

弛張熱を伴っていたのは3例であり、残り2例は初発症状からそれぞれ1年、8年後に弛張熱が出現していた。一方、発熱のなかった2例はRF陰性多関節型JIAと診断されていた。

4) 経過中の臨床像 (表2)

囊腫状腫脹は7例の全例に認められた。出現時期としては、初発時からみられた例は1例のみであり、残り6例は経過中に気づかれていた。囊腫状腫脹の部位には特徴があり、全例で手・足関節のやや末梢側の手背・足背部に限定していた。また、手・足関節炎による関節腫脹と、囊腫状腫脹は同時にみられていたが、囊腫状腫脹は関節腫脹消失後も持続して観察された。

ぶどう膜炎は、7例中5例に認めており、5例はすべて弛張熱があり全身型JIAと診断されていた症例であった。ぶどう膜炎と診断された時期は、初発症状の出現から最短で4か月、最長で9年であり、平均3.3年後であった。

指趾中節関節 (PIP) の屈曲拘縮は、発症早期にはみられないものの、経過中に全例で出現した。また、発症からの経過期間とともに徐々に顕在化する点が特徴でもあった。PIP関節で屈曲、末節関節 (DIP) で伸展位をとるため、形態的にはJIAで観察されるボタンホール変形と類似した。しかし、屈曲・伸展した指趾関節の可動域は保たれており、Xp上でも関節破壊や関節裂隙の狭窄、骨びらん像を伴わない点が、JIAとは異なっていた。

自己抗体としてリウマトイド因子 (RF)、抗核抗体が反復して検査されたが、いずれも全経過において全例で陰性であった。

D. 考察

2000年前後は自己炎症疾患の黎明期であり、自然免疫にかかわる蛋白の責任遺伝子 *MEFV* 変異が家族性地中海熱で初めて報告されたのが1997年である。また、1999年にはKastnerらは *TNFRSF1* を原因遺伝子としてTRAPSで同定した際に、初めて「自己炎症」という表記を行い、Blau症候群で *NOD2* 変異が確認された2001年の4年後に、EOSにBlauと同じ *NOD2* 変異があることがKanazawaらによって報告された。

当科で経験したEOSの最初の3例は、まだ、自己炎症の概念や遺伝子検査のない時代に病理組織像からEOSと診断したものであり、*NOD2* 変異の確認はその7~9年後である。その第一例目 (NT) は、皮膚病理組織像から偶発的に診断された面もあるが、その当時に1例目と極めて類似した臨床像を持つ症例が2例 (NK, UE) あり、いずれもJIAとしては非典型的な経過であったことから病理組織検査が進められ、その結果EOSと診断された症例である。その後診断した4例も同様に、臨床像からEOSを疑い、遺伝子検査に踏み切って診断した症例である。このことは、EOSには特異的な臨床像があり、臨床診断が可能な疾患であることを示唆している。

当科のEOS7例の全例に見られた臨床像は、関節炎、囊腫状腫脹、指趾の屈曲拘縮、RF/ANA陰性であった。

関節炎はOkafujiらの本邦例の検討 (*Arthritis Rheum*, 2009) でも20例中19例に認められていることから、EOSの中核的な臨床像の一つである。またこのことは、EOSがJIAと診断されている可能性が高いことを示唆しており、実際に当科で診断したEOS7例は全例が前医でJIAと診断されていた。

嚢腫状腫脹は、前記の Okafuji らの報告には頻度の記載がなく比較はできないが、JIA にはない EOS 特有の所見である。実際にも当科 7 例では、EOS を疑って遺伝子検査を行った重要な根拠となっていた (表 2)。ただ、手背・足背に嚢腫状腫脹があっても患児には自覚症状がなく、また腫脹が軽度であれば見逃されやすいため、嚢腫状腫脹に対する診察医の認識を深める必要がある。

指趾関節の屈曲拘縮では、ボタンホール変形様の指趾位 (PIP 関節屈曲, DIP 関節伸展) をとること、その程度の割には指趾関節の可動域が保たれている点が特異的であり、JIA や RA にみられる関節破壊による変形とは構造的に異なる。しかしながら、EOS の指趾の屈曲拘縮は初期にはなく、恐らく出現までに約 5 年、変形様といえるほど顕在化するまでに 10 年の経過が必要で、早期診断には有用な所見ではない。一方、関節破壊を欠きながら経過とともに指趾関節が屈曲していく原因病態として、慢性腱鞘炎の存在、その結果としての腱の短縮により、指趾の屈曲拘縮が進行する可能性が考えられる。であれば、関節エコーで腱鞘炎の存在や持続を確認することで、早期診断の一助となることが考えられる。

当科の EOS 7 例の全例の全経過で RF や ANA などの自己抗体が陰性であった点は、自己炎症疾患としての特性の一端を示している。一方、鑑別の対象となる JIA の本邦での全国調査では、これらの自己抗体の陽性率は RF で 24%、ANA で 18% である。しかも、RF 陽性であれば、抗 CCP 抗体を検査することで RF 陽性多関節型 JIA と診断することが可能であり、ANA 陽性であれば、ぶどう膜炎を合併しやすい少関節型 JIA との鑑別も容易である (武井修治, 厚労省研究班報告書 2007)。したがって、EOS における自己抗体は、JIA との鑑別や除外診断に有用な客観的

マーカーであり、予定されている全国二次調査にも組み込まれる予定である。

一方、Okafuji らの報告で triad of symptoms としてあげられた、皮疹、関節炎、ぶどう膜炎のうち、皮疹とぶどう膜炎は、当科 7 症例ではそれぞれ 4/7、5/7 の出現頻度であり、平均観察期間期間 10.9 年の症例においては必須症状ではなかった。これらの症状はいずれも JIA の重要な臨床所見であり、経過観察中に見落とした可能性はない。したがって、これらの症状の出現頻度に対しては、より多数例での検討が必要と思われる。

以上、当科で診断した EOS 7 例の平均 10.9 年にわたる臨床経過を分析することで、臨床診断に有用な情報を検討した。しかしながら、遺伝子検査が導入される前に病理像から診断した古い症例では、その初期像をカルテに記載された内容から retrospective に把握することは困難であり、本報告書の限界と思われる。また、今回の検討は、小児リウマチ医療施設での検討であり、EOS の多彩な臨床像を考えれば、皮膚科、眼科なども含めたより広い臨床領域からの検討も必要である。

今後の全国調査で多数の症例から臨床データが集積され、遺伝子検査に先立って利用可能な、臨床所見からの診断基準の策定が望まれる。

E. 結論

当科小児リウマチ医療施設で経験した EOS 7 例の平均 10.9 年の臨床経過からは、以下の 1) ~4) の所見を持つ症例では EOS の可能性があり、JIA との鑑別を十分に行う必要がある。

- 1) 関節炎 (時に無痛性関節腫脹を伴う)
- 2) 手背・足背の嚢腫状腫脹

3) 徐々に進行・顕在化する，可動性のある 52-652.

指趾中節関節の屈曲（顕在化すると指趾末節関節は軽度伸展＝ボタンホール変形様の指趾位）。

4) RF/ANA などの自己抗体は陰性

また，以下のいずれかの所見を併せ持てば EOS の可能性が高く，遺伝子検査を含む積極的な検査が必要である。

5) 皮疹

6) ぶどう膜炎

7) 弛張熱

F. 研究発表

1. 論文発表

武井修治. 自己炎症疾患における IL-1 阻害療法. 最新医学 2010; 66: 221-228.

武井修治. 全身型若年性特発性関節炎. 小児科 51(5):628-629,2010.

Takei S. Systemic JIA as an autoinflammatory disease. *Inflammation Regeneration* 2011; 31:

2. 学会発表

武井修治. 臨床から見た Autoimmunity と Autoinflammation. 第 31 回日本炎症・再生学会. 東京都. 2010.8.6

山崎雄一, 武井修治. 全身型 JIA は自己炎症疾患か? 第 3 回成人発症ステイル病 (AOSD)研究会 東京 2010.10.16

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス家族発症例における
超音波検査を用いた関節病変の病態解析

研究分担者 池田 啓 千葉大学医学部附属病院アレルギー膠原病内科 助教

研究要旨 ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス（early-onset sarcoidosis, EOS）の関節病変の病態を明らかとし、関節破壊を予防する治療介入ストラテジーの基盤を構築するため、千葉大学で外来加療されている家族発症例の関節病変を超音波検査（関節エコー）で経時的に評価した。その結果、父親の手指には炎症所見は認めないものの、明らかな関節破壊を認めた。一方男児の関節では、手指、手関節、ならびに足関節周囲の腱鞘滑膜に高度の滑膜肥厚を認めた。さらにその肥厚滑膜の一部には著明な血流ドプラシグナルを認め、炎症機序に伴う血管増生あるいは血管拡張が示唆された。

これにより、ブラウ症候群/EOS の関節病変は、その炎症の主座が腱鞘滑膜であること、炎症が自然寛解し得ること、しかし関節破壊を来し得ることが示された。ブラウ症候群/EOS の関節病変は若年性関節炎とは異なるものであり、その詳細な解析、治療介入戦略の構築には関節エコーが有用であることが示唆された。

A. 研究目的

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス（early-onset sarcoidosis, EOS）は皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とする主として4歳以下で発症する自己炎症症候群の1つである。本疾患における関節炎は腱鞘滑膜炎によるものとされているが、その詳細な病態、関節予後、ならびに治療介入の有用性は未だ不明である。

近年関節リウマチに代表される炎症性関節疾患における超音波検査（関節エコー）が進歩し、特に安静や放射線被爆が問題となる小児の関節疾患においてその有用性が注目されている。そこで本研究では、関節エコーを用いてブラウ症候群/EOS の関節病変の病態を明らかとし、関節破壊を予防する治療介

入ストラテジーの基盤を構築することを目的とした。

B. 研究方法

千葉大学で外来加療されている家族発症例の関節病変を関節エコーで評価した。男児では1年9カ月にわたり経時的に5回評価を行った。

超音波機器は GE 社 LOGIQ7、探触子は 6-14 MHz マルチプローブを使用した。

C. 研究結果

症例1 (父親): 35歳, 男性

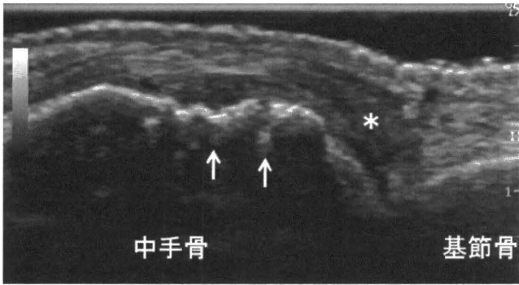


図1 右第2指 MCP 関節 (背側, 縦断像) を示す。やや輝度の高い陳旧性の滑膜肥厚を認める (*). 軟骨は菲薄化し, 微細な骨びらん様の骨表不整を認める (矢印)。

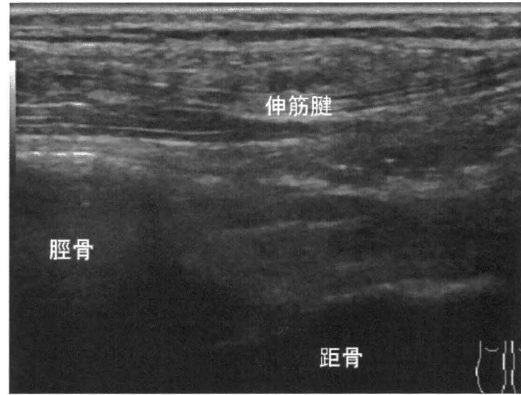


図4 右距腿関節 (背側, 正中, 縦断像) を示す。明らかな関節滑膜病変, 腱鞘滑膜病変なし。距骨の軟骨の菲薄化を認

症例2 (男児): 2歳4カ月, 男性

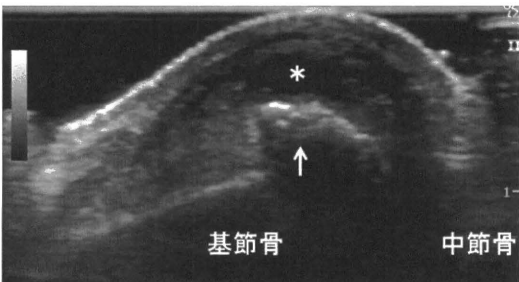


図2 右第3指 PIP 関節 (背側, 縦断像) を示す。やや輝度の高い陳旧性の滑膜肥厚と少量の滑液貯留を認める (*). 伸展障害を来した関節の軟骨は菲薄化し, 著明な骨棘形成を認める (矢印)。

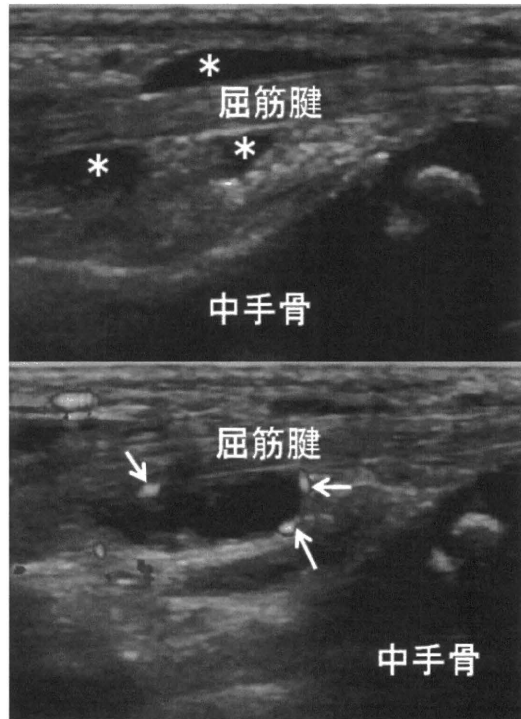


図5 右第3指屈筋腱 (掌側, 縦断像) を示す。腱鞘の滑液貯留を認める (*). 滑液貯留周囲の滑膜にパワードプラモード (下段) にて軽度の血流ドプラシグナルを認める (矢印)。



図3 右手関節 (背側, 正中, 縦断像) を示す。やや輝度の高い陳旧性の滑膜肥厚をごく軽度認める (*). 明らかな腱鞘滑膜病変なし。

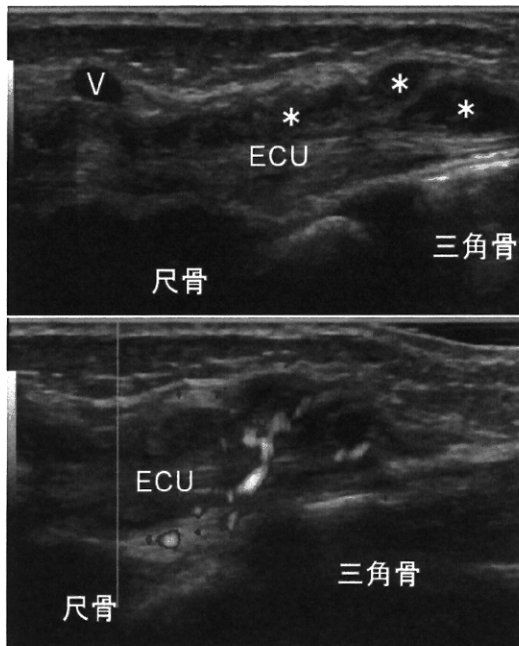


図 6 右手関節（尺側，縦断像）を示す。尺側手根伸筋（Extensor Carpi Ulnaris ECU）に高度の腱鞘滑膜肥厚を認める（*）。肥厚滑膜の一部および腱にパワードプラモード（下段）にて血流ドブラシグナルを認める。



D. 考察

父親の手指には滑膜炎を示す滑膜肥厚が散見された。しかしながらその輝度はやや高く、また現行の炎症を示唆する血流シグナルを認めなかったことより陳旧性の滑膜病変が示唆された（図 1-3）。また現行の炎症所見は乏しいものの、骨軟骨破壊の所見が認められ（図 1, 2, 4）、ブラウ症候群/EOS の関節における炎症が構造破壊を来すものであることが確認された。

一方男児の関節では多関節の腱鞘に著明な滑膜肥厚ならびに滑液貯留を認めた（図 5-7）。また肥厚滑膜には軽度から高度の血流シグナルを認めた。関節滑膜には有意な異常所見を認めなかった。これらの所見には経時的な再現性があり、1年9カ月の観察期間において大きな変化なく経過した。正常滑膜では通常パワードプラによる血流シグナルは検出されず、肥厚滑膜における血流シグナルは新生血管あるいは血管拡張を示し、通常炎症によるものと考えられる。しかしながら本症例での滑膜病変は腱鞘に局限していること、また無痛性であることより、滑膜炎を来す代表的小児疾患である若年性関節炎とは異なる病態であることが示唆される。

関節エコーで男児にみられた持続する炎症所見が無治療の父親において消失していることは、ブラウ症候群/EOS における腱鞘滑膜炎が少なくとも長期的には自然寛解し得る病態であることを示唆する。その一方で

図 7 右距腿関節（背側，正中やや外側，縦断像）を示す。伸筋腱の腱鞘滑膜肥厚，および滑液貯留を認める（*）。肥厚滑膜および腱の一部にパワードプラモード（下段）にて著明な血流ドブラシグナルを認める。

無痛性でありながら関節破壊を来すことが明らかとなり、今後関節破壊を予防する本疾患独自のストラテジーの開発が必要と思われた。

E. 結論

ブラウ症候群/EOS の親子例の関節病変を関節エコーで評価し、その炎症の主座が腱鞘滑膜であること、炎症が自然寛解し得ること、しかし関節破壊を来し得ることが示された。ブラウ症候群/EOS の関節病変は若年性関節炎とは異なるものであり、その詳細な解析、治療介入戦略の構築には関節エコーが有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horikoshi M, Suzuki T, Sugihara M, Kondo Y, Tsuboi H, Uehara T, Hama M, Takase K, Ohno S, Ishigatsubo Y, Yoshida Y, Sagawa A, Ikeda K, Ota T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Comparison of low-field dedicated extremity magnetic resonance imaging with articular ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2010. 20(6): 556-60.

Oki M, Watanabe N, Owada T, Oya Y, Ikeda K, Saito Y, Matsumura R, Seto Y, Iwamoto I, Nakajima H. A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol*. 2011, in press.

池田 啓. 関節リウマチにおける関節超音波検査の実際. *Monthly Book Orthopaedics*. 2010. 23(6): 37-44.

池田 啓. 関節の画像評価と治療戦略. *治療学*. 2010. 44(10): 26-30.

池田 啓. 関節リウマチ超音波検査の意義と問題点. *リウマチ科*. 2011. 45(2): 182-90.

池田 啓, 中島裕史. 関節エコー画像の特徴. *Mebio*. 2011. 28(2): 70-9.

池田 啓. 関節リウマチ (RA) 診療における画像診断の進歩. *Rheumatoid Arthritis Trends*. 2011. 2(1): 6-7

2. 学会発表

Ikeda K, Nakagomi D, Kawashima H, Takahashi K, Hiramatsu Y, Yokota M, Kashiwakuma D, Nakajima H. Comparison of ultrasonographic findings with established measures in the evaluation of drug response in rheumatoid arthritis. Annual European Congress or Rheumatology 2010. 16-19th June 2010, Rome, Italy.

Ikeda K. Lecture 1 “The application and benefit of ultrasonography in rheumatic conditions”, Lecture 6 “How to evaluate synovial inflammation in each joint with ultrasound in rheumatic conditions”. TLAR (Turkish League Against Rheumatism) Symposium in Antalya, 23rd October 2010, Antalya, Turkey.

池田 啓. 関節超音波で描出される基本的病変. 第1回日本リウマチ学会関節リウマチ超音波標準化委員会全体会議. 2010年5月23日, 東京.

池田 啓, 中込大樹, 高橋健太郎, 平松有希子, 柏熊大輔, 須藤 明, 廣瀬晃一, 中島裕史. 関節リウマチの薬効評価における関節超音波の有効性. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010年4月22-25日, 神戸.

池田 啓. リウマチ診療における超音波検査 の活用. 第41回九州リウマチ学会. 2011年 3月19-20日, 宮崎.	なし 2. 実用新案登録 なし
G. 知的所有権の所得状況	3. その他
1. 特許取得	なし

ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスに対する
責任遺伝子の分子機能評価に関する研究

研究分担者 金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師

研究要旨 特異な肉芽腫形成性自己炎症疾患であるブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスは、NLR ファミリー分子群の代表である NOD2 の機能獲得型変異によって生じる。NOD2 は単球・マクロファージなどの抗原提示細胞の細胞質内に恒常的に発現し、細菌細胞壁ペプチドグリカンに共通に含まれる muramyl dipeptide の刺激によって NF- κ B を活性化するが、その恒常的活性化から類上皮細胞肉芽腫に至る詳細な分子メカニズムは未だ明らかではない。

そこで本研究においては、ヒト単球系細胞株 THP-1 に疾患関連変異型 NOD2 遺伝子（野生型、最も頻度の多い R334W 変異、NF- κ B 活性化能の高い N670K 変異）を導入し、この細胞を用いた *in vitro* あるいは *in vivo* での類上皮細胞肉芽腫あるいはその構成細胞の誘導と、その分子メカニズムの解明を試みた。無刺激では変異の有無による明らかな違いを認めなかったが、マクロファージ様細胞への分化誘導因子である PMA で刺激することにより、変異細胞に特異的に、培養皿への接着性が長期間亢進し、同時に ICAM-1 の細胞表面への持続的発現と PDGF-B の mRNA の一過性発現を伴うことを見出した。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の染色により、肉芽腫内の NOD2 陽性多核巨細胞に ICAM-1 と PDGF-B が発現することを認めたことから、NOD2 変異による類上皮細胞肉芽腫の形成には ICAM-1 と PDGF-B が関与している可能性が示唆された。

研究協力者

西山 瑞穂 和歌山県立医科大学医学部
皮膚科大学院生
李 洪錦 和歌山県立医科大学医学部
皮膚科大学院生
岡藤 郁夫 神戸市立医療センター中央
市民病院小児科
神戸 直智 千葉大学大学院医学研究院
皮膚科准教授
古川 福実 和歌山県立医科大学医学部
皮膚科教授

A. 研究目的

ブラウ症候群（Blau syndrome: MIM#186580）および若年発症サルコイドーシス（early-onset sarcoidosis: MIM#609464）は、NOD2（CARD15, NLRC2）遺伝子変異を原因とする全身性肉芽腫性疾患である。原因遺伝子として同定された NOD2 は、細胞質内でパターン認識に関わる NLR ファミリー分子群の代表として自然免疫において重要な役割を果たしており、その機能喪失型変異が消化

管に肉芽腫を来すクローン病の発症に関連するとして注目され盛んに研究されている。そのような中、NOD2 の機能獲得型変異によって生じる疾患として報告されたのが、家族性に皮膚・関節・眼に系統的に肉芽腫を生じる稀な優性遺伝性疾患であるブラウ症候群である。

我々は、若年性関節リウマチと診断されていた弧発成人例の皮疹に類上皮細胞肉芽腫を認め、遺伝子解析にてブラウ症候群と同じ NOD2 変異を認めた (Kanazawa et al, *J Invest Dermatol* 2004) ことを契機に、若年発症サルコイドーシスと呼ばれ、乳幼児期発症で肺病変を欠き関節症状を来す小児サルコイドーシスの一群はブラウ症候群と病態が同じだと考えて国内症例を収集し、本疾患がブラウ症候群と同じく NOD2 の機能獲得型変異によって生じることを世界に先駆けて報告した (Kanazawa et al, *Blood* 2005)。NLRP3 の機能獲得型変異によるクリオピリン関連周囲熱症候群とともに、NLR ファミリー分子の遺伝子変異による代表的な自己炎症疾患である (Kanazawa and Furukawa, *J Dermatol* 2007)。

NOD2 は単球・マクロファージ・樹状細胞などの抗原提示細胞と消化管パネート細胞の細胞質内に恒常的に発現し、グラム陽性・陰性菌の細胞壁ペプチドグリカンに共通に含まれる muramyl dipeptide (MDP) を認識し、RICK/RIP2 と呼ばれるアダプター分子を介して NF- κ B を活性化する。ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスで想定される恒常的な NOD2 シグナルの活性化は、結核菌などのマクロファージ内寄生菌の持続感染と同じ効果をもたらす、類上皮細胞肉芽腫の形成に至ると容易に想像される (Kambe et al, *J Dermatol Sci* 2005)。

ヨーロッパを中心とした国際的コホート

研究と平行して、国内でもブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス合わせて 30 ほどの症例が集積されている。遺伝子型に直結した分子機能異常として、*in vitro* で HEK293 細胞に変異 NOD2 遺伝子を導入した時の NF- κ B 活性化能をルシフェラーゼアッセイで測定し、表現型との関連が検討されたが、明確な正の関連は認められなかった (Okafuji et al, *Arthritis Rheum* 2009)。治療におけるサリドマイドの有効性からも NF- κ B の関与が示唆されているものの、NOD2 の活性化が肉芽腫形成に至る詳細なメカニズムは未だ明らかではない。特に、超遅延型アレルギーとして知られ、類上皮細胞肉芽腫の形成に必須とされる Th1 細胞の分化と IFN γ によるマクロファージの活性化が本疾患において働いていないのか、本疾患が獲得免疫の活性化を要さない真の「自己炎症疾患」なのかという観点からも興味深い。

以上のような背景をふまえ、本研究においては、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 にブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス関連変異 NOD2 遺伝子を導入し、この細胞を用いた *in vitro* あるいは *in vivo* での類上皮細胞肉芽腫あるいはその構成細胞の誘導と、その分子メカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

研究協力者の神戸直智准教授と岡藤郁夫医師の協力を得て、野生型 (WT)、ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスで最も頻度の多い R334W 変異と NF- κ B 活性化能の高い N670K 変異を持つヒト NOD2 遺伝子を pMX-IRES-EGFP ベクターに組み込み、THP-1 細胞に導入した。G418 添加培地にて遺伝子導入細胞を数クローンずつ選択し、RT-PCR にて NOD2 の発現がほぼ同程度であるものを一つずつ選び、さらにシーケンス

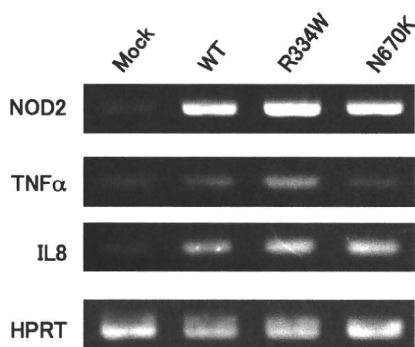
にて発現遺伝子のほとんどが変異遺伝子であることを確認したうえで、解析に用いた。

まず、無刺激でのサイトカイン産生能について、RT-PCR と培養上清の ELISA にてチェックした。次いで、種々の細菌由来成分すなわち MDP・Pam3Cys (TLR2 リガンド)・LPS (TLR4 リガンド)・MDP+Pam3Cys・MDP+LPS, さらに THP-1 をマクロファージ様細胞に分化させることが知られるホルボールエステルである PMA を添加して同様の解析を行った。PMA 添加後は細胞が付着性となるため、形態学的観察、フローサイトメトリーによる表面接着分子の発現の検討も行った。

以上の検討で変異 NOD2 導入細胞に特異的に誘導されることが明らかとなった分子について、患者病変部肉芽腫組織での発現を、NOD2 との蛍光二重染色と免疫組織化学法にて検討した。

C. 研究結果

1) 変異 NOD2 遺伝子導入 THP-1 細胞の作成と無刺激でのサイトカイン産生



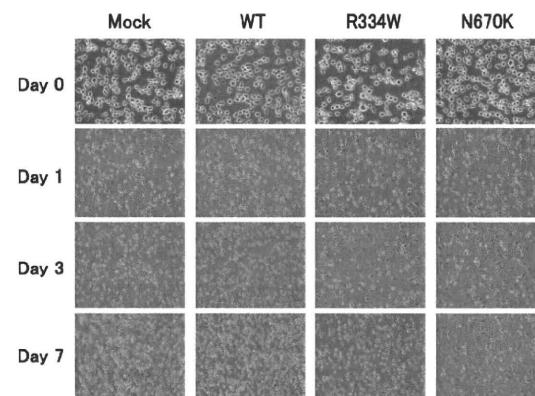
G418 添加培地で選択された変異細胞のうち、NOD2 の発現が同程度のものを選び解析を進めた。WT・R334W・N670K 発現細胞とも

に Mock と比べ NOD2 の mRNA を同程度に強く発現し、TNFα と IL-8 の mRNA の発現もこの 3 種の細胞に明らかな差を認めなかった。ELISA で検討した培養上清への TNFα と IL-8 の産生についても、変異の有無で有為な差を認めなかった。

2) 細菌由来成分刺激による変異 THP-1 細胞からのサイトカイン産生

MDP, Pam3Cys, LPS, MDP+Pam3Cys, MDP+LPS を添加して培養上清の TNFα と IL8 の産生を検討したが、野生型に比べて変異 NOD2 導入細胞で産生が上がるようなケースはなかった。IL-1β については、患者末梢血単核球を用いた解析で報告された (Masumoto et al, *Arthritis Rheum* 2009) ように、MDP と LPS による刺激で変異細胞からの産生が WT に比べむしろ低下する傾向が認められた。

3) PMA 刺激による変異 THP-1 細胞の形態学的変化

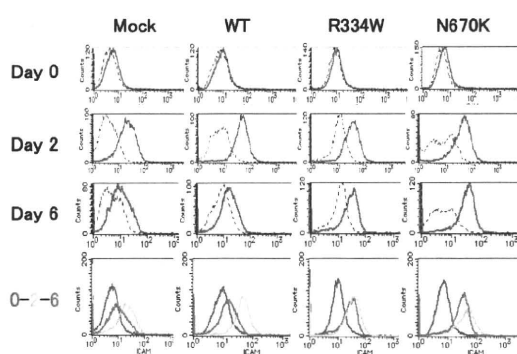


刺激前の THP-1 細胞はいずれも浮遊性であるが、PMA 刺激によって速やかに培養皿に付着する (Day1)。そのまま培養を続けると、Mock と WT は間もなく再度浮遊し増殖を開始するのに対し、R334W と N670K 発現細胞は偽足を伸ばして付着し続け (Day3)、特に N670K 発現細胞は 7 日後も付着を続けた。浮

遊細胞を洗い除くと、この差はさらに明らかであった。

このような形態的变化は、細菌由来成分や、患者の末梢血単球に加えると多核巨細胞が出現すると報告された M-CSF・M-CSF+IL4 による刺激では認められなかった (Yasui et al, *Arthritis Rheum* 2010)。

4) PMA 刺激による変異 THP-1 細胞の表面接着分子の発現の変化

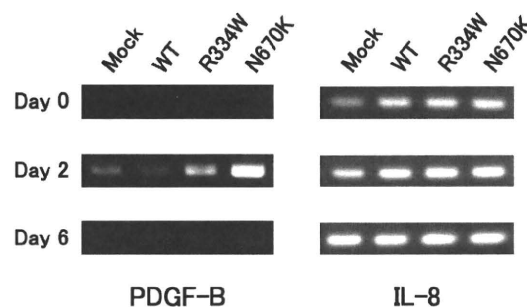


PMA 添加後に変異 THP-1 細胞がマクロファージ様細胞に分化したことから、表面接着分子の発現変化についてフローサイトメトリーで解析した。類上皮細胞という呼称から連想されたこともあり、まず各種カドヘリンの発現について検討したが、E-カドヘリン・N-カドヘリン・カドヘリン 11 のいずれも、PMA 添加による変化を認めなかった。

次いで ICAM-1 について検討した結果を図に示した。細胞の接着性の上昇と平行して Day2 に全ての細胞に等しく細胞表面に発現が誘導された後、Mock と WT は間もなく発現が減弱するのに対し、R334W と N670K 発現細胞では高発現を維持した (Day6)。RT-PCR では ICAM-1 の mRNA の発現はどの細胞でも等しく一過性に誘導され、長期に細胞表面に発現する理由とは考えられなかった。また、ICAM-1 の細胞外ドメインを切断するのに重要とされる ADAM17 の mRNA の

発現はいずれの細胞でも変化を認めず、切断酵素の発現量の違いのためでもないと考えられた。最後に、PMA 添加とともに ICAM-1 の中和抗体を加え、培養皿への接着性の亢進が ICAM-1 の発現亢進によるものか検討したが、ICAM-1 の中和抗体では培養皿への接着は影響を受けなかった。

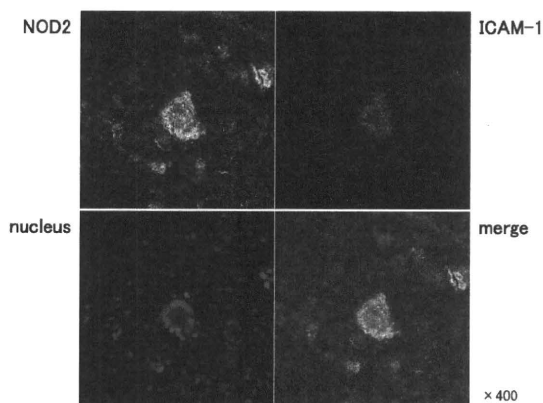
5) PMA 刺激によるサイトカイン・成長因子・接着分子の mRNA の発現の変化



NOD2 シグナルの活性化により、NF- κ B をはじめとする転写因子の活性化が起こると想定されていることから、変異 NOD2 発現細胞に特異的に mRNA の発現が変化する分子を検索した。図に示すように、IL-8 は WT, R334W, N670K 発現細胞のいずれも同じように Day2 に発現が上昇し、Day6 まで継続した。これに対し、PDGF-B は変異 NOD2 発現細胞に特異的に Day2 に一過性に強い発現を認めた。TNF α や IL-10 などのサイトカイン、VEGF などの成長因子、ICAM-2 などの接着分子についても検討したが、PDGF-B のように変異 NOD2 発現細胞に特異的に変化を示すような分子は、調べた限りではほかには見出されなかった。

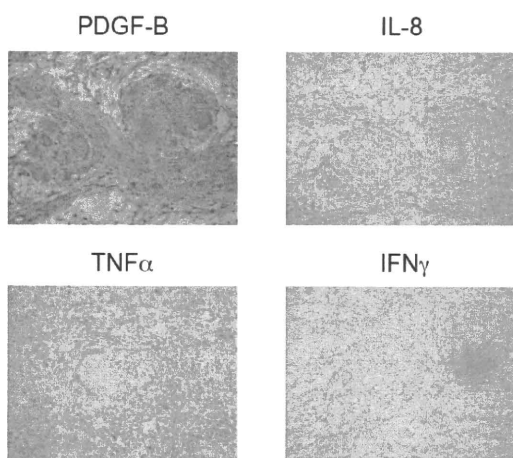
6) 若年発症サルコイドーシス患者病変部皮膚の類上皮細胞肉芽腫における ICAM-1 の発現

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のパラフィン切片を用



い、蛍光二重染色によって NOD2 と ICAM-1 の発現の局在を検討した。NOD2 はラングハンス型多核巨細胞の細胞辺縁に並ぶ核周囲に強く染色され、周囲の類上皮細胞にも弱く発現を認めた。ICAM-1 は NOD2 陽性の多核巨細胞に一致して発現を認め、免疫組織化学法にてよりはっきりと細胞膜表面に染色された。

7) 若年発症サルコイドーシス患者病変部皮膚の類上皮細胞肉芽腫における PDGF-B の発現



PDGF-B についても、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のパラフィン切片を用い、NOD2 との蛍光二重染色と免疫組織化学法にて局在を検討した。PDGF-B も ICAM-1 と同様に NOD2 陽性の多核巨細胞の細胞質に発現を認め、免疫組織化

学法でも確認された。これに対し、変異細胞特異的な mRNA の変化を認めなかった IL-8 と TNF α , さらに Th1 細胞から産生されマクロファージを活性化し肉芽腫形成に必須とされる IFN γ の産生は認められなかった。

D. 考察

これまで、ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスで認められる NOD2 変異があるが、皮膚・関節・眼のいずれにも症状を認めないような症例は見出されていない。これらの変異に共通して認められるのが、*in vitro* での NF- κ B の恒常的活性化であることから、NF- κ B の恒常的活性化を指標とした機能獲得型 NOD2 変異は、類上皮細胞肉芽腫の形成にとって十分条件であるといえる。ただその活性化能は、十分な MDP 存在下での完全な NF- κ B 活性化の 2 割から 8 割と、遺伝子型によって大きなばらつきがあり、臨床的重症度とも必ずしもリンクしない (Okafuji et al, *Arthritis Rheum* 2009)。すなわち、NF- κ B の恒常的活性化のみでは肉芽腫形成を説明できない。実際、患者血清中のサイトカインプロファイルを検討しても、NF- κ B の活性化で誘導されるような TNF α , IL-6, IL-8 の上昇はなく、IL-1 β の産生能低下のみ認められたと報告されている (Masumoto et al, *Arthritis Rheum* 2009)。また、ヒトの変異 NOD2 遺伝子を導入したノックインマウスがアメリカで作製されたが、明らかな表現型が出ず解析が進んでいないと伝え聞く。

そのような背景の中、我々は変異 NOD2 遺伝子を導入したヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 の作成に成功した。THP-1 細胞は患者の末梢血単球のように M-CSF・M-CSF+IL4 の添加によって多核巨細胞を形成することがないように、*in vivo* の細胞とは性質が異なることから、常に *vivo* とリンク

させることで乖離を最小限にする必要がある。ただその前提に立てば、非常に有用なモデルたりうる。

MDP や LPS などの細菌由来成分ではなく、PMA という分化促進因子を加えたことがブレイクスルーとなり、ようやく変異に特異的なポジティブな変化を捉えることができた。本邦では発症トリガーとして BCG 接種が問題視されてきたが、この系における PMA の添加は、微生物感染よりも広く、分化を促す何らかの活性化シグナルが発症（肉芽腫形成）のトリガーとして働く可能性を示唆している。

PMA 添加によって変異の有無にかかわらず全ての細胞が一過性に接着性を増すのは、PMA の直接作用として PKC を活性化しジアシルグリセロールとイノシトール 3 リン酸を介して一過性に細胞を活性化するためと考えられる。一方、変異細胞に特異的に、増殖せずに偽足を伸ばし長期にわたって接着性を増すのは、PKC からのシグナルと活性化 NOD2 の相互作用によって、あるいは転写因子の活性化よりも細胞骨格の変化が誘導されるためかもしれない。ICAM-1 が細胞表面に長期間発現するのも同様のメカニズムによる可能性がある。可溶性 ICAM-1 はサルコイドーシス患者の血中、気管支肺胞洗浄液中で増加することが知られており、サルコイドーシスと共通の肉芽腫形成メカニズムに関連するとも考えられる。実際我々はサルコイドーシス患者の皮膚病変部肉芽腫を染色し、一部で多核巨細胞を縁取るようにきれいに ICAM-1 が染まるのを観察したが、これは従来よりリンパ球に発現すると報告されているのと異なる結果であった。

一方、PMA-PKC からのシグナルと活性化 NOD2 の相互作用による転写活性の誘導として、PDGF-B の mRNA の一過性上昇を見出

した。PDGF-B は TGF- β とともに線維化に関与するとされ、肉芽腫を周囲から支持する線維芽細胞を活性化すると考えられる。サルコイドーシスが進行すると肺線維症に至ることからも興味深い知見である。さらに興味深いのは、IL-8 や TNF α をはじめとするより一般的なサイトカインの転写に差が見られなかったことである。実際に若年発症サルコイドーシス患者病変部皮膚の肉芽腫で PDGF-B の産生が確認された一方、IL-8 や TNF α 、さらに IFN γ の産生は認められなかったことから、若年発症サルコイドーシスでは PDGF-B がかなり特異的に作用している可能性がある。NF- κ B をはじめとする転写因子がどのように関わっているのか、今後、ウエスタンブロットによる転写因子の活性化の検討や阻害剤を用いた検討を進める必要がある。

サルコイドーシスで認められる類上皮細胞肉芽腫は *naked granuloma* といって T 細胞が比較的少ないとされるが、乳幼児期に発症して間もなくの若年発症サルコイドーシス患者の皮疹に見られる肉芽腫ではさらにほとんど T 細胞を認めないことから、やはりこの場合は Th1-IFN γ アクシスを介さずに肉芽腫が形成される可能性が考えられる。変異 THP-1 細胞を *in vitro* で PMA で活性化したうえで T 細胞のないヌードマウスに接種し、肉芽腫が形成されないか検討を進めている。

E. 結論

ブラウ症候群／若年発症サルコイドーシス関連変異型 NOD2 遺伝子を導入したヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を樹立した。無刺激では変異の有無による明らかな違いを認めなかったが、マクロファージ様細胞への分化誘導因子である PMA で刺激することにより、変異細胞に特異的に、培養皿への接着性が長期間亢進し、同時に ICAM-1 の細胞表面への

持続的発現と PDGF-B の mRNA の一過性発現を伴うことを見出した。若年発症サルコイドーシス患者の病変部皮膚の染色により、肉芽腫内の NOD2 陽性多核巨細胞に ICAM-1 と PDGF-B が発現することを認めたことから、NOD2 変異による類上皮細胞肉芽腫の形成には ICAM-1 と PDGF-B が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Kanazawa N: Hereditary autoinflammatory diseases with skin manifestations. The 22nd World Congress of Dermatology Special Book PP 270-274, 2011

金澤伸雄：自己炎症性疾患とは？マルホ皮膚科セミナー放送内容集 203: 48-52, 2010

金澤伸雄：自己炎症疾患。日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会雑誌 4: 23-29, 2010

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

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

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

金澤伸雄：自己炎症疾患とは。皮膚病診療 33: 8-14, 2011

2. 学会発表

Kanazawa N: Early-onset sarcoidosis and Blau

syndrome: autoinflammatory granulomatosis associated with NOD2 mutations causing constitutive NF-kappa B activation. The 20th Academic Meeting of Korean Society for Investigative Dermatology, 2010.4.2-3, Seoul, Korea

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, Georgia, USA

Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Kambe N, Furukawa F, Kanazawa N: Long-term ICAM-1 and transient PDGF-B expression on PMA-activated THP-1 cells harboring early-onset sarcoidosis / Blau syndrome-associated NOD2 mutations. 14th International Congress of Immunology, 2010.8.22-27, Kobe, Japan

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 Netherlands

Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Kambe N, Furukawa F, Kanazawa N: Transient PDGF-B expression on PMA-activated THP-1 cells harboring early-onset systemic granulomatous diseases-associated NOD2 mutations. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010.12.3-5, Wakayama, Japan

Kanazawa N. Finding in vivo critical pathways by the analysis of rare autoinflammatory disorders. 2nd JSID-Asia-Oceania-Forum in the 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010.12.3-5, Wakayama, Japan

金澤伸雄：若年発症サルコイドーシス・Blau症候群とNOD2変異（教育講演）第109回日本皮膚科学会総会 2010.4.16-18, 大阪

井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 江口勝美：シンポジウム 自己炎症症候群の新しい展開 自己炎症症候群から学ぶポストゲノム時代の蛋白機能解析 第54回日本リウマチ学会総会・学術大会 2010.4.22-25, 神戸

金澤伸雄：シンポジウム Autoinflammation vs Autoimmunity 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

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

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（英文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名・頁	出版年
Kambe N, Nakamura Y, Saito M, Nishikomori R.	The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity.	<i>Allergol Int.</i>	59: 105-13.	2010
Kambe N, Satoh T, Tanizaki H, Fujisawa A, Saito MK, Nishikomori R.	Enhanced NF-kappaB activation with an inflammasome activator correlates with disease activity of NLRP3 mutations outside of exon 3.	<i>Arthritis Rheum.</i>	62: 3123-4.	2010
Kambe N, Satoh T, Nakamura Y, Iwasawa M, Matsue H.	Autoinflammatory diseases and the inflammasome: mechanisms of IL-1 beta activation leading to neutrophil-rich skin disorders.	<i>Inflammation Regeneration</i>	31: 72-80.	2011
Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T.	A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene.	<i>Rheumatology (Oxford).</i>	49: 194-6	2010
Takei S.	Systemic JIA as an autoinflammatory disease.	<i>Inflammation Regeneration</i>	31: 52-65	2011
Horikoshi M, Suzuki T, Sugihara M, Kondo Y, Tsuboi H, Uehara T, Hama M, Takase K, Ohno S, Ishigatsubo Y, Yoshida Y, Sagawa A, Ikeda K, Ota T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T.	Comparison of low-field dedicated extremity magnetic resonance imaging with articular ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis.	<i>Mod Rheumatol</i>	20: 556-60	2010
Oki M, Watanabe N, Owada T, Oya Y, Ikeda K, Saito Y, Matsumura R, Seto Y, Iwamoto I, Nakajima H.	A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis.	<i>Clin Dev Immunol</i>	in press	2011
Kanazawa N.	Sarcoidosis and autoinflammation.	<i>Inflammation Regeneration</i>	31: 66-71	2011
Kanazawa N.	Hereditary autoinflammatory diseases with skin manifestations.	<i>The 22nd World Congress of Dermatology Special Book</i>	270-4	2011

研究成果の刊行に関する一覧表 (和文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名・頁	出版年
木村亜矢子, 神戸直智, 外川八英, 鎌田憲明, 松江弘之	伝染性軟属腫を多発した局面型皮膚サルコイドーシスの1例	臨皮.	64:473-6.	2010
佐藤貴史, 神戸直智	遺伝子がかかわる皮膚疾患入門ー責任遺伝子をはっきりした疾患ー 自己炎症性疾患の症状と遺伝子変異	Monthly Book Derma デルマ	163: 55-61	2010
神戸直智	総論 自己炎症疾患の病態から炎症を考える	細胞	42: 356-9	2010
神戸直智, 西小森隆太	IL-1をターゲットとした炎症性皮膚疾患の治療	Visual Dermatol	9: 850-2	2010
神戸直智, 佐藤貴史, 中村悠美	インフラマソームを介したIL-1 β 産生とアレルギー	Allergy From the Nose to the Lung 気道のアレルギー	8: 7-12	2010
神戸直智	インフラマソーム –IL-1 β 活性化のメカニズム	医学のあゆみ	235: 1153-8	2010
神戸直智, 佐藤貴史	インフラマソームを介したIL-1 β 産生とヒスタミン非依存性蕁麻疹	J Environ Dermatol Cutan Allergol	4: 185-91	2010
佐藤貴史, 神戸直智	Th17細胞と自己炎症性疾患	アレルギーの臨床	31: 218-22	2011
浅井康一, 井澤和司, 納富誠司郎, 大野光洋, 北村律子, 矢野潤, 加藤文英, 菊池清, 足立壮一, 中畑龍俊	骨髄移植後、RSウイルス感染を契機に特発性器質化肺炎と考えられる肺合併症を呈したDown症候群の1例	小児科臨床	63: 1803-7	2010
西小森隆太, 田中尚子, 井澤和司	CAPS	医学のあゆみ	235: 1170-4	2010
松本玲子, 松村由美, 宮地良樹, 西小森隆太	足底にみられた新生児エリテマトーデス	皮膚の科学	9: 197-8	2010
西小森隆太	【TLR/NLR/RLRと消化器疾患】 Inflammasomeの異常はどのような疾患に関与するのか	分子消化器病	34: 236-40	2010
西小森隆太, 酒井秀政, 平家俊男	【自己炎症疾患】 高IgD症候群の病態から炎症を考える	細胞	42: 376-8	2010
西小森隆太, 河合朋樹, 内尾寛子, 神戸直智, 松村由美	【子どもの皮膚疾患の診かた】 小児皮膚疾患 色素失調症	小児科	51: 636-7	2010
西小森隆太, 八角高裕, 平家俊男	自己炎症性疾患の最近の進歩	Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology	4: 49-51	2010
西小森隆太, 八角高裕	【小児におけるリウマチ・免疫疾患と生物学的製剤】 生物学的製剤の特徴と有用性・安全性のエビデンス サイトカインを標的とする生物学的製剤 抗インターロイキン(IL)製剤 抗IL-1抗体	アレルギー・免疫	17: 222-7	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名・頁	出版年
八木英哉, 田口周馬, 田中篤志, 藤野寿典, 八角高裕, 澤田眞智子, 西小森隆太, 平家俊男, 中畑龍俊	カプセル内視鏡で診断した小腸ク ローン病の小児例	日本小児科学会雑 誌	114: 966-70	2010
武井修治	自己炎症疾患におけるIL-1阻害療法	最新医学	66: 221-8	2010
武井修治	身型若年性特発性関節炎	小児科	51: 628-9	2010
池田 啓	関節リウマチにおける関節超音波検 査の実際	Monthly Book Orthopaedics	23: 37-44	2010
池田 啓	関節の画像評価と治療戦略	治療学	44: 26-30	2010
池田 啓	関節リウマチ超音波検査の意義と問 題点	リウマチ科	45: 182-90	2011
池田 啓, 中島裕史	関節エコー画像の特徴	Mebio	28: 70-9	2011
池田 啓	関節リウマチ (RA) 診療における画 像診断の進歩	Rheumatoid Arthritis Trends	2: 6-7	2011
金澤伸雄	自己炎症性疾患とは？	マルホ皮膚科セミ ナー放送内容集	203: 48-52	2010
金澤伸雄	自己炎症疾患	日本皮膚アレルギー 接触皮膚炎学 会雑誌	4: 23-9	2010
金澤伸雄	Blau / EOSの病態から炎症を考える	細胞	42: 372-5	2010
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: 1180-4	2010
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: 2997-9	2010
金澤伸雄	自己炎症疾患とは	皮膚病診療	33: 8-14	2011