

5. 上記HaCaT-NFi細胞  $10^6$  個を 1ml の Isogen<sup>®</sup> 溶液（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。
6. 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。
7. bFGF 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。
8. 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. 研究結果および考察

1. basic FGF は、周囲の健常真皮にはほとんど発現がなく、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質に強い発現が認められた。S-100 蛋白発現細胞と basic FGF 発現細胞は一致していた（図 1c, e）。神経鞘腫には basic FGF の発現を認めなかった（図 1）。
2. 神経線維腫から抽出した RNA をレンプレートとした real-time RT-PCR では、bFGF mRNA の発現増強が認められた（図 2）。
3. 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

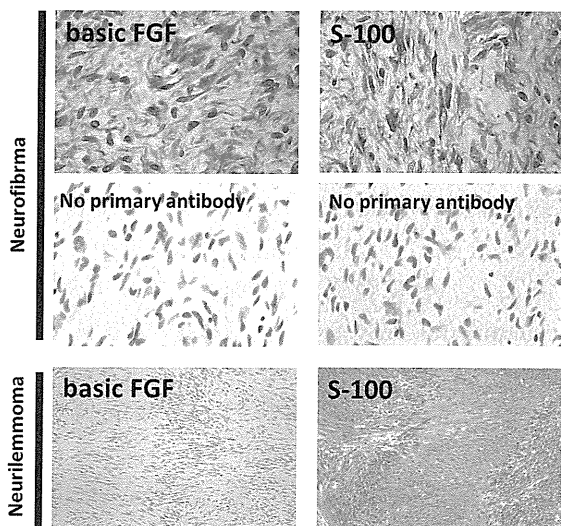


図 1 神経線維腫における bFGF の発現

の HaCaT 細胞に比べて bFGF mRNA レベルが約 2 倍に増加した。（図 3）。

4. 上記の結果から、NF1 患者における神経線維腫では bFGF の発現が亢進しており、bFGF は、VEGF の発現亢進とともに神経線維腫における血管増生に関わっていることが示唆された。
5. また、NF1 遺伝子のノックダウンにより bFGF の発現増強が引き起こされたことから、神経線維腫内の bFGF 過剰発現には、NF1 遺伝子のハプロ不全が関わっていると考えられた。

### 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. Linear childhood discoid lupus erythematosus following the lines of Blaschko: successfully treated with topical tacrolimus. *Pediatr Dermatol.* 2011; 28(2): 205-7.

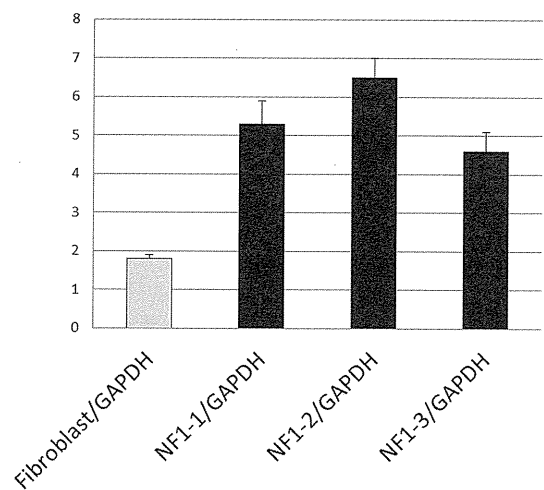


図 2 神経線維腫における bFGF mRNA 発現増強

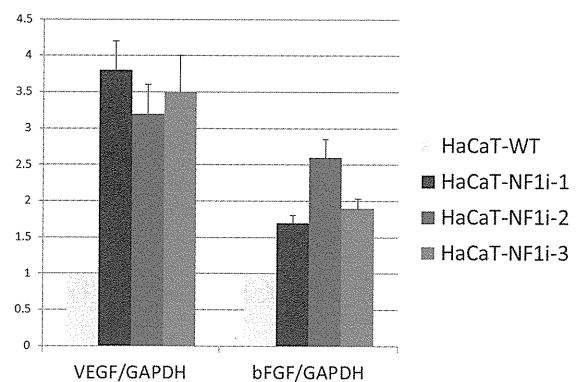


図 3 neurofibromin knockdown 細胞 (HaCaT-NFi) における bFGF mRNA 発現増強

- 2: **Kawachi Y**, Tanaka R, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superficial malignant peripheral nerve sheath tumor arising from a solitary cutaneous neurofibroma in a non-NF1 patient. *Eur J Dermatol.* 2011; 21(1): 125-6.
  - 3: Fujisawa Y, Ito M, Mori K, Okada S, Nakamura Y, **Kawachi Y**, Otsuka F. Intra-arterial mitoxantrone/paclitaxel in angiosarcoma of the lower limb associated with chronic lymphedema (Stewart-Treves syndrome) in a patient with cervical cancer. *Eur J Dermatol.* 2011; 21(1):119-20.
  - 4: Fujisawa Y, Sugita S, **Kawachi Y**, Otsuka F. Extra-abdominal desmoid tumor in the subcutis of the thigh. *J Dermatol.* 2011; 38(8): 810-2.
  - 5: Fujisawa Y, Nakamura Y, **Kawachi Y**, Otsuka F. A custom-made, low-cost intraoperative fluorescence navigation system with indocyanine green for sentinel lymph node biopsy in skin cancer. *Dermatology.* 2011; 222(3): 261-8.
  - 6: Fujisawa Y, Nabekura T, **Kawachi Y**, Otsuka F, Onodera M. Enforced ROR( $\gamma$ )t expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011; 29(1): 86-93.
  - 7: Hirota A, **Kawachi Y**, Yamamoto M, Koga T, Hamada K, Otsuka F. Acceleration of UVB-induced photoageing in nrf2 gene-deficient mice. *Exp Dermatol.* 2011; 20(8): 664-8.
  - 8: Nakamura Y, Fujisawa Y, Maruyama H, Furuta J, **Kawachi Y**, Otsuka F. Intraoperative mapping with isosulfan blue of lymphatic leakage during inguinal lymph node dissection (ILND) for skin cancer for the prevention of postoperative lymphocele. *J Surg Oncol.* 2011; 104(6): 657-60.
  - 9: Taguchi S, **Kawachi Y**, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Xu X, Ikebe D, Kato M, Otsuka F. Overexpression of the transcription factor Yin-Yang-1 suppresses differentiation of HaCaT cells in three-dimensional cell culture. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(1): 37-45.
2. 学会発表  
特になし
- E. 知的財産権の出願・登録**  
特になし。

# 悪性末梢神経鞘腫瘍におけるがん精巢抗原遺伝子の脱メチル化

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の脱メチル化、および、CpG アイランド低メチル化形質の存在を明らかにすることを目的とし、悪性末梢神経鞘腫瘍7検体において、がん精巢抗原遺伝子9個（*MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEA6*、*MAGEB2*、*MAGEC1*、*MAGEC2*、*CTAG1B*、*SSX4*）の5'上流に存在するCpGアイランドのメチル化状態を解析した。その結果、脱メチル化が全くみられない症例がある一方で、すべての遺伝子で脱メチル化がみられる症例もあった。悪性末梢神経鞘腫瘍において、がん精巢抗原遺伝子が脱メチル化すること、および、CpG アイランド低メチル化形質が存在することが示唆された。

延山嘉真、太田有史、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

遺伝子上流にあるCpGアイランドのメチル化は遺伝子の転写を抑制する<sup>1</sup>。がん精巢抗原は、悪性腫瘍と精巣などの組織に限定して発現することから、悪性腫瘍に対する分子標的療法の候補分子とされる。がん精巢抗原遺伝子のCpGアイランドは正常では概ねメチル化しているが、一部の悪性腫瘍では脱メチル化していることが知られている。現在まで我々は、がん精巢抗原遺伝子が悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株において異常脱メチル化、および、異常発現がみられることを示してきた。本研究では、実際の悪性末梢神経鞘腫瘍臨床検体において、がん精巢抗原遺伝子の異常脱メチル化がみられること、および、CpG アイランド低メチル化形質が存在するか否かを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

神経線維腫症1型患者に発生した悪性末梢神経鞘腫瘍7検体と正常コントロールとしての正常リンパ節において、がん精巢抗原遺伝子9個（*MAGEA1*、*MAGEA2*、*MAGEA3*、*MAGEA6*、

*MAGEB2*、*MAGEC1*、*MAGEC2*、*CTAG1B*、*SSX4*）の5'上流に存在するCpGアイランドのメチル化状態をmethylation-specific PCRにより解析した。さらに、その結果をbisulfite sequencingで確認した。

## C. 研究結果

臨床検体でそれぞれ0個、0個、1個、2個、4個、8個、9個の遺伝子に脱メチル化がみられた（図1）。Methylation-specific PCRの結果はbisulfite sequencingにより確認された（図2）。

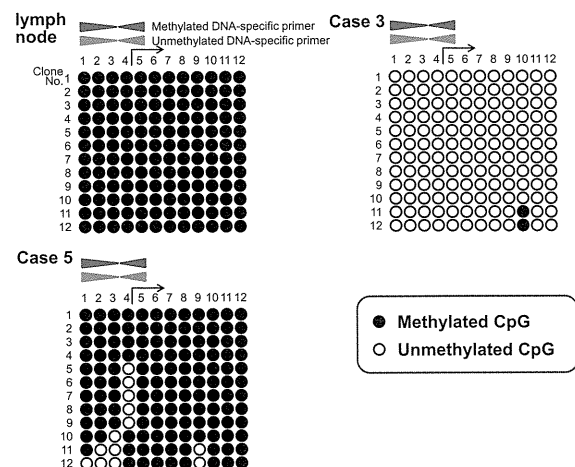


図1 解析遺伝子のメチル化状態

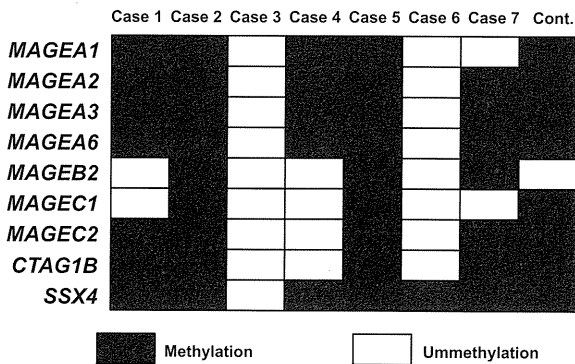


図2 例：MAGEA1における bisulfite sequencing の結果

#### D. 考察

本研究により、悪性末梢神経鞘腫瘍の臨床検体で、がん精巢抗原遺伝子MAGEA1、MAGEA2、MAGEA3、MAGEA6、MAGEB2、MAGEC1、MAGEC2、CTAG1B、SSX4の脱メチル化がみられることが明らかになった。他の腫瘍においてMAGEA群遺伝子産物が発がん重要な役割を担うことが明らかになりつつある。一方、MAGEA群遺伝子産物やCTAG1B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<sup>2</sup>。今後、悪性末梢神経鞘腫瘍においても発がんにおける役割や抗原性などを解析する必要がある。

脱メチル化が全くみられない症例がある一方、すべての遺伝子で脱メチル化がみられる症例もあるこ

とから、CpG アイランド低メチル化形質の存在が示唆された。大腸がんではCpG アイランドメチル化形質が存在し、これがみられる症例は予後が有意に良いことが知られている。今後、悪性末梢神経鞘腫瘍におけるCpG アイランド低メチル化形質が臨床病態に及ぼす影響について探究する必要がある。

#### E. 結論

悪性末梢神経鞘腫瘍でがん精巢抗原遺伝子の脱メチル化、および、CpG アイランド低メチル化形質が存在することが示唆された。

#### 参考文献

1. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007;128:635-8.
2. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009;100:2014-21

#### F. 研究発表

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

## メラノサイトの細胞内シグナル解析による カフェオレ斑発症機序の解明

研究分担者 古村南夫 久留米大学医学部皮膚科准教授

### 研究要旨

NF1のカフェオレ斑発症には表皮メラノサイトの過剰増殖や分化の異常が関わりと考えられる。真皮線維芽細胞由来 stem cell factor (SCF) の過剰分泌や表皮メラノサイトの増加が確認され、NF1のメラノサイトの細胞増殖異常には Ras 活性の上昇も原因とされるが発症機序はより複雑である。メラノサイトの G タンパク質共役受容体であるメラノコルチン 1 受容体 (MC1R) 下流の cAMP-PKA シグナル活性は、neurofibromin が adenylyl cyclase 活性を維持する機能を持つため、NF1 ノックダウン細胞では低下し cAMP シグナル抑制により、PARs が発現誘導・活性化され、TFE3/TFEB (Mit 転写因子ファミリー) の発現が亢進する。さらに Wnt 関連遺伝子などの細胞増殖シグナルが活性化されることが示唆されたが、神経系細胞や腫瘍細胞、マウス毛包メラノサイトのシグナル伝達経路と接点を持つこのような複雑な経路の意義をヒトメラノサイトで証明するには、マイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析を元に、次世代シーケンシングを用いた CAGE 法や ChIP アレイによる転写因子 DNA 相互作用の解析が必要と思われる。今回はその基礎的な情報収集のために培養ヒトメラノサイトで cAMP や PARs シグナルなどを修飾し包括的遺伝子発現パターンをマイクロアレイ解析し階層クラスタリングを試みた。Adenylate cyclase 阻害薬添加時と PAR-2 シグナル活性化時の発現パターンの類似性が見出された。両経路上の遺伝子が NF1 ノックダウンメラノサイトのシグナル修飾に関与し、Wnt 関連遺伝子も含まれるため、メラノサイトのカフェオレ斑での過剰増殖への関与が考えられた。

### A. 研究目的

NF1 遺伝子突然変異により、神経線維腫症 1 型 (NF1) では neurofibromin の減少・機能低下が起こりカフェオレ斑を含む皮膚症状を中心に母斑症としての病態が形成される。Neurofibromin は Ras-GAP 活性による細胞内 Ras シグナル活性の抑制作用に加え cAMP シグナル維持制御機能をもつことが神経系細胞で明らかにされた。したがって、NF1 ではメラノサイトにおける重要なシグナルである cAMP 経路も影響を受け、カフェオレ斑発症へ何らかの関与を持つことが推測される。

NF1 のカフェオレ斑では表皮メラノサイトの増加がみられ、皮疹部の真皮線維芽細胞の蛋白分解酵

素活性亢進によって sSCF が分泌増加したり、HGF の発現と分泌増加が関与したりすることも一因とされている。

メラノサイトでも NF1 遺伝子産物の変異・欠失に由来する細胞機能の異常が存在し、NF1 患者皮膚由来メラノサイトの培養で正常細胞とは異なる様々な動態が認められる。しかし、健常メラノサイトと比較すると、Ras-GTP レベルおよび、Ras シグナル関連の基本的な細胞増殖率は NF1 メラノサイトにおいても変わらず、メラノサイトの RAS 活性上昇で細胞増殖が単純に引き起されるものではないと推測されている。

NF1 の遺伝子発現レベル自体は培養条件によって

大きく影響され、患者由来メラノサイトでは NF1 発現がさらに大きく変化する可能性があり、細胞内シグナルの修飾や異常の詳細は全く明らかにされていない<sup>1)</sup>。

これまでに、我々はレンチウイルス miR RNAi による NF1 ノックダウンシステムを用いて、安定的な NF1 ノックダウンメラノサイトを確立した。この細胞モデルから、Ras 以外に特にメラノサイトで重要な cAMP シグナルに関連しユビキタスな転写因子を介する細胞内シグナルが修飾されメラノサイト増殖制御機構につながる経路が存在する可能性が見出された。

これまでに明らかにされた、カフェオレ斑形成に至るシグナルの断片の情報から得られた関与遺伝子が、細胞モデル内で一連の変化として機能しているかどうかを、まず、包括的な遺伝子発現解析により検証した。

## B. 研究方法

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 シグナルおよび、PARs シグナルの修飾には、 $\alpha$  MSH、forskolin および、adenylate cyclase 阻害薬の SQ22536、PAR2 activating peptides (PAR2-AP)を用いた。

刺激薬と阻害薬により cAMP/PKA シグナルを修飾したり、PAR2-AP により PARs を活性化したりしたメラノサイトから RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)によりトータル RNA を抽出した。

アジレント 2100 バイオアナライザーにて RNA の純度検定を行い、250ng の total RNA からビオチン標識cRNA 合成を行った。10 $\mu$ g の cRNA を用いて Human Genome U133 Plus 2.0 Array をプローブアレイとしてハイブリダイゼーションし、Affimetrix 社 GeneChip Expression Array 解析を行った。階層クラスタリングなどのアレイデータマイニング解析は GeneSpringGX11 を用いて行った。

## C. 研究結果

10nM  $\alpha$  MSH、20 $\mu$ M forskolin、300 $\mu$ M SQ22536、10 $\mu$ M PAR2 activating peptides (PAR2-AP) を培養ヒトメラノサイトに添加後 24 時間で totalRNA を抽出し、GeneChip Expression Array 解析を行った。

通常、培養メラノサイトの cAMP 経路を修飾する実験では添加後 48 時間から 96 時間で解析する

ため、下流の MITF 関連遺伝子の変化によるメラノジェネシスの変動が時間経過で徐々にみられるが、今回は early response gene を中心に解析する目的で、24 時間という、比較的短時間での遺伝子発現解析を試みた。

実験系が正常に機能していることを確認するコントロール遺伝子として、Dopachrome Tautomerase (DCT) 遺伝子発現の増加が、 $\alpha$  MSH 及び forskoline で確認された。

さらに、これまでに我々の研究結果で確認された、TFEB の遺伝子発現比については、cAMP 刺激時に比較して、SQ22536、PAR2-AP 添加後 24 時間で約 2 倍の差で発現量が亢進していることから、実験系が正常に反応していることが示唆された。

マイクロアレイ解析のデータマイニングを行った。

cAMP の活性化により発現が亢進し、cAMP 阻害および PAR2 の刺激による活性化にて発現が低下する遺伝子を表 1 に示す。

簡単なパスウェイ解析を行ったところ、関係するシグナル経路では cAMP 関連遺伝子が 7 遺伝子 (29%) でその半数が Wnt シグナルにも関連する遺

表 1 cAMP 活性化で発現低下、cAMP 阻害あるいは PAR2 刺激で亢進する遺伝子

Gene Symbol	Signaling Pathways		
	Wnt	cAMP	PAR2
AKAP12			
ALDH1a3	✓		
BCAT1			
CA12			
CALD1			
CLIP1			
CTNNBIP1	✓		
DNTT			
FZD3	✓		
LOC222070			
MBP		✓	
MEF2c	✓	✓	
NFATC1	✓		
PDK1		✓	
PRKabc	✓		
SH2D3c			
TAAR1		✓	✓
TCF4	✓		
TFEB			✓
TRBV27			
WNT6	✓		
ZNF382			

伝子であった。PAR2 関連遺伝子については、これまでに報告されたシグナルの関連遺伝子のデータが少なく 1 遺伝子にとどまった。

次に、cAMP シグナルの活性化で遺伝子発現が低下し、cAMP シグナル阻害および PAR2 活性化にて遺伝子発現が増加するものを表 2 に示す。22 遺伝子中 Wnt シグナル関連遺伝子が 8 遺伝子 (36%) で cAMP 関連遺伝子は 4 遺伝子 (18%)、PAR2 関連は 2 遺伝子 (9%) であった。

それぞれの処理群の遺伝子発現パターンの類似性を観るためにクラスター解析を行った。全検体で P または M フラグを示したプローブを用いてクラス

タリングを行った。

cAMP 阻害および PAR2 刺激下の遺伝子発現がクラスターを形成し、cAMP 刺激群の 2 つのデータもクラスターを形成した。cAMP の抑制による遺伝子変動が、PAR2 刺激群の遺伝子変動に類似していると考えられた (図 1)。

表 2 cAMP 活性化で発現亢進、cAMP 阻害あるいは PAR2 刺激で低下する遺伝子

Gene Symbol	Signaling Pathways		
	Wnt	cAMP	PAR2
AKAP14			
APC2	✓	✓	
CLU			
CNK			
COL3A1	✓	✓	
CSMD2			
DUOX1		✓	✓
FAM71D			
FAM98B	✓		
FMR1NB			
GIPC2			
GIPC3			
GLB1L3			
GPR158			
HS6ST2			
IL6ST	✓	✓	
IPCEF1			
ITPKB			
KITLG	✓	✓	
LAX1			
NEK1		✓	
PDZRN4			
RALGAPA2			
SEPT1			
SIT1		✓	
SLC38A4			
SR3			
TAF1		✓	
TOR1A IP2			
TRBV27		✓	
TSC22D2	✓	✓	
ZBTB7A			
ZFAND5			
ZNF664			

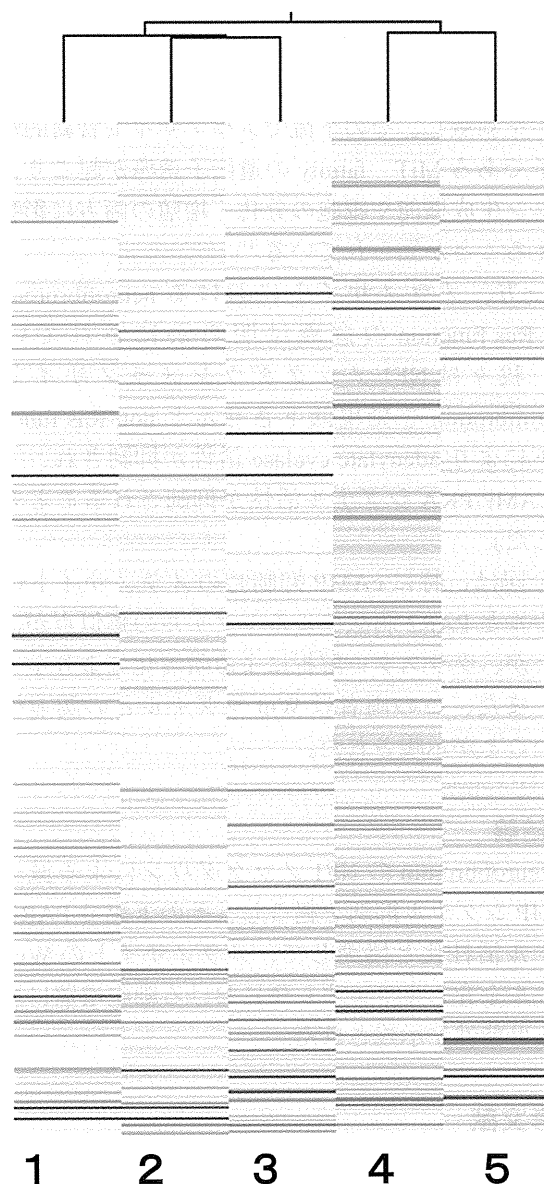


図 1 培養ヒトメラノサイトと cDNA Microarray (Affymetrix U133plus2) を用いた遺伝子発現プロファイリングデータの階層クラスタリング解析 (ヒートマップ) それぞれの条件での包括的遺伝子発現パターンを階層クラスタリングによりサブグループ化した。2 と 3、4 と 5 の間にそれぞれ高い相関性が認められる。

1. Control
2. alpha MSH 10nM
3. Forskolin 20µM
4. SQ22536 300µM
5. PAR2-AP 10µM

## D. 考察

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<sup>1)</sup>され、この一見無関係な2つの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が *Ira* (NF1 yeast homologue) の機能解析結果から提唱されている<sup>2)</sup>。

メラノサイトでは、MSH レセプターへの  $\alpha$  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<sup>3)</sup>。

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い。我々は NF1 ノックダウンメラノサイトで neurofibromin を発現低下させると non-Ras function 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、特に cAMP 抑制時のメラノサイトのシグナルと PAR2 刺激によるシグナルの類似点が高いことが、クラスター解析による階層化により示された。また、この両者は Wnt シグナルとの関連性が高いことが示唆された。

## E. 結論

Neurofibromin の NF1 ノックダウンによる減少が cAMP シグナル抑制を起こし、その下流で PAR2 シグナル活性化と協調して、メラノサイトの Wnt シグナルを介しカフェオレ斑における細胞増殖に影響する可能性が示唆された。

## 参考文献

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

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

- 2) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernardis A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- 3) Eirikur Steingrimsdottir, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 2004. 38:365-411, 2004

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) Minao Furumura, Hitoshi Takahashi, Eishin Morita. Intracellular signal transduction in neurofibromin knockdown melanocytes as a possible mechanism causing café-au-lait macules (CALMs) in neurofibromatosis type1 (NF1), The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec 11, Kyoto, Japan

### 2. 論文発表

- 1) Demonstration of epitope spreading in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. Hashimoto T, Tsuruta D, Dainichi T, Hamada T, Furumura M, Ishii N. *J Invest Dermatol.* 2011 131:2175-7
- 2) Murata S, Kaneko S, Kusatake K, Furumura M, Sakieda K, Harada Y, Maruyama R, Morita E. Angiosarcoma of the forearm arising in an arteriovenous fistula in a renal transplant recipient. *Eur J Dermatol.* 2011 21:792-3. Imaoka K, Furumura M, Maruyama R, Ren Nagasak R, Morita E. Erythrodermic Lymphomatoid Granulomatosis: A Case Report. *Case Rep Dermatol.* 2011 3: 244-250.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 神経線維腫症 1 型における melanoma inhibitory activity (MIA) の 検討（第 2 報）

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

Melanoma inhibitory activity (MIA) は悪性黒色腫の腫瘍細胞で発現がみられ、進行期悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして一般的に用いられている。われわれは 2009 年度の班会議にて NF1 では健常人と比較して血清 MIA 値に有意な上昇がみられることを示したが、NF1 の異常によりメラノサイトに潜在的異常が生じ、MIA の発現が亢進しているのではないかと考え、さらに検討をすすめた。しかしながら、正常ヒトメラノサイト培養細胞に対して、レンチウイルス miR RNAi を用いて NF1 ノックダウンを行い、ウエスタンブロットおよび ELISA 法にて MIA の定量を行ったが、MIA の発現はみられなかった。一方、免疫組織化学染色では、興味深いことに神経線維腫内の肥満細胞に MIA の発現がみられた。

以上の結果から、NF1 において血清 MIA 値が上昇する要因として、肥満細胞の関与が示唆された。

古村南夫  
山元 修

久留米大学医学部皮膚科  
鳥取大学医学部感覚運動医学  
講座皮膚病態学分野

年度の班会議にて NF1 では健常人と比較して血清 MIA 値に有意な上昇がみられることを示した。その原因として NF1 の異常によりメラノサイトに潜在的異常が生じ、MIA の発現が亢進しているのではないかと考え、さらに検討を行うこととした。

### A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF1) にはカフェ・オ・レ斑、雀卵斑様色素斑、大型の褐色斑、有毛性褐青色斑などの特徴的な色素斑がみられる。その原因として真皮の線維芽細胞からの SCF、HGF 分泌によるメラノサイトの過剰増殖や NF1 遺伝子の変異に伴う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。

Melanoma inhibitory activity (MIA) は悪性黒色腫の腫瘍細胞で発現がみられ、進行期悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして一般的に用いられている。興味深いことに NF1 において MIA が高値を示したという報告があるが、その意義についてはいまだ不明である。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る。われわれは 2009

### B. 研究方法

まず NF1 患者背景について調査した上で ELISA 法 (MIA ELISA kit, Roche) により血清 MIA 値の測定を行った。メラニン代謝産物である 5-S-CD は HPLC 法で測定を依頼した (SRL, Japan)。

培養細胞はヒトメラノサイト培養細胞 (クラブウ) を使用した。Block-it RNAi Designer Program (Invitrogen) により NF1 に特異的なノックダウン配列を作成し、Block-it Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit (Invitrogen) を用いてレンチウイルスによる NF1 ノックダウンを行った。その後、抗 MIA 抗体 (Lifespan Biosciences) を用いたウエスタンブロット法にて蛋白レベルでの確認を行った。

免疫組織化学染色は抗 MIA 抗体 (R&D systems) と Red Map kit (Ventana Medical Systems) を用いて

自動免疫染色装置にて施行した。  
(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。

表1 Characteristics of patients with NF1

case	sex	age (years)	MIA (ng/ml)	5-S-CD (nmol/l)	type	NFs
1	F	4	22.82	8.4	NPN	1-10
2	M	9	13.08	8.5		0
3	M	10	33.48	13.7		0
4	F	10	18.37	16.9		0
5	M	14	17.51	8.9		0
6	M	15	21.32	18.4	DPN	0
7	F	15	17.92	11.4	NPN	0
8	M	20	10.67	6	NPN,DPN	1-10
9	M	21	18.87	8.9	NPN	11-100
10	M	27	8.22	7.7		11-100
11	M	32	12.88	7.2		11-100
12	M	35	17.2	5		11-100
13	M	35	6.43	4.8	NPN	1-10
14	M	36	8.95	8.9		101-1000
15	F	38	3.96	2.2		1-10
16	M	41	13.7	9	DPN	11-100
17	F	47	13.22	6.4	DPN	11-100
18	F	51	6.49	7.8		>1001
19	F	58	11.31	4	DPN	101-1000
20	F	59	14.65	7.4		11-100
21	F	63	7.56	6.5		11-100
22	F	66	5.68	13		101-1000
23	M	67	9.63	9.2		>1001
24	F	68	8.83	6.8		11-100
25	F	73	5.37	7.6		101-1000
		36.6	13.12	8.6		

### C. 研究結果

NF1患者25例（通常タイプ：16例、神経の神経線維腫合併例：5例、びまん性神経線維腫合併例：5例）で検討を行った（表1）。血清MIA値はNF1では $13.1 \pm 6.8$  ng/mlであり、健常人（ $9.3 \pm 7.4$  ng/ml）と比較して有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。MIAはNF1、健常人とも小児では高値を示す傾向があった。さらに、血清5-S-CD値もNF1では健常人と比較して有意に上昇していた（ $8.6 \pm 3.7$  vs  $5.5 \pm 3.8$  nmol/l,  $p < 0.05$ ）（図1）。しかしながら、神経線維腫の数、タイプとの相関関係はなかった。一方、MIAと5-S-CDには相関関係がみられた（図2）。

そこで正常ヒトメラノサイト培養細胞に対して、レンチウイルス miR RNAi を用いて *NF1* ノックダウンを行い、ウエスタンブロットおよびELISA法にてMIAの定量を行ったが、MIAの発現はみられなかった（提示せず）。

免疫組織化学染色では、興味深いことに神経線維腫内の肥満細胞にMIAの発現がみられた（図3）。念のため、肥満細胞症の組織においても同様の染色を行ったが、MIAの発現がみられた（提示せず）。

### D. 考察

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

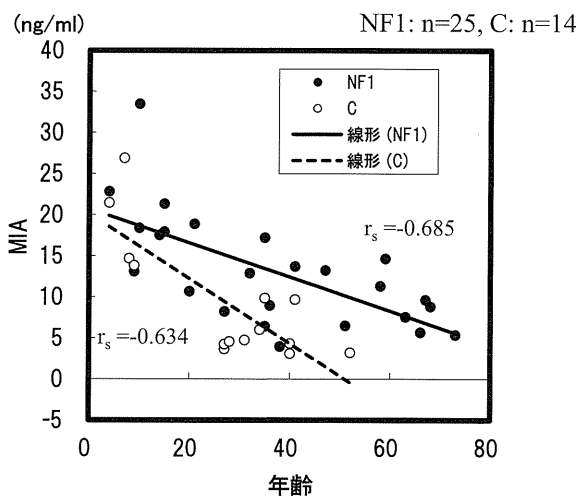


図. MIA 対年齢

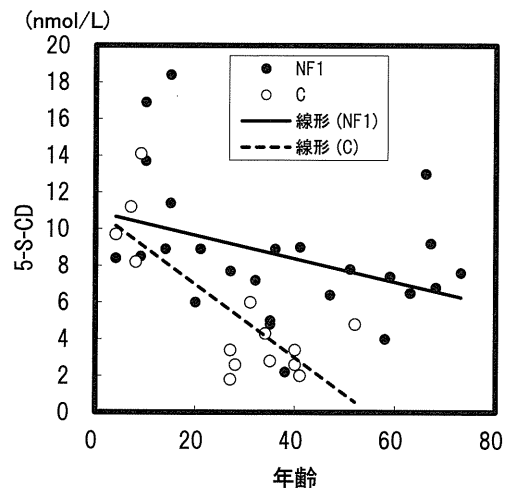


図. 5-S-CD対年齢

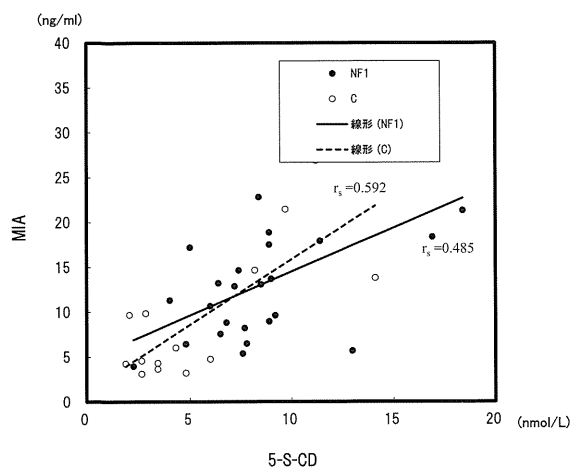
Mann-Whitney's *U* test,  $P < 0.05$

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

図1 MIA、5-S-CDと年齢との相関関係

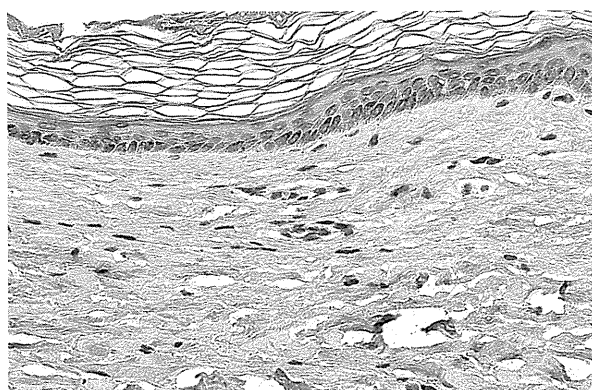
している。一方、カフェ・オ・レ斑では SCF、HGF 分泌によるメラノサイトの過剰増殖や NF1 遺伝子の変異に伴うメラニン産生亢進などが推測されている。

今回のわれわれの検討では NF1 において MIA が高値を示す要因としてメラノサイトではなく、肥満細胞の関与が示唆された。MIA は悪性黒色腫の腫瘍細胞の細胞増殖に関わっているが、色素産生における役割についてはいまだ不明な点が多い。肥満細胞症では通常病変部が褐色調であり、もしかすると肥満細胞から産生される MIA がメラノサイトの色素産生に何らかの役割を果たしているのかもしれない。今後、肥満細胞を用いた *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。



Spearman's rank correlation test,  $P < 0.05$

図2 MIA と 5-S-CD との相関関係



カフェ・オ・レ斑



神経線維腫

図3 免疫組織化学染色 (MIA)

## E. 結論

本研究により、NF1 において血清 MIA が上昇する要因として、肥満細胞の関与が示唆された。しかしながら、神経線維腫内の肥満細胞や培養細胞を用いたさらなる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：[わかりやすい！ How to 皮膚病理] 母斑・母斑症. *Derma*. 177: 184-190, 2011
- 2) 飛田礼子、渡邊徹心、吉田雄一、山元 修、森田栄伸：生下時より隆起した脂腺母斑（図説）. *西日皮膚* 73(2): 123-124, 2011
- 3) 和久本圭子、吉田雄一、山元 修：Blaschko 線に沿って生じた脱色素斑. *Visual Dermatology* 10(7): 692-693, 2011
- 4) Yoshida, Y., Shindo, M. and Yamamoto, O.: Occipital bone dysplasia associated with diffuse plexiform neurofibroma. *Eur. J. Dermatol.* 21(3): 452-453, 2011
- 5) 檜垣裕美、吉田雄一、板倉文子、大野耕策、山元 修：Proliferative nodule を伴った神経皮膚黒色症の 1 例. *皮膚臨床* 53(9): 1315-1318, 2011
- 6) 中島圭子、吉田雄一、山元 修：Blaschko 線に沿って生じた脱色素斑に合併した脂腺母斑と考えられた 1 例. *西日皮膚* 73(5): 486-488, 2011

- 7) 吉田雄一：特集3「神経線維腫症1型（レックリングハウゼン病）の診断基準および診療ガイドラインについて」JDA LETTER 09:4, 2011
- 8) 吉田雄一：[他科医師とともに診察すべき皮膚疾患] Recklinghausen 病. *Derma.* 185: 57-61, 2011
- 9) 吉田雄一、山元 修：神経線維腫症1型に生じた蝶形骨形成異常を伴ったびまん性神経線維腫の1例. *日小皮会誌* 30(3): 211-213, 2011

## 2. 学会発表

- 1) 堤 玲子、渡邊徹心、吉田雄一、山元 修. 肥満細胞症を合併した表皮母斑症候群の1例. 第122回山陰・第18回島根合同開催地方会

7月18日 2011年 米子

- 2) 吉田雄一、山元 修. 全身に無数の神経線維腫を生じ、小脳出血をきたした神経線維腫症1型の1例. 第3回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11月13日 2011年 東京
- 3) **Yoshida, Y.**, Furumura, M. and Yamamoto, O. Melanocyte inhibitory activity in neurofibromatosis type 1. The 36<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology Dec 9, 2011. Kyoto

## 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

## 神経線維腫症 1 型における注意欠陥 / 多動性障害、 学習障害に関する研究

研究協力者 岩崎信明 茨城県立医療大学医科学センター教授

### 研究要旨

神経線維腫症 1 型において、近年、認知機能障害や発達障害について注目されてきているが、本邦ではこれまで十分な検討がなされていない。このため、本研究ではこれまでの報告から、特に中枢神経系病変として Unidentified bright objects (UBOs) に注目し、臨床診断と画像診断を、さらに、病理学的診断を含めて検討している。

### A. 研究目的

神経線維腫症 1 型（以下NF1）の認知機能障害については近年、欧米において注目されており、注意、知覚、遂行機能、学習能力などの問題点に関する報告が散見される。本邦では平成 16 年に発達障害者支援法が制定され、注意欠陥・多動性障害、学習障害など NF1 の認知機能障害に関連する疾患への援助や早期発見の重要性について明記され、学業への影響やうつ病・行為障害などの二次障害を防ぐための支援体制の必要性が指摘されている。このことから、本邦においても NF1 と認知障害と関連する発達障害について検討する必要があると考えられる。

### B. 研究方法

これまでの本邦並びに海外における文献のを中心に NF1 と認知機能に関する報告をまとめ問題点を抽出する。特に、中枢神経系病変との関係については発症機序を解明する上で重要であることから注目すべき点である。

### C. 研究結果

本邦においては NF1 と認知機能、発達障害との関係についてまとまった報告はほとんどなされていなかった。このため、欧米の文献を中心に検討した。

NF1 の小児では 6 割に不注意の症状が認められ、約 1/3 で注意欠陥/多動性障害 (Attention deficit / hyperactivity disorder: ADHD) と診断されたとする報告がある (North K, 2007)。知能指数は正常範囲であることが多いが一部に低下がみられ、動作性知能が言語性知能に比較して低い (Hyman SL, 2005)。

遂行機能の低下や、特異的発達障害に分類される読字障害、算数障害も報告がみられている (Hachon C, 2011)。

NF1 の中枢神経系の病変について頭部MRI T2 強調画像において高信号域を呈す病変である Unidentified bright objects: 以下UBOs の存在が報告されている。小児の 60-70% で基底核、脳幹、視床、視索、小脳に認められ、認知機能との関係について関連がないとする報告がある一方、UBOs の数や局在部位について、全般性知能低下、言語能力、注意、視空間認知、遂行機能への影響が指摘され、特に視床病変との関連性が指摘されている (Hyman SL, 2007)。

### D. 考察

このように、本邦では、NF1 と認知機能や発達障害の関連性についてはあまり注目されていないが、欧米では極めて高頻度の合併が報告されている。

この違いが遺伝を背景にした民族的な差異であることは否定できないが、本邦においても十分な検索

が必要な課題であると考えられる。

また、NF1 の認知機能へ UBOs が影響を与えている可能性があるが、神経生物学的な解明はまだまだ十分ではない。

以上を踏まえ、本邦における NF1 の認知障害への影響を検討するために、小児の NF1 症例について、皮膚・骨に加え、知能検査や DN-CAS などを用いた遂行機能、発達障害の合併を含めた検索を施行し、また、UBOs の脳実質に対する影響を検索するために、病理学的検索を現在進めている。

## E. 結論

本邦においても小児の NF1 では ADHD などを含めた認知機能障害に対する配慮も必要であると思われる。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

岩崎信明：神経線維腫症 1 型と注意欠陥/多動性障害や学習障害との関連について. 第 3 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会(東京)、2011 年

## 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シグナルが活性化していることを見出し、EMT 阻害剤が本疾患に有効である可能性を考え化合物のスクリーニングを行った。その結果、およそ 2000 種類の既存薬剤の中に、血中濃度より低い濃度で EMT を阻害する候補薬を見出すことができた。

### 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 *NF1* の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。私達は昨年までの研究により、*NF1* 遺伝子の機能不全は上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition: EMT）様変化を細胞にもたらし、細胞外マトリクスの産生や細胞の運動性亢進など強い間葉系反応を誘導し、それが多発性神経線維腫形成の病態に関与することを見出した（Arima et al., *Int. J. Cancer* 2010）。本年度はこの理論に基づき、EMT 阻害剤の探索と、その候補化合物による間葉系反応の抑制を目的として研究を行った。

### B. 研究方法

*In vitro* で EMT を誘導できる方法を用いてアッセイ系を構築し、EMT 阻害剤のスクリーニングを行った。EMT 阻害効果および間葉系性質を阻害できる化合物を選択し、その生物学的効果について調べた。

### C. 研究結果

#### 1. *In vitro* EMT 誘導アッセイ系を用いた EMT 阻害剤のスクリーニング

私たちはヒト網膜色素上皮細胞に  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  を同時に作用させることによって、*in vitro* で EMT を誘導することに成功した（Takahashi et al., *J. Biol. Chem* 2010）。この時、細胞は培養プレート上で特徴的な細胞集塊を形成し（fibrotic focus: FF と呼ぶ）、この FF を染色によって定量化することにより、EMT の程度を測定することができることが分かった（図 1）。

このアッセイ方法を用いて約 2000 種類の既存薬ライブラリーをスクリーニングし、EMT を阻害できる薬剤の探索を行った。

#### 2. RLG-054 による EMT 阻害

既存薬剤の中で、RLG-054 と呼ぶ化合物が  $40\mu M$  以上の濃度で有意に FF 形成を阻害することが分かった（図 2）。本薬剤は既にヒトにおける薬物動態のデータがあり、 $2.5\text{ mg/kg}$  を一日 3 回経口投与すると、2 日で最高血中濃度約  $70\mu M$  に到達することが分かっている。また、この投与量では副作用はほとんどない。つまり、この投与量で EMT を抑制できる濃度を確保することが可能であると考えられる。

RLG-054 による EMT 阻害作用を確認するために

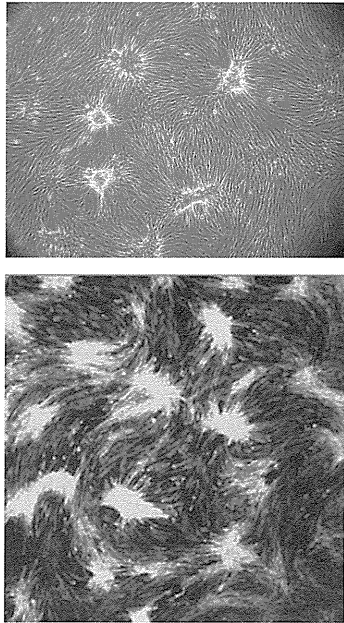


図1 Fibrotic focus 形成。ヒト網膜色素上皮培養細胞 ARPE19 を  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  で同時処理した場合、培養プレート上で細胞が集塊を形成する（上段）。細胞を染色し画像処理することで、FF 部を定量化することが可能となり、EMT の度合いを客観的に評価することが可能となった（下段）。

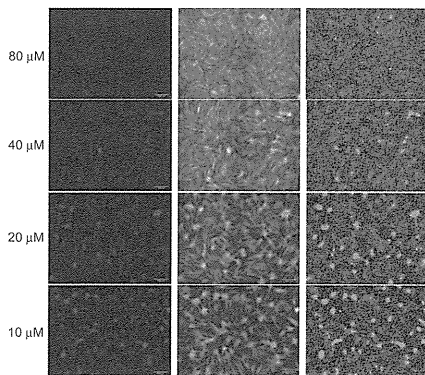


図2 Fibrotic focus 形成アッセイを用いた阻害剤スクリーニング。RLG-054 は  $40\mu M$  以上の濃度で有意に Fibrotic focus の形成を阻害できることが分かった。

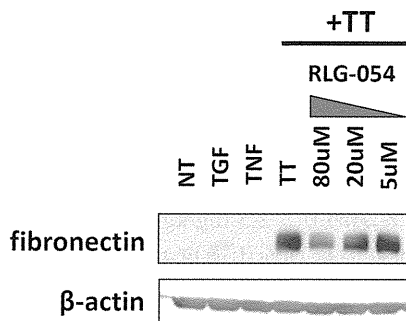


図3 RLG-054 による EMT 抑制効果。  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  の同時処理（TT 処理）によって誘導されるフィブロネクチンの産生が、RLG-054  $80\mu M$  処理によって有意に抑制された。

EMT の指標として感度の高いフィブロネクチンの産生について調べたところ、  $TNF\alpha$  と  $TGF\beta$  の同時処理（TT 処理と呼ぶ）によって誘導されるフィブロネクチンの産生が有意に RLG-054 処理によって抑制されることが分かった（図3）。

### 3. NF1 欠損細胞に対する RLG-054 の効果

NF1 欠損線維肉腫細胞である sNF96.2 cells を *in vitro* において RLG-054 で処理したところ、細胞形態の変化、VEGF 発現低下、ヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) 発現の低下が見られた。

### 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。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。実際私達は、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 の発現が病変部において有意に上昇していることを見出し、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確認している。

この結果に基づいて EMT を抑制できる薬剤のスクリーニングを行ったところ、既存薬の中にそのヒトにおける最高血中濃度より低いレベルで、EMT を有意に抑制することのできる薬剤を見出した。本薬剤は、既に他の疾患に対して投与されており、同じ投与方法ならびに投与量で EMT を抑制する効果を期待することができる。具体的に臨床試験を行うためのステップを今後踏む予定である。

### E. 結論

NF1 において発生する神経線維腫は EMT 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。また既存薬の中に EMT を抑制できる化合物があることを見出したので、今後応用を目指して研究を進める予定である。



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka A, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, and Saya H: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* 13: 784-791, 2011

Chiyoda T, Tsuda H, Tanaka H, Kataoka F, Nomura H, Nishimura S, Takano M, Susumu N, Saya H and Aoki D: Expression profiles of carcinosarcoma of

the uterine corpus - are these similar to carcinoma or sarcoma? *Genes Chromosomes Cancer* 2011 (in press)

### 2. 学会発表

Saya H: Role of EMT-related transcriptional factors in development of neurofibromas. The 2011 NF conference. 6/11/2011-6/14/2011. Jackson Hole, USA

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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 国際医療福祉大学臨床センター教授

### 研究要旨

先天性脛骨偽関節症の偽関節部分の骨癒合・骨癒合強度評価が可能な装置の開発

### 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、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、偽関節部の骨幅の狭小や変形は残存する場合が多い。その結果、長期の創外固定器・ギプス・装具の装着が新たな課題となっている。我々は、偽関節部の骨癒合程度を非侵襲に定量評価し、手術・後療法時期の適切な判断を可能とする判定装置の開発に取り組み Echo tracking 法（ET 法）を開発した。これにより、微小荷重に対する変形を定量的に検出し、骨癒合を評価可能である。この手法を用いて先天性脛骨偽関節症の患者に対し骨癒合強度測定を行うことを目的とした。

昨年度は動物モデルを作製し ET 法を用いて計測した曲げ剛性と、 $1\ \mu\text{m}$  の変位計測精度を持つレーザー変位計を用いて計測した曲げ剛性との相関を評価した。結果として相関係数は ( $r = 0.998, p < 0.001$ ) と高く、非常に高い正の相関関係を認め、ET 法は曲げ剛性を正確に評価可能であることが示された。

ET 法は元来患者を対象として、非侵襲的に骨癒合過程を定量的に評価するために開発されたものである。本実験結果より ET 法は生体内で非侵襲的に骨癒合部の曲げ剛性を正確に計測可能である事が示された。

本手法を臨床応用するためには、さらにもう一つの課題が残っている。それは曲げ剛性と破断強度の相関性である。破断強度は臨床試験では測定する事が不可能なパラメータであり、曲げ剛性と破断強度との相関性を評価する事は重要で、本年度において

このことを検証したので報告する

### B. 研究方法

曲げ剛性と強度の相関関係の評価

成熟した雄の日本白色家兔の右脛骨に観血的に水平骨切り術を行い、 $2\ \text{mm}$  の間隙を作成した動物モデルを 28 羽作製し、これらをランダムに各群 7 羽ずつに振り分け、術後観察期間を 4, 6, 8 及び 12 週とした。

#### a) 曲げ剛性と破断強度の相関関係

曲げ剛性と破断強度との相関関係は、摘出したウサギ脛骨に対して 4 点曲げ試験を行い評価した。

#### 1) 4 点曲げ試験

荷重条件

力学試験器：Servopulser (Shimadzu Co., Ltd. Tokyo)

- ・荷重制御
- ・初期荷重：5 N
- ・最大荷重：骨折荷重
- ・荷重速度：0.6 mm/min

圧縮条件

- ・圧縮子：ステンレス製の loop wire (breaking strength, 2450 N)
- ・支点圧縮点間距離  
内側支点間距離：10 mm  
外側支点間距離：110 mm

変位計測

レーザー変位計：(LJ-G 080; Keyence Co., Ltd. Osaka)

2 個

- ・変位計測精度：1.0  $\mu\text{m}$

2つのレーザー変位計のレーザー照射方向を一致させる為に、専用の固定用治具を作製した。これにより、2つのレーザー変位計は脛骨遠位・近位それぞれに同一面で照射が可能である。各々のレーザー変位計のレーザーを脛骨後面に照射した。近位のレーザー変位計は手術で使用した創外固定ピンの1-2番ピンの中心に照射し、遠位のレーザー変位計は3-4番ピン間に照射した。各のレーザー変位計の測定幅は10mmとし、その間隔での骨片の変位を計測した。これらの点の変位から、近位及び遠位骨片の変位角度をそれぞれ計測し、その和を算出した。

## 2) 力学特性評価

### 1. 曲げ剛性計測

4点曲げ試験から荷重変位曲線を求め、その線形領域（荷重：5-15N）での曲げモーメントと角度の比を求め、これを曲げ剛性とした。

### 2. 曲げ強度計測

骨が破断する最大骨折荷重時の曲げモーメントを破断強度とした。

以上より曲げ剛性と破断強度を各々の個体で計測し、Pearson'sの相関係数を算出した。統計解析にはSPSS version 18.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA)を使用し、有意水準を $p < 0.05$ とした。

## b) 骨癒合過程 (stage) の評価

過去の報告において、骨癒合過程は組織学的評価を用いて定義されている。

組織学的評価は検体の破壊試験である為、組織学的評価と力学試験を同一固体に対して同時に行うことは不可能である。本研究において、非破壊的に骨形態計測が可能なmicro-CTを適応し評価した。現在micro-CTを用いた骨癒合ステージ分類は存在しない。その為、組織学的評価による骨癒合治癒過程を参考にmicro-CTを用いた骨癒合ステージ分類を新たに定義した。

## 1) 標本の Micro-CT 撮像条件

- ・ 撮影機器：Scan X mate-E090 (Comscantecno Co., Ltd. Kanagawa)
- ・ データ解析ソフト：TRI-BONE (Ratoc System Engineering, Tokyo)
- ・ Micro-CT 撮像条件：管電圧：60 kV, 管電流：80 mA
- ・ ボクセルサイズ：28.57 $\mu$ m  $\times$  28.57 $\mu$ m  $\times$  28.57 $\mu$ m
- ・ 関心領域の抽出：Gap 2 mm の中心部、1 mm を

関心領域とし、抽出した。

## 2) Micro-CT データの取得

関心領域の36枚の軸位CTデータを、骨量ファントムを用いて骨密度値に変換した。仮骨の閾値は先行研究から200 mg/cm<sup>3</sup>とし、データを二値化し、抽出を行った。

これら36スライスCTデータから3次元CT画像構築した。

## 3) Micro-CT を用いた骨癒合過程の定義

先に述べたように、micro-CTを用いた骨癒合過程評価の定義が存在しない。その為、組織学的な評価を参考に新たな定義を作成した。

### ・ 修復期 (Reparative stage)

－ 仮骨の石灰化の開始

－ Gap の間隙が紡錘形の仮骨に包まれ、内部の石灰化の増加

### ・ リモデリング期 (Remodeling stage)

－ 皮質骨の形成と骨髓腔の形成

以上の手法を用いて全個体に対してmicro-CT撮影を行い、2mmのgapの中心部の1mmを抽出し、3次元画像を構築し仮骨の形態計測を行った。

## c) 骨癒合率評価

曲げ剛性と破断強度の相関性を評価する為に、それぞれの回復過程を評価する必要がある。本実験の全個体に対して、骨切りを施行していない左脛骨に対しても同様の4点曲げ試験を行い、骨切り手術を行った右脛骨との比を算出することで、曲げ剛性の回復率 (Stiffness healing ratio: Stiffness HR)、破断強度の回復率 (Strength healing ratio: Strength HR) を評価した。各群の平均値と標準偏差を算出し、同一時期におけるStiffness HRとStrength HRを比較した。

・ Stiffness HR (%) = 骨切りを行った右脛骨の曲げ剛性 (Nm/degree)  $\times$  100 / 健常な左脛骨の曲げ剛性 (Nm/degree)

・ Strength HR (%) = 骨切りを行った右脛骨の破断強度 (Nm/degree)  $\times$  100 / 健常な左脛骨の破断強度 (Nm/degree)

## C. 研究結果

全個体において術中にピン刺入部及び手術創部の感染は認めなかった。28羽中23羽に対し力学試験を行った。5羽においてはgapに形成された仮骨に

soft callus を多く含んでおり、創外固定を除去後に再骨折を起こしたため、除外した（除外個体：4週群；1羽、6週群；2羽、8週群；2羽）。Micro-CT撮影は全個体において可能であった。

#### A. 曲げ剛性と破断強度との相関関係

4点曲げ試験において、全個体は骨切り部分にて破断した。4から12週における曲げ剛性と破断強度は高い正の相関関係を認めた ( $r = 0.862, p < 0.001$ )。

#### B. Micro-CT を用いた骨癒合過程のステージ評価

経時的に仮骨の増加を認め、12週では7羽中4羽に仮骨の髓腔形成と外仮骨の皮質骨化を認めた。この形態変化は6週群では2羽に、8週群では1羽に観察された。

#### C. Stiffness HR と Strength HR の評価

12週において、Stiffness HR は72.74% (SD 24.93) で、Strength HR は29.37% (SD 9.93) の回復率を示した。

(倫理面への配慮)

本年度は動物実験を行った。動物福祉および苦痛に対する対応は、「動物実験倫理委員会規定」に基づき「動物実験承認規定」に従って行った。

#### D. 健康危険情報

(分担研究報告にて記入せず)

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

大西五三男. 骨粗鬆症診断・治療の新展開 定量的CTを用いた有限要素法による骨強度評価. 臨床整形外科 (0557-0433) 45巻10号 Page887-892 (2010.10)

大西五三男. 脊椎・脊髄のバイオメカニクス 椎骨(椎体)の力学的特性 骨密度と椎体骨折の力学解析. 脊椎脊髄ジャーナル (0914-4412) 23巻8号 Page785-789 (2010.08)

大西五三男. 【ロコモティブシンドローム 高齢社会における運動器障害の予防】運動器医療の応用研究 有限要素法による骨粗鬆症(骨強度)評価. 治療学 (0386-8109) 44巻7号 Page778-781 (2010.07)

大西五三男. 最新用語解説 臨床(第3回) 三次

元有限要素法 骨粗鬆症治療 (1347-572X) 9巻2号 Page181-184 (2010.04)

大西五三男、別所雅彦、松本卓也、金子雅子、大橋 暁、今井一博、中村耕三. 骨粗鬆症における画像診断 有限要素法による骨強度評価の臨床応用 Osteoporosis Japan (0919-6307) 18巻2号 Page192-196 (2010.04)

大西五三男. 【運動と骨II】基礎 骨のバイオメカニクス (有限要素法も含めて) THE BONE (0914-7047) 24巻2号 Page143-150 (2010.04)

超音波エコートラッキング法を用いた骨癒合評価 松山順太郎、大西五三男超音波エコートラッキング法を用いた骨癒合評価. 整形外科 (0030-5901) 61巻2号 Page138 (2010.02)

Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J: Treatment of Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia-A Multi-Center Study in Japan- Journal of Pediatric Orthopaedics. 25 (2): 219-24, 2005 Mar-Apr.

Ohnishi I, Kurokawa T: Measurement of the tensile forces during bone lengthening. Clinical Biomechanics, 20 (4), 421-427, 2005

S. Ohashi, I. Ohnishi, T. Kageyama: The Effect of Vascularity on the Canine Distracted Tibial Callus Consolidation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 438, 253-259, 2005

Matsuyama J, Ohnishi I, Kageyama T, Oshida H, Suwabe T, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005

Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005

Akimitsu Harada, Ryoichi Sakai, Koichi Miyasaka, Toshiki Ohtsuka, Yoshihiro Yoshikawa, Juntaro Matsuyama, Isao Ohnishi, Kozo Nakamura: A New Method for Measuring Bone Strength using Echo-Tracking, Proceedings of the IEEE, Vancouver, Canada, October, 2006, 13-16.

Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Suzuki H, Harada A, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. Med Eng Phys 2006; 28(6): 588-95.