

Knocked down of tuberin

western

methods

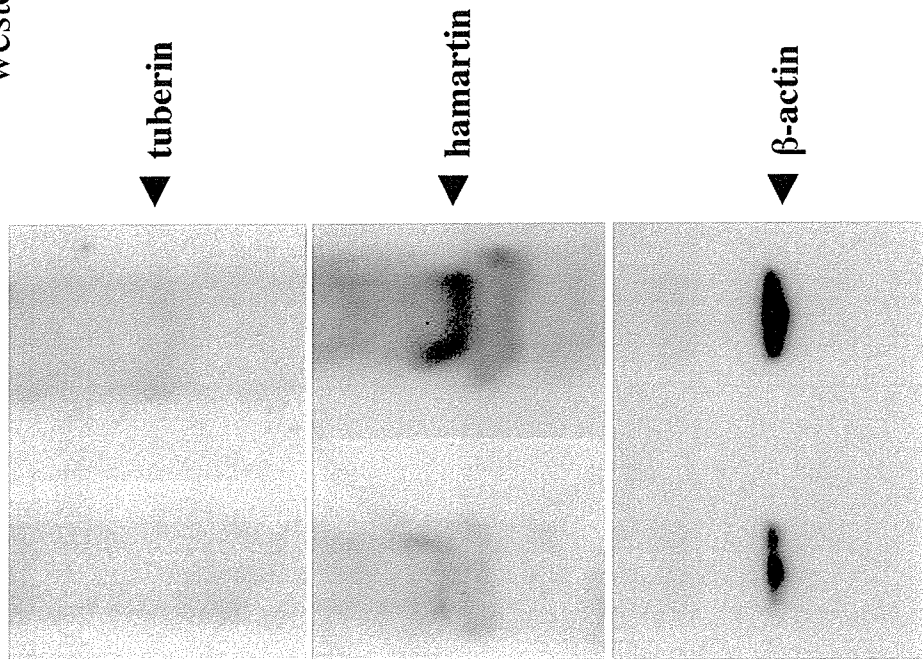
Hela cells



Knocked down :
using tuberin-SiRNA



Western:
anti-tuberin Ab
anti-ham,artin Ab



SiRNA

control

Tuberin-SiRNA

図4 Knocked down : tuberin-SiRNAをHeLa細胞に導入してtuberinをノックダウンした細胞をtuberin hamartinそれぞれに対する抗体を用いてウエスタンプロテイングを施行した。tuberinをノックダウンした細胞では、hamartinの減少が認められた。

仮説モデル

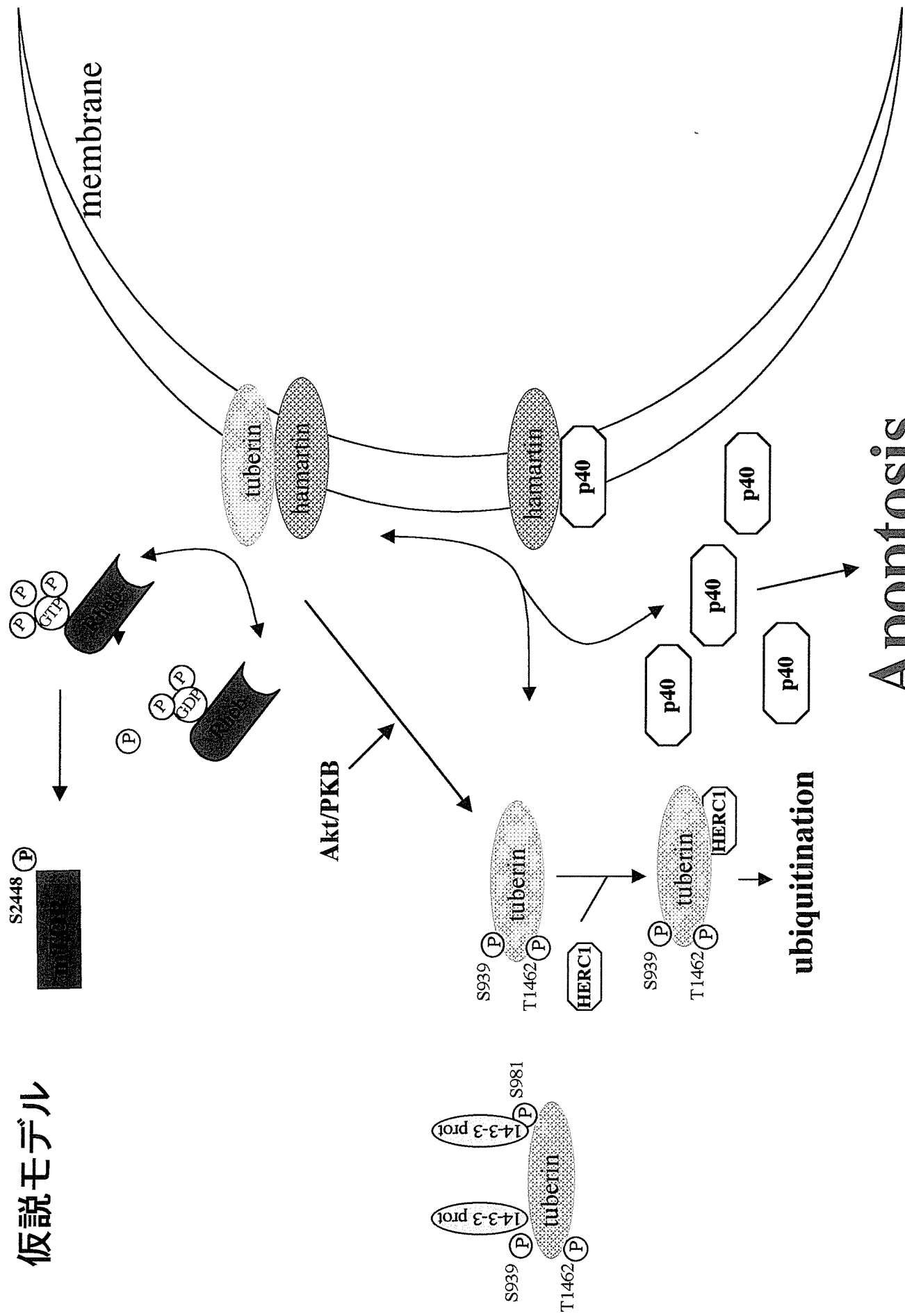


図5 仮説モデル図：p40とhamartin, tuberin の関係の仮説。

FACS analysis of cell cycle

a)

	TSC 2	TSC 2+p40	TSC 1	TSC 1+p40
G0-G1	87.54	35.41	83.50	37.69
S	5.4	64.59	7.94	48.37
G2-M	7.85	0.00	8.56	13.95
Apoptosis	0.05	11.18 ↑	0.10	3.77 ↑

b)

	Normal	Normal+p40
G0-G1	11.45	71.95
S	11.33	20.06
G2-M	7.22	7.99
Apoptosis	2	0.34 →

表1 正常の線維芽細胞、結節性硬化症患者病変部由来培養細胞でP40を強発現させて細胞周期に及ぼす影響を検討した。b)正常細胞でP40を強発現させてもアポトーシスに大きな変化は認められなかったが、a)結節性硬化症患者由来細胞でP40を強発現させるとアポトーシスの著明な増加を認めた。

先天性脛骨偽関節症の偽関節部骨癒合判定装置の開発

分担研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科教授

研究要旨

先天性脛骨偽関節症において、偽関節部の骨癒合判定を可能とする診断装置の開発を行う。

A. 研究目的

神経線維腫症に合併する先天性脛骨偽関節症は偽関節部に対し多数回の手術を要する骨癒合が得にくい極めて難治性の疾患である。近年、手術法の進歩により骨癒合率は上昇しているが、骨癒合が得られても偽関節部の骨幅の狭小は残存する場合が多い。骨癒合が得られた部位が荷重負荷に耐え得るかの判断は現在、主にレントゲンにより行われているが定性的であり十分ではない。我々は偽関節部の骨癒合判定を非侵襲に定量評価可能な診断装置の開発を目的とし研究を行った。

B. 研究方法

偽関節部の微小な荷重に対する骨の変位を高精度に測定することで骨の癒合程度を判断する。そのために、 $2.6\mu\text{m}$ の精度を有する超音波エコートラッキング法（ET法）を用いた。昨年度までの開発において脛骨骨幹部骨折における臨床測定にて、ギプスによる保存療法とプレートや髄内釘といった内固定材料を用いた手術療法の骨折症例いずれ

においても、骨折部の骨癒合部位の剛性経時変化を定量評価可能であった。このことから、この手法による先天性脛骨偽関節症例における測定の可能性が示されたが、偽関節症例では脛骨の遠位端に偽関節部が存在し、且つ骨幅が狭小しているため既存のリニア電子プローブと下肢保持具による測定が不可能であった。そこで平成18年度の開発においては測定部位の形状に適したプローブの開発と下肢の保持具の開発を行った。

プローブ開発において、脛骨の遠位端に設置可能な極めて小さいものが必要であることから、既存のもので生体に用いられている経直腸用シングルプローブ（周波数 7.5MHz、形状 $\phi 8\text{mm}$ 円形、重量 0.6g）に着目し開発を開始した。電子プローブではなくシングルプローブによりエコートラッキングが可能であるか、そしてこれらを平面配置することで面変化も検出可能であるかの検討を行った。3個の経直腸用シングルプローブを平板上に正三角形の頂点にあたる位置にそれぞれ配置し、これを金属平板に対し向け金属平板を微小変化させることにより面変化の検出を行った。また、こ

れに続く基礎実験として新たに開発した骨計測用シングルプローブ（15mm×12.2mm内に9つの振動子を有する）の音響特性を測定し、これを用いた臨床測定を健常脛骨において実施した。

下肢保持具として遠位支持部の明確化、測定精度の向上、測定の安全性・効率性向上を目標とし新たな保持装置を開発した。既存の陰圧による下肢全体を包み込む方法ではなく、シリコンゴムスポンジを支持部材料として用いたU字状の治具で、近位部は4cm、遠位部は2cm程度の幅で下肢を保持する。さらに近位部と遠位部は高さ調整機能と共にそれぞれの荷重が測定可能なものとし設置再現性の向上を図った。この下肢治具の固定性の評価として健常脛骨にて25N荷重を加え下肢の回旋の程度を評価した。

さらに、これらの新規プローブと下肢保持機能に対応可能な解析ソフトも新たに開発した。これらを用い臨床測定を実施し、既存の測定と比較することにより精度、安全性、効率化の評価を行った。

（倫理面への配慮）

今回の研究で用いられる超音波はすでに臨床で用いられているものと周波数・音圧ともかわらず安全性は確立されている。また、検査の際に負荷される荷重は被検者が日常生活において常に受けている荷重より充分小さいものでありこの検査による骨への損傷は無く安全である。

検査に際しては対象者および対象者家族に口頭および文書を用いて説明を行い、十分に理解し同意を得られたもののみを対象とする。また、全研究を通して患者の個人情報情報は公開されない。

C. 研究結果

基礎実験では、経直腸用シングルプローブにおいても金属表面のエコートラッキングが可能でありミクロンの精度で面変化も検出可能であった。このことから新たに骨計測用プローブの開発を行い、小型プローブの音響特性を評価した結果、中心周波数7.47MHz、比帯域74.7%、素子感度-30.7dB、静電容量700pFと骨表面波形を取得するために十分な特性、感度があることが実証された。また、実際の脛骨測定においても既存の電子プローブと遜色のないエコートラッキング測定が可能であった。

新規下肢保持具では近位部と遠位部を既存のものと比較し局所的に保持することに成功し、25N荷重による回旋角度は脛骨骨幹部上に設置したアングルメーターにて0.1度以下の回旋で、十分な保持力を有していることが実証された。また、これらの臨床健常骨測定において測定中・測定後の痛みや不快感を残すことはなく、安全性に問題は全く見られなかった。

これらのプローブ、治具を用いた健常脛骨における測定の結果、5回計測において標準偏差0.007度と既存測定の0.015度に対して2倍程度の測定再現性が実現された。

D. 考察

先天性脛骨偽関節症の測定において、骨幹部部の狭小した部位での計測を可能にする小型プローブとより高精度な計測を可能とする固定治具が必要であった。新たに開発した骨計測用プローブでは既存のプローブと遜色のない精度で狭小部位での計測が可能であり、下肢固定治具においては支持部位の局所化によっても荷重に対し安定

した固定性を有していた。

E. 結論

先天性脛骨偽関節測定用に新たなプローブと下肢固定冶具の開発を行い、これらが偽関節部の剛性測定における要求を満たしていることを明らかにした。

今後、これらプローブと下肢保持具を用い、先天性脛骨偽関節症例に対する臨床測定を開始する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Suzuki H, Harada A, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K.
A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. Med Eng Phys2006;28(6):588-95.

2. 学会発表

1. A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking.
Matsuyama, J; Ohnishi, I; Sakai, R; Miyasaka, K; Harada, A; Bessho, M; Ohashi, S; Matsumoto, T; Nakamura, K. The 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Poster session 2007. San Diego
2. 超音波エコートラッキングを用いた骨癒合判定法
松山順太郎、大西五三男、大橋 暁、別所 雅彦、松本卓也、中村 耕三

第 79 回日本整形外科学会学術集会 シンポジウム 2006 横浜

3. A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking.

Matsuyama J, Ohnishi I, Ohashi S, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K

第 32 回日本骨折治療学会 シンポジウム 2006 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1. 「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」
出願国：米国
発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大西五三男
出願人：アロカ(株)：国立大学法人東京大学
出願番号：11/390,788
出願日：2006年3月28日
2. 「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」
出願国：E P (英、仏、独、伊、スイス)
発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大西五三男
出願人：アロカ(株)：国立大学法人東京大学
出願番号：'06006394.8
出願日：2006年3月28日

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

神経線維腫症に合併した脊椎及び脊髄病変に関する研究

研究協力者 内藤正俊 福岡大学大学医学部整形外科教授

研究要旨

脊椎神経性腫瘍に対する Transverse Placement Laminoplasty の術後成績

有水 淳 福岡大学医学部整形外科

A. 研究目的

神経線維腫症は希な疾患であるが種々の脊椎病変を合併することはよく知られている。今回我々は当科における神経線維腫症を含めた神経腫瘍に対し新しい手術法を開発しこの術後成績を検討した。

B. 研究方法

従来脊椎硬膜内腫瘍に対しては椎弓切除にて腫瘍を摘出してきた。しかし術後の脊柱変形、血腫や瘢痕組織による硬膜の圧排等の問題があった。そこで我々は摘出した棘突起を横倒しにしてミニプレートで固定し脊柱の後方要素を再建する術式 (Transverse Placement Laminoplasty; 以下 TPL) を開発した。今回その術後成績を検討したので報告する。症例は 10 例で男性 5 例、女性 5 例であ

った。平均年齢は 56.4 才で罹患部位は胸椎が 5 例、胸腰椎移行部が 1 例残りの 4 例が腰椎罹患であった。組織型は schwannoma が 6 例で schwannomatosis が 4 例であった。これらの症例に対し術後神経症状、歩行能力、手術時間、術後出血量、JOA スコア、術後脊柱後弯変形につき直近に行なった椎弓切除術 8 例と比較検討した。JOA スコアは日整会頸髄症判定基準のうち上肢症状を除く 11 点満点にて算出した。

C. 研究結果

TPL 群、椎弓切除群共に術後に新たな神経症状の悪化や歩行障害が出現した症例は認めなかった。手術時間は TPL 群 229 分に対し椎弓切除群は 276 分と若干長い傾向はあったが統計学的に有意差は認めなかった。術後の出血量は TPL 群が 219g に対し椎弓切除群が 467g と統計学的に有意に少なかった。JOA スコアは TPL 群が術前平均 9.4 点から術後平均 10.0 点へと改善しその改善率は 38%

であった。また椎弓切除群は術前平均 8.2 点が術後平均差 10.7 点へと改善しその改善率は 89%であった。しかし改善率に統計学的な有意差はなかった。術後の後弯変形は TPL 群が術後の後弯角 4.6 度から術後の後弯角 5.3 度と統計学的な有意差は認めなかったが椎弓切除群は術前後弯角 12.6 度が術後後弯角 22. 度と統計学的に有意に増加していた。

症例供覧

症例 48 才女性。主訴：右臀部～右下肢痛

現病歴：47 才時に転倒し腰痛が出現。保存的に加療を行ない軽快していたが受傷 4 ヶ月後より特に誘因なく右臀部から下肢の疼痛が出現した。保存的に加療を受けるも症状軽快せず MRI を施行し下位胸椎レベルに腫瘍が認められ紹介され当科初診となる。

理学所見：知覚は右大腿外側から下腿外側にかけ 8 / 10 程度の知覚鈍麻を認める。筋力は左右差なくすべて正常。下肢深部腱反射は PTR は正常、ATR は減弱。画像所見：第 11 胸椎から第 2 腰椎にかけに T1WI にて低輝度、T2WI にて高輝度、造影 MRI にて腫瘍周囲が増強される多房性の腫瘍を認める。ミエログラフィー、CTM にても同様の所見であった。術中所見：腫瘍塊は巨大で脊髄、根糸と癒着しておりこれを丁寧に剥離し一塊として摘出。その後棘突起を横倒しにしてミニプレートにて再建術を行なった。術後経過：術前右下肢痛のために歩行が困難であったが術後は一本杖にて退院となった。

D. 考察

1993 年に富田らにより T-saw を用いた椎弓形成術が発表されたがこれは cutting loss がなく解剖学的に正確な還納は可能で骨癒合には有利と考えられるが、脊柱管内のワイヤー挿入操作時の危険性、還納椎弓の初期固定力の問題、術野が狭いなどの問題がある。ノミ、サージカルドリルを使用した場合、広範囲な術野が獲得できるが、切離面の cutting loss が生じそのままでは椎弓の還納が困難という欠点がある。この方法の欠点に対し 1999 年に村上らが報告した椎弓横倒し法による椎弓再建は、骨切除に際して cutting loss を考慮する必要がなく、脊柱管内操作が不要で、拡大された脊柱管が維持できるが、還納部の初期固定力に問題がある。

一方、1996 年から O'Brien、山元らによりチタン製ミニプレートの脊椎外科への応用が報告され、当科では椎弓横倒し再建法にチタン製ミニプレートを併用することにより、椎弓再建部の強固な初期固定と十分な術野の獲得を同時に得ることが出来るようになった。結果として従来の手術法より、外固定の簡素化、離床時期の短縮が可能となり、胸椎、腰椎神経性腫瘍の手術における椎弓再建法として有用な方法と考えられた。

D. 結論

1. Transverse Placement Laminoplasty (TPL) は平均術後出血量は有意に少なく手術侵襲の面では有用な手術方法であると考えられた。
2. Transverse Placement Laminoplasty (TPL) は術後の後弯変形予防に有用であると考えられた。

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生化学的、細胞生物学的に詳細に解析している。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、細胞骨格系制御、及びニューロン分化制御に関わる分子群が同定された。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。これらの分子の細胞内相互作用は、CRMP2 分子の非リン酸化フォームにおいてのみ特異的であり、リン酸化によってこれらの結合が制御されていることが判明した。又、NGF 刺激 PC12 細胞の neurite、およびラット胎児海馬ニューロンのアクソンにおいてこれらの分子すべての局在が一致することが観察された。新規の proteomic differential display 法である定量的 2D-DIGE 法と proQ Diamond を用いた phospho-differential 解析にて、NF1 ノックダウン細胞とコントロール細胞の発現プロファイルを比較したところ、多くのリン酸化蛋白スポットの変化が観察されたが、特に7種類の CRMP2 リン酸化スポットが NF1-siRNA 処理によって大きく発現上昇することがわかった。これらすべてのリン酸化部位の同定を行い、Rho Kinase (Ser555), CDK (S522), GSK-3 β (Ser518, Thr514, Thr509) による CRMP2 の特異的リン酸化が NF1 ノックダウン細胞内にて亢進していることが判明した。又、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 を回復したことから、ニューロフィブロミンによる RAS 経路の制御と CRMP2 活性制御が相互リンクしていることが判明した。以上のことから、ニューロフィブロミンは神経系細胞内において、RAS-Rho-RhoK-CRMP2 および RAS-MAPK-CDK5-GSK3- β -CRMP2 シグナルの制御、及び CRMP2-tubulin との相互作用を行うことによって、CRMP2 のリン酸化を相互制御し、アクソンの形成と伸展に関わっていることが判明し、NF1 患者における病態はニューロフィブロミンの欠失による神経細胞分化異常に関与して

いる可能性が考えられた。又同定された NF 蛋白結合分子群の一部は、NF2 蛋白結合分子群に共通しており、NF1, NF2 に共通した病態と関連していることが示唆された。

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。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と考えられる。

NF2 は両側性聴神経症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 蛋白ファミリーと極めて高い相同性を示す。ERM 蛋白は接着分子 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し、これらを病態の治療法・治療薬開発の基礎情報とするために、主にプロテオミクス、及び細胞生物学的な方法論を用いて、各分子の細

胞内結合分子群の同定、RNA 干渉による両分子の発現の抑制による結合分子群の生化学的変化、および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推測を行った。

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、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。プロテオミクスによる解析に関しては、熊本大学医学総合研究棟における病態プロテオミクス解析コアシステムを有効に活用し、主に、ITRAQ 法、2D-DIGE 法を用いた最新のプロテオミクス解析法にて定量的に関連蛋白質の同定を行うことが可能となった。
- 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. ニューロフィブロミンの SiRNA による発現抑制と、培養細胞への影響、及び関連シグナル分子群の同定

NF1 蛋白質の急激な発現抑制に伴う形態学的影響を観察するため、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解析した。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。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。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。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ところ、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。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。以上の結果から、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と考えられた。

そこで、アクチンフィラメントの切断・脱重合に関わる Cofilin/ADF タンパクに注目し、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。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、抑制できることが判明した。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。更に、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、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。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。

2. NF1-GAP 依存的 Rho シグナルと Ras シグナル経路の関連性

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

かにすることは重要と考えられる。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ところ、部分的にはあるが抑制効果を示した。このことより、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。そこで、Ras の下流のいかなるシグナルの関与があるかを調べるために、MEK、PI3K 阻害剤および Ral siRNA を用い検討したが、いずれの処置も形態学的変化を抑制することが出来なかった。このことから、NF1 siRNA により誘導された HeLa 細胞における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。

NF1 siRNA により誘導された効果に対して、NF1-RasGAP 機能喪失の関与を明らかにするため、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が、NF1-GRD type1 の導入は、効果は認められなかった。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 に由来する

機能が必要と考えられた。これらの結果から、NF1-GRD 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。

3. 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張現象の調節

特に神経系細胞の NF1-GAP 活性は非神経系細胞と比較して高値を示すことが以前の我々の研究から明らかとなっている。NF1 活性は神経分化・神経突起伸長・伸張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。

4. 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 Cystain-Ser/Thr rich 部位(CSRD)、及び C 末端部位に cAMP 依存性蛋白 kinase(PKA)による特異的なリン酸化部位を有していることを以前より報告している。両部位における結合タンパク質をプロテオミクスの手法によって網羅的に解析したところ、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。その中で幾つかの分子に注目し詳細な相互作用解析を行った。最も CTD と結合が顕著である 14-3-3 では、この分子を高発現する 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、ニューロファイブロミン抗体を用いて 14-3-3 を検出できた。又、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、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。これらの分子の細胞内相互作用を免疫沈降-western blotting にて確認したところ、CRMP2 分子の非リン酸化フォームのみに特異的に3者が結合し、リン酸化によってこれらの結合が制御されていることが判明した。又、NGF 刺激 PC12 細胞の neurite、およびラット胎児海馬ニューロンのアクソンにおいてこれらの分子すべての局在が一致することが免疫染色によって観察された。2D-DIGE 法と proQ Diamond を用いた phospho-differential 解析にて NF1 ノックダウン細胞とコントロール細胞の発現プロファイルと比較したところ、多くのリン酸化蛋白スポットの変化が観察されたが、特に7種類の CRMP2 リン酸化スポットが NF1-siRNA 処理によって大きく発現されることがわかった。各種キナーゼ阻害剤、および 2D-western を用いてこれらのリン酸化部位の同定を行ったところ、Rho Kinase (Ser555), CDK5 (S522), GSK-3b (Ser518, Thr514, Thr509) による CRMP2 の特異的リン酸化が NF1 ノックダウン細胞内にて亢進し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 を回復したことから、neurofibromin による RAS 経路の制御と CRMP2 活性制御が相互リンクしていることが判明した。以上のことから、neurofibromin は神経系細胞内において、RAS-Rho-RhoK-CRMP2 および RAS-MAPK-CDK5-GSK3-b-CRMP2 シグナルの制御、及び CRMP2-tubulin との相互作用を行うことによって、CRMP2 のリン酸化を相互制御し、アクソンの形成と伸展に関わっていることが判明した。NF1 患者における病態は neurofibromin の欠失による神経細胞分化異常に関与している可能性が考えられた。

5. 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

マーリンはその 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、マーリン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 NF2 siRNA 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-NF1 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ス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。

6. マーリンの細胞内結合タンパク質の同定と相互作用の解析

ニューロフィブロミンと同様なプロテオミクスによる定量的同定法(iTRAQ法)を用いて、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LC-ショットガン解析し、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60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傷害を誘起した種々の培養細胞において、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、NF2蛋白質結合分子である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。その他のNF2蛋白質結合分子群についての相互制御に関しては、特にNF1蛋白結合蛋白質と共通の分子として同定されたものに関して、特に焦点をあてて解析を進めている。

D. 考察

1. NF1蛋白ニューロフィブロミンの異常による機能破綻と病態との関連性

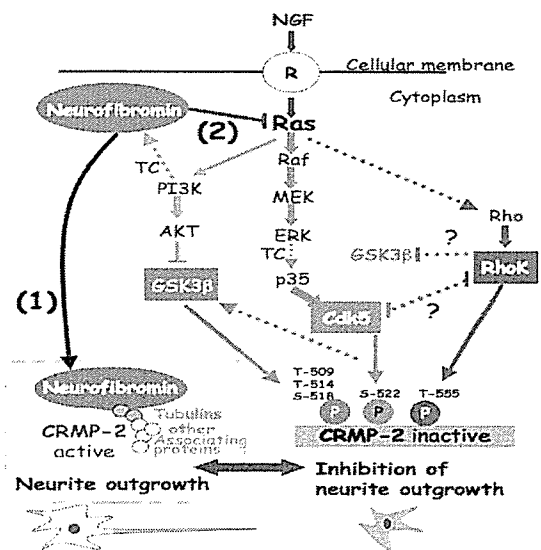
これまで、ニューロフィブロミンは、アクチン細胞骨格制御に関与しているとの報告がいくつか示されているが、その生物学的意義や、関連するシグナル経路の詳細についてはまだはっきりと解明されていない。本研究でニューロフィブロミンの喪失は、Rho-ROCK-LIMK2-cofilinシグナル経路を通じて、アクチン細胞骨格制御に影響を与え、マトリゲルマトリックス上における細胞運動・浸潤能・細胞間接着の促進をさせることにより、結果として巨大な細胞塊の形成を誘導するということが明らかとなった。この表現型は、NF1患者に特徴とされる多発性神経線維種の形成過程と非常に類似しているように思われた。神経線維種は、

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ことが判明している。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。

一方、神経系の細胞においてニューロフィブロミンの活性損失は、ニューロンのアクソン形成阻害 (コラップス) とデンドライドの未成熟を誘起することが、PC12 細胞、およびラット胎児海馬領域プライマリーニューロンに NF1 siRNA および NF1-GRD-DN を作用させた実験から明らかになった。これには、ニューロフィブロミンの結合蛋白質である CRMP2 とこれを制御する CDK5, GSK-3b、及び RhoK の相互機能制御が関わっていることが今回の実験からはじめて明らかになった (図 1)。これらのことから、ニューロフィブロミンの関わる神経細胞、とくにニューロンへの影響は、2つの経路より成り立っていることが推測された。すなわち、1) ニューロフィブロミンとアクソン形成に関わるカーゴ分子 CRMP2 との結合は、CRMP2 のリン酸化を阻害し、活性型 CRMP2 (非

リン酸化フォーム) コンプレックスによるアクソン形成に大きく寄与していること、2) ニューロフィブロミンの NF1-GAP 活性により、Ras-MAPK-CDK5-GSK-3b および Rho-RhoK シグナルが制御され、これらによる CRMP2 のリン酸化の制御が行われる事によって、活性型 CRMP2 の継続的な活性化、即ち正常なアクソンフォーメーションが形成される可能性が示唆された。この事から、ニューロフィブロミンの機能破綻は、ニューロンの分化異常を誘導し、NF1 患者の半数以上に発現する知能遅滞や学習障害に関わっていることが考えられた。

図 1 : ニューロフィブロミンの結合蛋白質が関わる神経細胞突起発現機構



2. ニューロフィブロミンの RAS-GAP 活性制御と RAS の関連性について

NF1-GRD は、特に神経系の細胞において強く Ras の negative regulator として機能する。NF1 siRNA により誘導された効果は、Ras のドミナントネガ

タイプ体の導入により過剰なアクチンストレスファイバーや、ニューロンの分化を抑制したが、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関与しているということを示唆している。NF1 タンパク発現抑制細胞は、恒常的な MAPK シグナルや PI3K 経路の活性上昇を認めるが、HeLa 細胞においては MAPK 阻害剤や PI3K による処置は、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。一方、神経系の細胞においては、Ras のシグナルは両方の阻害剤、特に PI3K に感受性であり、PI3K シグナル活性化によって NF1 遺伝子の転写を亢進することが判明している。これによって、上昇したニューロフィブロミンはフィードバック的に Ras を阻害し、結果として MAPK-CDK5-GSK-3b や Rho-RhoK を制御し、アクソン形成に関わる分子群のリン酸化を制御することによって、ニューロンの分化に関わっている可能性がある。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 活性は神経系細胞における分化制御には必要不可欠だが、HeLa 細胞の骨格制御においては、Ras の主要な下流シグナル経路の関与に加えて他のシグナルの関与が示唆され、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、細胞骨格に関わる分子群を制御しているの可能性が示唆される。

3. 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し、細胞機能を阻害していることがわかった。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。従って、細胞の浸潤・運動能、神経突起発現などの細胞機能制御には NF1-GRD は重要な機能を制御するような重要な機能を果たしていることが考えられた。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が、神経細胞の突起伸長阻害の抑制においては不十分であった。一方で、NF1-GRD type1 の導入は、不整な形態は両者の機能阻害を抑制した。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 シグナル経路などの制御を行っているのかもしれない。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ている。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や各種のリン酸化酵素・基質の機能制御は、Ras に関連したシグナルによってだけでなく、他のシグナル経路も関わっている可能性がある。

4. マーリンの結合蛋白質を介した核内移行と機能制御

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が関わって、CD44ICD による転写活性の亢進を制御している可能性が示唆された。マーリンは DNA 傷害性のシグナルを受けてその結合蛋白質である PARP とともに核に移行する現象が見られるが、CD44ICD 非存在下、即ち、マーリン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 存在下でマーリン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、マーリン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

ていることより、脳腫瘍における CD44ICD と NF2 との関連性、及び同時に NF2 蛋白質結合分子として同定された種々の分子群の病態における機能の関与が注目される。

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、Rho-ROCK-LIMK2-cofilin シグナル、Ras-Rho-ROCK-CRMP2 および、RAS-MAPK-CDK5-GSK-3-CRMP2 シグナル経路を通じた神経系細胞のアクチン細胞骨格および細胞運動/ニューロン分化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。多発性神経線維種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規のシグナル経路の制御異常により起こっていると考えられる。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、CDK5 や GSK-3b などのリン酸化酵素阻害剤など、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

アイ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ことから、我々が押し進めている最先端融合プロテオミクス的手法などによって、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できる可能性がある。同定された関連分子に対して低分子化合物あるいは RNAi 手法などで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のできる基礎的な解析を押し進めていくことが重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuninaka S, Iida SI, Hara T, Nomura M, Naoe H, Morisaki T, Nitta M, Arima Y, Mimori T, Yonehara S, Saya H. Serine protease Omi/HtrA2 targets WARTS kinase to control cell proliferation. *Oncogene*. 2006 in press
- 2) Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 2006 (11):1291-7
- 3) 荒木令江、病態プロテオミクスによる神経系腫瘍関連蛋白質群を介した細胞内異常シグナルの検索、「蛋白質の翻訳後修飾と疾患プロテ

オミクス」 監修吉川敏一、編集内藤裕二、内田浩二、診断と治療社、pp101-114, 2006

- 4) Araki N., Analysis of the specific signal transduction in glioma cells by proteomic differential display. *J. Electrophoresis*, 50(3), 217-224, 2006
- 5) 荒木令江、プロテオミクスによる病態解析への戦略と現状」*がんとプロテオミクス* 藤原研司・石井裕正・佐藤信紘・荒川泰行・井廻道夫編集、自然科学社 2006

2. 学会発表

- 1) 第 22 回臨床フリーラジカル会議 2006. 4. 1 (京都) シンポジウム 荒木令江 佐谷秀行 神経系腫瘍および変性疾患関連タンパク質のプロテオミクス～病態プロテオミクスによる神経系細胞内特異的シグナルの解析～
- 2) 日本臨床検査自動化学会第 20 回春季セミナー2006. 4. 7-8 (山梨/甲府) 特別講演 荒木令江 プロテオミクスによる疾患の病態解析
- 3) 産学連携セミナー2006. 5. 16 (パナファームラボラトリーズ:宇土) 荒木令江 佐谷秀行 プロテオミクスで生命の謎を解く
- 4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in Kyoto 第 20 回国際生化学・分子生物学会、第 75 回日本生化学会、合同大会 2006. 6. 19-23 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル) Araki N, Patrakitkomjorn S, Cho, K., Morikawa, T., Saya, H., 脳神経系特異的な虚血性細胞死の分子シグナル制御機構の解明
- 5) 20th IUBMB International Congress of

- Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in Kyoto 第 20 回国際生化学・分子生物学会、第 75 回日本生化学会、合同大会 006.6.19-23 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル)
- Morikawa T, Cho K, Aoki M, Patrakitkomjorn P, Nakamura H, Kuratsu J, Moriyasu M, Saya H, Araki N
- Proteomic analysis of brain tumors using natural protein chips
- 6) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in Kyoto 第 20 回国際生化学・分子生物学会、第 75 回日本生化学会、合同大会 2006.6.19-23 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル) Siriporn Patrakitkomjorn, Ozawa, T., Feng, L., Yunoue, S., Zhang, D., Aoki, M., Cho, K., Morikawa, T., Kaibuchi, K., Saya, H., Norie Araki
- Identification of NF1 tumor suppressor (neurofibromin) associating proteins and functional analysis for their regulations in neuronal cells.
- 7) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in Kyoto 第 20 回国際生化学・分子生物学会、第 75 回日本生化学会、合同大会 2006.6.19-23 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル)
- Kanlayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Chawalit Pairojkul, O-Tur Saeseow, Gregory J Riggins, Norie Araki, Sopit Wongkham
- Methionine aminopeptidase 2 is a main regulator of proliferation in cholangiocarcinoma.
- 8) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in Kyoto 第 20 回国際生化学・分子生物学会、第 75 回日本生化学会、合同大会 2006.6.19-23 (国立京都国際会館、京都宝ヶ池プリンスホテル) Mutita Junking Mutita Junking, Banchoh Sripa, Kalayanee Sawanyawisuth, Chaisiri Wongkham, Araki Norie and Sopit Wongkham
- Suppression of galectin-3 expression altered localization of galectin-3 in cholangiocarcinoma cells.
- 9) 第二回臨床プロテオーム研究会シンポジウム 2006.7.18-19
- 荒木令江 病態プロテオミクスによる脳腫瘍化学療法感受性に関連するタンパク質群の解析
- 10) 日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会(東京) シンポジウム 2006.7.18-19 融合プロテオミクスによる神経系腫瘍関連蛋白質を介した細胞内シグナルの解析 荒木令江, Patrakitkomjorn Siriporn, 小林大樹, 青木雅史, 長経子, 森川崇, 久保美和, 佐谷秀行
- 11) 日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会(東京) シンポジウム 2006.7.18-19 小林大樹, Patrakitkomjorn Siriporn, 森川崇, 佐谷秀行, 荒木令江 iTRAQ 法による神経系細胞分化に関わる NF1 腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の解析
- 12) 第 4 回北里疾患プロテオーム研究会 2006.8.4 (神奈川)