

ヒト結節性硬化症と腎癌の発症機構と遺伝子診断

所属機関 (財) 癌研究会癌研究所実験病理部
研究者名 樋野 興夫

< 研究の概要 >

我々は、ラット遺伝性腎癌の多段階的発癌の解析 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 327-331, 1993)、キャリアーの短期検出法の確立 (Cancer Res., 53: 5856-5858, 1993)、原因遺伝子の mapping (Jpn. J. Cancer Res., 84: 1106-1109, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1302-1308, 1994)、原因遺伝子の単離、同定 (Nature Genetics 9: 70-74, 1995)、原因遺伝子の構造解析 (Nucleic Acids Res., 23: 2608-2613, 1995, Mammalian Genome, 8: 554-558, 1997)、機能解析 (Cancer Res., 56: 429-433, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 241: 24-30, 1997)、癌抑制遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 3990-3993, 1997) および腎癌遺伝子の証明 (Cancer Res., 59: 1206-1211, 1999) と世界に先駆けて研究を進めてきた。驚いたことに、遺伝性腎癌ラット (Eker rat) の原因遺伝子は、ヒト結節性硬化症の病因遺伝子である TSC2 遺伝子の rathomologue であった。ここに、遺伝性腎癌ラット (Eker rat) はヒト結節性硬化症の疾患モデルとして新たに注目されるに至った。そこで、我々は、リファインされた疾患モデル (Eker rat、本研究において *Tsc1* & *Tsc2* genes knock out mice の作成にも成功した) を用い、ヒト結節性硬化症に合併する腎癌 (但し、ヒトでは angiomyolipoma が多い) の発生機構を実験病理学的に解析した。更に、多数の腎癌における 2ndhits のパターンを解析し (Jpn. J. Cancer Res., 88: 254-261, 1997, Cancer Res., 59: 849-855, 1999) 遺伝子機能の解明及び phenotype-specific mutation の有無を検討した。また、本邦におけるヒト結節性硬化症の遺伝子診断の確立を行った (投稿中)。本研究の成果は、我が国における、ヒト結節性硬化症の遺伝子診断に貴重な情報を提供するものと考える。

1998年8月アメリカの Cold Spring Harbor Meeting、1998年9月札幌の日本遺伝学会シンポジウム、1998年9月横浜の日本癌学会総会シンポジウム、1999年1月東京の日本学術会議シンポジウム及び1999年5月千葉で開かれた日本実験動物学会シンポジウムにて本研究成果の発表を行った。また、欧米およびわが国の学術雑誌に研究成果を多数発表した。特に、書籍「Phacolnatosis in Japan (Japan Scientific Societies Press 出版)」、「Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes (Karger 社出版)」の編集出版を行い我が国におけるヒト結節性硬化症の研究の推進に努めた。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
樋野興夫	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 部長	発癌機構と遺伝子診断
小林敏之	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 研究員	遺伝子構造解析
織本健司	(財) 癌研究会癌研究所 実験病理部 研究員	遺伝子機能解析

研究報告

I. 研究目的

本研究の目的は、リファインされた疾患モデル (Eker rat) を用いながら、現在、全く不明であるヒト結節性硬化症と腎癌の発症機構解明を目指し、治療に資する知見を得ようとするものである。またヒト結節性硬化症の遺伝子診断の確立を行う。

ヒト結節性硬化症の頻度は、最近の報告では、5800 人に 1 人の出生率であると報告されており比較的頻度の高い遺伝性疾患ということになる。本疾患の 60-70%は、家族歴はなく、新しい突然変異による孤発例であり高い spontaneous mutation rate を示す。本疾患の浸透率 (penetration) は 95%と高いが、家族内でも症状に variation があり腎癌の合併を含め多彩な症状を示す。難病であるヒト結節性硬化症の発症機序の解明と治療法の開発は切に求められるところである。またヒト結節性硬化症は *TSC1* 年度遺伝子と *TSC2* 遺伝子によるものが約半数づつ存在し表現型には差異はないと考えられており、さらに不全型も多く臨床の現場から遺伝子診断の必要性が指摘されている。

研究事業により期待される成果として、

- (a) ヒト結節性硬化症の遺伝子診断が可能となる。
- (b) *TSC1* 遺伝子と *TSC2* 遺伝子の機能解析より、同一の表現型を示すヒト結節性硬化症の発症機序の解明及び 2 つの遺伝子の関連を調べることが出来る。
- (c) 疾患の発症機序を解明することによって治療法の基礎の開発が期待できる。

II. 研究計画及び材料と方法

(1) 本邦のヒト結節性硬化症患者における遺伝子変異の解析:

ヒト結節性硬化症 (以下 TSC) は、かつては痙攣、精神運動発達遅滞、顔面血管線維腫を 3 主徴とした常染色体優性遺伝性疾患である。Gomez らのまとめによると、これら 3 主徴をそろえて有する症例は全体の 29%に過ぎず、また 3 主徴を一つも有しない症例が 6%存在すると報告されている。このように臨床表現型が非常に多彩であることが、本疾患の特徴でもある。近年、家族歴を有する家系の検索から、少なくとも 2 カ所の異なる責任遺伝子座が存在することが確認され、それぞれ *TSC1* (9q34 に局在)、*TSC2* (16p13 に局在) と名付けられた。*TSC2* 遺伝子は 41 個のエクソンからなる遺伝子である。一方、*TSC1* 遺伝子は 23 個のエクソンからなる遺伝子である。今回、我々は本邦における TSC 患者の遺伝子

変異を検討するため、*TSC1* および *TSC2* の全エクソンについて解析を行った。大阪大学の皮膚科あるいは小児科より臨床的に結節性硬化症と診断されている日本人 28 名（最終的に多型の有無が確認出来た症例のみで男性 12 例、女性 16 例、年齢 2 歳から 53 歳、平均 19.2 歳；家族歴を有する症例は 4 例）について、患者あるいは保護者から書面による同意を得た後に、採血を行い、リンパ球を分離、DNA を抽出し、*TSC1* および *TSC2* の遺伝子解析を行った。*TSC1* および *TSC2* 遺伝子の各エクソンの配列とスプライシングドナー、アクセプター配列を含むプライマーセットを用いて、PCR-SSCP を行った。シフトバンドが認められた場合、ゲルより直接シフトバンドを切り出し、DNA を抽出し、Direct Sequence を行い、シークエンスを検索した。polymorphism の可能性を否定できない場合、両親の DNA の解析も行った。

(2) Eker (*Tsc2*) 癌拘制遺伝子のプロモーター領域の同定：

Tsc2 遺伝子発現制御機構を明らかにするためプロモーター領域の解析を行った。ラットとヒト *Tsc2*/*TSC2* 遺伝子のプロモーター領域は約 60% の相同性を示しており、共に DNA 修復系酵素であるエンドヌクレアーゼ III をコードする *Ocfs3* 遺伝子が head-to-head の状態で近接している。我々はラット *Tsc2* 遺伝子側、*Ocfs3* 遺伝子側、各々のプロモーター活性を検出し、この領域が overlap していることを明らかにしてきた (Mammalian Genome 8: 554-558, 1997)。その領域には 2 ヶ所の cEts 結合配列が存在しており、その配列はヒトでも保存されている。我々は cEts 結合配列の *Tsc2* 及び *Ocfs3* 遺伝子発現制御への関与についてさらに検討を進めた。また、cEts 結合配列への結合が予想される Ets タンパクファミリーに関して、Eker rat の腎癌組織・細胞株における発現の検討を行った。

a) Construction of Reporter Plasmids :

Tsc2 5' 上流を含むプラスミドから、PvuII~PYuII (621bp) 及び SacII~PYuII (108bp) の断片を調整し、両方向性プロモーター活性測定用のレポータープラスミドである pDR-basic (放射線医学総合研究所第二研究グループ相良雅史先生より供与) に挿入した。

さらに PCR mutagenesis system を用いて、2 ヶ所の cEts 結合配列各々及び両方に対して Ets ファミリーの結合を抑制することが知られている point mutation (core motif: GGA[A/T]→ CCA[A/T]) を導入した断片を作製し、同様に pDR-basic に挿入した。

b) Luciferase Assay :

Eker rat 腎癌細胞株 (LK9d-L) に対して、上記 a) の如く作製したレポータープラスミドを各 8 μ g ずつトランスフェクション (リポフェクション法; Trans Fast TM, Promega, Madison, WI) して用い、ルシフェラーゼアッセイを行った。陰性コントロールとして pDR-basic を用い、陽性コントロールとして pDR-basic に CMV プロモーターを挿入したレポータープラスミドを用いた。またインターナルコントロールとして pCMV/ β を使用し、ONPG を基質とした β -Gal アッセイを行った。各プラスミドのルシフェラーゼ活性は β -ガラクトシダーゼ活性の値で補正した後、陽性コントロールの値を 100 とした時の相対値で表した。

c) *Gel Mobility Shift Assay* :

Eker rat 腎癌細胞株 (LK9d-L) より核抽出液を調整し、*Tsc2* 及び *Octs3* プロモーター中の cEts 結合配列を含む DNA 断片をプローブとした Gel Mobility Shift Assay を行った。また、どのバンドが特異的な結合によるものか検討するため競合実験を行った。

d) *Northern Blot Analysis of the rat Ets-1* :

Eker rat 腎癌細胞株, Eker rat 腎癌組織及び Rat 正常腎より RNA を抽出し、各々 10 μ g を 1% アガロースで分離した後、Ets ファミリーの 1 つである rat Ets-1 cDNA を用いて常法によりノーザンハイブリダイゼーションを行った。

e) *Immunohistochemical staining of Ets-1* :

Eker rat 腎癌組織はホルマリン固定後、パラフィン包埋を行った後、3 μ m に薄切した。脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素を用い内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、Avidin Biotin Complex 法 (ABC 法) で免疫組織染色を行った。一次抗体としてウサギ抗ヒト Ets-1 ポリクローナル抗体 (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を使用した。

(3) Eker (*Tsc2*) 遺伝子蛋白の存在様式の解析 :

我々は *Tsc2* の蛋白の機能解析の一環として正常ラットにおける分布を免疫組織化学を用いて全身の臓器にわたり調べた。用いた抗体はラット *Tsc2* 蛋白の Exon26 および C 末の 20 アミノ酸を認識する。全ての陽性染色は対応するペプチドの添加により吸収されることを確かめ、特異性に関して確認した。

(4) Eker rat における脳病変の同定 :

TSC 患者の QOL は、主に精神遅滞、てんかん等の神経症状に左右される。しかし、Eker ラットでは神経症状は認められない。そこで、Eker ラット 19 個体 (月齢 17-24) と正常対照 6 個体の脳を病理組織学的に観察し、ヒト TSC 脳病変と比較検討した。

(5) IFN- γ transgenic mice と *Tsc2* gene knockout mice 交配による腎癌発生の柳制 :

SAP-IFN- γ transgenic mice は、マウス IFN- γ 遺伝子を肝細胞で特異的に発現しており、門脈域のリンパ球浸潤および肝小葉内の壊死炎症反応が観察されユニークなヒト慢性肝炎モデルである (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 614-618, 1994)。本マウスの肝臓には、IFN- γ 以外にも TNF α 、Fas 抗原および Fas ligand の発現の尤進が認められる (Biochem. Biophys. Res. Commun., 226: 762-768, 1996, Jpn. J. Pharmacol., 78: 233-235, 1998)。興味あることに、本マウスは、慢性肝炎を伴うが肝発癌は、むしろ抵抗性である。現在、樹状細胞の機能尤進を含め、その分子メカニズムを検討している Biochem. Biophys. Res. Commun., 259: 294-299, 1999)。一方、我々は、遺伝性腎癌ラットの原因遺伝子である *Tsc2* 遺伝子の knockout mice を作製した (Cancer Res., 59: 1206-1211, 1999)。このマウスも腎癌を 100% 発生する。そこで、今回、IFN- γ transgenic mice と交配し腎癌発生の修飾を検討した。

(6) ラット腎癌発生の系統差 (Cancer modifier genes) の検討:

我々は、すでに腎癌の系統差 (IE 系と BN 系) を確認している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 327-331, 1993)。これは、modifier gene (s) の存在を示唆するものである。そこで、ヒトでは未知の腎癌の modifier 遺伝子の同定を Eker rat の系を用いて同定を試みている。今回、modifier gene (s) の mapping をすべく戻し交配ラット (LE/BNxLE) の作成を行った。更に、LB 系、F344 系および BN 系 3 種の congenic rats を作成を行った。

III. 研究成果

(1) 本邦のヒト結節性硬化症患者における遺伝子変異の解析:

ヒト結節性硬化症の患者 28 名 (24 例: 孤発例、4 例: 家族性) について *TSC1* および *TSC2* について遺伝子診断を行った。*TSC1* 遺伝子変異 4 例 (exons 4, 14, 15, 15) [3 例: frameshifts (内 1 例: 家族性)、1 例: nonsense mutation] で全て truncated 蛋白が作られる。*TSC2* 遺伝子変異は 6 例 (exons 16, 23, 33, 34, 40, 40) [2 例: frame shifts, 1 例: 18bp の in-frame deletion, 3 例: missense mutations] (全て孤発例) であった。truncated 蛋白が 2 例で予想された。これらの結果は、*TSC1* 遺伝子変異は家族歴を有する症例に多く、*TSC1* 遺伝子産物 (hamartin) の truncation を予測させる症例が多いという、諸外国からの報告に矛盾しなかった。今回、日本人において多型性を *TSC1* 遺伝子 (exons 10, 10, 12, 14, 14, 15, 15, 19)、および *TSC2* 遺伝子 (exons 7, 9, 14) に見いだした。遺伝診断の際に注意を要する。精神発達遅滞、痙攣、顔面血管線維腫の出現頻度および重症度に関しては、*TSC1* および *TSC2* の変異群間において、明らかな差異は認めなかった。また生成蛋白の予想される truncation の程度と臨床症状の重症度の間にも明らかな相関は認められなかった。本研究は、同一症例で全領域にわたって *TSC1* & *TSC2* 遺伝子変異を検索しえた本邦初の報告である (投稿中)。

(2) Eker (*Tsc2*) 癌抑制遺伝子のプロモーター領域の同定:

プロモーター領域に cEts 結合配列を見いだした。そして、cEts 結合配列に突然変異を入れると、プロモーター活性が著しく低下することをルシフェラーゼレポーターアッセイによって確認した。さらに、興味あることに、Eker (*Tsc2*) 癌抑制遺伝子のプロモーターは、bidirectional なプロモーター活性を持ち、head-to-head で隣接する endonuclease III gene と共有している。

a) Luciferase Assay:

Tsc2 プロモーター側に関しては、PvuII~PvuII (621bp) 及び PstI~PvuII (242bp) の断片より有意なプロモーター活性を確認した、さらに短い SacII~PvuII (108bp) の断片が同等のプロモーター活性を示した。*Octs3* プロモーター側においても、SacII~PvuII の断片にプロモーター活性が認められており、この部位が双方向性のコアプロモーター領域と考えられた。この部位に存在する 2 ヶ所の cEts 結合配列の欠失変異体 (78bp) で *Octs3* プロモーター活性は低下することは確認したが、さらに 2 ヶ所の cEts 結合配列各々に Ets ファミリーの結合を抑制することが知られている point mutation を導入した断片で両プロ

モーター共に活性の低下が認められた。特に *Tsc2* プロモーターに対して順方向となる cEts 結合配列に対して point mutation を入れた断片の方で低下の度合いが大きく、2ヶ所の cEts 結合配列に同時に point mutation を入れることで、活性の更なる低下が確認された。以上より、2つの cEts 結合配列が *Tsc2* 遺伝子及び *Oets3* 遺伝子発現を正に制御していることが示めされた（投稿準備中）。

b) Gel Mobility Shift Assay :

核抽出液の添加によりバンドのシフトが観察された。また、非標識 DNA 断片をプローブの 10 倍、50 倍、100 倍添加することにより、そのシフトバンドは消失した。一方、2ヶ所の cEts 結合配列に point mutation を入れた非標識の DNA 断片を添加した場合には、バンドの消失は観察されなかった。従って、このシフトバンドは cEts 結合配列に特異的な結合の結果生じたものと結論できた（投稿準備中）。

c) Northern Blot Analysis of the rat Ets-1 :

rat Ets-1 は、正常腎に比べ、Eker rat 腎癌細胞株 (LK9d-L、LK9d-R、ERC33)、Eker rat 腎癌組織でより高発現していた。

d) Immunohistochemical staining of Ets-1 :

周囲非癌部と比較して、腎癌部及び前癌病変において Ets-1 のより強い染色性が細胞質において確認された。Northern Blot Analysis の結果と併せて、Eker rat 腎癌での Ets-1 の高発現が確認され、以上 3) 4) の結果より Eker rat の腎発癌においては Ets-1 の発現が初期の段階で関与してくる可能性が示唆された。

(3) Eker (*Tsc2*) 遺伝子蛋白の存在様式の解析 :

ラットの各組織における本蛋白の局在様式を明らかにした。さらに病変部には truncated 蛋白の存在を観察した。特に、肺の一部の血管の平滑筋および膵臓のラ氏島 (β 細胞) において強く染色される細胞を同定し新しい知見を得た (Virchows Archiv, 434: 341-350, 1999)。肺の lymphangiomyomatosis、膵の insulinoma の合併がヒト結節性硬化症で頻度は少ないながら知られており、これらの病気の組織発生および TSC2 蛋白の機能を考える上で示唆に富む興味ある所見と考える。

(4) Eker rat における脳病変の同定 :

Eker ラット 19 個体において、subcortical and subependymal hamartomas が各 2 個体に見られた。1 個体で典型的な cortical tuber を発見した。1 個体の大脳には、原発性脳腫瘍があり、anaplastic gangliocytoma と診断された（投稿中）。

(5) IFN- γ transgenic mice と *Tsc2* gene knockout mice 交配による腎癌発生の抑制 :

腎癌治療を目指し *Tsc2* gene knockout mice と IFN γ transgenic mice を交配実験を行った。約 8 カ月 (7.5-9 カ月齢) で腎腫瘍の発生を病理組織学的に観察した。Double mice (*Tsc2* gene knockout mice と IFN γ transgenic mice) では腎発癌の抑制が明瞭に認め

られた (10/10 vs 0/8)。

(6) ラット腎癌発生の系統差 (Cancer modifier genes) の検討:

現在、congenic rats 8代まで達している。BN系 congenic rats で、顕著な腎癌発生の抑制がみられた。これによって、modifier gene (s)の存在は明らかになった。現在、modifier gene (s)の mapping をすべく戻し交配ラット (Eker/BN x Eker/LE) を約 100 匹作成した。

IV. 考察

TSC 患者において臨床症状と遺伝子異常の関連については、これまでに明らかな相関はないとする報告が多い。Jones らは *TSC1* 遺伝子に変異を有する患者の方が *TSC2* 遺伝子変異を有する患者よりも精神発達遅滞を示す傾向が少なかったと述べている。しかし、我々の症例では、精神発達遅滞に関しては両遺伝子変異群間に明らかな差は無いように思われた。但し、TSC に特徴的な病態である點頭てんかんは、*TSC2* 群で高い傾向にあったが、症例数が少なく、今後の課題である。*TSC1* 変異群では、最も蛋白が短いと予想される症例でも、精神発達遅滞はなく、點頭てんかんも発症せず、痙攣発作はコントロールされていた。現在、社会人として勤めており、生成蛋白の長さで臨床表現型には明らかな相関はなさそうである。*TSC2* 変異群でも、truncation を起こすと予想される症例で、精神発達遅滞は無いか軽度であり、発作のコントロールも良好であった。*TSC1* と *TSC2* 遺伝子がコードする蛋白である hamartin と tuberin が相互に interaction するという報告もあり、それぞれの蛋白の異常のみでは臨床表現型を予想するのは困難かもしれない。今後 *TSC1&2* 遺伝子産物の機能が明らかにされ、さらに症例が蓄積されれば、genotype と phenotype の関連も明らかにされるのではないかと期待される。多型性を除外すると *TSC1&TSC2* 遺伝子変異は $10/28=36\%$ であり、PCR--SSCP 法の検出感度を考慮に入れても期待値より低く、第 3 の原因遺伝子の存在の可能性を否定するものではない。

我々は Eker rat 腎癌における AP-1 の活性化、そして wild-type の *Tsc2* 遺伝子の発現に伴う AP-1 の活性化の抑制を予備的に確認している (投稿準備中)。本研究により、cEts 結合配列による *Tsc2* 遺伝子発現に対する正の制御が示唆されると共に、Ets-1 遺伝子 (Ets ファミリー) の Eker rat 腎癌への初期の段階での関与が考えられた。Ets ファミリーは主に AP-1 のような転写因子に協調的に働いて標的遺伝子の発現を活性化することが知られており、また Ets-1 遺伝子のプロモーター領域には AP-1 結合配列が存在している。*Tsc2* 遺伝子の反応経路において、AP-1 が活性化された場合、そのシグナルが Ets-1 (Ets ファミリー) さらには *Tsc2* へと伝達されることにより *Tsc2* 遺伝子産物である Tuberin が発現し、今度は逆に AP-1 の活性化を抑制するといった負のフィードバック機構が働いていると考えられる (投稿準備中)。その一方で、Eker rat 腎癌におけるように、*Tsc2* 遺伝子が機能を失なった状態では、この機構は障害され、また未知の標的癌関連遺伝子の発現が異常となり、癌化へ進むものと考えられる。現在、*Tsc2* 遺伝子及び *Ocst3* 遺伝子の発現を制御している 2ヶ所の cEts 結合配列に結合する蛋白因子の検索を Ets ファミリーの抗体を用いた Gel Mobility Shift Assay 等により進めている。さらに、Endonuclease III gene

発現変化が病気の表現型に与える影響の有無は今後の重要な点と考える。

今回、*Tse2* gene knockout mice と IFN γ transgenic mice を交配実験を行い腎発癌の抑制が観察された。腎癌発生抑制に、IFN- γ 、TNF- α 、Fas/Fas-L の関与が考えられ、化学療法抵抗性の腎癌に対して遺伝子治療を考える上で、格好のモデルを提供するものと期待される。これは、ヒト腎癌の遺伝子治療を考える上でも重要な知見と考える。

腫瘍発生の modifier gene (s) の単離、同定はヒト癌の遺伝的素因を分子レベルで解明することにつながり今後の重要なテーマと考える。

V. 研究成果の発表

1. Kobayashi, T., Urakami, S., Hirayama, Y., Yamamoto, T., Nishizawa, M., Takahara, T. and Hino, O.: Intragenic *Tsc2* somatic mutations as Knudson's second hit in spontaneous and chemically induced renal carcinomas in the Eker rat model. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88: 254-261, 1997.
2. Kobayashi, T., Mitani, H., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Ueda, M. Tamura, H. and Hino, O.: Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Eker rat model by introduction of a wild-type *Tsc2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3990-3993, 1997.
3. Kobayashi, T. and Hino, O.: Close proximity of the rat *Tsc2* and *Pkd1* genes. *Rat Genome 3*: 8-11, 1997.
4. Urakami, S., Tokuzen, R., Tsuda, H., Igawa, M. and Hino, O.: Somatic mutation of the tuberous sclerosis (*Tsc2*) tumor suppressor gene in chemically induced rat renal carcinoma cell. *J. Urology*, 158: 275-278, 1997.
5. Kobayashi, T., Urakami, S., Cheadle, J. P., Aspinwall, R., Harris, P., Sampson, J. R. and Hino, O.: Identification of a leader exon and a core promoter for the rat tuberous sclerosis 2 (*Tsc2*) gene and structural comparison with the human homologue. *Mammalian Genome*, 8: 554-558, 1997.
6. Miki, S., Miki, Y., Mitani, H., Sato, B., Yamamoto, M. and Hino, O.: Hyperlipidemia enhancement of renal preneoplastia but not tumor formation is due to elevated apoptosis in the Eker rat. *Cancer Res.*, 57: 4673-4676, 1997.
7. Urakami, S., Tsuchiya, H., Orimoto, K., Kobayashi, T., Igawa, M. and Hino, O.: Overexpression of members of the AP-1 transcriptional factor family from an early stage of renal carcinogenesis and inhibition of cell growth by AP-1 gene antisense oligonucleotides in the *Tsc2* gene mutant (Eker) rat model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241: 24-30, 1997.
8. Knudson, A. G. and Hino, O.: Genetic environmental interactions in cancer susceptibility in animal models. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 1669-1672, 1997.
9. Okamoto, T., Furuya, M., Yamakawa, T., Yamamura, K. and Hino, O.: Induction of tumor necrosis factor- α mRNA in the kidney of the mouse chronic hepatitis model. *Jpn. J. Pharmacol.*, 76: 97-99, 1998.

10. Satake, N., Urakami, S., Hirayama, Y., Izumi, K. and Hino, O.: Biallelic mutations of the Tsc2 gene in chemically induced rat renal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 77: 895-900, 1998.
11. Orimoto, K., Tsuchiya, H., Sakurai, J., Nishizawa, M. and Hino, O.: Identification of cDNAs induced by the tumor suppressor Tsc2 gene using a conditional expression system in Tsc2 mutant (Eker) rat renal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 728-733, 1998.
12. Toyokuni, S., Okada, K., Kondo, S., Nishioka, H., Tanaka, T., Nishiyama, Y., Hino, O. and Hiai, H.: Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independently of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 814-820, 1998.
13. Okamoto, T., Yamakawa, T., Yamamura, K. and Hino, O.: Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expression in interferon- γ transgenic mouse liver. *Jpn. J. Pharmacol.*, 78: 233-235, 1998.
14. Fukuda, T., Mitani, H., Tsutsumi, M., Konishi, Y. and Hino, O.: Specific induction of hepatocellular adenomas by transplacental administration of ENU in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat. *Int. J. Oncology*, 13: 957-961, 1998.
15. Fukuda, T., Hirayama, Y., Mitani, H., Maeda, H., Konishi, Y. and Hino, O.: Generation of metastatic variants of Eker renal carcinoma cell lines for experimental investigation of renal cancer metastasis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 86: 905-909, 1998.
16. Fukuda, T., Kobayashi, T., Yasui, H., Tsutsumi, M., Konishi, Y. and Hino, O.: Distribution of Tsc2 protein in various normal rat tissues and renal tumors of Tsc2 mutant (Eker) rat detected by immunohistochemistry. *Virchows Archiv*, 434:3 41-350, 1999.
17. Okamoto, T., Nakano, Y., Yamakawa, T., Hara, K., Yamamura, K. and Hino, O.: Chronic hepatitis in interferon-g transgenic mice is associated with elevated CPP32-like activity and interleukin-1 β converting enzyme activity suppression. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79: 289-294, 1999.
18. Satake, N., Kobayashi, T., Kobayashi, E., Izumi, K. and Hino, O.: Isolation and characterization of a rat homologue of the human tuberous sclerosis 1 gene (TSC1) and analysis of its mutations in rat renal carcinomas. *Cancer Res.*, 59: 849-855, 1999.
19. Kobayashi, T., Minow, O., Kuno, J., Mitani, H., Hino, O. and Noda T: Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomatosis and embryonic lethality caused by a germline Tsc 2 mutation in mice. *Cancer Res.*, 59: 1206-1211, 1999.
20. Hino, O., Satake, N., Kobayashi, T. and Kajino, K.: Carcinogenesis in tuberous sclerosis. Gann Monograph on Cancer Research No. 46: (Eds. Ohtuka, F., Hino, O. and Niimura, M.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 101-111, 1999.

21. Okamoto, T., Yamamura, K. and Hino, O.: The mouse interferon-g transgene chronic hepatitis model. *Int. J. Molecular Medicine*, 3: 517-520, 1999.
22. Hino, O., Fukuda, T., Satake, N., Kobayashi, T., Honda, S., Orimoto, K., Yamashita, Y. and Kikuchi, Y.: TSC2 gene mutant (Eker) rat model of a mendelian dominantly inherited cancer. *Prog. Exp. Tumor Res.* (Eds. Hiai, H. and Hino, O.), Karger, Basel, 35: 95-108, 1999.
23. Akbar, S. M. F., Kajino, K., Tanimoto, K., Yamamura, K., Onji, M., and Hino, O.: Unique features of dendritic cells in IFN- γ transgenic mice: relevance to cancer development and therapeutic implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259: 294-299, 1999
24. Kajino, K. and Hino, O.: TSC 1 and TSC 2 genes mutations in Human Kidney tumors. "Kidney Cancer" (Hereditary and Non-Hereditary Kidney Cancers) In *Contribution to nephrology* (Ed. Hino, O.), Karger, Basel, in press.
25. Fukuda, T., Kido, A., Kajino, K., Tsutsumi, M., Miyauchi, Y., Tsujiuchi, T., Konishi, Y. and Hino, O.: Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press
26. Yamashita, Y., Ono, J., Okada, S., Wataya-Kaneda, M., Yoshikawa, K., Nishizawa, M., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Seyama, K. and Hino, O.: Analysis of the entire TSC1 and TSC2 genes for germline mutations in Japanese cases of tuberous sclerosis: Reports of ten mutations. (submitted).
27. Mizuguchi, M., Takashima, S., Mitani, H. and Hino, O.: Cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis. (submitted).
28. 樋野興夫: Phacomatosis の研究の現状、病理と臨床、15: 96-99, 1997
29. 安井英明、福田智一、小林敏之、樋野興夫: TSC2/Tsc2 遺伝子産物の発現に関する最近の知見と問題点、病理と臨床、15: 163-165, 1997
30. 樋野興夫: 小児疾患研究におけるモデル動物、小児外科、29: 129, 1997
31. 樋野興夫、菊地泰:腎癌(Eker ラット)、小児外科、29: 188-193, 1997
32. 樋野興夫: 癌の発生、*Molecular Medicine*、34: 664-670, 1997
33. 樋野興夫、佐竹宣法:腎癌における VHL 遺伝子と TSC2 遺伝子の役割、*Molecular Medicine*、34: 728-733, 1997
34. 樋野興夫: 家族性腫瘍 Knudson 理論、癌と化学療法、24: 924-929, 1997
35. 樋野興夫、梶野一徳、浦上慎司、福田智一、山下与企彦、小林敏之、織本健司、三谷弘明: ヒト結節性硬化症遺伝子 (Tsc2) mutant (Eker rat) から見たヒトとラットにおける発癌の相違。日本疾患モデル学会記録、13:108, 1997
36. 樋野興夫: von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子および TSC2 遺伝子。癌と化学療法、24: 1386-1391, 1997
37. 樋野興夫: 腎癌モデル動物。 *Kirin Information on Drugs and Science*、7: 12-14, 1997
38. 樋野興夫: 腎がんモデル動物の病態。遺伝、52: 1, 1997

39. 樋野興夫：がんの遺伝と遺伝子の不活性化－クヌドソン理論を中心に－。遺伝、52：23-28, 1998
40. 樋野興夫：ヒト結節性硬化症。遺伝子医学、2：123-126, 1998
41. 樋野興夫、菊地泰：腎癌：Ekerラット。病理と臨床、16：301-306, 1998
42. Knudson, A, G.、樋野興夫：癌化遺伝子研究の現在、医学界新聞（9月22日号）、1997
43. 樋野興夫：癌抑制遺伝子、現代医療、29：3087-3092, 1997
44. 樋野興夫、佐竹宣夫、小林敏之、山下与企彦：VHLとTSC遺伝子、現代医療、30：1813-1817, 1998.
45. 樋野興夫、小林敏之、山下与企彦：結節性硬化症：TSC1, TSC2 遺伝子、*Molecular Medicine* 別冊（家族性腫瘍）、221-224, 1998.
46. 樋野興夫、福田智一：癌－遺伝性腎癌を中心として。*Molecular Medicine*, 35：1291-1294, 1998
47. 樋野興夫：結節性硬化症(tuberous sclerosis)、(高倉公朋、宮本忠雄監修、高橋徹、設楽信行、清水輝夫 編) 最新脳と神経科学シリーズ腫瘍性病変の神経科学、pp.68-74、メジカルビュー、1998.
48. 田矢洋一、樋野興夫、貫和敏博：癌遺伝子と癌抑制遺伝子。現代医療、30：1722-1734, 1998.
49. 樋野興夫：悠々として発癌研究－21世紀に向かって。*Molecular Medicine* 35：686-687, 1998.
50. 樋野興夫：Cancer genetics と高癌化状態。*Molecular Medicine* 35：762-767, 1998.
51. 樋野興夫：多段階発癌機構。臨床消化器内科 13：890-898, 1998.
52. 樋野興夫：病理学から見た疾患モデル－時代に生きる－。びょうりのバスケット 12：1-2, 1998.
53. 樋野興夫：ヒト多段階発癌研究の戦略：遺伝性癌に学ぶ。*News Letter* 1-4, 1998.
54. 樋野興夫：多段階発癌からみた消化器癌－大腸癌と肝癌を中心に。別刷、医学のあゆみ 109-111, 1998.
55. 樋野興夫：結節性硬化症。*Brain and Nerve* 51：11-16, 1999.
56. 北川知行、樋野興夫：動物モデルによるヒト発がん研究。*medicina* 36：185-191, 1999.
57. 杉村隆、樋野興夫：ヒト多段階発癌研究の戦略。*Molecular Medicine* 36：348-357, 1999.
58. 本田聡、樋野興夫：腎癌の多段階発癌。*Molecular Medicine* 36：424-432, 1999.
59. 樋野興夫：腎癌発生機構の解明。病理と臨床臨時増刊号, 17：176-178, 1999.
60. 樋野興夫：ヒト結節性硬化症。病理と臨床臨時増刊号, 17：338, 1999.
61. 樋野興夫：癌抑制遺伝子と発癌－Eker rat/Tsc2 を中心に－。「泌尿器科腫瘍学入門」（日本医学館）印刷中
62. 樋野興夫：ヒト多段階発癌研究の戦略－遺伝性癌に学ぶ－。現代医療、印刷中
63. 本田聡、樋野興夫：家族性腎癌(VHL, TSC 1, TSC 2, c-MET, WT 1 遺伝子)。遺伝子医学印刷中