

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461663

研究課題名(和文) 全身性強皮症患者由来マクロファージの極性変化における転写因子Fli1の役割

研究課題名(英文) The role of transcription factor Fli1 in macrophage polarization in patients with systemic sclerosis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は、免疫異常・炎症、血管障害、線維化を主要3病態とする原因不明の膠原病である。転写因子Fli1の発現低下は本症の線維化と血管障害に深く関わっているが、免疫異常・炎症の病態における役割は不明である。本研究では骨髄系細胞におけるFli1の発現低下の意義を検討したが、Fli1の発現低下はM2マクロファージの分化を促すこと、骨髄系細胞特異的Fli1欠失マウスでは内皮間葉移行が生じ、皮膚硬化が自然発症すること、同マウスではTh2/Th17優位な炎症が生じることが明らかとなった。以上より、骨髄系細胞におけるFli1の発現低下は本症のすべての病態に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is characterized by three pathological features, including immune abnormalities/inflammation, vasculopathy, and fibrosis. A series of our studies demonstrated that Fli1 deficiency contributes to the development of vasculopathy and fibrosis of SSc, but the role of Fli1 deficiency in immune abnormalities/inflammation still remains unknown. Therefore, to address this issue, we here investigated the impact of Fli1 deficiency on myeloid cells. Our results demonstrated the following findings: (i) Fli1 deficiency promotes the differentiation of macrophages into M2 subtype, (ii) myeloid cell-specific Fli1 knockout (Fli1 MyeKO) mice spontaneously develop dermal fibrosis due to endothelial-to-mesenchymal transition following initial vascular changes, (iii) Fli1 MyeKO mice exhibit Th2/Th17-skewed immune polarization. Taken together, these results indicate that myeloid Fli1 deficiency is involved in the development of the three cardinal pathological features of SSc.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 免疫異常 炎症 血管障害 線維化 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は「免疫異常・炎症」「血管障害」「線維化」を主要 3 病態とする原因不明の膠原病である。その病態はいまだ不明な点が多いが、近年我々は転写因子 Friend leukemia virus integration 1 (Fli1) の恒常的な発現低下が本症の線維化と血管障害の発症に深く関係している可能性を明らかにした。一方、Fli1 は様々な免疫担当細胞においても重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、各種免疫担当細胞における Fli1 の発現低下が強皮症の「免疫異常・炎症」の病態、つまり「B 細胞の異常活性化」「Th2/Th17 細胞優位な炎症」「M2 マクロファージ優位な炎症」などに及ぼす影響についてはいまだ不明な点が多い。

マクロファージには極性があり、一般に LPS 刺激で誘導される M1 型マクロファージは炎症の誘導と維持に重要な役割を果たしているが、IL-4 や IL-13 刺激によって誘導される M2 型マクロファージは炎症の収束と線維化において重要な役割を果たしている。強皮症患者では、健康人と比して病変部皮膚において M2 型マクロファージが多く浸潤している、間質性肺疾患を有する場合、気管支肺胞洗浄液中のマクロファージの極性は M2 型へシフトしている、末梢血中の CD14 を強発現する骨髄単球系細胞において CD163 と CD204 を強発現する独特な細胞集団が存在する、などの異常が明らかにされており、その病態において M2 型マクロファージへの極性シフトが関与している可能性が示唆されている。一方、強皮症関連間質性肺疾患モデルマウスの肺組織では、M2 型マクロファージのマーカーである arginase-1 や Ym1 の発現が亢進しており、クロドロン酸を用いてマクロファージを除去すると線維化が減弱する。また、強皮症患者では、IL-4、IL-13 などの M2 型マクロファージへの極性シフトを促す Th2 サイトカインの血清中濃度が上昇している、気管支肺胞洗浄液で得られた細胞では IL-4 の発現が亢進しており、その発現量と間質性肺疾患の重症度は相関する、などの報告がある。以上のように、強皮症の線維化の病態において、M2 型マクロファージが重要な役割を果たしている可能性が強く示唆されている。

我々の予備実験により、強皮症患者の病変部皮膚では M2 型マクロファージにおいて Fli1 蛋白の発現が低下していること、Fli1^{+/-}マウス由来の腹腔マクロファージでは野生型マウス由来の腹腔マクロファージと比較して M2 型マクロファージのマーカーの発現量が亢進していること、が明らかとなっている。これらの予備実験のデータは、Fli1 の恒常的な発現低下が「線維化」「血管障害」

のみでなく、マクロファージの極性を制御することによって「炎症」の過程にも密接に関与している可能性を示唆している。そこで、この仮説を証明するべく本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Fli1 がマクロファージの極性を制御する分子メカニズムを明らかにすると同時に、Fli1 の恒常的な発現低下がマクロファージの M2 シフトを促して強皮症の線維化や血管障害の病態に関与している可能性について動物モデルを用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Fli1 の恒常的な発現低下がマクロファージの極性変化に及ぼす影響についての検討

野生型マウスおよび Fli1^{+/-}マウスにチオグリコレート培地を腹腔内投与して無菌性腹膜炎を惹起させ、集積したマクロファージを回収した。これらの細胞を用いて、M2 型マクロファージの標識分子(Fizz1, Arginase-1, Ym-1 など)の発現量を real-time PCR 法を用いて比較検討した。

ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 細胞を Fli1 siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA で処理し、24 時間後に PMA で刺激し、更に 32 時間後に LPS + IFN- γ あるいは IL-4 + IL-13 で刺激し(それぞれ M1 型と M2 型への極性変化を誘導する) その 16 時間後に mRNA を回収した。Fizz1, Arginase-1, Ym1 などの M2 型標識分子の発現量を real-time PCR 法を用いて比較検討した。

(2) Fli1 の恒常的な発現低下が M2 型マクロファージへの極性変化を誘導する分子メカニズムについての検討

THP-1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、Fli1 が arginase-1 をコードする ARG1 遺伝子のプロモーター領域に結合するか否かを検討した。次に ARG1 プロモーター領域の配列を用いて DNA oligo pull-down assay を行い、Fli1 binding site の同定を試みた。

(3) 骨髄細胞特異的 Fli1 欠失マウスにおける皮膚の線維化の異常についての検討

骨髄細胞特異的 Fli1 欠失マウスの作成
Fli1^{flox/flox}マウスと LysM-Cre^{+/-}マウスを交配し、骨髄細胞特異的 Fli1 欠失(Fli1 MyeK0)マウスを作成した。

Fli1 MyeK0 マウスにおける皮膚硬化の検討
12 週齢の野生型マウスおよび Fli1 MyeK0 マウスの背部皮膚を用いて、病理組織学的かつ分子生物学的検討を行った。病理組織学的検討では、HE 染色および免疫染色により皮膚の厚さの違い 炎症細胞浸潤の違い(CD3, CD4, CD8, CD19, F4/80 など) 浸潤しているマクロファージの極性の違い(CD163, CD204)、などについて検討した。分子生物学的には、

皮膚組織において、 *Fizz1*, *Arg1*, *Ym1* などの M2 型マクロファージ標識遺伝子の mRNA の発現量、 *Col1a1*, *Col1a2*, *Ctgf* などの線維化関連遺伝子の mRNA の発現量、 Th1/Th2/Th17 サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL13, IL-17A など) の mRNA の発現量について検討した。

(4) *Fli1* MyeK0 マウスにおける血管の構造異常および機能異常の検討

強皮症に特徴的な血管構造があるか否かについて、12 週齢の *Fli1* MyeK0 マウスおよび野生型マウスを用いて検討した。血管構造の異常については、FITC-dextran を尾静脈より静注し、安楽死させた後に背部皮膚を蛍光顕微鏡で観察した。血管透過性については、Evans blue 色素を尾静脈より静注し、安楽死させた後、皮膚における色素の漏出の程度を評価した。

(5) *Fli1* MyeK0 マウスにおける内皮間葉移行の検討

内皮間葉移行の有無について、fibroblast specific protein-1 (FSP-1) と VE-cadherin に対する蛍光二重染色を行い、二重陽性細胞数を *Fli1* MyeK0 マウスと野生型マウスで比較した。

4. 研究成果

(1) *Fli1* の恒常的発現低下がマクロファージの極性変化に及ぼす影響についての検討

まずはじめに、野生型マウスおよび *Fli1*^{-/-} マウスの腹腔マクロファージを IL-4 あるいは IL-13 で刺激して、M2 型マクロファージの標識分子の発現量を real-time PCR で比較検討したところ、*Fli1*^{-/-} 腹腔マクロファージでは IL-4 および IL-13 刺激に対する *Fizz1*, *Arginase-1*, *Ym-1* の発現量が野生型腹腔マクロファージと比較して有意に亢進していた。次に、THP-1 細胞を *Fli1* siRNA あるいは scrambled non-silencing RNA で処理し、24 時間後に PMA で刺激し、更に 32 時間後に LPS + IFN- γ あるいは IL-4 + IL-13 で刺激し、その 16 時間後に mRNA を回収し、M2 型標識分子の発現量を real-time PCR で調べたところ、マウス腹腔マクロファージと同様に *Fli1* siRNA で処理した THP-1 細胞では scrambled non-silencing RNA で処理した THP-1 細胞と比較して、IL-4 + IL-13 刺激に対して *Fizz1*, *Arginase-1*, *Ym-1* の発現量が有意に亢進した。また、野生型マウスおよび *Fli1*^{-/-} マウスにブレオマイシンを皮下注射し、皮膚組織における M2 型マクロファージ標識分子の発現量を調べたところ、*Fli1*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して *Fizz1*, *Arginase-1*, *Ym-1* の発現量が有意に亢進していた。以上の結果から、*Fli1* の発現低下がマクロファージの M2 型への分化を促すことが明らかとなった。

(2) *Fli1* の恒常的発現低下が M2 型マクロファ

ージへの極性変化を誘導する分子メカニズムについての検討

クロマチン免疫沈降法により M2 マクロファージの分化マーカーである *ARG1* 遺伝子のプロモーターに *Fli1* が結合することを明らかにした。次に、DNA oligo pull-down assay を行い、*ARG1* 遺伝子プロモーターに *Fli1* が配列特異的に結合することを明らかにした。同定できた *Fli1* 結合部位の配列について検討したところ、過去に M1 マクロファージへの分化を制御していると報告されているある転写因子の結合部位とオーバーラップが認められた。そこで、*ARG1* 遺伝子プロモーターを用いて、これらの転写因子間の拮抗作用により *ARG1* 遺伝子の転写が制御されている可能性について現在検討を行っている。

(3) *Fli1* MyeK0 マウスにおける皮膚の線維化の異常についての検討

Fli1 MyeK0 マウスと野生型マウスで皮膚について比較したところ、*Fli1* MyeK0 マウスでは野生型マウスと比較して真皮が有意に厚くなり、hydroxyproline の含量が有意に多く、*Col1a1* 遺伝子と *Col1a2* 遺伝子の発現が有意に更新し、*Mmp13* 遺伝子の発現量は有意に抑制されていることが明らかとなった。また、炎症について評価したところ、*Fli1* MyeK0 マウスでは野生型マウスと比較して IL-4, IL-13, IL-17A の発現が有意に亢進しており、M2 型マクロファージの標識分子 (*Fizz1*, *arginase-1*, *Ym-1*) の発現についても亢進していた。

(4) *Fli1* MyeK0 マウスにおける血管の構造異常および機能異常の検討

FITC-dextran で血管構造の評価を行ったところ、*Fli1* MyeK0 マウスでは細動脈の狭窄や毛細血管の拡張など、強皮症の血管障害に特徴的に見られる異常が出現した。また、Evans blue 色素を静注して血管透過性について評価したところ、*Fli1* MyeK0 マウスでは野生型マウスと比較して有意に血管透過性が亢進していた。

(5) *Fli1* MyeK0 マウスにおける内皮間葉移行の検討

内皮間葉移行について蛍光二重染色で比較したところ、二重陽性細胞の数は *Fli1* MyeK0 マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に亢進していた。

(6) *Fli1* MyeK0 マウスにおける血管障害と線維化の経時的検討

4 週齢、8 週齢、12 週齢で検討したところ、血管の異常は 4 週例で既に存在したが、線維化の変化は 8 週例で初めて出現した。したがって、血管障害が先行し、続いて線維化が生じていることが明らかとなった。

以上の検討により、*Fli1* の恒常的な発現低

下がマクロファージの M2 型への分化を強力に促すこと、および *Fli1*MyeK0 マウスでは、強皮症に特徴的な血管の構造異常（細動脈の狭窄、毛細血管の拡張）および機能異常（血管透過性の亢進）が認められること、これらの血管異常が最初に生じ、その後に皮膚硬化が生じること、血管の構造異常が出現すると同時に内皮間葉移行が生じ、血管内皮細胞から筋線維芽細胞が供給されていること、が明らかとなった。つまり、骨髄細胞特異的に *Fli1* の発現を低下させることにより、「血管障害」「線維化」という強皮症に特徴的な病態カスケードに沿って、強皮症に特徴的な血管の構造異常・機能異常および線維化が忠実に再現できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S. Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated *Fli1*-haploinsufficient mice. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:517-26.

〔学会発表〕(計3件)

Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Trojanowska M, Sato S. *Fli1* haploinsufficiency exacerbates dermal fibrosis via activation of fibroblasts, endothelial cells, and macrophages in bleomycin-treated mice. The 2013 American College of Rheumatology Annual Meeting. San Diego, USA. 2013/10/26-2013/10/30

Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Saigusa R, Yoshizaki A, Trojanowska M, Sato S. Myeloid *Fli1* deficiency induces tissue fibrosis, vasculopathy, and immune abnormalities recapitulating systemic sclerosis. The 39th Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology. Osaka, Japan. 2014/12/12-2014/12/14

谷口隆志、浅野善英、赤股要、野田真史、高橋岳浩、市村洋平、遠山哲夫、三枝良輔、吉崎歩、佐藤伸一 骨髄系細胞における *Fli1* の恒常的発現低下が血管の恒常性に及ぼす影響についての検討 日本臨床免疫学会神戸 2015/10/22-2015/10/24

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野善英 (Yoshihide Asano)
東京大学医学部附属病院皮膚科・准教授
研究者番号：60313029