

結節性硬化症における白斑の病態解明から、結節性硬化症の治療薬開発へ

研究者氏名 楊 伶俐

共同研究者 楊 飛、 田中 まり

実験助手 藤 蘭婷

所属機関名 大阪大学医学系研究科皮膚科教室

要 旨

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex, TSC) は全身に過誤腫と呼ばれる良性腫瘍や顔面血管線維腫、てんかん、精神発達遅延、白斑など多彩な症状を示す疾患であるが、その病態はまだ未解明であり、確立された治療法はない。結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex) は原因遺伝子 TSC1, TSC2 が同定されているが、病態に未解明な部分が多く、確立された治療はない。

本研究では、結節性硬化症における白斑の病態解明するため、1) 正常皮膚から樹立された Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を用いて、TSC1, TSC2 を SiRNA でノックダウン (KD) し、また、2) 結節性硬化症患者から Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を樹立して、患者さんの病態を細胞レベルで再現するモデルを構築し、遺伝子、蛋白発現 profile の中、色素産生などの病態へ影響する因子を探索した。

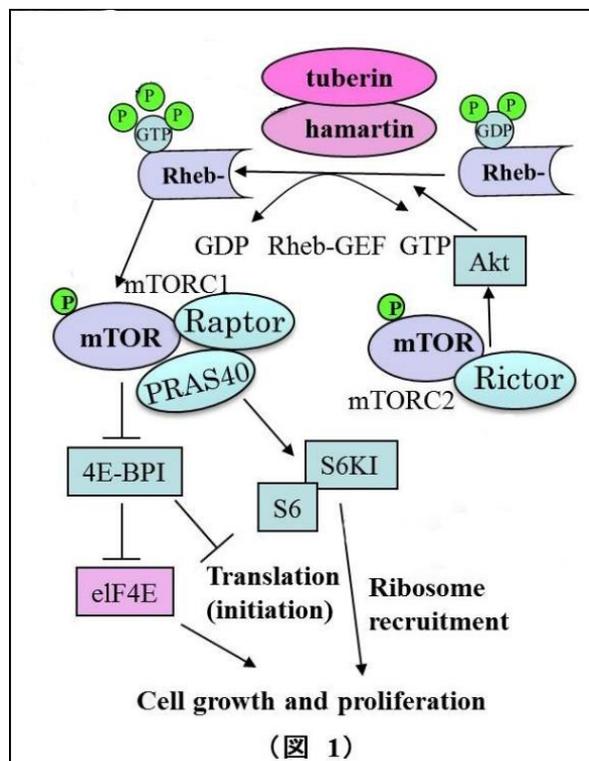
探索した結果、1) 正常メラノサイトと比べ、作られた結節性硬化症白斑モデルメラノサイトでは、オートファジー機能の低下が見られた。2) メラノサイトにおいて、オートファジー機能の低下が色素産生の低下と関連していることが分かった。3) メラノサイトにおけるオートファジーの機能異常が結節性硬化症の白斑形成に関与することが示唆された。

そこで、オートファジーがどのように色素産生と関連しているかについて解析し、結節硬化症の更なる病態解明および治療にもつながると考えられる。

Key Words : 結節性硬化症、 TSC、 白斑、 オートファジー

緒言：結節性硬化症は 1835 年に初めて報告された疾患で¹⁾、皮膚、神経系、腎、肺、骨など全身過誤腫を特徴とし、皮膚以外にも脳、肺、心、腎、骨などのほぼ全身の臓器に多様な症状を呈する。1935 年に常染色体優位遺伝であることが判明した²⁾。しかし、その後、約一世紀にわたってほとんど病態の解明はなされなかった。

1993年に16番の染色体上にTSCの遺伝子の一つであるTSC2遺伝子が³⁾、さらに1997年には9番染色体上にTSC1の遺伝子が同定されたことにより⁴⁾、本症の解明が飛躍的に進んだ。さらに最近、図1に示しているように、tuberin-hamartin複合体がRheb (Ras homolog enriched in brain)のGTPase activating protein (GAP)として作用し、Rheb-GTPを不活性化し、mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1)を抑制することにより、その下流のS6K1, ribosomal protein S6や4E-BP1に作用することが分かった⁵⁾。その結果、細胞の増殖や大きさが制御される。これら、TSC1, TSC2の作用機序で、TSCの腫瘍形成のメカニズムは説明できるが、白斑などの腫瘍病変以外のメカニズムは説明できない事の方が多く、今後のさらなる研究が必要と思われる。



対象と方法：

1) 正常皮膚から樹立された Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を用いて、TSC1, TSC2 遺伝子発現を SiRNA でノックダウン (KD) し、結節性硬化症モデル細胞を構成し、また、2) 結節性硬化症患者から Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を樹立して、患者さんの病態を細胞レベルで再現するモデルを構築し、マイクロアレイ遺伝子解析方法、proteome 解析方法とパスウェイ解析などを用い、それらの遺伝子、蛋白発現 profile の中、色素産生などの病態へ影響する因子を探索する。以上より得られた結果を real-time PCR、western blotting、細胞免疫染色、組織免疫染色、電子顕微鏡などで再検討する。

結果：

以上マイクロアレイ遺伝子解析方法、proteome 解析方法とパスウェイ解析など網羅的な解析と他詳細な解析を行った結果、メラノサイトにおいて、興味深いデータを得ることができた。

1) 正常メラノサイトと比べ、RNAi 手法により TSC1, TSC2 をノックダウンした結節性硬化症白斑モデルのメラノサイトでは、オートファゴゾームのマーカーである LC3 の発現が低下している

ことが見られた。また、それとともに、色素産生マーカである TRP-1、Melan-A などのタンパク質レベルの発現が TSC1、TSC2 遺伝子欠損により、有意に減少していることも見られた。2) メラノサイトにおいて、オートファジーの重要因子である ATG7 をノックダウンすることにより、色素産生能が顕著に抑えられることが見られた。この結果から、オートファジー機能の低下が色素産生の低下と関連していることが分かった。3) メラノサイトにおけるオートファジーの機能異常が結節性硬化症の白斑形成に関与することが示唆された。

考察 :

結節性硬化症は、下記図 2 で示しているように TSC1、TSC2 とよばれる遺伝子の異常により、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系の制御機能が働かなくなり、mTOR という酵素が過剰に活性化されることが言われているが、本研究では、表皮メラノサイトにおいて、TSC1、TSC2 遺伝子欠損することにより、これまでに、オートファジーは細胞が飢餓状態に陥った際に、細胞質やオルガネラの一部を分解して、生き延びるためのエネルギーやタンパク質を合成するといわれている。臨床医療においては、オートファジーが、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、2 型糖尿病、感染症など様々な疾患に関与することが分かっている。本研究では、結節性硬化症モデルのメラノサイトでは、オートファジーが低下されるとともに、色素産生機能が低下することが分かった。メラノソーム熟成や分泌にオートファゴゾームが深く関わっていることが示唆される。また、これらの機序は結節性硬化症白斑の病態形成に関与していることも示唆された。本研究成果を活用することで、皮膚の色素産生、白斑病態形成に新たなアプローチを提案できると考えられる。

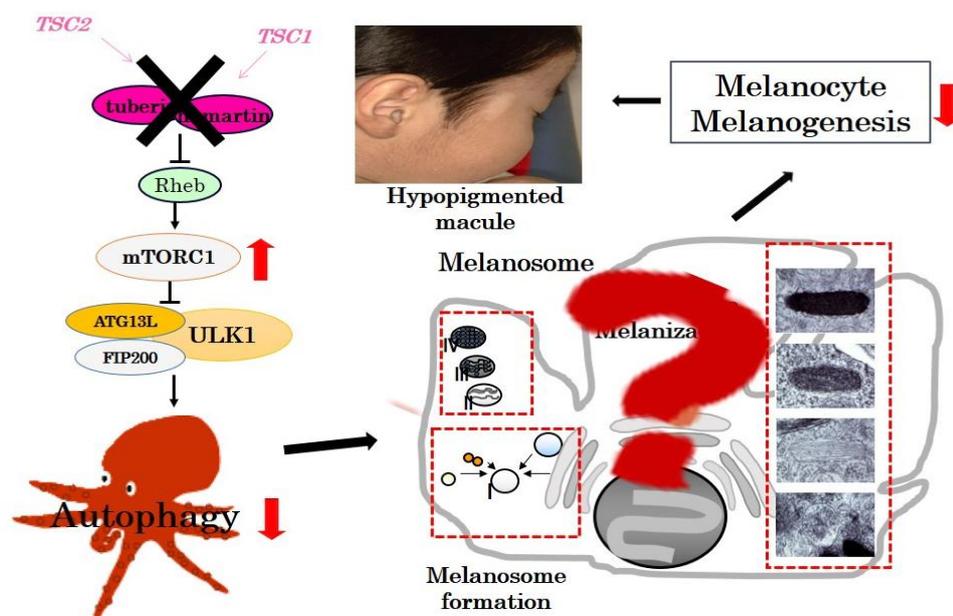


図 2

参考文献 :

- 1) Rayer PFO: Traite theorique et pratique des maladies de la peau ed. JB baillier, Paris, 1835.
- 2) Gunther M, Penrose LS: The genetics of epiloia. J Genet, 31: 413-430, 1935.
- 3) The European chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium: Identification and characterization of tuberous sclerosis gene on chromosome 16, Cell, 75: 1305-1315, 1993.
- 4) Van Slegtenhorst M, Hoogt R, Hermans C, et al: Identification of The Tuberous Sclerosis Gene TSC1 on Chromosome 9q34, Science, 277: 805-809, 1997.
- 5) Potter CJ, Huang He, Xu T: Drosophila TSC1 functions with TSC2 to antagonize insulin Signaling regulating cell growth cell proliferation, and organ size, Cell, 105: 357-368, 2001.

注: 本研究は、2013年11月16日「第25回日本色素細胞学会学術大会」国際シンポジウムにて口演発表。

2014年3月11日