

に変化し、細胞の接着性が減少している所見が得られた。この細胞の可溶性蛋白質と NF2 siRNA 非導入細胞のその蛋白質プロファイルを比較するため、2次元電気泳動による proteomic differential display 解析したところ、多数の細胞骨格系を含む分子群の変化が認められた。現在、詳細な解析を行っている。

D. 考察

神経線維腫症 1 型 (NF1) に関して、その原因タンパク質である neurofibromin は ras を起点とする各種細胞内シグナルの制御を行っていることが分かっていたが、そのシグナルがいかなる条件下でどの方向に分配されることによって、分化、増殖、細胞運動などの形質変化を細胞に与えるかを示唆する方法はなかった。本研究により、neurofibromin が細胞(特に神経系)の分化、及び細胞運動と組織構築に重要な役割を果たしていることがわかり、NF1 に特徴的な学習障害、母斑などの皮膚症状、骨変形など組織構築異常を説明することが可能となった。又、神経線維腫症 2 型 (NF2) に関してはその原因タンパク質である Merlin がこれまでは細胞膜裏打ち蛋白質ファミリーとの相同性から、細胞接着や骨格系にのみ作用すると考えられてきたが、本研究によって、細胞の核内において、転写や細胞死に関わる可能性があることが示唆でき、NF2 の病態における細胞の増殖抑制や生理的アポトーシスの破綻のメカニズムの一旦を明かにすることができた。neurofibromin や merlin の機能不全によって、その下流で病態に関わると考えられる多くのリン酸化酵素をはじめとするシグナル分子群が異常な制御を受けることが明らかになってきた。それら

関連分子を低分子化合物あるいは RNAi 手法を用いることによって阻害することによって、細胞の形質変化を制御することが可能となる。それらの分子制御によって、NF1 や NF2 のいかなる症候を改善することが出来るかを考察し、動物を用いた治療実験に入る必要性が示唆される。

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、及び神経系細胞の分化異常であると考えられる。本研究における解析では、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。プロテオミクス的手法によって、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。

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, and Araki N: PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of Neurofibromatosis Type I tumor suppressor, neurofibromin. FEBS Letters 557: 275-282, 2004
- 2) Iida S, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, Kosai K, Kawasuji M, Pallas DC, Saya H. Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. Oncogene;23(31):5266-74. . 2004
- 3) Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. Oncogene;23(39):6548-58, 2004 .
- 4) Zhang D, Hirota T, Marumoto T, Shimizu M, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Feng L, Suzuki M, Takeya M, Saya H. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. Oncogene ;23(54):8720-30 , 2004.
- 5) Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. Cancer Sci. 95(12):930-5. Review, 2004
- 6) Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. Nat Rev Cancer;5(1):42-50. Review , 2005.
- 7) Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M, Saya H. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. J Biol Chem. 2005
- 8) Araki N. Methods for protein purification from biological samples. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2004
- 9) 小澤達也、佐谷秀行 ニューロフィブロミンの機能、Visual Dermatology Vol3. No7. 730-732, 2004
- 10) 荒木令江/戸田年総 編集 “疾患プロテオミクスの最前線”, 遺伝子医学 2005

2) 学会発表

- 1) 日本プロテオーム学会 (JHUP0) (平成16年5月20日東京)
Study of human brain tumors by the proteomic and transcriptomic differential approach using cleavable ICAT, 2D-DIGE, and DNA array 各種ディフアレンシャルディスプレイを用いたヒト脳腫瘍の解析;cleavable ICAT、2D-DIGE、

および DNA array によるアプローチ

○ 荒木令江、長経子、戸田年総、古石和親、平野穰、小野聡、佐藤陽美、荒木朋洋、中村英夫、佐谷秀行

- 2) 日本プロテオーム学会 (JHUP0) (平成 16 年 5 月 19 日東京)

Proteomic analysis of hippocampus proteins related to the ischemic neuronal apoptosis using p53 gene knockout mice プロテオミクスによる脳神経細胞死に関連する細胞内蛋白質の解析; p53 遺伝子欠損マウス脳虚血モデルを用いたアプローチ

○ 荒木令江、長経子、平野穰、小野聡、古石和親、川野克己、戸田年総、荒木朋洋、次田皓、福永浩二、佐谷秀行

- 3) 平成 16 年度九州生化学会熊本大会 (平成 16 年 5 月 29 日熊本)

シンポジウム・プロテオームと疾患
プロテオミクスによる疾患研究への戦略
○ 荒木令江、佐谷秀行

- 4) 第 13 回日本がん転移学会総会 (平成 16 年 6 月 10 日東京)

シンポジウム「遺伝子から見たがん転移研究の現状と将来」
RNAi を用いた CD44 切断制御の解析
佐谷秀行

- 5) Annual Meeting of Korean Brain Tumor Society Meeting. Special Lecture in 2004 (平成 16 年 6 月 26 日 Suwon, Korea)

Cell cycle checkpoint abnormalities in malignant brain tumors.
Hideyuki Saya

- 6) International Symposium of Grant-in-aid for Scientific Research on

Priority Areas 'Cancer' (平成 16 年 7 月 1 日—2 日 東京)

"Global Trends in Cancer Research"

Role of Aurora kinases in mitotic regulation and tumorigenesis.

Hideyuki Saya

- 7) 第 23 回日本臨床化学会夏期セミナー (平成 16 年 7 月 15 日鹿児島)

シンポジウム プロテインチップとメタボローム: 臨床への応用
プロテオミクスによる脳神経系疾患の病態解析

○ 荒木令江、佐谷秀行

- 8) Gordon Research Conference on Cancer: Models and Mechanisms (平成 16 年 8 月 1 日—6 日 RI, USA)

Roles of Aurora-A kinase in mitotic progression.

Hideyuki Saya

- 9) 第一回佐賀大学総合研究施設研究会 (平成 16 年 8 月 3 日佐賀)

腫瘍関連蛋白質群のプロテオミクスによる機能解析

○ 荒木 令江、佐谷秀行

- 10) 第 16 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム (平成 16 年 8 月 19 日—20 日長野)

Aurora キナーゼによる分裂期制御機構
佐谷秀行

- 11) 第 63 回日本癌学会学術総会 (平成 16 年 9 月 29—10 月 1 日福岡)

ワークショップ 家族性腫瘍とその原因遺伝子

NF1 蛋白 neurofibromin のリン酸化と、新規細胞内 NF1 結合蛋白質群による特異的 RAS-

GAP 機能制御機構の解析

Specific RAS-GAP regulation of NF1 tumor suppressor gene product (Neurofibromin) by its phosphorylation and cellular binding proteins

○シリポーン・パトラキットコムジョーン、
馮立平、小沢達也、湯之上俊二、佐谷秀行、荒木令江

- 12) 第 63 回日本癌学会学術総会 (平成 16 年 9 月 29-10 月 1 日福岡)

シンポジウム プロテオミクスによる、がん研究の新戦略

Focused proteomic differential display による腫瘍研究

Study for tumor related proteins by focused proteomic differential display
荒木令江、長経子、シリポーン・パトラキコムジョーン、小沢達也、戸田年総、中村英夫、倉津純一、佐谷秀行

- 13) 第 63 回日本癌学会総会 (平成 16 年 9 月 29 日-10 月 1 日福岡)

シンポジウム「細胞周期とがん」

分裂期キナーゼの異常による細胞分裂障害
佐谷秀行

- 14) 第 63 回日本脳神経外科学会 (平成 16 年 10 月 6-8 日 名古屋)

RNAi 技術による神経線維腫瘍 1 型 (NF1) 遺伝子産物の機能解析: NF1 によるアクチン細胞骨格制御

Functional analysis of neurofibromin, neurofibromatosis type 1 gene product, in the regulation of actin cytoskeletal reorganization using RNAi technique

○小澤達也、徳王宏、湯之上俊二、馮立平、

Patrakitkomjorn Siriporn,

原敏浩、藤井清孝、荒木令江、佐谷秀行

- 15) 第 77 回日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13-16 日 横浜)

ワークショップ アダプター蛋白質による情報伝達制御

Analysis of cellular binding proteins for NF1 tumor suppressor gene product (neurofibromin) and their regulations toward the phosphorylation and RAS-GAP function of neurofibromin

NF1 蛋白 neurofibromin の結合蛋白質群を介したリン酸化と NF1-RAS-GAP 機能制御機構

○シリポーン・パトラキコムジョーン、馮立平、湯之上俊二、小沢達也、佐谷秀行、荒木令江

- 16) 第 77 回日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13-16 日 横浜)

ワークショップ がんの分子病態と遺伝子発現制御

脳腫瘍のプロテオミクスによる病態解析

○長経子、戸田年総、中村英夫、三池浩一郎、山村研一、佐谷秀行
荒木令江、

- 17) 第 77 回日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13-16 日 横浜)

ワークショップ 機能プロテオミクス 1

Functional proteomic approaches on p53 dependent neuronal apoptosis p53 を介した神経系細胞死関連分子群のプロテオミクスによる解析

○荒木令江、長経子、戸田年総、荒木朋洋、福永浩二、佐谷秀行

- 18) 第 77 回日本生化学会大会 (平成 16 年 10 月 13-16 日 横浜)
シンポジウム「細胞周期研究の新たな展開」
Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents.
佐谷秀行
- 19) 第 23 回日本脳腫瘍学会 (平成 16 年 10 月 30-11 月 1 日、霧島)
シンポジウム
Morphology, biochemistry, genetics and epigenetics
○ 佐谷秀行
- 20) 第一回京都大学プロテオミクス研究会 (平成 16 年 11 月 6 日京都)
プロテオミクスによる疾患解析への戦略と応用
○荒木令江、佐谷秀行
- 21) International Symposium in Osaka University Institute
大阪大学蛋白研セミナーCOE シンポジウム (平成 16 年 11 月 15-16 日大阪) Frontiers of Proteomics Aims and Perspectives
Functional proteomic studies on brain tumors and related diseases. -Signal network analysis in tumor tissue
Norie Araki Hideyuki Saya
- 22) National University of Singapore Cancer Symposium (平成 16 年 11 月 18-19 日 Singapore)
Functional implication of mitotic kinases in cancer development.
Hideyuki Saya
- 23) 第 8 回バイオ治療法研究会・第 3 回日本免疫療
- 療学研究会合同特別講演 (平成 16 年 12 月 4 日 福岡)
細胞周期に基づく発ガンの分子理論と新しい治療の考え方
佐谷秀行
- 24) 第 27 回日本分子生物学会年会 (平成 16 年 12 月 8-11 日 神戸)
シンポジウム「染色体の分配機構」
Aurora キナーゼによる染色体分配調節
佐谷秀行
- 25) 第 27 回分子生物学会 (平成 16 年 12 月 8-11 日神戸)
テクニカルセミナー
プロテオミクスによる細胞内腫瘍関連シグナルの解析
○荒木令江、佐谷秀行
- 26) 平成 16 年度厚生労働省科学研究費神経皮膚症候群に関する研究班研究発表会 (平成 16 年 12 月 17 日福岡)
NF1, NF2 遺伝子産物を介した腫瘍抑制シグナルの解析
○荒木令江、Siriporn Patrakitkomjorn、小澤達也、長経子、青木雅史、佐谷秀行
- 27) 岡山大学分析計測部門講演会 (平成 16 年 1 月 12 日岡山)
プロテオミクスによる細胞内シグナルの解析
○荒木令江、佐谷秀行
- 28) 第 5 回バイオ・ナノ・センシング技術による健康システム研究会 (平成 16 年 1 月 18 日北九州)
疾患プロテオミクスの戦略と現状
○荒木令江
- 29) 第一回疾患プロテオミクス研究会 (平成 16 年 1 月 18 日東京)

疾患プロテオミクスへの戦略と現状

荒木令江、佐谷秀行

30) 第4回鹿児島大学バイオインフォマティクス

講演会 (平成17年1月28日)

プロテオミクスによる細胞内シグナル解析

荒木令江

31) 第2回日本癌学会カンファレンス (平成17

年2月11-13日蓼科)

プロテオミクスによるがん研究の新しい挑戦

がんのプロテオミクスの最近の動向

○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

活性型ビタミンD3の外用によるカフェオレ斑の淡色化の機序の解明

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のカフェオレ斑では、hepatocyte growth factor (HGF) および stem cell factor (SCF) の分泌が真皮線維芽細胞において亢進し、メラノサイトが刺激されると考えられている。我々は、活性型ビタミンD3製剤(vitD3)の長期外用によるカフェオレ斑の淡色化とメラノサイトに対する増殖抑制作用をこれまでに報告した。しかし、線維芽細胞への vitD3 の作用は明らかにされていない。線維芽細胞の neurofibromin (NF1 遺伝子産物、Ras 抑制因子)を siRNA によってノックダウンし検討を加えた。ノックダウン細胞ではコントロールに比べて HGF 発現が亢進したが、vitD3 によって著しく抑制された。シグナリングとして Ras-GTP 活性化による epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現亢進につづく c-Src 経路の活性化により HGF 発現が亢進すると考えられた。また、ノックダウンで増加した細胞表面の EGFR は vitD3 添加後に細胞内に取り込まれ、下流のリン酸化経路が抑制されて HGF 発現が低下すると考えられた。カフェオレ斑に対する新しい分子治療ターゲットの存在の可能性が示唆された。

古村南夫 福岡大学医学部皮膚科・講師

線維芽細胞からの HGF や SCF の分泌亢進が表皮メラノサイトの増殖を引き起こしている可能性が近年報告された。

A. 研究目的

NF1 に生じるカフェオレ斑に関する有効な治療法として、vitD3 軟膏の長期外用が色素斑の淡色化を引き起こすこと。Qスイッチルビーレーザー照射を併用すると更に淡色化し、色素斑の再発もほとんど見られないことを初年度に報告した。

カフェオレ斑の発症機序として NF1 の皮膚真皮

昨年度は、この点に着目し、ヒト正常皮膚真皮由来の培養線維芽細胞の NF1 を siRNA でノックダウンしたところ、HGF の発現が低下することを見出した。

今回は、NF1 ノックダウンにより HGF がどのような細胞内シグナルを介して発現抑制されるかを調べた。さらにそのシグナリングに対する vitD3

の作用点についても検討した。

色素斑の発症につながる細胞内シグナルの解明は、カフェオレ斑の分子治療にむけた標的選択の第一歩として重要であると考えられる。

B. 研究方法

- 1) メラノサイト培養：正常ヒトメラノサイト (NHEM) はクラボウより購入。専用の培養液で継代培養した。
- 2) SiRNA 導入： NF1 mRNA 特異的構造 (シーケンスは本研究班分担研究者の熊本大学腫瘍医学教室より提供) を持つヒト特異的 SiRNA を合成し、培養ヒト線維芽細胞に TransMessenger Transfection Reagent (QIAGEN) による細胞内導入を行うことによって NF1 mRNA のノックダウンを行った。NF1 の発現はコントロールのランダム配列の SiRNA 導入細胞に比べて 80-90% (mRNA レベル) 低下していることがリアルタイム RT-PCR で確認された。
- 3) NF1 ノックダウン細胞における HGF、EGFR、c-src の蛋白レベルでの発現変化を特異抗体 (Santa Cruz Biotechnology) によるウェスタンブロット法で調べた。また、EGFR、c-src については抗リン酸化特異的抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてリン酸化の状態を確認した。
- 4) NF1 ノックダウン細胞における EGFR の細胞内局在を、抗 EGFR 抗体と FITC 標識二次抗体を用いて免疫細胞染色し蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果と考察

NF1 ノックダウン培養ヒト線維芽細胞ではコントロールに比べて、HGF の発現が有意に増加した。これは NF1 のカフェオレ斑部の真皮線維芽細胞の HGF 分泌亢進と一致する所見であった。VitD3 を添加したところコントロール細胞では HGF 発現が増加したが、NF1 ノックダウン細胞では反対に HGF の発現が著明に低下した (図1)。これは、カフェオレ斑に vitD3 を外用した場合に、NF1(-/-) の真皮線維芽細胞での HGF 分泌を低下させる可能性を示唆する所見であると考えられた。

NF1 ノックダウン線維芽細胞では RAS-GTP 活性が上昇するため、従来報告されている activated RAS oncogene と同様のシグナル経路の活性化が見られるとされ、その下流で HGF の遺伝子発現が誘導される可能性がある。

今回は、RAS の活性化により発現が相乗的に増加する EGFR とその下流に位置し、最近 HGF の発現にも関与するとの報告がある c-src の活性化をリン酸化抗体を用いて検討した。vitD3 によるノックダウン細胞での HGF 発現の低下がこの経路の抑制で起きるかどうかにについても調べた。

NF1 ノックダウン細胞では Ras-GTP による epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現亢進につづく c-src 経路の活性化により HGF 発現が亢進すると考えられた。

neurofibromin のノックダウンで増加した細胞表面の EGFR を蛍光顕微鏡下に観察した。vitD3 添加後に EGFR は細胞内に取り込まれ、ウェスタンブロット法では EGFR と c-src のリン酸化が抑制されたことから、EGFR の細胞内取り込みによりその下流のリン酸化経路が抑制されて HGF 発現が低下すると推察された (図2)。カフェオレ斑部の EGFR の発現を免疫組織染色で調べたところ、色素斑に

一致して EGFR 陽性の真皮線維芽細胞が認められ、組織内でも同様のシグナリングの活性化が示唆された (図 3)。

HGF 発現を制御するプロモータ領域には転写因子 STAT3 の responsive element が存在し、STAT3 は c-src により活性化されることも知られている。c-src の下流のシグナリングについて、今後さらに検討を加える必要があると考えられた。

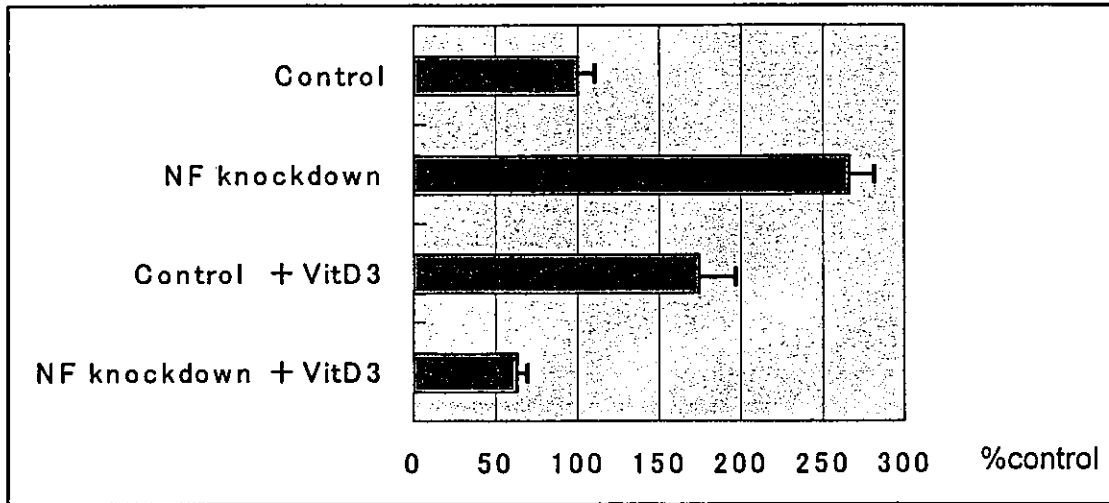
D. 結論

VitD3 のカフェオレ斑に対する淡色化の作用機序を調べることによって、カフェオレ斑の形成に関与するシグナリングの一部が明らかになった (図 4)。

カフェオレ斑に対する新しい分子治療ターゲットの存在の可能性が示唆された。

図1

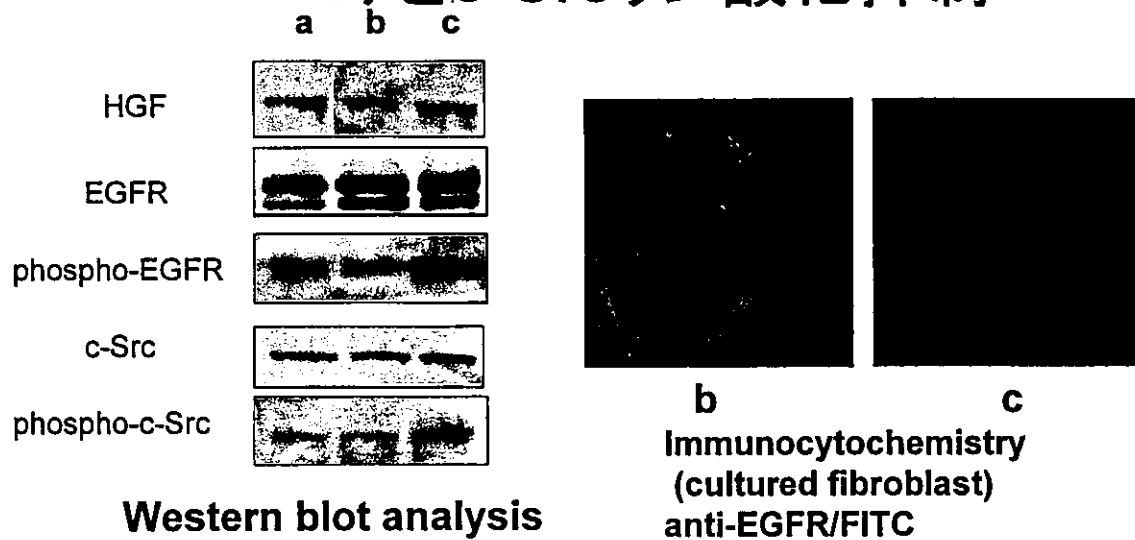
VitD3はneurofibrominノックダウン細胞のHGF発現を著明に抑制



VitD3: 100nM 22-oxiacalcitriol 24hr treatment

図2

VitD3によるEGFRの細胞内取り込み とc-Srcリン酸化抑制



Western blot analysis

b
c
Immunocytochemistry
(cultured fibroblast)
anti-EGFR/FITC

- a Control
- b NF-knockdown + VitD3 treatment 24hr
- c NF-knockdown

図3

カフェオレ斑部真皮上層でEGFR陽性細胞が増加

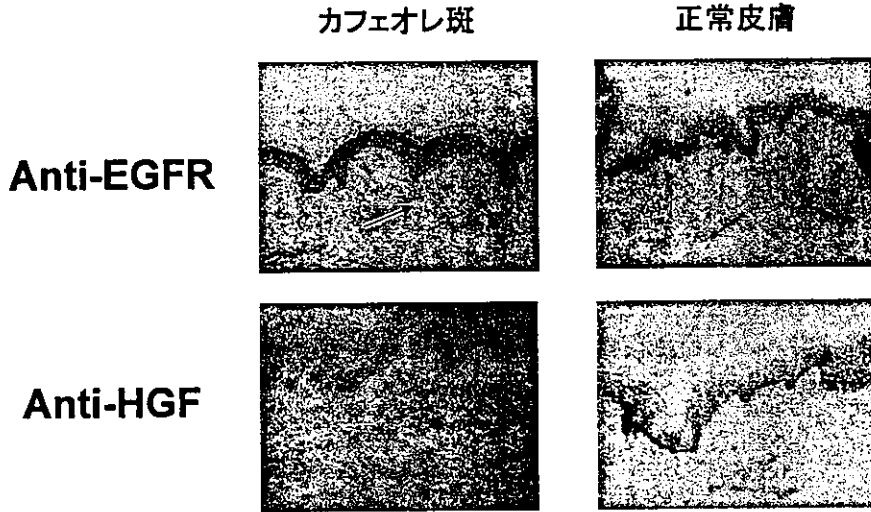
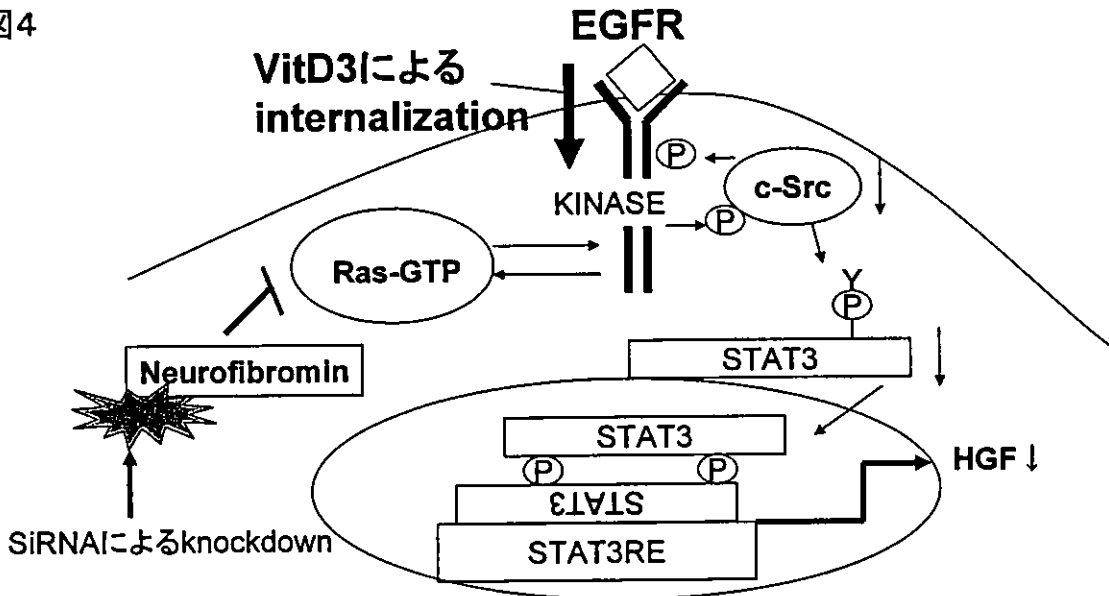


図4



ノックダウン細胞ではRas-GTP活性化によりEGFR発現は亢進するが、VitD3によって細胞内取り込みが起こり下流のシグナリングが抑制されHGF発現が低下

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

TS の分子標的治療

分担研究者 樋野 興夫 順天堂大学医学部第二病理教授

研究要旨

TSC 遺伝子変異を起点とした発がんの連盟的首位性の解明とヒト結節性硬化症の分子標的治療戦略の開発を行う。目的は、「結節性硬化症の制御」の根拠を示し、「結節性硬化症の進展阻止」の実際を示すことにある。

A. 研究目的

「遺伝性がん」でも「単因子病でありながら多因子病」の特徴を持つ。

初期条件がある範囲にあると、初期の変異が経時的変化とともに分子の相互作用によって、様々に拡大し、将来予測が不可能になる。これは初期のわずかな変異で大きな効果が出ることを意味する（発がんの連盟的首位性）。非平衡状態にあり外部と相互作用する開かれた複雑系である発がん過程は、初期状態が同じでも、外部から、意識的に適時に介入すれば、ある特異点で分岐し多様性のある制御が可能になるはずである（signal therapy）。浸透率の高い遺伝性がんでも予防・治療の介入が出来る根拠がここにある。

がん化細胞は病理学的には多段階的に成長する。がん化の起始細胞の進展には、境遇が大切である（癌性化境遇）。「病気のリスクがある」とことと実際に「病気が発症する」とは違う。我々は、「遺伝子型（genotype）」と「表現型（phenotype）」

に、さらに「変えられる、いじれる表現型：演出型（dramatype）」の概念を導入することを提唱するものである。何故なら、病気とは、『変えられる表現型』と考えるからである。この演出型（dramatype）発現のメカニズムの解明は、遺伝性がんの予防・治療法の開発にもつながるものと考ええる。

本研究の目的は、「結節性硬化症の制御」の根拠を示し、「結節性硬化症の進展阻止」の実際を示すことにある（Intentional delay）。

具体的には、本研究では、リファインされたユニークな結節性硬化症（TSC）遺伝子の疾患モデルを用いて、起始遺伝子を起点とした多段階発がん過程を解析し、その特異点の分子（分子標的）を明らかにし、最終的にはヒト結節性硬化症の治療（signal therapy）に資するものである。

B. 研究方法

特定の変異を遺伝子型 (genotype) に持つ遺伝性がんの表現型 (phenotype) に処置を加えると、ドラマが演じられる。この演出型 (dramatype) 発現のメカニズムの解明は、遺伝性がんの予防・治療法の開発につながる。ユニークな疾患モデルを用いることによって結節性硬化症遺伝子の変異による腫瘍発生機序解明とその治療に資する知見を得ようとするものである。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし

C. 研究結果及び考察

Hamartin (結節性硬化症 Type 1 産物) と tuberin (結節性硬化症 Type 2 産物) がインシュリン・シグナル伝達系において機能を発揮することを、報告してきた (Nature Cell Biology, 2002)。遺伝学的な解析からその作用点は S6 キナーゼの上流であり、且つ Akt キナーゼの下流に位置することが予測された。そこで、TSC signaling pathway (Akt-mTOR-S6K) に基づいた mTOR 阻害剤である rapamycin による分子標的治療を、Tsc2 KO マウスの腎がん細胞由来のヌードマウス移植腫瘍において実際に示した (Proc. Japan. Acad. 79 (B), 22-25, 2003)。次に、in vivo の primary tumor の治療について検討する為に生後約 1.5 年の Eker rat の腫瘍に対し、rapamycin を 1.0 mg/kg あるいは 0.3 mg/kg を同様に、腹腔内投与した。腎がん細胞で強発現しているリン酸化型 S6 の発現は消失し、rapamycin が作用していることが確認出来たが病変 (特に初期病変) の大きさ・数には変化を認めなかった (投稿準備中)。

そこで、背部に rapamycin 入りカプセルを埋め込み持続的に rapamycin を 2 週間投与し、腫瘍の明らかな縮小化を確認した。しかし、病変は残る (投稿準備中)。これは個体レベルでの遺伝子機能を考える上でも、実際の治療戦略を考える上でも重要な知見と考える。rapamycin の臨床応用における、問題点と効果的な使用方法に示唆を与えるものである。また異なる発がん過程、ステージにおいては、mTOR とは別の、pathway の存在を示す重要な知見とも考える。

Hamartin と tuberin はそれぞれの N 末端領域を介して直接結合し、協調して機能を発揮すると考えられている。我々は tuberin の欠失変異体を発現させたトランスジェニック・Eker ラットを作製し、生体内における tuberin の腫瘍抑制領域 (Tsc2-RGH; 興味あることに hamartin とは結合しない C 末領域) を明らかにした (Human Molecular Genetics, 2002)。また、Tsc2 KO マウスの腎がん細胞由来の細胞株に Tsc2-Full を導入すると、S6 のリン酸化は完全に抑制されるが、Tsc2-RGH を導入しても S6 リン酸化は抑制されないという興味ある知見を得ている (投稿中)。これらの知見は、ヒト結節性硬化症の分子標的治療の戦略・戦術を立てる上でも重要な情報を与えるものと考えられる。しかも、その抑制効果は、partial であり、N 末領域遺伝子導入ラットとの交配で完全に腫瘍発生が抑えられることが明らかとなった (投稿中)。これらの結果より、新しい作用機構を提唱した (Gene, Chromosome & Cancer 38: 357-367, 2003)。

以上の如く、結節性硬化症遺伝子変異を起点とした発がんの『制御』の根拠を示し、『進展阻止』の実際を示すことに成功した。しかし、一方で、発がん過程依存的な分子の役割、関与が判明した。

これらの知見に基づいて、難病であるヒト結節性硬化症の治療戦略の構築が具体的に、今後、展開されるものと期待される。

また新規の「ヒト皮膚疾患の症候群」(BHD)のモデルの遺伝子の単離・同定に成功した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 2023-2027, 2004)。

この新規のがん抑制遺伝子の機能解明は、TSC 遺伝子の機能解明にも示唆を与えるものと考えられる。ヒトでは、共に phacomatosis を起こす遺伝子である。さらに、多段階発がん過程で初期に発現する遺伝子を単離・同定した。新規の腫瘍マーカーとして期待される。

D. 結論

遺伝学的にリファインされた疾患モデルを用いて signal therapy の実際と課題を具体的に提示した。実際のヒト結節性硬化症への治療戦略を具体的に提供するものであり今後の進展が期待される。

E. 研究発表

- Mizuguchi M., Mori M., Nozaki Y., Momoi M. Y., Itoh M., Takashima S. and Hino O.: Absence of allelic loss in cytomegalic neurons of cortical tuber in the Eker rat model of tuberous sclerosis. Acta Neuropathol (Berl) 107: 47-52, 2004
- Kikuchi Y., Sudo A., Mitani H. and Hino O.: Presence of a modifier gene(s) affecting early renal carcinogenesis in the Tsc2 mutant (Eker) rat model. Int J Oncol 24: 75-80, 2004
- Okimoto K., Sakurai J., Kobayashi T., Mitani H., Hirayama Y., Nickerson M. L., Warren M. B., Zbar B., Schmidt L. S. and Hino O.: A germline insertion in the Birt-Hogg-Dube' (BHD) gene gives rise to the Nihon Rat model of inherited renal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 101: 2023-2027, 2004
- Adachi H., Majima S., Kon S., Kobayashi T., Kajino K., Mitani H., Shiina H., Igawa M. and Hino O.: The Niban gene is commonly expressed in renal tumors: A new candidate marker for renal carcinogenesis. Oncogene, 23: 3495-3500, 2004
- Hino O.: Studies of familial tumors using models: genotype, phenotype, and dramatype in carcinogenesis. Int. J. Clin. Oncol. 9: 257-261, 2004
- Hino O.: Multistep renal carcinogenesis in the Eker (Tsc 2 gene mutant) rat model. Current Molecular Medicine, 4: 807-811, 2004
- Okimoto K., Kouchi M., Matsumoto I., Sakurai J., Kobayashi T. and Hino O.: Natural history of the Nihon rat model of BHD. Current Molecular Medicine, 4: 887-893, 2004
- Hino O., Kobayashi T., Momose S., Kikuchi Y., Adachi H. and Okimoto K.: Renal carcinogenesis: Genotype, phenotype and dramatype. Gann Monograph on Cancer Research (Edited Tsuruo T and Kitagawa T) No. 52: 55-69, 2004 Japan Scientific Societies Press.
- Sato T., Seyama K., Kumasaka T., Fujii H.,

Setoguchi Y., Shirai T., Tomino Y., Hino O.
and Fukuchi Y. : A patient with TSC1 germline
mutation whose clinical phenotype was
limited to lymphangiomyomatosis. J. Int.
Medicine 256: 166-173, 2004

10. Ishii T., Yasuda K., Akatsuka A., Hino O.,
Hartman P.S. and Ishii N. : A mutation in the
SDHC gene of complex II increases oxidative
stress, resulting in apoptosis and
tumorigenesis. Cancer Research, 65: 203-209,
2005

F. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許取得： 特許申請中、予定（3つ）
- 2) 実用新案登録： 特になし
- 3) その他： 特になし

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

神経線維腫症 1 における画像診断学

分担研究者 土田 哲也 埼玉医科大学皮膚科教授

研究要旨

NF1 患者に生じる皮膚症状、すなわちカフェ・オ・レ斑、皮膚神経線維腫、びまん性神経線維腫、結節型蔓状神経線維腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、グロムス腫瘍のほか、視神経膠腫、Unidentified Bright Objects、モヤモヤ病などの中枢神経病変、褐色細胞腫などの神経冠由来腫瘍、及び腫々の骨病変の診断、描出に有用な画像診断の実際を示した。これらは極めて有用であり、必要に応じて NF1 患者の臨床経過を追う際にも、選択すべき検査法と考えられた。

倉持 朗

埼玉医科大学皮膚科助教授

regular pigment network (regular honeycomb-like structure) がみられる。ただし毛孔のまわりと皮膚紋理の一部では色が抜ける。

A. 研究目的

NF1 患者の臨床経過をフォローしている間に、皮膚症状、中枢神経病変、骨病変、神経冠由来腫瘍などに対し、画像診断を行った症例についてまとめ、有用性を検討した。

いずれも患者には、事前に十分な説明をし、検査、手術とも同意を得たのちに行ったものである。

B) 皮膚の神経線維腫

しばしば Color Doppler・Power Doppler Imaging (CDI・PDI) で腫瘍内部に血流が検出される。血管新生は神経線維腫の増殖においても必須である。

MRI では T1 強調画像で low、T2 で high、STIR (脂肪抑制画像) で high intensity の均一な mass として描出される。

C) びまん性の神経線維腫 (diffuse plexiform neurofibroma, diffuse PNF : いわゆる pachydermatocele)

一般に大レックリングハウゼン斑部が隆起してきて、巨大になること、血流が極めて豊富になること (しばしば sinusoidal vasodilation を伴う

B. 研究結果**1. 皮膚症状****A) カフェ・オ・レ斑**

dermoscopy で観察すると 61.5% で濃褐色調の

奇形血管を多数伴う)、しばしば腫瘍内出血・血腫形成を来すこと、内部に nodular plexiform neurofibroma やその悪性化を生じることが特徴で、そのいずれもが描出できる。①PDI・CDI では豊富な血流信号がみられる。②thermography では高温のことも、放熱のため反対側より低温になることもある。③血管造影では hypervascular であり、静脈相で sinusoidal vasodilation をみることも多い。④MRI では 3 つの pattern を示す、腫瘍成分が T1 low (Gd 静注後 T1 で造影効果を示し high になる)。T2 high、STIR high で、(i) 腫瘍が mass lesion 全体を構成するもの。(ii) 腰臀部の病変で多いが、腫瘍がサンドイッチのパンのように皮膚側と筋膜上にあって、間に健常脂肪織(の信号)を挟むもの。(iii) 霜降り状に入り込むもの、である。腫瘍内出血・血腫も MRI で描出が容易である。

D) nodular plexiform neurofibroma (nodular PNF)

後述の悪性化の前駆病変となりえ、paraspinal plexiform neurofibroma と並び NF1 の risk factor である。MRI が極めて有用で、(1) 均一な T1 low、T2・STIR high の病変で Gd 造影効果が一樣なものか、(2) target appearance を示すもの(腫瘍は T1 で中央部 high・周辺部 low、T2・STIR で中央部 low・周辺部 high、また Gd 静注後 T1 で、中央部が優位に造影される)に大別される(図 1)。PDI・CDI でも内部にしばしば血流信号をみる。

E) 悪性末梢神経鞘腫瘍 (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)

de novo に生じるものと、それより多い頻度で nodular PNF から発生するものがある。MRI がもっとも有用であるが、(1) nodular PNF に生じた focal malignancy や小型病変は、nodular PNF と同様の

所見であって、(2) 一定以上の大きさをもつものが、T1・T2・STIR 上、内部不均一性 (Gd 造影後 T1 が不均一性が明瞭となる) を特徴として描出される(図 2)。また核医学が有用で、 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 、 $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ で陽性となる (^{67}Ga で陰性のものが、他の核種でしばしば陽性となる)。

F) グロムス腫瘍

NF1 では理由は不明であるが、グロムス腫瘍の合併が多い。dermoscopy 上、桑の実状で、赤紫色調の構造物として観察される。色合いは血液のたまりや細胞集塊の程度の変化をおそらくは反映して、内部でそのトーンが変わる。

2. 中枢神経病変

A) optic (pathway) glioma

optic (pathway) glioma は欧米では NF1 の診断基準に入っているにもかかわらず、人種差があって、本邦では少ない(自験例では MRI 施行症例中 3%である)。pilocytic astrocytoma (毛様細胞性星細胞腫)であって (WHO grade I)、視神経にとどまり視覚路に沿って成長せず経過するものや、自然消褪をする症例(自験例でも認められた)もある。

B) unidentified bright objects (UBOs)

UBOs も欧米では多数 (NF1 の 60%) でみとめられるのにひきかえ、自験例では 27%と、やはり本邦では少ない(経時的追跡で、それまでなかった患者に生じる可能性はあるが)、MRI が有効で、小脳・脳幹・基底核を好発部位とする、MRI T2 で高信号を示す病変である。

C) モヤモヤ病

NF1 では他にさまざまな脳内病変が認められる。NF1 との関連は未知であるが、もっとも有名なものが、モヤモヤ病である。

3. 骨病変

側彎症・低身長・大頭症を生じるほか、胸郭変形、頭蓋骨・顔面骨骨欠損、下腿骨の菲薄化と彎曲（偽関節の原因となる）など、種々の骨病変がみられる。diffuse PNF の長期の圧迫に基づく顎骨などの菲薄化もしばしば認められる。NF1 ではまた patulous canal も有名で、難聴や神経耳科学的検査異常の一要因となる。

4. 神経冠由来腫瘍

NF1 に合併する neural crest-derived tumor として、多数の報告例のあるものは medullary thyroid cancer、悪性黒色腫、褐色細胞腫であるが、NF1 の疾患本態との強い関連性が推定されているものが、褐色細胞腫である。catecholamine 測定、MRI、US 検査のほか、画像診断上、¹²³I-MIBG シンチグラフィがきわめて有用である。

C. 結論

NF1 患者の経過・臨床像をよくみながら、必要に応じて検査を行うことは、skin/organ manifestation の描出・診断に必須であり、今回、その各々の臨床所見に対する妥当な検査法を規定しえたものとする。

具体的には、NF1 に生じうる皮膚症状としてのカフェ・オ・レ斑、皮膚神経線維腫、びまん性の神経線維腫、結節型蔓状神経線維腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、グロムス腫瘍のほか、視神経膠腫、Unidentified Bright Objects、モヤモヤ病などの中枢神経病変、褐色細胞腫などの神経冠由来腫瘍、及び種々の骨病変の診断、描出に有用な画像診断の実際を示した。これらは極めて有用であった。これらは臨床経過を追う際にも必要と考えられる。

なお、検査医学を実際にすすめていくにあたって、大切なことは、臨床像・経過をよくみながら、必要に応じて検査をすべきであり、いたずらに多くの検査をして、患者（とくに小児）に余計な不安を与えないことである。

最大の問題点は（皮膚科学的見地からは）、malignant peripheral nerve sheath tumor の early lesion を検出する良い方法が、まだないことであり、特にこの点については、ひきつづき検討を加えていきたい。

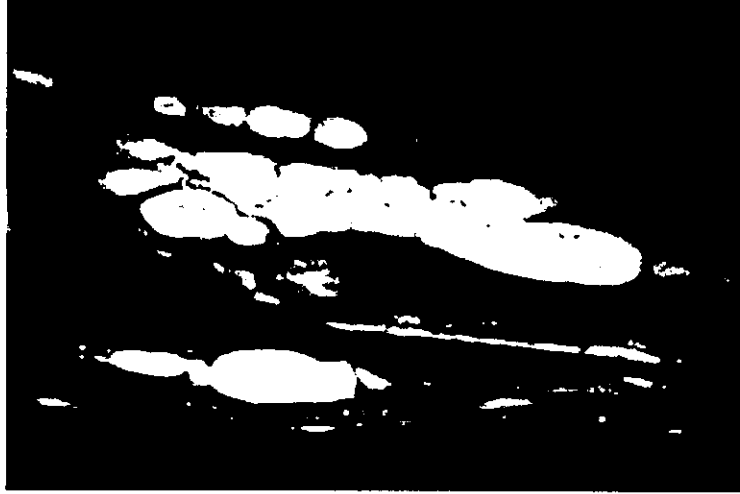


図1 nodular plexiform neurofibromaのMRI所見。
target appearanceを示す症例の一例である。

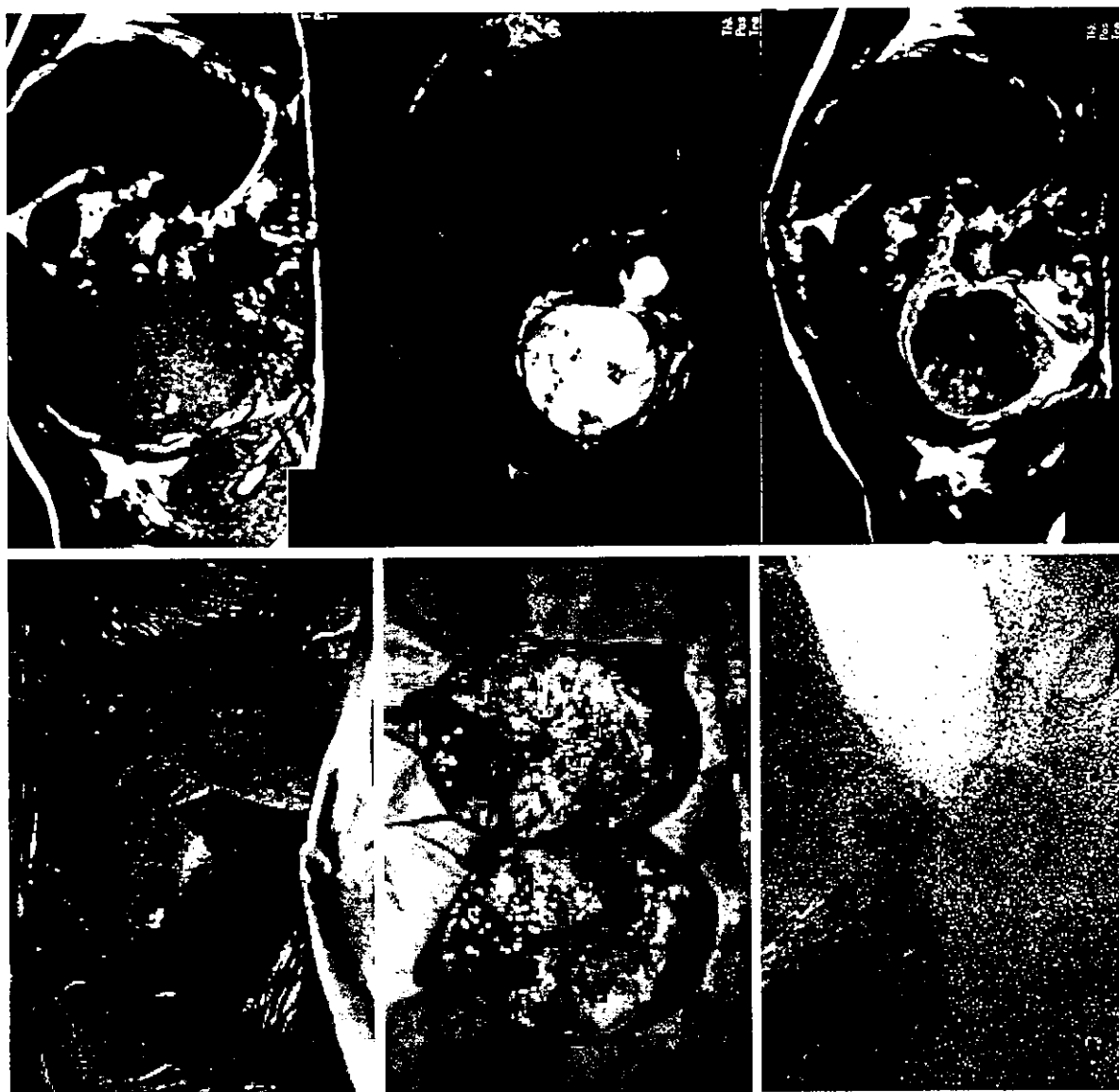


図2 malignant peripheral nerve sheath tumorのMRI所見。
内部不均一性を特徴として描出される。