

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：32636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461707

研究課題名(和文) 神経線維腫症に合併する悪性神経鞘腫誘発に関わる放射線照射の影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of radiation effects on Neurofibromatosis type1 tumor and its malignant transformation

研究代表者

後藤 孝也 (GOTOH, TAKATA)

大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：80284355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 神経線維腫症1型の患者に見られる良性腫瘍に対する放射線照射が悪性転化を誘発し、悪性神経鞘腫の発症に関与すると考えられ始めた。この悪性化の機構を解析する為に、腫瘍の組織構造を単純化した細胞培養モデル系を構築し、放射線照射前後で細胞内で変化する因子を形態的及び二次元電気泳動上の蛋白質スポットを手がかりに観察した。

これまでに報告のある放射線照射により誘発されるアポトーシスに関連する因子と、今回我々が同定を試みた因子は、分子量等から推定して異なる因子群であり、細胞の悪性化に関与する可能性がある。またその因子は、分子内の複数のアミノ酸残基のリン酸化により制御されている可能性が高い事が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Recently, there is some evidence that the usual dose of radiation in clinical work will become a trigger inducing MPNST (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor) in benign tumor of patient with NF1 which is an autosomal dominant inheritance disease. We investigated the radiation effects on dorsal ganglia derived cells that were over expressed ras oncogene, using proteomic analysis. The proteomic profiling was performed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and TOF/MS identification methods.

As a result, we observed the some of the differently expressed protein spots which changed between before and after irradiation in simple models which mimic the tissue structure of the benign tumor of NF1 and MPNST. From analysis of the gel spots, it was suggested that the phosphorylation of some amino acid residues of the proteins were related with the function itself and controlled by irradiation. And the factors may work important rule in malignant transition of NF1.

研究分野：病態生化学

キーワード：神経線維腫瘍 プロテオミクス 細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の中で最も頻度が高いとされる疾患の一つである神経線維腫症1型(NF1)の患者に見られる皮膚の神経線維腫は、本来良性腫瘍であるが、時として悪性神経鞘腫(MPNST)を発症し予後不良の転帰となる場合がある。この悪性転化機構の詳細は不明であるが、その誘発に放射線が関与する可能性があるとの報告がなされ、欧米ではスクリーニング目的のCT検査などの低線量の撮影すら極力避ける動きがある。通常、良性腫瘍であっても経過観察に於いてCT検査等は臨床診断のために必須である。そのため、本来診断に用いる程度の放射線が悪性転化の契機となるのであれば、これまでの診断指針や治療方針の見直しに迫られることになる。一方で、同症の患者に悪性神経鞘腫のみが高頻度に発生することは、発生母地が良性の神経線維腫由来であることを加味しても説明が難しい。そのため、放射線照射によるNF1の患者にみられる良性の皮膚神経線維腫の悪性転化メカニズムや放射線が神経線維腫由来の腫瘍に及ぼす影響、さらには良性腫瘍が悪性転化する際の臨床的な早期診断の方法やその診断基準、また治療評価の標準化など臨床応用が可能な基礎的な解析が求められている。

2. 研究の目的

現在、NF1の患者を含め腫瘍等の経過観察では腫瘍の増大傾向の有無等の確認のために放射線を用いたCT検査が行われている。比較的多くの線量の照射がなされるCT検査であるが、被ばく線量は最大に見積もっても平均十数mSv程度と考えられており、通常は問題とならない値とされている。しかし、最近NF1の患者に合併した視神経鞘腫に対して実施した放射線治療群と他群との比較経過観察の結果から、放射線治療群の50%以上に二次癌が発症し、その過半数がMPNSTであったとする報告があった(Sharif S et al, J.clin.Oncol. 2006)。そのため、特に小児に対しての放射線治療は慎重になるべきとされ、さらには、ここ数年の傾向として、放射線治療のみならず、CT検査などの低線量の放射線照射も長期的にみると、MPNSTを誘発するのではないかとの立場から、クリーンなCT検査すらも極力控えるべきであるとする傾向になりつつある。しかし、一方で、CT検査の有用性は明らかであり、臨床必須の検査であることも事実である。

(1) プロテオミクス的手法で悪性腫瘍特異的蛋白質を解析してきた結果同定された蛋白質であるカドヘリンや細胞骨格蛋白などであることをもとに、上皮細胞が極性を失い運動性を亢進させ、間葉系の形質を獲得する現象: 上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)が、神経線維腫の悪性化の一

端を担っているに他ならないと考え、EMT現象に関して放射線の細胞組織、細胞病理的变化及び放射線による神経線維腫の悪性化への影響を細胞レベルで解析し、EMT現象を起こし変化する過程に関与する因子、さらにMPNSTへの悪性転化際に関与する因子の同定等を主たる目的とした。

(2) 放射線と細胞内情報伝達因子の関連を強く示唆するような報告として、TGFの刺激および放射線照射と細胞内情報伝達因子の一つ、smadの関連を強く示唆する報告(Yano H, et.al., Hamanaka R, Biochem Biophys Res Commun. 2012 Feb 17, Hneino M, et.al. PLOS One. 2012)もあるため、より単純化した細胞モデル実験系を構築した上で、放射線照射による既知の細胞内情報伝達因子群に注目したMPNSTへの悪性転化機構の解明も併せて行う。さらには、NF1患者から得た手術検体(病理組織標本等)での検証を行い、臨床応用を目指した研究へも発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経線維腫腫瘍組織構造の単純化モデルの構築

上皮間葉転換と良性腫瘍の悪性化機構の解析のため、ヘテロな細胞集団である神経線維腫の腫瘍組織構造を単純化したモデル系を構築する。培養細胞系および生体組織を模倣した系を作り、各条件下の細胞に対する放射線の影響と悪性化の機構を解析した。

腫瘍組織を構成する複数の細胞のなかでもっとも主要かつ重要な役割を持つ細胞であると考えられる神経系細胞と腫瘍組織を構成する細胞群で多くを占める線維芽細胞の二種類の細胞に着目して単純化を行った。実際の腫瘍組織の代わりに既に株化された培養細胞である、ras導入系神経細胞(神経節由来)線維芽細胞の2種類の細胞に対するガンマ線の照射に対する影響を、その細胞死を指標として観察した。

対象となる細胞として、乳がん由来細胞(MCF7)、肝臓がん由来細胞(HepG2)細胞、腸管由来細胞(IEC6)の単層培養系に同様の線量のガンマ線を照射して影響を観察した。

次いで、メッシュ構造で上下を隔てた二重底になった細胞皿の上層の部分に細胞を播種し、上層から下層へメッシュ構造の細胞皿の底を通過し下の細胞皿へ移動した細胞をEMT転換した細胞として、それらの細胞の形態的特徴を観察するとともに、間葉系細胞の一連の表面マーカーで免疫染色し細胞を観察した。

(2) 単純化した培養系に対する放射線(ガンマ線)照射の影響の解析

単純化した二重底培養系において、ガンマ線照射を行う前と後で、照射線量および照射後の経時変化をその形態学的変化および細胞レベルでの細胞生理的变化を解析した。

細胞の細胞生理的解析では、培養細胞を 0.5% TritonX100 により可溶化し、細胞質蛋白質、膜蛋白質、核蛋白質、クロマチン結合蛋白質、細胞骨格蛋白質に分画し、解析すると共に、蛋白質の修飾である糖鎖とリン酸化に着目して分画した後、放射線照射前後での蛍光ディファレンス二次元電気泳動による網羅的プロテオミクス的手法を用いて解析した。

同じく、ガンマ線照射の前後で、メッシュ構造を通過した細胞と上層に残った細胞での蛍光ディファレンス二次元電気泳動による網羅的プロテオミクス的手法で解析した。

二重底構造の培養系において、線維芽細胞と *ras* 導入細胞をそれぞれ上層と下層で共培養し、ガンマ線を照射した後に上記と同様に免疫染色、蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動法を用いた網羅的プロテオミクス法で解析した。

(3) 関連因子の同定

網羅的プロテオミクス法で得られた二次元泳動上の蛋白質スポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化による断片化し、TOF/MS解析（飛行時間型質量分析計解析）による蛋白質の同定を試み、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 放射線照射により腫瘍細胞の細胞死が誘発される。

ラット及びマウスの神経節由来の細胞に原がん遺伝子 *ras* および *mos* を導入した神経由来細胞は、細胞内に Ras が相対的に増加しており、Ras の負の調節因子として働く RasGAP の一つである *Nf1* 原因遺伝子産物がヘテロで欠損したと考えられる NF1 患者の腫瘍細胞を模倣した状態と考えられる。この細胞にガンマ線（線量：1Gy、2Gy、4Gy、8Gy）を照射した後の経時的変化を形態的および細胞生化学的に観察した結果、8Gy 照射後 48 時間では多くの細胞（80%以上）が浮遊し死滅する現象が見られた。1Gy の照射後も多くの細胞に細胞死が認められ、照射後に生き残った細胞には形態的变化は認められず、増殖曲線を測定した結果でも有意な増殖速度の増減は認められなかった。本来神経細胞は培養細胞であっても細胞分裂の周期は長く放射線照射の障害は比較的に見られ難い。実験に使用した Ras 過剰発現系となる細胞では、細胞周期が早くなっているため、放射線による障害受け易くなっていると解すると矛盾は無いが、細胞の死に至る現象と、悪性化する現象とは共通の段階はあるものの、最終的には異なる経過を経て悪性化となると解釈するべきで、直接の説明はつかない。また、線維芽細胞系である Cos7 細胞や他の腫瘍系細胞（HepG2（肝癌由来）、MCF7（乳がん由来））の細胞で同様の線量で照射後の細胞の生存状況を観察した結果でも、細胞が死滅する放射線照射線量はそれぞれ違いがありその限

界となる線量は細胞に依存することが観察された。また、Ras 過剰発現系神経細胞由来の培養細胞のみに観察される細胞の形態変化など特別な変化も形態（光学顕微鏡で観察する一般的な倍率）では観察されなかった。そのため、形態的な観察とは別に、細胞の生化学的な解析を行った。

(2) 放射線照射による細胞内情報伝達物質の変化は細胞質内蛋白質、クロマチン結合蛋白質に見られる。

細胞にガンマ線（線量 0.5Gy、1Gy、2Gy、4Gy、8Gy）をそれぞれ照射した後（12 時間後、24 時間後、48 時間後）に、それぞれ細胞を 0.5% TritonX100 で可溶化した後、その可溶分画を、細胞質蛋白質、細胞膜蛋白質、核蛋白質、クロマチン結合蛋白質、核蛋白質に分画した後放射線の照射前後で時間経過も含めて蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動の比較し有意に変化する蛋白質を二次元電気泳動のゲル上のスポットとして可視し比較検討した。放射線照射前を緑、照射後を赤で蛍光ラベルし、同時に同じゲル上で電気泳動を行うことで、変化しない蛋白を黄色（緑 = 赤）の蛍光、照射後に増加した蛋白を赤色（緑 < 赤）の蛍光スポットとして観察し、照射後に減少する蛋白質は緑色のスポットとして観察した。その結果、細胞膜蛋白質ではほぼ全ての二次元泳動上の蛋白質スポットが黄色に観察され、放射線照射前後で変化が見られないことが判明した。一方で、細胞質蛋白質、クロマチン結合蛋白質の分画においては、前後で有意と見られるスポットが確認された。特にこれらの蛋白質スポットは、等電点として横一列に並ぶスポットとして観察されることより、同一蛋白質のリン酸化修飾の違いが関与すると考えられた。

(3) 放射線照射前後で量的変化する蛋白質では、複数のアミノ酸残基のリン酸化によって細胞内で機能の制御をおこなっている。

クロマチン結合蛋白質、細胞質蛋白質で二次元蛋白質泳動を行った結果観察された横一列に並ぶ分子量が等しく、等電点の違いとして観察できる蛋白質はリン酸化による違いであると考えられるため、リン酸化蛋白質を特異的に濃縮分画し二次元電気泳動上により大きなスポットとして泳動し観察を行った。また、神経由来細胞のみならず、腫瘍系の細胞として乳がん細胞由来 MCF7 細胞、増殖が早い細胞として腸管由来細胞 IEC6 細胞でも同様に解析した結果、神経系細胞照射後 48 時間後に見られるディファレンシャル解析での差異が明らかであり、照射後にその発現量が増加する蛋白質スポットに対して発現量が減少する蛋白質スポットの数がおよそ 3 倍の数見られることが判明した。そのスポットは 12 時間後、24 時間後、48 時間後と徐々に減少して行く事が観察され、放射線照射による細胞の変化は細胞質内の蛋白質、およびクロマチン結合蛋白質の減少に起因する可能性が示唆された。

放射線照射前と照射 48 時間後で可溶化した細胞からリン酸化蛋白質を濃縮回収した後、同様に蛍光二次元ディフュージョン電気泳動解析を行った。その結果、二次元で展開した泳動ゲル上で同一の分子量に異なる等電点に横一列で並ぶ変化する蛋白質スポットが観察され、この同スポットは、48 時間後には大きく減少することが観察できた。このような蛋白質の変化は、蛋白質は分子内の異なる複数力所がリン酸化されるアミノ酸に観察され、それぞれのリン酸化部位とリン酸化の有無が蛋白質の機能に密接に関係することが多い。この蛋白質のスポットをゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化をした後、ペプチド断片を TOF/MS 質量解析で解析したが、転写因子などの調節因子とは関係無い分子が推定された。蛋白質は放射線照射後に減少する蛋白質であるため、抗体などを用い時間経過の解析をする必要性があり、更なる解析を加えなければならない。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori H, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K
Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3
Genes to Cells, 22(3), 310 - 327, 2017-03,
DOI:10.1111/gtc.12479
2. Hazawa M, Yasuda T, Saotome-Nakamura A, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, Tajima K
Intra- and extracellular plasminogen activator inhibitor-1 regulate effect of vitronectin against radiation-induced endothelial cell death
Vascular Pharmacology, 87, 150 - 158, 2016-12,
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2016.09.006
3. Isozaki T, Fujita M, Yamada S, Imadome K, Shoji Y, Yasuda T, Nakayama F, Imai T, Matsubara H
Effects of carbon ion irradiation and X-ray irradiation on the ubiquitylated protein accumulation.
International journal of oncology, 49(1), 144-52, 2016-07,
DOI:10.3892/ijo.2016.3504
4. Sunada S, Kanai H, Lee Y, Yasuda T, Hirakawa H, Liu C, Fujimori A, Uesaka M, Okayasu R
Nontoxic concentration of DNA-PK inhibitor NU7441 radio-sensitizes lung tumor cells with little effect on double strand break repair.
Cancer science, 107(9), 1250-5, 2016-09,
DOI:10.1111/cas.12998
5. Obara C, Takizawa K, Tomiyama K, Hazawa K, Saotome-Nakamura A, Gotoh T, Yasuda T, Tajima K
Differentiation and Molecular Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Murine Induced Pluripotent Stem Cells Derived on Gelatin or Collagen
Stem Cells International, 2016-08,
DOI:10.1155/2016/9013089
6. Kawano M, Umeda S, Yasuda T, Fujita M, Ishikawa A, Imamura T, Imai T, Nakayama F
FGF18 Signaling in the Hair Cycle Resting Phase Determines Radioresistance of Hair Follicles by Arresting Hair Cycling
Advances in Radiation Oncology, 1(3), 170 - 181, 2016-06, DOI:10.1016/j.adro.2016.05.004
7. Obara C, Tomiyama K, Takizawa K, Rafiqul I, Yasuda T, Gotoh T, Tajima K
Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates
Cell and tissue research, 2016-04,
DOI:10.1007/s00441-016-2405-y
8. Matsumoto S, Fischer E, Yasuda T, Domae N, Iwai S, Moro T, Nisi R, Yoshino K, Sakai W, Hanaoka F, Thoma N
Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein
Nucleic Acids Research, 43, 1700-1713, 2015,
DOI:10.1093/nar.gkv038
9. Matsuzaki S, Yasuda T, Sakaguchi N, Yamaguchi Y, Akashi M
Cell-permeable intrinsic cellular inhibitors of Apoptosis protection and rescue intestinal epithelial cells from radiation induce cell death
J. Radiation Research, 56, 100-113, 2015,
10. Iwashita S, Suzuki T, Yasuda T, Nakashima K, Sakamoto T, Kohno T, Takahashi I, Kobayashi T, Ohno-Iwashita Y, Imajoh-Ohmi S, Song S
Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and Ser250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions
Bioscience Reports, 35(4), e00228, 2015-06,
DOI:10.1042/BSR20150111
11. 放射線による DNA 損傷と細胞応答
安田武嗣, 羽澤勝治, 崔星, 中山文明, 田嶋克史
放射線による DNA 損傷と細胞応答
医学物理, 35(2), 50-63, 2015-04

12. Tajima K, Nishimura H, Hongo S, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Tomiyama K, Obara C, Kato T

Estimation of measles transmission from a healthcare in a hospital setting
International Society for Infectious Diseases, 24,11-13, 2014:
DOI:10.1016/j.jid.2014.03.1377

13. Hazawa M, Tomiyama K, Saotome-Nakamura A, Obara C, Yasuda T, Gotoh T, Tanaka I, Yakumaru H, Ishihara H, Tajima K

Radiation increases the cellular uptake of exosomes through CD29/CD81 complex formation.

Biochemical and biophysical research communications, 446(4), 1165 - 1171, 2014
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.03.067

〔学会発表〕(計4件)

1. 安田武嗣

非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介した DNA 損傷応答

2016 年度国立遺伝学研究所 研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」

国立遺伝学研究所(三島市)2016.10.24

2. 安田武嗣、香川亘、荻朋男、齋藤健吾、加藤宝光、鈴木健祐、堂前直、滝澤和也、早乙女(中邑)愛、中沢由華、Matthew D. Genet、宇井彩子、花岡文雄、菅澤薫、岡安隆一、Penny A. Jeggo、胡桃坂仁志、田嶋克史
ヒト RAD52 のアセチル化を介した相同組換えにおけるアセチル化および脱アセチル化酵素の新規機能の解明

第 38 回 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(神戸市)2015.12.3

3. 小原千寿香、富山健一、イスラムラフクル、滝澤和也、安田武嗣、後藤孝也、田嶋克史
2つの異なる培養素材で培養したマウス骨髄細胞由来間葉系幹細胞における血管新生能に関する検討

第 14 回 日本再生医療学会総会
パシフィコ横浜(横浜市)2015.3.19 - 3.21

4. 田嶋克史、早乙女愛、安田武嗣、後藤孝也、小原千寿香、富山健一

X-linked inhibitor apoptosis protein のアセチル化は放射線細胞死を制御する

第 54 回 日本リンパ網内学会総会
山形国際ホテル(山形市)2014.6.21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 孝也 (GOTOH, Takaya)
大東文化大学・スポーツ健康科学部・健康科学科・教授
研究者番号: 80284355

(2) 研究分担者

田嶋 克史 (TAJIMA, Katsushi)
放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・プログラムリーダー
研究者番号: 80292423
平成 27 年度より連携研究者

安田 武嗣 (YASUDA, Takeshi)
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: 60332269
平成 27 年度より連携研究者

富山 健一 (TOMIYAMA, Kenichi)
放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・博士研究員
研究者番号: 20584064
平成 27 年度より連携研究者

小原 千寿香 (OBARA, Chizuka)
放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・研究員
研究者番号: 90415977
平成 27 年度より連携研究者