

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791074

研究課題名(和文)mTORとオートファジーを制御することによる新しい結節性硬化症治療の確立

研究課題名(英文)The therapeutic research using Autophagy in Tuberous sclerosis complex

研究代表者

宮原 弘明(MIYAHARA, HIROAKI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：00457615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、結節性硬化症(TSC)におけるmTORシグナル伝達とオートファジーの関連を明らかにし、オートファジーの制御による新しいTSCの根本治療の確立を目指した。TSCおよび正常対照の線維芽細胞を用いて飢餓負荷を行い、ウエスタンブロットでオートファジー関連蛋白を評価した。正常対照ではオートファジーが誘導されたが、TSCでは誘導されなかった。p62はオートファジーの誘導に伴い減少する蛋白であるが、p62は正常対照とTSCの両方で減少傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, I have tried to elucidate the relationship between mTOR signaling pathway and autophagy in Tuberous sclerosis complex (TSC) and establish new therapeutic strategy using induction of autophagy. In western blotting, control fibroblast induced autophagy with starvation, but TSC fibroblast did not at all. p62, which is decrease with induction of autophagy, showed reduction tendency in both fibroblasts.

研究分野：小児神経病理学

キーワード：結節性硬化症 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは飢餓などのストレス条件下に誘導される、不要になった細胞内小器官や蛋白を消化する細胞内リサイクル機構である。細胞の恒常性を維持するために必須の機能として注目され、腫瘍、神経変性疾患、老化など様々な分野で盛んに研究されており、最近では mammalian target of Rapamycin (mTOR) シグナル伝達がオートファジーを抑制的に制御していることが証明された。

一方、結節性硬化症は知能低下、てんかん、顔面血管線維腫を三主徴とし、臓器多発性過誤腫をきたす遺伝性疾患である。原因遺伝子として TSC1 と TSC2 が同定され、それぞれの遺伝子産物である Tuberin と Hamartin が mTOR を抑制的に制御していることがわかっている。

臨床的には皮質結節や上衣下巨細胞性星状細胞腫などの中枢神経過誤腫の増多・増大が難治性てんかんを誘導し、腎血管筋脂肪腫や心臓横紋筋腫の増大が死因の主要因となっている。

2. 研究の目的

本研究では、結節性硬化症の顔面血管線維腫から得られた線維芽細胞を用いて、オートファジー誘導過程をリアルタイムに観察したり、mTOR やオートファジーに関連する蛋白や遺伝子を解析することにより、結節性硬化症 - mTOR - オートファジーの相互関係を究明し、オートファジーの制御によって中枢神経過誤腫、腎血管筋脂肪腫、心臓横紋筋腫の増多・増大を抑制することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的な研究項目は、緑色蛍光蛋白を用いたオートファジーの経時的観察、オートファジーに関連した蛋白や遺伝子の解析、オートファジーを制御することによる結節性硬化症病変に対する治療効果の検討、の3つとした。

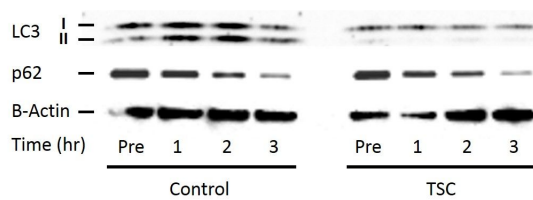
の具体的内容は以下の通り。結節性硬化症患者および正常対照の切除皮膚より確立した線維芽細胞を用いて Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) 培地による飢餓負荷を行い、オートファジーの誘導を試みた。飢餓負荷を行った培養細胞から蛋白を抽出し、mTOR やオートファジーに関わる蛋白の発現をウエスタンブロットにて検討した。また、それぞれの関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって検討し、結節性硬化症とオートファジーの間で mTOR がどのような働きを担っているのかを本実験で明らかにしようとした。

4. 研究成果

正常対照の線維芽細胞のウエスタンブロットでは飢餓負荷を開始した 1-2 時間にはオートファジー活性化を示唆する LC3- のバンドが出現したが、結節性硬化症の線維芽細胞のウエスタンブロットでは 4 時間の貴下負荷においてオートファジーは誘導されなかった。p62 はオートファジーの誘導に伴い減少する蛋白であるが、p62 は正常対照と結節性硬化症の両方で減少傾向を示した(図1)。その理由として p62 蛋白にオートファジー以外の役割がある可能性が示唆された。オートファジー研究を行う上で、線維芽細胞の取り扱い、適切な飢餓負荷をかけるための条件設定、蛋白の抽出方法に創意工夫を要し、その確立に多大な時間を要した。そのため、リアルタイム PCR、緑色傾向蛋白を用いたオートファジー観察、およびオートファジー促進剤を用いた治療

実験は期間内に十分な成果を得ることができなかつた。結節性硬化症における臨床的にも mTOR 阻害剤の有効性は認知されつつあるが、未だ病態形成の機序が十分解明されているとはいいがたい。今後も病態形成の機序解明と、より理論的な治療の開発に向け、今後も当研究を継続していく予定である。

図1 飢餓負荷によるオートファジー誘導。



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 1 件)

1. Miyahara H, Natsumeda M, Shiga A, Aoki H, Toyoshima Y, Zheng Y, Takeuchi R, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Izumi T, Fujii Y, Takahashi H, Kakita A.

Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex.

Brain Pathol 2013;23:254-262. 査読あり.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 宮原弘明, 棗田 学, 青木 洋, 豊島靖子, 村上博淳, 増田 浩, 亀山茂樹, 泉達郎, 藤井幸彦, 高橋 均, 柿田明美.
結節性硬化症におけるオートファジー活性の低下が及ぼす形態学的影響.

第 53 回 日本神経病理学会総会学術研究会 .2012 年 6 月 28-2012 年 6 月 30 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮原 弘明 (MIYAHARA HIROAKI)
大分大学 医学部 小児科学講座 講師

研究者番号: 00457615

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：