

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592662

研究課題名(和文) 軟部組織腫瘍発生・増殖に影響するマスト細胞の機能検索

研究課題名(英文) Mast cells influence soft tissue tumor increase through inflammatory or other proliferative factor in tumor environment.

研究代表者

山内 俊彦 (Yamauchi, Toshihiko)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：80239839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：軟部組織多発性良性腫瘍発生において、特にレックリングハウゼン病神経線維腫の発生および増殖メカニズムの解明を実施した。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- $\beta$ 1、SCF、Mn-SODなどの数種類の因子と転写因子NF $\kappa$ Bの関連性を確認した。

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 have clarified that mast cells significantly promoted proliferation of the NF1 cells and upped the levels of TGF $\beta$ 1, SCF and MnSOD. In this study, we observed association between MnSOD and its transcription factor Nuclear factor kappa B. We clarified that NF $\kappa$ B-p65, phospho-I $\kappa$ B, phospho-p65 in co-culture of NF1 cells and mast cells using western blotting. MnSOD was later than the other protein expression. MnSOD in the NF1 cells were increased after LPS stimulation and strongly decreased after tranilast (anti-allergic agent) and BAY11-7082 (NF $\kappa$ B inhibitor) stimulations compared without them. Hence, these results suggest a possibility that soluble factor involved in the cell-cell interaction activates NF $\kappa$ B signaling pathway for transcription of MnSOD.

研究分野：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。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

当研究室のこれまでの研究で、NF1 細胞とマスト細胞との共培養での ELISA と SDS-PAGE 二次元電気泳動、質量分析により、TGF- $\beta$ 1 の線維芽細胞増殖因子、IL-6 等のサイトカイン及び Manganese Superoxide dismutase (MnSOD) の関与を確認している。2) . その中で、MnSOD の腫瘍内での役割は不明である。そこで我々は、MnSOD の神経線維腫腫瘍増殖メカニズムへの関与を調査するため、MnSOD の上方調節因子である Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) に着目し

た。NF- $\kappa$ B は通常 p50 と p65 が二量体を形成しており、無刺激の状態では活性抑制蛋白質である I $\kappa$ B と結合して細胞内に留まっている。細胞がサイトカイン等の活性化因子の刺激を受けると I $\kappa$ B はリン酸化され NF- $\kappa$ B 二量体から外れ、次に p65 がリン酸化を受けることで核内へ移行する。核内へ移行した NF- $\kappa$ B が MnSOD 等の標的遺伝子の発現を制御する転写因子として機能することが知られている。そこで、前述の細胞増殖関連及び炎症性サイトカインの影響により NF- $\kappa$ B シグナリング経路が活性化され、MnSOD を発現するのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、シグナリング経路を刺激するサイトカイン等の活性化因子の放出を促進または抑制した場合や、NF- $\kappa$ B から I $\kappa$ B が外れる経路または p65 のリン酸化を阻害して核内への移行を阻害しシグナリング経路の活性を阻害した場合の、NF- $\kappa$ B p65、リン酸化 I $\kappa$ B、リン酸化 p65 と、その下流に位置する MnSOD の蛋白発現量への影響を観察した。

## 3. 研究の方法

### 1. NF1 細胞の作製

外科的に切除した神経線維腫 (シュワン細胞、線維芽細胞混合腫瘍) から explant culture にて得た細胞を 10% FCS (Fetal Calf Serum) 加 DME 培地 (Invitrogen, USA) にて分離培養した。これらを継代培養したものを NF1 細胞とし、3~10 継代した NF1 細胞を用いた。

### 2. マスト細胞の分化誘導

健常人骨髄由来単核細胞 (Bone marrow derived mononuclear cells; BMMC, Lonza, USA) を用い、1% FCS 加 AIM 培地 (Invitrogen) に播種し、SCF (Stem Cell factor, R&D system) 10ng/ml および IL-3 (R&D system) 10ng/ml を添加して分化誘導を行った。マスト細胞の同定はトルイジン青染色で確認し、マスト細胞の成熟の指標とした。実験には 6~8 週間分化成熟したものをを用いた。

### 3. 単培養での薬剤刺激モデルの作製

1) . で作製した細胞を 6well プレート (Becton & Dickinson) に  $4.8 \times 10^4$  個ずつ播種し、10% FCS 加 DME 培養液で細胞が subconfluent になるまで培養後、FCS の影響を抑えるため培地を 1% FCS 加 DME 培養液に交換し、Lipopolysaccharide (LPS, 炎症促進剤, ALEXIS, AUS) 250ng/ml 添加したものと、そこに PDTC (NF- $\kappa$ B 活性化阻害剤, Sigma) 20 $\mu$ M 添加したものを作製し、0~6 時間培養した。

### 4. 共培養での薬剤刺激モデルの作製

3) . と同様に subconfluent になるまで培養したものに 2) . のマスト細胞  $10 \times 10^4$  個ずつを共培養したものと、そこに LPS 1 $\mu$ g/ml またはトラニラスト (TGF- $\beta$ 1・ヒスタミン放出阻害

剤, キッセイ薬品工業)300 $\mu$ M, BAY11-7082(NF $\kappa$ B 活性化阻害剤, 和光純薬工業株式会社)10 $\mu$ M 添加したものを作製し 4 時間培養した。

5. MnSOD 及び NF $\kappa$ B 発現量の比較  
 培養終了後, 培養液を除去し PBS(-)で細胞を洗浄した。その後細胞溶解液(Thermo SCIENTIFIC)を 250 $\mu$ l/well 添加し細胞を回収した。Protein Assay Dye Reagent Concentrate(BIO-RAD)で蛋白定量し, SDS サンプル Buffer [0.5MTris-HCl(pH6.8), 10%SDS,  $\beta$ -メルカプトエタノール, グリセロール, BPB] を加えて蛋白濃度を一定に調整した後, 100 /10min 加熱し蛋白を抽出した。これを 10%SDS アクリルアミドゲル電気泳動後, PVDF 膜(BIORAD)に転写し, ブロッキングを行った。一次抗体である抗ヒト抗体 [MnSOD (Millipore, 1:1000), NF $\kappa$ B p65 (Millipore, 1:500), リン酸化 I $\kappa$ B (R&D systems, 1:1000), リン酸化 p65 (Cell Signaling, 1:1000), GAPDH (Millipore, 1:2000)] を反応させ, そこにペルオキシダーゼ標識抗マウスまたはウサギ IgG ポリクローナル二次抗体(ニチレイ)を反応させた。ECL 試薬(ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Life Sciences)にて発色後, 撮影(CheminDoc XRS Plus, BIORAD)した。

#### 4. 研究成果

##### 1. 薬剤刺激後の NF1 細胞における MnSOD と NF $\kappa$ B 発現量の経時的変化(図 1~4)

NF1 細胞を LPS または PDTC で刺激し, MnSOD と NF $\kappa$ Bp65, リン酸化 I $\kappa$ B, リン酸化 p65 の発現量の経時的変化を観察した結果, PDTC 刺激に比べ LPS 刺激では発現量が増加した。また MnSOD の発現に比べ, NF $\kappa$ B とリン酸化 I $\kappa$ B の発現が早かった。

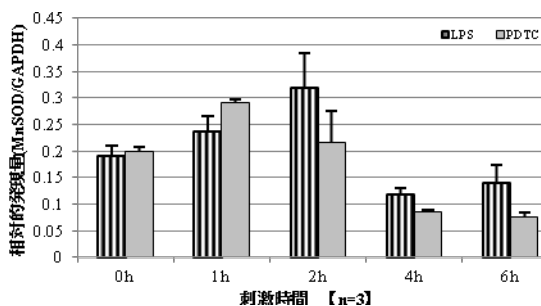


図 1. LPS, PDTC 刺激後の NF1 細胞における MnSOD 発現量の経時的変化

LPS で刺激後培養したものは 2 時間でピークを示し, PDTC で培養したものは 1 時間でピークを示した。

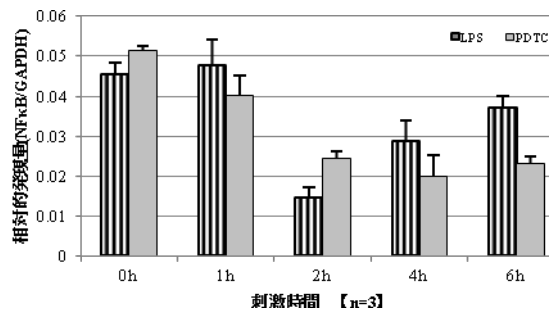


図 2. LPS, PDTC 刺激後の NF1 細胞における NF $\kappa$ B 発現量の経時的変化

どちらで刺激したのも 1 時間から 2 時間にかけて大きく減少した。

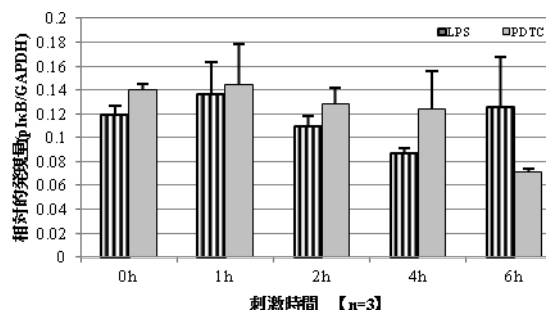


図 3. LPS, PDTC 刺激後の NF1 細胞におけるリン酸化 I $\kappa$ B 発現量の経時的変化

LPS で刺激したものは 1 時間にピークを示し, 2~4 時間で減少し, 6 時間後で再び増加した。また PDTC で刺激したのも 1 時間にピークを示し, 1 時間以降は徐々に減少した。

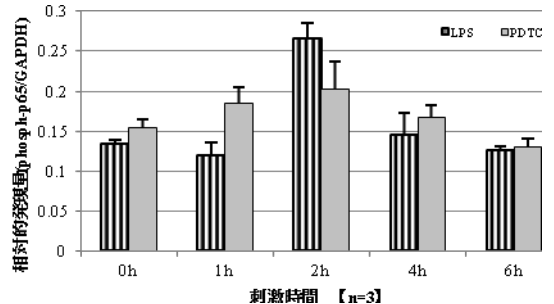


図 4. LPS, PDTC 刺激後の NF1 細胞におけるリン酸化 p65 の発現量の経時的変化

どちらで刺激したのも 2 時間でピークがみられた。

##### 2. 薬剤刺激後の共培養における MnSOD と NF $\kappa$ B 発現量の変化(図 5~8)

NF1 細胞とマスト細胞の共培養において薬剤刺激実験を行い, MnSOD と NF $\kappa$ B との関連性を検討した結果, MnSOD の発現量は炎症促進剤刺激により増加し, NF $\kappa$ B 活性化阻害剤刺激により有意に減少した。

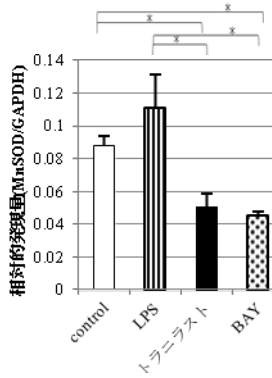


図 5. 薬剤刺激後の共培養における MnSOD 発現の変化

LPS 刺激後の発現量は増加し、トラニラスト・BAY11-7082 刺激後の発現量は有意に減少し

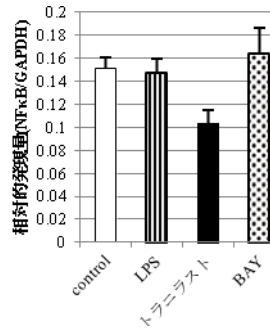


図 6. 薬剤刺激後の共培養における NFκB 発現の変化

トラニラスト刺激後の発現量は有意に減少した。

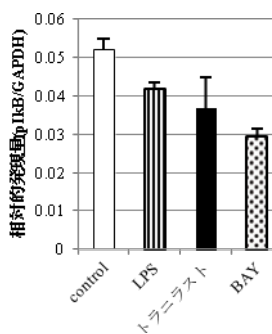


図 7. 薬剤刺激後の共培養におけるリン酸化 IκB 発現の変化

control に比べ LPS, トラニラスト, BAY11-7082 それぞれで発現が減少した。

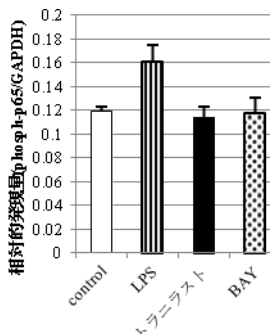


図 8. 薬剤刺激後の共培養におけるリン酸化 p65 発現の変化

LPS 刺激後の発現が有意に増加した。

実験 1 の結果より, NF1 細胞における MnSOD と NFκB の発現は細胞増殖因子や炎症性サイトカインの影響を受けることを確認した。LPS は細胞増殖因子や炎症性サイトカインの放出を促進する作用のある薬剤であり, NF1 細胞からのこれら因子の放出を促進し, その結果, MnSOD や NFκB の発現量が変化したと考えられる。また NFκB 活性化阻害剤の添加により, MnSOD の発現量が減少したこと, MnSOD の発現ピークより NFκB の発現ピークが早かったことから, NFκB の活性化が MnSOD の発現に関与していることが示唆された。また実験 2 の結果より, マスト細胞を共培養した NF1 細胞における MnSOD の発現量は NF1 細胞単培養の場合よりも薬剤刺激の影響を大きく受けることが確認できた。NF1 細胞ではもともと正常線維芽細胞やケロイド細胞に比べて MnSOD の発現量が高いが, マスト細胞から放出された細胞増殖因子や炎症性サイトカインの作用によって MnSOD の発現量がさらに増加した。

また, LPS およびトラニラストは NF1 細胞から

の細胞増殖因子や炎症性サイトカインの放出を促進または抑制するだけでなく, マスト細胞からのこれら因子の放出にも影響を与えた。さらに NFκB 活性化阻害剤の添加により, MnSOD の発現量が有意に減少したことから, 炎症及び細胞増殖性サイトカインの増加に伴い NFκB が活性化され, MnSOD の発現増加に影響を及ぼしたと考えられた。

マスト細胞はアレルギーの中心的役割を果たす細胞であるが, 腫瘍内での役割はほとんど不明である。近年では, 胃癌などの固形癌や悪性リンパ腫やホジキンリンパ腫にも正常マスト細胞が存在すると報告されており, 腫瘍中のマスト細胞が放出するケミカルメディエーターが腫瘍細胞の増殖に荷担しているのではないかと考えられている。

以上より, もともと炎症環境にある腫瘍中に存在するマスト細胞がさらに各種メディエーターを放出することで炎症環境はさらに悪化し, 腫瘍が増大していくことが証明された。

## 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)

[学会発表](計 2 件)

(1) 山本美佐, 山内俊彦, レックリングハウゼン病神経線維腫増殖に關する MnSOD と転写因子 NFκB の関連性 - 第 2 報 - 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (札幌)

(2) 山本美佐, 山内俊彦, レックリングハウゼン病神経線維腫増殖への Mn-SOD と転写因子 NFκB の関連性, 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 28 日, 京王プラザホテル(東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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・講師  
研究者番号: 70379957

(3) 研究分担者

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