

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 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：15H06165

研究課題名(和文) 全身性強皮症の病態で転写因子Fli1の発現異常が自然免疫系に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) The analysis on the correlation between Fli1 downregulation and innate immune system dysregulation in the pathogenesis of systemic sclerosis

研究代表者

高橋 岳浩 (TAKAHASHI, Takehiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30755690

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)：全身性強皮症は皮膚、内臓諸臓器などの線維化、血管系の異常、および自己に対する免疫応答をはじめとする免疫の異常、を特徴とする膠原病である。本疾患の病態の根本的なメカニズムは明らかになっていないが、遺伝子発現を制御する分子である転写因子の一種、Fli1の発現の異常と、全身性強皮症の関連が過去の研究から明らかになってきている。今回我々は、Fli1の発現異常が全身性強皮症の免疫異常、特に自然免疫系の異常に対して何らかの寄与を果たしているのかを明らかとすることを目的として研究を開始し、今回の検討によってそのメカニズムの一部が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc), or scleroderma, is a chronic connective tissue disease characterized by three cardinal features: autoimmunity/inflammation, vasculopathy, and fibrosis in the skin and various internal organs. Although SSc pathogenesis remains elusive, genetic studies have demonstrated the central role of immune abnormalities in SSc development. In particular, recent researches have disclosed the cardinal role of innate immune system dysregulation in the pathogenesis of autoimmune diseases including SSc. Numerous studies from our laboratory and others have demonstrated the critical role of Friend leukemia virus integration 1 (Fli1), a member of the Ets transcription factor family, in SSc pathogenesis. This time, we studied on the correlation between Fli1 and dysregulation in the innate immune system in SSc, and indeed could demonstrate their profound relationship in its pathogenesis.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 自然免疫 TLR4

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(Systemic Sclerosis; SSc)は血管障害と皮膚/内臓諸臓器の線維化を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その病因は未だ不明であるが、我々はこれまでの検討により、SSc 患者の病変部皮膚では様々な細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど)において転写因子 Fli1 の発現が恒常的に低下しており、この異常が本症の線維化、血管障害、炎症の病態に深く関与している可能性を明らかにしてきた。Fli1 は Ets 転写因子ファミリーの一つで、SSc 皮膚線維芽細胞ではエピジェネティックな機序によりその発現が恒常的に抑制されている(Wang Y, et al. Arthritis Rheum. 2006)。皮膚線維芽細胞において Fli1 は I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能しているが、Fli1 遺伝子サイレンシングは同細胞において I 型コラーゲン遺伝子の発現を強力に誘導し(Asano Y, et al. J Biol Chem. 2007)、Fli1 \square CTA/ \square CTA マウス(Fli1 の転写抑制活性ドメイン欠失マウス)では野生型マウスと比較して皮膚における I 型コラーゲンの含量が約 2 倍に亢進し、膠原線維の大小不同など SSc に類似したコラーゲンの高次構造の異常も再現できる(Asano Y, et al. Mol Cell Biol. 2009)。SSc の病態には血管新生の恒常的な活性化が関与しているが、血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスでは、皮膚微小血管内皮細胞において血管新生に関連した一連の遺伝子が恒常的に活性化しており、細動脈狭窄など SSc の血管障害に特徴的な血管の構造・機能異常を再現できる(Asano Y, et al. Am J Pathol. 2010)。また Fli1 \pm マウスを用いた in vivo/in vitro の検討により、マクロファージでの Fli1 の発現低下は、線維化促進的に作用する M2 マクロファージへの分化を誘導することが明らかとなっている(Taniguchi T, et al. Arthritis Rheumatol. 2015)。

以上のように SSc では広汎な細胞種で Fli1 の発現が恒常的に低下しており、このことが本症の線維化、血管障害、炎症に寄与している可能性が考えられる。しかしながら、Fli1 の発現異常が SSc の免疫異常に及ぼしている影響については未だ不明な点が多い。

自然免疫系は広く細菌などに病原体に共通の構造を認識して感染防御反応を誘導する免疫系であり、この免疫系において中心的な役割を果たしているのが Toll 様受容体(TLR)である。近年 TLR はこのような病原体などの異物認識だけでなく、炎症等によって生じる自己の成分に対する応答にも関与することが報告されている。

TLR には現在 10 種類の存在が知られており、TLR4 はグラム陰性菌の外膜の構成成分であるリポ多糖(LPS)を認識する受容体として最もよく研究されている TLR の一つであるが、上記のように自己に対する炎症・免疫応答、すなわち非感染性の慢性炎症疾患、自

己免疫疾患における重要な役割が示唆されてきている。SSc も例外ではなく、例えば SSc 患者皮膚においては TLR4 の発現が著明に上昇しており、SSc 患者皮膚由来の線維芽細胞では TLR4 シグナリングの活性化によって代表的な線維化促進的サイトカイン TGF- β 1 に対する感受性が増すことにより I 型コラーゲンの産生が亢進している(Bhattacharya S, et al. Am J Pathol. 2013)。また BLM 誘発 SSc マウスモデルでは、SSc の病態形成に重要な役割を果たす B 細胞の異常活性化につき、この活性化が主として TLR4 シグナリングを介することがすでに示されている(Yoshizaki A, et al. Am J Pathol. 2008)。さらに我々は、2 つの独立した SSc マウスモデル(BLM 誘発 SSc マウスモデルと TSK マウス)において、TLR4 のノックアウトによって有意にその線維化、血管障害、炎症の病態が緩和することを示し得た(Takahashi T, et al. Arthritis Rheumatol. 2015)。これらの結果は、TLR4 シグナリングの異常活性化が SSc の各種病態において極めて重要であることを示唆している。

SSc の病態に関する以上の 2 つの重要な背景は、SSc の病態における Fli1 の恒常的発現低下と自然免疫系、また特に TLR4 シグナリングの異常活性化の関連についての関心を惹起するものであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SSc における転写因子 Fli1 の恒常的発現低下が自然免疫系の恒常的活性化に関与している可能性について培養細胞および動物モデルを用いて検討を行うことを目的とした。

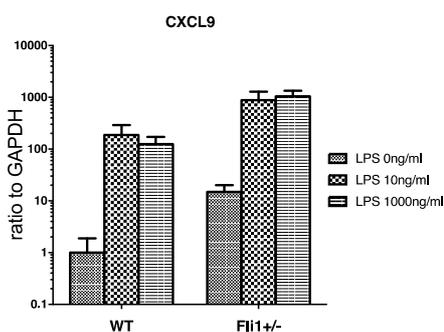
3. 研究の方法

(1) Fli1 の発現低下が TLR4 シグナリングに影響を及ぼすかどうかについて、マクロファージを WT(Fli1 $^{+/+}$)マウスおよび Fli1 $^{-/-}$ マウスより単離して ex vivo で培養し、無刺激下での naïve な細胞におけるサイトカイン等の発現の違いを比較検討するとともに、代表的な TLR4 のリガンドである LPS で刺激し、野生型マウス由来による同種の細胞に対する LPS 刺激によるサイトカイン産生等の応答と比較することにより評価を行った。マクロファージの単離に当たっては、マウスにチオグリコレート培地を腹腔内投与し無菌性腹膜炎を起こさせ、集積したマクロファージを回収することによって行った。

(2) 当研究室の最近の検討により、ケラチン 14 発現細胞特異的 Fli1 ノックアウトマウスは SSc 様の皮膚線維化と自己免疫を呈し、SSc の新規病態モデルマウスとして有用である可能性が示唆された。今回、この新規 SSc モデルマウスからにおける自然免疫系の活性化について、in vivo および ex vivo での検討を行った。

4. 研究成果

(1) Fli1^{+/-}マウスの腹腔マクロファージを単離し、LPSの無刺激条件下、10ng/mlおよび100ng/ml刺激条件下で24時間RPMI培地中でex vivo培養し、その後mRNAを回収して各種ケモカイン、サイトカインの発現レベルをRT-PCR法で検討したところ、無刺激条件においてもCXCL9などのケモカインの発現が上昇しており、さらにLPS刺激条件下においては上述のCXCL9に加え、代表的な炎症生サイトカインであるTNF α やMCP-1、RANTESなどの発現がWTに比較して有意に上昇することが明らかとなった。(図1にCXCL9についての結果を示す)



(図1: WTマウスおよびFli1^{+/-}マウス腹腔マクロファージex vivo培養でのLPS無刺激および刺激条件下でのCXCL9 mRNA発現の比較。House-keeping geneとしてGAPDHを用いた。WT無刺激条件下での発現量を1にnormalizeした比で示す)

CXCL9、TNF α 、MCP-1、RANTESなどの炎症性ケモカイン、サイトカインはいずれもSSc患者における発現上昇とその免疫異常の病態への関与が知られており、本症においてTLR4シグナリングが恒常的に活性化していることを考慮すると、LPSを用いた当実験の結果はFli1の発現低下が本シグナリングの活性化を介して上記炎症性ケモカイン、サイトカインの恒常的発現上昇の一要因となっている可能性を示唆するものと考えられた。

(2) Loxp/Cre系を用いFli1の臓器特異的/細胞特異的ノックアウトマウスを作成してその表現型を検討する最近の我々の一連の検討の中で、扁平上皮特異的Fli1ノックアウトマウスFli1^{flox/flox};K14Creマウス(以下KcKOマウス)がmildながらも皮膚の線維化および免疫異常を自然発症し、SScの新規病態モデルマウスとして活用できる可能性が示唆された。今回、この新規モデルマウスを用い、皮膚における各種分子の発現をコントロールマウスと比較したところ、本マウスの皮膚においては、TLR4、およびその共受容体として機能するCD14、MD2の発現がコントロールマウスに比較して有意に上昇していることが明らかとなった。さらに、KcKOマウスにおいては抗核抗体の

出現をはじめとしてSScにおける自己免疫の病態の一部を再現することが明らかとなった。SSc免疫異常において重要な役割を果たすとされるサイトカインIL-6の産生について、その主要産生細胞の一種とされるB細胞で観察するため、当マウスおよびコントロールマウスの脾臓からB細胞をMagnetic cell sortingにより単離、無刺激条件およびaCD40抗体刺激下においてex vivo培養し、培養上清中におけるIL-6濃度をELISA法で検討したところ、無刺激条件下、aCD40抗体刺激下、両条件下においてKcKOマウス由来B細胞のIL-6発現が有意に亢進していることが明らかになった。

これらの結果は、Fli1の発現低下を介する新規SScモデルマウスであるKcKOマウスにおける免疫異常の病態と、各種細胞におけるTLR4の発現上昇とそのシグナリングの恒常的活性化が見られるとされるSScの免疫異常の類似点を示すものと考えられ、本研究開始時に想定された、Fli1の発現低下とSScの自然免疫系の異常との関連についての仮説をさらに支持する知見と考えられた。

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6件; 全て査読あり)

Takahashi T, Asano Y, Sugawara K, Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Akamata K, Noda S, Yoshizaki A, Tsuruta D, Trojanowska M, Sato S. Epithelial Fli1 deficiency drives systemic autoimmunity and fibrosis: Possible roles in scleroderma. *J Exp Med*. 2017 Apr 3;214(4):1129-1151. doi: 10.1084/jem.20160247. Epub 2017 Feb 23.

Takahashi T, Asano Y, Taniguchi T, Yoshizaki A, Sato S. Serum LL-37 levels correlate with the efficacy of i.v. cyclophosphamide pulse for skin sclerosis and interstitial lung disease in systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2017 Apr;44(4):468-469. doi: 10.1111/1346-8138.13553.

Takahashi T, Asano Y, Shibata S, Tada Y, Sato S. Serum angiopoietin-2 level as a potential biomarker in psoriasis vulgaris. *J Dermatol*. 2017 Feb;44(2):205-206. doi: 10.1111/1346-8138.13529.

Takahashi T, Asano Y, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Yoshizaki A, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. A potential contribution of antimicrobial peptide LL-37 to tissue fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2016 Dec;175(6):1195-1203. doi: 10.1111/bjd.14699. Epub 2016 Aug 30.

Takahashi T, Asano Y, Hirakawa M, Nakamura K, Saigusa R, Aozasa N, Sumida H, Fujita H, Sugaya M, Ohmori A, Shimizu J, Sato S. Linear scleroderma with prominent multiple lymphadenopathy followed by the development of polymyositis: A case report and review of published work. *J Dermatol.* 2016 Oct;43(10):1224-1227. doi: 10.1111/1346-8138.13424.

Takahashi T, Asano Y, Oka T, Miyagaki T, Tamaki Z, Nonaka S, Sato S. Scleroderma en coup de sabre with recurrent episodes of brain hemorrhage. *J Dermatol.* 2016 Feb;43(2):203-6. doi: 10.1111/1346-8138.13023. Epub 2015 Jul 15.

〔学会発表〕(計 4 件)

遠山聡、高橋岳浩、赤股要、尾松淳、平林 恵、浅野善英、佐藤伸一、小野真太郎、小原 収、今井耕輔 「クリオピリン関連周期熱症候群を合併した抗セントロメア抗体陽性全身性強皮症の1例」 2017年2月11日 第80回日本皮膚科学会東京支部学術大会 パシフィコ横浜 会議センター (神奈川県・横浜市)

中村洸樹、高橋岳浩、中尾桃子、信田りの、荒木麻由子、吉崎歩、鎌田昌洋、浅野善英、大野久美子、立石晶子、門野夕峰、神田浩子、田中栄、山本一彦、佐藤伸一 「PASE/EARP 質問票を用いた関節炎スクリーニングと他科診療連携を通じた関節症性乾癬患者の臨床評価」 2016年9月2日 第31回日本乾癬学会学術大会 ホテル東日本 (栃木県・宇都宮市)

山口慶、高橋岳浩、深澤毅倫、沼尻宏子、吉崎歩、宮垣朝光、浅野善英、佐藤伸一、大塚十里、清水潤 「抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎に合併した急速進行性間質性肺炎の病勢をコントロールし得た一例」 2016年2月20日 第79回日本皮膚科学会東京支部学術大会 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

沼尻宏子、高橋岳浩、山口慶、宮垣朝光、佐藤伸一、中村明博、竹腰知紀 「HLA-A26陽性不全型ベーチェット病の1例」 2015年10月31日 第66回日本皮膚科学会中部支部学術大会 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

高橋岳浩 他、強皮症の基礎と臨床、医薬ジャーナル社 2016、44-51

〔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

高橋 岳浩 (TAKAHASHI, Takehiro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30755690

(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

()