

- 荒木令江 病態プロテオミクスによる新刊発症メカニズムの解析
- 13) 名古屋大学医学部セミナー 2006.9.1 (名古屋)
荒木令江 佐谷秀行「病態プロテオミクスによる脳疾患の解析」
- 14) 第30回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (2006.9.14-16 霧島) 荒木令江 佐谷秀行 病態プロテオミクスによる腫瘍抑制遺伝子産物を介した細胞内シグナルの解析
- 15) 第30回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (2006.9.14-16 霧島)
Mutita Junking, Banchob Sripa, Kalayanee Sawanyawisuth Chaisiri Wongkham, Hideyuki Saya, Sopit Wongkham, and Araki Norie
Cellular functional analysis of galectin-3 in cholangiocarcinomas
- 16) 第30回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (2006.9.14-16 霧島)
Patrakitkomjorn, S., Kobayashi, D., Morikawa, T., Ozawa, T., Saya, H., Araki, N. NF1 tumor suppressor, neurofibromin, controls neuronal differentiation via the regulation of CRMP2 phosphorylation.
- 17) 第65回日本癌学会総会 2006.9.28-30 横浜
プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制遺伝子産物 Neurofibromin の細胞内機能解析
Analysis of cellular function of Neurofibromatosis type I tumor suppressor gene product by proteomic strategy
Araki N, Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Fujimura, Kobayashi T, Ozawa T, Kaibuchi K, Saya H
- 18) 第65回日本癌学会総会 (2006.9.28-30 横浜)
病態プロテオミクスによる脳腫瘍化学治療感受性に関連する蛋白質群の解析
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、
- 19) The 22th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium.
Asia-Africa International Network Symposium in Kumamoto of JSPS Asia and Africa Science Platform Program. The 3th Japan-China Cooperative Science Symposium in Kumamoto 2006.10.23-24 (Kumamoto) Norie Araki Proteomic approaches on tumor related gene function
- 20) Asia-Africa International Network Symposium in Kumamoto of JSPS Asia and Africa Science Platform Program. 2006.10.23-24 (Kumamoto)
Kanlayanee Sawanyawisuth, Norie Araki, Sopit Wankham, Methionine aminopeptidase 2 regulates cell proliferation of cholangiocarcinoma via cyclophilin A
- 21) ヒューマンサイエンスワークショップ 2006.11.8(品川) 荒木令江 病態プロテオミクスによる脳神経系疾患の発症メカニズムの解析
- 22) 第4回拠点形成研究 B 公開シンポジウム オーガナイザー 2006.12.15 (熊本)「プロテオミクスとグライコミクスの最前線」～チップ開発からベッドサイドへ～
- 23) 厚生労働科学研究費補助金厚生省神経皮膚症候群に関する調査研究平成 17 年度総会

2006.12.22(福岡) 荒木令江、Siriporn Patrakitkomjorn, 小林大樹、小澤達也、佐谷秀行 融合プロテオミクスによる NF1 遺伝子産物 neurofibromin の神経系細胞内機能の解析

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。

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 non-RAS シグナルの 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

NF1 のカフェオレ斑は、皮膚の真皮線維芽細胞やマスト細胞の異常によるメラノサイト増殖因子の分泌亢進および表皮メラノサイトの異常増殖により生じると考えられている。我々は培養ヒト線維芽細胞やメラノサイトの NF1 を siRNA によりノックダウンしカフェオレ斑形成に関与する細胞内シグナルを解析してきた。初代培養の siRNA ノックダウン効率は、細胞の採取状況とその後の培養状態により大きく変化する。ノックダウン後も標的遺伝子の抑制は一過性で不安定な為、経時的、定量的な解析において問題が生じる。今回、レンチウイルスベクターにより shRNA および miR RNA をメラノサイトおよび線維芽細胞にて発現させ、安定した NF1 ノックダウンが可能かを調べた。線維芽細胞では比較的安定した効率でノックダウンが得られたが、メラノサイトではノックダウン効率が siRNA より低く、さらに抗生物質耐性遺伝子による選択的クローニングが必要と考えられた。メラノサイトにおいて、NF1 ノックダウンによる RAS 活性上昇は認められなかったが、メラノサイトの増殖能は亢進し cAMP 活性は低下したため non-RAS シグナルの neurofibromin による制御が考えられた。レンチウイルスによる RNAi では、分子治療を目的に標的細胞・組織での特異的ノックダウンを行うために、従来の Pol III 系プロモーターの代わりに、細胞特異的発現遺伝子のプロモーターなど Pol II 系プロモーターを組み込んだ miR RNA 発現レンチウイルスベクターが用いられている。線維芽細胞やマスト細胞とメラノサイトの共培養 in vitro モデルにおいて、それぞれの細胞に特異発現されている遺伝子のプロモーターを組み込んだ miR RNA 発現レンチウイルスで NF1 の発現を細胞別にコントロールできる可能性があり、このような in vitro モデルを確立すれば、カフェオレ斑における細胞間相互作用や細胞内シグナルを詳しく培養細胞系で解析できると考えられた。

高橋 仁、河野邦江、森田栄伸

島根大学医学部皮膚科

A. 研究目的

NF1 患者皮膚由来メラノサイトを用いた *in vitro* の培養にて、NF1 発現の低下がメラニン生成に影響を及ぼすことが示唆されている。病理組織学的所見では、NF1 カフェオレ斑における表皮メラノサイトの増加がみられる。しかし、健康人表皮由来の培養メラノサイトと比べて NF1 患者細胞の RAS-GTP 活性上昇は見られず、RAS による細胞増殖もみられないと報告されている。したがって、RAS 活性上昇のメラニン生成への直接的な関与は現在のところ、疑問視されている。最近、皮疹部由来の真皮線維芽細胞の sSCF や HGF 分泌亢進がメラノサイトの増殖を引き起こすとする、成長因子過剰刺激説が提唱されている¹⁾。

NF1 の遺伝子発現と NF1 蛋白のターンオーバーは、初代培養メラノサイトを継代・増殖させるための培養条件によって著しく変化するため、患者由来の NF1 変異メラノサイトでの NF1 発現低下による細胞内シグナルの変化は明らかにされていない。

今回、ヒト培養メラノサイトおよび皮膚真皮由来線維芽細胞における neurofibromin の RNAi を誘導する 2 種類の異なったレンチウイルス系ベクターを用いてノックダウンを試み、RAS シグナルや細胞増殖に対する影響について検討を加えた。

B. 研究方法

メラノサイトおよび真皮皮膚線維芽細胞は正常ヒト表皮角化細胞、正常人表皮メラニン細胞 (Cascade 社) を用い、プロトコール指定の無血清培地を使用した。

NF1 mRNA 特異的 siRNA (熊本大学腫瘍医学分野、佐谷秀行教授の研究グループからの情報提供によ

るシーケンス) は RNA 合成後、QIAGEN 社の HiPerFect トランスフェクションキットにより細胞内に導入した。siRNA は NF1 の CDS の 3 ヲ所に特異的な 19mer (NF1-609, NF1-827, NF1-3924) を用いた。コントロールにはノンサイレンスシーケンス siRNA (QIAGEN 社) を使用した。

これら 3 種類の配列 siRNA を作る shRNA を U6 プロモーターにて誘導する発現ベクターを構築し、レンチウイルス系 RNAi ベクターに組み込んだ (BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System, Invitrogen 社)。レンチウイルス実験系のコントロールとして LacZ 遺伝子に対する特異的ノックダウン配列をもつ RNAi 発現レンチウイルスコンストラクトを作製した。レンチウイルスパッケージングベクターと RNAi 発現レンチウイルスコンストラクトを 293FT 細胞に、コトランスフェクションし RNAi 発現レンチウイルスを含む上清からウイルスをカラムにて濃縮後、培養細胞の培地に 200 倍濃度にて添加し 48-72 時間培養して感染させた後、NF1 の発現抑制について解析した。

Pol II 系プロモーターで、ターゲットの RNAi 配列を含む miRNA (miR RNAi) を発現させ、内在性の miRNA 経路を利用して遺伝子を抑制するシステムについては、今回、CMV プロモーターをベクターに組み込んだキット (BLOCK-iT Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System, Invitrogen 社) を試験的に使用した。

miRNA 配列は Invitrogen 社の miR RNAi デザイナーソフトウェアにより抑制効果が高いと予測された 4 種類の NF1 特異的シーケンスに microRNA シーケンスを組み合わせ、ハイブリッドオリゴを作製、ダブルストランドにして発現ベクターにクローニングした。レンチウイルス miR RNA の発現には shRNA と同様の方法を用いた。

NF1 の遺伝子発現抑制はリアルタイム RT-PCR (ABI prism 7000) を用い、TaqMan Probe にて確認した。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確認した。

NF1 ノックダウンメラノサイトの増殖は ELISA 法による BrdU-incorporation (Cell Proliferation ELISA Biotrak system ver.2, Amersham Biosciences) を用いて解析した。sSCF (soluble stem cell factor)、MSH (melanocyte stimulating hormone), Forskolin, RAS inhibitor である L722-832、recombinant human SCF を添加後の増殖能を調べた。

RAS 活性は Raf-1 の GST 標識 RBD (RAS binding domain) を用いた活性型 RAS の pull down assay を行った (EZ-Detect RAS Activation Kit, PIERCE)。

C. 研究結果

1. 化学合成 siRNA を用いたトランスフェクションではターゲットシーケンスに非特異的な副次的作用を最小にし、特異的なノックダウン効果を得る目的で、低濃度 (5 nM) でトランスフェクションした。

siRNA (NF1-609, NF1-827, NF1-3924) をトランスフェクション後 48 時間で、70-80% の NF1 発現低下が、リアルタイム RT-PCR にて確認され、NF1-3924 の抑制効果が最も高かった。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、 α MSH、あるいは adenylyl cyclase 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. U6 プロモーター誘導による shRNA を用いたノックダウンでは pLenti6/BLOCK-iT-DEST-NF1 3924shRNA をレンチウイルス発現コンストラクトとして用いた。

メラノサイトを MOI 1 から 50 程度で感染させたが、かなり高濃度での感染時に発現の抑制がみられた。レンチウイルス濃縮カラムによる濃縮でも、同量の MOI が必要と考えられた。

4. CMV プロモーター誘導による miR RNA を用いたノックダウンについては pLenti6-GW/EmGFP-miR (CMV)-Hmi411424~411427 の 4 種類をレンチウイルス発現コンストラクトとして用いた。

293FT 細胞上清をカラムにて約 10 倍に濃縮したものを 200 倍希釈で加えたところ線維芽細胞では 4 種類のシーケンスのうち 3 種類にて比較的安定した 80% 程度の NF1 発現の抑制効果が確認された。しかしながら、メラノサイトでは、同じ濃度では 20% 弱の弱い抑制効果しか得られなかった。

5. siRNA NF1-3924 をトランスフェクションした NF1 ノックダウンメラノサイトの増殖アッセイを行った。BrdU 取り込みではコントロールのランダムシーケンス siRNA をトランスフェクションしたコントロールと相対的な BrdU 取り込み値比較にて約 2 倍の増殖能の亢進が認められた。

さらに、Recombinant Human SCF (100ng/ml) の添加後、6 時間の増殖能を調べたところコントロールでは、相対的な BrdU 取り込み値にて

約 1.4 倍と増殖刺激効果が認められたが、SiRNA NF1-3924 トランスフェクション細胞では 1.6 倍から 1.1 倍と逆に低下した。

6. SiRNA NF1-3924 によるノックダウンメラノサイトに、 α MSH、あるいは adenylyl cyclase の活性化剤である forskolin を添加し BrdU 取り込み値の相対比較により増殖能の変化を調べた。

コントロールと比較してベースラインでノックダウンメラノサイトの増殖能は 2.5 倍に亢進していたが、MSH や forskolin 添加によってコントロールに比べてさらに強い (3.5~4.5 倍) 相対的増殖反応が認められた。RAS inhibitor である L722-832 ではコントロール細胞での添加時に増殖反応が見られたがノックダウンメラノサイトではさらに強い増殖刺激が認められた。

7. RAS 活性を Raf-1 の GST 標識 RBD を用いて調べたところ、SiRNA NF1-3924 によるノックダウンメラノサイトではコントロールと比較して、RAS の恒常的活性化は認められなかった。

D. 考察

レンチウイルスを感染させて siRNA 発現コンストラクトを遺伝子に組み込むノックダウン法は近年開発され、化学合成法やダイサー法 (in vitro 法) ではできない長期の解析機会が得られ、非分裂細胞や初代培養細胞でも効率よく導入できる利点がある。

初代培養のヒトメラノサイトは、培養条件によって、その形態、色素産生能が変化し、さらにポリクローナルに様々なフェノタイプを示しながら増殖する。しかも、メラニンを大量に産生しつつ増殖能が比較的低い状態では神経系の細胞と同様

にトランスフェクション効率は極めて低い。

今回、このような理由からレンチウイルスによる RNAi を試みたが、ヒト真皮線維芽細胞に比べてメラノサイトのノックダウン効率は低く、化学合成 siRNA で得られた最も高い 70-80% のノックダウン効率を得ることはできなかった。

今後更に、レンチウイルスの細胞当たり感染数増加、メラノサイト特異的なプロモーター (MITF) によるコンストラクト駆動、同時に組み込まれる hygromycin-B によるノックダウン細胞のセレクトショナルなクローニングなどの手法追加が必要と考えられた。

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 adenylyl cyclase の活性制御が近年報告されている²⁾。

メラノサイトでは、MSH レセプターへの α MSH の結合による adenylyl 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。

昨年度、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 adenylyl 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。

今回の結果では、外部刺激によって cAMP シグナルを活性化させると、NF1 ノックダウンメラノサイトではコントロール細胞に比べて高い増殖反応を示すことが示唆された。しかし、真皮からの成長因子刺激によってカフェオレ斑が形成される仮説に反して、SCF 添加時は NF1 ノックダウン細胞の増殖はむしろ抑制された。

メラノサイト自身の NF1 発現低下による細胞増殖促進のシグナルは未解明である。NF1 ノックダ

ウンメラノサイトにおいては、non-RAS シグナルとして neurofibromin の減少が adenylyl cyclase 活性の低下を引き起こし cAMP シグナルが抑制されていると考えられるにもかかわらず、MSH などの細胞外からの cAMP 刺激による cAMP シグナル活性化によって NF1 ノックダウンメラノサイトでは強い増殖が引き起こされる。このようなシグナリングとカフェオレ斑発症機序との関わりを明らかにする必要がある。

今回、NF1 ノックダウン細胞における RAS の持続的活性化はみられなかったが、数分～数 10 分の短い時間経過で、RAS activator 刺激下の変化をコントロールと NF1 ノックダウンメラノサイトに比較検討する必要があると既に当班会議のメンバーから指摘されており、今後この点についても、レンチウイルスによる安定した NF1 ノックダウンメラノサイト実験系を確立した上で、更に解析を続けていく予定である。

参考文献

- 1) Schepper SD, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert J-M. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type1: an over view. Pigment Cell Res 18:13-24, 2004
- 2) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. Nature Neurosci 5: 95-96, 2002

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

IAI. 3B プロモーターを用いたNF 1 に対する遺伝子治療に関する研究

研究協力者 濱 田 雄 行 愛媛大学医学部産婦人科講師

研究要旨

IAI. 3B 遺伝子は、卵巣癌胸腔転移細胞蛋白高分子量領域を抗原として作成された monoclonal 抗体を用いて卵巣癌の cDNA ライブラリーよりクローニングされた遺伝子で、その遺伝子発現およびプロモーター活性、さらにこのプロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI. 3B は卵巣癌特異性が非常に高い。今回、NF1 細胞株において、このプロモーター活性を検討し、その AdE3-IAI. 3B の NF1 に対する抗腫瘍効果を検討した。細胞株は、NF1 患者より樹立された NF2 および NF3 よりクローニングした NF3-1、NF3-2、NF3-3、malignant triton tumor から樹立された MTT 細胞を用いた。IAI. 3B プロモーター活性は、SV40 を 1 とすると、NF2 (46 ± 0.2)、NF3-1 (8 ± 0.1)、NF3-2 (26 ± 1.2)、NF3-3 (16 ± 2.6)、MTT (11 ± 0.7) とコントロールの HUVEC (0.5 ± 0.2) に比較して非常に高い活性を示した。また、これらの値は一般的な悪性腫瘍マーカーとして知られ、プロモーター活性も高いとされている cox-2 あるいは midkine プロモーターとほぼ同様であった。アデノウイルス E1A プロモーターを IAI. 3B プロモーターと置換した AdE3-IAI3B は、in vitro においてコントロールの HUVEC に比べ高い増殖抑制効果を示した。これらの細胞株の内ヌードマウスに腫瘍形成能を有するのは、NF3-1、NF3-2、NF3-3 であり、最も腫瘍形成能が高いのは NF3-3 であった。このため、NF3-3 について AdE3-IAI3B は、高い抗腫瘍活性を示し、30 日後には 98% の腫瘍退縮が認められた。以上により、IAI. 3B プロモーターを用いたオンコリティックアデノウイルスによる遺伝子治療は、NF1 に対して有力な治療法となることが示唆された。

A. 研究目的

NF1 に対する治療法は、手術療法以外特に未だ有用なものは無い。多くの部位に腫瘍を発生する

NF1 に対してすべて手術療法で対処するのは、患者の QOL あるいはコンプライアンスにおいて限界があり、新たな治療法の開発が望まれる。NF1 は、NF1 遺伝子異常によって引き起こされる遺伝

子疾患であるが、NF1 は非常に長い遺伝子であり、この遺伝子自体がまだクローニングされておらず、また、これを導入したウイルスベクターによる遺伝子治療は、その免疫原性により感染が抑制されることから、NF1 遺伝子導入による遺伝子治療は、現況において不可能である。最近、制限増殖型の悪性腫瘍のみ増幅し、ウイルスそのものの細胞融解作用を利用して悪性腫瘍の腫瘍退縮を誘導する遺伝子治療が、基礎実験ならびに臨床試験において多く報告されている。我々は、卵巣癌胸腔転移の高分子領域蛋白に対する抗体から卵巣癌の cDNA ライブラリーからクローニングされた IAI. 3B 遺伝子プロモーターをクローニングした。このプロモーターは、卵巣癌特異性が高く、そのプロモーター活性は卵巣癌に著しく高い。このプロモーターをさらにアデノウイルス E1A プロモーターと置換したオンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI. 3B を作成すると、このオンコリティックアデノウイルスは卵巣癌特異的に非常に高い抗腫瘍活性を示す(Cancer Research, Hamada et al., 2003)。さらに最近、このプロモーターは卵巣癌のみならず腺癌を中心とした悪性腫瘍に対しても高い活性を示すことが明らかとなり、今回 NF1 に対しても同様に IAI. 3B プロモーター活性を測定し、そのオンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI. 3B について抗腫瘍活性を検討し、あらたな NF1 に対する治療法としての可能性について検討した。

B. 研究方法

NF1 腫瘍細胞 NF2、NF3、MTT(malignant triton tumor) は、筑波大学皮膚科において十分なインフォームドコンセントのもとに患者腫瘍より得られ

たものである。NF3 に関しては、継代培養を行うことによりさらに NF3-1、NF3-2、NF3-3 の各細胞のクローニングを行った。NF3-1、NF3-2 および NF3-3 細胞は、ヌードマウスにおける腫瘍形成能を有し、in vivo の実験に用いた。

IAI. 3B プロモーター活性は、dual luciferase assay kit (promega) により行った。In vitro における増殖抑制実験は、12 well plate に各 well に 5000 個ずつ NF1 細胞を入れ、AdE3-IAI. 3B さらに replicative アデノウイルス AdE3 を対照として 14 日後に cell count assay により検討した。ヌードマウスにおける腫瘍形成能を検討したところ、NF3-1、NF3-2、NF3-3 のみ腫瘍形成能を有し、そのなかで NF3-3 が最も高い腫瘍形成能を有した。このため、NF3-3 をヌードマウスにおける実験に供した。1x10⁷ 個の NF3-3 細胞をヌードマウス皮下に移植し、5~8mm の腫瘍形成した後に、AdE3-IAI. 3B を 1010PFU 腫瘍内注射を毎日 6 日間行った。腫瘍は、4 日毎に測定し、30 日間経過観察した。

(倫理面への配慮)

NF1 腫瘍細胞 NF2、NF3、MTT(malignant triton tumor) は、筑波大学皮膚科において十分なインフォームドコンセントのもとに患者腫瘍より得られたものであり、動物実験は愛媛大学医学部動物実験管理規定にのっとり許可を得た後、実験動物に対しては動物愛護上の配慮行い実験を行った。

C. 研究結果

IAI. 3B プロモーター活性は、SV40 を 1 とすると、NF2 (46±0.2)、NF3-1 (8±0.1)、NF3-2 (26±1.2)、NF3-3 (16±2.6)、MTT (11±0.7) とコ

ントロールの HUVEC (0.5 ± 0.2) に比較して非常に高い活性を示した。また、これらの値は一般的な悪性腫瘍マーカーとして知られ、プロモーター活性も高いとされている *cox-2* あるいは *midkine* プロモーターとほぼ同様であった。AdE3-IAI3B は、*in vitro* においてその IC50 は NF2 0.08MOI、NF3-1 (0.016MOI)、NF3-2 (0.07MOI)、NF3-3 (0.019MOI)、MTT (0.19MOI) と NF1 細胞において特異的に増殖抑制し、一方コントロールの HUVEC においては 14MOI とコントロールの 100~1000 倍の高い抗腫瘍活性を示した。NF3-3 について、AdE3-IAI3B は、高い抗腫瘍活性を示し、6 回腫瘍内連日投与により 30 日後には 98% の腫瘍退縮が認められた。

D. 考察

IAI. 3B プロモーターは、卵巣癌のみならず、NF1 においても高い活性を示すことが明らかとなった。IAI. 3B プロモーター導入オンコリティックアデノウイルス AdE3-IAI. 3B は、卵巣癌のみならず NF1 においても高い抗腫瘍効果を示し、局所腫瘍内注射で治療可能となることが明らかとなった。こうした保存的治療法が確立することは、従来の手術療法にくらべ患者の QOL において非常に意義のあることといえる。一方、6 回の腫瘍内投与においても完全腫瘍退縮に至らないことから、今後は、さらなる抗腫瘍効果の亢進とともに投与回数の減少のため、さらなるベクターの改良が必要になるものと思われる。

E. 結論

IAI. 3B プロモーターを用いた遺伝子治療は、NF1 に対して有効な治療法となりうることが明らかとなった。

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

神経線維腫細胞に対する tumor necrosis factor alpha の増殖能への影響に
関する研究

分担研究者 大塚 藤 男 筑波大学臨床医学系皮膚科教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型 (NF-1) における, 多発する神経線維腫や神経堤腫瘍の発生および増殖には何らかのホルモンや増殖因子が関与していると考えられるが, 現在まで神経線維腫細胞に対し増殖を促進する因子に関してはあまり検索されていない. 本研究では神経線維腫の増殖促進ないし抑制因子を検索する目的で, 各種サイトカインにて培養神経線維腫細胞を刺激し検討した. 一般に細胞増殖を抑制する蛋白と考えられている tumor necrosis factor alpha (TNF- α)にて, 神経線維腫培養細胞が刺激濃度依存性, 刺激時間依存性に増殖した. また, 抗 TNF- α receptor 抗体を TNF- α と同時投与したところ, 増殖が抑制された. これらの結果はリウマチ患者等の治療で既に臨床応用されている infliximab のような抗 TNF- α 薬剤による治療が神経線維腫症にも適用される可能性を示唆する.

中村泰大, 高橋毅法, 許 雪珠, 川内康弘

筑波大学臨床医学系皮膚科

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF-1) はカフェオレ斑, 多発する皮膚神経線維腫 (NF) や中枢神経腫瘍が特徴であることは周知であるが, その増殖制御因子として何らかのホルモンや成長因子がその増殖の促進ないし抑制に関与すると考えられる. 腫瘍増殖を抑制する因子を検索するためにいくつかの因子で NF 培養細胞を刺激したところ, 偶然にも tumor necrosis factor alpha (以下 TNF- α)で

の刺激時に NF 細胞が増殖することを見出した.

そこで本研究では NF 培養細胞を用いて, TNF- α の増殖能への影響について検討した.

B. 研究方法

1. NF 培養細胞の作成

①NF-1 患者 3 名より採取した NF をメスで細切し,
0.02%trypsin , 200U/ml DNase , 0.15g/ml

collagenase (Sigma) 含有 RPMI1640 で 2 時間 37°C 培養。

② 遠沈後、5%FBS RPMI1640 で攪拌し single cell suspension を回収して再び遠沈。得られた細胞を抗生剤・抗真菌剤含有 5% FBS RPMI1640 を用い type I collagen-coated plate 上で培養し、継代を重ねる。NF 細胞の同定は S-100 染色で陽性を確認。

2. MTT colorimetric bioassay

① NF 細胞および他の cell line (G361, MCF-7, HSC-1) にて増殖効果の有無をみるため、各種培養細胞を 24well dish に均等に撒布。

② 種々のサイトカインでの増殖効果の有無をみるため、TNF- α および他のサイトカイン (EGF, IGF-I, bFGF, NGF) にて種々の濃度で 7 日間刺激。刺激後、細胞を MTT で標識し、micro plate reader で 570nm にて細胞数を計測。

3. Cell cycle analysis

① おおの 1 \times 10⁶ 個の細胞を 70%エタノールで固定。

② Rnase および PI にて処理し、10 分間室温で incubate。

③ FACS scan と Modifit software で解析。

C. 研究結果

1. MTT colorimetric bioassay にて、NF 細胞は TNF- α の刺激濃度依存性に増殖した。一方、EGF, IGF-1, bFGF, NGF では種々の濃度で刺激しても NF 細胞の増殖は見られなかった (図 1)。

2. MTT colorimetric bioassay にて、NF 細胞以外の G361, MCF-7, HSC-1 では種々の濃度でも増殖は見られなかった (図 2)。

3. NF 細胞を TNF- α で 10 日間刺激したところ、NF 細胞は時間依存性に増殖した。一方、G361 では増殖がみられなかった (図 3)。

4. NF 細胞における TNF- α と抗 TNF- α レセプター抗体による阻害効果については TNF- α 単独の刺激に比べて、抗体を同時投与した場合、有意に増殖抑制効果がみられた。抗体のみでは増殖抑制はみられなかった (図 4)。

5. Cell cycle analysis では、NF 細胞において、48 時間で S 期の細胞はもとのパーセンテージに戻っています。TNF- α 未刺激の NF 細胞および TNF- α で刺激した G361, MCF-7, HSC-1 では各周期の細胞のパーセンテージに全く変化はなかった。

D. 考察

TNF- α は 157 アミノ酸から成る 17kDa の蛋白で、ヒトでは 6 番染色体にコードされている。1984 年当初は細胞増殖を抑制するサイトカインとして発見されたが、次第に増殖抑制のみならず、細胞特異性に細胞増殖・分化、炎症等に関与することが明らかとなってきた。一般に TNF- α が細胞膜表面の TNF- α レセプター 1 に付着することで、①カスパーゼ系が活性化してアポトーシスを誘導する経路と②NF κ B および MAP キナーゼ系が活性化して細胞増殖を誘導する 2 経路が解明されている。このように TNF- α の役割およびそのメカニズムが次第に明らかになってきたにもかかわらず、

細胞特異性にアポトーシスと細胞増殖という相対する機能がどのようなメカニズムで選択的に働くかは詳細不明である。

本研究では NF 細胞に対しては増殖促進効果があり、今後シグナル伝達経路に関して、western blot 等を予定している。

E. 結論

TNF- α にて NF 細胞が濃度依存性、刺激時間依存性に増殖することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大塚藤男：神経線維腫症 1 型、日本皮膚科学会雑誌、115, 843-847, 2005
- 2) 大塚藤男、他：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, 1003-1007, 2005

2. 学会発表

- 1) The growth regulation of neurofibroma cells by tumor necrosis factor alpha
Yasuhiro Nakamura, Takenori Takahashi, Xuezhu Xu, Yasuhiro Kawachi, Fujio Otsuka
The Society for Investigative Dermatology Annual meeting (May 3-6, 2006 Philadelphia)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 NF細胞に対する種々のサイトカインの増殖効果

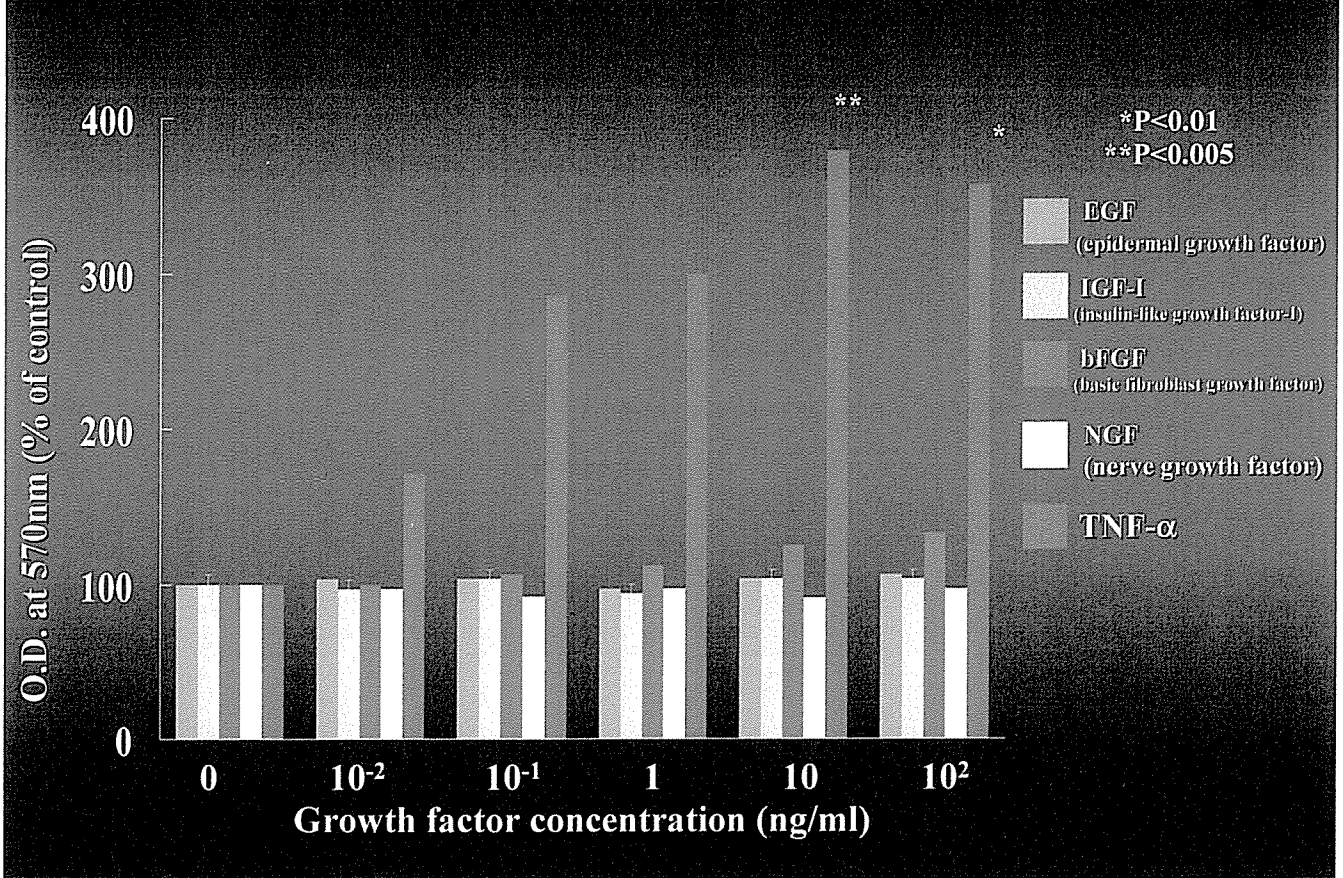


図2 種々の培養細胞に対するTNF-αの増殖効果

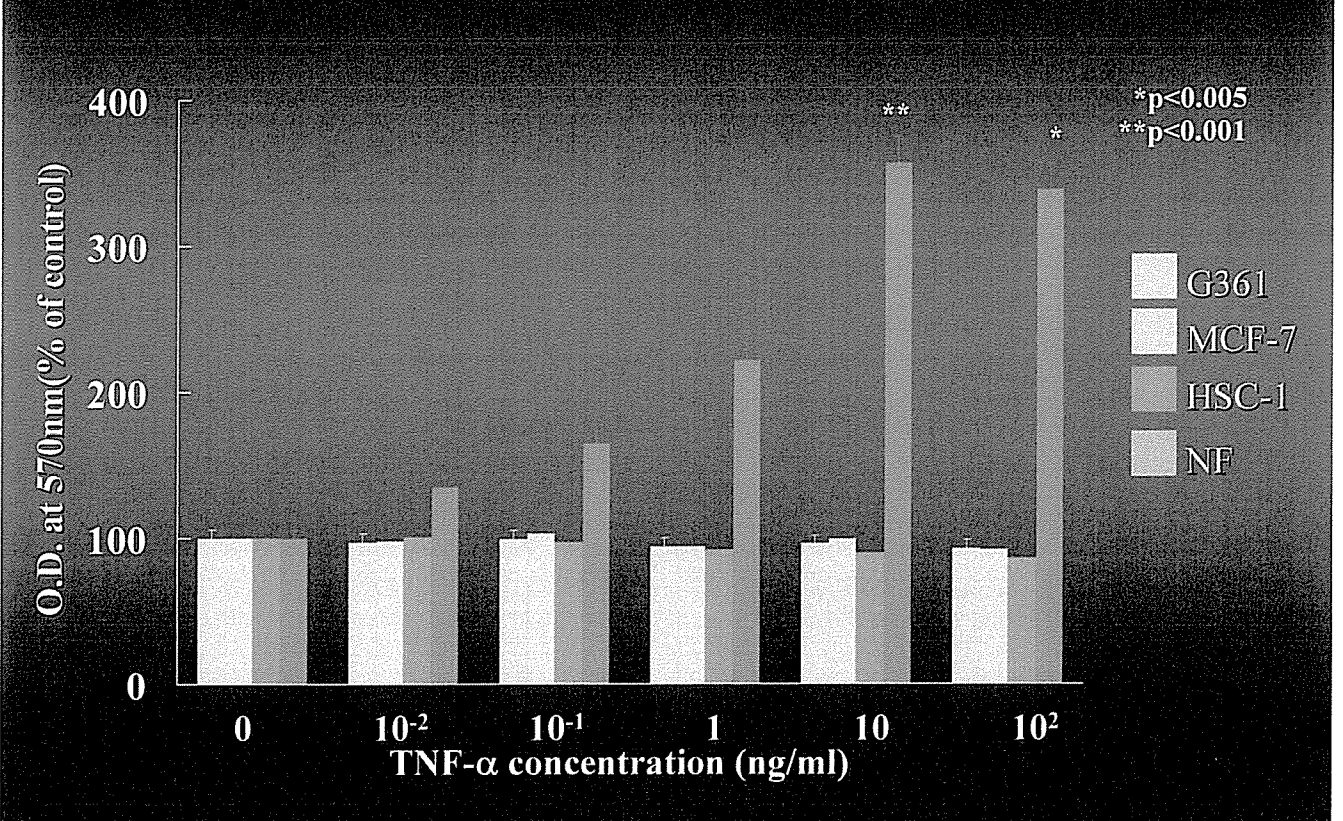


図3 TNF- α 刺激後のNF細胞増殖の経時的変化

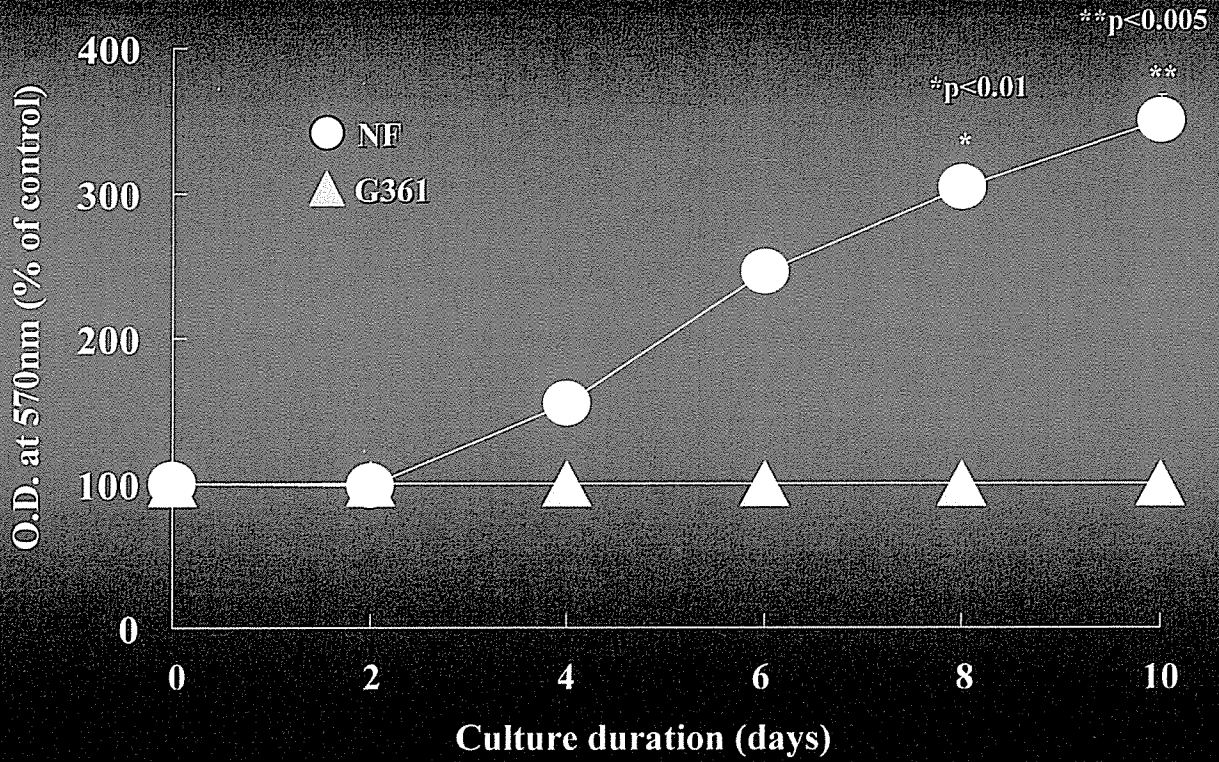


図4 TNF- α のNF細胞刺激への抗TNF- α の増殖阻害効果

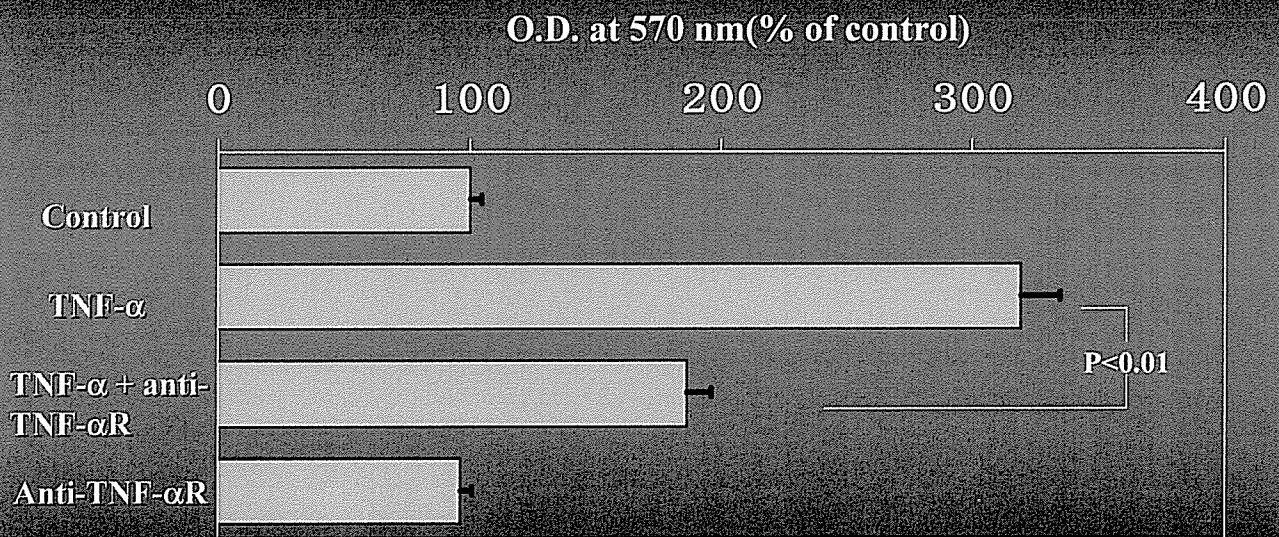
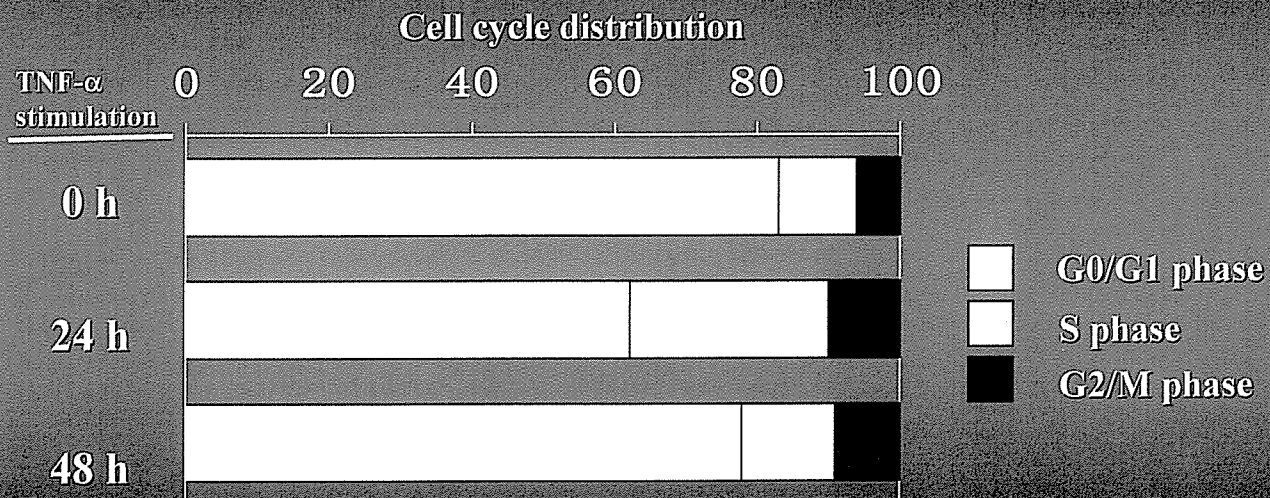


図5 NF細胞の細胞周期に対するTNF- α の刺激効果



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

超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への γ インターフェロン遺伝子の導入と
増殖抑制効果の検討

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

現在、超音波は治療医学として注目されており、我々は *in vitro* での超音波による高率遺伝子導入システムの研究をおこなってきた。また、以前より神経線維腫症 I 型 (NF I) の神経線維腫に対して γ インターフェロン (γ IFN) の腫瘍の抑制効果の検討を行い、リポフェクタミンを用いた遺伝子導入では腫瘍増殖抑制効果を確認、報告した。今回、より安全で *vivo* への応用可能な超音波を用いてヒト神経線維腫細胞に γ IFN の遺伝子を導入し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。ヒト神経線維腫細胞への pEGFP-N1 の導入では、電圧出力 0.15, 0.44 W/cm² で細胞へのダメージはほとんど認めず、導入率はそれぞれ 8.5, 9.1%であった。 γ IFN の遺伝子の導入では、対照群に比して増殖率が低下することが確認された。この方法は NF I 患者の神経線維腫の外科的切除以外の治療法になり得る可能性が示唆された。

山口和記 福岡大学医学部皮膚科
Loreto B. Feril, Jr. 同 解剖学助手
吉田雄一 鳥取大学医学部皮膚科助教授
立花克郎 福岡大学医学部解剖学教授

究をおこなってきた。今回、NF I 患者の神経線維腫に対する超音波を用いた遺伝子治療の臨床応用の可能性を検討した。超音波機器を使用してヒト神経線維腫細胞に pEGFP-N1 を導入し、超音波機器の電圧、照射時間、細胞濃度、遺伝子濃度等を変更し、高率に遺伝子導入する最適条件を検討した（実験 1）。また、我々はヒト神経線維腫細胞にリポフェクタミンを用いて γ IFN の遺伝子を導入し細胞の増殖抑制効果を確認、報告したが、今回、超音波を用いて γ IFN の遺伝子を導入し、細胞増

A. 研究目的

近年、超音波は診断のみならず治療医学として注目されており、我々は *in vitro* での超音波生体作用、超音波による高率遺伝子導入システムの研

殖抑制効果を検討した（実験2）。

B. 研究方法

実験1

細胞：NF1患者（37歳、女性）の神経線維腫を直径2～3mmに細断し、CO₂インキュベータ（37℃、5%CO₂/95%air）に24時間置いた。24時間後、培養液[MEM(Gibco)に10%FBS(Gibco)と1%PSA(Cascade Biologics)]を加え、その後は3日おきに培養液を交換した。14日間この状態で細胞を増殖し、trypsinを用いて細胞を剥離しOptiCell(BioCrystal, Ltd.)の一側面に播種した。OptiCellは標準マイクロプレートサイズフレーム内に2つの光学的にクリアなガス透過性生着面を持ち、その間の細胞培養エリアは滅菌の上、シールされている。内部及び内容物には自己シール性のアクセスポートにより無菌操作が可能で、細胞増殖、顕微鏡観察、選別、分離、細胞トランスフェクション(遺伝子導入)などに利用できる。

超音波照射方法：培養したヒト神経線維腫細胞を $2.0\sim 7.0\times 10^5$ /mlの濃度でOptiCellの一側面に播種させた後、48時間CO₂インキュベータ内で培養し、OptiCellの面積比で90%以上増殖させた。様々な出力設定が可能な超音波出力機器(SonoPore KTAC-4000, NepaGene)を用いて、最下層に個別に4つの出力端子を備えたトランスデューサーを、その上層に超音波伝播用のパッド(ESTEK)を設置した。その上層に播種させた面を上にしてOptiCellを置き、最上層に超音波吸収用のパッド(ESTEK)を設置した。ヒト神経線維腫細胞を面積比で90%以上増殖させたOptiCellにpEGFP-N1を100μg、超音波造影剤(Optison, Amershal Health)を100μl注入し、この装置を用いて様々な出力設

定下で超音波を照射した。出力設定は、周波数1.011MHz、出力電圧0.15, 0.44, 0.64W/cm²、出力周期0.5Hz、デューティー比25%、出力期間10～40秒で行った。24時間後pEGFP-N1が導入された細胞を蛍光顕微鏡(LEICA DMI 4000B, Leica Microsystems)で観察した。評価方法はそれぞれの出力設定における一視野(x200)あたりの染色された細胞数と全細胞数の比率を測定することによりおこなった。

実験2

細胞：実験1と同様。

超音波照射方法：ヒト神経線維腫細胞を 2.0×10^5 /mlの濃度でOptiCellの一側面に播種させた後、48時間CO₂インキュベータ内で培養し、OptiCellの面積比で約50%に増殖させた。実験1と同様のセッティングを用いて、γIFN発現プラスミドを100μg、Optisonを100μl注入し、超音波を照射した。出力設定は、周波数1.011MHz、出力電圧0.44W/cm²、出力周期0.5Hz、デューティー比25%、出力期間10～40秒で行った。Control(Optisonなし、超音波非照射)、US(Optison100μlと超音波照射)、γIFN(γIFN発現プラスミド100μgのみで超音波照射なし)を対照とした。評価方法は一視野(x200)あたりの細胞数を測定することによりおこなった。

C. 研究結果と考察

実験1

導入された細胞が蛍光顕微鏡で観察された。出力電圧0.64W/cm²、出力期間10秒の条件で、最も高率(12.3%)に導入された(図1)。しかしこの条件下では細胞へのダメージが強く60%の細胞に壊死を認めた。一方、出力電圧0.15, 0.44W/cm²で

は導入率は最も高率な値でそれぞれ 8.5, 9.1%であったが、細胞へのダメージはほとんど認めなかった。

実験 2

γ IFN 発現プラスミドと超音波を用いた方法では US (Optison 100 μ l と超音波照射) より増殖率が低下することが確認された(図 2)。Control (操作なし) と γ IFN (γ IFN 発現プラスミド 100 μ g のみで超音波照射なし) の増殖率は US と同様な傾向を認めた。今後、これらの結果を確実に証明するために、ELISA やフローサイトメトリー等、追加実験を予定している。

D. 結論

超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への γ IFN の遺伝子導入は細胞の増殖率を抑制することが確認され、この方法は NF I 患者の神経線維腫の外科的切除以外の治療法になり得る可能性が示唆された。

E. 研究発表

学会発表

- 2006 年度 第 1 回ソノポーレーション研究会
(2006 年 7 月 15 日 福岡市)
超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への Gene Transfection
山口 和記^{1,2}, Loreto B Feril², 立花 克郎², 中山 樹一郎¹
福岡大学医学部¹皮膚科、²解剖学
- 6Th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (30th August - 2nd September, 2006 Oxford, UK)

In vivo-simulated Sonotransfection and the Effect of Gamma Interferon Gene on Neurofibroma Proliferation

Kazuki Yamaguchi^{1,2}, Loreto B Feril¹, Yuichi Yoshida², Katsuro Tachibana¹ and Juichiro Nakayama²

¹Department of Anatomy and ²Department of Dermatology, Fukuoka University School of Medicine

- 2006 年度 第 3 回ソノポーレーション研究会
(2007 年 1 月 13 日 福岡市)

超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への Gamma Interferon Gene Transfection と増殖抑制効果の検討

山口和記^{1,2}, Loreto B. Feril¹, Jr.², 立花克郎², 中山樹一郎¹

福岡大学医学部¹皮膚科、²解剖学

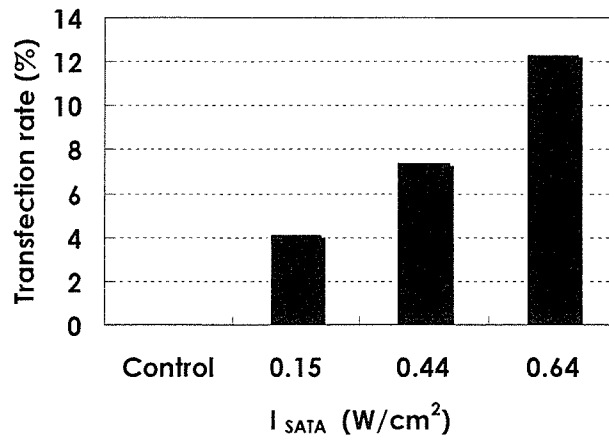


Figure 1 Transfection rates 48 hr post US, 10 sec duration. The transfection rates were calculated at 48 hr after the sonication.

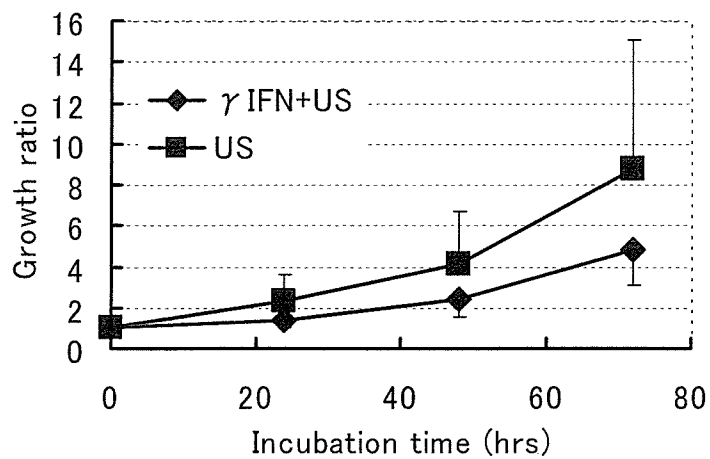


Figure 2 Effect of transfected γ IFN on cell growth. The growth ratios were calculated at 24, 48 and 72 hr after the sonication. The growth ratio of γ IFN + US was lower than US, while US alone did not show any significant difference with the untreated cells (data not shown).