

機関番号：24701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791087
 研究課題名（和文） Pyrin 関連分子の血管内皮細胞における役割の解明と血管炎症候群における変異検索
 研究課題名（英文） Role of pyrin-related molecules in vascular endothelial cells and their genetic mutations in vasculitis syndromes
 研究代表者
 中村 智之（NAKAMURA TOMOYUKI）
 和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員
 研究者番号：10405459

研究成果の概要（和文）：

マウス血管内皮細胞株 F-2 における pyrin、inflammasome の構成成分である NLRP3、ASC、pro-caspase-1 の発現を RT-PCR にて確認した。F-2 に NLRP3 のリガンドである R837 を添加した後の培養上清を用いた ELISA にて IL-1 β の産生を認め、inflammasome が機能することが示唆された。ただ、単純に R837 を添加したのみではその産生量はごくわずかで、LPS による前処置によって、IL-1 β 産生量の有為な増加を認めた。さらに FACS 解析により、IL-1 β 産生時の F-2 は Annexin V と結合することが確認されたが、mitotracker と lysotracker を使った解析では変化を認めなかった。不明熱・紫斑・結節性紅斑などを主症状とし、血管障害を伴う自己炎症疾患候群が疑われる症例について pyrin 関連遺伝子の変異検索を行ったが、変異を伴う症例は見出されなかった。

研究成果の概要（英文）：

Expression of the inflammasome components, NLRP3, ASC and pro-caspase-1, as well as pyrin, in F-2 murine vascular endothelial cells was confirmed with RT-PCR. IL-1 β production in culture media of F-2 cells after stimulation with R837, one of NLRP3 ligands, was detected by ELISA, suggesting the presence of functional inflammasome in F-2. Pretreatment with LPS significantly increased IL-1 β production of R837-stimulated F-2 cells. By FACS analyses, it was revealed that F-2 cells producing IL-1 β can bind Annexin V but show no change after labeling with mitotracker or lysotracker. Genetic analysis of the cases, who showed fever of unknown origin, purpura or nodular erythemas as the main symptom, and was suspected to be suffering from an autoinflammatory syndrome with vasculopathy, has not revealed any mutation in these molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：Pyrin 血管内皮細胞 血管炎症候群

1. 研究開始当初の背景

炎症において血管が重要な地位を占める

ことは他言を待たないが、血管炎 (vasculitis) とは、単に血管を場とするだけでなく、血管そのものをターゲットとする炎症をいう。この血管炎を本態とする疾患は血管炎症候群と総称され、血管炎を主病変とする疾患のみならず、他疾患に血管炎を伴うものなど多種多様の臨床病態が含まれる。申請者は大学院在学中から血管障害・血管炎症候群を研究テーマとし、マウス皮膚血管肉腫由来血管内皮細胞株である F-2 を使った薬剤による内皮細胞のアポトーシスに関する解析を行い (Ohtani T, Nakamura T, et al; *FEBS Lett* 2006)、また厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の「難治性血管炎に関する調査研究」に参加し、皮膚型結節性多発動脈炎の疾患概念の確立に関する調査研究を行ってきた (Nakamura T et al; *Arch Dermatol Res* 2009)。

多くの血管炎が核破砕を伴う好中球性のものであること、川崎病やアナフィラクトイド紫斑など明らかに感染症に関連した血管炎が存在することを考えると、血管炎の発症に自然免疫系の活性化が深く関わることは想像に難くない。実際、自然免疫系遺伝子の変異による、いわゆる遺伝性自己炎症症候群と呼ばれる家族性地中海熱 (familial Mediterranean fever: FMF) や高 IgD 症候群 (Hyper IgD syndrome: HIDS) では、しばしば血管炎を伴うとされる。FMF の原因遺伝子である pyrin は、細胞質内で細胞への危険シグナルを認識すると考えられる cryopyrin (NLRP3)、アダプター分子である ASC (apoptosis-associated speckle-like protein with a caspase recruitment domain)、pro-caspase-1 からなる複合体である NLRP3 inflammasome を抑制することで caspase 依存性の炎症を抑制しており、FMF においてはその変異によって NLRP3 inflammasome の抑制が失われることによって炎症が起こると考えられているが、それら pyrin や NLRP3 関連分子の血管内皮細胞での発現や役割については不明である。

好中球や単球に比べ、血管内皮細胞における pyrin 関連分子の発現や役割は、これまでほとんど調べられていないが、NLRP3 とドメイン構造がよく似た関連分子であり、その変異がクローン病やブラウ症候群と関連する NOD2 (NLRC2) において、ヒト血管内皮細胞での発現が報告されており、pyrin、NLRP3 についても、血管内皮細胞における発現、役割が予想される。

2. 研究の目的

本研究においては、FMF をはじめとする遺伝性自己炎症疾患における血管炎をモデルに、NLRP3 inflammasome を構成する pyrin 関連分子の制御異常によって、血管内皮細胞死などの血管障害、さらに血管をターゲットと

した炎症である血管炎が惹起されるメカニズムについて検討し、ひいてはいわゆる血管炎症候群における NLRP3 inflammasome と pyrin 関連分子の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マウス血管内皮細胞株 F-2 における pyrin、inflammasome の構成成分である NLRP3、ASC、pro-caspase-1 の各 mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。次いで、F-2 に種々の NLRP3 のリガンドを添加した後の培養上清中への IL-1 β 産生を ELISA にて検討し、また細胞死について Annexin V、mitotracker や lysotracker にて染色し、フローサイトメーターや蛍光顕微鏡にて検討した。

不明熱・紫斑・結節性紅斑などを主症状とし、血管傷害を伴う遺伝性自己炎症疾患群が疑われる症例について、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得てこれら pyrin 関連遺伝子の変異検索を行った。

4. 研究成果

まず、マウス血管内皮細胞株 F-2 における pyrin、NLRP3 inflammasome の構成成分である NLRP3、ASC、pro-caspase-1 の発現を RT-PCR にて検討し、いずれも期待したバンドを認めたことから、定常状態で mRNA を発現していることが確認された。F-2 に NLRP3 のリガンドである R837 を添加した後の培養上清を用いた ELISA にて有意な IL-1 β の産生を認めたことから、inflammasome が機能することが示唆された。ただ、単純に R837 を添加したのみではその産生量はごくわずかで、LPS による前処置によって、IL-1 β 産生量の有為な増加を認めた。LPS 前処置の効果は TLR4 を介することから、血管内皮細胞におけるその発現はエンドトキシンショックにおける血管障害に関わると考えられる。さらに FACS 解析により、IL-1 β 産生時の F-2 は Annexin V と結合し、細胞死に近い状態であることが確認されたが、mitotracker と lysotracker を使った解析では変化を認めず、ミトコンドリア、リソソーム膜の変化は認めなかった。

一方、紫斑や不明熱・結節性紅斑を主症状とし、血管障害を伴う自己炎症疾患群が疑われる症例について pyrin 関連遺伝子の変異検索を行ったが、変異を伴う症例は見出されなかった。さらに、皮膚型結節性多発動脈炎、アナフィラクトイド紫斑病等の血管炎症候群における pyrin の SNP 解析を開始しているか、まだ評価できるほどの症例数を集めるには至っていない。

最近、虚血/再還流による心筋障害モデルにおいて、心筋細胞よりも心臓線維芽細胞における NLRP3 inflammasome の活性化

が炎症惹起に必須であるという論文 (Kawaguchi M, et al: *Circulation* 2011) も発表されており、血管炎においても、血管内皮細胞だけでなく、血管壁平滑筋細胞や線維芽細胞の役割も考慮する必要があると考えられる。今後も血管内皮細胞における NLRP3 inflammasome の役割の解析を継続しつつ、平滑筋細胞や線維芽細胞の役割にも眼を向けて広い視野で研究を継続していきたいと考えている。

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)

[雑誌論文] (計4件)

1. 古川福実、金澤伸雄、石黒真理子、中村智之、西出武司、太田智秋、吉益隆：アトピー性皮膚炎に対する抗ヒスタミン薬の有用性の検討—患者意識調査による評価— 新薬と臨床 59: 2293-2301, 2010, 査読無し

2. 下松達哉、中村智之、岡本勝行、古川福実、山本有紀：毛細血管拡張肉芽腫の外観を呈した無色素性黒色腫の1例. *Skin Cancer* 25: 124-127, 2010, 査読有り

3. 西出武司、中村智之、金澤伸雄、山本有紀、古川福実：アトピー性皮膚炎患者に対する教育入院の実践. *和歌山医学* 60: 47-52, 2009, 査読有り

4. Nakamura T, Kanazawa N, Ikeda T, Yamamoto Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Furukawa F: Cutaneous Polyarteritis Nodosa: Revisiting its Definition and Diagnostic Criteria. *Archives of Dermatological Research* 301: 117-121, 2009, 査読有り

[学会発表] (計13件)

1. 中村智之、国本佳代、上出康二：重症乾癬に対するレミケードの使用経験. 第10回和歌山県皮膚科医会症例勉強会 2010.11.13、和歌山

2. 上中智香子、中村智之、山本有紀、古川福実：ラジオ波焼灼療法 (Radiofrequency Ablation: RFA) による熱傷の2例. 第61回日本皮膚科学会中部支部学術大会 2010.9.11-12、大阪

3. 古江隼人、岡本勝行、貴志知生、山本有紀、古川福実、中村智之：ワセリン自己注入後に発症した陰茎異物肉芽腫の1例. 第419回日本皮膚科学会大阪地方会和歌山地区会 2010.5.22、和歌山

4. 国本佳代、丸山希実子、中村智之、上出康二、楠智佐代、鳴海美智子、松尾昇、安田祐子：下腿潰瘍を伴ったHCV陽性クリオグロブリン血症の1例. 第419回日本皮膚科学会大阪地方会和歌山地区会 2010.5.22、和歌山

5. 中村智之：アトピーを治せる医者はどこにいるのか？-皮膚科医として、患者として伝えたいこと-. 第16回「アレルギー週間」市民講座 2010.2.28、和歌山

6. 中村智之：皮膚型結節性多発動脈炎の診断と治療. 第25回近畿MMC研究会 2010.2.20、大阪

7. 児玉芳季、佐々木有見子、金川紘司、倉本朋未、森喬史、藤井令央奈、南方良仁、松村永秀、稲垣武、柑本康夫、原勲、中村智之、山本有紀：禁制型膀胱瘻造設術を施行した外陰部Paget病の1例. 第209回日本泌尿器科学会関西地方会 2009.12.5、京都

8. 中村智之、金澤伸雄、古川福実：加温により血漿蛋白質の凝固を認めたlivedo reticularis with summer ulcerationsの1例. 第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2009.11.6-8、京都

9. 中村智之：「皮膚型結節性多発動脈炎の独立性」—疾患概念および診断基準に関する検討—. 第26回和歌山県皮膚科医会学術講演会 2009.10.18、和歌山

10. 中村智之：和歌山県立医科大学附属病院皮膚科の病診連携報告その12、第29回和歌山県皮膚科医会学術講演会 2009.9.26、和歌山

11. 土井直孝、岡本勝行、中村智之、米井希、古川福実：ガンマグロブリン大量療法を施行した落葉状天疱瘡の2例、第413回日本皮膚科学会大阪地方会 2009.5.16、和歌山

12. 岡本勝行、土井直孝、下松達哉、石黒真理子、西山瑞穂、豊澤聖子、木村文子、三木田直哉、上中智香子、中村智之、池田高治、米井希、貴志知生、金澤伸雄、山本有紀、古川福実：和歌山県立医科大学附属病院皮膚科の病診連携報告 その11、第413回日本皮膚科学会大阪地方会、2009.5.16、和歌山

13. 中村智之：アレグラ錠使用経験症例報告、新世代抗ヒスタミン薬を語る会 2009.4.4、和歌山

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 智之 (NAKAMURA TOMOYUKI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：10405459

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：