

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293242

研究課題名(和文) Fli1を中心とした全身性強皮症の一元的モデルの確立

研究課題名(英文) The establishment of animal models of systemic sclerosis based on Fli1 deficiency

研究代表者

佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20215792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を特徴とする自己免疫疾患である。本症の病因は未だ不明であるが、その病態形成においてB細胞の異常な活性化が重要な役割を果たしていることが示されている。一方、我々は転写因子Fli1の発現低下が様々な細胞において強皮症に特徴的な形質を誘導することを明らかにしてきた。そこでB細胞特異的Fli1欠失マウスを作成したところ、B細胞において強皮症に類似した異常な活性化が生じ、さらに強皮症に類似した血管障害および皮膚と肺の線維化が生じることが明らかとなった。以上の結果から、B細胞におけるFli1の発現低下が強皮症の病態に深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem connective tissue disease characterized by initial vascular injury and resultant tissue fibrosis with autoimmune background. In addition to autoantibody production, B cells have been shown to be directly involved in the development of SSc. Since our studies have proved a critical role of Fli1 deficiency in the induction of SSc-like phenotypes in dermal fibroblasts, endothelial cells, and macrophages, we here investigated the role of Fli1-deficient B cells in SSc pathogenesis. When we generated B cell-specific Fli1 knockout mice (Fli1^{flox/flox};Cd19-Cre^{+/-}), B cells were abnormally activated and these mice spontaneously developed vascular changes resembling SSc vasculopathy, subsequently exhibiting tissue fibrosis of the skin and lung. These results indicate that Fli1 deficiency induces SSc-like phenotypes in B cells as well as other cell types, integrating the expression of fibrosis-related gene programs into the development of SSc.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 B細胞 Fli1 免疫異常 血管障害 線維化

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化と血管障害を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常が関与していると考えられている。その病因は未だ不明であるが、近年我々は転写因子 *Fli1* の恒常的な発現低下が本症の疾病因子の一つとして、様々な病態に関与している可能性を明らかにしてきた。

Fli1 は Ets family 転写因子の一つで、線維芽細胞においては I 型コラーゲンの強力な転写抑制因子として機能している。強皮症皮膚線維芽細胞では *Fli1* の発現がエピジェネティック制御で抑制されているが、この異常は線維芽細胞を恒常的に活性化させ、強皮症皮膚線維芽細胞の形質の確立に深く関与している。一方、強皮症病変部皮膚では線維芽細胞の他に血管内皮細胞や炎症細胞においても *Fli1* の発現が低下しており、その異常が血管内皮細胞とマクロファージにおいて強皮症に特徴的な形質を誘導していることが明らかにされている。このように、*Fli1* の発現低下は様々な細胞において強皮症に特徴的な形質を誘導することから、本症の形質を規定する重要な疾病因子の一つと考えられている。

強皮症では B 細胞が異常に活性化しており、この異常は免疫異常・炎症のみならず線維化や血管障害の病態にも関与している可能性が、臨床検体や動物モデルを用いた様々な検討で示唆されている。強皮症において B 細胞が異常に活性化される分子メカニズムは現時点では不明であるが、我々は上記の研究結果に基づき、*Fli1* の発現低下が強皮症の B 細胞の異常活性化に関与していると仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Fli1* の発現低下が B 細胞に及ぼす影響を検討することにより、*Fli1* の発現異常に基づく強皮症病態一元化仮説を検証することである。

3. 研究の方法

(1) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの作成

Fli1^{flox/flox} マウスと *Cd19-Cre* マウスを交配することにより、*Fli1^{flox/flox};Cd19-Cre^{+/-}* マウスを作成した。CD19 は B 細胞特異的に発現することから、このマウスでは B 細胞特異的に *Fli1* の発現を欠失させることができる。

(2) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス由来 B 細胞の形質異常に関する検討

まず B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおいて自己抗体が存在するかどうかを Hep2 細胞を用いた蛍光抗体間接法および ELISA 法で検討した。次に、脾臓から単離した B 細胞を培養し、抗 CD40 抗体と LPS で刺激し、IL-6 産生能について検討した。さらに、B 細胞の活性化・不活性化に関与する液性因子および細胞

表面受容体についても、その発現量を ELISA および FACS で解析した。

(3) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの線維化に関する検討

「皮膚と肺の HE 染色と Masson's trichrome 染色による線維化の程度の評価」、
「hydroxyproline assay による皮膚と肺のコラーゲン含量の定量」、
「real-time PCR による *Col1a1*, *Col1a2*, *Mmp13*, *Tgfb*, *Ctgf* 遺伝子 mRNA の発現量の評価」を行った。

(4) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管障害に関する検討

「Evans blue 色素を用いた血管透過性試験」、
「FITC-dextran を用いた血管の構造異常の観察」、
「蛍光二重染色による内皮間葉移行の有無の観察」、
「 α -smooth muscle actin の免疫染色による血管周皮細胞の活性化状態の評価」、
「real-time PCR による *Cdh5*, *Pecam1*, *Snai1* 遺伝子 mRNA の発現量の評価」、
「肺細動脈・細静脈の組織学的評価」を行った。

(5) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの炎症に関する検討

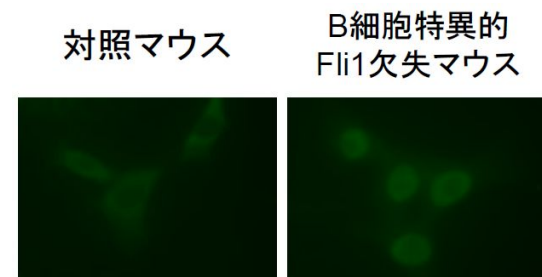
「real-time PCR による *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Il13*, *Il17a*, *Tnfa*, *Ifng*, *Il1b* 遺伝子 mRNA の発現量の評価」、
「Th1/Th2/Th17 バランスおよび Treg に関する FACS 解析」を行った。

4. 研究成果

(1) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス由来 B 細胞の形質異常に関する検討

B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスおよびコントロールマウス (*Fli1^{+/-};Cd19-Cre^{+/-}*) における自己抗体産生能を蛍光抗体間接法および ELISA 法で検討したところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスでは自己抗体産生が亢進していることが明らかとなった (図 1)。また、脾臓から単離した B 細胞を抗 CD40 抗体と LPS で刺激したところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス由来 B 細胞では IL-6 産生が顕著に亢進することが明らかとなった。以上の結果から、*Fli1* の発現低下により B 細胞が強力に活性化されることが明らかとなった。

図 1. Hep2 細胞を用いた蛍光抗体間接法

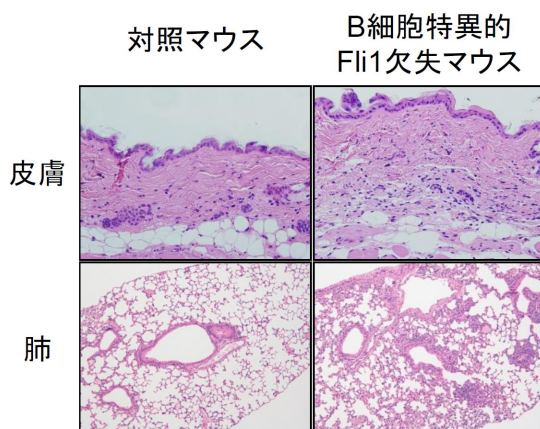


次に、B 細胞の活性化および不活性化に関与する因子について検討を行ったところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス由来 B 細胞では活性化に関与する CD19 の発現には変化はなかったが、抑制に関与する CD22 の発現が有意に低下していた。また、B 細胞活性化因子である BAFF の受容体の発現量も亢進していた。以上の結果から、CD22 の発現低下および BAFF signaling の活性化により、*Fli1* の発現低下は B 細胞の活性化を誘導していることが明らかとなった。

(2) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの皮膚と肺の線維化に関する検討

次に、皮膚および肺における線維化の状態について検討を行った。B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの皮膚ではコントロールマウスと比較して、真皮厚および hydroxyproline の含量が有意に亢進しており、*Mmp13* 遺伝子の発現は有意に抑制されていた (図 2)。同様に、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの肺では hydroxyproline の含量が有意に亢進しており、線維化関連遺伝子にも同様の変化が認められた。

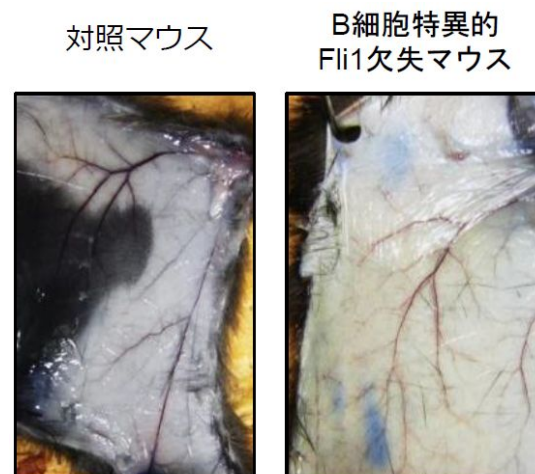
図 2 . 皮膚と肺の病理組織像 (H&E 染色)



(3) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管障害に関する検討

皮膚における血管の透過性について Evans blue 色素を用いて検討したところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの皮膚では血管透過性が顕著に亢進していた (図 3)。また、血管の構造異常について FITC-dextran を用いて検討したところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの皮膚の小血管では「細動脈の狭窄」や「毛細血管の拡張」などの強皮症の血管障害で特徴的に認められる変化が確認できた。血管の活性化状態について α -SMA の免疫染色を行ったところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの皮膚の小血管では α -SMA の発現が低下しており、血管が不安定化していることが明らかとなった。

図 3 . Evans blue 色素漏出試験



(4) B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの炎症に関する検討

脾臓および皮膚の所属リンパ節からリンパ球を単離し、CD4 陽性 T 細胞の分画を FACS で解析したところ、B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスでは CD4 陽性細胞において IL-17A 産生細胞の割合が有意に亢進していた。

(5) 本研究の意義

B 細胞の異常活性化は強皮症の病態において重要な役割を果たしていると考えられてきたが、その異常が強皮症の主要 3 病態にどの程度影響を及ぼしているかはこれまで不明であった。本研究により、*Fli1* の発現低下による B 細胞の異常活性化により、強皮症の主要 3 病態のすべてが再現できることが初めて示され、強皮症の病態における B 細胞の重要性が証明された。

一方、*Fli1* の発現異常による強皮症病態一元化仮説の観点からも、今回の検討結果は本仮説に矛盾がないことを示した点で非常に意義深い。

現在、強皮症の疾患修飾薬として注目されているボセンタンの作用機序の一つは血管内皮細胞における *Fli1* の発現を回復させる作用であることが示されているが、今回の検討結果から B 細胞における *Fli1* の発現異常を回復させることが新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

Saigusa R, Asano Y, Nakamura K, Miura S, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Taniguchi T, Yoshizaki A, Trojanowska M, Sato S. The impact of *Fli1* deficiency in B cells on the development of systemic sclerosis. The 40th Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology. Okayama, Japan.

2015/12/11-2015/12/13

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伸一 (SATO, Shinichi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 20215792

(2)研究分担者

浅野 善英 (ASANO, Yoshihide)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号 : 60313029

(3) 研究分担者

門野 岳史 (KADONO, Takafumi)
聖マリアンナ医科大学病院・准教授
研究者番号 : 80292910