

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591441

研究課題名（和文）プロテオミクスを応用した神経線維腫発生機構の解析と悪性化因子の同定

研究課題名（英文）Analysis of neurofibromatosis generation mechanism and identification of malignant factors using proteomics techniques

研究代表者

後藤 孝也（GOTOH TAKAYA）

独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・主任研究員

研究者番号：80284355

研究成果の概要（和文）：

神経線維腫症患者から得られた病理標本を用い、神経線維腫の腫瘍部周辺の正常組織と腫瘍部組織から蛋白質試料を抽出し蛍光色素で標識した後、同一ゲル上で1次元、2次元の電気泳動を行い、蛍光強度を比較検討した。腫瘍部と正常部の泳動結果の比較により、一方のみに発現有意を示す蛋白質スポットの同定を行った。同定された分子のみでは、臨床診断や症状との統一的な説明は困難であった。むしろ、組織差より個人差由来とも考えられ、判断に苦慮する結果となった。同定された因子をさらに詳しく生理的意義を考えて解析して行く必要がある。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed using pathological specimens obtained from neurofibromatosis patients. The protein samples from tumor tissue and normal tissue that exist in periphery of the tumor were labeled with fluorescence dye respectively. First dimension, and the second dimension electrophoresis for the sample performed on same gels. And we compared expressed protein amounts as the fluorescence intensity and color difference. From comparison of the portion spots of normal tissues with spots of the tumor portion, we identified and analyze protein that may be related to malignancy. However, it is impossible to explain the pathological biology of NF1 from the molecule that we identify. We have to study more detail for these molecules that may concern to malignancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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(neurofibromatosis:NF)は、全身の皮膚に多発する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)と両側聴神経腫瘍を主症状とする2型(NF2)の2つのタイプがある。異なる染色体上にそれぞれの原因遺伝子が存在することが解明され、NF1(17番染色体長腕)とNF2(22

番染色体長腕)は独立した疾患とされる。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が高い常染色体優性遺伝の神経皮膚疾患の一つである。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(GTP結合型)から不活性型(GDP結合型)への変換を活性化する。そのため、*Nf1*蛋白質の異常により、細胞の増殖に関する活性型Rasを非活性型Rasへ変換出来なくなることが腫瘍の発生に繋がると想定された。事実、NF1患者由来の細胞株や試験管内の再構成系において、細胞内*Nf1*蛋白質の発現低下や活性低下による活性型Rasの増加が証明され、NF1の病態は腫瘍抑制遺伝子である*Nf1*蛋白質の機能低下が原因と考えられた。コンディショナル (*cre/lox*) な*Nf1*欠損マウスを用いた研究では、シュワン細胞系の*Nf1*遺伝子欠損が腫瘍発生にとっては必要十分であるとの報告がされたり、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であると報告されたり、腫瘍形成機構に関しては混沌としていた。

我々が臨床で接する患者の臨床像は多彩であり、腫瘍組織像もシュワン細胞、線維芽細胞、神経周膜細胞などで構成され複雑な組織像を呈する。よって、カフエ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る。昨年ヌーナン症候群やコストロ症候群の原因因子として、*SOS1*や *PTPN11*、*RAF*というRas-MAPキナーゼのカスケードに属する遺伝子産物が同定されたが、NF1と同じ細胞内情報伝達系 Rasカスケードに属する遺伝子の異常であるにも関わらず、これらはNF1とは異なる臨床像を呈する。この事実は、単一の遺伝子異常は腫瘍形成の端緒に過ぎず、他の因子が協動的に関与し、腫瘍を形成することを意味する。また、NF1患者の臨床経過において、生命予後を左右する最大の問題点は、比較的稀な腫瘍であるはずの悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)が、思春期以降の患者に合併する点である。これらが示すことは、神経線維腫の発生とその増大・悪性化へ導く要因は、*Nf1*遺伝子の異常のみならず、腫瘍局所での腫瘍環境がその鍵であることに他ならない。これらを背景とし、臨床症状の多様性と悪性化に至る機構解明と治療に向けた研究を遂行するために、新たな手法がブレイクスルーには必要とされた。

2. 研究の目的

これまでの遺伝子解析、ゲノム解析では解析することができない、いわば組織や細胞レベルで実際に機能している分子そのものである蛋白質を扱い、正常組織、良性ではあるが、神経線維腫として腫瘍化した細胞組織、さらには、悪性化した細胞組織を構成する蛋白質を比較

解析する。それぞれの病態の腫瘍発生機構、良性の腫瘍を母地として悪性転化する悪性末梢神経鞘腫瘍の発生機構やその原因となる蛋白質及びその原因蛋白質の翻訳後修飾も含めた詳細な解析を、プロテオミクスの手法を駆使した網羅的解析を行う。

3. 研究の方法

【試料等】

大学の倫理委員会により審査許可された説明同意書により同意を得られた患者より手術切除標本の提供を受ける。手術標本として、皮膚神経腫の全身に多発している患者、びまん性神経線維腫の見られる患者、神経線維腫を母地とした悪性神経鞘腫を合併した患者と臨床的診断像からそれぞれ三群に分類して手術標本の一部の提供を受ける。

【腫瘍化悪性化の関連因子の同定】

①手術標本(凍結保存標本)を基に、厚さが12 μm の切片を切り出し、HEの組織切片用とレーザーマイクロダイセクション用の切片をそれぞれ作成する。

②HE染色による組織(一部切片):病理学的に腫瘍組織とその周辺に存在する正常組織を弁別しその境界を判定する。また、腫瘍組織内の細胞塊をS100抗体での免疫染色で染色した組織切片から腫瘍細胞を神経細胞由来細胞とそれ以外の細胞とを弁別し、それぞれをレーザーダイセクション装置(ライカ社)を用いて切り出し試料とする。

③総面積が3 mm^2 から10 mm^2 になるように同種の組織切片を集め、細胞の可溶化溶液(8Mウレアを含有)を用いて可溶化を行う。可溶化した後、2Dクリーンアップキット(BioRad社)を用いて脱塩などを行い泳動用サンプルとする。

④腫瘍組織由来蛋白質、腫瘍周辺(正常)由来蛋白質をそれぞれ用意し、腫瘍組織由来蛋白質にはCy2の蛍光色素、腫瘍周辺(正常)組織由来には、Cy5の蛍光色素を標識ラベルする。基本的な標識反応条件は、標準プロトコルに従い、サンプルはpH3からpH10の広レンジ、及びpH3からpH5、pH7からpH10の狭レンジのそれぞれの等電点電気泳動(1次元目ストリップゲル:BioRad社)を行い、得られた1次元泳動後のストリップゲルをポリアクリルアミドゲル(15%、10%、7%)で同時に一枚のゲル上に展開する。

⑤泳動後のゲルをそれぞれの励起波長で励起し、画像処理した後、それぞれの蛋白質の発現プロファイルを比較し、解析結果として得られた腫瘍部組織由来の特異的蛋白質の泳動スポット、腫瘍周囲の正常組織由来の特異的蛋白質スポッ

トを同定する。

⑥同蛋白質スポットをゲルから切り出す。

⑦ゲル内消化法（アセトニトリルによる脱水とトリプシン消化のための膨潤を繰り返す）により蛋白質を断片化する。

⑧TOF/MS による蛋白質断片の質量分析。

⑨質量分析結果の解析（コンピュータによる蛋白質推定）および蛋白質の同定。

【腫瘍内の構成細胞の分別と解析】

免疫抗体組織染色により細胞の由来などの特性を判定し、弁別採取してそれぞれの由来毎の蛋白質を用いた網羅的解析を蛍光色素標識により比較検討する。

(1) 候補蛋白質の機能解析

①候補蛋白質の修飾の解析として、二次元電気泳動した後、特異抗体を用いてウェスタンブロットによる解析を行う。二次元の内、一次元目は、広レンジ、狭レンジの3つの異なる泳動レンジのストリップゲルを用いて泳動を行い、2次元目は分子量に応じて、10%と7%の2種類のポリアクリルアミドゲルの電気泳動を行う。

②泳動結果のパターンからリン酸化修飾が考えられるものについては、抗リン酸化抗体を用いて、ウェスタンブロットを行い、その修飾の変化を解析する。

③質量分析（TOF/TOF）を用いた修飾解析

(2) 修飾解析として、質量分析装置を用いて、各ピークのフラグメント解析によりそのピークのアミノ酸残基の修飾を解析し、既存の蛋白との比較検討をする。

(3) 得られたイオン型を、解析ソフトを用いて推定する。

(4) 生理機能の解析

①候補蛋白質を培養細胞系に過剰発現、またノックダウンさせ、細胞形態、細胞の増加速度、EGF、TGF β 、NGF 刺激応答を観察する。

②蛍光蛋白（GFP）との融合蛋白質を発現する細胞を樹立し観察する。

4. 研究成果

【腫瘍組織の解析と臨床症状】

説明同意を得て、24名の患者から手術時の切除組織標本を得た。

(1): 皮膚の神経線維腫とカフェオレ斑のみを症

状と主とする患者群

(2): 全身に小型の神経線維腫を多発する症状を主症状とする患者群

(3): び漫性の比較的大きな神経線維腫の併発を主症状とする患者群

(4): 悪性神経鞘腫を併発した患者群

以上のように症状から4つの病態群に分類し切除手術時に病理標本として得た。

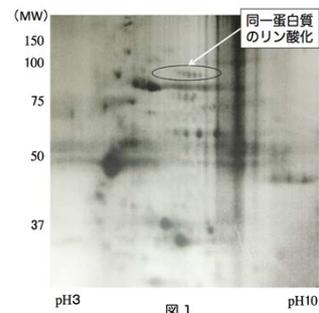
【臨床像とそれぞれの組織の差異解析】

本研究に用いた臨床病理組織と臨床像の比較検討では、(1)の患者に見られるような大小の様々な神経線維腫の見られる患者（皮膚に見られる個数は20~30個程度）と(2)の患者に見られるような全身の皮膚に多発する（100個以上）の病理組織に同じようなサイズの神経線維腫に関してはその差は特に見られないことがわかった。病理組織としては、全体に疎な組織構成で、構成する膠原線維の中に紡錘型の神経由来と思われる細胞がみられ、また細胞体の明るい由来の解らない細胞がその周囲にも見られた。血管（血管の内皮は総じて薄い）からの漏出と見られる赤血球やリンパ球の浸潤も見られ、臨床像および病理組織像として神経線維腫の診断判断できるものであった。(3)のび漫性の組織標本では、部分を病理標本として切り出して観察したが、(1)、(2)の組織と同様の組織像であったが、巨大なび漫性の腫瘍の一部であり、部分ごとに、より塊状の斑になっていた。(4)の悪性神経鞘腫では、それぞれの細胞が良性の神経線維腫に比べ、細胞体の異形成や核の濃染状態などから悪性度が高いことが推定でき、また、良性の神経線維腫にみられた由来の解らない細胞体の明るい細胞の数は減っており、神経由来の細胞と思われる紡錘形の細胞が比較密になっている像が見られた。このことから、病理組織のみからその悪性度についての推定は可能であるが、臨床像特異的な病理像が判定できないということが改めて確認された。

【腫瘍細胞特異的な蛋白質の同定】

凍結切片からクライオトームで薄層切片を作成し、顕微鏡下に病理像から腫瘍部位を切り出した後、蛋白質を抽出し、二次元電気泳動を行い蛋白質の発現差異を比較検討した。

図1に示すように二次元の電気泳動のゲルか



ら得られたスポットは蛋白質の修飾などにより泳動状況に差が見られる。

このように腫瘍部に於いて、悪性神経鞘腫の部分と良性の神経線維腫の部分との比較により悪性化した組織由来の蛋白質のみにみられるスポットの内、量の多いもの（大きなスポット）のものを特定しそれぞれのスポットゲルを切り出し、ゲル内消化法でトリプシン処理し TOF/MS の質量分析装置で質量分析して、図2に示すような結果を得た。（図2には、それぞれのフラグメントの質量値は記載していない。）図2に示したのは、特定した1つの蛋白スポットの結果例である。

これをもとにデータベースから理論値との比較により、候補としていくつかの分子を同定するに至った。

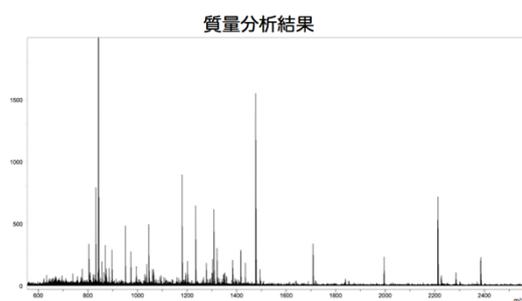


図 2

その分子群は、細胞骨格、転写因子などであった。Ras、Rho などの低分子G蛋白質の情報伝達系の因子は同定できなかった。また、MAP-kinase と関係するであろう因子も蛋白質量の変化、リン酸化の変化などを伴う因子としては確認できなかった。このように同定できていないという事が、すなわち疾患との関連が否定できたということにならない点は本手法の難しい問題点であった。

【悪性化関連因子の生理機能の解析】

特定した蛋白質の内、転写関連因子の内、TGFβ の情報伝達の下流の因子群を対象を絞り込みその転写活性を、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使い測定した。

NF1 の蛋白の欠損した細胞では、相対的にRasが活性化した状態であることが想定される。そのため、Ras の恒常活性型変異体である RasV12 を導入した細胞を用いて実験系を組んで測定を行った。その結果、我々の実験系では転写活性に変化を及ぼさなかった。更なる解析が必要である。

【臨床症例の検討】

(1) 幼少時より増大を見た神経線維腫に発生した悪性神経鞘腫の症例。び慢性神経線維腫から発生したと判断でき、切除手術と放射線治療を併用したが、肺転移の合併を来した。通常、

悪性転化する例は経過の長い中年以降の事が多いがこの症例は若年での悪性転化の症例であった。悪性転化する因子としては複雑な機構が考えられる。

(2) 皮膚の一部のみにカフェオレ斑や神経線維腫が見られる症例はモザイク型として考えられている。これ迄の経験例や診療録などから 58 例の検討を加えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- ①. 右肘部に生じたグロムス腫瘍の1例
高坂美帆, 石地尚興, 山田英明, 伊東秀記, 松尾光馬, 太田有史, 中川秀己
日本皮膚科学会雑誌 121巻14号
p3414(2011. 12)
- ②. Phacomatosis Pigmentokeratolicaに合併した腎芽腫の1男児例
奥山舞, 山岡正慶, 横川裕一, 寺尾陽子, 横井健太郎, 秋山政晴, 田嶋朝子, 田知本寛, 太田有史, 井田博幸
日本小児科学会雑誌 115巻11号
p1827(2011. 11)
- ③. Suzuki H, Murata K, Gotoh T, Kusano M, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Imamura M, Kudo M, Mizokami M, Sakamoto A.
Phenotype-dependent production of des-γ-carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma.
J Gastroenterol. 2011 Oct;46(10):1219-29.
- ④. Nagashima S, Yagyu H, Takahashi N, Kurashina T, Takahashi M, Tsuchita T, Tazoe F, Wang XL, Bayasgalan T, Sato N, Okada K, Nagasaka S, Gotoh T, Kojima M, Hyodo M, Horie H, Hosoya Y, Okada M, Yasuda Y, Fujiwara H, Ohwada M, Iwamoto S, Suzuki M, Nagai H, Ishibashi S. Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues--association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity.
J Atheroscler Thromb. 2011;18(3):190-9
- ⑤. 神経線維腫症のカフェオレ斑に対するQスイッチルビーレーザーの治療効果
小林康隆, 太田有史, 中川秀己, 堀和彦
日本皮膚科学会雑誌 121巻5号
p920(2011. 04)

- ⑥. レックリングハウゼン病の分子標的治療
太田有史
日本レックリングハウゼン病学会雑誌
1巻1号 p21-24(2010. 10)
- ⑦. 神経線維腫症1型のモザイクの親から神経線維腫症1型の子供が生まれた4家族
谷戸克己, 太田有史, 中川秀己, 新村真人, 澤田 俊一
日本レックリングハウゼン病学会雑誌
1巻1号 p30-34(2010. 10)
- ⑧. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) を合併した神経線維腫症1型の1例
小林光, 延山嘉眞, 松尾光馬, 太田有史, 中川秀己, 三木淳
西日本皮膚科 72巻3号 Page299(2010. 06)
- ⑨. Nakayama K, Bayasgalan T, Tazoe F, Yanagisawa Y, Gotoh T, Yamanaka K, Ogawa A, Munkhtulga L, Chimedregze U, Kagawa Y, Ishibashi S, Iwamoto S
A single nucleotide polymorphism in the FADS1/FADS2 gene is associated with plasma lipid profiles in two genetically similar Asian ethnic groups with distinctive differences in lifestyle.
Hum Genet. 2010 Jun;127(6):685-90.
- ⑩. Munkhtulga L, Nagashima S, Nakayama K, Utsumi N, Yanagisawa Y, Gotoh T, Omi T, Kumada M, Zolzaya K, Lkhagvasuren T, Kagawa Y, Fujiwara H, Hosoya Y, Hyodo M, Horie H, Kojima M, Ishibashi S, Iwamoto S.
Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI.
Obesity (Silver Spring). May;18(5):1006-14. 2010
- ⑪. 成人発症したLipoid proteinosisの1例
相馬孝光, 竹内紋子, 太田有史, 中川秀己, 濱田 尚宏
日本皮膚科学会雑誌 120巻5号 p1061(2010. 04)
- ⑫. びまん性神経線維腫内への出血に対し血管内塞栓術が奏功した1例
梶井崇行, 吉田寿斗志, 延山嘉眞, 松尾光馬, 太田有史, 石地尚興, 中川秀己, 蘆田浩一, 貞岡 俊一
日本皮膚科学会雑誌 120巻1号 p80(2010. 01)
- ⑬. PDI (Psoriasis Disability Index) 日本語版の検討
- 福地 修, 太田有史, 石地尚興, 本田まりこ, 上出良一, 中川秀己, 長谷川友紀
日本皮膚科学会雑誌 119巻6号 p110(2009. 05)
- ⑭. Nakayama K, Bayasgalan T, Yamanaka K, Kumada M, Gotoh T, Utsumi N, Yanagisawa Y, Okayama M, Kajii E, Ishibashi S, Iwamoto S; Jichi Community Genetics Team (JCOG).
Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population.
J Med Genet. 2009 Jun;46(6):370-4.
- ⑮. 液体窒素凍結療法が有効であったeccrine syringofibroadenomaの1例
片山宏賢, 川瀬正昭, 太田有史, 中川秀己
臨床皮膚科(0021-4973)63巻1号
- [学会発表] (計6件)
- ①. 若年発症した悪性末梢神経鞘腫の1例
東福有佳里
第3回 日本レックリングハウゼン病学会 学術大会 2011年 11月13日 東京
- ②. 神経線維腫症のカフェオレ斑に対するQスイッチルビーレーザーの治療効果
小林康隆
日本皮膚科学会学術大会 2011年 6月 (震災により中止となり紙上発表のみ)
- ③. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) を合併した神経線維腫症1型の1例
小林光
第62回 日本皮膚科西部支部学術大会 2010年 10月24日 倉敷,
- ④. びまん性神経線維腫内への出血に対し血管内塞栓術が奏功した1例
梶井崇行
日本皮膚科学会 2010年 4月16日 大阪
- ⑤. 神経線維腫症1型のモザイクの親から神経線維腫症1型の子供が生まれた4家族
谷戸克己
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
- ⑥. レックリングハウゼン病の分子標的治療
太田有史
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

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/gotoh/NF/>

<http://www.recklinghausen.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 孝也 (GOTOH TAKAYA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急
被ばく医療研究センター・主任研究員

研究者番号：80284355

(2) 連携研究者

太田 有史 (OHTA ARIHITO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20168933