

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591219

研究課題名（和文）mTOR の新規調節因子による神経皮膚症候群の神経と腫瘍病変の共通制御機構の解明

研究課題名（英文）A novel factor associated with TSC I/II may modulate neuronal symptoms in TSC patients.

研究代表者

金田 眞理 (KANEDA MARI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70397644

研究成果の概要（和文）：最近、Mammalian target of Rapamycin (mTOR)の神経病変および腫瘍形成における役割が注目を集めてきている。一方、mTOR系の異常の結果、中枢神経障害と全身の腫瘍発生を引き起こす一連の疾患群（神経皮膚症候群）がある。申請者はこの神経皮膚症候群の一つである結節性硬化症において減少し、てんかんや精神発達遅滞などの神経症状と腫瘍発生に重要な関連のある新規の蛋白質 p40 を見出した。そこで、本応募研究において、この p40 がこれら神経皮膚症候群の神経病変と腫瘍形成の両方における共通のキーファクターであると考え、その機構を解明し、ひいては神経症状と腫瘍発生を同時に抑制できる方法を確立することを目的として、p40 や TSC1, TSC2 のノックダウン細胞を用いて p40 と tuberin, hamartin および PI3k-AKT-mTOR 系に関与する蛋白質との関係を調べた。その結果、p40 は FKBP12, FKBP38 の発現と強い相関関係を呈し、ラパマイシンや、FKBPs, tuberin, hamartin などと同様に mTOR 系の調節に関与する新規の蛋白質であり、hamartin と蛋白レベルで結合し tuberin とは hamartin を介して TH-complex と結合しており、お互いの安定化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Tuberous sclerosis complex (TSC) is an autosomal dominant disease characterized by the hamartomas. Two genes, TSC1 and TSC2, which encode hamartin and tuberin respectively, have been shown to be responsible for TSC. Hamartin and tuberin are associated with each other physically in vivo, and function in the same complex. We had identified that a 40 kD protein, p40, recognized by one monoclonal antibody, was significantly reduced in TSC patient cells. To compare the relation between clinical symptoms and loss of p40, the amount of p40 in the peripheral lymphocytes from TSC patients was related to the clinical symptoms, especially the neural symptoms of TSC such as convulsion and mental retardation. In this report, we showed the interaction of tuberin and/or hamartin and other proteins involved in the mTOR system with p40. To examine the association of p40 and tuberin or hamartin, knocked-down experiments and coprecipitation experiments were conducted. As a result, p40 was positively related to FKBP32 and FKBP12 and was directly associated with hamartin and indirectly with tuberin presumably via hamartin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：mTOR, 結節性硬化症, p40, 神経皮膚症候群, 精神神経疾患, 腫瘍形成, TSC1, TSC2

1. 研究開始当初の背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

Mammalian target of Rapamycin (mTOR)は、マクロライド系抗生物質ラパマイシンの標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼの一種で種々のシグナルのキーポイントである。このうち mTORC1 は転写や翻訳に関与して、細胞の増殖や生存の調節を司り、免疫の調節に関与すると同時に、腫瘍の増殖や炎症反応にも関係する。さらに最近では、アポトーシスや autophagy (J Neurosci 28 6926-37,2008)の抑制を通して、アルツハイマー病(Nat Genet 36 585-95,2004)、ハンチントン病(J Neurochem 93 105-17,2005)、パーキンソン病(J Biol Chem 278 25009-13,2003)、自閉症(Neuron 50 377-388,2006)、ダウン症、認知障害(Ann Neurol 62 641-655,2007)、学習障害(Ann Neurol 63 444-453,2008)、てんかん(Ann Neurol 63 444-453,2008)などの中枢神経病変への関与が注目されている。

応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

ところで、皮膚科領域において、神経皮膚症候群と呼ばれる一連の疾患がある。結節性硬化症(TSC1,TSC2)、レックリングハウゼン病(NFI)、コウデン病、Bannayan-Zonana 症候群、プロテウス症候群 (PTEN)、peutz-jeghers 症候群 (LKB1)などがこれにあたる。これらはいずれも皮膚を初めとする全身の過誤腫と中枢神経系の異常を伴うものであり、その発症メカニズムに mTOR 系が関与している(Proc.Natl.Acad.Sci 102 8573-78,2005)。これら mTOR の作用を制御しているものの一つに tuberin hamartin complex (TH-complex)がある。TH-complex は結節性硬化症の原因蛋白であり、Rheb (Ras homologue enriched in brain)の GTP binding protein として働き mTORC1 を活性化すると同時に、mTORC2 と直接結合し、

Akt に作用して mTOR の系をフィードバック的に抑制する(Mol Cell Biol 28 4104-15,2008)。さらに、TH-complex はER(endoplasmic reticulum) stress を引き起こし、アポトーシスを誘導することも報告されている(Mol Cell 29 541-51,2008)。mTOR の制御に関与している別の蛋白質に、分子シャペロンの immunophilin に属する FKBP38、FKBP12 がある。FKBP38 や FKBP12-ラパマイシンの複合体は、mTORC1 を抑制し細胞増殖を抑制する(Science 318 977-80,2007)と同時に、Bcl-2 抑制を介して ER stress によるアポトーシスや autophagy を引き起こす (Nature Cell Biology 5 1-10,2003. Autophagy 4 841-43,2008)。これらのことから申請者は、mTOR 系に過誤腫と神経症状の両方を引き起こし、神経皮膚症候群と呼ばれる一連の疾患に共通の TH-complex や immunophilin 類似のキー蛋白質が存在すると考えた。

ところで、申請者は以前より結節性硬化症で特異的に減少し、結節性硬化症の患者の神経症状と強い相関を示している (Wataya-Kaneda BBRC 217 599-607,1995, JSID 2006) 40Kda の蛋白(p40)を発見した(Wataya-Kaneda et al. BBRC 217 599-607,1995)。そこでこの p40 が mTOR 系に作用して過誤腫と神経症状の両方を引き起こすキー蛋白質の一つであろうと考えその作用機序の解明を目指し、神経症状の解明、治療に役立てようと考えた

2. 研究の目的

最近、Mammalian target of Rapamycin (mTOR)の神経病変および腫瘍形成における役割が注目を集めてきている。一方、mTOR 系の異常の結果、中枢神経障害と全身の腫瘍発生を引き起こす一連の疾患群 (神経皮膚症候群)がある。申請者らはこれまでの研究で、神経皮膚症候群の 1 種である結節性硬化症 (TSC) で特異的に減少し、神経症状と強い相関を示す蛋白 p40 を見出した。そこでこの

p40 が mTOR 系の調節に関与する新規の蛋白質で、FKBP38,12 や mTORC1,2 と関係して細胞増殖やアポトーシスを引き起こし、結節性硬化症の神経症状と腫瘍形成の両方に深く関わるキー蛋白質であると考えた。そこで、この p40 と tuberin, hamartin, FKBP のなどの mTOR 関連蛋白質との関係を解明し、神経皮膚症候群の神経病変と腫瘍形成の両方における共通のキーファクターとしての p40 の作用機序、本機構の解明、ひいては神経症状と腫瘍発生を同時に抑制できる方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、p40 と mTOR, FKBP あるいは tuberin, hamartin との関係の解明を試みた。

- 1) p40 のノックダウンによる、TSC1, TSC2, FKBP12, FKBP38 の m-RNA 発現レベルの解析
 - ① HeLa 細胞を p40 の SiRNA を用いてノックダウンし Micro Array 検査を行った。
 - ② 又我々はすでにヒト p40 の siRNA については有効な配列を決定しており、遺伝子導入試薬である Optifect® によるノックダウンの条件も確立している。そこで、p40 の siRNA を用いて、HeLa, FS3 細胞をノックダウンし、回収した細胞から Isogen® で集めた RNA より cDNA をつくって、p40, TSC1, TSC2, FKBP12, FKBP38 それぞれのプローブを用いて、real-time PCR を行い、p40 と FKBP12, FKBP38 それぞれの m-RNA レベルの関係を調べた。ネガティブコントロールとしてはコントロールである scramble 配列の siRNA を導入した細胞を用いた。
- 2) p40 ノックダウンによる、tuberin, hamartin, FKBP12, FKBP38 の蛋白質量の解析
 - ① 同様に p40 をノックダウンし、ノックダウンした細胞としていない細胞を回収し、RIPA lysis buffer で処理し cell lysate を得る（この条件下では内在性の p40 のすべてが抽出できることを確認済み）。この lysate を SDS-PAGE で電気泳動を行い、membrane にトランスファー後、抗 p40, 抗 tuberin, 抗 hamartin, 抗 FKBP12, 抗 FKBP38 抗体を用いて Western blot を施行し、p40 と tuberin, hamartin, FKBP12, FKBP38, の蛋白レベルにおける関係を解析した。ネガティブコントロールとしては Scramble siRNA を導入した HeLa や FS3 を用いた。
- 3) p40 と FKBP12, FKBP38, tuberin, hamartin の蛋白間結合の有無についての解析

p40 と tuberin, hamartin, FKBP12, FKBP38 との蛋白間結合を調べるために、HeLa や FS3 細胞を RIPA lysis buffer で処理した cell lysate を anti-p40 抗体と 4℃ で 1 晩反応させ、proteinG-Sepharose 4B で沈降させ、SDS-PAGE で電気泳動を行い、membrane にトランスファーしてから抗 FKBP12, FKBP38, tuberin, hamartin 抗体で Western blotting を施行し、p40 と FKBP12, FKBP38, tuberin, hamartin との蛋白間結合の有無を検討する。逆に FKBP12, FKBP38, tuberin, hamartin に対する抗体で immunoprecipitation を施行後、anti-p40 抗体で Western blotting を施行し、p40 と FKBP12, FKBP38, tuberin, hamartin との共沈の有無を検討した。

- 4) p40 の低下による、アポトーシスのメカニズムについての検討。アポトーシスにはミトコンドリア依存性の経路とミトコンドリア非依存性のデスレセプター経路がある。p40 の低下によるアポトーシスがこの何れによるかを明らかにする為に、

- ① まずは、p40 のノックダウン細胞でのアポトーシスの増加や細胞周期の異常の有無を FACS を用いて解析した。アポトーシスの発現を確認するために caspase 3 の活性化を Western blotting を用いて確認する。
- ② ついでミトコンドリア由来のアポトーシスであることを確認する為に caspase 9 の活性化の有無を Western blotting を用いて検討し、次いで Caspase 8 の活性化を調べ非ミトコンドリア系の関与について検討する
- ③ オートファジーが活性化しているかどうかについて、オートファジーをモニターするための指標である LC3 の抗体を用いた間接蛍光抗体法により、シグナルが増加するかどうか、さらに Western blotting により LC3 の増大の有無について検討した。
- ④ p40 のノックダウン細胞でのアポトーシスの増加や細胞周期の異常の有無を FACS を用いて解析した。
- ⑤ HeLa 細胞を p40 の SiRNA を用いてノックダウンし、細胞の増殖能、同時に細胞の移動能を検討した

4. 研究成果

- 1) Micro Array の結果より、p40 は FKBP12, FKBP38 の発現と強い相関関係を呈することが判明した。
- 2) p40 の mTOR 系における作用機序を調べるために、p40 の siRNA を用いて p40 のノックダウン細胞を作成し、p40 と tuberin, hamartin, immunophilin との関

係を調べた。その結果、P40 をノックダウンした細胞では, tuberin, p-Tuberin (939), p-Tuberin(1462), hamartin, RhoB の mRNA レベルは低下していた。一方、p-tuberin(1254), caspase8 の mRNA レベルの変化は認められなかった。

- 3) p40 の共沈実験より p40 は hamartin と直接結合しており、tuberin とは hamartin を介して TH-complex と結合し、お互いの安定化に関与している可能性が示唆された。
- 4) p40 のノックダウンした細胞では、細胞の増殖能が低下し、同時に細胞の移動能が促進していた。
- 5) さらにP40ノックダウンした細胞では、RhoBのmRNAレベルは低下しており、RhoA, mTORと caspase3 のmRNAレベルは増加していた。
- 6) HamartinをノックダウンしたHeLa cell でもRhoBの発現が増加しており、これらの変化は *TSC1*, *TSC2*ノックダウン細胞と類似の変化と考えられた。

以上より、P40 はラパマイシンや、FKBPs, tuberin, hamartin などと同様にあるいは協同で mTOR 系の調節に関与する新規の蛋白質であり、神経症状と強い相関を示し、結節性硬症の腫瘍と神経症状の共通の病態に深く関わるキー蛋白質であること。p40 は hamartin と直接結合し、tuberin とは hamartin を介して TH-complex と結合することによって、お互いの安定化に関与している可能性が示唆された。さらに、p40 は Rho と関係して接着や細胞移動にも関与することが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- (1) Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Wataya-Kaneda M, (10 名中 5 番目): Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012, 25(2):219-30. (査読あり)
- (2) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Katayama I.: A novel application of topical rapamycin

formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex.

Arch Dermatol. 2012 ;148(1):138-9. (査読あり)

(3) Kawaguchi M, Hayashi M, Murata I, Wataya-Kaneda M, (14 名中 7 番目): Eleven novel mutations of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria.

J Dermatol Sci. 2012; 66(3):244-5. (査読あり)

(4) Tanemura A, Nakano M, Iwasaki T, , Wataya-Kaneda M. (10 名中 6 番目): An extremely rare case of Merkel cell carcinoma metastasized to the duodenum.

Eur J Dermatol. 2012; 22(4):568-70. (査読あり)

(5) 鈴木民雄、金田眞理、種村篤、谷岡美未、et al.: 尋常性白斑診療ガイドライン

日本皮膚科学会雑誌 2012; 122(7) 1725-40,

(6) Arase N, Wataya-Kaneda M, Katayama I (7 名中 2 番目) : Repigmentation of leukoderma in a piebald patient associated with a novel c-KIT gene mutation, G592E, of the tyrosine kinase domain.

J Dermatol Sci. 2011, 64(2):147-9. (査読あり)

(7) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Katayama I. (5 名中 1 番目) : A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br J Dermatol.* 2011,165(4):912-6. (査読あり) (8) Murakami Y, Wataya-Kaneda M, Terao M (7 名中 2 番目) : Peculiar distribution of tumorous xanthomas in an adult case of

erdheim-chester disease complicated by atopic dermatitis. *Case Rep Dermatol.* 2011; 3(2):107-12. (査読あり)

(9) Kono M, Akiyama M, Kondo T, Suzuki T, Suganuma M, Wataya-Kaneda M, Lam J, Shibaki A, Tomita Y: Four novel ADAR1 gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Journal of Dermatology* 2011; 38:1-3

(10) 金田眞理: 「結節性硬化症の診断基準および治療ガイドライン」について

JDA Letter 2011.12

(11) 金田眞理: 結節性硬化症の現状と治療 *日本皮膚科学会雑誌* 2011;121(13) 2765-7

(12) 金田眞理: 結節性硬化症の治療の現状と課題 *皮膚病診療* 2011;183-91

(13) Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, (10名中4番目): Impact of sedative and non-sedative antihistamines on the impaired productivity and quality of life in patients with pruritic skin diseases. *Allergol Int.* 2010;5 9(4):345-54. (査読あり)

(14) Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Wataya-Kaneda M (9名中6番目): Cutaneous symptoms in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2010, 163(4):881-4. (査読あり)

(15) Terao M, Sakai N, Higashiyama S, Wataya-Kaneda M (9名中6番目): Clinical and genetic features of 20 Japanese patients with vascular-type Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Dermatol.* 2010; 163(4):704-10. (査読あり)

(16) Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Effects of

nonsedative antihistamines on productivity of patients with pruritic skin diseases.

Allergy. 2010; 65(7): 929-30

(17) 田中智子、横関博雄、片山一朗、金田眞理、田村直、菅野範英(9名中4番目): 原発性局所多汗症診療ガイドライン *日本皮膚科学会雑誌* 2010;120:1607-25

(18) 山中隆嗣、種村篤、金田眞理、片山一朗、平川聡史、橋本公二: 脳転移を来たした乳房外Paget癌の1例: 剖検結果と進展様式の考察 *皮膚の科学* 2010; 9(3):229-36 (査読あり)

(19) 山中隆嗣、渡辺愛子、庄田裕紀子、田口敬子、種村篤、金田眞理: 重症筋無力症を伴った胸腺腫患者に生じた、タクロリムス(プログラフ)によるStevens-Johnson症候群の1例. *皮膚の科学* 2010; 9(3): 237-43 (査読あり)

(20) 金田眞理: 結節性硬化症の現状とガイドライン *日本皮膚科学会雑誌* 2010;120: 2850-3,

[学会発表] (計2件)

- (1) 金田眞理(招待講演): エベロリムスのTSC治療における位置づけ TSC Medical Advisory Board Meeting in Japan大阪2011.11
- (2) Wataya-Kaneda M(招待講演): Current Status in Japan, and Future Prospects. TSC Medical Advisory Board Meeting in Japan, 2010. 11 東京

[図書] (計2件)

- (1) 金田眞理: ファブリー病診断治療ハンドブック2012 (監修衛藤義勝) p16-17, p39, 2012
- (2) 金田眞理: 遺伝相談看護学テキストNICE 疾病と治療IV松田他編、南江堂東京 p. 72-73, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：皮膚疾患を処置するための外用薬及び
その用途

発明者：金田眞理

権利者：大阪大学

種類：

番号：PCT/JP2012/052047

出願年月日：H24 1.30

国内外の別：PCT

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 眞理 ()

研究者番号：70397644

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：