

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700981

研究課題名(和文) TCTP を介した神経線維腫症 1 型腫瘍の発症機序の解明と治療戦略の構築

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of, and construction of therapeutic strategy for, Neurofibromatosis type 1-associated tumors via TCTP

研究代表者

小林 大樹 (Kobayashi, Daiki)

熊本大学・生命科学研究部・研究員

研究者番号：20448517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：神経線維腫症 1 型(NF1)は良性の神経線維腫や悪性腫瘍などの多彩な病態を示す遺伝性疾患である。NF1腫瘍においては、その発生機構の解明、およびバイオマーカー・治療の開発が進んでおらず、治療法が確立されていない現状にある。本研究では、新規NF1病態関連分子TCTPが、NF1腫瘍の新規バイオマーカーおよび治療標的として有用であるか検証した。その結果、TCTPはNF1腫瘍の悪性度に相関して高発現しており、さらにNF1腫瘍細胞の成長を促進する役割を果たすことが判明した。本研究結果により、新規NF1病態関連分子TCTPを標的としたNF1腫瘍の診断法、および治療戦略の開発が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：Neurofibromatosis type-1 (NF1) is an inherited disorder that presents various pathological conditions including benign neurofibromas and malignant tumors. Due to the lack of information on the molecular mechanism of NF1-associated tumor pathogenesis or biomarkers/therapeutic targets, a radical treatment for NF1 tumors has not been established. In this study, we evaluated whether the novel NF1-associated protein, translationally controlled tumor protein (TCTP), could be a novel biomarker and therapeutic target for NF1-associated tumors. We found that TCTP expression level correlated with their malignancy and contributes to NF1-associated tumor cell growth. Collective to our findings, it is expected that a diagnostic method and therapeutic strategies targeting TCTP for NF1-associated tumors has been developed.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：神経線維腫 NF1 TCTP Neurofibromin プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 1 型は、多発性神経線維腫を始める多彩な病態を示す遺伝性疾患である。原因遺伝子産物ニューロフィブロミンは、Ras-GAP 相同領域を有し、細胞内シグナル伝達の重要な調節因子と考えられている。NF1 原因遺伝子の同定により本疾患群の発症機序が明らかになり、治療や予防法が開発されるものと期待された。しかしながら、遺伝子構造から予想される産物の機能と疾患の表現型との間にはなお大きな距離があり、具体的な治療法・予防法に関しては、リスクを伴う腫瘍の外科的摘出術による一時的な対処療法以外には存在しないのが現状である。

本研究では以前に、NF1 遺伝子に特異的な siRNA を処理した神経系細胞を NF1 病態モデルとして用い、新しい融合プロテオミクス手法によって、新規 NF1 病態関連分子として Translationally controlled tumor protein (TCTP) を同定した。TCTP は酵母からヒトにいたるまで、真核生物種間で構造および機能面において高度に保存されており、多彩な機能を示す蛋白質である。特にアポトーシス抑制、蛋白質合成、細胞分裂に関わる機能などの面から、TCTP は腫瘍との関連が示唆されている。しかしながら、NF1 の代表的な腫瘍である神経線維腫の発症・進行に TCTP が関与するという報告はない。そこで、TCTP 機能を標的とすることで、新規な NF1 腫瘍の治療法が開発できると考えられた。

### 2. 研究の目的

新規 NF1 病態関連因子 TCTP を標的とした NF1 腫瘍の新規治療法の開発を目指し、本研究では、TCTP の NF1 腫瘍内における発現制御機構および機能・役割について詳細に解析し、TCTP の NF1 腫瘍発症機序への寄与、および NF1 腫瘍治療のターゲットとしての有用性について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) siRNA によって NF1 遺伝子を欠損させた Schwann 細胞の定常状態、および各種成長因子での培養条件における細胞内 TCTP の発現状態を、抗 TCTP 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。

(2) 各種 NF1 腫瘍における TCTP の発現状態を抗 TCTP 抗体を用いた免疫組織染色法によって解析した。

(3) NF1 腫瘍細胞内の TCTP 発現制御機構を、NF1 が抑制する Ras の下流である MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ、および mTOR 阻害剤等を用いて解析した。

(4) NF1 腫瘍細胞内の TCTP の発現を siRNA によって抑制し、TCTP の腫瘍細胞内における機能を解析した。

### 4. 研究成果

(1) siRNA を用い、培養 Schwann 細胞 S16 の NF1 の発現を抑制した結果、細胞増殖能が亢進し (図 1A)、Ras の下流である Erk が活性化することと同時に TCTP の発現が亢進していることを見出した (図 1B)。また、特に NF1 を発現抑制させた細胞内において、PDGF 刺激により有意に TCTP の発現が上昇していることを見出し (図 1C)、その TCTP 発現誘導は Ras の下流である MAP キナーゼ、および PI3 キナーゼ阻害剤により抑制された (図 1D)。以上の結果、NF1 を発現抑制した Schwann 細胞において、TCTP は成長因子によって Ras シグナルを介して発現誘導することが判明した。

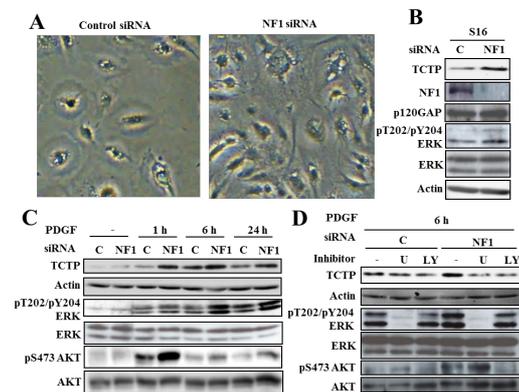


図 1. NF1 欠損 S16 シュワン細胞内における TCTP の発現変動

(2) NF1 腫瘍である皮下神経線維腫、網状神経線維腫および悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) の 3 種の腫瘍組織内 20 症例における TCTP の発現状態を、免疫組織化学法により解析した。その結果、TCTP の発現は組織の悪性度に相関して、高くなる傾向にあることが判明した (図 2)。したがって、TCTP は、NF1 腫瘍の診断バイオマーカーとして有用であることが示唆された。

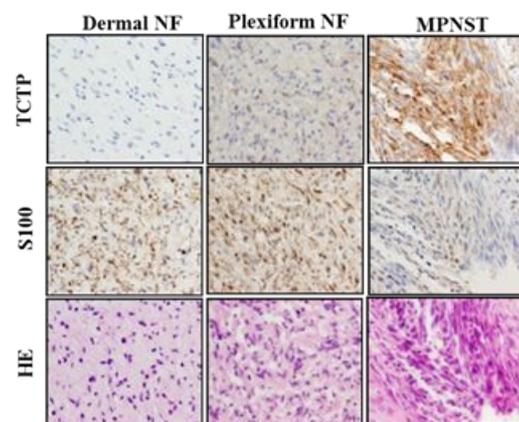


図 2. 悪性度の異なる神経線維腫内の TCTP 発現の免疫染色法による評価 (検体数 20 の代表例)。

(3) NF1 遺伝子機能が TCTP の発現に及ぼす影響を検討するため、NF1 の Ras を負に制御する GAP 関連領域 (GRD) を MPNST 由来の培養細胞内に過剰発現させ、TCTP の発現をウェスタンブロット解析により評価した。その結果、GRD の過剰発現によって MAPK、PI3K-AKT 経路の活性低下に伴い、TCTP の発現は減少することが判明した(図 3A)。さらに、MEK、PI3K を阻害することによっても TCTP の発現は減少することを見出した(図 3B)。また、TCTP の発現減少は、mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路の活性低下に伴って起こることが示唆された(図 3A、3B)。TCTP の mRNA の 5' 末端の配列には 5' -末端オリゴピリミジン領域が存在することが想定されていることから、TCTP は mTOR 活性による正の翻訳制御を受けることが考えられるため、MPNST 細胞の mTOR 活性のラパマイシンによる阻害が TCTP に及ぼす影響を検討した。その結果、ラパマイシン処理により TCTP の発現は翻訳レベルで減少することが明らかとなった(図 3C)。以上の結果、MPNST 細胞内において Ras-MAP キナーゼシグナル、および Ras-PI3 キナーゼ/AKT シグナルを介した mTOR 経路の活性化が TCTP の発現上昇に寄与していることが判明した。

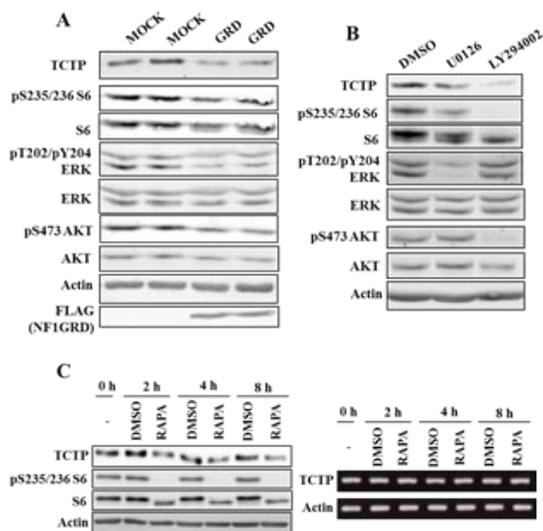


図 3 . ヒト培養 MPNST 細胞 (sNF96.2) 内における TCTP 発現上昇メカニズムの検証 .

(4) MPNST 細胞内における TCTP の機能を検討するため、siRNA によって TCTP の発現を抑制し、その表現型を検証した。TCTP の発現抑制によって、ヒト培養 MPNST 細胞の生存能は低下し(図 4A)、細胞サイズの低下を引き起こしていることが明らかとなった(図 4B、4C)。TCTP は細胞サイズの調節に密接に関わっている mTOR 経路を正に制御していることが報告されていることから、TCTP の mTOR 経路の下流である S6 のリン酸化レベルへの寄与について検討したところ、TCTP 発現抑制が S6 のリン酸化レベルを低下させることが明らかとなった(図 4D)。以上の結果から、TCTP

は MPNST 細胞のサイズ、および mTOR 経路を正に制御し、細胞の増殖を促進していることが判明した。

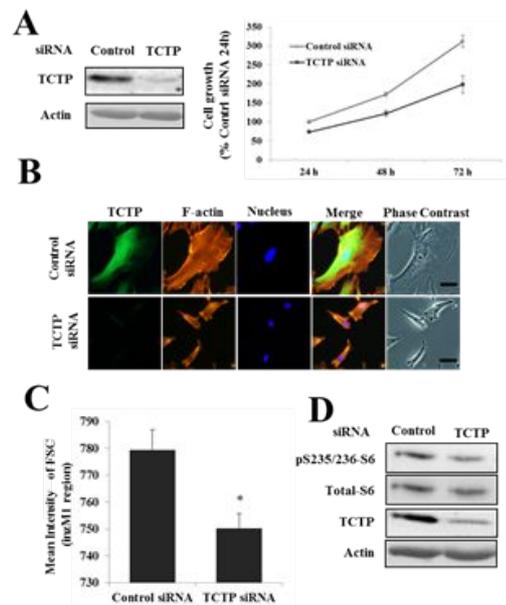


図 4 . ヒト培養 MPNST 細胞 (sNF96.2) 内における TCTP の役割の検証

(5) 以上の結果、NF1 の機能破綻により、Ras-MAP キナーゼシグナル、PI3 キナーゼ/AKT シグナルを介して活性化した mTOR 経路に TCTP による発現上昇、および TCTP の発現上昇が引き金となる mTOR 経路の異常な活性化が、NF1 の腫瘍化を引き起こす要因の一つであると考えられた。

(6) プロテオミクス手法を用いた解析により同定された新規 NF1 病態関連分子 TCTP を中心となる分子ネットワークが NF1 機能を欠損させた細胞内で活性化していることを見出した。さらに、NF1 腫瘍の悪性化に相関して TCTP の発現は上昇し、MPNST 細胞内で Ras-MAP キナーゼシグナル、PI3 キナーゼ/AKT シグナルを介した mTOR の活性化が TCTP 発現上昇に寄与していることが判明した。また、TCTP は MPNST 細胞のサイズ、および mTOR 経路を正に制御し、細胞の増殖を促進していることが明らかとなった。したがって、TCTP は腫瘍形成促進分子として、mTOR 経路と連動して NF1 腫瘍発症に密接に関わっており、TCTP の機能やそのシグナルの上流および下流の分子を標的とした治療戦略が有効であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Midorikawa U, Wilson MM, Nambu AN, Yoshizawa A, Kawano S, and Araki N. Integrated proteomics

identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 査読有, 12, 2013, 1377-1394.  
doi: 10.1074/mcp.M112.024802.

Nambu, NA., Midorikawa U, Mizuguchi S, Hide T, Nagai M, Komohara Y, Nagayama M, Hirayama M, Kobayashi D, Tsubota N, Takezaki T, Makino K, Nakamura H, Takeya M, Kuratsu J and Araki N. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin V. *PLOS ONE*, 査読有, 21, 2013, e59558.  
doi: 10.1371/journal.pone.0059558.

〔学会発表〕(計 21 件)

小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウイルソン森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江。融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 1 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、その NF1 腫瘍における機能解析。第 84 回日本生化学会大会。平成 24 年 12 月 15 日。福岡国際会議場、福岡市。

Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, Mizuguchi S, Wilson-morifuji M, Ihn h, Takeya M, Kuramochi A, Araki N. Integrated Proteomics Identified Translationally Controlled Tumor Protein as a Biological Target for Neurofibroma and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. HUP0 11th Annual World Congress, September 10th 2012. Hynes Covention Center. Boston, US.

小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウイルソン-森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江。融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 I 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、治療標的としての機能解析。日本プロテオーム学会 2012 年大会日本ヒトプロテオーム機構。平成 24 年 7 月 27 日。日本科学未来館、東京都。

〔図書〕(計 1 件)

荒木令江、南部晶子、小林大樹、中山書店、皮膚科臨床アセット 15 母斑と母斑症『神経線維腫症 2 型』、2013、181-189

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：融合プロテオミクスによる NF1 特異的タンパク質の同定方法、NF1 特異的タ

ンパク質発現抑制方法、NF1 特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての使用方法

発明者：荒木令江、小林大樹、水口惣平、平山未央

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許

番号：特開 2012-213391

出願年月日：2012 年 11 月 08 日

国内外の別：国内

名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法並びに同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法、およびそれを用いた原因物質同定方法

発明者：荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、倉津純一、ウイルソン政代

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許

番号：特願 2012-509621

出願年月日：2012 年 9 月 11 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大樹 (Kobayashi Daiki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員

研究者番号：20448517