

- 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
- 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 EF-FORT 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 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

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

結節性硬化症原因遺伝子産物ハマルチンとツペリンは相互作用することで、ツペリンのユビキチン分解を抑制している。今回、蛍光蛋白質発現実験系を用い、ハマルチンとツペリンの結合を光学的に検出できる細胞系の構築を試みた。培養神経細胞株を用いた予備的な実験の結果、ハマルチンとツペリンの結合を蛍光量として検出することができ、また変異を導入したツペリンでは蛍光が減少した。今後はこの細胞系を用い、変異ハマルチンの発現を相補する化合物の探索などに応用してゆく。

A. 研究目的

結節性硬化症原因遺伝子TSC1, TSC2の遺伝子産物であるハマルチンとツペリンは相互作用することで、ツペリンのユビキチン分解を抑制的に作用し、下流のシグナル伝達を行っている。よって、変異蛋白質の折りたたみ異常を補正する、または分解系を制御することで、変異蛋白質の発現を回復できる可能性が考えられる。本研究では、ハマルチンとツペリンの結合を効率的に検出できる細胞系の構築を樹立することを目的とした。

B. 研究方法および結果

1) 発現ベクターの構築

緑色蛍光蛋白質のN末とC末断片（mKG_N、mKG_C）にPCR法を用いそれぞれヒトTSC1とTSC2全長cDNAを結合し、融合蛋白質発現ベクターを構築した（pmKG_N-TSC1、pmKG_C-TSC2）。また、site-directed mutagenesis法によりTSC2遺伝子内にR611QとR905Q変異を導入した。構築したベクターはシーケンス解析により確認した。

2) 細胞発現実験

ラット副腎褐色細胞腫株PC12細胞にリポフェクション法によりベクターを一過性に導入後、蛍光顕微鏡下で蛍光を観察、画像を取得した。また、取得画像から蛍光量を算出した。結果、pmKG_N-TSC1

をpmKG_C-TSC2同時に導入した細胞で、緑色の蛍光シグナルが検出できたのに対し、それぞれ単独では検出できなかった。また、ミスセンス変異を導入したTSC2（R611QとR905Q）とpmKG_N-TSC1を導入した細胞でも蛍光シグナルは得られなかった。さらに、pmKG_N-TSC1とpmKG_C-TSC2 R611Qを導入後、プロテアソーム阻害剤MG132を5, 10 μ Mを含む培地で12時間培養することにより、導入細胞の蛍光が有意に増加した。

C. 考察

結節性硬化症では原因遺伝子TSC1またはTSC2のいずれかの遺伝子の2ヒット変異により、機能蛋白質が欠損し、下流のRheb-mTORシグナルの活性化を引き起こすことが分子病態と考えられている。一般に、変異蛋白質の多くは小胞体の蛋白質品質管理機構により検出され、ユビキチン-プロテアソーム分解系により速やかに分解される。そこで、変異蛋白質の折りたたみ異常を分子シャペロンである熱ショック蛋白質（Hsp70など）により相補する、あるいは蛋白質分解系を抑制することにより、疾患を予防する試みがポリグルタミン病をはじめとした遺伝性神経変成疾患を対象に行われている。

今回、蛍光蛋白質発現系を用い、ハマルチンとツペリンの細胞内結合を生細胞で簡便に検出できる実験系の構築を行い、正常TSC2とミスセンス変

異を導入した TSC2 遺伝子のハマルチン結合の違いを明確に検出することができた。また、変異 TSC2 (R611Q) の異常をプロテアソーム阻害剤により相補できたことは、蛋白質分解系の制御によりシグナル異常を防ぐことができる可能性を示唆した。今後はこの細胞系を用い、分子ライブラリーなどの中からハマルチンとツペリンの結合に対し上昇効果を示す化合物の検索を行う。また、培養神経細胞の表現形に対する保護効果などを検討する。

D. 結論

蛍光蛋白質発現系を用い、ハマルチンとツペリン結合を効率的に検出できる細胞系を構築した。

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. 学会発表

該当なし

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

結節性硬化症は高率に精神遅滞と自閉症を合併する。知的障害と行動異常は、結節性硬化症における患者 QOL 低下の最大の要因である。結節性硬化症に合併する自閉症の治療を目指す translational research の基礎研究として、われわれは本研究でモデル動物における自閉症様行動異常の有無を調べた。Tsc1^{+/-}および Tsc2^{+/-}マウスはいずれも雌雄ともに social interaction test において新奇マウスの探索時間が短く、立ち上がり行動が多いという異常を示し、この所見はヒト自閉症患者の症状に類似すると考えられた。今後の研究で、この自閉症様行動異常がラパマイシンによる治療で改善するか否かを検討する予定である。

水口 雅 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教授
佐藤敦志 東京大学大学院医学系研究科小児医学大学院生
池田和隆 東京都精神医学総合研究所分子精神医学研究ディレクター
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 順天堂大学医学部病理・腫瘍学教授
小林敏之 順天堂大学医学部病理・腫瘍学准教授

た TSC モデルマウスを用いた先行研究で、変異マウスはてんかん発作をおこさず皮質結節などの神経病変も合併しないが、記憶学習障害を示すことが報告されている。つまりこの障害は結節やてんかんによる二次的なものではなく、遺伝子異常の直接の結果と考えられる。いっぽう自閉症との関連では現在のところ、メス Tsc1^{+/-}マウスにおける他のマウスへの探索行動の低下、メス Tsc2^{+/-}マウスの育児行動の異常が報告されたのみである。そこで Tsc1^{+/-}および Tsc2^{+/-}マウスが雌雄ともに自閉症様行動を示すか、両系統に同じ行動実験を行って検討した。

A. 研究目的

自閉症は、社会的相互交流の障害、コミュニケーションの障害、反復的常同的な行動を主症状とする発達障害のひとつである。有病率は人口の1%以上で、知的障害の有無や程度に比して社会適応の困難が強いことが問題である。

結節性硬化症（TSC）は全身の過誤腫、中枢神経病変および皮膚病変からなる神経皮膚症候群である。TSC は知的障害、てんかん、自閉症を高率に合併することでも知られ、原因が既知の自閉症としては最も頻度が高い。自閉症全体では男性で多いが TSC に合併する自閉症では性差がなく、TSC が直接自閉症の発症と関連すると推測される。

TSC の原因遺伝子である TSC1、TSC2 を改変し

B. 研究方法

Tsc1^{+/-}および Tsc2^{+/-}マウスは東京都精神医学総合研究所（精神研）で繁殖し、離乳後1週間以上経ってから以下の実験を行った。実験は動物実験等の実施に関する基本指針に従い、精神研において承認を受けて行った。

【General condition】日齢 30 前後の離乳時に身体所見をチェックした。

【Open field test】直径 30cm の円筒状のフィールドにマウスを入れ、SUPERMEX（室町機械）を用いてマウスの運動量を2時間にわたって計測した。

【Pole test】バランスの異常を検討するために行った。直径 1cm、長さ 50cm の床に垂直に固定した木の棒

を用いた。測定前日にマウスを棒の先端に頭を上向きに捕まらせ、実験環境に慣れさせた。当日は同様にマウスを棒につかまらせ、下向きに向き直るまでの時間、床に下りるまでの時間を計測し、5回の計測の最小値を解析に用いた。

【Rotarod test】運動学習のテストとして行った。マウスを毎分10回転に設定したロータロッド装置（室町機械、直径9cm）に乗せ、落下までの時間をカットオフ値180秒で測定した。実験は1日5回、5日連続で行い、各実験日について5回の計測の最大値を解析に採用した。

【Social interaction test】自閉症様行動のひとつである相互交流を評価した。マウスをホームケージで15分間単独にし、初めて接触する同性のマウス（C57BL/6J）をケージに入れ、マウスの行動を10分間ビデオ撮影した。相互交流に相当する行動（anogenital sniffing, allo-grooming, mounting など）の時間および立ち上がり行動の回数を計測した。

【Tube test】相手に対する優位性をテストした。異なるケージで飼育されている同性の野生型マウスと変異マウスを、透明のチューブ（長さ33cm、直径3.5cm（オス）、2.6cm（メス））に向かい合わせに入れた。先にチューブから出たマウスを負け、残ったマウスを勝ちとし、変異マウスと野生型マウスの勝率を比較した。

【Novel object test】新奇性を調べる実験であり、白色のプラスチックボトル（直径2cm、高さ6cm）をホームケージの中央に置き、social interaction testと同様に行った。マウスがボトルを探索した時間および立ち上がり行動の回数を計測した。

【Food exploring test】嗅覚低下の有無を検査した。マウスは実験前日より16時間絶食にし、水分のみ与えた。通常マウスが食べている固形餌を0.5gの小片にし、新しいケージの床敷の下約5mmに埋めておき、マウスをそのケージに入れて餌を探させた。マウスが餌を見つけるまでの時間、餌を食べるまでの時間を計測した。

【Light/dark box test】不安傾向を検査するために採用した。実験には中央で仕切られた箱を用い、一方は壁面を白にして上からライトで明るくし、もう一方は壁面を黒にして天井を覆った。マウスを明るい側に入れ、暗い側にいた時間および仕切りを通過した回数を自動計測装置（Neuroscience）で10分間計測した。

統計解析にはStatView ver 5.0を使用した。Open field test、rotarod testは反復測定分散分析を用い、

tube testは二項検定によって解析した。その他の実験結果は分散分析を用いて解析した。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

Tsc1^{+/-}およびTsc2^{+/-}マウスの身体所見は野生型と同等であった。運動については、open field testにおいてオスの運動量がメスより高かったが、遺伝子型による差はなかった。Pole test、rotarod testの結果にも遺伝子型の差はなかった。

自閉症様行動に関して、変異マウスはsocial interaction testにおいて新奇マウスの探索時間が短く、立ち上がり行動が多く観察された。この差は両系統とも雌雄に分割して解析しても有意だった。自閉症様行動に見せかける行動異常については、tube test、novel object test、food exploring testおよびlight/dark box testにおいて遺伝子型による差はみられなかった。

D. 考察

Tsc1^{+/-}およびTsc2^{+/-}マウスがsocial interactionの低下という自閉症様行動を示すことが明らかとなった。両系統とも雌雄差がなかったことは、臨床においてTSCに合併する自閉症に性差がないというデータにも一致する。TSCモデルマウスが神経病変をもたず、てんかんも発症しないことを考慮すると、自閉症様行動はTsc1およびTsc2の遺伝子異常によって直接生じたと考えられる。Tsc1^{+/-}およびTsc2^{+/-}マウスともにmTORの活性亢進を示しており、ラパマイシンによるmTORの抑制が自閉症様行動を正常化すれば、遺伝子異常と自閉症様行動との因果関係がより明瞭になるだろう。

遺伝子型による有意差がある行動として、social interaction testを行っている間の立ち上がり行動の増加が明らかとなった。立ち上がり行動に注目した先行研究は乏しく、行動の意義も明らかではないが、自閉症の症状と比較すると常同行動のひとつかもしれない。

E. 結論

Tsc1^{+/-}およびTsc2^{+/-}マウスが雌雄ともに自閉症様行動を示すことが明らかとなった。ラパマイシン投与によりオスTsc2^{+/-}マウスの記憶学習障害が改善したという先行研究があり、自閉症様行動もラパマイシンで正常化するか検討を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tumorhhu M, Saitoh M, Sato A, Takahashi K, Mimaki M, Takita J, Takeshita K, Hama T, Oka A, Mizuguchi M. Comprehensive genetic analysis of overlapping syndromes of RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Pediatr Int* 2010; 52(4): 557-562.
 - (2) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev in press*.
 - (3) Mizuno Y, Takahashi K, Igarashi T, Saito M, Mizuguchi M. Congenital infection-like syndrome with intracranial calcification. *Brain Dev in press*.
 - (4) 水口 雅. 神経皮膚症候群研究の進歩－NF1（神経線維腫症I型）とTSC（結節性硬化症）－. *脳と発達* 2010；42（2）：150-152.
 - (5) 水口 雅. [小児の治療指針] 結節性硬化症. *小児科診療* 2010；73（Suppl）：S750-752.
 - (6) 水口 雅. 新時代の脳腫瘍学－診断・治療の最前線－結節性硬化症. *日本臨牀* 2010；68（Suppl. 10）：208-213.
- ### 2. 学会発表
- (1) 齋藤真木子、篠原麻由、高橋 寛、山中 岳、雨宮 馨、久保田雅也、水口 雅：テオフィリン関連急性脳症におけるアデノシン受容体

A2aのSNP解析. 第113回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010年4月25日

- (2) 齋藤真木子、高梨潤一、山内秀雄、久保田雅也、後藤知英、菊地正広、椎原 隆、山中 岳、水口 雅：日本人急性脳症患者の遺伝的素因について－SNPによるCPTII遺伝子型解析－. 第52回日本小児神経学会総会 福岡、2010年5月20日
- (3) 内野俊平、水野葉子、岩崎博之、高橋 寛、齋藤真木子、水口 雅：痙攣重積型急性脳症の臨床経過. 第52回日本小児神経学会総会 福岡、2010年5月20日
- (4) 佐藤敦志、高松幸雄、曾良一郎、水口 雅、池田和隆：アリピプラゾールがドーパミントランスporter欠損マウスの多動および協調運動障害に与える効果. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会、仙台、2010年9月15-17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。

結節性硬化症の顔面血管線維腫の治療の現状

研究分担者 片山一郎 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教授

研究要旨

結節性硬化症の皮膚症状の中で顔面の血管線維腫は高頻度に出現し、患者にとって苦痛の大きい症状の一つである。しかしながらその治療法はレーザーやメスを用いた外科的治療法が主であり、局所麻酔での治療が不可能な重度の精神発達遅滞を伴う患者にとっては全身麻酔での処置が不可欠となる。従って、重度の癲癇や肺病変、腎病変等のために全身麻酔も危険を伴う患者にとっては有効な治療法がない。今回我々は大阪大学皮膚科でフォロー加療中の患者 151 人について顔面の血管線維腫の特徴を調べるとともにその治療についても検討し、治療の問題点や新しい治療の必要性などについて考察した。

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

結節性硬化症の皮膚症状の中で顔面の血管線維腫は高頻度に出現し、患者にとって苦痛の大きい症状の一つである。しかしながらその治療法はレーザーやメスを用いた外科的治療法が主であり、局所麻酔での治療が不可能な重度の精神発達遅滞を伴う患者にとっては全身麻酔での処置が不可欠となる。従って、重度の癲癇や肺病変、腎病変等のために全身麻酔も危険を伴う患者にとっては有効な治療法がないのが現状である。そこで、今回我々は本症の血管線維腫の治療の問題点や新しい治療法の必要性について検討するために、大阪大学皮膚科でフォロー加療中の患者 151 人について顔面の血管線維腫の特徴を調べるとともにその治療についても検討考察した。

B. 研究方法

2002 年から 2010 年の間に大阪大学皮膚科を受診し、フォロー、加療されている結節性硬化症の患者 151 人に対して、顔面の血管線維腫（AF）を AF なし、軽度、中等度、重度の 4 段階に分類し、精神発達遅滞の程度と AF の重症度との関係をみた。軽度とは直径 2mm までの小丘疹が散在し、各丘疹は

融合せず、丘疹の合計面積が顔面の 50% 以下のものとした。中等度とは丘疹の合計面積が 50% 以上 75% までで、各丘疹は融合し一部が局面を形成していてもよい。ただし局面の厚さが 5mm を超えないものとした。重度は各皮診の合計面積が 75% を超えるかあるいは局面の厚さが 4mm を超えるものと定義した。精神発達の遅滞は、サポートがあれば 1 人で社会生活が可能なものを軽度、自分の身の回りのことはできるが社会生活は不可能なものを中等度、サポートがなければ何もできない程度を重度とし、精神発達遅滞なしを含めて 4 段階に分けた。

治療法に関しては、全身麻酔による外科的手術、局所麻酔による外科的手術、局所外用麻酔によるレーザー治療、麻酔のいらぬ液体窒素療法および無治療群にわけ複数治療経験者は主たる治療方法を選んだ。

（倫理面への配慮）

本調査はレトロスペクティブに行ったものであり、調査報告に関しては大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認を申請、患者外科的治療の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

対象患者男 63 人女性 88 人の計 151 人で、女性

58%、男性 42%とやや女性が多い（図 1）。年齢別患者数は図 2 に示した。

AF は全患者中 91%に認められ高頻度に認められることが確認できた（図 3）。さらに 10 歳未満では陽性率が 73%と低く、逆に 60 代以降で AF を認めない人が増加し、13%も存在した（図 4）。

精神発達遅滞との関係については重度の発達遅滞を伴う患者では AF が重度であった（図 5）。

治療法と血管線維種の程度および精神発達遅滞の程度を図 6 にまとめた。精神発達遅滞が重度の患者

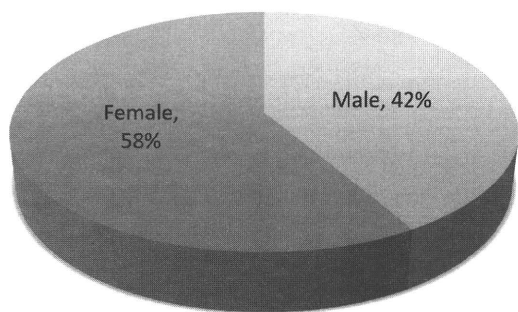


図 1 対象患者 151 人の内訳

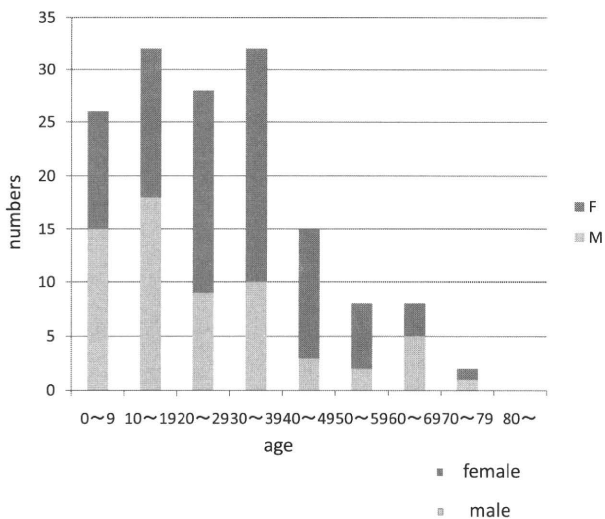


図 2 Number of the TSC patient in each age

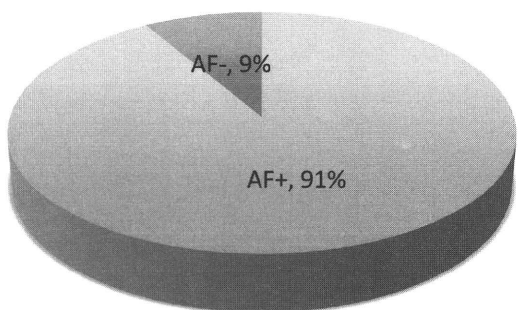


図 3 Ratio of the angiofibroma

では AF が重症の傾向があり、重度の AF に対しては全身麻酔下での外科的手術か、そうでなければ麻酔のいらぬ液体窒素であった。それに対して精神発達遅滞がないか軽度の場合はレーザー治療や局所麻酔による外科的切除が積極的に行われていた。なお精神発達遅滞のないあるいは軽度の精神発達遅滞で液体窒素療法を受けている 2 名はいずれも 6 歳以

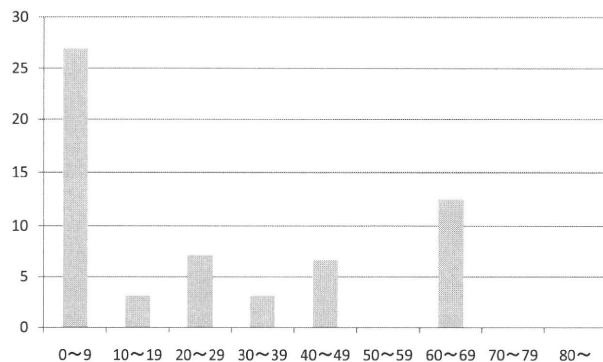


図 4 Ratio of the angiofibroma negative patient in each age

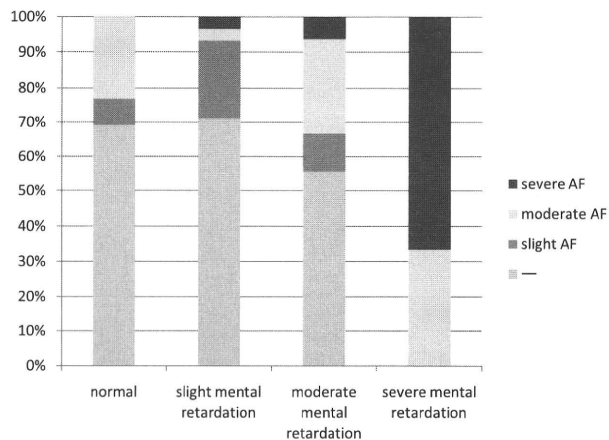


図 5 Relation between severity of mental retardation and angiofibroma

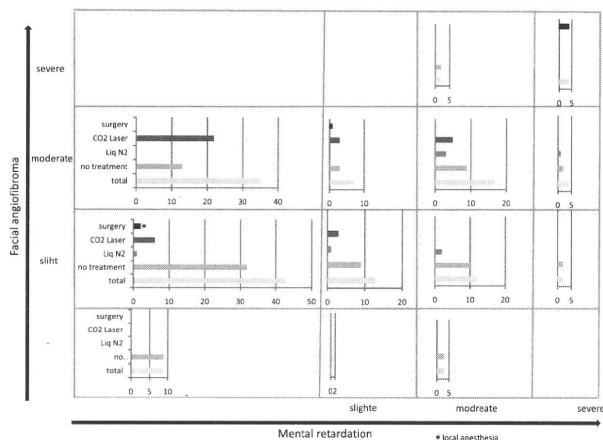


図 6 Treatment of the facial angiofibroma

下であり、年齢的にレーザー治療が困難な患者であった。

D. 考察

今回、結節性硬化症の顔面血管線維腫の特徴、治療方法を解析し、その問題点を検討した。AFは91%と高頻度に認められ診断に有効であることがわかった、またAFは通常思春期頃に著明になると言われている。10歳以上で新たにAFが出現する場合が25%ほどあるが、10歳までに出現している患者が73%もあり、言われているよりも早くからAFが出現することが確認できた。さらに60歳以上ではAFを認めない患者の割合が増加し、年齢が長じると皮診が軽快することも確認できた。さらに精神発達遅滞の程度とAFの重篤さとは相関関係が認められた。AFの治療の現状に関しては、重度の精神発達遅滞を伴う患者では重篤なAFを呈する頻度が高いが局所麻酔の困難さなどより、全身麻酔下での外科的切除が主な治療法でよほど重篤になるまでは放置されるか、麻酔のいらぬ液体窒素療法に頼らざるおえない現状が把握できた。一方精神発達遅滞を認めないあるいは軽症の患者さんでは積極的にレーザー治療が行われていた。

E. 結論

結節性硬化症の顔面血管線維腫は高頻度に認められ通常言われているよりも早くから出現し精神発達遅滞の程度と相関関係があることが確認できた。さらにAFの治療に関しては精神発達遅滞を伴う重度の患者に対しては全身麻酔下の手術療法以外に有効な方法がなく、ラパマイシン軟膏外用療法のように重度の精神発達遅滞を伴う患者に対しても使用できる治療法の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Kotobuki Y, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Yutsudo M, Ozono K, Katayama I. Clinical and genetic features of 20 Japanese patients with vascular-type Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Dermatol* 2010 May 28

Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, Azukizawa-H, Tanemura A, Umegaki N, Terao M, Kotobuki Y, Katayama I. Impact of Sedative and Non-Sedative Antihistamines on the Impaired Productivity and Quality of Life in Patients with Pruritic Skin Disease. *Allergy International*. 2010; 59: 345-354

2. 学会発表

第109回日本皮膚科学会総会（2010.4）分節型神経線維腫症の合併が疑われた結節性硬化症の一例 村上由佳子、金田眞理、田中まり、片山 一朗

第61回日本皮膚科学会中部支部学術大会（2010.9）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 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。）出願中

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

腫瘍抑制遺伝子である *TSC1* および *TSC2* はそれぞれ hamartin と tuberin をコードし、結節性硬化症 (TSC: tuberous sclerosis) の原因遺伝子である。病変は、脳内結節、血管線維腫、腎血管筋脂肪腫、肺リンパ脈管筋腫症など過誤腫性病変を発生する遺伝性疾患である。細胞増殖や分化遊走異常がその基盤であると考えられている。*TSC2* 産物は、*TSC1* 産物と共に Rheb-GAP として働き、mTOR の経路を抑制することが知られている。Hamartin と tuberin は、複合体を形成し S6K や 4E-BP1 を制御する mTORC1 (mammalian target of rapamycin 複合体 1) を抑制するため、mTOR 阻害剤 (rapamycin) 投与が TSC の治療の一つであるが、ラパマイシン単独での腫瘍縮小効果には限界があり、腫瘍縮小効果を示す他の薬剤の開発や中枢神経系の病態発生機構の解明が必要とされる。今回、我々は、mTORC1 抑制に連動する様式で tuberin が Rac 活性を促進すると共に、Rac の細胞内局在を制御することを明らかにした。

また、我々は、Eker (*Tsc2* 変異) ラット、*Tsc1* & 2 遺伝子ノックアウトマウスと Nihon (*Bhd* 変異) ラットのモデル動物を用いて多段階腎発がん機構の解明を進めている (ラット & マウス *Tsc* 変異体では腎がんが 100% 発生する)。*Bhd* 産物 (folliculin=Flcn) の機能に関してはほとんどわかっていないのが現状である。我々は、Flcn がリン酸化蛋白であることを報告した。さらに、我々は rapamycin によって Flcn のリン酸化が抑制されることを見出し、*Tsc2*-mTOR 経路との関連の一つの手がかりとして Flcn の機能解明を進め、Flcn の Ser62 と Ser302 のリン酸化が *Tsc2*-mTOR 経路によって制御されていることを明らかにした。

A. 研究目的

mTORC1 機能を著しく低下する G1556S 型変異体 (以下 GSM) あるいは野性型 tuberin を発現する *Tsc2* 欠損腎腫瘍細胞株 (以下 WT)、コントロールとして β -gal (以下 LZ) を発現する細胞株を用いて、Rho、Rac の細胞内局在、活性化状態と mTOR との関連について調べた。

Flcn リン酸化酵素とそれによるリン酸化部位を特定し、Flcn のリン酸化機構および、Flcn を介した mTOR から AMPK へのフィードバック的経路の解明に研究を進めた。

B. 研究方法と研究成果

Rac 活性は LZ や GSM に比べて WT において上昇しており、Rho 活性は LZ、WT、GSM で差は認

められなかった。一方、共焦点顕微鏡による観察では、Rac は LZ、GSM で細胞質内に点在し存在していたが WT では細胞内全体へ瀰漫性に広がっていた。Rho は、LZ、WT、GSM ともに細胞質内へ瀰漫性に広がっており差は観られなかった。これらのことから、mTORC1 抑制に連動する様式で tuberin が Rac 活性を促進すると共に、Rac の細胞内局在を制御する可能性が示唆された。さらに、*Tsc2* 欠損細胞をラパマイシン存在下において培養すると Rac の局在は瀰漫性に広がり、活性化状態は上昇した。また、Raptor をノックダウンすると Rac 活性が上昇した (投稿準備中)。これらの結果から mTORC1 の下流のシグナルが Rac 活性や細胞内局在の制御に関与すると考えられ、現在さらに解析を進めている。

Flcn リン酸化部位 (Ser302) に特異的な抗体を作製した。Flcn のリン酸化は Rheb-mTOR の経路により促進され、Tsc2 によって抑制されることが分かった。Tsc2-mTOR 経路は Ser302 のリン酸化により強く関わりと考えられ、それぞれのリン酸化部位の制御は異なることが示唆された。S6K2 は Flcn の発現量制御に関わる可能性が示唆された。Ser302 のリン酸化は Flcn と AMPK α 1 の結合を制御している。Bhd のノックダウンでは mTORC1 の形成が抑され、mTORC2 の形成は促進された。

C. 結語

近年、hamartin、tuberin が Rho family G protein である Rho、Rac を介して細胞の接着や遊走を制御していると考えられてはいるもののその詳細なシグナル伝達に関してはまだ、不明な点が多い。今回、mTORC1 抑制に連動する様式で tuberin が Rac 活性を促進すると共に、Rac の細胞内局在を制御することを明らかにした意義は大きい。

Tsc2 変異モデルは生後約 1 年で両側性に肉眼的に腫瘍を発生し、Tsc2 ノックアウトマウスも腎腫瘍を発生する。Tsc2 産物は mTOR 経路を抑制する機能を持つことが知られている。一方、Nihon ラットの原遺伝子 (Bhd) は、腎癌、毛嚢腫、自然気胸を発生するヒト Birt-Hogg-Dube 症候群原因遺伝子のホモログである。Nihon ラットは生後 3ヶ月程度で両側性に肉眼的に腎腫瘍を発生し、Eker ラットの場合より組織学的に淡明型腎癌が優位である。両遺伝子はともに腫瘍抑制遺伝子として知られている。Flcn の機能はまだ分かってないが、一つの特徴としてリン酸化されていることが我々とほかのグループにより報告されている。Rapamycin と Tsc2 のノックダウンによる Flcn バンドのシフトからこのタンパクは Tsc2-mTOR の下流において制御されていると考えられる。Flcn を介した mTOR から AMPK へのフィードバック的経路の解明を進めている。

本研究は新規の治療法開発に資するものとする。

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. 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, 584: 39-43, 2010
2. Inoue H., Uyama T., Suzuki T., Kazami M., Hino O., Kobayashi T., Kobayashi K., Tadokoro T., Yamamoto Y.: Phosphorylated hamartin-Hsp70 complex regulates apoptosis via mitochondrial localization. Biochem. Biophys. Res. Commun., 391: 1148-1153, 2010
3. 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 an Eker rat model. Cancer Science, 101 : 616-623, 2010.
4. Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody *in vivo*. Cancer Sci. 101: 969-974, 2010
5. 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
6. Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M., Jishage K., Noda T. and Hino O.; Deficiency of the *Erc/mesothelin* gene ameliorates renal carcinogenesis in *Tsc2* knockout mice. Cancer Science 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

結節性硬化症の麻酔経験

研究分担者 倉持 朗 埼玉医科大学皮膚科教授

研究要旨

術前より點頭てんかんが頻発する結節性硬化症に対する麻酔管理を提示し、文献的に検討を行った。

症例は12歳、男性。顔面の血管線維腫に対する皮膚剥削術が予定された。術前数種類の抗てんかん薬投与によっても、強直性の痙攣を生じていた。麻酔はレミフェンタニル、プロポフォールにて導入し、維持はセボフルラン、フェンタニル、レミフェンタニルにて行った。術翌日、軽度の點頭てんかん発作を生じたのみであった。

結節性硬化症患者の麻酔では、周術期のてんかん発作による脳低酸素症などの合併症を回避することが最も重要である。そのためには術前の抗てんかん薬の内服とともに適切な麻酔薬、麻酔法を選択して、周術期のストレスを回避することが必要である。過去の報告では、吸入麻酔薬を使用し、痙攣誘発には注意していたが、鎮痛を十分に行ったものは見当たらない。今後はオピオイドの使用について検討する必要があると思われる。

土井克史 埼玉医科大学麻酔科教授
星島 宏 埼玉医科大学麻酔科助教
菊地博達 埼玉医科大学麻酔科教授

A. はじめに

結節性硬化症は、皮膚・脳・腎・肺など諸臓器に病変を形成する、常染色体優性遺伝性の神経皮膚症候群¹⁾で、麻酔管理上の注意点としてはてんかん発作の予防と、合併する多臓器疾患への対応が中心となる。麻酔管理上、注意が必要な疾患であるが、近年までも、本邦では単発の症例報告がなされているのみであり、まとまった報告は見られない。

今回、術前より點頭てんかんが頻発する症例に対する麻酔管理を経験したので、症例を提示し、過去の報告を検索し、本症例の麻酔管理上の問題点と対策について検討を加えた。

B. 症例

症例は12歳、男性。

身長147cm、体重34kg。

出生時より點頭てんかんと心横紋筋腫を認め、小

児病院にて結節性硬化症と診断されていた。今回顔面の血管線維腫に対する皮膚剥削術が予定された。術前に痙攣発作に対して、ゾニサミド200mg/日、フェノバルビタール70mg/日、クロバザム18mg/日、ラモトリギン75mg/日を投与されていたが、ほぼ毎日、10秒程度の強直性の痙攣発作が残存していた。頭部CT画像では、脳室壁に多発する石灰化が見られていた（図1）。他の合併疾患では心循環系に自覚症状はなく、心エコー上も、横紋筋腫を認めるものの心室の収縮機能や弁機能は正常で、日常生活も保たれていた。

手術当日、上記の抗てんかん薬を内服後、手術室に入室させた。非観血的自動血圧計、パルスオキシメーター、心電図を装着し、左前腕に静脈ラインを確保した。麻酔導入は、プロポフォール60mg、ロクロニウム20mg、フェンタニル0.1mgを用い、その後、レミフェンタニル $0.5\text{microgram}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ の持続投与を開始し、気管挿管を行った。麻酔維持には、セボフルラン1.5～2.0%、フェンタニルの間欠投与合計0.2mg、レミフェンタニル0.25

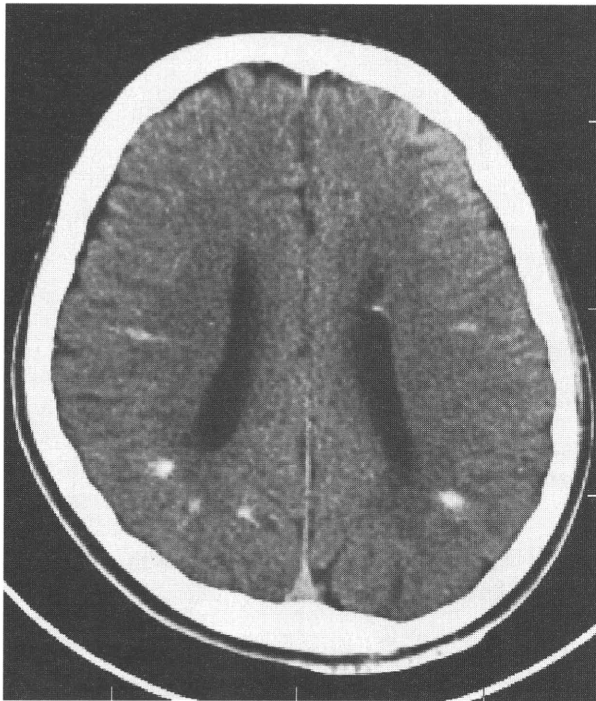


図1 頭部CT、脳室壁に多数の石灰化が認められる。

microgram·kg⁻¹·min⁻¹の持続投与にて行い、手術終了後、フルルビプロフェン（非ステロイド性鎮痛薬）30mg 静注した。自発呼吸、呼名開眼を確認したのち、気管チューブを抜管した（図2）。抜管後約10分間患者を観察したが、てんかん発作等の合併症はなかった。手術時間80分、麻酔時間145分であった。術翌日より、軽度にてんかん発作が発生したが、術前生じていた程度の発作であった。

C. 考察

結節性硬化症（プリングル病）は、てんかん発作、知能低下、顔面の血管線維腫の古典的3主徴のほか、多彩な症状を呈する神経皮膚症候群である¹⁾。本症の麻酔管理上の対策としては、周術期てんかん発作の予防ならびに発作時の対応と、他臓器合併症への対応が、重要となる。

他臓器病変としては、肺リンパ管筋腫症などの呼吸器系の合併症、心横紋筋腫などの心循環系の合併症、また腎血管筋脂肪腫などが挙げられる²⁾。本症例では、他臓器の合併症の十分な術前評価を行なったが、おおむね問題なく、軽度のものと判断した。

このため周術期てんかん発作の予防に注意を払った。まず術前の抗てんかん薬の内服、管理が挙げられる。周術期の抗てんかん薬については、術当日も内服させて、術後は早期に再開するのが原則であ

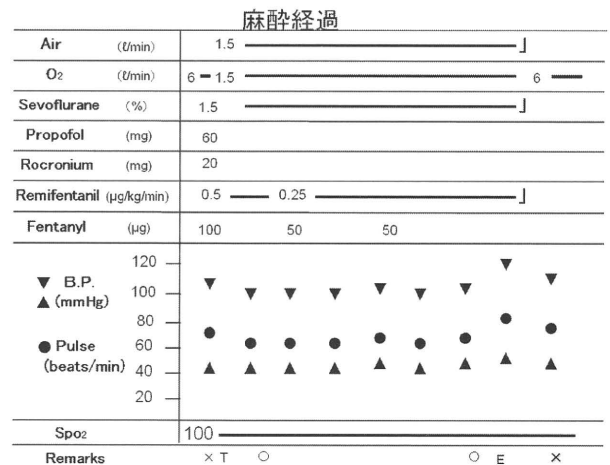


図2 麻酔経過

Remarks. X; 麻酔開始、T; 気管挿管、E; 抜管、O; 手術開始、終了

る³⁾。術前本症例で使用されていた内服薬は、術当日まで継続した。

次に痙攣閾値を下げる状態を避けるのも重要になる。痙攣の閾値を下げる状態には、浅麻酔、痛み、低酸素症、高炭酸ガス血症、高体温、低血糖、電解質異常などが挙げられる。本症例では、術中、術後にレミフェンタニルやフェンタニルを用いて、十分な麻酔深度を保った。また精神的なストレスがてんかん発作の誘因になることもあるので⁴⁾、術後鎮痛にも考慮して、フェンタニルやフルルビプロフェンを使用した。

また、てんかんを有する患者に対しては、全身麻酔薬は基本的にてんかんを抑制するので比較的 safely 使用できる⁵⁾。しかしその中でも、エンフルラン⁶⁾、ケタミン、ペンタゾシン⁷⁾はてんかんを誘発する作用を持っている。最近の文献では、プロポフォールがてんかんの抑制に有用であり、レミフェンタニルの大量投与やセボフルランに関しては、てんかん様の活動を生じる可能性があるが、臨床的な意義は不明である、としている⁸⁾。今回は臨床用量では問題のない麻酔薬を使用した。

本邦での最近の結節性硬化症の麻酔経験の症例報告を表にまとめた。様々な麻酔薬が使用されているが、何らかの静脈麻酔薬で導入をおこない、術中は吸入麻酔薬で管理しているものが多く報告されている。術中術後の鎮痛を図る上で麻薬使用は重要となるが、フェンタニル使用症例は、導入時の少量投与のみであった。

また欧米での、同一施設の24症例をまとめた報告がある²⁾。24症例で52回行われた麻酔の、麻酔経験をレビューしている。47回にわたる手術にお

表 最近の日本における結節性硬化症の麻酔報告

文献 発表年	年 齢	術式	麻酔法	静脈麻酔	吸入麻酔	麻薬
高橋ら 9) 2009	55	子宮全摘	硬膜外	なし	なし	なし
三村ら 3) 2006	5	歯科治療	全身	チラミラール	セボフルラン 亜酸化窒素	なし
今井ら 10) 1999	12	歯科治療	全身	プロポフォール	亜酸化窒素	なし
杉ら 11) 1996	22	顔面腫瘍剝離	全身	ミダゾラム チオペンタール	亜酸化窒素	フェンタニル
服部ら 12) 1994	43	腹腔鏡下胆嚢摘出	全身	チオペンタール	亜酸化窒素 イソフルラン	フェンタニル
金谷ら 13) 1993	5	眼科手術 手関節手術	全身	なし	亜酸化窒素 イソフルラン	なし

いて全身麻酔を行い、硬膜外麻酔を行ったものが1回であった。どんな吸入麻酔薬でも（セボフルラン、イソフルランでも）安全な麻酔管理が可能であった、という。これらの報告でも麻酔薬の選択に関しては、エンフルラン、ケタミン、ペンタゾシン以外の麻酔薬を使用すれば、大きな問題はないと考えられた。筋弛緩薬であるベクロニウム¹⁴⁾、ロクロニウム¹⁵⁾と、麻薬であるフェンタニル¹⁶⁾は抗けいれん薬の慢性投与下の患者では、その必要量が増加するとの報告がある。フェンタニルは術後鎮痛に対して最も一般的な鎮痛薬であり、今後術後鎮痛の方法の検討が望まれるのではないかと考える。

術前に頻回のてんかん発作を伴う結節性硬化症の麻酔経験を経験した。術中、フェンタニル、レミフェンタニルを使用し、十分な鎮痛を図ることで、良好な経過を得た。文献的にも、今後本症例の麻酔においてフェンタニルの使用方法を検討する必要がある。

文献

- 1) 神経皮膚症候群調査研究班（難病医学研究財団企画委員会編）：結節性硬化症（難病の診断と指針2）、第1版、六法出版社、東京、1997、492-495
- 2) Shenkman Z, et al. Anesthetic management of children with tuberous sclerosis. *Pediatr Anesth* 12, 700-

- 704、2002
- 3) 三村真一郎、他. 頻発するてんかん発作を伴う結節性硬化症を合併した小児の麻酔経験. *麻酔* 55、471-474、2006
- 4) 佐藤公宣、ほか. 結節性硬化症の麻酔経験. *臨床麻酔* 16、1607-8、1992
- 5) Roizen M, et al: Anesthetic Implications of Concurrent Diseases. In; *Miller's Anesthesia 7th ed.* Philadelphia, Churchill-Livingstone, 2010, 1067-1149
- 6) Michenfelder JD: *Anesthesia and the Brain.* New York, Churchill-Livingstone, 1988, 87-8
- 7) 安中 寛：痙攣を有する子の麻酔. *小児内科* 19：1347、1987
- 8) Kofke WA. Anesthetic management of the patient with epilepsy or prior seizures. *Curr Opin Anaesthesiol.* 23: 391-9. 2010
- 9) 高橋佳代子ら. 肺病変を合併した結節性硬化症に腎血管筋脂肪腫を併発した患者の麻酔経験. *麻酔* 58、641-644、2009
- 10) 今井智明ら. てんかん発作を頻発する結節性硬化症患者の全身麻酔経験. *日本歯科麻酔学会誌* 27、351-352、1999
- 11) 杉 恭之ら. 結節性硬化症の麻酔経験. *麻酔* 45：227-229、1996
- 12) 服部雅仁ら. 結節性硬化症の麻酔経験. *臨床麻酔* 18：621-623、1994
- 13) 金谷憲明ら. 結節性硬化症の麻酔中脳波モニター使用経験. *日臨麻学会誌* 13：331-335、1993
- 14) Soriano SG, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium in children receiving phenytoin or carbamazepine for chronic anticonvulsant therapy. *Br. J Anaesth* 86:223-229. 2001
- 15) Soriano SG, et al. Onset and duration of action of rocuronium in children on chronic anticonvulsant therapy. *Paed Anesth* 10: 133-136. 2000
- 16) Tempelhoff R, et al. Anticonvulsants therapy increases fentanyl requirements during anaesthesia for craniotomy. *Can J Anaesth* 37: 327-332. 1990

髄膜腫の網羅的 DNA メチル化解析

研究分担者 齋藤 清 福島県立医科大学脳神経外科教授
岸田悠吾 夏目敦至 名古屋大学大学院医学系研究科
脳神経外科学准教授
近藤 豊 愛知県がんセンター分子腫瘍学部准教授

研究要旨

組織学的に同じ組織型に分類される髄膜腫であっても、再発率や組織浸潤の程度には個体差が見られる。我々はエピジェネティックな機序がこのような個体差を生む一因であると推察し、今回髄膜腫の DNA メチル化を網羅的解析を行った。この解析結果から易再発性のマーカーとして有効と考えられる遺伝子群を同定したので報告する。

A. 研究目的

髄膜腫は頭蓋内で最多の原発性腫瘍であり、神経皮膚症候群 2 型患者においても神経鞘腫に次いで高頻度に発生する。組織学的に良性群に分類される髄膜腫においても、強い組織浸潤や早期再発をきたす症例群が存在し、組織所見とは独立したサブグループの存在が示唆される。

ゲノムの観点からは第 22 染色体長腕の欠失/NF2 遺伝子変異が髄膜腫の発生に強く関与することが知られているが、細胞増殖や悪性を決定づける遺伝子は、未だ明らかでない。これに対し我々はエピジェネティックな変化が髄膜腫の臨床性格に関与していると推察し、本研究において、髄膜腫の網羅的 DNA メチル化解析を行った。髄膜腫の DNA メチル化状態と各種要因との関連を検討するとともに、易再発性の予測マーカーとなる遺伝子群の同定を行った。

B. 研究方法

WHO grade I 20 例、grade II 10 例の髄膜腫凍結手術標本からゲノム DNA を抽出し、Methylated CpG islands amplification microarray (MCAM) により 6157 遺伝子、15137 CpG でのメチル化解析を行った。腫瘍サンプルのプロモータ領域 CpG メチル化状態は 2 色法により Control に対する比として表

し、このシグナル比 2 倍以上を異常な過メチル化状態と判定した。マイクロアレイデータの検証は Bisulfite pyrosequencing 法にて行った。また global methylation status の指標である LINE-1 遺伝子のメチル化についても同様に定量化した。自施設検体において再発率との関連が疑われた遺伝子群につき、関連施設より得た異なる validation set (n = 20) にて追加検証を行った。

(倫理面への配慮)

主施設では全例術前に文書及び口頭説明によるインフォームドコンセントを得た。関連施設から得た手術検体の使用については、外部委員を含む同施設の倫理委員会より承認を得た。検体は主施設において連結可能匿名化を行い、外部記録装置にて単独の研究分担者が連結表を保管している。

C. 研究結果

任意に選択した 3 遺伝子の Bisulfite pyrosequencing 法でのメチル化定量値を MCAM のシグナル比と比較し、マイクロアレイデータの妥当性を検証した。算出した 3 遺伝子の感度/特異度はそれぞれ 93%/75%、91%/72%、61%/50%であり、1 遺伝子ではやや相関が低かったもののマイクロアレイデータには妥当性があると判断し解析を進めた。MCAM に基づく髄膜腫の階層クラスタリン

グは3群を形成し (Fig. 1)、クラスター1に対し2, 3では高メチル化遺伝子の集積が認められた (165 vs 323,345 genes, $P < 0.001$)。クラスター1を低メチル化群、クラスター2,3を高メチル化群と再分類したところ、高メチル化群には男性の全例、再発症例の90%が含まれた (Table. 1)。再発群、非再発群、コントロールのLINE-1メチル化はそれぞれ平均値にて61.77%、65.46%、69.95%であり、腫瘍ではやや低く、再発群ではさらに低下する傾向を認めた (Fig. 2)。高及び低メチル化群間でメチル化レベルの差の大きい遺伝子を抽出して定量化を行い、5遺伝子で群間の差を確認した (Table. 2)。この内3遺伝子以上にメチル化を認める群では有意に高い再発率を示した (Fig. 3)。

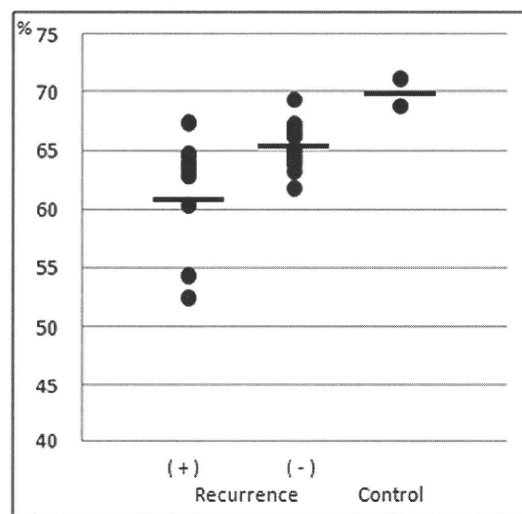


Fig.2 LINE-1 methylation

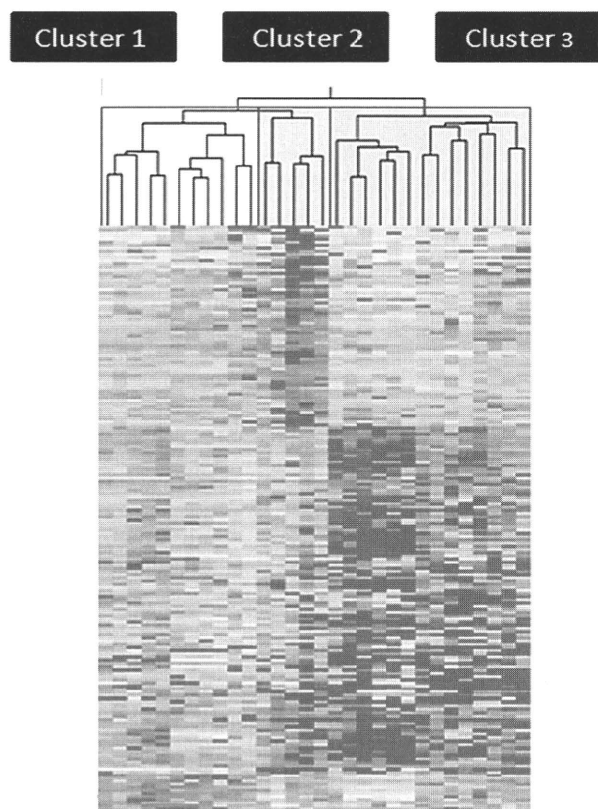


Fig. 1 Hierarchical clustering and heatmap

Table. 1 Patient background

	Hypo-methylated		Hyper-methylated		
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 3
WHO grade (I/II)					
Sex (F/M)					
Tissue Invasion (-/+)					
Edema (-/+)					
Size (Ave : mm)	39.6 mm	58.4 mm		53.1 mm	
Recurrence (-/+)					

Table. 2 Bisulfite pyrosequencing substantiated the significant difference between hypo- and hyper-methylated group in 5 genes.

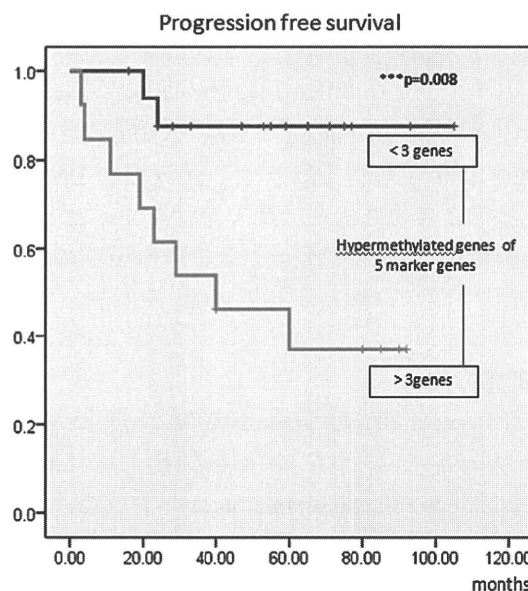
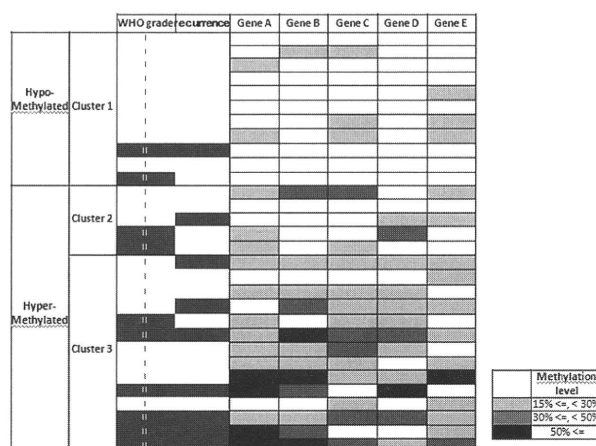


Fig. 3

D. 考察

DNA メチル化は遺伝子プロモータ領域において RNA polymerase の結合を阻害し遺伝子発現を抑制することが知られているが、複数の腫瘍において発現制御とは無関係に特定の遺伝子のメチル化が予後予測マーカーとなることが報告されている。また Toyota らは 1999 年、単独遺伝子のメチル化のみではなく、colorectal cancer においては遺伝子群としてメチル化の集積傾向を示す症例集団が存在することを明らかにし、CpG island methylator phenotype (CIMP) の概念を提唱した。現在 CIMP1 については予後との相関につき consensus の得られた知見として認知されている。また 2010 年 The Cancer Genome Atlas Research Network も Glioblastoma の網羅的メチル化解析により Glioma-CIMP の存在を示唆し、組織学的には同様の所見を示す腫瘍内にも subgroup が存在することを示している。本研究でも DNA メチル化に基づく階層クラスタリングでは 3 群の

subgroup が認められた。我々の結果では一部遺伝子にメチル化の集積を示す症例群で再発率が高い結果となり、今回同定した 5 遺伝子のメチル化状態の評価を組み合わせることにより、易再発群のマーカーになりうると考えている。

結論

髄膜腫は DNA プロモータ領域のメチル化状態により組織型と独立して subgroup を形成し、高メチル化群では高い再発率が示す。複数遺伝子のメチル化状態、及び LINE-1 メチル化レベルの評価が、再発リスクの予測マーカーとなりうると考えられる。

E. 学会発表

- ・ 第 1 回東海エピジェネティクス研究会
- ・ 第 28 回日本脳腫瘍学会
- ・ 第 11 回分子脳神経外科学会
- ・ 第 69 回日本脳神経外科学会総会

若年発症神経線維腫症 2 型における COX-2 阻害薬の腫瘍抑制効果に関する研究

研究協力者 松尾宗明 佐賀大学小児科准教授

研究要旨

若年発症 NF2 患者 2 名で保護者の同意のもとに COX-2 阻害剤メロキシカムの長期投与を行い、腫瘍抑制効果を検討したので報告する。

症例 1 は、27 歳男性。18 歳時、MRI で、両側聴神経鞘腫、左傍鞍部、大脳鎌などの多発性の髄膜腫、多発性脊髄腫瘍を認めた。メロキシカム 10mg 内服行い、発症後 9 年を経過したが、症状の著明な進行はなく、腫瘍の増大は軽度で新たな腫瘍の出現はみられていない。症例 2 は、13 歳男性。6 歳時、左顔面神経麻痺で発症。MRI にて、両側聴神経、左三叉神経、左顔面神経、両側動眼神経腫瘍を認め、脊髄神経根にも多発性の腫瘍を認めた。メロキシカム内服を続け 6 年経過したが、右橈骨神経麻痺が出現したことで聴力が若干低下したものの顔面神経麻痺の程度は変化なく、MRI 上も腫瘍の増大は軽度にとどまっている。

自然経過との比較が困難であるが、メロキシカムは NF2 の腫瘍抑制に有用である可能性がある。

A. 研究目的

神経線維腫症 2 型 (NF2) は、両側の聴神経鞘腫を特徴とし、中枢神経に同時多発性に髄膜腫、神経膠腫、脊髄腫瘍などの腫瘍を生じる予後不良の疾患である。一般に、発症年齢が早いほど予後が悪く、聴神経腫瘍の増大速度も速い。今のところ NF2 の腫瘍の発生予防や進行抑制に有効な治療法はなく、その開発が望まれている。

近年、消化管腫瘍をはじめとする種々の腫瘍において、プロスタグランジン合成酵素 2 型 (COX-2) が過剰発現しており、その阻害剤が腫瘍の増殖を抑制することが報告されている。家族性大腸腺腫症では、COX-2 阻害剤がすでに臨床で使用され効果を上げている。脳腫瘍においてもグリオーマ（神経膠腫）、髄膜腫、神経鞘腫など様々な種類の腫瘍で COX-2 の過剰発現が見られる。また、その阻害剤がグリオーマ細胞の増殖抑制効果を有することも培養細胞や動物実験で確認されている。

今回、若年発症 NF2 患者で保護者の同意のもとに COX-2 阻害剤メロキシカムの長期投与を行い、

腫瘍抑制効果を検討したので報告する。

B. 対象症例と方法

当科で経験した 18 歳以下発症の NF2 患者 2 名についてメロキシカムの長期投与を行い、聴力を含めた臨床症状の推移と MRI 上の腫瘍の大きさの経過について検討した。

（倫理面への配慮）

佐賀大学臨床試験倫理委員会において研究計画の承認を得たうえで、患者および保護者から文書による説明同意を得た。

C. 結果

【症例 1】 27 歳男性。

現病歴：7 歳発症のてんかんで、発症時の MRI では明らかな異常は指摘されなかったが、18 歳時、けいれん重積で入院した。

入院時身体所見：瞳孔不同なし、聴力正常。右方への軽度の注視眼振。左眼の軽度の内転障害。左膝蓋腱反射・両側アキレス腱反射減弱、腹壁反射減弱。

その他は異常なし

検査所見：MRIにて右前頭葉皮質形成異常、両側聴神経鞘腫、左傍鞍部、大脳鎌などの多発性の髄膜腫、多発性脊髄腫瘍を認めた。

左側聴神経鞘腫、大脳半球の髄膜腫についてののみガンマナイフによる治療を行い、COX-2 阻害薬メロキシカム 10mg 内服を続けながら経過を観察している。発症後9年を経過した。(図1、2、3)

発症時、両側聴力低下はなかったが、ガンマナイフ治療後、左は40dB 前後の聴力低下があり、その後安定。右聴力は25dB と軽度低下してきている。

腰痛、歩行時の軽度のふらつき、排尿に時間がかかるなどの症状は少し見られるもののADLを低下させるほどの症状の進行はない。

【症例2】13歳男性。発症年齢6歳。半年ほど前より気づかれ徐々に悪化してきた左顔面神経麻痺で発症。

MRIにて、両側聴神経、左三叉神経、左顔面神経、両側動眼神経にGdで増強される腫瘍を認め、脊髄神経根にも多発性の腫瘍を認めた。

メロキシカム 5mg 内服を続けながら経過観察し

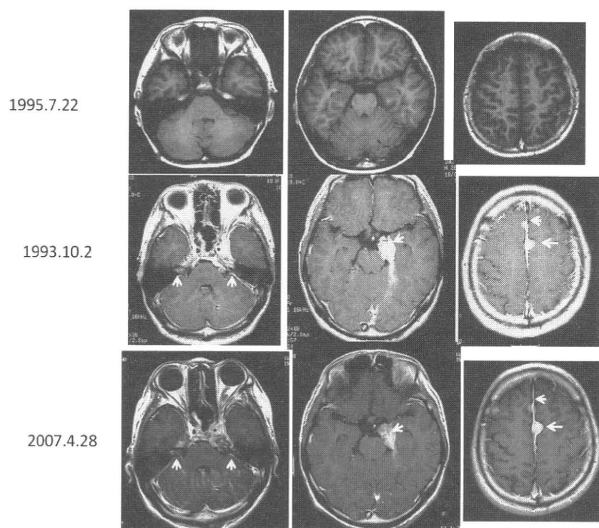


図1 症例1の経時的MRI

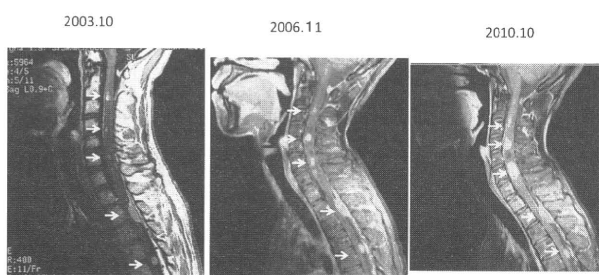


図2 症例1の脊髄MRIの経時的変化(1)

ている。

内服開始後、上腹部痛のため一時的にH2 ブロッカーを併用したが、自然に軽快し、その後は特に副作用は認めていない。

6年経過したが、4年目より右橈骨神経麻痺が新たに出現したことで聴力が若干低下したものの顔面神経麻痺の程度は変化なく、MRI上も腫瘍の増大は軽度にとどまっている。(図4)

D. 結論

自然経過との比較が困難であるが、COX-2 阻害剤(メロキシカム)はNF2の腫瘍抑制に有用である可能性がある。

若年発症のNF2の自然経過に関するまとまった報告はなく、今後の治療的介入の評価のうえで不可欠な基礎データとなると思われる。

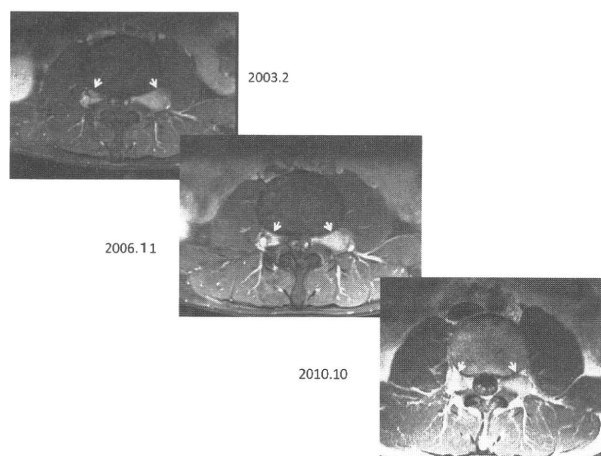


図3 症例1の脊髄MRIの経時的変化(2)

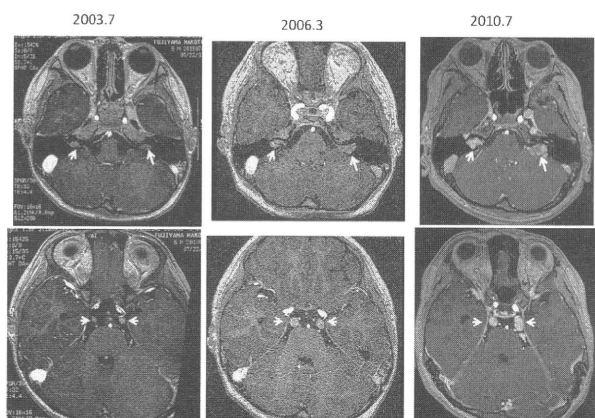


図4 症例2の経時的MRI