

エクソンを PCR-SSCP 法で異常をスクリーニングし、異常部位の塩基配列決定を行った。2000 年まではてんかんおよび神経症状が発端と考えられる小児及び神経内科からの依頼が 93%、非神経症状が主と考えられる呼吸器内科および皮膚科が 7%、2001 年以降は小児科・神経内科が 57%、皮膚科・形成外科・呼吸器内科 43%であった。2000 年までの検体では *TSC1* に変異を認めたもの 10/91(11%)、*TSC2* に変異を認めたもの 18/91(20%)、多型とも変異と決定できない塩基置換を持つもの 18 例 (20% : *TSC1*:*TSC2*=4:14) であった。2001 年以降分析の終了した 49 人中 *TSC1* に変異を認めたもの 4/21(19%)、*TSC2* に変異を認めたもの 10/49(20%)、多型とも変異とも決定出来ない塩基置換 9 例(18%, *TSC1*/*TSC2*=2:7)であった。*TSC1* と *TSC2* の変異の割合は約 1 : 2 で、小児科からの検体が多い場合にも、皮膚科からの検体が多い場合でもその頻度に差はなかった。

このうち多型とも疾患の原因とも同定できないミスセンス変異、アミノ酸の欠失または挿入を起こすがそれ以降のアミノ酸配列に変化をおこさず疾患を起こす変異と同定できない inflame の欠失、挿入を除くと、*TSC1* では 20 変異中 9 変異、*TSC2* では 49 変異中 12 変異であった (図 1)。変異が同定出来る可能性は 45%程度で、両親の検索をしないで疾患の原因変異と確認できる例は 15%であった。

図 1 日本人 TSC 患者 140 名に見られた変異

	TSC1	TSC2
Nonsense	4	5
Deletion	3	4
Deletion (C)	0	5
Insertion	2	3
Insertion (Inframe)	2	0
Missense	9	23
Intron change	0	9
	20	49

2. 結節性硬化症患者の *TSC1* 遺伝子変異、*TSC2* 遺伝子変異と臨床症状の重症度。

結節性硬化症では知的障害が重症な例に自閉傾向が強い例が多い。結節性硬化症の 2 つの原因遺伝子 *TSC1* と *TSC2* とどちらの変異が知的障害が重度で自閉性障害の合併が多いかについて、*TSC2* に変異を持つ例の方が知的障害の頻度が高く (Jones AD et al., 1997)、知的障害が重度 (Langkau N, et al., 2002)、自閉性障害の合併が多い (Levis JC et al., 2004) と言われてる。我々は研究を始めた当初の解析では、日本人結節性硬化症 38 名の遺伝子解析で *TSC1* と *TSC2* 変異を持つもので明らかな差は認めなかった (Zhang H, et al. 1999)。1999 年の時点でミスセンス変異について、正常人 100 人を調べて認められなかったものは多型ではないと考えて解析した。一方、一般には、両親にミスセンス変異が見られない場合、そのミスセンス変異は疾患の原因変異を考えられてきた。これらの 2 つの場合とも厳密には疾患の原因変異と断定す

ることは出来ない。そこで現在までに日本人 140 名の遺伝子変異のうち、疾患の原因と断定できないミスセンス変異、インフレームシフトをおこす挿入・欠失を除く TSC1 変異の 9 例、TSC2 変異の 12 例について知的障害の重症度と点頭てんかんの合併を調べた。

表 1 TSC1 変異と TSC2 変異の知的障害とてんかんの重症度

TSC1	Severe/Mild ¹⁾	West/CPS ²⁾
Nonsense 4	2/2	1/3
Deletion 3	1/2	1/2
Insertion 2	0/2	0/2
	3/6 (33.3%)	2/7 (22.2%)
TSC2	Severe/Mild	West/CPS
Nonsense 5	4/1	3/2
Deletion 4	4/0	3/1
Insertion 3	2/1	2/1
	10/2 (83.3%)	8/4 (57.1%)

¹⁾ 知的障害 severe/mild

²⁾ てんかん 点頭てんかん West/その他 CPS

表 1 に示すように TSC1 変異と TSC2 変異では重度の知的障害の合併が TSC1 の 33.3%、TSC2 の 83.3%と TSC2 に多く、点頭てんかんの合併も TSC1 の 22.2%、TSC2 の 57.1%と TSC2 に頻度が高かった。ナンセンス変異、欠失、挿入など明らかに異常な遺伝子産物を作る変異のみを比較した場合、明らかに TSC2 変異が重度の脳障害をおこすことが示唆された。

3. 特定の遺伝子領域の変異と知的障害重症度との関連.

TSC2 遺伝子変異の方が知的障害が重度であり、自閉性障害の合併が多いことから、TSC2 遺伝子内または近傍に自閉症関連遺伝子領域があると考えられる立場(Lucarrelli P, et al. 2003)がある。一方で、一卵性双生児一組の比較では自閉性障害は一致せず、自閉症状の合併はエピゲネティックな因子による可能性も示唆されている。特定の遺伝子領域の変異が知的障害や自閉性障害と関連しているか明らかにする目的で、TSC1 と TSC2 遺伝子に同じナンセンス変異を持つ患者について臨床症状の比較をした。

TSC1 のエクソン 15 の R509X 変異を持つ例は 38 歳、27 歳、58 歳の 3 例あり、27 歳の例は家族例であった。38 歳の例は 2 か月で点頭てんかんを発病し、けいれんのコントロールは不完全で、現在寝たきりの重度知的障害である。しかし、27 歳の例はこれまでてんかんの発症はなく、知的にはボーダーラインであり、58 歳の例は学童期にてんかんを発症しているが知的障害はない。従って R509X 変異はてんかんの発症や知的障害について多様な表現型を示す。

TSC2 のエクソン 28 の Q1119X は 5 歳と 20 歳の 2 例に認めた。5 歳の例は 6 か月に点頭てんかんを発症し、コントロールは不完全で現在 DQ51 で自閉性障害を示すのに対し、20 歳の例は 1 歳 1 か月部分発作で発症し、コントロールは良好で知的な遅れはない。従って Q1119X 変異もてんかん発症や知的障害に関して多様な表現型を示す。

TSC2 のエクソン 33 の R1459X 変異は 14 歳と 15 歳の例に認め、けいれんの発症は 3 歳 2 か月と 4 か月で、いずれも中等度の知的障害であるが、14 歳の例では自閉傾向が強く、自閉性障害について

は、一致を認めなかった。

以上から同一変異でも知的障害の重症度、てんかんの重症度にはバラツキがあり、特定の遺伝子領域の変異が知的障害の重症度と関係しているとは言い難いと考えた。

C. 考察

1) 結節性硬化症患者での TSC1/TSC2 遺伝子変異の頻度について

結節性硬化症患者 140 人の遺伝子検索を行い、TSC1 に 20 変異、TSC2 に 49 変異（合計 69 変異、49%）に変異を認めた。諸外国でも PCR-SSCP による遺伝子変異のスクリーニングでは 40%程度にしか変異が報告されていない、TSC2 ではパルスフィールドゲルやサザーン法で見出される異常が PCR-SSCP で見出される頻度の 7 割近くがあることが報告 (Jones, et al. 1997) され、また、DHPLC による検査では 74%に変異 (Dabora et al., 2001) が見出され、どのような方法を組み合わせるかが重要である。われわれのデータでは、両親の遺伝子解析をしないで、疾患の原因変異を同定できる頻度は約 15% (21 例/140 例) 例であり、遺伝子診断を行うにあたって注意が必要である。また、我々の研究室では、60 エクソンを常温と低温で PCR-SSCP を行い、結果の報告に至るまでに、きわめて時間がかかり、この点も重大な課題である。

2) TSC1 より TSC2 に変異を持つ例にてんかん・知的障害の合併が多い理由について。

TSC2 の方が遺伝子が大きく、また大きい欠失がおこりやすいことが知られている。このことは体細胞の分裂過程で、TSC2 の方が loss of heterozygosity をおこしやすい可能性が考えられ

る。脳の結節性病変は loss of heterozygosity によっておこると考えられ、TSC1 にくらべ TSC2 の方が脳の結節性病変を多く作りやすい可能性がある。

3) 同じ変異でも症状の一致が見られないことについて。

知的障害やてんかんなどの症状を決定するのは、2) でも述べたように生殖細胞変異ではなく、loss of heterozygosity をおこす体細胞でのセカンドヒットと考えられる。従って、生殖細胞変異によって知的障害や自閉症が決定されるのではないと考えられる。

D. 結論

結節性硬化症の知的障害 (自閉症) の合併は TSC2 遺伝子変異を持つ例に多い。しかし同じ遺伝子変異でも知的障害のレベルは多様で、知的障害の重症度を決定するのは遺伝子ではない可能性を示している。TSC2 に知的障害の重症例が多いのは、TSC2 遺伝子の方が体細胞レベルで Loss of Heterozygosity をおこしやすく、その結果、脳の病変が多くなる可能性を示唆している。我々の過去の経験と最近の欧米の報告を合わせて考えると、結節性硬化症の知的障害 (および自閉症) の合併は遺伝的に決定されるよりは、てんかんの発症時期などエピゲネティックな因子が強い可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 論文発表

1. 論文発表

- 1) Feng J-H, Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Oka A, Ohno K. Novel TSC2 mutations and decreased expression of tuberlin in cultured tumor cells with an insertion mutation. HUMAN MUTATION Mutation in Brief #696 (2004) Online
- 2) Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, and Ohno K. Axonal dystrophy of dorsal root ganglion sensory neurons in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. Experimental Neurology. 187:289-298 2004
- 3) Ohsaki Y, Sugimoto Y, Kaidoh T, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Joanna P. Davies, Yiannis A. Ioannou, Ohno K and Ninomiya H. Reduced sensitivity of Niemann-Pick C1-deficient cells to θ -toxin (perfringolysin O): sequestration of toxin to raft-enriched membrane vesicles. Histochem Cell Biol. 121: 263- 272 2004
- 4) Yamamoto T, Feng J-H, Higaki K, Taniguchi M, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. Brain Dev 26:245-250 2004
- 5) Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K. Degeneration of cholecystokinin-immunoreactive afferents to the VPL thalamus in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. Brain Research 1022:244-246 2004

2. 学会発表

- 1) 大野耕策 シンポジウム「先天性グリコシル化異常症」 日本人類遺伝学会 第49回大会 シェーンバッハ・サボー 平成16年10月14日

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

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

Eker ラットの脳病変：ヒト結節性硬化症との比較

分担研究者 水口 雅 東京大学大学院医学系研究科小児科助教授

研究要旨

ヒト結節性硬化症(TSC)とそのモデル動物 Eker ラットの間で、脳病変の病理学的特徴を比較検討した。ヒト TSC と Eker ラットの両方で皮質結節、皮質下白質病変、側脳室上衣下病変が観察されたが、その発生頻度は後者では低かった。ヒト TSC 皮質結節では cytomegalic neuron と balloon cell の両者が見られたが、Eker ラット皮質結節では前者のみだった。Eker ラット皮質下過誤腫はヒト TSC 白質病変に比し境界が明瞭、細胞密度が高く、様相を異にした。側脳室上衣下病変については、ヒト TSC と Eker ラットは類似していた。Eker ラットでは悪性脳腫瘍 anaplastic ganglioglioma が発生したが、これはヒト TSC には見られなかった。このようにヒト TSC と Eker ラットの間には共通点と相違点がある。

伊藤 雅之、後藤 雄一、
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 2
部
高嶋 幸男 柳川療育センター
樋野 興夫 癌研究所実験病理部

ヒト TSC の脳を対象とする genotype-phenotype 研究には困難が多い。その理由として、

- 1) ヒト TSC 脳組織の入手が困難であること（とくに軽症例で）
- 2) TSC の DNA 診断は多大な労力と時間を要する上、TSC 患者の 40% では原因となった変異が不明であること
- 3) 遺伝性不均質性（TSC1 と TSC2、欠失と点変異など）と臨床的不均質性（同一家系内で重症度に差）

が挙げられる。

Eker ラットは *Tsc2* 遺伝子変異に起因する TSC のモデル動物であるが、臨床的にはてんかん発作や行動異常を呈しない。しかし、われわれや他の

A. 研究目的

結節性硬化症 (tuberous sclerosis、以下 TSC) 患者の脳には皮質結節、皮質下白質病変、側脳室上衣下巨細胞星細胞腫が生じ、前二者はてんかんと精神遅滞、後者は水頭症の原因となる。われわれは、これら TSC の脳病変の病態生理に関し、従来より分子病理学的研究を進めてきた。しかし、

グループによる従来の研究により、Eker ラット大脳に種々の病変が見いだされた。Eker ラット脳組織を用いた研究では、ヒト TSC にまつわる上記の問題が回避される。このため、TSC 脳病変の分子病理学的研究にはきわめて有利である。

本年度は、Eker ラットの動物モデルとしての意義を検証する目的で、ヒト TSC と Eker ラットの間における脳病変の異同を検討した。

B. 研究方法

1. 組織材料

剖検ないしてんかん手術で得られたヒト TSC14 症例の大脳と、17~24 月齢の Eker ラット 19 個体の大脳を、中性ホルマリンで 1~2 週固定後、パラフィン包埋切片を作成した。

2. 組織病理学的・免疫病理学的染色

神経病理ルーチン染色 (hematoxylin/eosin, luxol fast blue/cresyl violet, 他) と細胞種特異的マーカー (GFAP, neurofilament, synaptophysin, 他) に関する免疫染色 (biotin-streptavidin-peroxidase 法) を行い、所見を比較検討した。

3. 皮質結節における loss of heterozygosity (LOH) の検討

Eker ラット皮質結節の cytomegalic neuron における loss of heterozygosity (LOH) の有無を、laser capture microdissection と nested PCR 法により調べた。

C. 研究結果

検索したヒト TSC 脳は 100% に皮質結節、皮質下白質病変、側脳室上衣下巨細胞星細胞腫が見られた。Eker ラットの大脳にはこれらに対応する病

変 (皮質結節、皮質下過誤腫、上衣下過誤腫) が見られたが、その頻度は各々 5%、11%、11% と低かった。

ヒト TSC の皮質結節では異常巨細胞に cytomegalic neuron と balloon cell の両者が見られたが (図 1A)、Eker ラットの皮質結節では前者のみだった (図 1B)。異常巨細胞の密度は Eker ラットで、反応性 astrocyte の密度はヒト TSC で高かった。Eker ラットの cytomegalic neuron では LOH は認められず、従来報告されたヒト TSC における成績と一致した。

ヒト皮質下白質病変は、白質内に位置し、境界はしばしば不明瞭だった (図 2A)。組織学的には、正常白質組織の中に少数の異常巨細胞が散在する過誤組織 (hamartia) ないし異所性組織 (heterotopia) であった (図 3A)。これに対し、ラット皮質下過誤腫は灰白質・白質の境界線上に位置し、病変の境界がより明瞭で、独立した結節を形成した (図 2B)。組織学的には異常巨細胞が高密度に集簇している過誤腫 (hamartoma) であった (図 3B)。

ヒト側脳室上衣下巨細胞性星細胞腫とラット上衣下過誤腫の組織学的、免疫病理学的所見は類似していた (図 4A、4B)。いずれにおいても、GFAP 陽性、アストログリア類似の異常巨細胞が高密度に集簇していた。

悪性脳腫瘍として、Eker ラットの 1 個体に退形成性神経節膠腫 (anaplastic ganglioglioma) が見られた。組織学的には細胞密度が高く、腫瘍細胞は大型で多形性、異形性に富み、多数の核分裂像を呈した (図 5)。一部の腫瘍細胞が neurofilament 陽性、synaptophysin 陽性、ないし GFAP 陽性を示した。この腫瘍はヒト TSC には見られなかった。また従来の報告で、多形膠芽細胞腫

(glioblastoma multiforme) が TSC に稀に合併する悪性脳腫瘍として記載されているが、Eker ラットの脳腫瘍はこれとも組織型を異にした。

D. 考察

本年度の研究で、ヒト TSC と Eker ラットの間に、以下の共通点が見いだされた。

- 1) 大脳の皮質、皮質下、側脳室上衣下に結節性病変が形成される。
- 2) 病変には神経・グリア細胞の形質を持った異常巨細胞が存在する。
- 3) 皮質結節では LOH は生じていない。
- 4) ヒト上衣下巨細胞性星細胞腫とラット上衣下過誤腫の組織所見は類似する。

その反面、ヒト TSC と Eker ラットの間には、以下の相違点も見いだされた。

- 1) ラットはヒトより結節性病変の形成される頻度が低い。
- 2) ラット皮質結節は cytomegalic neuron ばかりで、ヒト皮質結節に多い balloon cell が無い。
- 3) ラット皮質下過誤腫は腫瘍であり、ヒト白質のヘテロトピアとは異なる。
- 4) ラット悪性脳腫瘍は退形成性神経節膠腫であり、ヒトの膠芽細胞腫とは異なる。

TSC に関する今後の分子病理学的研究は、以上の共通点と相違点を踏まえて展開するべきである。

E. 結論

大脳病変に関し、ヒト TSC と Eker ラットの間に共通点と相違点があり、その両者の分子病理学

的背景を検討する必要がある。

F. 研究発表

- 1) Wei J, Chiriboga L, Mizuguchi M, Yee H, Mittal K. Expression profile of tuberin and some potential tumorigenic factors in 60 patients with uterine leiomyomata. *Mod Pathol* in press.
- 2) 水口 雅. 結節性硬化症. *Clinical Neuroscience* 23(3):256-257, 2005.

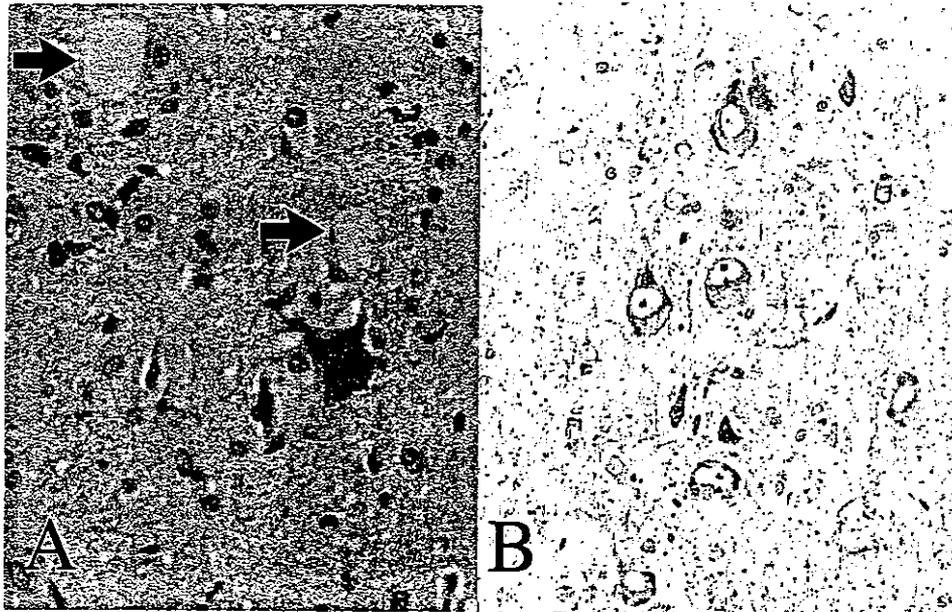


図1 ヒト TSC (A、hematoxylin/eosin)と Eker ラット(B、luxol fast blue/cresyl violet)の皮質結節。矢印は balloon cell。

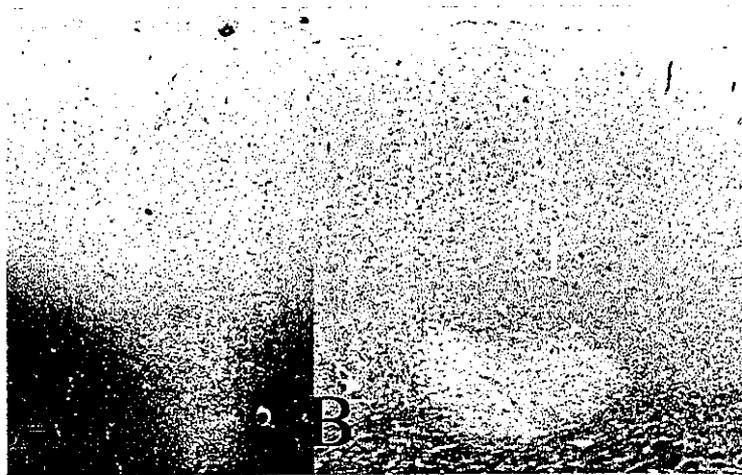


図2 ヒト TSC の皮質下病変(A)と Eker ラットの皮質下過誤腫(B)のセミマクロ所見。Luxol fast blue/cresyl violet 染色。

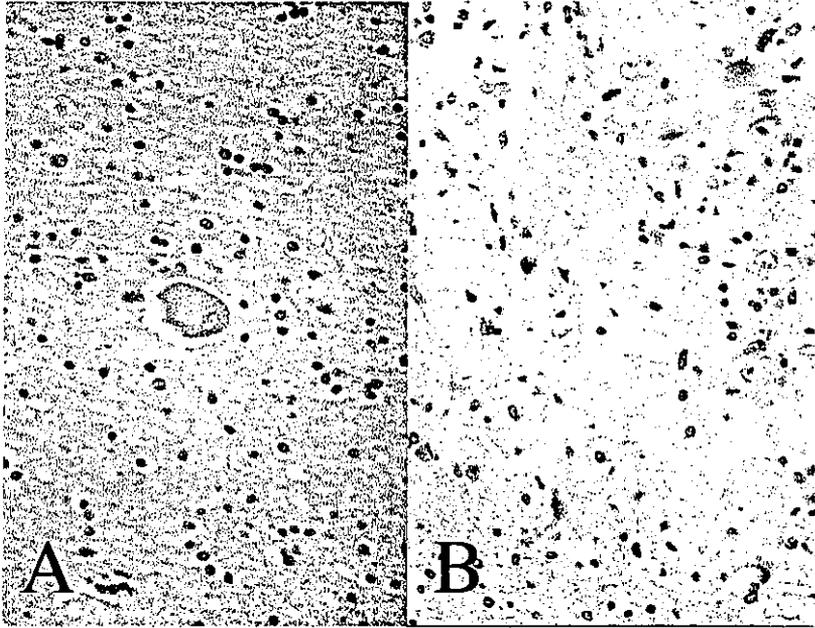


図 3 ヒト TSC の皮質下病変(A)と Eker ラットの皮質下過誤腫(B)の組織所見。
Hematoxylin/eosin 染色。

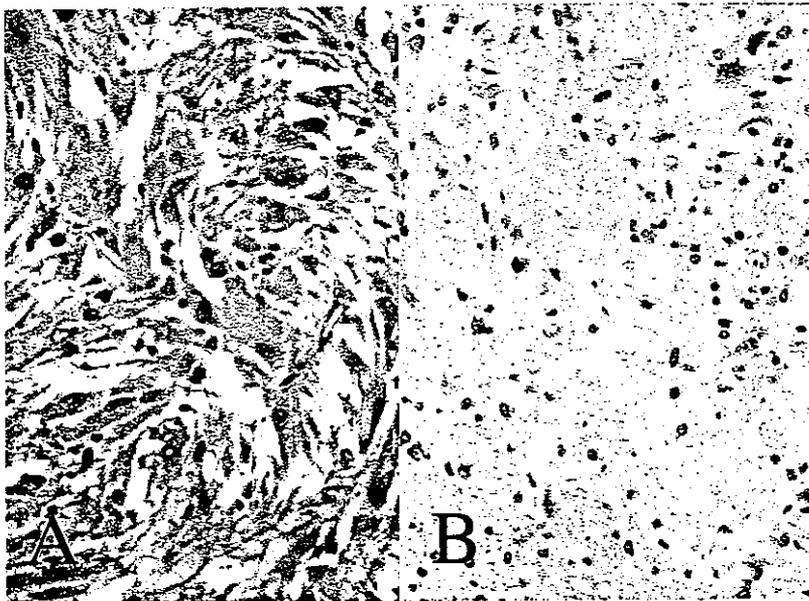


図 4 ヒト TSC の上衣下巨細胞性星細胞腫(A)と Eker ラットの上衣下過誤腫(B)の
組織所見。Hematoxylin/eosin 染色。

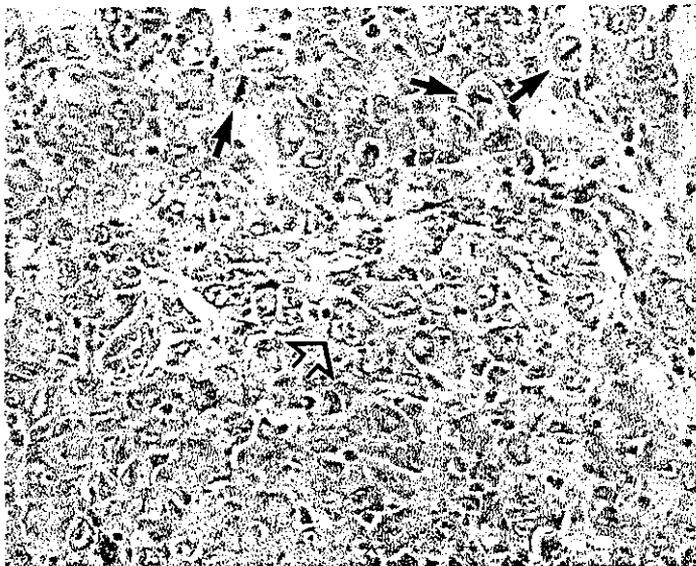


図 5 Eker ラットの退形成性神経節膠腫の組織所見。Hematoxylin/eosin 染色。
中空の矢印は多核の腫瘍細胞、小さい矢印は核分裂像。

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

Insulin-like growth factor を与える malignant triton tumor 細胞の浸潤能への影響に関する研究

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

神経線維腫症にまれに合併する悪性腫瘍である malignant triton tumor (MTT) の培養細胞にて insulin-like growth factor (IGF) が浸潤能を増強することが明らかとなった。

A. 研究目的

MTT の多くは NF-1 に生じ, Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) とは desmin 陽性である横紋筋肉腫由来の細胞を混じている点で異なる。NF-1 に合併する MPNST と比べても非常に予後不良の疾患であり, また症例が希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いまだなされていない。したがって本研究では NF-1 患者に生じた MTT より得た培養細胞と他の培養悪性腫瘍細胞を用いて, その浸潤能に焦点を当て, 他の内臓悪性腫瘍で浸潤能への影響が報告されている各成長因子 (EGF, IGF-I, HGF/SF, bFGF) について検討した。また desmin 陽性細胞の浸潤能への関与についても併せて検討した。

B. 研究方法

1. MTT, 神経線維腫 (NF), 隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP) 培養細胞の作成

①メスで細かく切断した組織切片を

0.02% trypsin, 200U/ml DNase,

0.15g/ml collagenase (Sigma) 含有 RPMI1640

で2時間 37°C 培養。

②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経代培養。

2. 細胞染色

①細胞をスライドガラスに乗せ 95%エタノールで固定。

②0.3% H2O2 含有メタノール内に 30 分間放置し内因性ペルオキシダーゼの阻害後に PBS で洗浄。

③S-100、desmin、NSE などの標的抗原に対する 1 次抗体を用い ABC キット (ベクター社) にて反応。酵素基質には diaminobenzidine (DAB) を用いて染色。

3. Flow cytometry 解析

①5% FBS RPMI1640 で安定した培養状態にある 1×10^6 個の細胞を RPMI1640 で 2 回洗浄し、目的とする各成長因子および各インテグリン分子の細胞表面抗原に対するマウス IgG モノクローナル抗体を加え氷上で 1 時間反応させる。

②RPMI1640 で 2 回洗浄後 FITC 標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体を加え氷上で 30 分間反応させ、RPMI1640 で 1 回洗浄後に FITC 標識による蛍光強度を FACSscan で測定する。

4. Cell invasion assay

①8- μ m ポアサイズの 6.5mm 径ポリカーボネートフィルター付属 24-well トランスウエルチャンバーを使用。Matrigel を 50 μ g ずつ各フィルター表面にコートされるよう調整液を作成し、フィルターに加えて 37°C で 2 時間放置しゲルを固形化。

② 1×10^4 個の各細胞を加え、フィルター上部およびウエルに培養液を加える。37°C で 48 時間培養。

③培養後に下部表面に付着する浸潤細胞をギムザ染色し細胞数を計測。

C 研究結果

1. Cell invasion assay において、MTT 細胞は DFSP 細胞や NF 細胞よりも細胞外基質への強い浸潤能を示した (図 1)。

2. 浸潤した MTT 細胞のデスミン陽性率は全 MTT 細胞での陽性率と有意な相違はなかった (図

2)。

3. Flow cytometry による MTT 細胞表面の各成長因子受容体の発現解析では IGF-I-R が他の成長因子に比べ増加していた (図 3)。

4. MTT 細胞は IGF-I により浸潤能が増強した (図 4)。また IGF-I により $\alpha 3$ インテグリン分子の発現が増強された (図 5)。デスミン陽性細胞の浸潤能が IGF-I により選択的に増強される所見は見られなかった (図 6)。

D. 考察

MTT 細胞の浸潤能の強さ、IGF-I による浸潤能および $\alpha 3$ インテグリン発現の増強が *in vitro* で観察された。MTT に特徴的である不良な予後とデスミン陽性細胞の相関に関しては示唆的な所見を得られなかったが、少なくとも IGF-I はインテグリンの発現調節を介して MTT の予後に関与する可能性が示唆された。今後、IGF-I-R や各インテグリン分子などのほか様々な浸潤・転移・増殖関連分子とデスミンとの二重染色を予定している。

E. 結論

MTT 培養細胞にて insulin-like growth factor (IGF) が浸潤能を増強することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. Malignant peripheral nerve sheath tumor 細胞株の確立および浸潤能の解析. 高橋毅法、藤沢康弘、中村泰大、梅林芳弘、川内康弘、大塚藤男 (筑波大学) 第 103 回日本皮膚学会総会

2. Malignant triton tumor の 1 例. 藤沢康弘、
中村泰大、梅林芳弘、高橋毅法、川内康弘、大
塚藤男（筑波大学）第 68 回日本皮膚科学会東
部支部学術大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 MTT, DFSP, NFの浸潤能の比較

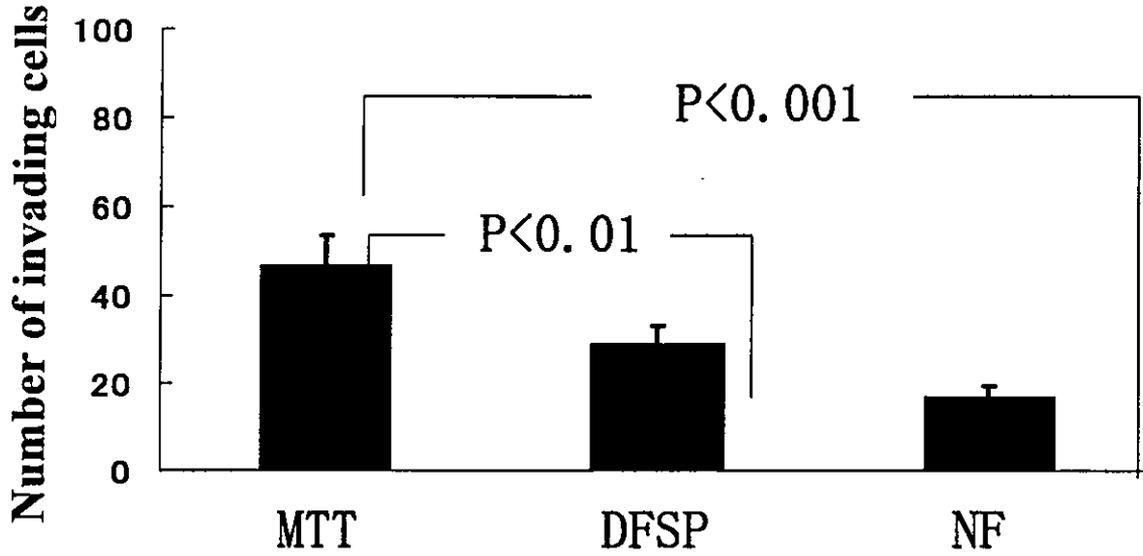


図2 浸潤MTT細胞におけるデスミン陽性細胞の比較

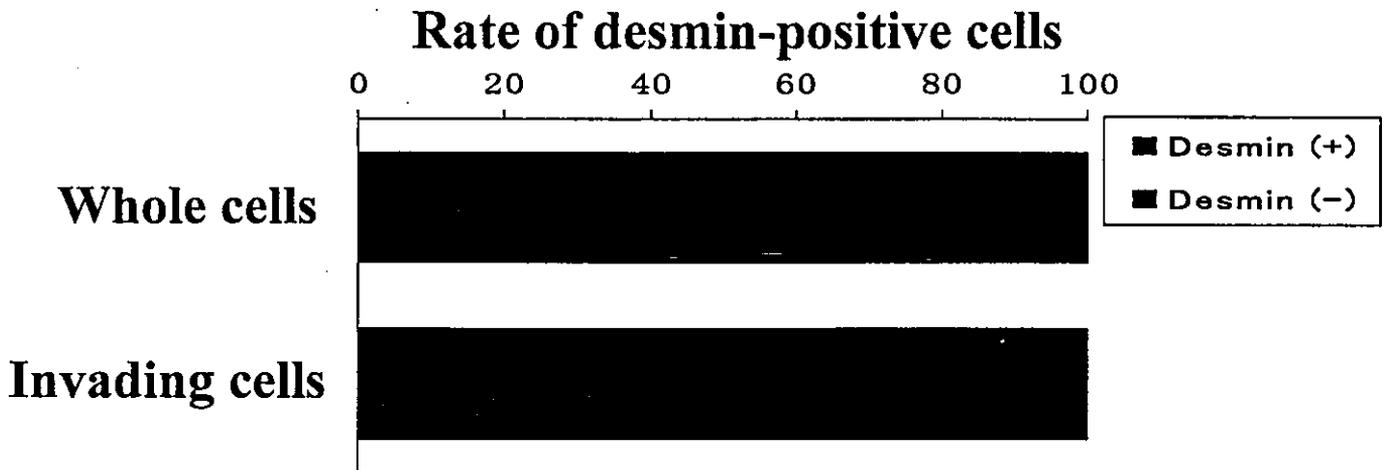


図3 MTT細胞表面における各成長因子受容体の発現

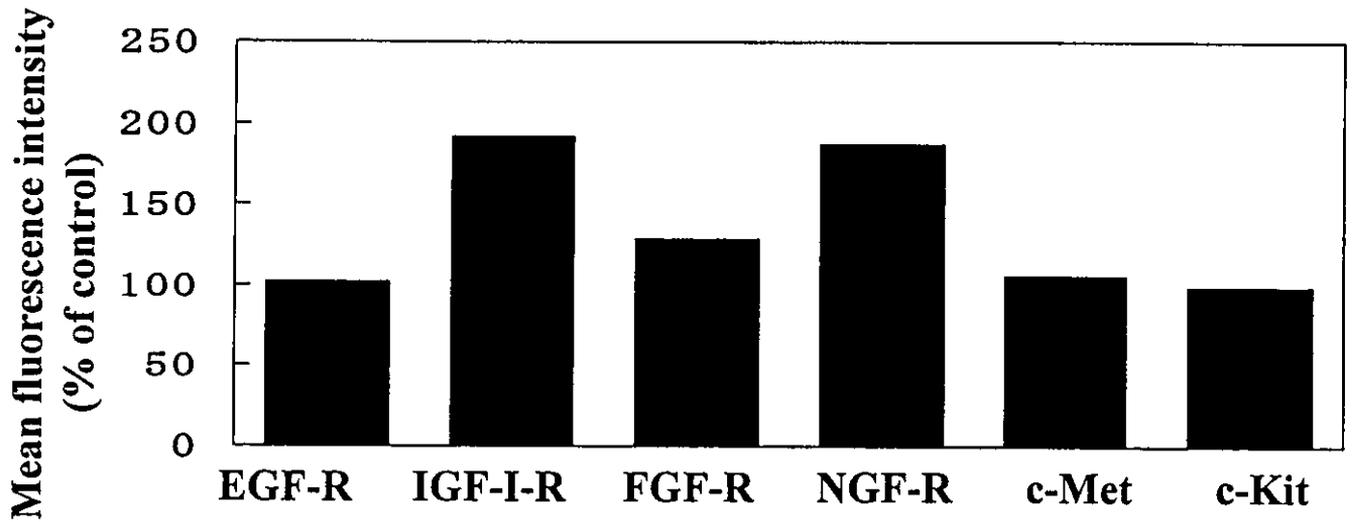


図4 MTT細胞の浸潤能に対する種々の成長因子の影響

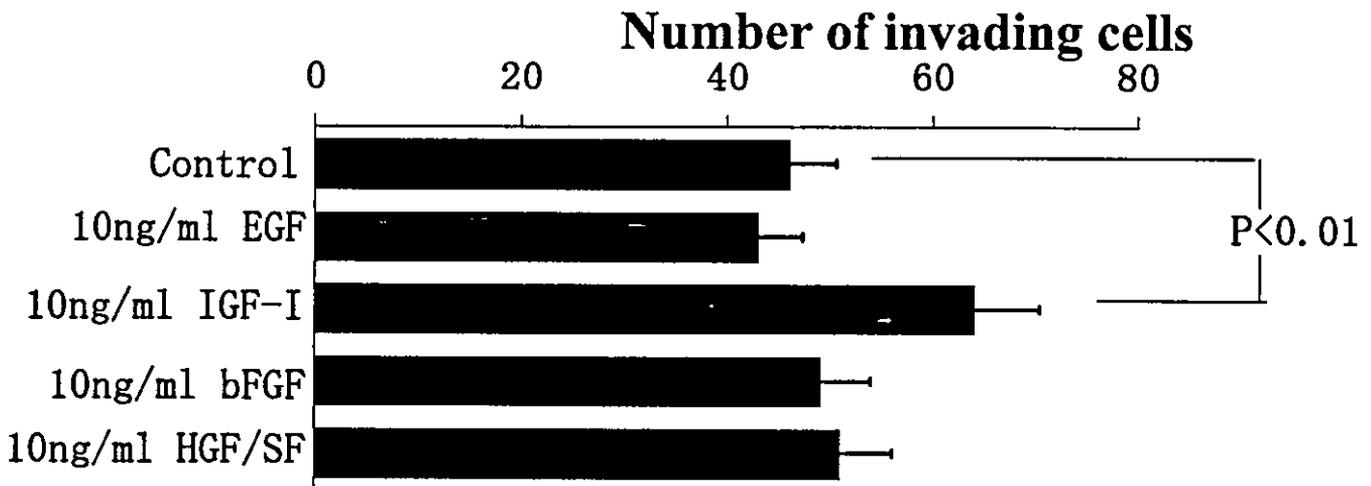


図5 各インテグリン分子の発現に及ぼすIGF-Iの影響

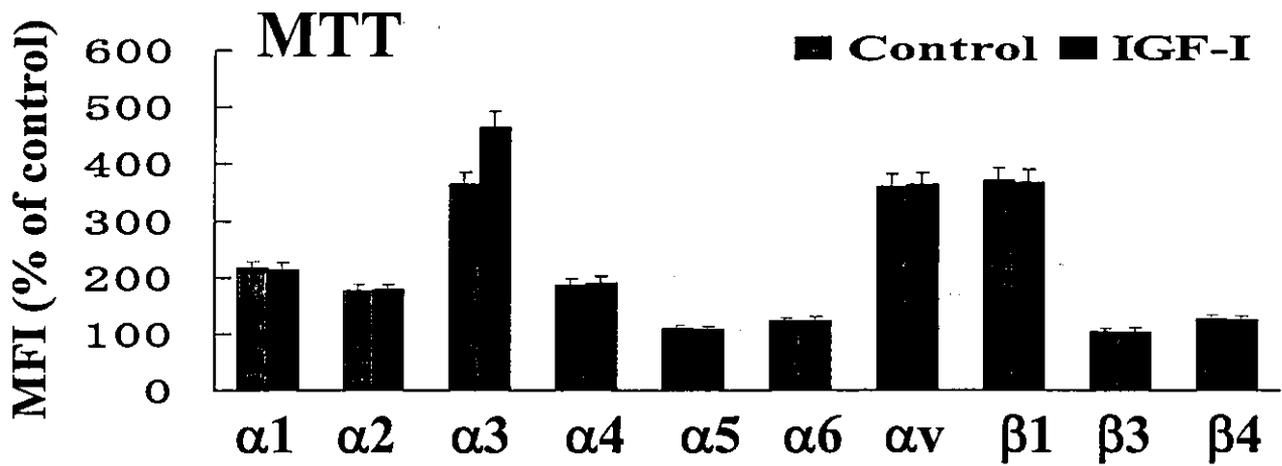
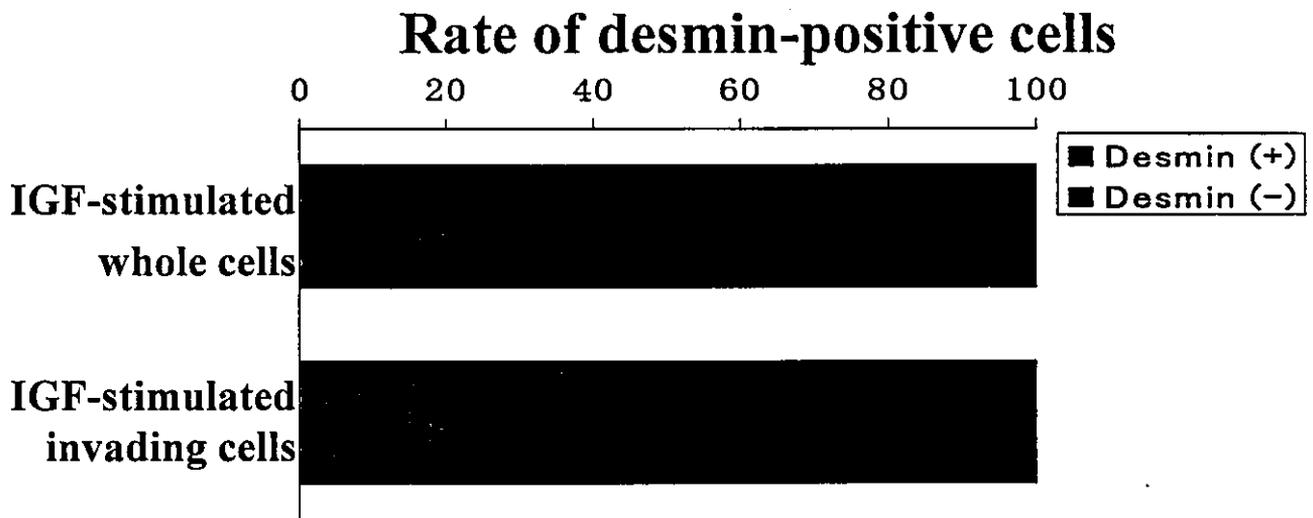


図6 IGF-I刺激MTT細胞におけるデスミン陽性細胞の比較



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講座教授

研究要旨

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 蛋白質 (neurofibromin) 及び NF2 蛋白質 (merlin) を介した細胞内シグナルと細胞内機能を生化学的、細胞生物学的に詳細に解析した。それぞれの分子の siRNA による細胞内ノックダウンを行い、細胞の形態変化の詳細とプロテオミクス的手法によるシグナルカスケードの変化を解析したところ、両分子 siRNA の作用によって細胞内 actin stress fiber、focal adhesion spot、ruffling 形成能の大きな変化が認められ、細胞骨格系のダイナミックな reorganization が起こっていることが判明した。これらの変化には細胞刺激因子や接着因子からの刺激を介して、特に NF1 に関しては Ras-MAPK 及び PI3K シグナル、Rho-Rock-LIM kinase-coffilin シグナル等の細胞の骨格形成に関連する分子の機能制御によって運動能を調節する機構があることが判明した。又、NF2 においては細胞接着や骨格系のみならず、細胞の核内においても転写や細胞死に関わる可能性から、細胞の増殖抑制や生理的アポトーシスの破綻に関連することが判明した。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。

荒木令江 熊本大学医学部腫瘍医学講座

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。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 蛋白質 (neurofibromin) 及び NF2

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

蛋白質 (merlin) を介した細胞内シグナルと細胞内機能を生化学的、細胞生物学的に詳細に解析した。

B. 研究方法

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・運動能の変化を生化学・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。さらに、NF1 蛋白質の細胞内調節因子とシグナルを解析するため、neurofibromin の結合蛋白質の iTRAQ 法を用いたプロテオミクスによる解析を行い、同定蛋白質群との相互制御に関する解析を行った。

2) NF2 蛋白質 (merlin) に関して NF1 と同様に、SiRNA による NF2 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・運動能の変化を生化学・形態学的に解析した。又、merlin と会合する細胞内蛋白質の Proteomic affinity cellular mapping 法を用いたプロテオミクスによる解析を行い、同定蛋白質群と merlin の細胞内シグナル、および細胞内局在の変化、核内活性変化を解析した。

3) 倫理面への配慮

現在までのところ、すべての研究材料は実験動物や培養細胞によって行っているため、倫理面への配慮に対する記入事項はない。

C. 研究結果及び考察

1) NF1 に関して

a) 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。NF1^{-/-}-MEF や NF1 SiRNA を導入細胞では、時間経過に伴って actin stress fiber 及び 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。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、migration には Ras の活性化による PI3K シグナルの活性化とそれにともなう ruffling の出現に加えて MAPK シグナルの持続的な強い活性化が必要であった。又、integrin などの細胞接着因子の関与、及び Rho-Rock-LIM kinase-coffilin リン酸化を介した細胞骨格系の reorganization と細胞 motility の亢進が NF1 ノックダウン細胞に起こってい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、Rho-Rock-LIM kinase-coffilin の活性制御を行うことにより、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。

b) Neurofibromin による神経系細胞の神経突起伸長伸展現象の調節

細胞内 NF1-RAS⁺GAP 活性測定法を開発し、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明らかにした。NF1 活性は神経分化・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検討するため、PC12 細胞を用いて NGF 刺激後の GAP 活性を測定した。NGF 刺激後、NF1-GAP 活性は経時的に上昇し、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。又、神経系細胞内在性 Neurofibromin の GAP 活性を特異的に抑制する NF1-GAP dominant negative 体や NF1SiRNA を構築し、これらの影響を調べたところ、NGF 刺激 PC12 細胞、及び海馬神経培養細胞において、アクソンの突起伸長の遅延とブランチ形成の減少、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不可欠な調節因子であることが証明された。

c) Neurofibromin の細胞内結合タンパク質の同定と機能制御解析

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) による特異的な磷酸化部位を有していることを見いだした。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たところ、C 末端部 (CTD) に特異的に強く結合する 56 個の、又弱く結合する 46 個の細胞内蛋白質を同定した。これらは、神経細胞分

化制御因子群、転写因子群、リン酸化・脱リン酸化酵素群、細胞骨格系・細胞接着系制御分子群、細胞周期関連分子群を含んでいた。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。14-3-3 高発現 PC12 細胞を用いて、免疫沈降を行い細胞内 neurofibromin を、又、neurofibromin 抗体を用いて 14-3-3 を検出できること、14-3-3 は neurofibromin の C 末端部の PKA リン酸化部位 (Ser2576, Ser2578, Ser2580, Ser2813, Thr2556) で結合していることが判明した。さらに 14-3-3 発現細胞では細胞内 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 活性が制御されており、その活性制御に neurofibromin とそのリン酸化酵素、その他の結合蛋白質が関与していることが示唆された。

2) NF2 に関して

a) merlin の細胞内結合タンパク質の同定とそれらとの相互作用

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化タンパク質から網羅的に、合計 102 分子同定した。これらの分子群には、DNA 修復酵素群に属する分子、細胞骨格、細胞死、細胞周期に関わる分子が多く含まれていた。又、NF1 結合タンパク質として同定された分子群も一部同定された。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^{-/-}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。

b) 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。

c) merlin の SiRNA によるノックダウン細胞の解析

merlin はその N 末端側に細胞膜裏打ち蛋白質である ERM family との高い相同性を有している。そこで、ERM family 蛋白質の発現には影響しないが、merlin のみの発現を阻害する SiRNA を構築し、それによる細胞の形態変化を観察した。SiRNA を導入した 48 時間後の Hela 細胞において merlin 蛋白質分子は完全に消失した。特徴として多数の filopodia を有する fibroblast 様形状