

図1 転写、TCRにおけるCSA、CSBの機能

SWI/SNFファミリーに属しATPアーゼ活性をもつCSBは、クロマチンリモデリング活性や転写伸長を促進する活性をもつ。RNAポリメラーゼII α が転写鎖上のDNA損傷部位で転写伸長を停止すると、CSBやTFIIFの機能依存性に、CSAユビキチンリガラー複合体がRNAポリメラーゼII α 停止部位にリクルートされる。ついで、CSA複合体はRNAポリメラーゼII α をユビキチン化する。さらに、CSBもユビキチン化され、プロテアソーム系により分解される。そのことでTCRが進行し、損傷が取り除かれ、転写が再開すると考えられている。

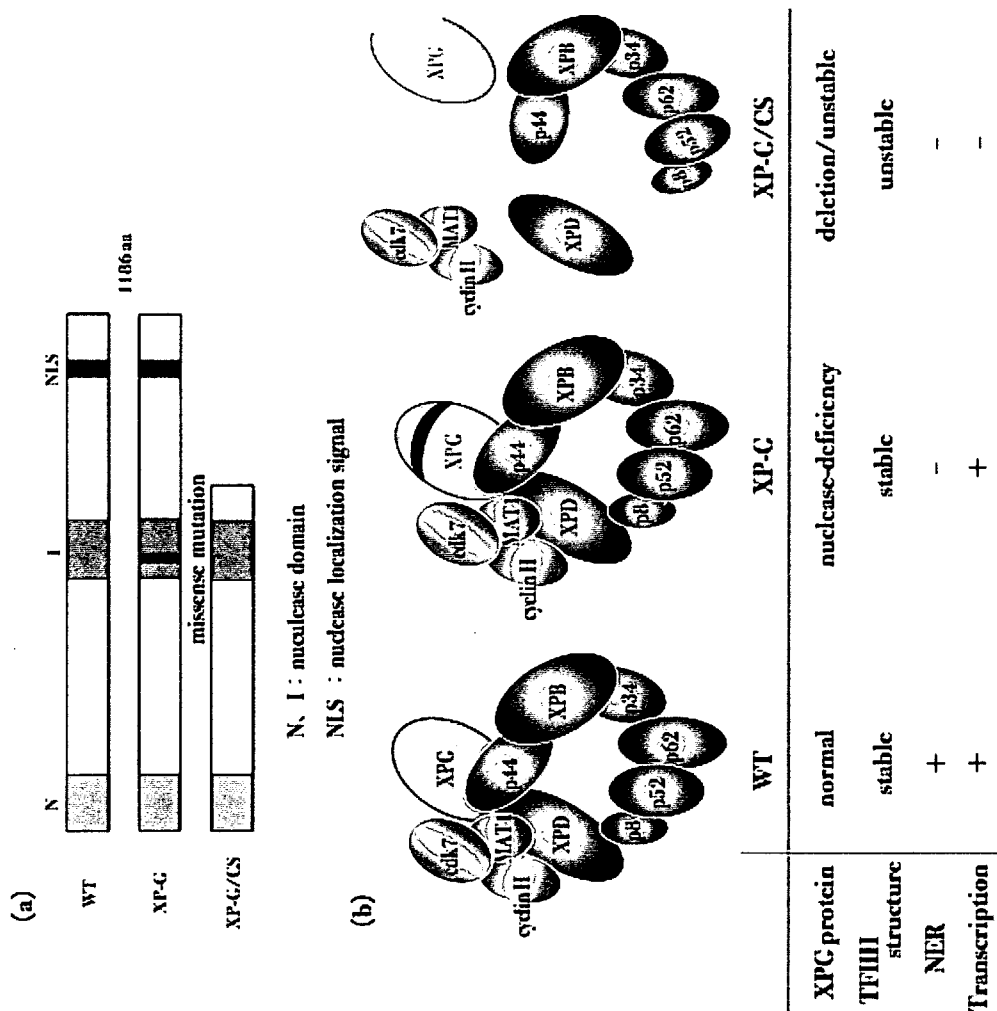


図2 XPGはTFIIHを安定化する

(a) XPGは1,186アミノ酸から成る蛋白質で、2つのヌクレアーゼ活性ドメイン(NとI)とNLSをもつ。XP症状のみを示すXP-G患者はミスセンス変異をもつものに対し、XP-G/CS患者はXPG蛋白質に欠失変異をもつ。この欠失変異がCS発症の原因と考えられる。ヌクレアーゼ活性ドメインにミスセンス変異を持ったXPGはヌクレアーゼ活性を損なう。

(b) 野生型 XPGはTFIIHと安定な複合体を形成し、TFIIH構造を維持する(左図)。XP-G患者に見られるミスセンス変異をもつXPGは、野生型XPGと同様にTFIIHと複合体を形成し、TFIIH安定化機能を維持している。しかし、ヌクレアーゼ活性に欠損をもつため、NERに異常をもち、XP発症に至る(中央図)。XP-G/CS患者に見られる欠失変異をもつXPGは、TFIIHと複合体形成できず、XPDとCAKがTFIIHコア複合体から解離する(右図)。部分的に崩壊したTFIIHは、NERのみならず、転写機構の異常を伴い、CS発症に至ると考えられる。

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

ヌクレオチド除去修復における
色素性乾皮症遺伝子産物の機能と診断への応用

分担研究者 菅 澤 薫 神戸大学自然科学系先端融合研究環
バイオシグナル研究センター教授

研究要旨

色素性乾皮症（XP）の遺伝的相補性群のうち、C群とE群の原因遺伝子産物はヌクレオチド除去修復機構においてDNA損傷の認識に関わる重要な因子である。国内におけるこれらXP相補性群の実態把握に寄与する目的で、患者細胞におけるXPC遺伝子の突然変異を同定するためのシステムを構築すると共に、E群の簡便な診断法の開発を目指してXPCタンパク質のユビキチン化を指標とした解析を進めている。

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）の遺伝的相補性群のうち、ヌクレオチド除去修復の損傷認識段階に欠損を示すC群、E群について、国内における変異アリの解析、および簡便な診断法の開発を目指す。XP-C群については欧米を中心に多数の変異が同定されているが、国内の患者については報告がなく、実態の把握が必要である。またXP-E群はDNA修復活性の欠損がマイルドであることから、従来その同定が容易ではなく、簡便な診断法の開発が望まれている。

B. 研究方法

国内のXP-C群患者由来の培養細胞からゲノム

DNAを調製し、XPC遺伝子を構成する16のエクソンとその前後のイントロンの一部を含む領域をそれぞれPCR増幅して、直接シーケンス法により変異の同定を行った（図1）。また、同じ患者細胞から全RNAを調製し、RT-PCR法によるXPC全長cDNAの増幅と塩基配列の決定、およびリアルタイムRT-PCR法によるXPC mRNAの定量解析を行った。さらに、XP-E群細胞で特異的に見られるXPCタンパク質のユビキチン化欠損についてウエスタンブロット法による解析を進めた。

これまでのところ、国内のXP患者由来の細胞としては細胞バンク等から入手可能な樹立細胞株を使用しており、研究倫理面での問題は特にないと考えている。

C. 研究結果及び考察

これまで国内の XP-C 群細胞について変異解析はなされていなかったが、今回 1 例 (XP4KA) について、欧米では報告されていない新しいタイプの変異アレル (フレームシフト変異) を同定した。また他の 2 例の患者細胞については、低レベルながら全長 XPC タンパク質が発現されていることをウエスタンブロットにより確認している。これは欧米の XP-C 群患者細胞では非常に稀なケースであり、国内の XP-C 群に特異的な変異アレルの存在が推察される。

XP のなかでも E 群は臨床症状、および DNA 修復能の欠損がマイルドであるために従来から診断が困難とされ、潜在的な患者が存在する可能性が考えられる。我々は、細胞に紫外線を照射した際に XPC タンパク質がユビキチン化を受けること、このユビキチン化が XP-E 群細胞で特異的に欠損していることを見出している (図 2)。このユビキチン化を指標とした E 群の簡便な診断法について、現在検討を進めている。

D. 結論

XPC 遺伝子については、各エクソンを含む領域と全長 cDNA の PCR 増幅とその配列決定、および mRNA の定量解析を行うシステムがほぼ確立された。XP-E 群については実際の症例が少ないため、XPC タンパク質のユビキチン化を指標とした診断の有効性についてはさらに検討が必要と思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasuda, G., Nishi, R., Watanabe, E., Mori, T.,

Iwai, S., Orioli, D., Stefanini, M., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: In vivo destabilization and functional defects of the xeroderma pigmentosum C protein caused by a pathogenic missense mutation. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6606-6614 (2007).

2. Sugasawa, K. and Hanaoka, F.: Sensing of DNA damage by XPC/Rad4: one protein for many lesions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 887-888 (2007).

3. Sugasawa, K.: XPC: its product and biological roles. in "Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum" (Ahmad, S. I. & Hanaoka, F. eds., Landes Biosciences) published online (2007).

4. Sugasawa, K.: Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* in press (2008).

2. 学会発表

1. Sugasawa, K.: Molecular mechanism of nucleotide excision repair as a defense against cancer. International Conference on Cellular Responses to DNA Damage, Hsin-Chu, Taiwan, Apr. (2007).

2. Sugasawa, K.: Molecular mechanisms promoting repair of UV-induced DNA damage. The 3rd Japan-US DNA Repair Meeting, Sendai, Japan, May (2007).

3. Sugasawa, K., Nishi, R., and Hanaoka, F.: Repair of UV-induced DNA damage: the molecular mechanism preventing skin cancer. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Symposium on "Genomic

- Instability”, Yokohama, Japan, Oct. (2007).
4. Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: In vivo regulatory mechanism of nucleotide excision repair analyzed by the dynamics of involved proteins. BMB2007, Symposium on “Frontiers of DNA Repair Research”, Yokohama, Japan, Dec. (2007).
 5. Sugasawa, K., Shimura, T., Akagi, J., and Nishi, R.: Damage recognition and ubiquitylation in nucleotide excision repair. BMB2007, Workshop on “Genome Dynamics Regulated by Ubiquitin and Related Modifiers”, Yokohama, Japan, Dec. (2007).

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 XPC遺伝子の各エクソン領域と全長cDNAのPCR増幅

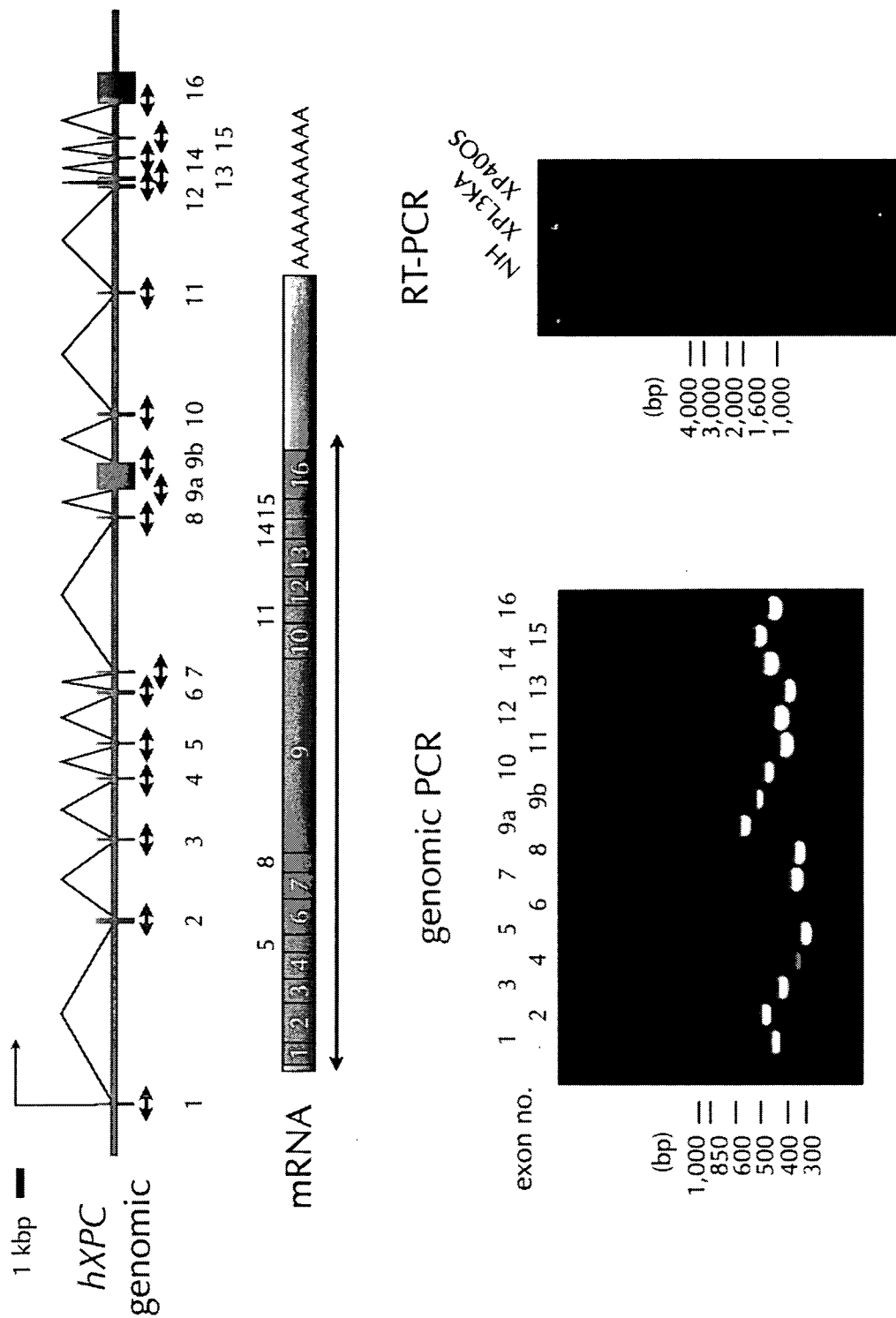
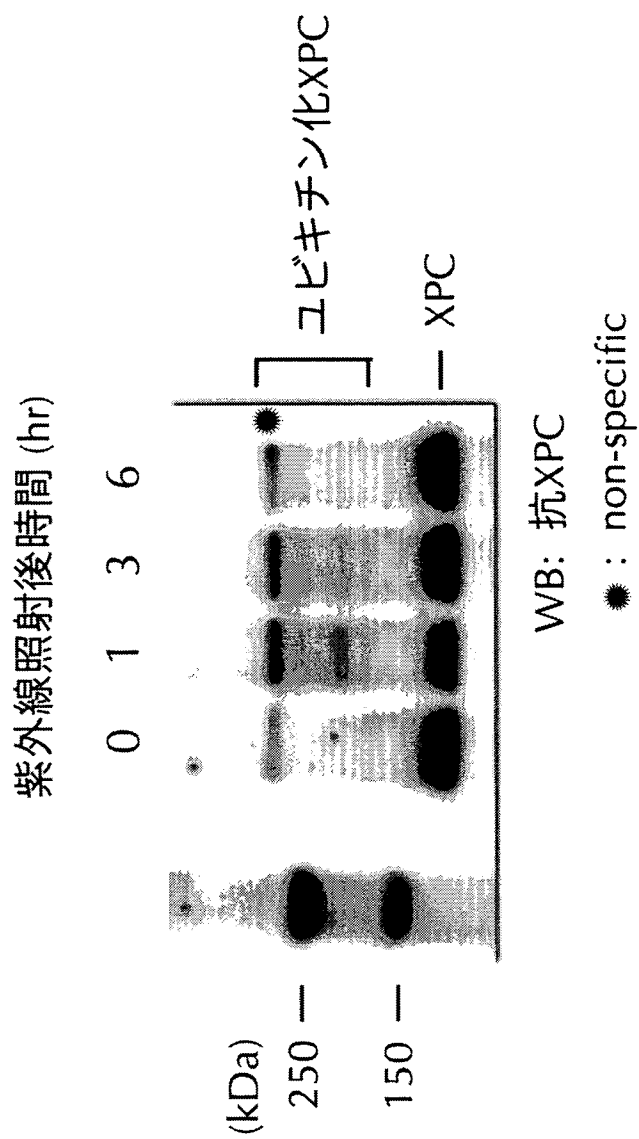


図2 XPEに依存したXPCタンパク質のユビキチン化



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

宿主細胞回復能を指標とした色素性乾皮症患者由来細胞の
酸化的DNA損傷修復能の検討

分担研究者 森 脇 真 一 大阪医科大学皮膚科准教授

研究要旨

本邦にて色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum；XP）に高頻度に合併する原因不明の神経学的異常の分子機構の解明を目指して、酸化的DNA損傷の修復能を定量する系を確立した。ローズベンガル処理と可視光線照射により人工的に酸化的DNA損傷のひとつである8OHdGを誘発したレポータープラスミドの宿主細胞回復能を指標にして、色素性乾皮症、コケイン症候群（Cockayne syndrome；CS）患者由来線維芽細胞（18系統）における酸化的DNA損傷の修復能力を検討した。その結果、XPD群、XPG群、XPA群の一部の細胞では修復能の低下を認めた。しかし、CS細胞、XPD/CS細胞では修復能に異常がみられなかった。この結果はXPA群において酸化的DNA損傷と神経症状との関連を示唆するものである。

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）は常染色体劣性形式で遺伝する高発癌性光線過敏症であり、平成19年3月、神経皮膚症候群に関する調査研究班の対象疾患として新たに加えられた。本邦では諸外国に比べてXP患者の頻度は高く、その内約60%の症例では進行性の神経学的異常が出現するがその原因は不明である。

また、その重症度は患者予後に直結するため、その対応や治療法の早急な確立が必要である。本研究の目的はXP神経症状に関する詳細な臨床所

見を蓄積し、その分子機構を解明し、治療ストラテジーについてのエビデンスを得ることである。本研究年度において分担研究者は新規XP症例の蓄積と、近年XP神経障害との関連が推定されている酸化的DNA損傷に注目して研究を行った。

B. 研究方法

大阪医科大学において、XP（さらにその類縁疾患であるコケイン症候群；CS）の診断センターを維持し、各種DNA修復試験や分子遺伝学的検査を駆使して、全国の医療施設から依頼のあつ

たXP、CS疑い症例の確定診断を行なった。また、XP神経症状との関連が示唆されている酸化的DNA損傷の修復能を検出する鋭敏な系を、レポータープラスミドの宿主細胞回復能を指標にすることで作成を試みた。さらに、同システムを用いて、分担研究者が過去に確定診断し保持している神経症状合併XP患者（XPA 6例、XPD 1例）、非合併XP患者（XPC 2例、XPD 4例、XPF 2例、XPG 1例）、CS患者（古典型CS 2例、XPD/CSコンプレックス1例）由来細胞における酸化的DNA損傷の修復能を健常人由来細胞5例の修復能と比較検討した。

（倫理面への配慮）

上記の研究は大阪医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査会において承認されている。研究はその審査会の基準を遵守し、患者あるいは家族の文書による同意を得た後に施行し、その場合検体は連結可能コード化して取り扱った。個人情報には十分配慮し、検体の保管も厳重に行った。また一部の細胞はすでに論文などで発表されており本研究が長年連結不可能化して保持しているものである。

C. 研究結果

研究期間（平成19年4月～平成20年2月）において、XPなどが疑われ全国の医療施設から紹介された患者に対して分子細胞診断を18例の患者で試みた。その中でXPA 2例、XPV 2例、CS 2例を確定し、さらに4例はXPの疑いが濃厚で現在精査中である。また、XP神経症状との関連が示唆されている酸化的DNA損傷の修復能を細胞レベルで解析する鋭敏なシステムをローズ

ベンガル処理+可視光線（キセノンランプ）照射したルシフェラーゼ発現ベクター含有のレポータープラスミドを細胞に遺伝子導入することで確立した。種々のXP細胞、正常細胞を用いた検討から重篤なXP神経症状が必発するXPA細胞では酸化的DNA損傷（主として8オキシグアニン）に対する修復能が正常細胞における修復能の約40%であり有意に低下しているという所見を得た。XPD細胞でも低下する傾向がみられたが、XP神経症状との関連は見いだせなかった。XPC、XPF、XPG、CS細胞では低下はみられなかった。

D. 健康危険情報

省略

E. 研究発表

邦文

1. 森脇真一：色素性乾皮症 眼でみる遺伝病のターナー症候群 メディアート 印刷中
2. 森脇真一：光線過敏症のスキンケア スキンケア最前線 皮膚科診療最前線シリーズ メディカルレビュー 印刷中
3. 森脇真一：DNA損傷と修復「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティシリーズ（1） 印刷中
4. 森脇真一：防御グッズ「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティシリーズ（1） 印刷中
5. 森脇真一：色素性乾皮症「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティシリーズ（1） 印刷中

6. 森脇真一: コケイン症候群、トリコチオディストロフィ「1冊でわかる光皮膚科」 皮膚科サブスペシャリティーシリーズ(1) 印刷中
 7. 森脇真一: 色素性乾皮症などの遺伝子検索はどこの誰に頼むか? 「1冊でわかる光皮膚科」 皮膚科サブスペシャリティーシリーズ(1) 印刷中
 8. 森脇真一: ポルフィリン症 皮膚疾患最新の治療 2009-2010、印刷中
 9. 森脇真一、高城倫子: 遺伝性光線過敏症 紫外線と皮膚 update Monthly Derma、印刷中
 10. 森脇真一: 色素性乾皮症 看護大事典第2版 医学書院 印刷中
 11. 森脇真一: 色素性乾皮症・コケイン症候群を確定診断するまでの流れ 「Environmental Dermatology〜環境・職業からみた皮膚疾患〜」 皮膚科診療プラクティス第20巻 p62-69 文光堂 2007
 12. 森脇真一、青島正浩: 重症皮膚疾患のフラッグサイン〜皮膚からのシグナルを見逃さない〜色素性乾皮症 Visual Dermatology 6; 1166-1167, 2007
- Ninomiya H, Nanba E, Kondo A, Maegaki Y, Ohno : Mental retardation, spasticity, basal ganglia calcification, cerebral white matter lesions, multiple endocrine defects, telangiectasia and atrophic skin: A new syndrome? Brain & Development, in press.
5. Yoneda K, Moriue J, Matsuoka Y, Moriwaki S, Moriue T, Nakai K, Yokoi I, Nibu N, Demitsu T, Kubota Y : A case of xeroderma pigmentosum complementation G in association with malignant melanoma. Eur J Dermatol, in press
 6. Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, Takigawa M, Inui H, Miyachi Y, Moriwaki S, Nishigori C : Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. J Invest Dermatol 127:1745-1751, 2007

学会発表

国内

英文

1. Moriwaki S, Takahashi Y : Photoaging and DNA repair. J Derm Sci, in press.
 2. Moriwaki S, Kraemer KH : Disorders of DNA repair : Therapy of skin diseases Springer, in press
 3. Tokura Y, Moriwaki S : Photodynamic therapy : Therapy of skin diseases Springer, in press
 4. Saito Y, Toyoshima M, Okai A, Shuo L, Moriwaki S, Yamamoto O, Kanzaki S, Hanaki K, Ninomiya H, Nanba E, Kondo A, Maegaki Y, Ohno : Mental retardation, spasticity, basal ganglia calcification, cerebral white matter lesions, multiple endocrine defects, telangiectasia and atrophic skin: A new syndrome? Brain & Development, in press.
1. 高橋慶人、遠藤洋子、杉山義宣、井上紳太郎、瀧川雅浩、荒尾友美子、古江増隆、森脇真一 高齢で皮膚症状のみを有する色素性乾皮症A群患者にみられた新規遺伝子変異 第33回日本研究皮膚科学会(横浜) 平成19年4月19日
 2. 森脇真一、山下能毅、蓑島伸生 色素性乾皮症に対する出生前診断の実際 第14回日本遺伝子診療学会(松山) 平成19年7月27日
 3. 大坪正史、王春霞、堀田喜裕、中西啓、峯田周幸、森脇真一、中西伸夫、寺尾俊彦、蓑島伸生 遺伝性疾患に関する症状データベース

SYMPHONIE の構築 日本人類遺伝学会第 52 回
大会 平成 19 年 9 月 12 日 (東京)

4. Ohtsubo M, Mitsuyama S, Ito S, Ito F,
Moriwaki S, Shimizu N, Minoshima S
KMccancerDB as a separate cancer database of
MutationView 第 66 回日本癌学会総会 平成
19 年 10 月 3 日 (横浜)
5. 白崎文朗、白崎幸雄、森脇真一 色素性乾皮症
バリエーションの 1 例 北陸地方会 平成 19 年 1
2 月 9 日
6. 森脇真一 出生前診断 第 31 回遺伝カウ
ンセリングリフレッシュセミナー 平成 20 年
1 月 12 日 (大阪)
7. 森脇真一 皮膚科領域の遺伝医療ー色素性乾
皮症を中心にー第 18 回日本臨床化学会近畿
支部総会 (京都) シンポジウム「遺伝子診断
の現状と展望」平成 20 年 2 月 21 日

海外

1. Moriwaki S. DNA repair and skin aging
Symposium; Skin aging 21st World Congress
of Dermatology 2007.10.5 Buenos Aires,
Argentina

F. 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

NF-1 ノックダウンメラノサイトを用いた
カフェオレ斑発症に関連する細胞内シグナルの検討

分担研究者 古村南夫 島根大学医学部皮膚科准教授

研究要旨

カフェオレ斑の分子レベルでの発症機序解明を目的として、培養ヒト皮膚メラノサイトのNF-1をノックダウンし細胞内シグナルの変化を検討した。NF-1ノックダウンによるRas活性の亢進について active-Ras pull down アッセイにて解析したところ、コントロール細胞と比較して、血清添加後のRas活性の有意な上昇は認められなかった。一方、正常メラノサイトのメラニン生成や細胞増殖を促進するcAMPシグナルはneurofibrominのnon-Ras functionの低下によってNF-1ノックダウン細胞で抑制されていた。しかし、NF-1ノックダウン細胞では、cAMPシグナル下流に位置するメラノサイト特異転写因子MITF類似蛋白(MiTF family)のTFEB/TFE3が過剰発現していた。更にその下流で、細胞周期調節蛋白CDK2の発現も亢進するため、メラノサイト刺激ホルモン(MSH)等によりcAMPシグナルが活性化されると、正常細胞に比較して過剰な細胞増殖反応が認められた。しかし、MITFの発現は変わらずメラニン生成は変化しなかった。カフェオレ斑形成機序として、真皮からのsSCFやHGFの過剰分泌に加えて、cAMPシグナルの反応性が変化し表皮内でメラノサイトの増殖が起こり、カフェオレ斑を形成する機序が示唆された。これらの結果は、NF1患者由来培養細胞から得られた従来の知見とも合致し、NF-1ノックダウン細胞を用いた研究がカフェオレ斑発症機序解析の為のモデルとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

カフェオレ斑はNF-1患者のほぼ全員に認められる主徴候である。NF-1変異によるneurofibrominの減少あるいは機能低下によりNF-1の皮膚症状が生じると考えられている。NeurofibrominはRas-

GAP活性による細胞内RASシグナル抑制だけでなくcAMPシグナルも制御することが最近明らかにされた。

これまでの研究で、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における蛋白分解酵素活性の亢進による sSCF の分泌増加や HGF の発現と分泌増加が関与する可能性が報告されている。

NF1 におけるカフェオレ斑の発症機序の一つとして、真皮線維芽細胞からの sSCF、HGF 過剰分泌による表皮メラノサイト過剰増殖に加え、メラノサイトでも 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見出されている。例えば、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体のメラニン生成にも影響を及ぼすことが示唆された。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基礎的な細胞増殖率は NF1 患者由来のメラノサイトで変わらず、RAS 活性の上昇がメラニン生成への直接的に関与することは否定的と考えられている。

NF1 の遺伝子発現レベルとその遺伝子産物である neurofibromin の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してしまう為、患者由来の NF1 変異メラノサイトを用いた培養実験では、NF1 の発現低下に起因する細胞内シグナルの変化についての詳細は全く明らかにされていない¹⁾。

今回我々は、siRNA やレンチウイルス miR RNAi と培養ヒトメラノサイトを用いて、安定的な NF-1 ノックダウン細胞モデルを作製し、細胞内シグナルの修飾について解析し、neurofibromin の機能低下からカフェオレ斑発症に至る発症機序に関連した細胞内シグナルの解明を試みた。

B. 研究方法

培養細胞はヒトメラノサイト培養細胞 (Melanocell メラノセル -正常ヒト表皮メラニン細胞 NHMC、Medium 254+HMGS、クラボウ) および正常ヒト線維芽細胞 (Fibrocell ファイブロセル -正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF (NB) Medium254+LSGS, クラボウ) を使用した。

SiRNA 実験には、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された 3 種類) を合成し、QIAGEN 社の HiPerFect による細胞内導入し、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。更に安定した RNAi を行うために、レンチウイルスを使用した shRNAi 発現システムである、BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System、miR RNAi 発現システムである BLOCK-iT Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System (Invitrogen) を使用してレンチウイルスによる NF-1 ノックダウンを行った。miR RNAi select で NF-1 に特異的なノックダウン配列を 4 種類選択し使用した。

NF-1 の遺伝子レベルでの発現抑制は SYBR GREEN を用い、リアルタイム RT-PCR (ABI prism 7000) 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。

細胞増殖は WST8 および BrdU 取り込みを ELISA キット (Cell Proliferation Biotrak ELISA, GE Healthcare 社) を用いて測定した。MITF 関連蛋白 (MITF、TFE3、TFEB) の発現レベルは特異的プライ

マーを用いてリアルタイム RT-PCR にて確認し、
各々の特異抗体を用いたウェスタンブロットにて
蛋白レベルの発現も確認した。

C. 研究結果

1. 5nM の低濃度にて siRNA の細胞内導入を行い、
ランダム配列のコントロール siRNA と比較して、
導入後 48 時間で、3 種類のいずれの配列でも有
意な NF1 発現レベルの低下 (約 80%) 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。
しかし、従来のトランスフェクションによる
siRNA 導入では長期間の安定した高効率ノック
ダウンが神経細胞と同様にメラノサイトでは難
しい為、レンチウイルス発現系を試みた。SiRNA
の配列を利用した shRNA では MOI-50 以上の高濃
度のウイルス添加で 80% 以上の有意な抑制が得
られたが、効率が悪いため miR RNA によるノッ
クダウンを試みた。MiR RNA NF-1-7575 にて
MOI-10 にて 80% 程度の発現抑制が確認できた。
2. NF1 ノックダウンメラノサイトでは、細胞増殖
能が有意に亢進していたが、基本培地での培養
では、予想に反して細胞内 cAMP レベルの減少が
みられた。さらに、adenylyl cyclase の活性
化作用を示すメラノサイト刺激ホルモン (MSH)
あるいは forskolin の添加後、細胞内 cAMP レベ
ルは有意に上昇したが、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 の増加は
有意に抑制されていた。
3. NF-1 ノックダウンによる Ras 活性の亢進につ
いて active-Ras pull down アッセイにて解析を
行った。コントロール細胞と比較して、血清添

加後の Ras 活性亢進は認められなかった。

4. MSH や forskolin を添加し cAMP 経路を活性化
させ NF-1 ノックダウンメラノサイトの細胞増
殖について検討したところ、cAMP レベルの上昇
はコントロール細胞に比較して低いにもかかわらず、細胞増殖が BrdU 取り込み比でコントロ
ール細胞の 1.5~2 倍程度に亢進していることが
確認された。
5. cAMP によるメラノサイト増殖は MiT family
と呼ばれる 3 種類の bHLH-Zip 転写因子を介し
て CDK 2 の発現上昇により引き起こされる。リ
アルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析によ
って、MiT family のうちメラニン生成と細胞増
殖の両方にかかわる MITF の発現は変わらない
が、主に細胞増殖に関与する TFEB および TFE3
の発現が亢進し、その下流の CDK 2 の発現増加
も確認された。

D. 考察および結論

NF1 遺伝子産物である neurofibromin の機能とし
て RAS シグナルの制御以外に adenylyl cyclase の活
性制御 (non-Ras function) が近年新たに報告され
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 の活性化が 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 MiT family の遺伝子誘導が起こり、メ
ラニン生成機能や細胞の分化・増殖の両方に大きな
影響を与えていることが最近明らかにされた³⁾。

これまでに、我々は NF1 ノックダウンメラノサイ
トを用いた解析で、NF1 ノックダウンによる
neurofibromin の発現低下が non-Ras function 低
下をもたらす adenylyl cyclase 活性を低下させ、

cAMP シグナルを抑制することを確認している。

しかし、cAMP シグナルが細胞増殖とメラニン生成の両方を制御しているメラノサイトにおいて NF-1 をノックダウンした状態で、cAMP シグナルを刺激した場合、cAMP シグナル活性上昇は正常コントロールメラノサイトより有意に低い。しかし、cAMP 刺激によるメラノサイト増殖は正常コントロール細胞より強く起きるとする一見相反する現象が見出され、昨年までの研究結果からは、このパラドックスを説明することが出来なかった。さらに、我々は NF-1 ノックダウンが Ras の活性化を起ささないにもかかわらずメラノサイトの細胞増殖を促進すること、メラニン生成には影響を与えないことをこれまでに確認している。

このパラドックスの機序を明らかにするために、今回、cAMP シグナルの下流において、メラニン生成や細胞増殖にかかわる転写因子である MiT family の発現パターンが NF-1 ノックダウンにより修飾されている可能性について検討した。

その結果、NF-1 ノックダウンが、MiT family の中で TFEB/TFE3 の発現を亢進させ、その下流の CDK2 の遺伝子発現も上昇することが確認された。NF-1 ノックダウンメラノサイトでは、cAMP シグナル活性上昇は低いにもかかわらず、その下流で増殖にかかわる TFEB/TFE3 転写因子の発現が亢進しているため、結果的に強い増殖シグナルが伝えられる可能性が示唆された。また、MITF の発現は変化しないため cAMP 下流のメラニン産生亢進シグナルは活性化されない可能性が考えられた [図]。

MiT family 転写因子発現レベルと neurofibromin の関連については未解明のため今後、さらに検討を加える必要がある。

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
- 3) Eirikur Steingrimsson, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 2004. 38:365-411, 2004

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Minao Furumura, Hitoshi Takahashi, Kunie Kohno, Eishin Morita. Intracellular signal transduction in neurofibromin knockdown melanocytes/fibroblasts as a possible mechanism for causing café-au-lait macules, XXth IPCC & Vth IMRC, Sapporo, Japan, 2008

2. 論文発表

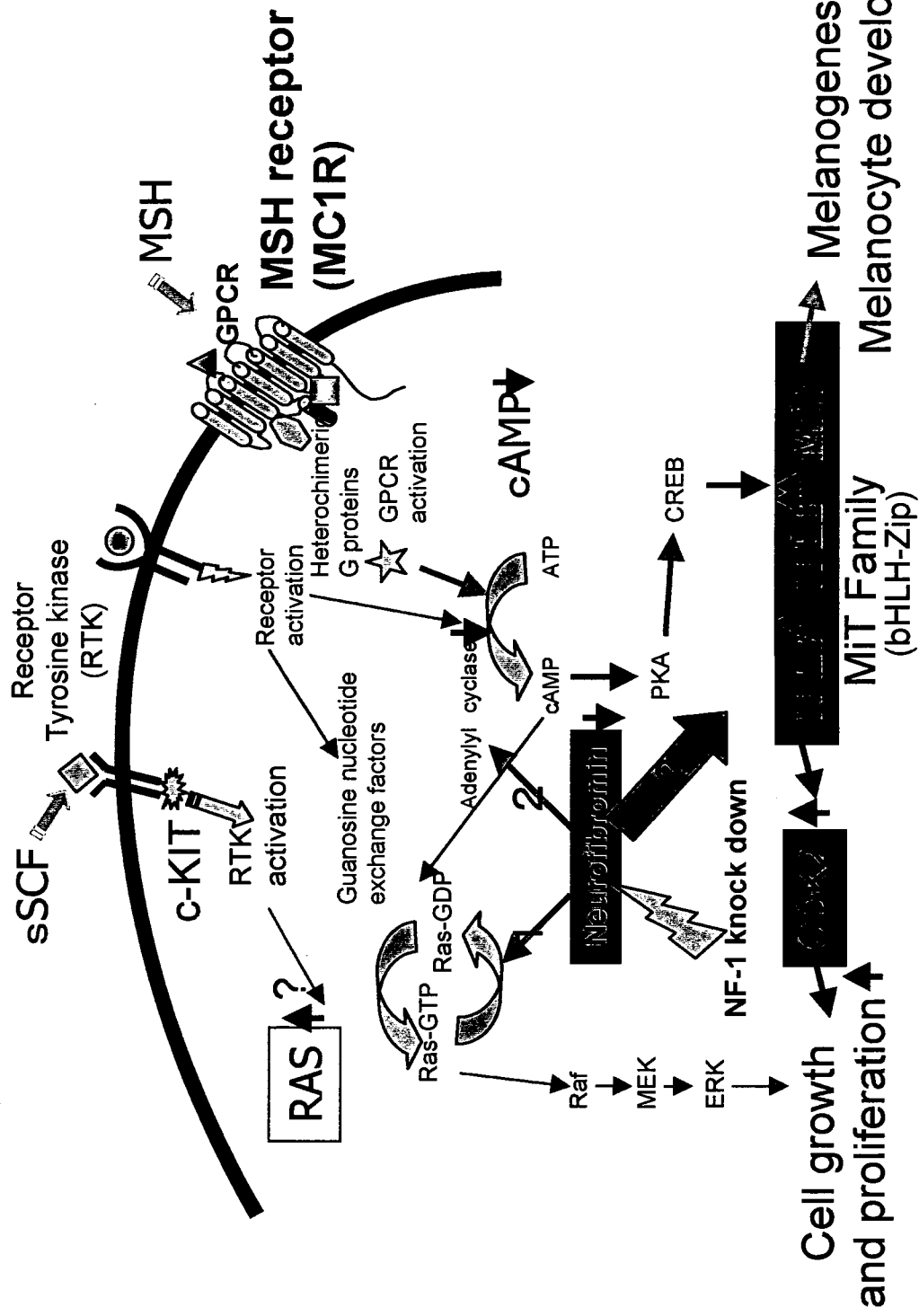
- 1) Yoshida Y, Sato N, Furumura M, Nakayama J. Treatment of pigmented lesions of neurofibromatosis 1 with intense pulsed-radio frequency in combination with topical application of vitamin D3 ointment. *J Dermatol.* 2007 34(4):227-30

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Modified regulatory function of neurofibromin in cell signal transduction of NF-1 knockdown melanocytes

1. Regulating RAS activity (RAS GTPase-activating protein (GAP) function)
2. Regulating cAMP signal transduction (non-RAS-GAP function, adenylyl cyclase activation)



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

筑波大学大学院人間総合科学研究科皮膚病態医学分野教授

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。前年度までの研究にて、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 (NF) 培養細胞が刺激濃度依存性、刺激時間依存性に増殖することを見出した。本年度の研究では TNF- α 刺激時の細胞増殖のシグナル伝達経路および TNF- α の局在部位に焦点を当てて、TNF- α の NF 細胞増殖能への影響について解析した。Western blotting にて NF 細胞は TNF- α の刺激時に、MEK/ARK シグナル伝達経路を介して増殖することが明らかとなった。また、TNF- α レセプターは NF 細胞に発現しているものの、NF 細胞内に TNF- α はみられず、組織免疫染色にて NF 組織内に散在性に認められる肥満細胞にのみ TNF- α が認められた。この結果より、NF 組織内の肥満細胞から分泌される TNF- α が腫瘍増殖に関与する可能性が示唆された。

中村泰大、高橋毅法、許 雪珠、川内康弘

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医学分野

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、増殖制御因子として何らかのホルモンや成長因子が増殖の促進ないし抑制に関与すると考えられる。2006 年度の研究

において、NF 細胞は各種サイトカインの刺激下にて、tumor necrosis factor alpha (TNF- α) での刺激時のみに時間依存性、および容量依存性に増殖を示すことを報告した。本研究では、TNF- α 刺激時の細胞増殖のシグナル伝達経路および TNF- α の局在部位に焦点を当て、TNF- α の NF 細胞増殖

能への影響について分子レベルにて解析した。

B. 研究方法

1. NF 培養細胞の作成

NF-1 患者 3 名より採取した NF をメスで細切し、single cell suspension を回収して type I collagen-coated plate 上で培養し、継代を重ねる (TKB-NF1, TKB-NF2, TKB-NF3)。NF 細胞の同定は S-100 染色で陽性を確認。

2. TNF- α 刺激時の細胞増殖の細胞内シグナル伝達経路の解析

NF, DFSP (dermatofibrosarcoma protuberans), G361 (malignant melanoma), MCF-7 (breast cancer), HSC-1 (squamous cell carcinoma), fibroblast の各培養細胞を TNF- α で刺激後、MEK1, ERK1/2, p38, JNK, AKT について western blot 法にてリン酸化の有無を解析。

3. NF 細胞内および組織内での TNF- α および TNF- α レセプター発現の有無およびその局在の検索

RT-PCR, western blotting, FACS scan および培養細胞・摘出組織の免疫化学染色を用いて TNF- α および TNF- α レセプターの発現およびその局在を解析。

(倫理面への配慮)

患者より採取した培養細胞の樹立および使用に関しては、「筑波大学医の倫理特別委員会」に諮り、「筑波大学附属病院における病理・細胞診標本の取り扱いに関する同意書」にて標本の研究使用の同意が得られた患者の組織のみ使用。

C. 研究結果

・Western blot 法にて NF 細胞は TNF- α の刺激時に、MEK/ARK シグナル伝達経路を介して増殖することが明らかとなった (図 1, 2)。

・RT-PCR, western blotting および FACS scan にて TNF- α レセプターは各種培養細胞に発現していたが TNF- α の発現はみられなかった (図 3, 4)。NF 培養細胞染色でも、TNF- α レセプターのみ染色された (図 5)。一方、NF の組織免疫染色では培養細胞と同様に腫瘍細胞に TNF- α は染色されないものの、二重染色にて NF 組織内に散在性に認められる肥満細胞にのみ TNF- α の発現が認められた (図 6)。

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。

本研究の結果、NF 細胞においては MEK/ARK シグナル伝達経路を介して増殖作用が認められ、NF 組織内の肥満細胞から分泌される TNF- α が腫瘍増

殖に関与する可能性が示唆された。慢性関節リウマチの治療で臨床使用されているインフリキシマブのような抗 TNF- α 製剤による治療が NF-1 においても腫瘍増殖制御の目的で適応される可能性が考えられる。

E. 結論

本研究の結果、NF 細胞においては TNF- α により MEK/ARK シグナル伝達経路を介して増殖することが明らかとなった。TNF- α は主に NF 組織内の肥満細胞に局在しており、肥満細胞からの TNF- α の分泌が NF 増殖に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tumor necrosis factor-alpha augments mitogenic activity of human neurofibroma cells via the MEK/ERK pathway

Yasuhiro Nakamura, Takenori Takahashi, Hiroko Sato, Xuezhu Xu, Yasuhiro Kawachi, and Fujio Otsuka (投稿中)

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

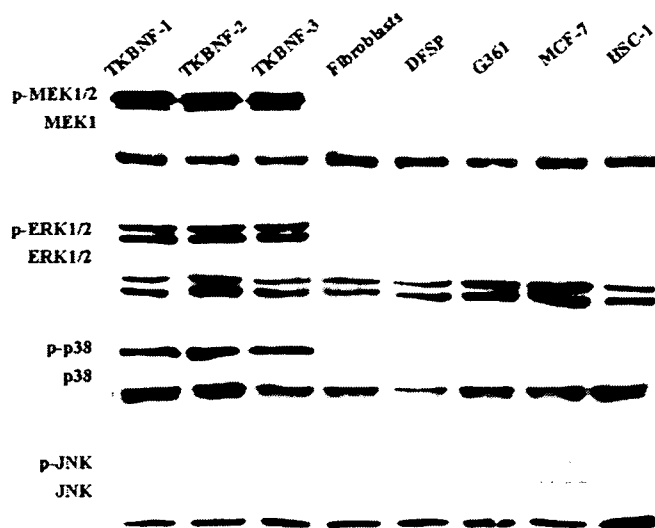


図1. TNF- α 刺激時における各種シグナル伝達経路のリン酸化の解析 (Western blotting). MEK/ERK、p38にてリン酸化がみられる.

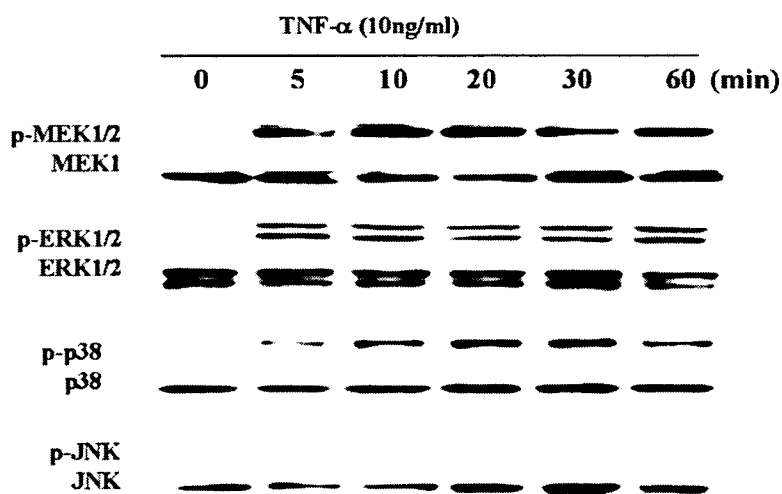


図2. TNF- α 刺激時におけるシグナル伝達経路のリン酸化の経時的変化. 刺激5分後よりリン酸化がみられる.