

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 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：2015～2016

課題番号：15H06164

研究課題名(和文)全身性強皮症患者の骨髄由来細胞の表現型の異常における転写因子Fli1の役割

研究課題名(英文)The roles of transcriptional factor Fli1 in the phenotypic changes of SSc myeloid cells

研究代表者

谷口 隆志(TANIGUCHI, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60757491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来細胞における転写因子Fli1の恒常的発現低下は骨髄由来細胞、特に骨髄由来間葉系細胞の表現型に異常をもたらす、脈管形成において新生血管の安定性に障害をもたらす。さらに、pericyte lossと呼ばれる血管壁細胞の機能不全にみられる血管構造の不安定化が骨髄由来細胞特異的Fli1欠失マウス皮膚血管に見られることが明らかになった。そしてpericyte lossに見られる特徴的な血管障害である血管構成細胞の増殖による増殖性血管障害や血管構造の消退による破壊性血管障害が同マウス皮膚血管に経時的に見られた。これらの異常はエンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンの投与により改善が見られた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that myeloid Fli1 deficiency impaired vasculogenesis due to aberrant vascular mural cells derived from Fli1 deficient myeloid cells. Vascular instability caused by insufficient function of vascular mural cells are called "pericyte loss". Consistently, pericyte loss caused by impaired vasculogenesis due to myeloid Fli1 deficiency induced characteristic vasculopathy such as proliferative vasculopathy and destructive vasculopathy in the skin vessels. These results suggest that transcription factor Fli1 play important roles as a genetic factor in the pathogenesis of characteristic vasculopathy in systemic sclerosis. In addition, these vasculopathy induced by myeloid Fli1 deficiency was partially reversed by dual endothelin receptor blocker bosentan.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性強皮症 血管内皮細胞 脈管形成

1. 研究開始当初の背景

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全身性の自己免疫疾患である。強皮症の病因はいまだ不明であるが、研究代表者はこれまでに「転写因子 *Fli1* の恒常的な発現低下」が強皮症の血管障害、線維化、免疫異常の病態に関与している可能性を明らかにしてきた。その一連の研究の過程で、強皮症病変部皮膚に浸潤している骨髄由来細胞においても *Fli1* の発現が低下していることを見出し、予備実験において「骨髄由来細胞における *Fli1* の発現低下が新生血管形成を障害する」可能性を見出した。そこで本研究では、*Fli1* が骨髄由来細胞の表現型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骨髄由来細胞に及ぼす影響が強皮症の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検討を行う。

2. 研究の目的

強皮症における脈管形成の異常の病態は未だ不明である。今回の研究は、*Fli1* の発現異常が骨髄由来間葉系幹細胞の表現型制御に及ぼす影響を明らかにし、強皮症における新生血管形成の障害やそれに引き続く血管障害の病態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずはじめに *Fli1* 遺伝子の恒常的な発現低下による骨髄由来細胞の表現型の変化が、新生血管形成に及ぼす影響について検討を行う。そのため、新生血管形成に重要な役割を担う骨髄由来間葉系幹細胞に着目し、*Fli1* 欠失骨髄由来間葉系幹細胞(*Fli1* McKO マウスから単離)の表現型の検討、骨髄由来細胞における転写因子 *Fli1* の恒常的な発現低下が血管障害に及ぼす影響を検討するため、骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管障害について評価を行う。さらに、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの血管障害に対して及ぼす影響についても検討を行う。

(1) マウス

Fli1^{flx/flx} マウスと *LysM-Cre*^{+/-} マウスを交配し、骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス(*Fli1* McKO マウス)を作成、繁殖させ実験に用いた。

(2) 骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおける骨髄由来間葉系幹細胞の表現型の検討

Fli1^{flx/flx} マウスおよび *Fli1* McKO マウスの大腿骨および頸骨を PBS で洗浄することで骨髄細胞を回収し、DMEM 培地にて培養した。増殖した細胞を 2 回継代した後、細胞の mRNA を回収し、血管壁細胞の標識遺伝子 (*Acta2*、*Sm22*、*Ng2*、*Desmin*、*Rgs5*、*Pdgfrb*)

や細胞外基質(*Coll1a1*、*Coll1a2*)ならびに *Vegfa* などの血管新生促進因子の発現量を real-time PCR 法を用いて比較検討した。

(3) 骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおける皮膚血管障害の検討

骨髄由来細胞における *Fli1* の恒常的な発現低下が器質的な血管障害の病態に直接関与している可能性について検討するため、野生型マウスおよび *Fli1* McKO マウスの皮膚の微小血管の機能的、構造的な解析を行った。その際、4 週齢、8 週齢、12 週齢のマウスを用いた。

Fli1^{flx/flx} マウス、*Fli1* McKO マウスより背部皮膚組織を回収し、病理組織学的検討として、HE 染色および免疫染色により皮膚微小血管の血管数・血管径・血管内腔面積の計測、血管壁細胞の分化度の評価(α -SMA、RGS5 の発現の評価)、毛細血管数(von Willebrand 因子染色により毛細血管を評価)についての検討を行った。

皮膚血管の構造異常の解析のため、*Fli1*^{flx/flx} マウス、*Fli1* McKO マウスに FITC 抱合デキストランを尾静注し、5 分後に皮膚検体を回収し、蛍光顕微鏡にて皮膚血管を可視化し、血管狭窄、血管拡張、血管の消失などの血管構造異常について検討した。

皮膚血管の脆弱性の評価のため、*Fli1*^{flx/flx} マウス、*Fli1* McKO マウスに Evans Blue Dye を尾静注し、30 分後に皮膚検体を回収し、腹部皮膚血管からの Evans Blue Dye の血管外漏出の程度を観察し、血管透過性の評価を行った。また、皮膚検体を 5mm パンチで回収し、組織中に漏出した Evans Blue Dye の量を定量化した。

(4) エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンが骨髄由来細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおける皮膚血管障害に及ぼす影響についての検討

Fli1^{flx/flx} マウス、*Fli1* McKO マウスに PBS に溶解したボセンタンを 2 週間腹腔投与し、(3) - の検討を行いボセンタンが *Fli1* McKO マウスの血管障害が改善するかどうかについての検討を行った。

4. 研究成果

まず、転写因子 *Fli1* の恒常的な発現低下が骨髄由来間葉系幹細胞の表現型に及ぼす影響を評価するため、*Fli1*^{flx/flx} マウスおよび *Fli1* McKO マウスの大腿骨および腓骨より骨髄細胞を採取し、DMEM 培地にて培養することで骨髄由来間葉系幹細胞を回収し、血管壁細胞の標識遺伝子や細胞外基質ならびに血管新生促進因子の発現量を real-time PCR 法を用いて比較検討した。その結果、骨髄系細胞の *Fli1* の恒常的な発現低下は骨髄由来間葉系幹細胞の *Acta2*、*Sm22*、*Ng2*、*Pdgfrb* 遺伝子の mRNA

発現を減少させた一方で Rgs5、Mmp9、Colla1、Colla2 遺伝子の発現を亢進させた。このことは、骨髄由来間葉系幹細胞において Fli1 の発現低下は同細胞の血管壁細胞に類似した表現型に関して、血管内皮細胞を取り囲み血管の安定化に寄与する表現型から、血管の安定化能が低く細胞外マトリックスを産生する表現型へと形質を変化させる可能性があることを示唆する。また一方で Fli1 の恒常的発現低下は血管新生促進因子の遺伝子の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、骨髄由来幹細胞における Fli1 の発現低下は同細胞の脈管形成における役割に重要な影響を及ぼしている可能性を考えられた。

また、matrigel plug assay による脈管形成の検討にて、骨髄由来細胞における転写因子 Fli1 の恒常的発現低下が、骨髄由来細胞から分化した血管壁細胞の機能障害により脈管形成に障害を来たことが明らかになっている。脈管形成の異常による新生血管形成の障害は血管の恒常性を破綻することが知られているが、血管の恒常性の評価のために 12 週齢の *Fli1* McKO マウスを用いて皮膚血管の血管壁細胞の α -SMA の発現の評価を行うと、12 週齢の *Fli1* McKO マウスにおいて皮膚血管の血管壁細胞の α -SMA の発現が低下しており、血管恒常性の破綻が示唆された。 α -SMA の発現低下に見られるような血管壁細胞の機能不全による血管不安定化は "pericyte loss" と呼ばれ、特徴的な血管障害を来たす病態として知られている。そこで、*Fli1* McKO マウスの皮膚血管の機能的・構造的な血管障害について検討した。Evans Blue dye を尾静注し皮膚血管からの漏出を評価する血管透過性の検討では、*Fli1* McKO マウスにて Evans Blue dye の血管外漏出が見られ、皮膚血管の脆弱化が見られた。また、皮膚血管の病理組織学的検討では、*Fli1* McKO マウス皮膚真皮の細動脈において血管内皮細胞数の増数、血管内腔面積の狭小化そして血管径の拡大があり、増殖性血管障害が見られた。FITC 抱合デキストランによる皮膚血管の観察で *Fli1* McKO マウス皮膚細動脈に虫食い状の狭小化が見られたこともこの結果を裏付けている。また、FITC デキストランによる皮膚血管の観察では毛細血管の消退が見られ、さらに皮膚組織の von Willebrand 因子染色にて毛細血管数を計測すると *Fli1* McKO マウスでは毛細血管数が減少しており、これらの所見は *Fli1* McKO マウス皮膚血管で破壊性血管障害も見られることを示唆する。骨髄由来細胞における転写因子 Fli1 の発現低下が引き起こす血管障害は脈管形成の異常による血管恒常性の破綻によると考えられるが、血管障害の経時的变化を検討するため、これらの血管障害についての同様の検討を 4 週齢、8 週齢のマウスでも行ったところ、4 週齢では毛細血管でのみ血管壁細胞の α -SMA の発現低下が見られ、Evans blue dye の漏出はごく軽度

であり病理組織学的な検討および FITC デキストランによる皮膚血管の構造評価において増殖性血管障害や破壊性血管障害はみられなかった。8 週齢の *Fli1* McKO マウスでは加齢に伴って細動脈・細静脈にも血管壁細胞の α -SMA の発現低下が見られ、FITC 抱合デキストランによる皮膚血管の観察にて、増殖性血管障害によると考えられる皮膚血管細動脈の虫食い状の狭窄像や毛細血管の消退に見られる破壊性血管障害もみられた。以上の検討により、骨髄由来細胞における転写因子 Fli1 の恒常的発現低下は全身性強皮症に類似した脈管形成の障害により血管恒常性の破綻および強皮症に類似した血管障害を再現することが今回の実験において明らかになった。

また、ボセンタンを 2 週間投与することで *Fli1* McKO マウスにおいて見られた皮膚血管の血管壁細胞における α -SMA の発現低下や FITC 抱合デキストランで観察された皮膚細動脈の虫食い状の狭窄像、Evans Blue dye の血管外漏出によって評価される血管脆弱性をそれぞれ改善し、ボセンタンが皮膚微小血管内皮細胞や皮膚線維芽細胞の異常のみならず、骨髄由来細胞における転写因子 Fli1 の恒常的発現低下が引き起こす血管障害をも改善することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Taniguchi T, Asano Y, Fukasawa T, Yoshizaki A, Sato S. Critical contribution of the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 axis to vasculopathy associated with systemic sclerosis. *J Dermatol.* 査読有り in press. doi: 10.1111/1346-8138.13827.

Taniguchi T, Asano Y, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Yoshizaki A, Sato S. Fli1 deficiency induces CXCL6 expression in dermal fibroblasts and endothelial cells, contributing to the development of fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 査読有り in press. doi: 10.3899/jrheum.161092.

[学会発表](計 1 件)

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、Maria Trojanowska 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

第 43 回日本臨床免疫学会総会 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

[図書](計 1 件)

谷口隆志 他、強皮症の基礎と臨床、医

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 隆志 (TANIGUCHI Takashi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60757491

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()