

## B. 研究方法

NF1遺伝子欠損マウスは、NF1遺伝子Exon 31にNeocassette遺伝子を導入したC57BL/6-Nf1tm1FCRマウスを用いた。ホモ接合体(NF1<sup>-/-</sup>)は致死で有るため、ヘテロ接合体(NF1<sup>+/-</sup>)マウスを掛けあわせることによってNF1<sup>-/-</sup>、NF1<sup>+/-</sup>、及びワイルド(NF1<sup>+/+</sup>)胎児を作成し、胎生12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<sup>-/-</sup>、NF1<sup>+/-</sup>、NF1<sup>+/+</sup>それぞれの不死化細胞を分離し実験に用いた。細胞形態と細胞内骨格の変化はRhodamin標識Phalloidinにてactinを染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。又細胞のmigration能はボイデンチャンバー法によった。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。抗GRD抗体はラットより作成し、p120GAPには反応しないが、Neurofibrominに特異的に反応してNF1-GAPを顕著に阻害するIgGフラクション(抗NF1-GAP抗体)を精製して実験に用いた。ラット神経系モデル細胞PC12をNGFで刺激してその神経突起伸長現象とNF1-GAP活性、Ras活性を測定した。NF1-GAP活性は、<sup>32</sup>P標識GTP結合Rasを用いてGTPase活性変化をfiltration assay法で測定する方法、及び、 $\gamma$ SGTP結合活性型RASへの結合能を測定する2つの方法にて解析した。発現ベクターとしてNF1-GRDType I、NF1-GRDType II、及びNF1-GRD Type Iの活性中心である1276ArgをProに変換させた変異プラスミドNF1-GRD(R1276P)を構築し、これらの細胞内活性を測定した。NF1-GRD(R1276P)は、活性型Rasに優位に結合するがRas GAPとしての触媒活性を失活しており、NeurofibrominのGAP活性を優位に阻害することから細胞内在性NeurofibrominのDominant Negative(DN)体として有用であった。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。ラット胎児神経細胞は胎生18日目のラット脳海馬領域より分離し、12時間後にリポフェクション法で各種発現ベクターを導入し、抗Tau1抗体、抗Map2抗体による蛍光染色にて経時的にその形態と極性変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞内NF1の可変スプライシングの変化は各種細胞を用いてRT-PCR法により解析した。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<sup>-/-</sup>)とPARP<sup>+/+</sup>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。RFP-PARPcDNAをPARP<sup>-/-</sup>MEFに発現誘導させ、GFP-NF2との細胞内局在の変化を細胞内局在は共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。Merlinの細胞内転写活性への影響は、NF2全長及び変異体、CD44細胞内ドメイン(CD44ICD)の発現ベクターを共導入したCos7細胞を用い、これらの組み合わせにおける12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-responsive element (TRE)-reporter responseへの影響をLuciferase assayにて測定した。

## C. 研究結果

### 1) NF1に関して

- (1) マウスファイブロブラスト(MEF)における neurofibrominを介した細胞内シグナルの細胞運動能(motility)に及ぼす影響

NF1<sup>+/+</sup>及びNF1<sup>-/-</sup>MEFを用いて、細胞骨格、細胞運動、接着の形態学的変化と、その際の細胞内シグナルの変化を生化学的に測定した。両細胞を無血清培地にて24時間培養後、EGFやFCS等の刺激因子を添加し、経時的に細胞形態と細胞内骨格の変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。NF1<sup>+/+</sup>MEFでは、EGFやFCS添加前後に大きな変化は認められなかったが、NF1<sup>-/-</sup>MEFでは両刺激添加後、時間経過に伴ってphalloidin染色性のactin stress fiber及びvinculin染色性のfocal adhesion spotが徐々に消失し、細胞膜のrufflingが優位に形成される現象が観察された。この現象はPI3 kinase inhibitor (LY294002)によって優位に抑制されたが、MAPK inhibitor (PD98059)によっては抑制されなかった。このことより、NF1<sup>-/-</sup>MEFのrufflingにはRasの下流シグナルにおけるPI3 kinase/AKT及びRacの活性化が関わっている可能性が考えられた。次に細胞運動能を解析するため、NF1<sup>+/+</sup>及びNF1<sup>-/-</sup>MEFを無血清培地にて24時間培養後、EGFやFCS等の刺激因子を添加してmotility変化をBoyden chamber法を用いて測定した。その結果、NF1<sup>-/-</sup>MEFにおいてのみ特異的にmigrationする細胞の増加がFCS濃度依存性に認められた。しかしながら、FCSと同様にNF1<sup>-/-</sup>MEF特異的にrufflingを形成したEGF刺激ではmigrationは誘導されなかった。細胞内シグナルの経時的変化を測定して両者の違いを比較すると、FCS及びEGF両刺激においてNF1<sup>-/-</sup>MEFに特異的に

見られるRas及びERKの活性化の持続性はFCS刺激の方が優位に高く、PI3Kの活性の上昇は両者供同等であった。このことから、特にRas-MAPK-ERKのシグナルの増強がNF1-/-MEF特異的migrationに必要であることが示唆された。そこで、MAPK inhibitor (PD98059)、及びPI3 kinase inhibitor (LY294002)のNF1-/-MEFのmigrationに対する影響を解析したところ、両inhibitor共に単独でFCSによるmigrationを阻害することが判った。このことから、NF1-/-MEFのmigrationには、Rasの活性化によるPI3Kシグナルの活性化とそれにもなるrufflingの出現、さらにはMAPKシグナルの持続的な強い活性化が必要であることが考えられた。又、NF1-/-MEFのmigration能がchamber membraneのfibronectinコートや、Rock inhibitor (Y27632)共存下で顕著に上昇したことから、integrinなどの細胞接着因子の関与、及びLock-LIM kinaseを介した細胞motilityの調節が重要であることが示唆された。以上の結果より、neurofibrominは種々の細胞刺激因子や接着因子を介したシグナルを受け、Ras-MAPK及びPI3Kシグナルの活性制御を行うことにより細胞の骨格形成及び運動能を調節する機能を果たしていることが示唆された。

### (iii) Neurofibrominによる神経系細胞の神経突起伸長・伸展現象の調節

以前より、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すことを見いだしているが、神経分化・神経突起伸長・伸展に際してどのような調節が行われているかを測定した。まず、PC12細胞を用いてNGF刺激後のGAP活性を測定したところ、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わっている可能性が示唆された。次に、NeurofibrominのGAP-related domain (NF1-GRD)のdominant negative体発現プラスミド、及び抗GRD抗体を用いて神経系細胞内存在性Neurofibrominを特異的に抑制した際の、細胞の神経突起伸長進展現象における影響を解析した。非刺激下のPC12細胞内にマイ

クロインジェクション及びリポフェクション法によって、抗NF1-GAP抗体、或いはNF1-Dominant Negative体 (R1276P)を導入し、細胞内NF1-GAPを特異的に抑制すると、神経成長因子 (NGF)非存在下においても早期の突起発現が見られた。一方、NGF刺激による長期の神経突起伸張現象に呼応してNF1-Ras-GAP活性は経時的に上昇するが、これをR1276Pによって抑制すると、神経突起伸長は減少し、異常なマルチブルアクソン様の形態変化を示した。この現象は活性化型Ras (G12V)を神経細胞に導入したときの形態変化と類似していた。海馬ニューロンプライマリー培養細胞の培養1日目にR1276Pを導入し経時的に神経突起伸長現象を観察したところ、抗tau1抗体陽性の突起伸長の遅延と異常な形態を示す突起伸長現象が観察された。以上のことから、細胞内Neurofibrominは神経系細胞の正常な神経突起伸長伸長における重要な調節因子であることが示唆された。

### (iii) NF1の新規alternative splicing form

NF1の細胞内活性調節の機構としてalternative splicingが特に神経系細胞分化に重要であることが注目される。我々はexon23aのalternative splicing挿入によりGAP非活性型 (NF1-TypeII)のneurofibrominの細胞内発現が活性調節因子として存在することを明かにしたが、さらに、新規のalternative splicing exonがNF1ゲノム上に存在することを見いだした。新規に同定したexonはNF1ゲノムDNA上の約60Kbpにわたる長いintron 27b内に迷入するEVI2 geneの相向部位近傍にあたり、exon 27bとexon 28の間に新たな89 bpのexonとして挿入されることから、これをexon 27cと命名した。Exon 27cの挿入によりNF1 mRNAのopen reading frameがshiftし、stop codonを持つ新規の10アミノ酸配列 (N-末端から1612番目のアミノ酸よりMESRRRENYMF stop)挿入型のsplicing formが形成されることが判明した。これによって、約250KdのNF1タンパク質は、約178Kdのtruncated isoformとして翻訳される可能性が考えられた。様々なヒト由来組織やcell lineにおけるexon 27c挿入型NF1 mRNAの発現をRT-PCRにより検索したところ、ヒト胎児脳ではメインに発現しており、adult brain、neuroblastoma (SKNSH)等の神経系細胞やlung fibroblast、Hela cellなどに特に優位な発現が認められた。PCRによってamplifyされたこれらの挿入配列を含むbandは、DNAシーケンス解析、及び制限酵素消化によってNF1-exon

27c特異的であることを確認した。現在、exon 27cのsplicingの意義、傾向、また、タンパク質の発現の有無、及びその機能等について解析を行っているが、神経系細胞に優位に認められる発現と、その発現調節、及び神経分化との関連が注目される。

## 2) NF2に関して

### (i) merlinの細胞核内移行とDNA傷害との関連

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、特にPARPはmerlinのN末端側にpoly (ADP) ribosyl化を誘導した。一方、PARP-/MEF細胞ではmerlinのpoly (ADP) ribosyl化は認められなかった。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・突起部に局在したが、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。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。

### (ii) merlinのCD44との相互転写活性制御

merlinは細胞膜下において細胞接着因子であるCD44とその細胞内ドメインを介して結合することが示唆されている。我々は、CD44の細胞内ドメイン (CD44 ICD) が細胞外からの刺激を受けて、細胞膜直下でプロテオリシスを受けてフラグメント化され、細胞核に移行することを見いだした。核移行したCD44ICDは、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-responsive element (TRE) を介した転写制御因子として細胞内の種々のシグナル活性化に関与していることが明らかとなった。この転写因子のコアクチベータとして

CBP/p300が関与しており、その結果CD44そのものの発現が亢進することが判明したが、このシステムにmerlinを過剰発現したところ、CD44ICDによる転写系細胞に優位に認められる発現と、その発現調節活性がmerlinの発現濃度依存性に亢進することが明かとなった。MerlinはDNA傷害性のシグナルを受けて核に移行する現象が見られるが、CD44ICD非存在下、即ち、Merlin単独の発現では優位なTREを介した転写活性は示さなかった。又、LMB存在下でmerlinの核蓄積を誘導しても、CD44ICD非存在下では弱い転写活性のみしかみとめられなかった。このことから、merlinは細胞膜下で活性化のシグナルを受け、フラグメント化されたCD44ICDと核に移行し、TREを介した転写活性を上昇させる転写因子のコアクチベータとして機能している可能性が示唆された。

## D. 考 察

### 1) NF1に関して

これまでの研究から、細胞内neurofibrominは、活性型Rasを不活性型Rasに変換するRas-GAP活性によってRasの活性制御を行い、Rasを介する細胞内シグナル伝達の調節、細胞増殖、細胞生存、器官発生などの重要な働きを担っていることが示唆されている。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の機能とその制御機構に関しては全く明かにされていない。我々はNF1 gene knock-out mice (NF1<sup>-/-</sup>) 及び、そのlitter mate wild type mice (NF1<sup>+/+</sup>) よりembryonic fibroblast (MEF) を調製し、細胞内neurofibromin有無時におけるRas-活性制御機構の比較解析を行い、neurofibromin非存在下においては、細胞内Ras活性は恒常的に高く保たれ、細胞増殖活性、細胞生存へのシグナルが亢進していることを明かにした。又、EGFやFCS等の増殖因子の刺激に反応して、細胞内neurofibrominは短時間でRas-GAP活性を上下させてRas活性に影響を与えるdynamicな制御をうけていること、更にこの制御の一部はneurofibrominのPKAによるリン酸化やalternative splicingやその細胞内結合蛋白質群によって行われていることを明かにし、これらが細胞内Rasの活性化及びRasを介した種々のシグナルを調節して、細胞の増殖や分化や細胞運動能、細胞骨格系へのシグナルを絶妙にコントロールして

いる可能性があることを示唆した。特にNF1-繊維芽細胞においては、EGF等の増殖因子によって特異的なRas-PI3K-Racのシグナルが亢進しており、これによってActin stress fiberの消失と細胞膜の過剰なrufflingが誘導されている。さらに多種の刺激因子によるRas-MAPK-ERKシグナルの亢進が加わることによって細胞運動能が誘導される。この運動能はMEK inhibitorによって優位に阻害されるだけでなく、PI3K inhibitorによっても阻害されることからPI3Kを介したシグナルも細胞運動能誘導において必要不可欠であることが示唆される。又、Rhoの下流因子ROCKの阻害によって細胞運動能が亢進されること、及びFCS刺激によるmigrationに伴うROCKの下流因子MBSの活性減少が観察された。これらの結果を総合すると、NF1-GAPが存在しないことによるRasの恒常的な活性化とそれに続くMAPK-ERKの過剰な活性化がRhoの下流因子ROCKの活性を低下させ、LIMK及びミオシンリン酸化の減少を誘導することによって、結果的にadhesionの低下とmotilityの上昇を誘導すると考えられた。これらの事実、NF1患者のneurofibroma形成においてSchwann細胞とそれととりまくfibroblastの方向性をもたないat randomな組織構築変化と関連づけられ興味深い。又、神経系細胞においても、NF1によって細胞骨格系が制御されていることを示唆する所見が得られた。神経系モデル細胞PC12において、NGFによる神経突起伸長と維持の際、NF1-GAP活性が亢進してRasの活性が制御されることによって(sustained inactivation)、正常な神経分化が誘導されている。これは、NF1のRas-GAP活性を特異的に抑制するDN体の導入により正常な神経突起伸長が優位に阻害されたことから明かである。又、刺激因子による短時間のRas活性の亢進に伴って、NF1の高活性型NF1Type Iの転写活性が上昇し、フィードバック的にRasの活性制御を行っている事実も明かとなった。更に、ラット胎児プライマリーニューロンの分化過程においても、NF1の失活は異常なアクソン伸長形態を示したことから、神経細胞において、neurofibrominはRasの活性制御を行うことによって神経分化、特に正常なアクソンの形成に重要であることが考えられた。NF1異常による神経細胞機能変化はNF1に特徴的な記憶・学習障害の病態に関連する所見として興味深い。

## 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、この部位は細胞膜裏打ち蛋白質群ERMfamilyと相同部位であること、又、NF2遺伝子が変異していなくてもその高変異部位にあたるサイトで細胞内merlinが特異的にカルパインによるプロテオリシスを受けて失活すること、又、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ことが明らかになっている。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が重要であると考えられる。又、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、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、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と考えられた。そこで、merlinの核内における活性に関して、転写制御因子としての可能性に注目した。12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-responsive element (TRE)は様々な細胞シグナル分子の転写のenhancer elementであるが、さまざまなelementを用いたレポーターアッセイから、merlinと結合するCD44の細胞内ドメインのフラグメント(CD44ICD)によって特にTREが大きくresponseすることが判明した。我々の実験によって、CD44は細胞外からの刺激に反応して、膜内在性のメタロプロテアーゼによってフラグメント化され、優位に核移行する事が判明したが、これにmerlinがコアアクチベータとして働いている可能性がある。これらの作用機構、及びこれによって誘導される分子群とmerlinの腫瘍抑制機能との関連性に関する詳細な解析が急務であると考えられる。

## E. 結 論

NF1及びNF2の原因蛋白質であるneurofibromin及びmerlinによる細胞内機能は、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、及び細胞分化の調節であると考えている。今回の解析では、NF1は主に細胞骨格系へのシグナル調節が重要な機能であると考えられた。又、NF2においては、細胞接着と細胞核内における機能が重要であることが示唆された。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言って等しい。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、又今回の結果からRho、Rockの調節に関する薬剤など、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剤など）や転写調節薬などが、腫瘍や種々の病態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。

## F. 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*. 494:48-53, 2001
- 2) Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong AJ, Saya H.  
Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol*. 155:755-62, 2001
- 3) Kaneko T, Yamashita T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, Yamashita J.  
Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis of tumorigenesis. *Cancer*. 92:2662-72 2001
- 4) Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y.  
Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells*. 6:441-54, 2001.
- 5) Kimura Y, Saya H, Nakao M.  
Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. *Neuropathology*. 2000 20:153-60.
- 6) Araki N, Saya H.  
Cellular signal transduction via the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene product: merlin. *Seikagaku*. 1999 71:128-34.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Araki N, Takeshima H, Saya H. *Neurofibromatosis type 2 (NF2) Gan To Kagaku* 1997, 24 (11):1427-31.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Nishi T, Lee PS, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H.

Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene*. 1991;6 (9):1555-9.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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*. 494:48-53, 2001
- 2) Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong AJ, Saya H.  
Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol*. 155:755-62, 2001
- 3) Kaneko T, Yamashita T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, Yamashita J.  
Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis of tumorigenesis. *Cancer*. 92:2662-72, 2001
- 4) Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y.  
Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells*. 6:441-54, 2001.

### 2. 学会発表

- 1) 第1回日本蛋白質科学会  
(平成13年6月1～3日大阪)  
神経系腫瘍抑制遺伝子産物Neurofibrominの細胞内構造と機能の解析  
○荒木令江、徳王宏、湯之上俊二、馮立平、小沢達也、佐谷秀行
- 2) 第25回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (平成13年7月12～14日 福岡)  
神経系腫瘍抑制蛋白Neurofibrominの細胞内構造と機能制御機構

○荒木令江、徳王宏、湯之上俊二、馮立平、小沢達也、佐谷秀行

- 3) 第60回日本癌学会総会  
(平成13年9月26～28日、横浜)  
ミニシンポジウム 腫瘍抑制遺伝子 NF1腫瘍抑制遺伝子産物neurofibrominの神経系細胞分化におけるRAS-GAP活性制御機構の解析  
○湯之上俊二、徳王宏、馮立平、小沢達也、西徹、菊池章、倉津純一、佐谷秀行、荒木令江
- 4) 第74回日本生化学会大会  
(平成13年10月25～28日 京都)  
シンポジウム “ゲノム新時代における創薬” プロテオミクスによる神経系腫瘍抑制関連遺伝子の機能解析  
○荒木令江、徳王宏、湯之上俊二、馮立平、小沢達也、木本真順美、菊池章、次田皓、佐谷秀行
- 5) 第74回日本生化学会大会  
(平成13年10月25～28日 京都)  
神経線維腫症1型 (NF1) 腫瘍抑制遺伝子産物neurofibrominの神経系細胞内RAS-GAP機能制御機構の解析  
○湯之上俊二、徳王宏、馮立平、小沢達也、菊池章、倉津純一、佐谷秀行、荒木令江
- 6) 第10回日本脳腫瘍カンファレンス  
(2001年12月2日～4日 別府)  
NF1遺伝子産物neurofibrominによる神経系細胞内RASの活性制御機構と神経細胞分化との関連  
○湯之上俊二、徳王宏、馮立平、小沢達也、西徹、菊池章、倉津純一、佐谷秀行、荒木令江
- 7) 第1回21世紀シンポジウム(2001年9月22日 東京)  
佐谷秀行 NF1研究の最前線  
荒木令江 NF2研究の最前線
- 8) The Second International Proteome and Proteomics Conference. September 30-October 3, 2001, Canberra, AU.  
PROTEOMIC ANALYSIS OF FUNCTIONAL PROTEINS RELATED TO THE TUMORE SUPPRESSOR GENE PRODUCTS IN BRAIN  
N. Araki, H. Tokuo, S. Yunoue, L. Feng, T. Ozawa, H. Kuwahara, T. Morimasa, A. Tsugita, H. Saya

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患者の神経線維腫におけるstem cell factor発現量の検討

主任研究者 大塚 藤 男 筑波大学臨床医学系皮膚科教授

研究要旨

NF1の神経線維腫において腫瘍内に肥満細胞が多数みられることにstem cell factor (SCF) が如何に関与するかを検討した。NF1患者の神経線維腫腫瘍内では、周囲健常部に比してSCF mRNAの発現が増加していた。次に、SCF蛋白量をELISA法を用いて調べたところ、腫瘍内では、周囲健常部に比してSCF蛋白量も増加していた。また、NF1の神経線維腫内にはc-kit陽性の肥満細胞が多数存在することが確認された。

丸山 智恵 筑波大学臨床医学系皮膚科  
川内 康弘 筑波大学臨床医学系皮膚科  
今門 純久 筑波大学臨床医学系皮膚科

蛋白量で補正した。

c) 抗c-kit抗体による免疫組織化学染色

NF1神経線維腫のPLP固定切片を、抗c-kit抗体 (Santa Cruz社、マウスモノクローナル) を用いて免疫染色し、c-kitの分布を調べた。

A. 研究目的

NF1患者に多発する神経線維腫は、線維芽細胞、シユワン細胞、血管内皮細胞、マスト細胞など多種類の細胞より構成される良性の腫瘍である。NF1の神経線維腫において腫瘍内に肥満細胞が多数みられる。一方、stem cell factor (SCF) は、赤血球系、巨核球系幹細胞の増殖促進以外に、肥満細胞の成熟、活性化、メラノサイトの分化、増殖促進作用を有している。我々は、神経線維腫内に肥満細胞が多数みられることに対して、SCFが如何に関与するかを検討した。

B. 研究方法

a) SCF mRNAのRT-PCR解析

NF1患者の神経線維腫組織と健常部真皮組織から、Isogen (ニッポンジーン) を用いて、total RNAを抽出した。PCR用のプライマー、5'-CCATTGATGCCTTCAAGGAC-3'と5'-GGCTGTCTCTTCTCCAGTA-3'を作成し、SCFのmRNAを検出した。コントロールにG3PDHのプライマーを用いた。

b) 膜型SCFのELISA法による定量

NF1患者の神経線維腫組織と健常部真皮組織を細切し、extraction bufferで抽出、超遠心にて膜画分を得た。得られた膜画分のSCF蛋白量をELISA法にて定量し、

C. 研究結果

まず、NF1患者の神経線維腫および周囲の健常組織からそれぞれtotal RNAを抽出してSCFの発現量の差を調べた。図1に示すように、腫瘍内では周囲健常部に比してSCF mRNAの発現が増加していた。次に、SCFの神経線維腫内での増加は蛋白質のレベルでも起こっているか調べる為に、SCF蛋白量をELISA法を用いて調べた。NF1の神経線維腫および周囲の健常組織から超遠心法にて膜画分を抽出し比較したところ、腫瘍内では6.1pg/microgram蛋白と、周囲健常部 (4.2pg/microgram蛋白) に比してSCFは増加していた (表1)。また、SCFの受容体であるc-kitに対する抗体を用いた神経線維腫の免疫組織化学染色では、NF1の神経線維腫内にはc-kit陽性の肥満細胞が多数存在することが確認された (図2)。

D. 考 察

SCFは、赤血球系、巨核球系幹細胞の増殖促進作用、メラノサイトの分化、増殖促進作用以外に、肥満細胞の成熟、活性化作用を有している。我々は、平成8年度の当班会議で、NF1患者3人の神経線維腫由来培養細胞と健常部由来培養細胞、健常人由来培養線維芽細

胞を用いたRT-PCRで、SCFの発現が腫瘍部由来培養細胞でのみ増加していることを報告している。今回さらに、in vivoでのRNAおよび蛋白質のデータ、さらに、SCFの受容体であるc-kitの解析データを加えた。すなわち、神経線維腫の腫瘍内ではSCFの発現増加があり、このSCFの作用によって神経線維腫内には多数の肥満細胞が存在する可能性が示唆された。神経線維腫が多発するNF1患者においては、蕁麻疹様の痒みに困って

いることも多いが、神経線維腫内でのSCFの発現増加がNF1のこうした病態を形作っていると思われる。

## E. 結 論

NF1神経線維腫の腫瘍内ではSCFの発現増加があり、SCFの持つ肥満細胞の成熟、活性化作用によって、神経線維腫内に多数の肥満細胞が存在する可能性が高い。

図1

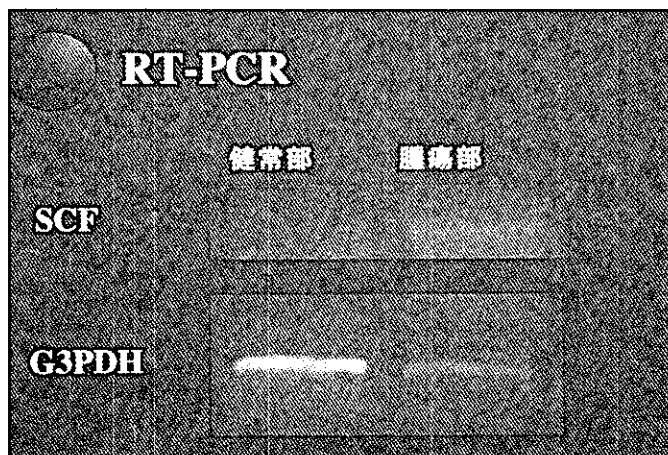


図2

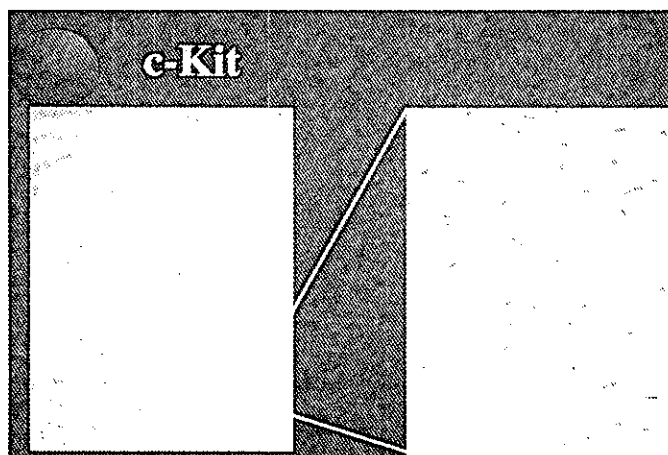


表1

結 果 (ELISA法)			
	SCF (pg/ml)	蛋白量 ( $\mu$ g/ml)	SCF/蛋白量
正常部	8	1.9	4.211
腫瘍部	54	8.8	6.136



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株への $\gamma$  IFN 遺伝子導入後の  
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

ヒト正常線維芽細胞株および初代培養神経線維腫細胞株にヒトガンマインタフェロン ( $\gamma$  IFN) 遺伝子を導入し、増殖阻害効果を検討した。結果は、ヒト $\gamma$  IFN遺伝子導入線維芽細胞株および神経線維腫細胞株のいずれも遺伝子導入1日目から著明な増殖阻害が観察された。培養液中のウシ胎児血清含有の有無に拘らずこの増殖阻害が観察された。いずれの細胞株培養液中にも200-400 pg/mlの $\gamma$  IFNがELISA法により定量された。神経線維腫細胞株では $\gamma$  IFN遺伝子導入後cell killing効果も示唆された。以上の実験結果から神経線維腫に対する $\gamma$  IFN遺伝子療法の有効性が示唆された。

田中 俊裕 福岡大学医学部第一外科  
志村 英生 福岡大学医学部第一外科  
荒川 文子 福岡大学医学部第一生化学  
黒木 政秀 福岡大学医学部第一生化学

A. 研究目的

神経線維腫の増殖抑制を可能にする薬剤あるいは手法の開発が必要である。今回、 $\gamma$  IFN遺伝子を神経線維腫細胞に導入することにより増殖阻害効果がどの程度みられるのかについて検討し、将来の $\gamma$  IFN遺伝子療法の可能性について考察した。

B. 研究方法

1) 細胞・ヒト線維芽細胞株はクラボウより購入した。神経線維腫細胞株は3名のレックリングハウゼン病患者の神経線維腫より初代培養し、3～4代の培養細胞を用いて実験した。なお、培養液はクラボウより購入した増殖因子含有合成培養液、あるいはウシ胎児血清含有MEM培養液を用いた。

2)  $\gamma$  IFN遺伝子クローニング・EBウイルス感染者末梢血白血球より全RNAを採取し、それよりcDNAを逆転写酵素を用いて合成した。DDBJ DNAデータベースより $\gamma$  IFNの合成primerを作製し、PCR法により増幅後、pT7Bluc Tベクターにクローニングした。

Primerの5'末端に導入した500bpの $\gamma$  IFN遺伝子を切り出し、ヒト細胞で発現可能なpcDNA3.1(-)ベクターに挿入した。

3)  $\gamma$  IFN遺伝子導入・遺伝子導入は常法に従ってLipofectAMIN PLUS<sup>TM</sup> reagent (Gibco) を用いたりポフェクタミン法により行った。他の細胞で行った本遺伝子導入法の効率は80%以上であった。

4) 細胞増殖阻害効果の検定・培養プレートに $1 \times 10^4$ 個/Wellの細胞をまき、24時間後マニュアルに従ってLipofectAMIN PLUS<sup>TM</sup> reagentを用いた $\gamma$  IFN遺伝子導入を行った。遺伝子導入1、3、5日後に培養液を凍結した。各培養液採取日に細胞をトリプシン処理し、コールターカウンターにて細胞数を算定した。実験は各ポイントあたりtriplicateで行った。コントロールとして、無処置群、LipofectAMIN PLUS<sup>TM</sup> reagentを用いて遺伝子導入操作のみ行った群、ヒト $\gamma$  IFN (マルホ製薬提供、サントリー作製) を各Wellに1000U (国際単位)/ml添加した群を設けて、細胞数を同様に算定した。また、遺伝子導入3日後の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み率を以前述べた方法<sup>1)</sup>で測定した。

5) ELISA法による $\gamma$  IFNの定量・上記凍結した培養液中の $\gamma$  IFN濃度をELISA kit (R&D System, USA) を用いて、常法に従って $\gamma$  IFNを定量した。

C. 研究結果

1) 正常線維芽細胞株への $\gamma$  IFN遺伝子導入効果・

図1および2に線維芽細胞株に $\gamma$  IFN遺伝子を導入し、1、3および5日後の細胞数、および培養液中の $\gamma$  IFN濃度の推移を示す。ウシ胎児血清を含むMEM培養液中でも同様の阻害効果が観察された。5日目以降若干の細胞数の増加がみられた。培養液中には導入1日後から200-400 pg/mlの濃度の $\gamma$  IFNが定量された。図3に $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み実験の結果を示す。遺伝子導入3日目の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み率はほぼ0であった。

2) 神経線維腫細胞株への $\gamma$  IFN遺伝子導入効果・3名のレックリングハウゼン病患者の神経線維腫より得られた初代培養株を用いて $\gamma$  IFN遺伝子導入実験を行った。図4に合成培地で培養した最初の患者細胞株の結果を示す。遺伝子導入線維芽細胞株と同様、著明な増殖阻害効果がみられた。ウシ胎児血清含有MEM培地で培養した場合でも同様の結果が得られた(データは示さない)。培養5日目になると細胞数は最初あった時の細胞数よりむしろ減少しており、この効果は増殖阻害というよりcell killing効果と考えられた。ほかの2名の細胞株でも同様の結果が得られた。ELISA法による培養液中の $\gamma$  IFN定量でも、線維芽細胞での実験結果(図2)と同様の結果が得られた(図5)。

## D. 考 察

神経線維腫細胞株が $\gamma$  IFNにより増殖阻害を受けることを前報報告<sup>1)</sup>した。その阻害率は $\gamma$  IFNの100 U/mlあるいは1000 U/mlのいずれの濃度でも、添加5日目で約40%程度であった。100 U/mlの $\gamma$  IFN濃度は商品化されている $\gamma$  IFNの1 vial ( $2 \times 10^6$  U/vial)の点滴静注で血中で十分達成できる濃度である。従って、 $\gamma$  IFNの点滴静注により神経線維腫を治療することは細胞レベルの実験からは可能と考えられる。

一方、 $\gamma$  IFNの効果をさらに増強させるために、今回 $\gamma$  IFN遺伝子を神経線維腫細胞株に導入し、その増殖阻害効果を検討した。まず、正常線維芽細胞株に遺伝子導入を行い、1000 U/mlの $\gamma$  IFNそのものを添加した場合との比較を行った。その結果、 $\gamma$  IFN遺伝子を導入した細胞は導入1日後より $\gamma$  IFNを培養液中に放出し、 $\gamma$  IFNを培養液中に添加した細胞よりも明らかに高い増殖阻害率を示した。なぜ遺伝子導入細胞の方が増殖阻害をより受けるのかについては不明であるが、細胞膜の $\gamma$  IFN受容体を介する増殖阻害反応機構以外に細胞内での別の増殖阻害機構あるいは細胞死機構がある

のかもしれない。

次に、線維芽細胞株での実験結果をもとに、神経線維腫細胞株を用いて同様の実験を行った。結果は、 $\gamma$  IFN遺伝子を導入した3種の神経線維腫細胞株のいずれも増殖率の著明な低下をみとめた。導入5日目以降はむしろ細胞数は減少し、cell killing効果もあるのではないかと考えられた。この現象は線維芽細胞株ではみられなかった。また、線維芽細胞株と同程度の培養液中への $\gamma$  IFN放出がみられた。

以上の実験結果から、神経線維腫の新しい治療法として $\gamma$  IFN遺伝子療法の可能性が示唆された。現時点では $\gamma$  IFN遺伝子を手術不能な神経線維腫へ局所的に投与することは可能であろう。最近、悪性末梢神経鞘腫の初代培養細胞株を用いて同様の $\gamma$  IFN遺伝子導入実験を行い、神経線維腫細胞株と同様の強い増殖阻害効果を観察した。従って、いわゆる神経線維肉腫への治療応用も可能ではないかと考えられる。今後、実際の臨床応用をめざして、 $\gamma$  IFN遺伝子療法が*in vivo*でも有効であるかどうかについて動物実験によりさらに検討すべきと思われる。

## E. 結 論

培養神経線維腫細胞への $\gamma$  IFN遺伝子導入により、著明な増殖阻害効果が得られた。今後、神経線維腫に対する $\gamma$  IFN遺伝子療法を含めた $\gamma$  IFN療法の臨床応用をめざしたさらなる研究が望まれる。

## F. 文 献

1. 培養神経線維腫細胞に対する $\gamma$  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、新村真人、本田まりこ、大塚藤男、小辻智恵、寺尾浩。厚生省特定疾患「神経皮膚症候群」調査研究班「平成12年度報告書」14-16 2001

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

レックリングハウゼン病の多発性皮膚神経線維腫に対するエタノール局注療法  
佐藤典子、渡邊亜紀、久保田由美子、中山樹一郎  
日本皮膚科学会雑誌 111(9):1369-1373, 2001

2. 学会発表  
なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

図1 ヒト線維芽細胞株増殖動態  
(無血清合成培地)

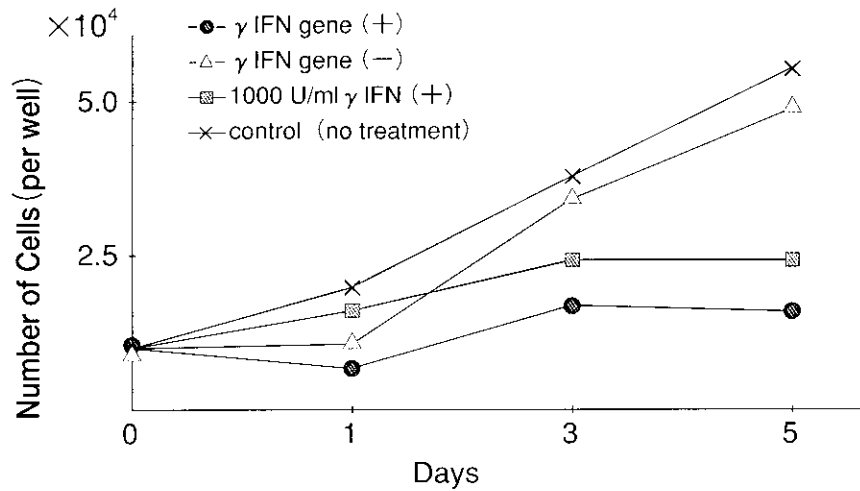


図2  $\gamma$  IFN 遺伝子導入ヒト線維芽細胞株培養液中の  
 $\gamma$  IFN濃度 (無血清合成培地)

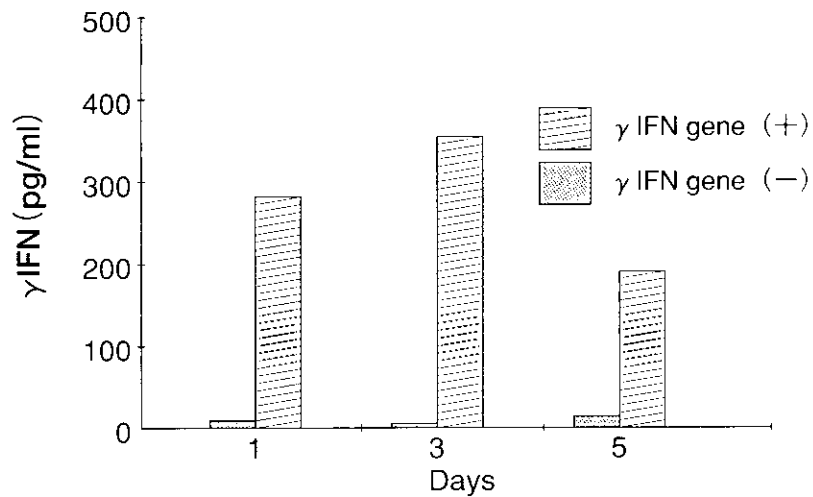


図3  $\gamma$  IFN 遺伝子導入ヒト神経線維腫細胞株の  
[ $^3$ H]-チミジン取り込み率

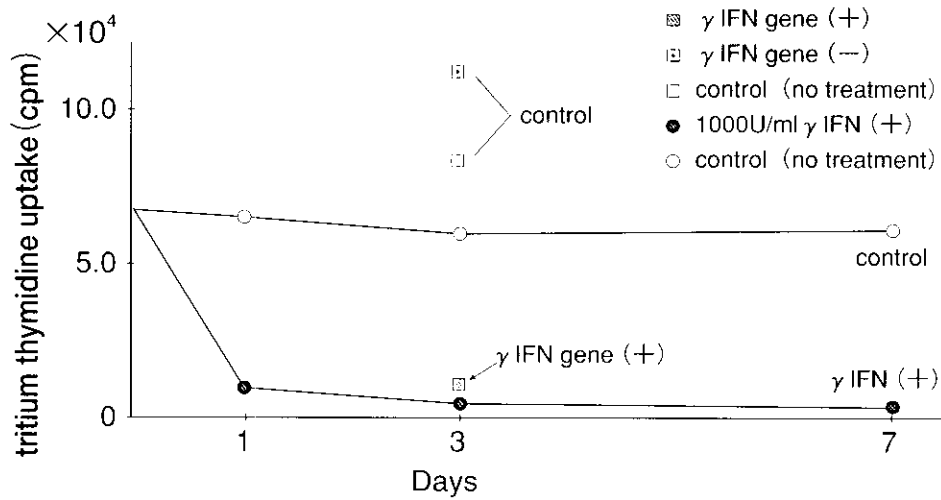


図4  $\gamma$  IFN 遺伝子導入による神経線維腫細胞株増殖阻害  
(無血清合成培地)

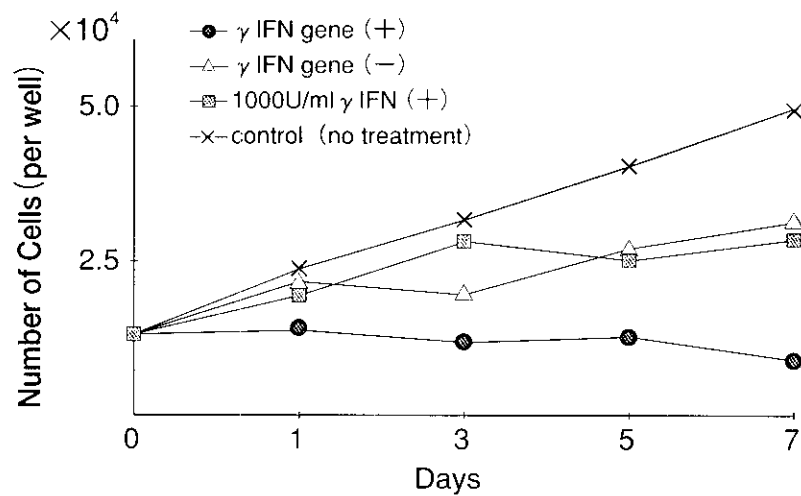
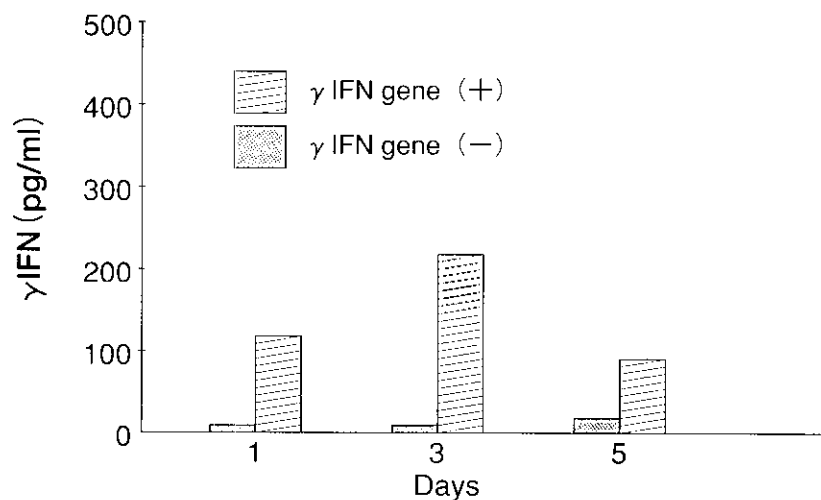


図5  $\gamma$  IFN 遺伝子導入神経線維腫細胞株培養液中の  
 $\gamma$  IFN 濃度 (無血清合成培地)



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

## 神経線維腫由来シュワン細胞の長期培養

研究協力者 今 門 純 久 筑波大学臨床医学系皮膚科助教授

### 研究要旨

NF1の神経線維腫からシュワン細胞を長期に培養することは困難と言われてきた。そこで我々は、Rosenbaumらの方法（forskolinを用いて細胞内のcAMP濃度を上げ線維芽細胞の増殖を抑える一方、シュワン細胞のmitogenであるbeta1-herregulinを培地に添加し、poly-lysineとラミニンでコートしたシャーレで培養する）を用いてNF1の神経線維腫からシュワン細胞を長期に培養することを試みた。抗ヒトfibroblast抗体を用いたwestern blotでは、passage 3の細胞においてもfibroblastの混在が見られたが、形態学的には長い突起を持ったシュワン細胞様細胞が増加していた。

丸山 智恵 筑波大学臨床医学系皮膚科  
川内 康弘 筑波大学臨床医学系皮膚科  
大塚 藤男 筑波大学臨床医学系皮膚科

態学的観察および、抗ヒトfibroblast抗体（Prolyl 4-Hydroxylaseのbetaサブユニットに対する抗体、ダコ社製）を用いたwestern blotで、培養細胞の構成を検討した。

### A. 研究目的

NF1の神経線維腫は、線維芽細胞、シュワン細胞、血管内皮細胞、マスト細胞など多種類の細胞より構成される良性の腫瘍である。従来より、NF1の神経線維腫から培養してシュワン細胞を長期に培養することは困難と言われてきた。一方、神経線維腫の病態の理解や、神経線維腫の新しい治療法を確立する為には、シュワン細胞を長期に安定的に培養することは、必要なことと思われる。そこで我々は、最近報告されてRosenbaumらの方法を用いて、NF1の神経線維腫からシュワン細胞を長期に培養することを試みた。

### B. 研究方法

方法は、Rosenbaumらの報告（Rosenbaum T, et al., J Neurosci Res 61:524-532, 2000）に従った。NF1神経線維腫の手術サンプルを細切しcollagenaseやdispaseによる処理を行った後、0.5mMの3-iso-butyl-methylxanthine、10nMのbeta1-herregulin、500nMのforskolinやインスリンを含有するDMEM（10%FCS）で培養した。シャーレは、poly-lysineとラミニンでコートしたものを用いた。DMEM（10%FCS）のみで培養したものを比較の対象とした。それぞれ継代したものをP0、P1、P2とし、形

### C. 研究結果

図1に抗ヒトfibroblast抗体を用いたwestern blotの結果を示す。60kDのProlyl 4-Hydroxylaseのbetaサブユニットに相当するバンドは、解析したすべてのサンプルで陽性であった。このことよりRosenbaumらのシュワン細胞増殖用培地を用いて培養したP3の培養細胞においても、一定量の線維芽細胞が存在していることが解った。しかし、図2に示すように、シュワン細胞増殖用培地においては長い突起を持ったシュワン細胞様細胞が明らかに増加していることが形態学的には観察できた。

### D. 考 察

NF1患者において、1対のNF1遺伝子（neurofibromin）の一方は生来性に異常がある。さらに元来正常であったもう一方のalleleに、somaticな変異（second hit）が入ることで神経線維腫が生じると考えられてきた。神経線維腫を構成する複数の細胞成分の中でsecond hitが入るのは、線維芽細胞なのか、シュワン細胞なのかは、長い間疑問の対象であった。近年、神経線維腫においてsecond hitはシュワン細胞に起こっていることが明らかにされたが、これで神経線維腫の病態が完全に明ら

かにされたとは言えない。我々が今回検討した、NF1の神経線維腫からシュワン細胞を長期に培養する方法は、NF1神経線維腫の病態を知る上で有用である。

Rosenbaumらの報告 (Rosenbaum T, et al., J Neurosci Res 61:524-532, 2000) を追試したが、原著の結果と異なり、P3においても線維芽細胞が明らかに残存しており、シュワン細胞は充分には濃縮されなかった。しかし、形態学的には長い突起を持ったシュワン細胞様細胞が多数観察されており、さらに検討する価値のある方法と思われる。

図1

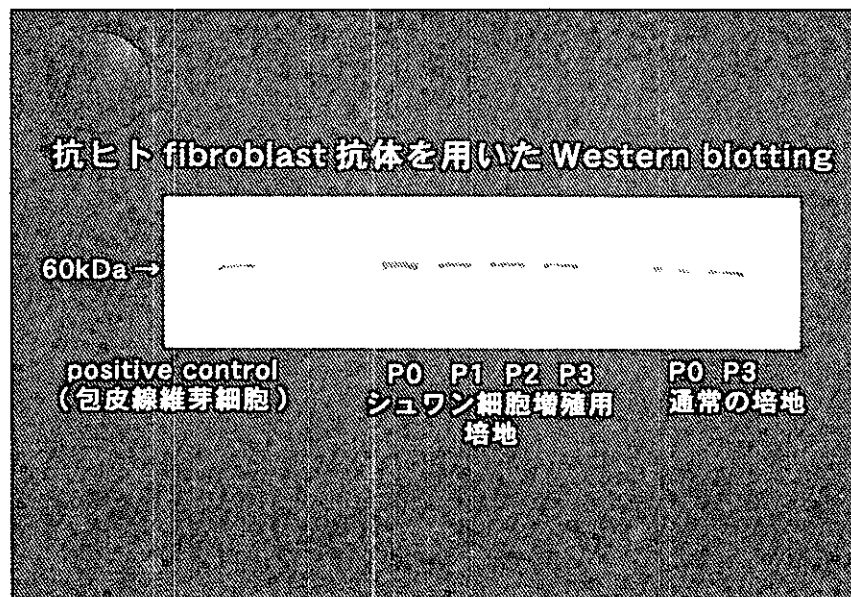
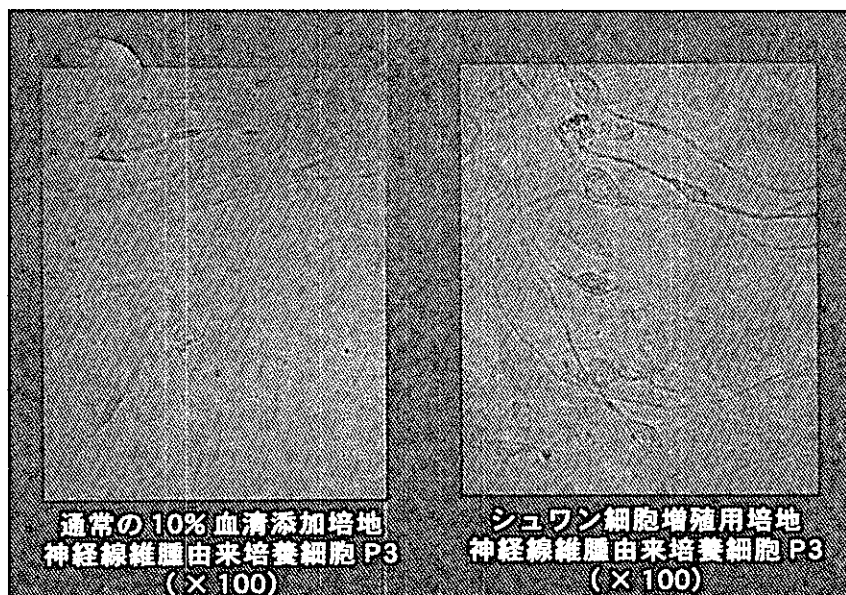


図2



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

隆起性皮膚線維肉腫におけるPDGF  $\beta$  型受容体阻害剤による  
アポトーシス誘導に関する研究

研究協力者 島田 眞路 山梨医科大学皮膚科教授

研究要旨

隆起性皮膚線維肉腫（DFSP: dermatofibrosarcoma protuberance）は皮下に浸潤性に増殖し局所再発傾向が強い、中間度の悪性度を示す腫瘍である。DFSPは第17、22染色体間の再編成により、collagen type I  $\alpha 1$  遺伝子とPDGFB遺伝子が融合したfusion遺伝子（COL1A1/PDGFB gene）が存在することが知られている。sis癌遺伝子であるPDGFBは強力な細胞増殖促進作用を有し、DFSPの発生、増殖に関与していることが考えられることより、我々はDFSPに関連したCOL1A1/PDGFB fusion gene及びその融合タンパクの機能的、構造的解析を検討した。本研究では、患者由来ヒトDFSPの腫瘍細胞を用いて、COL1A1/PDGFB fusion geneの機能及びその構造のより詳細な解析を行い、またPDGF  $\beta$  型受容体阻害剤による腫瘍細胞の増殖及びアポトーシス誘導に対する影響を検討し、抗腫瘍療法に応用することを試みる。

清水 顕 山梨医科大学皮膚科

A. 研究目的

隆起性皮膚線維肉腫（DFSP; dermatofibrosarcoma protuberance）は皮下に浸潤性に増殖し局所再発傾向が強い、中間度の悪性度を示す腫瘍である。DFSPは第17、22染色体間の再編成により、collagen type I  $\alpha 1$  遺伝子とPDGFB遺伝子が融合したfusion遺伝子（COL1A1/PDGFB gene）が存在することが知られている（Simon, M-P., et al, Nat. Genet., 15:95-98, 1997）。sis癌遺伝子であるPDGFBは強力な細胞増殖促進作用を有し、DFSPの発生、増殖に関与していることが考えられることより、我々はDFSPに関連したCOL1A1/PDGFB fusion gene及びその融合タンパクの機能的、構造的解析を検討した（A. Shimizu, et al., Cancer Res., 59, 3719-3723, 1999）。本研究の目的は、ヒトDFSPの腫瘍細胞を用いて、COL1A1/PDGFB fusion geneの機能及びその構造のより詳細な解析を行うことである。また受容体の特異的阻害剤による腫瘍細胞の増殖能に対する影響を検討し、抗腫瘍療法に応用することである。

B. 研究方法

DFSP由来腫瘍細胞の分離、収集：DFSP患者の腫瘍

細胞をskin biopsy時に収集し、in vitro培養系にて継代培養する。この際、患者には十分な説明を行い同意が得られた場合のみ行う。COL1A1/PDGFB fusion 遺伝子の検索解析：腫瘍細胞におけるCOL1A1/PDGFB fusion遺伝子の発現を特異的なprobeを作製し、RT-PCR法及びノーザンブロット法にて検討する。融合蛋白の機能及び構造解析：COL1A1/PDGFB fusion遺伝子が実際に蛋白として産生されていることを確認する。腫瘍細胞におけるPDGF  $\beta$  型受容体の発現及びそのリン酸化の程度を検討するため、抗PDGF  $\beta$  型受容体血清にて免疫沈降した後抗tyrosine抗体を用いてウエスタンブロット法を行う。PDGF  $\beta$  型受容体の特異的阻害剤によるin vivo、in vitroでの増殖能に関する影響：腫瘍細胞を6-well plateにまき、細胞数の経時的変化を比較することで阻害剤の増殖能における影響を検討する。また同時にTUNEL法を用いてアポトーシスの有無を確認する。次にin vitroにおいてCOL1A1/PDGFB fusion遺伝子を発現しているDFSP腫瘍細胞をnude miceの皮下に移植し、in vivoでの腫瘍形成能を検討する。同時にPDGF  $\beta$  型受容体阻害剤を投与し、腫瘍の増殖能に及ぼす影響を検討する。

C. 研究結果

ヒトDFSP由来腫瘍細胞をskin biopsy時に収集し、in

vitro培養系にて継代培養した後、6つのprimary cultureを樹立した。これら腫瘍細胞におけるCOL1A1/PDGFB fusion遺伝子の発現を特異的なprobeを作製し、RT-PCR法及びノーザンブロット法にて確認した。腫瘍細胞におけるPDGF $\beta$ 型受容体の発現及びそのリン酸化の程度を検討するため、抗PDGF $\beta$ 型受容体血清にて免疫沈降した後抗tyrosine抗体を用いてウエスタンブロット法を行ったところ、全例でPDGF $\beta$ 型受容体の発現及び活性化を認めた。次にPDGF $\beta$ 型受容体の特異的阻害剤 (STI-571) によるin vitroでの増殖能に関する影響を検討したところ、60-75%の増殖抑制が認められた。in vitroにおいてCOL1A1/PDGFB fusion遺伝子を発現しているDFSP腫瘍細胞をnude miceの皮下に移植し、in vivoでの腫瘍形成能を検討したところ、6例中1例の腫瘍細胞が皮下に腫瘍を形成した。PDGF $\beta$ 型受容体阻害剤を投与し、腫瘍の増殖能に及ぼす影響を検討したところ、腫瘍の増殖が阻害され、TUNEL法によりアポトーシスが誘導されていることが確認された。

## D. 考 察

今回我々が調べたヒトDFSP由来腫瘍細胞は全てCOL1A1/PDGFB fusion遺伝子を有しており、PDGF $\beta$ 型受容体の発現及び活性化を認めた。PDGFBは強力な細胞増殖促進作用を有するが、DFSPの腫瘍の発生、増殖に関与している可能性が示唆される。PDGF $\beta$ 型受容体の特異的阻害剤 (STI-571) 投与によりヒトDFSP由来腫瘍細胞の増殖抑制が認められ、in vivoではこの増殖抑制効果は主にアポトーシス誘導によるものと思われる。PDGFB及びその受容体の強発現は他の間葉系腫瘍においても報告されており、その腫瘍の増殖に関与していると考えられる。今後それらの腫瘍におけるPDGF $\beta$ 型受容体の特異的阻害剤の効果を検討していく予定である。

## E. 結 論

ヒトDFSP腫瘍の発生、増殖においてPDGFBによるautocrine PDGF $\beta$ 型受容体の活性化が関与している可能性が示唆された。PDGF $\beta$ 型受容体の特異的阻害剤であるSTI-571は、生物毒性なども少なく、現在CMLなどの白血病治療薬となっており、今後ヒトDFSP腫瘍の薬物的治療として有用である可能性が示唆される。

## F. 研究発表

Growth inhibition of Dermatofibrosarcoma Protuberans Tumors by the Platelet-derived Growth Factor Receptor Antagonist STI571 through induction of Apoptosis.

T. Sjoblom, A. Shimizu, K.P. O'Brien, K.Pietras, P.D. Cin, E. Buchdunger, J. P. Dumanski, A. Ostman, and C.-H. Heldin Cancer Research 61, 5778-5783, Aug 1, 2001

## G. 知的所有権の取得状況

特になし



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

## ラット脳、皮膚における diacylglycerol kinase の発現

研究協力者 三橋 善比古 山形大学医学部皮膚科助教授

### 研究要旨

Diacylglycerol kinase (DGK) は、細胞の増殖や分化などの最も根源的な細胞機能に関わる protein kinase C を活性化させる diacylglycerol の代謝酵素であり、現在のところ脳などでの組織特異的な発現が明らかにされ、数種のアイソタイプが報告されている。DGK が産生する phosphatidic acid は neurofibromin の GAP 活性を抑制するという報告や、最近では DGK アイソタイプのうち DGK  $\zeta$  が Ras の活性を制御しているとの報告があり、この分子種が neurofibromatosis の病態に関与するか解析していく予定である。

川口 雅一 山形大学医学部皮膚科  
近藤 慈夫 山形大学医学部皮膚科  
後藤 薫 山形大学医学部第2解剖

### A. 研究目的

Diacylglycerol kinase (DGK) は diacylglycerol (DAG) を phosphatidic acid (PA) に変換させる酵素であり、現在まで、人において9種のアイソタイプがクローニングされている。我々はこれまでの研究で、ラットにおいて6種のDGKのクローニングと、主に脳においてその発現局在を明らかにしてきた。DGKが産生するPAは neurofibromin のGAP活性を抑制するという報告や、最近ではDGKアイソタイプのうちDGK  $\zeta$  がRasの活性を制御しているとの論文が報告されており、neurofibromatosis の細胞内シグナル伝達機構にDGKが関与するか解析を試みることを目的とする。

### B. 研究方法

ラット皮膚fibroblastを培養しAGPC法でRNAを抽出し、各アイソタイプ (DGK  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ) の mRNA の発現を cDNA probe を用いて Northern blotting 法により解析した。さらに3mmトレパンメスでラットに皮膚欠損をつくり、1、3、5、7、15日目で皮膚欠損させた部分を含む周囲を切除し創傷治癒のモデルとし、経時的に各アイソタイプの発現変動を in situ hybridization 法で解析した。

### C. 研究結果

fibroblast培養系において、Northern blotting法による解析ではDGK  $\alpha$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$  が発現していた。しかし in situ hybridization 法では正常皮膚において fibroblast はこれらのアイソタイプの発現は見られなかった。創傷治癒モデルにおいては、DGK  $\zeta$  は創傷治癒過程で fibroblast の挙動に一致して発現が増加し、15日目では対照レベルに戻っていた。

### D. 考察

NF1 遺伝子産物 neurofibromin は活性型 Ras から不活性型 Ras に変換する GTPase 活性を上昇させ Ras の活性制御を行っている。Ras GRP のような交換因子は、GTP の結合を促進することによって、Ras を活性化する。Ras GRP は、主に脳に発現し、DAG-binding domain をもつ事が知られていたが、近年 DGK  $\zeta$  が Ras GRP 活性を抑制し、Ras の活性を制御している事がわかってきた。また DGK が産生する PA にも neurofibromin の GAP related domain の活性を抑制する作用があり、neurofibromatosis の細胞内シグナル伝達機構に DGK が関与する可能性がある。DGK アイソタイプの大部分は、程度の差こそあれ脳に発現し、特有の脳内遺伝子発現を示す。DGK  $\alpha$  はグリア細胞に多く、神経細胞には見られない。DGK  $\beta$  は線条体、側座核、嗅球、嗅結節の神経細胞に非常に多く発現し、DGK  $\gamma$  は網膜に最も多く、脳内では小脳のプルキンエ細胞に多く発現している。DGK  $\zeta$  は海馬、

小脳、大脳皮質、嗅球などに発現し、核移行シグナルを持ち、細胞分裂や分化に関与していることが示唆されている。DGK $\epsilon$ はグリセロール骨格のsn-2位にアラキドン酸を含むDAGを特異的にリン酸化するDGKで、脳全体の灰白質の神経細胞全体で発現している。多くのDGKアイソザイムが神経細胞に発現している事実は、神経細胞内におけるDGKアイソザイムの重要性を示唆するものであり、今後この分子種の機能を明らかにするとともに、neurofibromatosisとの関連を解析していく予定である。

## E. 論文業績

- 1) 三橋善比古：遺伝性皮膚疾患の診療における病診連携、日臨皮医学会誌 70：50-54、2001.
  - 2) Mitsuhashi Y, Suzuki N, Kondo S: Erythema and reticular pigmentation on a fatty young man. Proceedings of the 12th Japan-Korea Joint Meeting of Dermatology. 234-237, 2001.
  - 3) 今淳, 三橋善比古, 橋本功, 花田勝美：慢性放射線皮膚炎の皮疹部に発症した汗孔角化症の1例、皮膚臨床 43：1089-1091、2001.
  - 4) Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lönne Bodemer C, Paradisi M, Hamel-Teillac D, Ansai S, Mitsuhashi Y, Taieb A, de Prost Y, Zambruno G, Harper JJ, Hovnanian A: Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. J Invest Dermatol 118:352-361, 2002.
  - 5) 三橋善比古：毛孔性紅色秕糠疹、皮膚疾患最新の治療 2001-2002、新村真人・瀧川雅浩編、南江堂、東京、p98、2001（分担）
  - 6) 三橋善比古：皮膚凍結療法、今日の治療指針2001年版、北原光夫他編、医学書院、東京、p115、2001（分担）
- 本家族計画協会・厚生労働省)、東京、2001. 8. 4.
- 4) 三橋善比古：Does the salmon patch reappear?【甲午会賞受賞記念講演】第30回青森県日皮医学会、弘前、2001.11.18.
  - 5) 三橋善比古：患者から学んだこと、遺伝性疾患を中心に～【特別講演】、第3回スキンケア学術講演会、熊本、2001. 11. 30.
  - 6) 三橋善比古：掌蹠角化症の全体像を捉える【特別講演】、山梨皮膚科研究会、甲府、2001. 12. 14.

## F. 口頭発表業績

- 1) 三橋善比古：母斑と遺伝的モザイク～ブラシエロ線の成因についての考察～【特別講演】、第8回長崎ボンベ皮膚科談話会、長崎、2001. 1. 13.
- 2) 三橋善比古：患者から学んだ事【特別講演】、第78回弘前皮膚科専門学会、弘前、2001. 1. 26.
- 3) 三橋善比古：皮膚科領域の遺伝相談【教育講演】、第29回遺伝相談医師カウンセラー研修会（後援：日

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患者に生じた悪性末梢神経鞘腫瘍に対する樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いた免疫治療の試み

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

神経線維腫症1（NF1）患者に生じた悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）に対し、患者樹状細胞（DC）と患者腫瘍細胞の融合細胞を用いた免疫療法を施行した。2症例とも、副作用と思われる症状はみられず、安全性に関しては特に問題は認められなかった。症例1では、免疫療法後にDTH反応が陽性であった。観察期間中、2症例とも臨床的ならびに画像上著明な改善は認められなかった。

高木 祐子<sup>1)2)</sup> 本間 定<sup>2)3)</sup> 大野 典也<sup>2)</sup>  
石地 尚興<sup>1)</sup> 太田 有史<sup>1)</sup>  
1)東京慈恵会医科大学皮膚科  
2)同DNA医学研究所 3)同内科

A. 研究目的

神経線維腫症1（NF1）の数%に悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）が生じるとされるが、現在のところ有効な治療法は確立されていない。近年、悪性腫瘍の免疫治療の分野において、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いる試みがなされている。この融合細胞は樹状細胞の発現するMHC分子や共刺激分子と、腫瘍細胞の抗原を発現していると考えられ、未知の腫瘍抗原を効率よくT細胞に提示し、抗腫瘍効果を誘導することが期待される。今回我々は神経線維腫症NF1に発生した悪性末梢神経鞘腫瘍の2症例に対して、樹状細胞と腫瘍細胞の融合細胞を用いた免疫治療を試みた。

B. 研究方法

症例1は43歳女性、右腰部から大腿部のびまん性神経線維腫内に生じたMPNST。20歳時に他大学病院にてレックリングハウゼン病と診断されたが、加療せず放置していた。平成10年4月、当科受診、6月、12月と計2回右下腿前後面の懸垂型びまん性神経線維腫切除術を施行した。平成11年3月頃より、右大腿懸垂性腫瘍の一部に弾性硬の腫瘤に気づいたが、放置。8月頃より、急速に増大し、12年3月、生検の結果、MPNST

と診断した。胸部CTにて多発性肺転移を認めたため、手術適応はないと考え、3月末よりMAID療法変法を計2クール施行。その後、右大腿に対し、放射線療法を計50Gy施行した。症例2は28歳女性、左腋窩のびまん性神経線維腫内に生じたMPNSTである。生後数ヶ月より全身に散在する色素斑が出現、5歳時に神経線維腫症と診断された。8歳時に左腋窩に皮下腫瘤が生じ、93年切除術施行されたが、その後、同部位に腫瘍が再発した。1999～2000年に急速に増大したため、2000年8月当科外来受診。生検にてMPNSTと診断された。手術はせず、11月より放射線療法計50Gy施行した。それぞれの患者末梢血より単球分画を分離し、GM-CSF、IL-4、TNF- $\alpha$ および自己血清存在下で培養した。10日間、培養し得られた樹状細胞と検体より組織培養した患者腫瘍細胞をポリエチレングリコールで融合した。未融合腫瘍細胞の移入による弊害を防ぐために、細胞融合直前に腫瘍細胞に300Gyの放射線照射をおこなった。この融合細胞を約2週おきに計3回患者の鼠径部に皮内接種した。

C. 研究結果

培養した腫瘍細胞でのMHC-Iの発現は、症例1で陽性であったが、症例2では陰性であった。MHC-IIの発現は両者とも陰性であった。投与回数は症例1で計4回、DC数にして $15.4 \times 10^6$ 、症例2で計3回、 $14.2 \times 10^6$ であり、投与後症例1では、DTH反応（腫瘍lysateを用いた）が陽性化した。免疫治療前後の血中のCD4、CD8、4/8、CD16、CD19、CD56の変化は、有意な差はみ

られなかった。また2症例とも、血圧変動、38度以上の熱発、接種部の疼痛、発疹、血液検査異常など副作用はみられなかった。慢性期においても、接種部位の発赤、腫脹、接種部位腫瘤形成、所属リンパ節腫脹などはみられなかった。

#### D. 考察および結論

症例1、2ともに自覚症状、臨床症状ならびに画像所見では、治療後に著明な変化は認められなかった。症例1では1年前からみられた肺転移巣が画像上少しずつ拡大したが、きわめて進行が緩徐であり、びまん性神経線維腫の一部を手術切除しながら、在宅通院を続けている。症例2も現在通院経過観察中である。本治療により最終的には予後を改善するには至らなかった。この原因としては、融合細胞のみでは十分なCTL活性を得ることができないためであり、動物実験のデータでもあるように、IL-12などとの併用が必要と考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) J. et al: Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. Nat. Med. 3, 1997
- 2) Alexander Kugler, et al: Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. Nat. Med. 6, 2000
- 3) Y. Akasaki, et al: Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. J. Immunotherapy 24(2):106-113, 2001