

## 緒言

2014年、mTOR阻害薬シロリムスは、我が国において世界に先駆けてリンパ脈管筋腫症に承認されました。その後、多くの疾患の治療に応用され、適応が拡大してきました。そこで、シロリムスの新疾患への適応拡大や新しい用法用量の薬事承認を支援し、分野を越えて治療にあたる医療従事者にシロリムスの副作用について啓発し、シロリムスの基礎・臨床研究に携わる若手研究者を育成することを目的として、シロリムス新作用研究会（JASMIN研究会）が設立されました。

このような目的のもと、2020年から学術集会を開催してまいりました。2020年は完全ウェブ開催、2021と2022年はハイブリッド開催とし、2022年は東京品川会場に20名、オンラインで30名の方から参加いただきました。内容は、一般演題3題、奨励賞受賞者講演3題、情報提供、および特別講演3題と盛り沢山でした。

一般演題は、日本医科大学 神尾孝一郎先生、名古屋市立大学 尾上耕一先生、および岐阜大学 安江志保先生の3名の先生から臨床と基礎に関する発表がありました。これらの3演題には、いずれも研究奨励賞を贈呈いたしました。続いて過去の奨励賞受賞者の名古屋市立大学 中津海洋一先生、岐阜大学 小関道夫先生、長崎大学 住吉玲美先生より、受賞者講演を発表していただきました。さらに、和歌山県立医科大学 神人正寿先生からシロリムスゲルに関する情報提供がありました。

特別講演では、東京医科歯科大学 田中光一先生から、新規焦点性てんかんモデルにおけるmTORC1経路の過剰活性化と脳の興奮性亢進に関する講演をいただきました。また、久留米大学 青木浩樹先生より、大動脈解離における細胞増殖・老化応答の意義に関するご講演がありました。さらに、熊本大学 江良拓実先生から、「難治性疾患由来細胞を使った病態解析と治療薬の開発」と題して講演していただきました。いずれの講演も、これまでとは違った視点からシロリムスの新作用を知ることができ、大変有意義な内容でした。

第4回研究会は、2023年10月14日（土）にハイブリッド方式で開催する予定です。本研究会の今後の発展に向け、皆様の一層のご協力をお願いする所存です。

## 一般演題 1

### マイクロ RNA による mTORC2 を介した肺線維化病態の制御に関する研究

神尾 孝一郎

猪俣稔 (いのまたみのる)、吾妻安良太 (あづまあらた)、松田久仁子 (まつだくにこ)  
臼杵二郎 (うすきじろう)、盛永明美 (もりながあけみ)、田中徹 (たなかとおる)  
柏田建 (かしわだたける)、渥美健一郎 (あつみけんいちろう)、林宏紀 (はやしひろき)  
藤田和恵 (ふじたかずえ)、齋藤好信 (さいとうよしのぶ)、久保田馨 (くぼたかおる)  
清家正博 (せいけまさひろ)、弦間昭彦 (げんまあきひこ)

日本医科大学呼吸器内科

**【目的】** 肺線維化病態において、血中エクソソーム中の microRNA については不明点が多い。今回われわれは、ブレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症モデルマウスを用いて、肺線維化病態に関与するエクソソーム由来の microRNA の作用を明らかにする事を目的とした。

**【方法】** C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いて BLM を投与し肺線維症モデルマウスを作成 (day 0)。BLM 投与前、投与後 day 7, 14, 21, 28 にマウス血清より、エクソソームを単離し、microRNA array を用いてエクソソーム中の microRNA を解析した。線維化との関連が予想される microRNA を BLM 肺障害モデルマウス尾静脈より投与し、Aschcroft score、Hydroxyproline などを測定し、線維化への影響を評価した。さらにヒト肺線維芽細胞株を用いて同 microRNA の作用を検討した。

**【結果】** エクソソーム中の microRNA-16 (miR-16) は、BLM 投与後 day 14 に約 8 倍上昇した。同肺線維症モデルの day 14 に mir-16 mimic を投与した所、肺線維化は有意に抑制された。さらに線維化のメディエーターである secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) の発現を、肺組織中ならびに血中で抑制した。肺線維芽細胞を用いて検討した所、miR-16 は TGF- $\beta$ 1 誘導性の SPARC を抑制したが、これは mTORC2 のコンポーネントである Rictor の抑制によるものである事が確認された。

**【結語】** エクソソーム中の miR-16 による肺線維化抑制効果が認められたが、同エクソソームの由来などに関する詳細な検討が必要である。

## 一般演題 2

### mTOR 経路不活化時における LARP1 を介した長鎖ポリ A 型 TOP mRNA の蓄積と意義

尾上 耕一<sup>1,2</sup>

星野 真一<sup>1</sup>

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 遺伝情報学<sup>1</sup>

現所属：名古屋大学院 医学研究科 分子腫瘍学<sup>2</sup>

5' 末端に TOP (terminal oligopyrimidine) 配列を有する TOP mRNA は、リボソームタンパク質をはじめとした翻訳関連因子をコードし、ヒト細胞に発現する全 mRNA のおよそ 20% を占める。TOP mRNA の発現は mTOR 経路の活性に呼応して動的に調節されるが、その制御において鍵となるのが RNA 結合タンパク質 LARP1 である。LARP1 は mTOR が不活化時において TOP 配列に直接結合し、mRNA を安定化する傍ら翻訳を抑制することが知られる。今回我々は、LARP1 が TOP mRNA のポリ A 鎖伸長を介して、mTOR シグナルの ON-OFF に呼応した細胞の翻訳系の厳密な制御に寄与することを解明したので報告する。

長期のアミノ酸飢餓時および mTOR 阻害剤 Torin1 処理における TOP mRNA の代謝動態を調べたところ、長いポリ A 鎖をもつ TOP mRNA が蓄積する様子が観察された。この現象は LARP1 に依存して起こり、また、LARP1 はポリ A ポリメラーゼと結合することが免疫沈降実験により確認できたことから、LARP1 は TOP mRNA のポリ A 鎖を伸長することが明らかとなった。さらに、長鎖ポリ A 型 TOP mRNA が蓄積した後に mTOR 経路を再活性化させると、TOP mRNA の翻訳活性は急速に回復することを見出した。一方で、LARP1 をノックダウンすると、TOP mRNA の翻訳だけでなく、全体的な翻訳活性の回復に遅延が生じていた。重要なことに、mTOR がアクティブな通常の培養条件下では、TOP mRNA ではポリ A 鎖の長さと言訳活性の間に正の相関があることを明らかにした。以上から、mTOR 不活化時において LARP1 は TOP mRNA のポリ A 鎖を伸長することで、mTOR が再活性化された時の急速な TOP mRNA の翻訳回復を可能にしているものと考えられる。

### 一般演題 3

## リンパ管内皮細胞への NRAS 遺伝子導入による Kaposiform lymphangiomatosis のモデル細胞作製とシロリムスの作用

安江 志保

小関道夫、林大地、野澤明史、遠渡沙緒理、大西秀典

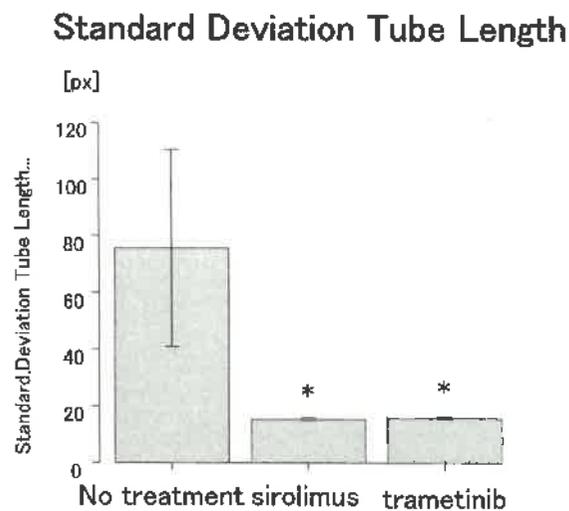
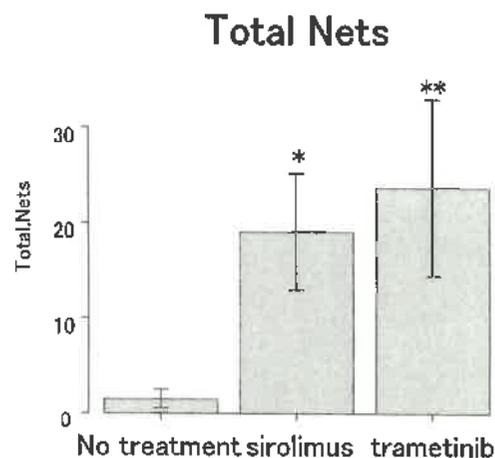
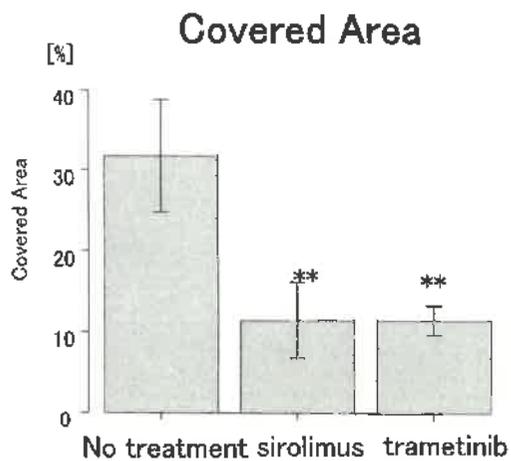
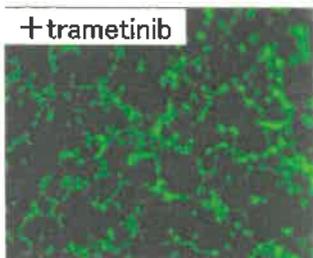
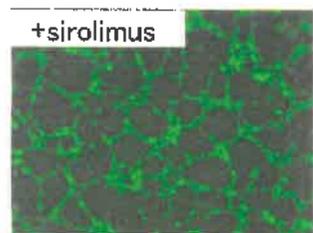
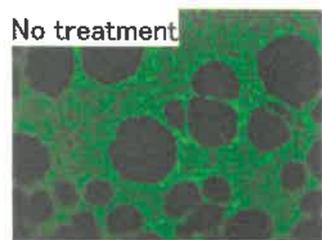
岐阜大学医学部附属病院小児科、国立成育医療研究センター小児がんセンター

【背景】Kaposiform lymphangiomatosis (KLA) はリンパ管腫症の中でも、胸部病変や凝固異常および病変組織の紡錘型細胞の集族を特徴とする予後不良な疾患である。病変の異常リンパ管組織では *NRAS Q61R* 変異の体細胞モザイク変異を呈していることが報告されたが、この遺伝子異常がどのように本疾患の病態に関わるかは明らかとなっていない。

【方法】レンチウイルスベクターを用い、リンパ管内皮細胞に *NRAS Q61R* 変異を導入した。KLA の病変を *in vitro* で再現するため、NRAS 野生型細胞と変異細胞を種々の割合で混合して培養し、Tube formation assay、細胞増殖能、遊走能、Akt/mTOR 経路および RAS 経路の主要なタンパク合成能などの評価を行なった。変異細胞に mTOR 阻害薬シロリムス、MEK 阻害薬トラメチニブを添加し、その変化を観察した。

【結果】変異細胞は大型で遊走能の高い細胞で、Tube formation assay において管腔を形成せずシート状に増殖した。変異細胞の混合率に比例して管腔形成が稚拙となった。上記 2 剤の添加により、管腔形成能の有意な改善、細胞増殖能の低下、Akt/mTOR 経路および RAS 経路の主要なタンパク合成の抑制を認めた。

【結論】*NRAS Q61R* 変異リンパ管内皮細胞が正常リンパ管内皮細胞に混在することにより、管腔形成、遊走能に異常が生じ、KLA の異常なリンパ管組織が形成される可能性が示唆された。mTOR 経路、RAS 経路の阻害薬によって、管腔の形態の改善および増殖の低下がみられたことから、シロリムスおよびトラメチニブが KLA 治療の選択肢になりえると考えられた。



NRAS Q61R変異細胞への  
Sirolimus/Trametinib添加により

- Sheet状の部分が減る
- 網目が形成される
- Tubeの長さのばらつきが減る

= 変異なし細胞のTube formationに  
近づく

(No treatment (NRASQ61R mutant type 100%)との比較: \*p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001)

## 特別講演 1

### mTORC1 経路の過剰活性化と脳の興奮性亢進—新規焦点性てんかんモデルを中心に

田中 光一

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学分野

焦点性てんかんは、脳の一部の神経細胞が異常に興奮することによって引き起こされるてんかんである。近年、遺伝子解析により、様々な種類の焦点性てんかん患者さんから mTORC1 抑制因子である GATOR1 複合体遺伝子 (DEPDC5、NPRL2、NPRL3) の変異が同定されている。焦点性てんかんの解明には、患者と同じ遺伝子変異と症状を有するモデルマウスが有用である。これまで、DEPDC5 変異を有するてんかんモデルマウスを用いた研究は行われてきたが、NPRL2 および NPRL3 に変異を持つてんかんモデルマウスは作製されていなかった。また、NPRL2 や NPRL3 を全身から欠損するマウスは胎児期に死亡し、焦点性てんかんの病態解明には用いることができなかった。そこで私の研究室では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用い、発作好発部位である大脳皮質及び海馬でのみ NPRL2 および NPRL3 を欠損させたマウスを作製した。

NPRL2 および NPRL3 欠損マウスは、患者と同様の症状（脳波異常を伴う自発性てんかん発作、mTORC1 経路の活性化を伴う異型巨大神経細胞の出現）を示した。

GATOR1 複合体の変異を持つ焦点性てんかん患者では、mTORC1 経路の過剰な活性化が認められる。そのため、mTORC1 の抑制剤であるラパマイシンが新たな抗てんかん薬として期待されている。そこで、NPRL2 および NPRL3 欠損マウスにラパマイシンを長期間投与したところ、てんかん発作の回数が有意に抑制された。しかし、DEPDC5 欠損マウスとは異なり、NPRL2 および NPRL3 欠損マウスでは、ラパマイシンの投与を中止すると効果は持続せず、てんかん発作が再発した。

脳の興奮性亢進はてんかんだけでなく、様々な精神神経疾患の共通病態として注されており、mTORC1 経路の活性化と脳の興奮性亢進についてグリア細胞の観点から言及する。

## 特別講演 2

### 大動脈解離における細胞増殖・老化応答の意義

青木 浩樹

久留米大学 循環器病研究所

大動脈解離は前兆なく強い痛みとともに大動脈壁が突然断裂する原因不明の疾患である。上行大動脈に解離が及ぶ場合、放置すれば死亡率は75%に及ぶため断裂した大動脈を人工血管に置換する緊急外科手術が行われるが、手術死亡率は30%~50%に及ぶ。解離病態には不明な点が多く、外科手術以外に積極的な治療法はない。

先天異常である大動脈二尖弁患者では大動脈解離の発症率が高く、その大動脈は解離準備状態と考えられる。二尖弁患者の大動脈を正常大動脈と比較したトランスクリプトーム解析から、二尖弁大動脈壁では受容体チロシンキナーゼ（RTK）系路の活性化が示唆された。事実、組織解析では二尖弁大動脈壁における RTK 経路の中心分子 AKT の活性が亢進していた。次にマウス大動脈解離モデルにおいて発症直前のトランスクリプトーム解析についてベイジアン・ネットワーク解析を行ったところ、細胞増殖、炎症・免疫応答、細胞遊走、筋細胞分化、細胞サイズと栄養応答に関わる遺伝子群が発現制御クラスターを形成することが示された。マウス解離モデルでは発症直前にチロシンリン酸化、mTOR 経路の活性化および細胞増殖応答が見られた。mTOR 阻害薬ラパマイシンは細胞増殖応答および大動脈解離発症を完全に阻止し、解離発症後の投与でも大動脈壁破壊を抑制した。過度の増殖応答は細胞老化を引き起こすことからマウス解離モデルで細胞老化について検討した。その結果、解離刺激による老化細胞の出現が認められた一方、老化細胞除去薬は解離による組織破壊進行および大動脈破裂による突然死を阻止した。

以上の結果から、大動脈解離病態においてラパマイシン感受性細胞増殖応答および細胞老化が中心的な役割を果たすことが示された。これらの観点から大動脈解離の分子病態を解明することが新たな病態診断・治療戦略に結びつくと期待される。

### 特別講演 3

#### 難治性疾患由来細胞を使った病態解析と治療薬の開発

江良 択実

熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野

難治性疾患(難病)は、患者数が少ないうえに神経細胞など簡単には標的細胞を採取できない疾患が多い。そのため、病態の解明と治療薬開発が進んでいない。私たちは、皮膚由来線維芽細胞や血液細胞と、患者から樹立した疾患 iPS 細胞から誘導した疾患標的細胞を使って、難病の病態解明と治療薬開発を行っている。

iPS 細胞は *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* を体細胞へ強制的に発現させることで容易に得ることができる多能性幹細胞である。試験管内で、増殖可能で様々な細胞へ分化を誘導することができる。疾患研究においては、これまで患者からの採取が困難であった疾患の標的細胞を iPS 細胞から誘導し解析することで、病態解明や薬剤開発に活用できる。特に遺伝子変異をもつ難病研究には、これまで絶大な貢献をしてきた。本講演では、私たちが行ってきた難病患者(全身性強皮症やその他の難病の患者)から直接採取した細胞や、それから樹立した iPS 細胞を使った最近の研究を紹介する。

全身性強皮症は、皮膚や肺の線維化、血管障害による腎障害や手指の血流障害(レイノー現象、難治性皮膚潰瘍)、自己抗体等の免疫異常、を呈する自己免疫疾患である。病因は不明であるが、異常な線維化、血管障害、免疫異常の3つが主要な病態である。対症療法と免疫抑制剤投与が行われるが、限定的な効果のため根治は得られず、新薬の開発が強く望まれている。私たちは、独自の解析手法を用いて治療薬候補を選別し、選別候補薬の作用機序を解析した。これをもとに、患者の線維芽細胞と iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞での新たな異常な表現型と遺伝子発現を明らかとした。さらに、ある既知薬が、異常表現型を改善させ、モデルマウスでの線維化を抑制することを明らかとした。本講演では、iPS 細胞を使った難病研究を紹介し、その有用性について皆様と議論をしたい。

## 受賞者講演 1

### mTORC1 による液-液相分離調節を介した新たな翻訳制御機構

中津海 洋一先生

名古屋市立大学 薬学研究科

シロリムスの標的タンパク質である mTORC1 は栄養依存的に活性化するリン酸化酵素であり、下流分子をリン酸化し活性を制御することで細胞の栄養応答を実現する。mTORC1 による栄養応答はタンパク質の翻訳促進とオートファジーの抑制を中心に、様々な細胞応答を介して制御される。これらはいずれも下流分子のリン酸化によって引き起こされるため、mTORC1 による細胞応答の理解には下流のリン酸化を知ることが重要である。

われわれは細胞内のリン酸化を数千から一万の規模で同定し、また異なるサンプル間で各々のリン酸化の変動について定量比較可能な手法 (Phospho-iTRAQ System) を開発した。本手法により延べ 20000 を超えるリン酸化の変動を解析したところ、mTORC1 下流のリン酸化分子群として、既知分子を含めて 53 の遺伝子群を同定した。特に P-body とよばれる細胞内小器官の構成因子が複数含まれており、着目して研究を進めたところ、P-body の形成が mTORC1 活性に依存して変化することがわかった。P-body は特定のタンパク質と RNA で構成され、液-液相分離により形成される膜のない細胞内小器官である。P-body は mRNA の分解と翻訳に関与することが知られるものの、mTORC1 や栄養応答との関連は知られていなかった。われわれは P-body 欠損細胞を調製し、mTORC1 依存的な翻訳について大規模解析を行ったところ、P-body に局在する mRNA について、その翻訳が有意に低下することが分かった。

これまで mTORC1 依存的な翻訳制御は、5' TOP mRNA を対象とした制御が知られているが、本研究から P-body 形成を介した新しい翻訳制御機構を見出した。

## 受賞者講演 2

### 難治性脈管異常に対するシロリムス療法研究の進捗

小関 道夫先生

岐阜大学医学部附属病院 小児科

従来より「血管腫」、「リンパ管腫」と呼ばれていた疾患は、近年の病態、病理学的理解の進歩に伴い、脈管異常（脈管腫瘍・脈管奇形）と呼ばれるようになった。これらは様々な疾患を含むが、代表的なものは、カサバツハメリット現象を伴う血管性腫瘍や、リンパ管腫（嚢胞性リンパ管奇形）、リンパ管腫症、静脈奇形、動静脈奇形、混合型脈管奇形、クリッペル・トレノネー・ウェバー症候群などである。これらの難治例に対する有効な治療法は確立されていないばかりか、承認されている薬剤もない。近年、遺伝子解析技術の発達に伴い、病変部位より PI3/AKT/mTOR 経路の遺伝子変異が検出され、本疾患の原因との関連性が示唆されている。

こうした研究を背景に、mTOR 阻害剤であるシロリムスがこれらの疾患の病状を高い確率で抑え、病変を縮小させることが国内外で報告されており、新しい治療薬として注目されている。2014 年頃より、岐阜大学ではエベロリムスの臨床研究を開始し、その後、本邦でシロリムスがリンパ脈管筋腫症に承認されたため、本剤の薬事承認を目指し、医師主導治験を計画した。

2016 年に日本医療研究開発機構（AMED）より研究を獲得し、2017 年より、リンパ管疾患（リンパ管腫、リンパ管腫症、ゴーハム病）に対するシロリムス錠の医師主導治験を実施したところ、高い有効性を認め、2021 年 9 月に承認された。さらに 2020 年より、小児用製剤である顆粒剤を加え、様々な脈管異常に対する治験も開始し、世界初の薬事承認を目指している。

発表では、これまでの研究の進捗と今後の展望についてまとめる。

### 受賞者講演 3

#### TAFRO 型特発性多中心性キャッスルマン病に対するシロリムスの可能性

住吉 玲美先生

古賀 智裕先生、川上 純先生

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 先進予防医学共同専攻 リウマチ・膠原病内科学

特発性多中心性キャッスルマン病 (idiopathic multicentric castleman disease: iMCD) は、iMCD-NOS (iMCD-not otherwise specified) と iMCD-TAFRO に大別されるが、iMCD-TAFRO は TAFRO 症候 (T: Thrombocytopenia、A: Anasarca、F: Fever、R: Reticulin fibrosis、O: Organomegaly) を呈する重篤な病態であり、既存治療に十分な反応を示さない例も多い。iMCD-TAFRO では、病態に PI3K/Akt/mTOR 経路が関与していることが報告されていたが、iMCD-TAFRO と iMCD-NOS の分子学的な差異についてはこれまで十分に検討されていなかった。第2回 JASMIN 研究会において、我々は末梢血 CD4 陽性 T 細胞の RNA シーケンスで iMCD-NOS と比較して iMCD-TAFRO で mTOR 経路の有意な亢進を認めること、また血清蛋白の網羅的な解析で mTOR 経路に関連のある IGFBP-1 という蛋白が iMCD の病態に寄与している可能性があることを報告した。血清 IGFBP-1 については、ELISA 法で iMCD-NOS 患者(13名)、iMCD-TAFRO 患者(6名)、関節リウマチ患者(16名)、SLE 患者(17名)、健常人(28名)の血清中の濃度を測定し、他の群に比べて iMCD-TAFRO 患者で高値であることが明らかとなった。以上の結果から、iMCD-TAFRO 患者では mTOR 阻害剤であるシロリムスが有効である可能性が示唆された。当院において IL-6 阻害薬や副腎皮質ステロイド薬への反応が不十分であった iMCD-TAFRO 患者に対して、院内の適応外使用委員会の承認を得て mTOR 阻害薬であるシロリムスを導入した 8 例の臨床的経過を報告する。

## 情報提供

和歌山県立医科大学 皮膚科

神人 正寿先生

結節性硬化症に対するシロリムスゲルの米国での承認というニュースについて解説する。結節性硬化症は、全身の過誤腫を特徴とする遺伝性の全身性疾患と定義されている。その原因遺伝子である TSC1 や TSC2 の転写産物であるハマルチン-チューベリン複合体の機能不全により、下流の mTOR の抑制が外れ、細胞の増殖分化が異常活性化するというメカニズムが明らかになっている。国内有病率は 10,000 人に 1 人で、国内患者数は約 1 万から 1.5 万人と推定されている。脳、目、心臓、肺、腎臓に良性腫瘍が形成されるが、皮膚だけでも顔面の血管線維腫を含め実に多彩な症状を呈する。これらが診断のきっかけになることも多い。腎移植患者の拒絶反応予防目的でシロリムスを服用していた結節性硬化症患者の血管線維腫が劇的に改善したというセレンデピティを元に、結節性硬化症患者の血管線維腫細胞を用いたシロリムスの *in vitro* VEGF 産生抑制作用やヒト皮膚メラノサイトを用いたメラニン産生増加作用が見出された。

そして実際、シロリムスを結節性硬化症患者の血管線維腫に外用したところ、腫瘤の縮小と紅斑の改善を認め、2015 年から医師主導治験、III 相試験を経て、2018 年に日本での承認取得、そして販売開始となった。さらに本邦を皮切りに米国、中国、EU で申請が進められ、このたび米国で本年 3 月に FDA の承認が得られた。顔面の血管線維腫の治療として最初にして唯一の外用剤、として注目されている。