

く変化し、患者由来の NF1 変異メラノサイトを培養した細胞では、NF1 の発現低下に起因する細胞内シグナルの詳細は全く明らかにされていない¹⁾。

本研究は、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 NF1 ノックダウン細胞モデルを構築し、RAS 以外で重要な cAMP シグナルに関連し、ユビキタスな転写因子を介した細胞内シグナルとメラノサイト増殖制御機構のつながりを見出すことを目的とする。

カフェオレ斑形成に至るメラノサイト増殖能亢進が、NF1 変異メラノサイト自身の細胞内シグナルの変化も背景にしている可能性が考えられる。

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) を用いた。

細胞内 cAMP/PKA シグナルの修飾には、forskolin、adenylate cyclase 阻害薬の SQ22536 添加、PKA 阻害薬 H89 添加を行った。PARs シグナル活性化には PAR2-AP を用いた。

細胞増殖は BrdU 取り込みを ELISA キット (Cell Proliferation Biotrak ELISA, GE Healthcare 社) で測定した。

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。

上記の cAMP 関連シグナル修飾薬や、PAR2-AP により cAMP/PKA シグナルや PARs を活性化したメラノサイトのタンパクを抽出 (抽出) のアフィニティークロマトグラフィーによるリン酸化タンパク質を精製した。続いて、CUTL1 転写因子の cAMP/PKA シグナルや PARs 活性化によるリン酸化 (転写因子不活性化) について確認する目的で、CUTL1 の serine リン酸化部位 1215 を含むペプチドを抗原として作製された抗体である抗 CDP (CUTL1 (CUX1)) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech 社) を用いてウェスタンブロットを行った。

Melanocyte 全細胞抽出液を、CUTL1 コンセンサスシーケンス (WT) を含むビオチン化二重鎖オリゴと共にインキュベートし、DNA-転写因子複合体を形成させ、更に抗 CUTL1 抗体で検出する ELISA 法を用いて CUTL1 の転写因子活性を確認する目的で DNA binding assay を行なった。変異型結

合配列オリゴをコントロールとした。

cAMP/PKA シグナルを修飾した場合の、Wnt/ β -catenin シグナルの活性の変化は、TOPFLASH (LEF1/TCF レポーター) ベクターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイにて解析した。

メラノサイトの MC1R の agonist であるメラノサイト刺激ホルモン (MSH) あるいは、inverse agonist である agouti signaling protein をマウス培養メラノサイト (melan-a) に作用させ cAMP/PKA シグナル活性を亢進/抑制した場合の cDNA マイクロアレイ解析の結果 (共同研究者の解析データ) と、CUTL1 ノックダウン細胞での下流の遺伝子発現パターンを比較した。

CUTL1 を特異的 shRNAi 発現レンチウイルスにてノックダウンしたメラノサイトで cAMP/PKA シグナルを抑制した場合の TFE3/TFEB の発現レベルの変化をリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。

(倫理面での配慮)

レンチウイルスを用いた実験は、島根大学組換え DNA 実験安全部会の承認を得たうえで、島根大学共同実験施設遺伝子解析部門遺伝子工学実験室 (P2 施設) にて行われた。

C. 研究結果

1. NF1 ノックダウンメラノサイトでは cAMP シグナルは抑制されている。そのシグナリングモデルとして、培養ヒトメラノサイトで cAMP/PKA シグナル拮抗剤を用いて活性を抑制、あるいは PAR2-AP により PARs シグナルを活性化すると CUTL1 の DNA binding activity 上昇が確認された (図 1)。

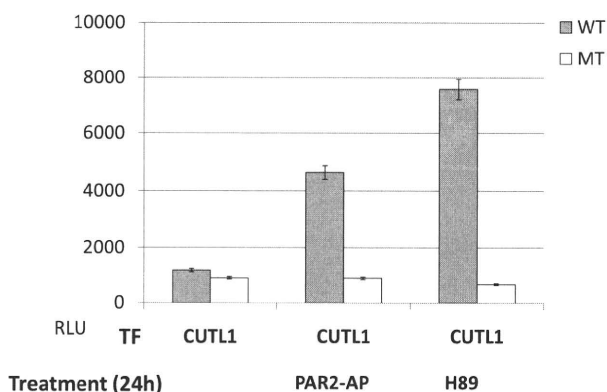


図 1 DNA binding activity of CUTL1 in human melanocytes
Melanocyte 全細胞抽出液を CUTL1 コンセンサスシーケンス (WT) を含むビオチン化二重鎖オリゴと共にインキュベートし、DNA-転写因子複合体を抗 CUTL1 抗体で検出。変異型結合配列オリゴ: ネガティブコントロール (MT)。

2. cAMP/PKA シグナル拮抗剤を用いた場合は、CUTL1 serine リン酸化部位 1215 のリン酸化抑制が確認された。しかし PAR2-AP では確認できなかった。

3. CUTL1 ノックダウン細胞でのオリゴマイクロアレイを使った遺伝子発現スクリーニングの修飾遺伝子の結果²⁾と、共同研究者による cAMP/PKA 経路の agouti signaling protein/MSH により発現レベルが変化する遺伝子スクリーニングの結果³⁾の比較検討では、CUTL1 ノックダウン後の発現亢進 25 遺伝子中 8 遺伝子に一致がみられた (表 1)。

4. CUTL1 ノックダウンメラノサイトでは cAMP/PKA シグナル拮抗剤および PAR2-AP による TFE3/TFEB の発現亢進が抑制された (図 2)。

5. NF1 ノックダウンメラノサイトおよび、PKA の阻害薬を添加したメラノサイトでは Wnt/ β -catenin シグナルが活性化していることが、TOPFLASH ルシフェラーゼレポーターアッセイにより明らかにされた。

6. TFE3/TFEB は β -catenin 発現を亢進させ、Wnt/ β -

catenin シグナルを活性化する転写因子であることが近年明らかにされていることから、最終的に図 3 に示すようなシグナル伝達経路が示唆された。

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)が近年報告⁴⁾され、この一見関係のないシグナルの生物進化過程における密接な関連を説明することができる理論も提唱されている⁵⁾。

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・増殖の両方に影響を与えることが知られている⁶⁾。

一方、メラノサイトにおける neurofibromin の non-Ras function の意義は明らかにされていなかったが、我々は NF1 ノックダウンメラノサイトで neurofibromin が発現低下すると non-Ras function の低下により adenylyl cyclase 活性が抑制され、下流の cAMP/PKA シグナル活性が抑制されることを見出した。

今回は、この non-Ras function シグナルによって、PARs が活性化され、更に PARs/PKA により活性化/抑制される CUTL1 の転写因子活性上昇を介した TFE3/TFEB の発現亢進が起こり TFE3/TFEB による Wnt/ β -catenin 経路の活性化により、cyclin-D1 の発現亢進などが誘導され細胞増殖を引き起こすシグナルが存在していることが示唆された。

表 1 Genes up-regulated by CUTL1

✓ASP up-regulated / MSH down-regulated genes in melanocytes			
Annotation	Ratio CUTL1/RNAi	Gene symbol	Full name
Development/differentiation			
Mm_103593	49.7	✓ DKK2	Dickkopf-2
Mm_3085	8.1	PFN	plectrophilin
Mm_8180	9.9	EPYSL3	dihydropyrimidinase-LIKE 3
Mm_32207	2.4	WNT5A	wingless-type mshv integration site, member 5a
Mm_29095	2.3	BRUNOL4	bruno-like 4
Mm_69624	2.1	MSRP1F3	mitogen-regulated protein proliferin-3
Mm_139314	2.1	DPP4S	developmental pluripotency associated-5
Mm_9336	2.1	✓ GNB4	guanine nucleotide-binding protein, beta-4 subunit
Adhesion/motility			
Mm_29798	5.0	CD34	hematopoietic progenitor cell antigen cd34
Mm_2877	4.7	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
Mm_225096	3.3	✓ ITOA6	integrin, alpha-6
Mm_16749	2.9	KLRA18	killer cell lectin-like receptor a18
Mm_154610	2.7	TMSR10	transmembrane 4 superfamily, member 10
Mm_1	2.0	S100A10	100 calcium binding protein a10 (calpain)
Extracellular matrix			
Mm_25755	3.5	ASP	aspirin
Mm_234856	2.6	COL3A1	collagen, type iii, alpha-1
Mm_205021	2.4	NPNT	natriuretic peptide
Mm_5020	2.4	SEMA3A	semaphorin 3a
Mm_738	2.1	COL4A1	collagen, type iv, alpha-1
Transcription/translation			
Mm_5025	3.8	ETV4	ets variant gene 4
Mm_9045	3.5	RPS27	ribosomal protein s27
Mm_473	2.9	MYBL1	v-myb myeloblastosis oncogene homolog-like 1
Mm_18810	2.8	ZFP422	zinc finger protein 422
Mm_45239	2.1	LRFAP1	leucine-rich repeat in fib-interacting protein 1
Mm_925	2.0	TFDP1	transcription factor dp1

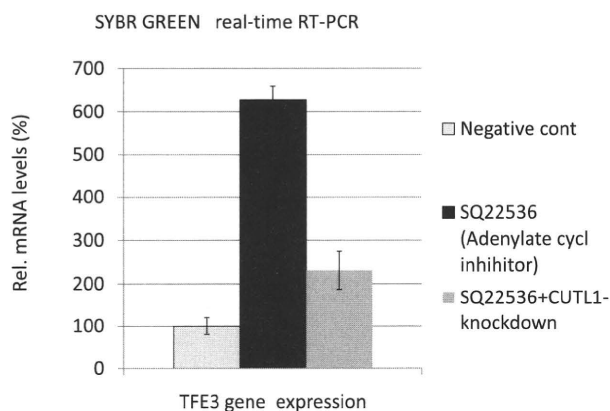


図 2 TFE3 overexpression induced via cAMP inhibition is down-regulated by CUTL1 knockdown

参考文献

- 1) Schepper SD, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert J-M. Pigment cell-related manifestations

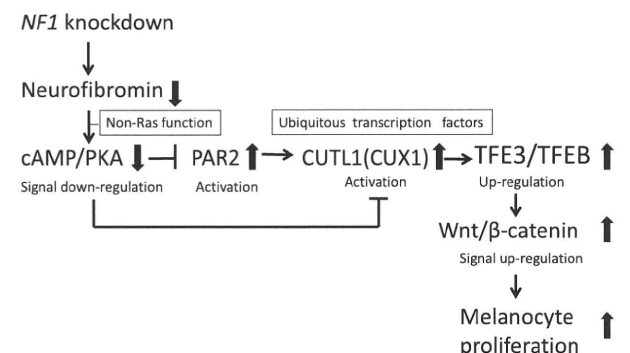


図 3

in neurofibromatosis type1: an over view. *Pigment Cell Res* 18: 13-24, 2004

- 2) Michl P, Ramjaun AR, Pardo AE, Warner PH, Wagner M, Poulosom R, Arrigo CD, Ryder K, Menke A, Gress T, Downward J. CUTL1 is a target of TGF β signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7: 521-532, 2005
- 3) Pape EL, Passeron T, Giubellino A, Valencia JC, Wolber R, Hearing VJ, Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the Mc1r. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1802-1807, 2009
- 4) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- 5) 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.
- 6) 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. 太田征孝、草竹兼司、今岡かおる、金子 栄、

森田栄伸：治療に苦慮したびまん性神経線維腫（NF1）の1例、島根形成外科懇話会、松江、2010年7月

2. 古村南夫、IPL（光）+RF（高周波）によるスキンジュービネーション、第10回日本抗加齢医学会総会、2010年6月15日、京都
 3. 古村南夫 QスイッチレーザーとIPL：最近の進歩と活用術、第4回見た目のアンチエイジング研究会、2010年11月6日、東京
- ### 2. 論文発表
1. 古村南夫、中山樹一郎、神経線維腫症1型の病態と治療：カフェ・オ・レ斑の発症病理 *西日本皮膚科 VOL 72、500-506、2010*
 2. 古村南夫、高橋 仁、森田栄伸、カフェオレ斑とメラノサイトの細胞内シグナル、*日本レックリングハウゼン病学会雑誌 VOL1、52-56、2010*
 3. 古村南夫、色素血管母斑症、小児科臨床ピクシス17 年代別子どもの皮膚疾患、五十嵐隆編、P36-37、中山書店、東京、2010
 4. 古村南夫、メラニン産生調節機構、*日本皮膚科学会雑誌 VOL 119、2777-2779、2010*
 5. 古村南夫、カフェオレ斑の病態と治療、*SEM-INARIA DERMATOLOGIE、207、23-25、マルホ株式会社、大阪、2010*

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

融合プロテオミクスによる神経系細胞分化に関わる NF1 腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の解析

研究協力者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部
腫瘍医学分野准教授
(研究協力者の共同研究者：小林大樹 同腫瘍医学分野研究員
平山未央 同腫瘍医学分野研究院生
尹 浩信 同皮膚病態治療再建学分野教授
竹屋元裕 同細胞病理分野教授
菰原義弘 同細胞病理分野助教
倉持 朗 埼玉医科大学皮膚科学教授)

研究要旨

神経線維腫症 1 型 (NF1) 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ある。NF1 の原因遺伝子産物 Neurofibromin は Ras-GAP 相同領域を有し、その機能の欠損による Ras を介した細胞内シグナル伝達異常は、神経系細胞の増殖と分化異常を誘発し、NF1 の病態に関わると考えられているが詳細は明らかでない。Neurofibromin の神経系細胞内機能とその欠損による細胞増殖分化異常の機構を明らかにするため、RNA 干渉 (siRNA) 法を用いた NF1 発現抑制によって、神経系細胞内にて生じた表現形の細胞内責任シグナル分子群を、融合プロテオミクスを用いて詳細に検討し、NF1 発現抑制により、特異的に発現が変動する 38 種の蛋白質を確認した。その中で、特に mTOR 経路の調節因子である Translationally controlled tumor protein (TCTP) を中心とした分子ネットワークに注目し、NF1 患者腫瘍より分離した初代培養細胞と NF1 欠損によって生じた MPNT 培養細胞、およびそのコントロールとなる正常シュワン細胞および繊維芽細胞を用いて、その機能の詳細を解析した。その結果、NF1 欠損細胞では TCTP の発現が有意に上昇しており、特に、MPNST 細胞において、TCTP の発現が顕著であることから、TCTP が NF 病態において悪性化の指標となる可能性を示唆した。また、TCTP の発現抑制によって、腫瘍性の未分化細胞が正常な分化状態に誘導され、同時に細胞増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果より、NF1 病態において、TCTP を中心とした分子活性化シグナルの亢進が重要なメカニズムとして考えられ、本シグナルの NF1 治療ターゲットとしての可能性を提唱した。

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の十分な解明には至っていない。また、ニューロフィブロミンの発現低下に起因すると思われる様々な所見が多々報告されていることから、ニューロフィブロミンには、更なる未知の機能が存在するのではないかと推測されている。本研究では、ニューロフィブロミン

の細胞内機能と NF1 の病態との関連性を明らかにするために、NF1 発現抑制によって生じた神経系細胞の表現形変化に関与する細胞内責任シグナル分子群を、融合プロテオミクス法、および細胞生物学的検証法を用いて詳細に検討した。特に新規に同定した Translationally controlled tumor protein (TCTP) を中心とした分子ネットワークに注目し、本シグナルの治療ターゲットとしての可能性、および、NF1 異常による腫瘍細胞悪性化のマーカーとしての可能性を検証した。

B. 研究方法

培養細胞は、PC12 細胞、Hela 細胞、ヒト繊維芽細胞、ラットシュワン細胞、ヒト正常シュワン細胞、ヒト MPNST 細胞、および NF1 患者腫瘍組織より分離した繊維芽細胞および NF 腫瘍細胞を用いた。定量的プロテオミクス法として、iTRAQ 法を用いた。RNA 干渉法 (siRNA) による NF1 発現抑制をそれぞれの細胞にて行い、これらのコントロール細胞と同時に蛋白質を抽出し、それぞれのトリプシン分解により得られたペプチドを iTRAQ 試薬で修飾し、LC-MALDI-TOF-TOF および LC-ESI-QqTOF を用いて iTRAQ 修飾ペプチドの同定と定量解析を行った。同定蛋白質の検証は、Western Blotting 法を、また機能解析として、注目すべき発現変動蛋白質の 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。また、NF1 患者の腫瘍部位より分離した primary 培養細胞、およびヒト MPNST 細胞については、NF1 病態関連分子機能に関しての詳細な細胞生物学的／生化学的解析を行った。(倫理面への配慮) NF1 患者の腫瘍組織は、熊本大学病院皮膚病態治療再建学の尹浩信教授と、埼玉医科大学皮膚科学の倉持朗教授より、熊本大学倫理則、および埼玉医科大学倫理則に従って御供与いただいた。

C. 研究結果

1. プロテオミクス手法を用いた NF1 病態関連分子群の同定

現在までに約 1600 種の PC12 細胞内発現蛋白質を同定し、その内、NGF 刺激によって特異的な発現差異を示す 72 種の蛋白質を同定している。これらには既知の NGF 誘導分子のみならず、新規の分子群が含まれており、これらの機能解析と細胞生物学的検証を行うことによって、神経系細胞分化と細胞死抑制に関わる新規機能分子群であることが

判明している (Kobayashi et al. Mol. Cell. Proteomics 2009)。さらに NF1 の発現抑制により、NGF で刺激した PC12 内で特異的に発現が変動する 38 種の蛋白質を確認した。発現上昇を示した蛋白質には、新規 mTOR 経路の調節因子である Translationally controlled tumor protein (TCTP) が含まれており、TCTP の発現上昇をウエスタンブロットングにより確認した (図 1)。TCTP は酵母からヒトにいたるまで、真核生物種間で構造および機能面において高度に保存されており、多彩な機能を示す蛋白質である。特にアポトーシス抑制、蛋白質合成、細胞分裂に関わる機能などの面から、TCTP は腫瘍との関連が示唆されている。しかしながら、NF1 病態の代表的な腫瘍である神経線維腫と TCTP とを関連づける報告はない。そこで神経線維腫の主体とされるシュワン細胞内における NF1 遺伝子機能欠損が、TCTP の発現に及ぼす影響を解析した。培養シュワン細胞 S16 の siRNA を用いた NF1 発現抑制によって、細胞増殖能の亢進および Erk の活性化を確認し、それら細胞において、インスリン刺激により有意に TCTP の発現が上昇していることを見出した (図 2)。

2. NF1 患者の腫瘍部位由来 primary culture cell 内における NF1 病態関連分子の発現と機能

NF1 患者腫瘍組織より細胞の単離を行った。腫瘍部位の周囲部より fibroblast 様の細胞 (NF fibroblasts)、腫瘍部位より肥大化している紡錘形の細胞 (NF Pt cell) を単離した。ウエスタンブロットの結果、両細胞は NF1 が正常の fibroblast と比べて neurofibromin の発現が少なく、さらに PT cell においては neurofibromin が発現していないことを確認した (図 3)。

この NF Fibroblasts および PT cell の NF1 活性を

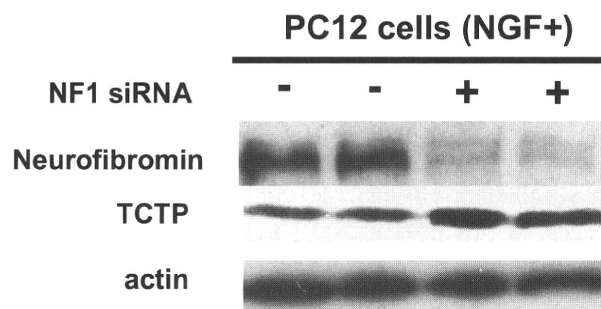


図 1 NF1 siRNA によって発現抑制 (Knock Down: KD) された PC12 細胞内の Neurofibromin と、NF1 KD 細胞内で上昇する分子として同定された TCTP の Western Blotting による検証

Erk のリン酸化により評価した。無血清条件下で 24 時間培養した両細胞を血清添加 (1% FBS) によって刺激し、変動するリン酸化 ERK を Western Blot により検出したところ、無血清培養条件下において、PT cell は Fibroblasts に比較して ERK が高レベルで活性化しており、さらに血清刺激による ERK の活性化が、より長く持続していた (図 4)。PT cell 内

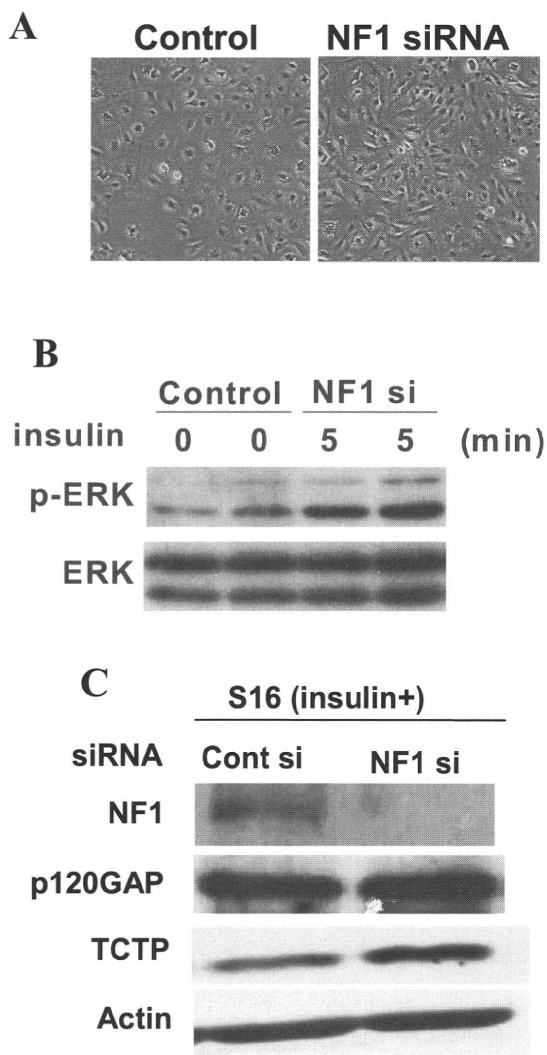


図 2 NF1 欠損 S16 シュワン細胞内における TCTP の発現変動: insulin 刺激によって ERK と TCTP の活性化が NF1 欠損細胞で亢進した。

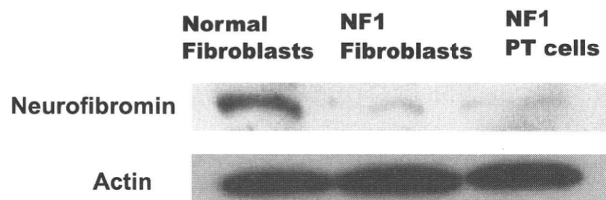


図 3 正常、および NF1 患者皮膚由来繊維芽細胞、および NF1 腫瘍組織由来培養細胞 (PT cell) のニューロフィブロミンの Western Blotting による解析

で、NF1 の機能欠損による RAS の活性化が起こっていると考えられた。

NF fibroblasts、NF Pt cell 両細胞の TCTP の発現をウエスタンブロッティングおよび免疫染色により検討したところ、fibroblasts に比較して、Pt cell は TCTP が有意に高発現していた (図 5)。また、TCTP siRNA を処理した PT cell は、顕著な形態変化を示し、この形態は正常シュワン細胞の形態に酷似していた。また、細胞増殖能の低下も同時に認められた (図 6)。さらに神経線維腫の中で最も悪性度が高い悪性末梢神経線維腫鞘 MPNST 細胞 sNF96.2 に TCTP siRNA を処理した場合も同様に顕著な形態変化および細胞生存能の低下が確認された (図 7)。

また、NF1 患者 MPNST 組織における TCTP の発現を免疫組織化学的に観察したところ、MPNST では S100 の発現が 50% 以下に低下していたが、特異的な TCTP の発現の増強が顕著に観察された (図 8)。

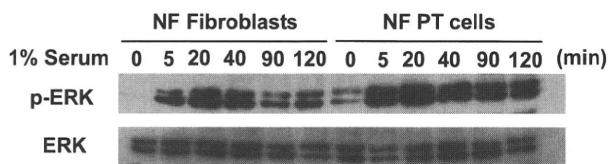


図 4 NF1 患者皮膚および neurofibroma 組織由来培養細胞における、血清刺激による MAP kinase/ERK 活性の経時的変化

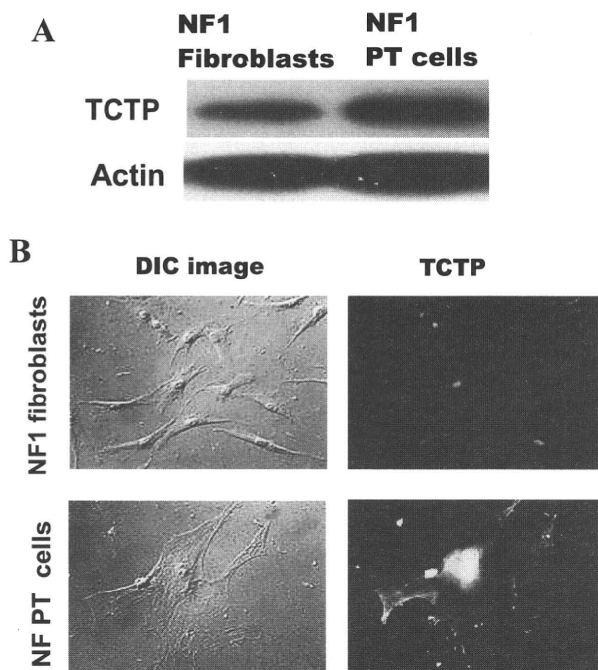


図 5 ウエスタンブロッティングおよび免疫染色による NF fibroblasts、NF PT cell 内 TCTP の発現量解析

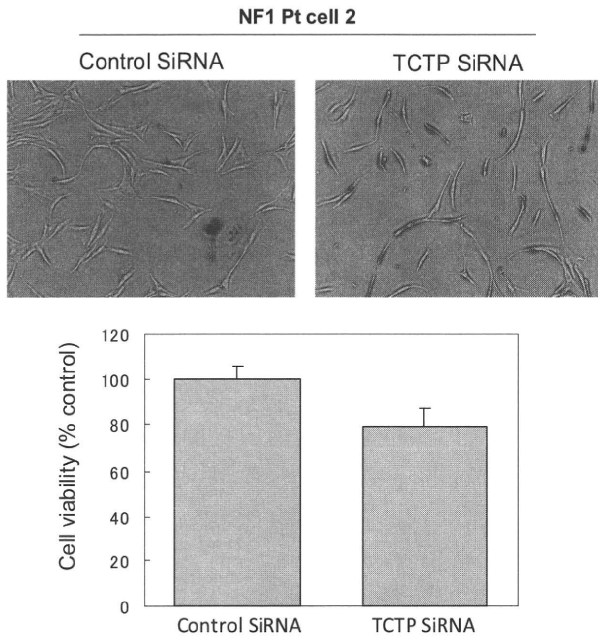


図6 NF1 PT cell における TCTP 発現抑制による細胞内変化と細胞増殖能の低下

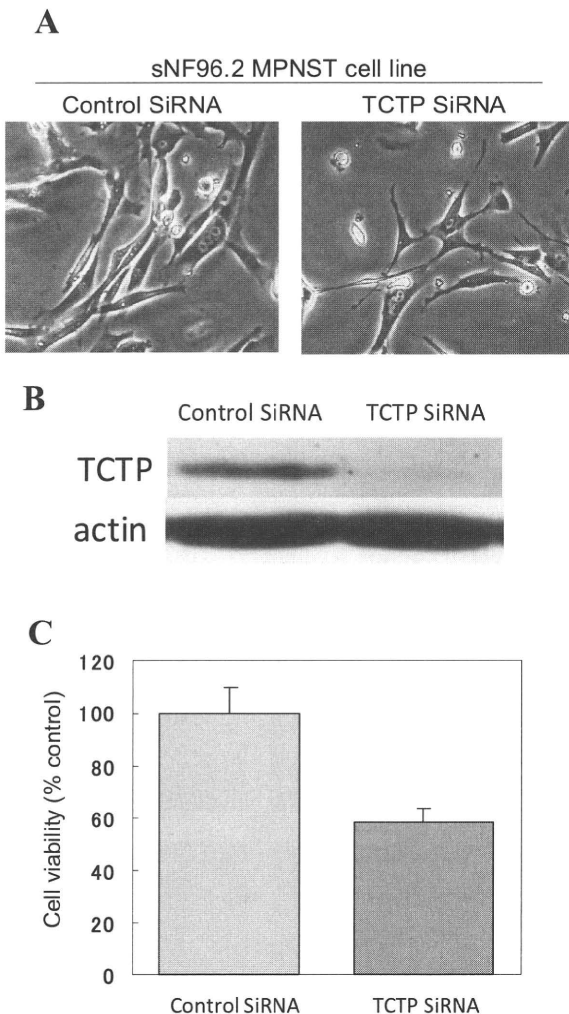


図7 NF1 PT cell における TCTP 発現抑制による細胞内変化と、細胞増殖能の低下

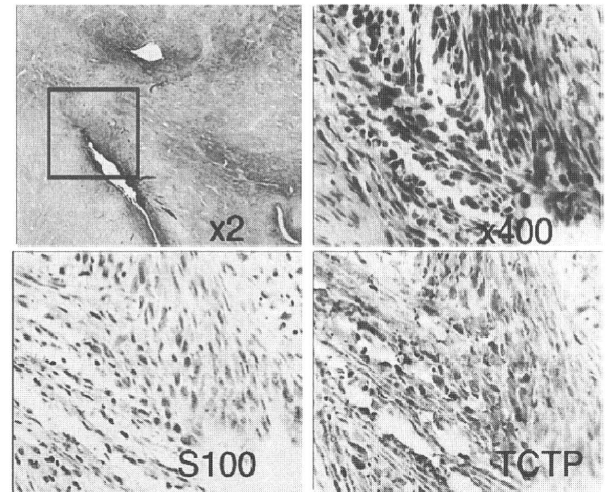


図8 NF1 患者 MPNST 組織における S100 および TCTP の免疫染色 MPNST では S100 の発現は低下するが、TCTP の発現増強が観察された。

以上の結果より TCTP が神経線維腫の治療ターゲットとなることのみならず、NF1 欠損による細胞の悪性化の指標となる可能性が示唆された。

D. 考察

今回の実験により、NF1 発現抑制により、NGF で刺激した PC12 内で特異的に発現上昇する蛋白質には、mTOR 経路の調節因子である Translationally controlled tumor protein (TCTP) が含まれていることが初めて明らかになった。NF1 の機能欠損が TCTP の発現を上昇させる要因は、Ras-MAPK シグナル経路の活性化が引き金になっていると考えられる。NF1 の欠損によって RAS が活性化し MAPK カスケードが活性化した後、さらにその下流では転写因子 CREB が活性化する。CREB は、TCTP をコードする遺伝子 TPT1 の転写因子であることが報告されている。すなわち、NF1 欠損による RAS-MAPK の活性化、TCTP の発現亢進が連動して mTOR 経路を亢進している可能性があり、NF1 siRNA 処理した PC12 細胞、シュワン細胞および NF1 腫瘍部位より単離された PT cell 内で、有意に細胞増殖が亢進しているメカニズムの一つと考えられた。

これまでに NF1 の病態における mTOR 経路の関与が報告されているが、どのようにして NF1 病態において mTOR 経路が活性化する詳細な機構はよくわかっていないのが現状であった。今回、NF1 患者より切除された腫瘍部位より単離された PT cell では、ERK の活性化が顕著に見られ、TCTP が高発現していることが明らかになったことから、TCTP の発現上昇は NF1 の病態における mTOR 経路の活

性化に関与していることが強く示唆された。実際にラパマイシンなどの mTOR 阻害剤が、NF1 の治療薬として検討されている様に、TCTP の機能やそのシグナルの上流および下流の分子を標的とした治療法の確立が期待できる。

E. 結論

プロテオミクス手法を用いた解析により、NF1 siRNA 処理した神経系細胞に、TCTP の発現が上昇していることを見出した。NF1 患者腫瘍部位より単離した培養細胞 NF PT cells では、NF fibroblasts と比べ Erk の発現が有意に活性化しており、それに連動して TCTP の発現が亢進していることを確認した。特に、NF1 患者由来 MPNST 細胞において、TCTP の発現は顕著であり、TCTP が NF1 病態に関わる腫瘍の悪性化の指標となる可能性を示唆した。さらに TCTP の発現抑制によって、未分化細胞が正常な分化状態へと誘導され、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果より、NF 1 の機能破綻により活性化した Ras-MAPK シグナル活性化、TCTP の発現上昇、および TCTP の発現上昇が引き金となる mTOR 経路の異常な活性化が、NF 1 の腫瘍化を引き起こす要因の一つと考えられた。今後、TCTP の機能やそのシグナルの上流および下流の分子を標的とした治療戦略が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nambu, T, Araki, N*, Nakagawa, A, Kuniyasu, A. Kawaguchi, T, Hamada, A. Saito, H: The Contribution of BCR-ABL-independent Activation of ERK1/2 to Acquired Imatinib Resistance in K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Science*, 101(1): 137-42, 2010.
2. Silsirivanit A, Araki N*, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu H, Kuwahara K, Wongkham S*, Sakaguchi N: A novel serum carbohydrate marker for cholangiocarcinoma: values for diagnostic and prognostic indicators. *Cancer*, in press
3. Esaki K, Terashima Y, Toda E, Yoshinaga S, Araki N, Matsushima K, Terasawa H. Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Expression and Purification*, 2010 in press

2. 学会発表

1. 融合プロテオミクスによる神経系腫瘍の発症メカニズムの解析 日本生理学会 (盛岡) 2010年5月19日~21日
2. Analysis of cellular signals activated in the tumor tissue related to chemotherapy sensitivity by Integrated Proteomics
*Norie Araki, Souhei Mizuguchi, Takashi Morikawa, Daiki Kobayashi, Masayuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Anthony Wilson, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu
日本ヒトプロテオーム機構 第8回大会 JHUPO (東京) 2010年7月26日~27日
3. 統合プロテオミクスによる新規な神経系疾患関連分子群の同定と機能解析 小林大樹、平山未央、森川 崇、水口惣平、長山 慈、ウィルソン森藤政代、荒木令江 日本ヒトプロテオーム機構 第8回大会 JHUPO (東京) 2010年7月26日~27日
4. バイオインフォマティクスと統合プロテオミクスの手法を用いた病態組織細胞内の活性化分子ネットワークの解析 水口惣平、森川崇、坪田誠之、緑川宇一、小林大樹、中村英夫、倉津純一、荒木令江 日本ヒトプロテオーム機構 第8回大会 JHUPO (東京) 2010年7月26日~27日
5. 腫瘍医学教育における最先端基礎研究概念の導入の必要性和展望 第42回日本医学教育学会大会 (東京) 2010年7月31日
6. A quick cancer proteome validation system by a fully automated 2DE-western blotting device Norie Araki HUP02010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010
7. Integrated proteomics of brain tumor cell signals related to chemotherapy sensitivity Souhei Mizuguchi, Takashi Morikawa, Nobuyuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Daiki Kobayashi, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu, Norie Araki HUP02010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010
8. A proteomic integrated approach for targeting and elucidating the functions of novel proteins involved in neuronal differentiation and disorders Daiki Kobayashi, Jiro Kumagai, Takashi Morikawa, Mio

Hirayama, Anthony Wilson, Masayo Wilson, Norie Araki HUPO2010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010

9. ヘテロな細胞集団における HIF シグナル伝達を介した転移性癌細胞の発育機構の解明 森藤政代、水口惣平、新堀晶子、小林大樹、森川 崇、荒木令江 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010 年 9 月 22 日～24 日
10. 融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制による異常シグナルの解析 平山未央、小林大樹、森川 崇、長山 慈、緑川宇一、水口惣平、荒木令江 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日～10 日
11. プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析 緑川宇一、新堀晶子、水口惣平、新森加納子、丸尾祐二、鶴沼 豊、中村 眞、荒木令江 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日～10 日
12. Integrated proteomics of cancer cellular activation signals related to chemotherapy sensitivity Souhei Mizuguti, Takashi Morikawa, Nobuyuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Daiki Kobayashi, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu, Norie Araki 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日～10 日
13. Development of a fully automated 2DE-western

blotting system for quick validation and profiling cancer specific proteomes Norie Araki, Uichi Midorikawa, Souhei Mizuguti, Hideki Kinoshita, Nobuyuki Tsubota, Takashi Morikawa, Daiki Kobayashi, Yuji Maruo, Makoto Nakamura 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日～10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願

1. 特願 2009-025607、胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体、発明者：阪口薫雄、荒木令江、他 2 名、出願人：国立大学法人熊本大学、株式会社トランスジェニック 国際特許 PCT/JP2010-000708、胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体、出願人：国立大学法人熊本大学、2010 年出願
2. 特願 2010-81524、融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法および薬剤効果検出方法、発明者：荒木令江、他 4 人、出願人：国立大学法人熊本大学、2010 年出願、2011 年国際特許出願予定
3. 特願 2010-81525、統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法、発明者：荒木令江、他 4 人、出願人：国立大学法人熊本大学、2010 年出願、2011 年国際特許出願予定

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

NF1 の主症状である神経線維腫の形成は、皮膚の形状変化による美容上の問題、発生部位による機能上の問題のみならず、悪性の母地となり得ることから、その治療法及び予防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。その結果、神経線維腫は上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition: EMT）シグナルの亢進によって引き起こされる線維性疾患に類似した所見があることを見出した。それゆえ、EMT 阻害剤が本疾患に有効であ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

神経線維腫の組織における上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition: EMT）誘導転写因子の発現を調べ、神経線維腫と上皮間葉転換（EMT）の関連について検討を行った。その所見に基づいて、EMT 阻害剤のスクリーニングを行った。

C. 研究結果

1. 神経線維腫を構成する細胞における EMT 誘導転写因子群の発現

神経線維腫の組織における EMT 誘導転写因子 Zeb1 の発現を調べたところ、腫瘍構成細胞の大半が 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。

2. NF1 欠損シュワン細胞における EMT 誘導転写因子の発現

神経線維腫患者より確立された NF1 欠損シュワン細胞における Snail, Zeb1 の発現を免疫細胞染色によって調べたところ、核内に Snail タンパク質と Zeb1 タンパク質の高い発現を認めた。

さらに NF1 欠損シュワン細胞における EMT 誘導転写因子群 Slug, Snail, Twist, Zeb1, Zeb2 の発現を mRNA レベルで調べたところ、正常シュワン細胞（HSC）と比べて NF1 欠損シュワン細胞では、Snail, Twist, Zeb1 が高発現していた（図 1）。

3. NF1 発現抑制の際の EMT 誘導転写因子の発現

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 誘導転写因子群の発現を検討した。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。

また、正常シュワン細胞 (HSC) において NF1 の発現を抑制したところ、Zeb1 と Zeb2 の発現が上昇した (図2)。

4. EMT 阻害化合物のスクリーニング

上記の結果より、NF1 発現低下と EMT 誘導が関与し、神経線維腫形成に EMT シグナルの活性化が働いていることが推測できたので、EMT を阻害する化合物のスクリーニングを行った。具体的には、TNF- α と TGF- β を上皮系細胞に作用させることによって EMT 誘導転写因子の活性化が生じ、そのシグナルに依存して細胞集塊が形成される性質を指標として化合物のスクリーニングを行った。約 2000 種類の化合物をスクリーニングし、細胞毒性が生じない濃度で EMT が抑制できたものが 22 種あった。現在高次スクリーニングを行い、臨床応用に向けて開発を進めている。

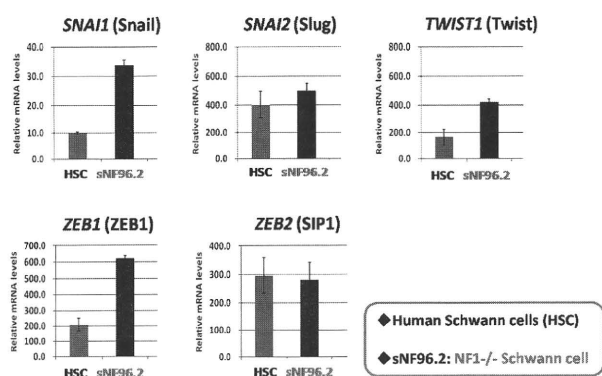


図1 NF1 欠損シュワン細胞 sNF96.2 cell における EMT 誘導転写因子群の発現

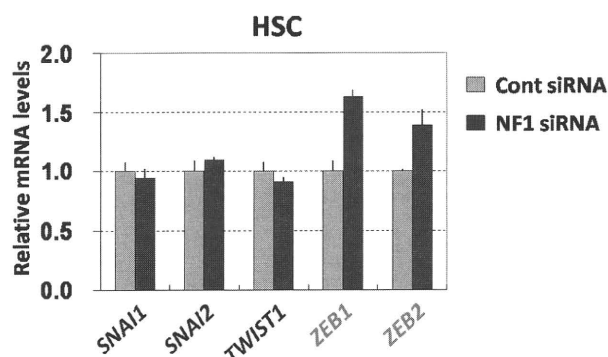


図2 正常シュワン細胞における NF1 発現抑制時の EMT 因子の動態

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。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ことができる。

私達は今回、神経線維腫の臨床サンプルおよび NF1 患者から樹立したシュワン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 や Zeb1 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 誘導転写因子の発現上昇がみられた。さらに上皮性細胞および正常シュワン細胞において 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ックスの産生も増加することも観察されており、EMT シグナルこそが、神経線維腫形成のメカニズムではないかと考えた (Arima et al., 2010)。

これまでの結果から、EMT シグナルの阻害は神経線維腫の形成を抑制できる可能性があると考えた。そこで私達が独自に見出した EMT によって誘導される細胞集塊反応 (Takahashi et al., 2010) をアッセイ系として、現在 EMT を抑制できる薬剤のスクリーニングを行っている。

E. 結論

NF1 において発生する神経線維腫は上皮間葉転換シグナルの亢進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

1. 論文発表

Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H, Tanihara H and Saya H: TNF- α regulates TGF- β -dependent epithelial- mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-Moesin interaction. J Biol Chem 285: 4060-4073, 2010

Arima Y, Hayashi H, Kamata K, Goto TM, Sasaki M, Kuramochi A, Saya H: Decreased expression of neurofibromin contributes to epithelial-mesenchymal transition in neurofibromatosis type 1. Exp Dermatol 19: e136-41, 2010

2. 学会発表

佐谷秀行. 分子機構に基づく神経線維腫治療戦略の

考案. 会長講演. 第2回日本レックリングハウゼン病学会学術大会. 2010年11月14日、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号	特願 2009-243455
発明者	佐谷秀行、永野 修、丹羽眞一郎、中村賢志、岩崎良美、畑 幸江
発明の名称	in vitro Fibrotic Focus モデル及び、それを用いた治療薬評価システム
出願人	学校法人慶應義塾、リンク・ジェノミクス㈱
出願日	2009年10月22日

神経線維腫症 1 患者に合併した GIST（Gastrointestinal Stromal Tumor）の 3 例

研究分担者 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

神経線維腫症 1 (NF1) 患者に伴う GIST は、小腸に多発することが多く、約 90% は c-kit の遺伝子変異がみつからないにもかかわらず腫瘍細胞が KIT タンパクの高発現を示す特徴を持つ。提示した 3 例とも原発巣は小腸であった。3 例とも手術的に摘出し、術後イマチニブ（グリベック®）を内服。再発を繰り返し Clinically Malignant と考えられた 1 例（女性例）はイマチニブ耐性とみなされスニチニブ内服に変更された。摘出腫瘍は組織学的に紡錘形腫瘍の密な束状配列であり免疫組織学的に KIT (+)、CD34 (+)、ビメンチン (+)、 α -SMA (-)、S-100 (-) であった。腫瘍細胞に c-kit、PDGFRA 遺伝子変異はなかった。

c-kit、PDGFRA 遺伝子変異を高率に伴う sporadic GIST と NF1 患者に伴う GIST では両者とも KIT タンパクの高発現を伴うがその発生メカニズムは異なることが予想される。

太田有史、延山嘉眞、谷戸克己、新村真人
慈恵医大皮膚科
衛藤 謙、小林徹也 慈恵医大消化器外科
高倉一樹、梶原幹生、石川智久
慈恵医大消化器内科

A. 研究目的

神経線維腫症 1 (NF1) 患者に合併する GIST の頻度は 7% という報告や一般集団と比べて 45 倍発生頻度が高いという報告があるが、日本人での NF1 合併 GIST の頻度や臨床症状についての詳細な報告は少ない。

B. 研究方法

我々はここ 5 年間に 5 人の GIST 合併 NF1 患者を経験し、うち 3 人は当院にて摘出術を受けた。その臨床症状、病理・免疫組織化学、遺伝子 (c-KIT、PDGFRA) 変異について検討した。また、合併頻度についても概算した。

C. 結果（症例提示）

症例 1

70 歳 男性

初診 平成 6 年 10 月 31 日

家族歴 近親に NF1 の患者はいない

合併症 3 歳時、生来よりわん曲していた左下腿を骨折。偽関節となった。

現病歴 慈恵医大皮膚科に通院中であった。平成 22 年 9 月 30 日、黒色便に気づいた。ヘモグロビン値 8.5g/dl。消化管出血を疑われ消化器内科に入院となった。

経過と治療 胃・十二指腸の上部内視鏡、回腸から肛門までの下部内視鏡検査では所見にとぼしかったが、小腸内視鏡にてトライツ靭帯より 125cm から 145cm の部位に粘膜下腫瘍の多発をみた（最大 30 x 25mm）。同年 10 月 26 日、腹腔鏡下に同部分を約 35cm に渡り切除したが、少なくとも大小 8 個の腫瘍を確認できた。またトライツ靭帯より 6cm と 180cm の部位にも 10mm までの腫瘍があり楔状切除をおこなった。腫瘍は組織学的にはいずれも同様で紡錘形細胞の束状配列を示し個々の細胞の異型性は乏しかった。免疫組織学的には c-kit (+)、

CD34 (+)、 α -SMA (-)、desmin (-)、S-100 蛋白 (-)であった。以上より GIST と診断した。腫瘍の大きさや核分裂指数より low risk grade と考えられた。術後、グリベックによる化学療法を継続している。

症例 2

30 歳 男性

初診 平成 20 年 4 月 21 日

家族歴 近親に NF1 の患者はいない

合併症 仙椎に dural ectasia あり

現病歴 自治医大皮膚科で小児期から診てもらっていた。平成 18 年に骨盤内腫瘍を指摘された。ゆっくと増大しているため慈恵医大に紹介となった。経過と治療 MRI にて膀胱上部に境界明瞭な約 9cm 大の類円形腫瘍があり、平成 20 年 10 月 29 日経腹式needle biopsy が行われ、GIST などが疑われた。平成 21 年 2 月 26 日摘出術が行われたが小腸との癒着があったため小腸も 10cm ほど合併切除された。病理学的には紡錘形細胞腫瘍で免疫組織学的には症例 1 と同様で、小腸との連続性があるため小腸原発の GIST と診断した。腫瘍の大きさや核分裂指数より intermediate risk grade と考えられた。術後、グリベックによる化学療法を継続している。術後 2 年近くになるが再発はない。

症例 3

31 歳 女性

初診 平成 21 年 12 月 28 日

家族歴 近親に NF1 の患者はいない

既往歴 1 歳のとき肺動脈狭窄を指摘

現病歴 平成 19 年 11 月 12 日、急性腹症（小腸穿孔）にて緊急開腹術施行。小腸同士が癒着をした中心に腫瘍あり、病理より GIST と診断。平成 20 年 6 月、PET にて確認された S 状結腸間膜再発巣を 11 月 26 日独協医大で摘出したが、平成 21 年 11 月の CT 検査にて骨盤内右側に再び再発巣を生じたため慈恵医大に紹介となった。

経過と治療 CT、MRI、PET などの画像にて再発腫瘍は多発しているため骨盤内・腹腔内に播種している可能性があったが、平成 22 年 2 月 19 日可及的に切除できるすべての腫瘍を摘出した。最大の腫瘍は 12cm x 6cm x 5cm であった。病理学的には紡錘形細胞腫瘍で免疫組織学的には症例 1 と同様で、再発 GIST と診断した。再発腫瘍は、骨盤腔内に播種しておりリスク分類上は、Clinically Malignant と

考えられた。術後、グリベックによる化学療法を継続していたが、同年 12 月の MRI にて骨盤腔内に再発腫瘍が確認された。このためグリベック耐性とみなしスーテントによる化学療法開始された。

以上 3 症例の免疫組織化学、リスク評価（GIST 研究会）、KIT、PDGFRA 遺伝子変異解析結果を表 1、2、3 に示した。

表 1 免疫組織化学

症例		C-kit	CD34	α -SMA	S-100	PAS
1	小腸に無数の病変	++	+	-	-	
2	小腸原発	++	+	-	+(focal)	Skeinoid fiber+
	初発時(小腸原発) (H19年11月12日)	+	+		-	
3	再発時 (H20年11月26日)	+		+(focal)	+(focal)	
	播種 (H21年2月19日)	++	-	-	-	

表 2 リスク評価（GIST 研究会）

症例		腫瘍径(cm)	核分裂像数	MIB-1 index	リスク評価 (再発率)
1	小腸に無数の病変	2.8x2.4x1.8 (最大のもの)	1/50HPF	<1%	低リスク (<5%)
2	小腸原発	10x7x4.5	2/50HPF	2-3%	中リスク (10~20%)
	初発時(小腸原発) (H19年11月12日)	7 (小腸と一塊)	1/50HPF	<1%	中リスク (10~20%)
3	再発時 (H20年11月26日)	7x6	27/50HPF		高リスク (>40%)
	播種 (H21年2月19日)	6.8x5.5x1.2 (最大のもの)	4/50HPF	<10%	Clinically Malignant (>90%)

表 3 KIT、PDGFRA 遺伝子変異解析

症例	腫瘍	KIT Exon9,11,13,17	PDGFRA Exon12,18
1	1	Negative	Negative
	2	Negative	Negative
2		N/A	N/A
	初発時	N/A	N/A
3	再発時	Negative	N/A
	播種時	Negative	Negative

D. 考察

GIST (Gastrointestinal Stromal Tumor) について

GIST すなわち消化管間質腫瘍は、疫学的には年間 10 万人に 2 人程度の発症率といわれており、近年、消化管全般に幅広く分布する間葉系腫瘍 (Gastrointestinal mesenchymal tumor: GIMT) の大部分を占める 1 つの腫瘍単位とみなされている。GIST は KIT (c-kit 遺伝子産物) や CD34 を発現し他の消化管間葉系腫瘍である平滑筋 (肉) 腫や神経鞘腫とは表現型が異なる。近年まで、唯一有効な治療は外科手術とされてきたが、約 90% の GIST では c-kit 遺伝子変異があり、KIT や PDGFR を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKR-I) が開発・臨床応用され有効な成績をあげている。

Sporadic GIST と NF1 に伴う GIST の発生頻度を含めた相違点

頻度に関する記載は、散見される程度にとどまってはいるが、Zoeller らによれば NF1 患者に伴う GIST は 7%。また、Miettinen らは、3000 人の GIST 患者を対象に調査した結果、NF1 患者は一般集団と比べて 45 倍 GIST に罹患するリスクが高いという報告をしている。

慈恵医大皮膚科では、全登録患者約 3000 人のうち 5 人が GIST を発症しているので 0.17%。毎年 1 人経験とすると年間 10 万人に 33 人となり、sporadic GIST とくらべると 16 倍であり合併頻度は比較的高いものと推察される。

Sporadic GIST は、胃に生じることが多く初発時多発することは稀であり、約 90% は c-kit の遺伝子変異があり腫瘍細胞が KIT タンパクの高発現を示す。一方、NF1 患者に伴う GIST は、小腸に多発することが多く、約 90% は c-kit の遺伝子変異がみつからないにもかかわらず腫瘍細胞が KIT タンパクの高発現を示す特徴を持つ。自験例を含めた日本人患者も同様の傾向を示した。また、risk grade は中から高リスクとみなされるものが多いが予後は比較的良好という特徴をもつ。しかし、症例 1 のように小腸にきわめて多発している患者や症例 3 のように再発を繰り返す患者も存在し、その予後を sporadic

GIST と同様に病理学的な分裂像や腫瘍の大きさから決定するのは疑問が残る。

NF1 に伴う GIST の c-kit、PDGFRA 遺伝子変異

これまでの報告では c-kit、PDGFRA 遺伝子変異が少ないのも特徴であり、自験例も変異はみつからなかった。Sporadic GIST で高率に変異がみつかる限られた exon 領域のみの検索であり他の領域に変異がある可能性は否定できない。興味深いことに、症例 3 のように再発時でも播種時でも c-kit、PDGFRA 遺伝子変異がみつからなかったことである。すなわち病期の進行にこれらの遺伝子は関与していないようである。Maertens らは、NF1 患者に生じた GIST に NF1 遺伝子の体細胞変異を確認し MAPK cascade の活性化を示した。すなわち c-kit 変異がなくても NF1 遺伝子の変異が KIT タンパクの高発現を誘導している可能性を示した。そのため TKR-I (Tyrosine Kinase Receptor Inhibitor) であるイマチニブの効果について疑問視する向きも多い。

E. 結論

NF1 患者に腹部症状や画像異常所見をみたときは GIST を念頭におき検索、観察するべきである。NF1 患者合併 GIST の治療は、手術療法が主体である。イマチニブ (グリベック[®]) などの分子標的治療剤は理論上、効果を期待できないが、臨床試験が望まれる。

c-kit、PDGFRA 遺伝子変異を高率に伴う sporadic GIST と NF1 患者に伴う GIST では KIT タンパクの高発現を両者とも伴うがその発生メカニズムは異なることが予想される。

F. 研究発表

学会発表 第 61 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2009 年 10 月 24 日) にて内容の一部を発表した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

骨形成異常を伴ったびまん性神経線維腫について

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）において本邦でのびまん性神経線維腫の合併頻度は約 10%とされているが、その約 40%は頭頸部に生じる。びまん性神経線維腫は早期から治療を行うことが望ましいが、頭頸部に生じたびまん性神経線維腫はその半数に骨形成異常を伴っており、治療が困難な場合も多い。

骨形成異常を合併した頭頸部のびまん性神経線維腫は治療の開始時期、具体的な治療方法、さらに治療後に懸念される機能障害の問題について様々な課題が残されており、今後さらなる検討が必要である。

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

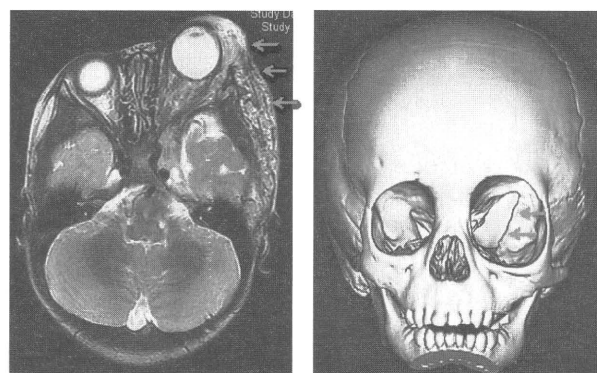
神経線維腫症 1 型（NF1）における本邦でのびまん性神経線維腫の合併頻度は約 10%とされている。びまん性神経線維腫は整容的な問題や悪性化・腫瘍内出血のリスクなどから比較的早期に治療（主に外科的治療）を行うことが望ましいが、手術時の出血も多く、注意が必要である。また、びまん性神経線維腫の約 40%は頭頸部に生じるとの報告もあり、治療が困難な場合も多い。

一方、NF1 に特徴的な骨病変（蝶形骨の形成異常、先天性脛骨偽関節症）の合併頻度はそれぞれ 5%、3%とそれほど高くないが、眼窩にびまん性神経線維腫を生じた場合には約 80%に眼窩形成不全を伴うとされている。今回、われわれは骨形成異常を伴ったびまん性神経線維腫の 2 例を経験したので、治療上の問題点を含めて報告する。

B. 研究方法および結果

症例 1：2 歳、女児。生後 1 カ月ごろから左上眼瞼の腫瘍が増大し、眼球が下方へ変位してきたため、当科を紹介された。MRI と CT にて精査を行ったと

ころ、上眼瞼から眼窩内にかけてびまん性神経線維腫を認め、海綿静脈洞への進展がみられた。さらに左蝶形骨の形成不全と緑内障を伴っていた（図 1）。
症例 2：17 歳、男児。幼少時に NF1 の診断を受けた。最近になり、右後頭部の腫瘍が増大してきたため、当科を紹介された。MRI と CT にて精査を行ったところ、右後頭部にびまん性神経線維腫を認め、その下床ではラムダ縫合部と後頭蓋窩の 2 カ所に頭蓋骨の骨欠損を認めた。さらに小脳虫部の低形成、後頭蓋窩嚢胞性病変もみられた（図 2）。



MRI

3DCT

図 1 症例 1

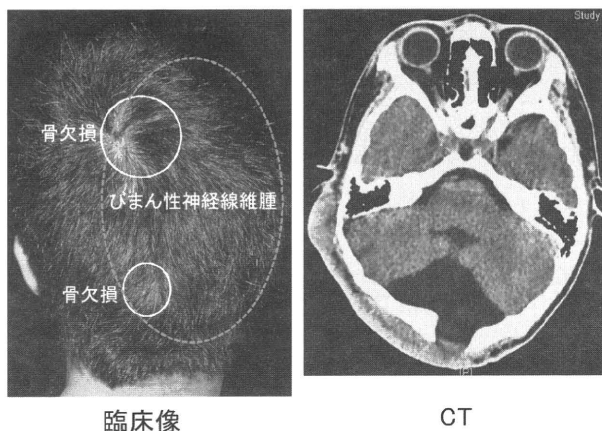


図2 症例2

C. 考察

NF1 においてはびまん性神経線維腫の合併頻度は10%程度とされており、その頻度はそれほど高くはない。しかしながら、びまん性神経線維腫を放置した場合に徐々に増大し、機能障害や時に致死的な腫瘍内出血をきたすため、できる限り早期から切除を行うことが望ましいとされている。近年、手術時の出血対策として塞栓術をはじめ様々な方法が用いられている。

しかし、びまん性神経線維腫はその約40%は頭頸部に生じるとの報告もあり、さらにその半数は骨形成異常の合併もみられる。特に蝶形骨の形成異常があれば、後に拍動性の眼球突出、髄膜瘤、脳瘤などをきたすことがあり、注意が必要である。

骨病変のみであれば、骨欠損の修復については通常脳神経外科にコンサルトを行う。治療の適応について慎重に判断する必要があるが、近年人工骨による再建法などが用いられ良好な結果も報告されている。

一方、びまん性神経線維腫を合併している場合には、塞栓術が施行できず、治療が難しい場合が多い。根治的には眼窩内容摘出術+骨形成+遊離皮弁+義眼が必要となるが、治療開始時期については現在特にガイドラインは定まっておらず、よく話し合った上で、個別に対応を行っているのが実情である(表1)。今後の分子標的薬による治療に期待がもたれているが、現時点では皮膚科、脳神経外科、形成外科、眼科などで治療の適応について検討し、協力して治療を行う必要がある。

D. 結論

骨形成異常を合併したびまん性神経線維腫に対して、治療の開始時期、具体的な治療方法、さらに治療後に懸念される機能障害の問題について様々な課

表1 頭頸部のびまん性神経線維腫における治療上の問題点

- ・いつ治療を開始するのか？
- ・塞栓術は可能か？
- ・術後の顔面神経の機能障害はどうか？
- ・眼球の摘出は？(pulsating exophthalmos)
- ・骨欠損の治療は？
- ・治療後のフォローアップは？

題が残されており、今後さらなる検討が必要である。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田雄一：神経線維腫症1型の診断と治療. マルホ皮膚科セミナー 203：34-36、2010
- 2) 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. 日レ病会誌 1(1)：25-28、2010
- 3) Yoshida, Y. and Yamamoto, O.: Ultrasonic dissection for diffuse plexiform neurofibroma. Dermatol. Surg. 36(11): 1773-1774, 2010
- 4) Yoshida, Y., Adachi, K. and Yamamoto, O.: Local mast cell histamine and plasma histamine levels in neurofibromatosis type 1. Acta. Derm. Venereol. 90(6): 637-639, 2010
- 5) 吉田雄一、中山樹一郎：神経線維腫症1型の病態と治療(Ⅲ)－治療ガイドラインと重症度認定基準－. 西日皮膚 72(6)：617-622、2010

2. 学会発表

- 1) 吉田雄一. 神経線維腫症1型 診断と治療. レックリングハウゼン病学会設立記念講演会 2月6日 2010年 東京
- 2) Yoshida Y, Adachi K, and Yamamoto O. Local mast cell histamine and plasma histamine levels in neurofibromatosis type 1. The 35th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology Dec 3, 2010. Wakayama

G. 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

神経線維腫症 1 型の瀰漫性神経線維腫に対する対応

研究分担者 倉持 朗 埼玉医科大学皮膚科教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型 (NF1) に生じる神経原性腫瘍は、臨床的に、皮膚神経線維腫 (cutaneous neurofibroma)、結節性蔓状神経線維腫 (nodular plexiform neurofibroma; nodular PNF)、瀰漫性神経線維腫 (diffuse neurofibroma; diffuse NF)、および (多くは) nodular PNF の悪性病変である悪性末梢神経鞘腫瘍 (malignant peripheral nerve sheath tumor; MPNST) の、主たる 4 つの phenotype に分けられる。これらは各々独特な biological behavior を有し、従ってその各々に対する対応には、それぞれに独自の工夫が要求される。このうち diffuse NF は、NF1 の児で、多くは生来性に存在する巨大な色素斑部に 5 歳前後に生じ、次第に隆起・増大する神経線維腫で、懸垂状に垂れ下がる pachydermatocle や、下肢の高度な肥大を来たす elephantiasis neuromatosa など、特徴的な臨床像を形成する原因となる。diffuse NF の臨床像や組織所見には多様性がみられるが、腫瘍内の異常な血管 (ときに sinusoidal vasodilatation を伴うような脆弱な奇形血管である) と弾力性を欠いた脆弱な結合織の存在が、この腫瘍の治療上のさまざまな困難を引き起こす。しかし本症には、整容上の問題 (社会的 Q.O.L. の障害)、機能上の問題 (運動制限・視野の制限など) のみならず、時に致死的ともなる腫瘍内の出血、また MPNST の発生 (多くは内部の nodular PNF からの発生であるが、de novo の発生もある) といった、生命予後にも関わる重大な問題点が含まれるため、種々の工夫をして、この腫瘍に対処する必要がある。この論文では 4 つの主題に限って論じた。【1】diffuse NFs の治療の原則; (1) 術前の画像診断が必須である。MRI, 血管造影、超音波ドプラ法のほかにも、種々に有用なモダリティーがあり、例えばエラストグラフィは diffuse NF 内の、触知しにくい小型の nodular PNF を描出しうる。(2) CUSA, ハーモニックも、有用性は限られるが使用する。(3) 術後すぐに圧迫固定を行い、1 週間はそのまま圧迫固定を続ける。(4) 1 度の手術で neurofibroma を取り残すことは構わず、むしろ数回にわたる reduction surgery であることを覚悟する。【2】腫瘍の存在部位によるが、術前の選択的動脈造影・塞栓術が、大きな diffuse NF の大量出血の阻止に、有効な症例がある。放射線科に依頼、ゼラチンスポンジ細片を用いた術前の塞栓術を行うことにより、腫瘍内に供給される血流が (動脈血流と静脈還流の血流とも) 大幅に減少するため、血流の乏しくなった腫瘍内で切り込み、切除できる。四肢・体幹の病変できわめて有効で、出血量は従来に比し激減した。【3】腫瘍内出血を反復する、巨大症例・手術拒絶例に対し、SORBO fiber なる衝撃吸収剤を縫い付けた衣服を作成し、出血を未然に防ぐ工夫をした。体に加わった外圧力を熱変換により横方向に分散する効果があり、出血対策に有効であった。【4】四肢で、腫瘍が筋層内を充満するような症例では、内在する奇形血管の破綻による大出血のため、切断術が救命の唯一の方法であるようなものがある。このような症例に対しては、さらに工夫を加えた combination therapy が必要であろう。

A. 研究目的、ならびに方法

NF1 に生ずる神経原性腫瘍は、皮膚神経線維腫 (cutaneous neurofibroma; cutaneous NF)、結節状蔓状神経線維腫 (nodular plexiform neurofibroma; nodular PNF)、そして多くは nodular PNF に由来する悪性病変 malignant counterpart である (de novo の発生もある) 悪性末梢神経鞘腫瘍 (malignant peripheral nerve sheath tumor; MPNST) と、本稿で扱われる瀰漫性神経線維腫 (diffuse neurofibroma) の、主たる4つの phenotype に大別できる (図1)。これら4つの phenotype は各々独特な biological behavior を有し、従ってその各々に対する対応には、それぞれに独自の工夫が求められる【文献1・2】。

筆者は、以前より NF1 患者の神経原性腫瘍に対する治療を続けてきた。長期間にわたり、MPNST への対応・治療の実践について報告を続け、また、平成20年度の本研究に於いては、nodular PNF に対する対応についての、一応の総括を行った。本稿に於いては、NF1 に生じた瀰漫性神経線維腫に限り、その臨床像をまとめ、これらに対する現実的な対応を、新たに考案した工夫を含めて4つの主題に分け、簡潔に述べることにする。代表的な臨床所見と実際の対応については、最小限であるが必要なものを、図譜の形式で示させて頂く。

これらの症例は筆者が24年間の間に、埼玉医科大学で、実際に治療を行ってきた方々である。NF1 に生じる神経原性腫瘍のうち、最も治療上、困難を来たすものが、MPNST と巨大な瀰漫性神経線維腫であることは間違いなく、本研究班に於いても、現実的な対応の探求が、続けられている。

倫理面への配慮：巨大な瀰漫性神経線維腫の治療

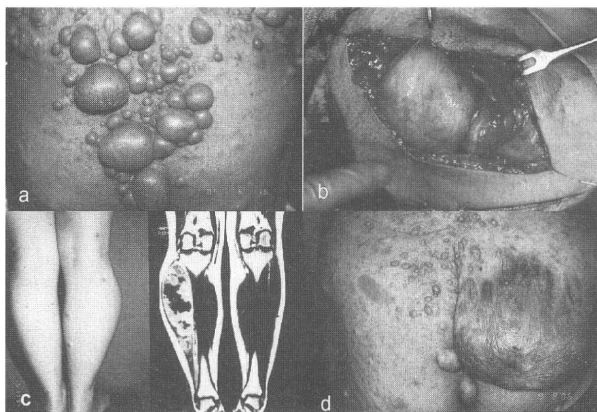


図1 NF1 に生じる神経原性腫瘍の主たる4つの phenotype の典型像
a 皮膚神経線維腫、b 結節状蔓状神経線維腫、
c 悪性末梢神経鞘腫瘍 (臨床像とMRI)、d 瀰漫性神経線維腫

は、ときに困難を極め、通常の方法で対処できない症例は多い。患者には治療に於ける新たな試みや、リスク、臨床写真により治療効果の記録をすることを十分に説明し、同意をえた。本研究会の報告にあたり、個人を特定できる情報は全て削除し、写真では、顔の一部は、本人と分らないようにするため、ブラックで覆った。

B. 研究結果と考察

瀰漫性神経線維腫の臨床像を最初にまとめ、それらに対して実際に行った対応と治療の実際を4つの主題に分けて述べ、それぞれについて、考察を加える。

瀰漫性神経線維腫 diffuse neurofibroma の臨床

diffuse neurofibroma (以下 diffuse NF と記す) は、diffuse plexiform neurofibroma、massive neurofibroma とも呼ばれ、大きな腫瘍、ドーム状の隆起のみならず、懸垂状に垂れ下がる pachydermatocele や、主に片側下肢に高度の肥大を来たす elephantiasis neuromatosa といった、NF1 でよくみられる特徴的な臨床像の原因ともなる。すなわち NF1 患者の pachydermatocele や elephantiasis neuromatosa の本態は、diffuse NF である。本症は、5~6歳ころから徐々に増大してくる、そして生じる部位によって、部位特異的な臨床像を呈してくる腫瘍である。多くは、生来性に存在する巨大 Recklinghausen 斑や大きな色素斑部から生じ、隆起、或いは懸垂してくる (図2、図3)。原則的に、巨大な色素斑から diffuse NF が生じることは重要な事実で、図4に示した NF1 の兄・妹の例では、巨大 Recklinghausen 斑を有する妹のみに、隆起が生じていることが分る。

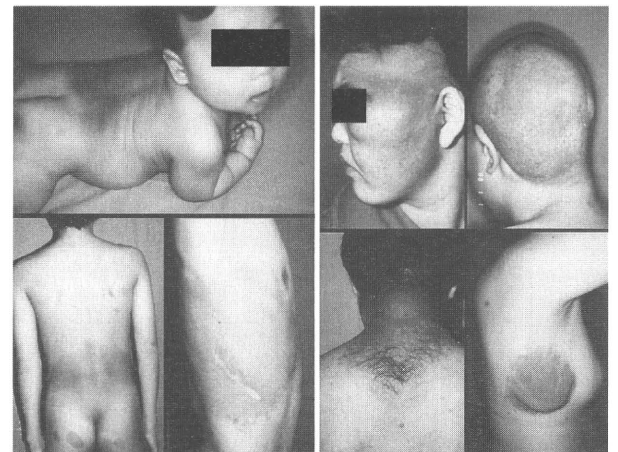


図2 瀰漫性神経線維腫の臨床像一様な臨床像を示す。巨大 Recklinghausen 斑のある部位が隆起する。

(図4; このような家系内での臨床像の大きな違い-intrafamilial phenotypic variation-も、NF1でしばしばみられる大切な事象である。)巨大色素斑とdiffuse NFがみられる部位では、脊椎変形や骨奇形、胸郭の変形がときにみられ、経時的にそれらの変形は高度となる(図3)。

臨床像と病理組織所見には多様性が存在する【文献3-6】。組織学的にdiffuse NFはdiffuse pigmented neurofibromaであり、Schwann cell、神経内fibroblast、perineurial cellが、種々の割合で増殖した腫瘍と、腫瘍内に多数存在する(腫瘍の形成・維持・増殖に直接関わる)mast cell【文献7】、また腫瘍内にしばしば集簇したかたちでみられる色素細胞(-その由来は未だ不明である-)から成る構築が、まず観察される。Meissner小体に類似した構造もしばしば認められる。しかし、本症の何といても大

きな病理学的特徴は、腫瘍内の異常な奇形血管の存在(-ときにはsinusoidal vasodilatationを伴うようなanomalous vesselであり、もちろん動脈様-・静脈様-、各々の奇形血管が存在する-)と、これらを取り巻く脆弱な結合織の存在、であり、臨床像はこのような組織学的特徴を反映する(図5)。これらはしばしば、この腫瘍への対応・治療の困難さを引き起こす。また更にしばしば、diffuse NF内には、出生時から4~5歳くらいまでの比較的早期に、末梢神経の神経周膜(perineurium)内に発生した、神経のneurofibromaであるnodular PNFが生じ(-diffuse NF内で、念珠状に触知する)、時間の経過と共に(長期にわたって)増加・増大する(図6、図7、図8)。nodular PNFの存在は、MPNSTの多くが、nodular PNFを発生母地とするために、重要である【文献8】。妊娠・出産を契機とする、diffuse

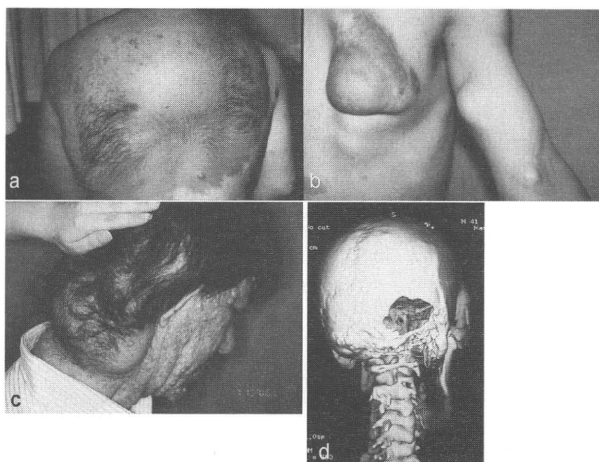


図3 瀰漫性神経線維腫の様々な臨床像。
a, bのように、脊椎変形、骨変形がみられることがある。c, dは骨欠損(3D-CT所見)である。

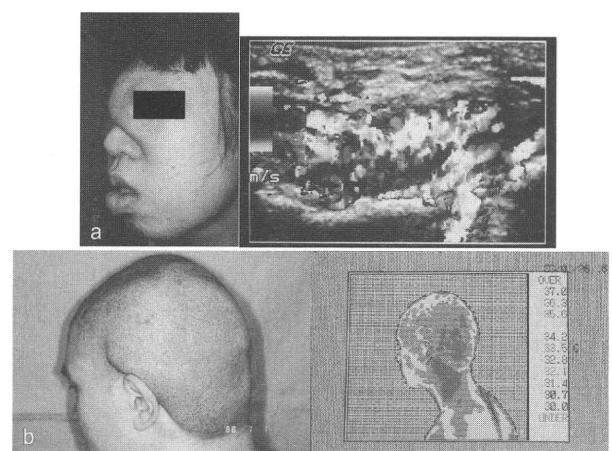


図5 瀰漫性神経線維腫は腫瘍内に奇形血管が多数存在する。aは超音波カラードブラ法、bはサーモグラフィ所見である。両者とも豊富な血流を反映した所見がみられる。

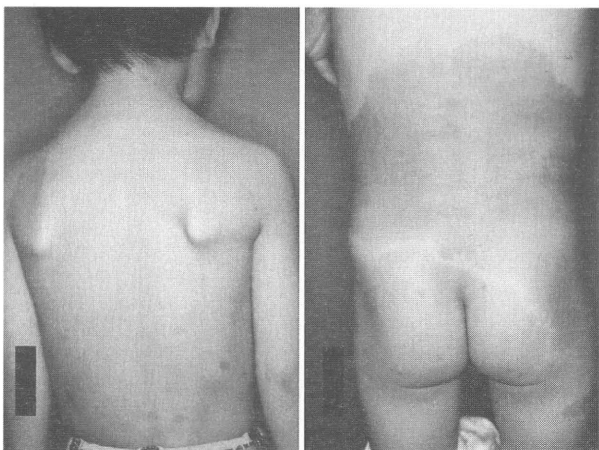


図4 NF1の兄(7歳)と妹(4歳)。
妹の巨大Recklinghausen斑の中央部に隆起がみられる。

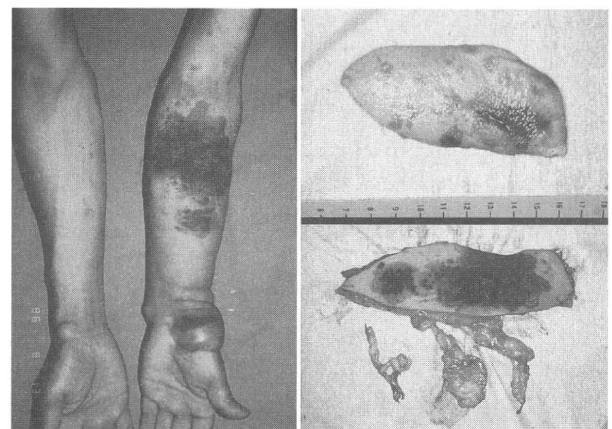


図6 瀰漫性神経線維腫の内部にはしばしば結節状蔓状神経線維腫が存在する。