

厚生科学研究研究費補助金
神経皮膚症候群研究事業

神経皮膚症候群の新しい治療法の
開発と治療指針に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 大塚 藤 男

平成13 (2001) 年 3 月

目 次

研究班名簿

総括研究報告

神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と

治療指針作製に関する研究

主任研究者 大塚藤男…………… 1

分担研究報告

NF1 定点モニタリングの継続性と問題点

縣 俊彦・豊島裕子・清水英佑・高木廣文・早川東作・黒沢美智子・稲葉 裕・柳 修平・大塚藤男… 5

神経線維腫症NF1・NF2原因遺伝子の細胞内機能と病態との関連

佐谷秀行・徳王 宏・湯之上俊二・馮 立平・荒木令江…………… 8

神経線維腫症1 (NF1) 患者に生じる悪性神経鞘腫瘍でのp53 遺伝子変異に関する研究

新村真人…………… 13

培養神経線維腫細胞に対する γ インタフェロンの増殖阻害効果に関する研究

中山樹一郎…………… 14

NF1 神経線維腫に対する β -インターフェロンの増殖抑制効果の検討

大塚藤男・丸山智恵・藤澤裕志・今門純久…………… 17

SCIDマウスに移植した神経線維腫に対するTNP-470の影響 (続報)

今門純久・丸山智恵・市川栄子・大塚藤男…………… 20

神経線維腫症1型および5型における神経線維腫内の肥満細胞 profile

三橋善比古・片桐美之・穂積 豊…………… 22

Neurofibromatosis type 1 の神経耳科学的所見

土田哲也・倉持 朗・伊藤彰紀・水野正浩…………… 26

NF1 に合併した先天性脛骨偽関節タイプ2 の骨切り術による治療経験

会田育男…………… 30

神経線維腫症にともなう脊椎変形が多施設調査結果報告

中村耕三・北川知明・大西五三男・岩崎元重…………… 33

先天性脛骨関節症の多施設調査結果報告

中村耕三・大西五三男・松山順太郎・佐藤和強・岡崎裕司・仲村一郎…………… 34

神経線維腫症2 の我が国における実態

縣 俊彦・豊島裕子・清水英佑・高木廣文・黒沢美智子・稲葉 裕・柳 修平・新村真人・大塚藤男… 36

NF2 の治療方針：全国調査の結果から

吉田 純・齋藤 清…………… 44

多発性脊髄腫瘍の臨床的特徴 —全国調査結果—	
中村耕三・岩崎元重・大西五三男・北川知明……………	46
神経線維腫症2型に伴う神経鞘腫における VEGF の発現	
吉田 純・須崎法幸・加藤美穂子・齋藤 清・長坂徹郎……………	48
隆起性皮膚繊維肉腫に関連したCOL1A1/PDGFB-chain 融合遺伝子の機能的解析	
島田真路……………	50
右大腿に特異な限局性腫大 —一種の localized myofasciitis—を生じたtuberous sclerosisの1例	
土田哲也・倉持 朗・福山幸夫……………	52
癌性化境遇:遺伝子発現病からみた多彩なヒト結節性硬化症の病態の解明	
樋野興夫……………	56
結節性硬化症皮膚病変部細胞の特徴と増殖阻害剤の開発に関する研究	
大野耕策……………	58
結節性硬化症の脳病変の病態生理に関する研究	
水口 雅……………	61
結節性硬化症の治療の為の基礎的検討 —P40の関与—	
吉川邦彦・金田真里・金田安史・樋野興夫……………	63

治療指針作製に向けての案

神経線維腫症1の治療指針案	
土田 哲也・倉持 朗……………	69
神経皮膚症候群一型にともなう先天性脛骨偽関節症に対する治療指針案	
中村 耕三・大西五三男・岡崎 裕司・佐藤 和強・仲村 一郎……………	70
神経線維腫症一型にともなう脊椎変形に対する治療指針案	
中村 耕三・大西五三男・北川 知明・岩崎 元重……………	71
神経線維腫症に合併する多発性脊椎腫瘍の治療指針案	
中村 耕三・大西五三男・岩崎 元重・北川 知明……………	72
神経線維腫症2型の治療指針案	
吉田 純・齋藤 清……………	73
結節性硬化症の治療指針案	
水口 雅・大野耕策……………	75

ガイドライン

神経皮膚症候群（母斑症）における遺伝子解析研究とこれを応用した診療に関するガイドライン（案）……	77
研究成果の刊行に関する一覧表……………	93
第1回総会プログラム……………	97
第2回総会プログラム……………	99

神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作製に関する研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	大塚 藤 男	筑波大学臨床医学系皮膚科	教 授
分担研究者	大野 耕 策	鳥取大学医学部神経生物学	教 授
	佐谷 秀 行	熊本大学医学部腫瘍医学	教 授
	中村 耕 三	東京大学医学部整形外科学	教 授
	中山 樹一郎	福岡大学医学部皮膚科	教 授
	新村 眞 人	東京慈恵会医科大学皮膚科	教 授
	樋野 興 夫	癌研究所実験病理	部 長
	水口 雅	自治医科大学小児科	助 教 授
	吉川 邦 彦	大阪大学医学部皮膚科	教 授
	吉田 純	名古屋大学医学部脳神経外科	教 授
研究協力者	會田 育 男	筑波大学臨床医学系整形外科	講 師
	縣 俊 彦	東京慈恵会医科大学環境保健医学	助 教 授
	今門 純 久	筑波大学臨床医学系皮膚科	助 教 授
	緒方 克 己	宮崎医科大学皮膚科	講 師
	島田 眞 路	山梨医科大学皮膚科	教 授
	土田 哲 也	埼玉医科大学皮膚科	教 授
	三橋 善比古	山形大学医学部皮膚科	助 教 授
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	今門 純 久	筑波大学臨床医学系皮膚科 〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL (0298) 53-3128 FAX (0298) 53-3217	助 教 授

総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針
作製に関する研究

主任研究者	大塚 藤 男	筑波大学臨床医学系皮膚科	教 授
分担研究者	大野 耕 策	鳥取大学医学部神経生物学	教 授
	佐谷 秀 行	熊本大学医学部腫瘍医学	教 授
	中村 耕 三	東京大学医学部整形外科	教 授
	中山 樹一郎	福岡大学医学部皮膚科	教 授
	新村 眞 人	東京慈恵会医科大学皮膚科	教 授
	樋野 興 夫	癌研究所実験病理	部 長
	水口 雅	自治医科大学小児科	助教授
	吉川 邦彦	大阪大学医学部皮膚科	教 授
	吉田 純	名古屋大学医学部脳神経外科	教 授

A. 研究目的

“神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作製”を研究課題として研究を推進している。近年、神経線維腫症のNF1とNF2、および結節性硬化症（TS）の責任遺伝子（NF1遺伝子、NF2遺伝子、TSC1遺伝子、TSC2遺伝子）とその蛋白産物（neurofibromin, merlin, hamartin, tuberin）が同定され、遺伝子変異や遺伝子産物の細胞内機能が分子レベルで解明されつつある。しかし、その治療は対症療法のみであり、患者QOLは満足すべき状態からほど遠い。分子レベルや細胞レベルで得られた多くの病態生理学的知見を基に治療に結びつく可能性のあるものを探索的に研究し、新しい治療法の開発を目指す。遺伝子変異や蛋白産物の機能解析なども治療法の開発の観点重視して推進する。一方、対症療法とは言え、レーザー治療法の普及、各種外科的治療法の改善、改良など、神経線維腫症や結節性硬化症の治療法は近年種々工夫されているので、これを統合して治療指針を作製することを目標としている。

B. 研究結果

1. 疫学、臨床統計

1999年の受診患者に関してNF1の定点モニタリング調査がおこなわれた。回収率は65%であったが、定点モニタリングは数年に一度同一対象機関で実施するため対象機関の負担が大きく、調査を拒否されることも

あった。これらの問題点への対応策が必要と考えた（縣）。NF2の全国調査を初めて行なった。調査対象 8,700診療科の回収率58%、詳細な臨床疫学調査により77名の患者を把握した。多くは脳神経外科でフォローされ、症状の変化に伴いしばしば治療に抗して進行することを明らかにした（縣）。

2. 病因、病態生理と治療法開発

[NF1について]

NF1蛋白の細胞内機能を解析した。NF1蛋白質は特殊な刺激や増殖因子のもとでRas-GAP機能を失活しRasを上昇させたが、これはNF1蛋白のcAMP (PKA) によるリン酸化によって制御され、細胞刺激初期におけるRasシグナル制御に重要であった。NF1-GAP活性は神経系細胞で高く、NGF刺激でも上昇するが、活性上昇とNF1 Type II からType I へのalternative splicing変化、細胞の神経突起伸長現象と相関したので、NF1蛋白質は神経細胞の分化誘導シグナルに関与する可能性が示唆された。NF1の病態発生子防、治療のための基礎的情報を得た（佐谷）。NF1と発生過程で一部の体細胞に突然変異が生じた（モザイク）のNF5についてその神経線維腫内の肥満細胞の頻度、亜型を検索した。ともに健常人乳頭層の2倍程度で、粘膜型が増加していた。肥満細胞からみる限り、両者の相違を見いだせなかった（三橋）。多くの悪性腫瘍で悪性化の進展にp53遺伝子変異の関与が知られている。NF1に生じた悪性神経鞘腫瘍（MPNST）についてp53遺伝子変異の有無をSSCP

法とダイレクトシーケンス法を用いて検索したが、p53の変異は見いだせなかった。MPNSTの発症にはp53の変異以外の機序を考える必要がある(新村)。NF1の21例に頭部MRIを施行し、11例にunidentified bright object (UBOs)を認めた。UBOsのある11例とUBOsのない10例とを比較すると、前者には眼球運動異常、聴性脳幹反応異常など後頭蓋窩障害を示唆する所見があった。神経耳科学的検査はNF1の中樞神経障害の経過観察に有用である(土田)。NF1神経線維腫由来培養細胞に1,000単位/mlの β インターフェロン(INF β)を添加すると増殖が30%程度まで抑制でき、p21の早期発現、RB蛋白のリン酸化の遅延、サイクリンDの発現遅延を確認した。同意を得た患者の神経線維腫に30万単位のINF β を局注したが、明らかな抑制効果は見られなかった(大塚)。

血管増殖抑制効果のあるTNP-470を神経線維腫を移植したSCIDマウスに投与すると対照薬投与群に比して線維腫内血管数が減少したが、BrdU陽性細胞は増加した。血管減少に伴う代償性増加と推測したが、腫瘍抑制効果はなかった(今門)。1,000単位/mlの γ INFを神経線維腫培養細胞に添加すると3-6日後の細胞数で40%程度の増殖阻害、DNA合成阻害率は1日後で100%、3-5日後で70%であった。 γ INFは神経線維腫の増殖を抑制する可能性が高く、治療への応用を期待できる(中山)。NF1の多発性脊髄腫瘍を全国調査したところ硬膜内髄外の神経線維腫が多く、10%に悪性神経鞘腫瘍が発生した。NF1の多発性脊髄腫瘍の特徴を明らかにした(中村)。

[NF2について]

DNA傷害を誘起したMEF細胞内でNF2蛋白質はNF2結合蛋白PARPによりpoly-ADP-ribosyl化されて細胞質から核近傍へ移行した。PARP $^{-/-}$ MEFではこの現象は起こらず、細胞死に陥ったが、PARP導入で相補された。PARP、DNA-PKsとNF2蛋白質の相互作用がDNA損傷修復、細胞死のシグナル制御に関与する可能性を明らかにした(佐谷)。

NF2の神経鞘腫と多発性、孤発性神経鞘腫のVEGF発現を免疫染色とmRNA発現により検討した。NF2に伴う神経鞘腫ではVEGF発現が強い傾向があり、VEGF抑制による治療の可能性が示唆された(吉田)。NF2の多発性脊髄腫瘍を全国調査したところ硬膜内髄外の神経鞘腫が多く、約15%に髄内腫瘍が生ずること、悪性腫瘍がないことなど、NF2の多発性脊髄腫瘍の特徴を明らかにした(中村)。

[TSについて]

変異Tsc2遺伝子(Rap1GAP相同部分欠失、Rap1GAPのみ有するなど4種類)を導入したtransgenic Eker ratを作製してホモ接合体の致死回避の有無とヘテロ接合体の腎発癌の抑制の有無を調べたところ、胎性致死と腎発癌における機能ドメインの解離を見いだした(樋野)。ヒトの結節性硬化症の原因遺伝子にはTSC2とTSC1とがあるが、両者間で臨床症状の差異はほとんどない。Tsc2とTsc1遺伝子それぞれのknockoutマウスを作製するとそのヘテロ接合体では後者が前者より腎発癌が明らかに軽度であった。両者の交配実験を進行中である(樋野)。多段階発癌過程で特異的に発現する新しい遺伝子Nibanを単離、同定したが、その遺伝子産物はヒト腎癌でも発現することを明らかにし、腎腫瘍のマーカーになる可能性が示された(樋野)。TSにおいて蛋白p40は特異的に減少し、細胞周期の異常をもたらすが、p40遺伝子導入してもTSC1細胞、TSC2細胞の細胞周期異常は回復せず、アポトーシスが増加した。これにtuberin遺伝子を導入すると細胞周期異常が正常化し、アポトーシスも減少した。TSの腫瘍形成を抑制するのにtuberinを用いる可能性、あるいはp40によりアポトーシスを誘導して腫瘍を自壊、縮小させる可能性が示唆された(吉川)。成人TS患者の脳の異常巨細胞の一部にdoublecortinとDCAMKL1(doublecortinと高いホモロジーを有するcalcium calmodulin-dependent kinase)の蛋白発現を見いだした。TS脳に胎児期蛋白が残存していることを示し、異常巨細胞の分化異常や神経細胞移動障害と関連するなど注目すべき所見と考えた(水口)。Hamartinは各種細胞の細胞質のみならず核内にも局在するが、ラット神経細胞のPC12細胞をNGFで刺激すると神経突起の伸張とともにhamartinは核から細胞質へ移動した。アンチセンスオリゴDNA導入によりhamartin発現を抑制すると神経突起が異常に伸張したが、これは低分子量G蛋白の活性変異体遺伝子導入で抑制された。同活性変異体遺伝子導入PC12では増殖状態でもhamartinは細胞質に局在していた。これらの所見は神経細胞分化にhamartinが重要な役割を果たしていることを示しており、細胞増殖阻害薬開発の基礎的知見を提供していると考えた(大野)。TSに生じた分類不能の局所腫大性myofascitisの筋、筋膜内、結合織間にangiofibromaで見られる多数の間葉系細胞を認めた。外的刺激による組織損傷の修復機序にTS特異的angiofibroma形成機序が関与して特殊なmyofascitisができたと推測した(土田)。

3. 治療

[NF1について]

脊椎変形と先天性脛骨偽関節症の治療法について多施設調査を行なった。前者のdystrophic typeは手術が必要で特にinstrumentation使用で矯正率が高いことが示され、頸椎変形は痙性四肢麻痺の合併率が高く、多椎間固定やinstrumentationの必要性が示唆された。後者ではイリザロフ法や血管柄付き骨移植などの手術により骨癒合率の改善をみているが、多数回の手術を要したり、骨癒合の得られなかった例の存在などの問題点も明らかになった（中村）。1歳6月のNF1男児左脛骨に38度の内反、63度の後弯を認めた。変形部の骨切りでは癒合を得にくいので、変形近位3cm部で64度のclosed wedge osteotomyを施行、4ヶ月で骨癒合が得られた。骨折前で彎曲部位がある程度の力学的強度を持つ症例がこの骨切り術の適応と考えた（会田）。NF1皮膚病変の治療指針案を作製した（土田）。NF1の整形外科的病変について全国アンケート調査などを基礎に治療指針案を作製した（中村）。これらの指針案を作製する予定である。

[NF2について]

NF2の治療指針作製のために全国調査をおこない治療指針案を作製した（吉田）。指針案を検討して治療指針を作製する予定である。

[TSについて]

TSの治療指針案を作製した（大野、水口）。指針案を検討して治療指針を作製する予定である。

[その他]

神経皮膚症候群（NF1, NF2, TS）における遺伝子検査ガイドラインを作製した。遺伝子検査については各領域からガイドラインが提唱されているが、神経皮膚症候群の特殊性を考慮して作製したものであり、公表することにした（大塚、樋野、新村）。

C. 研究成果のまとめと結論

疫学、病態、治療の研究を推進しているが、特に病態と関連した新しい治療法の開発を目指して探索的研究を行っている。直ちに臨床応用できるような成果は得られていないが、病態の解明と相まって着実な結果が得られつつある。また、各種病変の治療法の解析、全国調査などを通して治療指針案ができたので、次年度一年で検討を加えて治療指針を作製、公表する予定である。

分担研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業） 分担研究報告書

NF1定点モニタリングの継続性と問題点

研究協力者 縣 俊彦 東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座助教授

研究要旨

特定疾患調査研究班は平成11年度からは厚生科学研究事業に変更になるなど大きく変化している。神経線維腫症も治療対象研究疾患となり、その実態把握は急務で、全国疫学調査に加え、定点モニタリング調査も実施されることとなった。

その主な目的は 1. モニタリングの全国調査代替性の検討、2. 継続的情報収集体制の整備、3. 患者数、臨床情報等の経年推移の把握の3点である。今回は定点モニタリング調査を行い、過去の調査と比較検討し、モニタリングの継続性と問題点に関し報告する。

1999年の受診患者に関してNF1定点モニタリング調査を実施した。対象は、今までと同じ72診療科である。調査項目は前回同様、性、年齢、疫学的項目、臨床症状等である。過去の全国調査、モニタリング調査との特性について比較検討し、モニタリングの継続性と問題点について検討した。

定点モニタリング調査の回収率65%（46/71，拒否1）は、94年調査の58%に比べれば高いが、97年（68%）とほぼ同等である。98年（76%、患者概数調査）は簡単な調査であったから回収率が高かったのであろう。把握患者は456名で、97年モニタリング調査469名とほぼ同数である。94年の全国調査では868名であったのでそれに比べるとかなり少ない。また、98年の概数調査544名に比べても若干少ない。

定点モニタリング調査は、効率性、継続性を鑑み、数年に1度同一対象機関を対象に実施するため、対象となる医療機関の負担は膨大である。特に患者数の多い医療機関、又患者数が少ないにしてもカルテ、医療情報、病名が電算化されておらず手作業で対象疾患患者を抽出するような医療機関ではその負担は甚大である。今回も調査拒否の医療機関が出るなど今後何らかの対策も検討する必要がある。

豊島 裕子 清水 英佑

東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座

高木 廣文 新潟大学医学部・看護学

早川 東作 東京農工大・保健管理センター

黒沢美智子 稲葉 裕

順天堂大学医学部・衛生学

柳 修平 川崎医療福祉大学・保健看護学

大塚 藤男 筑波大学医学部・皮膚科学

携)に加え、『QOLの向上を目指した福祉施策の推進』が追加された。また、神経線維腫症も治療対象研究疾患に指定され、その実態把握は、急務となった。そして、全国疫学調査に加え、定点モニタリング調査も実施されることとなった¹⁾⁻¹⁶⁾。

その主な目的は

1. NF1の定点モニタリングが全国疫学調査の代替となるかを検討する。
2. 継続的情報収集体制の整備をする。
3. 患者数、疫学情報、臨床情報等の経年推移を把握する。

今回は1999年定点モニタリング調査を行い、過去の全国調査、モニタリング調査との特性について比較し、継続性、問題点も検討したので報告する。

A. 研究目的

厚生省の特定疾患対策は平成8年度に大幅な改定が行われ、さらに11年度からは厚生科学研究事業に変更になるなど大きく変化している。疾患対策も従来の4項目（調査研究の推進、医療設備の整備、医療費の自己負担の解消、地域における保健医療福祉の充実・連

B. 研究方法

郵送法により、1999年の受診患者に関してNFI 定点モニタリング調査を実施した。対象は、過去の調査と同一の72診療科である。調査項目も前回同様、性、年齢、家族歴、臨床症状等である。過去の全国調査、モニタリング調査との特性について比較検討し、さらに継続性、問題点について報告する。

C. 研究結果

定点モニタリング調査の回収率：65% (46/71, 拒否1)、94年調査の58%に比べれば回収率は高いが、97年(68%、49/72)とほぼ同等である。98年(76%、55/72, 患者概数調査、協力度調査)は簡単な調査であったから回収率が高かったのであろう。

対象施設は皮膚科が約半数を占める。次いで形成外科が多い。回収数も皮膚科29、形成外科8となっている(表1)。回収率でも、皮膚科は各年次とも8割前後と高く、形成外科も6割以上とかなり高い。他の診療科は、年次によるばらつきもあるが概して低い(表2)。対象施設が少ないので、さらに回収率を高め調査精度を安定させる必要がある。

把握患者は456名で、97年モニタリング調査469名とほぼ同数である。94年の全国調査では886名であったのでそれに比べるとかなり少ない。また、98年の概数調査544名に比べても若干少ない。報告患者数は各年次とも半数以上が皮膚科からで、300名を超えている。次いで、眼科、形成外科などが多い。次に多いのが小児科、整形外科などである(表3)。

D. 考察

調査の効率性、継続性を考え、厚生省神経皮膚症候群調査研究班、厚生省特定疾患 皮膚・結合組織疾患調査研究班 神経皮膚症候群分科会、神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作成に関する研究班および特定疾患の疫学に関する研究班では、定点モニタリング調査は、数年に1度同一対象機関を対象に実施する。そのため、対象となる医療機関の負担は膨大である。特に患者数の多い医療機関、又患者数が少ないにしてもカルテ、医療情報、病名が電算化されておらず手作業で対象疾患患者を抽出するような医療機関ではその負担は甚大である。今回も実際に調査拒否の

医療機関が出るなどあった。今後対象機関の希望も考慮し、記載法、転記人員などに関し、何らかの対策も検討する必要がある。

E. 結論

定点モニタリング調査の回収率：65% (46/71, 拒否1)で、把握患者は456名と、97年モニタリング調査とはほぼ同様な結果が得られた。しかし、対象となる医療機関の負担は膨大であるため、調査拒否の医療機関が出るなどしている。今後何らかの対策も検討する必要がある。

表1. 年次別診療科別返送数

	94年	97年	98年	2000年
眼 科	8	5	5	3
形成外科	13	9	10	8
耳 鼻 科	1	0	0	0
小 児 科	7	3	4	2
整形外科	6	3	4	3
脳 外 科	2	2	1	1
皮 膚 科	35	27	31	29
合 計	72	49	55	46

表2. モニタリング調査の年次別診療科別返送割合:%

	送付	97年	98年	2000年
眼 科	8	62.5	62.5	37.5
形成外科	13	69.2	76.9	66.7
耳 鼻 科	1	0	0	0
小 児 科	7	42.9	57.1	28.6
整形外科	6	50	66.7	50
脳 外 科	2	100	50	50
皮 膚 科	35	77.1	88.6	82.9
合 計	72	68.1	76.4	64.8

2000年；拒否1：形成外科

表3. 年次別診療科別報告患者数

	94年	97年	98年	2000年
眼 科	152	55	56	56
形成外科	112	45	59	40
耳 鼻 科	5	0	0	0
小 児 科	75	23	46	10
整形外科	65	34	38	24
脳 外 科	14	7	3	6
皮 膚 科	463	305	342	320
合 計	886	469	544	456

F. 文 献

- 1) 橋本修二、川村孝、大野良之、縣俊彦、大塚藤男、神経線維腫症1の定点モニタリング—研究計画—、厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成8年度研究業績41～3,1997
- 2) Poyhonen M, Kytola S, Leisti J. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet.* 2000 Aug; 37 (8) :632-6.
- 3) Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 1999 Mar 26; 89 (1) :1-6.
- 4) 新村真人. Recklinghausen病、日本臨床:50:増刊:168-175,1992
- 5) 縣俊彦、西村理明、高木廣文、稲葉裕. レックリングハウゼン病と結節性硬化症の疫学研究の現状. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成5年度研究業績5～12,1994
- 6) 縣俊彦、西村理明、門倉真人、新村真人、本田まり子、舟崎裕記、大塚藤男、中内洋一、吉田純、玉腰暁子、川村孝、大野良之、高木廣文、稲葉裕. 神経皮膚症候群全国疫学調査・第1次調査—中間報告—、厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成6年度研究業績5～9,1995
- 7) 縣俊彦、西村理明、門倉真人、新村真人、本田まり子、舟崎裕記、大塚藤男、中内洋一、吉田純、玉腰暁子、川村孝、大野良之、高木廣文、稲葉裕. 神経皮膚症候群の家系内発症に関する研究. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成7年度研究業績5～10,1996
- 8) 縣俊彦、西村理明、浅尾啓子、清水英佑、新村真人、大塚藤男、玉腰暁子、川村孝、大野良之、高木廣

文、稲葉裕. 非回答集団を考慮したNF1の有病率推計. 厚生省 特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成8年度研究業績5～9,1997

9) 縣俊彦、西村理明、浅尾啓子、清水英佑、新村真人、大塚藤男、玉腰暁子、川村孝、大野良之、高木廣文、稲葉裕. NF1患者のQOLと臨床症状に関する基礎的研究. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成8年度研究業績10～14,1997

10) 縣俊彦、西村理明、浅尾啓子、新村真人、大塚藤男、高木廣文、稲葉裕、玉腰暁子、川村孝、大野良之、柳修平. linear logistic regression modelにおけるsmoothing効果の検討. 第16回SASユーザー会研究論文集 129-136、1997.

11) 縣俊彦. 神経線維腫症1 (NF1) の遺伝形式・家族歴に関する研究. *医学と生物学.*135:1:17-21,1997

12) 縣俊彦. NF1 (神経線維腫症1、レックリングハウゼン病) 患者の疫学特性とQOLに関する研究. *医学と生物学.*135:3:93-97,1997

13) 新村真人: 神経皮膚症候群、からだの科学:190:210-211,1996

14) 川戸美由紀、橋本修二、川村孝、大野良之、縣俊彦、大塚藤男「神経線維腫症1の定点モニタリング1997・1998調査成績」厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成10年度研究業績119～126,1999

15) 縣俊彦、清水英佑、大塚藤男、大野良之、橋本修二、高木廣文、稲葉裕「NF1の定点モニタリング重複把握者の特性」厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成11年度研究業績2000、5-9

16) 縣俊彦、清水英佑、橋本修二、柳修平、稲葉裕、高木廣文、大塚藤男「NF1モニタリング調査の解析」厚生省特定疾患の疫学に関する研究班平成11年度研究業績149-57,2000

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

神経線維腫症NF1・NF2原因遺伝子の細胞内機能と病態との関連

分担研究者 佐谷 秀行 熊本大学医学部腫瘍医学講座教授

研究要旨

神経線維腫症1型(NF1)及び2型(NF2)の病態発症予防・治療の基礎的情報を得るため、これらの原因遺伝子産物(NF1蛋白; neurofibromin, NF2蛋白; merlin)の細胞内機能を解析した。NF1蛋白は、マウス胎児線維芽細胞(MEF)内にてEGFやFCS刺激直後にRas-GAP機能を失活し、Ras活性を上昇させた。この現象はNF1蛋白のcAMP依存性キナーゼ(PKA)によるリン酸化によって制御され、細胞刺激初期におけるRasシグナル制御に重要であった。NGF刺激後のPC12細胞内NF1-GAP活性は経時的に上昇し、細胞の神経様突起伸長現象と、NF1-TypeIIからTypeIへのalternative splicing変化と高く相関し、神経分化誘導への関与が示唆された。NF2蛋白質はDNA傷害を誘起したMEF細胞内において、NF2結合蛋白PARPによってpoly-ADP-ribosyl化され局在を細胞質から核近傍へ移行した。PARP-/-MEFではこの現象が起こらず、顕著な細胞死が観察されたが、PARP導入によってこれらの現象が相補された。PARP、DNA-PKsとNF2蛋白質の相互作用がDNA損傷修復、細胞死のシグナル制御に関与する可能性がある。

徳王 宏 熊本大学医学部腫瘍医学講座
湯之上俊二 熊本大学医学部腫瘍医学講座
馮 立平 熊本大学医学部腫瘍医学講座
荒木 令江 熊本大学医学部腫瘍医学講座

1) NF1蛋白質(neurofibromin)に関して、特にその細胞内Ras-GAP活性とPKAリン酸化能に注目し、RAS-APKシグナルにおけるNF1蛋白質の細胞内活性制御機構を、NF1-/-,+/+マウス細胞(MEF)、及び神経系細胞PC12を用いて解析した。

2) NF2蛋白質(merlin)に関しては、以前より、merlinと会合する細胞内蛋白質の解析を行い、5種類(DNA-PK subunit Ku-antigen p70, Ku-antigen p85, Poly(ADP)ribose polymerase (PARP), P140, P165)の蛋白がNF2の細胞内シグナルに関与していることを明らかにしており、今回、これら細胞内結合性蛋白質群との細胞内相互作用及び機能変化に注目し、細胞障害性刺激とこれらの活性変化を解析した。

A. 研究目的

神経線維腫(neurofibromatosis: NF)は、全身の皮膚に多発性結節と色素斑を伴う遺伝性疾患として最初に報告された1型(NF1)、及び1型と類似した皮膚症状に加え中枢神経系腫瘍を高頻度に伴うことで特徴づけられる2型(NF2)の2つのタイプに分けられる。近年、これらの神経線維腫症の原因遺伝子がそれぞれ異なる染色体上に同定され、NF1、NF2が独立した疾患であることが判明した。NF1、及びNF2に関連した病態は、これらの原因遺伝子NF1、NF2の変異・欠失による細胞機能異常によってもたらされるものと考えられている。しかし、これらの原因遺伝子の異常によってもたらされる如何なる細胞機能の変化が、NF1及びNF2に特徴的な病態を惹起するのかは、ほとんど明かにされていない。我々は、NF1及びNF2の病態発症予防・治療のための基礎的情報を得ることを目的として、NF1蛋白及びNF2蛋白の細胞内機能を生化学的、細胞生物学的に詳細に解析した。

B. 研究方法

NeurofibrominのPKAリン酸化能、Ras-GAP活性の測定法、活性型Ras(Ras-GTP型)に特異的に結合する活性型Neurofibrominの定量法を、細胞画分・及びラット脳からの精製Neurofibrominを用いて確立した。NF1遺伝子欠損マウスは、NF1遺伝子Exon 31にNeo cassette遺伝子を導入したC57BL/6-Nf1tm1FCRマウスを用いた。ホモ接合体(NF1-/-)は致死であるため、ヘテロ接合体(NF1-/-)マウスを掛けあわせることによってNF1-/-、

NF1-/+、及びNF1+/+胎児を作成し、胎生10-11日目のこれら個々より初期培養線維芽細胞 (MEF) を得た。3T3法によってNF1-/-、NF1-/+、NF1+/+それぞれの不死化細胞を樹立し実験に用いた。各種のNeurofibrominドメインに対する抗体を、ラット及びウサギを免疫することによって得た。細胞内Ras活性は、GST-c-Raf への結合活性を測定することによって解析した。一方、NF2に関して 各種変異NF2cDNAの哺乳類発現ベクターへの組み込み、VA13/Cos細胞への発現、merlinと結合蛋白質の各抗体による相互作用、結合部位の同定、相互作用する蛋白質の活性解析を行った。又、NF2結合蛋白質であるPARPの遺伝子欠損マウス線維芽細胞 (PARP-/-) とPARP+/+細胞とを用いてGFP-NF2 cDNAを導入し、過剰発現merlinの細胞内局在をBleomycin及びLeptomycinB存在下で観察した。細胞内局在は焦点レーザー顕微鏡にて解析した。NF2蛋白質の細胞内poly ADP ribosylationは抗poly ADP ribose抗体を用いて測定した。Tioredoxin-tagの各種PARPフラグメントは大腸菌より誘導精製を行った。PARPの細胞内発現誘導はRFP-PARPcDNAをPARP-/-MEFにtransfectionすることによって行った。

C. 研究結果

1) NF1に関して

(I) neurofibrominの高変異部位であるC末端側に細胞内NO制御因子であるN-G, N-G-dimethylarginine dimethylamino-hydrolase (DDAH) が特異的に結合する事は既に報告しているが、それに加えてNF1の高変異部位として最近注目されているSerin/Threonin rich domain (CSRD) にもDDAHは相互作用し、CSRDのcAMP依存性リン酸化酵素 (PKA) によるリン酸化のaccessibilityを特異的に上昇することによって細胞内neurofibrominの構造変化を誘導し、その細胞内活性を制御する可能性を示唆した。

(II) 無血清培地で培養したMEFに、20% FCS又はEGF添加後、Ras活性化の経時的変化を測定した。NF1+/+MEFにおいてはEGF添加前には全くRasの活性は認められなかったが、EGF刺激5分後に一過性に活性化し、15分後にはその活性が消失した。それに対して、NF1-/-MEFにおいては、Rasの活性はwildに比較して非刺激状態で恒常的に高く、EGF刺激後5分でピークに達した後30分経過後もその活性を持続していることが判明した。FCS刺激下においても同様の結果が得られ

た。即ち、neurofibromin非存在下では細胞内Ras活性が特異的に亢進していることが明かとなった。

(III) NF1+/+ MEFにおいて、各刺激による活性型Ras (Ras-GTPcS) 結合性のneurofibromin (活性型neurofibromin) の量的変化を解析したところ、無血清培地での非刺激培養条件では活性型neurofibrominが細胞内全neurofibrominの約5%以上であったが、血清添加後やEGF刺激5分後には、その量が1%以下に激減した。

(IV) この活性型neurofibrominのEGFによる急激な減少と同様の現象が、cAMP依存性kinase (PKA) 特異的活性化剤であるforskolin刺激でも顕著に認められ、PKA阻害剤 (H89) 存在下でその活性減少が特異的に阻害された。以上の結果より、neurofibrominは細胞外刺激によって迅速にその活性が制御されることによってRASの活性を調節しており、その過程にはneurofibrominのPKAによるリン酸化が関与している可能性が示唆された。

(V) 種々の神経系細胞のNF1-GAP活性は非神経系細胞と比較して高値を示し、特にPC12細胞においてNGF刺激後のNF1-GAP活性は経時的に上昇し48時間後には刺激前の約5倍以上に達した。この活性上昇はNGF刺激後の経時的なNF1 TypeIIからTypeIへのalternative splicing変化、及び細胞の神経様突起伸長現象の変化と高く相関していた。NF1-GRD-TypeIはTypeIIに比較して10倍以上のGAP活性を有していたことより、neurofibrominは神経系細胞内においてRas-GAP活性をalternative splicingにより上昇させ分化誘導のシグナルに関与している可能性が示唆された。

2) NF2に関して

(I) 細胞のBleomycin処理によってDNA傷害を誘起したMEFにおいて、我々の同定したNF2蛋白質細胞内結合性蛋白質である、PARP、DNA-PK subunit Ku70, Ku80は顕著に活性化した。これと同時にmerlinはその高変異部位であるN末端側 (19-339) を介してPARPと結合し、PARPのpoly (ADP) ribose polymerase活性を上昇させ、merlinのN末端側にpoly (ADP) ribosylationを誘導した。一方、PARP-/-MEF細胞ではmerlinのpoly (ADP) ribosylationは認められなかった。

(II) MEFにて過剰発現したmerlinは、核内へ一端移行した直後、そのN末端側上の核外輸送シグナル配列 (NES) を介して核外へ輸送され、細胞質内及び細胞質辺縁・突起部に局在するが(昨年度までの我々の所見)、細胞にBleomycin処理などのDNA傷害を誘起することによってmerlinの細胞内局在が細胞質から核近傍へ

移行した。核外移行阻害剤である Leptomycin B 共存化においてはこの現象は顕著であった。一方、PARP 遺伝子欠損 MEF においてはこの現象が遅延し、顕著な細胞死が観察されたが、PARP 遺伝子導入によってこれらの現象が有意に相補された。

(Ⅲ) Ku70, Ku80 は細胞質及び核内に分散して存在しているが、PARP はほとんどが核内に蓄積しており、DNA 傷害によって DNA-PKs (Ku70, Ku80) と PARP は細胞内で強く相互作用している所見が得られたことから、Ku, PARP, merlin はそれぞれをお互いの scaffold として結合し、それぞれの細胞内局在に関与して、DNA 修復、細胞死に関わっている可能性が示唆された。

D. 考 察

1) NF1 に関して

NF1 遺伝子産物 neurofibromin は、活性型 Ras (Ras-GTP form) から、不活性型 (Ras-GDP form) に変換する GTPase 活性を 100 倍以上にも上昇させる Ras-GAP 活性を有することが知られている。これによって、neurofibromin は Ras の活性制御を行い、細胞の増殖や分化の調節に重要な役割を演じていると考えられている。しかし、細胞内 neurofibromin の Ras-GAP 活性が如何なる重要性をもってどのように制御されているか、即ち、NF1 の病態に最も関わっている neurofibromin の機能制御機構に関しては全く明かにされていない。我々は、活性型 Ras に結合性の細胞内在性 neurofibromin fraction (活性型 neurofibromin) の簡便な定量法を始めて開発し、これを用いて各種細胞刺激因子による RAS-MAPK シグナルにおける neurofibromin の活性制御機構の解析に応用した。その結果、細胞内 neurofibromin が、細胞増殖因子刺激によって刺激反応の初期に於いて PKA リン酸化を介して活性を制御し、Ras-MAPK シグナルの活性上昇のスイッチとなっていることを明らかにした。他の Ras シグナルを制御する因子として p120GAP があげられるが、我々の所見は NF1 が優位なる Ras-GAP として、恒常的な Ras の活性化制御と増殖刺激直後における Ras の活性化に主に働いている可能性を始めて提唱するものである。又、神経系の細胞において、NGF による長時間の刺激は、neurofibromin を NF1-TypeII から TypeI へ alternative splicing させることによって total の NF1-Ras-GAP 活性を制御しており、これが神経細胞分化誘導のシグナルに重要である可能性を示唆している。このことは NF1 の病態における神経系細胞の分化異

常と関連して興味深い。

2) NF2 に関して

今までのわれわれの研究によって以下の事が判明している。即ち、NF2 患者における変異型 merlin の多くは、N 末端側に deletion 型や missence, nonsense 型の変異部位を有しており、この部位は PARP, Ku85, Ku70 その他の細胞内 merlin 結合蛋白質との結合部位でもあることから、これらの結合蛋白質は変異 merlin と結合することが出来ない。又、変異 merlin は細胞内局在が核に集中する傾向にあり、正常 merlin の細胞内シャトル (細胞質→核→細胞質→細胞膜) が機能していない。更に、変異 merlin 発現細胞は細胞接着能を低下させている。したがって、正常 merlin の細胞内機能は、細胞内結合蛋白質群を介した腫瘍抑制シグナル伝達機能、細胞内局在の変化、及び細胞骨格系蛋白質への関与を詳細にすることが急務であると考えられる。今回我々の実験より、merlin はその結合蛋白質である PARP や DNA-PKs の複合体を形成し、scaffold として細胞内の局在と、これらの DNA 修復酵素活性の制御に関わっていることは間違いない。更に、細胞障害性のストレスによる DNA ダメージがこれらの機能を誘起する可能性を示した。これらの制御機構は DNA 損傷修復、細胞周期、細胞死のシグナル制御に大きく関与していることが示唆され、merlin の核における役割が重要である可能性が提唱された。

E. 結 論

NF1 及び NF2 の原因蛋白質である neurofibromin 及び merlin による腫瘍抑制機能は、これらと細胞内で相互作用する分子を介する細胞内シグナルによる細胞増殖抑制と、脱落すべき細胞の生理的アポトーシスの誘導、及び神経系細胞の分化異常であると考えられる。現在までに NF1, NF2 の病態に有効な治療薬や予防薬はほとんどないと行って等しい。我々のこれまでの結果は、例えば NF1 に関して、FTI や PI3 キナーゼ阻害剤などの Ras の活性化阻害剤や、NF1 の RAS-GAP 活性を上昇させる PKA 阻害剤など、又、NF2 に関して merlin 結合蛋白質を介した細胞内シグナルを回復させるような薬剤や、NF2 の活性を失活させるような翻訳後修飾の阻害剤 (カルシウムブロッカーやカルパイン阻害薬剤など) が、細胞増殖の抑制や再発の防止などの治療目的に応用できる可能性を示唆している。又、NF1 と NF2 は病態が一

部重複することから、細胞内において、NF1及びNF2蛋白質は細胞内シグナルを共有している可能性がある。これらの細胞内における蛋白質レベルでの機能解明、即ちこれらを介する細胞内シグナル伝達機構を詳細に明らかにすることが、神経線維腫症の病態の治療と発症予防薬等の開発における重要な基礎的情報となると考える。

参考文献

- 1) Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H., Araki, N.
Phosphorylation of neurofibromin by cAMP dependent protein kinase is regulated via a cellular association of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. FEBS Letters 2001 494:48-53.
- 2) Kimura Y, Saya H, Nakao M.
Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. Neuropathology. 2000 20:153-60.
- 3) Araki N, Saya H.
Cellular signal transduction via the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene product; merlin. Seikagaku. 1999 71:128-34.
- 4) Koga H, Araki N, Takeshima H, Nishi T, Hirota T, Kimura Y, Nakao M, Saya H.
Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. Oncogene. 1998 20;17:801-10.
- 5) Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashita T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M.
The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. Nature Medicine. 1998 4:915-22.
- 6) Araki N, Takeshima H, Saya H. Neurofibromatosis type 2 (NF2) Gan To Kagaku 1997, 24 (11):1427-31.
- 7) Izawa I, Tamaki N, Saya H.
Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. FEBS Lett. 1996, 11;382 (1-2):53-9.
- 8) Takeshima H, Izawa I, Lee PS, Safdar N, Levin VA, Saya H.

Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. Oncogene. 1994 9 (8):2135-44.

- 9) Nishi T, Lee PS, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H.
Differential expression of two types of the neurofibromatosis type1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. Oncogene. 1991;6 (9):1555-9.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura Y, Saya H, Nakao M.
Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. Neuropathology. 20:153-60, 2000.
- 2) Araki, N., Tokuo, H., Yunoue, S., Kuwahara, H., Morimasa T., Tsugita, A., Saya H.
Functional proteomic analysis of tumor suppressor related proteins in brain. BIOJAPAN 2000, pp147-157, 2000.
- 3) Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H., Araki, N.
Phosphorylation of neurofibromin by cAMP dependent protein kinase is regulated via a cellular association of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. FEBS Letters 2001 494:48-53.

2. 学会発表

- 1) 平成12年度日本生化学会九州支部例会 平成12年5月13日-14日
神経系腫瘍抑制関連タンパク質のプロテオーム解析と細胞内シグナル伝達機構
荒木令江、徳王 宏、湯之上俊二、次田 皓、佐谷秀行
- 2) 蛋白質合同年会 東京2000 (第51回タンパク質構造討論会・第12回日本蛋白質工学会年会・第7回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)
平成12年6月7-10日シンポジウム
中枢神経系腫瘍抑制関連タンパク質のプロテオーム解析
荒木令江、佐谷秀行、徳王 宏、湯之上俊二、盛政忠臣、宮崎賢司、次田 皓
- 3) The the 14th Symposium of the Protein Society August 5-9, 2000, in San Diego, California

Proteomic analysis of tumor suppressor related proteins
in brain

N. Araki, H. Tokuo, S. Yunoue, T. Morimasa,
T. Araki, K. Miyazaki, A. Tsugita, H. Saya

- 4) MPSA 2000 (The 13th International Congress of
Methods of Protein Structure Analysis) September
16-20, 2000, Charlottesville, Virginia, USA

FUNCTIONAL PROTEOMIC ANALYSIS OF TUMORE
SUPPRESSOR RELATED PROTEINS IN BRAIN

N. Araki, H. Saya, H. Tokuo, S. Yunoue, T. Morimasa,
A. Tsugita

- 5) BIOJAPAN 2000 SYMPOSIUM September 26-28,
Tokyo, Japan

Functional proteomic analysis of tumor suppressor
related proteins in brain

N. Araki, H. Tokuo, S. Yunoue, H. Kuwahara,
T. Morimasa, A. Tsugita, H. Saya

- 6) 第59回日本癌学会総会

平成12年10月4-6日 ミニシンポジウム

中枢神経系腫瘍抑制関連タンパク質のプロテオミク
スを用いた解析とその細胞生物学的意義

荒木令江¹、徳王 宏¹、湯之上俊二¹、桑原博昭¹、
盛政忠臣²、次田 皓³、佐谷秀行¹

- 7) 第59回日本癌学会総会

平成12年10月4-6日

NF1 蛋白 neurofibromin の神経系細胞内 RAS-GAP 活
性制御と腫瘍抑制機構の解析

湯之上俊二、徳王 宏、西 徹、倉津純一、佐谷
秀行、荒木令江

- 8) 第73回日本生化学大会

平成12年10月11-14日

脳神経系腫瘍抑制関連分子のプロテオミクスによる
検索と細胞内機能解析

荒木令江、徳王 宏、湯之上俊二、桑原博昭、盛政
忠臣、次田 皓、佐谷秀行

- 9) 第73回日本生化学大会

平成12年10月11-14日

NF1 遺伝子 knock-out マウスの各種初期培養細胞を用
いた NF1 蛋白質 neurofibromin の機能解析

徳王 宏、湯之上俊二、小野友道、佐谷秀行、荒木
令江

- 10) 第73回日本生化学大会

平成12年10月11-14日

PC12細胞内における NF1 蛋白質 neurofibromin の RAS-

GAP機能の解析

湯之上俊二、徳王 宏、西 徹、倉津純一、佐谷
秀行、荒木令江

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

神経線維腫症 1（NF1）患者に生じる悪性神経鞘腫瘍でのp53遺伝子変異に関する研究

分担研究者 新村 真人 東京慈恵会医科大学皮膚科教授

研究要旨

8例のNF1患者に合併した悪性神経鞘腫瘍（以下MPNST）を対象にp53遺伝子変異ならびにp53免疫組織化学を施行。遺伝子解析はSSCP法とdirect-sequence法により検討した。結果は8例全例においてp53遺伝子変異は認めず、p53染色では一部の腫瘍細胞核に陽性所見を得た。NF1モデルマウスの知見やヒトMPNSTのp53変異解析の報告からp53遺伝子変異は高い頻度で生じているといわれてきたが、今回の結果からは異なる機序も考えるべきと思われる。

A. 研究目的

大腸癌などはいくつかの遺伝子変異の蓄積により発癌するという多段階発癌の代表的モデルである。NF1患者に合併したMPNSTでもp53遺伝子をはじめとしてCDK遺伝子、mismatch repair遺伝子（hMLH1）の変異も稀ながら報告されている。今回、我々はその代表的な腫瘍抑制遺伝子である‘p53遺伝子’について8例のNF1患者に合併したMPNSTを対象にその変異解析を施行した。さらに、p53免疫組織化学でも検討した。

B. 研究方法

8症例のNF1患者に合併したMPNSTの凍結組織を対象にした。変異解析はDNA抽出後p53遺伝子のエクソン2～11についてPCRで増幅し、SSCP法で解析。アマルシャンの解析ソフトで分析後、正常コントロールと検体の波形を比較し、変異の有無を調べた。また、免疫組織化学は、野生型と変異型の2種類のモノクロナール抗体を使用し、染色の状態を検討した。

C. 研究結果

8症例全例で変異はみとめられなかった。また、p53免疫組織染色では、抗ヒト野生型p53遺伝子産物モノクロナール抗体で一部の腫瘍細胞核に陽性所見をみた。

D. 考察

現在多くの悪性腫瘍においてその悪性化の進展に腫瘍抑制遺伝子‘p53遺伝子’の変異が関与していること

が知られている。NF1の疾患モデルマウスに関する論文では、Tyler Jacksらが、キメラマウスを作製し、そこにp53遺伝子を同一染色体上にリンクすることで、高率（30%）にMPNSTの発生を早期（5ヶ月）にみとめたという報告がある。一方、ヒトNF1患者においては、1990年のMenonらの報告で、30例の神経線維腫では第17番染色体上のLOHは1例もみつからなかったが、7例中2例のneurofibrosarcomaにp53遺伝子変異を認めたという報告があり、MPNSTの発生にp53遺伝子の変異が関与している可能性を示唆している。また、Hallingらは、抗p53モノクロナール抗体による腫瘍組織の免疫染色を行い、MPNSTのほうが、神経線維腫に比べp53のoverexpressionを示す細胞がより多いことを示した。しかしながら今回の検討では、p53変異解析で全例に遺伝子変異は認められず、また、p53免疫染色では野生型で一部の腫瘍細胞核に陽性所見を認めており、正常なp53遺伝子産物がoverexpressionをしていることが考えられた。

以上より、NF1に伴うMPNSTでp53遺伝子変異が生じている可能性は低く、他の機序も考えるべきと思われる。

E. 結論

NF1に生じるMPNSTでは、p53遺伝子の変異以外の機序があると考えた。

F. 研究発表

2. 学会発表
第762回 東京研究地方会にて発表予定

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

培養神経線維腫細胞に対する γ インタフェロンの増殖阻害効果に関する研究

分担研究者 中山 樹一郎 福岡大学医学部皮膚科教授

研究要旨

29歳女性のレクリングハウゼン病患者の神経線維腫を切除し、その組織から初代培養を行った。確立された細胞株に γ インタフェロンを100あるいは1000U/ml添加し、3ないし6日後の細胞数をカウントした。その結果、神経線維腫細胞株はいずれの投与量でも3日後以降にコントロールに比べ30~40%の細胞数の減少がみられた。他施設から供与された細胞株を用いて同様の実験を行い、3種類の細胞株で γ インタフェロンによる同程度の増殖阻害効果が認められた。さらに、 γ インタフェロンを添加した細胞株の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み率を測定した。結果は、 γ インタフェロン添加1日後では95%以上、また3~5日後では70%程度の取り込み率の阻害がみられた。以上の実験結果から γ インタフェロンは神経線維腫の増殖を抑制するのではないかと考えられ、将来の治療への応用が期待された。

新村 真人 慈恵医科大学
本田まり子 慈恵医科大学
大塚 藤男 筑波大学臨床医学系皮膚科
小辻 智恵 筑波大学臨床医学系皮膚科
寺尾 浩 九州大学医学部大学院皮膚科

供与され、それらの細胞株を用いて同様の阻害実験を行った。さらに、 γ INFを添加した細胞株の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み率を測定する目的で、100U/mlの γ INFを添加1、3、5日後の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。実際の測定は、九州大学医学部大学院皮膚科寺尾浩講師に委託した。

A. 研究目的

神経線維腫（以下NF）の増殖抑制をめざした研究の一環として、本腫瘍細胞の増殖を阻害する薬剤の探索、開発がある。本研究では γ インタフェロン（以下 γ INF）が培養NF細胞株の増殖を阻害する効果があるのかどうかについて検討した。

B. 研究方法

29歳女性のレクリングハウゼン病患者の頭部のびまん性NFおよび大腿の蔓状NFを切除し、それらのNF組織から初代培養細胞株を確立した（10%FCSを含むMEM培地で培養）。これら2種類の細胞株にリコンビナント γ INF（200万U/ml、マルホ製薬より供与）を培養液中に100あるいは1000U/ml添加し、3日後および6日後の細胞数をコーンターカウンターで測定した。また、慈恵医科大学皮膚科（新村真人教授、本田まり子講師）と筑波大学臨床医学系皮膚科（大塚藤男教授、小辻智恵講師）よりNF細胞株あるいはNF手術組織を

C. 研究結果

図1に29歳女性のレクリングハウゼン病患者の頭部のびまん性NFおよび大腿の蔓状NFより確立したNF細胞株に対する γ INFの増殖阻害効果を示す。いずれの細胞株に対しても γ INF100U/mlあるいは1000U/mlの濃度で添加3日後から6日後まで30~40%程度の阻害効果が得られた。図2に他施設より供与された3種類のNF細胞株に対する γ INFの増殖阻害効果を示す。いずれの細胞株（図2の①~③）も添加3~6日後にやや阻害率に幅があるものの図1にみられる阻害効果が再現された。図3にNF細胞株に100U/mlの γ INFを添加1、3、5日後の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み率を示す。同時に細胞数もカウントした。 γ INF添加1日後ではコントロールに比し95%以上の阻害率、3~5日後では70%程度の阻害率が得られた。その実験時の細胞数は3日後以降約30%の減少がみられた。

D. 考 察

NFの増殖を効果的に阻害する薬剤は現在のところ報告がない。今回 γ INFがNF細胞の増殖を阻害するのではないかと考え、手術標本から培養NF細胞株を確立し、それらの細胞株に対する γ INFの増殖阻害効果を検討した。その結果、 γ INFは培養NF細胞に対し明らかな増殖阻害効果を有していた。またこの結果は他施設から供与された細胞株でも同様にみられた。この阻害効果は細胞のDNA合成阻害によることが $[^3\text{H}]$ -チチミジンの取り込み実験の結果明らかとなった。但し、 γ INF添加1日目が最も阻害効果が強く、3～5日目ではむしろ若干の取り込み阻害率の低下がみられた。この点は今後研究すべき課題と思われた。今回の結果から、 γ INFは治療薬としての可能性が示唆された。現在保険適用されて市販されているリコンビナント γ INFは1バイアル200万Uであり、これを全身投与した場合、末梢血中のINFの濃度は十分100U/ml以上となる計算であり、実際的にも使用可能と考えられる。

E. 結 論

培養NF細胞株に対する γ INFの増殖阻害効果が明らかとなった。本薬剤の治療への実際的応用が可能か、今後の研究課題と考えられる。

F. 謝 辞

今回の研究に協力を頂いた慈恵医科大学新村真人、本田まり子、筑波大学臨床医学系皮膚科大塚藤男、小辻智恵、九州大学医学部大学院皮膚科寺尾浩の各氏に深甚なる謝意を表す。

γ IFNの増殖抑制効果 (1)

