



The two types of mRNAs for neurofibromin isoforms produced by von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene: analysis in human astrocytic tumors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徳山, 勤 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1080

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 227号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	徳山 勤		
論文題目	<p>The two types of mRNAs for neurofibromin isoforms produced by von Recklinghausen neurofibromatosis(NF1) gene : analysis in human astrocytic tumors (フォン・レックリングハウゼン神経線維腫症(NF1)遺伝子から発現したニューロフィブロミン・イソ形に対する2型の mRNA:ヒト星状膠細胞系腫瘍における解析)</p>		

博士(医学) 徳山 勤

論文題目

The two types of mRNAs for neurofibromin isoforms produced by von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene : analysis in human astrocytic tumors

(フォン・レックリングハウゼン神経線維腫症 (NF1) 遺伝子から発現したニューロフィブロミン・イソ形に対する2型の mRNA : ヒト星状膠細胞系腫瘍における解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

神経線維腫症1型 (von Recklinghausen 病、neurofibromatosis type1、NF1) の原因遺伝子がクローニングされ、その発現タンパク質であるニューロフィブロミン (neurofibromin) が、ほ乳類の GTP アーゼ活性化タンパク質 (GTPase-activating protein、GAP と略) と酵母の GAP 類似タンパク質である IRA と高い相同性をもつことが明らかとなった。GAP 関連ドメイン (GAP related domain、GRD と略) をもつニューロフィブロミンは癌遺伝子産物である Ras タンパク質の GTP アーゼ活性を刺激し、Ras タンパク質を GTP と結合した活性型から GDP と結合した不活性型に変換すると考えられている。その結果、ニューロフィブロミンは Ras を介したシグナル伝達系に負の制御を及ぼすことになると考えられ、NF1 遺伝子は癌抑制遺伝子の1つとされている。最初に報告された NF1 遺伝子の mRNA (I 型) に対しその GRD 領域に63bp の挿入配列をもつもう1つの mRNA (II 型) が同定され、両者は選択的スプライシング (alternative splicing) によって生じることが明らかになった。これら2型の mRNA から翻訳されるタンパク質は GAP 活性に差があり、またそれらのアミノ酸配列は種を越えて保存されていることから、両者は細胞の増殖や分化に重要な働きをしていると考えられている。今回、脳腫瘍及び正常脳組織におけるそれぞれの型の mRNA の発現を RNA-PCR 法により調べ、比較・検討した。

[材料ならびに方法]

治療のため腫瘍摘出術を施行した16例の星状膠細胞系腫瘍 (astrocytic tumor) [膠芽腫 (glioblastoma) 8例、退形性星状膠細胞腫 (anaplastic astrocytoma) 3例、星状膠細胞腫 (astrocytoma) 5例] の腫瘍組織と、8例の膠芽腫の手術の際やむを得ず摘出した2例の正常組織を用いた。総 mRNA は腫瘍組織および正常組織試料から Micro-FastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen、USA) を使用し、抽出した。cDNA は、TaKaRa RNA PCR Kit (TaKaRa、Japan) で、トリ骨芽球症逆転写酵素 (avian myeloblastosis reverse transcriptase) とランダムプライマーを用い、抽出した mRNA から合成した。PCR は、GDR に挿入される63bp を挟み込むようなプライマー (5'-AATTCCTCCG-3' と 5'-CTAAATCCCTGCTTCATACG-3') を設計し (I 型に対する PCR 産物は153bp、II 型に対するそれは216bp のバンドとして検出される)、変性95℃・30秒、アニーリング60℃・30秒、伸長反応72℃・30秒で40 cycle で増幅した。PCR で増幅した断片を6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。染色したバンドをデンシトメーターでスキャンし、I、II 型の NF1 mRNA の量比を計算した。

[結果]

星状膠細胞系腫瘍において発現している NF1 mRNA の II 型 / I 型の量比は星状膠細胞腫の場合の

1.47から膠芽腫の場合の18.8まで相当程度のばらつきはあったが、星状膠細胞系腫瘍としてはいずれもⅡ型が優位に発現していた。それに対して正常組織では2例ともⅡ型/I型比は1より低く、したがってこれらの正常組織ではI型が優位に発現していた。

[考 察]

Ⅱ型の方がI型より GAP 活性が低いこと以外ニューロフィブロミンの2つのイソ形の働きの違いについてはほとんどわかっていないが、この2つのイソ形はヒトだけでなく、種を越えて保存されていることから生体のなかで重要な働きをしていると考えられている。事実、マウスとニワトリの胚を用いた実験では、発生の初期にはⅡ型が優位に発現しているが、その後I型の発現が優位になることが報告されており、発生初期においてはⅡ型が優位に発現していることになる。

今回の我々の脳腫瘍及び正常脳組織で調べた結果でも、分化した正常脳組織ではI型が優位に発現していたが、同じ患者の未分化な細胞からなる膠芽腫の組織ではⅡ型が優位に発現していた。また、その他すべての星状膠細胞系腫瘍でも同様にⅡ型が優位に発現していた。

ニューロフィブロミンの2つのイソ形は、Ras を介した細胞の増殖、分化を調整し、GAP 活性のより低いⅡ型が腫瘍組織で優位に発現していることより、その結果として癌遺伝子産物である Ras に対する負の制御が減少し Ras を介した腫瘍の増殖、分化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

[結 論]

16例の星状膠細胞系腫瘍組織と2例の正常脳組織より RNA-PCR 法を用いて、ニューロフィブロミンの2つイソ型 mRNA (I型、Ⅱ型) の発現量の比を調べ検討した。腫瘍組織ではいずれもⅡ型が優位に発現していたが、正常脳組織ではI型が優位に発現していた。GAP 活性のより低いⅡ型が腫瘍組織で優位に発現していることより、その結果として癌遺伝子産物である Ras に対する負の制御が減少し、Ras を介した腫瘍の増殖、分化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

癌遺伝子、癌抑制遺伝子を用いた癌研究は近年めざましく、ヒト脳腫瘍においてもそれらの発生、増殖、分化の機序が遺伝子レベルで分析されている。

遺伝性疾患である神経線維腫症1型 (von Recklinghausen 病、neurofibromatosis type1、NF1) の原因遺伝子である NF1遺伝子は1990年にクローニングされ、癌抑制遺伝子の一つと考えられている。それは、この遺伝子がコードするタンパク質ニューロフィブロミンが、癌遺伝子のひとつである Ras タンパク質を抑制する GTP アーゼ活性化タンパク質 (GTPase-activating protein、GAP) と相同性を持ち、ニューロフィブロミン上の GAP 関連領域 (GAP related domain、GRD) が実際に GAP 機能をもつことによる。

また、ニューロフィブロミンには従来報告されていた mRNA (I型) と、選択的スプライシングにより GRD の部分に63塩基が挿入された新たな mRNA (Ⅱ型) があり、それらからコードされるタンパク質はいずれも GAP 活性を示すが、興味深いことにその活性はⅡ型の方がより低くなっている。

これらのニューロフィブロミンの2つのイソ形は、ヒトだけでなくマウスやラット、ニワトリなどでも認められ、種を越えて保存されていることから、細胞の発生、増殖、分化に重要な働きをしていると考えられている。

申請者は、ヒトの星状膠細胞系腫瘍組織および正常脳組織において、NF1遺伝子がコードしているニューロフィブロミンのイソ形に対する2型の mRNA の発現（I型、II型）について検索した。その結果、星状膠細胞系腫瘍では、いずれも GAP 活性の低いII型が優位に発現しており、それに対して正常脳組織ではI型が優位に発現していることを見いだした。

方法としては、星状膠細胞系腫瘍組織および正常脳組織から総 mRNA を抽出しトリ骨髄芽球症逆転写酵素とランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。63塩基が挿入される部分を挟み込むように設計した I 型、II 型に共通のプライマーを用いて PCR 法によって cDNA 断片を増幅した。この DNA 断片を電気泳動し、バンドを定量化して、I 型、II 型の mRNA の発現の比率を求めた。

16例の星状膠細胞系腫瘍組織では、症例ごとにばらつきはあったが、いずれもII型が優位に発現していた。しかし、腫瘍間の悪性度や臨床症状などとは明らかな相関関係は認められなかった。それに対して、2例の正常脳組織ではI型が優位に発現していた。

以上の発表にさいして、以下のような事項につき質疑がなされた。

- 1) NF1の遺伝形式
- 2) NF1に神経鞘腫は合併しないのか
- 3) NF1の遺伝子座はどこにあるのか
- 4) NF1遺伝子のエクソン数
- 5) NF1タンパク質（ニューロフィブロミン）の特徴
- 6) ニューロフィブロミン、GAPの相同性について
- 7) ニューロフィブロミン以外にGAP機能を持つタンパクは
- 8) 星状膠細胞系腫瘍について
- 9) 腫瘍部の炎症細胞浸潤の程度について
- 10) 腫瘍サンプル内の正常組織の混入について
- 11) PCRの条件について
- 12) I型、II型をしめすとしたバンドの塩基配列を実際に確認したか
- 13) I型、II型の比率と腫瘍の再発との関連
- 14) I型、II型の比率と予後との関係
- 15) 腫瘍の悪性度との関連
- 16) I型、II型のニューロフィブロミンの抗体での検索

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 梶 村 春 彦
副査 教授 市 山 新 副査 教授 瀧 川 雅 浩