

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701095

研究課題名（和文）トランスジェニック Eker ラットを用いたアミノ酸置換型 Tsc2 の機能解析

研究課題名（英文）In vivo effects of human disease-associated Tsc2 mutations analyzed by transgenic Eker rat system.

研究代表者

塩野 雅俊 (SHIONO MASATOSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10596266

研究成果の概要（和文）：

1. G1556S 型変異 Tsc2 のトランスジェニック (Tg) ラットは複数個体得られたが、N525S 型変異 Tsc2 では得る事ができず、胎生致死を誘発している可能性が示唆された。
2. N525S 型変異 Tg 導入胚の解析により、この胎仔は胎生 13.5 日前後で急激に減少する事がわかった。これは Eker ラットの変異 TSC2 アリル homozygote 個体の胎生致死の時期とほぼ一致し、N525S 型変異による何らかの優性抑制的な影響を示唆させた。
3. 野生型、G1556S 型、N525S 型それぞれの強制発現細胞において、各種シグナル伝達経路における特徴的な分子のリン酸化状態に関する網羅的解析を行い、幾つかの特徴的な変化を見出した（論文投稿準備中）。

研究成果の概要（英文）：

We have exploited a transgenic Eker (*Tsc2*-mutant) rat system to analyze the effects of various *Tsc2* mutations in pathogenesis *in vivo*. Here we focus on an N525S-type *Tsc2* variant (NSM). Unexpectedly, we were unable to generate viable newborn rats carrying an NSM transgene (Tg) by repeated experiments. Genotype analysis revealed that most embryos carrying Tg died around embryonic day 13.5, consistent with Eker homozygotes' embryonic lethal stage. Thus, the NSM appeared to have a dominant lethal effect in rats. These indicate that the pathway other than the mTOR axis, regulated by tuberlin, is crucial for embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学・1955

キーワード：Tsc2, Tuberlin, Tumor Suppressor gene, Tuberous sclerosis, Eker rat, Transgenic rat

## 1. 研究開始当初の背景

癌の治療や予防の為には、その病態発生に関与する遺伝子異常の解明が重要である。その点において家族性腫瘍と呼ばれるような遺伝性疾患は、家系分析による原因遺伝子の

同定により、腫瘍発生の確固たる要因を明らかにできる利点がある。Eker ラットは 1953 年にノルウェーの Eker 博士により遺伝性腎癌を自然発生するラットとして発見された (Eker R and Mossige J, Nature 189, 858,

1961)。原因遺伝子のヘテロ変異体は約一年齢で例外無く肉眼的な腎癌を発生する。我々グループは家族性腫瘍を発症する疾患として知られる結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis; TS) の原因遺伝子である *Tsc2* のホモログが *Eker* ラットの原因遺伝子である事を明らかにした (Hino O et al, BBRC 203, 1302, 1994/ Kobayashi T et al, Nature Genet 9, 70, 1995)。TS は約 1/6000 人に認められる遺伝病であり、全身性の多発性過誤腫 (脳内結節、腎血管筋脂肪腫、心横紋筋腫、肝血管筋脂肪腫、肺リンパ脈管平滑筋腫、網膜腫瘍)、顔面皮脂腺腫、頭蓋内石灰化を特徴とする疾患である。このような腫瘍性病変を発生する TS の原因遺伝子産物である tuberin(*Tsc2* 産物)は、ラパマイシン感受性 mTOR 経路を抑制する機能を持つ事がショウジョウバエでの研究を端緒として明らかになった (Martin DE et al, Curr Opin Cell Biol 17, 158, 2005)。一方で我々は、野生型 *Tsc2* の cDNA とプロモーターから成る導入遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) *Eker* ラットを作製し、ヘテロ変異体の腎発癌とホモ変異体の胎生致死が抑制される事を証明し (Kobayashi T et al, PNAS 94, 3990, 1997)、*in vivo* の系において *Tsc2* の機能を解析するシステムを開発した。

このような背景を基に我々は次に、これまでに報告されているヒト *TSC2* 変異の中で「mTOR 抑制への影響と症状の重篤性が対応しないアミノ酸置換型変異」に着目した。即ち上記変異体の機能解析が、病態発生に関わる (mTOR 経路とは別の) 新たなシグナル伝達系を解明する為の手がかりとなるのではないかと考え、以下の研究を計画、履行した。

## 2. 研究の目的

国内外の研究により、*Tsc2* 変異による腫瘍発生には mTOR 経路が重要な役割を担っており、その経路の遮断による TS の治療・予防の可能性が考えられるに至った。しかしながら効果・副作用の観点から、異なる分子標的に対する薬剤との併用などが望まれている。近年、TS の家系分析でアミノ酸置換型 *Tsc2* 変異による症状の差異が報告されてき

た。その中で、*Tsc2* 産物(tuberin)の 525 番目のアスパラギンがセリンに変わる変異 (N525S 型変異) は、tuberin の Rheb-GAP 活性による mTOR~S6K1 抑制機能を保持するにも関わらず、重篤な症状に関連している事が報告されている(Nellist M et al, Hum Mol Genet 10, 2889, 2001)。また、1556 番目のグリシンがセリンに変わる変異 (G1556S 型変異) は mTOR 抑制機能を失う変異であるにも関わらず、患者の症状が軽微である事が示唆されている(Mayer K et al, J Med Genet 41, e64, 2004)。我々は、これらの変異と症状の関連が mTOR 経路とは異なる生理反応系と tuberin の接点を反映しているのではないかと想定した。上記の変異による機能変化を調べる事により、新たな分子標的の手がかりを得る事を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

mTOR 抑制能を失うが患者の症状が軽微な G1556S 型変異(GSM)、mTOR 抑制能を保持するが重症例の発病に至る N525S 型変異(NSM)、これらの変異体に関し、まず Site-directed mutagenesis PCR 法により各発現プラスミドを作成した。サンガーシークエンス法によって塩基配列を確認し、各変異が正しく導入されている事を確認した。ついで培養細胞に強制発現させ、ウェスタンブロット法、免疫染色法等により、*in vitro* の系において既存の報告と合致する表現型

(mTOR 抑制能の保持あるいは喪失)を示す事を確認した。ついで各発現プラスミドを用い Microinjection 法によるトランスジェニック (Tg)-*Eker* ラットの作出及び各変異体の *in vivo* での表現型解析を進めた。Tg-*Eker* ラットの作出にあたってはサザンブロット法、ノザンブロット法、ウェスタンブロット法、サンガーシークエンス法等により、各変異体の導入と発現が正しく行なわれている事を確認した。

## 4. 研究成果

1. GSM の Tg ラットは複数個体得ることができたが、NSM は Tg ラットを得ることができず、胎生致死を誘発している事が予 想 さ

れた。

2. NSM-Tg ラットに関しては、Tg 導入胚の解析により、NSM-Tg を保持する胎仔は胎生 13.5 日前後で急激に減少する事がわかった。これは Eker ラットの変異 TSC2 アリル homozygote 個体の胎生致死の時期とほぼ一致し、NSM による何らかの優性抑制的な影響を示唆させた。

3. 野生型-*Tsc2*、GSM-*Tsc2*、NSM-*Tsc2* それぞれの強制発現細胞において、各種シグナル伝達経路における特徴的な分子のリン酸化状態に関する網羅的解析を行い、幾つかの特徴的な変化を見出した(論文投稿準備中、未発表データ)。

これらの結果は、mTOR 抑制能を保ちながらもその変異によって優性抑制的に異常をもたらす機能や、mTOR 抑制能を失いながらも発癌を抑制する事のできる TSC2 の機能の存在を反映し、既に知られている mTOR 経路に加え、TSC2 が関わる未知の重要な活性・経路の存在を示唆するものと考えられた。今後、これら変異体のテトラサイクリン誘導性発現プラスミドや安定発現細胞株(現在作出中)を用いて更なる解析へと発展させ、最終的には tuberin によって制御される mTOR 経路以外の新規経路の特定し、それによる病態発生機構の解明と治療・予防法の改良・開発を目指していく予定である。

#### 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 2 件)

① Yoshida K, Shiono M, Ishioka C: Infusion reaction and anaphylaxis. Gan To Kagaku Ryoho, 38(11): 1753-7, 2011. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083179>

② Shiono M, Shimodaira H, Watanabe M, Takase K, Ito K, Miura K, Takami Y, Akiyama S, Kakudo Y, Takahashi S, Takahashi M, Ishioka C.: Multidisciplinary approach to a case of Lynch syndrome with colorectal,

ovarian, and metastatic liver carcinomas. International Cancer Conference Journal, 1(3): 125-137, 2012. 査読有  
DOI 10.1007/s13691-012-0040-3

[学会発表] (計 6 件)

① 秋山聖子、加藤俊介、木皿重樹、我妻恭行、久道周彦、大桐規子、石澤賢一、井上 彰、大槻健郎、三浦 康、塩野雅俊、下平秀樹、森隆弘、眞野成康、石岡千加史: 多職種チーム研修—レジメン審査に重点を置いて。

第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (横浜・パシフィコ横浜) 2011 年 7 月 23 日

② 塩野雅俊、森隆弘、石岡千加史: がんプロフェッショナル養成プランの紹介 (東北がんプロフェッショナル養成プラン 東北大学、山形大学、福島県立医科大学)。

東日本がんプロフェッショナル養成プラン 10 拠点公開シンポジウム (東京・ホテルグラン ドパレス) 2011 年 7 月 25 日

③ 塩野雅俊、下平秀樹、加藤俊介、角道祐一、高橋信、秋山聖子、吉田こず恵、高見裕子、石岡千加史: 大腸、卵巣の重複癌が疑われ、集学的な検査・治療を要した Lynch 症候群の一例。

第 15 回東北家族性腫瘍研究会 (仙台・仙台国際センター) 2012 年 1 月 28 日

④ 大内康太、高橋信、下平秀樹、角道祐一、秋山聖子、吉田こず恵、塩野雅俊、加藤 俊介、石岡 千加史: 固形がんに合併した播種性血管内凝固症候群 (DIC) に対する組換え型トロンボモデュリンアルファ (rTM) の有効性に関する後方視的解析。

第 109 回日本内科学会 (京都・みやこめっせ) 2012 年 4 月 13 日

⑤ 李仁、高橋昌宏、鈴木貴夫、安田勝洋、井上正広、坂本康寛、塩野雅俊、添田大司、高橋信、角道祐一、秋山聖子、下平秀樹、森隆弘、加藤俊介、石岡千加史: セツキシマブ不応後にパニツムマブを施行した KRAS 野生型進行再発大腸癌の治療成績。

第 50 回日本癌治療学会学術集会（横浜・パシフィコ横浜）2012 年 10 月 26 日

⑥ 下平秀樹、高橋雅信、西條憲、塩野雅俊、添田大司、井上正広、秋山聖子、高橋信、角道祐一、森隆弘、加藤俊介、石岡千加史：進行大腸癌に対する化学療法を行った Lynch 症候群の 4 例

第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会（大阪・堂島ホテル）2012 年 6 月 15 日

〔図書〕（計 1 件）

① 塩野雅俊、石岡千加史

「がん薬物療法専門医による上腕 CV ポート留置術の実際 ～東北大学病院 腫瘍内科 600 症例 / 5 年間の経験を基に～」

株式会社オンブズマン 49 分 51 秒 2012 年 (DVD 教材)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩野 雅俊 (SHIONO MASATOSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10596266

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者