

令和 3 年 4 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24041

研究課題名(和文) Fli1欠損モデルを用いた全身性強皮症の血管障害における脂肪細胞の役割の検討

研究課題名(英文) Investigation of association between adipocytes and vasculopathy of systemic sclerosis by Fli1 knockout model

研究代表者

宮川 卓也 (Miyagawa, Takuya)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60843323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞と全身性強皮症の血管障害との関わりを調べるため、脂肪細胞特異的Fli1欠損(Fli1 AdipoKO)マウスを作成し、血管障害の有無、機序について検討した。12週齢Fli1 AdipoKOマウスでは血管の構造、機能異常、特に骨髄由来の新生血管の異常が見られた。骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSCs)は未熟な周皮細胞で見られるフェノタイプを示し、そのフェノタイプはIL-6により誘導された。脂肪細胞におけるFli1の発現低下がIL-6の発現上昇を介してBM-MSCsを未熟な周皮細胞を作るフェノタイプに変化させ、それにより生じた未熟な周皮細胞が未熟な血管を作り血管障害を起こす機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで明らかになっていなかった全身性強皮症の血管障害と脂肪細胞の関連が本研究によって示唆された。また全身性強皮症の血管障害の病態にもIL-6が関与している可能性があり、抗IL-6抗体による治療が線維化のみならず血管障害の改善にも寄与する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Association between adipocytes and vasculopathy of systemic sclerosis (SSc) remains to be seen. We generated adipocyte-specific Fli1 knockout (Fli1 AdipoKO) mice and investigated whether and how vasculopathy is induced. Fli1 AdipoKO mice exhibited vascular structural and functional abnormalities as early as 3 months of age. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) of Fli1 AdipoKO mice exhibited de-differentiated phenotype, suggesting the contribution of defective vasculogenesis to the development of vascular abnormalities. This phenotype was induced by co-culture of Fli1-deficient adipocytes and BM-MSCs of wild type mice. Furthermore, upregulated IL-6 induced by Fli1-deficient adipocytes changed BM-MSCs of wild type mice into de-differentiated phenotype. These results indicate that Fli1-deficient adipocytes can be involved in the development of vasculopathy recapitulating SSc, suggesting a contribution of phenotypically altered adipocytes to the development of SSc.

研究分野：全身性強皮症、皮膚悪性腫瘍などの皮膚科難病領域

キーワード：全身性強皮症 血管障害 脂肪細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は血管障害、線維化、免疫異常を主徴とした自己免疫疾患である。遺伝因子のみならず環境因子によるエピジェネティックな作用により、様々な細胞において強皮症特有の形質変化が生じ、免疫寛容の破綻、過剰な炎症、血管リモデリングの障害、血管内皮細胞及び線維芽細胞の恒常的かつ異常な活性化が誘導され、複雑な病態が形成されると考えられている。転写因子 *Fli1* は全身性強皮症においてエピジェネティック制御により発現調整を受けている因子として最初に同定された転写因子であり、*Fli1* の線維芽細胞、血管内皮細胞、表皮細胞、マクロファージにおける恒常的発現低下は全身性強皮症特有の形質変化を誘導することが明らかになっている。その一方で、近年、全身性強皮症の病態にアディポカインの発現異常が関与している可能性が示唆されている。例えばアディポネクチンは全身性強皮症の線維化の病態に抑制的に作用し、その血清濃度の低下は線維化の病勢を反映する。レジスチン、オメンチン、リポカリン2の血清濃度は血管障害と関連を示し、ビスファチン、リポカリン2などの血清濃度は線維化の程度を反映することが分かっている。これらの知見は全身性強皮症の病態に脂肪組織が関与していることを強く疑わせるものであるが、脂肪組織の主体である脂肪細胞がどのように全身性強皮症の病態と関わっているかに関しては多くの知見は存在せず、特に血管障害の病態との関わりについては依然不明である。

### 2. 研究の目的

全身性強皮症の血管障害に対して、脂肪細胞がどのような役割を果たしているかを明らかにし、その責任因子を検討することで新規薬剤開発につながることを期待した。

### 3. 研究の方法

全身性強皮症の病態において疾患因子の1つとして働いている *Fli1* の発現を脂肪細胞特異的に欠損させ、血管障害が生じるかを確認し、血管障害が生じている場合にはその機序に関して検討を行った。具体的には、脂肪細胞特異的 *Fli1* 欠損 (*Fli1* AdipoK0) マウス作成後、FITC 抱合デキストランの尾静注による皮膚血管の描出、Evans blue 尾静注による透過性の評価を行い血管障害が生じているかどうかの確認を行った。その後、皮膚検体を用いて血管の接着、安定性に関わる因子の mRNA 発現量の確認し、タンパク発現量を免疫染色にて検討した。また血管障害の起源を調べるため、血管新生の異常の有無に関して検討した。さらには骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSCs) の異常の有無を mRNA 発現量にて確認した。また Wild-type マウスの BM-MSCs と *Fli1* AdipoK0 マウスの脂肪細胞の共培養を施行し、その異常が骨髄中の脂肪細胞からもたらされているかどうかについて検討した。さらには脂肪細胞のどの因子が形質変化をもたらすかについて共培養上清中のサイトカインを測定することで検討し、その因子を Wild-type マウスの BM-MSCs に添加することで *Fli1* AdipoK0 マウス BM-MSCs の形質が誘導されるかについて検討した。

### 4. 研究成果

FITC 抱合デキストランの尾静注による皮膚血管の描出では、*Fli1* AdipoK0 マウスで血管の狭窄や途絶が顕著に見られた。また Evans blue 尾静注による血管透過性の評価では、同マウスで色素の血管外漏出が目立った。また肺の組織を用いて血管の評価を行ったところ、*Fli1* AdipoK0 マウスでは高齢マウスで肺細動脈が有意に狭窄していた。以上より、*Fli1* AdipoK0 マウスの皮膚や肺に血管障害が生じることが示唆された。次に皮膚検体を用いて、血管の接着、安定性に関わる因子の mRNA 発現量の比較、及び免疫染色を行った。*Fli1* AdipoK0 マウスの血管において、VE-cadherin や  $\alpha$ -SMA の低下を確認し、同マウスで血管透過性の異常や構造異常を伴う血管障害が生じていることを裏付けた。

次に血管障害がどのように生じているかを検討するために、血管の新生に関して検討を行った。既存血管由来の新生血管には異常が見られなかったが、骨髄由来の新生血管では十分な周皮細胞に裏打ちされない未熟な血管が目立った。また *Fli1* AdipoK0 マウスでは骨髄由来の新生血管の数も少なかった。以上より *Fli1* AdipoK0 マウスでは骨髄由来の脈管形成に異常があることが示唆された。次に BM-MSCs において mRNA 発現量を比較したところ、*Fli1* AdipoK0 マウスでは時間依存性に *Acta2*、*Calponin* の発現低下、*Rgs5* の発現上昇が見られ、これらの所見は未熟な周皮細胞で見られるフェノタイプと一致していた。さらに、脂肪細胞と BM-MSCs の共培養を行ったところ、*Fli1* AdipoK0 マウスの脂肪細胞と共培養した Wild-type マウス BM-MSCs では *Acta2*、

*Calponin* の発現低下、*Rgs5* の発現上昇が見られ、*Fli1* AdipoK0 マウスの BM-MSCs で見られる所見を誘導できた。そのため *Fli1* AdipoK0 マウスの骨髄中脂肪細胞が BM-MSCs のフェノタイプを変えていることが示唆された。共培養時の培養上清を用いて各サイトカインを測定したところ、*Fli1* AdipoK0 マウスの脂肪細胞と共培養した培養上清中の IL-6 濃度が有意に上昇していた。そのため、IL-6 が BM-MSCs のフェノタイプを変化させている可能性を考え、recombinant IL-6 を Wild type マウスの BM-MSCs に添加した。添加した BM-MSCs では *Acta2*、*Calponin* の発現低下、*Rgs5* の発現上昇を誘導することができた。以上より、脂肪細胞における *Fli1* の発現低下が IL-6 の発現上昇を介して BM-MSCs を未熟な周皮細胞を作るフェノタイプに変化させ、それにより生じた未熟な周皮細胞が未熟な血管を作ることで、透過性の亢進、構造変化などの血管障害をもたらすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuya Miyagawa
2. 発表標題 Fli1-deficient adipocytes promote spontaneous skin fibrosis and vasculopathy: potential roles of adipocytes in systemic sclerosis
3. 学会等名 Systemic sclerosis world congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------