

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、障害度スコアについて検討した。障害度スコアは、特定疾患個人調査票のスコアを利用した(表1)。罹病期間と障害度スコアの関係については、2010年度特定疾患個人調査票のデータとの比較検討を行った。

(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

【NF2 患者由来腫瘍組織の免疫組織化学的検討】

2名のNF2患者由来の脊髄腫瘍組織について、COX2の過剰発現を確認した。(図1A, B)

【症例1】29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。

両側聴神経鞘腫、大脳半球の髄膜腫について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11年を経過した。

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。

表1 神経症状障害度スコア

- ▶ 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

(図2)

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。発症10年目で頸髄の腫瘍の増大に伴い(図3, 4)、四肢の脱力感とふらつきが強くなったため、頸髄腫瘍(アストロサイ

A

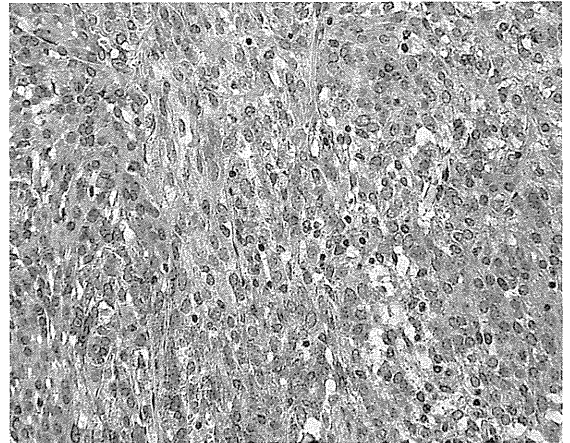


図1A NF2 髄膜腫でのCOX-2発現

B

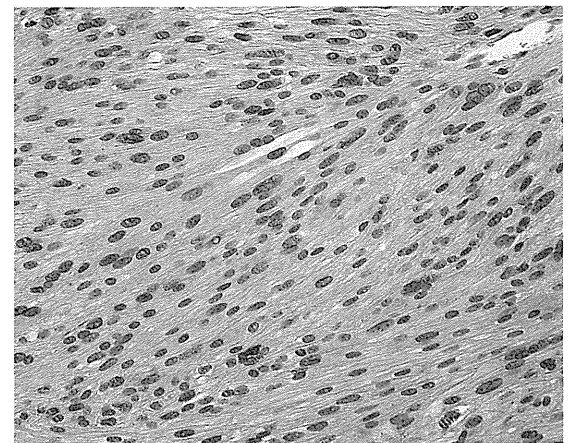


図1B NF2 アストロサイトーマでのCOX-2発現

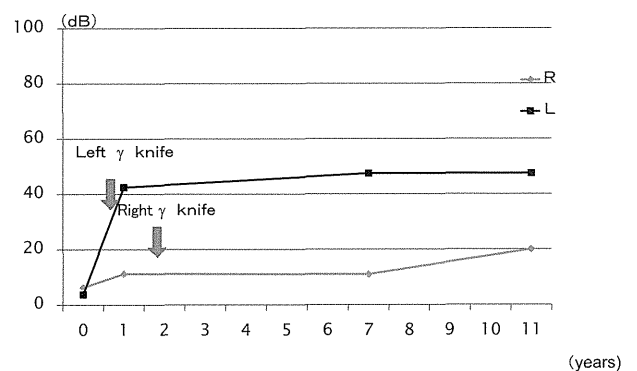


図2 聴力の経過【症例1】

トーマ) 摘出術をうけた。摘出した腫瘍内部はのう胞状になっており、そのため比較的急速に増大したものと考えられた。11年後の現在、障害度スコアは4点。

【症例2】15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(5年目以降は10mg)内服を続けながら経過観察している。

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。

9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、聴力低下が進行している(図5)。顔面神経麻痺の程度は変化なく、MRI上腫瘍は徐々に増大してきている(図6)。現在、障害度スコアは5点。

【2010年度の特定疾患個人調査票のデータとの比較】

特定疾患個人票のデータでは、20歳未満発症のNF2の障害度の自然経過は個人差がきわめて大き

いため、有効性の評価は困難であるが、2例とも比較的進行の遅いグループに属していた。(図7)

D. 結論

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。

有効性を証明するには、今後、症例数を増やした検討が必要であるが、観察期間や効果の指標をどうするかなど課題も多い。

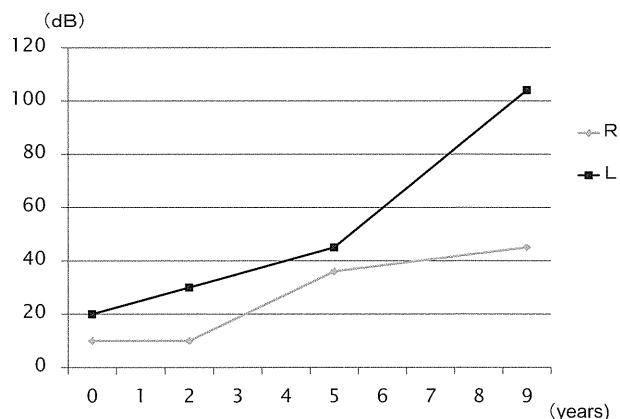


図5 聴力の経過【症例2】

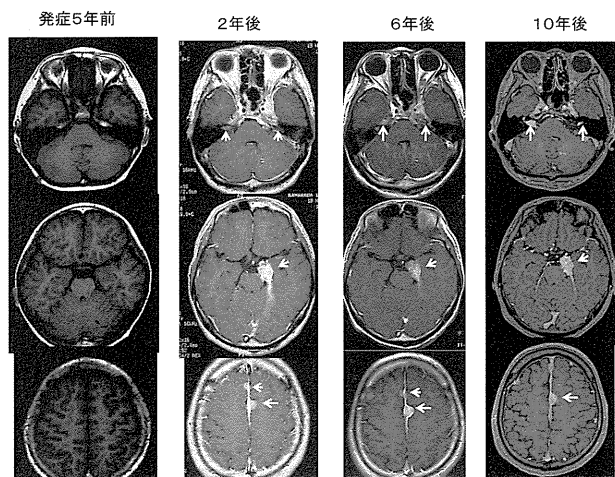


図3 症例1の経時的MRI

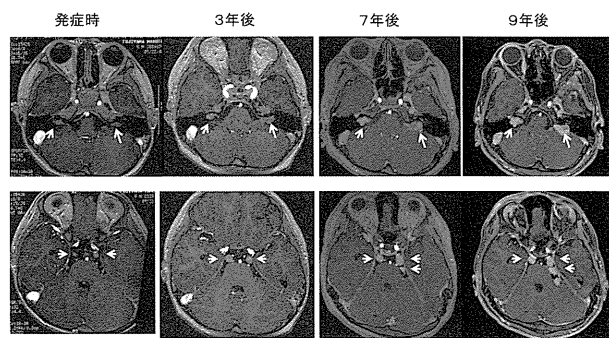


図6 症例2の経時的MRI

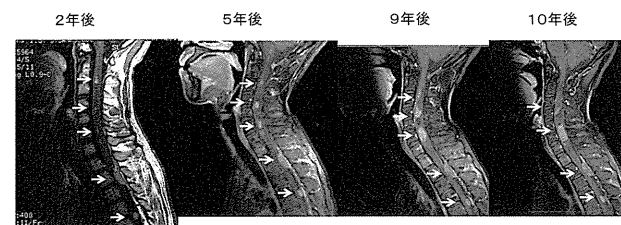


図4 症例1の脊髄MRIの経時的変化(1)

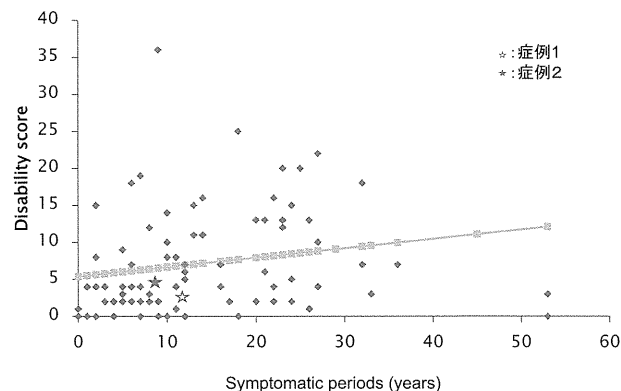


図7

E. 研究発表

論文発表

- 1) Matsuo M, Maeda T, Ono N, Sugihara S, Kobayashi I, Koga D, Hamasaki Y. Efficacy of dextromethorphan and cyclosporine A for acute encephalopathy. *Pediatric Neurology* (accepted)
- 2) Matsuo M, Togawa M, Hirabaru K, Mochinaga S, Narita A, Adachi M, Egashira M, Irie T, Ohno K. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. *Molecular Genetics and Metabolism* (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.005>

学会発表

松尾宗明. 特定疾患臨床個人調査票からみた若年発症神経線維腫症 2 型の特徴. 第 54 回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17-19. 脳と発達 2012; 44 S275.

E. 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

DNA メチル化からみた髄膜腫の再分類と、その臨床応用

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

髄膜腫の多くは組織学的良性に分類されるが、組織学的良性例の中に再発、浸潤、悪性転化など悪性の臨床経過をたどる腫瘍が存在する。このような組織診断の問題点を補完する目的で、DNA メチル化を網羅的に解析し、臨床所見との関連を検討した。Training set 30 例を用いメチル化マイクロアレイにて一次スクリーニングとその再現性の検証を行った。マイクロアレイの解析では training set は 3 群に分類され、これらのうち 1 群では一部遺伝子群にメチル化が高集積しており、また同群には再発症例が多く含まれていた。この群でメチル化レベルの高い遺伝子群から最終的に 5 遺伝子を抽出し DNA プロモータ領域のメチル化レベルを定量化してスコア化した。再発との関連が最も強いスコアのカットオフ値を計算し validation set の 32 例に適用したところ、強い有意差をもって結果が再現された。また悪性転化した症例群では、組織学的良性の段階でメチル化スコアが既に高値を示していた。髄膜腫においても、一部遺伝子群のメチル化が臨床的悪性性格と関連する可能性があることが示唆された。特定の遺伝子のメチル化解析が再発に関し予測マーカーとなりうる可能性があると考えている。

岸田悠吾 福島県立医科大学脳神経外科
講師
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

A. 研究目的

髄膜腫は原発性脳腫瘍のうち最も頻度が高く、神経線維腫症 2 型 (NF2) では約半数に発生する。髄膜腫の多くは組織学的良性に分類されるが、組織学的良性例の中にも再発、浸潤、悪性転化など悪性の臨床経過をたどる腫瘍が存在し、病理診断と臨床経過の乖離が問題となっている。このような組織診断の問題点を補完する目的で、DNA メチル化を網羅的に解析し、臨床所見との関連を検討した。

一昨年にも、易再発性マーカーとなりうる遺伝子群について報告したが、症例数を増やして、より詳細で臨床経過を反映する結果を得ることができたので報告する。

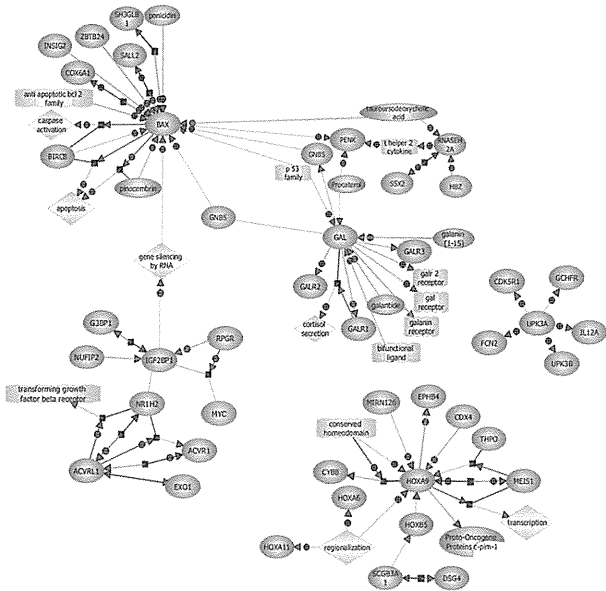
B. 研究方法

Training set 30 例を用い、一昨年報告したように、メチル化マイクロアレイにて一次スクリーニングとその再現性の検証を行った。また、解析結果にて大別された症例群間に差の大きい遺伝子を抽出し、bisulfite pyrosequencing にて DNA プロモータ領域のメチル化レベルを定量化してスコア化した。Training set にて再発との関連が強いカットオフ値を求め、validation set 32 例にて再現性を検証した。

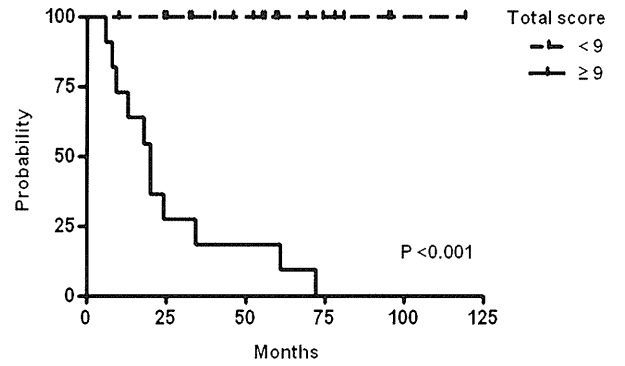
C. 研究結果

一昨年報告したように、マイクロアレイの解析では training set は 3 群に分類され、consensus clustering でもその安定性が確認された。これらのうち 1 群では一部遺伝子群にメチル化が高集積しており、また同群には再発症例が多く含まれていた。

このメチル化高集積群で、メチル化レベルの高い 113 遺伝子群から pathway analysis software を用いてハブ遺伝子を選択し、最終的に 5 遺伝子 (HOXA6、HOXA9、UPK3A、IGF2BP1、PENK) を抽出した。



この結果を validation set に適用したところ、強い有意差をもって再発の有無が予測されるという結果が再現された。



Validation set 32 例の結果

これらの定量値に基づき、メチル化程度をスコア化した (30%以上が3、15%以上30%未満が2、15%未満が1)。5 遺伝子のメチル化スコアの合計から、再発との関連が最も強いスコアのカットオフ値を計算したところ、スコア9以上が再発と最も関連した。

また経過中に悪性転化をした症例群では、組織学的良性的段階でメチル化スコアが既に高値を示していた。

D. 考察

DNA プロモータ領域のメチル化定量値に基づき、髄膜腫の再発と有意に関連を示すスコアを作成した。神経膠芽腫などにおいて一部の遺伝子のメチル化変化と表現型との関連が報告されているが、髄膜腫においても同様に、一部遺伝子群のメチル化が臨床的悪性性格と関連する可能性があることが示された。また、DNA メチル化は、病理学的変化に先立ってみられることが示唆された。

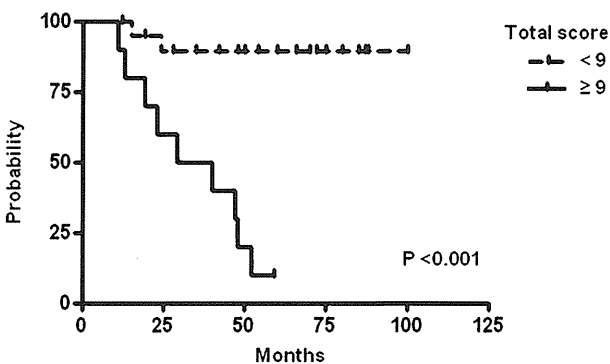
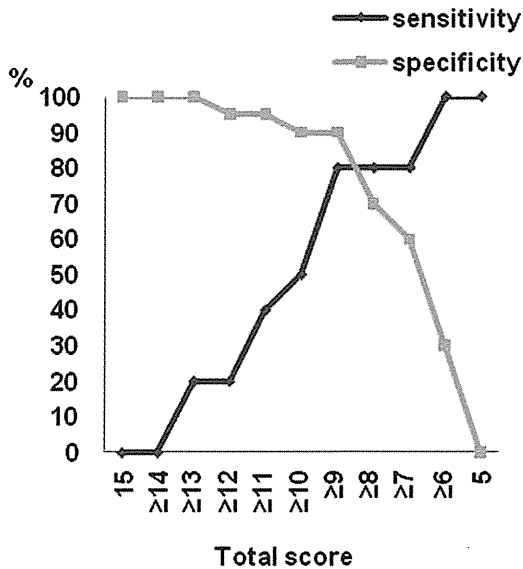
E. 結論

良性的髄膜腫にも再発傾向、悪性転化などの悪性傾向をもつサブグループが存在する。今回の研究で、特定の遺伝子のメチル化解析によりこのサブグループを予知診断できる可能性が示唆された。今後、今回検討した遺伝子の機能を解析し、診断についての理論的背景を解明するとともに、これらの遺伝子を標的とした治療法開発に結びつけたい。

F. 研究発表

1. 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 33: 436-441, 2012](#)



Training set 30 例の結果

2. 学会発表

Kishida Y, Saito K, Natsume A, Kondo Y, Wakabayashi T: Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. 13th Asian Australasian Congress of Neurological

Surgeons. 2011/12/1-4. Taipei, Taiwan

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Schwannomatosis 11 例の臨牀的検討

研究分担者 中川秀己 東京慈恵会医科大学皮膚科教授

研究要旨

臨牀的に Schwannomatosis は、non-intradermal Schwannoma すなわち皮下の Schwannoma であり、かつ Vestibular Schwannoma の存在を否定できる多発性 Schwannoma を言い、遺伝子レベルでは NF2 遺伝子変異を germ line にみないことが条件とされている。11 症例の家族性（3 例）ならびに散発性（8 例）の Schwannomatosis と考えられる患者を臨牀的に検討した。

10 家系 11 症例のうち、2 家系 3 症例は家族性の発症であり、不完全浸透の常染色体優性遺伝形式をとっているようである。また発症年齢は 20 歳前後と 40 歳前後にピークがあり前者のグループが脳脊髄腫瘍を合併しやすい。全例、皮内ではなく皮下の神経鞘腫であり疼痛、圧痛を伴うものが多い。また、前庭神経鞘腫を発症するものはなかった。

Schwannomatosis と神経線維腫症 2 型（NF2）は共に神経鞘腫を主徴とする病態であり髄膜腫も合併する。しかし、臨牀的に Schwannomatosis は前庭神経鞘腫の発生をみないとされる。家族性および散発性 Schwannomatosis は SMARCB1 遺伝子の germ line 変異が原因であると報告された。しかし、mosaicNF2 患者も前庭神経鞘腫を発症する場合があることから germ line に NF2 遺伝子変異をみない場合その鑑別が問題となる。最近、片側性に前庭神経鞘腫を発症しながら Schwannomatosis と診断されている報告もあるため SMARCB1 遺伝子と NF2 遺伝子の変異検索による診断が必要である。

太田有史、谷戸克己、石地尚興、新村真人
東京慈恵会医科大学皮膚科

的に検討した。

A. 研究目的

Schwannomatosis は、1973 年、Niimura M が Rinsho Derma にその存在を初めて報告した。しばらく、その独立性が議論されたが、2005 年、MacCollin らによって診断基準が提出され、30 歳で前庭神経鞘腫の発生がないことが重要とされた。現在、その発生頻度は、40,000 出生にひとりと言われている。

診断基準によれば、臨牀的に Schwannomatosis は、non-intradermal Schwannoma すなわち皮下の Schwannoma であり、かつ前庭神経鞘腫（Vestibular Schwannoma）の存在を否定できる多発性 Schwannoma を言い、遺伝子レベルでは NF2 遺伝子変異を germ line にみないことが条件とされている。10 家族の Schwannomatosis と考えられる患者を臨牀

B. 研究方法

10 家族の家族性（3 例）ならびに散発性（8 例）の Schwannomatosis と考えられる患者を対象に臨牀的に検討した。検索項目は、性別、初診時年齢、初発年齢、家族歴、皮膚の神経鞘腫は皮内に生じているか皮下に生じているか、痛みを伴うか、脊髄腫瘍の有無、頭蓋内腫瘍の有無そして前庭神経鞘腫の有無とした。

倫理面への配慮：患者の訴えに即した検査と治療を十分なインフォームドコンセントを得た上でを行い、研究を目的にした検査や腫瘍切除などは行っていない。

C. 症例提示

Schwannomatosis と考えられる 2 症例を選択し提示する。

症例1 (家族1)。

患者は54歳、男性。主訴は、圧痛を伴う左胸部、両側上腕の皮下腫瘍 (図1)。家族歴は、母と妹に同様な症状あり (図2)。

33歳時、右頸部の腫瘍切除を皮切りに、42歳時、左胸部、左腋部腫瘍、47歳時、左腋部、左鎖骨部腫瘍、53歳時、右前腕部腫瘍の切除を受けた。以上の切除腫瘍はすべて皮下の神経鞘腫であった。なお、54歳時、頭部MRIにて頭蓋内腫瘍はないことが確認されている。

MRI (図3A) などの検索後、左胸部の皮下腫瘍の切除が行われた。組織学的に神経鞘腫と診断した (図4)。

なお、両側傍咽頭部にも腫瘍があり神経鞘腫と考えている (図3B)。

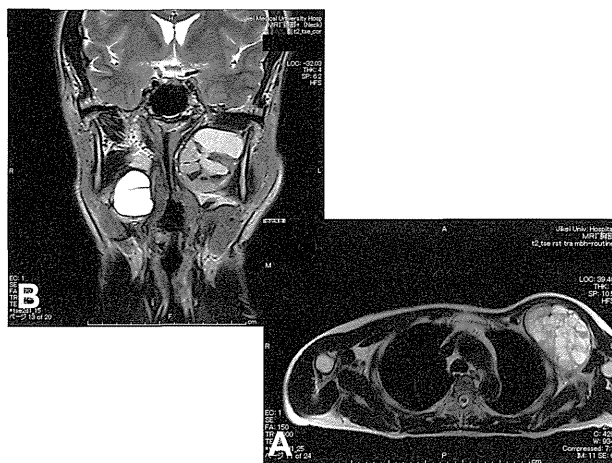


図3 症例1のMRI画像
A: 左胸部皮下、小胸筋下の10x9x7cm大腫瘍 (T2WI)。
B: 両側傍咽頭部の3~5cm大腫瘍性病変 (T2WI)。

症例2 (家族8)。

患者は、42歳、女性。主訴は、疼痛を伴う左下腿部、左足部そして右前腕の皮下腫瘍 (図5A)。同様な症状の近親はいない。未婚。

19歳ごろ皮下腫瘍に気づいた。38歳時、皮下の

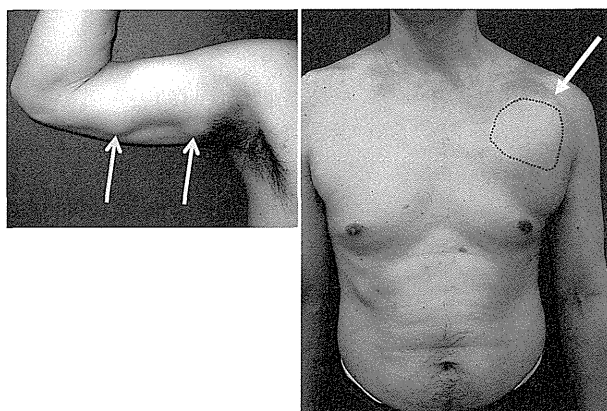


図1 症例1の臨床像
右上腕内側に2つの皮下腫瘍。左胸部に手拳大皮下腫瘍。圧痛あり。

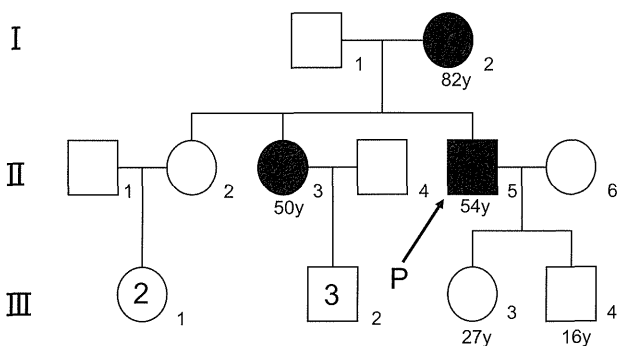


図2 家族1の家系図
発端者の子には、現時点で症状ない。

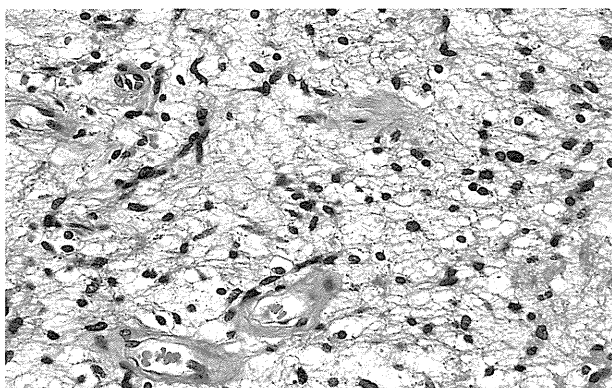


図4 症例1の左胸部皮下腫瘍の病理組織像
浮腫状の間質の中に類円形の核をもつ小型の細胞が散在している。血管の周囲に硝子化がみられる。神経鞘腫である。

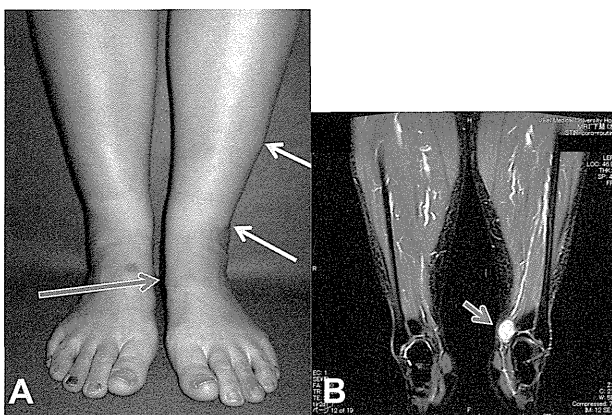


図5 症例2の臨床像とMRI (STIR) 画像
A: 左下腿外側に2個、左足部内果後ろに1個の皮下腫瘍。疼痛あり。
B: 左足部内果後ろの腫瘍は頸骨神経由来と考えられる。

腫瘍切除を初めて受けた。39歳時、記銘力障害、右下肢麻痺出現。多発脳腫瘍、脊髄腫瘍みつきり、開頭術、サイバーナイフにて治療。脳腫瘍は髄膜腫であった。41歳時、腰背部痛、両下肢しびれ強くなり、T8/9、T11/12の硬膜内髄外腫瘍がみつきり切除術を受けた。組織学的に神経鞘腫であった。

MRI (図5B)などの検索後、左足部内果後方の頸骨神経由来と思われる皮下腫瘍の切除が行われた。組織学的に神経鞘腫であった(図6)。

その後、43歳時、腰痛増強しMRIにてL4に硬膜内髄外腫瘍がみつきり切除術を受け、組織学的に神経鞘腫であった。

D. 研究結果

10家族(11症例)のまとめを表1に示した。

家族性(家族1と家族2)のSchwannomatosisは不完全浸透の常染色体優性遺伝形式をとっている。

発症年齢は20歳前後と40歳前後にピークがあり前者のグループが脳脊髄腫瘍を合併しやすい。

全例、皮内ではなく皮下の神経鞘腫であり疼痛、

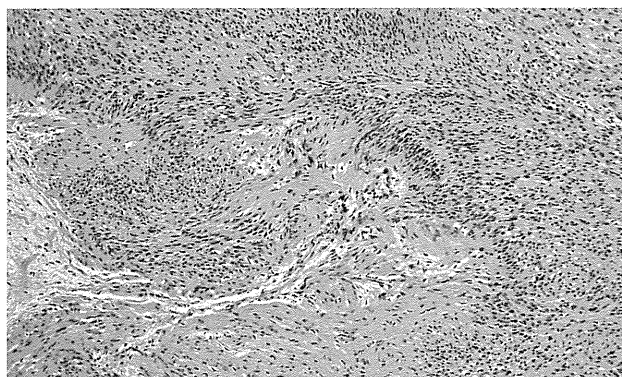


図6 症例2(左足部内果)の病理組織像
柵状に並んだ核を持つVerocay bodyがみられる。
神経鞘腫である。

表1 Schwannomatosis 10家系の臨床的特徴

家族	性別	初診時年齢	初発年齢	FH	皮内の神経鞘腫 Schw	皮下の Schw/ (疼痛)	脊髄腫瘍	前庭神経鞘腫 VS	頭蓋内腫瘍 (髄膜腫)
1	M	54	30~	+	-	+/+	-	-	-
2	F	49	23	+	-	+	+(C)	-	-
	F	24	21	-	-	+	+(T/L)	-	-
3	M	43	39	-	-	+/+	-	-	-
4	F	56	40~	-	-	+	-	-	-
5	M	24	20	-	-	+/+	-	-	-
6	M	49	22	-	-	+/+	+(T/L)	-	-
7	M	59	54	-	-	+/+	-	-	-
8	F	42	19	-	-	+/+	+(T/L)	-	+
9	F	46	36	-	-	+/+	-	-	-
10	F	63	20	-	-	+/+	+(L)	-	+

圧痛を伴うものが多い。

全例、前庭神経鞘腫はなかった。

E. 考察

Schwannomatosisと神経線維腫症2型(NF2)はともに神経鞘腫を主徴とする病態であり髄膜腫も合併する。しかし、臨床的にSchwannomatosisは前庭神経鞘腫(VS)の発生をみないとされるが、小脳橋角部腫瘍をみたとき、それが前庭神経以外の部位(三叉神経、舌咽神経など)からの発症と区別しなければならないことも重要である。

近年、家族性および散発性Schwannomatosisは、SMARCB1遺伝子のgerm line変異が原因であると報告された。しかし、mosaicNF2患者もVSを発症する場合があることからgerm lineにNF2変異をみない場合その鑑別が問題となる。最近、片側性にVSを発症しながらSchwannomatosisと診断されている報告もあるためSMARCB1遺伝子とNF2遺伝子の変異検索による診断が必要である。

Schwannomatosisの腫瘍発生モデルとして4-hit 3-step modelが提唱されている(図7)。SMARCB1遺伝子とNF2遺伝子が4-hitすることで腫瘍が発生するという仮説である。このとき、多発している腫瘍のひとつにNF2変異をみたとき別の腫瘍あるいは末梢血細胞に同一のNF2変異がなければNF2とは言わないほうが好ましい。逆に、2つ以上の腫瘍にNF2の同一の変異をみないときは、むしろSchwannomatosisを考える。

F. 結論

Schwannomatosisの独立性は臨床的な診断基準により広く認識されているが、いまだ不明瞭な部分も

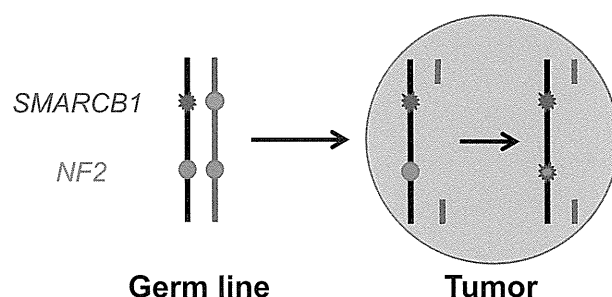


図7 Schwannomatosisの腫瘍発生モデル(4-hit 3-step model)

Germ lineにSMARCB1遺伝子の片方のアレルに変異がある場合、2nd stepとしてNF2遺伝子を含んだSMARCB1遺伝子のLOHを生じ、3rd stepとしてNF2遺伝子に変異が起こる。この過程で腫瘍が発生するという仮説。

ある。遺伝子レベルでの再検討、とくに SMARCB1 変異がある Schwannomatosis と SMARCB1 変異がない Schwannomatosis での臨床像の比較が望まれる。

G. 研究発表

学会発表 第 64 回日本皮膚科学会西部支部学術

大会（広島、2012 年 10 月 27 日）にて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

結節硬化症の遺伝子機能解明と治療法の開発

研究協力者 樋野興夫 順天堂大学医学部病理・腫瘍学教授

研究要旨

2つの結節性硬化症（TSC）遺伝子産物（Tsc1 と Tsc2）は結合し、翻訳促進やオートファジー抑制、代謝系の遺伝子発現制御などを司っているラパマイシン感受性 mTOR 複合体（mTORC1）の抑制因子として機能する。Tsc1/Tsc2 複合体の mTORC1 抑制能は各種のストレス応答からの上位シグナル伝達系により修飾されることが知られている。TSC ではいずれかの遺伝子欠損（2ヒット）によって惹起される mTORC1 活性亢進が腫瘍発生の要因となっている。このことからラパマイシンの投与による TSC の治療が試みられているが、効果には限界がある。そこで、病態発生に関わる他の経路の解明を目指す。

さらに、我々は、Eker ラットから ES 細胞を樹立し、神経分化誘導実験等を行い、Tsc2 の脳内病変発生に関わるメカニズムを、細胞レベルで調べられる実験系の開発を目指す。

A. 研究目的

Tsc1 や Tsc2 が制御する mTORC1 以外の標的候補が報告されているが、我々も最近、mTORC1 を介さない経路により Tsc1 がアクチン骨格の制御を行っている可能性を見出した。我々はこのアクチン骨格系制御を含め、mTORC1 以外の Tsc1 および Tsc2 の標的分子・下流シグナルもストレス応答により変動するものと予想している。また我々は Tsc2 の発現による Rac1 の活性促進が mTORC1 抑制を介して生ずることを見出しており、mTORC1 の新たな下流経路の存在も視野に入れ研究を進めている。これらの Tsc1 および Tsc2 が関わる細胞機能制御の解明は、TSC のみならず、糖尿病や神経変性疾患など、ストレス応答の破綻の関与が強く示唆されている他の病態発生の理解にも重要な課題と考えている。本研究では Tsc1 あるいは Tsc2 を欠損する腎腫瘍細胞と各遺伝子相補を行った細胞を用い、我々が見出した Tsc1 によるアクチン骨格の分子制御機構を明らかにする。一方、Tsc2 発現細胞株において見出した、Rac1 陽性の細胞内顆粒について分析を進める。さらに、ラパマイシン処理を利用しながら遺伝子発現の網羅的な比較分析を行い、Tsc1 と Tsc2 の新規下流標的分子や下流経路の同定を進

める。

また、結節性硬化症は、てんかんや自閉症関連障害を伴い、病理学的には皮質や上衣下の結節が認められ、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ない。モデル動物の Eker (*Tsc2* 変異) ラットでは、異型ニューロンや巨細胞が頻発し、まれに皮質結節も生じる。我々は、Eker ラットから ES 細胞を樹立し、神経分化誘導実験等を行い、Tsc2 の脳内病変発生に関わるメカニズムを、細胞レベルで調べられる実験系の開発を目的とする。

B. 研究方法と研究成果

Tsc1 による細胞頂端側アクチン繊維形成と制御機構：これまで *Tsc1* 欠損腎腫瘍細胞株に Tsc1 を発現させることにより、細胞の頂端側にアクチン繊維が形成され、基底側のアクチン繊維（ストレスファイバー）の形成は抑制されることを見出していた。この頂端側アクチン繊維は、 β カテニンや ZO1 などとの共染色により、タイトジャンクション、またはそれに近い位置を起点としていることがわかった。Tsc1 非発現コントロール細胞に対するラパマイシン処理（24 時間）ではこの頂端側アクチン繊維

は認められないことから、少なくとも mTORC1 の抑制だけではその形成に十分ではないことが示唆された。一方、Rock キナーゼ阻害剤である Y27632 処理で Tsc1 発現株の頂端側アクチン繊維は消失することから、少なくともその形成機構の一部には Rho-Rock キナーゼの経路が関与することがわかった。

Tsc2 欠損によって生ずる Rac1 陽性細胞内顆粒の分析：これまで Tsc2 欠損細胞株において Tsc2 を発現させることにより、Rac1 の活性が亢進し、Tsc2 欠損細胞株の細胞質に見出される Rac1 陽性の顆粒が消失することを見出していた。Tsc2 非発現コントロール株に対してラパマイシン処理あるいは raptor (mTORC1 特異的サブユニット) ノックダウンを行うことにより、Rac1 陽性顆粒は消失した。従って Tsc2 による顆粒形成抑制は、Rac1 活性制御と同様に mTORC1 を介していることがわかった。この顆粒はユビキチン陽性であり、またユビキチン化タンパクの分解に関わる p62 も陽性となることがわかった。一方、オートファゴソームのマーカーである LC3 では染色されなかった。ごく最近 Rac1 がユビキチン化による分解の制御を受けていることが報告された。我々が観察している Rac1 の活性制御と顆粒形成は密接に関連している可能性がある。また、種々のストレスに応答して変動するオートファジーは mTORC1 の活性亢進によって抑制されることが知られており、それとの関連が示唆される。

Tsc1 と Tsc2 によって発現が制御される遺伝子の同定：Tsc1 発現株と非発現株、Tsc2 発現株と非発現株の間で発現に差のある遺伝子、さらに各非発現株 (mTORC1 亢進) に対するラパマイシン処理と非処理の条件下で発現に差のある遺伝子を網羅的に分析した。その結果、Tsc1/Tsc2-mTORC1 の経路によって制御されている遺伝子の候補として Ppbb などと同定することができた。一方、mTORC1 非依存性に Tsc1/Tsc2 の下流で制御されている遺伝子の候補も同定されている。今後これらの mTORC1 依存性、非依存性の遺伝子発現変化の意義を、ストレス応答との関連、上記の細胞骨格や Rac1・RhoA 制御との関連を含めて分析し、病態発生機構の解明を進める。

Buehr ら (Cell, 2008) に準じて Eker ラットより ES 細胞を樹立し、ALP 染色や、RT-PCR による多能性マーカーの確認、および、胚様体形成から ES 細胞を分化させ、三胚葉分化マーカーの確認を行った。野生型、Tsc2 ヘテロ欠損型および Tsc2 ホモ欠

損型の各 ES 細胞株を樹立し、野生型 ES 細胞からはキメララットも作出することができた。また、各 ES 細胞株をヌードマウスに移植したところ、全ての株で、外胚葉、内胚葉、中胚葉の各組織型を示す奇形腫を形成した。Tsc2 ホモ欠損型細胞からの奇形腫では、Eker ラットの腎腫瘍組織像を彷彿とさせる上皮様の構造異常が散見され、Tsc2 欠損による異常発生の組織特異性を反映しているものと推察している。

C. 考察

これまでの我々のデータにより、Tsc1 発現により Rac1 の活性抑制が生じる一方で、細胞内の RhoA 活性には大きな変化が生じないこともわかっている。近年、上皮細胞の管腔形成には、頂端側の Rac1 の抑制に伴うアクチン繊維の形成が必須であるとの報告がなされている。今回の我々の分析結果は、Rac1 の抑制と共に RhoA の活性が頂端側では亢進し、基底側では低下するという、極性を持った制御がなされていることを反映している可能性がある。腎尿細管では、浸透圧変化や pH 変化などの細胞環境によって惹起されるストレス応答が生じ、細胞骨格のリモデリングが生ずることが知られており、今後その制御との関連が重要な課題の一つであると言える。

現在、ES 細胞から神経分化誘導実験を行っており、早期神経外胚葉系のマーカーである Sox1 や、神経マーカーの Tuj1 の発現、神経ロゼット様構造の出現などを認めており、野生型とホモ欠損型 ES 細胞における分化表現型の違いを解析している。また、遺伝子発現の網羅的解析では、野生型 ES 細胞とヘテロ欠損型は類似し、ホモ欠損型はそれらと異なる発現パターンを示しており、現在詳細を分析中である。

D. 結語

TSC に見出される脳内結節などの発生には、神経細胞の移動の異常が関与することが推察されている。今回見出した mTORC1 非依存性のアクチン骨格制御はその病態発生の理解に新たな視点を与えるものである。

さらに、今後、樹立 ES 細胞株を利用し、Tsc2 欠損に伴う変化を調べ、分化や病態発生に関わる未知のメカニズムを解明したい。

E. 健康危機情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

論文発表

- 1) 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*, 40: 789-797, 2012.
- 2) Goncharova E.A., Goncharov D.A., Fehrenbach M., Khavin I., Ducka B., Hino O., Colby T.V., Merriam M.J., Haczku A., Albelada S.M. and Krymskaya V.: Preventing of alveolar destruction and airspace enlargement in a mouse Model of pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *Science Translational Medicine*. 4: 1-10, 2012
- 3) Saeki H., Hashizume A., Izumi H., Suzuki F., Ishi K., NOjima M., Maeda M. and Hino O.: The utility of serum N-ERC/mesothelin as biomarker of ovarian carcinoma. *Oncology Letters*,4: 637-641, 2012.
- 4) Akatsuka S., Yamashita Y., Ohara H., Liu Y-T., Izumiya M., Abe K., Ochiai M., Jiang L., Nagai H., Okazaki Y., Murakami H., Sekido Y., Arai E., Kanai Y., Hino O., Takahashi T., Nakagama H. and Toyokuni S.: Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PloSONE*, in press
- 5) Obulhasim G., Yase M., Kajino K., Mogushi K., Tanaka S., Mizushima H., Tanaka H., Arii S. and Hino O.: Up-regulation of dbpA mRNA in hepatocellular carcinoma associated with metabolic syndrome. *Hepatol. Int*, in press
- 6) Hirano S., Kakinuma S., Amasaki Y., Nishimura M., Imaoka T., Fujimono S., Hino O. and Shimada Y.: Ikaros is a critical target during simultaneous exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in mouse T-cell lymphomagenesis. *International J. Cancer* in press.
- 7) Mori T., Tajima K., Hiramata M., Sato T., Kido K., Iwakami S., Sasaki S., Iwase A., Shiomi K., Maeda M., Hino O. and Takahashi K.: N-ERC index is a novel monitoring and prognostic marker in advanced malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*, in press
- 8) Ito M., Kajino K., Abe M., Fujimura T., Mineki R., Ikegami T., Ishikawa T. and Hino O.: NP-1250, an ABCG2 inhibitor, induces apoptotic cell death in breast carcinoma MCF7/mitoxantrone-resistant cells via a caspase-independent pathway. *Int. J. Oncology*, in press.
- 9) Sato A., Kasai S., Kobayashi T., Takamatsu Y., Hino O., Ikeda K. and Mizuguchi M.: Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature Communications* in press.
- 10) Osawa M., Kobayashi T., Okura H., Igarashi T., Mizuguchi M. and Hino O.: TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity. *Plos One*, in press.

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に対して有効な薬物療法を開発する目的で、TSC モデル動物を使った治療の研究を行った。 $Tsc2^{+/-}$ マウスの脳における mTOR 系の諸因子の遺伝子発現、タンパク発現・リン酸化を、mTOR 阻害薬ラパマイシンの投与前と投与後で検討した。その結果、ラパマイシン投与前には遺伝子発現やタンパク質リン酸化に複数の異常が認められ、ラパマイシン投与後にそれらのほとんどが正常化することが判明した。この結果は、自閉症様行動異常と mTOR 系の異常活性化が直接連動していることを証明するとともに、ヒト TSC 患者の自閉症治療に mTOR 阻害薬を応用可能であることを強く示唆した。

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
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

成 22 年度には $Tsc1^{+/-}$ マウスおよび $Tsc2^{+/-}$ マウスが社会性相互交流の障害に相当する行動異常を有すること、平成 23 年度にはこの行動異常が mTOR 阻害薬ラパマイシン投与により改善することを報告した。本年度はラパマイシン投与による自閉症様症状の改善の分子メカニズムを解明するため、モデルマウスの脳内で mTOR 信号伝達系の遺伝子（mRNA）発現および蛋白質の発現・リン酸化にどのような異常があるか、ラパマイシン投与後にそれがどう変動するかを検討した。

A. 研究目的

結節性硬化症（TSC）は自閉症を高率（約半数）に合併し、自閉症の基礎疾患となる遺伝子病の中で最も頻度の高いものである。自閉症に代表される発達障害は、TSC 患者の QOL 低下の最大の要因であり、有効な治療法が待望されてきた。しかし従来、自閉症の中核症状に有効な薬剤はなく、薬物療法は興奮、不安、パニックなどに対する対症療法に限定されていた。

自閉症の三主徴である (1) 社会性相互交流の障害、(2) コミュニケーションの障害、(3) 反復的・常同的な行動をとる発達障害のうち、最も基本的な障害は (1) である。われわれは結節性硬化症モデルマウスを用いて発達障害の治療の研究を進め、平

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、東京都医学総合研究所（都医学研）において承認を受けて行った。

(動物実験)

マウスの繁殖、行動試験、およびラパマイシン投与は平成 23 年度報告書の記載と同様の方法で行った。本年度の研究では生後 90 日齢の $Tsc2^{+/-}$ マウスを用いた。

(全ゲノム発現解析)

全脳から総 RNA を抽出し、増幅、cDNA 合成の後、MouseRef-8 Expression BeadChips（Illumina 社）とハイブリダイズさせ、Illumina iScan reader を用い

て検出した。

(Western ブロットニング)

全脳をホモゲナイズしてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE、転写の後、mTOR 系の各種蛋白質（総蛋白およびリン酸化蛋白）を抗体を用いて検出し、バンド強度の測定により蛋白量を定量した。

C. 研究結果

(遺伝子発現)

Tsc2^{+/-}マウス脳における Tsc2 mRNA の発現は、野生型マウス脳に比して低下しており、ラパマイシン投与後さらに低下した。Tsc1 mRNA の発現は亢進しており、ラパマイシンで低下傾向を示したが統計学的有意差には至らなかった。Tsc1 および Tsc2 の上流の遺伝子の中では、Gsk3b (GSK3 β をコードする遺伝子) と Mapk1 (ERK2 をコードする遺伝子) の mRNA 発現が亢進しており、ラパマイシン投与後に正常化した。mTORC1 下流の遺伝子の中では、Ulk1、Igbp1、Rps6 (S6 をコードする遺伝子)、Eef2k の発現が亢進していた。ラパマイシン投与後、Ulk1 と Eef2k の発現は抑制されたが、Igbp1 はされなかった。mTORC1 と mTORC2 の成分中では Deptor の発現が亢進しており、ラパマイシン投与後正常化した。

(蛋白発現・リン酸化)

Tsc2^{+/-}マウス脳では、従来の研究で知られていたとおり、S6K のリン酸化が亢進していたが、これはラパマイシン投与後に抑制された。総S6K の量には変化がなかった。Tuberin 発現は軽度低下しており、ラパマイシン投与によっても改善しなかった。Hamartin 蛋白量には著変を認めなかった。Akt リン酸化は軽度低下しており、ラパマイシン投与に反応しなかった。総Akt 蛋白量にはラパマイシンの前も後も、変化がなかった。

D. 考察

Tsc2^{+/-}マウスは野生型マウスに比し、新奇マウスに遭遇した際の active interaction（新奇マウスを追い回し、その臭いをかく行動）が減少し、rearing（後肢で立ち上がる行動）が増加する行動異常を示す（平成 22 年度研究成果）。これらの異常行動は、ラパマイシン投与後に正常化する（平成 23 年度研究成果）。Active interaction の減少は、ヒト自閉症の基本症状である社会的相互交流の障害に対応する所見であり、今後、TSC 患者の多くが有する自閉症症状への臨床応用に大きな期待を抱かせるものであ

る。しかしヒト患者に応用する前に、ラパマイシンが脳内の遺伝子発現やタンパク発現・リン酸化にどのような影響を及ぼすのか、モデル動物で確認しておく必要がある。今年度の研究では、これらの点が解明された。

本研究における上記の結果から、Tsc2^{+/-}マウスの脳には mTOR 系の諸因子の遺伝子発現やタンパク発現・リン酸化に多くの異常な変動があること、ラパマイシン投与後に行動の改善と対応してそれらの変動の多くが正常化することが判明した。この結果は、TSC における自閉症症状が mTOR 系 (mTORC1) の異常活性化に直接起因すること、本系の活性を正常化することが自閉症症状の改善に直結することの強い証拠を提供する。

従来の研究により、mTOR 系下流の S6K は上流の Akt に negative feedback を及ぼすことが知られている。したがってラパマイシン投与で S6K 活性を落とした際に Akt 活性が亢進して、シグナルのクロストークにより種々の副次的影響を生じる可能性が懸念されていた。しかし今回の研究結果から、ラパマイシン投与が Akt 活性に及ぼす影響は僅少であることが判明し、この点も今後の臨床応用に向けて明るい見通しを与えたといえる。

E. 結論

Tsc2^{+/-}マウス脳では mTOR 系の遺伝子発現と蛋白リン酸化に異常があり、ラパマイシン投与によりその多くが改善する。この分子病態はマウスの自閉症様行動に直結するものと考えられる。ヒト TSC 患者の自閉症に対しても、mTOR 阻害薬の有効性を期待できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M: Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. Nature Communications 3:1292. doi: 10.1038/ncomms2295.

2. 学会発表

- 1) 水口 雅. 小児期での母斑のアプローチ—皮膚科から・小児科から—. 結節性硬化症の神

経症状. 第36回日本小児皮膚科学会学術大会,
前橋, 2012年7月14日

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。本年度は、結節性硬化症における神経分化異常とハマルチン-MAT1 蛋白質相互作用の関連性に培養細胞系を用い解析を行った。TSC1 遺伝子ノックダウンした培養神経芽細胞腫では、レチノイン酸刺激後の神経突起伸張、細胞増殖抑制、細胞周期制御に異常を示した。また、MAT1 のユビキチン化が抑制され、CDK7, Cyclin H および RAR α の発現亢進し、ラパマイシン添加は RAR α の発現に抑制効果を示した。一方、TSC1 遺伝子ノックダウンでは、レチノイン酸刺激後の p75NTR 蛋白質の上昇が見られず、神経栄養因子刺激による NADE を介した細胞死が抑制された。以上の結果から、ハマルチンと MAT1 および NADE の相互作用の欠損により引き起こされるレチノイン酸シグナル異常が、結節性硬化症の神経細胞分化異常と関わっている可能性を示唆した。

A. 研究目的

結節性硬化症原因遺伝子 TSC1, TSC2 の遺伝子産物ハマルチン、ツペリンは細胞内で複合体を形成し、Rheb-mTOR シグナルを抑制する。よって、結節性硬化症細胞において、TSC1 または TSC2 の遺伝的欠損による mTOR シグナルの亢進が分子病態と考えられているが、神経細胞分化異常など関わる詳細な分子機構は不明である。

私たちはこれまで、ハマルチンと相互作用する蛋白質の検索で、NADE と MAT1 という蛋白質を同定した。本年度はレチノイン酸誘導の神経分化細胞を用い、ハマルチンと MAT1 の相互作用と神経分化との機能関連について解析を行った。

B. 研究方法

1) 細胞培養と遺伝子導入

培養ヒト神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH 細胞は 10% 胎児牛血清を含む DMEM 培地で培養し、siRNA または cDNA 発現ベクターの導入は Nucleofector を用いた。神経分化誘導は、培地中にレチノイン酸 (ATRA) を添加することにより行った。

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 Annexin-V 染色により行った。

3) 蛋白質発現解析

蛋白質の発現は、免疫蛍光染色とウェスタンブロット法により行った。また蛋白質の相互作用は免疫沈降法により解析した。蛍光画像は共焦点顕微鏡により画像取得した。

C. 結果

通常培養条件下で SK-N-SH 細胞は ATRA を添加により MAT1 のユビキチン分解を介した CDK7, Cyclin H 複合体である CAK の活性の低下、細胞周期 G1 期の停止、細胞増殖の抑制、および神経突起の伸張が誘導された。一方、siRNA で TSC1 遺伝子をノックダウンした細胞 (TSC1 ノックダウン細胞) では、MAT1 のユビキチン分解が抑制され、CAK の活性化状態が維持され、RAR α 蛋白質の抑制が起こらず、細胞周期停止と神経突起伸張がそれぞれ有意に抑制された。この TSC1 細胞に対し、ラパマイシン添加は RAR α 蛋白質の発現の抑制効果を示した。また、通常培養条件下の SK-N-SH 細胞で

は ATRA 添加後、p75NTR 蛋白質の発現上昇したのに対し、TSC1 ノックダウン細胞では ATRA による p75NTR 蛋白質の発現上昇を示さず、BDNF 添加による NADE を介した細胞死が有意に抑制された。

D. 考察

TSC の脳病変の過誤性の神経細胞増殖はてんかんや自閉症、知能発達不全などの原因と考えられている。TSC 遺伝子欠損マウスホモ個体は胎生致死を示すが、外胚葉の発生異常による神経幹細胞の分節化や遊走に障害があることも示されている。

これまでの培養PC12 細胞を用いた解析では、ハマルチンと NADE の結合が神経細胞死と関連すること、また低分子G 蛋白質Rho と神経突起との関連を示してきた。今回、培養神経芽細胞のレチノイン酸による神経分化誘導系では、ハマルチンが Mat1 のユビキチン分解を制御し、ハマルチンの欠失による Mat1 の分解不全が下流のシグナル異常を介し、神経細胞の細胞周期と神経突起伸張の異常を引き起こしている可能性を示した。また、NADE を介した細胞死の異常もレチノイン酸シグナルの下流で起

こることも分かった。さらにラパマイシンが RAR 蛋白質の分解に促進作用を示し、レチノイン酸シグナル異常に効果を示す可能性を示唆した。今後はハマルチンの Mat1 蛋白質分解系に関わるか詳細な分子機構を解析することで、レチノイン酸シグナルを標的とした TSC の新たな治療法の可能性について検討を行いたいと思う。

E. 結論

ハマルチンと MAT1 の相互作用の欠損は培養神経細胞系でレチノイン酸シグナル異常を引き起こし、結節性硬化症の神経分化異常との関連性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

結節性硬化症の血管線維腫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（TSC）の腫瘍病変に対し、ラパマイシン等の mTOR 阻害剤の有効性は知られており、顔面血管線維腫に対するラパマイシン外用療法の有効性についても近年いくつかの報告がなされている。我々も TSC の顔面血管線維腫に対するラパマイシン・タクロリムス混合外用療法の有効性を左右比較試験で示した。しかし、これまでの報告の殆どは症例報告で、経皮吸収は確認されておらず、ラパマイシンと基剤とを比較した試験もない。我々は基剤の異なる 2 種の外用剤：0.2%ラパマイシン軟膏・0.2%ラパマイシingleルを作製し、11 名の TSC 患者を対象に血管線維腫に対する左右比較試験を施行した。またヒト三次元皮膚モデルを用い *in vitro* での経皮吸収を測定した。結果、*in vitro* 経皮吸収試験では、0.2%ラパマイシingleルは、ラパマイシン軟やラパマイシン・タクロリムス混合軟膏に比べ有意に吸収が高かった。左右比較臨床試験では軟膏群 4 名、ゲル群 7 名ともに、ラパマイシン外用側では基剤側に比べ有意に高い改善度であった。10 才以下の小児では特に高い有効性が認められた。副作用としては、接触皮膚炎や検査値の大きな異常は認められず、血中ラパマイシンも検出されなかった。TSC の血管線維腫に対し、副作用が少なく有効な治療法であるラパマイシン外用療法を皮疹出現早期から行うことは、有用であると考え。今後さらに臨床応用を進めていきたい。

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、ラパマイシン等の mTOR 阻害剤の内服が TSC の腎、肺、脳の腫瘍病変に有効であることが知られている。TSC の腎血管筋脂肪腫及び上衣下巨細胞性星細胞腫に対し、同じく mTOR 阻害剤であるエベロリムスの効能追加も先日承認された。

顔面血管線維腫は生命予後には殆ど関与しない

が、90%以上の患者に生じ、比較的早期から出現し、また顔面という部位の特殊性から、整容面・社会生活面で大きな問題となる。顔面血管線維腫に対するラパマイシン外用の有効性についても 2009 年よりいくつかの報告があり、我々も 0.03%タクロリムス軟膏を基剤とした 0.2%ラパマイシン軟膏外用の左右比較試験を報告した。

しかしながら、これまでの報告の殆どは症例報告で、ラパマイシン外用剤と基剤を比較した試験はなく、また経皮吸収を確認したのも殆どない。

その後、我々は、タクロリムスを含まないラパマイシン外用剤を作製し、血管線維腫に対するラパマイシン外用療法の有効性について左右比較試験を施行した。*In vitro* での経皮吸収試験の結果と合わせ、若干の考察を加えて報告する。

B. 研究方法

Rapamune®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2種類を調製した。

(1) *In vitro* 経皮吸収試験

In vitro 経皮吸収試験には、ヒト3次元皮膚モデル (TEST SKIN™, TOYOBO) を用い、今回調製した0.2%ラパマイシン軟膏、0.2%ラパマイシングルと以前の臨床試験で用いた0.2%ラパマイシン含有0.03%タクロリムス軟膏の3種類について測定した。

3次元皮膚モデルの表面 (角質側) に外用剤40mgを塗布し、37°C 24時間インキュベート後、表面の外用剤を除去し、表皮層を剥離して得られた真皮層のラパマイシン濃度をLC-ESI/MS法で測定した。

(2) 血管線維腫に対するラパマイシン外用剤の左右比較臨床試験

結節性硬化症患者11名 (男7名、女4名) (2~36歳) を対象に、顔面の左右同等の血管線維腫に、一方に0.2%ラパマイシン外用剤、他方にコントロールとして基剤のみを、1日2回12週間塗布した。軟膏群ではテープstrippingの上塗布とした。

評価項目は紅色調・丘疹の縮小・平坦化の3項目とした。評価方法は、医師2名が別々に、治療前と比べた改善度を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名の合計点数を各項目の評価とした。また3項目の評価点の平均をその患者の改善度の総合評価とした。

副作用については、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)

結節性硬化症の顔面血管線維腫に対するラパマイシン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

In vitro 経皮吸収試験の結果を図1に示す。0.2%ラパマイシングルは、0.2%ラパマイシン軟膏及び0.2%ラパマイシン含有0.03%タクロリムス軟膏に比べて、有意に経皮吸収が高かった。

血管線維腫に対する左右比較試験は、軟膏群が男性2名、女性2名 (平均15.5歳)、ゲル群が男性5

名、女性2名 (平均18.9歳) であった。軟膏群、ゲル群全患者の、12週終了時ラパマイシン側と基剤側の総合評価を図2に示す。すべての患者において、ラパマイシン側は改善度が高く、軟膏群・ゲル群ともに基剤に比べて有意に改善度が高い結果であった。

軟膏・ゲルともにラパマイシン側は、評価3項目すべてで、12週終了時有意に高い改善を示した。また、全患者を年齢別3群に分けて比較したところ、10才以下の患者では、11~19歳の患者群に比べて有意に改善が高い結果であった (図3)。

軟膏群の1名で一過性に紅斑が出現したが、臨床試験外用部 (ラパマイシン軟膏及び基剤) のみならず、試験とは無関係な頸部下肢の部位にも同時に生じていたこと、また軽快後外用再開でも紅斑を認めなかったことから、本外用剤によるものではないと

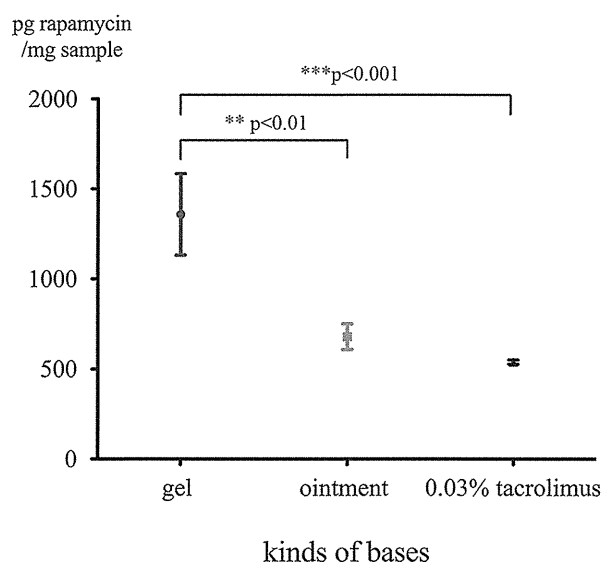


図1 0.2%ラパマイシン外用剤の *in vitro* 経皮吸収試験

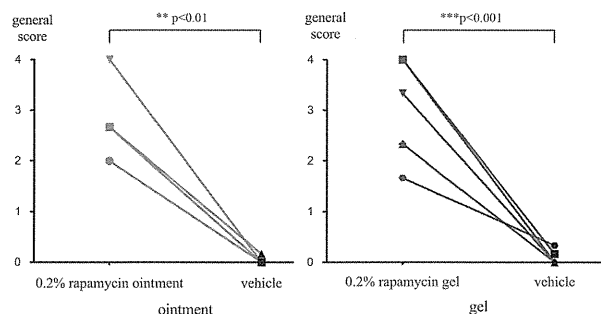


図2 12週終了時の、全患者のラパマイシン外用側と基剤側の改善度総合評価
左：ラパマイシン軟膏群、右：ラパマイシングル群
改善度評価は最高4点~最低-2点