

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20592113

研究課題名(和文) 多発性神経線維腫瘍発生メカニズムの検索

研究課題名(英文) Clarify the tumor development in multiple neurofibromatosis Type 1 in vitro.

研究代表者

清川 兼輔 (KENSUKE KIYOKAWA)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10195399

研究成果の概要(和文): 神経線維腫症は遺伝子変異の起こったシュワン細胞が組織中のマスト細胞に過剰な刺激を与え、さらにマスト細胞から刺激を受けた線維芽細胞とシュワン細胞が過剰に増殖し腫瘍を形成すると考えられるが、そのシグナル伝達に関与する因子についてはほとんど解明されていない。本研究では、腫瘍より作製した培養細胞を用いる実験によりこれらの可溶性因子を検索した。その結果、腫瘍増殖に関わる TGF- β 1、SCF、Mn-SOD などの数種類の因子を同定し、また、腫瘍増殖を抑制する薬剤についてもその効果を確認した。

研究成果の概要(英文): Neurofibromas are benign tumors that comprise primarily of Schwann cells and fibroblasts. Mast cells have been found scattered in the tumor tissue, and their role in promoting the proliferation of neurofibroma has been suggested. We investigated the effectiveness of mast cells in proliferation the tumor growth in vitro. Mast cells significantly promoted proliferation of the NF1 cells and upper the levels of TGF- β 1, SCF and Mn-SOD. On the other hand, tranilast, an anti-allergic drug, is retards tumor proliferation not only suppression of cell growth factor, but also the inhibition of a chemical mediator released from mast cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究代表者の専門分野：形成外科学・腫瘍再建学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：良性腫瘍、発生・分化、細胞・組織、遺伝子、病理学

1. 研究開始当初の背景

レックリングハウゼン病 (neurofibromatosis 1 = NF1) は幼少期に皮膚カフェオレ斑が発生することに始まり、思春期以降には全身性に皮下神経線維腫が多発する遺伝性疾患である。本邦では患者数約4万人と推定されており、優性遺伝性疾患としては患者数が多い疾患である。レックリングハウゼン病患

者にみられる症候は極めて多彩であり、このことから未だ治療方法が確立されていない。また、良性腫瘍ながら頻繁に再発を来すことにより、軽度においても整容的、精神的に患者を悩ませ、また度重なる摘出術による術後の機能障害等も問題となっている。

レックリングハウゼン病の責任遺伝子 NF1 は 17 番染色体長腕上 (17q11.2) に存

在し、患者は生来、この NF1 遺伝子の片アレルの変異 (NF1+/-) を全身の細胞で heterozygous に生じている。神経線維腫症 1 型では NF1+/- シュワン細胞に何らかの要因で体細胞変異 second hit が生じることで LOH (loss of heterozygous) を起こした NF1 -/- シュワン細胞が産生する異常タンパク (ニューロフィブロミン) が周囲に存在するシュワン細胞、線維芽細胞、マスト細胞等に過剰増殖シグナルを与え、神経線維腫が発生すると考えられている (1-2)。しかし、レックリングハウゼン病神経線維腫増殖メカニズムに関連する既出論文の多くの実験系が、ヒトではなくノックアウトマウスを用いた動物実験であり、ヒト由来細胞を用いた実験系においても悪性シュワンノーマ由来の NF1 -/- シュワン細胞株や白血病由来のマスト細胞株を使用しているものがほとんどである。レックリングハウゼン病の症候の多彩さを加味すると、現在までに報告されているものは真の現象を捉えていない可能性が示唆される。当研究室では、外科的切除された神経線維腫から直接腫瘍構成細胞を分離培養し、in vitro におけるレックリングハウゼン病の病態モデルを考案した。本研究では、この実験モデルを用いて、共培養時の細胞液中の増殖関連タンパクの解析、遺伝子変異の影響について検討することで、現在までに解明されていない病態発生・増殖メカニズムの詳細の解析を目指している。

2. 研究の目的

レックリングハウゼン病多発性神経線維腫の主な腫瘍構成細胞は、シュワン細胞、線維芽細胞であり、特に腫瘍中に存在するマスト細胞が腫瘍増殖に重大な影響を及ぼすと考えられている。本研究では NF1 神経線維腫から直接細胞株を樹立し、これらの細胞を用いて in vitro におけるレックリングハウゼン病の病態発生・増殖メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、実験モデル中の共培養時の細胞および培養液中の増殖関連タンパクの抽出と同定、遺伝子変異の影響、さらにこれらのモデルに対する各種薬剤を添加し、細胞増殖に対する増殖抑制効果に対する影響を観察することで、治療方法の確立も目的とした。

3. 研究の方法

神経線維腫摘出術を施行した NF1 患者の余剰腫瘍より細胞株を樹立した (図 1)。多発性神経線維腫 (以下、NF1) の主な腫瘍構成細胞である、シュワン細胞、線維芽細胞、マスト細胞を用いて in vitro モデルを作成し、細胞間の相互作用について、(1) 蛍光染色によるアクチンフィラメントの構築とマスト

細胞の接着、(2) 細胞シグナル伝達実験、(3) 遺伝子学的・分子生物学的検索、(4) 薬剤による腫瘍増殖阻害実験を実施した。

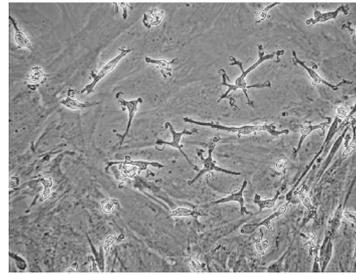


図 1. 神経線維腫より explant culture 7 日目。まず、線維芽細胞がプラスチック底面に遊走・増殖し、さらに培養することで神経様細胞が遊走してくる。

4. 研究成果

(1) NF1+/- 細胞と NF1+/+ 細胞のアクチンフィラメント構築の差異について

NF1 から確立した細胞株を、GFAP、S-100、フィブロネクチン、Type VI collagen 等の特異タンパクについて免疫組織化学染色を用いて神経系および線維芽細胞系の起源を同定した。また、マスト細胞の NF1 細胞への接着を確認した。さらに NF1 細胞のアクチンフィラメント構築について検査し、正常細胞とは異なる構築を持つことを確認した (図 2-3)。この事より、神経線維腫腫瘍中で、マスト細胞は NF1 細胞に接着して何らかのシグナル伝達を行っている可能性や、NF1+/- 細胞も正常の NF1+/+ とは異なる機能を持つ可能性が考えられた。

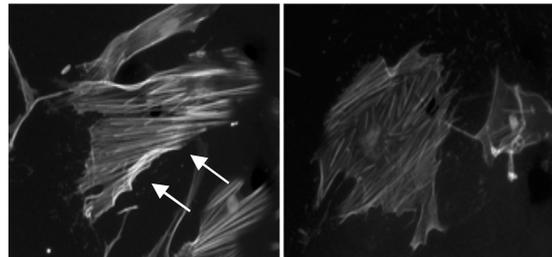


図 2. 左 NF1 細胞、右正常線維芽細胞 (Phalloidin アクチン染色×200) 正常線維芽細胞に比べ、NF1 細胞はアクチンフィラメント (矢印) が平行に走る特徴を持つ。

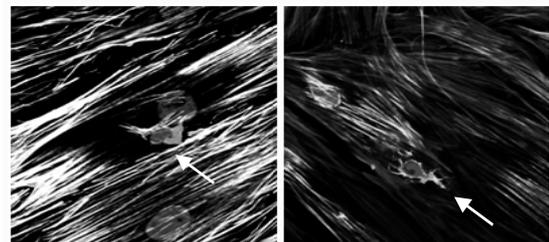


図 3. Phalloidin + Tryptase (×630) Tryptase 陽性の突起を伸ばしたマスト細胞 (矢印) が Phalloidin 陽性のアクチンフィラメントを持つ NF1 細胞の細胞質に接着している。

(2) NF1 由来細胞間シグナル伝達実験

(1) の結果より、マスト細胞は腫瘍中で NF1 細胞に直接接着してシグナル伝達を行っている可

能性が示された。そこで腫瘍細胞の増殖に細胞間連絡による直接的なシグナル伝達機構が関与しているかを検索した。NF1 細胞にマスト細胞を共培養する実験系において、細胞表面レセプター PAR (protease- activated receptor) 上の細胞内 Ca^{2+} 動向を詳細に検索した。その結果、マスト細胞と NF1 細胞が PAR2 を介するシグナル伝達機構が存在することが示唆された。

(3) NF1+/- 細胞とマスト細胞培養時の発現タンパクについて

腫瘍細胞の増殖にマスト細胞がどのように関与するかを検索するため、共培養時の細胞に発現する細胞増殖に関する蛋白を質量分析 (MALDI-TOF / MS, AXIMA-QIT) を用いて検索した。その結果、Mn-SOD を始めとする数種類の細胞増殖因子について共培養で有意に発現が増加していることを見いだした。また、TGF- β 1 や Mn-SOD などの NF1 細胞内の mRNA 発現量も有意に増加していた。このことから、腫瘍中に存在するマスト細胞の刺激により NF1 細胞から細胞増殖に関する因子が過剰に放出され腫瘍が増殖すると考えられた。

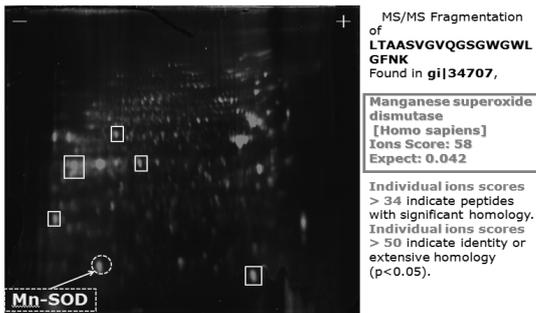


図4. タンパク 2次元電気泳動&質量分析 (AXIMA-QIT Mascot 検索) 結果

で囲まれたスポットが NF1 細胞とマスト細胞の共培養により蛋白が増出したスポット。Mascot 検索によりは Mn-SOD と同定された。

(4) NF1 に対するトラニラストの増殖抑制効果の検討

NF1 細胞とマスト細胞の共培養系に抗アレルギー薬であるトラニラストを添加し、細胞増殖および細胞上清中の増殖因子について ELISA 法を用いて定量した。その結果、トラニラストにより細胞増殖および増殖因子の発現抑制効果が示された (図 5 A-C)。この事より、トラニラストは NF1 腫瘍の治療方法の一つになりうる可能性が示された。

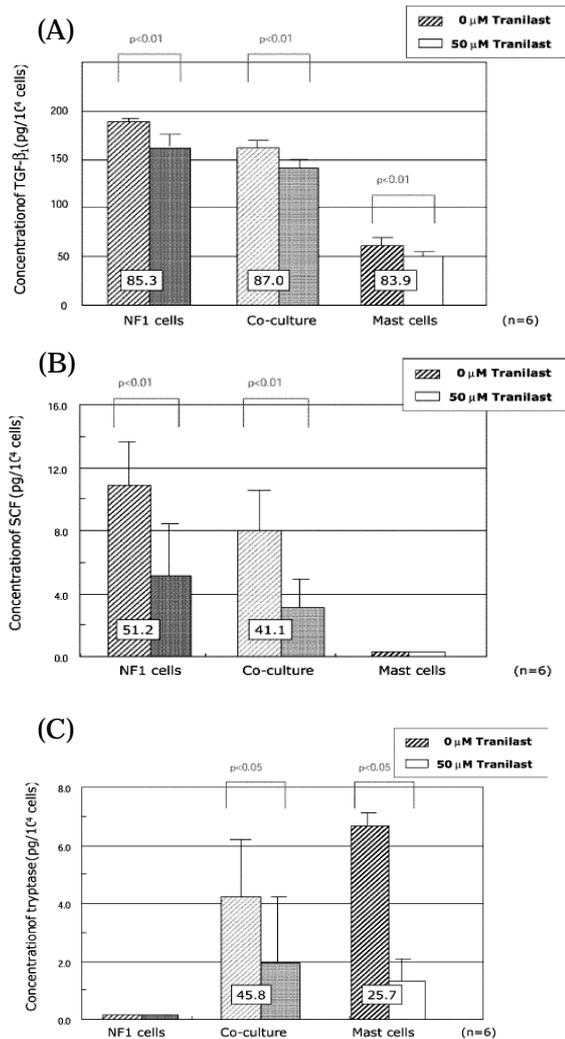


図5. NF1 細胞とマスト細胞の共培養液中の各因子の濃度 (ELISA)

(A) TGF- β 1 = 線維芽細胞増殖因子

(B) SCF = 線維芽細胞が放出するマスト細胞増殖因子

(C) Tryptase = マスト細胞脱顆粒中に存在するセリンプロテアーゼ

いずれもトラニラスト添加により発現量が有意に低下している。

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1件)

(1) Misa Yamamoto, Toshihiko Yamauchi, Kozue Okano, Mutsuo Takahashi, Shoji Watabe, Yoshimi Yamamoto. Tranilast, an Anti- Allergic Drug, Down- Regulates the Growth of Cultured Neurofibroma Cells Derived from Neurofibromatosis Type 1. *Tohoku J. Exp. Med.*, 査読有、217 巻、2009、193 - 201

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 山内俊彦、トラニラストの Neurofibromatosis 1 神経線維腫増殖抑制作用機序の検索 - 第 2 報 -、第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会、2010 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

(2) 山本美佐、レックリングハウゼン病神経線維腫混合培養細胞株中の細胞同定と細胞間接着因子の検索、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 26 日、京王プラザホテル (東京)

(3) 吉田美幸、レックリングハウゼン病における腫瘍増殖メカニズムの解析-共培養による細胞内 m-RNA と蛋白の発現量変化-、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 26 日、京王プラザホテル (東京)

(4) 大隈亜弥、レックリングハウゼン病神経線維腫の腫瘍構成細胞の相互作用 - Ca^{2+} 動向と細胞間接着 -、第 113 回山口大学医学会学術講演会、2010 年 2 月 20 日、宇部市霜仁会館 (宇部市)

(5) 山内俊彦、Neurofibromatosis 1 神経線維腫に対するトラニラストの増殖抑制効果の検討-第 2 報-、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 2 日、都市センター (東京都)

(6) 山本美佐、レックリングハウゼン病神経線維腫由来培養細胞の同定と細胞間接着、第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会、2009 年 10 月 31 日、シーホークホテル (福岡市)

(7) 山本美佐、レックリングハウゼン病神経線維腫に対するトラニラストの増殖抑制効果の検討 - 第 3 報 -、第 98 回日本病理学会、2009 年 5 月 3 日、京都国際会議場 (京都市)

(8) 大隈亜弥、レックリングハウゼン病神経線維腫の腫瘍構成細胞の相互作用 - Ca^{2+} 動向と細胞間接着 第 2 報 -、第 98 回日本病理学会、2009 年 5 月 3 日、京都国際会議場 (京都市)

(9) 山本美佐、レックリングハウゼン病神経線維腫に対するトラニラストの増殖抑制効果の検討 - 第 2 報 - 第 97 回日本病理学会 2008 年 5 月 17 日、金沢市

(10) 大隈亜弥、レックリングハウゼン病神経線維腫の腫瘍構成細胞の相互作用 - Ca^{2+} 動向と細胞間接着 - 第 97 回日本病理学会 2008 年 5 月 17 日、金沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清川 兼輔 (KENSUKE KIYOKAWA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：10195399

(2) 研究分担者

山本 美佐 (MISA YAMAMOTO)
山口大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：70379957

(3) 連携研究者

山内 俊彦 (TOSHIHIKO YAMAUCHI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：80239839

(4) 研究協力者

大隈 亜弥 (AYA OHKUMA)
山口大学大学院・医学系研究科・大学院生