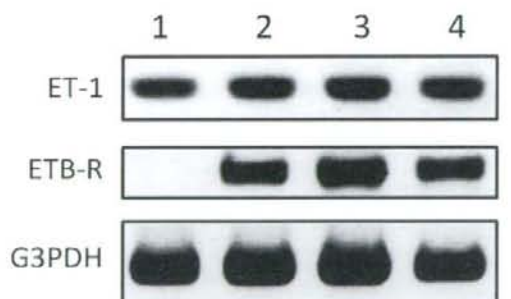


(GRO α), WNT にそれぞれ特異的なオリゴプライマーを合成した。コントロールとして G3PDH 特異的プライマーを用いた。これらのプライマーを用い、上記の神経線維腫由来 cDNA を鋳型として、RT-PCR を行った。

5. 得られた PCR 産物をコントロールの G3PDH 産物とともにアガロースゲル電気泳動し、相対的発現量を神経線維腫と HaCat 細胞間で比較した。

C. 研究結果

1. 独立した 3 人の NF1 患者から切除した神経線維腫における ET-1 および ETB-R の発現を検討したところ、ET-1 はコントロールの HaCaT 細胞、3 つの神経線維腫のいずれにも発現が認められた。一方、ETB-R は神経線維腫のみに発現が検出された (図 1)。
2. 同様に神経線維腫における SCF および c-kit の発現を検討したところ、SCF はコントロールの HaCaT 細胞、3 つの神経線維腫のいずれにも発現が認められた。一方、c-kit は神経線維腫のみに発現が検出された (図 2)。

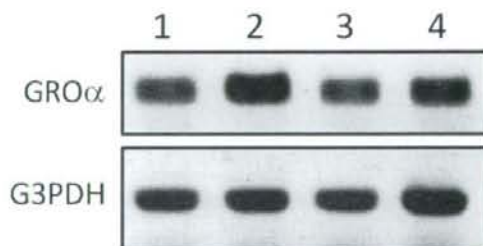


1: HaCaT 2: Neurofibroma-1 3: Neurofibroma-2 4: Neurofibroma-3
図 1 神経線維腫における Endothelin (ET)-1/ETB-Receptor mRNA の発現

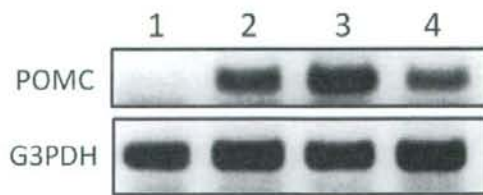


1: HaCaT 2: Neurofibroma-1 3: Neurofibroma-2 4: Neurofibroma-3
図 2 神経線維腫における Stem cell factor (SCF)/ c-kit mRNA の発現

3. 同様に神経線維腫における GRO α の発現を検討したところ、GRO α はコントロールの HaCaT 細胞、3 つの神経線維腫のいずれにも発現が認められた (図 3)。
4. 同様に神経線維腫における POMC の発現を検討したところ、POMC は神経線維腫のみに発現が検出された (図 4)。
5. 同様に神経線維腫における WNT family mRNA の発現を検討したところ、WNT6 が神経線維腫のみ、WNT7a が HaCaT 細胞のみに発現が検出された (図 5)。
6. 神経線維腫は、メラノジェネシスを促進する因子である SCF, ET-1, GRO α , POMC (α MSH) を産生し、これらは液性因子であるため循環系に表皮のメラノサイトに作用し表皮の色素増強をもたらすことが示唆される。また、神経線維腫細胞は SCF のリガンドである c-kit, ET-1 のリガンドである ETB-R を発現していることが明らかとなり、これらはオートクリンに作用して神経線維腫細胞の増殖や恒常性維持に働いていることも考えられた (図 6)。



1: HaCaT 2: Neurofibroma-1 3: Neurofibroma-2 4: Neurofibroma-3
図 3 神経線維腫における Growth-related oncogene-a (GRO α) mRNA の発現

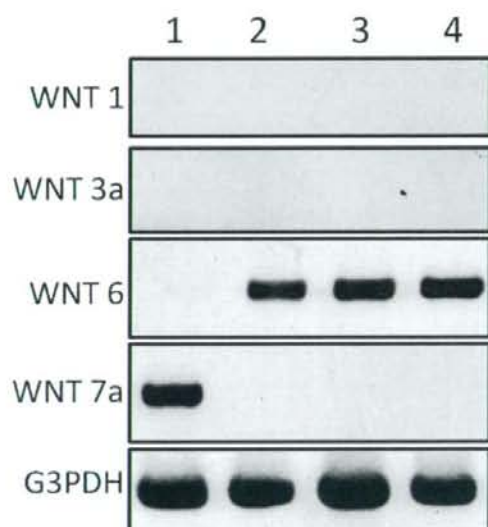


1: HaCaT 2: Neurofibroma-1 3: Neurofibroma-2 4: Neurofibroma-3
図 4 神経線維腫における Proopiomelanocortin (POMC) mRNA の発現

D. 研究発表

1. 論文発表

- ① **Kawachi Y**, Nakamura Y, Yoh K, Suzuki T, Furuta J, Fujisawa Y, Takahashi T, Otsuka F: Rheumatoid papules successfully treated with oral tacrolimus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22: 241-242.
- ② **Kawachi Y**, Xu X, Tguchi S, Sakurai H, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Furuta J, Takahashi T,



1: HaCAT 2: Neurofibroma-1 3: Neurofibroma-2 4: Neurofibroma-3

図5 神経線維腫における WNT family mRNA の発現

Itoh K, Yamamoto M, Yamazaki F, Otsuka F: Attenuation of UVB-Induced Sunburn Reaction and Oxidative DNA Damage with No Alterations in UVB-induced Skin Carcinogenesis in *Nrf2* Gene-Deficient Mice. *J Invest Dermatol*, 2008; 128: 1773-1779

- ③ **Kawachi Y**, Koike Y, Kano T, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F: Paraneoplastic dermatomyositis triggered and exacerbated by oral 5-fluorouracil administration. *Eur J Dermatol*, 2008; 18: 195-196

2. 学会発表

- ① Nakamura Y, Takahashi T, **Kawachi Y**, Otsuka F: Tumor necrosis factor α induces the production of stem cell factor in human neurofibroma cells derived from neurofibromatosis-1. *International Investigative Dermatology 2008*, Kyoto Japan, May, 2008
- ② **Kawachi Y**, Xu X, Takahashi T, Otsuka F: Attenuation of sunburn reaction and UVB-induced oxidative DNA damage with no alteration in UVB-induced skin carcinogenesis in *Nrf2* gene-deficient mice. *International Investigative Dermatology 2008*, Kyoto Japan, May, 2008

E. 知的財産権の出願・登録

特になし。

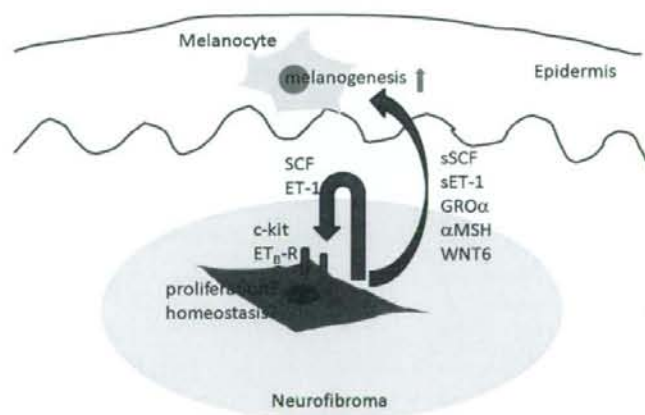


図6 神経線維腫における melanogenic factor の発現モデル

NF-1 ノックダウンメラノサイトにおける 増殖シグナルの検討

研究分担者 古村南夫 島根大学医学部皮膚科准教授

研究要旨

培養ヒト皮膚メラノサイトの NF-1 をレンチウイルス miR RNAi にてノックダウンし、その細胞内シグナルを解析することによってカフェオレ斑の分子レベルでの発症メカニズムの一部を解明した。NF1 ノックダウンヒトメラノサイトでは、neurofibromin の non-Ras function の低下によって cAMP シグナルが抑制されている。NF1 ノックダウンによる持続的な cAMP シグナル低下は PARs (protease activated receptors) の発現を誘導し、さらに PARs 活性化により cAMP シグナルの下流で細胞増殖を引き起こす転写因子 TFEB/TFE3 の発現が上昇することが明らかになった。その結果、NF1 ノックダウンにより転写因子 TFEB/TFE3 の発現が亢進している状態で、メラノサイト刺激ホルモン (MSH) 等で一過性に cAMP シグナルが活性化されると、メラノサイトの細胞増殖シグナルが過剰に伝達されることが示唆された。NF1 の真皮で増加する mast cell 由来の tryptase は表皮メラノサイトの PAR-2 を介して TFE3 や TFEB の発現を誘導し、表皮メラノサイトの異常増殖からカフェオレ斑形成に関与する可能性が推察される。TFEB/TFE3 と MITF はヘテロダイマーを形成し c-kit シグナル伝達にかかわる転写因子であるため、NF1 のカフェオレ斑の直下でみられる真皮線維芽細胞由来の c-kit リガンドである sSCF の増加が、表皮メラノサイトの強い増殖反応を引き起こすしくみも今後検討する必要がある。

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、NF-1 遺伝子変異による neurofibromin の減少あるいは機能低下により NF-1 の皮膚症状として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、我々は特に cAMP シグナル伝達の異常が、カフェオレ斑発症に及ぼす影響について検討した。

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の変化が見出されている。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、健康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本的な細胞増殖率は NF1 患者由来のメラノサイトで変わらないため、メラノサイトの RAS 活性上昇によってメラニン生成亢進が直接引き起こされるような単純なメカニズムではないと考えられている。

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を用いては、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⁾。

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た。RAS 以外で特に cAMP 関連細胞内シグナルを検討し、neurofibromin の機能低下からカフェオレ斑発症に至る全く新しいメカニズムを検証した。

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) 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 (シークエ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クエンス siRNA (QIAGEN) を使用した。更に安定的な 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。ノックダウン細胞に類似させた細胞内 cAMP レベルの修飾として、forskolin 刺激により増加、adenylate cyclase 阻害薬の SQ22536 添加により減少させて cAMP シグナル下流への影響を調べた。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) および PARs の発現レベルは特異的プライマーを用いて SYBR GREEN 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発現量を確認した。PAR2-AP またはトリプシンにより PAR を刺激し、遺伝子発現の変化をリアルタイム RT-PCR にて検討した。cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現パターンを NF-1 ノックダウンメラノサイトとコントロール細胞で比較した [AccGene Human oligo chip 30K、日立ソフト]

C. 研究結果

1. 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 RNAi を用いて解析した。さらに、SiRNA の配列を再利用した shRNA では効率が悪い為レンチウイルスベクターにより発現された、新たな miR RNAi シークエンスによるノックダウンを行った。
2. NF1 ノックダウンメラノサイトでは、細胞増殖は有意に亢進していたが、基本培地培養では、予想に反してメラノサイトの増殖にかかわる細胞内 cAMP レベルは減少していた。さらに、adenylate 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するものの、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 の増加は有意に低下していた。NF-1 の non-Ras function の低下による cAMP シグナル低下が示唆された。
3. NF-1 ノックダウンメラノサイトでは血清添加後の 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と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た。増殖亢進は H89 (PKA 阻害薬) によって完全に消失した。したがって、cAMP-PKA シグナルによる細胞増殖刺激の下流の転写因子などが過剰に反応し増殖シグナルを伝達していることが示唆された。
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CDK2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NF-1ノックダウン細胞では亢進し、その下流のCDK2の発現増加も確認された。

- さらにneurofibrominの減少とMiT family転写因子発現レベルの修飾との関連を調べるために、cDNAアレイを用いて、これらの事象に介在し関与している遺伝子を検索した。TFEB等の発現を上流で調節する遺伝子の一つであるPAR2がNF-1ノックダウンで発現上昇していることが見出された。
- リアルタイムRT-PCRにて確認したところ、PARs遺伝子のPAR1とPAR2の発現がノックダウンにて上昇していた。
- NF-1ノックダウンによるcAMPの減少とPARs遺伝子、MiT family遺伝子の発現レベル変化を明らかにするために、adenylate cyclase阻害剤であるSQ22536を添加し発現を経時的に解析したところ、添加後PAR2あるいはPAR1とTFE3/TFEBの発現レベルがほぼ並行して推移し上昇することが明らかになった。
- PAR2-APやトリプシン刺激によりPARsを刺激すると、TFE3/TFEBの発現が上昇することがリアルタイムRT-PCRにて確認された。

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adenylate 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adenylate 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低下をもたらしadenylate 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。

今回、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少ないが、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いう一見相反する現象のしくみが明らかになった。MiT familyの転写因子発現パターンがNF-1ノックダウンにより修飾され、TFEB/TFE3転写因子の発現が亢進し、cAMPシグナルで過剰に増殖反応を示す可能性が考えられた。一方、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コントロールと比較して活性化されることはないと考えられた。

MiT family転写因子発現レベルとneurofibrominの関連については、cAMPの低下がPARsの発現を亢進させ、その下流のTFE3/TFEBの発現上昇をきたす機序が示唆された。今後、PARsのRNAiノックダウンなどにより、この経路をさらに確認する必要があると考えられた。

参考文献

- 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
- Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- Eirikur Steingrimsdottir, 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

- 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

- Zhang Yong, Minao Furumura, Eishin Morita. Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF121 and VEGF165, *Growth Factors*, 26: 125-131, 2008.
- 古村南夫. 母斑症に気づくコツは、小児の皮

膚トラブル FAQ、p264-265、末廣 豊、宮地
良樹編、診断と治療社、東京、2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

NF1 遺伝子産物の細胞内シグナル解析と 腫瘍形成機序の研究

研究分担者 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

多発性神経線維腫の形成は NF1 の主症状であり、皮膚の形状変化による機能上の問題のみならず、悪性化の母地となり得ることから、その治療法の開発は重要である。私達は神経線維腫の病理像の洗い直し、更には動物モデルの文献的考察から、その形成機構に関する新たな考察を行った。そして、神経線維腫に見られる、1) NF1+/- 肥満細胞の浸潤、2) NF1+/- の線維芽細胞、シュワン細胞、血管上皮細胞の増生、3) フィブロネクチンや、ヒアルロン酸などを中心とした細胞外マトリクスの集積、などの特徴的な病理像は上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) によって引き起こされる線維性疾患に類似した所見であることを見出した。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が判明し、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。本研究は、多発性神経線維腫の形成に関する新たな考え方にに基づき、従来のパラダイムとは異なった治療戦略を考案することを目的として行った。

B. 研究方法

神経線維腫の病理組織をさまざまな上皮マーカーおよび間葉系マーカーにより染色することにより、

神経線維腫と上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) の関連について検討を行った。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. 研究結果

1. 神経線維腫を構成する細胞における EMT 関連転写因子の発現

神経線維腫の組織における EMT 関連転写因子 snail, zeb1 の発現を調べたところ、腫瘍構成細胞の大半が snail 陽性、一部の細胞が zeb1 陽性であり、神経線維腫が間葉系性質を持った細胞によって構築されていることが分かった (図 1)。

2. NF1 欠損シュワン細胞における EMT 関連転写因子の発現

神経線維腫患者より確立された NF1 欠損シュワン細胞 sNF96.2 cell における Snail の発現を免疫細胞染色によって調べたところ、Snail タンパク質の高い発現を認めた (図 2)。

次に sNF96.2 cell における Slug, Snail, Twist,

Zeb1, Zeb2 の発現を mRNA レベルで調べたところ、間葉系性質を持つ乳がん細胞 MDA-MB-157 同様に、これら転写因子が高発現していた (図 3)。

3. NF1 発現抑制の際の EMT 関連転写因子の発現

上皮性性質を持つ ARPE-19、MCF7、HeLa において、siRNA によって NF1 を発現抑制した際の EMT 関連転写因子の発現を検討した。ARPE-19、MCF7 において、それぞれ Zeb1、Slug が NF1 の発現を抑制することによって上昇した (図 4)。

D. 考察

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 (図 4)。つまり、神経線維腫では、1) NF1^{+/-} 肥満細胞の浸潤、2) NF1^{+/-} の線維芽細胞、シュワン細胞、血管上皮細胞の増生、3) フィブロネクチンや、ヒアルロン酸などを中心とした細胞外マトリックスの集積、などの特徴的な病理像が見ら

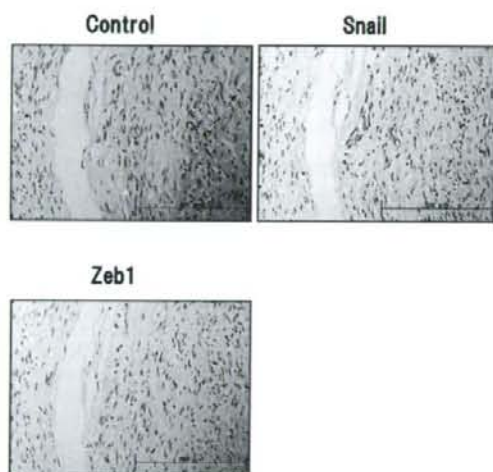


図 1 神経線維腫における Snail, Zeb1 発現

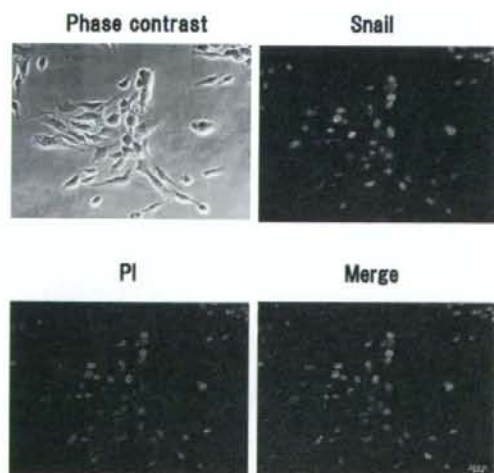


図 2 sNF96.2 cell における Snail の発現

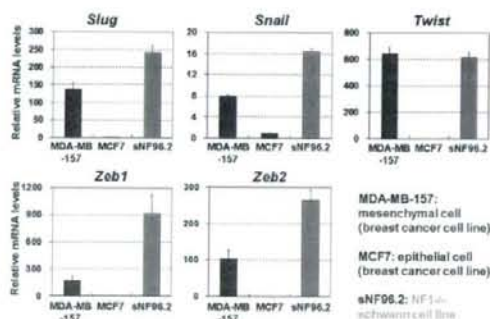


図 3 sNF96.2 cell における EMT 関連分子の発現

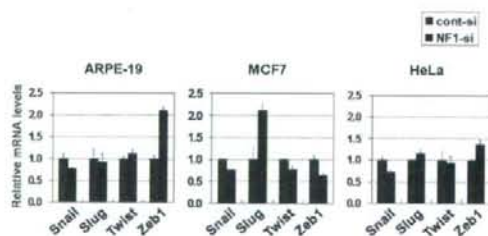


図 4 NF1 発現抑制時の EMT 因子の動態

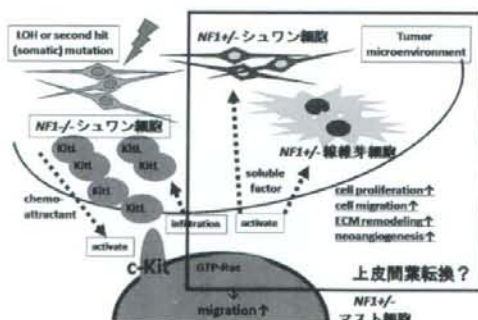


図 5 神経線維腫形成機構

れ、これらは EMT によって引き起こされる線維性疾患に類似した所見であると考えられる。

私達は 2005 年に、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、NF1 欠損・変異が間葉系転換に関与する可能性について初めて報告した (Ozawa et al., *J Biol Chem* 280: 39524-39533, 2005)。そこで今回、神経線維腫という病態が過剰な間葉系反応によって生じていることを確認するための実験を行った。結果に示すように、臨床サンプルおよび NF1 患者から樹立したシワ細胞を用いた解析により、EMT を誘導する主たる転写因子である Snail の発現が有意に上昇していることを見出した。また、mRNA レベルでも Slug、Snail、Twist、Zeb1、Zeb2 など EMT 関連転写因子の発現上昇がみられた。さらに上皮性細胞において NF1 の発現を抑制することで、これらの転写因子の上昇が確認でき、NF1 遺伝子の機能不全と EMT の誘導が直接関連していることを見出した。また、NF1 siRNA によりヒアルロン酸など細胞外マトリクスの産生も増加することも観察されており、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。

E. 結論

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た。現在私達のグループは上皮間葉転換を抑制する薬剤の開発研究を行っており、これらの薬剤が本症候の新たな治療になる可能性が考えられる。

F. 研究発表

論文発表

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*. 283: 9399-9413, 2008

Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H and Taya Y: Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristics of the epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 68: 5104-5112, 2008

学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得

現在、申請中。

幼児に生じた神経線維腫の形成に 肥満細胞が及ぼす影響に関する研究

研究分担者 中山樹一郎 福岡大学医学部皮膚科学教室教授

研究要旨

症例は2歳の女兒、2002年9月生まれ。生後半年頃から躯幹に褐色斑が多発し、神経線維腫症1型と診断されていた。家族内に同症なし。2004年9月（1歳11か月）で再診した際には腰背部に常色から褐色の柔らかい丘疹が多発していたため当科紹介受診。活性型ビタミンD3軟膏外用を開始、色素斑は軽度改善したが、小結節は次第に増数してきた。2004年2月よりケトチフェン0.5mg/dayを投与開始した。丘疹が増数するため生検。病理組織像は神経線維腫であった。その後も増数が続くため2006年11月入院、全麻下におよそ30個の丘疹を切除した。その後も増数が続くため2008年再度入院、多数の切除を行った。神経皮膚線維腫症1型（レックリングハウゼン病）の診断基準及び治療ガイドラインにおいて、皮膚の神経線維腫は多くの患者が整容上の問題ととらえていることから外科的切除が薦められているが、幼児期の神経線維腫の多発は稀で慎重な治療方針の選択が必要と考えられた。

今福信一、松嶋 悠、
高橋 聡 福岡大学医学部皮膚科学教室

A. 研究目的

神経皮膚線維腫症1型（NF1）の整容的に問題となる皮膚症状である神経線維腫は95%の症例に見られるが、15歳頃から徐々に多発してくる。多発する皮膚の神経線維腫は患者の70%以上が整容上の問題として意識していて、特に20%は重大な問題と考えていて[1]、その治療については、日本皮膚科学会のガイドライン[2]において外科的な切除が推奨されている。しかし、小児については頻度が少なく、治療指針が示されていない。我々は1歳から多発した神経線維腫症例について病理組織学的に検討し、また手術療法を選択したのでその結果について報告する。

B. 研究方法

症例：3歳の女兒。主訴：多発性の皮下結節。現病歴：生後半年頃から躯幹に褐色斑が多発し、近くの病院で神経線維腫症1型（NF1）と診断されて

いた。2004年頃から腰臀部に結節が出現してきた。2004年9月（1歳11か月）で再診した際には腰背部に常色から褐色の柔らかい結節が多発していた。結節が増数するため当科紹介受診となった家族歴：同症なし。生活歴：母親が色素斑を気にしており、それを取ろうと毎日入浴時にごしごし皮膚を擦っていたという。初診時現症（図1）全身に散在性に3cm程度の類円形の褐色斑がみられた。腰部に拇指頭大のなだらかな軽度の隆起が多数見られた。隆起は触診上柔らかくぶよぶよしており境界は不明瞭であった。

経過：色素斑に対し活性型ビタミンD3軟膏外用を開始、色素斑は軽度改善したが、小結節は次第に増数してきた。2004年2月よりケトチフェン0.5mg/dayを投与開始したが、丘疹が増数するため生検。病理組織像は神経線維腫であった。その後も増数が続くため2006年11月入院、全麻下におよそ30個の丘疹を切除した。その後も更に増数が続くため2008年再度入院、約20個の切除を行った。術創部は瘢痕となっているが、近傍からの神経線維腫の再発はみられていない。現在の臨床像を示す（図2）。

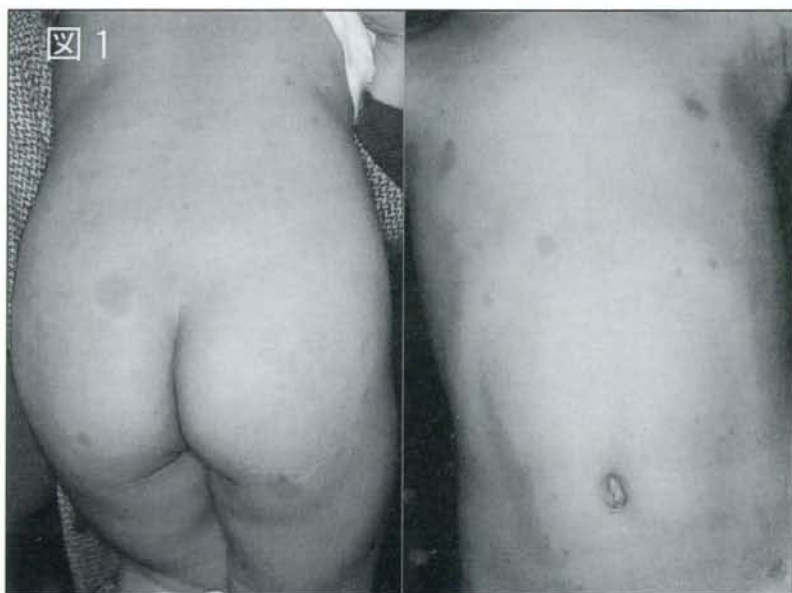


図1 初診時臨床像(2006.2.28) 3歳5ヶ月
 躯幹、臀部に散在性に小型の類円形褐色斑が見られる。

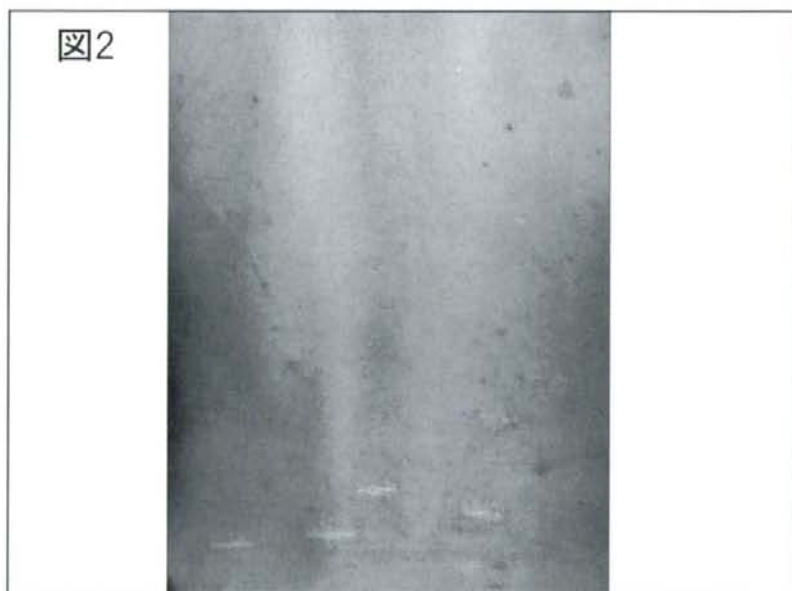


図2 2008.9.9(5歳)の臨床像。皮内結節は切除によりみられない。腰部に白色の線状瘢痕がみられる

骨の肥大や延長はみられていない。

C. 研究結果

幼児期に神経線維腫が多発する記載はあるものの稀で、病理組織学的に一般的な皮膚の神経線維腫と比較して検討した。HE染色においては本症例

の病理像は真皮下層から皮下にかけて境界不明瞭な神経線維腫がみられ、多数の肥満細胞の浸潤が見られた。(図3,4) 肥満細胞の正確な同定のためトルイジンブルー染色を行った(図5)。対照として成人のNF、単発性のNFも同様の染色を行った。400倍一視野あたりの肥満細胞の数を腫瘍内の3カ所計



図3 初回手術時病理組織像。HE original magnification x40



図4 初回手術時病理組織像。HE original magnification x100

測し、集計したところ、図6のように他のNFと比較して肥満細胞の数が非常に多いことが示された。

神経線維腫の発生機序は不明な点もあるが、神経の神経線維腫においては、NF1+/-のSchwann細胞が何らかの変異によりNF1-/-となり、大量のkit ligandを分泌することによりNF1+/-の肥満細胞が

侵入、増殖し他のNF1+/-の細胞（線維芽細胞、血管内皮細胞など）を増殖させることがその本態である。肥満細胞は腫瘍形成のinducerと考えられており、本症例においては、他の成人例と比較して、かなり多い肥満細胞が浸潤していると考えられた。現在までに幼児期のNFの肥満細胞数の詳細な検討は

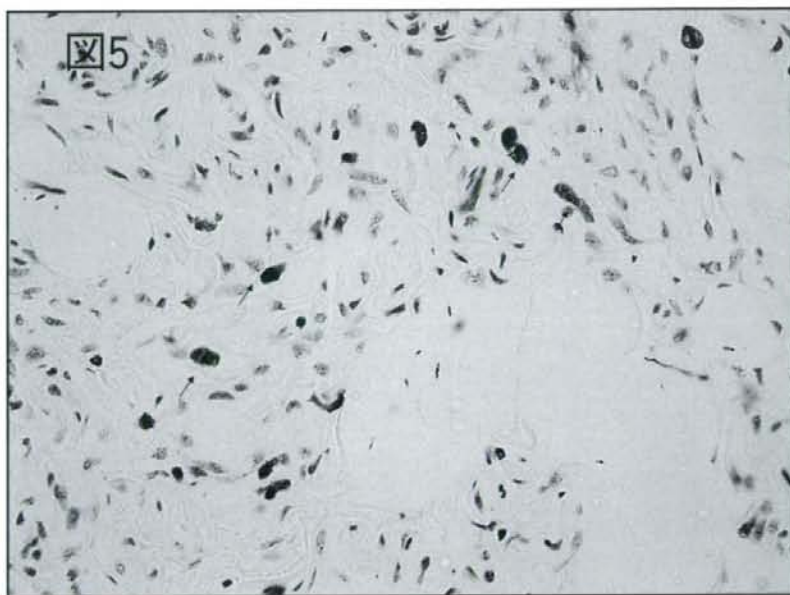


図5 症例の神経線維腫の中に見られた肥満細胞 (→)。高い密度で見られる。Troidine blue staining, x400

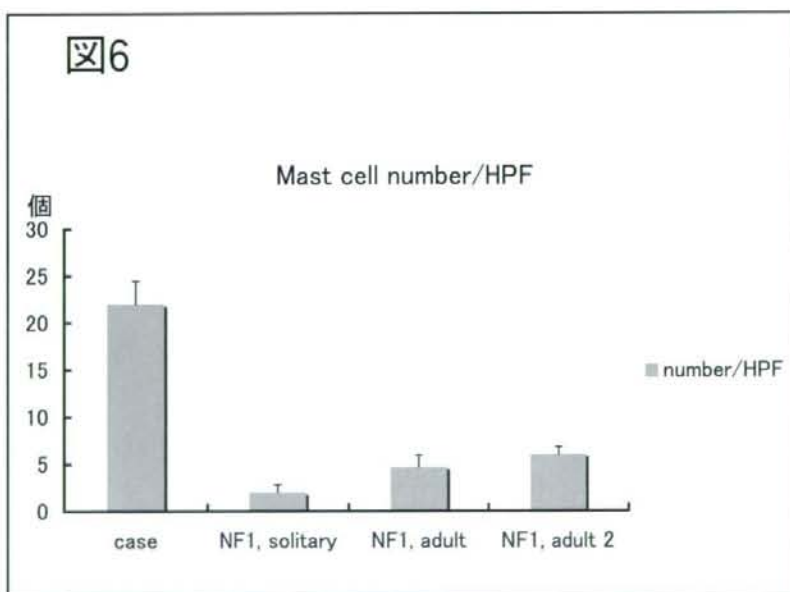


図6 400倍視野あたりの mast cell の数。本症例 (case) に於いて著しく高い傾向が見られた。他は対象として行った成人例

ないので、これが本症例に特異的なのかはさらなる検討を要する。またこの結果が幼児期からの発症と関連があるのかはより多くの検討が必要である。肥満細胞の浸潤を抑制するような治療法の検討も必要と考えられた。

臨床的には、前述したように幼児期の神経線維腫に対する手術的な治療に対してはあまりコンセンサスが無いのが現状である。病態的にこれらの境界不明瞭な NF がやがてび慢性神経線維腫となっていくのか、それとも皮膚の神経線維腫のように孤在性で

続くのかのフォローアップが必要である。また、本人、保護者の整容的な要求もあり、どの時期にどの程度の治療を行うかは何らかの指針が必要と考えられる。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表（本報告を現在投稿中）

2. 学会発表 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Neurofibromatosis 1 の Nodular plexiform neurofibroma をめぐって

研究分担者 倉持 朗 埼玉医科大学医学部皮膚科教授

研究要旨

Neurofibromatosis 1 (NF1) の神経原性腫瘍は主たる 4 つの phenotype に分けられ、これら各々の腫瘍が持つ、独自の biological behavior に即した対応と工夫を行うことにより、妥当な、また良好な予後を期待しうる治療が、できるようになってきた。しかし同時にまた、容易には解決できない困難、未知の問題を有しており、さらに様々な工夫を、考えていかななくてはならない。今回、nodular plexiform neurofibroma (nodular PNF) の持つ問題点について、考察した。nodular PNF には、a) その経年的な増加、生涯進行性、のほか、b) しばしば疼痛が高度な腫瘍 (painful tumor) であること、c) intrafamilial phenotypic variation をしめす、familial case の一方として生じること、d) malignant peripheral nerve sheath tumor の発生母地となること、といった、重要で特徴的な、4 つの問題点があることを示し、かつ考察を加えた。

A. 研究目的および研究方法

NF1 の神経原性腫瘍のうち、nodular PNF は末梢神経の神経周膜の中に発生した、神経の神経線維腫と定義される。nodular PNF は、paraspinal nodular PNF を含め、NF1 の生命的予後と QOL を決定する、重要な因子のひとつである。筆者が“長期に渡って”経過を追うことのできた、NF1 患者、約 440 人について、その臨床像を、診療録や、手術記録を仔細に調べ、また病理組織学的・画像診断学的検討も、充分加えることにより、nodular PNF の持つ、実質的な問題点を、明確に示すことを目指した。倫理面への配慮：患者個人が特定されない、または家族性症例も特定できないような、最大限の配慮を行った。個人が特定できる情報は避け、臨床経過を追う際に使用を避けられない写真の利用については、個人が特定できないよう、ブラックで一部を完全に覆った。

B. 研究結果

次の 4 つに集約することができた。

nodular PNF は、経年的に増加・増大し、浅いところにも深いところにも生じ、生涯進行性のことがある腫瘍である。稀に体表全面を覆い尽くし、全て

の体腔内に無数に生じ、埋め尽くすことがある。

nodular PNF は、高度な疼痛を生じる腫瘍—すなわちいわゆる painful tumor—であることがある。

intrafamilial phenotypic variation を示す familial case の一方として、nodular PNF は生じることがある。自験例では、これは親子間で認められており、一方、特に親の neurofibroma が cutaneous neurofibroma のみであり、他方、子供の neurofibroma が nodular PNF のみであることが、多かった。

malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) の発生母地として、nodular PNF は重要である。しばしば異時性・多中心性に、MPNST が nodular PNF に由来して生じ、多発する。nodular plexiform MPNST と呼ばれることもある。nodular PNF 内で focal malignancy といいうる状態が観察される。なお nodular PNF 内の focal malignancy、early nodular plexiform MPNST といいうる状態を、画像診断学的に描出できないかを検討したが、まだ一般的には難しい状態であった。

C. 考察及び結論

Nodular PNF は末梢神経の perineurium 内に生じた、神経の神経線維腫であるが、皮膚の神経線維腫

とは全く性格の異なったものと考えられている。

遊走する neural crest cell は、Schwann cell precursor にまず分化し、そののち S-100 を表現する immature Schwann cell に分化する。Immature Schwann cell は、2つの type の mature cell、すなわち myelinating Schwann cell と、non-myelinating Schwann cell に分化する。Schwann-cell precursor と immature Schwann cell の両者は embryonic Schwann cell lineage と呼ばれ、nodular PNF はこの lineage の transformation によって生ずる。Cutaneous (dermal) neurofibroma は、mature Schwann cell lineage からの transformaton で生じ、NF1 の disruption とホルモンの影響などの non-genetic factor の影響下で生じると考えられている。

臨床上也、cutaneous neurofibroma が明らかに他の NF1 の neurogenic tumor とは異なり、NF1 の個体で最も遅く、思春期前後に生じるのが普通であるのに引き換え、nodular PNF は、6-7歳ころに四肢、頸部に、神経の走行に沿って、念珠状に、生じることが多い。ただし、diffuse plexiform neurofibroma の内部に、出生時、或いは出生後の早期から 5-6歳ころまでに触知することがあり、またときには diffuse plexiform neurofibroma を伴うことなく、出生時、出生後早期に、触知することがある。

Nodular PNF が、症例によっては、極めて多数生じること、体腔内全て、筋層内全てを埋め尽くすことすらあることは、留意すべきことである。このことは、この腫瘍が独特な性格を有し、このことだけでも NF1 の生命予後と QOL に強く関わることを意味する。

疼痛の高度な症例は、男児で大腿の内側に生じ、かつ、筋層内にまで多数存在する症例が多かった。痛みのコントロールの極めて難しいものがある。ガンナイフの施行例で、10ヶ月程度疼痛を抑えたものがあつた。Cox2 inhibitor が有効と思われる症例もあつた。

しかし長期間疼痛を抑えられるものは、現時点では不明である。ベンゾジアゼピン系薬剤に、ノイロトロピンや、Cox2 inhibitor, Vit B12, プロピオン酸などを併用したものや、筋膜レベルでの腫瘍の切除を、現実的には行わざるをえない。

nodular PNF の malignant transformation については、初期には focal malignancy と評価してよいもの

が悪性度を増すこと、一その後は、肺転移を高率に生じ、手術や化学療法 (MAID や CYVADACT) による治療がうまくいかない予後不良例も多い、一など、最大の問題点を、はらんでいる。Nodular PNF の多発例、とりわけ深部での多発例では、異時性、多中心性に各々が MPNST を生じ得、また簡単に発見できず、摘出して組織学的診断を可及的早期に行うことが、不可能なため、特に重大である。さらに現時点で、初期の悪性化を detect 出来る、画像学的、生化学的マーカーが無いことが、大きな問題である。

拡散強調画像と PET/CT の組み合わせが有効である可能性があると考えられたが、neurogenic tumor では、良性でも standardized uptake value (SUV) が高いことはざらで、SUV が異常高値でなければ決定打とはならないため、難しかった。(もちろん advanced の MPNST については、MRI や、通常の sintigraphy で、容易に detect されるわけである。)

なお、diffuse plexiform neurofibroma の中にある、小さな nodular PNF が、触診や MRI による検査では、分らないことがよくある。これは、Elastography により、容易に detect されることを確認した。

家族内の phenotypic variation の原因は、例えば、母と子の症例でいうと、遺伝子の半分のセットが父親から由来したセットであることは、重要な要因であることは考えられる。またほかにも、NF1 gene の変異の pleiotropism, NF1 gene 以外の modifying gene の存在の可能性、microenvironment に依る調節、など、phenotype 発現の多様性に影響を与えるものの存在の可能性、が指摘されている。しかしこれらについては、いまだに何も分っていない。

D. 研究発表

学会発表

日本臨床皮膚科医会総会；教育講演 2008年5月
24日 東京

日本皮膚科学会西部支部学術大会；ワークショップ
2008年10月18日 福岡

E. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

神経線維腫症 1 患者に生じる腫瘍の 拡散強調画像による評価

研究分担者 中川秀己 東京慈恵会医科大学皮膚科教授

研究要旨

神経線維腫症 1 (NF1) 患者に生じる腫瘍の良性悪性の評価は組織学的検討が肝要ではあるが、MRI による新しい悪性腫瘍診断法として拡散強調画像 (diffusion-weighted imaging: DWI) が臨床応用されるようになった。NF1 患者の場合、該当する腫瘍が神経線維腫なのか悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) などの悪性腫瘍なのか鑑別することを要求されるが困難な場合も多い。そこで NF1 患者に生じる腫瘍の DWI による評価と病理組織の関連性についての検討をおこなったところ、DWI で腫瘍の一部でも high b value を示した症例は、MPNST と病理学的に診断され、high b value の DWI で低信号あるいは信号の減弱を示した症例は、神経線維腫と病理学的に診断されたことにより感度、特異度ともに高値であると期待できる。DWI は、悪性腫瘍への臨床応用が盛んに行われているが、NF1 患者に生じる腫瘍の DWI による良性悪性病変の評価もその病理学的見地からの再認識が必要である。

太田有史、二木 賢、
堀 和彦、谷戸克己、
新村真人
大木一剛

東京慈恵会医科大学皮膚科
東京慈恵会医科大学放射線科

A. 研究目的

神経線維腫症 1 患者に生じる腫瘍の良性悪性の評価は組織学的検討が肝要ではあるが、その補助的診断として CT, MRI, PET などの画像診断がある。近年、MRI による新しい診断法に拡散強調画像 (diffusion-weighted imaging: DWI) が臨床応用されるようになった。DWI は水分子 (プロトン) の熱運動状態を画像化したもので、最初に急性期脳梗塞に臨床応用され、現在きわめて明瞭な画像を得ることが出来る。また近年、悪性腫瘍、特に乳癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、肝転移腫瘍、骨転移腫瘍でも診断のための重要な判断基準となりつつある。神経線維腫症 1 (NF1) 患者の場合、該当する腫瘍が神経線維腫なのか悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) などの悪性腫瘍なのか鑑別することを要求されるが困難な場合も多い。そこで NF1 患者に生じる腫瘍

の DWI による評価と病理組織の関連性についての検討をおこなった。

B. 研究方法

対象は、結節性の病変を生じた NF1 患者で DWI を術前に施行し、切除標本の病理学的検討を行った 10 症例。High b value DWI で高信号かつ ADC 画像で低信号の場合、悪性腫瘍を考えた。

倫理面への配慮に関しては、通常の MRI 検査に準じた危険性に関して説明し理解を得られた場合のみ検査をおこなった。

C. 研究結果

DWI で腫瘍の一部でも high b value (b=800 あるいは 1000) で高信号を示した症例は、MPNST と病理学的に診断された (症例 1 から 6)。一方、high b value DWI で低信号、あるいは high b value での信号が low b value (b=50) と比較して信号の減弱を示した症例は、神経線維腫と病理学的に診断された (症例 7 から 10)。症例 8 は、臨床的にはびまん性神経線維腫であるが、腫瘍と思われる部分すべてが

ADC 画像で高信号を示した。(表1)。

D. 考察

DWI は脂肪抑制法を併用した SE-EPI (echo-planar imaging) 型 T2 強調画像に、位相分散を強調する 1 対の傾斜磁場 (motion probing gradient: MPG) を印加した拡散を強調した画像である。MPG によるプロトンの位相分散の強調度は b 値 (b value) で表現される。2 つの異なる b 値の DWI から「みかけの拡散係数 (ADC)」が計測できる。拡散像には、拡散強調画像 (DWI) とみかけの拡散係数 (ADC) 画像がある。DWI は、拡散強調成分と T2 強調成分の両者の反映であり、ADC 画像 (ADC map) は、これから T2 強調成分を除いて拡散成分のみを表したものである。すなわち、T2 が長いと高信号、ADC が大きいと低信号となるので、適当に T2 が長く ADC が小さい組織で DWI は高信号を呈する。単純化すると、“拡散強調画像 (DWI) の信号強度 \propto T2 強調画像 / 拡散の程度”となる。

DWI の特徴として、1. 正常部と病変部のコントラストが非常に高い。2. 造影剤を用いない。3. 見かけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient: ADC) を測定することによりある領域内の水分子の動きをある程度定量化できる。などが挙げられる。DWI は水分子の拡散現象 (ブラウン運動) を反映した画

像である。すなわち高信号を呈する部分は、細胞密度が上昇しているために水分子の拡散が低下しているたとえば悪性腫瘍、また細胞外液の粘稠度が高く水分子の熱運動が制限されるたとえば蛋白成分に富む粘液が多い部分である (表2)。

今回の研究では、DWI で腫瘍の一部でも high b value で高信号を示した症例は、MPNST と病理学的に診断され、high b value の DWI で低信号あるいは信号の減弱を示した症例は、神経線維腫と病理学的に診断されたことにより感度、特異度ともに高値であると期待できるが症例数が少ないため統計学的な考察は行っていない。一般的に ADC 画像が高信号

表2 拡散強調画像 (DWI) における高信号

1. 細胞密度の上昇 (細胞浸潤) による拡散の低下
 - 悪性腫瘍
 - 正常リンパ節
 - 炎症 (膿瘍)
2. 細胞内浮腫による拡散の低下
 - 脳梗塞 (急性期)
3. T2 強調画像の影響
 - T2 shine through 効果

表1 NF1 患者に生じた腫瘍の拡散強調画像 (DWI) と病理組織診断

症例	年齢	性	発生部位	High b での信号	ADC 画像	病理組織診断
1	68	F	左腋下	高信号(H)	低信号(L)	悪性神経鞘腫症(MPNST)
2	22	F	左大腿神経	H	L	MPNST
3	17	M	後腹膜腔	H(一部)	L	MPNST
4	60	M	右第4肋間	H	L	MPNST
5	30	F	後腹膜腔	H(一部)	L	MPNST
6	77	M	腰部皮膚	H	L	MPNST
7	12	M	後頭部皮膚	L	L	神経線維腫
8	25	M	左大腿	L	H	神経線維腫
9	30	F	直腸左	L	L	神経線維腫
10	15	M	右肩	L	L	神経線維腫

を示す症例（部分）は、血腫、のう胞、壊死となっている可能性があるが、NF1患者のびまん性神経線維腫では腫瘍内出血という特殊な場合を除いて生じる可能性はないため、どうして拡散の程度が少なくなっているのか検討する必要がある。また、後腹膜腔に生じたMPNSTが巨大化した場合、病変の一部だけがDWI high b valueで高信号を示す傾向があるが、病理学的な壊死の存在だけでは解釈しにくい。さらに、のう胞性病変の場合、辺縁に存在する腫瘍が不明瞭となることがある。これらの詳細な病理学的検討を踏まえたDWIの理解が必要と考える。

E. 結論

DWIは、悪性腫瘍への臨床応用が盛んに行われ

ている。その補助的画像診断としての有用性は確立しつつあるが、病変の良悪性を表すだけでなく組織構築を考える手がかりのひとつとして理解するべきである。NF1患者に生じる腫瘍のDWIによる良性悪性病変の評価もその病理学的見地からの再認識が必要である。

F. 研究発表

学会発表 第60回日本皮膚科学会西部支部学術大会（2008年10月19日）にて内容の一部をポスター発表した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

神経皮膚症候群に関する研究

研究分担者 大西五三男 東京大学医学部附属病院整形外科・脊椎外科専任講師

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、ギブスによる保存療法とプレートや髓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

する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（ $15\text{mm} \times 12.2\text{mm}$ 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評価を行い、さらに動物実験においてウサギ脛骨に対してプローブの測定精度評価を行った。

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。