

図1 患者数 (年度別)

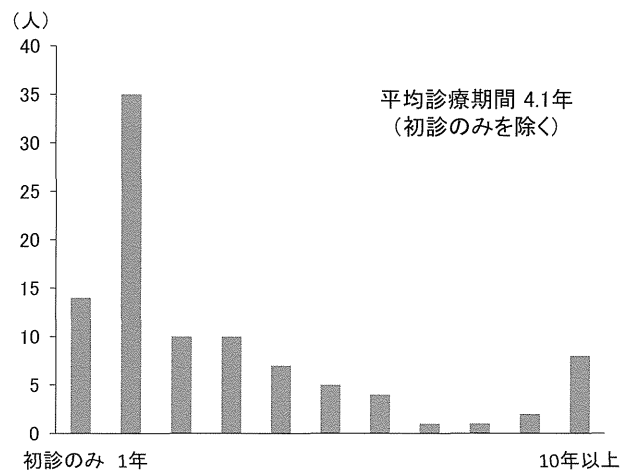


図4 診療期間

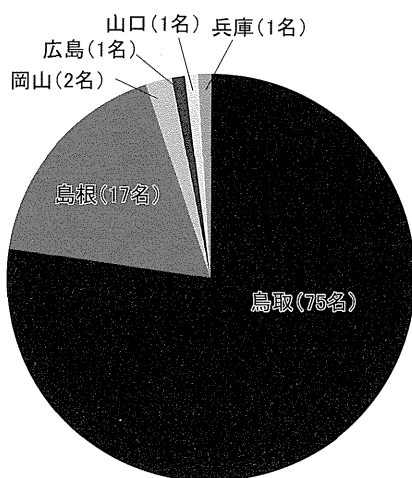


図2 患者数 (県別)

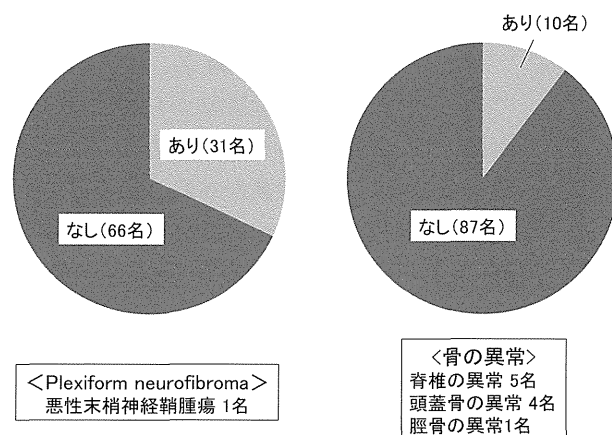


図5 合併症状

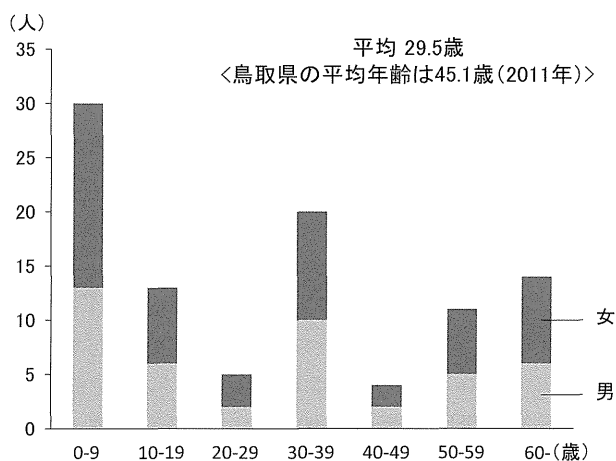


図3 年齢分布

では過去の報告と比較して差はなかった。

初診のみの患者の割合は、14.4%で、初診のみを除いた患者の平均診療期間は4.1年であった(図4)。

症状については、plexiform neurofibroma の合併は31名(32.0%)、骨の異常は10名(10.3%)にみられた(図5)。悪性腫瘍の合併は6名(6.2%)で、脳腫瘍2名、視神経膠腫1名、悪性末梢神経鞘腫瘍1名、肺がん1名、悪性黒色腫1名であった。いわゆるモザイク患者は11名(11.3%)であり、その内訳は色素斑のみ:7名、神経線維腫のみ:1名、色素斑+神経線維腫:2名、色素斑+びまん性神経線維腫:1名であった。特定疾患公費認定患者は26名(26.8%)であった。

治療については41名(42.3%)の患者に外科的治療が行われており、平均手術回数は2.0回であった。

D. 考察

NF1においては過去に定期的な疫学調査が行われており、本邦での患者数は約4万人と推測されている。しかしながら、人口の高齢化とともに患者の社会的状況は徐々に変化している。これまでの調査では、臨床個人調査票をもとにした疫学調査が行わ

れてきたが、その大半は stage 4 もしくは 5 の重症患者への偏りがあり、すべての患者の状況を把握するのが難しい状況であった。また、定期的に全国定点調査も行われているが、すべての診療科を対象としているため、専門医による NF1 の確定診断が行われていないこと、また個人情報保護の問題もあり、近年その調査が難しくなっている。

2009 年に都市部での NF1 患者の現状については、福岡大学病院からの報告があるが、過去に過疎地域における NF1 患者に対する報告はなかった。そこで今回我々は山陰地方における NF1 患者の調査を行った。

その結果、近年受診患者が増加しており、都市部の報告と比較して受診患者数に差はないことが分かった。また、ほとんど患者が自県もしくは近隣県から受診していた。さらに、受診患者の年齢分布は 9 歳以下の患者が最も多かった。この理由として、情報化社会となり、過疎地であっても患者もしくはその家族が早期からインターネット等で NF1 の疑いを持ち、病院を受診しているのではないかと推測された。

山陰地方ではもともと都市部と比較して高齢者の人口比率が高いため、受診患者の平均年齢はやや高い傾向にあったが、症状、重症患者の割合（公費認定患者）、治療についてはそのいずれも過去の報告と比較して、大きな差はみられず、都市部と過疎地において NF1 の患者層に違いはないものと考えられた。

E. 結論

本研究により、山陰地方における NF1 患者の現状が明らかになった。今後も定期的に調査を行い、年次的な変化や都市部との比較を行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 後藤寛之、足立孝司、吉田雄一、山元 修：小児に生じた solitary neurofibroma の 1 例. 日小皮会誌 32(1): 63-66, 2013
- 2) 吉田雄一、山田七子、山元 修：悪性末梢神経鞘腫瘍との鑑別を要した神経線維腫症 1 型モザイクに生じたリュプロレリン肉芽腫. 日レ病会誌 4(1): 37-40, 2013
- 3) 吉田雄一：37 神経線維腫症 1 型. 皮膚科臨床アセット 15 母斑と母斑症（編集：古江増隆、金田眞理）、中山書店, 2013, p164-170
- 4) 吉田雄一：Column: MPNST. 皮膚科臨床アセット 15 母斑と母斑症（編集：古江増隆、金田眞理）、中山書店、2013, p171-172

2. 学会発表

- 1) 吉田雄一. レックリングハウゼン病の診断と治療（現状と最近の知見について）. 2012 年度神経線維腫症 1 型（レックリングハウゼン病）講演会 2 月 23 日 2013 年 東京
- 2) 吉田雄一. 神経線維腫症 1 型の診断と治療. 第 112 回日本皮膚科学会総会 6 月 15 日 2013 年 横浜
- 3) 江原由布子、吉田雄一、山元 修. 神経線維腫症 1 型（NF1）に生じた Epstein-Barr virus（EBV）関連血球貪食性リンパ組織球症（hemophagocytic lymphohistiocytosis: HLH）の 1 例. 第 5 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 10 月 20 日 2013 年 東京
- 4) 丸岡 亮、武内俊樹、鳥居千春、森山啓司、吉田雄一、太田有史、小崎健次郎. 次世代シーケンサーを用いた NF1 遺伝子診断法の確立. 第 5 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 10 月 20 日 2013 年 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

NF1 遺伝子産物の細胞内シグナル解析と腫瘍形成機序の研究

研究分担者 佐谷秀行 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型 (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。NF1 は *NF1* 遺伝子の変異で生じる疾患である。これまでに *NF1* ノックアウトマウスを中心としたモデル生物が作成され、疾病発症機構の解明ならびに新規治療薬の薬効評価に用いられてきた。今回マウスと比較してより簡便に薬剤スクリーニングが可能なメダカに着目して NF1 モデルメダカ作成を試みた。

A. 研究目的

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、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。*NF1* 遺伝子の変異は結果的にニューロフィブロミンに異常をもたらし、細胞内の Ras 活性を上昇させる。この Ras 活性の上昇が、多彩な NF1 の症候を引き起こす重要な原因の一つと考えられている。しかし NF1 の発症機構は非常に複雑であり、その詳細を明らかにするために欧米を中心に NF1 モデルマウスが作成され精力的に解析が進められている。現在 NF1 マウスは両アレル喪失による発生初期異常を回避するために NF1^{Flox/Flox} と標的細胞特異的発現プロモーターで Cre を駆動させるトランスジェニックを組み合わせたものが頻用されている。このような状況のなか、欧米に追随するのではなく日本独自の NF1 モデル生物を創出することを考え我々はメダカに着目した。メダカは日本を含むアジア地域に生息する淡水魚で、マウスと同じく脊椎動物門に属している。メダカの利点の一つは日本メダカ研究の先達らの努力により多くの近交系が存在することが挙げられる。NF1 発症機構の遺伝学的解析を試みる場合に近交系の有無は非常に重要であると考えられる。またメダカは人工的な条件下で飼育すると成熟メスがほぼ毎日 10-30 個産卵する。

この多産性は新規薬剤スクリーニングなどのハイスループット解析においても威力を発揮することが予想される。これらの利点を踏まえ我々は新規 NF1 モデルメダカの作出を試みており、これまでの進行状況を報告する。

B. 研究方法

基礎生物学研究所のメダカバイオリソース研究室に寄託されている TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome) ライブラリよりメダカ *nf1* 遺伝子に変異を持つクローンを HRM (High Temperature Melting) 法を用いてスクリーニングした (図 1)。HRM の標的部位はメダカ Ras-GAP 相同領域を設定した。得られた候補部位は直接シーケンスにて変異の有無を確認した後、凍結保存した精子を用いて体外受精し個体を作成した。変異個体は Cab 系統 (Keio-Cab) と F5 まで戻し交配したものを解析に用いた。

C. 研究結果

メダカ Ras-GAP 相同領域を含む exon27-28 に HRM プライマーを設定して約 6000 クローンをスクリーニングした結果 2 つのミスセンス変異体を得た (c.3524C>T, p.T1157I; c.3649T>A, p.F1217I)。ナンセンス変異体は得られなかった。2 つの変異体うち c.3649T>A (p.F1217I) は野生型 Keio-Cab でも同

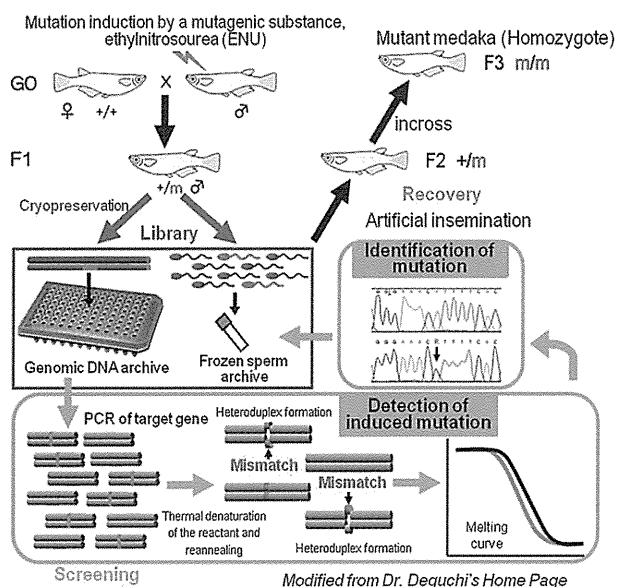


図1 TILLING ライブラリより変異体取得までの流れ (NBRP Medaka Web ページより抜粋)
<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/strain/aboutTilling.jsp>

様な塩基変化を認めたため、SNP の可能性を疑い以後c.3524C>T (pT1157I) のみの解析を行った。まず最初に NF1 患者に同様な変異が存在するか否かを HGMD (The Human Genome Mutation Database) に収録されている既知の変異と比較した。メダカ T1175 に相当するヒトアミノ酸残基は T1245 で NF1 患者に同部位の変異の報告はなかった。しかし近傍の L1243P, R1250P などにミスセンス変異が存在することから T1157I 変異がメダカ *nf1* の Ras-GAP 活性に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。実際にメダカ脳組織を用いたウエスタンブロットで野生型と比較してホモ変異組織では活性化ERK、AKT が増加していることを確認している。

次に F5 ヘテロ変異を交配して産子の割合を検討してみたところ、ホモ変異メダカはほぼメンデル則に従って誕生した。またホモ、ヘテロ変異とも野生型と比べ生存率に有意な差を認めなかった ($p=0.783$) (図 2A)。しかし 6 か月齢のホモ変異メダカの 30% (6/20 匹) に皮下腫瘍を認め (図 2B)、同部は S-100 抗体染色陽性であった (図 3)。

D. 考察

nf1 蛋白 Ras-GAP 相同領域にミスセンス変異を有するメダカライン (F5) を TILLING ライブラリより樹立した。c.3524C>T (pT1157I) に相当するヒト T1245 は GAP 機能の活性中心である Arginin finger R1276 に近接している。ヒトで報告されている L1243P, R1250P などの変異は、アミノ酸立体構

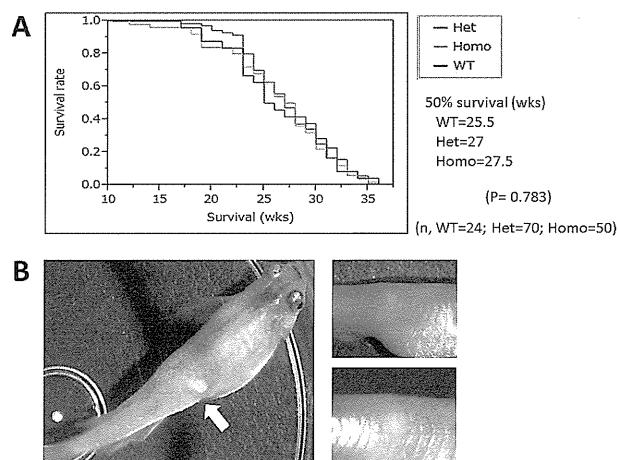


図2 A. NF1 変異メダカの生存曲線 B. NF1 ホモ変異メダカに生じた皮下腫瘍 (6 か月齢)。



図3 NF1 ホモ変異メダカ皮下腫瘍の H&E、免疫染色像

造の変化を引き起こし Arginin finger の不安定化をもたらすことが予想されている。ヒトとメダカの Ras-GAP 相同領域は高度に保存されている (identity, 91%) ことから今回得られた変異体でも同様な異常をきたしていると考えられる。ホモ変異体神経組織では野生型に比べ Ras シグナルの下流である MAPK、PI3K 経路の活性増強が見られていることもこの仮説を支持する。

E. 結論

今回樹立した Ras-GAP 相同領域ミスセンス変異体メダカは新しい NF1 モデル生物となり得る可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

國仲慎治、松崎ゆり子、亀井保博、谷口善仁、佐谷秀行. TILLING ライブラリより取得した *neurofibromatosis1 (nf1)* 変異メダカの解析. 第

30回日本癌学会学術総会. 2013年10月4日.
横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

インターフェロン β に対する悪性末梢神経鞘腫瘍の感受性 —in vitro における解析—

研究分担者 中川秀己 東京慈恵会医科大学皮膚科教授

研究要旨

神経線維腫症1型患者の数パーセントに悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）が発生する。局所症状によりQOLを損なう症例もよく経験されることから、局所制御の方策が求められている。インターフェロン β （IFN- β ）の局所投与を想定して、in vitro でMPNST細胞に対する効果を検討した。感受性のある悪性黒色腫細胞と比較して同程度に抑制されるMPNST細胞が存在した。また、アポトーシスに重要な分子をコードしているIRF1およびTRAIL遺伝子の発現は感受性株でIFN- β により顕著に誘導された。今回の研究で、MPNSTの局所制御にIFN- β の局所投与が有効である可能性が示唆された。

延山嘉眞、谷戸克己、太田有史

東京慈恵会医科大学皮膚科

A. 研究目的

神経線維腫症1型の患者の数パーセントに悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）が発生する。局所症状によりQOLを損なう症例もよく経験されることから、局所制御の方策が求められている。今回は、本邦の保険上、悪性黒色腫で認められているインターフェロン β （IFN- β ）の局所投与を想定し、in vitro でMPNSTに対する効果を検討した。

IFN- β を含む1型インターフェロンの直接的作用として腫瘍細胞の細胞周期停止やアポトーシスを誘導する作用が指摘されている。この直接的作用において、IFN- β 受容体からIRF1を介してカスパーゼを活性化する経路、TRAILが受容体を介してカスパーゼを活性化する経路が抗腫瘍効果に影響を与える可能性が指摘されている。今回の研究では、MPNSTに対する直接的抗腫瘍効果があるかをin vitro で検討し、感受性のある細胞と抵抗性の細胞において、IRF1およびTRAIL遺伝子の発現量をmRNAレベルで検討した。

B. 研究方法

細胞を播種したのち、24時間と72時間で、 1×10^2 IU/ml、 1×10^3 IU/ml、 1×10^4 IU/mlのIFN- β で処理した。抑制率は、生存している処理細胞数を生存している非処理細胞数で除して、1より引いた数値と定義した。発現はreal-time reverse transcription-PCRにて定量した。

C. 研究結果

IFN- β で処理した場合、感受性の高い悪性黒色腫細胞株と比較して同程度に抑制されるMPNST細胞が存在した（図1）。IRF1とTRAIL遺伝子は悪性黒色腫細胞と同様、MPNST細胞でも感受性が高い細胞において、発現誘導が顕著にみられる傾向がみられた（図2）。

D. 考察

本研究では、in vitro で悪性黒色腫細胞と同程度に、IFN- β により増殖が抑制されるMPNST細胞が存在することが示された。感受性株は耐性株に比べて、アポトーシスに重要な役割を持つ分子であるIRF1やTRAILをコードしている遺伝子の発現誘導が顕著にみられることが示された。これらの遺伝子のIFN- β に対する発現誘導の程度が、MPNST細胞

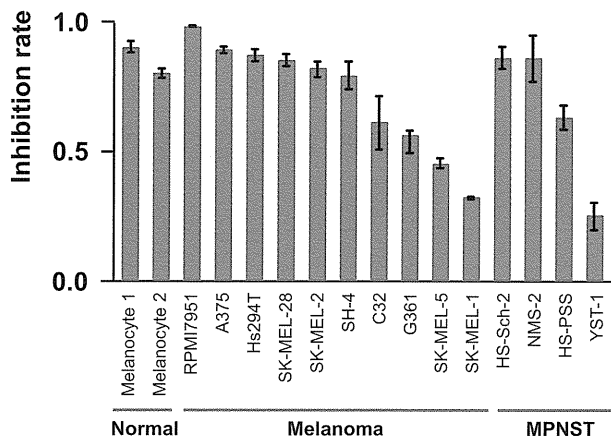


図1 例：IFN-β (1 × 10³ IU/ml) 処理による抑制

の IFN-β に対する感受性を決定する因子である可能性がある。

E. 結論

MPNST の局所制御に IFN-β の局所投与が有効である可能性がある。

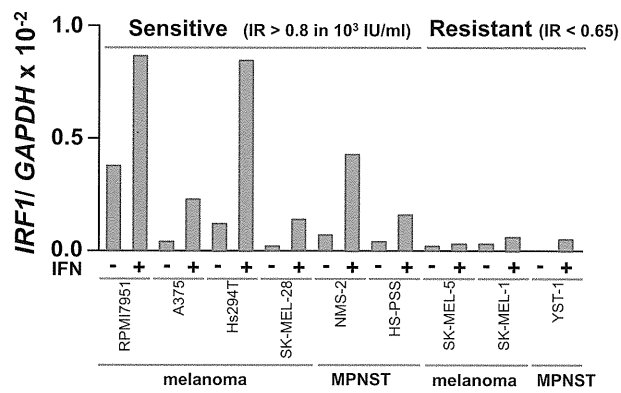


図2 例：IRF1 遺伝子の発現

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

IFN-β に対する悪性末梢神経鞘腫瘍の感受性-in vitro での解析-2013年、於：福岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経系細胞増殖に関わる新規 NF1 関連シグナル TCTP-mTOR の相互調節機構の解析

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る。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、NF1 発現抑制モデル細胞を構築し、生じた表現形の細胞内責任シグナル分子群を、独自に開発した 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。その結果、NF1 発現抑制によって特異的に発現変動を示す 112 種の蛋白質を特定し、これらの形成する腫瘍関連ネットワークのなかで、mTOR 経路調節因子である TCTP (Translationally controlled tumour protein) の関わる新規ネットワークに注目した。NF1 腫瘍起源細胞である培養シュワン細胞内の NF1 発現を抑制したところ、有意に TCTP の発現が亢進し、特に成長因子の刺激は、MAPK や PI3K-AKT シグナルを介して顕著に TCTP の発現を亢進した。NF1 腫瘍患者組織における TCTP の発現は、NF1 腫瘍の悪性度に相関し、特に悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) においては顕著であった。また、MPNST 細胞内において、TCTP の発現は mTOR の活性化によって翻訳レベルで正に制御されることが明らかとなった。NF1 腫瘍細胞の TCTP 発現抑制により、細胞サイズの縮小、mTOR シグナル抑制、および生存能の低下が観察された。さらに、TCTP を分解するアーテスネート (ART) の抗腫瘍効果を検討した結果、MPNST 細胞の ART 感受性は TCTP の発現抑制によって増大し、過剰発現により減弱すること、さらに mTOR 阻害剤ラパマイシンとの併用により NF1 腫瘍に対する抗腫瘍効果が増大することが判明した。以上の結果より、新規 NF1 腫瘍関連分子 TCTP は mTOR の上流および下流で NF1 腫瘍の増殖や悪性化に関わっており、これを制御する事で NF1 腫瘍が抑制されることが示唆された。

小林大樹

熊本大学大学院生命科学研究
部腫瘍医学分野

倉持 朗

埼玉医科大学皮膚科学教授

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NF1の病態（多発性神経線維腫形成）との関連性を明らかにするために、NF1発現抑制によって、発現変動する分子群を融合プロテオミクス法により同定し、特にNF1細胞増殖に関わる新規ネットワークTCTP-mTORシグナルに注目して詳細な解析を行った。

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（図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を用いて統合を行った。

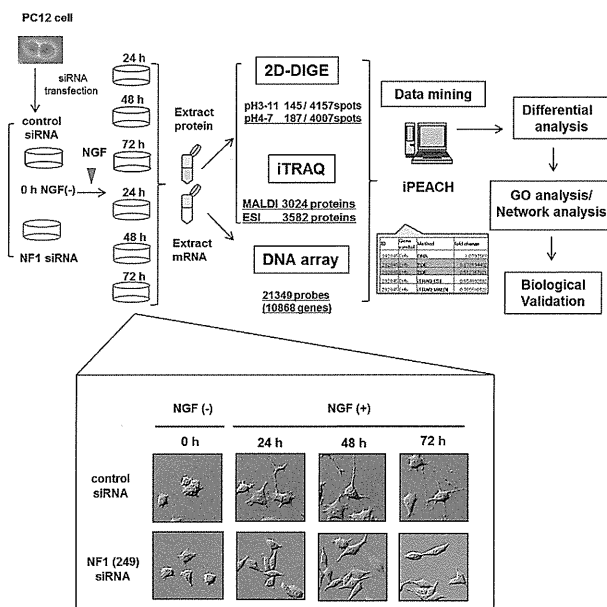


図1 NF1-KD PC12細胞における異常なシグナルネットワーク同定のための融合プロテオミクス法のワークフロー

C. 研究結果

1. 融合プロテオミクス法によるNF1病態関連分子ネットワークの同定

融合プロテオミクス法の各手法による解析の結果、DNA arrayでは21349プローブ（10868遺伝子）、iTRAQでは3189タンパク質、2D-DIGEでは2way-ANOVA解析を行い、NF1ノックダウンにより有意に発現変動した332spotsを同定した。各解析の分子データをデータマイニングソフトiPEACHによって統合し、総計10926分子の発現情報の取得に成功した（図2）。これら分子の情報からデータマイニングソフトSubioを用いてNF1発現抑制およびNGF刺激によって特異的な発現誘導を示す112種の蛋白質を抽出し、分子パスウェイ解析ソフトKeymolnetによりNF1新規病態関連分子ネットワークの探索を試みた。これらには新規の腫瘍関連ネットワーク分子の上昇、特にmTOR経路調節因子であるTCTP等が含まれており、これらが総合的にNF1に関わる細胞分化増殖異常に関連すると考えられた（図3）。

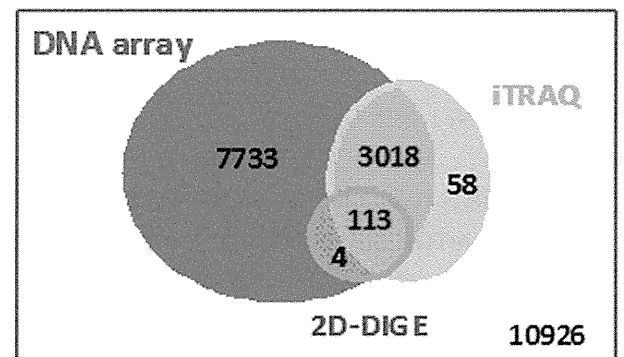


図2 融合プロテオミクスにより同定された総分子数（10926分子）

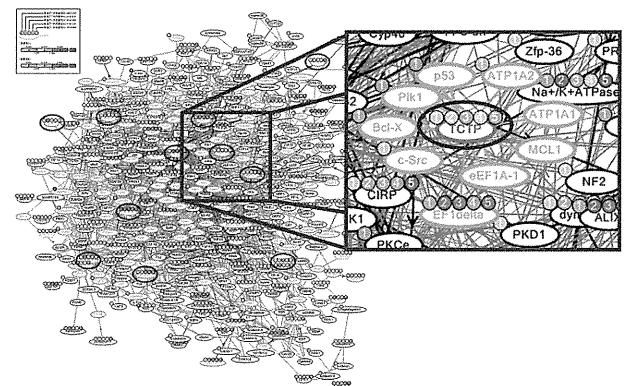


図3 112発現上昇分子群から抽出したTCTPを中心としたNF1新規病態関連分子ネットワーク

2. NF1 腫瘍における TCTP の発現

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、NF1 腫瘍である皮下神経線維腫、網状神経線維腫および悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) の3種の腫瘍組織内における TCTP の発現状態を、免疫組織染色により解析した。その結果、TCTP の発現は組織の悪性度に相関して、高くなる傾向にあることから、TCTP は、神経線維腫の悪性化の指標として有用であることが示唆された (図4)。

次に NF1 遺伝子機能が TCTP の発現に及ぼす影響を検討するため、NF1 の Ras を負に制御する GAP 関連領域 (GRD) を MPNST 由来の培養細胞内に過剰発現させ、TCTP の発現を評価した。その結果、GRD の過剰発現によって MAPK、PI3K-AKT 経路の活性低下が誘導され、それに伴い、TCTP の発現が減少することが判明した。さらに、MEK、PI3K を阻害することによっても TCTP の発現が減少することを見出した。また、TCTP の発現減少は、mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路の活性低下に伴って起こることが示唆された。TCTP の mRNA の 5' 末端の配列には 5'-末端オリゴピリミジン領域が存在することが想定されていることから、TCTP は mTOR 活性による正の翻訳制御を受けることが考えられるため、MPNST 細胞の mTOR 活性の

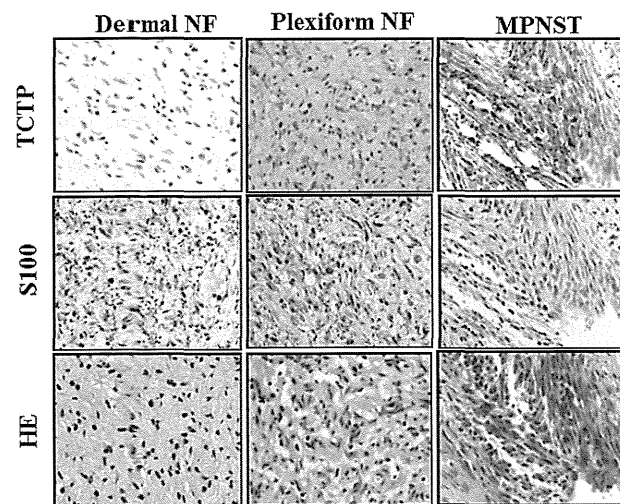


図4 悪性度の異なる神経線維腫内の TCTP 発現の免疫染色法による評価 (検体数 20 の代表例)

ラパマイシンによる阻害が TCTP に及ぼす影響を検討した。その結果、ラパマイシン処理により TCTP の発現は翻訳レベルで減少することが明らかとなった (図5)。以上の結果、MPNST 細胞内において Ras-MAPK, および PI3K-AKT を介した mTOR の活性化が TCTP の発現上昇に寄与していることが判明した。

3. MPNST 細胞内における TCTP の役割

TCTP の MPNST 細胞内における機能を検討するため、siRNA によって TCTP の発現を抑制し、その表現型を検証した。TCTP の発現抑制によって、MPNST 細胞の生存能は低下し、さらに細胞サイズの低下を引き起こしていることが明らかとなった (図6)。TCTP は細胞サイズの調節に密接に関わっている mTOR 経路を正に制御していることが報告されていることから、TCTP の mTOR 経路の下流である S6 のリン酸化レベルへの寄与について検討したところ、TCTP 発現抑制が S6 のリン酸化レベルを低下させることが明らかとなった (図6)。以上の結果から、TCTP は MPNST 細胞のサイズ、および mTOR 経路を正に制御し、細胞の増殖を促進していることが明らかとなった。

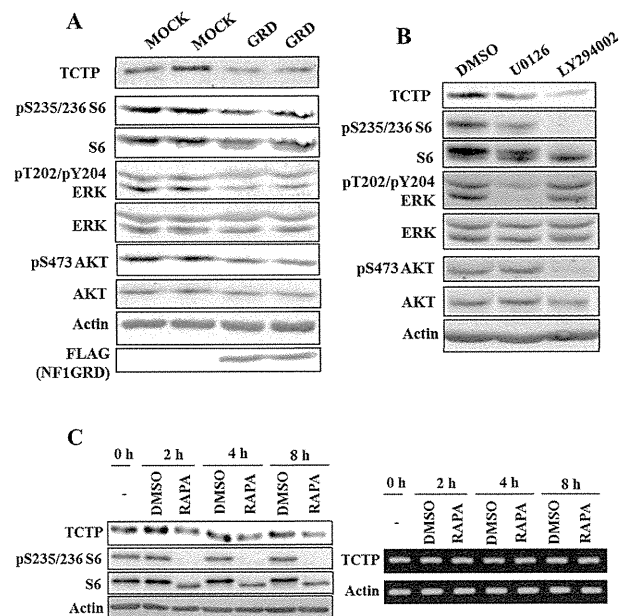


図5 MPNST 細胞 (sNF96.2) 内における TCTP 発現上昇メカニズムの検証. A. NF1-GRD 領域を導入した MPNST 細胞内の TCTP 発現のウエスタンブロット解析による評価. B. MEK、PI3K を阻害した MPNST 細胞内の TCTP 発現のウエスタンブロット解析による評価. C. mTOR を阻害した MPNST 細胞内の TCTP 発現のウエスタンブロットおよび RT-PCR 解析による評価

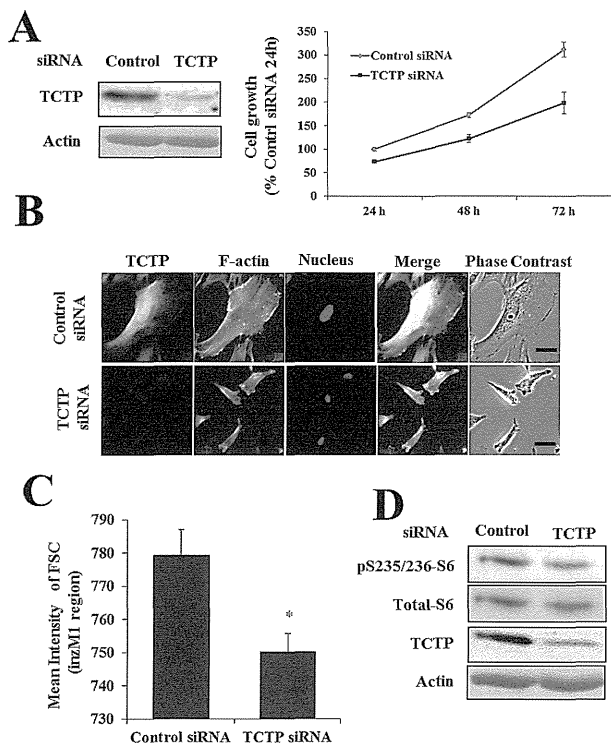


図6 MPNST細胞(sNF96.2)内におけるTCTPの役割の検証。A. siRNAによってTCTP発現を抑制したMPNST細胞の増殖能の評価。B. TCTPを発現抑制したMPNST細胞の表現型の評価。C. フローサイトメーターによるTCTP発現抑制MPNST細胞のサイズの評価。D. TCTPを発現抑制したMPNST細胞のS6活性化レベルのウェスタンブロットによる評価

D. 考察

NF1の機能破綻によりRas-MAPK、PI3K-AKTシグナルを介して活性化したmTOR経路による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、NF1の腫瘍化を引き起こす要因の一つと考えられ、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有効であることが示唆された。

E. 結論

プロテオミクス手法を用いた解析により、NF1機能を欠損させた細胞内で、TCTPを中心とする分子ネットワークが活性化していることを見出した。さらに、NF1腫瘍の悪性化に相関してTCTPの発現は上昇し、MPNST細胞内でRas-MAPK、およびPI3K-AKTを介したmTORの活性化がTCTP発現上昇に寄与していることが判明した。また、TCTPはMPNST細胞のサイズ、およびmTOR経路を正に制御し、細胞の増殖を促進していることが明らかとなった。これらのことより、TCTPの分解を促進して、細胞増殖を抑制するARTとmTOR阻害剤の併

用によるNF1腫瘍治療への有用性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nambu NA, Midorikawa U, Mizuguchi S, Hide T, Nagai M, Komohara Y, Nagayama M, Hirayama M, Kobayashi D, Tsubota N, Takezaki T, Makino K, Nakamura H, Takeya M, Kuratsu J and Araki N. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin αV . PLOS ONE, 2013 8(5):e59558,
- 2) Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Wilson MM, Nambu NA, Yoshizawa A, Kawano S, and Araki N. Integrated proteomics identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. Molecular & Cellular Proteomics, 2013 12(5):1377-1394
- 3) Nitta H, Wada Y, Kawano Y, Murakami Y, Irie A, Taniguchi K, Kikuchi K, Yamada G, Suzuki K, Honda J, Wilson MM, Araki N, Eto M, Baba H and Imamura T. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). Clinical Cancer Research, 2013, 19(8); 1-10
- 4) Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, Narimatsu H, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S*. CA-S27: A novel Lewis A associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. Cancer Sci. 2013; 104(10):1278-84
- 5) Kuwano Y, Yoneda K, Kawaguchi Y, Araki N, Araki T. The complete amino acid sequence, and enzymatic properties of an i-type lysozyme isolated from the common orient clam (Meretrix lusoria) Bioscience Biotechnology, and Biochemistry, 2013 77(11):2269-77.
- 6) Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Kodera Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, Goshima N. Integrated View of the Human Chromosome X-centric Proteome Project. J Proteome Res. 2013;12:58-61.
- 7) Shimada H, Nambu-Niibori A, Wilson-Morifuji M, Mizuguchi S, Araki N, Mezaki Y, Senoo H, Ishikawa K, Okamoto O, Fujiwara S. Epiplakin

modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters. *J.Dermatol.*2013 40(4):249-5

- 8) 荒木令江 プロテオミクス辞典、プロテオーム学会編、講談社 全 130 頁 2013 年
- 9) 荒木令江 神経線維腫症 2 型、『診療最前線の母班と母班症』、皮膚科臨床アセット 15、金田眞理編集 中山書店、pp181-189, 2013 年

②学会発表

- 1) 融合プロテオミクスによる癌特異的分子の統合的解析. 荒木令江. 産業総合技術研究所セミナー (つくば)平成 25 年 3 月 28 日
- 2) 融合プロテオミクスによる異常病態シグナル検出システムの開発と応用. 荒木令江. *BIO Tech* 2013 第 12 回国際バイオテクノロジー展/技術会議 (東京ビッグサイト)平成 25 年 5 月 8 日～10 日
- 3) 融合プロテオミクスによるがん細胞およびがん幹細胞の悪性化ネットワーク抽出と治療ターゲットの検索. 荒木令江. 第 40 回BMS (Biological Mass Spectrometry) コンファレンス招待講演 (シーガイア コンベンションセンター & シェラトングランデオーシャンリゾート・宮崎)平成 25 年 7 月 8～9 日
- 4) 神経系腫瘍の発症メカニズムと治療ターゲットの融合プロテオミクスによる解析. 荒木令江. 宮崎大学医学部脳神経外科学セミナー講演 (宮崎大学医学部脳外科学・宮崎)平成 25 年 7 月 10 日
- 5) 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化ニッチと悪性化メカニズムの解析. 荒木令江、南部 (新堀) 晶子、緑川宇一、小林大樹、水口惣平、永井美奈子、秀拓一郎、中村英夫、倉津純一. 第 84 回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜) 2013 年 09 月 11 日～2013 年 09 月 13 日
- 6) 融合プロテオミクスによる神経線維腫症I型 (NF1) 病態モデル細胞内活性化シグナル Dynein IC2-GR-COX-1 の同定. 小林大樹、平山未央、水口惣平、森川 崇、長山 慈、緑川宇一、ウィルソン-森藤政代、南部-新堀晶子、吉沢晶康、河野 信、荒木令江. 第 84 回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜) 2013 年 09 月 11 日～2013 年 09 月 13 日
- 7) 全自動 2 次元電気泳動装置を用いた前立腺がんマーカータンパク質の解析. 西村宗徳、小林大樹、緑川宇一、長山 慈、村上洋嗣、河野吉昭、今村隆寿、和田孝浩、鷗沼 豊、荒木令江. 第 84 回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜) 2013 年 09 月 14 日～2013 年 09 月 18 日
- 8) Integrated Proteomics for the Study of Metastatic Human Tongue Cancer Development in a heterogeneous Microenvironment. Masayo Wilson Morifuji, Akiko Niibori Nambu, daiki kobayashi, Norie Araki. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama) 2013 年 09 月 14 日～2013 年 09 月 18 日
- 9) An Integrated Proteomics for Extracting Molecular Target of Malignant Gliomas. Norie Araki, Takashi Morikawa, Souhei Mizuguchi, Daiki Kobayashi, Akiko Niibori Nambu, Uichi Midorikawa, Mio Hirayama, Masayo morifuji Wilson, Sin Kawano, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama) 2013 年 09 月 11 日～13 日
- 10) Integrated Proteomics for the Study of Metastatic Human Tongue Cancer Development in a heterogeneous Microenvironment. Masayo Wilson Morifuji, Akiko Niibori Nambu, daiki kobayashi, Norie Araki. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama) 2013 年 09 月 11 日～13 日
- 11) Integrated Proteomics Identified Novel Activation of Dynein IC2-GR-COX-1 Signaling by Suppression of NF1 Tumor Suppressor Gene Product, Neurofibromin, in Neuronal Cells.. Daiki Kobayashi, Mio Hirayama, Souhei Mizuguchi Takashi Morikawa, Megumi Nagayama, Uichi Midorikawa, Masayo Wilson-Morifuji, Akiko Nambu-Niibori, Akiyasu Yoshizawa C., Shin Kawano, Norie Araki. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama) 2013 年 9 月 14 日～18 日
- 12) Integrated Proteomics Identified the Differentiation Niche Induced by glioma Stem Cells. Akiko Niiboari Nambu, Uichi Midorikawa, Souhei Mizuguchi, Takuichiro Hide, Minako Nagai, Yoshihiro Komohara, Megumi Nagayama, Mio Hirayama, Daiki Kobayashi, Hideo Nakamura, Motohiro Takeya, Jyunichi Kuratsu, Norie Araki. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama)

2013年09月13日

- 13) A quick profiling System for Cancer marker Proteins with Diverse Post-Translational Modifications by a Fully Automated 2DE Device, Auto-2D. Munenori Nishimura, Uichi Midorikawa, Megumi Nagayama, Daiki Kobayashi, Mio Hirayama, Yoji Murakami, Yoshihiro Wada, Takahisa Imamura, Yutaka Unuma, Norie Araki. HUPO 11th Annual World Congress (Yokohama) 2013年09月11日～13日
- 14) 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化遊動機構と治療ターゲット分子の解析 (Analysis of the differentiation mechanism of glioma initiating cells by the integrated proteomics). 荒木令江、南部(新堀)晶子、緑川宇一、水口惣平、秀拓一郎、小林大樹、ウィルソン森藤政代、菰原義弘、中村英夫、竹屋元裕、倉津純一. 第70回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2013年10月3日～2013年10月5日 English oral
- 15) HIF-1 alpha シグナルを介した細胞競合によるヘテロな口腔癌細胞集団の発育機構 (Heterogeneous oral cancer development by competition via HIF-1 alpha signal regulation). 森

藤政代(モリフジマサヨ)、南部(新堀)晶子、小林大樹、荒木令江. 第70回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜) 2013年10月3日～2013年10月5日

- 16) Norie Araki. Integrated proteomics for identifying the specific signal networks regulated by post-translational modifications in cancer and cancer stem cells. 5th ACGG (Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology) International Conference. (タイ王国コンケン大学) 2013年10月14日～18日
- 17) 荒木令江、招待講演、融合プロテオミクスを基盤とした病態システムズバイオロジーによる癌の治療標的検出への挑戦. 荒木令江(神戸 神戸大学) 2013年11月12日～2013年11月13日
- 18) 荒木令江、招待講演、プロテオミクスを基盤とした病態システムズバイオロジー～がん幹細胞の分化メカニズムへの応用～(岡山 岡山大学) 2013年11月19日～2013年11月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願 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

NF1におけるカフェオレ斑の発症に、メラノサイト自体の増殖・分化の異常が関与していることが、様々な分子生物学的手法により明らかにされつつある。カフェオレ斑におけるメラノサイトの細胞異常増殖には、neurofibrominの減少によるRasGAP機能の異常に加えて、cAMPシグナルの定常的活性化状態の低下が関わっていることを、我々はNF1ノックダウン培養メラノサイトを用いて確認してきた。具体的には、neurofibrominをノックダウンすると細胞増殖が促進されるが、これに伴ってnon-RasGAP functionと呼ばれるneurofibrominのadenylate cyclase活性維持機能が低下し、メラノコルチン1受容体（MC1R; melanocortin 1 receptor）のadenylate cyclase活性が下がる。これによってcAMP-PKAシグナル活性の低下とprotease-activated receptors（PARs）の発現誘導・活性化がみられる。また、マイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析ではNotchシグナルなどの活性化も示唆された。しかし、これらのシグナルが、ノックダウンメラノサイトで同時にみられるユビキタス転写因子TFE3/TFEBの発現亢進や、細胞周期や増殖にかかわるサイクリン、CDKなどの遺伝子発現亢進を起こす機序は不明であった。今回、miRNAマイクロアレイ解析により、培養メラノサイトで高発現しているmiRNAを特定し、その機能について検索したところ、miR-30b, miR-146a, miR-29aなどが、複数のシグナルとクロストークしながら、細胞増殖などを起こす遺伝子の発現制御に関わっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

Neurofibrominはその機能としてよく知られた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adenylate cyclaseに作用してcAMPシグナルの維持制御機能をもつことが神経系細胞を用いた研究で近年明らかにされている¹⁾。NF1遺伝子突然変異により起こる神経線維腫症1型（NF1）では、neurofibrominの減少・機能低下が原因となって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。したがって、NF1の皮膚メラノサイトにおける分化増殖の重要なシグナルであるcAMP経路も何らかの影響を受け、その異常がカフェオレ斑発症へ進展する可能性が考えられる。

表皮メラノサイトの増加がNF1のカフェオレ斑

において起こることが近年明らかにされたが、その原因として皮疹部直下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の発現と分泌の増加が関与したりすることも一つの原因として考えられている。

一方、メラノサイト自体にもNF1遺伝子産物の機能低下に由来する細胞機能の何らかの変化が存在することの証拠として、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増殖異常や細胞動態の変化が認められるという報告がある。しかし、健常者皮膚由来のメラノサイトと比較した場合、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有意な上昇は認められず、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ことが示唆されている。

ヒト皮膚由来のメラノサイトの培養条件では多くの添加因子がその継代と増殖に必要とされる上、初代培養のため、メラノサイトの多様でポリクローナルな増殖分化状態が起こることによって、NF1 遺伝子発現レベル自体も影響されて大きく変化し、NF1 患者由来メラノサイトでは NF1 発現がさらに大きく修飾される可能性が知られており、細胞内シグナルの修飾や異常の詳細は、患者由来培養メラノサイトを用いた研究では全く明らかにされていない^{2,3)}。

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。

以前の研究で明らかにされた、カフェオレ斑形成に至るシグナルの断片的情報から得られた様々な関与遺伝子が、細胞モデルの細胞内シグナル経路を介して発現制御されて、一連の変化として機能する際に、マイクロ RNA (miRNA) の制御機構が関与している可能性について、マイクロアレイを用いた解析を行い検討した。

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、 α MSH、forskolin および、adenylate cyclase 阻害薬の SQ22536、PAR2 activating peptides (PAR2-AP) を培地中に添加した。

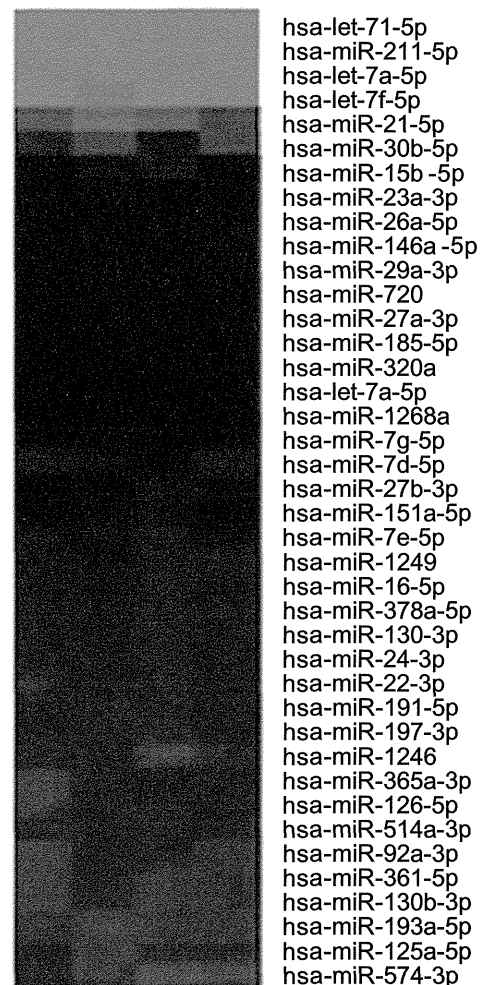
上記の刺激薬と阻害薬により cAMP/PKA シグナルを修飾したり、PAR2-AP により PARs を活性化したりしたメラノサイトから miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて miRNA を抽出した。

アジレント 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) にて RNA の純度検定を行いサンプルとした。miRBase release 19 (Aug 1, 2012) を基にした Homo sapiens miRNA (1872 precursors, 2578 mature) 搭載の miRNA microarray (Agilent Technologies) を用いて解析を行った。サンプルは、脱リン酸化させて精製し、Cy3 にてエンドラベリ

ング後、アレイ上でハイブリダイゼーションした後に、quality control を行い発現解析した。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。miRNA Target Database 解析は、インターネット上のサイトを用いた。miRBase, microRNA.org, TargetScanS, MiRTrail の各サイトにデータをアップロードし解析結果を得た。

C. 研究結果

まず、miRNA microarray で培養ヒトメラノサイトに高発現している約 40 種類の miRNA を確認した (図 1)。継代培養している、ロットの異なる Asian 由来 2 ロット、Asian/Caucasian, Caucasian 由来の各 1 ロットの新生児包皮皮膚由来の初代培養メラノサイトについて miRNA の発現を比較検討したが、ほぼ一致する結果が得られた。次に cAMP シ



Clones 1 2 3 4

図 1 培養ヒトメラノサイトに高発現している 40 種類の miRNA のヒートマップ (miRNA microarray)

グナルを定常状態以下に抑制する adenylate cyclase 阻害薬の SQ22536 添加時に低下し、反対に cAMP シグナルを刺激後には上昇がみられる miRNA をこのなかから選択し、qRT-PCR にてその発現を確認した (図2)。

これまでに MiT ファミリーの2つの転写因子 TFE3 および TFE3 の発現が cAMP シグナルを抑制したときに亢進すること、および、その下流の PKA および PAR-2 シグナルを介した変化であることが我々の実験結果より確認されており、この2つの転写因子の標的 mRNA の 3'UTR へ特異的に結合して発現を抑制できると予想される miRNA のデータ検索を miRNA.org にて行った。その結果、図3に示す複数の miRNA が候補として得られた。hsa-miR-146a, 29a, 30b は発現低下が cAMP 抑制時に起こるため TFE3 および TFE3 の発現上昇に何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、しかも hsa-miR-146a, 29a の2者に関しては、2つの転写因子に作用できる可能性が高い点で一致しており、これらはさらに、種間で 3'-UTR のターゲットシーケンスが保存されているものでも TargetScanS に

よる検索で明らかになった (図4)。さらに、これまでの我々の検討にて、NF1 ノックダウンの発現の網羅的解析で変化が予想されたシグナル経路と miRNA 発現の関連付けを試みた。miRTrail にて関連付けの相関性解析を行ったが、Wnt/Notch signal pathway や細胞周期関連で発現が変化する遺伝子群とメラノサイトで高発現している miRNA 発現パターンとの有意な相関は、今回の mRNA・miRNA の統合解析では確認できなかった (図5)

D. 考察

NF1 遺伝子産物 (neurofibromin) 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) を有することが、明らかにされている

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

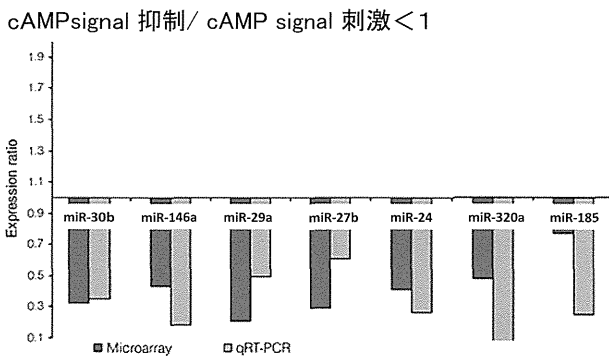


図2 miRNA Expression Ratio

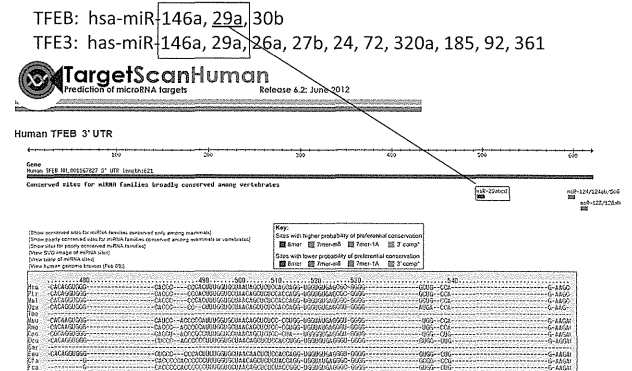


図4 標的 mRNA の 3'UTR へ結合 (特異的) できる miRNA のうち、特に、種間で 3'-UTR のターゲットシーケンスが保存

TFEB: hsa-miR-146a, 29a, 30b
TF3: has-miR-146a, 29a, 26a, 27b, 24, 72, 320a, 185, 92, 361

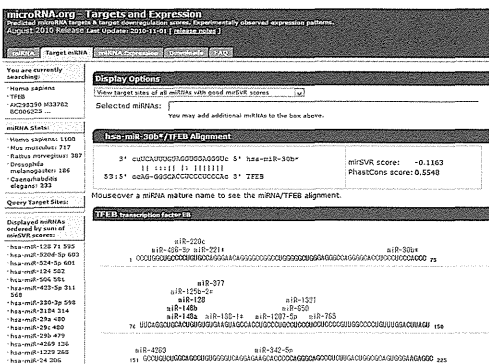


図3 標的 mRNA の 3'UTR へ特異的に結合できる miRNA のデータ検索

TFEB: hsa-miR-146a, 29a, 30b
TF3: has-miR-146a, 29a, 26a, 27b, 24, 72, 320a, 185, 92, 361

○ : Notch シグナルとの関連の報告あり

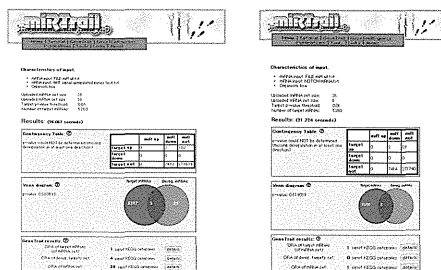


図5 Wnt/Notch signal pathway や細胞周期関連で発現が変化する遺伝子群と miRNA 発現パターンとの相関 : mRNA・miRNA 統合解析では確認できなかった

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

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³⁾。

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 adenylate cyclase 活性が定常状態以下に低下し、下流の cAMP/PKA シグナル活性の抑制と、PARs シグナルの活性化がみられる。

その結果、TFE3/TFEB の発現亢進が起こるが、今回の検討で、miRNA を介するシグナル伝達機序の存在が示唆された。

Wnt signal や Notch signal の活性化、cyclinD1 の発現亢進などメラノサイトの細胞増殖が引き起こされる事象が NF1 ノックダウンメラノサイトで確認されているが、これらのシグナルへの miRNA の関与は、今回のマイクロアレイを用いた検索では、明らかに出来なかった。

今後、アンチセンス miRNA インヒビターなどを用いた確認が必要と考えられる。

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 シグナル活性化や転写因子 TFEB および TFE3 の発現を亢進させて細胞増殖を誘導し、その結果カフエオレ斑におけるメラノサイトの増加を引き起こす可能

性があるが、miRNA がこれらの転写因子の発現亢進に関与している可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nature Neurosci* 5: 95-96, 2002
- 2) Schepper SD, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert J-M. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type1: an over view. *Pigment Cell Res* 18:13-24, 2004
- 3) Eirikur Steingrimsson, 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

2. 論文発表

- 1) Li X, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. Potential mesenchymal stem cell therapy for skin diseases. *Exp Dermatol.* 2013; 22(8):515-6.
- 2) Kawachi Y, Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ichikawa E, Furumura M, Otsuka F. NF1 gene silencing induces upregulation of vascular endothelial growth factor expression in both Schwann and non-Schwann cells. *Exp Dermatol.* 2013;22(4):262-5

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経線維腫症 1 型に合併する類もやもや病の成因に関する研究

研究分担者 松尾宗明 佐賀大学小児科准教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型 (NF1) では類もやもや病と呼ばれる脳血管の狭窄をきたす。我々は、もやもや病患者剖検例の検討から、ヒアルロン酸の内膜への蓄積が狭窄の原因であると推測した。今回、もやもや病患者由来 iPS 細胞を樹立後、分化誘導し、平滑筋細胞株を樹立。ヒアルロン酸合成酵素の mRNA の発現について検討した。IL-1 β 超音波刺激にて発現が亢進する傾向がみられたが、正常対照との発現の差は認めなかった。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF1) の約 2.5% で類もやもや病と呼ばれる脳血管の狭窄をきたすことが知られているが、その成因は不明である。我々は、もやもや病患者剖検例の病理学的検討から、血管平滑筋細胞で過剰産生されたヒアルロン酸の内膜への蓄積が血管狭窄の原因であると推測した。今回、患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を平滑筋に分化誘導することにより病態解析を試みた。

B. 対象症例と方法

- (1) もやもや病患者剖検例 (19 歳女性) について病理学的検討を行った。患者および正常対照剖検例の内頸動脈狭窄部の病理標本を免疫組織化学染色にて検討した。ヒアルロン酸については、ヒアルロン酸結合蛋白による染色を行い、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS2) はモノクローナル抗体を用いて染色した。
- (2) 2 名の小児のもやもや病患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立した。(図 1) 患者 iPS 細胞 (A182, A205) と正常対照人より樹立した iPS 細胞 (N1) を平滑筋用培地 SMCM で 10 日間培養し分化誘導。その後、抗 α -SMA 抗体陽性細胞を MACS を用いて分離し、それぞれの平滑筋細胞株を樹立した (SM182, SM205, SMN1) (図 2)。さらに、ヒト脳血管平滑筋細胞株 (BVSMC) も対照として使用した。

- (3) それぞれの平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素の発現について検討した。刺激は、IL-1 β と低周波超音波刺激 (LIPUS) を用いた。LIPUS は血流による血管壁への物理的ストレスのモデルとして行った。

- (4) それぞれの平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS2, HAS3) の mRNA の発現について、TaqMan 定量 PCR にて検討した。

(倫理面への配慮)

佐賀大学臨床試験倫理委員会において研究計画の承認を得たうえで、患者および保護者から文書による説明同意を得た。

C. 結果

【症例】 19 歳女性。

突然の頭痛・嘔吐、意識障害を発症して救急搬入された。頭部 CT にて脳室内出血を認め、MRI、脳血管撮影を実施し、もやもや病と診断した。速やかに脳室ドレナージを実施したが、4 日後に再出血を呈して死亡した。

【免疫組織化学結果】患者の内頸動脈狭窄部は、内膜の著明な肥厚を認め、同部位には平滑筋細胞と多量のヒアルロン酸の蓄積を認めた (図 3)。患者の病変部の平滑筋細胞は HAS2 は正常対照に比べて強く染まる傾向がみられた (図 4A, B)。

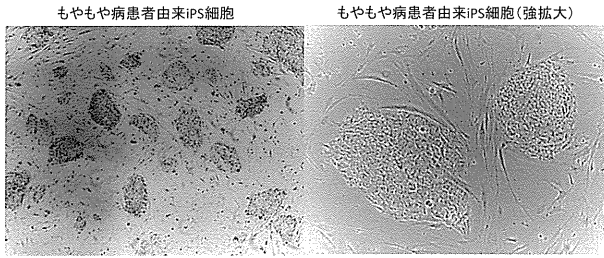


図 1

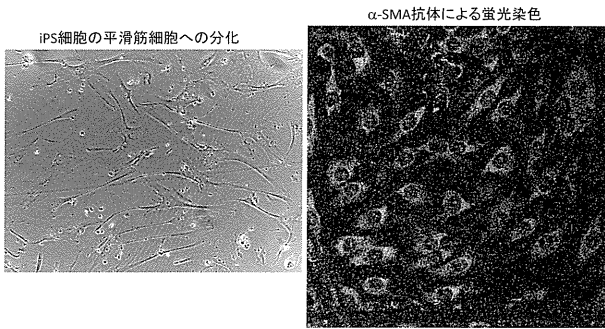


図 2

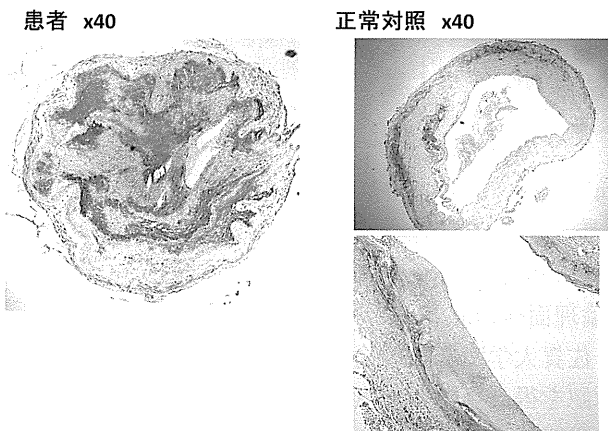


図 3

【平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS2, HAS3) 発現】

正常人平滑筋細胞株 (SMN1) の無刺激状態での発現を 1 とし、相対的な値で表示する。正常細胞と患者細胞株の間で明らかな発現の違いはみられなかった。HAS3 は IL-1 β や超音波刺激で発現が亢進する傾向がみられた (図 5)。

D. 結論

培養平滑筋細胞株では、いずれの細胞株においても無刺激の状態では HAS2,3 の mRNA の発現を認め、HAS3 は IL-1 β 超音波刺激にて発現が亢進する傾向がみられた。

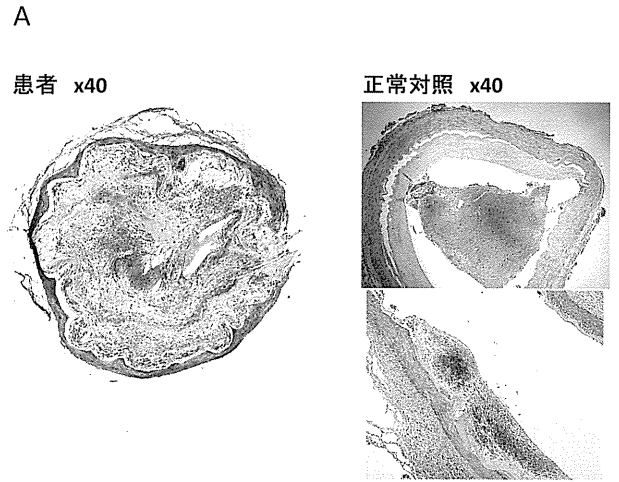


図 4A

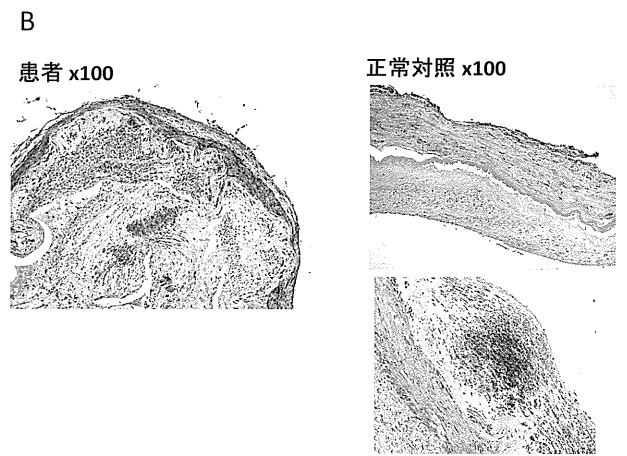


図 4B

平滑筋細胞株におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS2, HAS3) 発現

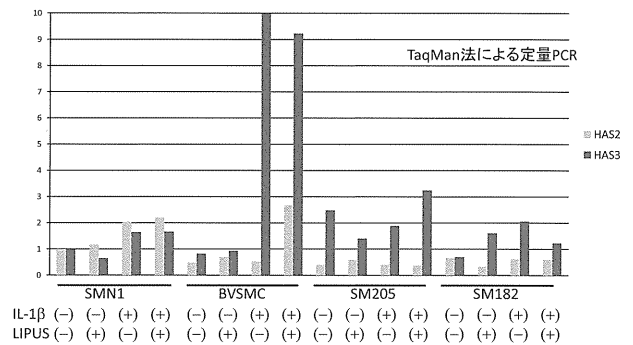


図 5

しかしながら、正常人ともやもや病患者間では、ヒアルロン酸合成酵素の発現に関しては有意な差は認めなかった。

E. 研究発表

36 (2014) 148-152

論文発表

1. 松尾宗明. 神経線維腫症. 臨床医が知っておきたい先天異常. 小児科臨床 (2013) 66:1357-1362.
2. Matsuo M, Ohno K, Ohtsuka F. Characterization of early onset neurofibromatosis type 2. Brain Dev

E. 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