

令和 4 年 6 月 21 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：2020～2021

課題番号：20K22972

研究課題名（和文）新規強皮症モデルマウスの血管障害における単球・マクロファージの役割に関する検討

研究課題名（英文）The analysis of vasculopathy in systemic sclerosis with the mice lacking the Fli1 gene in macrophages

研究代表者

福井 夕輝（Fukui, Yuki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10880198

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）：全身性強皮症の病態を再現し単球、マクロファージに異常を有する骨髄由来細胞特異的Fli1欠失マウス（Fli1 McK0マウス）を用いて全身性強皮症の血管障害と創傷治癒異常におけるマクロファージの関与につき検討を行った。マクロファージにおける転写因子Fli1の発現低下は、M2マクロファージへの分化を誘導することが示されており、Fli1 McK0マウスのマクロファージではさらに新生血管の不安定化に関連するフェノタイプへの変化がみられた。性質変化したマクロファージが創傷部位での血管内皮細胞の遊走能、管腔形成能の異常を誘導することで全身性強皮症における創傷治癒遅延に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症の血管障害と創傷治癒遅延における単球、マクロファージの役割について現時点では不明とされている。本研究では、ヒトでの検討が困難な血管障害の病態解析に全身性強皮症の病態を忠実に再現するFli1 McK0マウスを用いることで、マクロファージが新生血管の不安定化を誘導し、血管形成の障害や創傷治癒遅延の病態形成に関与する可能性を明らかにした。本研究成果は、全身性強皮症の血管障害においてマクロファージをターゲットとした新規治療開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem autoimmune disease characterized by vasculopathy and fibrosis of the skin and various internal organs. Previous studies have shown that the deficiency of transcription factor Fli1 induces SSc-like phenotypes in dermal fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. In this study, we generated myeloid cell-specific Fli1 knockout mice (Fli1 McK0 mice) and investigated whether this animal model reproduces SSc-like vasculopathy. Fli1 McK0 mice recapitulated structural and functional abnormalities of SSc vasculopathy. Furthermore, wound healing was delayed in Fli1 McK0 mice due to loss of newly formed blood vessels. In vitro experiments, the migratory activities were enhanced, while the tubulogenic activity was reduced in human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) co-cultured with macrophages isolated from Fli1 McK0 mice. These results indicate that Fli1-deficient macrophages involve in the development of vasculopathy recapitulating SSc.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 創傷治癒 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

①全身性強皮症における手指潰瘍の病態とその背景

全身性強皮症では末梢循環不全を基盤として指尖部に難治性皮膚潰瘍・壊死を高頻度に生じる。その主要な原因として「血管の構造・機能異常に伴う創傷治癒遅延」が挙げられる。全身性強皮症における血管構造の異常はほぼすべての患者に生じ、その病態には新生血管形成の異常が関与している。創傷治癒における新生血管形成の機序として、「創傷付近の血管から血管内皮細胞が遊走、増殖することで血管を形成する血管新生」と「骨髄由来細胞が創傷部位に遊走し、血管内皮細胞や血管壁細胞へ分化することで新生血管を形成する脈管形成」が挙げられる。血管新生と脈管形成が協調して新しい血管が形成されるが、全身性強皮症では「血管新生の恒常的活性化」と「脈管形成の障害」により、疾患固有の血管リモデリング異常をきたすことが知られている。

②転写因子 *Fli1* の発現異常に基づく新規全身性強皮症モデルマウス

転写因子 *Fli1* は全身性強皮症の病変部皮膚においてエピジェネティック制御により発現が恒常的に抑制されており、さらに *Fli1* の発現低下は線維芽細胞や血管内皮細胞をはじめとする様々な細胞において全身性強皮症固有の形質変化を誘導することから、病態に深く関わる疾病因子の一つと考えられている。事実、骨髄細胞、血管内皮細胞、表皮角化細胞、脂肪細胞、B細胞において *Fli1* を特異的に欠損したマウスを作製することにより、自己免疫、炎症、血管障害、皮膚線維化、間質性肺疾患などの全身性強皮症に特徴的な病態を様々な程度に再現することができる。これらのマウスの病態解析は、全身性強皮症の病態理解と治療開発の一助となることが期待されている。

③創傷治癒における単球・マクロファージの役割

創傷部位において循環単球は免疫、炎症、組織再生、サイトカイン産生、抗原処理に関与し、創傷治癒に重要な役割を果たす。近年、心血管系や神経系の虚血性疾患における組織修復に「単球移植」が非常に有用であることが数多く報告されており、単球の多能性や細胞分化能、血管新生能は再生医療の観点からも注目されている。一方、マクロファージは創傷治癒の全ての段階に関与し、その形質は創傷治癒の進展に伴い、炎症誘発性 (M1 マクロファージ) から抗炎症性 (M2 マクロファージ) に移行する。マクロファージは組織の恒常性と免疫監視において重要な役割を果たし創傷治癒を促進するが、マクロファージの活性化が解消されない場合は慢性炎症や線維化を誘導し、不可逆的な臓器障害へと進展する。単球、マクロファージの機能異常は全身性強皮症の血管障害や創傷治癒遅延に深く関与すると推測されているが、その背景にある分子機序は現時点では不明である。

2. 研究の目的

本研究では、新規全身性強皮症モデルマウスとしてリゾチーム 2 遺伝子 (*Lyz2*) 発現細胞 (単球、成熟マクロファージ、骨髄細胞) 特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* McKO マウス) を用いること

で、血管障害と創傷治癒異常における単球、マクロファージの役割について解析し、現時点では不明とされる全身性強皮症の血管障害と創傷治癒遅延における単球、マクロファージの役割を解明する上での基盤となるデータの構築を目指す。本研究の最終目的は、全身性強皮症の難治性皮膚潰瘍に対する新規治療開発の基盤となる病態理解の構築である。

3. 研究の方法

全身性強皮症モデルマウスとして、*Fli1*^{flox/flox} マウスと *LysM-Cre* マウスを交配することで作製された *Fli1* McKO マウスを用いた。*Fli1*^{flox/flox} マウスをコントロール群とした。東京大学大学院医学系研究科の東京大学動物実験実施規則に従って実験を行い、マウスの苦痛を最小限とするために麻酔、安楽死を適切に施行した。

① 創傷治癒の評価

マウス背部皮膚を円形に切除し、24 時間毎に欠損創の変化を比較することで創傷治癒の経過について検討した。FITC-dextran を用いて上皮化より 2 日経過した創傷癒痕部位における血管構造の評価を行った。創形成 7 日後の肉芽形成期の創部皮膚を採取して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

② *Fli1* McKO マウスの腹腔マクロファージにおけるフェノタイプの評価

マウスの腹腔マクロファージを採取した。血管の新生もしくは新生血管の安定化に関与する VEGFA、MMP9、PDGFB の mRNA 発現量を RT-qPCR 法にて測定し、マクロファージが血管新生に与える影響を評価した。

③ 創傷部位の血管の新生や組織修復に対するマクロファージの関与

マウスの腹腔マクロファージを採取し、一定時間低酸素下に置くことで培養環境を創傷部位に類似させた。腹腔マクロファージとヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells: HDMECs) を共培養し、マイトマイシン C を加えて細胞増殖の影響を除いた上で scratch assay および tube formation assay を行った。HDMECs の遊走能、管腔形成能を評価し、創傷部位のマクロファージが血管新生や組織修復に与える影響について検討した。

④ ボセンタン投与下における血管新生の評価

マウスの腹腔マクロファージ培養液にエンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンを投与した。HDMECs と共培養を行った後 scratch assay を施行し、HDMECs の遊走能の変化についてボセンタン非投与群と比較した。ボセンタンはアクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社より供与を受けた。

4. 研究成果

① 創傷治癒の評価

Fli1 McKO マウスでは肉芽形成期以降を中心とする創傷治癒の遅延がみられた。FITC-dextran を用いて創部が上皮化した際の癒痕部位の血管構造を評価したところ、*Fli1* McKO マウスでは癒痕部位の新生血管が減少していた。HE 染色において *Fli1* McKO マウスの肉芽組織ではコントロー

ルマウスと比較して不整な血管構造および血管数の減少がみられ、真皮には線維芽細胞様細胞が増殖していた。肉芽組織および癒痕部位に血管の構造異常が確認されたことから、*Fli1* McKO マウスでは創傷部位における血管の新生異常が創傷治癒の遅延に影響している可能性が示唆された。

② *Fli1* McKO マウスの腹腔マクロファージにおけるフェノタイプの評価

血管の新生、安定化に関連する因子について mRNA 発現量の比較を行ったところ、*Fli1* McKO マウスの腹腔マクロファージでは VEGFA、MMP9 の発現が亢進していた一方、PDGFB の発現は低下していた。VEGFA、MMP9、PDGFB はそれぞれ血管内皮細胞の分化や新生血管の発芽、新生血管への血管周皮細胞の動員および血管の安定化に関連することから、*Fli1* McKO マウスのマクロファージが新生血管の不安定化に関連するフェノタイプに変化したことが明らかとなった。

③ 創傷部位の血管の新生や組織修復に対するマクロファージの関与

マウスの腹腔マクロファージと HDMECs を共培養し、scratch assay および tube formation assay を行ったところ、*Fli1* McKO マウス由来の腹腔マクロファージと共培養した HDMECs では遊走能が亢進し、管腔形成能が低下していた。*Fli1* McKO マウスのマクロファージが新生血管の不安定化を誘導することで、創傷部位における血管内皮細胞の遊走能、管腔形成能の異常に関与した可能性が示された。

④ ボセンタン投与下における血管新生の評価

治療の検討として *Fli1* McKO マウス由来の腹腔マクロファージ培養液にボセンタンを投与し scratch assay を施行したところ、HDMECs の遊走能はコントロール群と同程度まで正常化した。ボセンタンはエピジェネティックに *Fli1* の発現が低下した細胞においても protein stability を亢進させることにより *Fli1* タンパク質の発現量を増加させることが示されており、*Fli1* McKO マウスのマクロファージで低下した *Fli1* の発現を亢進させ、血管内皮細胞における遊走能の正常化に寄与した可能性が示唆された。

以上の結果より、全身性強皮症の病態を再現する *Fli1* McKO マウスを用いることで、マクロファージが新生血管の不安定化を誘導し、血管形成の障害や創傷治癒遅延の病態形成に関与している可能性を明らかにした。また、マクロファージで低下した *Fli1* の発現をボセンタンが亢進させることで、血管内皮細胞の遊走能正常化に寄与する可能性が示された。本研究成果は、全身性強皮症の血管障害においてマクロファージをターゲットとした新規治療開発の一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------