

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591325
 研究課題名（和文）ゲノム網羅的検索による神経線維腫症発症機構の解明と悪性化因子の解析
 研究課題名（英文）Study of the onset mechanism and the malignant transformation factor of neurofibromatosis using genomic search
 研究代表者
 後藤 孝也（GOTOH TAKAYA）
 自治医科大学・医学部・講師
 研究者番号：80284355

研究成果の概要：

神経線維腫症の発症における原因遺伝子および遺伝子発現制御領域の変異を含めゲノム全領域を網羅的に検索した。遺伝子発現制御部位のメチル化が原因であるとされるこれまでの仮説を裏づけるメチル化変異は確認されなかった。この知見は、これまでエピジェネティックな変異やゲノム上に見られる変異が腫瘍化や悪性転化の原因とされていた考えに一石を投じる事実であり、遺伝子の変異のみが原因ではないことを示唆する重要な知見となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症(NF)は、全身の皮膚に多発性神経線維腫とカフェオレ斑、神経系悪性腫瘍、学習障害等の多彩な病態を伴う1型(NF1)と1型に類似した皮膚症状に加え中枢神経系腫瘍を伴う2型(NF2)の2つのタイプに分けられる。それぞれの原因遺伝子は異なる染色体上に位置し、NF1(17番染色体長腕)とNF2(22番染色体長腕)は独立した疾患である。このうちNF1は、約3500人に1人の出生頻度で見られ、浸透率も高く最も発生頻度の高い優性遺伝神経系疾患の一つといえる。NF1の原因遺伝子は、ニューロフィブロミンをコードしており癌原遺伝子産物Rasの活性型から不活性型への変換を活性化する。よって神経線維腫症では、NF1蛋白質の異常により細胞の増殖

に関する活性型Rasの相対的増加が腫瘍の発生に関与すると想定された。しかし、臨床像としての神経線維腫は複雑な腫瘍で、軸索突起、シュワン細胞、線維芽細胞、神経周膜細胞、肥満細胞などで構成され、典型的皮膚症状であるカフェオレ斑の成因を含め癌原遺伝子*ras*の異常との関連だけでは説明が困難であった。そのため、最終的腫瘍発生の完遂には腫瘍形成を運命付けられた細胞でのNF1遺伝子欠損だけでなく、非腫瘍形成性細胞との異型接合性が必要とする報告もあり、混沌とした現状で、神経線維腫症の原因遺伝子単離同定から15年という長い期間を経た現在においてもその腫瘍形成機構の詳細は未だ不明であった。本来は良性であるが、悪性転化した場合は、その予後は悪く、腫瘍発生機構の解明及び悪性転化の機構の解明は不可欠で

ある。原因遺伝子の同定とその分子機構の一部が解明され、癌抑制遺伝子としての機能が解明されたことによって、神経線維腫症の腫瘍発生機構や病態生理が解明されたと思われる疾患であるが、真の意味での解明には至っておらず、臨床症状の多様性と悪性化に至る機構を解明し、診断治療に向けた研究を遂行するためには、新たなブレイクスルーが必要となっていた。

2. 研究の目的

(1) NF1患者の遺伝子上には変異として点突然変異や欠失などが見られるが、その変異のゲノム上のホットスポットは無いとされ、症状と各エクソンにおける欠失、点変異と表現型である特定の症状との関連は認められない。よって、単純に遺伝子配列及びその遺伝子産物が病態生理機構に関与するのでは無いと考えられる。最近の知見から、遺伝子上のエピジェネティック変異（遺伝子配列の変化を伴わない遺伝情報の変異）として知られるDNAのメチル化とヒストン修飾が相互に制御し、遺伝子発現スイッチとして働くことが分かってきた。また、臨床上、NF1患者においては加齢に伴い腫瘍が増加し、悪性腫瘍の発生が見られることとも矛盾しないため、NF1遺伝子配列に生じた異常に加えて、加齢にともなうエピジェネティックな影響が腫瘍の増大、悪性化に関与している可能性は高いと想定される。そこで、NF1遺伝子プロモーター領域を含むと考えられる上流の広い領域と、細胞内情報経路に位置するRasを含めた相互作用に関わる因子群の遺伝子およびそのプロモーター領域に解析範囲を広げ、メチル化も含め網羅的な遺伝子異常を検討することを目的とする。

(2) 比較的稀ではあるはずの悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)が神経線維腫症の患者に高頻度に合併する。神経線維腫の発生とその増大・悪性化には、NF1遺伝子単一の異常のみならず、神経線維腫の腫瘍局所での変異が相互作用すると考えられる。近年、NF1遺伝子とp53遺伝子の二重欠損マウスに、有意にMPNSTが起こることが報告されたが、本邦のNF1患者に併発したMPNSTにおいては、同時にp53遺伝子の変異が認められる例は少なく神経線維腫の悪性転化には、他の遺伝子等の関与する発生機構が複雑に絡んでいると考えられる。そこで、良性の神経線維腫を母地として発症したMPNSTの手術摘出組織を試料として、母地である神経線維腫と悪性転化したMPNSTの各組織由来のゲノムDNAを抽出して、ゲノムの網羅的解析を行い、それぞれのゲノム上に起こった変異を解析し、悪性化に関与する遺伝子変異およびゲノム上の変異を解析し、悪性化因子の解明を

行うことを目的とする。

3. 研究の方法

NF1患者の遺伝子上には変異として点突然変異や欠失などが見られるが、その変異のゲノム上のホットスポットは無いとされ、症状と各エクソンにおける欠失、点変異と表現型である特定の症状との関連は今まで明らかになっていない。原因遺伝子であるNF1遺伝子の大きさは、ゲノム上でおよそ350Kbpであり、mRNAは13Kbpと巨大である。2818アミノ酸をコードするOpen Reading Frameは9kbにおよぶ。また、プロモーター領域の制御機構も解析が終了していない。このため、網羅的解析を行い、効率よく解析を進めるために次のような方法を行う。

(1) ゲノム上のDNAメチル化の解析

DNAメチル化の誘発には加齢が強く関与し、環境要因等により『加齢によりメチル化されるCpGアイランド（CGの2塩基配列に富む配列）』が存在することが提唱されている点、およびこのCpGアイランドが塩基組成から確率論的に期待される量の20-25%程度しか存在しない点に着目し、制限酵素のEagI (C↓GGCCG) やBssHII (G↓CGCGC) など、CpG配列を含むCG塩基のみからなる配列を切断する制限酵素が、メチル化シトシンを含む認識配列を切断できないという特性（メチル化感受性）を応用し、ゲノム遺伝子を二次元電気泳動で展開することで解析する。採取する検体は、a)患者白血球、b)腫瘍組織、c)悪性腫瘍部分（悪性化腫瘍併発の患者の場合）、d)腫瘍部分と共に切除された正常組織を対象を絞り解析に用いる。

①RLGS法（二次元電気泳動法を利用した制限酵素ランドマークゲノムスキニング）を応用した全ゲノムにわたる網羅的なメチル化部位および遺伝子変異の同定・解析を行う。この方法は、1991年に日本において開発された網羅的ゲノムスキニング法の1種であり、比較する2つのゲノムをそれぞれランドマークとなる制限酵素（第一番目の酵素）と他の制限酵素（第2、3番目の酵素）とで重複消化し、得られた消化後ゲノム断片の二次元電気泳動ゲル上の泳動距離（位置）の差をゲノム上の変異の反映として検出し解析する方法である。即ち、メチル化部位に関しては、使用する制限酵素の1種類をメチル化特異的制限酵素（BssHI, EagI等）の認識部位に設定し、メチル化部位（切断されない）と非メチル化部位（切断される）で起こる断片長の差を、二次元電気泳動におけるゲノム断片の移

動距離の差として検出する。

(i) まず、10名程度のNF1患者ゲノムを用いて制限酵素等の各種条件を変えながらおこない、ラフなマッピングを行う。NF1患者の腫瘍（神経線維腫）部位と正常部位（手術の際に得られる腫瘍周辺部）、神経線維腫を母地として発生した悪性神経鞘腫の組織、そして末梢血より得られる白血球を解析の試料とする。

(ii) それぞれの組織、白血球より、ゲノム遺伝子を抽出し、それぞれの検体をそのゲノム上のランドマークとなる酵素で消化し一次元目を泳動した後、別の酵素でゲル内消化する。

(iii) 消化された断片を二次元目電気泳動へ展開し、得られた展開スポットとしてのDNA断片の移動差が大きいものを腫瘍に関係する変異部位の候補とする。

(iv) DNA断片をゲルからクローニングしてどのような部分であるかを解析同定する。これには、試料の量が問題となる場合や、正常のゲノム断片により異常ゲノム断片が隠れるため、それに対しては、酵素消化後に制限酵素消化断片断端にプライマーを付加し、そのプライマーに対してPCRを行い、断片を増幅させてから一次元目泳動をさせることで解決を図る。

② 直接シーケンス法での解析

cDNAの解析は終了しており、その塩基配列は解読は終了している。その配列を利用して、塩基配列を解析するためのプライマーを設計して直接塩基配列を解析して行く。シーケンスには、ハイスループットの解析装置を用いる。

(2) 腫瘍の悪性化に関する因子の細胞内情報伝達系の中での機能解析

(i) 悪性化因子の可能性が推定されると同定されたものは、細胞レベルへの系で検討する。同定された因子を細胞内発現ベクターとして、FLAG タグ、Myc タグ、蛍光蛋白タグをつけたもの、試験管内の発現系としてGST タグをつけたものを構築する。それぞれを細胞系（COS7、NIH3T3、など）へ導入し、その形態変化を時系列で経過観察するとともに、試験管内の検証としては、Ras制御系の下流の因子に対して、MAPK、MAPKKのリン酸化の影響を検討する。

(ii) 同定した蛋白質についての抗体を作成する。

(iii) 抗体を用いて、患者腫瘍組織の免疫組織染色を行い検討する。

4. 研究成果

(1) 倫理委員会の承認を受けたのち、イ

ンフォームドコンセントを受けて神経線維腫症患者（良性腫瘍及び悪性神経鞘腫を発症した患者）の手術切除組織および血液検体よりゲノムDNAを抽出した。検体は24名（23歳から54歳）の患者からのべ81検体を得た。患者に対する説明と検体の採取は継続して行う環境整備は整ったといえる。次いで、二次元電気泳動法を利用したゲノム網羅的解析(RLGS法)の最適条件の検討として、培養細胞を用いて行った。その結果、一次元目の分離能が最終的な分解能に大きく寄与することが判明した。また、プロモーター部分のメチル化の部位を検討すると、血液と組織では明らかな違いがあるものの、腫瘍部分と健常部分では明らかな差異が特定できず、一次元目電気泳動と二次元目電気泳動を組み合わせるだけでは細かい分解能が得られないということが判明した。ラフな解析をまず行い、詳細な変異解析は塩基配列を直接解析することにして、ラフな解析を手術切除組織および血液検体よりゲノムDNAを抽出したのち、二次元電気泳動法を利用したゲノム網羅的解析を行った。しかしながら、悪性神経鞘腫の部位と良性神経線維腫の有為な差異を検出するには至らなかった。これに対する対策として、廉価に入手可能となったジーンチップを用いた解析へとシフトした。検出感度を上げる目的でPCR法を加え、10kbaseのジーンチップを用いた解析を加えることにした。具体的に解析に用いたゲノム遺伝子をXbaIの制限酵素で完全消化し、制限酵素サイトに特定の配列のリンカーを挿入させ、そのリンカー部分に対するプライマーで増幅することで感度を増幅させた。これらの増幅したゲノム遺伝子を用い泳動解析とジーンチップ解析を行った。これまでの諸外国における報告例では、小児においては、NF1の遺伝子およびプロモーター部位において変異は認めないものの、成人患者症例においては、プロモーター部位に欠損やメチル化の異常が認められるという報告があったが、我々の成人症例による解析では、ゲノム上の欠損や特異的メチル化の部位などを認めなかった。臨床的解析では、検討した悪性腫瘍(MPNST)を併発した患者と良性の腫瘍のみ患者との比較では、悪性化した部位以外の腫瘍、およびカフェオレ班の量や大きさの差異や母地となった良性腫瘍部分の大きさなどにおいて優位な差は認められないと考えられた。海外の症例の臨床像の詳細が不明であるため、単純な比較が出来ないが、発生母地となった組織の細胞の形態変異なども検討する必要があることが示唆された。

(2) 蛋白質レベルでの解析も加える必要があると考え、解析する為の基礎的データをとることを始めた。倫理委員会の承認が得られていないため、承認を得るまでは、マウスの脳及び肝臓の細胞を用いて解析をすることにして、採取される組織切片の単位面積及び単位スライスの厚さにおける細胞数と得られる蛋白質の量を検討した結果、厚さ $10\mu\text{m}$ ×面積 1mm^2 の凍結切片を用いることで、およそ2000個から3000個の細胞が得られることが判った。また、これらの細胞を用いたプロテオミクスの解析には、染色法により障害が起こることを見いだしたため、今後の解析に応用が期待できる。

(3) 臨床的な解析として、症状として悪性腫瘍 (MPNST) を発生した患者と良性の患者との比較では、カフェオレ斑の多少の差異や部位、母地となった良性腫瘍部分の大きさなどにおいて有為な差は認められなかったと考えられた。また、モザイク型とされる体の一部だけに神経線維腫やカフェオレ斑の診られる患者が少なからずいること (37名のモザイク型患者症例を報告)、また、モザイク型でありながら複数の遺伝家系が存在する家系を症例として報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Kumada M, Lkhagvasuren M, Utsumi N, Omi T, Gotoh T, Kamesaki T, Okuda H, Kajii E, Iwamoto S. Genetic heterogeneity in a susceptible region for essential hypertension among demographically different local populations in Japan. *Community Genet.* 2008;11(3):150-9. (査読有り)
- 2) Munkhtulga L, Nakayama K, Utsumi N, Yanagisawa Y, Gotoh T, Omi T, Kumada M, Erdenebulgan B, Zolzaya K, Lkhagvasuren T, Iwamoto S. Identification of a regulatory SNP in the retinol binding protein 4 gene associated with type 2 diabetes in Mongolia. *Hum Genet.* 2007 Feb;120(6):879-88. (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 宇津見七海 中山一大、熊田真樹、後藤孝也、村田一素、坂本敦司、岩本禎彦 CIAS1とIL-1 β 発現調節機構との関係 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学大会合同大会 2008年 12月 9日-12日. 神戸.
- 2) 谷戸克己、上出良一 広範な皮疹を呈した好酸球性膿疱性毛包炎の1例. 第59回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2008年 10月 12日-13日. 名古屋.
- 3) Nakayama I, Iwamoto S, Utsumi N, Yanagisawa Y, Sakamoto A Gotoh T, Kumada M, Munkhtulga L, Kagawa Y. SNP genotyping of the lifestyle related disease loci provides A new insight into the ethnicity of Asia-Pacific region 7th International Symposium ADVANCES in LEGAL MEDICINE September 1st-5th, 2008 Osaka, JAPAN
- 4) 谷戸克己、吉田正宏、山田英明、山田英枝、片山賢宏、小林康隆、上出良一 プレミネント®による光線過敏型薬疹の1例. 第819回日本皮膚科学会東京支部合同臨床地方会. 2008年 7月12日. 東京.
- 5) 谷戸克己、樋口彩子、角大治朗、小林康隆、谷野千鶴子、上出良一 血管ベーチェット病の1例. 第71回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 2008年 2月 9日. 東京.
- 6) 谷戸克己、塚原菜々子、堀和彦、幸田公人、松尾光馬、大田有史、中川秀己 新村真人 腰神経叢の nodular plexiform neurofibroma が悪性転化した神経線維腫症1型の1例. 第59回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2007年 10月 27日 - 28日. 宮崎.
- 7) 谷戸克己、堀和彦、太田有史、新村真人、中川秀己 神経線維腫症1型のモザイク37例の検討 第106回日本皮膚科学会総会. 2007年 4月 20日 - 22日. 横浜.

〔図書〕（計 2 件）

- 1) 谷戸克己、角大治朗，小林康隆，谷野千鶴子，上出良一.
血管ベーチェット病の1例.
皮膚病診療 2008；30：1357-1360
- 2) 谷戸克己
小児の症候群:色素異常を伴う症候群 von Recklinghausen 病.
Visual Dermatology 2007；6：924-926

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

- 1) 講演
谷戸克己.
子供がレックと診断されたら….
あせび会・レックリングハウゼン病講演会.
2008年2月16日 東京.
- 2) 講演
後藤孝也.
NF の理解のためのネット環境を通じた情報発信の現状
あせび会・レックリングハウゼン病講演会.
2008年2月16日 東京
- 3) ホームページ作成：
<http://www.jichi.ac.jp/gotoh/test/>
構築中、構築後は患者団体を通して公開の紹介をするとともに、検索エンジンにも登録して広く公開していく。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 孝也 (GOTOH TAKAYA)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：80284355

(2) 研究分担者

岩本 禎彦 (IWAMOTO SADAHIKO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232711

中山 一大 (NAKAYAMA KAZUHIRO)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：90433581

宇津見 七海 (UTSUMI NANAMI)
自治医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：20406086

(3) 連携研究者

谷戸 克己 (TANITO KATSUMI)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：90277054