

図3. 各種培養細胞におけるTNF- α およびTNF- α レセプター発現の有無の解析 (RT-PCR, Western blotting). すべての培養細胞でレセプターの発現はみられるが, TNF- α の発現はない (BLC: activated EBvirus-transformed B lymphoblastoid cells, TNF- α 発現陽性コントロール)

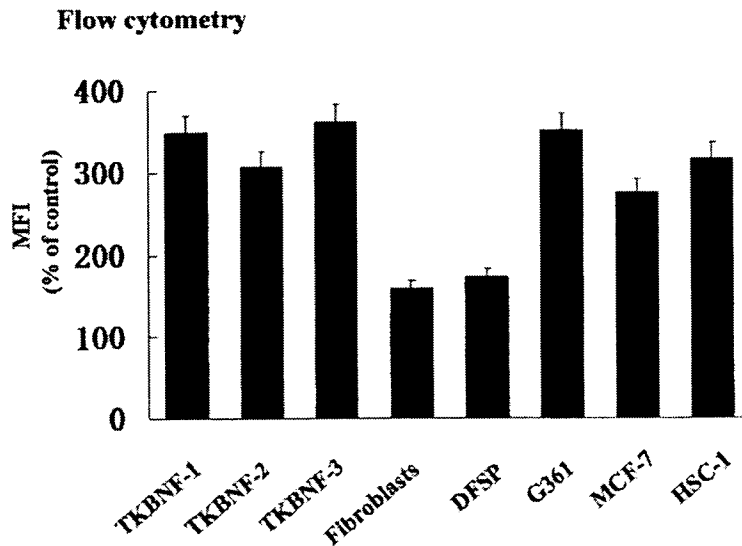


図4. FACS scan.
各培養細胞表面にTNF- α レセプターの発現がみられる.

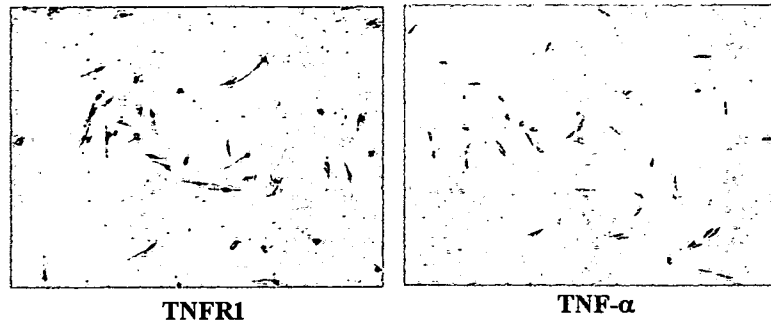


図5. NF培養細胞のTNF- α およびTNF- α レセプター抗体を用いた免疫化学染色. TNF- α レセプターのみ陽性.

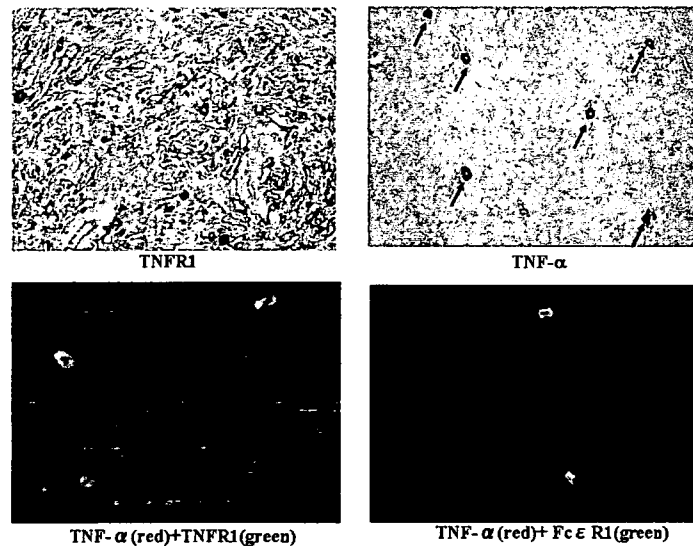


図6. NF組織のTNF- α およびTNF- α レセプター抗体を用いた免疫化学染色. TNF- α レセプターは組織内の細胞にubiquitousに染色されるが, TNF- α は組織内の小型円形の細胞のみに染色. 肥満細胞マーカー (Fc ϵ 1) との二重染色にてTNF- α を発現しているのは肥満細胞と判明.

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

神経線維腫および悪性末梢神経鞘腫における抗 CD10 抗体免疫組織染色
に関する研究

研究協力者 師 井 洋 一 九州大学大学院医学研究院皮膚科准教授

研究要旨

CD10 (90-110kDa の II 型膜貫通蛋白) は Enkephalin、Substance P などの炎症物質を分解する亜鉛結合酵素 (Zinc-binding metalloproteinase) であり Neutral endopeptidase (NEP)、Nepriylsin、Enkephalinase と呼ばれ、リンパ濾胞内の B 細胞、好中球のほか、腎尿細管、気管支、小腸粘膜等の上皮細胞表面にも発現する。一方、乳癌では間質の CD10 陽性所見が悪性度、予後の悪さと相関すると報告されている。皮膚腫瘍においては、Trichoepithelioma の間質で陽性所見が認められたが、BCC では腫瘍実質に陽性だったが、間質細胞には陽性所見は少なかったと報告されている。今回、我々は神経線維腫症 1 型において、良性の神経線維腫と悪性の悪性末梢神経鞘腫について、抗 CD10 抗体を用いて免疫組織学的に検討したので、報告する。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF-1) では多数の神経線維種が発生し、まれではあるが悪性化が認められる。その予後は極めて不良で、この疾患全体の予後を決定する因子にもなっている。しかし、神経線維腫内に発症した悪性末梢神経鞘種の病理診断は、しばしば困難を伴う。今回、悪性腫瘍の間質で染色性が認められる CD10 分子に着目して、この疾患で発症する腫瘍における良性・悪性の鑑別を試みた。

B. 研究方法

ホルマリン固定、パラフィン包埋した NF-1 症例から採取した神経線維腫、悪性末梢神経鞘腫、NF-1 でない症例の孤発性良性神経鞘腫を用いた。抗 CD10 抗体、抗 Ki-67 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

腫瘍採取 (手術) 時に、研究目的の利用に対する同意を取得している。

C. 研究結果

良性の神経線維腫では、ほぼ全例で CD10 陽性所見を得た。しかし、悪性末梢神経鞘腫では CD10 は染色されなかった。この傾向は、低悪性度の腫瘍である atypical peripheral nerve tumor でも同様に、CD10 は陰性であった。一方、腫瘍の増殖マーカーとして汎用される Ki-67 染色では、神経線維腫で陰性、悪性末梢神経鞘腫で一部陽性であった。NF-1 と関連のない孤発性の神経鞘腫では、CD10 陽性所見を 7 例中 1 例にのみ認め、腫瘍周囲の間質は陽性であった。

以上の結果より、CD10 染色は神経線維腫内に生じた悪性変化を明瞭に鑑別することが可能であり、診断や治療（切除範囲の確認）に、極めて有用な方法である。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

- Xie LN, Uchi H, Hayashida S, Kido M, Takeuchi S, Takahara M, Moroi Y, Furue M. : Stromal CD10 expression is correlated with invasiveness and proliferation of extramammary Paget's disease. Br J Dermatol (in press)

2. 学会発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

	CD10		Ki-67
	tumor	stroma	tumor
Neurofibroma	+	-	-
MPNST	-	+ ?	-/+1
atypical peripheral nerve tumor	-	+ ?	-
Schwannoma	-/+2	+	-

+ ? : 周囲は神経線維腫

-/+1 : 一部の腫瘍細胞に陽性

-/+2 : 7 例中 1 例で一部の腫瘍細胞に陽性

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

神経線維腫内の mast cell に関する検討

研究協力者 吉田雄一

鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野准教授

研究要旨

孤発性神経線維腫、神経線維腫症1型に合併した皮膚の神経線維腫、神経の神経線維腫における組織内の mast cell に関する検討を行った

足立孝司、山田七子、山元 修
鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野

A. 研究目的

神経線維腫症1型(NF1)は多臓器に多種の腫瘍性病変をきたす遺伝性の難病であり、現時点では根治治療は難しく、主として対症療法が行われている。本症に合併する神経線維腫は整容状の問題が特に大きく、患者や家族に精神的な苦痛を与え、新治療法の開発に対する要望や社会的要請も強い。そこで神経線維腫の原因を明らかにするため、様々なタイプの神経線維腫における mast cell に関する検討を行うこととした。

B. 研究方法

NF1患者に合併した神経線維腫において多数の mast cell がみられることは分かっているが、孤

発性神経線維腫との違いについて検討した報告はみあたらない。また、NF1には皮膚の神経線維腫、神経の神経線維腫(nodular plexiform neurofibroma)、びまん性神経線維腫(diffuse plexiform neurofibroma)がみられるが、mast cellの関与を腫瘍ごとと比較した報告もみられない。そこで各々の組織内の mast cell に関する免疫組織化学的検討を行うこととした。具体的には患者から得られた組織を用いて研究を行った。同時に電子顕微鏡を用いてそれぞれの神経線維腫内における mast cell と他の細胞との関連や形態学的特徴を検討した。当施設においては、患者から得られた試料を医学研究に用いる場合には、口頭と文書により十分な説明を行い(インフォームド・コンセント)、文書による明確な同意が得られた患者においてのみ、医学研究用の試料として取り扱うこととなっているので、その規定を遵守して研究を遂行した。

C. 研究結果

孤発性神経線維腫、NF1に関連した皮膚の神経線維腫、神経の神経線維腫内の mast cell をトリジンブルー染色により検討した結果、孤発性神経線維腫、NF1に関連した皮膚の神経線維腫では数は同程度であったが、神経の神経線維腫では腫瘍内の mast cell の数が少ないことが分かった。さらに腫瘍内のヒスタミンの染色を行ったところ、NF1の皮膚の神経線維腫では陽性細胞が多いことが分かった。透過型電子顕微鏡を用いた観察では、孤発性神経線維腫とNF1に合併した皮膚の神経線維腫では線維芽細胞と近接する mast cell を確認できたが、NF1に合併した神経の神経線維腫では mast cell の数は少なく、孤立性に存在する傾向にあった。

D. 考察

神経線維腫の発生には Schwann cell と mast cell が極めて重要な役割を果たしていることがすでに報告されている。NF1は時に強いかゆみ・痛みの症状を伴うことがあるが、その原因として神経線維腫内に多く存在する mast cell の関与が指摘されている。NF1患者に抗ヒスタミン剤を長期投与し、症状の緩和や腫瘍の発生・増殖を予防しようとの試みもなされ、ある程度の効果は認められている。かゆみや痛みなどの臨床症状は患者の予後とも密接に関わっているとの報告があるが、その詳しい機構や実際どのような患者にかゆみ・痛みの症状が強く現れるのかについてはまだよく分かっていない。本研究により、孤発性神経線維腫とNF1の神経線維腫においては mast cell の数は同じでもそのヒスタミン含有量に違いがあることが明らかとなった。また神経の神経線維腫では

mast cell の数が少ないことが明らかとなった。これらの所見が腫瘍の増生や臨床症状（かゆみ）、あるいは悪性末梢神経鞘腫瘍の発生に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により孤発性神経線維腫とNF1に合併する神経線維腫はそのタイプにより腫瘍内 mast cell の数やヒスタミン陽性細胞の数に違いがあることが明らかになった。また電子顕微鏡を用いた観察により、神経線維腫内の mast cell の動態にも神経線維腫のタイプによる違いがある可能性が推測された。今後はその違いが臨床症状とどのように関連しているのかをさらに検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 吉田雄一、中山樹一郎：遺伝病とターナー症候群：神経線維腫症1型。株式会社メディアート 2007 p10-11
2. Yoshida, Y., Sato, N., Furumura, M. and 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. 34(4): 227-230, 2007

G. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 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

神経線維腫症 1 型患者に生じた悪性腫瘍の早期発見における
FDG-PET の有用性

分担研究者 中 川 秀 己 東京慈恵会医科大学皮膚科学講座教授

研究要旨

悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）は完全切除が困難である場合には確立された治療法がないため、神経線維腫症 1 型（NF1）患者において MPNST を早期発見することは極めて重要である。我々は MPNST の合併が疑われるが MRI と Ga シンチでは悪性所見を確認し得なかった NF1 患者 2 例に FDG-PET 検査を施行し、1 例に MPNST を早期発見し完全切除した。FDG-PET は MPNST を早期発見するのに有効な補助診断技術と考えられ、臨床的に MPNST が疑われる場合には本検査を施行すべきであると考えられた。

谷戸克己、堀 和彦、太田有史、新村真人

東京慈恵会医科大学皮膚科学講座

A. 研究目的

MPNST は完全切除が困難である場合には確立された治療法はないため、NF1 患者のフォローアップにおいて MPNST を早期発見することは極めて重要な課題である。

近年、FDG-PET は“神経線維腫の悪性転化の早期診断に非常に有用である”という報告が相次ぎ、欧米では高感度・非侵襲性の検査として高く評価されている。

今回我々は最近経験した MPNST の合併が疑われた 2 例の NF1 患者に FDG-PET 検査を施行し、若干の文献的考察を加えその有用性を検討した。

B. 症例呈示

症例 1. 28 歳女。思春期からある左上腕内側の腫瘍が徐々に増大、初診（2006 年 5 月）の約 1 年前から痛みを伴うようになり来院。腫瘍は 6 cm 大、造影 MRI で不均一な増強がみられず、Ga シンチも陰性であったが、FDG-PET では standardized uptake value (SUV) は 4.45 と腫瘍に一致して異常集積を認めた。腫瘍摘出術を施行し、病理組織学的に MPNST と確定診断。拡大切除、補助療法は行わず、術後 1 年が経過しているが、腫瘍の再発、転移を認めない。

症例 2. 17 歳女。生来、右大腿部内側に大きな色素斑があり小児期より同部に一致した腫瘍の増大に気づいていた。17 歳時と 19 歳時同腫瘍の一部を切除。しかし、右大腿部深部に存在する結節性腫

瘍が漸増し約6年間で直径3cmから5cm大となった。継時的なMRIとGaシンチによる観察では悪性化の所見に乏しかったため、25歳時(2007年3月)にFDG-PETを施行。SUVは2.78と腫瘍に一致して集積の増加をみたが、整形外科と協議の上、手術は行わず経過観察中である。

C. 考察

MPNSTは末梢神経由来の代表的な肉腫であるが、その半数はNF1合併例で、NF1患者の5~10%にMPNSTが生じるとされる。Plexiform neurofibroma (PNF)の約10%がMPNSTになるという報告もあり、脊髄神経や深部神経のnodular PNFやdiffuse PNFからMPNSTが発生することが多い。疼痛などの自覚症状を伴い急速に増大する腫瘍はMPNSTである可能性が高いとされるが、これらの症状は良性病変でも認められることがあるため診断の決め手にはならない。

これまでの画像診断では造影MRIが最も有用とされ、不整な腫瘍辺縁像や腫瘍の不均一性は悪性化を疑う根拠となりうるが、早期病変ではそのような所見に乏しいため悪性と良性を鑑別するには熟練を要する。またガリウム、タリウム、テクネシウムなどの核医学検査も有用とされてきたが、FDG-PETは糖代謝の活発な部位を高感度に検出できるため、良悪性の鑑別に特異度が高く、より有用であると考えられる。空間分析能に優れ解剖学的情報を提供するMRI、CTと代謝の亢進など機能情報を示すFDG-PETの併用は、MPNSTの診断精度の向上をもたらすと考えられる。

これまでの報告によると、NF1患者に合併したMPNSTを対象としたFDG-PETの感度は89~100%、特異度は72~95%であり、疑陰性よりも疑陽性が問題

となることが多い。特にBredellaらの報告では偽陽性の数が多いが、¹¹C methionin PETの併用により特異度が改善されたとしている。またFernerらは105人のNF1患者における116個の腫瘍を検討し、SUVが2.5未満の場合に悪性腫瘍は1個もなく、3.5を越える場合に良性腫瘍は3個しかなかったと報告し、痛みなどの自覚症状を伴う神経線維腫でSUVが3.5を越えた場合は切除、2.5~3.5では経過観察をするべきと提案している。BrennerらはMPNSTを生じた16人のNF1患者において、SUVが3未満では平均余命は52ヶ月であるのに比べ、3を越えると13ヶ月と著しく短くなると報告しており、SUVが3を超えるものはより悪性化の危険性が高まると考えられる。自験例ではSUVが4.45であった症例1では腫瘍摘出術、また2.78であった症例2では経過観察とこれまでの報告に準じた治療を行っているが、今後も慎重な経過観察を要すると考えられた。

D. 結論

FDG-PETはMPNSTを早期発見するのに有効な補助診断技術と考えられる。本邦ではまだFDG-PETはMPNSTに対して保険適応が認められていないが、より症例数を重ねその有用性を確認し、保健適応認可を得られるようにする必要があると考える。

E. 文献

- 1)Ferner RE et al: *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 68:353, 2000
- 2)Cardona S et al: *Eur J Surg Oncol*; 29:536, 2003
- 3)Brenner W et al: *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 33:428, 2006

4)Bredella MA et al: *AJR Am J Roentgenol*; 189:928,

2007

5)Ferner RE et al: *Ann Oncol.*; 19:390, 2008

F. 研究発表

学会発表

日本皮膚科学会第 369 回北海道地方会で症例 1 を

発表

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

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

**神経線維腫症 1 型 (NF1) に合併した原発性乳癌症例からの
センチネルリンパ管内皮細胞の分離培養**

分担研究者 倉持 朗 埼玉医科大学皮膚科教授

研究要旨

原発性乳癌の臨床においては、リンパ節転移は依然として重要な予後規定因子のひとつであり、原発巣からのリンパ流の最初の到達点とされるセンチネルリンパ節 (SLN) は、腫瘍免疫学的観点から非常に意義深いものと推察される。

一方で、これまで NF1 と原発性乳癌の関連について一定の見解は得られていないが、2007 年に英国から NF1 が乳癌発症の中等度危険因子になるという報告がなされ、さらには NF1 と BRCA1 (ヒト乳癌 suppressor gene) が同じ 17 番染色体の長腕に存在することや乳癌合併 NF1 患者の乳腺腫瘍で NF1 遺伝子の LOH (loss of heterozygosity) が示されたという報告から、近年、両者の因果関係も示唆されるようになってきている。

今回我々は、神経線維腫症 1 型 (NF1) に合併した原発性乳癌症例から、SLN への輸入リンパ管内皮細胞 (SLEC) を分離・培養し、リンパ管としての生物学的特性の確認を試みた。

竹内英樹、佐伯俊昭

埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科

リンパ節 (SLN) は、腫瘍免疫学的観点から非常に意義深いものと推察される。今回、我々は神経線維腫症 1 型 (NF1) に合併した原発性乳癌症例 (図 1) から、SLN への輸入リンパ管内皮細胞 (SLEC) を分離・培養し、その生物学的特性の確認を試みた。

A. 研究目的

近年、乳癌領域の臨床においては、従来の病理学的視点に基づいた腫瘍の層別化から遺伝子学的視点に基づいた腫瘍の個別化への Paradigm shift が急速に進んでいる。しかしながら、リンパ節転移は依然として重要な予後規定因子のひとつであり、原発巣からのリンパ流の最初の到達点とされるセンチネル

B. 研究方法

NF1 に合併した原発性乳癌患者の患側傍乳輪皮内に、術前日 RI (99mTc-フチン酸:74MBq) と術直前色素 (インジゴカルミン:5ml) を注入し、術中に併用

法にて SLN およびそれに流入する輸入リンパ管を同定した(図2)。色素によって青染されたリンパ管を色素の逸脱を防ぐために両端にクリップをかけた後に周囲組織から剥離切除し、EGM-2培地に入れて清潔な状態で培養室に移送した。

線維芽細胞の混入を防ぐために実体顕微鏡下でリンパ管周囲組織を丁寧に剥離し、カニューレションチューブをリンパ管内に挿入、細い糸で結紮固定した(図3)。37°CのCollagenase IIにてリンパ管内腔をゆっくり灌流し、灌流液を滅菌済みの遠心チューブに回収した。このときチューブ内には回収液中のCollagenase IIを失活させるためにFBS含有EGM-2培地を入れておく。回収液を1000-2000rpmにて5分間遠心分離し、上清を破棄後、EGM-2にて再懸濁し、培養系(37°C、5%CO₂)に移行させた(図4)。

培養されたSLECについて蛍光抗体染色にてリンパ管内皮細胞に特異的な蛋白の発現、またRT-PCRを用いてSLECにおける内皮細胞増殖マーカーの発現を確認した。さらにVEGF-C刺激によるシグナル伝達路の解析として、ウェスタンブロット法によるMAPK、Akt、JNKのリン酸化の有無を検討した。

C. 研究結果

本症例は結果的にNF1に異時性両側乳癌を合併した症例であったが、最初は2004年12月にNF1の悪性末梢神経鞘腫瘍(MPSNT)の鑑別診断目的で当院皮膚科を初診し、生検にて左局所進行乳癌(T4bN1M0:stageIIIb, Invasive ductal carcinoma)が発覚した。術前抗癌剤治療(AC-T)の後、2005年6月に左乳房切除術施行し、ホルモン治療経過観察に移行したが、翌年に右乳房硬結触知、2006年9月に右乳房切除術施行(T2N1M0 stageIIb, Invasive lobular carcinoma)された。本研究は、後者の右乳

房切除術時に併せて施行されたプログラムである。

分離されたSLECは、蛍光抗体染色にてリンパ管内皮細胞に特異的な表面マーカーであるVEGFR-3、Prox1、Podoplaninを発現していた(図5)。また、RT-PCRによるSLECの細胞内蛋白の検討ではVEGF-A, B, C, DとVEGFR-1, 2, 3をすべて発現していた(図6)。

ウェスタンブロット法を用いたVEGF-C刺激によるシグナル伝達路の*in vitro*解析では、MAPK、Akt、JNKそれぞれの経路のリン酸化が確認された(図7)。また、いずれのリン酸化においても作用時間10分で最も強いバンドの発現が認められた。

D. 考察

本邦におけるNF1患者の乳癌合併は、これまで60例以上の報告がなされているが、国内外の合併頻度は0.1-9.0%で、そのうち10%が両側乳癌とされている。組織型に特徴はなく、NF1特有の皮膚病変のため腫瘍発見が遅れたり、自覚をしても「腫瘍性病変」に対する病識の問題から受診がおくることが多く、stageIII-IVが40%以上を占めるとされている。これまでNF1と原発性乳癌の因果関係について一定の見解は得られていないが、2007年に英国から304例のNF1女性(20歳以上)を30年間(1975-2005)追跡したところ14例で乳癌が発症し、Standardised Incidence Ratio (SIR)が3.5、50歳以下の若年でみるとSIR4.9となり、基礎疾患としてのNF1が乳癌発症の中等度危険因子になるという報告がなされている。これを支持する要因としては、LOH (loss of heterozygosity)を示すSchwann細胞が肥満細胞に対しchemoattractantに働き、神経線維腫発症の一端を担っている可能性が示唆されているのと同様に、あるNF1家系の乳癌合併症例

から得られた乳腺腫瘍細胞で、乳癌リスクを高める BRCA1 や BRCA2 遺伝子に変異を認めず、NF1 遺伝子の LOH が示されたという報告と無関係ではないかもしれない。

今回、NF1 に合併した原発性乳癌症例から SLEC の分離・培養およびそのリンパ管内皮細胞としての生物学的特性の確認に成功した。癌の浸潤や転移の評価は腫瘍の病理形態学的視点に基づいてなされるが、その個体間における多様性からは、腫瘍そのものの持つ遺伝子学的要因のみならず、宿主側要因との複雑な生体反応の関与も強く示唆される。近年、血管新生が癌の浸潤、転移に重要な役割を果たしていることが報告されているが、リンパ行性転移も癌の悪性度と予後を反映する因子のひとつである。リンパ管に直接作用する増殖因子である VEGF-C/D およびチロシンキナーゼ受容体である VEGFR-3 の発見に伴い、腫瘍周囲のリンパ管と所属リンパ節転移との相関性も研究が進みつつある。腫瘍組織が増殖の過程で誘導した新生リンパ管が既存リンパ管と交通し、これに沿って癌細胞がリンパ管内に流入、転移を形成すると考えられる。新生リンパ管は内皮細胞が欠落した未熟な管腔であるが、それに交通する既存リンパ管内腔は内皮細胞で構成されており、癌細胞から分泌される VEGF-C/D により恒常的な生物学的活性を得て、リンパ管相互交通の制御に関与し、最終的にリンパ節転移を促進する一因子となり得る。さらに本研究では、腫瘍からのリンパ流が一番最初にたどり着く SLN に流入する輸入リンパ管にターゲットを絞ることで、より確実に原発巣からの腫瘍因子による修飾を受けていることが予想されるリンパ管内皮細胞を得ることができ、今後この SLEC の生物学的特性の解析をさらにすすめることで、リンパ節転移メカニズムの解明に大きく寄与する可能性が示唆される。

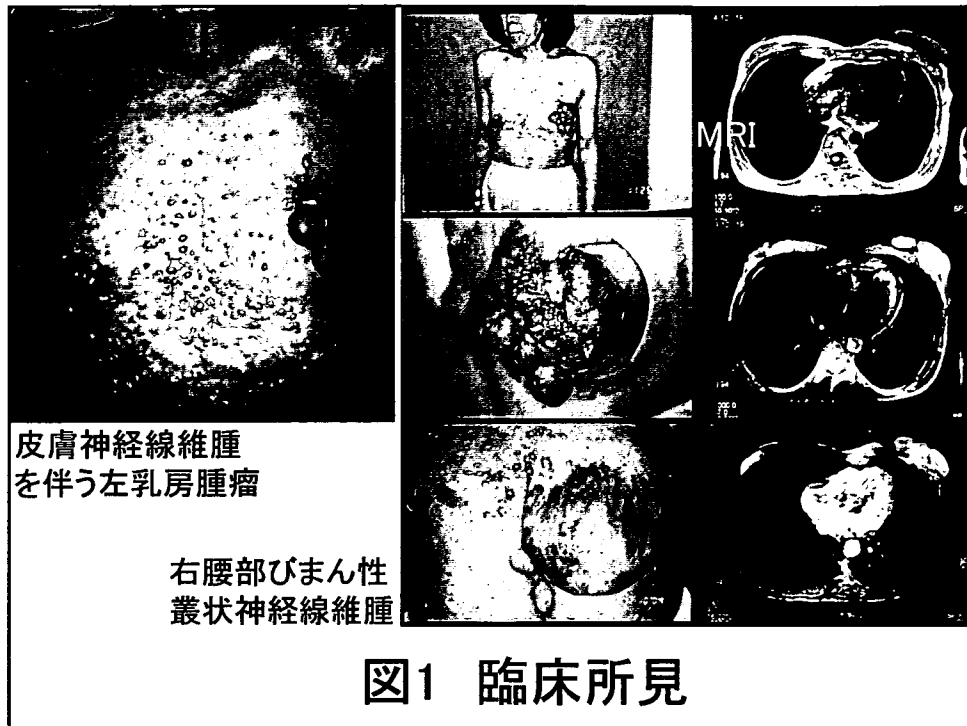
F. 研究発表

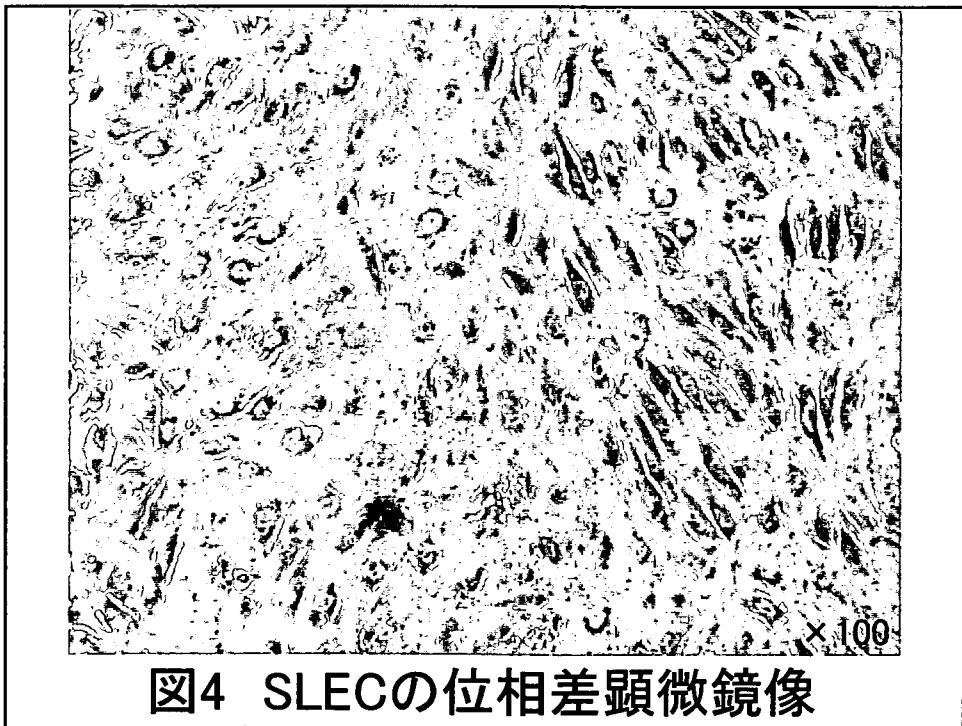
第 66 回 日本癌学会 (横浜 平成 19 年 10 月 3 日)

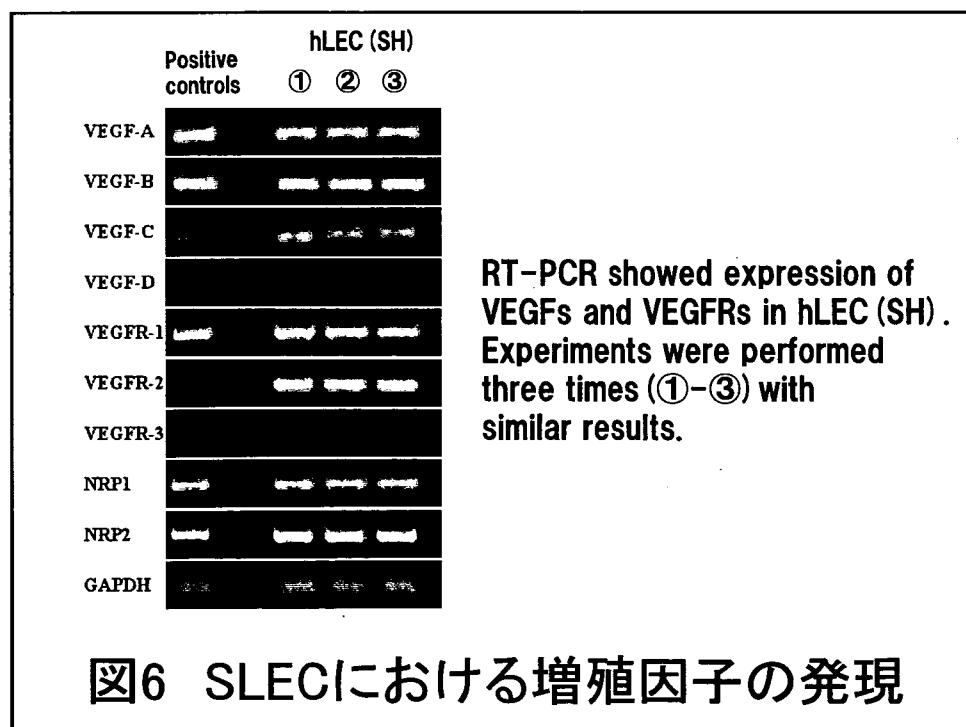
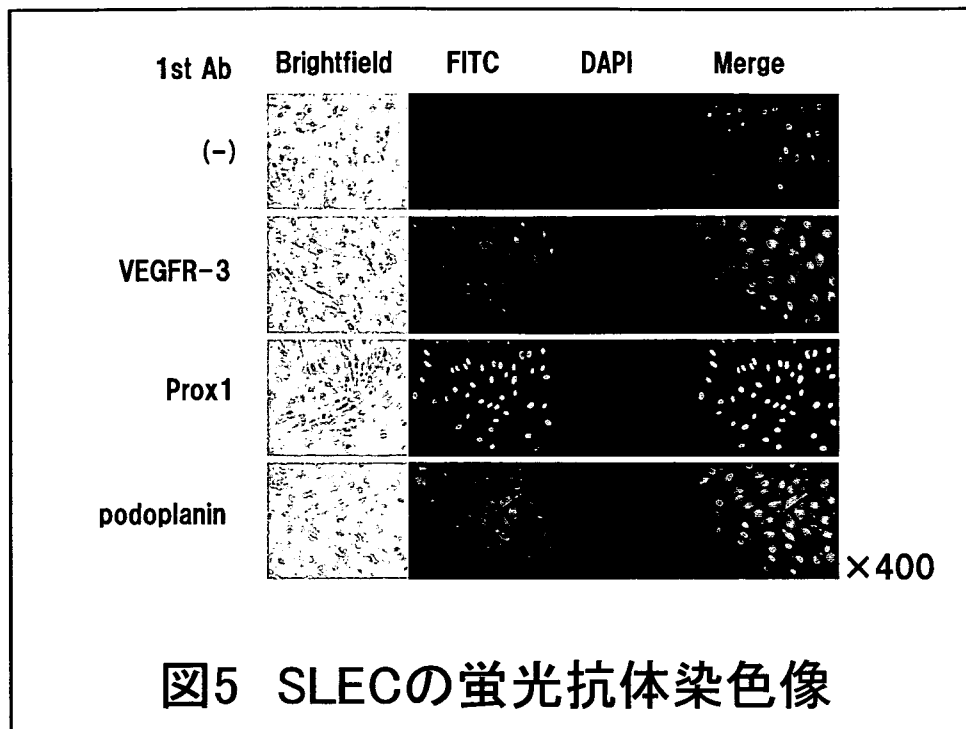
Isolation and characterization of human lymphatic endothelial cell from primary breast cancer patients.

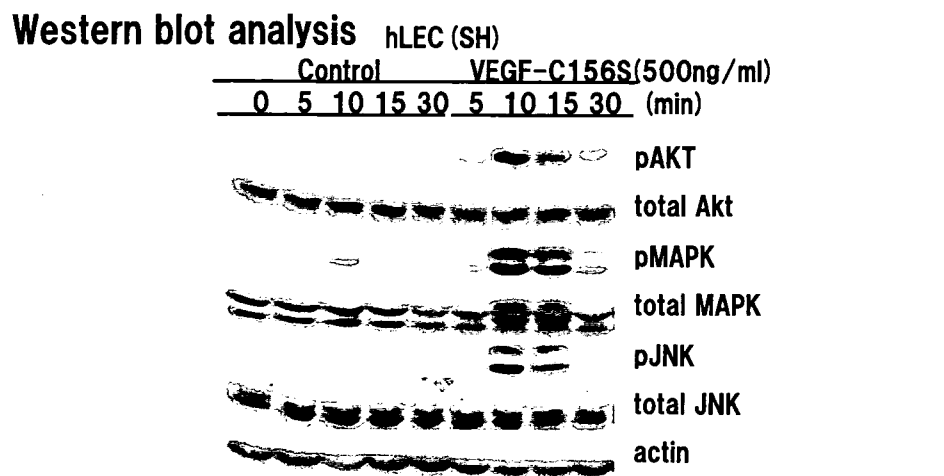
G. 知的財産権の出願・登録

なし









Akt, MAPK and JNK were phosphorylated in VEGF-C156S treated hLEC (SH). The strongest band was observed at 10 minutes.

図7 VEGF-C156Sによるリン酸化の確認

**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**

神経線維腫症 1 型における腫瘍形成メカニズムに関する研究

分担研究者　佐　谷　秀　行　慶應義塾大学医学部先端医科学研究所教授

研究要旨

Neurofibromatosis type1 (NF1) 遺伝子は、神経線維腫症 1 型 (NF1) の原因遺伝子として発見され、その遺伝子産物ニューロフィブロミン neurofibromin は中央部に存在する GTPase activating protein related domain (GRD) を通じて、癌遺伝子 p21Ras タンパクを不活性化し Ras を介したシグナルを負に制御することから癌抑制遺伝子と考えられている。本研究では、NF1 における神経線維腫形成メカニズムを解明するために、ヒト培養細胞においてニューロフィブロミンの発現抑制を行ったところ、細胞の増殖亢進のみならず、細胞運動能及び細胞集塊形成の増加が観察され、それらの形質が Rho-ROCK-LIMK2 のシグナル経路を介していることを見出した。また、細胞運動能の亢進と集塊形成には間葉系細胞としての性質が関与していることを見出され、間葉系細胞としての性質を抑制することが NF1 患者の多発性神経線維腫の治療戦略となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型は、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を説明することはできない。本研究では、ニューロフィブロミンの細胞内機能と NF1 の病態（多発性神経線維腫形成）との関連性を明らかにするために、RNA 干渉 (RNAi) によるニューロフィブロミンの発現の抑制により、ヒト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行った。

B. 研究方法

RNA 干渉法を用いてニューロフィブロミンの発

現を急速に抑制することにより、ヒト培養細胞 (HeLa 細胞、HT1080 細胞) に及ぼす効果・影響を細胞免疫染色法およびタイムラプスビデオレコードにて観察し、さらに、生じた表現型の責任シグナル経路の解明を、各種シグナル阻害剤および siRNA を用い、細胞生物学的および生化学的解析により行った。さらにニューロフィブロミンの発現を抑制することが細胞の間葉系性質を増強させるか否かについて検討を行った。

C. D. 研究結果と考察

1. ニューロフィブロミン発現の細胞骨格への影響

HeLa 細胞において、siRNA によって NF1 蛋白の発現を抑制したところ、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た。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。他の培養細胞 (HT1080 細胞) でも同様の細胞形態変化が誘導された。この所見から、NF1 蛋白は、細胞骨格系の制御に関与していることが示唆された。

2. ニューロフィブロミン発現の細胞外マトリックス内での細胞運動における影響

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、マトリゲル内での NF1 タンパク発現抑制細胞の細胞形態および運動能について観察した。NF1 タンパク発現抑制細胞はマトリゲル内で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 1)。

この集塊形成の様子をタイムラプスビデオ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。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を意味づけるシグナルの検討

NF1 siRNA の導入により、アクチン細胞骨格制御異常が生じていることが分かったが、この異常はアクチンフィラメントの切断・脱重合を促進する因子である Cofilin/ADF タンパクのリン酸化による不活性化によるものであることが示唆された (図 2)。

コフィリンの活性は Rho-ROCK-LIMK2 経路により抑制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、この経路の活性化が関与している可能性について検討した。LIMK2siRNA, ROCK inhibitor, Rho dominant negative mutant により、Rho-ROCK-LIMK2 経路を遮断したところ、全てにおいて 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 経路を通じて制御されていることが分かった。NF1 タンパク発現抑制細胞では、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、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ことができる。

4. NF1 遺伝子異常と間葉系形質との関連性

NF1 siRNA により、上皮系細胞が、細胞集塊形成、紡錘状の細胞形態変化、細胞運動能亢進などの変化を呈したことから、間葉系細胞の性質を獲得したのではないかとこの可能性が高まった。現実には NF1 siRNA によりヒアルロン酸など細胞外マトリックスの産生も増加することが観察されており、こうした上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) こそが、神経線維腫形成のメカニズムではないかと考えた。

神経線維腫は、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、神経線維腫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 EMT もまた、細胞が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、そこに走化性因子やマトリックス産生増加が加わり、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(図3)。

E. 結論

ニューロフィブロミンは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えた。更に、NF1 において発生する神経線維腫は上皮間葉転換に基づく病態である可能性が示唆され、上皮間葉転換を抑制するという戦略が本症候の治療になる可能性が考えられる。

F. 研究発表

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. Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H and Araki N: NF1 tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, collapsin response mediator protein-2. *J Biol Chem*. 2008 Jan 23 [Epub ahead of print]

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
現在、申請中。

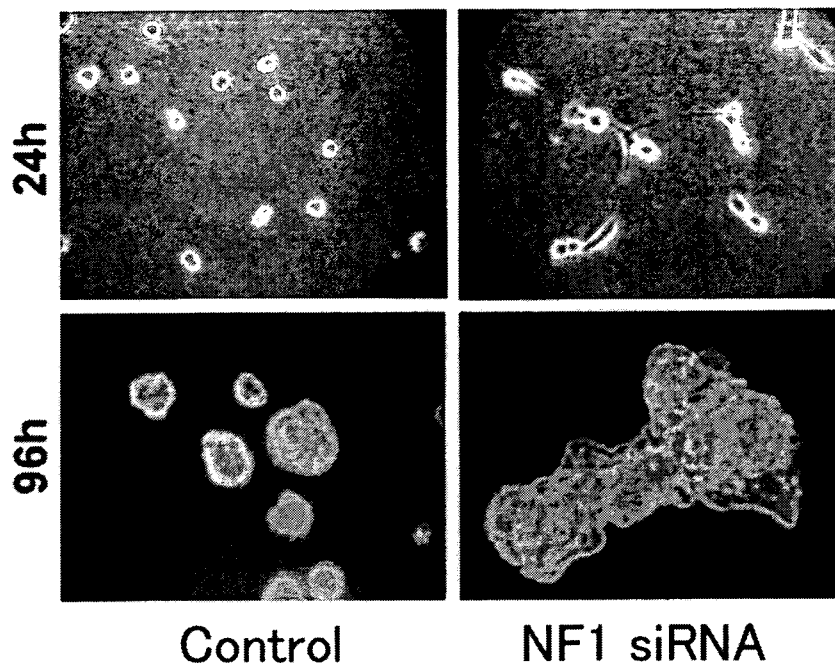


図1 NF1抑制による細胞集塊形成

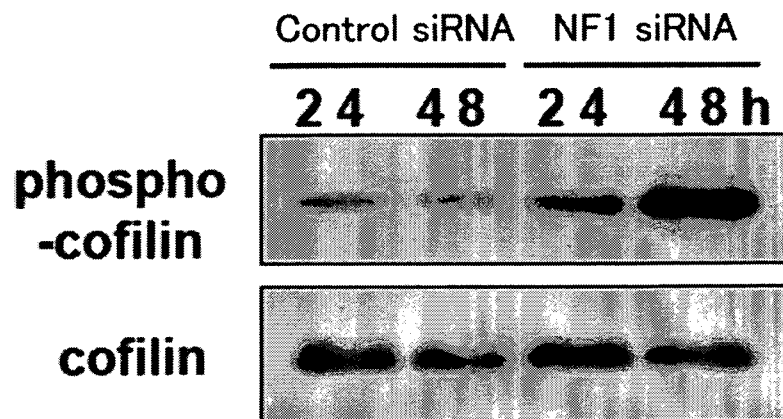


図2. NF1 siRNAによるコフィリンのリン酸化