

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Schwannomatosis と neurofibromatosis2 は異なる疾患か

研究協力者 新村 真人 東京慈恵会医科大学名誉教授

**研究要旨**

神経線維腫症 1（レックリングハウゼン病）は、皮膚、神経その他に神経線維腫が多発する母斑症であり、神経線維腫症 2 では、前庭神経、脊髄、皮膚などにシュワン細胞腫が多発する。1988年に NIH の consensus statement で neurofibromatosis 2 (NF2) の診断基準<sup>1)</sup> が発表されて以降、NF2 は schwannoma（シュワン細胞腫）が多発する母斑症、すなわち schwannomatosis（シュワン細胞腫症）であると考えられてきた。しかし、schwannomatosis の中には、遺伝性があり、終生 vestibular schwannoma（前庭神経のシュワン細胞腫）が発生しないものがあることも確かである。2003年 MacCollin ら<sup>2)</sup> は、vestibular schwannoma の発生しない familial schwannomatosis の家系にみられた腫瘍の遺伝子検索を行い、ほとんどの腫瘍で、LOHが認められ、そのマーカー遺伝子(sch) は、22番染色体長腕の NF2 遺伝子より、わずかにセントロメア寄りに、NF2 とは別個の遺伝子として存在するのではないかと推定している。以上の結果から schwannomatosis は、NF1, NF2 と異なる第3の神経線維腫症ではないかとしている。さらに、臨床的にも NF2 の皮膚のシュワン細胞腫は皮内の腫瘍であるのに対して、schwannomatosis のそれは、皮下にあり、疼痛が強いのが特徴であるという。2003年10月に米国、Boston で、Schwannomatosis consensus conference が開催され、それに参加したので討議の内容を報告する。

**A. 研究目的**

Schwannomatosis は前庭神経以外の末梢および中枢神経にシュワン細胞腫が多発し、神経線維腫症 2 型のいずれの症候もみられないものと 1990 年に Mautner が定義した。これより以前の 1984 年に、われわれは neurilemmomatosis（神経鞘腫症）<sup>3)</sup> という病名を提唱した。Schwannoma と neurilemmoma

は同義語であるが、われわれが報告した時期は、神経線維腫症 2 型の概念が確立する以前のことであり、前庭神経腫瘍の合併の有無については、議論しておらず、それぞれ狭義の NF2 と schwannomatosis の両者を含んだものであった。

1995 年以降には、臨床症状、皮膚科および眼科的な観察、脳及び脊髄の MRI および疼痛に関する研究が行われ、確実ではないものの

schwannomatosis の診断ができるようになった。しかし vestibular schwannoma は 40 歳を過ぎて初発することもあり、臨床所見だけでは、NF2 を完全に除外することはできない。さらに、schwannomatosis と NF2 原因遺伝子が異なるのではないかとの報告もある。この研究は schwannomatosis の独立性について議論することを目的とする。

## B. 研究方法

The National Neurofibromatosis Foundation は、2003 年 10 月 27 日に米国 Boston で、Schwannomatosis Consensus Meeting を行った。分子生物学、遺伝学、病理学、皮膚科、神経内科、小児神経科、眼科、整形外科などの専門家 13 人が欧米、日本から参加し、schwannomatosis について、それぞれの見地から議論し、診断基準の作成を行った。

また、1966 年以降、われわれは多数の神経線維腫症患者、およびその類症患者を治療し、経過の観察を行っている。その内でレックリングハウゼン病（神経線維腫症 1）は 1861 例、神経鞘腫症 12 例、神経線維腫症 2 型 46 例、神経線維腫症 1 のモザイク 58 例、限局性カフェ・オレ斑 23 例、限局性多発性神経線維腫 55 例であった。神経鞘腫症および神経線維腫症 2 型と分類された症例について検討を行ったが、この診断名は診断した年代によって疾患の定義が異なっている。

## C. 研究結果

1984 年に Shishiba, Niimura ら<sup>31)</sup> は、皮膚に神経鞘腫が多発した 4 例を報告した。我が国の文献

に報告された同様の 29 例と併せた 33 例では、男性 23, 女性 10 例で、患者の年齢は 4~49 歳、平均年齢は 22.3 歳であった。このうちで聴力障害がみられたものの平均年齢は 24.3 歳、聴力障害のみられなかったものの平均年齢は 20.1 歳で、両者に大きな差はなかった。神経鞘腫は、皮膚に多発したもの 33 例(100%)、聴神経 15 例(45.5%)、脊髄神経 11 例(33.3%)、三叉神経 5 例(15.2%)、顔面神経 5 例(15.2%)、消化管 5 例(15.2%)、肺 4 例(12.1%)であった。脳腫瘍は、硬膜腫が 3 例、グリオーマが 2 例、星細胞腫が 1 例にみられた。臨床症状としては聴力障害 14 例(42.8%)、眩暈 6 例(18.2%)、筋萎縮 5 例(15.2%)、歩行障害 5 例(15.2%)、嚥声 4 例(12.1%)、知覚低下 4 例(12.1%)であった。結論として、これらの症例は、レックリングハウゼン病とは異なる疾患であり、神経鞘腫症と呼ぶべき疾患と考えた。しかしながら、今こら考えるとこれらの疾患には、NF2 と狭義の schwannomatosis の両者が含まれていたと考えられる。

Boston で開かれた Schwannomatosis Consensus Meeting で議論した結果、おそらく schwannomatosis は、NF2 と異なる独立疾患であると考えられた。討議の末に以下の診断基準が作られた。

Clinical criteria for schwannomatosis

DEFINITE

Age over 30 years AND two or more non-intradermal schwannomas, at least 1 with histologic confirmation AND no evidence of vestibular tumor on high quality MRI scan AND no known constitutional NF2 mutation.

or

One pathologically confirmed schwannoma plus a

first degree relative who meets above criteria

#### POSSIBLE

Age under 30 years AND two or more non-intradermal schwannomas, at least 1 with histologic confirmation AND no evidence of vestibular tumor on high quality MRI scan AND no known constitutional NF2 mutation.

or

Age over 45 years AND two or more non-intradermal schwannomas, at least 1 with histologic confirmation AND no symptoms of 8th nerve dysfunction AND no known constitutional NF2 mutation

or

Radiographic evidence of a schwannoma and first degree relative meeting criteria for definite schwannomatosis.

#### SEGMENTAL

Meets criteria for either definite or possible schwannomatosis but limited to one limb or five or fewer contiguous segments of the spine.

#### D. 考按および結語

2003年MacCollinら<sup>2)</sup>は、vestibular schwannomaの発生しない familial schwannomatosis 8家系の28個の schwannomaについて調べ、germlineと正常細胞には、NF2 遺伝子の変異は認められな

かったと報告した。しかし schwannoma では、28個中24個に、D22S193 から D22S430 のマーカーでLOHが認められたと報告している。また、linkage analysisでは、schwannomatosisの遺伝子schは、2番染色体長腕のNF2遺伝子より、わずかにセントロメア寄りに、NF2とは別個の遺伝子として存在するのではないかと推定している。以上の結果から schwannomatosisは、NF1、NF2と異なる第3の神経線維腫症ではないかとしている。

臨床的にもNF2の皮膚のシュワン細胞腫は皮内の腫瘍であるのに対して、schwannomatosisのそれは、皮下にあり、疼痛が強いのが特徴である。また、症状はNF1、NF2より遅れて発症する。NF2は予後の極めてわるい疾患であるが、schwannomatosisの生命の予後はよいなどの特徴もある。

#### E. 参考文献

- 1) National Institute of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis. Conference statement. Arch Neurol. 45: 575-578, 1988
- 2) MacCollin M, Willett C, Heinrich MS et al: Familial schwannomatosis. Neurology 60:1968-74, 2003
- 3) Shishiba T, Niimura M, et al: Multiple cutaneous neurilemmomatosis as a skin manifestations of neurilemmomatosis. J Am Acad Dermatol. 10:744-754, 1984

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

NF-1 患者に生じた Malignant triton tumor の細胞株作成および性質解析

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**

本研究では NF-1 患者に生じた Malignant peripheral nerve sheath tumor (以下 MPNST) のまれな亜型である Malignant triton tumor (以下 MTT) 細胞の培養を試み、その培養細胞を用いて腫瘍表面の integrin 分子の発現について flow cytometry にて解析した。結果は  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  の integrin subunit の発現がみられ、 $\beta 4$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  の発現はみられなかった。対照とした squamous cell carcinoma (以下 SCC) および dermatofibrosarcoma protuberans (以下 DFSP) cell line の細胞と比較して特徴的な発現の差はみられなかったが、今後リガンドである細胞外基質や血管内皮細胞への接着能などを調べることで悪性動態の検討を行う予定である。

中村泰大, 高橋毅法, 川内康弘

筑波大学臨床医学系皮膚科

**A. 研究目的**

MTT の多くは NF-1 に生じ、非常に予後不良の疾患である。また症例が稀少であることから、培養細胞の作成およびそれを用いての本疾患の浸潤・転移における分子学的レベルの検討はまだまだされていない。本研究では、NF-1 患者に生じた MTT より細胞培養を試み、腫瘍細胞の浸潤・転移過程で重要な役割を果たす integrin 分子に焦点を当て、各 subunit の発現レベルにつき検討した。

**B. 研究方法**

62 歳女性の NF-1 患者の左側胸部に生じた腫瘍を摘出し、病理組織所見および免疫組織染色 (S-100 陽性, NSE 陽性, Desmin 陽性) にて MTT と確認した。その腫瘍細胞の一部を collagen-coated plate 上で培養を行った。数代継代したのち、免疫染色を行い S-100 陽性, NSE 陽性, Desmin 陽性より培養細胞が MTT であることを確認。この細胞を flow cytometry にて integrin 分子の発現につき解析した。

1. 上記患者より腫瘍を摘出し、その一部をメスで細切し、0.02% trypsin, 200U/ml Dnase I, 0.15g/ml collagenase (Sigma) 含有 RPMI1640 で 2 時間 37°C で培養。遠沈後、5% FBS RPMI1640 で攪拌し single cell suspension を回収して再び遠

沈。得られた細胞を抗生剤・抗真菌剤含有 5%FBS RPMI1640 を用い type I collagen-coated plate 上で培養。細胞の安定した増殖が得られた後に継代培養を行い6代継代した。

2. 継代中の培養細胞を数回免疫染色した。S-100, NSE, Desmin に陽性所見より, 培養細胞が MTT であることを確認した。

3. 培養 MTT 細胞表面の各 integrin 分子  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  の発現を flow cytometry で解析した。陰性コントロールとして fibroblast を, 対照として SCC (HSC-1) および DFSP cell line の細胞を用い比較検討した。

## C 研究結果

1.  $\beta$  subunit では  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  の発現を認めたが,  $\beta 4$  の発現は認めなかった (図 1)。
2.  $\alpha$  subunit では  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  の発現を認めたが,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  の発現は認めなかった (図 1)。
3. MTT と SCC (HSC-1) および DFSP の integrin 分子発現について比較検討すると MTT は他に比べ  $\alpha$ ,  $\alpha v$  を強く発現していた (図 2)。

## D. 考察

MPNST のなかでも rhabdomyosarcoma の成分を併せ持つ MTT は NF-1 に合併して生じ, MPNST よりもさらに予後不良である。また症例が稀少であることから培養細胞の作成およびそれを用いての浸潤・転移における分子学的レベルの検討はいま

だなされていない。その高い悪性度に関して, 本研究では転移に重要な役割を果たす integrin

(1) に着目し, 培養細胞を作成してその解析を試みたところ  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  の発現を認めた。また SCC および DFSP との integrin 分子発現の比較では, MTT は他に比べ  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$  の発現を認めた。他の培養細胞に比べ特徴的な強発現がみられなかったものの, 実際の integrin 分子の生物学的活性につき, リガンドである細胞外基質や血管内皮細胞での接着能や, 浸潤および他の因子について今後解析する予定である。

## 文献

K.V.R. Reddy, Sachin S. Mangale: Integrin reporters: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue and Cell* 35, 260-273, 2003

## G 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawachi Y, Xu X, Ichikawa E, Imakado S, Otsuka F. Expression of angiogenic factors in neurofibromas. *Experimental Dermatology*. 2003; 12: 412-417.
- 2) Suzuki T, Miyamura Y, Matsunaga J, Shimizu H, Kawachi Y, Ohyama N, Ishikawa O, Ishikawa T, Terao H, Tomita Y. Six novel P gene mutations and oculocutaneous albinism type 2 frequency in Japanese albino patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003; 120: 781-783.

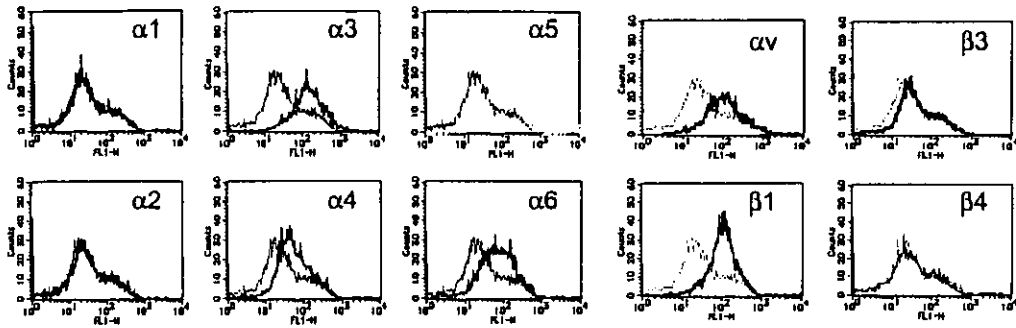


図1 Flow cytometry による MTT 細胞表面の integrin 分子の発現 (緑線は fibroblast)

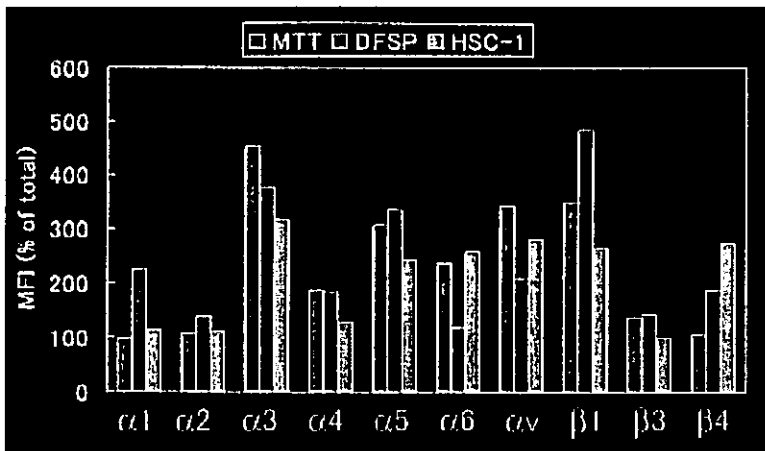


図2 MTT 細胞と DFSP, HSC-1 での integrin 分子発現の比較

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

NF1, NF2 遺伝子産物の細胞内シグナル解析と新規治療開発の基礎的研究

分担研究者 佐谷 秀行 熊本大学大学院医学薬学研究部腫瘍医学分野教授

**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、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・形態学的に解析するとともに、NF1 高変異部位である C 末端部位に対する結合タンパク質をプロテオミクス的手法を用いて解析した。NF1 蛋白質ノックダウン細胞においては、特異的 Ras-PI3K シグナルの活性化、それに伴う細胞骨格異常、細胞膜 ruffling, 細胞運動能の亢進が観察された。又、neurofibromin のリン酸化を制御する細胞内結合蛋白質 (N-G, N-G-dimethylarginine dimethylamino-hydrolase; DDAH) (NO 制御因子)、そのリン酸化を特異的に認識するアダプター蛋白質 14-3-3 が neurofibromin 結合タンパク質として同定された。さらに 14-3-3 は neurofibromin の C 末端部のリン酸化クラスター部位 (Ser2576, Ser2578, Ser2580, Ser2813, Thr2556) に結合して GAP 活性を抑制することが判明した。neurofibromin は細胞内にて GAP 活性を制御することによって RAS 活性を調節しており、その過程には neurofibromin のリン酸化、及びそれを制御する結合蛋白質群の相互作用が重要であることが示唆された。一方、Merlin に関してはプロテオミクス的手法によって、DNA 修復酵素である PARP や Ku75, Ku80, DNA-Pks 含む 8 つの細胞内結合蛋白質が同定された。これらの相互作用によって poly ADP-ribosylation を受けること、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こと、さらには核へ移行した Merlin が、各種遺伝子の転写調節に関わっている可能性が明らかとなった。プロテオミクスによる、細胞内 NF1, NF2 関連分子の検索はこれらを介した細胞内シグナル解析と新規治療薬の開発に有効である可能性がある。

馮立平、小澤達也、Siriporn Patrakitkomjorn、  
荒木令江 熊本大学医学部腫瘍医学講座

ように NF2 の病態と関わる細胞内シグナルに関与しているかを検討した。

## 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。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、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プロテオミクスの手法を用いて生化学的、細胞生物学的に詳細に解析した。

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<sup>-/-</sup>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、プロテオミクスの手法を用いて、NF1<sup>-/-</sup>マウス細胞 (MEF) の特異的変動分子の検索、neurofibromin の細胞内結合タンパク質の検索とこれらの相互作用を検討した。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プロテオミクスの手法を用いて行い、これらのタンパク質と merlin との相互作用によってどの

## B. 研究方法

NF1 mRNA 特異的構造を持つ 3 腫のヒト特異的 siRNA、及びラット細胞特異的 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り、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パー法によった。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、これを用いて特異点 NF1-GAP 活性測定法を確立した。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。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。各種 GST-NF1 フラグメント固相化カラムを用い、ラット、及びマウス脳抽出液より NF1 結合蛋白を単離し、プロテオミクスの手法を用いて質量分析計にて同定した。これらの結合蛋白と各種 NF1 フラグメントに対する抗体を作製し、COS7 細胞、Hela 細胞、PC12 細胞可溶性蛋白を用いた免疫沈降実験によって細胞内結合性を確認した。Neurofibromin のリン酸化と結合タンパク質の相互作用は、は PKA 活性フラグメント、PKA 活性化



試薬 Forscolin、PKA 阻害剤、phosphatase 阻害剤の存在下、非存在下によって解析した。14-3-3 は GST リコンビナントタンパク、myc-14-3-3 発現 PC12 細胞の可溶化画分を用いた。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。プロテオミクスによる解析は 2 つの手法、すなわち、電気泳動による網羅的バンド切り取り法、及び LC-MAS によるショットガンの質量分析法を用いた。

## C. 研究結果

### 1) NF1 に関して

(I) 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

これまで、NF1 遺伝子欠損マウス胎児 fibroblast (NF1<sup>-/-</sup>MEF) の種々の刺激因子による細胞内シグナル、細胞骨格、運動能の変化を生化学・形態学的に詳細に解析してきたが、本年度においては、SiRNA 技術により種々の培養細胞における neurofibromin 発現の抑制法の確立を行い、neurofibromin の acute knockdown における細胞形態、及び、signal pathway の変化を検討して、NF1<sup>-/-</sup>MEF における各種特徴的な変化と比較した。Hela 細胞において、neurofibromin は SiRNA 細胞内導入後 9-24 時間に顕著な蛋白レベルの減少が見られ、48 時間後にはほぼ完全に抑制された。蛋白発現の減少に伴い 3 stage の経時的細胞骨格変化が観察された。SiRNA 導入後急性期 (~9h) では、細胞の円形化、filopodia の形成、中期 (12 ~ 24h) では、filopodia の減少、actin stress fiber の過剰形成、後期 (48h ~) では、細胞の平坦・扁平化、異常な actin stress fiber の出現、消失を特徴とした。各種 signal 分子の生化学的検討から、これらの細胞骨格変化には、Ras-MAPK pathway よりむしろ Ras-PI3K pathway の強い関与が示唆された。一方、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、経時的に細胞形態と細胞内骨格の変化を観察したところ、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) によって抑制されなかった。これらのことより、NF1<sup>-/-</sup>

MEF や SiRNA による neurofibromin の抑制は、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。NF1<sup>-/-</sup>MEF の骨格変化及び生化学的変化と SiRNA による同変化は相互に類似していたが、SiRNA における neurofibromin のノックダウンにおいては、よりダイナミックな細胞骨格系の経時的変化が観察された。NF1 遺伝子欠失に伴う Ras を介した細胞内シグナルの異常と、これによる骨格形成変化が、NF1 に特徴的な病態と関連していることが示唆された。

## (II) Neurofibromin の細胞内結合タンパク質の同定とリン酸化による機能制御

以前より、細胞内 Neurofibromin はその高変異部位である Ser/Thr rich 部位、及び C 末端部位に cAMP 依存性蛋白 kinase (PKA) による特異的なリン酸化部位を有していることを見いだしている。両部位における結合タンパク質をプロテオミクスの手法によって、網羅的に解析している。本年度は C 末端部 (CTD) に注目し、GST-CTD を固相化したアフィニティーカラムを用いて、ラット、及びマウス脳可溶性タンパク質より、結合タンパク質群を検出した。検出された約 12 種類の特異的結合タンパク質をすべて質量分析により解析したところ、リン酸化酵素群、及びそのアダプタータンパク質群が同定された。その中で特に 14-3-3 タンパク質に注目し、詳細な相互作用解析を行った。Myc-14-3-3 を permanent に発現している PC12 細胞を用いて、抗 myc 抗体にて免疫沈降を行い細胞内 neurofibromin を、又、neurofibromin 抗体を用いて myc-14-3-3 を検出できること、又 PKA や phosphatase 阻害剤存在下において、有意にその結合が上昇すること、PKA 阻害剤によって完全に

その結合が阻害されることから細胞内にて 14-3-3 とリン酸化 neurofibromin が結合していることが証明された。各種 Neurofibromin フラグメント及び putative なリン酸化部位変異体を作成し、14-3-3 タンパク質との結合性を解析したところ、特に C 末端部の PKA リン酸化部位である (Ser2576, Ser2578, Ser2580, Ser2813, Thr2556) で結合していることが判明した。特に、結合に必要なリン酸化は上記 5 カ所がリン酸化クラスターを生じることによってはじめて有効であることがわかった。細胞内 neurofibromin の Ras-GAP 活性測定法を確立し、これらの結合による neurofibromin の活性変化を解析したところ、14-3-3 発現細胞では非発現細胞と比較して、細胞内 neurofibromin 活性が有意に減少しており、又細胞内 PKA を活性化する forskolin の存在下でも同様に減少した。以上の結果から、細胞内 neurofibromin は C 末端側のリン酸化クラスター部位に 14-3-3 と結合することによって、その Ras-GAP 活性が制御されていることが判明した。

## 2) NF2 に関して

### (I) merlin の細胞内結合タンパク質の同定

プロテオミクスの手法によって、NF2 結合性の細胞内タンパク質群を牛、マウス、ラット、及び脳神経系培養細胞の可溶性タンパク質から網羅的に同定した。これらの分子は、DNA 修復酵素群に属する分子、細胞骨格に関わる分子などが多く同定された。これらの相互作用は、すべて merlin 分子の高変異部位である N-末端側であった。これらの結合タンパク質の各抗体を用いた免疫沈降実験によって、これらは細胞内でクラスターを形成しながら相互作用していることが判明した。DNA 傷害を誘起した MEF において、同定した結合性蛋

白質 poly ADP-ribose polymerase (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<sup>-/-</sup>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 の核内移行と転写活性制御

以前我々は、merlin がカルパインによって限定分解されることによって抗腫瘍活性を失活して腫瘍発生に関わっていることを報告した。又、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わかっている。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。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。又、merlin のカルパインによる分解産物とこの転写活性の制御機構の関連性について、現在検討を加えている。

#### 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<sup>-/-</sup>)及び、その litter mate wild type mice (NF1<sup>+/+</sup>)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 な制御を行っていること、更にこの制御の一部は neurofibromin の alternative splicing や PKA によるリン酸化やそのリン酸化部位を介した 14-3-3 をはじめとする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<sup>-/-</sup>繊維芽細胞及び 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。繊維芽

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。

## 2) NF2 に関して

NF2 患者における変異型 merlin の多くは、N 末端側に deletion 型や missense, nonsense 型の変異部位を有していることがわかっている。この部位は細胞膜裏打ち蛋白質群 ERM family と相同部位であり、NF2 遺伝子に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。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应答して、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ら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行うとともに、NF2 様の髄膜腫や神経鞘腫に散見される merlin 分子の分解フラグメントがこの現象といかに関わってい

るか、現在検討を加えている。

## 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、neurofibromin 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こと、又、PKA によるリン酸化やこれを介した結合タンパク質群による GAP としての機能制御が必要不可欠であると考えられた。又、NF2 においては、細胞内結合タンパク質群による細胞接着と細胞核内における機能制御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や、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。プロテオミクスの手法によって、これらに関わる重要なシグナル分子の解明や、リン酸化などの翻訳後修飾反応を明らかにすることによって、これらの細胞内における機能を詳細

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。

#### 参考論文

1. Feng L, Yunoue S, Tokuo H, Ozawa T, Zhang D, Patrakitkomjorn S, Ichimura T, Saya H, Araki N. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett.* 557(1-3):275-282, 2004
2. 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.* 278(29):26958-69, 2003.
3. 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*, 23(1):68-78, 2003.
4. 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
5. 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
6. 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.* 160(2):441-7, 2002.
7. Kimura Y, Saya H, Nakao M. Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. *Neuropathology.* 2000 20:153-60.
8. Araki N, Saya H. Cellular signal transduction via the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene product: merlin. *Seikagaku.* 1999 71:128-34.
9. 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.
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. 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.
12. 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.
  13. 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.
  14. 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、羊土社、実験医学別冊、pp152-164, 2002
  15. 荒木令江 「脳神経系腫瘍および変性疾患の病態プロテオミクス」 動き出しているプロテオミクス研究、医学書院、臨床医学増刊号、Vol. 47(11), 1373-1385, 2003
- tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GAP function toward Ras. *J. Biol. Chem.* 278(29):26958-69, 2003.
- 3) 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*, 23(1):68-78, 2003.
  - 4) Araki N, Kawano K, Toda T, Araki T, Tsugita A, Kira J. and Saya H. Analysis of disease on the central nervous system by proteomic approaches. *J. Electrophoresis*, 47:7-16, 2003
  - 5) Araki N, Yunoue S, Feng L, Ozawa T, Patrakitkomjorn S, Tsugita A, and Saya H. Functional proteomic analysis of tumor suppressor related proteins in neuronal cells. “New aspects in Kidney disease”, pp 63-79, 2003.
  - 6) 荒木令江、「脳神経系腫瘍および変性疾患の病態プロテオミクス」動き出しているプロテオミクス研究、医学書院、臨床医学増刊号、Vol. 47(11), 1373-1385, 2003

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Feng L, Yunoue S, Tokuo H, Ozawa T, Zhang D, Patrakitkomjorn S, Ichimura T, Saya H, Araki N. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett.* 557(1-3):275-282, 2004
  - 2) 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
2. 学会、研究会発表
    - 1) 産業総合研究所プロテオミクスセミナー（平成 16 年 5 月 9 日つくば）  
脳神経系疾患のプロテオーム解析  
○荒木令江、佐谷秀行
    - 2) 第 51 回日本質量分析総合討論会（平成 16 年 5 月 24 日つくば）

Proteomic analysis of brain proteins related to the ischemic neuronal apoptosis  
虚血性神経細胞死に関連する細胞内蛋白質の  
プロテオミクスによる検索

○ 荒木令江、シリポーン・パトラキットコム  
ジョーン、馮立平、小沢達也、川野克己、  
戸田年総、荒木朋洋、次田皓、吉良潤一、佐  
谷秀行

- 3) 第5回ブレインサイエンス研究会 2003, (平  
成16年5月31日 福岡)

プロテオミクスの脳科学への応用

○ 荒木令江 佐谷秀行

- 4) かずさ DNA 研究所セミナー2003 (平成16年6  
月25日 千葉)

脳疾患のプロテオミクス解析

○ 荒木令江、佐谷秀行

- 5) 蛋白質最前線セミナー2003, (平成16年7月3  
日 東京)、

脳変性疾患、及び脳腫瘍のプロテオミクス解  
析

○ 荒木令江 佐谷秀行

- 6) 第27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16年年7月18日 宮  
崎)

新規 Proteomic differential display 法によ  
る虚血性神経細胞死に関連する細胞内蛋白質  
の検索

○ 荒木令江、佐谷秀行

- 7) 第41回 動物への遺伝子導入とその応用の開  
発研究会 「プロテオミクス研究最前線」2003  
年7月29日 (東京)

脳神経系疾患の病態プロテオミクス解析

○ 荒木令江、佐谷秀行

- 8) 第62回日本癌学会総会(平成15年9月25-27

日、名古屋)

カッティングエッジ

がん研究と臨床診断へ向かう新戦略

神経系腫瘍抑制遺伝子群のプロテオミクスに  
よる機能解析

Functional analysis of neuronal tumor  
suppressor gene products by proteomic  
strategy

○ 荒木 令江、徳王宏、湯之上俊二、小澤達也、  
シリポーン・パトラキットコムジョーン、馮  
立平、川野 克己、戸田 年総、荒木 朋洋、佐  
谷 秀行

- 9) 第62回日本癌学会総会 (平成15年9月25-  
27日、名古屋)

ワークショップ 家族性腫瘍

培養細胞における SiRNA による NF1 蛋白質  
neurofibromin のノックダウン法の確立と機  
能解析

○ 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

- 10) 第76回日本生化学会大会 (平成15年10月  
15-18日 横浜)

Proteomic analysis of hippocampus and  
striatum proteins related to the ischemic  
neuronal apoptosis by 2D-DIGE and cleavable  
ICAT 荒木 令江、 福永浩二、シリポーン・パ  
トラキットコムジョーン、小沢達也、川野 克  
己、戸田 年総、荒木 朋洋、佐谷 秀行

- 11) 第76回日本生化学会大会 (平成15年10月  
15-18日横浜)

The 14-3-3 protein negatively regulates GAP  
activity of neurofibromin

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



- 12) 第 76 回日本生化学会大会 (平成 15 年 10 月 15-18 日横浜)  
Establishment of neurofibromin knock down system by SiRNA and analysis of cellular function of neurofibromin  
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
- 13) 第 76 回日本生化学会大会 (平成 15 年 10 月 15-18 日横浜)  
Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GAP function toward Ras.  
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
- 14) 農芸化学会シンポジウム「生命の持つ見事な仕組み」(平成 15 年 11 月 15 日都城)  
私たちの時代の生命科学研究--ヒトゲノム計画とプロテオミクス--  
荒木令江、佐谷秀行
- 15) 九州基礎皮膚科研究会 (平成 16 年 11 月 15 日 福岡)  
神経線維腫症原因遺伝子の機能解析--プロテオミクスによるアプローチ--  
○荒木令江、佐谷秀行
- 16) 第 26 回分子生物学会 (平成 15 年 12 月 10 日 神戸)  
プロテオミクスによる脳疾患の病態解析  
荒木令江、佐谷秀行
- 17) 第 26 回分子生物学会 (平成 15 年 12 月 11 日 神戸)  
脳神経系細胞死に関与するタンパク質・遺伝子の網羅的発現解析  
荒木令江、佐谷秀行
- 18) レドックス生命科学公開シンポ, (平成 16 年 1 月 30 日東京)  
脳疾患に関するプロテオミクス  
荒木令江、佐谷秀行
- 19) 熊本公開シンポジウム「プロテオミクスの最前線~熊本からの発信」(平成 16 年 3 月 15 日 熊本)  
プロテオミクスによる脳疾患研究へのアプローチ  
荒木令江、佐谷秀行

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

IFN $\gamma$ とアポトーシス誘導抗腫瘍薬による  
神経線維腫細胞の増殖抑制効果の検討

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**

インターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) は NF1 患者の神経線維腫由来培養細胞に対し細胞増殖抑制効果を示す。しかし、NF-1 の皮膚神経線維腫に対する IFN $\gamma$  の臨床試験投与における抗腫瘍効果はまだ確認されおらず、他剤の併用による有効性の高い治療法開発が望まれる。今回、IFN $\gamma$  にアポトーシス誘導抗腫瘍薬を併用し細胞増殖抑制作用の増強が得られるかどうかを検討した。アポトーシス誘導リガンドの Apo-2L/TRAIL が IFN $\gamma$  で発現誘導されることを、昨年度の本研究の培養神経線維腫細胞の遺伝子発現スクリーニングで見いだした。最近、抗腫瘍薬として開発された 2-methoxyestradiol (2ME2) は Apo-2L/TRAIL レセプターの death receptor 5 (DR5) の発現を誘導する。IFN $\gamma$  と 2ME2 を併用した場合のアポトーシス誘導が細胞増殖に及ぼす効果を培養神経線維腫細胞で調べたところ、IFN $\gamma$  あるいは 2ME2 単独に比べて強い増殖抑制が確認された。また腫瘍細胞の xenograft モデルとして IFN $\gamma$  ノックアウトマウスの腎皮膜下にヒト培養神経線維腫細胞を移植し、移植後の正常コントロールマウスと組織学的に比較したところ、IFN $\gamma$  ノックアウトマウスにのみ腫瘍細胞の持続的な増殖がみられ、腫瘍増殖抑制への IFN $\gamma$  の関与が示唆された。IFN $\gamma$  と 2ME2 併用療法の *in vivo* での効果検討などに利用できると考えられた。

古村南夫	福岡大学皮膚科
中野 昌彦	福岡大学第一外科
吉田雄一	福岡大学皮膚科
久保田由美子	福岡大学皮膚科
安波 洋一	福岡大学第一外科

**A. 研究目的**

我々は、IFN $\gamma$  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 IFN $\gamma$  遺伝子療法への応用を目指して基礎研究を進めてきた。

昨年度は、IFN $\gamma$  遺伝子導入あるいは培地への IFN $\gamma$  添加時の培養神経線維腫細胞に対する増殖抑

制機序の解明を目的として IFN $\gamma$ による遺伝子発現変化のスクリーニングを行った。さらに、IFN $\gamma$ および $\beta$ の全身・局所投与による神経線維腫の増殖抑制効果を確認するために臨床投与試験を開始した。

本年度は、遺伝子スクリーニングによって見出された IFN $\gamma$ による神経線維腫細胞の新たなシグナリング活性化部位をターゲットとして、新たな治療法開発にむけて基礎研究を行い、in vivoでの臨床効果を確認するための動物モデルの導入実験を行った。

## B. 研究方法

- 1) 細胞：神経線維腫細胞は 29 歳および 30 歳女性の NF1 患者の神経線維腫瘍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後 3~4 代の培養細胞を用いた。
- 2) 神経線維腫細胞の増殖に対する IFN $\gamma$ と 2ME2 の影響の検討：培養神経線維腫株の培地にヒトリコンビナント IFN $\gamma$  (塩野義製薬) 1000U/ml のみ、あるいは IFN $\gamma$ と種々の濃度の 2ME2 (SIGMA) を添加し 8 時間後に BrdU incorporation ELISA キット (Amersham Biosciences) を用いて細胞増殖能を調べた。
- 3) 神経線維腫細胞における IFN $\gamma$ と 2ME2 の発現蛋白の検討：培養神経線維腫株の培地にヒトリコンビナント IFN $\gamma$  1000U/ml と 1 $\mu$ M の 2ME2 を添加し 24 時間後の Apo-2L/TRAIL、DR5 蛋白の発現と caspase8 のフラグメンテーションによる apoptosis 誘導をウェスタンブロット法で調べた。
- 4) IFN $\gamma$ ノックアウトマウスでの神経線維腫細胞移植後の細胞動態を知るために、培養神経線

維腫細胞  $5 \times 10^8$  個をシリコンチューブ内で遠心しペレット化したものを IFN $\gamma$ ノックアウトマウスおよびコントロールマウスの腎皮膜下に移植し 2 週間後に腎を摘出後、ホルマリン固定パラフィン包埋した組織を HE 染色して観察した。

## C. 研究結果と考察

IFN $\gamma$ と 2ME2 を同時に添加したところ、培養神経線維腫細胞において Apo-2L/TRAIL、DR5 両者の発現が蛋白レベルで増加し、自己の Apo-2L/TRAIL によると思われる外因性アポトーシスが誘導されることが caspase8 のフラグメンテーションで確認された (図 1)。また、両者の併用により、アポトーシスと強い細胞増殖抑制がみられた。

BrdU 取り込みをみると、両者を併用した場合 2MEM2 の用量依存性に増殖抑制作用がみられ 2ME2 単独投与に比較して、低用量においても強い増殖抑制作用が確認された (図 2)。

2ME2 は経口抗腫瘍薬 Panzem<sup>™</sup> (米国 EntreMed Inc.) として米国ならびに本邦で骨髄腫、乳癌などの固形癌に治験中の薬剤である。エストロゲンの代謝過程で生成される副産物であり生体内でもごく微量存在する。女性ホルモンとしての活性は無く、アポトーシス誘導および VEGF 生成の抑制による血管新生抑制がその作用機序とされている。

2ME2 以外では既に市販されている非ステロイド抗炎症薬にも DR5 の発現を誘導するものがあり、IFN $\gamma$ と COX2 阻害剤等の同時使用による抗腫瘍作用について今後検討していく予定である。

次に、生体内での抗腫瘍効果確認のために IFN $\gamma$ ノックアウトマウスの腎皮膜下への腫瘍細胞移植実験を行った。腎皮膜下移植は、少数の細胞で

も確認が容易な点の特徴である。一般的なヌードマウス皮下への移植では、神経線維腫は良性腫瘍で発育が緩徐なため、腫瘍が表面から肉眼で確認できるレベルに達するのに長時間を要し腫瘍増殖の計測が難しい。

今回、IFN $\gamma$ ノックアウトマウスの腎皮膜下 xenograft では腫瘍細胞移植 2 週間後に肉眼的に増殖した腫瘍細胞が腎表面から白色の小結節として容易に確認できた。組織学的にもコントロールと比較してより多くの神経線維腫細胞の増殖が確認され、IFN $\gamma$ の神経線維腫細胞に対する *in vivo* での増殖抑制効果が示唆された。IFN $\gamma$ と併用薬剤の効果の *in vivo* での確認に利用できると考えられた(図3)。

最近、高濃度のマトリゲルを皮下に腫瘍細胞とともに注入し、ペレット状に硬化したゲル内の細胞増殖を計測する方法も開発されている。腎皮膜下移植より手技が簡単であり今後利用を検討中である。

#### D. 結論

IFN $\gamma$ による神経線維腫細胞の遺伝子発現変化のスクリーニングから、腫瘍増殖抑制のための標的となるシグナリングを定め操作することによって、より強い抗腫瘍効果が得られることが判明した。抗腫瘍作用増強のための薬剤として長期投与が可能なものを選択すれば、早期からの長期間持続投与による神経線維腫の発生予防などにも応用できると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakayama J, Tanaka T, Furumura M, Takahashi A, Yamaguchi T, Shimura H, Ikeda S, Kuroki M.  
Inhibition of the proliferation of a malignant peripheral nerve sheath tumor cell line by gamma interferon gene transfection. *J Dermatol.* 30:879-85. 2003