

平成 23 年 5 月 6 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790788

研究課題名（和文） 神経線維腫の増殖に対する TNF- α 作用の検討

研究課題名（英文） Analysis of the role of tumor necrosis factor alpha in proliferation of neurofibroma cells

研究代表者

中村 泰大 (NAKAMURA YASUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：20455934

研究成果の概要（和文）：一般に細胞増殖を抑制する蛋白と考えられているTNF- α により、神経線維腫（NF）培養細胞は刺激濃度依存性、刺激時間依存性に増殖することを見出した。NF細胞はTNF- α の刺激時にMEK/ARKシグナル伝達経路を介して増殖することが明らかとなった。TNF- α レセプターの局在についてはNF細胞に発現しているものの、細胞内にTNF- α はみられず、神経線維腫組織内に散在する肥満細胞にのみTNF- α の局在が確認された。さらに抗TNF- α 抗体、抗TNF- α 受容体抗体を競合させたところ、NF細胞の増殖は抑制される傾向にあった。

以上の結果より、今後臨床の現場において抗TNF- α 薬剤による治療により、神経線維腫症I型患者のNFの増殖を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the growth responses of human neurofibroma cells to various growth factors and focused on the role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in proliferation of neurofibroma cells. Proliferation of NF cells was accelerated by TNF- α in dose- and time-dependent manners whereas other growth factors did not serve as the mitogen. Furthermore, TNF- α specifically enhanced the mitogenic activity of neurofibroma cells but not other normal and malignant cells. Elicited proliferation was accompanied by MEK/ERK and p38 signaling pathway. The TNF- α mitogenic effect was attenuated by anti-TNF receptor 1 neutralizing monoclonal antibody. Whereas expression of TNF- α receptor was confirmed in neurofibroma cells and tissues, TNF- α production was found mainly in mast cells within neurofibroma. TNF- α derived from mast cells may play an important role in the proliferation of neurofibroma cells in neurofibromatosis type I. Inhibition of the TNF- α action with specific TNF- α and/or TNF- α receptor antibody might lead to efficacious suppression of neurofibroma growth in NF-1 patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚科学・皮膚腫瘍学

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 I 型 (以下 NF-1) は全身の神経系を侵す常染色体優生遺伝の神経系疾患である。3500 人に 1 人の割合で生じ、主に進行する皮膚の神経線維腫が全身に生じる。時に一部の腫瘍は悪性化し、生命を脅かす。さらに懸垂性神経線維腫という、巨大な腫瘍が体から垂れ下がった状態まで成長すると患者の quality of life を著しく低下させる。以上のように NF-1 は進行、増殖する皮膚神経線維腫が前述した諸症状、種々の病態の原因となるため、神経線維腫増殖の制御が本疾患治療の鍵となる。しかし、治療は頻回の外科的切除に留まり、現在まで確立された根本的治療法はなく、本腫瘍の増殖に関する詳細なメカニズムも依然解明されていない。

現在までに、本疾患の原因遺伝子である NF-1 遺伝子は第 17 染色体 (17q11.2) にコードされており neurofibromin を産生することが明らかとなっている。これは ras 遺伝子機能を抑制する癌抑制遺伝子であり、NF-1 ではこの遺伝子に変異が生じることで、通常産生されるべき neurofibromin の機能不全が生じ、ras 遺伝子機能活性を介して神経線維腫の分裂増殖が進むことが解明されている。このような細胞内遺伝子レベルでの腫瘍の自己増殖機構の他に、細胞外因子も神経線維腫の増殖に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。現在まで insulin-like growth factor、hepatocyte growth factor、human stem cell factor、platelet-derived growth factor 等の数種類のサイトカインが NF-1 に関連する神経系腫瘍の増殖に関与することが *in vitro* および *in vivo* で示されている。しかしながら、現在のところ神経線維腫を有意に制御するサイトカインは見出されておらず、実際の臨床における治療でも実用化されていない。研究代表者は tumor necrosis factor alpha (以下 TNF-alpha) が強い神経線維腫細胞の増殖能を有することを見いだした。

TNF-alpha は 157 アミノ酸から成る 17KDa の蛋白で、ヒトでは 6 番染色体にコードされており、1984 年当初は細胞増殖を抑制するサイトカインとして発見されたが、次第に増殖抑制のみならず、特定の細胞には増殖促進的に作用し、また、細胞分化、炎症等にも関与することが明らかとなっている。現在では欧米において、TNF-alpha によりアポトーシスが誘導される各種の悪性腫瘍において治療薬として使用されている。また、近年では慢性関節リウマチやクローン病、乾癬における TNF-alpha の炎症症状への関与が示されており、抗 TNF-alpha 抗体による治療が既に本邦においても行われ

ている。

2. 研究の目的

本疾患の治療は前述のように神経線維腫増殖の制御の鍵となる訳であるが、本研究では NF-1 患者より得られた神経線維腫培養細胞を用いて、TNF-alpha の増殖能への影響について検討し、TNF-alpha が神経線維腫の病態にどのように関わっているか分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 各種培養細胞および細胞株を TNF-alpha を含む各種サイトカイン (aFGF、bFGF、HGF、NGF 等) にて刺激し、その増殖能の差異を比較検討する (MTT colorimetric bioassay による)。この際、時間および濃度暴露による増殖能の最大効果もあわせて検討する。
- (2) TNF-alpha 刺激時の神経線維腫細胞の cell cycle analysis を FACS scan にて行い細胞増殖を分子レベルで確認する。
- (3) TNF-alpha 刺激時の神経線維腫細胞内のシグナル伝達経路をウエスタンブロット法を用いて解析する。
- (4) 細胞内因性 TNF-alpha 発現の有無を確認するため、神経線維腫培養細胞に TNF-alpha および TNF-alpha レセプターが発現しているか否か RT-PCR 法、免疫染色、およびウエスタンブロット法を用いて解析する。また、TNF-alpha が培養液中に放出されているかも ELISA で測定する。
- (5) 細胞外因性、すなわち細胞外の腫瘍組織内 TNF-alpha 発現の有無を確認するため、NF-1 患者より得た神経線維腫を免疫組織化学染色してその有無を確認する。
- (6) TNF-alpha の産生細胞を同定しておき、もし autocrine に神経線維腫細胞に作用する場合には直接的に抗 TNF-alpha 抗体、あるいは抗 TNF-alpha 受容体抗体などの TNF-alpha 阻害物質を用いて神経線維腫細胞の増殖を有意に抑制できるか否かにつき検討する。
- (7) さらに、神経線維腫以外の細胞が実際に有効濃度の TNF-alpha を産生している状況を確認するため、無刺激で自動的に産生を続けているのか、もしくは神経線維腫細胞との混合培養など何らかの刺激 (神経線維腫が生じるサイトカインなど) を要するかに関し、培養液中の TNF-alpha 濃度を ELISA で測定しつつ検討を加えていく。
- (8) TNF-alpha の作用としてアポトーシス関連シグナルが神経線維腫細胞では惹起さ

れていないかに関し、アポトーシス誘導因子、抑制因子につき各因子に対する抗体を用いてウエスタンブロット法にて確認する。

- (9) 神経線維腫細胞において TNF- α 作用が増殖のみを促進し、細胞のアポトーシスおよびサバイバルには影響しなかった場合には、TNF- α 刺激によるスイッチが何故、神経線維腫には増殖方向に入りアポトーシス方向には入らないのか検討を加えていく。

4. 研究成果

TNF- α より、神経線維腫症 I 型患者より得た神経線維腫培養細胞において刺激濃度依存性、刺激時間依存性に増殖することを見出した。さらに TNF- α の NF 細胞増殖能への影響について解析したところ、NF 細胞は TNF- α の刺激時に MEK/ARK シグナル伝達経路を介して増殖することが明らかとなった。

TNF- α レセプターの局在については神経線維腫細胞に発現しているものの、神経線維腫細胞内に TNF- α はみられず、神経線維腫組織内に散在性に認められる肥満細胞にのみ TNF- α の局在が確認された。この結果より NF 組織内の肥満細胞から分泌される TNF- α が腫瘍増殖に関与する可能性が示唆された。

さらに TNF- α の作用としてアポトーシス関連シグナルが NF 細胞で惹起されていないかに関して、アポトーシス誘導・抑制因子につき検討したところ、NF- κ B を介してアポトーシスシグナルを抑制していることが確認された。さらに抗 TNF- α 抗体、抗 TNF- α 受容体抗体を競合させたところ、神経線維主細胞の増殖は抑制される傾向にあった。

以上の結果より、今後臨床の現場において抗 TNF- α 薬剤による治療により、神経線維腫症 I 型患者の NF の増殖を抑制できる可能性が示唆された。

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 9 件)

- ① Taguchi S, Kawachi Y, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Xu X, Ikebe D, Kato M, Otsuka F: Overexpression of the Transcription Factor Yin-Yang-1 Suppresses Differentiation of HaCaT Cells in Three-Dimensional Cell Culture. *J Invest Dermatol.* 2011; 131: p37-45 (査読有)

- ② Nakamura Y, Ishitsuka Y, Nakamura Y, Xu X, Hori-Yamada E, Ito M, Onizawa S, Kawachi Y, Otsuka F: Modified gluteal-fold flap for the reconstruction of vulvovaginal defects. *Int J Dermatol.* 2010; 49: p1182-1187 (査読有)
- ③ Nakamura Y, Nakamura Y, Hori E, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F: Complete long-term response of angiosarcoma of the scalp with cervical lymph node metastases treated with a combination of weekly and monthly docetaxel. *Br J Dermatol.* 2010; 163: p1357-1358 (査読有)
- ④ 中村泰大、石塚洋典、里見久恵、石井良征、川内康弘、大塚藤男、頭部びまん性神経線維腫切除時の止血の工夫、査読無、Vol.1、2010、pp.68-70
- ⑤ Nakamura Y, Nakamura Y, Hori E, Furuta J, Ishii Y, Takahashi T, Kawachi Y, Otsuka F: Tumor lysis syndrome after transcatheter arterial infusion of cisplatin and embolization therapy for liver metastases of melanoma. *Int J Dermatol.* 2009; 48: p763-767 (査読有)
- ⑥ Enomoto H, Takahashi T, Nakamura Y, Otsuka F: A case of syringoid eccrine carcinoma with circumscribed abundant stroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009; 23 : p317-318 (査読有)
- ⑦ Nakamura Y, Takahashi T, Xu X, Otsuka F: Multiple microvenular hemangiomas in a healthy child. *Int J Dermatol.* 2009; 48: p95-97 (査読有)
- ⑧ Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. *Exp Dermatol.* 2009; 18: p396-403 (査読有)
- ⑨ 中村泰大、中村貴之、石井良征、古田淳一、川内康弘、大塚藤男、耳下腺リンパ節転移を生じた頭頸部皮膚原発悪性黒色腫 耳下腺領域および頸部リンパ節の取り扱いに関して、日皮会誌、査読有、Vol.14、119、2009、pp.3051-3058

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中村泰大、藤澤康弘、中村貴之、石塚洋典、鬼澤沙織、伊藤倫子、宮崎郁、小林桂子、伊藤周作、大塚藤男、頭頸部悪性腫瘍手術時における顔面神経露出・温存

術式および術後顔面神経麻痺に関する検討 第 26 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2010 年 6 月 4 日-5 日、東京

- ② 中村泰大、石塚洋典、里見久恵、石井良征、川内康弘、大塚藤男、頭部びまん性神経線維腫切除時における止血の工夫 第 1 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会、2009 年 11 月 15 日、東京
- ③ 中村泰大、石塚洋典、中村貴之、伊藤倫子、鬼澤沙織、大塚藤男、皮弁術と植皮術 私の使い分け 女性外陰部悪性腫瘍切除後欠損に対する V-Y advancement type gluteal fold flap による再建の有用性について 植皮術との比較、第 25 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2009 年 5 月 22 日-23 日、岡山
- ④ 中村泰大、中村貴之、石塚洋典、藤澤康弘、大塚藤男、当科における骨盤リンパ節郭清術式の変遷 第 24 回日本皮膚外科学会総会・学術集会、2009 年 6 月 20 日-21 日、愛知
- ⑤ 中村泰大、田中亮多、堀延未、中村貴之、川内康弘、大塚藤男、非神経線維腫症 1 型患者の神経線維腫より生じた malignant peripheral nerve sheath tumor 第 24 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2008 年 7 月 4 日-5 日、岐阜
- ⑥ 中村泰大、中村貴之、大塚藤男、柳澤和彦、山本雅由、両側大臀筋皮弁および片側薄筋皮弁による骨盤底再建 第 23 回日本皮膚外科学会総会・学術集会、2008 年 8 月 9 日-10 日、京都

[図書] (計 1 件)

- ① 中村泰大、他(監修 日本皮膚外科学会)、学研メディカル秀潤社、皮膚外科学、2010、572-579

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 泰大 (NAKAMURA YASUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：20455934