

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791089

研究課題名（和文） NOD2シグナルの過剰活性化による肉芽腫形成モデルの検証

研究課題名（英文） A model of granuloma formation induced by hyperactivation of NOD2 signaling

研究代表者

金澤 伸雄 (KANAZAWA NOBUO)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：90343227

研究成果の概要（和文）：若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群関連変異 NOD2 遺伝子を導入したヒト単球系 THP-1 細胞を用い、無刺激あるいはマクロファージ様細胞への分化を促す PMA 刺激に対する細胞の反応の違いを検討した。無刺激では細胞の表現型に明らかな違いを認めなかったが、PMA 添加後、コントロール細胞は一過性にプレートに付着するだけであるのに対し、変異 NOD2 を導入した THP-1 細胞は長期間プレートに付着し増殖しなかった。細胞表面の接着分子の発現を検討したところ、プレートへの付着能とリンクして ICAM-1 の発現レベルに差を認めた。また変異 NOD2 を導入した THP-1 細胞が PMA 刺激によって特異的に産生するサイトカインとして、PDGF-B を見出した。実際に、若年発症サルコイドーシス患者の皮膚組織において、変異 NOD2 を発現する多核巨細胞が ICAM-1 と PDGF-B を発現することも確認された。

研究成果の概要（英文）：Human monocytic THP-1 cells expressing early-onset sarcoidosis/Blau syndrome-associated mutant NOD2 were applied for analysis of their phenotype without stimulation or when stimulated with PMA, which induces their differentiation into macrophage-like cells. No significant difference was observed among phenotype of THP-1 derivatives without stimulation. After PMA addition, mutant THP-1 cells were attached to the culture plate for a long period without proliferation, while control cells were attached only transiently. By analysis of surface adhesion molecules, surface ICAM-1 expression level was shown to be correlated with capacity of the cells to attach the plate. Furthermore, PDGF-B was discovered as a cytokine which is specifically produced by mutant THP-1 cells after PMA stimulation. Actually, it was confirmed that ICAM-1 and PDGF-B were expressed on mutant Nod2-expressing multinucleated giant cells in the granulomatous skin lesion of an early-onset sarcoidosis patient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：NOD2 肉芽腫 NF-κB

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、組織学的には典型的な非乾酪性類上皮細胞肉芽腫の像を示しながら、通常のサルコイドーシスと異なり、幼少児期に発症し、皮膚・関節・眼病変を3主徴とする若年発症サルコイドーシスが、家族発症性のブラウ症候群と同じく、*NOD2* 変異による遺伝子疾患であることを明らかにするとともに、見出した関連する *NOD2* 変異に共通して、リガンドである細胞壁ペプチドグリカン成分 MDP に非依存性に NF- κ B を恒常的に活性化することを見出した (Kanazawa N *et al.*, *Blood* 2005)。しかし、その発病メカニズムの解明は必ずしも進んでいない。

2. 研究の目的

本研究においては、*NOD2* シグナルの過剰活性化による肉芽腫形成というモデルを検証するため、変異 *NOD2* 遺伝子を導入した THP-1 細胞を用い、*in vivo*、*in vitro* にて、類上皮細胞肉芽腫あるいはその構成細胞の形成を試みることににより、本当に過剰な *NOD2* シグナルのみで抗原特異的 T 細胞の誘導がなくても類上皮細胞肉芽腫が形成されるのかどうか、検討する。

3. 研究の方法

マウスに MDP をはじめとする種々のアジュバントを注射し、類上皮細胞肉芽腫の形成を試みた。また若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群関連変異 *NOD2* 遺伝子を導入した THP-1 細胞を用い、無刺激あるいは MDP、PGN などの細菌成分由来因子、PMA や M-CSF などの分化因子、尿酸結晶などの不溶性異物などを添加した時の細胞形態、サイトカイン産生、表面発現分子の変化を検討した。発現に変化を認めた分子について、*NOD2* 変異を伴う若年発症サルコイドーシス患者病変部皮膚の肉芽腫での発現を組織化学的に検討した。さらに形態変化を認めた細胞をヌードマウスの皮下に投与することにより、類上皮細胞肉芽腫が形成を試みた。

4. 研究成果

若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群関連変異 *NOD2* 遺伝子を導入した THP-1 細胞の解析において、無刺激では細胞の各種サイトカイン産生能に明らかな違いを認めなかった。PMA を添加したところ、コントロール細胞は一過性にプレートに付着するだけであるのに対し、変異 *NOD2* を導入した THP-1 細胞は長期間プレートに付着し増殖しなかった。細胞表面の接着分子の発現をフローサイトメトリーで検討したところ、ICAM-1 の発現レベルがコントロール細胞では PMA 添加後一過性に上昇するだけであるのに対し、変異 *NOD2* を導入した THP-1 細胞は長期間強

発現が継続し、プレートへの付着能とリンクしていた。また RT-PCR にて、変異 *NOD2* を導入した THP-1 細胞が PMA 刺激によって特異的に mRNA を発現するサイトカインとして、PDGF-B を見出した。実際に、*NOD2* の R334W 変異を持つ若年発症サルコイドーシス患者の病変部皮膚組織において、変異 *NOD2* を発現する多核巨細胞が ICAM-1 と PDGF-B を発現することが免疫組織学的に確認された。

一方、マウスへの MDP などのアジュバントの投与あるいはヌードマウスへの変異 THP-1 細胞の投与による類上皮細胞肉芽腫の形成の試みは、いまだ成功していない。

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 19 件)

1. 金澤伸雄: 自己炎症疾患とは. 皮膚病診療 33: 8-14, 2011, 査読なし

2. Kanazawa N: Sarcoidosis and autoinflammation. *Inflammation and Regeneration* 31: 66-71, 2011, 査読なし

3. Furukawa F, Kaminaka C, Ikeda T, Kanazawa N, Yamamoto Y, Ohta C, Nishide T, Tsujioka K, Hattori M, Uede K, Hata M: Preliminary study of etidronate for prevention of corticosteroid-induced osteoporosis due to oral glucocorticoid therapy. *Clinical and Experimental Dermatology* 36: 165-168, 2011, 査読あり

4. 金澤伸雄: 若年発症サルコイドーシス・Blau 症候群と *NOD2* 変異. 日本皮膚科学会雑誌 120: 2997-2999, 2010, 査読なし

5. 金澤伸雄: Blau/EOS: 肉芽腫形成性自己炎症疾患. 医学のあゆみ 235: 1180-1184, 2010, 査読なし

6. 金澤伸雄: Blau / EOS の病態から炎症を考える. 細胞 42: 372-375, 2010, 査読なし

7. 金澤伸雄: 自己炎症性疾患とは? 日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会雑誌 4: 23-29, 2010, 査読なし

8. 金澤伸雄: 自己炎症性疾患. マルホ皮膚科セミナー放送内容集 203: 48-52, 2010, 査読なし

9. Kaminaka C, Nishide T, Kanazawa N, Furukawa F, Hashimoto T: A case of anti-laminin- γ 1 pemphigoid associated with psoriatic erythroderma. *Journal of Dermatology* 37: 272-275, 2010, 査読あり

10. 金澤伸雄: 若年発症サルコイドーシス・Blau 症候群と *NOD2* 変異. 日本皮膚科学会雑誌 119: 2730-2732, 2009, 査読なし

11. 金澤伸雄, 三木田直哉, 李洪錦, 中谷友美, 尾崎元昭, 小坂真紀, 石井則久, 西村泰行, 古

川福実:日本人のハンセン病発症における細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD1・NOD2の遺伝子多型の関与. 日本ハンセン病学会雑誌 78: 255-261, 2009, 査読なし

12. Toyozawa S, Yamamoto Y, Kishioka A, Yonei N, Kanazawa N, Matsumoto Y, Kuroyanagi Y, Furukawa F: Effective treatment of intractable skin ulcers using allogeneic cultured dermal substitutes in patients with systemic lupus erythematosus. *European Journal of Dermatology* 19: 594-596, 2009, 査読あり

13. Li HJ, Kanazawa N, Nakatani Y, Furukawa F, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N: No involvement of the NOD1 gene mutation Glu266Lys in Japanese leprosy patients. *Journal of Dermatological Science* 56: 72-73, 2009, 査読あり

14. Nishiyama M, Kanazawa N, Hiroi A, Furukawa F: Lupus erythematosus tumidus in Japan: a case report and a review of the literature. *Modern Rheumatology* 19: 567-572, 2009, 査読あり

15. Mikita N, Kanazawa N, Yoshimasu T, Ikeda T, Li HJ, Yamamoto Y, Furukawa F: The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. *Clinical and Developmental Immunology* 673952, 2009, 査読あり

16. Arakawa A, Kanazawa N, Tanaka S, Yonezawa M, Miyachi Y, Mochizuki T: Genotyping of *Trichophyton tonsurans* isolate from a Japanese boy reveals infection in the U.S.A. *Clinical and Experimental Dermatology* 34: 630-632, 2009, 査読あり

17. 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, 査読あり

18. Mikita N, Kanazawa N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F: No involvement of non-synonymous TLR2 in Japanese leprosy patients. *Journal of Dermatological Science* 54: 48-49, 2009, 査読あり

19. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis and Rheumatism* 60: 242-350, 2009, 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

1. 金澤伸雄, 国本佳代, 木村文子, 上出康二, 青柳憲幸, 月野隆一, 鈴木啓之, 古川福実:

中條—西村症候群の新規幼児例. 第 4 回日本免疫不全症研究会 2011.1.22、福岡

2. 金澤伸雄, 古川福実, 雑賀麻衣, 若崎久生: 伝染性単核球症様症状で発症し遷延したラモトリギンによる薬疹. 第 40 回日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会 2010.12.10-12、広島

3. Kanazawa N: Finding in vivo critical pathways by the analysis of rare hereditary autoinflammatory disorders. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010.12.3-5, Wakayama

4. 金澤伸雄, 豊澤聖子, 中谷友美, 古川福実: 中條—西村症候群 (家族性日本熱) の東北症例のまとめ. 第 74 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 2010.11.20-21、仙台

5. 金澤伸雄, 李洪錦, 中谷友美, 木村文子, 米井希, 上中智香子, 山本有紀, 古川福実: トリクロ酢酸ピーリングにおける Transient receptor potential protein 1 (TRPV1) の役割. 第 62 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2010.10.23.-24、倉敷

6. 金澤伸雄, 西山瑞穂, 李洪錦, 古川福実, 岡藤郁夫, 神戸直智: 若年発症サルコイドーシス/ブラウ症候群に関連する *NOD2* 遺伝子変異を組み込んだ THP-1 細胞の解析. 第 30 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 2010.10.1-2、浜松

7. Kanazawa N, Furukawa F, Matsunaka M, Sugino H, Yoshiura K, Ida H: Familial Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome): a novel autoinflammatory syndrome with periodic fever, skin eruptions and partial lipodystrophy. 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research 2010.9.8-11, Helsinki, Finland

8. Kanazawa N, Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Kambe N, Furukawa F: Long-term ICAM-1 and transient PDGF-B expression on PMA-activated THP-1 cells harboring early-onset sarcoidosis / Blau syndrome-associated *NOD2* mutations. 6th International Conference on FMF and other Autoinflammatory Diseases 2010.9.2-6, Amsterdam, The Netherland

9. Kanazawa N, Furukawa F, Matsunaka M, Sugino H, Yoshiura K, Ida H: Familial Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome): a novel autoinflammatory syndrome with periodic fever, skin eruptions and partial lipodystrophy. 14th International Congress of Immunology 2010.8.22-27, Kobe

10. 金澤伸雄: サルコイドーシスと Autoinflammation. 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010.8.5-6、東京

11. Kanazawa N, Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Kambe N, Furukawa F: Long-term ICAM-1 and transient PDGF-B expression on PMA-activated

THP-1 cells harboring early-onset sarcoidosis / Blau syndrome-associated *NOD2* mutations. 70th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 2010.5.5-8, Atlanta, USA

12. 金澤伸雄, 井田弘明, 古川福実: 中條—西村症候群 (家族性日本熱) の全国疫学調査のまとめ. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術大会 2010.4.22-25、神戸

13. 金澤伸雄: 若年発症サルコイドーシス・Blau 症候群と *NOD2* 変異. 第 109 回日本皮膚科学会総会 2010.4.16-18、大阪

14. Kanazawa N: Early-onset sarcoidosis and Blau syndrome: autoinflammatory granulomatosis associated with *NOD2* mutations causing constitutive NF- κ B activation. The 20th Academic Meeting of Korean Society for Investigative Dermatology 2010.4.2-3, Seoul, Korea

15. Kanazawa N, Furukawa F, Momoi T, Yoshifuji H, Ohmura K: A new case of Nakajo-Nishimura syndrome, previously-diagnosed as systemic lupus erythematosus and inclusion body myositis. 第 34 回日本研究皮膚科学会総会学術大会 2009.12.4-6、福岡

16. 金澤伸雄、古川福実、松中成浩、杉野禮俊、吉浦孝一郎、井田弘明: 凍瘡様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う自己炎症疾患である家族性日本熱 (中條-西村症候群). 第 73 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 2009.9.26-27、甲府

17. 金澤伸雄: 家族性日本熱 (中條—西村症候群): 凍瘡様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う日本固有の遺伝性周期熱症候群. 第 2 回自己炎症疾患研究会 2009.7.10、東京

18. Kanazawa N, Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Kambe N, Furukawa F: Long-term ICAM-1 expression on PMA-activated THP-1 cells harboring disease-associated *NOD2* mutations. The 9th World Congress on Inflammation 2009.7.6-10, Tokyo

19. 金澤伸雄、古川福実、松中成浩、小池通夫、杉野禮俊: 凍瘡様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う自己炎症疾患である家族性日本熱 (中條症候群). 第 33 回日本小児皮膚科学会学術大会 2009.7.4-5、千葉

20. 金澤伸雄、吉益隆、古川福実: 掻痒性皮膚疾患に対するエバスタチンの有効性と安全性の検討—追加投与による評価—. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009.6.4-6、岐阜

21. 金澤伸雄: 若年発症サルコイドーシス・Blau 症候群と *NOD2* 変異. 第 108 回日本皮膚科学会総会 2009.4.24-26、福岡

金澤 伸雄 (KANAZAWA NOBUO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90343227

6. 研究組織
(1)研究代表者