

金城芳秀、柳 修平、河 正子、個人情報と定点モニタリングについての研究、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成 16 年度研究業績 2005 : 266-80.

- 32) 三宅吉博、縣 俊彦、横山徹司、佐々木敏、古村南夫、中山樹一郎、田中景子、牛島佳代、岡本和士、阪本尚正、小橋 元、鷺尾昌一、稲葉 裕. 神経線維腫症 1 の症例対照研究、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成 16 年度研究業績 2005 : 11-20.
- 33) 縣 俊彦. 個人情報と神経線維腫症 1 定点モニタリングに関する研究、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 神経皮膚症候群に関する調査研究班 平成 16 年度研究業績 2005 : 15-28.
- 34) 縣 俊彦、高木廣文、金城芳秀、稲葉 裕、黒沢美智子. 複数の疫学調査から見た NF1 (neurofibromatosis 1) の臨床疫学的傾向、特性. 第 13 回日本疫学会学術総会. (福岡. 2003.1)
- 35) 縣 俊彦、高木廣文、金城芳秀、稲葉 裕、黒沢美智子、三宅吉博. 個人情報保護と疫学研究のあり方. 第 14 回日本疫学会学術総会. (山形. 2004.1)
- 36) 縣 俊彦、高木廣文、金城芳秀、稲葉 裕、黒沢美智子、三宅吉博. 個人情報保護と疫学研究. 第 15 回日本疫学会学術総会. (大津. 2005.1)
- 37) Agata Toshihiko, Shimizu Hidesuke, Takagi Hirofumi, Hayakawa Tosaku, Ryu Shuhei, Saiki Keitiro, Kinjo Yoshihide, Inaba Yutaka, Otsuka Fujio, Niimura Michito. A study of lish nodules (LN) of NF1 (neurofibromatosis 1) in Japan. Journal of AOPO (Asia Pacific Academy of Ophthalmology) 2005: 20: 261-2
- 38) 縣 俊彦、柳澤裕之、稲葉 裕、黒沢美智子、金城芳秀、柳 修平、河 正子、佐伯圭一郎、島田三恵子、西川浩昭、廣田良夫、上原里程、中村好一、太田晶子、永井正規、中山樹一郎、新村真人、大塚藤男. NF1 患者定点モニタリングでの臨床像、予後の把握 - 対象施設選定 -、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成 20 年度研究業績 2009 : 288-300.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

- 1) Agata T, Yanagisawa H, Niimura M, Inaba Y, Kurosawa M., Nishikawa H., Nagai M., Ryu S., Nakayama J., Ohtsuka K. Epidemiological Studies of Facial Nerve Problems of NF2 (Neurofibromatosis type 2) in Japan XI International Facial Nerve Symposium ROME 2009-4-25-28
- 2) 西川浩昭、縣 俊彦、稲葉 裕、黒沢美智子. 全国調査データから見た神経線維腫症 1 の家族歴、受療状況とその関連要因. 第 74 回日本民族衛生学会、京都 (2009.11.12-13) 第 75 巻付録 p84-5
- 3) 縣 俊彦、西川浩昭、稲葉 裕、黒沢美智子. 結節性硬化症 (TSC) の患者医療費補助決定要因に関する研究. 第 74 回日本民族衛生学会、京都 (2009.11.12-13) 第 75 巻付録 p98-9
- 4) T Agata, Y Yanagisawa, M Niimura, H Nishikawa, T Ohtsuka, Y Inaba, M Kurosawa, Y Nakamura, R Uehara, M Watanabe, M Nagai. Change of socio-epidemiologic status of Tuberous Sclerosis Complex (TSC) patients during these 10 years in Japan. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association, January 9-10, 2010, Koshigaya, Saitama, JAPAN
- 5) H Nishikawa, T Agata, Y Yanagisawa, M Niimura, T Ohtsuka, Y Inaba, M Kurosawa, Y Nakamura, R Uehara, M Watanabe, M Nagai. Differences in the socio-epidemiologic status patients with Neurofibromatosis: Comparison of facilities with and without a member of NF research group. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association, January 9-10, 2010, Koshigaya, Saitama, JAPAN

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

結節性硬化症（TSC）患者 医療費補助決定要因に関する研究

研究分担者 縣 俊彦 東京慈恵会医科大学・環境保健医学准教授

研究要旨

TSC（結節性硬化症）は臨床的に TSC1、TSC2 を区別することはできず、多彩な臨床症状を呈する。そして、充分労働もできず、医療費も多額必要となる患者が多い。しかし本疾患は難病の治療対象疾患に該当しないため、難病としての医療費補助は行われず、必要な場合、別の名目で補助が行われる。今回補助が行われる要因はどのようなものかを検討し今後の難病対策の一助とすることを考える。

資料は TSC 全国調査 2 次調査の患者情報を基に解析した。TSC は国の難病（治療対象疾患）には認定されていないが、何らかの特定疾患と認定され、治療を受けている患者が半数以上である。この辺は患者、担当者の知恵のたまものである。また、痙攣発作の有無が公費負担の要因として大きな役割を占めているので、医療者は、日常診療、地域連携活動においても、患者情報を充分入手し、患者及び家族のための最適な方策を検討する必要がある。

柳澤裕之	東京慈恵会医科大学・環境保健医学
稲葉裕、黒沢美智子	順天堂大学衛生学
金城芳秀	沖縄県立看護大、大学院
柳 修平	東京女子医大、大学院
河 正子	東京大学、大学院ターミナルケア学
佐伯圭一郎	大分看護情報大学、大学院、保健情報
島田三恵子	大阪大学大学院医学系研究科
西川浩昭	日本赤十字豊田看護大
上原里程、中村好一	自治医科大学公衆衛生学
太田晶子、永井正規	埼玉医科大学公衆衛生学
中山樹一郎	福岡大・皮膚科
新村真人	東京慈恵会医科大学皮膚科
大塚藤男	筑波大、皮膚科

る。皮膚と神経系に異常がみられ、母斑症グループに属する。古くは、顔面血管線維腫、てんかん、知的障害の 3 症状（3 主徴）により確定診断してきたが、診断技術の進歩に伴い、知的障害や、痙攣発作のない軽傷例も多数確認されるようになった¹⁻²⁰⁾。それに伴い、全身の種々の症状で診断されることも多くなり、臨床疫学像も変化してきた。

Tuberous sclerosis（結節性硬化症）に関する記載は、1862 年 von Recklinghausen により brain sclerosis を伴った新生児の cardiac tumors (myomata) が最初と考えられている。

その後 1880 年に、Bourneville によりてんかんを伴う精神薄弱者の 3 剖検例が報告され、そのなかで、脳の病理学的な所見として脳に硬化した結節性病変“Tuberous sclerosis of the cerebral convolutions”という表現が使われた。これが本疾患の病名 Tuberous sclerosis の由来となった。

1890 年、pringle は顔面の皮膚症状を adenoma sebaceum（後年これは adenoma sebaceum ではなく angiofibroma と確認された）と報告した。本症の遺伝形式に関しては、既に、1935 年に Gunther と

A. 研究目的

結節性硬化症（TSC）はプリングル病とも呼ばれ、全身に過誤腫（良性腫瘍）が生じる常染色体性優性遺伝疾患で原因遺伝子は染色体 9、16 番に存在す

Penroseにより常染色体優性遺伝と報告されている。

1993年にEuropean chromosome 16 tuberous sclerosis consortiumによって16番の染色体上に結節性硬化症のTSC2遺伝子が、1997年にSlegtnenhorstらによって9番の染色体上にTSC1の遺伝子が同定され、本症解明が進んだ。

それに伴い、本症は結節性硬化症複合体(Tuberous sclerosis complex)(TSC)とよばれるようになってきた。TSC1遺伝子とTSC2遺伝子とは、全く異なった遺伝子であるが、現在のところ、臨床的にTSC1、TSC2を区別することはできず、多彩な臨床症状を呈する。そして、充分労働もできず、医療費も多額必要となる患者が多い。しかし本疾患は難病の治療対象疾患に該当しないため、難病としての医療費補助は行われず、必要な場合、別の名目で補助が行われる。今回補助が行われる要因はどのようなものかを検討し今後の難病対策の一助とすることを考える。

B. 研究方法

TSC全国調査2次調査の患者情報を基に解析した。解析項目は、性、生年月日、年齢などの個人属性の他、推定発症年月日、初診年月日、診断年月日、公費負担の有無およびその種類、受療状況、家族歴、日常生活、経過、臨床症状の有無、程度(痙攣発作とコントロール、精神発達遅滞、IQ、顔面血管線維腫等、色素脱失斑、気胸)等である。公費負担の有無で患者を分類し、関連する要因を検討した。ロジスティックモデルでは独立変数は性、年齢、家族歴に各臨床症状を加えステップワイズ法で検討した。検討した臨床症状は、痙攣発作、多発性爪囲線維腫、色素脱失斑、隆起革様皮or結合組織母斑、木の葉状白斑周囲の小白斑、歯エナメル質の多発性小腔、歯肉の線維腫、長管骨の過形成、粉瘤、大脳皮質結節、放射状大脳白室神経細胞移動線、石灰化沈着、発作波、心エコー所見、眼底病変である。

解析にはSAS9.1を用いた²¹⁻³³⁾。

(倫理面への配慮)

調査票の個人情報に含まれない部分の解析であるので、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

公費負担の有無でみると、負担なし107(33.9%)、あり209(66.1%)で、性別の結果は表1に示した。表2に診療科別負担有無別患者数を示す。小児科で

は負担ありが、多い傾向が見られる。表3、4に受療状況別、経過別患者数を示す。家族歴との関連では家族歴なし群に公費負担ありの割合が高い(F-e-p=0.00008)。医療費の名目は特定疾患95(該当疾患74、その他95(該当疾患74、21)、身体障害者36、生活保護6、その他48であった。子供有無との関連では子供なし群に公費負担ありの割合が高い(F-e-p=0.0183)。痙攣発作有無との関連では発作あり群に公費負担ありの割合が高い(F-e-p=0.00000)。公費負

表1 性*負担有無別患者

	負担なし	あり	計
男	45 (15.5%)	99 (34.1%)	144 (49.7%)
女	48 (16.6%)	98 (33.8%)	146 (50.3%)
計	148	147	295

F-e-p= 0.080

表2 診療科別患者数

	負担なし	あり	計
神経内科	5 (1.9%)	12 (4.6%)	17 (6.5%)
脳外科	10 (3.8%)	12 (4.6%)	22 (8.4%)
眼科	4 (1.5%)	6 (2.3%)	10 (3.8%)
耳鼻科	0 (0.0%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)
小児科	39 (14.9%)	134 (51.2%)	173 (66.0%)
皮膚科	20 (7.6%)	8 (3.1%)	28 (10.7%)
形成外科	3 (1.1%)	0 (0.0%)	3 (1.2%)
精神科	1 (0.4%)	5 (1.9%)	6 (2.3%)
その他	2 (0.8%)	0 (0.0%)	2 (0.8%)
計	84	178	262

表3 受療状況別患者数

	負担なし	あり	計
主に入院	3 (1.0%)	3 (1.0%)	6 (1.9%)
主に通院	91 (29.5%)	179 (57.9%)	270 (87.4%)
入院と通院	3 (1.0%)	15 (4.9%)	18 (5.8%)
転院	4 (1.3%)	4 (1.3%)	8 (2.6%)
死亡	1 (0.3%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
他、不明	2 (0.6%)	4 (1.3%)	6 (1.9%)
計	104	205	309

$\chi^2=6.3466$ p=0.3855

表4 経過別患者数

	負担なし	あり	計
軽快	6 (2.0%)	13 (4.4%)	19 (6.4%)
不変	65 (21.7%)	149 (49.8%)	214 (71.6%)
徐々に悪化	25 (8.4%)	34 (11.4%)	59 (19.7%)
死亡	1 (0.3%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
不明	2 (0.7%)	4 (1.3%)	6 (2.0%)
計	99	200	299

$\chi^2=5.0496$ p=0.2822

担に関連する要因の検討では、家族歴（オッズ比、95% Wald Confidence Limits = 0.189 - 0.811）、痙攣発作（95% WCL = 1.326 - 4.429）、木の葉状白斑の周囲の小白斑（95% WCL = 1.060 - 4.683）。石灰化沈着（95% WCL = 1.034 - 6.935）が有意であった。

D. 考察

舛添厚生労働相は2008年6月21日、九州市内で講演し、治療法が確立していない難病研究の予算を09年度には08年度の4倍程度に増やす意向を表明した。舛添氏は「難病で困っている人をみんな救ってあげたい。09年度の予算が決まった時、難病対策費が（08年度の）約24億円から100億円に増えた、としたい」と述べ、原因や治療法を究明する「難治性疾患克服研究事業」の対象となる病気を、現在の123疾患から大幅に拡大する考えを示した。これらは難病対策にとっては明るい材料といえよう。

TSCは国の難病（治療対象疾患）には認定されていないが、結果からもわかるように何らかの特定疾患と認定され、治療を受けている患者が半数以上である。

E. 結論

TSCは国の難病（治療対象疾患）には認定されていないが、何らかの特定疾患と認定され、治療を受けている患者が半数以上である。この辺は患者、担当者の知恵のたまものである。また、痙攣発作の有無が公費負担の要因として大きな役割を占めているので、医療者は、日常診療、地域連携活動においても、患者情報を充分入手し、患者及び家族のための最適な方策を検討する必要がある。今回は研究費も増額されており、またとないチャンスであろう。

文献

- 1) Sasongko TH, Wataya-Kaneda M, Koterazawa K, Gunadi, Yusoff S, Harahap IS, Lee MJ, Matsuo M, Nishio H. Novel mutations in 21 patients with tuberous sclerosis complex and variation of tandem splice-acceptor sites in TSC1 exon 14. *Kobe J Med Sci.* 2008 May 23; 54 (1): E73-81.
- 2) Hohman DW, Noghrehkar D, Ratnayake S. Lymphangiomyomatosis: A review. *Eur J Intern Med.* 2008 Jul; 19 (5): 319-24. Epub 2007 Dec 26.
- 3) Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H,

Sahin M, Kwiatkowski DJ. Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *J Neurosci.* 2008 May 21; 28 (21): 5422-32.

- 4) Camposano SE, Major P, Halpern E, Thiele EA. Vigabatrin in the treatment of childhood epilepsy: a retrospective chart review of efficacy and safety profile. *Epilepsia.* 2008 Jul; 49 (7): 1186-91.
- 5) O'Callaghan FJ, Martyn CN, Renowden S, Noakes M, Presdee D, Osborne JP. Subependymal nodules, giant cell astrocytomas and the tuberous sclerosis complex: a population-based study. *Arch Dis Child.* 2008 Sep; 93 (9): 751-4. Epub 2008 May 2.
- 6) Sheehan J, Ionescu A, Pouratian N, Hamilton DK, Schlesinger D, Oskouian RJ Jr, Sansur C. Use of trans sodium crocetin for sensitizing glioblastoma multiforme to radiation: laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2008 May; 108 (5): 972-8.
- 7) Chorianoopoulos D, Stratakos G. Lymphangiomyomatosis and tuberous sclerosis complex. *Lung.* 2008 Jul-Aug; 186 (4): 197-207. Epub 2008 Apr 12. Review.
- 8) Montcalm-Smith EA, Fahlman A, Kayar SR. Pharmacological interventions to decompression sickness in rats: comparison of five agents. *Aviat Space Environ Med.* 2008 Jan; 79 (1): 7-13.
- 9) Tolin DF, Diefenbach GJ, Flessner CA, Franklin ME, Keuthen NJ, Moore P, Piacentini J, Stein DJ, Woods DW; Trichotillomania Learning Center Scientific Advisory Board. The trichotillomania scale for children: development and validation. *Child Psychiatry Hum Dev.* 2008 Sep; 39 (3): 331-49. Epub 2008 Jan 8.
- 10) de Vries PJ, Watson P. Attention deficits in tuberous sclerosis complex (TSC): rethinking the pathways to the endstate. *J Intellect Disabil Res.* 2008 Apr; 52 (Pt 4): 348-57. Epub 2007 Dec 19.
- 11) Wang XF, Lin RY, Wang SZ, Zhang LP, Qian J, Lu DR, Wen H, Jin L. Association study of variants in two ion-channel genes (TSC and CLCNKB) and hypertension in two ethnic groups in Northwest China. *Clin Chim Acta.* 2008 Feb; 388 (1-2): 95-8. Epub 2007 Oct 22.
- 12) Muzykewicz DA, Newberry P, Danforth N, Halp-

- ern EF, Thiele EA. Psychiatric comorbid conditions in a clinic population of 241 patients with tuberous sclerosis complex. *Epilepsy Behav.* 2007 Dec; 11 (4): 506-13. Epub 2007 Oct 23.
- 13) Oliveras-Vergés A, Espel-Masferrer E. Elevated basal hepcidin levels in the liver may inhibit the development of malaria infection: another piece towards solving the malaria puzzle? *Med Hypotheses.* 2008; 70 (3): 630-4. Epub 2007 Sep 4.
- 14) Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Borowicz E, Ksiazek A. TGF-beta1 and TSC-22 gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in type 2 diabetes. *Nephron Physiol.* 2007; 106 (4): p69-75. Epub 2007 Jul 2.
- 15) Meikle L, Talos DM, Onda H, Pollizzi K, Rotenberg A, Sahin M, Jensen FE, Kwiatkowski DJ. A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *J Neurosci.* 2007 May 23; 27 (21): 5546-58.
- 16) Jansen FE, van Huffelen AC, Algra A, van Nieuwenhuizen O. Epilepsy surgery in tuberous sclerosis: a systematic review. *Epilepsia.* 2007 Aug; 48 (8): 1477-84. Epub 2007 May 1. Review.
- 17) Gallagher-Thompson D, Gray HL, Tang PC, Pu CY, Leung LY, Wang PC, Tse C, Hsu S, Kwo E, Tong HQ, Long J, Thompson LW. Impact of in-home behavioral management versus telephone support to reduce depressive symptoms and perceived stress in Chinese caregivers: results of a pilot study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2007 May; 15 (5): 425-34.
- 18) Jansen FE, Van Huffelen AC, Van Rijen PC, Leijten FS, Jennekens-Schinkel A, Gosselaar P, Van Nieuwenhuizen O; Dutch Collaborative Epilepsy Surgery Programme. Epilepsy surgery in tuberous sclerosis: the Dutch experience. *Seizure.* 2007 Jul; 16 (5): 445-53. Epub 2007 Apr 6.
- 19) de Vries PJ, Hunt A, Bolton PF. The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC): a postal survey of UK families. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007 Feb; 16 (1): 16-24. Epub 2007 Jan 31.
- 20) Avila NA, Dwyer AJ, Rabel A, Moss J. Sporadic lymphangioliomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioliomyomatosis: comparison of CT features. *Radiology.* 2007 Jan; 242 (1): 277-85. Epub 2006 Nov 14.
- 21) 縣 俊彦. 臨床医学研究の方法論・SASの概要、臨床医 2000: 26: 9: 2118-23.
- 22) 縣 俊彦. 臨床医学研究の方法論・SAS-DATA ステップ、臨床医 2000: 26: 10: 2274-8.
- 23) 縣 俊彦. 臨床医学研究の方法論・SAS-PROC ステップ、臨床医 2000: 26: 11: 2430-3.
- 24) 加納克己、縣 俊彦 (共著). 医学生物学のためのパソコン統計解析. 1-188 南江堂、東京、1985.
- 25) 縣 俊彦. やさしい保健統計学. 1-194 南江堂、東京、1993.
- 26) 縣 俊彦. 産業医学セミナー. 1-177 ソウル: 順天郷大学. 1994.
- 27) 縣 俊彦. やさしい栄養・生活統計学. 1-216、南江堂、1997.
- 28) 縣 俊彦. 基本医学統計学・その医学研究への応用、1-227、中外医学社、1997.
- 29) 縣 俊彦. やさしい保健統計学: 改訂 2 版、1-202 南江堂、東京、1998.
- 30) 縣 俊彦 編著. EBM (Evidence-Based Medicine): 臨床医学研究の方法論. 1-202、東京: 中外医学社. 1998.
- 31) 縣 俊彦 編著. 基本医学統計学・EBM、医学研究への応用: 改訂 2 版、1-188、中外医学社、1999.
- 32) 縣 俊彦 編著. EBM のための新 GCP と臨床研究、1-217、中外医学社、1999.
- 33) 縣 俊彦 編著. EBM (Evidence-Based Medicine): 医学研究、診療の方法論、1-227、中外医学社、2000.

F. 健康危険情報 (該当せず)

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) Agata T, Yanagisawa H, Niimura M, Inaba Y, Kurosawa M., Nishikawa H., Nagai M., Ryu S., Nakayama J., Otsuka F. Epidemiological Studies of Facial Nerve Problems of NF2 (Neurofibromatosis type 2) in Japan XI International Facial Nerve

Symposium ROME 2009-4-25-28

- 2) 西川浩昭、縣 俊彦、稲葉 裕、黒沢美智子.
全国調査データから見た神経線維腫症1の家族歴、受療状況とその関連要因. 第74回日本民族衛生学会、京都 (2009.11.12-13) 第75巻付録 p84-5
- 3) 縣 俊彦、西川浩昭、稲葉 裕、黒沢美智子.
結節性硬化症 (TSC) の患者医療費補助決定要因に関する研究. 第74回日本民族衛生学会、京都 (2009.11.12-13) 第75巻付録 p98-9
- 4) T Agata, Y Yanagisawa, M Niimura, H Nishikawa, T Ohtsuka, Y Inaba, M Kurosawa, Y Nakamura, R Uehara, M Watanabe, M Nagai. Changes of socio-epidemiologic status of Tuberous Sclerosis Complex (TSC) patients during these 10 years in Japan. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological

Association, January 9-10, 2010, Koshigaya, Saitama, JAPAN

- 5) H Nishikawa, T Agata, Y Yanagisawa, M Niimura, T Ohtsuka, Y Inaba, M Kurosawa, Y Nakamura, R Uehara, M Watanabe, M Nagai. Differences in the socio-epidemiologic status patients with Neurofibromatosis: Comparison of facilities with and without a member of NF research group. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association, January 9-10, 2010, Koshigaya, Saitama, JAPAN

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

神経線維腫および悪性末梢神経鞘腫における テネイシンCとニューロナチンの発現に関する研究

研究協力者 師井洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野准教授

研究要旨

神経線維腫症I型（レックリングハウゼン病）における神経線維腫（NF）からの悪性化（悪性末梢神経鞘腫瘍：MPNST）は、この疾患特有の死亡原因となる。今回、我々は神経線維腫症I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、抗テネイシンC抗体、抗ニューロナチン抗体および抗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I型（レックリングハウゼン病：NF-1）では多数の神経線維腫（NF）が発生し、まれではあるが悪性化（悪性末梢神経鞘腫瘍：MPNST）が認められる。その悪性腫瘍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腫の病理診断は、しばしば困難を伴う。また、悪性化が早期に発見できれば、予後の改善にもつながる事が期待される

近年、悪性腫瘍、特に神経系腫瘍において、細胞外マトリックス糖タンパク質であるテネイシン-C（TnC）の過剰発現が注目されている。一方、新しく同定された糖タンパク質ニューロナチン neuronatin（Nnat）は、胎児の中枢系と末梢神経系で主に発現され、成人では様々な臓器でも発現が認められている。CD10は細胞表面の亜鉛依存性メタロプロテアーゼであり、癌の浸潤する領域の間質細胞で発現が見られる。今回、我々は良性NFとMPNSTについて、TnCとNnat、CD10の免疫組織化学的に発現を検討し、またそれらの発現を細胞増殖マーカーであるKi-67と比較検討し、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

5例の正常皮膚（神経線維）、19例の皮膚の

NF、15例のびまん性NF、15例の蔓状NFと4例のMPNSTのパラフィン包埋標本を使って免疫組織化学染色を行った。

使用した抗体は抗CD10抗体、抗Nnat抗体、抗TnC抗体、抗Ki-67抗体である。
（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

すべての正常神経、皮膚のNF、びまん性NFおよび蔓状NFではTnC、Nnatの発現を認めなかった。MPNSTでは、全例にこれら糖タンパク質の細胞質での高発現を認めた。TnCでは腫瘍辺縁部の間質（ストローマ）細胞にも高発現を認めた。Ki-67の発現はTnC、Nnatの発現に相関して発現パターンを示したが、発現は細胞核に認められた。一方、CD10は良性の神経線維腫の周囲を取り囲むストローマ細胞に高発現していたが、悪性腫瘍についてはその発現は弱かった。

下記表1に結果まとめを示す。

以上の結果から、悪性化に伴い高発現するTnCとNnatは、MPNSTと良性NFを鑑別するために有用なマーカーであり、悪性化の早期発見において強力な診断ツールとなる事が判明した。残念ながら今回の検討では、悪性化の早期発見という点で注目し

表 1

	TnC		Nnat		Ki-67	CD10	
	腫瘍	間質	腫瘍	間質	腫瘍	腫瘍	間質
皮膚神経線維腫	-	-	-	-	-	-	+
蔓状神経線維腫	-	+	-	+	-	-	++
びまん性神経線維腫	-	-	-	-	-	-	-
悪性末梢神経鞘腫	++	++	+++	-	+	-	+

ていた、通常の HE 標本で病理学的に良性と判断された腫瘍（その後の経過で悪性腫瘍が発現した症例）について、TnC、Nnat の発現（悪性化の早期発見）は認められなかった。今後は、症例を重ねて検討していきたい。

TnC については、慢性関節リウマチなどの慢性炎症疾患での局所での発現増加が認められており、また toll-like receptor 4 を活性化させる事も判明し、今後の更なる検討が期待される。TnC は腫瘍細胞に加えて周囲の間質細胞にも発現が認められる事から、臨床上前に問題となる局所再発を予防する重要なマーカーとなる可能性が示唆された。すなわち、TnC 陽性細胞を残さず切除できれば再率が低くなる可能性があり、断端に陽性細胞が認められれば、追加切除を検討する事ができる。

これら TnC、Tnat は悪性化に伴い発現してくる事から、今後の治療のターゲットとなる可能性が示唆された。特に、TnC については各種癌での臨床応用が検討されており、この悪性腫瘍 MPNST でも治療効果が期待できる。

CD10 発現については、今までの報告と異なり、良性腫瘍の間質に腫瘍と接する部位で高い発現が認められたが、TnC の発現腫瘍細胞（蔓状神経線維腫）と隣接しており、何らかの機能的関連が疑われた。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 独 孤龍・中原剛士・師井洋一・古江増隆.
神経線維腫における CD10 とテネイシン C の発現の検討. 第 108 回日本皮膚科学会総会 2009.4. 24-26 福岡
- 2) 独 孤龍・林田清芽・中原剛士・師井洋一・古江増隆. 神経線維腫と悪性末梢神経鞘腫瘍におけるテネイシン-C とニューロナチンの発現. 第 1 回日本レックリングハウゼン病学会 2009.11.15 東京

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

神経線維腫における血管増殖因子の発現機構に関する研究

研究分担者 川内康弘 筑波大学大学院人間総合科学研究科（医学）
皮膚病態医学准教授

研究要旨

我々は本研究班において、神経線維腫では VEGF、bFGF などの血管増殖因子が過発現し、神経線維腫における微小血管増生の要因となっていることを報告してきた。今回、我々は、代表的な血管増殖因子である VEGF の神経線維腫における過発現機構を明らかにするために VEGF のプロモーター領域に結合して VEGF の転写を促進する転写因子 HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) の発現を real-time RCR を用いて検討した。その結果、神経線維腫において HIF-1 α の発現亢進が認められ、HIF-1 α が VEGF の発現を亢進させていることが明らかとなった。さらに NF1 における neurofibromin の loss of function が、VEGF などの血管増殖因子の発現を直接増強させるかを調べるために、NF1 遺伝子発現をノックダウンさせるレンチウイルスを HaCaT 細胞に感染させ、GFP 選択により neurofibromin の発現が非感染細胞の約 10% にノックダウンされた NF-HaCaT 細胞を作製した。この NF-HaCaT 細胞の VEGF、HIF、リン酸化 mTOR の発現を real-time RCR および Western blotting にて検索したところ、NF-HaCaT 細胞では、VEGF、HIF、リン酸化 mTOR はいずれも発現が亢進していた。これらの結果から、NF1 における neurofibromin の loss of function が、直接 mTOR-HIF-VEGF 経路を活性化し、VEGF の発現を亢進させているものと考えられた。

田口詩路麻、石塚洋典、
中村泰大、大塚藤男 筑波大学大学院人間総合科学
研究科（医学）皮膚病態医学
古村南夫 島根大学医学部皮膚科

A. 研究目的

神経線維腫症 1 (NF1) では、神経線維腫内に血管が増生していることが知られ、この腫瘍内血管増生は、ときに腫瘍内大量出血で患者の生命に関わることもある。我々は本研究班において、神経線維腫では VEGF、bFGF などの血管増殖因子が過発現し、神経線維腫における微小血管増生の要因となっていることを報告してきた。しかし、NF1 における VEGF 発現亢進の分子機構は不明のままであった。一方、神経線維腫は、Schwann 細胞、線維芽細胞、肥満細胞、血管内皮細胞など多彩な細胞から構成され、それぞれがサイトカイン分泌などを通して相互

作用し、このことが腫瘍発生に重要であることがわかっている。VEGF 発現亢進も、細胞内 NF1 遺伝子のハプロ不全による intrinsic な現象か、多種の神経線維腫構成細胞間の相互作用による extrinsic な現象かが問題となる。今回、我々は、上記を明らかにするために、神経線維腫構成細胞でないケラチノサイト内で neurofibromin をノックダウンし、ノックダウン細胞の mTOR-HIF-VEGF 経路の活性化を検討した。

B. 研究方法

1. 島根大学医学部皮膚科の古村南夫博士から供与された neurofibromin のノックダウン用 miR RNAi を HaCaT 細胞に transduction し、neurofibromin の発現がコントロール細胞の 10% に抑制された HaCaT-NFi 細胞を得た。(図 1)
2. 上記 HaCaT-NFi 細胞 10^6 個を 1ml の Isogen[®] 溶液

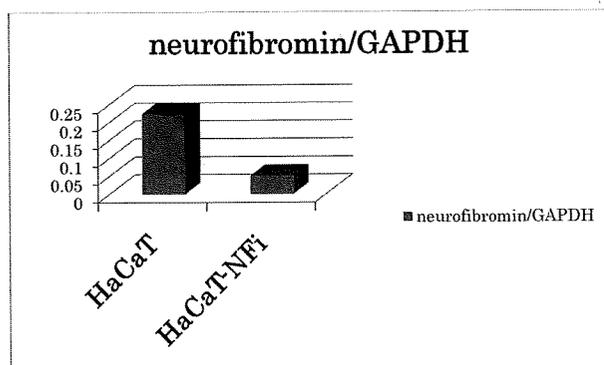


図1 HaCaT細胞における neurofibromin のノックダウン

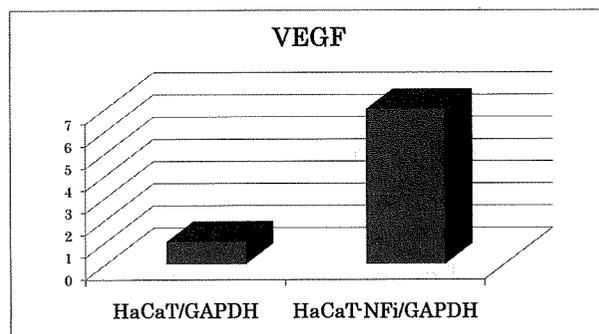


図2A neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) における VEGF mRNA 発現増強

(日本ジーン)に懸濁し、Lysateを得、このLysateから定法に従って、total RNAを抽出した。また、4% SDS- サンプルバッファーに上記HaCaT-NFi細胞 10^6 個を懸濁し、細胞蛋白抽出液を作製した。コントロールとして HaCaT 細胞から同様に total RNA および蛋白を抽出した。

3. Total RNA からランダムオリゴプライマーを用いて cDNA を合成した。
4. VEGF および HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)、mTOR 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、Real-time 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。
6. HaCaT 細胞および HaCaT-NFi 細胞蛋白抽出液を SDS-PAGE し、VEGF および HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)、mTOR 及びリン酸化mTOR 特異的抗体を用いてウエスタン・ブロットを行った。

C. 研究結果および考察

1. Real-time RT-PCR の結果、neurofibromin をノックダウンした HaCaT-NFi 細胞ではコントロールの HaCaT 細胞に比べて VEGF mRNA レベルが約 12 倍に増加した。(図 2A)。また、ウエスタン・ブロットの結果、neurofibromin をノックダウンした HaCaT-NFi 細胞ではコントロールの HaCaT 細胞に比べて VEGF 蛋白レベルが増加した (図 2B)。
2. VEGF 遺伝子転写を活性化する転写因子である HIF-1 α の発現を Real-time RT-PCR で検討したところ、neurofibromin をノックダウンした HaCaT-

Immunoblotting

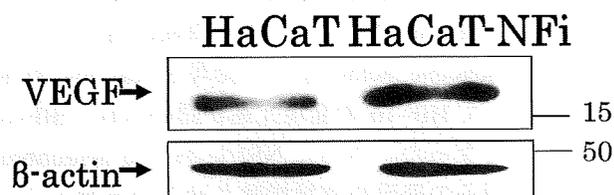


図2B neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) における VEGF 蛋白発現増強

- NFi 細胞ではコントロールの HaCaT 細胞に比べて HIF-1 α mRNA レベルが約 6 倍に増加した。(図 3A)。また、ウエスタン・ブロットの結果、neurofibromin をノックダウンした HaCaT-NFi 細胞ではコントロールの HaCaT 細胞に比べて VEGF 蛋白レベルが増加した (図 3B)。
3. VEGF 遺伝子転写を増強する HIF-1 α のさらに上流にある mTOR の活性化をリン酸化mTOR の発現をウエスタン・ブロット検出することによって検討したところ、neurofibromin をノックダウンした HaCaT-NFi 細胞ではコントロールの HaCaT 細胞に比べて、非リン酸化mTOR の発現は変化なかったが、リン酸化mTOR の発現は増強した (図 4)。以上の結果より、neurofibromin ノックダウンによる VEGF 発現亢進は、細胞内NF1 遺伝子のハプロ不全による intrinsic な現象であり、多種の神経線維腫構成細胞間の相互作用による extrinsic な現象であることが明らかとなった。
 4. さらに、neurofibromin ノックダウンによる VEGF 発現亢進は、mTOR-HIF1 経路の活性化によるものであることが明らかとなった (図 5)。

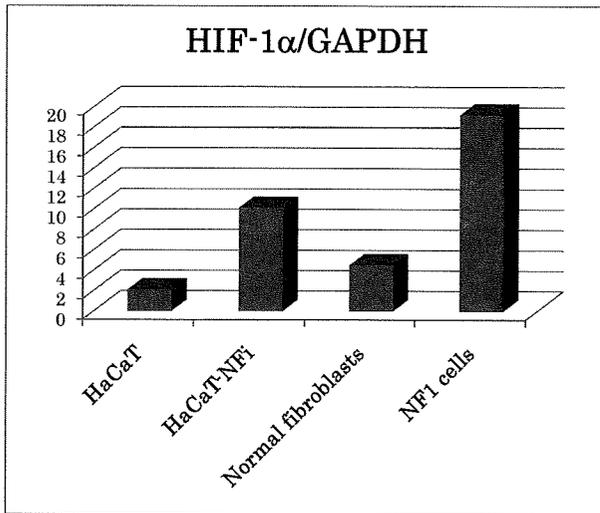


図 3A neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) における HIF-1α mRNA 発現増強

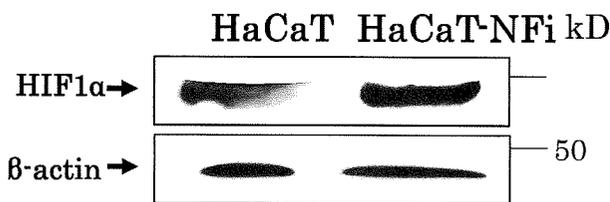


図 3B neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) における HIF-1α 蛋白発現増強

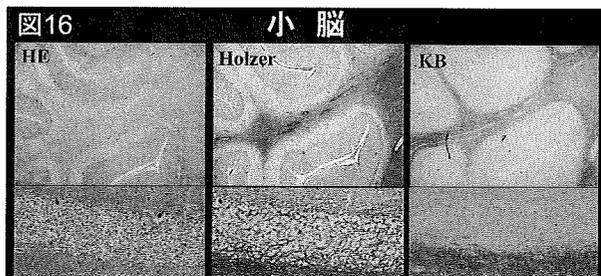


図 4 neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) におけるリン酸化 mTOR 発現増強

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1: **Kawachi Y**, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superimposed segmental dermatitis with chronic prurigo. *Eur J Dermatol.* 2009; 19 (4): 337-340.
- 2: Fujisawa Y, Ishitsuka Y, Nakamura Y, **Kawachi Y**, Otsuka F. Metastatic squamous cell carcinoma of the

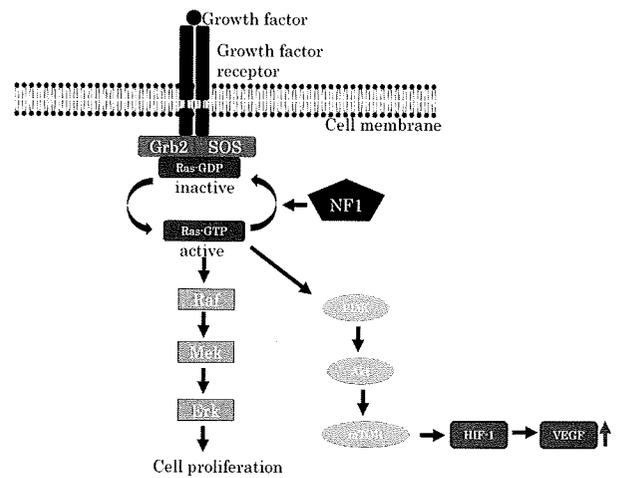


図 5 neurofibromin knockdown による VEGF 発現亢進のシグナル伝達モデル

buttock treated with chemoradiation using cisplatin and 5-fluorouracil. *J Am Acad Dermatol.* 2009; 60 (2): 355-7.

- 3: Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, **Kawachi Y**, Otsuka F, Onodera M. The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. *Exp Dermatol.* 2009; 18 (4): 396-403.
 - 4: Fujisawa Y, Ito S, Mori K, **Kawachi Y**, Otsuka F. Combined therapy of selective embolization followed by surgery in a case of giant arteriovenous malformation in the buttock. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009; 62 (5): 127-8.
 - 5: **Kawachi Y**, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F. Epidermal pseudocarcinomatous hyperplasia with underlying epidermal growth factor-producing cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009; 23 (2): 181-3.
2. 学会発表
なし
- E. 知的財産権の出願・登録
特になし

メラノサイトの転写因子を介した細胞内シグナルと カフェオレ斑発症機序について

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

NF1 のカフェオレ斑の発症機序としてメラノサイトの増殖・分化の異常が考えられている。Stem cell factor (SCF) が真皮線維芽細胞から過剰分泌され、表皮メラノサイトの増殖がカフェオレ斑部で更に亢進していることも確認されている。これまで、NF1 における細胞増殖の異常は、主に Ras 活性上昇によると考えられてきた。しかし、NF1 自体の発症メカニズムは予想よりも複雑で、neurofibromin が制御する反応性細胞増殖分化シグナルのひとつとして cAMP-PKA も Ras シグナルの他に関与している可能性をこれまで検討してきた。NF1 をノックダウンすると、メラノサイトで adenylate cyclase を制御する neurofibromin の機能 (non-Ras function) が低下し cAMP シグナル低下が起これ、PARs が発現誘導・活性化され、c-Kit シグナルを介して転写因子 TFE3/TFEB (Mitf 転写因子ファミリー) が発現亢進しメラノサイトの増殖能が亢進する。また、その下流の因子の転写活性をスクリーニングしたところ、E2F や TFE3 とともに細胞周期を制御する DP-1 の活性上昇がみられた。また、NF1 ノックダウンメラノサイトを SCF 等で増殖刺激すると、cAMP シグナル低下と c-Kit シグナルの上昇の相補的効果により、TCF4a や LEF1、cyclinD1 等の Wnt シグナル関連転写因子の発現が亢進する。LEF1 は Wnt シグナルの活性化によって Mitf を発現させメラノサイトを分化させるが、TCF4a は反対に Mitf を抑制しメラニン生成を低下させる。ユビキタスな転写因子が NF1 において様々なシグナル伝達経路に関与していることが示唆され、カフェオレ斑の病態解明の手がかりとなることが期待される。

A. 研究目的

NF-1 の主徴候であるカフェオレ斑は、NF-1 変異による neurofibromin の減少あるいは機能低下によりみられる NF-1 の皮膚症状である。Neurofibromin の yeast homologue である Iral 蛋白は、Ras-GAP 活性抑制にかかわる GRD に加えて、cAMP シグナルに関与する抑制性G 蛋白結合部位 (GBD) を有するが、類似した機能として、ヒトでも細胞内RAS シグナル抑制だけでなく抑制G 蛋白に結合し抑制機能を阻害するため cAMP シグナル維持に働いていることが最近明らかにされた¹⁾。我々はこの cAMP シグナル伝達の NF-1 における機能低下が、カフェオレ斑発症に関連する可能性を探ってきた。

NF1 におけるカフェオレ斑の発症機序として、

病理組織学的には表皮メラノサイトが増加する。皮疹部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。

さらに真皮線維芽細胞の 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。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与える可能性が示唆された。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²⁾。しかし、NF-1モザイクでは、NF-1の変異が1カ所の部分で皮膚の色調が全体に濃くなるが、その中でカフェオレ斑を認める部分にはメラノサイトにさらに、もう一つ別の変異が加わっていることが報告されている³⁾。

我々の研究で、まず、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 ノックダウンヒトメラノサイトモデルを作製し解析した。ノックダウンメラノサイトではRASの活性化が認められないにも関わらず、増殖能はコントロールに比して高く、さらにcAMPの細胞内レベルはコントロールに比して低いにも関わらず、cAMP刺激に過剰反応してコントロールより増殖することが明らかになった。この機序を明らかにするために、NF-1 ノックダウンメラノサイトでのcAMP関連細胞内シグナルを解析し、neurofibrominの機能低下からメラノサイトの増殖亢進を介して、カフェオレ斑発症に至る全く新しいシグナル伝達メカニズムの解明を試みた。

これまでにNF-1 ノックダウンメラノサイトでは、cAMP/PKAシグナルの低下がPAR1/PAR2の発現を亢進させ、PARsシグナル刺激が、その下流でMit family 転写因子のTFEB・TFE3の発現を亢進させることが増殖能の亢進につながる事が示唆された。今回、PARsシグナルが、Mit family 転写因子のTFEB・TFE3の発現をコントロールする機序とTFEB・TFE3の下流で細胞増殖が亢進するメカニズムを明らかにした。

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。

NF-1 mRNA 特異的構造を持つヒト特異的siRNA (配列は慶応大学、佐谷秀行教授のグループより提供された3種類) を合成し、QIAGEN社のHiPerFectで遺伝子導入し、ノックダウンを行った。更に安定したRNAiを行うために、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。

PARsの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、adenylate cyclase 阻害薬のSQ22536添加によりcAMPシグナルを抑制し下流への影響を調べた。MITF関連転写因子であるMit family (TFE3、TFEB) 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。

TFEB/TFE3の更に下流で細胞増殖、細胞周期制御にかかわる因子を調べるための、NF-1 ノックダウン細胞の転写因子活性スクリーニングには、ELISAをベースにした転写因子活性スクリーニングキット (クロンテック社トランスファクタープロファイリングキット (発色法) のInflammation 1および2、Oncogenesis 1および3を用いた。

ノックダウンメラノサイトとコントロールメラノサイトの核抽出蛋白と、ビオチン標識E2Fコンセンサス配列オリゴを用いたゲルシフトアッセイを行い、さらに抗E2F1、2、3、4、DP-1ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてスーパーシフトアッセイを行った。

PARsの下流のシグナルを確認するために、特異的なc-kit阻害薬としてgenistein、srcの阻害薬としてPP2、MAPK/ERK阻害薬としてPD98059を添加し、SQ22536によるcAMPシグナル低下によるTFEB/TFE3の発現亢進がどのように変化するかどうかを検討した。

SQ22536によるcAMPシグナル抑制でWntシグナルが活性化されることをLEF1レポーターのTOPFlashを用い、ルシフェラーゼレポーターアッセイで確認した。Wntシグナル下流の転写因子LEF1に加え、MSHの拮抗的アゴニストであるアゴウチシグナル蛋白をメラノサイトに作用させた場合にTCF4a (ITF2) の発現が上昇しメラニン関連酵素制御転写因子MITFを抑制できることを我々は報告している^{4,5)}。CyclinD1についても同様の機序で発

現上昇することを確認しておりこれらの発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。

C. 研究結果

1. miR RNAi シークエンスによる NF-1 ノックダウン細胞を作製し発現低下を確認後細胞モデルとして使用した。
2. NF-1 ノックダウンで細胞増殖が亢進し、細胞内 cAMP レベルは減少し、forskolin の添加でも細胞内 cAMP レベルは上昇するが NF1 ノックダウン細胞では有意に低く、NF-1 の non-Ras function の低下による cAMP シグナル抑制が示唆された。
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. 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。cAMP 増加はコントロールより低い細胞増殖が 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 cAMP-PKA シグナル下流の増殖関連転写因子が異常なシグナルを伝達していると考えられた。
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 の発現上昇などにより引き起こされる。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、細胞増殖に関与する TFEB/TFE3 の発現が NF-1 ノックダウン細胞では亢進し、さらに下流の CDK2 発現増加が確認された。
6. PARs 遺伝子の PAR1 と PAR2 の発現がノックダウンメラノサイトで上昇していた。
7. 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 SQ22536 を添加後、経時的に解析した。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。
8. PAR2-AP 刺激で PARs シグナルが上昇すると、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。
9. PARs シグナルの下流では複数のリン酸化経路が関与するが、阻害薬の抑制効果比較により MAPK/ERK が TFEB/TFE3 の発現亢進に関与す

る可能性が示唆された。

10. TFEB/TFE3 の下流にある転写因子活性をスクリーニングしたところ細胞周期制御転写因子 E2F と関連する DP-1 の転写活性が上昇していた。
11. さらにゲルシフトアッセイにより、メラノサイトが増殖休止から増殖状態に移行する時に活性化すると報告されている E2F4 と DP-1 の転写活性が NF-1 ノックダウンで上昇していることが明らかになった。
12. SQ22536 による cAMP シグナル抑制に加え c-Kit シグナルを SCF 添加で刺激することで Wnt シグナルが活性化された。さらに、Wnt シグナル下流の転写因子 TCF4a と LEF1 の発現亢進、および細胞周期制御蛋白 CyclinD1 の発現亢進も認められた。

D. 考察および結論

NF1 遺伝子産物である neurofibromin は RAS シグナルの制御以外に adenylate cyclase の活性制御 (non-Ras function) 機能を持ち神経細胞で重要な働きをしていることが近年報告され⁶⁾、その機序についても yeast homologue の分子構造と機能から推測されている¹⁾。

MSH レセプターへの α MSH の結合による adenylate cyclase の活性化がメラノサイトでは cAMP シグナルを刺激し、メラノサイト特異的転写因子である MiT family の発現誘導が起こり、メラニン生成機能や細胞の分化・増殖に影響を与えている⁷⁾。

NF1 ノックダウンメラノサイトを用いた解析で、neurofibromin の発現低下が non-Ras function 低下で cAMP シグナルを抑制すること。MSH 刺激後の 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少ないが、増殖はコントロールより大きい一見相反する現象が起こる。また MiT family の転写因子発現パターンがノックダウンでは PARs シグナルを介し TFEB/TFE3 転写因子の発現が亢進することなどを報告した。

今回、PARs シグナルが TFEB/TFE3 転写因子発現亢進を起こす機序と、その亢進がその下流で細胞周期制御転写因子の活性化を引き起こし NF-1 ノックダウンメラノサイトで増殖能を高める可能性が示唆された。また、メラノサイトで MITF 発現制御を介してメラニン生成に関与する Wnt シグナル下流の転写因子 TCF4a、LEF1 の発現も、SCF などを添加することによって変化する可能性が見出された。

今後、さらに個々の転写因子の RNAi ノックダウンなどで、今回明らかにされた新しいシグナルとカフェオレ斑発症についての関連を検討する必要があると考えられた。

参考文献

- 1) Harashima T, Anderson S, Yates JR 3rd, Heitman J. The kelch proteins Gpb1 and Gpb2 inhibit Ras activity via association with the yeast RasGAP neurofibromin homologs Ira1 and Ira2. *Mol Cell* 22: 819-30, 2006
- 2) 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
- 3) Maertens O, De Schepper S, Vandesomepele J, Brems H, Heyns I, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L. Molecular Dissection of Isolated Disease Features in Mosaic Neurofibromatosis Type 1. *Am J Hum Genet* 81: 244-251, 2007
- 4) Furumura M, Sakai C, Potterf SB, Vieira WD, Barsh GS, Hearing VJ. Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 7374-8, 1998
- 5) Furumura M, Potterf SB, Toyofuku K, Matsunaga J, Muller J, Hearing VJ. Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J Biol Chem*. 276: 28147-54, 2001
- 6) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernardis A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- 7) Eirikur Steingrimsso, Neal G. Copeland, Nancy

A. Jenkins. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 38: 365-411, 2004

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Furumura M, Takahashi H, Kohno K, Morita E. Intracellular signaling in NF1 knockdown melanocytes as a possible mechanism causing café-au-lait macules in neurofibromatosis type 1, the 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, 2009
- 2) Furumura M, Café-au-lait macules from the perspective of NF1 knockdown melanocytes. Symposium of The 22th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research. Fukuoka, 2009
- 3) Furumura M, Nakayama J, Morita E, Hearing VJ. A novel inhibitory signaling pathway for melanogenesis mediated by the ubiquitous bHLH transcription factor TCF4a, The 22th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research. Fukuoka, 2009

2. 論文発表

- 1) 古村南夫.メラニンと美白・白斑の治療：メラニン産生調節機構、日皮会誌 119：2777-2779、2009
- 2) 古村南夫.色素血管母斑症 小児ピクシス、p152-153、五十嵐隆、馬場道子編、中山書店、東京、2010.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経線維腫症 1 に関連する悪性末梢神経鞘腫瘍における DNA メチル化異常の検索

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

悪性末梢神経鞘腫瘍において、がん精巢抗原遺伝子と腫瘍抑制遺伝子のメチル化状態を明らかにすることを目的とし、ヒト悪性末梢神経鞘腫瘍 6 細胞株 HS-PSS、sNF02.2、sNF96.2、HS-sch-2、NMS-2、YST-1 を用いて、がん精巢抗原遺伝子 *MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEB2*、*SSX4*、および、腫瘍抑制遺伝子 *BRCA1*、*MLH1*、*p14 (ARF)*、*p16 (INK4a)*、*p27 (KIP1)* のメチル化状態と発現を解析した。その結果、*MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEB2*、*SSX4* の異常脱メチル化による異常発現、および、*p16 (INK4a)* の異常メチル化による不活化が認められた。

延山嘉眞、太田有史、
須甲礼奈、谷戸克己、
新村真人

東京慈恵会医科大学皮膚科

A. 研究目的

CpG 部位が密集する CpG アイランドのメチル化は、下流の遺伝子発現を抑制（不活化）する¹⁾。現在まで多くの悪性腫瘍で、腫瘍抑制遺伝子が不活化されることや、治療の標的分子になり得るがん精巢抗原遺伝子が脱メチル化により異常発現をきたすことが報告されてきた。一方、悪性末梢神経鞘腫瘍は神経線維腫症 1 の 2-4 % に発生し予後に重大な影響を与えるが、エピジェネティックな異常に関する知見は限られている。本研究では、悪性末梢神経鞘腫瘍において、がん精巢抗原遺伝子と腫瘍抑制遺伝子のメチル化状態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト悪性末梢神経鞘腫瘍 6 細胞株 HS-PSS、sNF02.2、sNF96.2、HS-sch-2、NMS-2、YST-1 において、がん精巢抗原遺伝子 *MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEB2*、*SSX4*、および、腫瘍抑制遺伝子 *BRCA1*、*MLH1*、*p14 (ARF)*、*p16 (INK4a)*、*p27 (KIP1)* の 5' 領域 CpG アイランドのメチル化状態

を methylation-specific PCR、それらの遺伝子発現を real-time reverse transcription-PCR で解析した。

なお、本研究で使用したヒト由来細胞は商業ベースで販売されている細胞株であり、倫理面に関する配慮は必要ないと判断した。

C. 研究結果

解析したがん精巢抗原遺伝子 *MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEB2*、*SSX4* において少なくとも 1 つ以上の細胞株で、異常脱メチル化と異常発現が認められた。一方、解析した腫瘍抑制遺伝子のうち、*p16 (INK4a)* において、細胞株 HS-sch-2 で、異常メチル化と発現抑制が認められた（図 1、2）。

D. 考察

本研究により、悪性末梢神経鞘腫瘍の細胞株で、*MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEB2*、*SSX4* の脱メチル化による異常発現、および、*p16 (INK4a)* のメチル化による不活化が認められた。*p16 (INK4a)* のメチル化はすでに報告されているが、がん精巢抗原遺伝子の脱メチル化の可能性については初めての知見である。最近まで、*MAGE* などのがん精巢抗原遺伝子の遺伝子産物の機能は不明であったが、近年、*MAGE* 遺伝子産物が発がん重要な役割を担

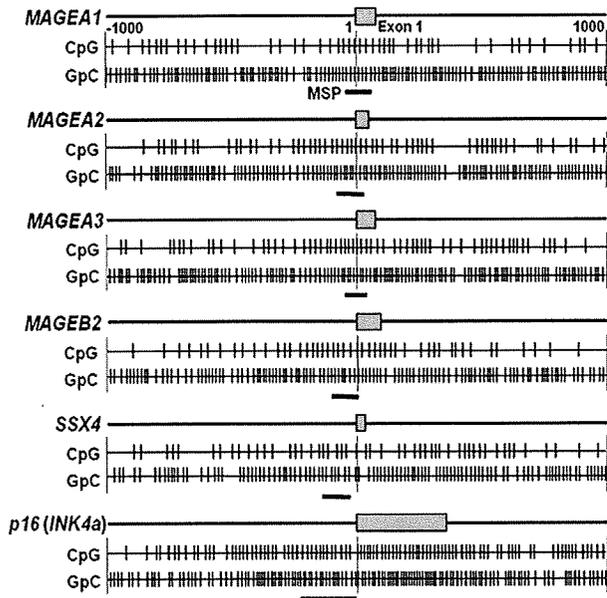


図1 5'領域の遺伝子構造とMSPの解析領域

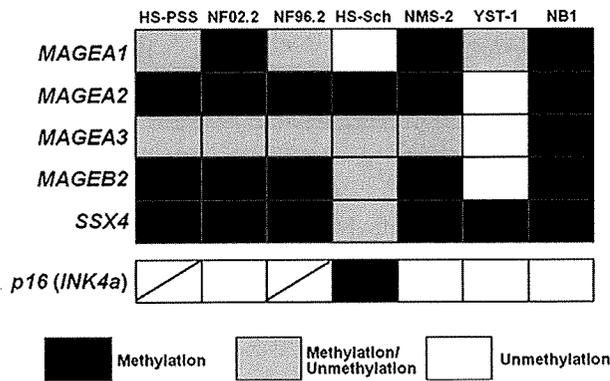


図2 解析遺伝子のメチル化状態

うことが明らかになりつつある。一方、MAGE 遺伝子産物は、がん特異抗原として治療の分子標的になり得る可能性も指摘されている²⁾。今後、細胞株ばかりでなく、臨床検体でもメチル化異常や脱メチル化異常がみられることを確認する必要がある。

参考文献

- 1) Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128: 635-638, 2007
- 2) Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 100: 2014-2021, 2009

E. 研究発表

学会発表

Promoter methylation profiling of cancer/testis genes in human malignant peripheral nerve sheath tumor. Nobeyama Y, Ikegami M, Nakagawa H. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, poster session, Fukuoka, Japan, 2009

神経線維腫症 1 型における血中ヒスタミン および MIA に関する研究

研究分担者 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

神経線維腫症 1 型 (NF1) において血中のヒスタミンと MIA (melanocyte inhibitory activity) について検討を行った。ヒスタミンについては NF1 の臨床症状や合併する神経線維腫のタイプとの相関関係はなく、健常人と比較して有意な上昇はみられなかった。

一方、MIA については NF1 では健常人と比較して有意な上昇がみられた。MIA と NF1 の臨床症状との相関関係はみられなかったが、MIA が高値を示す原因として NF1 の melanocyte や chondrocyte における潜在的な機能異常による可能性が示唆された。

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

る。しかしながら、NF1 における MIA について検討を行った報告はほとんど見られない。そこで今回われわれは NF1 の血中 MIA についての検討も行うこととした。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF1) に合併する神経線維腫内には多数の mast cell が存在しており、腫瘍発生において重要な役割を果たしている。また NF1 にはそう痒や痛みを合併することがあり、mast cell から放出されるヒスタミンの関与が推測されている。われわれは昨年度から NF1 の血中ヒスタミンについての研究を行っている。本年度もさらに症例数を増やして、臨床症状との相関関係を含めて検討を行った。

一方、NF1 にはカフェ・オ・レ斑、雀卵斑様色素斑、大型の褐色斑、有毛性褐色青斑などの特徴的な色素斑がみられ、真皮線維芽細胞からの SCF、HGF 分泌による melanocyte の過剰増殖や NF1 遺伝子の変異に伴う melanocyte のメラニン産生亢進などが関与する可能性が示唆されているが、その原因についてはいまだ不明な点も多い。MIA (melanoma inhibitory activity) は現在悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして用いられている。NF1 と悪性黒色腫の関連については、関連はないという報告がある一方、眼部発生の悪性黒色腫では関連を示唆する報告もあ

B. 研究方法

まず NF1 患者背景について調査した上で ELISA 法により血中のヒスタミン、MIA 値の測定を行った。

(倫理面への配慮)

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

ヒスタミンについては NF1 患者 28 例 (通常タイプ: 19 例、神経の神経線維腫合併例: 4 例、びまん性神経線維腫合併例: 5 例) で検討を行った (表 1)。28 例中 7 例 (25%) にかゆみがみられた。また、かゆみのみみられた 7 例のうちアトピー性皮膚炎の合併が 4 例にみられた。かゆみを合併した例ではヒスタ

表1 NF1 患者背景

Type	Case no.	Age(years)	Sex	No. of CNs	Histamine(ng/ml)	IgE(IU/ml)	AD	Itch
CN	1	9	M	0	1.15	527†	○	○
	2	10	M	0	0.62	464†		
	3	10	F	0	0.99	22		
	4	14	M	0	1.32	125		
	5	24	F	<10	1.31	391	○	○
	6	27	M	<100	0.65	2396†	○	○
	7	32	M	<30	0.52	59		
	8	35	M	<100	0.55	3		
	9	36	M	<1000	0.17	18		
	10	38	F	<10	0.52	91		
	11	51	F	>1000	0.29	78		
	12	59	F	<100	0.41	62		
	13	62	F	<100	0.56	18		
	14	63	F	<100	0.38	588†		○
	15	66	F	<1000	0.34	45		
	16	67	F	<1000	0.81	44		
	17	67	M	>1000	0.37	27		
	18	68	F	<30	0.82	23		○
	19	73	F	<1000	0.7	21		
NPN	20	4	F	0	0.56	23		
	21	15	F	0	0.61	166		
	22	21	M	0	0.75	30		
	23	35	M	<10	0.7	666†		
DPN	24	15	M	0	1.34	1500†	○	○
	25	20	M	<10	0.99	77		
	26	41	M	<100	0.55	24		
	27	47	F	<100	0.4	93		
	28	58	F	<1000	0.34	54		○

AD: アトピー性皮膚炎, CN: 皮膚神経線維腫, NPN: 神経の神経線維腫, DPN: びまん性神経線維腫

表2 血中ヒスタミン値の比較 (タイプ別)

	CN	NPN	DPN	NF1	Control	Psoriasis
n	19	4	5	28	14	11
Sex						
(Male)	8	2	3	13	7	10
(Female)	11	2	2	15	7	1
Age(years)	42.4±22.8	18.8±12.9	36.2±18.2	38.1±22	27±14.7	58.5±13.1
(mean±SD)						
Histamine(ng/ml)	0.66±0.34	0.66±0.1	0.72±0.43	0.67±0.32	1±0.93	1.9±1.82
(mean±SD)						

ミンがやや上昇している例もみられたが、かゆみのない群と比較して有意差はなかった。さらに、神経線維腫の数、タイプについて検討を行ったが、特に相関関係はなく (表2)、NF1 では健常人と比較して血中ヒスタミンの上昇はみられなかった (図1)。(陽性のコントロールとして乾癬患者でも同様の測定を行ったところ健常人、NF1 と比較して有意に高値を示した。)

MIA については25例で検討を行った。MIA はNF1、健常人とも小児では高値を示す傾向があったが、NF1 では有意に高値であった (図2、 $p < 0.05$)。今後はさらにメラニン代謝産物 (5-S-CD) や他の因子 (S100) との関連を含めて検討を進める予定である。

D. 考察

神経線維腫の発生にはNF1-/-の Schwann cell から放出される SCF (Kit ligand) と kit receptor を発現したNF1+/-の mast cell が極めて重要な役割を果た

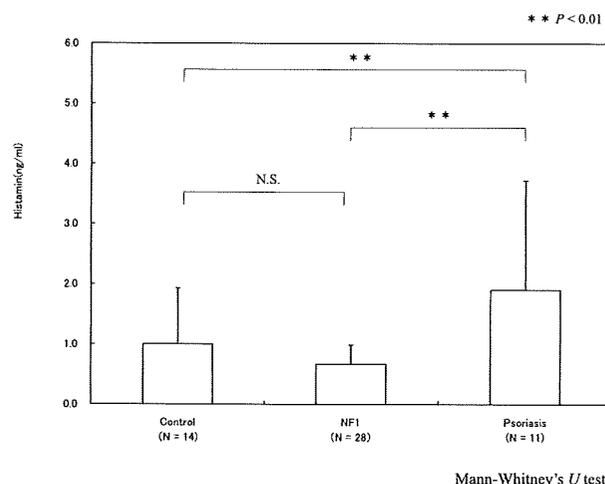
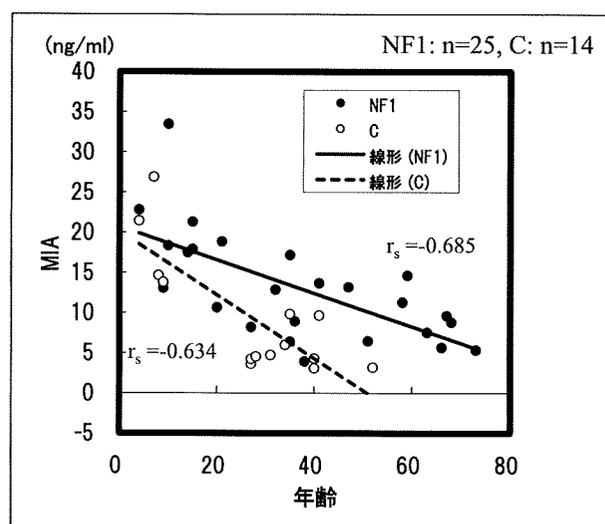


図1 血中ヒスタミン値



Mann-Whitney's U test, $P < 0.05$

図2 血中MIA値

していると推測されている。NF1はその約20%にそう痒を伴うことが知られているが、その原因はいまだよくわかっていない。Mast cellは刺激により、ヒスタミンを含む様々な chemical mediator を放出することが知られている。そこでわれわれはNF1のかゆみの原因を解明するために血中ヒスタミンの検討を行った。乾癬 (陽性コントロール) ではヒスタミンは上昇していたが、NF1においてはかゆみの有無にかかわらず、健常人と比較して有意な上昇はみられなかった。

以上の結果より、NF1は局所 (神経線維腫内) での mast cell によるヒスタミン放出があったとしても必ずしも血中のヒスタミンの上昇につながるわけではないことが明らかになった。しかしながら、NF1のかゆみにはヒスタミン以外の他の因子 (サブスタンスPなど) も関与している可能性もあり、

今後さらに検討を行う必要があると考えられた。

NF1 と悪性黒色腫の関連については否定的な意見が多いが、悪性黒色腫の腫瘍細胞において NF1 遺伝子の異常が見られたという報告もある。MIA は悪性黒色腫のみならず chondrocyte から放出されることが知られている。NF1 では色素斑（カフェ・オ・レ斑、雀卵斑様色素斑）のみならず骨の形成異常を伴うことが多く、今回われわれは血中 MIA の検討も行った。驚くべきことに NF1 では健康人と比較して血中 MIA が有意に上昇しており、その原因として melanocyte や chondrocyte の潜在的な異常が示唆された。今後、メラニン代謝産物などの他の因子との関連を含めて in vitro の系でさらに詳細な検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では NF1 のかゆみについてはいまだ不明な点が多く、さらなる検討が必要であることが明らかとなった。また、NF1 では MIA の上昇がみられ、NF1 に伴う melanocyte の機能異常についても培養細胞を用いた詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田雄一：神経線維腫症 1 型（レックリングハウゼン病）の診療ガイドラインについて. 西日皮膚 71(3)：255-259、2009

- 2) 吉田雄一：＜皮膚科領域の特定疾患＞神経線維腫症 1 型. 医学のあゆみ 230(11)：975-979、2009
- 3) Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: Cutaneous lipomatous neurofibroma. J. Dermatol. 36 (12): 674-675、2009
- 4) 吉田雄一：EL6-3 母斑症・色素性乾皮症 神経線維腫症 1 型（診療ガイドラインに基づいた皮膚病変の治療）. 日皮会誌 119(13)：2554-2555、2009

2. 学会発表

- 1) 吉田雄一.
教育講演 6（母斑症・色素性乾皮症）：神経線維腫症 1 型（皮膚病変の治療）.
第 108 回日本皮膚科学会総会 4 月 24 日 2009 年 福岡
- 2) 吉田雄一.
神経線維腫症 1 型の診断と治療.
ラジオ NIKKEI <マルホ皮膚科セミナー> 7 月 30 日 2009 年 出演
- 3) 吉田雄一.
レックリングハウゼン病（神経線維腫症 1 型）の診断・治療ガイドライン.
第 1 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11 月 15 日 2009 年 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし