

図 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-LIMK シグナル経路との関連性の検討

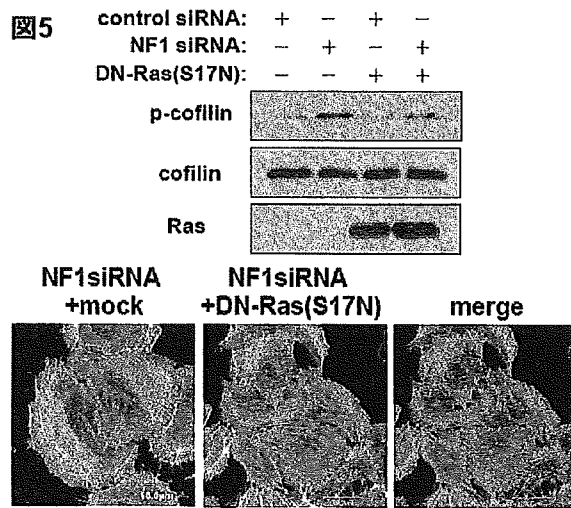


図 5. NF1 依存的 Rho シグナル経路と Ras シグナル経路との関連性の検討

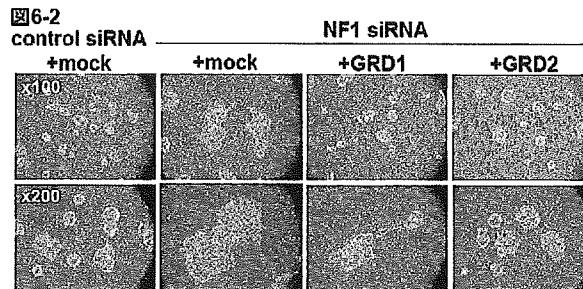
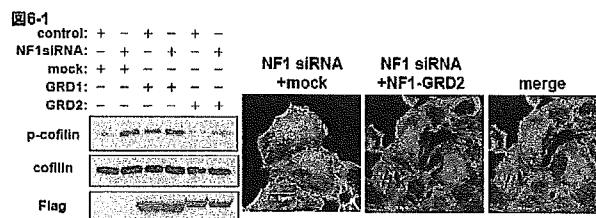


図 6. NF1 siRNA により誘導された効果と NF1-RasGAP 機能との関連性の検討

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

Malignant triton tumor 細胞への nerve growth factor の影響

分担研究者 大塚 藤 男 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
病態制御医学専攻皮膚病態学教授

**研究要旨**

Malignant triton tumor (MTT) は neurofibromatosis の患者に生じる malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) のうち横紋筋肉腫への分化を示す細胞が混じる腫瘍を呼称する。MPNST は切除を含む治療後の再発率 60~70%、転移率が約 50%と予後不良の動態を示す腫瘍であるが、MTT はさらに予後が悪く 5 年生存率も 3~10%と MPNST の 40~60%に比較して低いことが報告されている。その原因は横紋筋肉腫様細胞の混在に由来する可能性が高いが、その細胞が MPNST 細胞と起源を同じくするか、別の progenitor cell から誘導されて出現するかは解明されていない。横紋筋肉腫様細胞と他の構成細胞の性状は形態からの鑑別が難しく、悪性動態の違いも全く理解されていない。MPNST 細胞を用いた in vitro での研究は少数の報告があるが、極めて稀な腫瘍である MTT は細胞の in vitro での培養自体が報告されていないため、今回得られた培養細胞を用いて腫瘍の進展を担う増殖能・浸潤能につき、様々なサイトカインのうち nerve growth factor (NGF) による MTT 細胞への影響につき報告する。

**A. 研究目的**

MTT の予後に影響を与える可能性のある因子を in vitro において検討することを目的とした。以前 insulin-like growth factor-I (IGF-I) が integrin  $\alpha 3$  subunit の誘導を介して MTT 細胞の細胞外基質浸潤を強めることを報告したが、今回は神経系細胞の栄養因子である NGF およびその family の brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、nerotrophin のうち、末梢神経

系での影響が最も大きい NGF に焦点を当て、MTT 細胞への増殖能、浸潤能への影響につき検討した。

**B. 研究方法**

MTT 細胞、dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) 細胞  
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 含有

RPMI1640 で 2 時間 37℃ 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。

#### 細胞染色

細胞をスライドガラスに乗せ 95%エタノールで固定。0.3% 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 3 回洗浄し、S-100、desmin、NSE などの標的抗原に対する 1 次抗体を用い ABC キットにて反応。酵素基質には diaminobenzidine (DAB) を用いて染色。

#### Cell cycle 解析

NGF 刺激および無刺激の細胞を PBS で洗浄した後氷冷した 70%エタノールで固定し 100 U/ml RNaseA で 20 分間 37°C で処理。50 mg/ml の propidium iodide 含有培養液で 10 分間室温で培養し、FACScan で Modifit software を用いて細胞周期を解析。

#### MTT colorimetric bioassay

メラノーマ細胞を NGF の刺激下および無刺激下で 24-well 培養プレートにて培養し最後の 6 時間は 5 mg/ml の MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] を加えての培養とし、さらに 500  $\mu$ l の 100% dimethyl sulfoxide を加え 10 分間培養の後、Microplate Reader にて 570 nm で吸光度を測定。

#### Flow cytometry 解析

5% FBS RPMI1640 で安定した培養状態にある

$1 \times 10^6$  の細胞を RPMI1640 で 2 回洗浄し、目的とする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。RPMI1640 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 FACScan で測定する。

#### Cell invasion assay

8- $\mu$ m のポアサイズを有する 6.5mm 径の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用いた。Matrigel を 50mg 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 時間放置ゲルの固形化を確認後、 $1 \times 10^4$  の細胞を加え、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 時間培養し、培養最後にゲル上部の非接着細胞を綿棒で拭き取り下部表面に付着する浸潤細胞をメタノールで固定した後ヘマトキシリン染色し細胞数を計測。

#### Immunoprecipitation および immunoblotting

細胞を NP-40 および protease inhibitors 含有 single detergent lysis buffer により融解し、抗体で 2 時間室温で反応。抗原抗体複合体を回収し 2 次抗体付着 protein A-Sepharose beads で反応後、SDS PAGE にかき nitrocellulose membrane へ。Immunoblotting は ECL detection system で検出し、対応する非リン酸化物は strip 後に対応抗体で reprobe し ECL で再検出。

## C 研究結果

### 1. MTT 細胞における TrkA (高親和性 NGF 受容体) の発現

TrkA は MTT 細胞の control として同時に検索した DFSP 細胞での発現を認めず、MTT 細胞には強い発現を認めた。また、TrkA の control として同時に検索した IGF-I 受容体の発現はどちらにも認めた (図 1)。

### 2. MTT 細胞の NGF 濃度依存的増殖

MTT 細胞を NGF 添加培地にて培養したところ、7 日間培養で NGF は濃度依存性に MTT 細胞の増殖能を強め 10ng/ml 以上で有意な ( $p < 0.01$ ) 作用を認めた。一方、IGF-I、basic FGF 添加では有意な増殖能の増強は認められなかった (図 2)。

### 3. NGF の 7 日刺激と無刺激での MTT 細胞における デスミン陽性細胞比率

NGF 刺激により増殖した subpopulation を検討したが、全細胞数に対するデスミン陽性細胞数の比率に有意差を認めなかった。さらに刺激 2 週間後においても有意差はなく、細胞の形態にも著変を認めなかった (図 3)。

### 4. 細胞外基質接着能への NGF の影響

MTT 細胞の type I collagen への接着能は NGF によっては変化せず、同時に検討した IGF-I によって増強した ( $* p < 0.001$ )。Type III collagen、fibronectin、laminin への接着に関しても同様の結果が得られ (data not shown)、FAK のリン酸化も NGF 刺激では明らかな誘導がみられなかった。

### 5. 各インテグリン分子の発現レベルへの影響

10ng/ml の NGF もしくは IGF-I で 24 時間刺激した MTT 細胞表面上の各インテグリン分子の発現を flow cytometry 解析で検討した。IGF-I が MTT 細胞の  $\alpha 3$  インテグリン分子を特異的に増強 ( $p < 0.05$ ) したのに対し、NGF ではいかなる濃度、刺激時間においてもインテグリン分子発現への影響を認めなかった。

### 6. 細胞外基質への浸潤能への影響

MTT 細胞の Matrigel 浸潤能に及ぼす NGF あるいは IGF-I の効果を invasion assay にて検討した。ヒストグラムは異なる 3 回の実験の平均値を表す。接着能、インテグリン分子への影響所見に一致して NGF は MTT 細胞の浸潤能に影響せず、positive control として同時施行した IGF-I は有意に浸潤活性を増強した ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.005$ )。この IGF-I の効果は特異的と考えられ抗 IGF-I-R 中和抗体により有意に阻害された。また、浸潤した MTT 細胞におけるデスミン陽性細胞の比率も非浸潤細胞と比較して有意差を認めなかった。

## D. 考按

NGF は様々な細胞の増殖、分化、生存に関与し、特に神経系の正常細胞および悪性腫瘍細胞では増殖に効果を示さないか抑制的に働く報告が多く、もっぱら分化の誘導、生存に役割を果たすとされる。一方では乳癌、膀胱癌、筋細胞の増殖を促進する報告があり、rhabdomyoblastic change を有する細胞が混在する MTT での NGF の効果に興味があった。

本来対照とすべき MPNST 細胞株がなかったため増殖能の比較検討はできなかったが、NGF は MTT

細胞の増殖を促したものの、rhabdomyoblastic cell の増殖を特異的に誘導した所見は得られず、分化を示唆する形態変化も見られなかった。

真皮の主要構成物である type I collagen および type III collagen など細胞外基質への MTT 細胞の接着・浸潤能には NGF は貢献せず、転移の面では IGF-I など他のサイトカインの影響を受ける可能性が示唆された。MTT の不良な予後には多因子が関与していそうだが、その効果を受ける構成細胞の多様性に由来するか否かを解明することが今後の課題と思われる。

## G. 研究発表

学会発表：

1) Malignant triton tumor 細胞への nerve growth factor の影響

高橋毅法、藤沢康弘、中村泰大、川内康弘、大塚藤男（筑波大）

第 69 回日本皮膚科学会東部支部総会、岩手、2005 年 9 月 24 日

論文発表：

1) 藤沢康弘、高橋毅法、梅林芳弘、大塚藤男：

神経線維腫症 1 型に生じた悪性トリトン腫瘍.  
皮膚臨床 47 (7) : 1003-1007, 2005.

2) 大塚藤男：神経線維腫症 1 型. 日本皮膚科学会雑誌 115(6) : 843-847, 2005.

著書：

1) 大塚藤男：Recklinghausen 病. 皮膚疾患最新の治療 2005-2006 (瀧川雅浩、渡辺晋一編)、南江堂、東京、2005 年、p. 218.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

Malignant peripheral nerve sheath tumor における stat3 の関与

研究協力者 占 部 和 敬 九州大学大学院医学研究院皮膚科助教授

**研究要旨**

Stat(signal transducer and activator of transcription)3 は多種のサイトカインや増殖因子に反応して Jak(Janus kinases)によるチロシンリン酸化により活性化される細胞質内転写因子である。リン酸化により癌遺伝子として無秩序の細胞増殖引き起こすことが知られており、乳癌、白血病、肺、前立腺癌などの癌由来の細胞株および組織にしばしばリン酸化された活性化 stat3 (p-stat3) の発現がみられる。そこで、今回 malignant peripheral nerve sheath tumor (TPNST) において p-stat3 の発現が見られるかどうか検討した。神経線維腫症の患者に発症した TPNST において p-stat3, cyclinD1, p-ERK の発現がみられたが、p-Akt の発現はみられなかった。しかしながら、神経線維腫症のない TPNST, schwannoma においてその発現はみられなかった。我々は現在 p-stat3 のインヒビッターによる腫瘍の治療をめざして研究を始めているが、MPNST もその対象腫瘍になることが今回の研究であきらかとなった。

**A. 研究目的**

malignant peripheral nerve sheath tumor (TPNST) は、悪性神経線維肉腫とも呼ばれ、化学療法に抵抗性で治療に難渋する腫瘍であり、有効な治療法が望まれる。最近、我々は、Stat(signal transducer and activator of transcription)3 に注目し、このインヒビッターによる腫瘍の治療法の開発のために研究を行なっている。Stat3 は多種のサイトカインや増殖因子に反応して Jak(Janus kinases)によるチロシンリン酸化により活性化される細胞質内転写因子である。リン酸化により癌遺伝子として無秩序の細胞増殖引き起

こすことが知られており、乳癌、白血病、肺、前立腺癌などの癌由来の細胞株および組織にしばしばリン酸化された活性化 stat3 (p-stat3) の発現がみられる。そこで、今回 malignant peripheral nerve sheath tumor (TPNST) において p-stat3 の発現が見られるかどうか検討した。同時に cyclinD1, p-ERK, p-Akt の発現も調べた。

**B. 方法**

神経線維腫症の患者より発症した TPNST と神経線維腫症のない症例それぞれ 1 例を対象とした。

コントロールとして schwannoma 4 例も検討した。

ABC 法による免疫組織化学染色を行なった。抗体は p-STAT3 (try705) (Cell signaling technology, Beverly, USA) p-ERK (E4) (Santa cruz biotechnology, inc) cyclin D1 (Novocastra, Newcastle, UK), p-Akt (ser473) (Cell Signaling Technology) を用いた。発色は 3,3'-diaminobenzidine (DAB) により行った。

### C. 研究結果

神経線維腫症の患者に発症した TPNST において p-stat3, cyclinD1, p-ERK の発現がみられたが、p-Akt の発現はみられなかった。しかしながら、神経線維腫症のない TPNST, schwannoma においてその発現はみられなかった。

### D. 考察、E. 結論

我々は皮膚悪性腫瘍において p-stat3 の発現を検討し、乳房外 Paget 病、悪性黒色腫、血管肉腫、隆起性皮膚線維肉腫においてその発現が増強していることを見出している。今回 TPNST においてその発現を検討した。その結果、神経線維腫症に生じた TPNST でのみ p-stat3 の発現増強がみられた。これが神経線維腫症合併例に共通に見られる現象なのかは症例の蓄積が必要である。また、この症例では p-stat3 の他、cyclinD1 と p-ERK の発現もみられた。cyclinD1 は細胞の cell cycle に関与する因子で stat3 の下流にあり、その発現増強は p-stat3 の直接作用と考えた。P-ERK を含む Ras/MER/ERK の発現増強は甲状腺癌、悪性黒色腫、白血病、肺癌などでみられることが報告されているが、神経線維腫症 I 型では neurofibromin の

異常によりこの系が活性化されていることが知られているので、このため p-ERK の発現が亢進していたと考えられる。P-ERK が P-stat3 の発現増加に関与しているかどうかは明らかではない。いずれにせよ、我々は現在 p-stat3 のインヒビッターによる腫瘍の治療をめざして研究を始めているが、MPNST もその対象腫瘍になることは今回の研究であきらかとなった。

### G. 研究発表

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

メラノサイトにおける cAMP シグナル/ $\beta$ -catenin 活性化経路の  
neurofibromin による制御

分担研究者 古村南夫 島根大学医学部皮膚科助教授

**研究要旨**

Neurofibromin は Ras-GAP 活性と細胞内 RAS シグナルだけでなく cAMP シグナルも制御することが最近明らかにされた。NF1 におけるカフェオレ斑の発症機序として、真皮線維芽細胞からの SCF、HGF によるメラニン産生刺激に加え、メラノサイトにおいても NF1 遺伝子産物の変異・欠失に由来するとされる細胞機能異常が報告されているが、RAS シグナルの異常のみが原因とする考えは疑問視されている。しかし、RAS 以外のシグナル伝達経路は明らかにされていない。今回、我々はメラノサイトにおける cAMP シグナルの抑制が、 $\beta$ -catenin 経路を活性化しさまざまな遺伝子発現に影響を及ぼすことを見出した。さらに、siRNA を用いた neurofibromin ノックダウンメラノサイトにおいても、このシグナル経路が同様に修飾される可能性が示唆された。cAMP シグナルや  $\beta$ -catenin 経路はメラノサイト特異的転写因子である Mitf の発現や活性の制御に関与する。さらに、 $\beta$ -catenin 誘導遺伝子の多くは細胞の増殖や分化にかかわるため、見出されたシグナル伝達経路が NF1 患者のメラノサイトのメラニン産生や表皮内での細胞動態の変化に関与している可能性が考えられた。

河野邦江、松尾裕彰、森田栄伸

島根大学医学部皮膚科

れている。

NF1 患者表皮由来の培養メラノサイトを用いた研究で、NF1 遺伝子の変異がメラノサイト自身のメラニン生成にも影響を及ぼすことが示唆されている。しかし、健常人表皮由来のメラノサイトと比較して、RAS-GTP レベルおよび、RAS シグナルと密接に関連する細胞増殖率は NF1 患者由来のメラノサイトで変わらず、RAS 活性の上昇のメラニン生成への直接的な関与は疑問視されている。NF1

**A. 研究目的**

NF1 におけるカフェオレ斑の発症機序を示唆する所見として、病理組織学的に表皮メラノサイトの増加がみられ、皮疹部由来の真皮線維芽細胞の sSCF や HGF 分泌亢進が関与していることが報告さ



の遺伝子発現と蛋白レベルのターンオーバーは、メラノサイトを表皮細胞から選別し増殖させるための培養条件によっても大きく変化することから、患者由来の NF1 変異メラノサイトでの NF1 の発現低下に起因する細胞内シグナルの変化は明らかにされていない。

一方、LOH や NF1 gene alternative splicing (type1→2 shift) は NF1 患者メラノサイトでは確認されていないが、neurofibromin 自体は tyrosinase, DCT (TRP2) 等メラニン産生酵素のプロモーターを活性化するなど、メラノサイトの特異的遺伝子への neurofibromin の直接の関与も示唆されている<sup>1)</sup>。

今回、ヒト培養メラノサイトにおける neurofibromin の siRNA によるノックダウンを試み、RAS シグナル以外のシグナリング経路への影響について検討した。

## B. 研究方法

NF1 mRNA 特異的構造を持つヒト特異的 siRNA (シーケンスは熊本大学腫瘍医学分野、佐谷秀行教授の研究グループより提供) を合成し、QIAGEN 社の HiPerFect による細胞内導入を行うことによって、培養ヒトメラノサイトの NF1 mRNA ノックダウンを行った。コントロールとしてランダム配列のノンサイレンスシーケンス siRNA (QIAGEN) を使用した。

NF1 の遺伝子発現抑制はリアルタイム RT-PCR (ABI prism 7000) を用いて確認した。抗 neurofibromin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いたウェスタンブロット法を用いて蛋白レベルでもさらに定量的に確認した。

培養ヒトメラノサイトの細胞内 cAMP レベルは

cAMP EIA Kit (Cayman Chemical Company) を用いて測定した。Wnt 経路の活性化の指標としての LCF1 プロモーター活性は TOPFLASH ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより測定した。

Wnt- $\beta$  catenin 経路の下流で発現が調節される遺伝子として cyclinD1 および ITF-2 の発現レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。

## C. 研究結果

1. Off target effect を最小にして、特異的なノックダウン効果を確認するために、5nM の低濃度にて siRNA の細胞内導入を試みた。ランダム配列のコントロール siRNA と比較して、3種類の異なったシーケンスをもつ siRNA の導入後 48 時間で、いずれの配列でも有意な NF1 発現レベルの低下が、リアルタイム RT-PCR にて確認された。蛋白レベルではウェスタンブロット法による定量的解析にて neurofibromin の発現量の低下が確認された。
2. NF1 ノックダウンメラノサイトでは、細胞内 cAMP レベルの減少がみられた、 $\alpha$  MSH、あるいは adenylylcyclase の活性化剤である forskolin の添加後、細胞内 cAMP レベルは著明に上昇したが、コントロール細胞と比較して NF1 ノックダウン細胞では cAMP の増加が有意に抑制された。
3. TOPFLASH レポーターベクターをメラノサイトにトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイにて Wnt シグナルについて検討した。コントロールと比較してノックダウンメラノサイトではレポーター活性が上昇しており Wnt- $\beta$  catenin 経路の活性化が示唆された。
4. TOPFLASH レポーター活性を指標とした Wnt-

$\beta$ -catenin 経路の活性化は、メラノサイトの  $\alpha$ MSH による刺激により抑制されたため、cAMP を介するシグナリングの関与が示唆された。さらに、PKA 阻害剤の H89 を添加したところ、逆に活性の著明な上昇が認められたため、neurofibromin の低下による cAMP の低下が PKA 経路を抑制し Wnt- $\beta$ -catenin 経路を活性化する機序が考えられた。

5. Wnt- $\beta$ -catenin 経路による誘導遺伝子のうち、細胞周期関連蛋白の cyclinD1 と転写因子 ITF-2 について遺伝子レベルおよび蛋白レベルの発現をリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット法を用いて検討した。いずれの遺伝子も発現がノックダウン細胞において上昇していた。

#### D. 考察

NF1 遺伝子産物の neurofibromin の新しい機能として RAS シグナル制御以外に adenyly cyclase の活性制御が近年報告されている<sup>2)</sup>。

メラノサイトでは、MSH レセプターへの  $\alpha$ MSH の結合による adenyly cyclase の活性化は cAMP シグナルを刺激し、その下流でメラノサイト特異的転写因子である Mitf の発現やその他の細胞増殖シグナルなどを介して、メラニン生成機能や細胞の分化・増殖に大きな影響を与えている。

今回の我々の NF1 ノックダウンメラノサイトを用いた解析結果から、NF1 の発現低下が adenyly cyclase 活性を低下させ、cAMP シグナルを抑制する方向に働くことが示唆された。また、その下流で Wnt- $\beta$ -catenin 経路を活性化している可能性も考えられた。

メラノサイトの cAMP シグナルを定常レベル以下に抑制する蛋白として、ユーメラニンからフェオ

メラニン生成へのシフトを引き起こす agouti signal protein (ASP) がこれまでに見出されている。この蛋白は、MSH レセプターの inverse agonist であり、レセプターとの結合によって cAMP シグナルを抑制する<sup>3)</sup>が、NF1 の変異でも adenyly cyclase の活性が低下し同様に下流のシグナルの修飾が起きる可能性が考えられる。

我々は、ASP によるメラノサイトの遺伝子発現変化として、Wnt- $\beta$  catenin 経路を介した ITF-2 の発現亢進を以前報告した<sup>4)</sup> が、同様のシグナリングの修飾によると思われる結果が NF1 ノックダウンメラノサイトでも認められた。

今回の解析結果からは、NF1 変異による neurofibromin の発現低下は、むしろメラニン生成を抑制する方向のシグナルを活性化することが示唆されたが、このシグナルは一方で細胞増殖を促進させ分化を抑制することが予想される。

メラノサイト細胞内の NF1 変異による細胞増殖促進のシグナルと、真皮からの細胞増殖因子による刺激による細胞内シグナルとのクロストークによって、カフェオレ斑においてはメラノサイトがメラニン生成の亢進した状態でしかも細胞増殖が保たれているという仮説も考えられる。今後、更にこの点について解析を進める予定である。

#### 参考文献

- 1) Schepper SD, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert J-M. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an over view. *Pigment Cell Res* 18:13-24, 2004
- 2) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernardis A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-

stimulated adenylyl cyclase activity.

Nature Neurosci 5: 95-96, 2002

- 3) Furumura M, Sakai C, Abdel-Malek Z, Barsh GS, Hearing VJ. The interaction of agouti signal protein and melanocyte stimulating hormone to regulate melanin formation in mammals. Pigment Cell Res 9: 191-203, 1996
- 4) Furumura M, Potterf SB, Toyofuku K, Matsunaga J, Muller J, Hearing VJ. Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. J Biol Chem 276: 28147-54, 2001

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### 分担研究報告書

## 結節性硬化症の遺伝子変異と臨床症状の関係について

分担研究者 大野 耕 策 鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経小児科教授

### 研究要旨

結節性硬化症原因遺伝子産物ハマルチン、ツベリンは細胞内で複合体をつくり下流の Rheb-mTOR シグナルを調節している。結節性硬化症と神経分化異常の分子機構を解明する目的で、培養神経細胞を用いた結節性硬化症原因遺伝子の機能解析を行った。ハマルチンは神経栄養因子受容体下流分子 NADE と結合することにより、神経細胞のアポトーシスに関与していた。一方、培養神経細胞 PC12 においてハマルチン、ツベリンともに細胞質に存在し共局在するが、神経栄養因子刺激による神経突起伸長に伴いハマルチンは突起の先端に強く局在移動を示したのに対し、ツベリンは細胞質に発現していた。また、神経突起末端において神経栄養因子受容体 p75 と低分子量 G 蛋白質 RhoA はハマルチンと共局在したが、ツベリンはしなかった。これらの結果は、神経分化過程におけるハマルチンとツベリンの新たな機能を示唆する。

### A. 研究目的

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis; TSC) は TSC1、TSC2 遺伝子のヘテロ接合体の消失により引き起こされる皮膚の白斑・顔面血管線維腫、脳皮質結節・上衣下結節、腎血管線維腫などを主症状とする。特に中枢神経症状が士官の重症度、死亡原因の主要因子である。また、TSC の患者は発達遅滞あるいは精神遅滞を呈する可能性が高い。最近の報告によると TSC 患者は 25%を自閉症を、40-50%は自閉症スペクトラム疾患の診断基準を満たしている (Curatolo P et al., 2004, Wiznitzer M 2004)。TSC2 変異をもつ患者の方が知的障害の頻度が高く、重傷で自閉的障害の合併が多いと言われている

(Langkau N et al., 2002, Levis JC et al., 2004)。脳結節においては遺伝子産物ハマルチン、ツベリンの発現が減少しており (Mizuguchi M et al., 2001)、また巨細胞性アストロサイトーマなどの分化の異常な細胞の出現が見られる (Crino BB et al., 1996)。

我々は TSC における神経分化異常の分子機構を明らかにする目的で、神経細胞におけるハマルチン、ツベリンの機能解析を行ってきた。これまで、ハマルチン結合蛋白質として NADE (p75 neurotrophin receptor-associated cell death executor) を同定し、TSC と神経栄養因子シグナルの関連性について検討を行ってきた。今回、我々

は神経細胞内におけるハマルチン、ツベリンの動態を検討することにより、神経分化過程における機能について検討した。

## B. 研究方法および結果

### 1. ハマルチン-NADE 相互作用とプロテアソーム

培養神経細胞 PC12 をプロテアソーム阻害剤 MG132 処理、未処理状態から抽出した蛋白質を抗 p75NTR 抗体と抗ハマルチン抗体で免疫沈降後、抗 p75NTR 抗体、抗 NADE 抗体及び抗ハマルチン抗体でウェスタンブロットを行った。NADE は MG132 処理により p75NTR と共免沈したが、ハマルチンとは MG132 の処理有無に関わらず共免沈した (図 1)。

### 2. PC12 細胞神経分化に伴うハマルチン、ツベリンの細胞内局在

ハマルチン、ツベリンは血清を含む通常増殖培養条件において PC12 細胞の細胞質に局在していた。一方、神経栄養因子 (Nerve Growth Factor; NGF) 添加による神経突起伸長に伴い、ハマルチンは細胞質と共に神経突起の先端にも局在したが、ツベリンは細胞質のみ局在した。また、神経突起末端には低分子量 G 蛋白質 RhoA が局在し、この RhoA は NGF 刺激前後で神経栄養因子受容体 p75NTR と共局在を示した (図 2)。

## C. 考察

神経栄養因子受容体 p75NTR は細胞質内領域に type2 cell death domain を持つ TNF (tumor necrosis factor) /NGF 受容体スーパーファミリーの一つである (Mukai J et al., 2000)。NGF により惹起される p75NTR シグナルは神経系細胞の生

存維持と共にアポトーシスを誘導する。NADE は p75NTR の細胞質内領域に結合し NGF 依存的にアポトーシスを誘導する。これまでの解析により我々は TSC 原因蛋白質ハマルチンと NADE の結合を明らかにしてきた (投稿準備中)。NADE は細胞死誘導機構を担う蛋白質であり、通常状態では培養神経細胞内での発現はプロテアソーム分解系により抗体検出以下に押さえられている。実際、PC12 細胞においてプロテアソーム阻害剤 MG132 を作用させた分画のみ p75NTR で共免沈してくる NADE が検出できる (図 1)。ところが、ハマルチンで共免沈する NADE は MG132 を作用させない分画にも検出できた。このことは、NADE がハマルチンと結合することによりプロテアソームによる分解から逃れていることを示唆する。また、このことは、TSC 病変部細胞においてハマルチン蛋白質の減少が NADE の発現低下を招き、神経細胞のアポトーシスを抑制している可能性を示唆する。

一方、Lamb らはハマルチンが血管内皮細胞内において ERM (ezrin-radixin-moesin)、Rho 蛋白質と結合し、細胞接着に関与していることを示した (Lamb RF et al., 2000)。Rho は細胞基質間接着、細胞移動、細胞質分裂などの分子スイッチとして働いているとともに、神経突起の退縮にも関わっている (Hall A, 2005)。培養 PC12 細胞の NGF 刺激による神経突起伸長に伴いハマルチン、p75NTR、RhoA 蛋白質が突起の先端に発現し、ツベリンとは異なる局在を示した (図 2)。我々のこれまでの解析よりアンチセンスオリゴ DNA を用いハマルチン蛋白質の発現を抑制した PC12 細胞で見られる神経突起異常が RhoA の発現により抑制されることや (未発表)、TSC 患者皮膚病変部細胞において高頻度に多核細胞が認められる (Toyoshima M et al., 1999) ことなどからも、TSC 細胞における Rho シ

グナル伝達の異常を示唆することができる。さらに、MDCK 細胞においてツベリンも RhoA の活性化に関与していることや (Astrindidis A, et al., 2002)、ツベリンが細胞内シグナル伝達アダプター分子である 14-3-3 と結合しリン酸化の調節に関わっていること (Li Y et al., 2002, Hengstchlager M et al., 2003)、また、その 14-3-3 が NADE と結合し p75NTR 下流の情報伝達に関わっている (Kimura M et al., 2001) など、ツベリン、ハマルチンを中心とした情報伝達経路は複雑に関連している。今後はこの PC12 細胞を用い、ハマルチン、ツベリンの欠失により引き起こされる神経分化とこれら関連分子の機能相関を明らかにすることにより、TSC 神経分化異常を検討して行く。

#### D. 結論

ハマルチンは NADE と結合することにより NGF 依存的な神経細胞アポトーシスの制御に関与する可能性が示唆された。また、ツベリン、ハマルチンは神経細胞分化過程においても、RhoA などの結合蛋白質とともに神経細胞機能維持に関与していることが分かった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 論文発表

##### 1. 論文発表

1. Maegaki Y, Kurozawa Y, Hanaki K, Ohno K. Risk Factors for Fatality and Neurological Sequelae after Status Epilepticus in

Children. *Neuropediatrics* 36:186-192, 2005

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

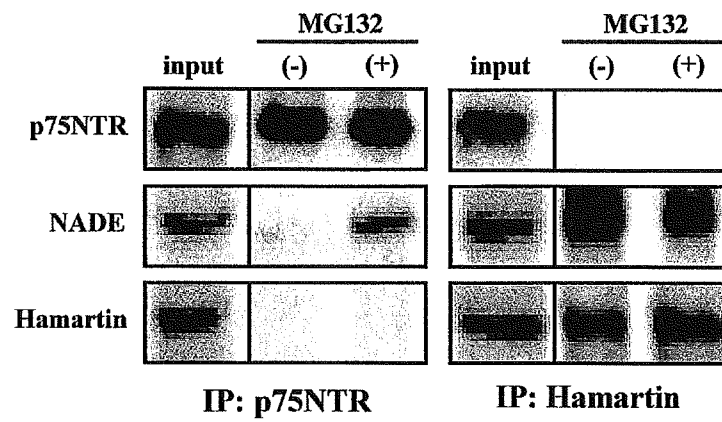


図 1 . PC12細胞におけるハマルチンとNADEの結合

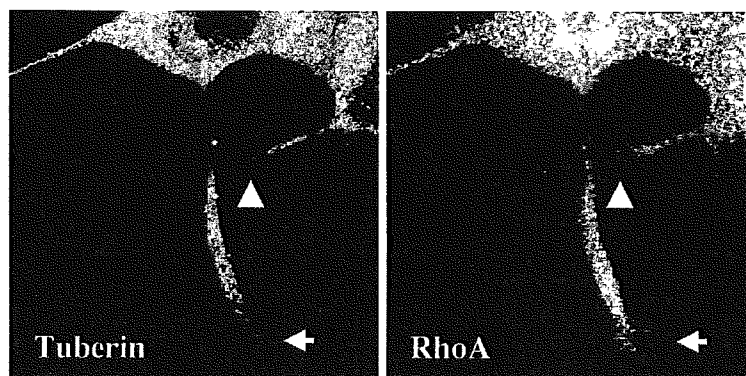


図 2 . 神経突起末端におけるTuberinとRhoAの発現

# 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・腎病変における tuberin の上・下流の信号伝達

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

結節性硬化症のモデル動物である Eker ラットの脳・腎病変における tuberin の上・下流の信号伝達を、リン酸化特異的抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。脳・腎の過誤組織・腫瘍のいずれにおいても、tuberin の上流にある Akt のリン酸化は見られなかった。tuberin 下流にある mTOR のリン酸化は腎細胞癌で見られたが、大脳皮質結節では認められなかった。いずれの病変においても著明な S6 リン酸化にもかかわらず、p70 S6 キナーゼ (p70S6K) リン酸化は認められず、S6 を活性化する別の経路の存在が示唆された。

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

小林敏之、樋野興夫

順天堂大学医学部第二病理学、  
癌研究所実験病理部

PI3K/Akt 経路の活性は negative feedback 機構により低下する可能性が指摘されている。いっぽう、脳の皮質結節（過誤組織）では second hit は無く、PI3K/Akt 経路の活性化により tuberin のリン酸化を介した恒常的不活性化が生じるとの仮説が提唱されている。

Eker ラットは *Tsc2* 機能喪失変異に起因する TSC モデル動物である。今回われわれは、in vivo でこれらの仮説があてはまるかどうかを検証する目的で、Eker ラットの脳・腎病変における Akt/Tuberin/ mTOR 活性の亢進・低下を、リン酸化蛋白特異的抗体を用いて免疫組織化学的に観察した。特に腫瘍と過誤組織の異同に注目し、両者の比較検討を行った。

#### A. 研究目的

結節性硬化症(TSC)の原因遺伝子 *TSC2* の蛋白産物 tuberin の上流には insulin/ PI3K/ Akt、下流には Rheb/ mTOR/ p70S6K/ S6 がある。従来の研究により、ヒト TSC の病変（腫瘍、過誤組織）では tuberin 機能低下のため mTOR 経路が異常に活性化し、S6 リン酸化が亢進することが示された。このうち腫瘍は two hit メカニズムにより生じ、



## B. 研究方法

2歳齢のEkerラット腎臓の腎細胞癌(悪性腫瘍)、大脳の皮質結節(過誤組織)と退形成性神経節膠腫(悪性腫瘍)をホルマリン固定し、パラフィン包埋標本とした。マイクロウェーブ照射による抗原賦活(90度、10分)を行った後、Akt(Ser473)、mTOR(Ser2448)、p70S6K(Thr389)、S6(Ser235/236)のリン酸化特異的抗体(Cell Signaling Technology社製)を一次抗体としてbiotin-streptavidin-peroxidase法による免疫染色を行った。

動物の取扱いは癌研究所の取扱い規約に則って行った。

## C. 研究結果

腎の悪性腫瘍(腎細胞癌)における各蛋白のリン酸化レベルを周囲の腎組織と比較すると、Aktのリン酸化は低下、mTORのリン酸化は亢進、p70S6Kのリン酸化は低下、S6のリン酸化は亢進していた。

脳の悪性腫瘍(退形成性神経節膠腫)において、Akt、mTOR、p70S6Kのリン酸化は一部の腫瘍細胞に限って認められ、他の大部分では陰性だった。S6のリン酸化は腫瘍全体で亢進していた。

脳の過誤組織(皮質結節)の巨大神経細胞ではAktリン酸化は正常神経細胞と同等、mTOR、p70S6Kのリン酸化は全く認められなかった。これは、腫瘍周囲の軟化巣で一部の反応性グリア細胞(アストロサイト)が強いAkt、p70S6Kのリン酸化を示した所見と対照的であった。

また、これらの全ての病変でS6リン酸化は著明に亢進していた。

## D. 考察

今回の研究結果では、脳の皮質結節におけるAktリン酸化は亢進しておらず、皮質結節で恒常的にAktが活性化しているとの仮説には合致しない所見であった。

また、Ekerラットの脳・腎病変では共通してS6が活性化しているが、その上流のmTOR、p70S6Kは、少なくとも病変の完成した段階では、必ずしも活性化していないことが判明した。ことにp70S6Kのリン酸化亢進は、反応性グリア細胞以外では全く認められなかった。したがってS6の上流にはmTOR、p70S6K以外の因子も介在した複雑な変化が生じていると考えられる。このことは、TSCに対する治療戦略を考慮する上で重要である。

## E. 結論

Ekerラットの脳・腎病変では共通してS6が活性化している。Tuberin上流のAkt活性亢進を示す所見はない。Tuberin下流のmTOR、p70S6Kも、少なくとも病変の完成した段階では、必ずしも活性化していない。S6の上流にはAkt/mTOR/p70S6K以外の流れを含む複数の経路があり、病変形成の各段階で相互に影響しながら、複雑に変動していることが推測される。

## 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. *Modern Pathology* 18: 179-188, 2005.
- 2) 水口 雅. 結節性硬化症. *Clinical Neuroscience* 23: 256-257, 2005.

表 免疫組織学的所見のまとめ

	P-Akt (Ser473)	P-mTOR (Ser2448)	P-p70S6K (Thr389)	P-S6 (Ser235/6)
腎細胞癌 (悪性腫瘍)	-	+	-	++
退形成性神経節 膠腫 (悪性腫瘍)	+ ~ -	++ ~ -	++ ~ -	++ ~ -
皮質結節 (過誤組織)	±	-	-	+++
軟化巣 (グリオ ーシス)	+++	-	+++	++

## 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

## TSC gene mutant の発がん研究における Translational research の実際

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

新規の遺伝性「皮膚症候群」のモデルの起始遺伝子を同定した (Bhd)。また、昨年度に引き続き、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を進め、ヒト結節性硬化症の分子標的治療戦略の新たな展開が見られた。「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。また結節性硬化症研究の一連の中で、予期しない Translational research に発展したことは、特筆すべきであろう。

#### 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。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」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。

本研究の目標は、「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、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。また、新規の遺伝性の「皮膚症候群」のモデルの起始遺伝子 (Bhd) を同定したことは、結節性硬化症遺伝子の研究にも役立つものと考えられる。

(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

### (1) 発がん過程、病期ステージによる有効な分子標的治療

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、背部にカプセルを

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、小さな病変は残る傾向があった。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。発がん過程、病期ステージにより rapamycin の効果的な使用方法の存在を示唆をするものである。

### (2) mTOR と異なるシグナル伝達経路

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。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。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)。

さらに、ヒト TSC 患者の変異型 (mTOR 活性の異なる変異型) を導入した Transgenic Eker rat の作製を行い検討中である。

### (3) 「皮膚症候群」の新規モデルの起始遺伝子の同定と証明

「ヒト皮膚疾患の症候群」(BHD) の新規のモデルの起始遺伝子の単離・同定した (Proc. Natl.