

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670520

研究課題名(和文) 転写因子欠損による新たな自然発症強皮症モデルの作成

研究課題名(英文) The generation of a new animal model of systemic sclerosis by focusing on environmental factors

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症は皮膚と内臓諸臓器の血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。本症は多因子疾患であり、特に環境因子がその形質を規定する上で重要と考えられている。強皮症皮膚線維芽細胞では転写因子Fli1とKLF5の発現がエピジェネティック制御により抑制されており、その異常は環境要因の影響を反映した疾病因子の可能性が示唆されている。興味深いことに、Klf5+/-;Fli1+/-マウスは強皮症に極めて類似した免疫異常、血管障害、線維化を自然発症した。同マウスは強皮症の病態概念に基づいて作成された世界初の遺伝子改変動物であり、本症の病態理解・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 connective tissue disease characterized by three cardinal pathological features, including immune abnormalities/inflammation, vasculopathy, and fibrosis. Although the pathogenesis of SSc still remains unknown, it is generally accepted that environmental factors play a critical role in the development of this disease in genetically predisposed individuals. In SSc dermal fibroblasts, two transcription factors, Fli1 and KLF5, are epigenetically suppressed, suggesting that the downregulation of these molecules is likely to be predisposing factors of SSc. Of note, mice with heterozygous deletion of Fli1 and Klf5 spontaneously developed the three cardinal pathological features of SSc, strictly recapitulating the sequential pathological process (initiating with immune abnormalities, followed by vasculopathy, and eventually resulting in tissue fibrosis). Further studies with this murine model would provide a useful clue to understand SSc pathogenesis.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 転写因子 エピジェネティクス 線維化 血管障害 免疫異常

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血管障害と線維化を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常の関与が示唆されている。その病因は未だ不明であり、病態に立脚した根治療法は現時点では存在しない。その主要な理由の一つとして、本症の主要3病態(「免疫異常・炎症」「血管障害」「線維化」)を忠実に再現する動物モデルが存在しないことが挙げられる。これまで強皮症の動物モデルとしてはプレオマイシン誘発強皮症モデルマウスとタイトスキンマウスが汎用されてきた。プレオマイシン誘発モデルマウスは強皮症の線維化と炎症の病態を反映したモデルであるが、血管障害と自己免疫については十分に再現できていない。タイトスキンマウスは *Fbn1* 遺伝子変異が同定されている突然変異種であり、非炎症性に皮下組織の線維化を来すために硬化期の強皮症モデルとして用いられているが、真皮に線維化がなく、肺病変は肺気腫であるなど、強皮症の病態を反映しているとは言い難い。一方、強皮症の線維化と血管障害を反映したモデルとして、*Fra2* トランスジェニックマウスと *uPAR*^{-/-}マウスが報告されている。しかし、これらのマウスは強皮症に特徴的な免疫異常は認められず、やはり強皮症のモデルマウスとしては不十分である。これらのマウスに共通する問題点として、強皮症の病態概念に基づいて作成されていない点が挙げられる。これらはいずれも他疾患・他病態を対象として作成されたモデルを特定の病態に注目して強皮症との類似性を論じているにすぎず、強皮症モデルマウスを作成することを目的として開発されたものではない。

このような背景を踏まえ、我々は強皮症の病態概念に基づいてモデルマウスの作成を試みることにした。強皮症は多因子疾患であり、その発症には遺伝因子と環境因子がともに重要な役割を果たしていると考えられている。事実、SScの発症に対して最も強い危険因子は家族歴であるが、双生児におけるSScの診断一致率は、一卵性と二卵性の間で差がないことが報告されている。環境因子の影響を反映した遺伝情報の変化としてエピジェネティック制御が挙げられるが、近年SScにおいてもゲノムワイドな網羅的DNAメチル化解析やmicroRNAアレイ解析のデータが多数報告されており、エピジェネティック制御が病態へ及ぼす影響が注目されている。

SScにおいて、エピジェネティック制御により発現調節を受けている遺伝子として最初に同定されたのが転写因子 *Fli1* である。培養SSc皮膚線維芽細胞およびSSc病変部皮膚を用いた検討により、*Fli1* 遺伝子プロモーター領域の CpG 配列のメチル化が顕著に亢進していることが報告されている。皮膚組織を用いた免疫染色では、線維芽細胞と血管内皮細胞における *Fli1* の発現量は、健常人皮膚と比較してSSc非病変部皮膚で軽度低下し

ており、SSc病変部皮膚ではさらに顕著な低下が認められる。*Fli1*^{-/-}マウスの皮膚では線維芽細胞が恒常的に活性化されており、I型コラーゲン産生が亢進しているが、組織学的には真皮の肥厚は認められない。また、皮膚の微小血管には軽度の構造異常が見られ、分子レベルではSSc皮膚血管内皮細胞に類似した形質変化が生じている。一方、*Fli1*^{-/-}マウスを用いてプレオマイシン誘発SScモデルマウスを作成すると、炎症、血管障害、線維化の全てにおいてSScのphenotypeの発現が増強する。以上の検討結果から、*Fli1* の発現低下は分子レベルでSScに類似した線維芽細胞と血管内皮細胞の活性化を誘導しうが、その異常のみではSScの発症には至らないことが明らかとなった。

KLF5は各種線維化反応を制御する重要な転写因子で、心筋線維芽細胞においては線維化反応を誘導し、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する因子として機能している。この転写因子は、SScの病変部皮膚において発現が抑制されていることがDNAマイクロアレイ解析により既に報告されている。そこで我々はKLF5に注目し、検討を進めたところ、

SSc皮膚線維芽細胞ではエピジェネティック制御により *KLF5* 遺伝子の発現が強力に抑制されていること、*KLF5* は皮膚線維芽細胞において *CTGF* 遺伝子プロモーターに対して強力な転写抑制因子として作用していること、*KLF5* と *Fli1* は相互作用することにより *CTGF* 遺伝子に相乗的に抑制作用を示すこと、が明らかとなった。

強皮症皮膚線維芽細胞ではTGF-β signalingの恒常的な活性化とCTGFの恒常的な発現亢進が見られる。一方、マウスに成長因子を皮下注射する実験系において、持続的な線維化反応を誘導するにはTGF-βとCTGFの2種類の成長因子があれば必要十分であることが示されている。正常ヒト皮膚線維芽細胞において、*Fli1* 遺伝子の恒常的な発現低下はTGF-β signalingの活性化の大部分を模倣でき、*Fli1* 遺伝子と *KLF5* 遺伝子の恒常的な発現低下はCTGFの発現亢進を誘導することを鑑みると、理論的にはこの2つの転写因子の発現低下が同時にかつ持続的に生じれば、*in vivo*でSScに類似した線維化反応を自然に誘導できると考えられる。そこで、*Klf5*^{-/-};*Fli1*^{-/-}マウスを作成し、同マウスが強皮症のモデルマウスとなるか否かについて検討を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の背景に基づき、強皮症の病態概念に基づく世界で初の遺伝子改変モデルマウスを作成することである。

3. 研究の方法

(1) 線維化に関する評価

「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」, 「電子顕微鏡によるコラーゲン線維の高次構造の評価」を行う。

(2)血管障害に関する評価

「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」, 「二光子顕微鏡を用いた生体イメージングによる皮膚組織の低酸素化の評価、および毛細血管における血流速度の評価」, 「肺細動脈・細静脈の組織学的評価」を行う。

(3)免疫異常・炎症に関する評価

「B 細胞の活性化状態の評価 (IL-6 産生能)」, 「自己抗体の力価の定量」を行う。

4. 研究成果

(1)皮膚および肺の線維化について

Klf5^{-/-};Fli1^{+/-} マウスでは、8-12 週齢で顕著な皮膚硬化が自然発症した。また、膠原線維の高次構造について電子顕微鏡で観察したところ、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスでは SSc に特徴的とされるコラーゲン線維の平均径の増加と顕著な大小不同が認められた。コラーゲン線維の大小不同は fibrillogenesis の異常によって生じるが、その過程に関与している遺伝子の発現について検討したところ、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスの皮膚では decorin の発現低下、および lumican と Adamts2 の発現亢進が認められた。また、SSc 患者の皮膚において同様の検討を行ったところ、これらの遺伝子の発現量については *Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスと全く同様の変化が認められた。次に肺について検討したところ、8-16 週齢で間質性肺疾患が自然発症し、その程度は経時的に悪化がみられた。また、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺では II 型肺胞上皮細胞の増殖と同細胞における CTGF の過剰産生が認められた。以上の結果から、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスは SSc に特徴的な皮膚硬化と肺線維症を自然発症することが明らかとなった。

(2)血管障害について

Klf5^{-/-};Fli1^{+/-} マウスの皮膚では、8 週齢から毛細血管が減少し、週齢に比例してその減少率は亢進していた。また、皮膚の血管構造については、細動脈の虫喰状の狭窄と毛細血管の異常増生が 4 週齢から認められた。また、二光子顕微鏡を用いた生体イメージングによる評価では、皮膚組織では低酸素化が生じており、また毛細血管における血流速度の低下も認められた。肺血管については、12 週齢において血管内皮細胞・血管平滑筋細胞の増殖活性が亢進しており、16 週齢以降細動脈の狭窄が経時的に進行し、32 週齢では α -SMA 陽性細胞が増殖して血管内腔が狭窄する像が認められた。また、32 週齢では肺静脈においても血管壁の線維化と鬱血所見が認められ

た。以上より、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスは SSc に特徴的な血管障害（皮膚における毛細血管の減少、細動脈と毛細血管の構造異常、毛細血管における血流低下、肺動脈性肺高血圧症、肺静脈閉塞性疾患など）を自然発症することが明らかとなった。

(3)免疫異常・炎症について

Klf5^{-/-};Fli1^{+/-} マウスの肺では、SSc の肺の特徴的な病理所見の一つである巣状かつびまん性の B 細胞浸潤が認められた。SSc 患者の B 細胞では CD19 の発現が 20%ほど上昇しており、この異常が B 細胞の恒常的な活性化を誘導し、免疫異常の病態に関与していると考えられている。*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺および脾臓から B 細胞を単離して検討したところ、CD19 の発現が約 15%上昇しており、活性化を反映して顕著な IL-6 産生能の亢進が認められた。また、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスでは自己抗体が産生されていた。さらにクロマチン疫沈降法で検討したところ、*Cd19* 遺伝子プロモーターに Fli1 と KLF5 が結合していることが明らかとなった。以上の結果より、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスでは B 細胞が恒常的に活性化しており、その機序には転写を介した直接的な CD19 の発現亢進が関与していると考えられた。

(4)本研究の意義

SSc の線維化の病態においては、線維芽細胞における TGF- β signaling の恒常的な活性化と CTGF の恒常的な発現亢進が重要であると考えられてきた。今回我々は SSc 皮膚線維芽細胞におけるエピジェネティック制御を介した遺伝情報の変化に注目することにより、Fli1 と KLF5 という 2 つの転写因子の恒常的な発現低下がその病態において重要な働きをしている可能性を見出し、実際に *Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスにおいて SSc の皮膚と肺の線維化の病態がきれいに再現できることを明らかにした。さらに、同マウスは SSc の血管障害、炎症、自己免疫の病態に関しても再現していた。更に重要なことに、炎症・自己免疫は 4 週齢、血管障害は 4-8 週齢、皮膚線維化は 8-12 週齢において出現しており、これらの主要 3 病態が生じる順番も SSc と同様であった。つまり、*Klf5^{-/-};Fli1^{+/-}* マウスは SSc の主要 3 病態を SSc と同様の経過で自然発症する新規 SSc モデルマウスと考えることができる。

Fli1 と KLF5 の発現異常による SSc の病態モデルは、治療戦略を考える上でも非常に有用である。SSc の病態において中心的な役割を果たしている転写因子の発現や機能の異常を是正することができれば疾患の自然経過を修飾することが可能と考えられるが、近年 SSc の疾患修飾薬として注目を集めたボセンタンとイマチニブは、いずれも Fli1 の転写活性を強力に回復させる機能を持っている。今後、この疾患モデルに基づき、SSc の

病態が明らかになり、新規治療薬が開発されることが期待される。

5．主な発表論文等

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤伸一 (Shinichi Sato)

東京大学医学部附属病院皮膚科・教授

研究者番号：20215792

(2)研究分担者

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