

- 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 15 年度研究業績 2004:99-104.
- 30) 縣 俊彦、清水英佑、松平 透、佐野浩斎、中村晃士、西岡真樹子、稲葉 裕、黒沢美智子、古村南夫、中山樹一郎、三宅吉博、高木廣文、金城芳秀、柳 修平、河 正子、神経線維腫症 1 モニタリング研究、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研究班 平成 15 年度研究業績 2004:9-15.
- 31) 縣 俊彦、清水英佑、松平 透、佐野浩斎、中村晃士、西岡真樹子、稲葉 裕、黒沢美智子、古村南夫、中山樹一郎、三宅吉博、高木廣文、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 Kei-itiro, 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.
- 39) 縣 俊彦、NF1 大規模モニタリング研究－モニタリング施設とそれいがかいでの特性比較－、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 21 年度研究業績 2010:235-52.
- 40) 縣 俊彦、結節硬化症 (TSC) 患者の医療補助を決める要因に関する研究、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 21 年度研究業績 2010:94-100.
- 41) 縣 俊彦、神経線維腫症 1 (NF1) 患者疫学像の変化 (1998-2008)、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 22 年度研究業績 2011:27-38.
- 42) 縣 俊彦、定点モニタリング研究－(NF1 の場合)－多変量解析による検討、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 22 年度研究業績 2011:33-40.
- 43) 縣 俊彦、定点モニタリングの調査票作成経過－班員意見聴取と進捗状況、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 22 年度研究業績 2011:41-51.

## 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) 西川浩昭、縣 俊彦、稲葉 裕、黒沢美智子.  
神経線維腫症 1 型の患者像の疫学的状況 –  
2003 年と 2009 年の比較. 第 77 回日本民族衛  
生学会、東京 (2011.11.16-7) 第 78 巻付録  
p70-1
- 2) 縣 俊彦、西川浩昭、稲葉 裕、黒沢美智子.  
神経線維腫症 1 型の患者像の臨床学的状況 –  
2003 年と 2009 年の比較. 第 77 回日本民族衛  
生学会、東京 (2011.11.16-7) 第 78 巻付録  
p75-6
- 3) T Agata H Nishikawa Y Inaba M Kurosawa M

Nagai. M Niimura F Ohtsuka. Long term dermato-  
logic epidemiology of Neurofibromatosis 1(NF1)  
patients from 1998 to 2011 in Japan and European  
countries. 21th Congress of the european Academy  
of Dermatology and Venereology. Prague Cheko  
20-24 Oct.2012

## 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

## NF1 患者の継続的疫学的状況 － 2004 年と 2010 年の比較 －

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

神経線維腫症 I 型（NF1、レックリングハウゼン病）患者の社会疫学的状況の経年変化を明らかにするため、当該疾患と診断された者を対象として厚生労働省と神経皮膚症候群に関する研究班が実施している患者臨床個人調査票調査の 2004 年と 2010 年の結果を比較した。2004 年と 2010 年とでは日常生活の状況、保険種別、罹病期間などには変化があった。発病の居住地にも差があったが、各地の担当者の入力状況の差が起因していると判断される。

なお、本研究の一部は厚労科研難治性疾患克服研究事業の補助を受けて行ったものである。

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	静岡県立大学看護学
廣田良夫	大阪市立大学公衆衛生学
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

### A. 研究目的

神経線維腫症 I 型（Neurofibromatosis 1）は von Recklinghausen 病とも呼ばれる常染色体優性遺伝疾患で、3,000～4,000 人に 1 人の割合で発生する。神経線維腫は、良性の末梢神経腫瘍であり、皮膚神経線維腫、カフェ・オ・レ斑と呼ばれる皮膚の色素沈着病変、腋窩など太陽に曝露されない領域の皮膚の染み、Lisch 小結節と呼ばれる虹彩の過誤および脛

骨の偽関節などの特徴的な症状を有する。著者らは今まで多くの研究成果を報告してきた<sup>1-43)</sup>。

今回、皮膚・結合組織疾患調査研究班（神経皮膚症候群）が臨床調査個人票を用いた調査を 2004 年と 2010 年に実施したので両調査結果の相違を報告する。

### B. 研究方法

厚生労働省と神経皮膚症候群に関する研究班の協力の下、本症が治療対象疾患に認定された 1998 年以降、毎年、患者臨床個人票調査を行っている。そのうち、患者数が 1,000 名以上となった 2004 年と 2010 年の把握対象患者（重複チェック後）について調査を行い、比較検討した。

調査項目は対象者の属性として発病年月日、初診年月日、発病時の年齢、発病時居住地、現在の年齢、健康保険の種別、身体障害者手帳の有無、介護認定の有無、生活状況、家族歴、受診状況、臨床症状であった。

本報告で使用した患者臨床個人票調査の対象は、診断基準に基づき神経線維腫症 I 型の患者と診断された者である。

### C. 研究結果

各年次の対象者数は、調査年次に新規に診断され

た者と以前から受診している者を合わせて、2004年1,087（男517、女570）名、2010年1,719（男774、女945）名で、両年次とも男性に比べ女性が多くなっていた（表1）。新規患者は最近でも350名、20%と多い。

調査間隔が6年と比較的短いこともあり、大半の項目において、年次間で有意な差異は見られなかった。

年齢別対象者数数の分布は2004年で31～40歳19.1%、21～30歳18.4%で、2010年で61歳以上20.1%、31～40歳18.5%と近年高齢化している。

対象者の平均年齢は、2004年が36.2歳、2010年が40.2歳で差は見られるが統計的に有意ではなかった。

（表2）発病時年齢構成は2004年で0歳41.4%、1～10歳18.2%で、2010年で0歳46.5%、1～10歳19.9%とほぼ同様な状況である。発病時の年齢は2004年11.5歳、2010年10.3歳でともに差は見られるが統計的に有意ではなかった。（表3）

介護認定状況、家族歴、社会活動状況、受診状況、最近の経過に関しては統計的有意差はない。（表4-8）。

日常生活の状況では2004年に比べ2010年では「正常」と判定されて者の割合が減少し、介助を必要

表1 対象者数

	男性	女性	計
新規	118(49.0%)	123(51.0%)	241
2004年 更新	399(47.2%)	447(52.8%)	846
計	517(47.6%)	570(52.4%)	1,087
新規	162(46.7%)	185(53.3%)	347
2010年 更新	612(44.6%)	760(55.4%)	1,372
計	774(45.0%)	945(55.0%)	1,719
合計	1,291(46.0%)	1,515(54.0%)	2,806

表2 年齢別対象者数

	2004年	2010年	計
0～10歳	111(11.4%)	96( 5.7%)	207( 7.8%)
11～20歳	123(12.7%)	218(13.0%)	341(12.9%)
21～30歳	179(18.4%)	267(15.9%)	446(16.8%)
31～40歳	185(19.1%)	308(18.5%)	493(18.7%)
41～50歳	92( 9.5%)	247(14.7%)	339(12.8%)
51～60歳	150(15.4%)	203(12.1%)	353(13.3%)
61歳以上	131(13.5%)	337(20.1%)	468(17.7%)

とする者などが増えており、有意差が認められた。（表9）。

保険種別では、年次に大きな差異が見られ、組合健保、協会けんぽが減少した。（表10）。

罹病期間では2010年30年以上が急増した（表11）。

表3 発病時年齢構成

	2004年	2010年	計
0歳	275(41.4%)	489(46.5%)	764(44.5%)
1～10歳	131(19.7%)	209(19.9%)	340(19.8%)
11～20歳	121(18.2%)	162(15.4%)	283(16.5%)
21～30歳	57( 8.6%)	85( 8.1%)	142( 8.3%)
31～40歳	34( 5.1%)	41( 3.9%)	75( 4.4%)
41～50歳	22( 3.3%)	27( 2.6%)	49( 2.9%)
51歳以上	24( 3.7%)	38( 3.6%)	62( 3.6%)

表4 介護認定状況

	2004年	2010年	計
要介護	33( 3.5%)	83( 5.3%)	116( 4.6%)
要支援	11( 1.2%)	21( 1.3%)	32( 1.3%)
なし	904(95.3%)	1,471(93.4%)	2,375(94.1%)

$X^2=4.500$  d.f.=2 p=0.105

表5 家族歴

	2004年	2010年	計
あり	105(46.5%)	154(47.4%)	259(47.0%)
なし	92(40.7%)	126(38.8%)	218(39.6%)
不明	29(12.8%)	45(13.8%)	74(13.4%)

$X^2=0.253$  d.f.=2 p=0.881

表6 社会活動状況

	2004年	2010年	計
就労	358(37.0%)	570(38.0%)	928(37.5%)
就学	182(18.8%)	241(16.0%)	423(17.1%)
家事労働	171(17.6%)	321(21.4%)	492(19.9%)
在宅療養	156(16.1%)	226(15.0%)	382(15.5%)
入院	42( 4.3%)	61( 4.1%)	103( 4.2%)
入所	11( 1.1%)	21( 1.4%)	32( 1.3%)
その他	49( 5.1%)	62( 4.1%)	111( 4.5%)

$X^2=8.812$  d.f.=6 p=0.184

発病時の居住地については、年次間で明らかな差異が認められ、2004年次多かった近畿が著しく減少し、その他の地区が増加していた。特に関東と九州で著しく増加していた（表12）。

表7 受診状況

	2004年	2010年	計
主に入院	54( 5.3%)	76( 4.9%)	130( 5.0%)
入院と通院	84( 8.2%)	117( 7.5%)	201( 7.8%)
主に通院	799(77.7%)	1,248(80.1%)	2,047(79.2%)
入通院なし	40( 3.9%)	45( 2.9%)	85( 3.3%)
その他	50( 4.9%)	72( 4.6%)	122( 4.7%)

$X^2=2.936$  d.f.=4 p=0.569

表8 最近の経過

	2004年	2010年	計
軽快	34( 3.3%)	47( 3.0%)	81( 3.1%)
不変	476(45.9%)	641(41.4%)	1,117(43.2%)
徐々に悪化	504(48.7%)	815(52.7%)	1,319(51.2%)
急速に悪化	18( 1.7%)	32( 2.1%)	50( 1.9%)
不明	4( 0.4%)	12( 0.8%)	16( 0.6%)

$X^2=6.886$  d.f.=4 p=0.142

表9 日常生活の状況

	2004年	2010年	計
正常	455(46.1%)	601(40.6%)	1,056(42.8%)
独力で可能	381(38.7%)	627(42.4%)	1,008(40.9%)
要部分介助	113(11.5%)	197(13.3%)	310(12.6%)
要全面介助	36( 3.7%)	54( 3.7%)	90( 3.7%)

$X^2=7.858$  d.f.=3 p=0.049

表10 保険種別

	2004年	2010年	計
組合健保	283(29.1%)	352(25.1%)	635(26.7%)
協会けんぽ	190(19.5%)	263(18.7%)	453(19.1%)
共済組合	35( 3.6%)	62( 4.4%)	97( 4.1%)
国民健康保険	460(47.4%)	667(47.5%)	1,127(47.4%)
老人保険	4( 0.4%)	60( 4.3%)	64( 2.7%)

$X^2=36.457$  d.f.=4 p=0.000

## D. 考察

本研究はNF1の受給対象患者の2/3を対象としているので、全体像、トレンドを把握するには十分意義があると考えられる。

しかし、層別化分析（特に地方別）を考えると、地域により協力体制に差があるためデータのばらつきが多くなるという問題が残る。

## E. 結論

神経線維腫症I型（NF1、レックリングハウゼン病）患者の社会疫学的状況の経年変化を明らかにするため、当該疾患と診断された者を対象として厚生労働省と神経皮膚症候群に関する研究班が実施している患者臨床個人調査票調査の2004年と2010年の結果を比較した。2004年と2010年とでは日常生活の状況、保険種別、罹病期間などには変化があった。発病の居住地にも差があったが、各地の担当者の入力状況の差が起因していると判断される。

なお、本研究の一部は厚労科研難治性疾患克服研究事業の補助を受けて行った。

## 【文献】

- 1) 橋本修二、中村好一、永井正規、柳川 洋、玉腰暁子、川村 孝、大野良之. 難病患者のモニタリングシステムに関する基礎的検討.

表11 罹病期間

	2004年	2010年	計
1年未満	32( 5.2%)	33( 3.2%)	65( 4.0%)
1年以上3年未満	41( 6.7%)	43( 4.2%)	84( 5.1%)
3年以上5年未満	36( 5.9%)	26( 2.5%)	62( 3.8%)
5年以上10年未満	62(10.1%)	102( 9.9%)	164(10.0%)
10年以上20年未満	121(19.8%)	175(17.0%)	296(18.0%)
20年以上30年未満	113(18.5%)	209(20.3%)	322(19.6%)
30年以上	207(33.8%)	441(42.9%)	648(39.5%)

$X^2=30.402$  d.f.=6 p=0.000

表12 発病時居住地

	2004年	2010年	計
北海道・東北	97( 8.9%)	147( 8.6%)	244( 8.7%)
関東	356(32.8%)	748(43.5%)	1,104(39.3%)
中部	163(15.0%)	255(14.8%)	418(14.9%)
近畿	245(22.5%)	132( 7.7%)	377(13.4%)
中国・四国	106( 9.8%)	152( 8.8%)	258( 9.2%)
九州	120(11.0%)	285(16.6%)	405(14.4%)

$\chi^2=143.932$  d.f.=5 p=0.000

- 厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成5年度研究業績 24-31,1994
- 2) 橋本修二、中村好一、永井正規、柳川 洋、玉腰暁子、川村 孝、大野良之. 難病患者のモニタリングシステムに関する基礎的検討 - 受療患者のモニター施設割合の年次変化 - J. 厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成7年度研究業績 94-100,1996
  - 3) 橋本修二、川村 孝、大野良之、縣 俊彦、大塚藤男. 神経線維腫症1の定点モニタリング - 研究計画 -. 厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成8年度研究業績 41-3,1997
  - 4) Poyhonen M, Kytola S, Leisti J. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet.* 2000 Aug;37(8):632-6.
  - 5) Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 1999 Mar 26;89(1):1-6.
  - 6) 新村真人. Recklinghausen 病、日本臨床:50: 増刊:168-175,1992
  - 7) 縣 俊彦、西村理明、高木廣文、稲葉 裕. レックリングハウゼン病と結節性硬化症の疫学研究の現状. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成5年度研究業績 5-12,1994
  - 8) 縣 俊彦、西村理明、門倉真人、新村真人、本田まり子、舟崎裕記、大塚藤男、中内洋一、吉田 純、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕. 神経皮膚症候群全国疫学調査・第1次調査 - 中間報告 -. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成6年度研究業績 5-9,1995
  - 9) 縣 俊彦、西村理明、門倉真人、新村真人、本田まり子、舟崎裕記、大塚藤男、中内洋一、吉田 純、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕. 神経皮膚症候群の家系内発症に関する研究. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成7年度研究業績 5-10,1996
  - 10) 縣 俊彦、西村理明、浅尾啓子、清水英佑、新村真人、大塚藤男、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕. 非回答集団を考慮したNF1の有病率推計. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成8年度研究業績 5-9,1997
  - 11) 縣 俊彦、西村理明、浅尾啓子、清水英佑、新村真人、大塚藤男、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕. NF1患者のQOLと臨床症状に関する基礎的研究. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成8年度研究業績 10-14,1997
  - 12) 縣 俊彦、西村理明、浅尾啓子、新村真人、大塚藤男、高木廣文、稲葉 裕、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、柳 修平. linear logistic regression modelにおけるsmoothing効果の検討. 第16回SASユーザー会研究論文集 129-136,1997.
  - 13) 縣 俊彦. 神経線維腫症1 (NF1)の遺伝形式・家族歴に関する研究. *医学と生物学.*135:1:17-21,1997
  - 14) 縣 俊彦. NF1 (神経線維腫症1、レックリングハウゼン病)患者の疫学特性とQOLに関する研究. *医学と生物学.*135:3:93-97,1997
  - 15) 新村真人: 神経皮膚症候群、からだの科学:190:210-211,1996
  - 16) 川戸美由紀、橋本修二、川村 孝、大野良之、縣俊彦、大塚藤男「神経線維腫症1の定点モニタリング1997・1998調査成績」厚生省特定疾患難病の疫学研究班平成10年度研究業績 119-126,1999
  - 17) 縣 俊彦、清水英佑、大塚藤男、大野良之、橋本修二、高木廣文、稲葉 裕「NF1の定点モニタリング重複把握者の特性」厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成11年度研究業績 2000,5-9
  - 18) 縣 俊彦、清水英佑、橋本修二、柳 修平、稲葉 裕、高木廣文、大塚藤男「NF1モニタリング調査の解析」厚生省特定疾患の疫学に関する研究班平成11年度研究業績 149-57,2000
  - 19) 田中 隆、山本 博、広田良夫、竹下節子. 「特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリング経過報告」厚生省特定疾患の疫学に関する研究班平成11年度研究業績 218-225,2000
  - 20) 縣 俊彦、豊島裕子、清水英佑、高木廣文、早川東作、稲葉 裕、柳 修平、大塚藤男. NF1 定点モニタリング1994-2000. 厚生省特定疾患の疫学に関する研究班平成12年度研究業績 2001:213-7.
  - 21) 縣 俊彦、豊島裕子、清水英佑、高木廣文、早川東作、稲葉 裕、柳 修平、大塚藤男. NF1 定点モニタリングの継続性と問題点. 厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成12年度研究業績. 2001:5-7.
  - 22) 田中 隆、山本 博、広田良夫、竹下節子.

- 特発性大腿骨頭壊死症定点モニタリングについて、厚生省特定疾患の疫学に関する研究班平成12年度研究業績156-162,2001
- 23) 縣 俊彦、豊島裕子、清水英佑、高木廣文、早川東作、稲葉 裕、柳 修平、大塚藤男。NF1 モニタリングでの継続把握者の特徴。厚生労働省特定疾患の疫学に関する研究班平成13年度研究業績2002:213-7.
- 24) 縣 俊彦、豊島裕子、清水英佑、高木廣文、稲葉 裕、黒沢美智子、柳 修平、西川浩昭、河 正子、金城芳秀、新村真人、大塚藤男。あせび会NF1患者の特性。厚生労働省特定疾患神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作成に関する研究 平成13年度研究業績。2002:9-14.
- 25) 縣 俊彦、清水英佑、高木廣文、河 正子、早川東作、稲葉 裕、黒沢美智子、柳 修平、金城芳秀、新村真人、大塚藤男。NF1 (neurofibromatosis 1) の1985-2000年での臨床疫学的傾向の研究。厚生労働科学研究 研究費補助金 特定疾患対策研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成14年度研究業績2003:103-112.
- 26) 縣 俊彦、清水英佑、中山樹一郎、三宅吉博、稲葉 裕、黒沢美智子、新村真人、大塚藤男。神経皮膚症候群調査研究班とのNF1 (神経線維腫症1) の定点モニタリング調査：進捗状況厚生労働科学研究 研究費補助金 特定疾患対策研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班 平成14年度研究業績2003:113-116.
- 27) 縣 俊彦。神経線維腫症1 (NF1) の過去20年での臨床疫学研究の総括 厚生労働科学研究 研究費補助金 特定疾患対策研究事業 神経皮膚症候群に関する研究班 平成14年度研究業績2003:5-12.
- 28) 縣 俊彦、中村晃士、西岡真樹子、佐野浩斎、清水英佑、高木廣文、河 正子、早川東作、柳 修平、金城芳秀、稲葉 裕、黒沢美智子、大塚藤男、新村真人、三宅吉博、中山樹一郎、定点モニタリングのあり方の検討 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15年度研究業績2004:105-111.
- 29) 縣 俊彦、清水英佑、松平 透、佐野浩斎、中村晃士、西岡真樹子、稲葉 裕、黒沢美智子、古村南夫、中山樹一郎、三宅吉博、高木廣文、金城芳秀、柳 修平、河 正子、神経線維腫症1 定点モニタリング2003、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15年度研究業績2004:99-104.
- 30) 縣 俊彦、清水英佑、松平 透、佐野浩斎、中村晃士、西岡真樹子、稲葉 裕、黒沢美智子、古村南夫、中山樹一郎、三宅吉博、高木廣文、金城芳秀、柳 修平、河 正子、神経線維腫症1 モニタリング研究、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研究班 平成15年度研究業績2004:9-15.
- 31) 縣 俊彦、清水英佑、松平 透、佐野浩斎、中村晃士、西岡真樹子、稲葉 裕、黒沢美智子、古村南夫、中山樹一郎、三宅吉博、高木廣文、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、鷲尾昌一、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 Kei-itiro, 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.
- 39) 縣 俊彦、NF1 大規模モニタリング研究－モニタリング施設とそれいがいでの特性比較－、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 21 年度研究業績 2010:235-52.
- 40) 縣 俊彦、結節硬化症 (TSC) 患者の医療補助を決める要因に関する研究、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 21 年度研究業績 2010:94-100.
- 41) 縣 俊彦、神経線維腫症 1 (NF1) 患者疫学像の変化 (1998-2008)、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 22 年度研究業績 2011:27-38.
- 42) 縣 俊彦、定点モニタリング研究－(NF1 の場合)－多変量解析による検討、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 22 年

度研究業績 2011:33-40.

- 43) 縣 俊彦、定点モニタリングの調査票作成経過－班員意見聴取と進捗状況、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 22 年度研究業績 2011:41-51.

## 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) 西川浩昭、縣 俊彦、稲葉 裕、黒沢美智子. 神経線維腫症 1 型の患者像の疫学的状況－2003 年と 2009 年の比較. 第 77 回日本民族衛生学会、東京 (2011.11.16-7) 第 78 巻付録 p70-1
- 2) 縣 俊彦、西川浩昭、稲葉 裕、黒沢美智子. 神経線維腫症 1 型の患者像の臨床学的状況－2003 年と 2009 年の比較. 第 77 回日本民族衛生学会、東京 (2011.11.16-7) 第 78 巻付録 p75-6
- 3) T Agata H Nishikawa Y Inaba M Kurosawa M Nagai. M Niimura F Ohtsuka. Long term dermatologic epidemiology of Neurofibromatosis 1 (NF1) patients from 1998 to 2011 in Japan and European countries. 21th Congress of the european Academy of Dermatology and Venereology. Prague Cheko 20-24 Oct.2012

## 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、近年、欧米で注目されており、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（以下 ADHD）、学習障害（以下 LD）など上記の問題に関連した疾患について援助の必要性や早期発見の重要性、学業への影響やうつ病・行為障害など二次障害防止へ向けた支援体制整備の必要性が指摘されている。このため、本邦においても NF1 と認知機能障害や発達障害との関連性について検討する必要があると考えられた。

### B. 研究方法

本学付属病院を受診し NF1 が疑われた小児 13 名について知能、注意、知覚、遂行機能、学習能力などの認知機能に関して後方視的に検討した。

### C. 研究結果

検討した小児 NF1 患者 13 名のうち知能指数・発達指数が 70 以上であったのは 8 名であった。頭部 MRI で Unidentified bright objects（以下 UBOs）が認められたのは 8 名中 6 例であった。ADHD ないし LD と診断されたのは 8 名中 3 名で、全例で UBOs が認められた。内訳は、ADHD のみが 1 名で内服

薬による治療がおこなわれていた。LD 単独は 1 名で、ADHD と LD を合併していたのが 1 名であった。この合併例について以下に提示する。

生後 4 ヶ月時の健診でカフェオレ斑が指摘された。皮膚のカフェオレ斑は最大径 4cm 以上で、6 か所以上に認められた。徐々に多動が目立つようになったため、7 歳 9 か月時に当院に来院した。頭部 MRI で小脳に UBOs が認められた。DSM-IV の診断基準では ADHD、不注意優勢型と判断され、ADHD-RS-IV-J では家庭版で不注意 18 点、多動衝動 7 点、学校版で不注意 12 点、多動衝動 3 点であった。WISC-IV 知能検査では全検査 IQ82、言語理解指標 86、知覚推理指標 82、ワーキングメモリー指標 68、処理速度指標 104、DN-CAS 認知評価システムの評価点はプランニング 106、同時処理 80、注意 115、継時処理 64 であった。フロスティック視知覚発達検査では視覚と運動の協応と図形と素地の知覚年齢に遅れがみられ、LD 判断のための調査票（LDI-R）では特に「書く」「計算する」「推論する」に問題がみられた。このように本例では ADHD、LD 境界知能（IQ82）、ワーキングメモリの低下、継次処理<同時処理、視覚認知の障害などに関する問題が認められた。

### D. 考察

欧米の文献では NF1 の小児の 6 割に不注意の症

状が認められ、約 1/3 で ADHD と診断され、遂行機能の低下や、特異的発達障害つまり LD に分類される読字障害、算数障害に関する報告がある。

また、UBOs は小児NF1 患者の 60-70% の基底核、脳幹、視床、視索、小脳に認められる病変で、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。

今回の検討では医療機関への受診者というバイアスがかかっているが、精神遅滞のない 8 例中 3 例に ADHD ないし LD の合併がみられた。また、UBOs もその 3 例全例に認められた。しかし、特に関連が指摘されている視床病変は明らかではなかった。

頭部MRI 画像で診断される UBOs の病理学的検討はほとんどないが、頭部MRI で病変が検出できなかった部位にも病理学的には病変を認めることがあり、今回の検討で視床の異常を完全には否定できない。

今回の検討で、本邦でも小児の NF1 で認知機能障害や発達障害を合併することがあることから、皮

膚・骨などに加え、問診や心理検査などを用いて遂行機能、発達障害の合併について検索をおこなうことが必要であると考えられた。

これまで、NF1 と認知機能や発達障害の関連性について欧米では極めて高頻度の合併が報告がある半面、本邦ではあまり注目されていなかった。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、今後、さらに、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。

## 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。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

三浦慶子、中山純子、新 健治、岩崎信明：神経線維腫症 1 型と発達障害に関する臨床的検討  
第 101 回日本小児神経学会茨城地方会（水戸）、  
2012 年 11 月

## 神経線維腫における Interleukin-6 の発現増強

研究分担者 川内康弘 筑波大学医学医療系皮膚科学准教授

### 研究要旨

我々はこれまでに本班研究において、神経線維腫では血管増殖因子 VEGF が過発現しており、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、VEGF 以外の血管増殖因子である Interleukin-6 (IL-6) の神経線維腫における発現を解析した。NF1 患者に生じた神経線維腫を用いて real-time RT-PCR を行ったところ、神経線維腫周囲の健常組織に比べて、神経線維腫組織では有意に IL-6 mRNA を発現していた。また、免疫組織染色によっても神経線維腫では IL-6 が高発現していることが確かめられた。さらに NF1 における neurofibromin の loss of function が、IL-6 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 Schwann 細胞株である SW10 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 SW10-NFi 細胞を作製した。この SW10-NFi 細胞の IL-6 の発現を real-time RCR にて検索したところ、SW10-NFi 細胞では、IL-6 は非感染 SW10 細胞に比較して発現が有意に亢進していた。この結果は、神経線維腫内の IL-6 過剰発現には、NF1 遺伝子のハプロ不全が関わっていることを示していると考えられた。

石塚洋典、丸山 浩、中村泰大、大塚藤男  
筑波大学医学医療系皮膚科学  
古村南夫 久留米大学医学部皮膚科

### 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。我々は本研究において、神経線維腫では VEGF、basic FGF (bFGF) 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、VEGF、bFGF 以外の主要な血管増生因子である Interleukin-6 (IL-6) の発現を解析し、IL-6 が神経線維腫の血管増生に関与しているかどうかを明らかにするために本研究を行った。

### B. 研究方法

1. 神経線維腫症 1 の患者から手術により切除された神経線維腫およびびまん性神経線維腫を液体窒素

中で凍結・OCT 包埋した。

2. 上記凍結組織をクライオトームを用いてスライド切片とした。一次抗体として血管増殖因子 (VEGF, IL-6) または S-100 蛋白に対するポリクローナル抗体、二次抗体として抗うさぎ IgG 抗体を用い、また発色法としてアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法を用いて組織染色を行い、どの血管増殖因子が神経線維腫において発現しているかを比較検討した。
3. 神経線維腫組織片から定法により腫瘍組織から RNA を抽出した。抽出した RNA をテンプレートとし、IL-6 特異的な DNA プローブを用いて real time RT-PCR を行い、IL-6 の発現を RNA レベルでも比較検討した。
4. neurofibromin のノックダウン用 rhR RNAi を Schwann 細胞株である SW10 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 SW10-NFi 細胞を得た。
5. 上記 SW10-NFi 細胞  $10^6$  個を 1 ml 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SW10-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. IL-6 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 SW10 細胞間で比較した。

### C. 研究結果および考察

1. IL-6 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。(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、IL-6 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 SW10-NFi 細胞 (図 3) ではコントロールの SW10 細胞に比べて IL-6 mRNA レベルが約 3 倍に増加した。また、Western blotting の結果、neurofibromin をノックダウンした SW10-NFi 細胞ではコントロールの SW10 細胞に比べて IL-6 蛋白レベルが約 1.5 倍に増加した。(図 4)。
4. 上記の結果から、NF1 患者における神経線維腫では IL-6 の発現が亢進しており、IL-6 発現亢進は、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 IL-6 の発現増強が引き起こされたことから、神経線維腫内の IL-6 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。

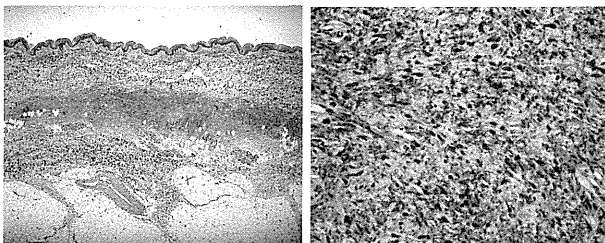


図 1 神経線維腫における IL-6 の発現

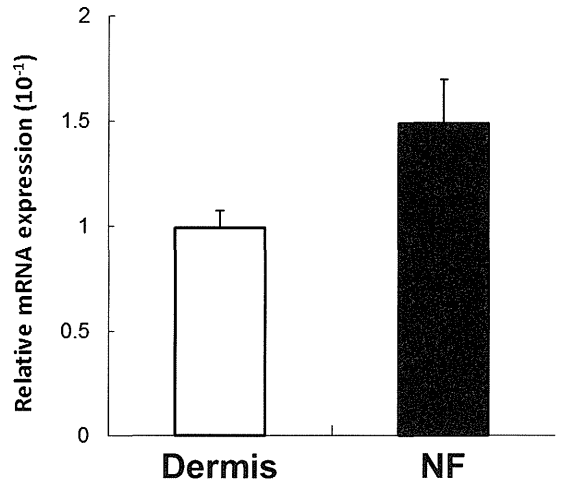


図 2 神経線維腫における IL-6 mRNA 発現増強

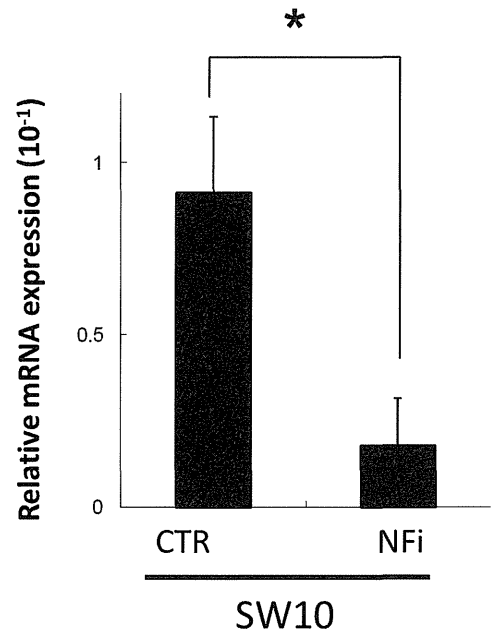


図 3 NF1 遺伝子ノックダウンで NF1 mRNA 量が約 1/10 に減少した。

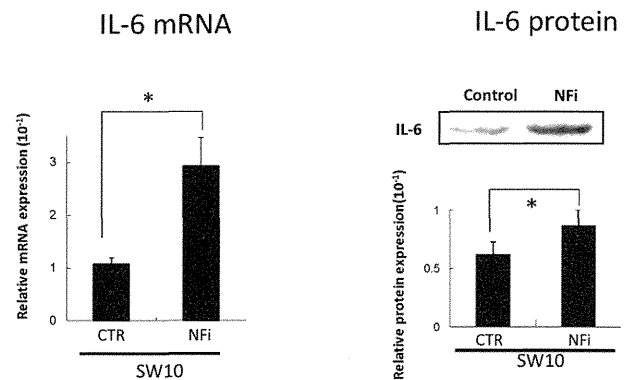


図 4 NF1 遺伝子ノックダウン細胞 (SW10-NFi) における IL-6 mRNA 発現増強

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujisawa Y, Miyazono Y, Kawachi Y, Otsuka F. A case of sterile transient neonatal pustulosis presenting with large flaccid pustules. *Pediatr Dermatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]
- 2) Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Comparison between taxane-based chemotherapy with conventional surgery-based therapy for cutaneous angiosarcoma: a single center experience. *J Dermatolog Treat*. 2012 Dec 5.
- 3) Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. GATA-3 regulates differentiation-specific loricrin gene expression in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2012; 21(11): 859-64.
- 4) Nakamura Y, Nakamura Y, Fujisawa Y, Obara S, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Multiple inguinal and pelvic lymph node metastases of malignant melanoma of the heel identified by common iliac lymphadenopathy. *Lymphat Res Biol*. 2012; 10(3):118-21.
- 5) Nakamura Y, Fujisawa Y, Ishikawa M, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Usefulness of sentinel lymph node biopsy for extramammary Paget disease. *Br J Dermatol*. 2012; 167(4): 954-6.
- 6) Ishitsuka Y, Kawachi Y, Taguchi S, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. Pituitary tumor-transforming gene 1 enhances proliferation and suppresses early differentiation of keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012; 132(7): 1775-84.
- 7) Kawachi Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pruritic poikilodermatous eruption associated with dermatomyositis: successful treatment with dapsone. *Eur J Dermatol*. 2012; 22(2): 289-90.
- 8) Nakamura Y, Satomi K, Noguchi M, Shibata-Ito M, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Incidental gastric signet-ring cell carcinoma metastasis to the skin in basal cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2012; 92(6): 635-6.
- 9) Nakamura Y, Shibata-Ito M, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Malignant blue nevus arising in a giant congenital cellular blue nevus in an infant. *Pediatr Dermatol*. 2012; 29(5): 651-5.
- 10) Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Indocyanine green fluorescence-navigated sentinel node biopsy showed higher sensitivity than the radioisotope or blue dye method, which may help to reduce false-negative cases in skin cancer. *J Surg Oncol*. 2012; 106(1): 41-5.
- 11) Kawachi Y, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Indolent subcutaneous panniculitis-like T cell lymphoma in a 1-year-old child. *Pediatr Dermatol*. 2012; 29(3): 374-7.
- 12) Nakamura Y, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Facial nerve morbidity following facial nerve preservation surgery for the treatment of skin cancer of the head and neck. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012; 26(10): 1323-5.

### 2. 学会発表

特になし

## E. 知的財産権の出願・登録

特になし。

## 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

神経線維腫 1 型 (NF1) のカフェオレ斑はメラノサイトの増殖・分化の異常で起こる。細胞増殖因子として、真皮由来の SCF、HGF が確認されている。NF1 のびまん性皮膚メラニン色素沈着に類似するフェノタイプが、NF1 ハプロ不全マウスにみられる。更に、メラノblast 前駆細胞の分化の途中に、メラノサイトのみで neurofibromin の発現低下が引き起こされたモデルマウスにも、全く同様のフェノタイプが発生することが、組織特異的 NF1 ノックアウトマウスで明らかにされた。NF1 にみられる細胞異常増殖は、主に neurofibromin の RasGAP 機能異常による Ras 不活性化の障害によるとされるが、NF1 患者皮膚由来の培養メラノサイトには Ras 活性上昇がみられず、他の機序が関わっている可能性がある。ヒト培養メラノサイトの neurofibromin をノックダウンすると、特異な細胞増殖反応がみられ、neurofibromin がもつ non-RasGAP function である G 蛋白質共役受容体に対する adenylate cyclase 活性制御作用が低下する。すなわち、メラノサイト刺激ホルモン (MSH) 受容体であるメラノコルチン 1 受容体 (MC1R) の adenylate cyclase 活性化による cAMP-PKA シグナルがノックダウン細胞では低下する。さらに PARs が発現誘導・活性化され、ユビキタス転写因子である TFE3/TFEB (MiT 転写因子ファミリー) の発現が亢進する。このような NF1 ノックダウンで起こる変化を、既知の細胞内シグナルに関連付けるため、cAMP 活性や PARs シグナルを修飾した培養メラノサイトの遺伝子発現パターンをマイクロアレイにて検討した。階層クラスター解析、遺伝子機能アノテーション、パスウェイデータベース解析にて、Notch シグナルや Wnt シグナル、神経系細胞の分化増殖、アポトーシス関連遺伝子の関与が示唆された。

### 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有することが神経系細胞を用いた実験から知られている。

したがって、メラノサイトにおける重要なシグナルである cAMP 経路が NF1 遺伝子突然変異による影響を NF1 の機能低下によって受ける可能性があ

り、さらに、カフェオレ斑発症はメラニン色素産生の恒常的な増加という基本的な生理現象の異常が背景にあるが、メラニン生成および細胞増殖に cAMP 経路がメラノサイトにおいて、最も重要な働きを持つことから、何らかの関与が推測される。

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 の分泌が増加したり、HGF の発現と分泌増加が起きたりすることも一因とされている。

神経堤由来のメラノサイトの分化経路に着目した

研究によって、NF1 のびまん性皮膚メラニン色素沈着にはほぼ類似したフェノタイプが、NF1 ハプロ不全マウスにみられることが知られていたが、その機序が明らかにされた。すなわち、メラノblast前駆細胞の分化の途中で、メラノblast特異的に neurofibromin の発現低下を引き起こすとこのフェノタイプが再現できることが、組織特異的NF1 ノックアウトマウスで最近明らかにされた<sup>1)</sup>。これは、メラノサイトにも NF1 遺伝子産物の変異・欠失に由来する NF1 ハプロ不全による細胞機能の異常が少なくともその分化段階に存在し、その結果、NF1 患者のびまん性色素斑やカフェオレ斑発症にも関与する可能性を示唆している。

これまでに、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たことから、何らかの細胞内シグナルの異常がカフェオレ斑の発症に関与している可能性は高い。しかし、健常ヒト表皮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。

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。

このように、これまでに得られたカフェオレ斑形成に至るシグナル伝達機構の断片的情報から得られた NF1 ノックダウン下流の関連遺伝子が、細胞モデル内で一連の流れとして位置づけられるかどうかは知られていない。NF1 ノックダウン細胞に類似した修飾を起こすような拮抗薬や刺激薬を培養ヒト正常メラノサイトに添加し、人工的に cAMP 活性や PARs シグナルを修飾したメラノサイトの遺伝子発現パターンをマイクロアレイ解析し、NF1 ノックダウン細胞での遺伝子発現変化と重複あるいは相違した部分を確認することが必要である。

本年度は、NF1 ノックダウン細胞のマイクロアレイ及び DNA/Protein マイクロアレイを用いた転写因子の活性化の側面からの解析実験の準備をするとともに、既知のヒト、マウスのメラノサイトに関して我々がこれまでに解析し、発表してきたデータを基にして、最新のデータ分析法を駆使して、既知の細胞内シグナルに関連付けを試みるために、階層クラスター解析、遺伝子機能アノテーション、パスウェイデータベース解析を行った。

## 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 (図1)。

刺激薬、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ウェブ上で公開されている、データベース解析プログラム The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 を用いて行った。

Panomics 社の Protein-DNA array kits I-V の中で、

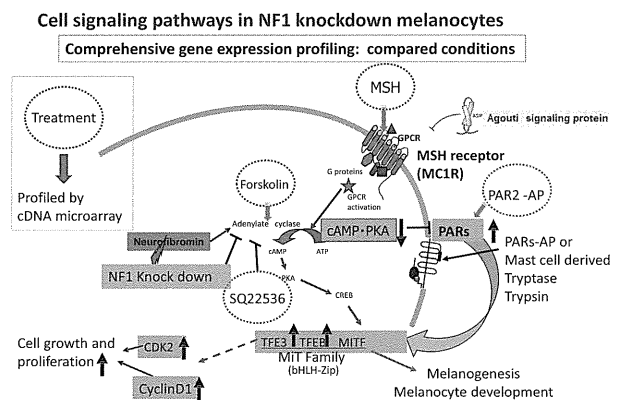


図 1

最もその機能が明らかにされている転写因子 345 種類の転写活性を包括的に解析するために、Protein/DNA combo array (345 種類のシスエレメントを搭載) を使用して、レンチウイルスを用いた、NF1 ノックダウンメラノサイトの核抽出液を精製し、ランダムシーケンス RNAi を発現させたものをコントロールにし、パイロットスタディーを開始した。

### 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 時間を、また阻害薬などの効果の持続性と細胞毒性の関係で長時間の経時的観察は難しいことが判明し、48 時間後について追加解析し、時系列で同じ傾向の発現変化が見られるものを抽出し、データマイニングした。

実験系の状況確認するための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。これまでの本研究の成果で確認された、TFEB の遺伝子発現比が、cAMP 刺激時に比較して、SQ22536、PAR2-AP 添加後 24 時間で約 2 倍の差で発現量が上昇していることで実験系が正しく機能していると判断した。

cAMP の活性化 (MSH と forskolin) により発現が亢進し、cAMP 阻害あるいは PAR2 の刺激による活性化にて発現が低下する遺伝子について、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、昨年と同様の階層化クラスタリング解析を行った。全検体で P、M フラグプローブを用いクラスタリングし、これまでの実験結果の予想通り、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することを確認し、さらに精度を確保するために同様のマイクロアレイ実験を繰り返し、DAVID 解析用のデータを収集した。

DAVID による遺伝子機能アノテーションの結果、表 1 に示されるようなシグナル経路が活性化されることが明らかになり、さらに興味深いことにこ

れまで我々が取り組んできたマウスメラノサイトにおける MSH レセプターに結合しその構成的活性を減寂させるインバースアゴニストのアゴウチシグナル蛋白 (図 1) で処理した細胞のマイクロアレイ解析による遺伝子機能アノテーションの結果<sup>2)</sup>と合わせて類似した結果 (表 1、図 2、3) が得られた。

### D. 考察

NF1 遺伝子産物 (neurofibromin) には RasGAP としての Ras の抑制機能以外に、adenylate cyclase の活性制御機能 (non-Ras function) があることが明らかにされ、この一見無関係なシグナルの生物進化における密接な関連を説明する理論も提唱されている<sup>3)</sup>。

メラノサイトでは、MSH レセプター (MC1R) への MSH の結合による adenylylase の活性化が cAMP シグナルを刺激し、その下流で Mit family のメラノサイト特異的転写因子である MITF 発現が亢進し、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。

NF1 ノックダウンメラノサイトで neurofibromin の発現が低下すると non-Ras function の低下により adenylylase 活性が低下し、下流の cAMP/PKA シグナル活性の抑制がみられる。

cAMP/PKA シグナルは定常状態で PARs シグナルを抑制するため、non-Ras function が低下すれば PARs は活性化される。

その結果、PARs による TFE3/TFEB の発現亢進、Wnt signal や Notch signal の活性化、cyclinD1 の発現亢進などにより、カフェオレ斑においてメラノサイトの細胞増殖が引き起こされる可能性が示唆された。

### E. 結論

今回の包括的な遺伝子発現解析で、Wnt signal や

表 1

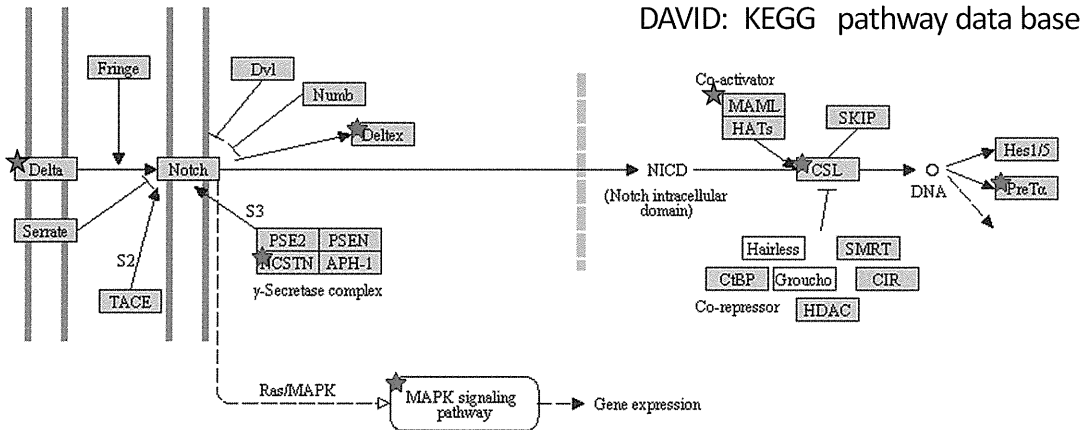
	Neurogenesis	Notch signal	Wnt signal
SQ22536 (Adenylylase inhibitor) or PAR-2 AP as a NF1 knockdown equivalent	↑	↑	→
Agouti signal protein (MSH-R inverse agonist)	↑	↑	↑
MSH Forskolin (Adenylylase activator)	↓	↓	↓



**Genes upregulated by SQ22536 or PAR2-AP in human skin melanocytes vs genes upregulated by agouti signaling protein in mouse melan-a melanocytes**

1. Genes involved in the development of the nervous system, and genes involved in neurogenesis, such as *ErbB3*, *Ablim1*, *Foxd1*, *Uchl1*, *Amigo1*, and *EphB2*, and genes involved in neuroapoptosis regulation.

2. NOTCH SIGNALING PATHWAY



4種類のコファクター蛋白(ニカストリン, プレゼニンなど)が  $\gamma$ セクレターゼを形成

図 2

**Genes downregulated by MSH or forskolin in human melanocytes vs genes upregulated by agouti signaling protein in mouse melan-a melanocytes**

Wnt signaling pathway genes

DAVID: KEGG pathway data base

Downregulated genes by

MSH

Forskolin

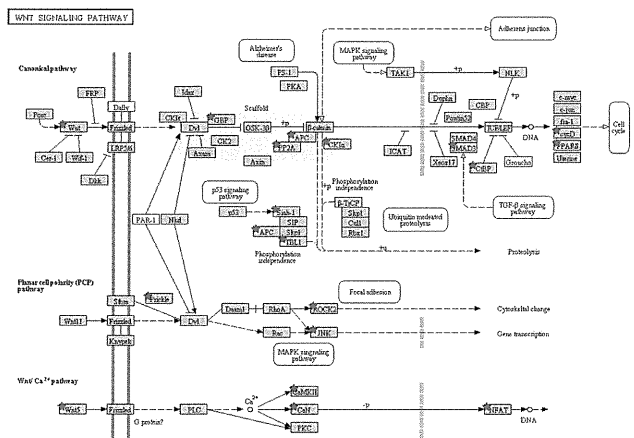
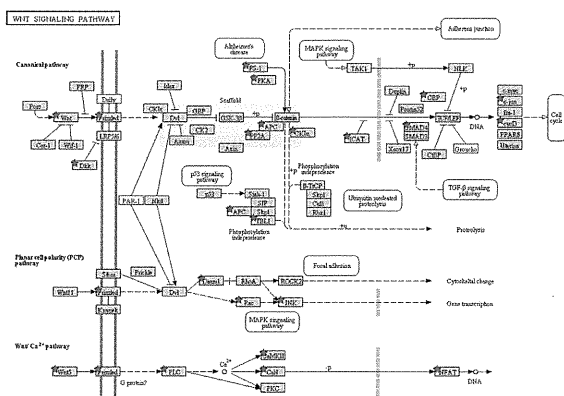


図 3

Notch signal の活性化、神経系組織の形成、神経細胞の分化増殖・アポトーシス制御に関与する遺伝子群の発現が NF1 の機能不全により影響を受ける可能性が、NF1 ノックダウンメラノサイトに準じた細胞シグナル修飾モデル細胞の遺伝子機能アノテーションを用いた検討にて新たに示された。

## 参考文献

- 1) Deo M, Huang JL, Fuchs H, de Angelis MH, Van Raamsdonk CD. Differential Effects of Neurofibromin Gene Dosage on Melanocyte Development. *J Invest Dermatol.* 133, 49-58, 2013
- 2) Le Pape E, 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* 106:1802-7, 2009
- 3) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernardis A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- 4) 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

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) 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. 古村南夫、日本レックリングハウゼン学会 第4回学術大会、2012年11月、東京

### 2. 論文発表

- 1) Yoshida Y, Furumura M, Tahira M, Horie T, Yamamoto O. Serum biomarker in neuro-fibromatosis type 1. *J Dermatol Sci* 67(2):155-8, 2012
- 2) Furumura M, Sato N, Kusaba N, Takagaki K, Nakayama J. Oral administration of French maritime pine bark extract (Flavangenol) improves clinical symptoms in photoaged facial skin. *Clin Interv Aging.* 7:275-86, 2012

## G. 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 院生  
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る。Neurofibromin の神経系細胞内機能とその欠損による細胞増殖や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 PC12 に及ぼす NGF による分化誘導への影響を解析し、生じた表現形の細胞内責任シグナル分子群を、iPEACH (データ統合マニング法) を用いた融合プロテオミクスによって詳細に検討した。siRNA により NF1 発現を抑制した PC12 は、神経突起伸長が経時的に阻害され、細胞骨格系の制御異常、運動能の亢進が観察された。NF1 発現抑制細胞およびコントロール細胞より蛋白質および mRNA を抽出し、iTRAQ、DNA array、2D-DIGE を組み合わせた融合プロテオミクスにより 3198 分子群を定量的に同定し、NF1 発現抑制細胞で有意に経時的発現変動した 97 分子のクラスター解析、および活性化分子ネットワークを検索した結果、Dynein IC2、GR、COX-1 の一連の特異的活性化シグナルネットワークが検出された。このシグナル経路に関わる各分子群の siRNA や阻害剤処理による検証実験の結果、NF1 発現抑制細胞では、Dynein IC2-B から IC2- へのスプライシングとリン酸化の亢進によって GR の核輸送が誘導され、その結果 COX-1 の発現を亢進させて NF1 の病態と関わっていることが判明した。興味深いことに、NF1 欠損 PC12 細胞において、この COX-1 の過剰発現を抑制したところ、神経突起伸長阻害が回復して分化異常が正常化することが判明し、NF1 病態の新たな治療ターゲットとなることが示唆された。神経線維腫症 I 型で生じる神経系分化異常を始めとした多彩な症状の発症は、これらのシグナルの制御異常に関与している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

神経線維腫症 1 型は、多発性神経線維腫や骨形成不全、悪性腫瘍、学習障害を始め多彩な病態を示す遺伝性疾患である。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。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や神経系細胞分化異常が大きく NF1 病態に関与していることが知られているが、多彩な NF1 の病態メカニズムの解明には全く至っておらず、本病態の根治療法は存在しない。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ことが推測されている。本研究では、ニューロフィブロミンの細胞内機能とその欠損によるNF1の病態（学習機能障害や神経線維腫形成等）の関連性を明らかにするために、NF1病態モデルPC12細胞を用いた融合プロテオミクス法によって、神経細胞様分化過程において病態細胞内で起こる異常なシグナルネットワークを網羅的に分子レベルで抽出することを目的とした。得られた結果から治療ターゲットとなる分子群の絞り込みを行い、詳細な細胞生物学的検証を行った。

## B. 研究方法

siRNAによるNF1発現を抑制したNF1病態モデルPC12細胞と、コントロール細胞によりサンプル（蛋白質およびmRNA）を調製し、二次元電気泳動をベースとした2D-DIGE、iTRAQを用いたLC-MALDI-およびLC-ESI-MS/MS解析、およびマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を同時に行い、網羅的遺伝子・蛋白質発現および翻訳後修飾情報を取得した。それら全ての同定結果をデータマイニングソフトiPEACHにより統合し、統計解析マイニングソフトsubioを用いたクラスター解析によってNF1病態関連分子群の抽出を行った。これら分子ネットワークソフトKeymolnetにより、NF1ノックダウン細胞で異常な挙動を示すシグナル分子群の抽出を試みた（Fig. 1）。各手法で検出したプロテオミクスとトランスクリプトームデータを各

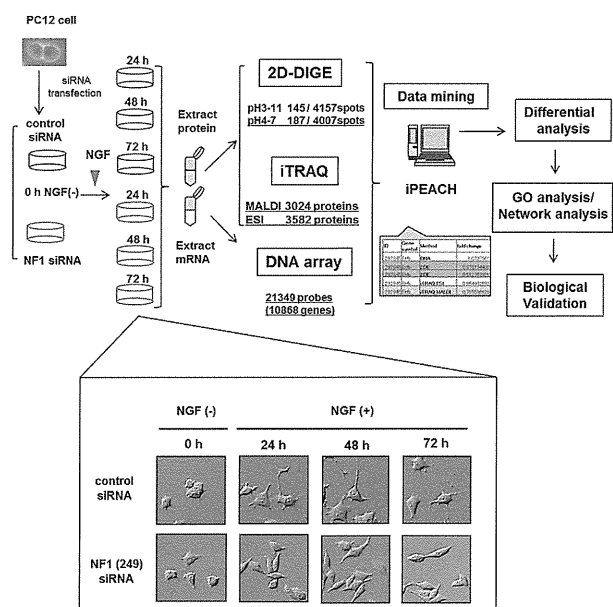


Fig. 1 NF1-KD PC12細胞における異常なシグナルネットワーク同定のための融合プロテオミクス法のワークフロー

タイムポイントにおけるcontrolに対するsiNF1の比の値を算出し、iPEACHを用いて統合を行いData Baseを構築した。

## C. 研究結果

### 1. 融合プロテオミクス法によるNF1病態関連分子群の同定

各手法により同定された総分子の内、タンパク質(iTRAQと2D-DIGE)とDNAの両方で3193分子が共通してすべての時間帯で定量データを有していた(Fig. 2-A)。このうち、プロテオミクスによって得られたデータに焦点をあて、クラスター解析を行った。iTRAQでは、MALDIとESIの両方の解析で増加(1.2倍以上)または減少(0.83以下)したタンパ

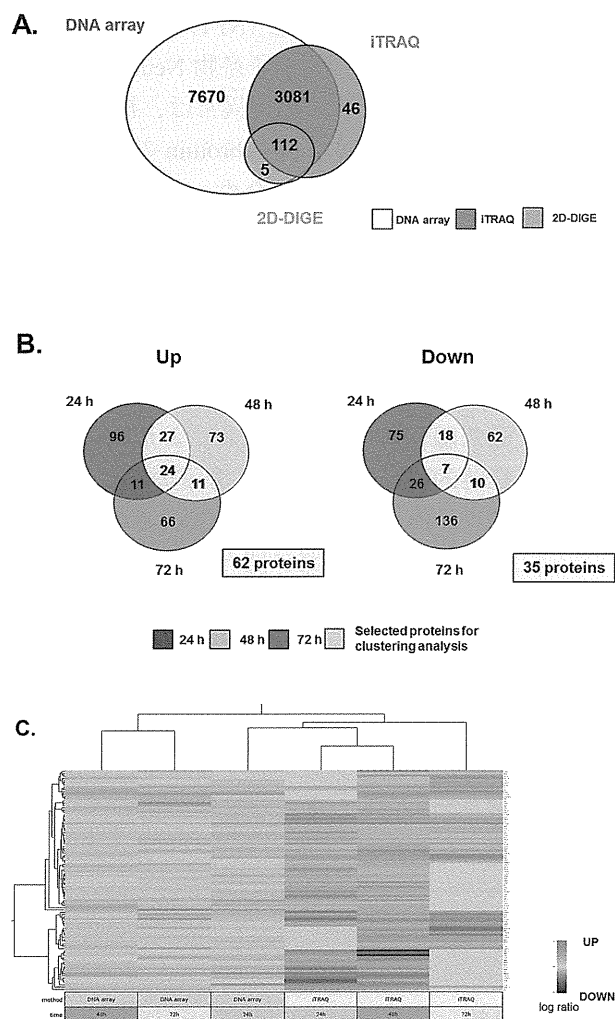


Fig. 2 融合プロテオミクス法より得た結果より抽出した発現量に変動がある分子群のクラスター解析とパスウェイ解析：A. 2D-DIGE, iTRAQ, and DNA arrayによって同定した全遺伝子/タンパク質数のベン図：B. iTRAQ法によって同定された増加/減少したタンパク質数のベン図：C. iTRAQ法で得たデータより抽出した発現量に変動がある97分子群の発現量のクラスター解析