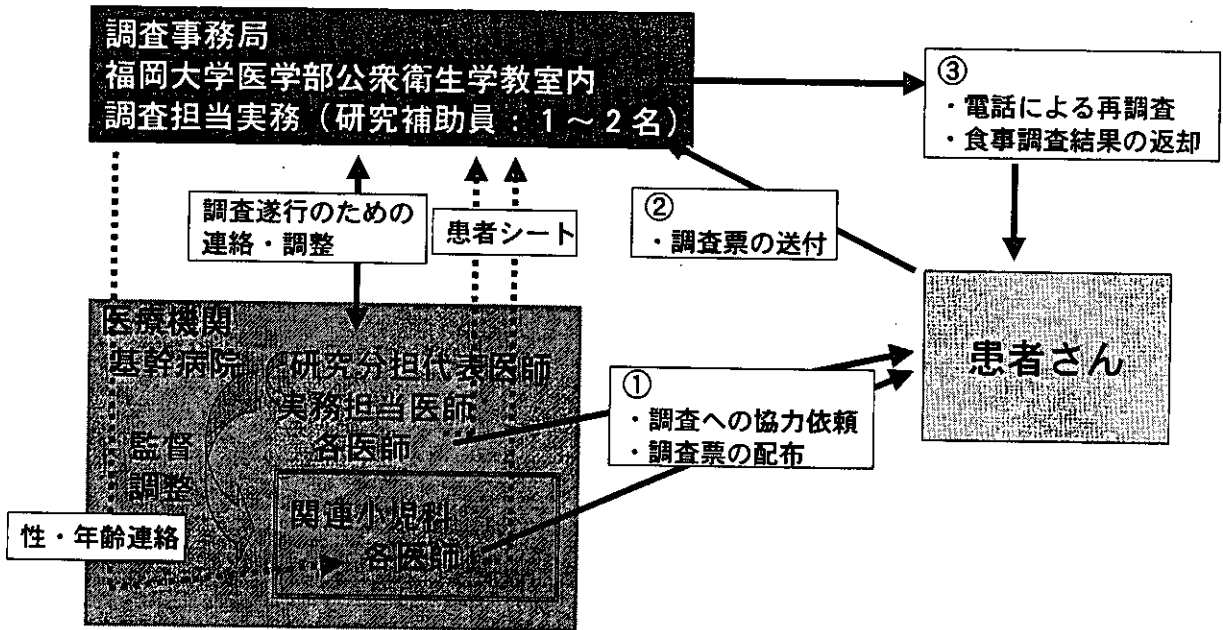


【調査作業分担の概念図】



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

神経線維腫における血管増殖因子の発現（第II報）

分担研究者 大塚 藤 男 筑波大学臨床医学系皮膚科教授

研究要旨

我々は、これまでに NF1 に生じる神経線維腫において、血管増殖因子 VEGF、basic FGF が強く発現していることを報告してきた。本研究では、S-100 蛋白と同時に染色することによりこれらの血管増殖因子を産生している細胞が、S-100 蛋白陽性腫瘍細胞であることを明らかにした。また、神経線維腫由来培養細胞から抽出した RNA をレンプレートとした RT-PCR では、VEGF subtype のうち VEGF₁₂₁ の発現のみが認められた。VEGF₁₂₁ はヘパリン結合性が低く、比較的生物学活性が低いサブタイプであり、神経線維腫においては、VEGF₁₂₁ と basic FGF が共同して血管新生を行っている可能性が示唆された。

川内康弘 筑波大学臨床医学系皮膚科

イブについても解析した。

A. 研究の目的

我々は、神経線維腫症 1（以下 NF1）に多発する神経線維腫ないしその variant であるびまん性神経線維腫において、種々の血管増殖因子（なかでも VEGF、basic FGF）が発現していることを報告してきた。一方で神経線維腫は多様な細胞種から構成されていることが知られており、神経線維腫のなかのどの細胞が血管増殖因子を発現しているかが問題であった。そこで、本研究では、NF1 患者皮膚に生じた神経線維腫およびびまん性神経線維腫でどの血管増殖因子が VEGF、Basic FGF などの血管増殖因子を強く発現しているかを免疫組織化学、RT-PCR 法を用いて検索するとともに、神経線維腫で発現している VEGF のサブタ

B. 研究方法

NF1 患者に生じた神経線維腫、びまん性神経線維腫および NF2 患者に生じた神経鞘腫の手術標本を種々の血管増殖因子（VEGF、basic FGF）に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体で染色するとともに、連続切片を S-100 蛋白に対するポリクローナル抗体でも染色し、その染色性を比較した。さらに上記腫瘍から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により VEGF のサブタイプの発現を mRNA レベルで検索し、どのサブタイプが神経線維腫の血管増生にドミナントに作用しているかを解析した。

1、神経線維腫症 1 の患者から手術により切除された神経線維腫およびびまん性神経線維腫

を液体窒素中で凍結・OCT包埋した。

- 2、上記凍結組織をクライオトームを用いてスライド切片とする。一次抗体として血管増殖因子 (VEGF, basic FGF) または S-100 蛋白に対するポリクローナル抗体、二次抗体として抗うさぎ IgG 抗体を用い、また発色法としてアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法を用いて組織染色を行い、どの血管増殖因子が神経線維腫において発現しているかを比較検討した。
- 3、神経線維腫組織片および健常部真皮を培養し、培養細胞から定法により腫瘍組織から RNA を抽出した。抽出した RNA をテンプレートとし、種々の VEGF subtype に特異的な DNA プローブのミックスを用いて RT-PCR を行い、VEGF subtype の発現を RNA レベルでも比較検討した。

C 研究結果

- 1、VEGF は、周囲の健常真皮にはほとんど発現がなく、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質に強い発現が認められた。S-100 蛋白発現細胞と VEGF 発現細胞は一致していた (図 1 a, e)。神経鞘腫には VEGF の発現を認めなかった (図 1 a, b, g)。
- 2、basic FGF は、周囲の健常真皮にはほとんど発現がなく、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質に強い発現が認められた。S-100 蛋白発現細胞と basic FGF 発現細胞は一致していた (図 1 c, e)。神経鞘腫には basic FGF の発現を認めなかった (図 1 c, d, h)。
- 3、神経線維腫由来培養細胞から抽出した RNA をテンプレートとした RT-PCR では、VEGF subtype のうち VEGF₁₂₁ の発現のみが認めら

れ、VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ の発現は認められなかった (図 2)。

D, F. 結論と考察

神経線維腫症 1 (以下 NF 1) に多発する神経線維腫ないしその variant であるびまん性神経線維腫は、大小の血管が腫瘍内に増生していることが従来より知られており、ときに腫瘍内出血をきたして、また手術時に大量出血して患者の生命をおびやかすこともあり、本症罹患患者の ADL 上大きな問題となっている。一方、血管新生は正常の血管新生以外に炎症や糖尿病性網膜症、腫瘍の増殖に必要な腫瘍血管などに病的血管新生が認められ、疾患の進展に深く関与している (1)。我々は、これまでに NF1 に生じる神経線維腫において、血管増殖因子 VEGF、basic FGF が強く発現していることを報告してきた。本研究では、S-100 蛋白と同時に染色することによりこれらの血管増殖因子を産生している細胞が、S-100 蛋白陽性腫瘍細胞であることを明らかにした。また、神経線維腫由来培養細胞から抽出した RNA をテンプレートとした RT-PCR では、VEGF subtype のうち VEGF₁₂₁ の発現のみが認められた。VEGF₁₂₁ はヘパリン結合生が低く、比較的生物活性が低いサブタイプであり (2)、神経線維腫においては、VEGF₁₂₁ と basic FGF が共同して血管新生を行っている可能性が示唆された。

文献

- (1) 高橋智子、渋谷正史：VEGF と受容体。医学のあゆみ：Vol. 194 (10), 731-735, 2000
- (2) Guo P, Xu L, Pan S, Brekken RA, Yang ST, Whitaker GB, Nagane M, Thorpe PE, Rosenbaum JS, Su Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY. :

Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. *Cancer Res* Vol. 61(23), 8569-77, 2001

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawachi Y, Xuezhu Xu, Ichikawa E, Imakado S and Otsuka F. Expression of angiogenic factors in neurofibroma : *Exp Dermatol*, in press.
- 2) Kotsuji-Maruyama T, Imakado S, Kawachi Y, Otsuka F. PDGF-BB induces MAP kinase phosphorylation and VEGF expression in neurofibroma-derived cultured cells from patients with neurofibromatosis-1. *Journal of Dermatology*. 2002; 29: 713-717.

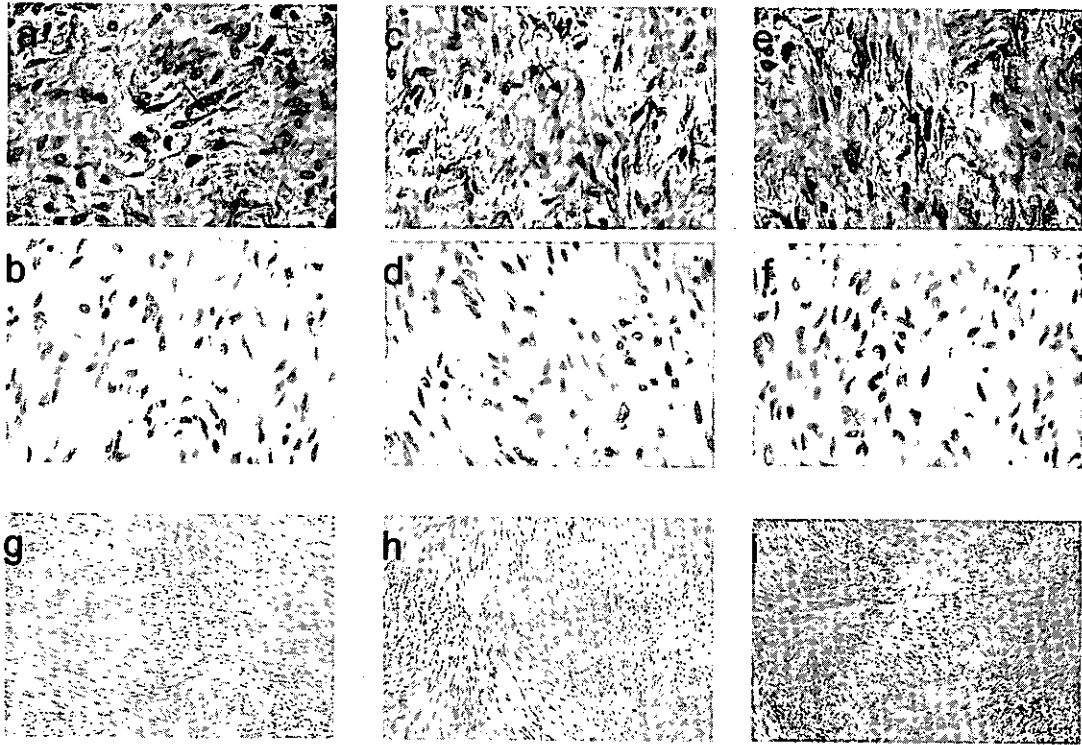


図 1 : 神経線維腫と神経鞘腫における VEGF, basic FGF と S-100 蛋白の発現
 a: VEGF expression in neurofibroma, b: negative control for VEGF, c: basic FGF expression in neurofibroma, d: negative control for basic FGF, e: S-100 expression in neurofibroma, f: negative control for S-100, g: VEGF expression in neurilemmoma, h: basic FGF expression in neurilemmoma, i: S-100 expression in neurilemmoma. Arrows indicate spindle-shaped cells which are stained positively.

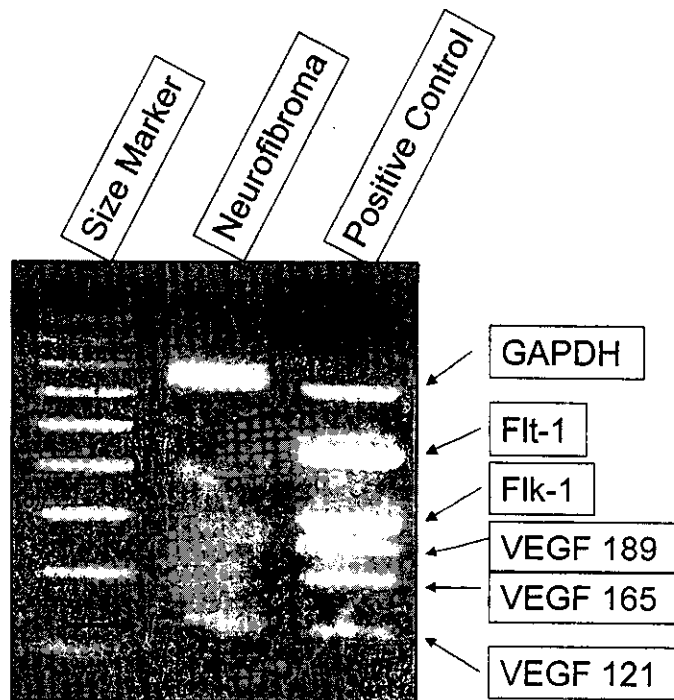


図 2 : 神経線維腫における VEGF subtype の発現パターン
 中央のレーンが神経線維腫。VEGF121 に対応した位置にのみバンドが認められる (矢印)。
 上のバンドはコントロールの GAPDH。

厚生労働科学研究費補助金（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 原因遺伝子産物（neurofibromin, merlin）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ている。NF1 においては、NF1^{-/-}マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の樹立、及び siRNA による NF1 蛋白質のノックダウン法の確立を行い、NF1 蛋白質の欠失による細胞内シグナル・細胞骨格の変化を生化学・形態学的に解析した。NF1 蛋白質欠失細胞において、EGF や FCS 刺激による恒常的な特異的 Ras の活性化に伴って、PI3K シグナル、及び MAPK-ERK シグナルが過剰に活性化され、細胞骨格異常、細胞膜 ruffling, 細胞運動能の亢進が観察された。NF1 に関連する腫瘍形成との関連性が示唆された。更に、NF1 の記憶・学習障害に関連する特異的な所見として、神経細胞内での NF1 蛋白質は、神経細胞の正常な神経突起伸長に最も関わる Ras 活性を調節する GAP として機能しており、この特異的活性は Ras によって高活性型である NF1-TypeI の転写誘導と alternative splicing 調節が重要であることが明らかとなった。これらのことから、neurofibromin は Ras 活性の制御因子として増殖因子により誘導される細胞骨格系の変化を調節し、正常な神経細胞の神経突起伸展形成に重要であることが判った。一方、Merlin に関して、は DNA 修復酵素である PARP や DNA-Pks など 5 つの細胞内結合蛋白質と相互作用し、これらの結合蛋白質と核・細胞質・膜へのシャトルするためのスカフォードとして機能している可能性が示唆された。又、接着因子として知られる CD44 も NF2 との結合蛋白質として知られるが、この分子の細胞内ドメインと相互作用することによって各種遺伝子の転写調節に関わっていることが判明した。CD44 は脳腫瘍悪性化に伴いその細胞内ドメインのフラグメント化が上昇することが判明した。Merlin は細胞内結合蛋白質群を介して、細胞膜では細胞接着、細胞核内においては DNA 修復と転写調節因子として、腫瘍抑制シグナルを伝達していることが示唆された。

湯之上俊二、馮立平、小澤達也、村上大造、
荒木令江 熊本大学医学部腫瘍医学講座

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。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が、これらの原因遺伝子の変異・欠失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。

- 1) NF1 蛋白質 (neurofibromin) に関して、特にその Ras-GAP 活性と細胞内 RAS シグナルの制御機構に注目し、NF1^{-/-}マウス細胞(MEF)の樹立、及び siRNA による NF1 蛋白質のノックダウン法の確立を行い、NF1 蛋白質の欠失による細胞内シグナル・細胞骨格の変化を生化学・形態学的に解析した。又、神経系細胞 PC12 とラット胎児海馬神経細胞における神経突起伸長伸展現象の調節における NF1 蛋白質の役割に関して詳細に解析した。
- 2) NF2 蛋白質 (merlin) に関しては、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 蛋白との相互作用によって NF2 の細胞内シグナルおよび、細胞質と細胞核間シヤトル、及び DNA 障害修復に関与していることを示唆したが、今回、これら細胞内結合性蛋白質群に加えて細胞接着因子 CD44 の細胞内ドメインの関与と、これとの相互作用による NF2 の核内における転写調節機能に注目して解析した。又、CD44 の細胞内ドメインと脳腫瘍との関連性についても検討を加えた。

B. 研究方法

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^{-/-})は致死で有るため、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^{+/-}、及びワイルド(NF1^{+/+})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^{-/-}、NF1^{+/-}、NF1^{+/+}それぞれの不死化細胞を分離し実験に用いた。又、NF1 mRNA 特異的構造を持つ siRNA を合成し、オリゴフェクタミンによる細胞内導入を行うことによって、NF1 mRNA のノックダウンを試みた。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 フラクシオン(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、³²P 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、 γ 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-GRDTypeI、NF1-GRDTypeII、及びNF1-GRDTypeI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 日め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^{-/-}) 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。RFP-PARPcDNA を PARP^{-/-}-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-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。CD44ICD を特異的に認識する抗体を作成し、各種脳腫瘍サンプル中の CD44 のフラグメント化を Western Blotting により、解析した。

C. 研究結果

1) NF1 に関して

(I) NF1 遺伝子ノックアウト細胞、及び SiRNA によって NF1 蛋白質ノックダウンされた細胞における、細胞骨格と細胞内シグナルの変化

NF1^{+/+}及び NF1^{-/-}-MEF、及び SiRNA を導入した Hela、MEF 細胞を用いて、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^{+/+}-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^{-/-}-MEF や NF1 SiRNA を導入細胞では、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^{-/-}-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+/+及び NF1-/-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-/-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-/-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-/-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ともなう 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 Rho や、Rac、Cdc42 など細胞の骨格形成に関連する分子の機能制御を行い、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。

(II) Neurofibromin による神経系細胞の神経突起伸長伸張現象の調節

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、今回、神経分化・神経突起伸長・伸張に際してどのような調節が行われているかを検討した。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 倍以上に達したが、EGF 刺激では全く変化がなかった。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。この NGF 刺激特有の NF1 typeI の alternative splicing には刺激初期における Ras の一過性の活性化が必要不可欠であることが、Ras 欠失 PC12 細胞を用いることによって、明らかになった。又、TypeI の splicing は優位に PI3K 阻害剤にて抑制されたことから、Ras-PI3K シグナルの活性化がこの現象誘導に最も関わっていることが示唆された。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 NF1-Dominant Negative 体(NF1-DN)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 NF1-DN によって抑制すると、神経突起伸長は減少し、異常な形態変化を示した。海馬ニューロンプライマリー培養細胞の培養 1 日目に NF1-DN を導入し経時的に神経突起伸長現象を 7 日まで経時的に観察したところ、抗 tau1 抗体陽性であるアクソンの突起伸長の遅延とブランチ形成の減少、抗 Map2 抗体陽性のデンドライトの数と伸長遅延現象が観察された。以上のことから、細胞内 Neurofibromin は神経系細胞の正常なアクソン、及びデンドライトの伸長進展に必要な不可欠な調節因子であることが証明された。

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と腫瘍化との関連性

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(CD44ICD)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 による転写活性が merlin の発現濃度依存性に亢進することが明らかとなった。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

さなかつた。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つた。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。CD44 は種々の脳腫瘍においてその細胞内フラグメント CD44ICD が上昇する事が示された。これらのことより、脳腫瘍における CD44ICD と NF2 との関連性が注目される。

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^{-/-})及び、その litter mate wild type mice (NF1^{+/+})より embryonic fibroblast (MEF)を樹立した。又、今回新たに siRNA 技術による細胞内 NF1 蛋白質のノックダウンシステムを確立した。これらの道具を用いて、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^{-/-}線維芽細胞及び NF1 ノックダウン Hela 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 及び Rho 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。線維芽細胞では、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、或いは減少していることによる 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。これらの事実は、NF1 患者の neurofibroma 形成において Schwann

細胞とそれを取りまく 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らかとなった。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 NF1typeI 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らかとなった。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 の失活はアクソン伸長・分岐、及びデンドライトの伸長阻害活性を示したことから、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・デンドライトの形成に重要であることが示唆された。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。又、今回我々によって構築された DN 体が、明かに NF1-GAP 活性を特異的に阻害していることは、Ras の活性が DN 体導入細胞で恒常的に上昇していること、又、Raf の活性化体導入 PC12 細胞において神経突起の伸長異常現象が NF1-DN 体導入によって阻害されないことから初めて証明されており、この NF1 特異的阻害活性分子の今後の応用が注目される。

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 遺伝子の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応答して、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 がコアクチベータとして働いていることが判明した。CD44 は種々の脳腫瘍において、その細胞内フラグメント CD44ICD が上昇する事が我々によって明かとなっていることから、merlin の腫瘍抑制機能との関連性に関する詳細な解析を現在行っている。

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、及び神経系細胞の分化異常であると考えられる。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細胞分化と腫瘍抑制に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腫瘍抑制に重要な機能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が、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薬剤など) 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。又、今回われわれが確立した、SiRNA や dominant negative 体の細胞内導入による特異的な分子ターゲット法は、将来的にも基礎、臨床応用両面において有用であることが考えられる。

参考文献

1. Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, Feng L, Ozawa T, Nishi T, Kikuchi A, Hattori A, Kuratsu J, Saya H, Araki N. Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GAP function toward Ras. *J. Biol. Chem.* (2003), in press.
2. 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
3. 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
4. Okamoto I, Tsuiki H, Kenyon LC, Godwin AK,

- Emlet DR, Holgado-Madruga M, Lanham IS, Joynes CJ, Vo KT, Guha A, Matsumoto M, Ushio Y, Saya H, Wong AJ. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol.* 2002 Feb;160(2):441-7.
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. 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.
9. Murakami D, Okamoto I, Nagano O, Kawano Y, Tomita T, Iwatsubo T, De Strooper B, Yumoto E, Saya H. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene.* 2003, 22(10):1511-6.
10. 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.
11. 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.
12. 荒木令江 脳疾患の病態プロテオミクス “注目のプロテオミクスの全貌を知る”
磯辺俊明・高橋信弘編集、pp152-164, 2002

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, Feng L, Ozawa T, Nishi T, Kikuchi A, Hattori A, Kuratsu J, Saya H, Araki N. Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GAP function toward Ras. *J. Biol. Chem.* (2003), in press.
- 2) Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H and Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology*, (2003), in press
- 3) Murakami D, Okamoto I, Nagano O, Kawano Y, Tomita T, Iwatsubo T, De Strooper B, Yumoto E, Saya H. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene.* 2003 Mar 13;22(10):1511-6.
- 4) Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki

- T, Sato K, Murai H, Osoegawa M, Yamada T, Okamura K, Ogino T, Mizumoto K, Yamashita H, Saya H, Kira J. Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett.* 2002 Sep 25;528(1-3):197-202.
- 5) Okamoto I, Tsuiki H, Kenyon LC, Godwin AK, Emler DR, Holgado-Madruga M, Lanham IS, Joynes CJ, Vo KT, Guha A, Matsumoto M, Ushio Y, Saya H, Wong AJ. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol.* 2002 Feb;160(2):441-7.
2. 学会発表
- 1) 自己免疫性神経疾患のヒト脳プロテオームマップを用いた抗原検索. 荒木令江、堀内泉、戸田年総、越智博文、村井浩之、川野克己、佐谷秀行、吉良潤一：第2回日本蛋白質科学会(平成14年6月13-15日 名古屋)
- 2) 脳疾患の発現プロテオミクス. 荒木令江、佐谷秀行：第52回日本電気泳動学会シンポジウム(平成14年6月28日 東京)
- 3) Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. 荒木令江、佐谷秀行：第26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14年7月18~20日 唐津)
- 4) 神経疾患のプロテオミクス. 荒木令江、佐谷秀行：第17回新潟腎シンポジウム-腎疾患とゲノミクス・プロテオミクス研究(平成14年7月27日 新潟大学)
- 5) 癌および神経疾患の病態プロテオミクス. 荒木令江、佐谷秀行：第2回創薬プロテオーム研究会 (平成14年8月29日 横浜市立大学木原研)
- 6) 感染症とプロテオミクス. 荒木令江、佐谷秀行：感染分子と病態形成を考える会 (平成14年8月30日 東京)
- 7) プロテオミクスによる神経系腫瘍抑制遺伝子産物群の細胞内機能解析. Proteomic Analysis on Cellular Function of Neuronal Tumor Suppressor Gene Products. 荒木令江、佐谷秀行：文部科学省科学技術振興調整費 公開シンポジウム 機能プロテオミクス-細胞機能解析のための最新技術-(平成14年9月26日-27日 東京薬学会館)
- 8) 脳神経系疾患の病態プロテオミクス. 荒木令江、佐谷秀行：第9回長崎大学バイオフィオーラム (平成14年9月28日 長崎大学医学部)
- 9) ワークショップ Ras系遺伝子 NF1 遺伝子産物 Neurofibromin の神経系細胞内における Ras-GAP 機能の解析. 湯之上俊二、徳王宏、馮立平、小澤達也、西徹、菊池章、倉津純一、佐谷秀行、荒木令江：第61回日本癌学会総会 (平成14年10月1-3日 東京)
- 10) ワークショップ 家族性腫瘍 NF1 腫瘍抑制遺伝子欠損マウス胎児由来 fibroblast の細胞内シグナル異常と病態との関連. 小澤達也、徳王宏、湯之上俊二、馮立平、藤井清孝、佐谷秀行、荒木令江：第61回日本癌学会総会 (平成14年10月1-3日 東京)
- 11) シンポジウム "機能プロテオミクス-先端技術と病態解析-" 脳神経系疾患のプロテオミクスによる病態解析. 荒木令江、川野克

- 己, 戸田 年総, 荒木 朋洋, 次田 皓, 吉良 潤一, 佐谷 秀行: 第 75 回日本生化学会大会 (平成 14 年 10 月 14-17 日 京都)
- 12) NF1 腫瘍抑制遺伝子産物 neurofibromin のリン酸化による特異的 RAS-GAP 機能制御機構の解析. 馮 立平, 湯之上 俊二, 徳王 宏, 小澤 達也, 市村 徹, 菊池 章, 佐谷 秀行, 荒木 令江: 第 75 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月 25-28 日 京都)
- 13) NF1 遺伝子欠損による細胞内シグナル異常と細胞形態変化の解析. 小澤 達也, 徳王 宏, 湯之上 俊二, 馮立平, 渡部 和彦, 藤井 清孝, 佐谷 秀行, 荒木 令江: 第 75 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月 25-28 日 京都)
- 14) ヒト脳プロテオームマップの作成と自己免疫性神経疾患の自己抗原検索への応用. 川野克己, 戸田 年総, 堀内 泉, 越智 博文, 荒木 朋洋, 佐谷 秀行, 吉良 潤一, 荒木 令江: 第 75 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月 25-28 日 京都)
- 15) プロテオミクスによる神経系腫瘍関連遺伝子産物の機能解析. 荒木令江: 第 12 回 WS フォーラム (平成 14 年 11 月 9 日 福岡)
- 16) Functional regulation of Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin controls neuronal cellular differentiation via its Ras-GAP related domain. Norie Araki, Shunji Yunoue, Kohji Fukunaga, Toru Nishi, Junichi Kuratsu, Hideyuki Saya : The Third Neuroscience Workshop in Kyushu (Nov. 29th, 2002, Hisayama)
- 17) 脳神経系腫瘍及び変性疾患の病態プロテオーム解析. 荒木 令江, 湯之上俊二, 徳王宏, 小澤達也, 馮立平, 川野克己, 戸田 年総, 荒木 朋洋, 次田 皓, 吉良潤一, 佐谷秀行: 第 1 回プロテオミクス学会 (平成 15 年 2 月 13-14 日 つくば)
- 18) シンポジウム「創薬における薬物ターゲットの解析法とその実現」プロテオミクスによる脳神経系腫瘍・変性疾患の病態解析. Proteomic Study of Diseases on Central Nervous System. 荒木令江 小澤達也 湯之上俊二 馮立平 Siriporn Patrakitkomjorn, 徳王宏, 川野克己, 戸田年総, 佐谷秀行: 第 123 回日本薬学会大会 (平成 15 年 3 月 27-29 日 長崎)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

NF1 神経線維腫に対するインターフェロンの抗腫瘍効果の研究

主任研究者 中山 樹 一 郎 福岡大学医学部皮膚科教授

研究要旨

NF1 患者の神経線維腫由来培養細胞に対する γ IFN の増殖抑制機序を解明するために、 γ IFN 遺伝子導入あるいはリコンビナント γ IFN 添加時の神経線維腫細胞の遺伝子発現の変化を解析した。定量 PCR 法による成長因子の発現比較では、有意な遺伝子発現量の変化は認められなかった。cDNA マイクロアレイを用いた包括的遺伝子スクリーニングを行ったところ、多数の Jak/Stat1 依存性の遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子のうち、細胞増殖抑制、アポトーシス関連遺伝子のほとんどは、マイクロアレイ解析によって他の細胞腫でインターフェロンにより発現誘導が確認・報告されたものであった。Jak/Stat1 依存性インターフェロン誘導遺伝子の下流の細胞周期調節遺伝子である cdc 2 の発現低下も見られ、細胞増殖抑制作用との関連が示唆された。また、IFN の臨床試験投与として、 β IFN の全身および局所投与を NF1 患者 1 例に対し行い、皮膚神経線維腫に対する腫瘍増殖抑制効果を観察した。エタノール局注射療法後の腫瘍再発期間の延長と外科的切除が現在唯一の治療手段である比較的大きな腫瘍に対する増殖抑制効果が期待された。

古村南夫	福岡大学皮膚科
吉田雄一	福岡大学皮膚科
久保田由美子	福岡大学皮膚科
清水昭彦	福岡大学皮膚科
田中 俊裕	福岡大学第一外科

遺伝子療法への応用を目指して基礎研究を進めてきた。今回は、 γ IFN 遺伝子導入あるいは培地への γ IFN 添加時の培養神経線維腫細胞に対する増殖抑制作用の機序を解明するために、 γ IFN によって引き起こされる遺伝子発現変化の解析を行った。

β IFN の全身および局所投与時の神経線維腫の増殖抑制効果を確認する臨床試験投与を行った。

A. 研究目的

我々は、 γ IFN が神経線維腫に対し増殖抑制効果を持つことを見出し、遺伝子導入による γ IFN

B. 研究方法

- 1) 細胞：29歳女性のレックリングハウゼン患者の神経線維腫組織からウシ胎児血清10%含有MEM培地にて初代培養細胞株を確立し、3～4代の培養細胞を用いた。
- 2) γ IFN 発現ベクターと遺伝子導入：ヒト末梢血白血球より抽出した全RNAより逆転写酵素を用いてcDNAを合成、 γ IFN 特異的プライマーを用いたPCR法により得られた γ IFN 遺伝子を発現ベクターpcDNA3.1(-)に挿入した。遺伝子導入はリポフェクタミン法により行った。
- 3) 定量的PCR法による成長因子発現量測定：種々のヒト成長因子遺伝子に特異的なPCRプライマーを用いて、 γ IFN 遺伝子発現ベクター導入細胞とコントロール発現ベクター導入細胞で成長因子の遺伝子発現量を定量的に測定し比較した。定量化PCR法はPE Biosystem社のGeneAmp5700サーマルサイクラーを使用しSYBRGreenアッセイにて行った。
- 4) cDNA マイクロアレイによる包括的遺伝子発現スクリーニング：培養神経線維腫細胞株にヒトリコンビナント γ IFN(塩野義製薬)を1000U/ml添加し24時間後に全RNAを抽出した。Agilent社cDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現をスクリーニングし γ IFN 無添加コントロール細胞における遺伝子発現パターンとの比較を行った。
- 5) β IFN の全身および局所投与による神経線維腫の増殖抑制効果の確認：投与症例は37歳の女性。幼少時より躯幹に褐色斑(カフェオレ斑)が存在。14歳頃から躯幹に淡褐色丘疹が出現し、徐々に略全身に拡大した。NF-1の診断にて、計3回の切除術を受けたが、その

後手術に対する不安が強く治療を中断。外科的手術療法以外の治療を希望し当科受診。当初、略全身の神経線維腫に対し、全身麻酔下にエタノール局注療法および電気凝固術を施行したが、やや大きな腫瘍に対する効果が一定せず、術後比較的早期に腫瘍新生も認めため、福岡大学医の倫理委員会の承認および患者の承諾を得た上で「NF-1の神経線維腫に対するインターフェロン療法」を施行した。まず γ IFN300万単位を5日間連続点滴静注で投与し、以後維持量として2週間に1回 γ IFN(300万単位点滴静注)投与を継続した(計3300万単位)。腫瘍の一部には100万単位の局所注射を数回行った。

C. 研究結果

- 1) 定量化RT-PCRによる γ IFNの成長因子遺伝子発現への効果の検討

IFNは様々な腫瘍で血管新生因子bFGF、VEGFの発現を低下させ腫瘍増殖抑制効果を示す。そこで、培養神経線維腫細胞でのbFGF、VEGF、HGFの発現に γ IFNが及ぼす影響について定量化RT-PCR法で検討した。いずれの因子でも増殖が抑制されている状態の γ IFN高発現神経線維腫細胞で有意な発現の低下は見られなかった。

- 2) cDNA マイクロアレイを用いた γ IFN添加神経線維腫細胞の遺伝子発現変化の解析

γ IFNはこれまでのマイクロアレイ検索されたあらゆる細胞において、200～500の遺伝子の発現を変化させるとされる。神経線維腫細胞でも約300の遺伝子の発現誘導と100の発現抑制された遺伝子が同定された。表1にその一部を示す。

発現量が数十～数百倍に増加する遺伝子の多く

は IFN 感受性遺伝子、あるいは IRF (IFN regulatory factor) と呼ばれる γ IFN レセプター下流の Jak/Stat 1 依存性のものがほとんどであった。細胞増殖抑制因子として PKR、ATF 3 の上昇がみられる一方、アポトーシスを誘導する phospholipid scramblase 1 の増加もみられた。CD54 は我々が γ IFN により発現亢進を示す遺伝子として既に報告しているが、21 倍の増加が見られ、この解析の信頼性を示すインターナルコントロールとして適当と考えられた。また、マクロファージに対する γ IFN の増殖抑制において、その発現低下が重要な意義を持つとされる c-Fos は神経線維腫細胞では γ IFN により発現が上昇していた。

一方、発現低下がみられた遺伝子には細胞周期関連の cdc2 と HLH 転写因子の id1 などがあった。血管新生因子や増殖因子については、神経線維腫を構成する Schwann cell, fibroblast, mast cell, neuron などで発現されている PDGF、bFGF、VEGF、midkine 等を含めて 20 種類以上の関連遺伝子がスクリーニングされたが、有意な発現低下は認められなかった (表 1)。

3) β IFN の全身・局所投与による神経線維腫の腫瘍増殖抑制効果の検討

投与期間が投与開始後 4 ヶ月と短く、まだ治療効果の判定には至っていないが、 β IFN の局所投与を行った部位には、組織学的にリンパ球を主体とした著明な細胞浸潤を認めた。現在、特に重篤な有害事象の発生は認めていないため継続投与を行い、腫瘍増殖抑制効果について判定する予定である。

D. 考察

IFN は多面的生物活性を持ち、生体の免疫系調節因子として作用するだけでなく、細胞増殖抑制

作用を示すため抗悪性腫瘍剤として臨床応用されている。しかし、その抗腫瘍作用の機構は未だ完全には解明されていない。近年、細胞表面の IFN 特異的レセプターとその下流の Jak/Stat 1 シグナリング系を介した遺伝子発現調節によって腫瘍細胞の蛋白質や DNA 合成を抑制する機構が解明され、様々なサイトカインによる細胞内のシグナル伝達とも関連し、さらに免疫系調節因子としての作用が加わり抗腫瘍作用を示すことが明らかになってきた。

今回の研究では、IFN 特異レセプターにより活性化される Jak/Stat 1 シグナル伝達系を介する多くの IFN 反応性の遺伝子の発現亢進が認められ、神経線維腫細胞でもこのシグナル伝達系によって、細胞周期調整蛋白の発現調節などが起こり、細胞増殖抑制効果を示す可能性が強く示唆された。

IFN 全身投与による、神経線維腫に対する抗腫瘍作用については、投与症例数が 1 例のみで、今後さらに症例の蓄積や γ IFN 投与なども含めた検討が必要と思われる、最終的な結論を出す段階には至っていない。皮疹の新生や増大が抑制されることが期待されるが、これまで行ってきたエタノール局注療法後の腫瘍再発期間との比較も重要と考えられるので、今後投与を継続し、治療効果を最終的に判定する予定である。

E. 結論

γ -IFN が Jak/Stat 1 シグナル伝達系を介して細胞周期調節分子の発現を抑制し、神経線維腫細胞の増殖抑制作用を示すことが示唆された。 γ IFN によって発現が変化する遺伝子は、IFN 投与時の治療効果確認のマーカーとして利用でき、関連したシグナル伝達経路の究明が効果的な治療法の開発につながると期待される。

F. 研究発表

- 1) Gamma Interferon Gene Transfection Efficiently Inhibits Proliferation of Neurofibroma Cell Lines In vitro. Nakayama J, Tanaka T, Arakawa F, Terao H, Shimura H, Ikeda S, Kuroki M : J Dermatol 30 : 181-188, 2003.

表 1. cDNAマイクロアレイ解析結果
 γ IFN添加後、培養神経線維腫細胞において発現量に変化が認められた遺伝子

遺伝子名	発現比	機能
Gamma-interferon inducible early response gene	316	ISGs
Retinoid inducible gene 1 (RIG1)	213	ISGs
RhoG	204	small GTPase
Tel-2	82	transcription factor
Guanylate binding protein 2 (GBP-2)	52	GTPase
IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 4 (RIG-G)	35	ISGs
IFN-inducible protein p78 (MxA)	35	GTPase, antiviral
IFN regulatory factor 1 (IRF1)	33	tumor suppressor/proapoptotic
Guanylate binding protein 1 (GBP-1)	30	GTPase
IFNalpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	25	ISGs
CD54	21	intercellular adhesion molecule
IFN-stimulated gene factor 3	9.3	ISGs
Protein kinase, IFN-inducible double stranded RNA dependent (PKR)	4.2	tumor suppressor/proapoptotic
ATF3	4	transcription factor
c-Fos	4	oncogene
Phospholipid scramblase 1	3.7	tumor suppressor/proapoptotic
Cdc2	-1.8	Cell cycle regulation
Id1	-3.6	HLH-transcription factor

ISGs: Interferon sensitive genes