルや機能は明らかになってきているが、mTORC2 に関してはまだ不明な点が多い。

一方、低分子Gタンパク質、特に Rho ファミリーと TSC の関係を述べている報告がある。また Rac の GEF (guanine nucleotide exchange factor) として最近

B. 研究方法

1. COS7 細胞を細胞密度 $1 \times 10^4/\text{mm}^2$ で播き、10% 胎児ウシ血清・抗生物質を添加した DMEM 培地で培養した。
2. 24 時間後に Myc-tagged Rac1、Myc-tagged RhoA、Myc-tagged P-Rex1、HA-tagged TSC1、FLAG-tagged TSC2 のプラスミドを、FuGENE6[®] (Roche) を用いて COS7 に導入した。
3. さらに 24 時間後に COS7 からタンパクを抽出し、Rac1 あるいは Rho activation assay kit (Cytoskeleton) を用いて活性型低分子Gタンパク質を pulldown

した。

4. 各tag に対する抗体を用いた Western blotting でタンパクの発現を見た。

C. 研究結果

P-Rex1 単独の強制発現系で、活性型Rac1 の増加が見られた (図 1、左段)。

P-Rex1 とともに TSC1 と TSC2 も同時に強制発現させると、さらに活性型Rac1 の増加が見られた (図 1、右段)。

P-Rex1 単独の強制発現系で、わずかではあるが活性型Rho の増加が見られた (図 1、左段)。

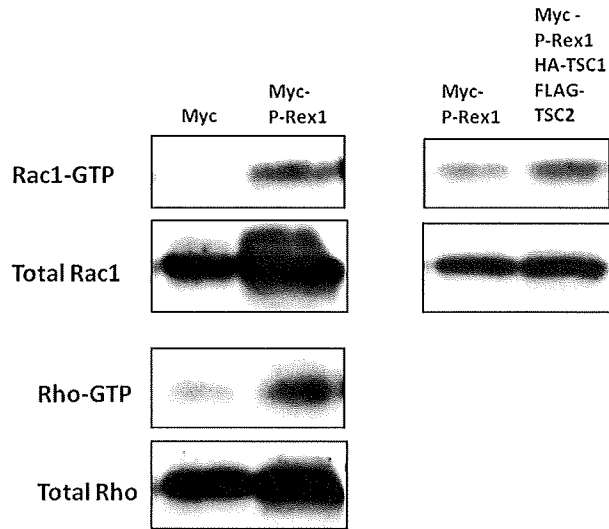


図 1 COS7 細胞へのプラスミド (左段では Myc-tagged P-Rex1、右段では Myc-tagged P-Rex1、HA-tagged TSC1 と FLAG-tagged TSC2) 導入によるタンパク量の変化

D. 考察 (Figure2)

本研究結果から、P-Rex1 の Rac1 に対する GEF としての機能を確認できた。

また TSC1 と TSC2 が P-Rex1 の Rac1 に対する GEF の機能を増強している可能性が示唆された。今後さらに、ノックダウンにより反対の効果がみられるかどうか、この機能が mTORC2 を介したものでかどうかを検証していく必要がある。

従来 RhoA は P-Rex1 により直接活性化されるとは考えられていなかったが、今後この pathway の中で活性型 RhoA の動態も確認していく必要がある。

E. 結論

P-Rex1 の GEF としての機能が TSC1 と TSC2 によって増強されている可能性を示唆する結果を得た。今後この結果の再現性や裏付けの確認し、

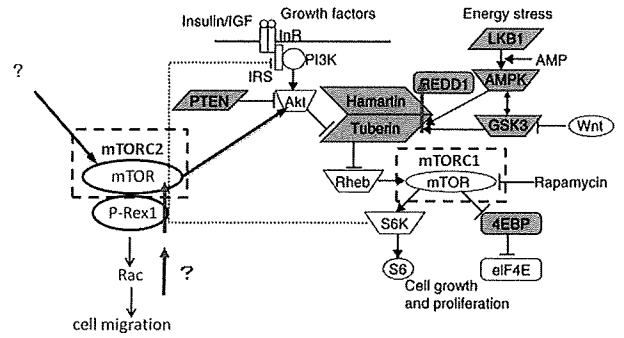


図 2 mTOR pathway と P-Rex1。灰色矢印は本研究の結果を示す。

mTOR pathway 中での役割などの解析をより詳細に行っていくと同時に、神経系での機能も解析していく必要がある。

F. 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*. 2009; 91 (6): 2664-2675
- (2) Nonoda Y, Saito Y, Itoh M, Nakagawa E, Sugai K, Takahashi A, Otsuki T, Saito Y, Arima K, Mizuguchi M, Goto Y, Sasaki M: Activation of microglia/macrophages expressing phosphorylated S6 ribosomal protein in a case of hemimegalencephaly with progressive calcification and atrophy. *Journal of Neurological Sciences* 2009; 287 (1-2): 52-59

2. 学会発表

水口 雅: 神経皮膚症候群研究の進歩 - NF1 (神経線維腫症 1 型) と TSC (結節性硬化症) - 結節性硬化症 (TSC) の脳病変. 第 51 回日本小児神経学会総会シンポジウム、米子、2009 年 5 月 29 日

G. 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。

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

ERC (Expressed in renal carcinoma) は遺伝性腎がん（結節性硬化症遺伝子 *Tsc2* 変異）モデルで発現が誘導される遺伝子であり、ヒトの中皮細胞において特異的に高発現する *Mesothelin* 遺伝子のホモログである。我々は *Erc* ノックアウトマウスと *Tsc2* ノックアウトマウスの交配実験において *Erc* ホモ変異体により腎腫瘍の成長が著しく抑制される結果を得た。また、*Erc* が関わる反応経路が腫瘍発生をコントロールする標的の一つであるとの知見を得た。さらに、*ERC* 遺伝子産物に対する抗体を作製し抗体治療による腫瘍抑制効果を観察した。

樋野興夫 順天堂大学医学部病理・腫瘍学教授

A. 研究目的

Erc 遺伝子は遺伝性腎癌ラット（Eker ラット；*Tsc2* mutant）の腎発がん過程で特異的に発現する遺伝子で、ヒト *Mesothelin* 遺伝子のホモログであり、*Tsc2* ノックアウトマウスの腎腫瘍細胞においても強発現している。腎発がんにおける *Erc* の機能を解明するために我々は *Tsc2* と *Erc* ダブルノックアウトマウスおよびこれらのマウス由来の腎癌細胞株を樹立した。

また今回、抗*ERC*/*mesothelin* モノクローナル抗体（22A31）を作製し *ERC*/*mesothelin* 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果の評価を行った。

ERC/*Mesothelin* は、タンパク分解酵素により、N 末と C 末に別れる。全長型 *ERC*/*Mesothelin* の機能として、*ERK1/2* 活性化を介する細胞死の抑制、細胞接着・浸潤の促進が報告されている。一方、N 末 *ERC* の機能は不明である。我々は、N 末の生物活性を解析した。

B. 研究方法と研究成果

① *Tsc2* のヘテロ変異で有り且つ *Erc* のホモ変異を持つマウスの腎腫瘍サイズは *Tsc2* 単独変異マウ

スの腫瘍に比べ、有意に小さいことがわかり、*Erc* 欠損により腫瘍の増殖が抑制されることが示唆された。②腎腫瘍細胞株をヌードマウス皮下へ移植する実験において、*Tsc2*；*Erc* 両欠損腫瘍細胞の増殖が *Tsc2* 単独欠損腫瘍細胞に比べ著しく抑制される傾向を見出した。③ *Tsc2*；*Erc* 両欠損腎腫瘍細胞株に *Erc* を強発現させた場合、コラーゲンコートプレートに対する細胞接着が強くなる傾向を示し、RNAi 法により一過性に *Erc* 発現を抑制した場合に細胞接着性が低下する傾向を示した。④細胞-基質接着と密接な関係がある *Integrin β1* は Western blot 法で複数のバンドとして検出されるが、*Erc* を強制発現する腎腫瘍細胞株においては、移動度の遅いバンドが減少し、下にシフトしている傾向が示された。さらにリン酸化 *focal adhesion kinase* (*FAK*) の発現レベルは *Erc* 発現により高くしていることが示した。一方、*Erc* 野生型に対して *Erc* の *shRNA* で *Erc* 発現を抑制すると、*Integrin β1* のバンドが上にシフトし、リン酸化 *focal adhesion kinase* (*FAK*) の発現レベルは弱くなっていることが解った。⑤インテグリン免疫染色法で腎腫瘍が陽性を示しているが、これまでのところ *Tsc2* KO/*Erc* WT および *Tsc2* KO/*Erc* +/- マウスでは *Tsc2* KO/*Erc* -/- マウスと比較して、より強く染色される傾向を見出しており、さらに今後検討を進める予定である。

ERC/methelin 発現細胞を MESO4 を用いて nude mouse へ皮下移植を行い、xenograft を作成し、22A31 の腫瘍内投与を行った。コントロール抗体としてはマウス IgG1k を用いた 22A31 はコントロールに比べ著明に腫瘍増殖を抑制した。続いて、in vitro で 22A31 の抗腫瘍活性のメカニズムを解析した。Rag2 -/-マウスの脾臓より effector cell を抽出し、クロムリリースアッセイを行ったところ、Antibody-depend cell mediated cytotoxicity を認めた。また、F (ab1) 2 化 22A31 や抗 Asialo GM1 抗体投与下での 22A31 の腫瘍内投与では抗腫瘍効果を認めなかった。我々の作製した 22A31 は C-ERC/mesothelin 発現腫瘍に対し effector system を介した抗腫瘍効果を認めた。

ERC/Mesothelin の内在性発現のない細胞 Huh7 を用いて、全長型、N 末、C 末それぞれを強制発現させ、細胞増殖に与える影響 (細胞増殖曲線、XTT アッセイ、BrdU 取り込み率測定)、細胞死に与える影響 (トリパンブルー取り込み率測定、TUNEL 染色)、細胞増殖関連シグナル伝達物質のリン酸化への影響を調べた。N 末を強制発現させると、全長型の強制発現時と同様に、細胞内の ERK1/2 のリン酸化は亢進した。C 末単独の強制発現では同様の変化は認められなかった。また、N 末は全長型と同じく細胞死を抑制し、細胞増殖曲線を上昇させた。

C. 結語

Erc/Mesothelin が Tsc2 ノックアウトマウスの腎発がん過程において腫瘍増殖およびインテグリン伝達系関連する細胞接着における重要な役割を果たすことが示唆された。

今後、ERC/mesothelin 発現腫瘍の新規治療として 22A31 の応用が期待される。

全長型 ERC/Mesothelin の機能として報告されている ERK1/2 活性化や細胞死抑制は、分泌型 N 末による作用であると考えられた。

Tsc2 遺伝子変異多段階発がんにおける Erc 遺伝子の役割が明らかとなった。

D. 健康危機情報

特記すべきことなし

E. 研究発表

論文発表

1. Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M. and Hino O.: Establishment of novel

monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* 59: 161-166, 2009.

2. Piao X., Kobayashi T., Wang L., Shiono M., Takagi Y., Sun G., Abe M., Hagiwara Y., Zhang D., Okimoto K., Kouchi M., Matsumoto I. and Hino O.: Regulation of folliculin (the BHD gene product) phosphorylation by Tsc2-mTOR pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389: 16-21, 2009.
3. Matsumoto I., Kouchi M., Okimoto K., Kijima K., Ueda T., Hirayama Y., Inoue T. and Hino O.: Establishment and characterization of renal carcinoma cell lines from a *Bhd* gene mutant (Nihon) rat. *Tumor Biology*, 30: 249-256, 2009.
4. Wang L., Kobayashi T., Piao X., Shiono M., Takagi Y., Mineki R., Taka H., Zhang D., Abe M., Son G., Hagiwara Y., Okimoto K., Matsumoto I., Kouchi M., Hino O.; Serine 62 is phosphorylation site in folliculin, the Birt-Hogg-Dube gene product. *FEBS Letters*, in press, 2009.
5. Fukamachi K., Tanaka H., Hagiwara Y., Ohara H., Joh T., Iigo M., Alexander D.B., Xu J., Long N., Takigahira M., Yonagihara K., Hino O., Saito I.: An animal model of precinical diagnosis of pancreatic ductal carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009 (Corresponding Author: Dr. Hiroyuki Tsuda).
6. Kunogi M., Kurihara M., Shigihara-Ikegami T., Kobayashi T., Shindo N., Kumasaka T., Gunji Y., Kikkawa M., Iwakami S., Hino O., Takahashi K., Seyama K.: Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dubé syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature. *J. Med. Genetics*, in press.
7. Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O., Shimada Y.: Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in Eker rat model. *Cancer Scienc*, in press.
8. Inoue H., Uyama T., Suzuki T., Kazami M., Hino O., Kobayashi T., Kobayashi K., Tadokoro T.: Phosphorylated hamartin-Hsp70 complex regulates apoptosis via mitochondrial localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
9. Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda

M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody *in vivo*. Cancer Sci. 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

神経皮膚症候群に関する研究

研究分担者 大西五三男 東京大学整形外科脊椎外科専任講師

研究要旨

先天性脛骨偽関節症の偽関節部分の骨癒合・骨癒合強度評価が可能な装置の開発

A. 研究目的

神経線維腫症に合併する先天性脛骨偽関節症は、骨癒合が得にくい極めて難治性の疾患である。近年、手術法の進歩により骨癒合率は上昇しているが、偽関節部の骨幅の狭小や変形は残存する場合が多い。その結果、長期の創外固定器・ギプス・装具の装着が新たな課題となっている。我々は、偽関節部の骨癒合程度を非侵襲に定量評価し、手術・後療法時期の適切な判断を可能とする判定装置の開発に取り組み Echo tracking 法（ET 法）を開発した。これにより、微小荷重に対する変形を定量的に検出し、骨癒合を評価可能である。しかし先天性脛骨偽関節症の患者に対する測定はプローブを小型に改良する必要がある。我々は術中に用いる長軸 31mm の小型プローブを骨計測用に新たに開発し、臨床評価できないか検討した。よって本年度の目的は、

- ①小型プローブの Echo Tracking Angle の計測精度評価
- ②先天性脛骨偽関節症患者への臨床測定評価である

B. 研究方法

使用プローブ

・UST-536（アロカ（株））

プローブ精度評価

角度が 90 で表面が十分研磨された金属板を、部分的に水槽に沈めた。この平板を垂直方向に秒速 50 μ m で移動させ、その時の変位量を、高精度のレーザー変位計と小型プローブの両方を用いて同時に計測を行った。

レーザー変位計より得られる変位量 DL と超音波プローブより得られる変位量 DP の差の絶対値を計

測し評価した。

臨床評価

患者 5 歳（手術時年齢）、女兒

左下腿に偽関節を認め、脚長差は 90mm。

手術は、骨切除後に脛骨延長を行った。

現在術後 6 年で、レントゲン上骨癒合は得られており、荷重歩行も行っている。この患者に対して ET 法による骨強度評価を行った。

（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情報は公開されない。

C. 研究結果

プローブの精度評価

プローブ上の 3 点で計測し、合計 3 回行った。DL と DP の絶対値の平均は 2.9 μ m であり、角度検出精度は $\text{ArcTan} (2.9/12.8 \times 10^3) = 0.013$ 度であった。

臨床評価結果は、

右健側: 0.046 \pm 0.002 度

左患側: 0.045 \pm 0.003 度

であった。

以上の結果より、プローブを変更後も高精度に

ET angle の計測が可能であり、また臨床評価においても、先天性脛骨偽関節症の患者の骨癒合・骨癒合強度を定量的に評価可能であった。

今後は、症例数を増やすとともに測定 of 正確性・再現性を検証していく予定である。

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ー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)

CT/有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価ー検者内・検者間解析信頼性、解析再現性について: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、Osteoporosis Japan 17 巻 増刊 1 号 Page200

CT 有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価ー年齢別骨強度値の作成と骨強度に影響する因子の解析:金子雅子、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、林直人、Osteoporosis Japan 17 巻 増刊 1 号 Page200

CT/有限要素法を用いた脊椎椎体の日常生活における骨強度評価ー骨粗鬆症治療効果判定への応用:松本卓也、大西五三男、別所雅彦、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、Osteoporosis Japan17 巻 増刊 1 号 Page202

CT/有限要素法による椎体骨折リスクおよびアレンドロネート効果の評価:今井一博(東芝病院 スポーツ整形外科)、大西五三男、山本精三、中村耕三、Osteoporosis Japan17 巻 2 号 Page226-229

松本卓也、大西五三男、別所雅彦、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、CT/有限要素法を用いた脊椎椎体の日常生活における骨強度評価ー骨粗鬆症治療効果判定への応用ー、SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator7 号 Page88-89

別所雅彦、大西五三男、金子雅子、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、塩酸ラロキシフェン 2 年内服患者における大腿骨近位部の骨強度変化ーCT/有限要素法による薬剤効果判定への応用ー、SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator7 号 Page90-91

- 金子雅子、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、林 直人、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、日本整形外科学会雑誌 83 巻 2 号 PageS182
- 今井一博、大西五三男、山本精三、中村耕三、骨強度評価法を用いた閉経後女性における椎体骨折リスクおよびアレンドロネート効果の評価、日本整形外科学会雑誌 83 巻 2 号 PageS181
- 別所雅彦、大西五三男、松本卓也、大橋 暁、金子雅子、飛田健治、松山順太郎、中村耕三、CT 非線形有限要素法を用いた大腿骨近位部と腰椎の骨強度評価について、日本整形外科学会雑誌 83 巻 2 号 PageS181
- 大橋 暁、大西五三男、松本卓也、飛田健治、別所雅彦、松山順太郎、金子雅子、中村耕三、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、日本整形外科学会雑誌 83 巻 3 号 PageS574
- 大西五三男、別所雅彦、松本卓也、金子雅子、中村耕三、高齢者の骨脆弱性骨折の予防 定量的 CT を用いた有限要素法による大腿骨近位部の力学特性・強度の評価、日本整形外科学会雑誌 83 巻 3 号 PageS672
- 石橋英明、大西五三男、松本卓也、別所雅彦、中村耕三、CT/有限要素法解析による腰椎椎体骨強度に対するラロキシフェンの効果、日本整形外科学会雑誌 83 巻 2 号 PageS180
- 飛田健治、大西五三男、松本卓也、大橋 暁、別所雅彦、松山順太郎、金子雅子、中村耕三、低出力超音波パルス治療の骨癒合リモデリング期に対する効果 マイクロ CT を用いた仮骨の髓腔化・皮質骨化の定量評価、日本整形外科学会雑誌 83 巻 8 号 PageS1239
- 中村耕三、低侵襲・高精度骨折整復・治療支援システムの開発、新しい医療機器研究 14 巻 Page50-52
- 宮坂好一、廣田浩二、酒井亮一、皆川栄一、村下 賢、大橋 暁、大西五三男、中村耕三、超音波による関節軟骨音速の高精度計測法、超音波医学 36 巻 Suppl. PageS455(2009.04)
- 大西五三男、松山順太郎、【骨折とその治癒機転】超音波エコートラック法を用いた骨癒合判定法 Clinical Calcium 19 巻 5 号 Page682-690 (2009.04)
- 大西五三男、【骨粗鬆症の薬物療法 薬効評価と臨床研究の進歩】薬物療法総論 薬物治療の薬効評価と意義 定量的CTを用いた有限要素法による骨強度評価と薬剤効果判定日本臨床 (0047-1852) 67 巻 5 号 Page932-937
- 大西五三男、【創外固定の原理と応用 基礎から新しい臨床展開まで】創外固定の原理 (基礎) 創外固定法の基礎、別冊整形外科 55 号 Page13-18
- Matsumoto T, Ohnishi I, Bessho M, Imai K, Ohashi S, Nakamura K, Prediction of vertebral strength under loading conditions occurring in activities of daily living using a computed tomography-based nonlinear finite element method. Spine. 2009 15; 34 (14): 1464-9.
- Bessho M, Ohnishi I, Matsumoto T, Ohashi S, Matsuyama J, Tobita K, Kaneko M, Nakamura K. Prediction of proximal femur strength using a CT-based nonlinear finite element method: differences in predicted fracture load and site with changing load and boundary conditions. Bone. (2): 226-31.
2. 学会発表
- CT・CAD/有限要素法解析を用いた Lag screw 刺入高位による大腿骨頸部の応力・ひずみの検討：松本卓也、大西五三男、別所雅彦、大橋 暁、金子雅子、飛田健治、中村耕三、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- CT/有限要素法による非線形解析を用いた大腿骨近位部の強度評価－荷重・拘束条件の相違による予測骨強度・部位の相違について－：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 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- CT/有限要素法解析を用いた創外固定抜去後骨欠損例の経時的骨強度予測：大橋 暁、大西五三男、松本卓也、別所雅彦、金子雅子、飛田健治、松山順太郎、岡崎裕司、佐藤和強、中村耕三、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- μCT 解析ソフトを用いた 3 次元慣性モーメントによる仮骨強度評価：飛田健治、大西五三男、松本卓也、大橋 暁、別所雅彦、金子雅子、松山順太郎、中村耕三、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- レーザを用いた創外固定器の設置支援に関する検討：林 成煥、道家健仁、小野本真哉、中島義和、光石 衛、佐久間一郎、別所雅彦、大

- 西五三男、中村耕三、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- 皮的穿刺のためのレーザによる位置・姿勢呈示：林成煥、道家健仁、小野木真哉、中島義和、光石 衛、佐久間一郎、別所雅彦、大西五三男、中村 耕三、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- Universal-Bar-Link 創外固定器の位置姿勢誘導システムの開発：石原良太、鄭 常賢、小林英津子、大西五三男、伊藤悠平、清徳省雄、清 徳則、落合正志、伊藤孝則、長谷川孝則、別所雅彦、松本卓也、飛田健治、大橋 暁、中村耕三、金子雅子、佐久間一郎、第 18 回日本コンピュータ外科学会、2009
- 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 EFORT 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。)

1. 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

「超音波骨癒合診断装置」

発明者 : 酒井亮一、岡田孝

出願人 : アロカ (株)

出願番号 : 特願 2008-185468 号

出願日 : 2008 年 7 月 17 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

髄膜腫の網羅的エピゲノム解析

研究分担者 齋藤 清 福島県立医科大学脳神経外科教授

研究要旨

今回我々は、髄膜腫の発生及び悪性転化に遺伝子プロモータ領域の hypermethylation が関与する可能性につき検討した。髄膜腫において、悪性化に伴いメチル化の蓄積傾向を示す遺伝子が存在する。また髄膜腫においては、血管新生系のネガティブフィードバックとして機能する可能性のある HIF3A の発現が低下しており、これは DAC にて発現が回復することから、DNA 過メチル化が HIF3A の発現抑制機構として重要な役割を果たしていると推察される。

岸田悠吾 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科
夏目敦至 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科准教授
若林俊彦 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科教授
近藤 豊 愛知県がんセンター分子腫瘍学部

生及び悪性転化における腫瘍関連遺伝子プロモータ領域の hypermethylation の関与の有無につき検討した。

B. 研究方法

対象：髄膜腫（WHO grade 1）23 例、異型髄膜腫（grade 2）6 例、異型髄膜腫 cell line 3 系統（IOMM-Lee, HKBMM, KTelmgl）。

過メチル化遺伝子同定のための一次スクリーニングとして、一部の臨床検体を用い MCAM（Methylated CpG islands amplification microarray）を施行し、その結果に基づき pyrosequencing を行った。また、pyrosequencing にて著明な過メチル化の認められた 1 遺伝子につき、RT PCR にて発現解析を行った。（倫理面への配慮）

本研究は連結可能匿名化にて進めており連結名簿は研究代表者のみ保有している。当院の症例については研究目的で遺伝子解析を行う旨の同意書を術前に得ており、また他院より症例を得るに当たっては倫理審査依頼を提出し、外部委員を含む倫理委員会を経て検体を得た。

C. 研究結果

MCAM：12 症例（grade 16 例、grade 26 例）の 6157 gene, 15137 loci に対する解析結果より、遺伝子プロモータ領域の過メチル化（Sample/Con-

A. 研究目的

髄膜腫は神経線維腫症 2 型（NF2）にも高頻度に随伴する良性腫瘍であり、頭蓋内において最多の原発性腫瘍である。単発生の場合多くは摘出術により寛解治癒が得られるが、NF2 においては、時間的・空間的に多発傾向を示すことによって頻回の開頭手術を要したり神経障害を残す原因となったりする。また、髄膜腫には一部、周囲組織に強い浸潤をきたし臨床的に不良な経過を辿る例や、病理所見上悪性像を呈する例が存在する。

Genetic な見地からは、髄膜腫の発生過程での NF2 gene mutation や 22qLOH、悪性化の過程においては 1p、6qLOH、9p21 欠損の関与などが示唆されているが、特に後者においては未だ議論の余地が多く、また epigenetic factor については過去に網羅的に評価した報告はほとんどない。我々は、髄膜腫に対する新たな治療開発に結び付けるため、髄膜腫発

trol signal ratio ≥ 2) と判定された遺伝子は grade 1 250/6157 gene (4.06 %)、445/15137 loci (2.94 %)、grade 2 323/6157 gene (5.25 %)、567/15137 loci (3.75%)であった。一方、grade 1 群優位に高頻度に過メチル化傾向を示した遺伝子 (grade 14 例/6 例以上かつ grade 2 3 例/6 例以下) は 24 遺伝子、grade 2 群優位に高頻度に過メチル化を示した遺伝子 (grade 24 例/6 例以上かつ grade 1 群 3 例/6 例以下) は 79 遺伝子であり、grade 2 にて遺伝子プロモータ領域のメチル化が集積する傾向が見られた。両群ともに高頻度に過メチル化が見られた遺伝子は、8/12 例以上では 55 遺伝子、10/12 例以上では 19 遺伝子であった。

Pyrosequencing: 上記解析結果から特に群間の差の大きい遺伝子を抽出し pyrosequencing を施行した。遺伝子発現と過メチル化の相関を検討する上では、転写開始部位から上流 200bp 前後の CpG の密な遺伝子プロモータ領域に解析対象部位を設計する必要がある。このような部位でかつ信頼に足る pyrosequencing

が施行できたのは、現在までで 14 遺伝子である (MMP14、HOXA5、MGMT、FAIM2、HIF3A、TUBA4、MCF2L2、SFRP-1、RUNX3、RASSF1A、WNT6、CHAD、CLIC6、REC8 の 14 遺伝子及び、グローバルなメチル化の指標となる LINE-1 につき pyrosequence を施行した)。MCAM 結果と相関した結果を示したのは 6/14 遺伝子であった (図 1)。HOXA5 では grade 1 優位に、また CHAD では grade 2 優位に過メチル化傾向が見られ、REC8、CLIC6、HIF3A では全体に高いメチル化状態を示した。

Real-Time RT-PCR:HIF3A 遺伝子に対する RT PCR では、臨床検体のうち 2 例 (No.8, 22) で control より高発現を示し 2 例 (No.9, 10) ではほぼ control と同程度の発現であったものの、25 症例及び cell line 2 系統では $1/10^2$ - 10^3 程度の著明な発現低下が見られた (図 2)。また、DAC を添加し培養した cell line においては、未処理の cell line に比し 18-588 倍の cDNA が認められ、DAC にて HIF3A の発現が回復することが確認された (図 3)。

		HOXA5	RUNX3	CHAD	REC8	CLIC6	HIF3A
control	Male	11.0	7.3	4.7	8.7	11.6	62.0
	Female	12.1	7.9	5.0	8.7	14.5	68.1
Grade I	1	34.9		10.9	9.9	36.7	93.7
	2	24.3		12.5	75.1	7.8	94.8
	3	27.2		5.5	10.8	64.4	96.7
	4	26.2		7.2	11.3	59.5	97.0
	5	17.8		4.3	11.5	17.8	96.1
	6	16.6		5.6	26.2	42.3	96.4
	7	30.0		5.5	25.8	53.4	96.0
	8	12.6		15.6	26.5	29.3	96.8
	9	26.0		19.7	17.8	24.5	95.5
	10	14.1		13.7	38.9	43.2	95.6
	11	38.7	9.6	22.2	45.5	20.5	94.1
	12	36.7	27.2	22.4	27.8	43.1	92.4
	13	30.0		11.3	7.5	9.7	96.9
	14	38.8	7.5	8.7	10.7	12.7	92.7
	15	20.5	41.1	24.1	59.7	32.5	95.1
	16	21.2	20.2	8.2	13.0	41.1	94.8
	17	36.9		11.2	51.9	88.5	94.0
	18	18.5		5.1	12.2	8.4	96.6
	19	33.2		24.8	33.4	23.1	91.8
	20	21.1		9.3	47.4	30.7	96.9
	21	32.0		26.6	26.1	75.1	96.6
	22	17.3	7.7	5.4	11.7	38.0	97.0
	23	21.8	17.3	7.2	71.6	12.6	93.7
Grade II	24	39.3	39.6	22.7	51.9	58.2	94.8
	25	9.3	42.9	5.0	7.1	46.6	97.4
	26	20.2	14.1	22.1	26.6	59.2	96.4
	27	12.5	15.2	19.5	53.4	56.8	94.2
	28	11.7	17.3	36.1	29.5	46.9	81.4
	29	14.4		26.6	15.0	6.7	94.3
cell line	IOMM-Lee	12.4	96.0	73.3	96.4	92.0	95.8
	HKBM	66.2	48.4	59.9	96.4	85.0	98.9
	KTelmgl	5.3	3.9	30.9	95.7	64.0	97.3

図 1 The quantitative results on pyrosequencing
The promoter domain methylation of HOXA5 shows higher percentage in grade 1 samples than grade 2 samples. Conversely, it is high in grade 2 samples in CHAD, and in both groups in REC8, CLIC6, HIF3A.

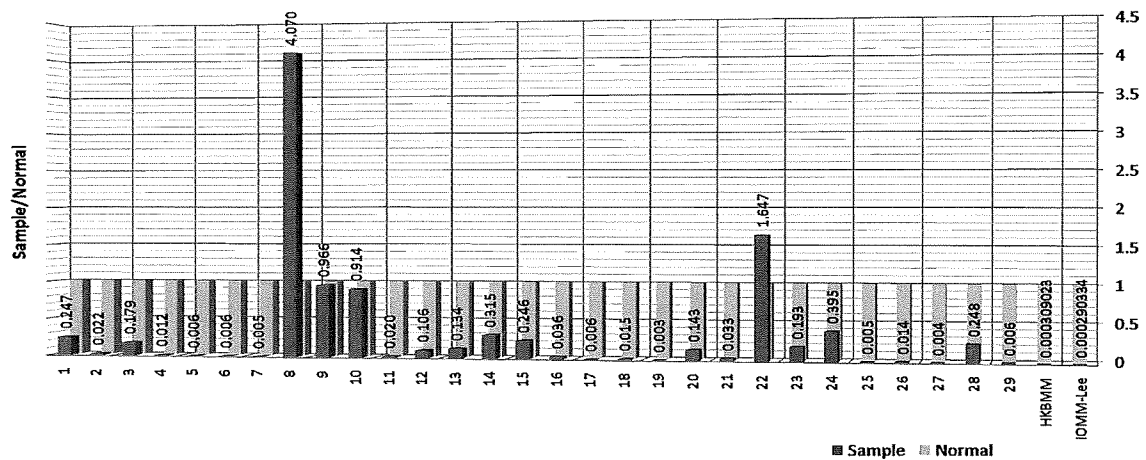


図2 The Real-Time RT PCR result of HIF3A gene in all samples and cell lines

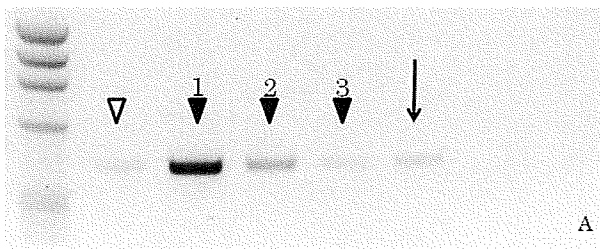


図3A The RT-PCR result of HIF3A gene in HKBMM; before and after the addition of DAC
 ▽ no treatment ▼ DAC 3uM ▼ DAC 5uM ▼ DAC 10uM ↓ Normal brain tissue

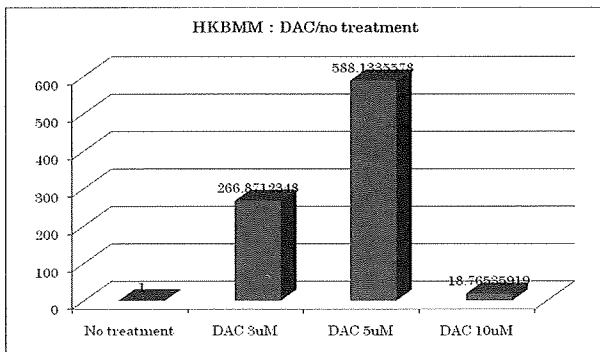


図3B The Real-Time RT PCR result of HIF3A gene in HKBMM; before and after the addition of DAC

D. 考察

Customized microarray を用い、網羅的に髄膜腫の DNA 過メチル化解析を行った。全遺伝子における DNA メチル化の頻度は grade 1 4.06%、grade 2 5.25% と、軽度ながら悪性化に伴い過メチル化遺伝子が増加する傾向を示した。また、grade 2 では共通の遺伝子にメチル化が集積する傾向が見られたのに対し、grade 1 ではメチル化が比較的散在する傾向を示した (4 例/6 例以上に過メチル化がみられた

のは grade 2 79 遺伝子に対し grade 1 24 遺伝子)。

現在までの解析で過メチル化状態を示した遺伝子のうち、今回、HIF3A に着目して発現解析を進めた。HIF3A のスプライシングバリエーションである IPAS: inhibitory PAS (Per/Arnt/Sim) は低酸素環境下で誘導され、HIF1 α (Hypoxia inducible factor 1 α) と結合して HRE (hypoxia response elements) への結合を阻害することで、angiogenesis に働く VEGF、EPO、PDGF などの低酸素誘導因子の発現を抑制する、negative regulator である可能性が示唆されている²。今回われわれの検体において、正常組織では HIF3A の発現が見られたのに対し腫瘍組織及び cell line でその発現が大きく低下していたことは、髄膜腫において低酸素誘導因子発現の調節機構が破綻している可能性を示唆しており、興味深く捉えている。DAC 添加により発現が回復したことより、DNA メチル化が HIF3A の発現抑制に重要な役割を持っており、かつ可逆的の反応であることが示された。今後 HIF3A 強制発現が腫瘍増大や血管新生等に与える影響につきさらなる追加実験を検討している。

E. 結論

髄膜腫において、悪性化に伴いメチル化の蓄積傾向を示す遺伝子が存在する。また髄膜腫においては、血管新生系のネガティブフィードバックとして機能する可能性のある HIF3A の発現が低下しており、これは DAC にて発現が回復することから、DNA 過メチル化が HIF3A の発現抑制機構として重要な役割を果たしているかと推察される。