

201442047A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

「ドラッグリポジショニングによる神経線維腫症1型の  
進行阻止薬の開発」に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小崎健次郎

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))委託事業による委託業務として、学校法人慶應義塾が実施した平成26年度「ドラッグリポジショニングによる神経線維腫症1型の進行阻止薬の開発(契約書第1条で定めた委託業務題目)」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
「ドラッグリポジショニングによる神経線維腫症1型の進行阻止薬の開発」に関する研究 平成26年度総括研究報告	1
小崎 健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 多能性細胞を用いた神経線維腫抑制化合物の探索	7
佐谷 秀行（慶應義塾大学医学部先端医科学研究所）	
2. 神経線維腫症1型患者由来細胞株を用いた In vitro スクリーニング	9
有馬 好美（慶應義塾大学医学部先端医科学研究所）	
3. NF1遺伝子ノックアウトブタの作出と細胞の供給	11
長嶋 比呂志（明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート）	
4. 臨床情報とサンプルの収集	13
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）	
5. 神経線維腫症1型患者由来神経線維腫の細胞培養に関する研究	15
太田 有史（東京慈恵会医科大学皮膚科）	
6. 神経線維腫症1型患者由来由来組織のメチル化解析	16
谷戸 克己（東京慈恵会医科大学皮膚科学講座）	
7. 神経線維腫症1型由来細胞株樹立の試み	18
原田 和俊（東京医科大学皮膚科学分野）	
8. 神経線維腫症1型患者組織の採取と組織からの線維芽細胞とDFATの培養	20
貴志 和生（慶應義塾大学医学部形成外科学教室）	
9. 次世代シーケンサーと解析パネルを用いたNF1遺伝子診断法の構築	22
小崎 里華（独立行政法人国立成育医療研究センター生体防御系内科部遺伝診療科）	
10. 神経線維腫症1型患者組織の採取・細胞の株化	25
松本 守雄（慶應義塾大学医学部整形外科）	
11. 神経線維腫症1型患者由来組織・細胞・DNAのバンキング・疫学・生物統計学	27
増井 徹（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）	
III. 学会等発表実績	29
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
V. 研究成果の刊行物・別刷	35

〔 I 〕

委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告(総括)

「ドラッグリポジショニングによる神経線維腫症1型の進行阻止薬の開発」に関する研究  
業務主任者 小崎 健次郎  
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

Cell-based screening、神経線維腫症1型ブタモデルを使用した薬効評価、神経線維腫症1型患者レジストリーとバンキングの各領域において確実な進展が見られた。1) Cell-based screeningについては上皮間葉転換を阻害できる薬剤をロボットでスクリーニングできるシステムが構築できたことから、確実なヒット化合物を取得することが可能であると考えられる。並行してNF1に特化した培養条件についても、最適化を進めることができた。sNF96.2細胞を用いたin vitroスクリーニング系のリードアウトとして、因子Xの発現が有効であると考えられた。つまり、この因子Xの発現をマーカーにして、阻害剤を見出すことにより、神経線維腫に対する治療薬の開発につながる。さらに異種移植により臨床病理像と似た腫瘍を形成することができたことにより、候補薬剤をマウスを用いて評価することが可能となった。2) ゲノム編集技術の利用によって、ブタ初代培養細胞におけるNF1遺伝子の機能喪失体が高効率に誘導され、それらの細胞の体細胞核移植によりクローン個体の作出が可能である。今年度、脱分化脂肪細胞の作成を行った。今後、NF1遺伝子の機能喪失ブタの育成・長期観察によって、神経線維腫症1型モデルとしての有用性を見極める必要がある。また、神経線維腫症1型の研究領域におけるDFAT技術の利用を確立した。すなわち、患者の手術切除由来の組織やNF1遺伝子ヘテロ欠損ブタ由来の脱分化脂肪細胞が樹立できたことで、NF1遺伝子の異常によってどのような分化異常や代謝異常が細胞にもたらされるかを詳細に解析することが可能となった。最終的にはスクリーニングで取得した化合物の脱分化脂肪細胞に対する作用を調べ、異常の是正が可能かについて検討を行う。3) 246名の病的意義のある変異を有するコホートを確保することができた研究の進捗については、患者会(あせび会)を通じて、共有している。Cell-based screening、神経線維腫症1型ブタモデルを使用した薬効評価を通じて、候補薬が得られた場合、十分な大きなコホートでの検証を開始可能と期待される。またこのコホートのなかで手術を受ける患者がいた場合、病変組織および正常組織を得て、脱分化脂肪細胞を作成することにより、薬剤スクリーニングに供することが可能となる。

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
有馬 好美	慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 助教
長嶋 比呂志	明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート 所長
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
太田 有史	東京慈恵会医科大学皮膚科学講座 准教授
谷戸 克己	東京慈恵会医科大学皮膚科学講座 助教
原田 和俊	東京医科大学皮膚科学分野 准教授
貴志 和生	慶應義塾大学医学部形成外科学教室 教授
小崎 里華	独立行政法人国立成育医療研究センター生体防御系内科部 遺伝診療科 医長
松本 守雄	慶應義塾大学医学部整形外科 教授
増井 徹	慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

A. 研究目的

神経線維腫症1型は遺伝子変異による稀少難治性疾患である。年齢とともに神経線維腫の増生等、症状が進行する。小児期から進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングにより治療薬の早期開発を目的とする。

先行した難治性疾患克服事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発プロジェクト一般研究班」の班研究活動により、蓄積した臨床データ・遺伝子変異データ、慶應義塾大学岡野栄之教授(難治性疾患からのiPS細胞の樹立とそれを利用した難病研究)との連携により蓄積した研究リソースに加え、佐谷研究分担者が実績を挙げている既承認薬ライブラリー・スクリーニング技術と、世界で初めて確立した神経線維腫

症 1 型の大動物モデルであるブタを組み合わせ、神経線維腫症 1 型の効果的な治療方法の確立を目指した。

われわれは既承認薬であるトラニラストが、網膜色素上皮細胞の線維化の抑制に有効であることを網羅的 in vitro スクリーニングにより同定し、さらに神経線維腫症 1 型における神経線維腫の増生に対しても、トラニラストが有効であることを見出していた。本研究では、トラニラスト以外のシーズを同じ手法で探索するとともに、トラニラストの誘導体を評価した。神経線維腫症 1 型ブタを使用して前臨床試験を行い、効果判定のためのバイオマーカーの同定を進めた。プロジェクトを通じて Proof-of-concept (概念実証 POC) を確立し、臨床試験の準備完了を目指した。

これまで集積した患者由来線維芽細胞等を用いて、既承認薬・類縁化合物の網羅的 in vitro スクリーニング系 (cell-based screening) の整備を行った。実験系としては、生体に近い状態で培養した患者由来細胞塊にさまざまな薬剤を添加し、細胞の形態・増殖能を評価した。神経線維腫症 1 型についてはトラニラストという候補薬が得られており、同時に他の作用機序で働く薬剤の探索を進める。具体的には患者由来細胞を用いて培養皿上で細胞塊を形成させて生体に類似した状態とし、様々な薬剤を加えて、細胞の増殖能や浸潤能、形態変化などを評価した。とくに、NF1 で問題となる組織への多能性分化能の極めて高い DFAT (dedifferentiated fat cells: 脱分化脂肪細胞) の技術を活用する。

ヒトに近い有効な中動物モデルを得るために、遺伝子編集および核移植技術を用いて、神経線維腫症 1 型患者由来の遺伝子変異と全く同じ変異を有するブタモデルを作成した。遺伝子編集作業を完了し、核移植ののち、ブタ仔が出生した。上述の、DFAT を樹立した。この罹患ブタ由来の細胞 (DFAT) を用いて薬効評価と新規化合物のスクリーニングを行う。

### 神経線維腫症 1 型患者レジストリーとバンキング

遺伝子診断により診断確定した患者については、手術時の皮膚組織検体の保存、および将来に向けて患者由来線維芽細胞を作成し、保存した。典型的あるいは特殊なタイプの遺伝子変異を有する患者由来の細胞について、上述の DFAT を作成し、既承認薬・候補薬の in vitro スクリーニングを進める。同時に、このレジストリーは将来の臨床試験を実施する際のコホートとなりうる。

## B. 研究方法

### 1) Cell-based drug screening

Cell-based drug screening を、汎用性双腕ロボットを用いて実施するための準備ならびにテストランを行い、上皮間葉転換を阻害する薬剤をスクリーニングするためのシステム構築を行った。さらに神経線維腫症 1 型患者由来神経線維腫の細胞培養の手法を、網羅的スクリーニングの観点から多角的なアプローチを用いて、検討した。

腫瘍切除術から採取した検体から、線維芽細胞と DFAT の培養を行った。培養の方法と評価についても検討を行った。手術で採取された神経線維腫を MEM+10%FBS 培地で細胞培養した。さらに neuregulin  $\beta$  と forskolin 添加無血清培地にてシユワン細胞を選択培養した。メチル化レベルは定量的リアルタイムメチル化特異的 PCR 法

(RT-MSP)、遺伝子発現は定量的リアルタイム PCR 法を用いて、解析した。タンパク発現は免疫組織化学染色による評価も併用した。並行して sNF96.2 細胞株を免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍の病理解析を行った。

### 2) 神経線維腫症 1 型ブタモデルを使用した薬効評価

初代培養ブタ胎仔線維芽細胞 (Large White 種 x Hypo 種) に、NF1 遺伝子の第 23 エクソンを標的とする Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) の mRNA をエレクトロポレーション法により導入し、遺伝子ノックアウト (KO) を誘導した。得られた NF1-KO 細胞を用いて体細胞核移植を行い、クローン胚の発達能の検証後、実際にクローンブタを作出した。NF1-ヘテロ KO クローンブタの皮下脂肪組織から脂肪前駆細胞 (DFAT) を樹立した。

### 3) 神経線維腫症 1 型患者レジストリーとバンキング

神経線維腫症 1 型の全国診療ネットワーク

(Recklinghausen 病学会の理事: 小崎・吉田・太田・谷戸・原田・貴志・小崎里) を通じて既に 200 名登録されているレジストリーの拡充と検体・遺伝子変異情報の収集を推進した。変異陽性のコホートを確保するため次世代シーケンサーによる新しい解析手法を開発した。上述のごとく腫瘍切除術から採取した検体から、線維芽細胞と DFAT の培養を行うことができた。培養の方法と評価についても検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を採取する際には、試料等提供者の個人情報の保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に十分に説明したうえで、文書により同意を得る。個人情報の外部への持ち出し禁止、試料等の匿名化など個人情報の保護に努め、個人情報の保護に関する法律、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第58号)、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第59号)及び地方公共団体等において個人情報の保護に関する法律第11条の趣旨を踏まえて制定される条例等を遵守する。

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の遵守： 遺伝子変異解析による変異陽性例の表現型の詳細な解析はヒトの家系情報を含めた身体的、遺伝的な情報の収集と、遺伝子解析から成り立っており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の適用範囲内であり当該ガイドラインを遵守して実施した。必要に応じ、慶應義塾大学臨床遺伝学センター・各臨床遺伝専門医療施設の遺伝外来において遺伝カウンセリングを提供した。

動物実験等の実施に関する基本指針の遵守： 明治大学農学部明治大学農学部動物実験委員会の承認を受けて行った。

## C. 研究結果

神経線維腫症1型患者由来神経線維腫の細胞培養に関する研究

### 1) Cell-based drug screening

上皮間葉転換阻害剤スクリーニングを、汎用性双腕ロボットを用いて実施するため、以下の過程を踏んでシステム及びアルゴリズムの構築を行った。

- i. 細胞増殖能定量化のための実験プロトコルの確立
- ii. ロボットの作業プロトコルの確立、シミュレーション、プログラミング
- iii. 必要設備の設置、器具等の配置、必要器具の作製およびロボットへの作業プロトコルのティーチング
- iv. 試運転、必要器具の改良、ロボット動作のチューニング
- v. 96穴プレートを用いたアッセイの施行

EMTを阻害する化合物のスクリーニングは、TNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を上皮系細胞に作用させることによってEMT誘導転写因子の活性化が生じ、そのシグナルに依存して細胞集塊が形成される性質を指標とした(Takahashi *et al.*, *J Biol Chem* 285: 4060-4073, 2010)。IC50の1/10の濃度で細胞集塊を50%以上阻害する化合物を2次スクリーニングへとすすめるクライテリアとした。

sNF96.2細胞を脳内または腎皮膜下に移植したマウスにおいて腫瘍が形成された。組織切片の病理組織学的解析の結果、NF1患者に生じる悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)と類似した特性を保有していることがわかった。

網膜色素上皮細胞を用いたスクリーニングにより得られたEMT阻害剤をsNF96.2細胞に添加したところ、因子Xの発現が顕著に低下した。また、siRNAを用いて因子Xの発現を抑制すると、sNF96.2細胞の生存および増殖能が抑制された。

悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株(YST-1)のうちMAGEB2遺伝子5'上流領域のCpGアイランド(CGI)のメチル化レベルが極めて低い(0.1%)を同定し、MAGEB2遺伝子の発現が低下していることを示した。

### 2) 神経線維腫症1型ブタモデルを使用した薬効評価

NF1遺伝子の第23エクソンを標的として、NF1-KO細胞を作成した。TALENのmRNAを導入した細胞168コロニーの内、167コロニーに変異が確認された。変異が確認されたコロニーの内、heterozygous KOは27.4%(46/168)、homozygous KOは2.4%(4/168)であった。

Heterozygous KO細胞1ラインとhomozygous mutationを有する細胞(homozygous KO細胞)1ラインを体細胞核移植に供し、クローン胚の体外発生能を調べた結果、それぞれ高効率(78~83%)に胚盤胞への発達を示した。

Heterozygous KO細胞に由来するクローン胚を2頭のレシピエント雌に移植した結果、両個体が妊娠した。1頭からは胎仔(50-51日齢)を回収し、解析に供すると同時に、クローン個体作出のための線維芽細胞を樹立した。他の1頭は合計2頭の産仔を分娩した。死産仔および産後死亡した個体より、皮下脂肪組織を採取した。Homozygous KO細胞に由来するクローン胚の移植では、合計38体の胎仔(胎齢19-20日)を得たが、いずれも発達遅延あるいは発達停止(吸収過程)胎仔であった。

*NF1* 遺伝子ヘテロ欠損ブタ脂肪前駆細胞 (DFAT) の樹立

産後死亡した個体より採取した皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより、成熟脂肪細胞を得た。この細胞を、培地を満たしたフラスコに散布し、天井培養を行った。脂肪細胞はフラスコ上面に付着し、分裂を開始し、培養 1 週間を過ぎると脂肪滴をほとんど有さない線維芽細胞様の細胞に変化した。その後フラスコを反転して通常の培養を継続した。得られた線維芽細胞様細胞が脂肪分化能を持つことを確認した。

### 3) 神経線維腫症 1 型患者レジストリーとバンキング

246 名の病的意義のある変異を有するコホートを確保した。従来、検出が困難とされる欠失例を 24 例同定した。NF1 患者から神経線維腫の細胞培養をおこなった。初代培養後 3 から 4 世代で凍結保存を行なった。カバーガラス上の培養細胞は S100 染色にて平均約 30% 陽性であった。

### D. 考察

Cell-based screening、神経線維腫症 1 型ブタモデルを使用した薬効評価、神経線維腫症 1 型患者レジストリーとバンキングの各領域において確実な進展が見られた。

上皮間葉転換を阻害できる薬剤をロボットでスクリーニングできるシステムが構築できたことから、確実なヒット化合物を取得することが可能であると考えられる。並行して NF1 に特化した培養条件についても、最適化を進めることができた。sNF96.2 細胞を用いた *in vitro* スクリーニング系のリードアウトとして、因子 X の発現が有効であると考えられた。つまり、この因子 X の発現をマーカーにして、阻害剤を見出すことにより、神経線維腫に対する治療薬の開発につながる可能性がある。さらに異種移植により臨床病理像と似た腫瘍を形成することができたことより、候補薬剤をマウスを用いて評価することが可能となった。

ゲノム編集技術の利用によって、ブタ初代培養細胞における NF1 遺伝子 KO は高効率に誘導され、それらの細胞の体細胞核移植によりクローン個体の作出が可能である。今後、NF1-KO ブタの育成・長期観察によって、神経線維腫症 1 型モデルとしての有用性を見極める必要がある。

また、神経線維腫症 1 型の研究領域における DFAT 技術の利用を確立した。すなわち、患者の手術切除由来の組織や *NF1* 遺伝子ヘテロ欠損ブ

タ由来の DFAT 細胞が樹立できたことで、*NF1* 遺伝子の異常によってどのような分化異常や代謝異常が細胞にもたらされるかを詳細に解析することが可能となった。最終的にはスクリーニングで取得した化合物の DFAT に対する作用を調べ、異常の是正が可能かについて検討を行う。

246 名の病的意義のある変異を有するコホートを確保することができた研究の進捗については、患者会（あせび会）を通じて、共有している。Cell-based screening、神経線維腫症 1 型ブタモデルを使用した薬効評価を通じて、候補薬が得られた場合、十分な大きなコホートでの検証を開始可能と期待される。またこのコホートのなかで手術を受ける患者がいた場合、病変組織および正常組織を得て、DFAT を作成することにより、薬剤スクリーニングに供することが可能となる。

### E. 結論

汎用性双腕ロボットを用いて上皮間葉転換阻害剤スクリーニングアッセイを実施する体制が構築できた。更に、*NF1* 遺伝子ヘテロ欠損ブタの DFAT 細胞が樹立できたことで、ヒット化合物の異常是正能を評価する実験系が構築できた。*In vitro* 薬剤スクリーニングに際して有用なバイオマーカーを見出し、また、薬効評価系動物モデルの一つとして、異種移植マウスモデルを構築した。

今後は、本研究班によって樹立した NF1 患者由来細胞および NF1 ブタ由来細胞を用いて、既承認薬のスクリーニングを行う予定である。

神経線維腫症 1 型患者由来の組織は慶應大学病院にて手術治療を要することになった患者より採取を行う。組織はゲノム解析用と細胞株樹立用に無菌操作で分割する。細胞株樹立用の組織は通常通り培養し、腫瘍塊から増殖した細胞を継代し、株化を試みる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Maruoka R, Ota A, Tanito K, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Saya H, Kosaki K et al., The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study, Genet Test Mol Biomarkers, 2014 Oct
- 2) Nobusue H, Saya H and Kano K et al., Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. Nat Commun 5: 3368, 2014



- 3) Matsunari H, Nakauchi H, Nagashima H, et al., Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein, *Journal of Reproduction Development* 60(3):230-237, 2014
  - 4) Watanabe M, Kobayashi M, Nagashima H., et al., Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum, *Journal of Reproduction Development*, 61, 2015
  - 5) 丸岡 亮、太田有史、谷戸克己、倉持 朗、有馬好美、吉田雄一、佐谷秀行、小崎健次郎ら、次世代シークエンサーを用いたNF1遺伝子診断法の確立、*日レ病会誌* 5(1):19-22, 2014
  - 6) 江原由布子、吉田雄一、山元 修ら、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 *日レ病会誌* 5(1):27-30, 2014年
2. 学会発表
- 1) 廣瀬盟子、有馬好美、佐谷秀行、レックリングハウゼン病に生じる悪性末梢神経鞘腫瘍の異種移植モデル作製 (口頭発表), 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014年11月15-16日
  - 2) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Matsumura Y, Hatae S, Asano Y, Nagashima H, Hollow fiber vitrification of in vitro produced bovine embryos at early developmental stages (ポスター), *World Congress of Reproductive Biology*, 2014
  - 3) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H, Transmission of lethal phenotype in a Mendelian fashion by genetically modified pigs that underwent blastocyst complementation (ポスター), *World Congress of Reproductive Biology*, 2014
  - 4) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Uchikura A, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H, Generation of X-linked SCID pigs by genome editing and somatic cell cloning (ポスター), *Swine in Biomedical Research International Conference*, 2014
  - 5) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Hatae S, Nagashima H, Cryopreservation of porcine zona-free embryos and isolated blastomeres using the hollow fiber vitrification method (口頭), *Swine in Biomedical Research International Conference*, 2014
  - 6) Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kimura T, Matsunari H, Nagaya M, Kosaki K, Saito M, Nagashima H, Matsumoto M, Production of fibrillin-1 gene knockout cloned pigs using zinc finger nucleases (ポスター), *Swine in Biomedical Research International Conference*, 2014
  - 7) Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Kobayashi M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H, Development of apancreatic pig by genome editing and its application in organ regeneration research (ポスター), *Swine in Biomedical Research International Conference*, 2014
  - 8) 吉田雄一, レックリングハウゼン病の最新の知見 (口頭), 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014.11.15
  - 9) 鈴木収二、吉田雄一、江原由布子、山元 修、神経線維腫症1型患者に生じた腹臥位での皮膚腫瘍切除によって顕在化した一過性四肢麻痺 (口頭), 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014.11.15
  - 10) 丸岡 亮、武内俊樹、清水厚志、鳥居千春、三須久美子、日笠幸一郎、松田文彦、太田有史、谷戸克己、倉持 朗、有馬好美、大塚藤男、吉田雄一、森山啓司、小崎里華、新村真人、佐谷秀行、小崎健次郎、次世代シークエンサーと解析パネルを用いたNF1遺伝子診断法の構築 (口頭), 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014.11.15
  - 11) 入澤亮吉、新井崇、前賢一郎、白井浩平、原田和俊、坪井良治、齋藤和博、林礼人、三橋喜比古、腰臀部の巨大びまん性神経線維腫の手術法について, 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014.11
  - 12) 貴志和生, レックリングハウゼン病の連携診療 (口頭), 第6回日本レックリングハウゼン病学会
  - 13) 松本守雄, レックリングハウゼン病に伴う脊柱変形に対する治療と問題点 (口頭), 第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会, 2014.11.16
- H. 健康危険情報  
なし

# 〔Ⅱ〕

委託業務成果報告(業務項目)

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告(業務項目)

多能性細胞を用いた神経線維腫抑制化合物の探索

研究責任者：佐谷秀行  
慶應義塾大学医学部先端研遺伝子制御・教授

研究要旨

神経線維腫症1型(NF1)は遺伝子変異による稀少難治性疾患である。年齢とともに神経線維腫の増生等、症状が進行する。神経線維腫は骨病変や悪性腫瘍や様々な身体的障害の原因となるため、その進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングによりその治療薬を見出し、早期開発を進める。分担者らは、NF1における神経線維腫が上皮間葉転換シグナルの活性化によって増大することを見出し、そのシグナル抑制が神経線維腫の抑制につながると考えている。本年度は、上皮間葉転換シグナル抑制薬剤のスクリーニングのためのロボットシステムの構築と、薬剤が取得できた場合の標的細胞として用いる*NFI*遺伝子ヘテロ欠損ブタ脂肪前駆細胞(DFAT)の樹立を行った。

A. 研究目的

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、悪性化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。私たちは神経線維腫の病理像や*NFI*欠損細胞株を用いた実験、動物モデルの文献的考察から、神経線維腫に見られる、1) 肥満細胞の浸潤、2) 線維芽細胞、シュワン細胞、血管上皮内皮細胞の増生、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蓄積、等の特徴的な病理像は上皮間葉転換(EMT)シグナルの亢進によって引き起こされる線維性疾患に類似した所見であることを見出した(Arima Y *et al.*, *Exp Dermatol* 19: e136-41, 2010)。細胞運動能の亢進と線維性集塊の形成には間葉系細胞としての性質が関与していることが判明し、間葉系細胞としてその性質を抑制することが多発性神経線維腫の治療戦略となる可能性が示唆されている。

本研究は、神経線維腫に対する治療薬の開発を目指し、汎用性双腕ロボットを用いたスクリーニングシステムの構築および、スクリーニングの標的細胞となる*NFI*遺伝子ヘテロ欠損ブタ脂肪前駆細胞(DFAT)の樹立を目的として実施した。

B. 研究方法

1) Cell-based drug screening を、汎用性双腕ロボットを用いて実施するための準備ならびにテストランを行い、上皮間葉転換を阻害する薬剤をスクリーニングするためのシステム構築を行った。

2) 研究者分担者である明治大学農学部・長嶋比呂志教授の研究室において作製した*NFI*-ヘテロ KO クローンブタの皮下脂肪組織から脂肪前駆細胞(DFAT)を樹立した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたDFAT細胞は、明治大学の学内動物実験指針および遺伝子組換え実験安全管理規程にしたがって作製した遺伝子改変ブタから摘出した組織から樹立した。

C. 研究結果

1) 上皮間葉転換阻害剤スクリーニングを、汎用性双腕ロボットを用いて実施するため、以下の過程を踏んでシステム及びアルゴリズムの構築を行った。

- vi. 細胞増殖能定量化のための実験プロトコルの確立
- vii. ロボットの作業プロトコルの確立、シミュレーション、プログラミング

- viii. 必要設備の設置、器具等の配置、必要器具の作製およびロボットへの作業プロトコールのティーチング
- ix. 試運転、必要器具の改良、ロボット動作のチューニング
- x. 96穴プレートを用いたアッセイの施行

EMTを阻害する化合物のスクリーニングは、TNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を上皮系細胞に作用させることによってEMT誘導転写因子の活性化が生じ、そのシグナルに依存して細胞集塊が形成される性質を指標として行う (Takahashi *et al.*, *J Biol Chem* 285: 4060-4073, 2010)。IC50の1/10の濃度で細胞集塊を50%以上阻害する化合物を2次スクリーニングへとすすめる。

#### 2) *NFI*遺伝子ヘテロ欠損ブタ脂肪前駆細胞 (DFAT) の樹立

産後死亡した個体より採取した皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより、成熟脂肪細胞を得た。この細胞を、培地を満たしたフラスコに散布し、天井培養を行った。脂肪細胞はフラスコ上面に付着し、分裂を開始し、培養1週間を過ぎると脂肪滴をほとんど有さない線維芽細胞様の細胞に変化した。その後フラスコを反転して通常の培養を継続した。得られた線維芽細胞様細胞が脂肪分化能を持つことを確認した。具体的には、細胞をディッシュ内で semi-confluentになるまで増殖させ、10% FBS, 0.25  $\mu$ Mデキサメタゾン, 0.5 mMイソブチルメチルキサンチンおよび5  $\mu$ g/mlインスリンを添加したDMEM脂肪細胞分化誘導培地で2日間処理し、その後DMEM培地 (10% FBS) に培地を交換し培養を続け、数日後に細胞内に油滴が存在することをOil Red O染色することによって、確認した。

#### D. 考察

本年度の研究によって、上皮間葉転換を阻害できる薬剤をロボットでスクリーニングできるシステムが構築できた。汎用性双腕ロボットはそのスループット性よりもむしろ高い再現性を持つことが予備実験で確認できており、確実なヒット化合物を取得することが可能であると考えられる。また、*NFI*遺伝子ヘテロ欠損ブタのDFAT細胞が樹立できたことで、*NFI*遺伝子の異常によってどのような分化異常や代謝異常が細胞にもたらされるかを詳細に解析することが可能となった。次年度は可能ならばホモ欠損DFAT細胞の樹立も行い、*NFI*遺伝子の異常を反映する明確なマーカーの同定を目指す。最終的にはス

クリーニングで取得した化合物のDFATに対する作用を調べ、異常の是正が可能かについて検討を行う。

#### E. 結論

汎用性双腕ロボットを用いて上皮間葉転換阻害剤スクリーニングアッセイを実施する体制が構築できた。更に、*NFI*遺伝子ヘテロ欠損ブタのDFAT細胞が樹立できたことで、ヒット化合物の異常是正能を評価する実験系が構築できた。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

- 1) Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H and Kano K: Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 5: 3368, 2014
- 2) Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H, Kosaki K: The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. *Genet Test Mol Biomarkers* 18(11):722-35, 2014

##### 2. 学会発表

- 1) 廣瀬盟子、有馬好美、佐谷秀行  
レックリングハウゼン病に生じる悪性末梢神経鞘腫瘍の異種移植モデル作製  
第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 (2014年11月15-16日 東京)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告(業務項目)

神経線維腫症1型患者由来細胞株を用いた In vitro スクリーニング

研究責任者：有馬好美  
慶應義塾大学医学部先端研遺伝子制御・助教

研究要旨

神経線維腫症1型(NF1、レックリングハウゼン病)は、*NF1*遺伝子変異により発症する。主症状の一つである神経線維腫に対する効果的な治療薬はまだなく、腫瘍の増生を抑制する薬剤および再発を予防する薬剤の開発が望まれている。本研究では、*NF1*遺伝子変異に起因する神経線維腫の形成および進行に関与する因子を同定し、病態を分子レベルで理解すると同時に、神経線維腫の抑制に有効な低分子化合物を探索するための *in vitro* スクリーニング系の確立を行う。また、スクリーニングにより得られた候補薬剤の効果を評価するための実験系の構築を行う。

A. 研究目的

分担者の所属する研究室ではこれまでに、独自の既承認薬ライブラリーから、網膜色素上皮細胞株を用いて、上皮間葉転換(EMT)シグナルを抑制するいくつかの薬剤を同定している。分担者は、神経線維腫の臨床サンプルおよびNF1患者由来細胞株sNF96.2において、EMT転写因子であるZEB1の発現上昇が観察されることを見出しており(Arima Y *et al.*, *Exp Dermatol*, 2010)、EMT阻害薬がNF1に生じる神経線維腫に対しても有効である可能性を考えている。

本研究では、NF1の主症状の一つである神経線維腫に対する治療薬の開発を目指し、*NF1*遺伝子変異細胞株を用いた *in vitro* 既承認薬スクリーニング系および評価系の確立を目的とした。

B. 研究方法

1) sNF96.2細胞株を免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍の病理解析を行った。

2) sNF96.2細胞株を用いた *in vitro* スクリーニング系の構築、およびバイオマーカーの探索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた sNF96.2細胞は、市販の一般化されたヒトNF1-MPNST由来細胞株であり、患者個人を特定することができない。そのため、

これらの細胞から抽出した核酸の使用に当たり倫理委員会による承認を必要としない。

C. 研究結果

1) sNF96.2細胞を脳内または腎皮膜下に移植したマウスにおいて腫瘍が形成された。組織切片の病理組織学的解析の結果、NF1患者に生じる悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)と類似した特性を保有していることがわかった。これらの成果について、第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会にて発表した。

2) 網膜色素上皮細胞を用いたスクリーニングにより得られたEMT阻害剤をsNF96.2細胞に添加したところ、因子Xの発現が顕著に低下した。また、siRNAを用いて因子Xの発現を抑制すると、sNF96.2細胞の生存および増殖能が抑制された。

D. 考察

sNF96.2細胞を用いた *in vitro* スクリーニング系のリードアウトとして、因子Xの発現が有効であると考えられた。つまり、この因子Xの発現をマーカーにして、阻害剤を見出すことにより、神経線維腫に対する治療薬の開発につながる可能性がある。

異種移植により臨床病理像と似た腫瘍を形成することができたことより、得られた候補薬剤をマウスを用いて評価することが可能となった。

## E. 結論

*In vitro*薬剤スクリーニングに際して有用なバイオマーカーを見出し、また、薬効評価系動物モデルの一つとして、異種移植マウスモデルを構築した。

今後は、本研究班によって樹立したNF1患者由来細胞およびNF1ブタ由来細胞を用いて、既承認薬のスクリーニングを行う予定である。

## F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### 1. 論文発表

1) Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H, Kosaki K:  
The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. *Genet Test Mol Biomarkers* 18(11):722-35, 2014

### 2. 学会発表

1) 廣瀬盟子、有馬好美、佐谷秀行  
レックリングハウゼン病に生じる悪性末梢神経鞘腫瘍の異種移植モデル作製  
第6回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 (2014年11月15-16日 東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告(業務項目)

NF1 遺伝子ノックアウトブタの作出と細胞の供給

担当責任者 長嶋比呂志  
明治大学農学部・教授

**研究要旨**

神経線維腫症 1 型を発症するモデルブタの作出と、そのブタからの前駆脂肪細胞・脂肪由来幹細胞の樹立を目的とした。神経線維腫症 1 型遺伝子(NF1)をノックアウト(KO)したブタ胎仔繊維芽細胞を樹立し、それらの体細胞核移植によってクローン胚ならびにクローン胎仔・産仔を獲得した。ブタ初代培養細胞におけるNF1遺伝子KOは、ゲノム編集技術のより高効率に誘導されること、heterozygous NF1-KOブタの作出が可能なこと、homozygous NF1-KOはブタにおいても胎性致死となることなどが明らかとなった。

**A. 研究目的**

神経線維腫症 1 型(NF1)を発症するモデルブタの作出と、そのブタからの前駆脂肪細胞・脂肪由来幹細胞の樹立を目的とした。そのため、神経線維腫症 1 型遺伝子(NF1)をノックアウトしたブタの作製に取り組んだ。

**B. 研究方法**

初代培養ブタ胎仔繊維芽細胞 (Large White 種 x Hypo 種) に、NF1 遺伝子の第 23 エクソンを標的とする Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) の mRNA をエレクトロポレーション法により導入し、遺伝子ノックアウト(KO)を誘導した。得られた NF1-KO 細胞を用いて体細胞核移植を行い、クローン胚の発達能の検証後、実際にクローンブタを作出した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、学内動物実験指針に基づいて行われた。遺伝子改変ブタの作出は、遺伝子組換え実験安全管理規程に従って行われた。

**C. 研究結果**

**1. NF1-KO 細胞の獲得**

NF1 遺伝子の第 23 エクソンを標的とする TALEN の mRNA を導入した細胞 168 コロニーの内、167 コロニーに変異が確認された。変異が確認されたコロニーの内、heterozygous KO は 27.4% (46/168)、homozygous KO は 2.4% (4/168)であった。

**2. NF1-KO 体細胞核移植胚の発達能の検証**

Heterozygous KO 細胞 1 ラインと homozygous mutation を有する細胞(homozygous KO 細胞)1 ラインを体細胞核移植に供し、クローン胚の体外発生能を調べた結果、それぞれ高効率(78~83%)に胚盤胞への発達を示した。

**3. NF1-KO クローンブタの作出**

Heterozygous KO 細胞に由来するクローン胚を 2 頭のレシピエント雌に移植した結果、両個体が妊娠した。1 頭からは胎仔(50-51 日齢)を回収し、解析に供すると同時に、クローン個体作出のための繊維芽細胞を樹立した。他の 1 頭は合計 2 頭の産仔を分娩した。死産仔および産後死亡した個体より、皮下脂肪組織を採取した。前駆脂肪細胞・脂肪由来幹細胞の樹立は、研究分担者の佐谷が行った。

Homozygous KO 細胞に由来するクローン胚の移植では、合計 38 体の胎仔(胎齢 19-20 日)を得たが、いずれも発達遅延あるいは発達停止(吸収過程)胎仔であった。

**D. 考察**

NF1 遺伝子第 23 エクソンを標的とする TALEN mRNA の導入は、初代培養ブタ胎仔繊維芽細胞における変異誘導効率が良好であり、高効率な遺伝子 KO 細胞の樹立が可能であった。

得られた KO 細胞は、増殖性・形態的正常性・正常染色体構成をもち、体細胞核移植によって発達能の高いクローン胚を作製するのに適していた。

Heterozygous FBN1-KO の遺伝子型を有するクローン胚からは、産仔が得られることが確認されたが、そのような変異個体の発育能、さらに NF1 症状の発現については今後の研究が必要である。Homozygous FBN1-KO の遺伝子型を有する個体は、ブタにおいても胎性致死となることが確認された。

## E. 結論

ゲノム編集技術の利用によって、ブタ初代培養細胞における NF1 遺伝子 KO は高効率に誘導され、それら細胞の体細胞核移植によりクローン個体の作出が可能である。NF1-KO ブタの育成・長期観察によって、神経線維腫症 1 型モデルとしての有用性を見極める必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Matsunari H., Kobayashi T., Watanabe M., Umeyama K., Nakano K., Kanai T., Matsuda T., Nagaya M., Hara M., Nakauchi H., Nagashima H. Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev* 60(3):230-237. 2014.  
Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H. Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *J Reprod Dev* 61: online Feb 20, 2015

### 2. 学会発表

Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Matsumura Y, Hatae S, Asano Y, Nagashima H: Hollow fiber vitrification of in vitro produced bovine embryos at early developmental stages. In: World Congress of Reproductive Biology 2014 2-4 Sep 2014; Edinburgh, UK.  
Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Transmission of lethal phenotype in a Mendelian fashion by genetically modified pigs that underwent

blastocyst complementation. In: World Congress of Reproductive Biology 2014: 2-4 Sep 2014; Edinburgh, UK.

Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Uchikura A, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of X-linked SCID pigs by genome editing and somatic cell cloning. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Hatae S, Nagashima H: Cryopreservation of porcine zona-free embryos and isolated blastomeres using the hollow fiber vitrification method. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kimura T, Matsunari H, Nagaya M, Kosaki K, Saito M, Nagashima H, Matsumoto M: Production of fibrillin-1 gene knockout cloned pigs using zinc finger nucleases. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Kobayashi M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Development of apancreatic pig by genome editing and its application in organ regeneration research. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)  
研究事業 委託業務成果報告

臨床情報とサンプルの収集

担当責任者 吉田雄一  
鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野・准教授

研究要旨

神経線維腫症1型 (NF1) に対して海外では分子標的薬を用いた様々な臨床試験が行われているが、現時点では根治療法は難しく、主に対症療法が行われている。そこで我々は将来的なNF1の治療薬の開発を目指して、NF1と確実に診断された患者の臨床情報とサンプルの収集し、解析を行った。

臨床的にNF1と診断された26名の患者において遺伝子解析を行い、現時点で12名に異常を認めた。全欠失のある患者では症状が明らかに重症であった。将来的なドラッグリポジショニングによるNF1の進行阻止薬の開発のため、今後も規模を拡大し、NF1患者の臨床情報とサンプルの収集を継続する。

A. 研究目的

神経線維腫症1型 (NF1) はカフェ・オ・レ斑、神経線維腫という特徴的な皮膚病変を主徴とし、そのほか骨、眼、神経系、副腎、消化管など様々な臓器に多彩な病変を生じる難治性の疾患である。1990年にその原因遺伝子(17q11.2)は明らかにされ、その蛋白産物ニューロフィブロミンの機能喪失により、様々な症候を呈すると推測されているが、詳しい機構についてはいまだに不明な点が多い。NF1に対して通常臨床診断が行われているが、家族歴がない小児の場合は診断に悩むことが多い。NF1遺伝子は巨大な遺伝子であり、変異の好発部位もないため、遺伝子診断は困難であったが、医療技術の進歩により、次世代シーケンサーを用いた短時間で低コストの診断が可能になってきている。また、本邦では過去にNF1の疫学調査が行われたが、近年の患者臨床情報についての報告に乏しい。

NF1の症状の進行を阻止することは現時点では難しく、現在対症療法が行われている。そこで我々は将来的なNF1の進行阻止薬の開発を目指して、まずはNF1と確実に診断された患者の臨床情報とサンプルの収集を行うこととした。

B. 研究方法

鳥取大学医学部付属病院を受診した患者でNF1と診断された患者の臨床情報(年齢・性別・症状・家族歴・合併症等)の解析を行うこととした。文書による説明と同意が得られた患者においては末梢血5mlを採取し、慶応義塾大学医学部臨床遺伝学センターにて次世代シーケンサ

ーを用いて遺伝子解析を行った。また、神経線維腫の外科的切除を希望した患者に対して通常の治療を行い、得られた余剰組織を-70℃で冷凍保存した。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子解析についてはヒトゲノム解析研究に関する倫理指針、症状の解析については臨床研究に関する倫理指針を遵守するとともに個人情報that特定できないように匿名化し、当該施設の規定を遵守して研究を遂行した。なお、本研究については当該施設の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

NF1と診断され、遺伝子解析の同意が得られた患者は26名(男9名、女17名)で、平均年齢は31.3歳であった。うち14名に家族歴があった。本邦で作成された重症度分類を用いた患者の重症度は、stage 1: 7名、stage 2: 6名、stage 3: 1名、stage 5: 12名であった。

現時点で変異が明らかとなった患者は12名で、その内訳はフレームシフト: 8名、塩基の置換: 3名、遺伝子の全欠失: 1名であった。他の患者については現在病的変異の有無について検討中である。全欠失を認めた患者で約4500個の神経線維腫の合併があり、明らかに症状が重篤であった。

## D. 考察

海外ではNF1に合併する症状の進行を食い止めるため、様々な分子標的薬を用いた臨床試験が行われている。一部の症例でびまん性神経線維腫の縮小が認められているが、その効果は20-30%程度であり、劇的な効果のある薬剤に乏しい。それらの薬剤はもともと抗がん剤として開発されたものが多いため、費用も高く、副作用や幼少時期から長期間使用した場合の安全性については不明な点も多い。そこで、ドラッグリポジショニングによるNF1の進行阻止薬の開発を行うことは極めて重要である。

そのためには本邦におけるNF1患者の臨床情報とサンプルの収集が不可欠である。本研究により、次世代シーケンサーによるNF1の遺伝子は従来の方法と同程度の精度でかつ短時間で診断可能であることが分かった。また、多施設の研究であり、正確にNF1と診断された患者コホートが確保された。通常NF1は遺伝子の全欠失などの特別な場合を除いてgenotypeとphenotypeとの関連はないとされているが、本邦からの報告はほとんどないため、さらなる解析が必要である。また、遺伝子解析を行っていない患者についても今後患者の重症度等についてさらなる解析を進める必要がある。

## E. 結論

今後はモデル動物（ブタ）によって得られた成果を本邦におけるNF1患者情報とサンプル収集から得られたヒトの細胞に応用し、NF1の進行阻止薬の開発を行うことで、NF1（難病患者）のQOLを改善できる新たな治療薬が期待される。

## F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

### 1. 論文発表

- 丸岡 亮、武内俊樹、清水厚志、鳥居千春、三須久美子、日笠幸一郎、松田文彦、太田有史、谷戸克己、倉持 朗、有馬好美、大塚藤男、吉田雄一、森山啓司、新村真人、佐谷秀行、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. 日レ病会誌 5(1): 19-22, 2014
- 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. 日レ病会誌 5(1): 27-30, 2014

- Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H, Kosaki K: The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: A validation study. Genet Test Mol Biomarkers. 18(11): 722-735, 2014

### 2. 学会発表

- 吉田雄一.  
レックリングハウゼン病の最新の知見.  
第 6 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11 月 15 日 2014 年 東京
- 鈴木収二、吉田雄一、江原由布子、山元 修.  
神経線維腫症 1 型患者に生じた腹臥位での皮膚腫瘍切除によって顕在化した一過性四肢麻痺.  
第 6 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11 月 15 日 2014 年 東京
- 丸岡 亮、武内俊樹、清水厚志、鳥居千春、三須久美子、日笠幸一郎、松田文彦、太田有史、谷戸克己、倉持 朗、有馬好美、大塚藤男、吉田雄一、森山啓司、小崎里華、新村真人、佐谷秀行、小崎健次郎.  
次世代シーケンサーと解析パネルを用いた NF1 遺伝子診断法の構築.  
第 6 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11 月 15 日 2014 年 東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 特許取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告

神経線維腫症 1 型患者由来神経線維腫の細胞培養に関する研究

担当責任者 太田有史  
東京慈恵会医科大学皮膚科・准教授

研究要旨

神経線維腫症1型(NF1)患者に生じた神経線維腫をはじめとする腫瘍組織を初代培養し3から4世代で凍結保存した。NF1患者15人から22サンプル腫瘍組織(神経線維腫)を採取した。これらは、いずれも網羅的遺伝子解析に供する予定である。また、シュワン細胞の選択培養を試みる予定である。

A. 研究目的

神経線維腫症1型(NF1)患者に生じた神経線維腫をはじめとする腫瘍組織を初代培養し3から4世代で凍結保存をして遺伝子解析に供する。神経線維腫は、シュワン細胞、神経周膜細胞、神経軸索、マスト細胞、血管内皮細胞などの正常末梢神経を構成する要素から成り立っているが、これらの細胞が無軌道に増殖した姿と考えられている。また、NF1患者では、すべての細胞にNF1遺伝子のheterozygousな変異を生じているが、腫瘍を生じると残りの正常なNF1アレルが欠失して、変異を生じているNF1アレルのみが残存する。このtwo hit mechanismはNF1遺伝子が腫瘍抑制遺伝子と言われている所以であるが、このtwo hitは、腫瘍を構成するすべての細胞に生じるのではなく一部のシュワン細胞のみに起こっていると言われている。すなわち、NF1遺伝子以外の網羅的解析を行う場合、シュワン細胞のみの単離培養も効率化を図るためには重要である。一方、神経線維腫のmicroenvironmentに視点をあてると、腫瘍を構成する細胞の相互関係を無視して腫瘍の増殖は考えられない。この観点を重視する立場をとる場合、すべての構成細胞が増殖する細胞培養環境を見出すことも重要である。

B. 研究方法

手術で採取された神経線維腫を MEM+10% FBS 培地で細胞培養し 3 から 4 世代で凍結保存する。また、neuregulin  $\beta$  と forskolin 添加無血清培地にてシュワン細胞を選択培養し、3 から 4 世代で凍結保存する。それぞれ、一部をカバーグラス上で培養し、ホルマリン固定後、シュワン細胞のマーカーである S100、GFAP、NGF、

GDNF、CNTF に対する抗体で免疫組織化学染色を行い細胞構成を確認しておく。

(倫理面への配慮)

NF1 患者が自ら希望した切除腫瘍を対象とし、本研究目的だけのためのサンプル採取は行わない。

C. 研究結果

NF1患者15人から神経線維腫の細胞培養を22サンプルおこなった。初代培養後3から4世代で凍結保存を行なった。カバーグラス上の培養細胞はS100染色にて平均約30%陽性であった。シュワン細胞の選択培地による培養は未施行。

D. 考察

MEM+10%FBS培地にて神経線維腫由来の細胞培養は、十分な細胞ストックを得ることができた。しかし、この細胞ペレットからのNF1遺伝子変異解析や網羅的遺伝子解析が効率よく行われるかは今後、はっきりしてくると考える。

E. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)研究事業  
委託業務成果報告(業務項目)

神経線維腫症 1 型患者由来由来組織のメチル化解析

担当責任者 谷戸克己  
東京慈恵会医科大学皮膚科学講座・助教

研究要旨

神経線維腫症 1 型患者由来の悪性末梢神経鞘腫瘍におけるがん精巢抗原遺伝子 *MAGEB2* のメチル化レベルと発現を解析した。神経線維腫症 1 型患者由来の悪性末梢神経鞘腫瘍において *MAGEB2* は異常な低メチル化を示し発現することが明らかになった。

研究協力者

延山嘉真(東京慈恵会医科大学皮膚科学講座・講師)

A. 研究目的

悪性末梢神経鞘腫瘍は神経線維腫症 1 型(NF-1)患者の数%に生じ、予後に多大な影響を与える。遺伝子 5' 上流領域の CpG アイランド(CGI)のメチル化は遺伝子発現を抑制する。*MAGEB2* を含むがん精巢抗原は、精巣など限られた組織やある種の悪性腫瘍細胞にのみ発現することから、診断上の有用性や治療における分子標的になる可能性があるが、悪性末梢神経鞘腫瘍における情報は限られている。今回、NF-1 より発生した悪性末梢神経鞘腫瘍における *MAGEB2* の発現とメチル化状態を解析した。

B. 研究方法

メチル化レベルは定量的リアルタイムメチル化特異的 PCR 法(RT-MSP)、遺伝子発現は定量的リアルタイム PCR 法を用いて、NF-1 患者由来の悪性末梢神経鞘腫瘍の細胞株と臨床サンプル、および、神経線維腫の臨床サンプルを対象として解析した。バイサルファイトシークエンスにより RT-MSP の結果を確認した。タンパク発現は免疫組織化学染色により評価した。なお、臨床検体は、東京慈恵会医科大学倫理委員会の許可のもと、対象患者に書面にて説明し、同意を得ている。

C. 研究結果

1 つの悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株(YST-1)でメチル化レベル 0.1% で発現がみられた。他の 5 つの悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株と正常培養

線維芽細胞では 53.1% 以上のメチル化レベルを呈し発現が抑制されていた(図 1)。

臨床検体では 13 例の悪性末梢神経鞘腫瘍のうち 3 例で 36.0% 以下の低いメチル化レベルを示した。一方で残りの悪性末梢神経鞘腫瘍 10 例と神経線維腫 14 例全例で 79.9% 以上の高いメチル化レベルを示した(図 2)。バイサルファイトシークエンス法により高いメチル化レベルを示す悪性末梢神経鞘腫瘍と低いメチル化レベルを示す悪性末梢神経鞘腫瘍を解析、RT-MSP の結果と一致することを確認した。免疫組織化学染色では、高いメチル化レベルを呈する悪性末梢神経鞘腫瘍ではタンパク発現がみられず、低いメチル化レベルのサンプルではみられた。

D. 考察

悪性末梢神経鞘腫瘍の臨床サンプルでは 36.0% 以下の低いメチル化レベル、一方、残りの悪性末梢神経鞘腫瘍 10 例と神経線維腫 14 例全例で 79.9% 以上の高いメチル化レベルを示した。低メチル化群と高メチル化群間の値は明確な隔たりがみられた。また、53.1% 以上のメチル化レベルを有する細胞株では発現が抑制されていたことから発現を決定するメチル化レベルは 53.1% 以下であると考えられた。

磁気共鳴画像(MRI)や陽電子断層撮影法(PET)で悪性末梢神経鞘腫瘍と神経線維腫を区別できるとする報告がある一方で、神経線維腫内に血腫などを形成した場合、不均一な MRI 画像となり、判別が困難になることや、PET のトレーサーを取り込む神経線維腫が存在するこ