

## HOXA9/PBX 結合阻害ペプチドによる髄膜腫の成長抑制効果

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）では 50～60%で多発性髄膜腫を合併し、治療に難渋することが多い。我々はこれまでに髄膜腫の DNA メチル化解析から、メチル化レベルの高い遺伝子のメチル化レベルをスコア化することで WHO grade には依存せずに再発や悪性転化が予測可能であることを報告した。今回は、メチル化標的遺伝子の一つである HOXA9 について検討した。HOXA9 は悪性髄膜腫細胞株や髄膜腫臨床検体では高率に発現していた。HOXA9 は pre-B cell leukemia transcription factor（PBX）と結合して機能するが、HOXA9 と PBX との結合阻害には新規ペプチド HXR9 を用いた。in vitro で悪性髄膜腫細胞株に HXR9 を投与したところ、cell growth は著明に阻害された。また、HXR9 は HOXA9 が PBX と結合して核内に移動するのを阻害した。さらに、悪性髄膜腫細胞株を xenograft したマウスモデルに HXR9 を定期的に静注したところ、腫瘍増大速度は著明に減少していた。これらの結果は、HOXA9/PBX 結合阻害により悪性髄膜腫においても腫瘍成長が制御できることを示している。HOXA9/PBX 結合阻害ペプチド HXR9 により NF2 合併髄膜腫、特に悪性髄膜腫が制御できる可能性が示唆された。

安藤 等 福島県立医科大学脳神経外科  
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  
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  
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

### A. 研究目的

神経線維腫症 2 型（NF2）では 50～60%で多発性髄膜腫を合併し、治療に難渋することが多い。我々はこれまでに髄膜腫の DNA メチル化解析から、一部遺伝子にメチル化が高集積した腫瘍群では再発が多いこと、メチル化レベルの高い遺伝子のメチル化レベルをスコア化することで WHO grade には依存せずに再発や悪性転化が予測可能であることを報告した。またメチル化標的遺伝子である hypoxia inducible factor（HIF）の機能解析結果も報告した。今回は、メチル化標的遺伝子の一つである HOXA9

について検討したので報告する。

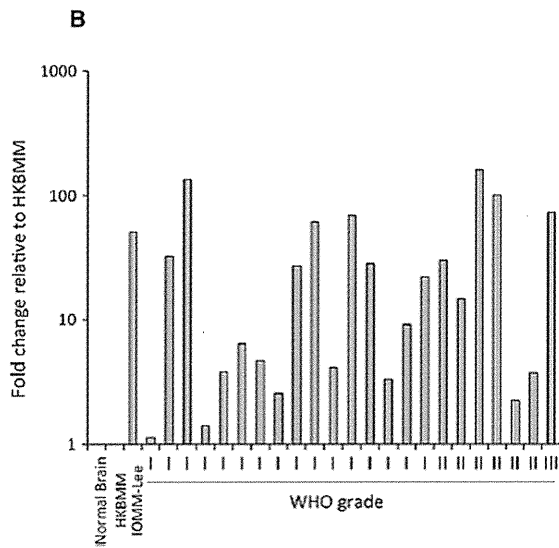
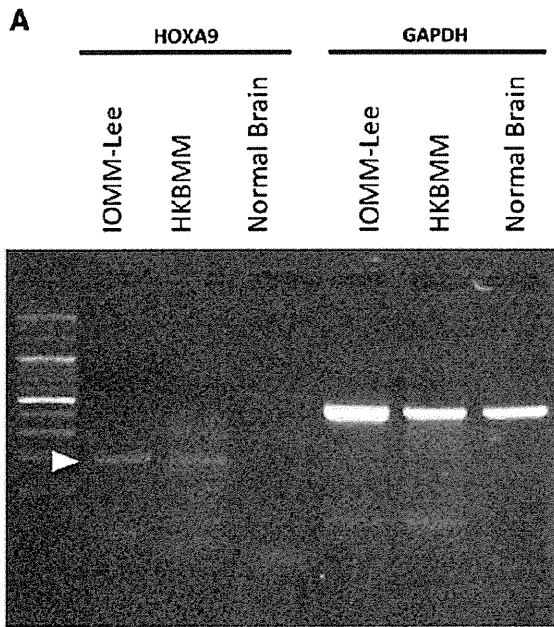
### B. 研究方法

ヒト悪性髄膜腫細胞株である IOMM-Lee と HKBMM を使用した。また手術で摘出した 24 髄膜腫検体を解析した。

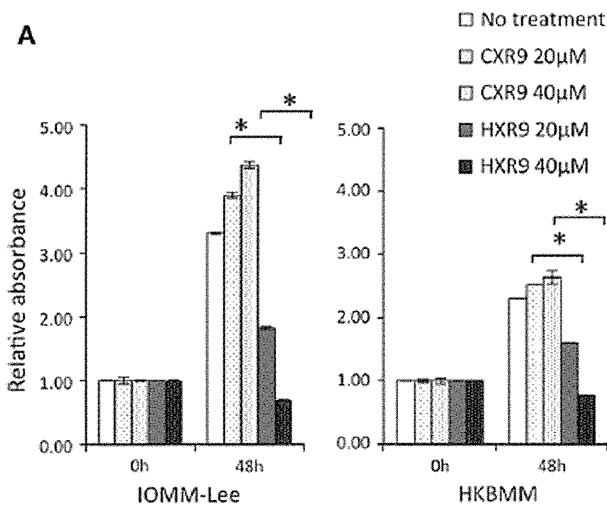
HOXA9 は pre-B cell leukemia transcription factor（PBX）と結合し、核内に移動して転写因子として機能する。HOXA9 と PBX との結合阻害には新規ペプチド HXR9 を用いた。HXR9 は、HOXA9 が PBX と結合するための“YPWM”モチーフをもっており、PBX と HOXA9 との結合を阻害する。コントロールとして“YPWM”モチーフをもたない CXR9 ペプチドを使用した。

### C. 研究結果

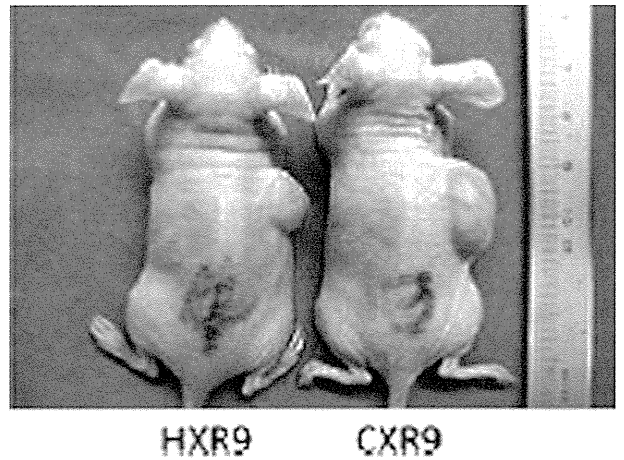
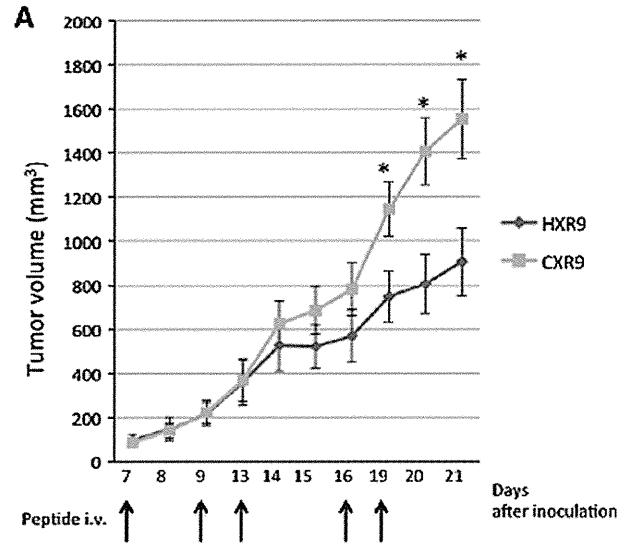
HOXA9 は転写レベルで正常脳では検知できなかったものの、悪性髄膜腫細胞株や髄膜腫臨床検体では高率に発現していた。



次に *in vitro* で悪性髄膜腫細胞株に HXR9 を投与したところ、cell growth は著明に阻害された。



また、HXR9 は HOXA9 が PBX と結合して核内に移動するのを阻害した。さらに、悪性髄膜腫細胞株を xenograft したマウスモデルに HXR9 を定期的に静注して腫瘍増大速度を計測したところ、腫瘍増大速度は著明に減少していた。



#### D. 考察

HOX 遺伝子は動物の胚発生初期において、組織の前後軸および体節に関する構造の適切な数量と配置など体節制を決定する遺伝子である。ほ乳類には 39 の HOX 遺伝子があり A ~ D の 4 群に分類され、HOXA 群は染色体の 7p15.3 に局在している。

HOX 遺伝子群の発現は、成人では低いレベルに抑制されているが、種々の癌では抑制が外れている。HOXA9 タンパクは PBX と結合して標的遺伝子の発現を調節しているが、この結合を阻害すると悪性黒色腫や腎癌・卵巣癌など多くの癌腫において進行遅延・縮小効果が認められることが報告されている。

我々の結果は、HOXA9/PBX 結合阻害により悪性

髄膜腫においても腫瘍成長が制御できることを示している。NF2に伴う髄膜腫は多発するために摘出術や放射線治療のみでは制御できず、新しい治療法が求められている。HOXA9/PBX 結合阻害ペプチド HXR9 により NF2 合併髄膜腫、特に悪性髄膜腫が制御できる可能性が示唆された。

## E. 結論

悪性髄膜腫細胞株および髄膜腫検体において、HOXA9 は過剰に発現していた。新規ペプチド HXR9 は HOXA9/PBX の結合を阻害し、悪性髄膜腫細胞株の増殖を抑制した。また悪性髄膜腫細胞株を xenograft したマウスモデルにおいて、腫瘍の成長速度を遅らせる効果が確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ando H, Natsume A, Senga T, Watanabe R, Ito I, Ohno M, Iwami K, Ohka F, Motomura K, Saito K, Morgan R, Wakabayashi T: Peptide-based inhibition of the HOXA9/PBX interaction retards the growth

of human meningioma. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* (in press)

Ando H, Natsume A, Iwami K, Ohka F, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Ito K, Saito K, Sugita S, Hoshino T, Wakabayashi T: A hypoxia-inducible factor (HIF)-3a splicing variant, HIF-3a4 impairs angiogenesis in hypervascular malignant meningiomas with epigenetically silenced HIF-3a4. *Biochem Biophys Res Com* 433:139-144, 2013

### 2. 学会発表

Ando H, Senga T, Saito K, Wakabayashi T, Natsume A: Functional analysis of HIF in malignant meningiomas. Joint Neurosurgical Convention, The 6<sup>th</sup> International Mt. BANDAI Symposium for Neuroscience, The 7<sup>th</sup> Pan-Pacific Neurosurgery Congress, 2013/1/29-2/3, Waikoloa, Hawaii

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 神経線維腫症 2 型に伴う聴神経鞘腫に対する bevacizumab の腫瘍縮小効果

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）には神経鞘腫や髄膜腫が多発するが、両側聴神経鞘腫による聴力消失、失調、脳幹障害が予後に最も影響している。これまで手術または定位放射線治療しか治療方法はなかったが、2009 年に bevacizumab の効果が報告され、これまでに 50～60% の腫瘍縮小効果と有効聴力の改善効果が確認されている。NF2 には保険外適応のために普及していないが、我々は先進医療申請の前段階として、倫理委員会承認のもと自由診療として 5 例の NF2 患者（28～45 歳女性）に bevacizumab 5mg/kg を 2 週間間隔で 4 回点滴投与し、投与開始から 3 ヶ月および 6 ヶ月後に MRI で聴神経鞘腫の腫瘍体積を評価した。その結果、5 例中 2 例で腫瘍体積として 20% 以上の縮小が治療開始 3 ヶ月時点で得られ、6 ヶ月時点でも効果は継続していた。最大効果として腫瘍体積は 56%、61% まで縮小した。今回の 5 例では、小さくて未治療の腫瘍に有効という結果であった。治療の中止を要する様な重大な合併症はみられなかった。術前有効聴力が残っていた 1 例では聴力の変化はみられなかった。本研究結果をもとに先進医療申請を行い、有効性を確認して公知申請による薬事承認に繋げたい。また、有効性の予測と効果持続期間の確認ができれば、NF2 に対する新たな治療指針が策定できると考えている。

市川優寛 福島県立医科大学脳神経外科  
講師  
佐藤 拓 福島県立医科大学脳神経外科  
講師  
岸田悠吾 福島県立医科大学脳神経外科  
講師  
佐久間潤 福島県立医科大学脳神経外科  
准教授

Med に発表して以来、あたらしい治療法として注目されている。bevacizumab は抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体であり、本邦では治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌、扁平上皮癌を除く切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌、手術不能または再発乳癌、悪性神経膠腫に保険適応がある。NF2 には保険外適応のために普及していないが、患者団体からの要望は強い。我々は先進医療申請の前段階として、倫理委員会承認のもと、本大学附属病院にて自由診療として当該治療を行ったので効果を報告する。

### A. 研究目的

神経線維腫症 2 型（NF2）には神経鞘腫や髄膜腫が多発するために治療は容易でない。なかでも両側の聴神経鞘腫による聴力消失、失調、脳幹障害が患者の予後に最も影響している。これまで手術または定位放射線治療しか治療方法はなかったが、2009 年に Plotkin らが bevacizumab の効果を New Engl J

### B. 研究方法

対象は 5 名（28～45 歳女性）で、bevacizumab 5mg/kg を 2 週間間隔で 4 回点滴投与し、投与開始から 3 ヶ月および 6 ヶ月後に MRI でターゲットとした聴神経鞘腫の腫瘍体積を評価した。また、神経症

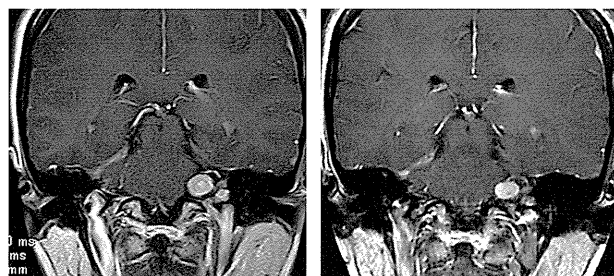
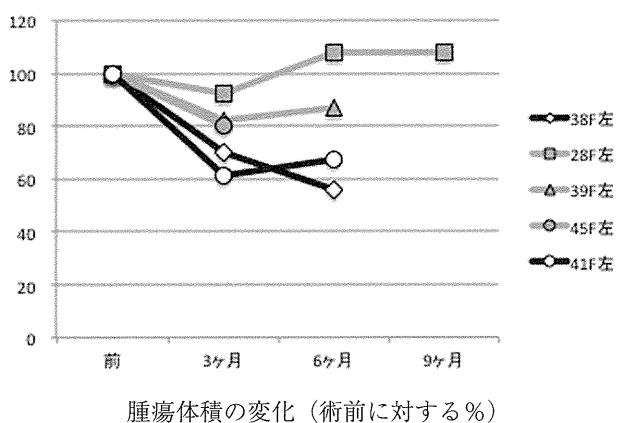
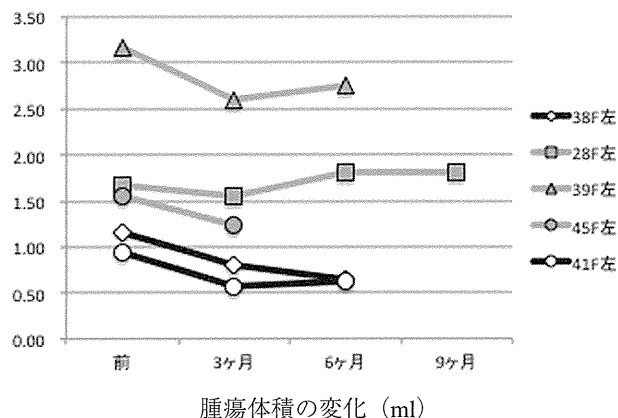
状の変化、副作用の有無についても確認した。

### C. 研究結果

腫瘍は4名で縮小傾向が見られ、効果は治療開始から3ヶ月で確認された。20%以上の縮小を有意と考えると、5例中2例で腫瘍の縮小が得られ（図に黒実線で示した2例）、最大効果として腫瘍体積は56%、61%まで縮小した。この2例のターゲット腫瘍は未治療であり、効果が確認できなかった3例の腫瘍は部分摘出後が2例とガンマナイフ治療後が1例であった。今回の検討では小さくて未治療の腫瘍に有効という結果であった。

合併症として、生理の遅れが4例に、鼻出血が3例に、傷の止血遅延、目の充血、吐気、頭痛、下痢が1名にみられた。治療の中止を要する様な重大な合併症はみられなかった。

なお、併発している皮下腫瘍の縮小を2例で自覚したが、頭蓋内髄膜腫には変化はみられなかった。術前有効聴力が残っていたのは1例のみで、この例では聴力の変化はみられなかった。



代表例：38歳女性  
術前（左）、6ヶ月後（右）冠状断造影MRI

### D. 考察

2012年までに、NF2に対する bevacizumab 治療は19例の文献報告がある。これらの報告をまとめると、腫瘍縮小率は63%、有効聴力が残っている場合の聴力改善率は50%と、これまで得られることのなかった初めての薬剤有効性を示している。また Plotkin らによる31例の経過報告では、腫瘍縮小率は53%、聴力改善率は57%であり、25例で中央値14ヶ月の治療継続が可能であった。経過中12例17回の治療中断があり、中断中に腫瘍の再増大もみられた。

今回の bevacizumab 投与量は Plotkin らと同様であるが、癌に対する投与量よりも少ない。継続期間は4回としたが、これは3ヶ月で効果が確認できるという過去の文献結果から、最小投与回数として決定した。その結果、やはり3ヶ月で効果がみられ、少なくとも6ヶ月の時点では効果は継続していた。今回は聴力を消失している方が多かったために聴力回復効果は不明である。

問題点として、有効例の予測が困難であること、治療効果の持続期間が不明であることがあげられる。今回は未治療の小さな腫瘍に有効であったが、文献ではMRIのADC値が有効性と関係しているとの報告もある。今後症例数を増やし、VEGFの値など、有効性を予測できる方法の確立が求められる。

治療効果の持続期間について、過去の文献からも明らかにはなっていない。Plotkin らは31例中25例で長期間の継続が可能であり、うち6名で腫瘍が増大したとしている。しかし、高額な薬剤を漫然と長期間投与続けることは望ましくない。4回の投与で効果が得られることは判明したので、今後効果の持続期間を確認し、腫瘍の再増大がみられるときに再度 bevacizumab 投与を行うことが合理的と考える。

希少疾患NF2は治療困難であり、新規治療法開発の必要性は非常に高い。腫瘍縮小および聴力改善は、これまで得ることのできなかった画期的効果で

あり、手術や定位放射線治療に比較して患者および家族の負担も著減する。本研究結果をもとに先進医療申請を行い、有効性を確認して公知申請による薬事承認に繋げるように計画している。また、bevacizumab 治療の有効性が証明されれば、NF2 に対する治療指針も新たに策定する必要があると考えている。

#### **E. 結論**

NF2 の 5 例に bevacizumab 5mg/kg を 2 週間間隔で 4 回点滴投与したところ、2 例で 20%以上の腫瘍縮小が治療開始 3ヶ月時点で確認され、6ヶ月の時

点でも効果は継続していた。

#### **F. 研究発表**

1. 論文発表  
該当なし

2. 学会発表  
該当なし

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

## 神経線維腫症Ⅱ型症例における放射線治療成績に関する研究

研究分担者 原 晃 筑波大学医学医療系耳鼻咽喉科教授

### 研究要旨

NF2 症例の放射線治療成績を検討した。放射線治療 9 耳中 7 耳は制御され 2 耳は増大。有効聴力残存時に治療した 4 耳中 2 耳は聴力変化なく、2 耳は悪化。悪性化症例はなく、これら治療成績を踏まえて治療方針を決定することが重要と考えられた。

### A. 研究目的

聴神経腫瘍の治療方針には、①wait and scan、②摘出術、③放射線治療の 3 者がある。神経線維腫症Ⅱ型（NF2）においても同様であるが、いずれの方針でも一側性の症例に比べて NF2 では経過が不良であるとされてきた。特に放射線治療については、同じように治療しても一側性聴神経腫瘍より反応性が不良であるとする報告が主流であった。しかし、近年、NF2 関連頭蓋内腫瘍の放射線治療効果を検討した報告で必ずしも経過は悪くないと述べられた。評価が未だ定まっていない放射線治療の効果が、当施設の NF2 症例においてはどうかを検討し、NF2 症例への治療方針決定の一助とする。

### B. 研究方法

1988 年 4 月～2013 年 3 月に当院を受診した NF2 症例 11 例 21 耳のうち、放射線治療施行した症例の経過を検討した。

（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

放射線治療が行われたのは 6 例 9 耳で 5 例 8 耳は  $\gamma$  ナイフ、1 例 1 耳は分割照射が行われていた。4 耳は有効聴力残存時に治療を施行した。2 耳で治療後にあきらかな増大を認め、有効聴力残存 4 耳中、

2 耳に聴力悪化がみられた。悪性化は認めなかった。

### D. 考察

一側性聴神経腫瘍に比べれば、やはり放射線治療に反応不良であった。しかし、悪性化は認められず、治療成績を踏まえたインフォームド Consent の上、治療方針を決定することが重要と考えられた。

### E. 結論

現時点の放射線治療成績を踏まえて、治療方針を決定していく。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

和田哲郎、他：聴神経腫瘍ならびに神経線維腫症Ⅱ型の臨床統計. 耳鼻咽喉科展望 56 補 1：43-48, 2013

#### 2. 学会発表

和田哲郎、他：神経線維腫症Ⅱ型の聴神経腫瘍に長期間 wait and scan を行った 3 症例の経過. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
特になし。

## 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 檜垣克美 鳥取大学生命機能研究支援センター

### 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。一方で、臨床症状、特に神経症状に関し、TSC1 患者と TSC2 患者に違いがあることが知られている。私たちは、これまで TSC1 遺伝子変異の神経細胞機能異常に関わる分子機構を解明する目的で、ハマルチンと相互作用する分子 Mat1 に着目して細胞機能解析を行ってきた。本年度は、TSC1 shRNA で恒常的に TSC1 をノックダウンした培養神経細胞をモデル細胞として、解析を行った。shTSC1 細胞において、レチノイン酸刺激による神経突起伸長の低下、細胞周期亢進と Mat1 蛋白質の発現量の上昇が見られた。一方、Mat1 蛋白質分解は、ライソゾームプロテアーゼ阻害剤により抑制された。また、蛋白質ネグレイション阻害剤は Mat1 蛋白質レベルを低下し、shTSC1 細胞の神経突起と細胞周期異常に対し抑制効果を示した。以上の結果は、TSC1 欠損神経細胞の神経異常には Mat1 蛋白質の発現亢進が関わる可能性を示唆した。

大野耕策

山陰労災病院

### 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 シグナルを抑制する。よって TSC1/TSC2 の欠損による 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。一方で、TSC1 と TSC2 欠損の臨床症状が異なることも示されている。私たちは、TSC1 遺伝子変異と神経細胞機能障害の分子解析を行う目的で、ハマルチンと相互作用を示す分子として同定した Mat1 蛋白質に着目して培養細胞実験系を用い、解析を進めてきた。本年度は、shRNA ベクターを用い、恒常的に TSC1 発現が低下した培養神経細胞株をモデル細胞系として解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞培養と遺伝子導入

培養神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH への cDNA 発現ベクターと siRNA、shRNA 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。shTSC1 細胞は shRNA 導入後、ネオマイシン耐性細胞中から、ハマルチン発現が低下している細胞株をウエスタンブロット法と免疫染色法により選別した。

#### 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、アポトーシス解析は Annexin-V 染色により解析を行った。

### C. 結果

TSC1 shRNA により恒常的にハマルチン発現が抑制された細胞株 2 株を樹立した。この細胞では、コントロール細胞に比べ Mat1 蛋白質発現が亢進し、BrdU 取り込みの亢進、およびレチノイン酸刺激による神経突起の伸長が抑制された。また、これらの機能異常は、Mat1 siRNA による Mat1 発現抑制により解消された。一方で、培養 SK-N-SH 細胞にライソゾーム機能阻害剤クロロキンまたはロイペプチンを作用させると、Mat1 蛋白質発現が上昇したが、



プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤では効果は認めなかった。さらに、細胞内蛋白質ネディレーション阻害剤は shTSC1 細胞の Mat1 発現を低下し、神経突起と細胞周期の異常に対し抑制効果を示した。

#### D. 考察

Mat1 は CDK7、Cyclin H とともに基本転写因子 TFIIF の構成因子として転写調節と細胞周期調節に関わる。私たちは、ハマルチンと相互作用をする候補分子として Mat1 を酵母ツーハイブリット法により同定し、GST 融合蛋白質と免疫沈降法により相互作用を確認してきた。一方で、免疫沈降法では、この複合体にはツペリンは検出できず、ハマルチン単独の機能の可能性を示唆している。

昨年までの siRNA を用いた一過性のハマルチンノックダウン細胞に比べ、shRNA により恒常的に TSC1 発現低下した神経細胞モデルにより、安定した詳細な機能解析が可能となった。得られた 2 細胞株は、siTSC1 細胞と同様の細胞機能異常を認めた。一方で、酵母の解析で Mat1 の酵母相同蛋白質 Tfb3 と蛋白質ネディレーションの関与の報告 (Rabut et al, 2011) に注目した。蛋白質ネディレーションの強力な阻害剤の効果を調べた結果、shTSC1 の機能異

常を相補することが分かった。蛋白質ネディレーション阻害剤は細胞内蛋白質分解系の一つで、種々の癌との関連性が示され、治療薬として開発が進行中である。今回の結果は、ネディレーション阻害剤の TSC に対するより詳細な効果検討の必要性を示唆した。

#### E. 結論

TSC1 欠損モデル神経細胞系における細胞機能の異常は、Mat1 蛋白質分解異常による Mat1 蛋白質の機能亢進が原因である可能性を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

##### 3. その他

大野耕策 結節性硬化症のひろば 専門医からのメッセージ. 2013

<http://www.tsc-info.jp/message/index.html>

## 結節性硬化症遺伝子機能解明と新規治療法の開発

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

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（Tsc2変異）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。EkerラットのES細胞をヌードマウスの腎皮膜下に注入し、4週間後、奇形腫が形成された後に摘出した。ホモ変異体（-/-）由来のES細胞においても、3胚葉全てへの分化が確認された。大変興味深い事に、Ekerラットの腎がんに組織学的に部分的に良く似た異常な腺管構造が、ホモ変異体ES細胞由来の奇形腫内に散見された。mTOR阻害剤であるラパマイシン投与下では、異常腺管構造の発生は著明に抑制された。

### A. 研究目的

Tsc1やTsc2が制御するmTORC1以外の標的の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、 $\beta$  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た。

**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、mTOR 阻害剤であるラパマイシン投与下では、異常腺管構造の発生は著明に抑制された。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考えられる。

## 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。腎尿管管では、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反応が生じ、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の解明に資する。

## 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) Obulhasim G., Yasen 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 metabolic syndrome. *Hepatology*. 7:215-225, 2013 (DOI 10.1007/s12072-012-9357-4)
- 2) 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. *Oncology Reports*, 29: 1492-1500, 2013
- 3) 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*, 8: e54503, 2013.
- 4) Obulhasim G., Yasen 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. *Hepatology*. 7: 215-225, 2013
- 5) Nomura R., Fujii H., Abe M., Sugo H., Ishizaki Y., Kawasaki S. and Hino O.: Mesothelin Expression is a prognostic factor in cholangiocellular carcinoma. *Int. Surgery*, 98: 164-169, 2013.
- 6) Okura H., Kobayashi T., Koike M., Ohsawa M., Zhang D., Arai H., Uchiyama Y. and Hino O.: Tuberin activates and controls the distribution of Rac1 via association with p62 and ubiquitin through the mTORC1 signaling pathway. *Int. J. Oncology*, 43: 447-456, 2013.
- 7) Mori T., Tajima K., Hirama M., Sato T., Kido K., Iwakami S., Sasaki S., Iwase A., Shiomi K., Maeda M., Hino O. and Takahashi K.: The N-ERC index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *Journal of thoracic disease*. Apr;5(2):145-8. 2013. (doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.03.03.)
- 8) Kawamata F., Homma S., Kamachi H., Einama T., Kato Y., Tsuda M., Tanaka S., Maeda M., Kajino K., Hino O., Takahashi N., Kamiyama T., Nishihara H., Taketomi A. and Todo S.: C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. *J. Gastroenterology*. *J. Gastroenterology*.2013. (DOI 10.1007/s00535-013-0773-6)
- 9) Hirohashi, T., Igarashi K., Abe M., Maeda M., and Hino, O.: Retrospective analysis of large-scale research screening to the construction workers for an early diagnosis of mesothelioma. *Molecular and Clinical Oncology*, 2013. (DOI: 10.3892/mo.2013.197)
- 10) Ito T., Kajino K., Abe M., Sato K., Maekawa H., Sakurada M., Orita H., Wada R., Kajiyama Y. and Hino O.: ERC/mesothelin is expressed in human gastric cancer tissues and cells lines. *Oncology Reports*, 31:27-33,2013 (DOI: 10.3892/or.2013.2803)
- 11) 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*15: 259-168, 2013 (DOI: 10.1002/ijc.27668).
- 12) Abe H., Mochizuki S., Ohara K., Ueno M., Ohiai H., Kitagawa Y., Hino O., Sato H. and Okada Y.: Src plays a key role in ADAM28 expression in v-src-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. *The American Journal of Pathology*, 183: 1667-1678, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpatho.2013.07.011>)
- 13) Sugiura H., Yasuda S., Katsurabayashi S., Oguri K., Tanaka H., Takasaki K., Iwasaki K., Kobayashi T., Hino O. and Yamagata K.: Rheb-syntenin interaction regulates dendritic spine formation in

rodent models of tuberous sclerosis. PNAS, in press

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

**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

## 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。*Tsc1*<sup>+/-</sup>マウスと *Tsc2*<sup>+/-</sup>マウスは、以前に報告した他にも様々な自閉症様の行動異常を示し、*Tsc2*<sup>+/-</sup>マウスでより重度となる異常もあったが、いずれもラパマイシンの投与によって正常化した。この結果は、TSC1 変異例と TSC2 変異例における自閉症様の行動異常の差が mTOR 系の異常活性化によること、より重症であっても病態に即した治療が有効であることを強く示唆している。

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 東京都精神医学総合研究所依  
存性薬物プロジェクト 研究  
員  
池田和隆 同 参事研究員  
樋野興夫 順天堂大学医学部病理・腫瘍  
学教授  
小林敏之 同 准教授

シン投与により改善すること、平成 24 年度には、モデルマウスの脳内でおこる mTOR 信号伝達系の遺伝子（mRNA）発現および蛋白質の発現・リン酸化の異常について報告した。

TSC と自閉症の関連について、ヒトでは TSC2 変異例が TSC1 変異例より自閉症を合併しやすく、より重症であることが知られている。この点を動物レベルで検討した先行研究はなく、ラパマイシンによる自閉症の治療効果が、両者で同等に期待できるかも明らかではない。本年度は、*Tsc2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて *Tsc1*<sup>+/-</sup>マウスより重症となる自閉症様の行動異常を見だし、mTOR 阻害薬の効果が同様に得られるか検討を試みた。

### 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。

自閉症は大きく (A) 社会性相互交流の障害、(B) 反復的・常同的行動からなる発達障害であり、より社会生活に支障をきたす障害は (A) である。われわれは結節性硬化症モデルマウスを用いて自閉症治療の研究を進め、平成 22、23 年度には *Tsc1*<sup>+/-</sup>マウスおよび *Tsc2*<sup>+/-</sup>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し、mTOR 阻害薬ラパマイ

### 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において承認を受けて行った。

(動物実験)

マウスの繁殖：東京都医学総合研究所にて繁殖している *Tsc1*<sup>+/-</sup>マウスと *Tsc2*<sup>+/-</sup>マウスを交配し、遺伝学的背景が共通する野生型マウス、*Tsc1*<sup>+/-</sup>マウス、*Tsc2*<sup>+/-</sup>マウスおよび *Tsc1*<sup>+/-</sup>; *Tsc2*<sup>+/-</sup>マウス (*TscD* マウス)を得た。

行動試験：これらのマウスを用いて、生後 90 日齢

以降に以下の行動試験を行った。

- ・ Social interaction test (SIT)：平成 23 年度報告書の記載と同様の方法で行った。
- ・ 3-Chamber social approach task (3CST)：1 辺 50cm の正方形のオープンフィールドを 3 等分した装置内で行った。はじめに左右に空のカゴを置き、マウスを装置に入れて 10 分間慣らした。この操作につづいて、以下の計測を行った。
- ・ 3-chamber social approach task (3CST)：1 辺 50cm の正方形のオープンフィールドを 3 等分した装置内で行った。はじめに左右に空のカゴを置き、マウスを装置に入れて 10 分間慣らした。この操作につづいて、以下の計測を行った。preference for social novelty：左右の一方に新奇マウス (S1)、他方にケージメイト (C：同じ母マウスから生まれ、離乳後も同じケージで飼育されている同性のマウス) を入れ、マウスに 10 分間提示した。各対象に対するマウスの探索行動は、ビデオトラッキング装置を用いて自動判定した。
- ・ Social approach：左右の一方に新奇マウス (S1)、他方に新奇物体 (O) を入れ、マウスに 10 分間提示した。
- ・ Social preference: social approach または preference for social novelty (後述) の測定に続き、O および C を新奇マウス (S2) に替え、マウスに 10 分間提示した。
- ・ Self-grooming test (SGT)：床敷を除いたケージにマウスを入れ、10 分間慣らしたのち、マウスの行動を 10 分間ビデオ撮影した。毛づくろいなどマウスが自分の体を刺激する行動を行った時間を、目視によって測定した。

ラパマイシン投与：ラパマイシンは、平成 23 年度報告書の記載と同様の方法で投与した。投与後に SIT および 3CST を行った。3CST ははじめに preference for social novelty、続いて social preference を測定した。

### C. 研究結果

$Tsc1^{+/-}$ マウス、 $Tsc2^{+/-}$ マウスおよび  $TscD$  マウスはいずれも、SIT において新奇マウスへの探索時間が減少し、SGT において自己刺激行動が亢進していた。3CST では、social approach では野生型も変異マウスも S1 をより探索し、social preference ではどの変異マウスも S1 と S2 を区別できなかった。

Preference for social novelty において、野生型および  $Tsc1^{+/-}$ マウスは S1 をより探索したが、 $Tsc2^{+/-}$

および  $TscD$  マウスは S1 と C を区別できなかった。S1 の探索時間から C の探索時間を減じた値で表された approach avoidance score は、野生型と比べて  $Tsc1^{+/-}$ マウスでも有意に低下しており、 $Tsc2^{+/-}$  および  $TscD$  マウスではさらに低下していた。

ラパマイシンの投与後、SIT における変異マウスの探索行動は、野生型と同程度まで回復した。3CST では、 $Tsc2^{+/-}$  および  $TscD$  マウスにおける preference for social novelty の異常、および変異マウスにおける social preference の異常は、いずれもラパマイシン投与後に正常に戻った。

### D. 考察

$Tsc1^{+/-}$  および  $Tsc2^{+/-}$  マウスは社会的相互交流の障害にあたる行動異常として、新奇マウスに対する探索行動の減少を示す (平成 22 年度研究成果)。この行動異常はラパマイシン投与後に正常化し (平成 23 年度研究成果)、それに伴って mTOR 系の異常活性化が正常に戻る (平成 24 年度研究成果)。しかし、ヘテロ欠失マウスが他の自閉症症状を示したとの報告は乏しい。TSC2 変異例が自閉症を合併しやすく重症であるという、よく知られた TSC の臨床的特徴に関する研究もほとんどない。

本年度の研究では、 $Tsc1^{+/-}$  および  $Tsc2^{+/-}$  マウスが異なる実験系において社会的相互交流の障害にあたる行動異常を示すこと、反復的常同的行動のひとつとして自己刺激行動が亢進していることが明らかとなった。更に、きょうだいであるケージメイトと比較して新奇マウスへの探索行動が減少するという行動異常 (preference for social novelty の異常) が、 $Tsc1^{+/-}$  マウスより  $Tsc2^{+/-}$  マウスで顕著であり、この異常も従来のラパマイシン投与によって正常化することが示された。TSC2 変異が重症の表現型をもたらすことは、ヘテロ欠失マウスにおける腎腫瘍の発生時期、アストロサイト特異的ノックアウトマウスにおけるけいれん、脳腫大などが知られていた。今回の研究成果は、TSC1 変異例と TSC2 変異例における自閉症様行動の差が、欠失した遺伝子の違いによって生じることを示すとともに、その差も mTOR 系の異常活性化に起因していることを強く示唆している。自閉症を含め、TSC2 変異に由来するより重症の症状には mTOR 阻害剤が十分に作用しない懸念もあったが、この結果によってその懸念を払拭されるだろう。

## E. 結論

*Tsc1*<sup>+/-</sup> および *Tsc2*<sup>+/-</sup> マウスが多様な自閉症様の行動異常を示し、一部は *Tsc2*<sup>+/-</sup> マウスにおいてより重症であるが、これらの行動異常はラパマイシン投与で正常化する。TSCに関連する自閉症に対しては、重症であっても mTOR 阻害剤の有効性が期待できる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sato A, Mizuguchi M, Ikeda K. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. Protocol Exchange. doi:10.1038/protex.2013.046.
- 2) Ohsawa M, Kobayashi T, Okura H, Igarashi T, Mizuguchi M, 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 2013; 8(1): e54503.
- 3) 水口 雅. 結節性硬化症. 小児科臨床 2013 ; 66 (Suppl) : 1347-1355.
- 4) 水口 雅. 結節性硬化症にともなう自閉症の薬物治療. 日本小児科学会雑誌 2013; 117(11): 1686-1693.

### 2. 学会発表

- 1) Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Causal role of unregulated mTOR signaling in autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Beijing, 11-14 Sept. 2013
- 2) 佐藤敦志、高松幸雄、笠井慎也、田中美歩、小林敏之、樋野興夫、池田和隆、水口 雅：結節性硬化症モデルマウス *Tsc1*、*Tsc2* ヘテロ欠失マウスおよび *Tsc1-Tsc2* ダブルヘテロ欠失マウスの自閉症様行動. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会、沖縄、2013 年 10 月 24-26 日.
- 3) 佐藤敦志：mTOR 阻害薬による ASD 治療の可能性. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会、沖縄、2013 年 10 月 24-26 日.
- 4) 佐藤敦志、笠井慎也、高松幸雄、小林敏之、樋野興夫、池田和隆、水口 雅：結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動に対するラパマイシンの治療効果. 第 1 回日本結節性硬化症学会学術総会、東京、2013 年 11 月 1 日

## H. 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



## 結節性硬化症の白斑に対するラパマイシンゲル外用臨床試験

研究分担者 片山一郎 大阪大学大学院医学研究科皮膚科教授

### 研究要旨

結節性硬化症（TSC）は mTOR の活性化の結果、全身に過誤腫を生じる遺伝性疾患で、白斑以外に、精神発達遅滞、てんかん、自閉症などの神経症状と全身の腫瘍を特徴とする。TSC の腫瘍性病変の病態に関しては、最近よく解析が進んできているが、TSC の白斑は、遺伝性の白斑の中では最も多いといわれているにもかかわらず、その病態に関しては、いまだに不明である。我々はすでに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顔面の血管線維腫に対する臨床試験を試み良好な結果を得た。さらに結節性硬化症の白斑に対しても本外用薬が有効である事を示した。今回我々は結節性硬化症の白斑に対するパマイシン外用薬の有効性、安全結節を確認するために3歳から33歳の結節性硬化症患者6名、（男性4名女性2名）に対し、顔面露光部の白斑と非露光部の白斑に対して、0.2%ラパマイシンゲルを1日2回12週間外用を行いその効果を調べた。効果は12週間の外用終了時より、終了後4週目で最も高い改善が認められ、外用終了後12週間後においても効果の持続が認められた。さらに、露光部と非露光部の比較により、紫外線が結節性硬化症の白斑におけるラパマイシンの白斑改善効果と相乗的に働く可能性も示唆された。ラパマイシン外用薬は、TSCの白斑に対しても安全で有効である事が確認できた。

金田眞理 大阪大学大学院医学研究科皮膚科 講師

田中まり 大阪大学大学院医学研究科皮膚科 大学院生

性硬化症の白斑に対しても本外用薬が有効である事を症例報告した<sup>3)</sup>。今回は結節性硬化症の白斑に対するパマイシン外用薬の有効性と安全結節の確認を目的としている。

### A. 研究目的

結節性硬化症（TSC）は原因蛋白ハマルチン、チューベリンの異常の結果、その下流の mTOR の活性化がおこり、全身に過誤腫を生じる遺伝性疾患で、全身の腫瘍以外に、精神発達遅滞、てんかん、自閉症などの神経症状や白斑を特徴とする。TSC の白斑は遺伝性の白斑の中では最も多いといわれているが、本症における白斑の病態に関しては、不明である。我々はすでに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顔面の血管線維腫に対する臨床試験を試み良好な結果を得た<sup>1,2)</sup>。さらに結節

### B. 研究方法

日本皮膚科学会の TSC の診断基準で TSC と確定診断できた種々の臨床症状の、3歳から33歳の結節性硬化症患者6名、（男性4名、女性2名）に対し、顔面露光部の白斑と非露光部の白斑に、0.2%ラパマイシンゲルを1日2回12週間外用を行い、その効果を調べた。以前の試験で、ラパマイシン外用薬の投与では、白斑の完治が認められ、基剤のみの外用では白斑の軽快が認められないことが確認できていたので、今回は、プラセボはおかずに、実薬による投与前後の効果の判定を目的に検討をおこなった。判定方法は、報告済みの判定と同様の方法

に、3名の皮膚科医師による白斑部の改善度スコアで判定した。改善度スコアは、白斑部と周囲の正常皮膚色部との色調の差の改善をもって行い、悪化、不変、軽度改善、改善、著明改善の5段階に分け、それぞれの点数を-1,0,0.5,1,2とし、3人の判定者の平均値を後に改善度スコアとした。測定は開始前から外用終了12週まで4週ごとに行い、さらに外用終了後4週12週後と24週目まで施行した。同時に、判定の客観性を確認するために、分光測色計を用いて白斑部と周囲の正常部との色調を測定し、それぞれの色調の差 $\Delta L$  (L-L')値を用いて改善値とした。それぞれの色調は3回ずつ測定し、3回の $\Delta L$ 値の平均を用いて改善値とした。

(倫理面への配慮)

本臨床試験は大阪大学医学部の倫理委員会の承認を得て、UMINに登録をした上で行った。試験への参加は、患者の自由意志で、研究の目的と意義、利益と不利益、個人情報の保護、研究に同意しない場合でも被験者が治療上の不利益を被らないこと、医療者側の守秘義務、同意が得られた後でもいつでも撤回が可能であること等を含む項目について、あらかじめ十分に説明し、原則的に直接本人から(未成年者など動意能力のないものについては代理人から)同意書による承諾を得た上で行った。

### C. 研究結果

#### 1) TSC患者白斑に対するラパマイシン外用薬の効果

①3名の皮膚科医師による白斑部の改善度スコアによる判定結果。

露光部では、患者によるばらつきが認められたが、12週終了時、終了後4週間、終了後12週いずれにおいても開始前と比較して平均の改善度スコアは1.3から1.4と改善以上を示し、 $p<0.05$ と有意差を認めた。これに対し、非露光部では、開始前と比較して、12週終了時、終了後4週間で有意差( $p<0.05$ )を認めましたが、平均の改善度スコアはそれぞれ0.36、0.42とやや改善以下にとどまり、視診上は露光部ほどの改善は認められなかった(図1)。

②分光測色計を用いた白斑の改善効果の結果

露光部では全例に於いて、 $\Delta L$ は著明に改善し、外用後4週、8週、12週及び外用終了後4週、12週後の $\Delta L$ 値の平均はそれぞれ、3.05、2.73、2.09、1.86、1.37、1.20で、外用終了時には有意差は認められなかったが、 $\Delta L$ は外用終了後も改善傾向を示し続け、終了後12週目で、 $p=0.0297$ で有意差が認め

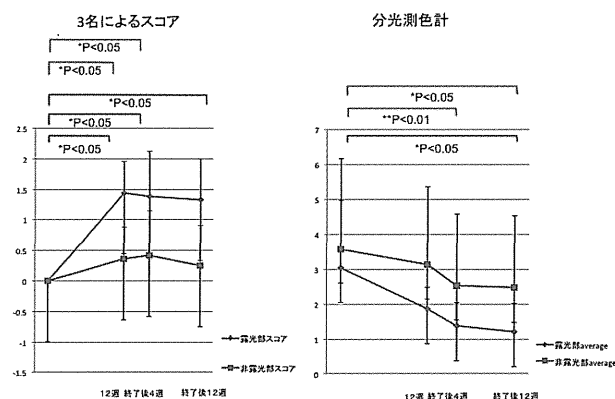


図1 ラパマイシン外用薬の結節性硬化症の白斑に対する結果

られた。これに対し、非露光部では、外用後4週、8週、12週及び外用終了後4週、12週後の $\Delta L$ 値の平均はそれぞれ、3.59、3.14、2.54、2.47と露光部より緩やかな改善を認めた。非露光部においても露光部と同様、外用12週終了時には有意差が認められなかったが、終了後4週、終了後12週目で有意に $\Delta L$ の低下を認めた。特に外用終了4週目では $p<0.01$ と明らかな有意差を認めた(図1)。

#### 2) TSC患者白斑に対するラパマイシン外用薬の安全性

本臨床試験では、外用開始から観察期間終了まで、全症例に於いて、局所の異常は認められなかった。又全例に於いて、外用終了時に血中でのラパマイシンは検出できなかった、さらに、全例に於いて血液検査、生化学検査でも異常は認められなかった。

### D. 結論

以上の結果より、ラパマイシン外用薬は、TSCの白斑に対しても安全で有効である事が確認できた。効果は12週間の外用終了時より、終了後4週目で最も高い改善が認められ、外用終了後12週間後においても効果の持続が認められた。結節性硬化症の白斑部では、メラノサイトは存在するが、メラニン産生の異常が認められることが報告されている<sup>4)</sup>。ラパマイシンはこのメラニン産生機構を復活させる作用を有していると考えられ、4週間という改善の時間のずれは、ラパマイシンにより、開始されたメラニン産生機構の継続の時間かもしれない。さらに露光部と非露光部の比較により、紫外線が結節性硬化症の白斑におけるラパマイシンの白斑改善効果と相乗的に働く可能性も示唆された。

## 参考文献

- 1) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I: First left-right comparative study of topical rapamycin versus vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol* Aug 5. doi: 10.1111/bjd.12567, 2013
- 2) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I: A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex: A pilot study of 9 Japanese TSC patients with different disease severity. *Br J Dermatol*, 2011; 165(4): 912-6
- 3) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, et al: A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. *Arch Dermatol*. vol 148(1):138-9 (2012)
- 4) Jimbow K, Fitzpatrick TB, Szabo G et al.: Congenital circumscribed hypomelanosis: a characterization based on electron microscopic study of tuberous sclerosis, nevus depigmentosus, and piebaldism. *J Invest Dermatol* 1975; 64: 50-62.
- 5) Arase N, Wataya-Kaneda M, Oiso N, Arase H, Katayama I: CD1a-positive familial cutaneous mastocytosis without germ-line or somatic mutations in c-kit. *Br J Dermatol* 2013 Jul; 169(1):201-4. doi: 10.1111/bjd.12265.
- 6) Murakami Y, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Katayama I: A case of tuberous sclerosis complex complicated by segmental neurofibromatosis type 1. *Journal of Dermatology* 2013; 413-414
- 7) Murota H, Itoi S, Terao M, Matsui S, Kawai H, Satou Y, Suda K, Katayama I: Topical cholesterol treatment ameliorates hapten-evoked cutaneous hypersensitivity by sustaining expression of 11 $\beta$ -HSD1 in epidermis. *Exp Dermatol*. 2013 Nov 13. doi:10.1111/exd.12284
- 8) Takahashi A, Murota H, Matsui S, Kijima A, Kitaba S, Lee JB, Katayama I: Decreased Sudomotor Function is Involved in the Formation of Atopic Eczema in the Cubital Fossa. *Allergol Int*. 2013 Sep 25.
- 9) Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I: 11 $\beta$ Hydroxysteroid dehydrogenase contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 18; 440(2):265-70.

## E. 研究発表 (平成 24 年度)

### 論文発表

- 1) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Hamasaki T, Katayama I: Trends in the Prevalence of Tuberous Sclerosis Complex Manifestations: An Epidemiological Study of 166 Japanese Patients. *PLOS ONE* Vol.8 issue5 e63910, 2013
- 2) Oiso N, Suzuki T, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tanio M, Katayama I: Guidelines for the diagnosis and treatment of vitiligo in Japan. *Journal of Dermatology*; 40: 344-35 2013
- 3) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I: First left-right comparative study of topical rapamycin versus vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol* Aug 5. doi: 10.1111/bjd.12567, 2013
- 4) Itoi S, Tanemura A, Kotobuki Y, Wataya-Kaneda M, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I: Coexistence of Langerhans cells activation and immune cells infiltration in progressive nonsegmental vitiligo. *Journal of Dermatological Science* 2013 Sep 13. doi:pii: S0923-1811(13)00311-3. 10.1016/j.jdermsci.2013.09.004
- 5) Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I: Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. *Acta Derm Venereol*. 2013 Aug 8. doi:10.2340/00015555-1678.
- 6) Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang L, Lee JB, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I: Dynamic Analysis of Histamine-Mediated Attenuation of Acetylcholine-Induced Sweating via GSK 3 $\beta$  Activation. *J Invest Dermatol*. 2013 Jul 30. doi:10.1038/jid.2013.323.
- 7) Murota H, El-Latif MA, Tamura T, Katayama I: Olopatadine Hydrochloride Decreases Tissue Interleukin-31 Levels in an Atopic Dermatitis Mouse Model. *Acta Derm Venereol* 2013 Jul 1. doi:10.2340/00015555-1648.

- 13) Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S: Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol.* 2013 Nov;133(11):2555-65.
- 14) Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I: Increased Frequency Of skin-infiltrating FoxP3+regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):507-12.
- 15) Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I: Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-in human epidermal tumors and its role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol.* 2013 Feb;22(2):98-101. doi:10.1111/exd.
- 16) Murota H, Katayama I: Reply: To PMID 22770266. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Mar;131(3):928-9.
- Mechanism of Hypopigmented Macules in Tuberous Sclerosis Complex. 日本色素細胞学会学術大会 国際シンポジウム. 大阪 2013.11.16-17
- 2) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I: Topical rapamycin therapy is effective against hypomelanotic macules arising in tuberous sclerosis complex A prospective, self-controlled study. *International Pigmented Cell Development Workshop Edinbergh 2013.5*
- 3) Kotobuki Y, Yang L, Wataya-Kaneda M, Turuta D, Atanemur, Tanaka M, Murota H, Ishii M, Katayama I: Hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex is linked to Th17 cell infiltration with possible impairment of cytoplasmic autophagy via mTOR pathway *International Pigmented Cell Development Workshop Edinbergh 2013.5*
- 17) Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Tang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I: Reduction of Autophagy: A potential

#### 学会発表

- 1) Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Tang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I: Reduction of Autophagy: A potential

#### F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願中：皮膚疾患を処置するための外用薬およびその製造方法  
国際出願番号：PCT/JP2012/052047
2. 実用新案登録  
なし