

## 特定疾患臨床個人調査票からみた神経線維腫症Ⅱ型の実態と個人調査票の問題点

研究協力者 松尾宗明 佐賀大学小児科准教授

### 研究要旨

神経線維腫症Ⅱ型（NF2）に関する疫学的データは乏しく、経過や予後についてのまとまった報告はほとんどない。今回特定疾患臨床個人調査票のデータを用いて解析検討を行った。2004年以降は毎年30-50の新規登録と220-400の再登録がみられた。登録数は変動が大きく、都道府県毎にみると、30例以上報告のあった県が翌年0になるなど不可解な変動がみられた。未記入のデータも多く、2010年のデータでは、症例総数312例で、うち新規登録は40例、男女比は、1：1.29で女性に多かった。家族歴のあるのは記載のあった185例中76例であった。発症年齢は2歳から76歳、中央値25歳、20歳未満の発症は全体の19.8%であった。罹病期間は0から53年、中央値10年。罹病期間と重症度スコアは、症例全体では相関係数 $R = 0.35$ で有意な相関を認めた。20歳以上発症群では $R = 0.44$ で有意な相関を認めたのに対し、20歳未満発症群では $R = 0.20$ で有意な相関はなく、罹病期間が短くても重症度スコアの高い症例が多数認められた。

### 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といわれているが、経過や予後についてのまとまった報告はほとんどない。今後、治療介入の有効性などを評価する場合の基礎資料とするため、特定疾患臨床個人調査票のデータの解析検討を行った。

### B. 方法

2001年から2010年まで10年間の登録データを解析した。臨床症状の重症度スコアは、特定疾患臨床個人調査票のスコアを用いた。

### C. 結果

2004年以降は毎年30-50の新規登録と220-400の再登録がみられた。登録数は変動が大きく、都道府県毎にみると、30例以上報告のあった県が翌年

0になるなど不可解な変動がみられた（図1、2）。データも未記入のものが多く、一部にはⅠ型と思われるものも含まれていた。登録更新が途絶えた症例の転帰は不明であり、死亡例の把握は困難であった。

2010年のデータでは、症例総数312例で、うち新規登録は40例、男女比は、1：1.29で女性に多かった。家族歴のあるのは記載のあった185例中

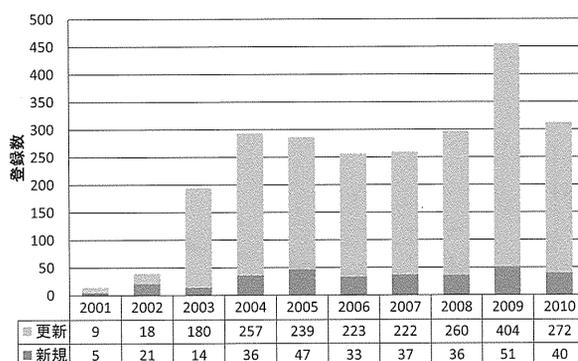


図1 神経線維腫症Ⅱ型の登録状況の年次推移

76例であった。発症年齢は2歳から76歳、中央値25歳、20歳未満の発症は全体の19.8%であった(図3)。罹病期間は0から53年、中央値10年であった(図4)。

2010年のデータにおいて、記載不備などの不適当なデータを除いた272症例について20歳未満発症85例、20歳以上発症168例の臨床的特徴について比較検討を行った(表1)。 $\chi^2$ 検定で有意差を認めた項目は、脳神経鞘腫Ⅲ-Ⅵ、脊髄神経鞘腫、色素斑の頻度、臨床症状では、失明、半身麻痺、失語、痙攣、脊髄症状でいずれも20歳未満の発症例で頻度が高い傾向がみられた。

罹病期間と重症度スコア(表2)は、症例全体では相関係数 $R = 0.35$ で有意な相関を認めた(図5)。

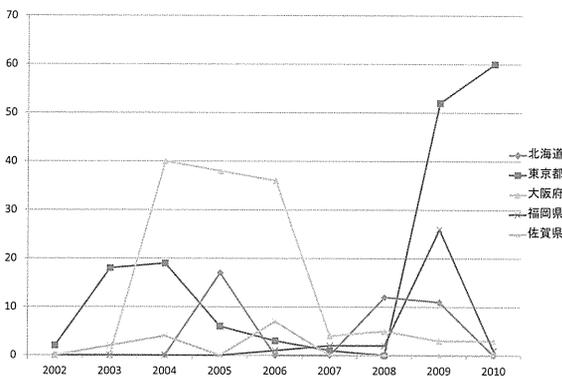


図2 都道府県別の登録患者数の推移

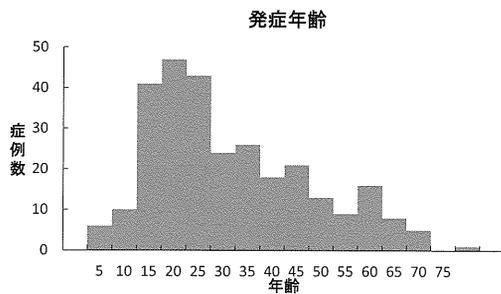


図3 2010年発症年齢

20歳以上発症群では $R = 0.44$ で有意な相関を認めたのに対し、20歳未満発症群では $R = 0.20$ で有意な相関はなく、罹病期間が短くても重症度スコアの低い症例が多数認められた(図6)。男女間や20歳未満発症群と20歳以上発症群の間での重症度スコアは有意な差は認めなかった。

#### D. 考察

現在の個人調査票は、都道府県の事務レベルでのデータ入力に依存しているためきわめて精度の低いデータである。死亡例の把握が困難であるなど問題点が多い。

20歳未満発症の症例は全体の約2割を占め、Ⅲ-Ⅵ脳神経鞘腫、脊髄神経鞘腫、色素斑が多く、失明や半身麻痺、失語、痙攣、脊髄症状が20歳以降の発症の症例より多い傾向があった。また、20歳未満発症の症例は、20歳以降の発症例に比較して進行の早い例が多く含まれていた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

Matsuo M, Maeda T, Ishii K, Tajima D, Koga M, Hama-saki Y. Characterization of childhood-onset complex partial seizures associated with autism spectrum disorder. *Epilepsy & Behavior* (2011) 20: 524-7.

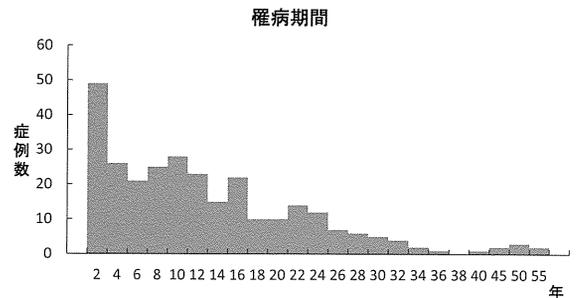


図4 2010年罹病期間

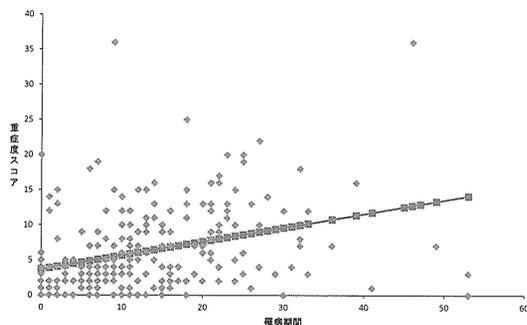


図5 重症度スコアと罹病期間の相関(2010)

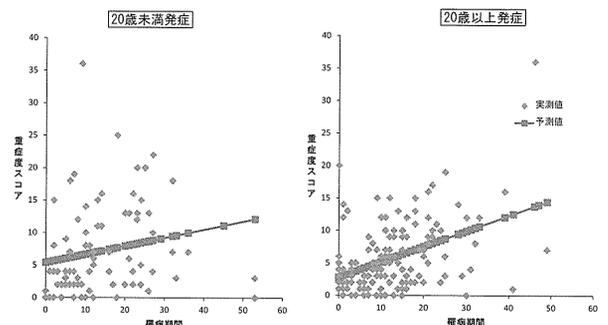


図6 重症度スコアと罹病期間の相関(2010)

表1 発症年齢による臨床像の比較

	2010年	発症年齢	
		20歳未満	20歳以上
登録者数	272	85	168
男女比	01:01.2	01:01.4	01:01.0
家族歴あり	73 (40.8)	22 (37.2)	50 (44.2)
脳神経鞘腫			
V	109 (40.0)	45 (52.9) *	55 (32.7)
III, IV, VI	32 (11.8)	19 (22.4) *	8 (4.8)
VII	20 (7.4)	4 (4.7)	12 (7.1)
IX, X, XI	68 (25.0)	23 (27.1)	37 (22.0)
XII	27 (9.9)	11 (12.9)	12 (7.1)
頭蓋内髄膜腫	126 (46.3)	40 (47.1)	75 (44.6)
脊髄			
神経鞘腫	178 (65.4)	67 (78.8) *	96 (57.1)
髄膜腫	32 (11.8)	12 (14.1)	16 (9.5)
神経膠腫	17 (6.3)	8 (9.4)	6 (3.6)
色素斑	82 (35.2)	36 (42.4) *	39 (23.2)
若年性白内障	29 (13.1)	12 (14.1)	15 (8.9)
高度難聴			
(100dB<)			
右	101 (37.1)	32 (37.6)	58 (34.5)
左	111 (40.8)	32 (37.6)	59 (35.1)
両側	63 (23.2)	24 (28.2)	30 (17.9)
顔面神経麻痺			
片側	96 (35.3)	29 (34.1)	59 (35.1)
両側	17 (6.3)	8 (9.4)	7 (4.2)
顔面知覚低下	90 (33.1)	30 (35.3)	52 (31.0)
嚥下・構音障害	70 (25.7)	26 (30.6)	35 (20.8)
複視	38 (14.0)	12 (14.1)	22 (13.1)
失明			
片側	25 (9.2)	12 (14.1) *	10 (6.0)
両側	4 (1.5)	4 (4.7) *	0 (0.0)
半身麻痺	43 (15.8)	21 (24.7) *	17 (10.1)
失語	7 (2.6)	5 (5.9) *	1 (0.6)
記憶力低下	23 (8.5)	11 (12.9)	12 (7.1)
痙攣	29 (10.7)	17 (20.0) *	11 (6.5)
脊髄症状			
軽度	123 (45.2)	47 (55.3) *	66 (39.3)
高度	30 (11.0)	14 (16.5)	14 (8.3)

括弧内は%。\*太字はχ<sup>2</sup>検定で有意差あり (p<0.05)。

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  
なし

表2 神経症状重症度スコア

聴力低下 70-100dB (1), 100dB< (2):片側で
顔面神経麻痺 片側で(1)
小脳失調(1)
顔面知覚低下(1)
嚥下または構音障害(2)
複視(1)、一側失明(2)
半身麻痺(2)、失語 (2)、記名力低下(1)、痙攣(1)
軽度脊髄症状(2): 痛み、歩行障害、上肢脱力、 排尿排便障害
高度脊髄症状(4): 歩行不能、 一側または両側上肢機能全廃

括弧内の数字がスコア

## 髄膜腫の網羅的遺伝子発現解析： invasive meningioma は新しい entity か

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

神経線維腫症 2 型 (NF2) の約半数にみられる髄膜腫には組織学的には良性 (WHO grade 1) であっても浸潤傾向の強い一群が存在する。組織学的分類とは異なる髄膜腫の特徴をとらえるために、当科で 2 年間に摘出術を行った 33 例の髄膜腫について遺伝子発現の網羅的解析を行い、組織学的所見や浸潤傾向との相関を検討した。浸潤傾向の強い髄膜腫の発現プロファイルを解析すると、近似性のあるクラスターとして集まる傾向が認められた。

佐久間潤 福島県立医科大学脳神経外科  
准教授  
和栗 聡 福島県立医科大学解剖・組織  
学講座教授  
渡辺慎哉 福島県立医科大学臨床ゲノム  
学講座教授

底の骨や筋肉、神経などに浸潤していたものと定義した。

(倫理面への配慮)

全症例において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。手術検体は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。

### A. 研究目的

髄膜腫は NF2 の約半数にみられ、しばしば多発して治療に苦慮する。また組織学的には WHO grade 1 に分類されていても頭蓋外への伸展・浸潤傾向が強い、いわば “invasive meningioma” と呼ぶべきグループが存在することが知られている。我々は組織学的分類とは異なる髄膜腫の特徴を捉えるために、摘出手術を施行して組織学的確定診断がついた総ての髄膜腫について遺伝子発現の網羅的解析を行っている。本研究では “invasive meningioma” が遺伝子的に異なる特徴を有するのか解析を行った。

### B. 研究方法

2009 年 1 月～2010 年 12 月までの 2 年間に当科で摘出術を施行し、組織学的確定診断が得られた髄膜腫 33 例を対象とした。腫瘍の全部もしくは一部を摘出後、直ちに液体窒素で凍結して解析センターに搬送し、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。なお “invasive meningiomas” とは手術時に頭蓋

### C. 研究結果

髄膜腫 33 例中、病理組織学的に WHO grade 1 と診断されたのは 26 例、grade 2、grade 3 は、それぞれ 6 例、1 例であった。画像所見ならびに術中所見から “invasive meningioma” と判断されたのは 6 例で、このうち 5 例が WHO grade 1 で組織学的には良性と診断されたものであり、1 例は grade 2 であった。

33 例の発現プロファイルでは “invasive meningioma” は近いクラスターとして集まる傾向を認めた (図 1)。そこで invasive/non-invasive meningioma で発現の差が大きい遺伝子を抽出すると、一部の遺伝子の有意な高発現あるいは発現低下を認めた。WHO grade 1 の 26 例で、統計学的に差が大きな遺伝子のヒートマップを作成すると、その傾向は顕著であった (図 2)。

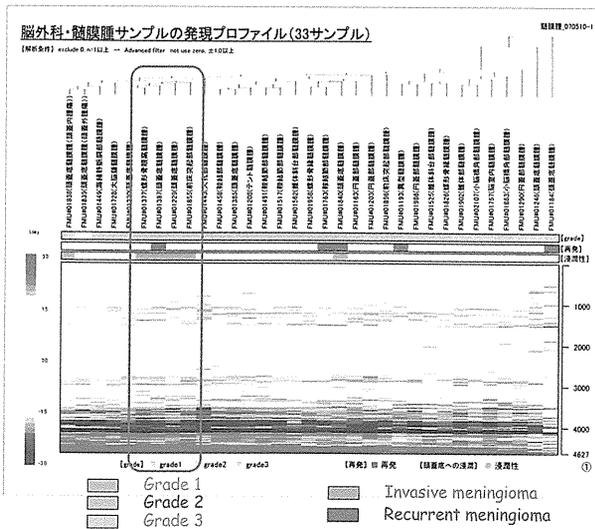


図1 33 髄膜腫の遺伝子発現解析

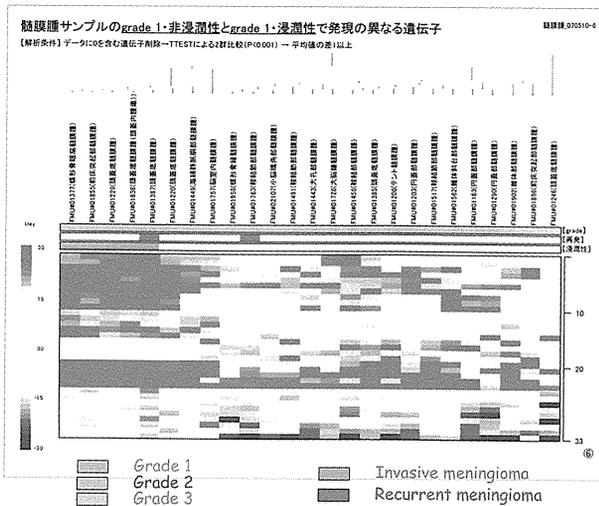


図2 WHO grade 1 の26 例での遺伝子発現解析

#### D. 考察

髄膜腫は頭蓋内腫瘍で最も発生頻度が高いが、病理組織学的には WHO grade 1 (benign) が大多数を占め、grade 2 (atypical) は 4.7~7.2%、grade 3 (anaplastic) は 1.0~2.8%といわれている。良性髄膜

腫は適切な外科的切除を行うことで完治が期待できる。しかし WHO grade 1 と診断されても頭蓋外への伸展・浸潤傾向が強い“invasive meningioma”が存在し、治療に難渋することがある。髄膜腫の摘出標本から遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、“invasive meningioma”が浸潤傾向のない一般的な髄膜腫と比較して、遺伝子的に異なる特徴を有することが示唆された。個々の遺伝子の同定については更なる研究が必要であるが、発現状態の異なる遺伝子を解析することで、「浸潤性」に関与する遺伝子が同定できればテーラーメイドの治療や follow-up の計画、さらには予後予測に関して有用なマーカーになりうる可能性が示唆された。

#### E. 結論

病理学的な髄膜腫の分類とは別に、髄膜腫の臨床的病態に添った遺伝子解析による分類が可能であることが示された。本研究を進展させることで、腫瘍の「浸潤性」にかかわる遺伝子を同定することができれば、患者の治療計画や予後の予測に関して有用なマーカーとして活用できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表

佐久間潤、安藤 等、松本由香、織田恵子、岸田悠吾、田村貴光、市川優寛、佐藤 拓、渡邊 督、齋藤 清、渡辺慎哉、和栗 聡：Low grade meningiomas の中で invasive meningioma は新しい entity か：遺伝子解析結果から。社団法人日本脳神経外科学会 第70回 学術総会、2011年10月、横浜

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 悪性髄膜腫における DNA メチル化標的遺伝子 hypoxia inducible factor の機能解析

研究分担者	齋藤 清	福島県立医科大学脳神経外科教授
研究協力者	安藤 等	名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学
	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
	若林俊彦	名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学教授
	千賀 威	名古屋大学大学院医学系研究科腫瘍生物学准教授

### 研究要旨

髄膜腫は原発性脳腫瘍の中で最も発生頻度が多く、その多くは WHO 分類で grade I に属し、外科的切除により根治可能な良性腫瘍であるが、中には高い浸潤性を伴って再発を繰り返す予後不良な症例もある。しかし、このような悪性度の高い髄膜腫に対する有効な治療は現在の所存在しない。

これまで我々は、WHO grade I、II と診断された髄膜腫の網羅的メチル化解析を行い、メチル化標的遺伝子によって、WHO grade や手術摘出度に依存せずに再発予後を予測できる可能性を示した。そのメチル化標的遺伝子群には、hypoxia inducible factor 3 $\alpha$  (HIF3 $\alpha$ ) が含まれた。

HIF タンパクは $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットからなる二量体である。 $\alpha$ サブユニットには HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-3 $\alpha$  の 3 つのアイソフォームがあり、このうち HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$  は、 $\beta$ サブユニットと結合して核内に移行し、血管新生、代謝、腫瘍増殖、浸潤転移に関連する遺伝子を転写誘導する。一方、HIF-3 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$  の negative regulator と考えられているが、詳細は未だ不明な点が多い。我々は本研究で、髄膜腫におけるメチル化標的遺伝子 HIF-3 $\alpha$  の機能解析を行い、治療に苦慮する悪性髄膜腫の革新的分子標的治療の可能性を探った。

### 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。髄膜腫には、組織学的に良性と診断されたにもかかわらず、強い組織浸潤や早期再発をきたす群が存在し、組織所見による分類と独立したサブグループの存在が唆される。

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、我々はこれまでの研究で、ある遺伝子群のエピジェネティックな変化（メチル化）が細胞増殖や悪性化など髄膜腫の臨床性格に強く関与することを示した。この遺伝子群の中には hypoxia

inducible factor 3 $\alpha$  (HIF-3 $\alpha$ ) が含まれていた。

もともと髄膜腫や神経鞘腫では腫瘍形成・進展に強く関与する hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が高発現していることは知られていた。一方、HIF-3 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$  の negative regulator と言われているものの詳細は今なお不明である。本研究の目的は、HIF-3 $\alpha$  の機能解析を行い、神経鞘腫や髄膜腫に対する革新的な分子標的治療を開発することである。

### B. 研究方法

レトロウイルスベクターを用いて、悪性髄膜腫細胞株 (HKMM, IOMM-Lee) に、green fluorescence

protein (GFP) タグをつけた HIF-3 $\alpha$  の 2 種類のスプライシングバリエント (HIF-3 $\alpha$ 2, HIF-3 $\alpha$ 4) を遺伝子導入して安定発現株を得た。これらの細胞の、正常酸素下および低酸素下、あるいはマウス脳内における増殖能、腫瘍血管増生能を評価した。また、マウスを用いた腫瘍モデルの生存期間も検証した。(倫理面への配慮)

各施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。

### C. 研究結果

IOMM-Lee において、HIF-1 $\alpha$  の転写量は有意に増加しており、一方 HIF-3 $\alpha$ 2 の転写量は有

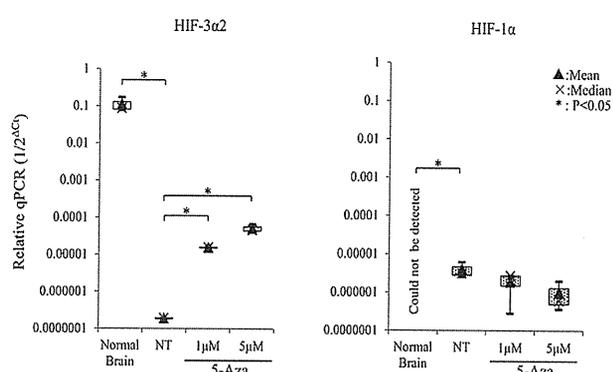


Fig.1 5-aza-deoxycytidine can increase transcription of HIF-3 $\alpha$ 2

意に減少していた。これに脱メチル化剤 5-aza-deoxycytidine を作用させたところ、HIF-3 $\alpha$ 2 の転写量は回復傾向を示した (Fig 1)。

次に HIF-3 $\alpha$ 2 を導入した細胞株を用いて western blotting を行ったところ、HIF-3 $\alpha$ 2 の発現を確認することができた (Fig 2)。この株を用いて、HIF-3 $\alpha$ 2 と HIF-1 $\alpha$  の導入を免疫沈降法で確かめたところ、両者は確かに結合することが示唆された (Fig 3)。

Cell growth assay では、興味深いことに HIF-3 $\alpha$ 2 を導入した株ではむしろ有意に増殖が亢進しており、一方 HIF-3 $\alpha$ 4 を導入した株では著名に増殖が抑制されていた (Fig 4)。この株をマウス脳内に移植して作成した腫瘍モデルの生存期間を Kaplan-Meier 法でプロットし、Log-rank 検定を行ったところ、HIF-3 $\alpha$ 4 モデルでは有意に生存期間の延長が認められた (Fig 5)。さらに、モデルに tetramethylrhodamine dextran を静注して血管造影を行い、この腫瘍組織を共焦点顕微鏡で観察して 3 次元画像を構築し、血管密度を相対定量したところ、HIF-3 $\alpha$ 4 モデルでは血管密度が著名に低下していた (Fig 6)。

### D. 考察

髄膜腫は非常に豊富な血管をもち、HIF-1 $\alpha$  と VEGF の高発現が特徴的である。また HIF-1 $\alpha$  は

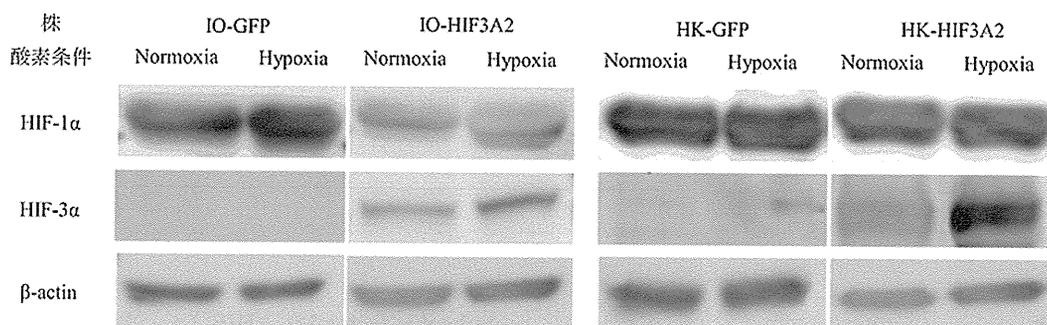


Fig.2 Expression of HIF-3 $\alpha$ 2

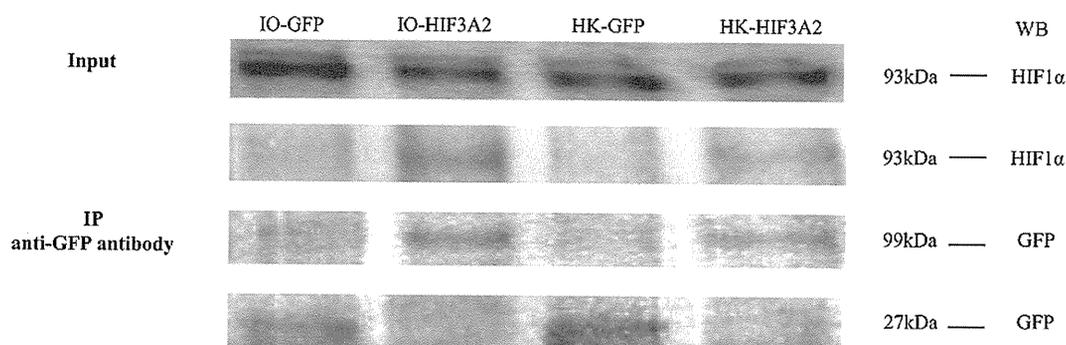


Fig.3 Immunoprecipitation. HIF-3 $\alpha$ 2 interact with HIF-1 $\alpha$

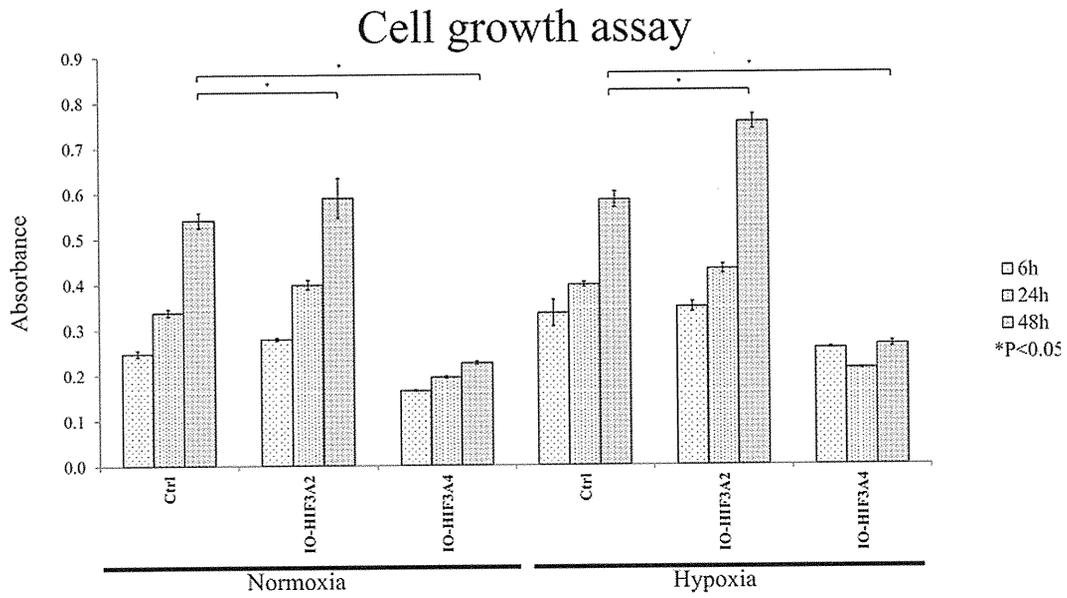


Fig.4 Cell growth assay. HIF-3  $\alpha$  4 decrease meningioma cell growth in vitro.

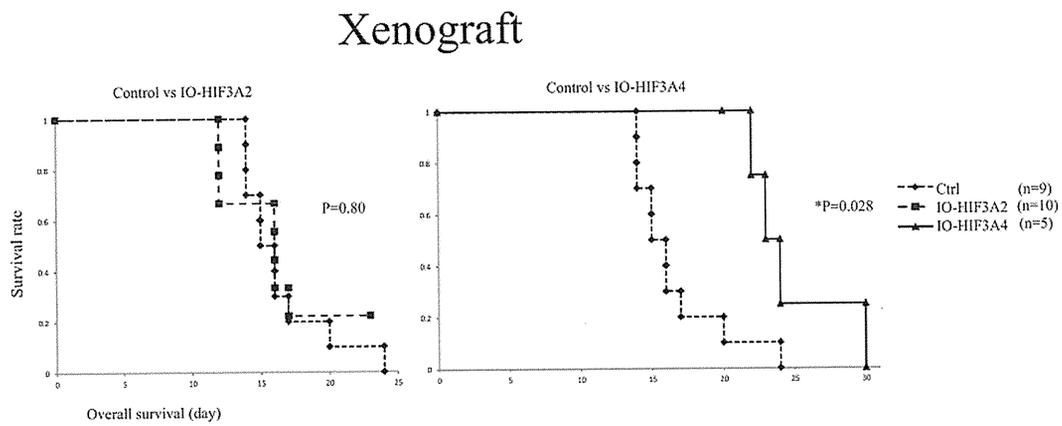


Fig.5 Xenograft. HIF-3  $\alpha$  4 prolongs overall survival in animal model.

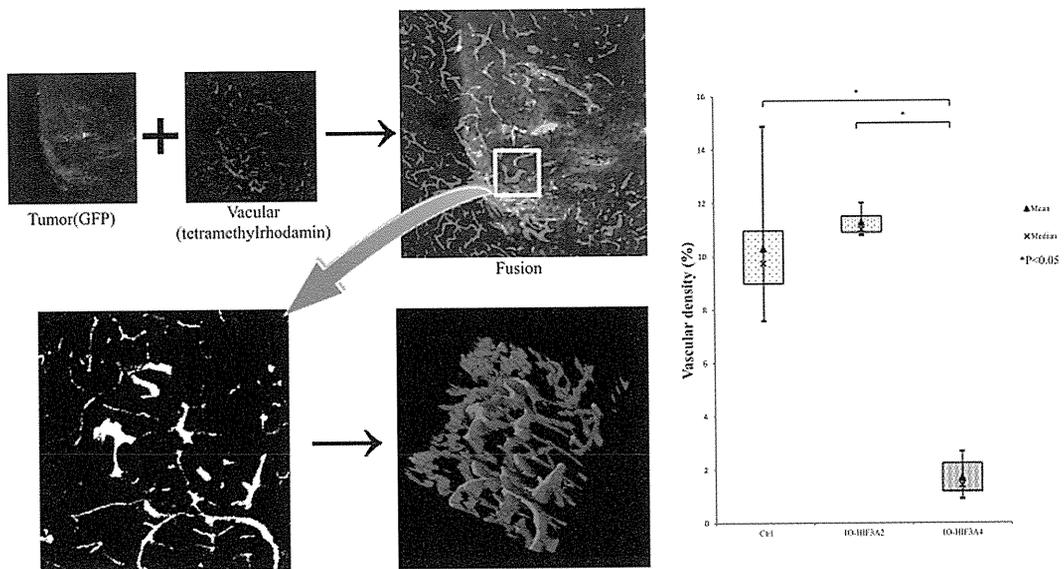


Fig.6 Quantitative determination of tumor vascular density. HIF-3  $\alpha$  4 nificantly decrease vascular density in meningioma.

VEGFをはじめ、EPO、GLUT1をはじめ腫瘍形成・進展に関わる100を超える様々な遺伝子を標的にしていることもわかってきた。これまでに我々は、メチル化標的遺伝子の解析が、WHO gradeによらない髄膜腫の再発・予後予測を可能にするのを示した。この遺伝子群にHIF-1 $\alpha$ のnegative regulatorと考えられてきたHIF-3 $\alpha$ が含まれていたことは大変に興味深い。

von Hippel Lindau病(VHL)と関連の深い腎癌などでは、HIF-3 $\alpha$ 4の安定発現によりVEGF発現が抑制され、血管密度が低下するのが報告されている。我々はこの研究で、HIF-3a4の安定発現は髄膜腫においても血管密度を低下させ、モデル動物の生存期間を延長させることを示せた。悪性髄膜腫に対する有効な化学療法が存在しない現在、HIF-3 $\alpha$ の機能解析を進めることで、髄膜腫はもとより他の癌腫の治療にも応用できる分子標的治療の開発が期待できる。

## E. 結論

髄膜腫において、HIF-3 $\alpha$ 4はHIF-1 $\alpha$ の機能を阻害して細胞増殖や血管密度を抑制し、モデル動物の生存期間を延長させる。HIF-3 $\alpha$ の機能解析により、髄膜腫はもとよりHIF-1 $\alpha$ が過剰に発現している他の腫瘍性病変に対する革新的分子標的治療を開発できる可能性がある。

## F. 研究発表

論文発表

Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Saito K, Ando H, Ohka F, Sekido Y, Wakabayashi T. Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis*. 2011 Dec 13. [Epub ahead of print]

学会発表

- ・ 第70回日本脳神経外科学会総会
- ・ 第29回日本脳腫瘍学会

## 神経線維腫症Ⅱ型症例において、 一側の聴神経腫瘍治療が対側に与える影響に関する研究

研究分担者 原 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

### 研究要旨

神経線維腫症Ⅱ型（NF2）の治療方針決定においては原則としてより腫瘍径の大きい、聴力レベルの悪い方を先に治療する。しかし、先行する一側の治療が対側腫瘍の臨床経過に影響するならば、先行治療側が例え既に高度難聴であったとしても方針決定に慎重にならなければならない。我々の経験症例を retrospective に検討し、一側の治療が対側の腫瘍増大や聴力悪化を引き起こした症例は認められず、対側に影響が起こる頻度は高くないと推測された。

### A. 研究目的

聴神経腫瘍（VS）の治療方針については①wait and scan、②摘出術、③放射線治療の3者が考えられる。しかし、個々の症例について、どのタイミングでいずれの方針を選択するのが最善かは意見の分かれるところである。NF2においては一般に両側罹患となるため、より一層、難聴に配慮した治療方針決定が必要であり、原則としてより腫瘍径の大きい、聴力レベルの悪い方を先に治療していくことになる。

近年、一側の聴神経腫瘍手術が対側の腫瘍径増大の引き金になったことが示唆される報告があり、当院のNF2症例において一側の治療が行われた前後の対側の変化を検討し、NF2症例へ求められる対応を考察する。

### B. 研究方法

2000年4月から2011年3月までに当院を受診したNF2症例11例中、両側聴神経腫瘍を認めた10症例について、一側の治療前後の対側腫瘍径の変化ならびに聴力経過について検討した。

#### （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

10例中、聴神経腫瘍の治療は行われなかった症例が2例あった。それ以外の8例中、初診時に既に一側が高度難聴であった症例が4例あった。それら4例ではいずれも難聴側の治療がまず行われた。

残る4例もいずれも聴力の悪い側が最初の治療側に選ばれていた。治療法は手術が3例、γナイフが5例であった。一側の治療が行われた前後で対側の腫瘍径には8例とも変化はみられなかった。尚、先行する治療側はいずれも最終的に高度難聴になっていた。

### D. 考察

治療は原則に従い、より腫瘍径の大きい聴力レベルの悪い方を先に行われていることが確認された。文献報告のように、一側の治療が対側の腫瘍増大や聴力悪化を引き起こしたケースは我々の経験症例には認められず、発生頻度は高くないと推測された。インフォームドコンセントを得ることは必要であるが、これまでの治療方針に沿って、まず難聴側の治療をすすめていくことは妥当と考えられた。

### E. 結論

一側の治療が対側の腫瘍増大や聴力悪化を引き起こす可能性は否定し得ないが、その頻度は高くないと考えられ、原則に従い、より腫瘍径の大きい聴力

レベルの悪い方をまず治療することは妥当である。

## 2. 学会発表

平成 24 年日本耳鼻咽喉科学会総会にて発表予定

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

耳鼻咽喉科展望に投稿予定

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 結節硬化症の遺伝子機能解明と治療法の開発

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

*Tsc2* 欠損多能性幹細胞が示す特徴は全く知られていないことから、今回我々はまず *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の樹立を進めた。また、近年確立されたラット多能性幹細胞培養の樹立・培養技術を駆使し、*Tsc2* 欠損病変細胞の iPS 細胞化を試みた。さらに、TSC1 の細胞極性に関連した細胞骨格形成における機能の解析を行った。

### A. 研究目的

結節性硬化症（TSC）は、てんかんや自閉症関連障害を伴い、病理学的には患者の約 90% に皮質や上衣下の結節が認められる。病態発生の様子から神経幹・前駆細胞の分化・移動の異常が生じていることが想定されるが、その詳細は明らかではない。TSC の脳病態発生を模倣するモデルとして知られる Eker (*Tsc2* 変異) ラットでは、皮質結節はまれであるものの、*dysmorphic neuron* や *cytomegalic cell* が頻発する。我々は *Tsc2* 欠損による病態発生のエピゲノム異常の解明と、エピゲノム制御機構への人為的な介入による新規治療法の開発を目指している。

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。一方最近の研究では、*TSC1* と *TSC2* は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である *Rac1* や *RhoA* の活性を制御し、結果的に細胞-マトリックス間接着である *focal adhesion* におけるアクチン細胞骨格形成に関与していることが示唆されている。しかし、*TSC1* の細胞間接着におけるアクチン細胞骨格形成や、細胞極性の確立における機能は明らかではない。我々は、*TSC1* ノックアウトマウスの腎がん細胞から樹立した *TSC1* 欠損の培養細胞株に *TSC1* を発現させ、低分子量 G タンパクと細胞骨格形成について解析した。

### B. 研究方法と研究成果

Eker ラットのヘテロ変異体同士の交配により得られる胚盤胞から 2i 法により ES 細胞のコロニーを樹立した。遺伝子型を決定したところ、ES 様形態を示す継代可能な株としてホモ変異体細胞が得ることがわかった。ホモ変異体細胞は多能性の指標となる各種マーカー遺伝子を発現し、且つ胚様体誘導により三胚葉の分化マーカーを発現することが明らかとなった。現在、ホモ変異体細胞の増殖・分化能についてさらに詳細な分析を進めている。これまで *Tsc2* の下流に位置する mTORC1 の活性亢進が各種幹細胞の枯渇などの異常を惹起することが示唆されていたが、少なくともラットでは *Tsc2* 欠損多能性幹細胞を樹立することが可能と考えられた。

*TSC1* を発現させると、*Rac1* の活性は低下した。*RhoA* の活性もわずかに低下したが、明らかな変化は見出せなかった。共焦点顕微鏡を用いた細胞骨格の解析では、*TSC1* を発現させると葉状仮足と糸状仮足の形成が減少し、細胞の基底側のアクチン線維は減少した。細胞の頂端側においては、細胞間接着である *tight junction* に結合するアクチン線維が出現した。この線維は、Rho のエフェクターである ROCK の阻害剤によって減少した。*TSC1* 欠損の細胞に mTOR の阻害剤である rapamycin で処理してもこの線維は出現しなかった。

### C. 結語

これらの結果をもとに、Eker ラットの *Tsc2* 欠損

腎腫瘍細胞の iPS 細胞化の実験を進めており、今後病変部のエピゲノム的人為的リセット・修飾による TSC の病態抑制を現実化していきたい。また、TSC1 は細胞の極性形成に関与しており、この頂端側のアクチン線維は mTOR 非依存性で、かつ Rho の活性により形成されることが予想された。今後 TSC1 が頂端側のアクチン線維を形成する機序について、シグナル伝達系がどのように働いているのか、また低分子量 G タンパク質の活性との関係を明らかにする必要がある。

#### 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. 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* 102: 720-727, 2011.
2. Imashimizu K., Shiomi K., Maeda M., Aoki N., Igarashi K., Suzuki F., Koizumi M., Suzuki K. and Hino O.: Feasibility of large-scale screening using N-ERC/mesothelin levels in the blood for the early diagnosis of malignant mesothelioma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2: 409-411, 2011
3. Takamura A., Komatsu M., Hara T., Sakamoto A., Kishi C., Waguri S., Eishi Y., Hino O., Tanaka K. and Mizushima N.: Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Gene & Development*, 25: 795-800, 2011.
4. Nakamura H., Aoki H., Hino O. and Moriyama M.: HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatology Research* 4: 455-462, 2011
5. Inami Y., Waguri S., Sakamoto A., Kouno T., Nakada K., Hino O., Watanabe S., Andoh J., Iwadate M., Yamamoto M., Lee M-S., Tanaka K. and Komatsu M.: Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Biology*, in press.
6. Shiomi K., Shiomi S., Ishinaga Y., Sakuraba M., Hagiwara Y., Miyashita K., Maeda M., Suzuki K., Takahashi K. and Hino O.: Impact of renal failure on the tumor markers of mesothelioma, N-ERC/mesothelin and Osteopontin. *Anticancer Research*, 31: in press
7. Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Ishizu Y., Okamura-Oho Y., Hino O., Abe M., Kishimoto T., Sekihara H., Nakamura Y., Suzuki H., Forrest A.R.R., Hayashizaki Y.: LRR4 and UPK3B are markers of primary mesothelial cells. *Plosone*, in press
8. Yasen M., Obulhasim G., Kajino K., Mogushi K., Mizushima H., Tanaka S., Tanaka H., Hino O. and Arii S.: DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Int. J. Oncology*, 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（TSC）に高率に合併する自閉症の中核症状、とりわけ社会的相互交流の障害に対して有効な薬物療法を開発する目的で、モデル動物を使った治療の研究を行った。Tsc1<sup>+/-</sup>およびTsc2<sup>+/-</sup>マウス成獣に mTOR 阻害薬ラパマイシンを投与し、投与前後に行動実験を行って社会的相互交流を観察した。その結果、ラパマイシン投与前に認められた自閉症様行動（相互交流の減少と立ち上がりの増加）は投与後には改善し、野生型マウスと同程度となった。TSC に合併する自閉症に対し mTOR 阻害薬が有効であり、成人に達してからの治療でも奏功する可能性が示唆された。

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

る mammalian target of rapamycin (mTOR) の機能亢進をもたらし、これが TSC における病変や症状の原因と考えられている。TSC モデルマウスには脳病変が発生しないが、記憶学習障害があることが知られていた。しかし、自閉症に相当する行動異常については明らかでなかった。

われわれは昨年度の本会議にて、TSC モデルマウスが雌雄差なく自閉症様行動を示すことを発表した。この行動異常が mTOR シグナル系の亢進によって生じているかを明らかにするため、mTOR 阻害剤であるラパマイシンを投与した TSC モデルマウスにおける自閉症様行動の変化を検討した。

### 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である。有病率は人口の1%以上におよび、社会適応の困難が強いこと、対症療法を超えた薬物治療が確立していないことが問題である。

結節性硬化症（TSC）は自閉症を高率に合併し、原因が既知の自閉症としては最も頻度が高い。また、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い。このことから、TSC は自閉症の発症に直接関与していると推測される。TSC の原因遺伝子 *TSC1*、*TSC2* の異常は、下流にあ

### B. 研究方法

（倫理面への配慮）

実験は動物実験等の実施に関する基本指針に従い、東京都精神医学総合研究所（精神研）および東京都医学総合研究所（都医学研）において承認を受けて行った。

（マウス）

Tsc1<sup>+/-</sup>およびTsc2<sup>+/-</sup>マウスは精神研および都医学研で繁殖した。生後4週程度で離乳したのち、生後90日を過ぎたマウスに対して実験を行った。単独飼育となったマウスは異なる行動パターンを示すことが知られているため、今回の実験対象からは除外

した。

(ラパマイシン)

ラパマイシン (sirolimus, LC laboratories) は使用当日に溶媒 (10% DMSO) に溶解し、投与量が 2、5、10 mg/kg となるように 10 ml/kg の溶液を調整した。この溶液または溶媒を 24 時間間隔で 2 回、マウスに腹腔内投与した。

(Social interaction test)

*Tsc1*<sup>+/+</sup>マウス、*Tsc2*<sup>+/+</sup>マウスおよびそれぞれの野生型マウス (N = 9-11) に対して、投薬を終了した翌日に実験を行った。昨年度の報告にあるとおり、social interaction test における異常には性差がないので、今回は雌雄差については検討せず、遺伝子型とラパマイシンの投与量に関する検討を行った。

実験対象のマウスをホームケージで 15 分間単独にしたのち、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 active interaction (AI, anogenital sniffing, allo-grooming, mounting など) の時間および立ち上がり行動 (rearing) の回数を計測した。

### C. 研究結果

*Tsc1*<sup>+/+</sup>および *Tsc2*<sup>+/+</sup>マウスの AI は、ラパマイシンの投与量を増量するにつれて有意に変化した。野生型マウスの AI は、10 mg/kg までの投与によっても変化しなかった。変異マウスの AI は、溶媒の投与後には野生型に比べて有意に短く、2 mg/kg ラパマイシンの投与後には変化しなかった。しかし、5 および 10mg/kg ラパマイシンを投与すると、変異マウスの AI は有意に改善し、野生型マウスと同程度まで回復した。

続いて、5mg/kg ラパマイシンの投与による AI と rearing の変化を調べた。溶媒を投与した *Tsc1*<sup>+/+</sup>および *Tsc2*<sup>+/+</sup>マウスでは、野生型に比べて AI が短く、rearing が増加していた。ラパマイシンの投与後には、変異マウスの AI は野生型マウスのレベルまで回復し、rearing は野生型マウスと同程度まで減少した。野生型マウスの AI および rearing は、ラパマイシンの投与後も明らかな変化を示さなかった。

### D. 考察

昨年度得られた、*Tsc1*<sup>+/+</sup>および *Tsc2*<sup>+/+</sup>マウスが自閉症様行動を示すという事実のみでは、これが何を原因にして生じたものかについて言及するには不十分であった。今回、この行動異常が両系統のマウス

において mTOR 阻害剤で正常化することが明らかとなった。TSC モデルマウスの自閉症様行動の原因が mTOR シグナル系の機能亢進にあること、また、このマウスが治療可能な自閉症のモデルとして有用であることも示された。TSC モデルマウスの詳細な研究により、いまだ理解が進まない自閉症の病態が解明されていくことが期待される。

本研究では、成獣において短期間のラパマイシン投与が自閉症様行動を改善した。TSC に合併する自閉症においては、mTOR 阻害剤による治療を幼弱期以降に開始しても、治療効果が得られる可能性を示唆している。今後は、自閉症を合併した TSC 患者に対する臨床応用が期待される。また、より重症例においては幼弱期からの治療が要求されうるが、その安全性をモデルマウスで検討していくことも必要となるだろう。

### E. 結論

*Tsc1*<sup>+/+</sup>および *Tsc2*<sup>+/+</sup>マウスの自閉症様行動は、成獣においてラパマイシンで正常化した。TSC において遺伝子異常が自閉症の発症に直接関わること、これが mTOR シグナル系の亢進を介すること、更には発達期を過ぎても治療可能であることを強く示唆する。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Inter-stitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain and Development* 2011; 33(4): 353-356.
- (2) Mizuno Y, Takahashi K, Igarashi T, Saito M, Mizuguchi M. Congenital infection-like syndrome with intra-cranial calcification. *Brain and Development* 2011; 33(6): 530-533.
- (3) 水口 雅. ウイルス感染症と自閉症. *医学のあゆみ* 2011; 239(6):693-697.

#### 2. 学会発表

- (1) 佐藤敦志. 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動. 第 33 回日本生物学的精神医学会「若手研究者のための研修講座」、東京、2011 年 5

月 20 日

- (2) Sato A, Kasai S, Takamatsu Y, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Autism-like behaviors in mouse models of tuberous sclerosis complex and their recovery by rapamycin. 2<sup>nd</sup> AsCNP, Seoul, 2011/9/23-24.

#### H. 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

結節性硬化症細胞ではハマルチンとツペリンはヘテロ複合体機能の欠損により、Rheb とその下流の mTOR シグナルが亢進する。よって、mTOR シグナルを抑制することが結節性硬化症細胞の種々の機能異常に抑制効果を発揮すると考えられる。本年度は mTOR 複合体のライソゾーム膜局在に着目し、ライソゾーム機能阻害剤の効果に関し検討を行った。結果、ライソゾーム融合を阻害するクロロキンは mTOR のライソゾーム局在を抑制し、TSC2 欠損細胞の細胞周期を抑制した。また、低濃度のラパマイシンとクロロキンの併用で TSC2 欠損細胞の細胞死を誘導した。以上の結果は、mTOR のライソゾーム局在阻害が mTOR シグナルの抑制に有効である可能性を示唆する。

### 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細胞内で複合体を形成し、Rheb-mTOR シグナルを抑制している。よって、TSC1 または TSC2 の欠損により引き起こされる mTOR シグナルの亢進がこの疾患の分子病態と考えられている。mTOR シグナルの抑制はラパマイシンを用いた薬理的な手法が治療研究として進められている。一方、mTOR 複合体の活性化には複合体蛋白質のライソゾーム膜局在が重要との報告がされている。そこで、本研究ではライソゾーム機能阻害剤の mTOR 局在に対する効果について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞培養と遺伝子導入

培養 HeLa または HEK293 細胞への cDNA 発現ベクターと siRNA の導入は Lipofectamine2000 試薬を用いリポフェクション法により行った。細胞へのクロロキシン、U18666A、ラパマイシンの投与は、遺伝子導入後の細胞に 18 時間作用させた。免疫蛍光染色は、抗 mTOR、抗 Lamp-2 または抗 LC3 抗体を用いた。蛍光画像の取得は共焦点レーザー顕微鏡により行った。ライソゾーム活性染色はライソトラッ

カー染色により、またライソゾーム pH の測定はライソセンサーを用い測定した

#### 2) 細胞周期、細胞死の解析

細胞周期の解析は BrdU 法で、細胞死の解析は培養液中の LDH 活性測定により行った。

### C. 結果

通常培養条件下で、HeLa 細胞または HEK293 細胞にくらべ、TSC2 siRNA を導入した細胞では Rab7 または Lamp-2 と共局在する mTOR 蛋白質が上昇していた。また、TSC2 ノックダウン細胞では、ライソゾーム活性が亢進し、ライソゾーム pH が上昇していた。一方、ライソゾーム機能阻害剤のうち、U18666A はラパマイシンで誘導されるオートファゴソームとライソゾームの融合は阻害したが、mTOR のライソゾーム局在は阻害しなかったのに対し、クロロキンはライソゾーム融合と mTOR の局在ともに阻害した。さらに、クロロキシンとラパマイシンの併用は TSC2 欠損細胞において細胞周期の抑制と細胞死の誘導作用を示した。

### D. 考察

mTOR 複合体 1 (mTORC1) は細胞の栄養状態により活性化し、蛋白質合成促進やオートファジーの

抑制など種々の細胞機能の調節に重要な働きを示し、その分子機構が明らかにされつつある。アミノ酸に応答した mTORC1 の活性化には、mTORC1 が Rag 複合体と結合しライソゾーム膜上局在することが重要であることが分かってきた。そこで、本研究の結果から、クロロキンによりライソゾーム融合を阻害することで、mTOR のライソゾーム膜局在を抑制し、TSC2 欠損細胞の機能に抑制効果を示した。今後は神経細胞における mTOR とライソゾーム機能との関連性について検討を行うことで、TSC 細胞の分子病態の分子機能の解明につなげてゆく予定である。

## E. 結論

ライソゾーム膜融合は mTOR シグナルの抑制し、

TSC 細胞に効果を示す可能性を示唆した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ueda M, Sugiura C, Ohno K, Kakita A, Hori A, Ohama E, Vinters HV, Miyata H. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuropathology*. 2011, 31(6):589-598

### 2. 学会発表

該当なし

## 結節性硬化症の白斑に対するラパマイシン外用治療の有効性

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（TSC）の原因蛋白である 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。TSC では、この抑制が働かず mTOR が活性化し種々の過誤腫が生じる。TSC の腫瘍病変に対し rapamycin 等の mTOR 阻害剤内服の有効性が報告されており、一昨年、我々は TSC の顔面血管線維腫に対する rapamycin 外用療法の有効性を報告した。一方、TSC の特徴的な皮疹の 1 つに白斑がある。白斑については、メラノサイト数は正常であるが、樹状突起の発達不良やメラノソームが小型・数減少・含有メラニン減少との報告がある。しかしながら、その成因や mTOR の関与については未だ不明である。我々は、血管線維腫に対する rapamycin 外用療法の臨床試験の際に、白斑に対しても rapamycin 外用療法が有効である知見を得た。rapamycin の作用機序を調べるため、培養ヒト正常メラノサイトを用い、rapamycin を添加して、RT-PCR で MITF の mRNA 発現及びメラニン量の変化を測定した。結果、MITF の mRNA 発現の増強とメラニン産生増加が認められ、rapamycin によるメラニン生成の亢進が示唆された。TSC の白斑に対し、rapamycin 外用療法は副作用が少なく有効な治療法であり、今後さらに臨床・実験の両側面から検討を加えていきたい。

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

TSC の責任遺伝子には、hamartin をコードする *TSC1* と tuberin をコードする *TSC2* の二つがあり、hamartin と tuberin の複合体は、下流の mammalian target of rapamycin (mTOR) を抑制している。TSC では、この複合体の異常で mTOR が活性化し細胞増殖や腫瘍形成が生じる。近年、rapamycin 等の mTOR 阻害剤の内服が TSC の腎、肺、脳の腫瘍病変や顔面血管線維腫に有効である報告がある。また、一昨年、この研究班で我々は TSC の顔面血管線維腫に対する rapamycin 外用療法の有効性を報告した。

一方、TSC の特徴的な皮疹の 1 つに白斑がある。

TSC の白斑は診断基準の大症状の 1 つであるが、研究報告は少ない。白斑部では、メラノサイトの数は正常だが、樹状突起の発達が悪く、メラノサイト内のメラノソームの小型化、数の減少、含有メラニン量の低下や、周囲のケラチノサイト内のメラノソームの減少がこれまで報告されている。しかしながらその発生機序や、白斑部での mTOR の関与については未だ不明である。

我々は、血管線維腫に対する rapamycin 外用療法の有効性について臨床試験を施行する中で、白斑に対しても rapamycin 外用療法が有効である知見を得たので、今回、正常ヒトメラノサイトを用いた実験結果と合わせ、若干の考察を加えて報告する。

### B. 研究方法

Rapamune<sup>®</sup>2mg 錠を主剤、軟膏・ゲル 2 種類を基剤とし、錠剤を粉碎して基剤と混和し 0.2% ラパマイシン外用剤を調製した。顔面血管線維腫に 0.2%

rapamycin 外用剤または基剤を1日2回12週間左右塗り分けする臨床試験の際に、血管線維腫の周囲に白斑を有する2名の患者において、周囲の白斑部も含め0.2% rapamycin 外用剤を塗布した。

培養正常ヒトメラノサイトに rapamycin 1nM、10nM を添加し、12時間後、24時間後の Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) の mRNA 発現を RTPCR で測定した。また、培養正常ヒトメラノサイトに rapamycin 1nM、10nM を添加し、4日間培養後メラニン定量を行った。細胞数を計数後、細胞を 1N NaOH で溶解し、合成メラニンを用いた標準濃度液とともに 400nm 吸光度を測定しメラニン量を算出した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

ラパマイシン外用剤12週間外用前後の、患者2名の白斑の変化を図1、2に示す。図1の2歳男児では、右顎に紅色小局面とその周囲に白斑が認められたが、12週外用後白斑はほぼ消失した。図2の8歳男児も、右頬に白斑が見られたが、12週終了時には同じく白斑はほぼ消失した。いずれの患者でも、皮膚刺激等の明らかな局所の副作用は認められず、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なかった。また終了時の血中ラパ

マイシン濃度は検出限界以下であった。

培養正常ヒトメラノサイトに rapamycin 1nM、10nM を添加し、MITF の mRNA 発現を RTPCR で測定した結果、10nM 添加群では12時間後より MITF の発現増加が認められた。また24時間後では、濃度依存性に MITF の発現増加が認められた(図3)。

また、培養正常ヒトメラノサイトに rapamycin 1nM、10nM を添加し4日間培養後メラニン定量した結果、用いた2種の正常ヒトメラノサイトいずれにおいても、メラノサイト1万個あたりのメラニン産生はラパマイシン添加で亢進した(図4)。

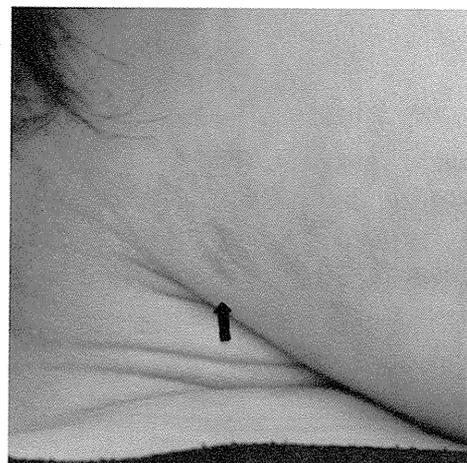
### D. 考察

今回我々は、TSCの白斑に対しても rapamycin 外用療法が有効である知見を得た。TSCの白斑形成に、hamartin-tuberin 複合体の異常がどのように関与しているかは不明であるが、mTOR 阻害剤である Rapamycin が有効であったことから、hamartin-tuberin 複合体の機能障害による mTOR 活性化が、白斑形成にも関与している可能性が考えられた。

また、培養正常ヒトメラノサイトを用いた実験では、rapamycin の添加で MITF の mRNA 発現の増強とメラニン量増加が認められた。MITF は、核内に存在し、タイロシネースなどの酵素やメラニン生成に関与する多くの因子の転写を制御している、メラニン生成に重要なタンパクの一つである。実験結果からは、rapamycin が、MITF 発現増強を介してメラニン生成を亢進させることが示唆され、rapamycin のメラニン生成亢進そのものが白斑の改



A: 外用開始前



B: 外用12週後

図1 患者1 2歳男児