

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

特定疾患治療研究事業における  
神経線維腫症 1 型の臨床調査個人票の見直し（改定案）について

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**

特定疾患治療研究事業は診断基準が一応確立し、かつ難治度、重症度が高く、患者数が比較的少ないため、公費負担の方法をとらないと原因の究明、治療方法の開発などに困難をきたす恐れのある疾患を対象としており、1998 年より神経線維腫症 1 型 (NF1) は臨床調査個人票の重症度分類 (DNB 分類) において stage4、5 に該当する患者が公費の対象となっている。Stage4、5 に該当する患者は、それぞれ日常生活に軽度の問題があり、社会生活上の問題が大きい場合と身体的異常が高度で、日常生活の支障が大きい場合と定義されている。

NF1 は症候が多彩であり、病変は様々な臓器におよぶことがあるが、個々の患者によって合併する症候（重症度）は異なるため、現在の重症度判定は皮膚症状、中枢神経症状、骨症状を組み合わせて行われている。しかしながら、近年神経皮膚症候群の研究班参加施設に NF1 の臨床調査個人票の重症度分類が分かりにくいという意見や重症度分類に対する疑問などが寄せられるようになった。もともと臨床調査個人票は重症患者の救済を目的としたものとも考えられるが、重症でありながら、上記の分類基準における定義に合致しない場合も時折みうけられる。

そこで今回我々は、患者の日常生活に極めて大きな影響を与えると考えられる中枢神経症状および骨症状の基準を一部見直すこととした。また、重症度分類の表記に一部分かりにくい箇所があり、あわせて見直しを行うこととし、改定案を作成した。今後は特定疾患懇談会等にて改定案を提示し、了承が得られれば、然るべき手続きを経て新調査票への変更を行っていく予定である。

吉田雄一 福岡大学医学部皮膚科  
古村南夫 島根大学医学部皮膚科  
大塚藤男 波大学医学部皮膚科  
土田哲也 埼玉医科大学皮膚科  
谷戸克己、中川秀己、新村真人  
東京慈恵会医科大学皮膚科

## A. 研究目的

難治性疾患克服研究事業（特定疾患調査研究分野）は疾病の原因の究明、治療法の確立を目指し、現在 121 の疾患を対象に行われている。特定疾患治療研究事業は診断基準が一応確立し、かつ難治度、重症度が高く、患者数が比較的少ないため、公費負担の方法をとらないと原因の究明、治療方法の開発などに困難をきたす恐れのある疾患を対象としており、現在 45 の疾患が対象となっている。特定疾患治療研究事業は 1972 年にパーチェット病などの 4 疾患を対象として発足し、NF1（臨床調査個人票の重症度分類 stage4, 5）、NF2 は 1998 年より医療費公費負担の対象疾患となっている。難病情報センターの報告によると 2004 年現在 45 疾患の公費対象疾患患者総数は 541,704 人であるが、NF1、NF2 両者の公費負担の対象患者数（認定患者数）は約 2000 人である（図 1）。本邦における NF1 の患者数は約 4,000 人、NF2 は約 3000 人程度と推定されているが、NF1 の約 20% が重症患者（stage4, 5）であるとの過去の統計から考えると認定患者数と実際の重症患者数との間にかなりの差が認められる。最近になり神経皮膚症候群研究班に NF1 の臨床調査個人票の重症度分類が分かりにくいという意見や重症度分類に対する疑問などが寄せられるようになったため、今回我々は現在

の NF1 臨床調査個人票を改めて検証し、問題点があれば改定を行うこととした。

## B. 研究方法

現在の NF1 臨床調査個人票を神経皮膚症候群研究班にて検証を行う。具体的には重症度分類の stage に関する表記をより分かりやすいものとし、皮膚症状、中枢神経症状、骨症状を個別に見直し、現在の医療水準にてらして問題点等が認められれば、補足・改定を行うこととした。

## C. 研究結果

NF1 の重症度分類の表記にやや分かりにくい部分があることが判明し（図 2）、より分かりやすい表記へ変更した（医療従事者用と臨床調査個人票の双方）（図 3）。

①皮膚症状に関しては医療従事者用の重症度分類の皮膚症状 D4 の＜機能障害＞という表記を＜びまん性神経線維腫などによる機能傷害や著しい身体的苦痛又は悪性末梢神経鞘腫瘍の併発あり＞とより分かりやすい表記へ変更し、臨床調査個人票の D4a の＜強い身体的苦痛＞を＜著しい身体的苦痛＞という表記へ変更し両者を統一した。

②中枢神経症状に関しては項目を神経症状という表記へ変更するとともに、日常生活や社会生活に重大な影響を与える脊髄神経系の障害に関する具体的な記載がなされていなかったため、N1 の＜中枢神経症状や中枢神経系に異常所見があるが比較的軽度＞というあいまいな表記を改め、＜麻痺、痛み等の神経症状や神経系に異常所見がある＞という具体的な記載を N 分類に補足した。また同時

に NO を<神経症状なし>という表記へ変更した  
(医療従事者用と臨床調査個人票の双方)。

③骨症状として本来重篤な骨病変であるはずの  
頭蓋骨欠損、顔面骨欠損が具体的に記載されてい  
なかったため B3 へ追記し、a, b の細目は削除した  
(医療従事者用と臨床調査個人票の双方)。

#### D. 結論

特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票  
は、その時期における医療水準を基礎として十分  
な検討、推敲を行い作成されている。しかしなが  
ら、時代の流れとともに定期的に再検討を行う必  
要があると思われる。今回、神経皮膚症候群研究  
班に医療従事者と患者の双方より現在の臨床調査  
個人票に対する苦情や疑問が寄せられたため、研  
究班参加施設にて検証を行ったが、その結果一部  
に改定を行うべき箇所が認められ、改定案を作成  
した。今後も医療従事者や患者団体からの意見も  
参考として問題点が認められれば、必要に応じて  
よりよい臨床調査個人票の改定を行っていくべき  
であると考えられる。

#### E. 結論

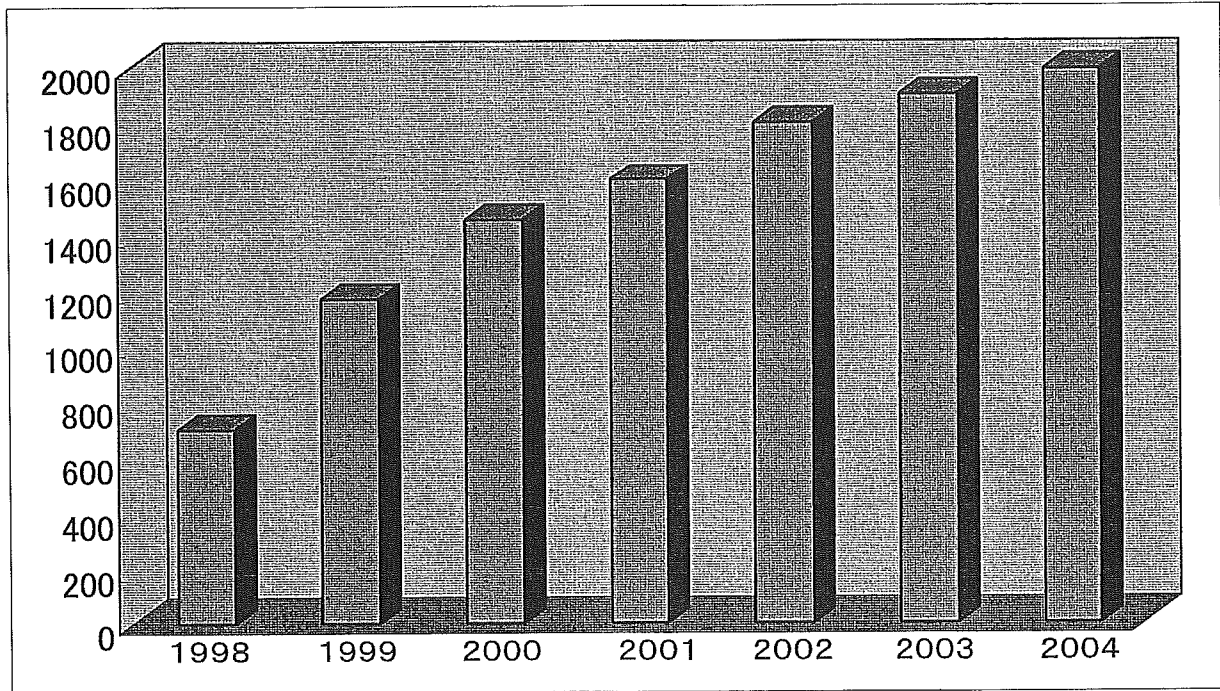
特定疾患治療研究事業における NF1 臨床調査個  
人票の改定案を作成した。今後は特定疾患懇談会  
等にて改定案を提示し、了承が得られれば、然る  
べき手続きを経て新調査票への変更を行っていく  
予定である。

#### F. 研究発表

なし

(図1)

# 特定疾患治療研究事業における医療費 公費負担対象患者数(NF1,NF2)の推移



注)45疾患の公費対象疾患患者総数は541,704人

(難病情報センターより)

(図2a)

## <NF1における現在の認定基準>

### 40-1.神経線維腫症1型

#### 1 主な症状

- (1) カフェ・オ・レ班  
肩平で盛り上がりのない斑であり、色は淡いミルクコーヒー色から濃い褐色に至るまで様々で、色素斑内に色の濃淡はみられない。形は長円形のものが多く、丸みを帯びたなめらかな輪郭を呈している。
- (2) 神経線維腫  
皮膚の神経線維腫は思春期頃より全身に多発する。このほか末梢神経内の神経線維腫 (nodular plexiform neurofibroma)、びまん性の神経線維腫 (diffuse plexiform neurofibroma) がみられることもある。

#### 2 その他の症状

- ① 骨病変—脊柱・胸部の変形、四肢骨の変形 (頭蓋骨・顔面骨の骨欠損など)
- ② 眼病変—虹彩小節節 (Lisch nodule)、視神経萎縮など
- ③ 皮膚病変—掌跖軟線色素斑、青年性褐色斑、貧血母斑、若年性黄色内皮腫など、
- ④ 脳脊髄腫瘍—局所神経ならびに脊髄神経の神経線維腫、髄膜腫、神経母腫など、
- ⑤ 脳脊髄の異常
- ⑥ クロム親和性細胞腫
- ⑦ 悪性神経鞘腫

#### 3 診断上のポイント

カフェ・オ・レ班と神経線維腫がみられれば診断は確実である。小児例 (prepubertous stage) では、径 1.5cm 以上のカフェ・オ・レ班が6個以上あれば本症が疑われ、家族歴その他の症状を参考にして診断する。ただし両親ともに正常のことも多い。成人例ではカフェ・オ・レ班が分かりにくいことも多いので、神経線維腫を主体に診断する。

#### 4 重症度分類 (表)

#### 5 特定疾患治療研究事業の範囲

1型の診断基準により神経線維腫と診断された者については、重症度分類の stage 4, 5に該当する者を対象とする。

### 分かりにくい

#### 表：重症度分類

DNB分類	生活機能と社会的活動度
Stage 1: D1, N0, B0, 1	日常・社会生活活動にほとんど問題ない
Stage 2: D2, N1, B2のいずれかを含む D1, 2, N0, 1, B0, 1	日常・社会生活活動に問題があるが軽度
Stage 3: D3, N0, B0	日常生活に問題はないが、社会生活上の問題が大きい
Stage 4: D3, N1, B1, 2	日常生活に軽度の問題があり、社会生活上の問題が大きい
Stage 5: D4, N2, B3のいずれかを含む Any D, any N, any B	身体的異常が高度で、日常生活の支障が大きい

#### 皮膚症状

- D1 色素斑と少数の神経線維腫が存在する
- D2 色素斑と比較的多数の神経線維腫が存在する
- D3 顔面を含めて極めて多数の神経線維腫が存在する
- D4 腋窩腋帯又は悪性末梢神経鞘腫瘍の併発あり

#### 中枢神経症状

- N0 中枢神経症状 (学習能力低下 や てんかん など) 無し
- N1 中枢神経症状や中枢神経系に異常所見があるが比較的軽度
- N2 高度あるいは進行性の中枢神経症状や異常所見あり

#### 骨症状

- B0 骨症状なし
- B1 軽度の骨柱変形ないし四肢骨変形あり
- B2 中等度の non-dystrophic type の骨柱変形あり
- B3 高度の骨病変あり



(図3b)

# <NF1における臨床調査個人票改定案>

40-1 神経線維腫症(1型) 臨床調査個人票 (1.新規)

氏名	性別	1.男 2.女	生年月日	1.明治 2.大正 3.昭和 4.平成	年	月	日	生(歳)
住所	郵便番号	市区町村	出生地	出生年月日	出生月	出生日	出生時在住所	出生時年齢
現病年月	1.発症 2.平成	年	月	(西暦)	初発年月日	年	月	日
身体障害者手帳	1.あり(等級)	2.なし	介護認定	1.要介護(要介護程度)	2.要支援	3.なし		
生活状況	社会活動(1.娯楽 2.読書 3.家事労働 4.在宅介護 5.入院 6.入所 7.その他)							
家族歴	日常生活(1.正常 2.やや不自由であるが自力で可 3.要援助が大部分補助 4.全面的介護)							
既往と経過	(病歴の経過)							
最近の経過	1.軽快 2.不変 3.徐々に悪化 3.急悪に悪化 4.不明							
臨床症状	(1) 主要症状							
	① カフェ・オ・レ症(6歳以上) 1.あり 2.なし 3.不明							
	② 小レットリングハウゼン症 1.あり 2.なし 3.不明							
	③ 皮膚の神経線腫 1.あり 2.なし 3.不明							
	④ ひまん性神経線腫 1.あり 2.なし 3.不明							
	(2) その他の症状							
	① 骨欠損 1.あり 2.なし 3.不明							
	② 骨質・軟骨の異常 1.あり 2.なし 3.不明							
	③ 顔面骨・顔面骨の骨欠損 1.あり 2.なし 3.不明							
	④ その他 1.あり( ) 2.なし 3.不明							
	⑤ 眼所見 1.あり 2.なし 3.不明							
	⑥ 虹彩小房腫 1.あり 2.なし 3.不明							
	⑦ 視神経腫 1.あり( ) 2.なし 3.不明							
	⑧ その他 1.あり( ) 2.なし 3.不明							
重症度(DNB分類)	該当するものに○をつけること							
① 皮膚症状	D1	色素斑と少数の神経線腫が存在する						
	D2	色素斑と比較的多数の神経線腫が存在する						
	D3	顔面を含めて極めて多数の神経線腫が存在する						
	D4	神経線腫又は顔面神経線腫の併発あり						
	D4a	ひまん性神経線腫などによる顔面腫脹や美しい身体的特徴あり						
② 神経症状	D4b	顔面神経線腫の併発あり						
	D5	神経症状なし						
	D6	頭部、顔面等の神経症状や神経系に異常所見がある						
③ 骨症状	D7	高度あるいは進行性の神経症状や異常所見あり						
	D7a	高度の学習困難低下あり						
	D7b	進行性や多発性の神経線腫が存在する						
	D8	骨症状なし						
	D9	軽度の骨柱変形ないし四肢骨変形あり						
	D9a	中程度以上の non-Asymptomatic type の骨柱変形あり						
	D9b	高度の骨前変形あり(四肢骨変形、骨質、軟骨腫、Asymptomatic typeの骨柱変形(骨質あるいは軟骨)、顔面骨欠損又は顔面骨欠損)						

より分かりやすい表記へ変更

重症度分類	該当するものに○をつけること
Stage 1	D1であって、D3、D4、D5で あるもの
Stage 2	D1、D2であって、D3を含まないもの
Stage 3	D3であって、D4、D5を含まないもの
Stage 4	D4であって、D5を含まないもの
Stage 5	D5、D6、D7のいずれかを含まないもの
活況	(1) 平常 1.あり(対照所見) 2.なし (2) その他 1.あり( ) 2.なし
医師上の病名	
医師機関所在地	
医師の氏名	
記号年月日:平成 年 月 日	

日常生活へ反映

脊髄神経系の症状について具体的に記載

骨欠損について具体的に記載

## 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

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（ニューロフィブロミン）及び NF2 蛋白質（マーリン）を介した腫瘍形成メカニズムに関連した細胞内シグナルと細胞内機能を RNA 干渉（RNA interference: RNAi）法、および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。ヒト培養細胞においてニューロフィブロミンの急激な発現抑制は、異常なアクチンストレスファイバーの形成とフォーカルアドヒージョンの増加を伴った細胞の扁平化とマトリゲルマトリックス上での細胞運動の亢進を伴った巨大な細胞凝集塊の形成を誘導した。これには、アクチンフィラメントの脱重合、切断によりアクチン細胞骨格制御を担っているコフィリンタンパクの Rho-ROCK-LIMK2 pathway を通じた抑制的リン酸化の増加（不活性化）が関与していた。また神経系細胞内におけるニューロフィブロミンの発現抑制は、特にアクソン形成を中心とした神経系細胞の分化誘導を抑制した。プロテオミクスによるニューロフィブロミンの神経系細胞内結合蛋白質の解析により、ニューロン制御因子群、細胞骨格系制御に関わる分子群が同定され、特にニューロンのアクソン形成に関わる collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) と tubulin との interaction に注目したところ、これらの分子は NF1 蛋白質を介してリン酸化を相互制御することによってアクソンの形成と伸展に関わっていることが判明した。外因性 NF1-GRD の NF1 ノックダウン細胞内への導入は、NF1 siRNA に起因した phenotype を抑制、回復した。マーリンの siRNA による発現抑制においても、細胞運動能、細胞接着能、骨格系の異常が認められ、これらに関わる DNA 修復分子群、アポトーシス関連分子群、細胞骨格系・細胞接着系制御分子群、Neuron Regulators、細胞周期関連分子群を含む NF2 結合蛋白質群が同定された。マーリンの構造的相同性から予測される機能である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を制御している可能性から、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 蛋白質と NF2 蛋白質に共通する Neuron Regulator や細胞骨格制御因子などの結合蛋白質群の存在や、両分子のノックダウンによる形態変化と、それに伴う変動蛋白質分子群に共通性があることから、

これら共通分子を介したシグナルの異常が NF1 及び NF2 に類似する病態に関連する可能性が考えられた。

荒木令江、小澤達也、Ptrakitkomjorn Siriporn  
熊本大学医学薬学研究部腫瘍医学分野

## 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。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。

NF1 は、多発性神経線維腫を始め多彩な病態を示す遺伝性疾患で、原因遺伝子産物ニューロフィブロミンは、Ras-GAP 相同領域を有し、細胞内シグナル伝達の重要な調節因子と考えられている。近年のマウスを用いた研究により、多発性神経線維腫は、細胞-細胞間および細胞-マトリックス間の相互的なシグナルの異常が形成の誘引と考えられている。特に、これまでに、ニューロフィブロ

ミンの発現低下に伴い活性化された Ras-MAPK pathway を介した異常な細胞増殖が大きく関与していることが知られているが、この事象のみでは多発性神経線維腫形成メカニズムの十分な解明には至っていない。また、ニューロフィブロミンの発現低下に起因すると思われる様々な所見が多々報告されていることから、ニューロフィブロミンには、更なる未知の機能が存在するのではないかと推測されている。

NF2 は両側性聴神経鞘腫や多発性髄膜腫など頭蓋内良性腫瘍を主徴とする遺伝性疾患で、原因遺伝子産物マーリンは、アミノ末端側半分の構造が細胞膜の裏打ち蛋白質群であるエズリン、ラディキシン、モエシンなどいわゆる ERM 蛋白質ファミリーと極めて高い相同性を示す。ERM 蛋白質は接着分子 CD44 及びアクチンと複合体を形成し、これらが Rho によって制御されることが報告されていることから、マーリンは膜タンパク質と細胞骨格を結びつけ、細胞内外のシグナルを伝達する役割を担っていることが予想される。しかし、マーリンは上皮の顆粒層細胞、筋細胞、及びシュワン細胞に高発現し、また細胞膜下のみならず細胞質内および核にも分布しており、ERM 蛋白質とは組織および細胞内での局在が異なることなどから、ERM 蛋白質に共通した機能以外の、即ちマーリン特有の機能が存在すると考えられる

本研究では、ニューロフィブロミン、およびマーリンの細胞内機能と NF1, NF2 との関連性を明らかにするために、主に RNA 干渉 (RNAi) 法による両分子の発現の抑制によって、培養細胞に及ぼ



す効果・影響を観察し、生じた表現型の責任シグナル経路の解明を、細胞生物学的、生化学的に行った。

## 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<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・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、ニューロフィブロミンの結合蛋白質の 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) マーリンに関しても 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、マーリンと会合する細胞内蛋白質の Proteomic affinity cellular mapping 法 (iTRAQ) および細胞内タグベクター発現システムを用いたプロテオミクスによる解析を行い、同定蛋白質群とマーリンの細胞内シグナル、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

### 1. ヒト培養細胞におけるニューロフィブロミンの発現抑制の影響

はじめに、NF1 蛋白質の急激な発現抑制に伴いどのような影響が生ずるか、siRNA の細胞内導入後、経時的にアクチン染色を行い細胞骨格に着目し比較検討した。siRNA の HeLa 細胞内導入 12 時間頃より、NF1 タンパク発現抑制細胞では過剰なアクチンストレスファイバーおよびフォーカルアドヒージョンの形成を伴った細胞の扁平化が見られるようになり、その後 24~48 時間後には一部の細胞で過剰なアクチンストレスファイバーが消失する傾向にあったが細胞の扁平化はなお維持された (図 1)。一方で、コントロール siRNA 導入細胞では、このような形態変化は誘導されなかった。

また、他の培養細胞 (HT1080 細胞) においても HeLa 細胞と同様のダイナミックな経時的な細胞形態変化が誘導された。以上から、NF1 蛋白質は、細胞骨格系の制御に関与しているのではないかと考えられた。

### 2. 細胞外マトリックス内での細胞運動における NF1 siRNA の効果・影響

細胞外マトリックス内での細胞の運動は、アクチン細胞骨格の再構築を伴ったダイナミックな細胞形態変化を必要とする。それ故、マトリゲル上での NF1 タンパク発現抑制細胞の成長能・細胞形態および運動能に着目し観察した。Matrigel 上で、コントロール細胞では、球状の小さな細胞塊を形成したのに対し、NF1 タンパク発現抑制細胞では、紡錘状の形態を示し、大きな不整形の細胞塊を形成した (図 2)。

興味深いことに、NF1 タンパク発現抑制細胞はコントロール細胞と比較して、約 2 倍の速さで増

殖したのにもかかわらず、マトリゲル内に形成されたコロニーの数は明らかに少なかった。

このマトリゲル内での様子をタイムラプスビデオ撮影にて観察したところ、NF1 タンパク発現抑制細胞はマトリゲル内を活発に動き回り、個々の細胞が互いに寄り集まり巨大な細胞塊を形成してゆくのが観察された。一方で、コントロール細胞では、活発な運動は見られず、また、互いに寄り集まることもなく、その場で増殖し腫瘍塊を形成した。これらの結果から、NF1 siRNA は、細胞増殖の亢進に加え、特有の細胞運動および細胞間接着を促進させることにより、マトリゲルマトリックス内での細胞凝集塊の形成を誘導したのではないかと考えられた。

### 3. NF1 siRNA により誘導された細胞形態変化とコフィリン活性との関連性の検討

NF1 siRNA の導入により観察された形態変化や細胞運動異常という所見から、ニューロフィブロミンはアクチン細胞骨格の制御に関与しているのではないかと更に考えられるようになった。このため、我々は、このアクチン細胞骨格の制御異常に関与しているシグナル分子の解明を進めた。Cofilin/ADF タンパクは、アクチンフィラメントの切断・脱重合を促進することによりアクチンフィラメントのターンオーバーに重要な役割を担っている。したがって、リン酸化によるコフィリンタンパクの不活性化は、アクチンフィラメントが安定化することが知られている。それ故、NF1 siRNA により誘導された過剰なアクチンストレスファイバーを伴った細胞形態変化は、コフィリンの不活性化が関与しているかどうか調べるために、コフィリンのリン酸化状態をウエスタンブロッティングにて検討したところ、NF1 siRNA の導入と

共に経時的にコフィリンのリン酸化が上昇していくのが確認された(図 3-1)。一方で、コントロール細胞においては、変化は認められなかった。また、NF1siRNA により誘導された形態変化は、コフィリンの恒常的活性化変異体の導入により、抑制することが出来た(図 3-2)。以上から、NF1siRNA によって生じた細胞形態変化は、コフィリンの不活性化によるものではないかと示唆された。

### 4. ニューロフィブロミンによるコフィリン依存的アクチン細胞骨格の制御と Rho-ROCK-LIMK2 シグナル経路との関連性の検討

コフィリンの活性は Rho-ROCK-LIMK2 pathway により負に制御されることが知られていることから、NF1siRNA によるコフィリンの不活性化は、この pathway が関与しているかどうか、このシグナル経路を遮断し、NF1siRNA の効果が抑制できるか検討した。LIMK2siRNA, ROCK inhibitor, Rho dominant negative mutant により、Rho-ROCK-LIMK2 シグナル経路をそれぞれ遮断したところ、NF1siRNA により誘導されたコフィリンのリン酸化も過剰なアクチンストレスファイバーの形成も抑制することができた(図 4)。これらの結果より、NF1siRNA による一連の効果は Rho-ROCK-LIMK2 pathway を通じて制御されているのではないかと考えられた。

### 5. NF1 依存的 Rho シグナル経路と Ras シグナル経路との関連性の検討

ニューロフィブロミンは、RasGAP 機能を有することから、NF1 siRNA により誘導された一連の効果は、Ras の活性に依存しているかどうか明らかにすることは重要と考えられる。それ故、我々は、Ras のドミナントネガティブ変異体 DN-Ras

(S17N)を NF1 siRNA と共に細胞内導入し、NF1 siRNA により誘導されるコフィリンのリン酸化および過剰なアクチンストレスファイバーを抑制できるか検討した。Ras のドミナントネガティブ変異体は部分的にはあるが抑制効果を示した。以上より、NF1 siRNA により誘導された形態変化には、Ras の活性が関与しているということが示唆された。

また、どの Ras の主要な下流シグナル経路が関与しているかどうか調べるために、MEK、PI3K 阻害剤および Ral siRNA を用い検討した。しかしながら、いずれの処置も抑制することが出来なかった。以上の結果から、NF1 siRNA により誘導された一連の効果に対して、Ras の活性は部分的に必要であるが、Ras-MAPK、PI3K および RalGEF シグナル経路以外の未知のシグナル経路を通じて関与している可能性が示唆された(図 5)。

## 6. NF1 siRNA により誘導された効果と NF1-RasGAP 機能との関連性の検討

最後に、NF1 siRNA により誘導された効果に対して、NF1-RasGAP 機能の喪失が関与していたのかどうか明らかにするために、我々は、NF1-GRD (GTPase activating protein-related domain)の導入により、NF1 siRNA による効果が抑制できるか検討した。NF1-GRD には、NF1-GRD type1 と GRD の中央部に 21 アミノ酸残基をコードする 63bp の塩基配列の挿入 (exon23a) を含む alternative splicing form である NF1-GRD type2 が存在し、NF1-GRD type1 は、type2 と比較して高い Ras-GAP 活性を有することが知られている。このスプライス変異体である NF1-GRD type2 を細胞内導入したところ、NF1 siRNA により誘導されたコフィリンのリン酸化および形態変化は完全に抑制された。

一方で、NF1-GRD type1 の導入は、効果は認められなかった(図 6-1)。これらの所見より、NF1 依存的 Rho シグナル経路の制御には、NF1-RasGAP 機能に加えて他に未知の NF1-GRD type2 の機能が必要と考えられた。更に我々は、NF1 タンパク発現抑制細胞に観察された、マトリゲルマトリックス上における、亢進した運動および浸潤能に対する NF1-GRD の抑制効果を検討した。NF1-GRD type2 の細胞内導入は、NF1 siRNA により誘導された巨大な腫瘍塊の形成を抑制し、小さな球状の腫瘍塊となり、その総コロニー数は増加した(図 6-2)。また、NF1-GRD type1 の細胞内導入も同様に、部分的にはあるが巨大な腫瘍塊の形成を抑制したものの、不整な形態までは完全に抑制することは出来なかった(図 6-2)。これらの結果から、NF1-GRD 特に、NF1-GRD type2 がアクチン細胞骨格変化を通じた細胞運動の制御に必要であることが示唆された。

## 7 ニューロファイブロミン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がわかった。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、細胞内ニューロファイブロミン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。

#### 8 ニューロファイブロミンの細胞内結合タンパク質の同定と機能制御解析

細胞内ニューロファイブロミン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ニューロファイブロミンを、又、ニューロファイブロミン抗体を用いて 14-3-3 を検出できること、14-3-3 はニューロファイブロミンの 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。さらに、NF1 結合蛋白質群中で neuron の axon 形成に関わる collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) と tumbulin との interaction に注目したところ、これらの分子は PC12 細胞の NGF 刺激後、NF1 蛋白質を介してリン酸化を相互制御することによって neurite の形成と伸展に関わっていることが NF1 ノックダウン細胞にて証明された。

#### 9. ヒト培養細胞におけるマーリンの発現抑制と過剰発現の影響

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。ヒトグリオーマ細胞、および HeLa 細胞を用いて NF2siRNA によるマーリンノックダウン細胞の経時的な形態変化を観察したところ、マーリンの発現は siRNA 導入後 24 時間で減少し、48 時間で完璧に消失した。ニューロファイブロミンと同様、マーリンノックダウンにおいても、細胞運動能、細胞接着能、骨格系の異常が認められ、細胞間の凝集抑制とスパースな細胞の拡散が観察された。特徴として多数の filopodia を有する fibroblast 様形状に変化し、細胞の接着性が減

少している所見が得られた。この細胞の可溶化蛋白質と NF2 SiRNA 非導入細胞のそのの蛋白質プロファイルと比較するため、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。またこれと平行して、GFP-NF2 プラスミドの導入を行い、その細胞内局在と形態変化を観察したところ、グリオーマ細胞において細胞の接着性が上昇していることが観察された。また、マーリンの核外輸送シグナルの阻害剤(LMB)を導入したところ、グリオーマ細胞においても HeLa 細胞においても、マーリン分子の核内蓄積が確認された。通常、マーリンは細胞膜、および細胞質に発現が認められるが LMB の作用によって、核内に蓄積すると同時に、細胞膜の接着性が減少することが判明し、この現象は NF2 ノックダウン細胞がスパーズな拡散現象を示す事と関連性があると考えられた。このことから、マーリンは細胞膜直下にて細胞骨格系の制御をおこなうことによって、細胞の接着性と運動能を制御していることが考えられた。

#### 10. マーリン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 LC-ショットガン法によって解析し、DNA 修復分子群、アポトーシス関連分子群、細胞骨格系・細胞接着系制御分子群、Neuron Regulators、細胞周期関連分子群を含む約 25 種類の NF2 結合蛋白質群を同定した。これらの相互作用点のほとんどがマーリン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 はマーリンの 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 にて過剰発現したマーリンは、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マーリン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、マーリン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。その他、細胞骨格系、細胞膜系の NF2 結合蛋白質の相互制御に関して、現在解析を行っている。

## D. 考察

### 1. ニューロフィブロミンによる細胞骨格制御

これまで、ニューロフィブロミンは、アクチン細胞骨格制御に関与しているとの報告がいくつか

示されているが、その生物学的意義や、関連するシグナル経路の詳細についてはまだはっきりと解明されていない。我々は、本研究でニューロフィブロミンの喪失は、Rho-ROCK-LIMK2-cofilin シグナル経路を通じて、アクチン細胞骨格制御に影響を与え、マトリゲルマトリックス上における細胞運動・浸潤能・細胞間接着の促進をさせることにより、結果として巨大な細胞塊の形成を誘導するという所見を提示した。この我々の示した印象的な表現型は、NF1 患者に特徴とされる多発性神経線維種の形成過程と非常に類似しているように思われた。神経線維種は、過剰に蓄積した細胞外マトリックスとシュワン細胞、線維芽細胞、内皮細胞そして肥満細胞のような様々な種類の細胞が凝集した細胞塊の形成を特徴としている。また、マウスモデルを用いた近年の研究によると、神経線維種形成の過程において、NF1-/-シュワン細胞は、KitL のような走化性因子を分泌し炎症性細胞を腫瘍微小環境 (tumor microenvironment) 内に誘導させ細胞を集積させるという。我々の所見を合わせ考えると、走化性因子の発現・分泌だけでなく NF1 タンパク発現抑制細胞に見られたような運動能の亢進もまた、細胞凝集塊を形成するのに大きく貢献していたのではないかとと思われる。すなわち、運動能の亢進した細胞は、マトリックス内を活発に移動することにより様々な細胞と遭遇し接触する機会が増え、そこに走化性因子の効果が加わりより効率的に細胞が凝集していくのではないかと考えられた。

## 2. コフィリンの不活性化と細胞運動との関連性について

細胞運動には、以下のような過程の協調が必要と考えられている。

1. Membrane protrusion of the leading edge
2. Adhesion to the substratum
3. Retraction of the trailing end
4. Detachment from the substratum

これらの過程すべてにおいて、アクチン細胞骨格のリモデリングを伴ったダイナミックな細胞形態変化を必要とすることがよく知られており、特に、コフィリンは、アクチンフィラメントを切断・脱重合し、アクチンフィラメントのターンオーバーを促進させることにより、このような細胞運動の様々な過程に大きく関与・貢献しているという。更に以前の報告によると、コフィリンは、THP-1 monocytic cell においては Membrane protrusion を、また、primary monocyte においては tail retraction をいずれも RhoA-ROCK シグナル経路を通じて制御しているという。これより、我々は、NF1 タンパク発現抑制細胞においても同様に、RhoA-ROCK-LIMK2 シグナル経路の活性化を通じたコフィリン活性の制御によって、巧妙あるいは効率的に Membrane protrusion や tail retraction が促進され、細胞運動の亢進が誘導されたのではないかと考える。ちなみに、コフィリンのリン酸化は、LIMK によるリン酸化によってのみでなく、slingshot のようなコフィリンフォスファターゼの制御異常によっても生じる可能性を念頭に置く必要がある。それ故、コフィリンフォスファターゼの制御におけるニューロフィブロミンの関与についても今後、明らかにする必要があると思われる。

## 3. RhoA-ROCK-LIMK2 シグナル経路と細胞運動との関連性について

Rho GTPase は、細胞運動を行うために要する細胞形態変化や接着の制御において中心的な役割

を担っている。LIM キナーゼ 1 および 2 の活性は、異なる Rho family GTPase により制御されており、Cdc42/Rac-Pak1-LIMK1, Rho-ROCK-LIMK2 および Cdc42-MRCK $\alpha$ -LIMKs のような異なる Rho family GTPase に関連したシグナル経路により活性化され、コフィリン依存的なアクチンダイナミクスの制御に特異な役割を担っていることが知られている。したがって、各シグナル経路により活性化された LIM キナーゼは、様々な状況・場所で異なる目的を持ちコフィリン依存的なアクチンダイナミクスの制御を行っているものと考えられる。我々の所見では、ニューロフィロミンの発現抑制により LIM キナーゼ 2 が活性化され、コフィリンの不活性化に基づくアクチンストレスファイバーと細胞運動を促進させた。近年、LIM キナーゼ 2 が細胞運動を制御しているという報告もまたいくつかなされている。Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、TGF- $\beta$  type1 receptor-Rho-ROCK-LIMK2-cofilin シグナル経路を通じてアクチン細胞骨格制御を促進するという。また、転移性ヒト線維肉腫細胞 (HT1080 細胞) において hammerhead ribozyme による LIMK2 の抑制は、細胞の増殖能や生存能に影響を与えることなく、それらの細胞の運動能や過剰なコロニー形成能を制限するという。このように、LIM キナーゼは、運動している細胞において異なる Rho family GTPase による時間的・空間的制御のもとコフィリンを不活性化することにより、アクチンダイナミクスに重要な役割を担っているのではないかと考えられた。細胞は、細胞の leading edge と rear edge におけるアクチンダイナミクスがアンバランスになった場合に過度の浸潤・運動能を獲得するのかもしれない。そして、LIM キナーゼによるコフィリン活性の不均衡もまた、偶発的な細胞浸潤あるいは無動

状態を生じさせるのかもしれない。しかしながら、ADF/cofilin 活性の制御異常がヒトの癌の病因という直接的な報告はないが、コフィリンタンパクの発現異常は、いくつかの癌組織で示されている。我々の所見は、コフィリン活性の制御異常は、腫瘍細胞の運動能や浸潤能に関与しているのではないかという仮説をサポートできるのではないだろうか？

## 5. Ras 活性の関連性について

NF1-GRD は、Ras の negative regulator として機能することが知られている。それ故、我々は、NF1 siRNA により誘導された効果が Ras 活性の異常に関与しているかどうか検討したところ、Ras のドミナントネガティブ体の導入によりコフィリンのリン酸化および過剰なアクチンストレスファイバーを部分的ではあるが抑制した。これは、Ras の活性化が、NF1 依存的 Rho シグナル経路の活性化にいくらか関与しているということを示唆していると思われた。したがって、我々は、Ras のどのような下流経路 (Ras-MAPK, Ras-PI3K, Ras-RalGEF pathway) が関与しているのかどうかを更に検討した。しかしながら、NF1 タンパク発現抑制細胞は、恒常的な MAPK および PI3K シグナル経路の活性上昇を認めていたにもかかわらず、MAPK および PI3K 阻害剤による処置は効果なく、NF1 siRNA により誘導された効果を抑制することは出来なかった。また、RalA siRNA の導入もまた、効果は認められなかった。これらの結果から、NF1 siRNA により誘導された効果に対して Ras 活性は必要だが、Ras の主要な下流シグナル経路は関与していないということが示された。NF1 タンパク発現抑制細胞は、未知の Ras の下流シグナル経路の活性化を通じて、コフィリン活性を制御してい

るのかもしれない。

## 6. NF1-GRD による細胞運動の制御について

NF1 タンパク発現抑制細胞は、マトリゲルマトリックス上において過剰に亢進した運動能を獲得し、それにより活発に動き回り、近接した細胞と接触する機会が増加し haptotaxis のサポートのもと巨大な島状の腫瘍塊を形成するに至った。このような特徴的な表現型は NF1-GRD の導入により抑制された。それゆえ、NF1-GRD は、細胞の浸潤・運動能を抑制するような重要な機能を有しているのではないかと考えられた。NF1-GRD type2 の導入は、NF1 タンパクの発現抑制によって誘導された巨大な島状の腫瘍塊の形成を概ね抑制することが出来た。一方で、NF1-GRD type1 の導入もまた、不整な形態は残存したものの部分的に抑制した。NF1-GRD type1 は、type2 と比較して高い Ras-GAP 活性を有することが知られていることから、NF1-GRD type2 は、Ras-GAP 機能だけでなく他の未知の機能も有するのではないかと考えられた。その未知の機能が、NF1 依存的 Rho シグナル経路の制御を行っているのかもしれない。近年、ニューロフィブロミンは、その GRD と C 末端側でシンデカン syndecan と結合し、アクソンやシナプスにおいて共局在することが報告された。シンデカンは、ラミニンやフィブロネクチンのような細胞外マトリックスタンパクやヘパリンに結合し、細胞内へシグナルを伝達することにより cell-matrix adhesion, cell motility, focal adhesion assembly そして morphogenesis などの制御に関与している膜貫通型プロテオグリカンである。現在のところ、このニューロフィブロミンのシンデカンとの結合の生物学的意義はまだ明らかになっていないが、NF1-GAP ドメインは触媒活性の他に

binding motif としての新奇の機能を有しているのではないかと考えられる。したがって、ニューロフィブロミンの発現抑制によって誘導されたアクチン細胞骨格変化は、Ras に関連したシグナルによってだけでなく、細胞膜レセプターを通じた直接的なシグナル経路という、もう一つの作用が加わって生じたのかもしれない。

## 7. マーリン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、このシステムにマーリンを過剰発現したところ、CD44ICD による転写活性がマーリン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。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。マーリン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検討を加える必要がある。

## E. 結論

本研究で、NF1 原因遺伝子産物ニューロフィブロミンはこれまでよく知られていた細胞増殖の制御だけでなく、Rho-ROCK-LIMK2-cofilin シグナル経路を通じたアクチン細胞骨格および細胞運動の制御においても重要な役割を担っているという所見を提示した。多発性神経線維腫形成や学習障害といった NF1 の多彩な症状の発症は、この我々の示した新奇のシグナル経路の制御異常により部分的に説明が出来るかもしれない。また、NF2 原因遺伝子産物マーリンにおいては、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 に関してマーリン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。ニューロフィブロミンやマーリン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シグナル分子群が異常な制御を受けることが明らかなことから、プロテオミクスなどの手法によって、これらに関わる共通の重要なシグナル分子や、リン酸化などの翻訳後修飾反応の詳細を明らかにし、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と考えられる。今後、NF の原因遺伝子産物ニューロフィブロミンおよびマーリンの細胞内における機能をさらに詳細に明らかにすることによって、神経線維腫症の病態の治療と発症予防薬等の開発に繋げることでできる基礎情報を蓄積する事が重要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ozawa T, Araki N, Yunoue S, Tokuo H, Feng L, Patrakitkomjorn S, Hara T, Matsumoto K, Fujii K and Saya H: Neurofibromin, neurofibromatosis type 1 gene product, plays a role in cell motility by regulating the actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. *J Biol Chem*, 280: 39524-39533, 2005

2) Saya H. Molecular mechanisms of brain tumor invasion], Nippon Rinsho. 2005 Sep;63 Suppl 9:61-7.

## 2. 学会発表

1) 第2回 公開シンポジウム「遺伝子～プロテオミクス～バイオインフォマティクス」(平成17年4月1日熊本) 2005

荒木令江, 佐谷秀行

熊本大学プロテオミクスコアシステムの構築と、それによる細胞内シグナルネットワークの解析”

2) 第55回 日本電気泳動学会シンポジウム(東京17年5月24日) 2005

荒木令江, 佐谷秀行

脳のプロテオミクスで見えてくる新たなシグナル伝達経路 プロテオミクス10年の奇跡と進路～ここまで来た疾患プロテオミクス研究～

3) 第3回 ケモゲノミクスシンポジウム(京都17年5月25日) 2005

京都大学 COE シンポジウム

荒木令江, 佐谷秀行

病態プロテオミクスによる特異的細胞内シグナル解析と創薬の可能性

4) 第5回日本蛋白質科学会年会(平成17年6月30-2日福岡) 2005

プロテオミクス統合データマイニングによる細胞内シグナル解析

荒木令江, 長経子, 青木雅史, 森川崇, パトラキットコムジョーン シリボン, 戸田年総, 佐藤陽美, 荒木朋洋, 佐谷秀行

5) 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会(JHUP0)

(平成17年8月1日横浜)

Proteomic differential display による脳腫瘍の抗がん剤感受性に関連する分子群の解析  
長 経子, 青木 雅史, 森川 崇, 中村 英夫, 倉津 純一, 戸田 年総, 三池 浩一郎, 山村 研一, 佐藤 陽美, 佐谷 秀行, 荒木 令江

6) 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会(JHUP0)  
(平成17年8月1日横浜)

iTRAQ 法を用いたがん細胞内タンパク質の高感度 nanoLC-MS 解析法の確立 Proteomic differential analysis of tumor cells by the iTRAQ method using highly sensitive nanoLC-MS

青木雅史, 南部健, 豊留浩, 長経子, 森川崇, 山村研一, 佐谷秀行, 荒木令江

7) 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会(JHUP0)  
(平成17年8月1日横浜)

KeyMolnet による脳神経系組織細胞内 p53 特異的アポトーシス機構の解析 Mechanism analysis of p53 dependent apoptosis in mouse brain using KeyMolnet

佐藤陽美, 難波剛志, 小関洋平, 板井昭子, 青木雅史, Ken Parker, 福永浩司, 荒木令江

8) 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会(JHUP0)  
(平成17年8月1日横浜) ワークショップ

荒木 令江, 青木 雅史, 長 経子, 森川 崇, 南部健, 豊留浩, パトラキットコムジョーン・シリボン, 小澤達也, 佐谷 秀行

プロテオミクスによる脳腫瘍特異的細胞内シグナル解析

9) 第64回日本癌学会学術総会(2005/09/14-16 札幌) ワークショップ

森川崇, 長経子, 青木雅史, Siriporn Patrakitkomjorn, 中村英夫, 倉津純一, 森

安眞津子、佐谷秀行、荒木令江

Natural protein chip を用いた脳腫瘍診断法の開発

- 10) 第 64 回日本癌学会学術総会 (2005/09/14-16 札幌) ワークショップ

小澤達也、荒木令江、湯之上俊二、徳王 宏、馮 立平、藤井清孝、佐谷秀行

神経線維腫症 1 型遺伝子産物ニューロフィブロミン低下によるマトリクス内細胞運動及び細胞凝集の亢進

- 11) 第 78 回日本生化学会大会 ((平成 17 年 10 月 19-22 日神戸)

NF1 癌抑制遺伝子産物 neurofibromin とその結合タンパク質群による神経系細胞の制御

NF1 tumor suppressor gene product (neurofibromin) and its associating proteins regulate the neuronal cellular differentiation.

Siriporn Patrakitkomjorn, Tatsuya Ozawa, Shunji Yunoue, Liping Feng, Kozo Kaibuchi, Hideyuki Saya, and Norie Araki

- 12) 第 78 回日本生化学会大会 (平成 17 年 10 月 19-22 日神戸)

青木雅史、南部健、豊留裕司、長経子、森川崇、山村研一、佐谷秀行、荒木令江

Proteomic differential analysis of tumor cells by the iTRAQ method using highly sensitive nanoLC-MAS

- 13) 平成 17 年度厚生労働省「神経皮膚症候群に関する調査研究班」班会議 2005/12/16 福岡

小澤達也、荒木令江、パトラキットコムジョン・シリポン、藤井清孝、佐谷秀行：神経線維腫症 1 型遺伝子産物ニューロフィブ

ロミン低下によるマトリクス内細胞運動及び細胞凝集の亢進

- 14) 平成 17 年度厚生労働省「神経皮膚症候群に関する調査研究班」班会議 2005/12/16 福岡

荒木令江、Siriporn Patrakitkomjorn、青木雅史、

小澤達也、長経子、森川崇、佐谷秀行

病態プロテオミクスによる NF1、NF2 蛋白質の機能解析

- 15) The 31st Annual Meeting of Korean Cancer Association “ Cancer Research and Treatment” . 06/09/2005-06/10/2005, Hotel Lotte, Seoul, Korea

Saya H: New concept and dynamic analysis of anti-cancer therapy.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

現在、申請中。

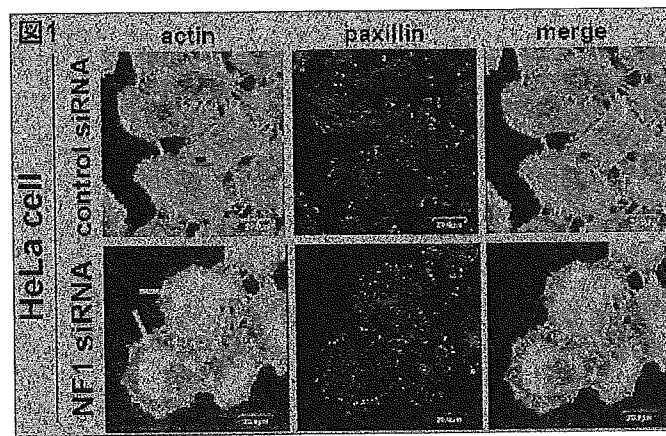


図 1. ヒト培養細胞におけるニューロフィブロミン発現抑制の影響

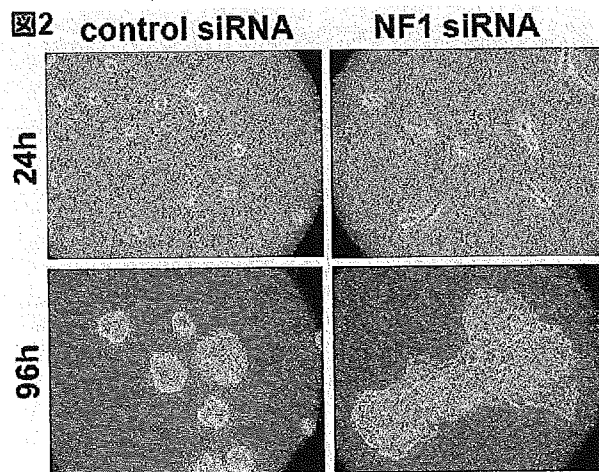
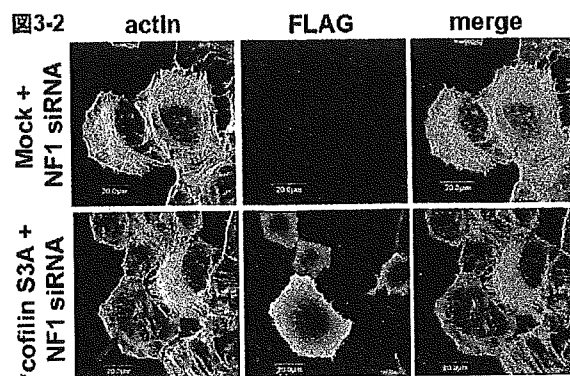
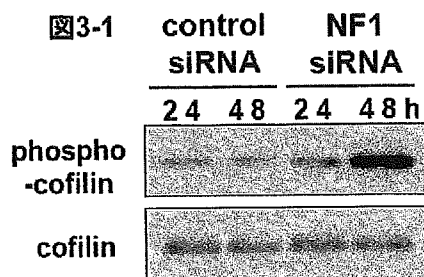


図 2. 細胞外マトリックス内での細胞運動における NF1 siRNA の効果・影響



\*cofilin S3A: constitutively active mutant

図 3. NF1 siRNA により誘導された細胞形態変化とコフィリン活性との関連性の検討