

令和元年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05366

研究課題名(和文) 各種細胞特異的Fli1欠失マウスを用いた全身性強皮症の系統的病態解析

研究課題名(英文) The analysis of systemic sclerosis pathogenesis with mice lacking the Fli1 gene in various cell types

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症の疾病因子の一つである「転写因子Fli1の恒常的発現低下」に着目し、loxP-Creシステムを活用して各種細胞(血管内皮細胞、上皮細胞、B細胞、gamma delta T細胞、制御性T細胞、脂肪細胞、巨核球、骨髄細胞)特異的Fli1欠失マウスを作製し、強皮症の病態が再現できるか否かについて検討した。上記8系統の全てのマウスにおいて、強皮症の主要3病態(免疫異常・炎症、血管障害、線維化)が様々な程度に再現され、特にB細胞および骨髄細胞特異的Fli1欠失マウスでは主要3病態の全てが再現された。以上より、B細胞と骨髄細胞を軸として様々な細胞が強皮症の病態形成に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強皮症にはいまだ確立された治療法はないが、近年、抗IL-6受容体抗体と抗CD20抗体が皮膚硬化と間質性肺疾患の治療に有用であり、さらにM2マクロファージとB細胞の異常活性化がその病態形成において重要であることが示された。本研究では、骨髄細胞およびB細胞特異的Fli1欠失マウスにおいて強皮症の主要3病態が忠実に再現され、特にM2マクロファージとB細胞の異常活性化が重要であることを証明した。以上より、Fli1の発現異常に基づく動物モデルは強皮症の病態解析に有用であること、および8系統のモデルマウスを活用した解析は強皮症の病態解明と治療開発に大きく貢献できる可能性を秘めていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fli1 deficiency is a potential predisposing factor in the development of systemic sclerosis (SSc). To investigate the role of various cell types in the pathogenesis of SSc, we generated mice lacking the Fli1 gene in endothelial cells, epithelial cells, B cells, gamma delta T cells, regulatory T cells, adipocytes, megakaryocytes or myeloid cells by using loxp-Cre system. Of note, all the 8 strains of mice reproduced all or a part of the three cardinal pathological features of SSc, such as autoimmunity/inflammation, vasculopathy and tissue fibrosis. Since B cell- and myeloid cell-specific Fli1 knockout mice strictly recapitulated the three pathological features, these results suggest that B cells and myeloid cells play a central role in the development of SSc and the other cell types contribute to the induction of SSc clinical phenotype.

研究分野：全身性強皮症(自己免疫・炎症、血管障害、線維化)

キーワード：全身性強皮症 動物モデル 自己免疫・炎症 血管障害 線維化 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) は線維化・血管障害・免疫異常を主要 3 病態とする指定難病で、その病態解明と治療開発は医学研究者に課された急務の一つである。申請者は 10 年以上にわたり SSc の研究に携わってきたが、2014 年にその主要 3 病態を忠実に再現する世界初の遺伝子改変マウスの作成に成功した。その研究過程で、「転写因子 *Fli1* の発現低下」が線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージにおいて SSc に特徴的な形質を誘導していることを見出した。これらの知見は、各種細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスを作成することにより、SSc の主要 3 病態における個々の細胞の役割を詳細に検討することが可能であることを示唆している。事実、申請者は既に血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおいて、SSc に特徴的な血管障害を誘導できることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、各種細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの病態解析を行うことにより、「*Fli1* の発現異常に基づく SSc の一元的な病態理解」を確立し、「病態に立脚した SSc の新しい治療戦略」を提案・検証するための基盤を確立することである。

3. 研究の方法

各種細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスの作製

Fli1^{flox/flox} マウス (ボストン大学 Maria Trojanowska 教授より供与) と各種 Cre マウス (*Tie2-Cre* マウス、*K14-Cre* マウス、*Cd19-Cre* マウス、*Adiponectin-Cre* マウス、*Pf4-Cre* マウス、*Tcrd-CreER* マウス [デューク大学 Yuan Zhuang 教授より供与]、*Foxp3-Cre* マウス、*LysM-Cre* マウス) を交配し、各種細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスを 8 系統作製した。実験動物の取り扱いに関しては、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守し、東京大学大学院医学系研究科の動物倫理規定に従い、麻酔や安楽死などを含め適切に施行した。

線維化の評価

8-12 週齢のマウスの皮膚・肺・食道について、HE 染色および Masson-Trichrome 染色で組織学的に線維化の有無を評価した。また、皮膚・肺・食道から mRNA を抽出し、quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) にて線維化関連遺伝子の発現を調べた。

血管障害の評価

8-12 週齢のマウスの尾静脈から FITC-dextran を注射し、皮膚組織における小血管の構造異常について評価した。また、同じ条件で尾静脈から Evans blue 色素を注射し、皮膚における色素漏出の程度から血管透過性を評価した。

免疫異常の評価

8-12 週齢のマウスの皮膚・肺について、Th1, Th2, Th17, Treg 関連サイトカインの mRNA の発現量を (qRT-PCR) にて評価した。また、脾臓からリンパ球を採取し、T 細胞と B 細胞の細胞表面マーカーやサイトカイン産生能について、Flow Cytometry で評価した。

4. 研究成果

血管内皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1^{EckO}* マウス, *Fli1^{flox/flox}; Tie2-Cre*) の病態解析

先行研究において、*Fli1^{EckO}* マウスは SSc の血管障害に特徴的な細動脈狭窄を再現することが明らかとなっていた。このモデルがヒトの SSc の病態を反映し、薬効評価にも適しているか否かについて、ヒトの SSc で血管障害に対する疾患修飾作用を示す 2 つの薬剤 (ボセンタンとシクロホスファミド) について検討した。背部皮膚において血管の構造異常を FITC-dextran で可視化して評価したところ、これら 2 つの薬剤を投与することにより細動脈狭窄は有意に改善した。その機序として、これらの 2 つの薬剤は血管内皮細胞における *Fli1* の発現を回復させる効果があることが明らかとなった。ボセンタンについてはヒトの SSc においても、投与後に血管内皮細胞において *Fli1* の発現が回復することが確認され、このモデルは薬効評価にも有用であることが示唆された。

表皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1^{KcKO}* マウス, *Fli1^{flox/flox}; K14-Cre*) の病態解析

Fli1^{KcKO} マウスの表皮細胞では、IL-1 α , CCN2, K6, K16 の発現が亢進しており、SSc の表皮細胞の形質が忠実に再現された。また、*Fli1^{KcKO}* マウスは自然経過で皮膚硬化と食道の線維化を発症し、その機序には表皮細胞の活性化が関与していることが明らかとなった。さらに、*Fli1^{KcKO}* マウスでは胸腺髄質上皮細胞において Aire の発現が低下し、中枢性免疫寛容が破綻し、その結果として自己免疫性間質性肺疾患を自然発症することが明らかとなった。以上の結果から、SSc の臓器選択性 (皮膚 100%, 食道 70%, 肺 30%) と自己免疫の起源に表皮細胞の形質変化が深く関与していることが示唆された。

B 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1^{BcKO}* マウス, *Fli1^{flox/flox}; Cd19-Cre*) の病態解析

Fli1^{BcKO} マウスから単離した脾臓 B 細胞では、Cd22 の発現が低下し、BAFF 受容体の発現が亢進していた。また、IL-6 産生が亢進していた。*Fli1^{BcKO}* マウスは皮膚と肺の線維化を自然発症し、また SSc に類似した血管障害、および自己抗体産生がみられた。以上より、*Fli1^{BcKO}* マウスでは SSc の主要 3 病態がすべて再現できることが明らかとなった。

その他のマウス

脂肪細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1^{AdipoKO}* マウス, *Fli1^{flox/flox}; Adiponectin-Cre*) では、

SSc に類似した皮膚硬化と血管障害が自然発症すること、その過程には adipocyte-to-myofibroblast transdifferentiation が関与していることが明らかとなった。巨核球特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* Pck0 マウス、*Fli1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}; *Pf4*-Cre) では、モノクローリンを投与することにより SSc に類似した皮膚線維化が誘導できることが明らかとなった。 $\gamma\delta$ T 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* $\gamma\delta$ TcK0 マウス、*Fli1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}; *Tcrd*-CreER) と制御性 T 細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* TregK0 マウス、*Fli1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}; *Foxp3*-Cre) では、野生型マウスに比してプレオマイシン誘発皮膚硬化が増強し、その過程に IL-17 の産生亢進が関与していることが明らかとなった。骨髄系細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* McK0 マウス、*Fli1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}; *LysM*-Cre) では、SSc に類似した皮膚硬化と血管障害が自然発症し、さらに自己抗体産生がみられること、その過程には M2 マクロファージの活性化が関与していることが明らかとなった。

以上の検討結果より、本研究課題の目標であった 8 系統 (血管内皮細胞、表皮細胞、B 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、制御性 T 細胞、脂肪細胞、巨核球、骨髄細胞) の各種細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスにおける SSc の主要 3 病態の誘導について、詳細に明らかにすることができた。特に重要な点として、B 細胞および骨髄系細胞特異的 *Fli1* 欠失マウスでは SSc の主要 3 病態の全てが再現された点が挙げられる。このことは、SSc の病態形成において、B 細胞と骨髄系細胞が軸となっており、その他の細胞が様々な程度に病態を修飾していることを示唆している。SSc に対して抗 CD20 抗体および抗 IL-6 受容体抗体が、それぞれ B 細胞除去と M2 マクロファージの機能抑制を介して疾患修飾作用を示すことが知られているが、この 2 種類の細胞が SSc の病態形成において重要であることが本研究によって動物モデルでも証明された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yamashita T, Asano Y, Saigusa R, Taniguchi T, Hirabayashi M, Miyagawa T, Nakamura K, Miura S, Yoshizaki A, Trojanowska M, Sato S. Cyclophosphamide Pulse Therapy Normalizes Vascular Abnormalities in a Mouse Model of Systemic Sclerosis Vasculopathy. *J Invest Dermatol*. 2019;139(5):1150-1160.

2. Saigusa R, Asano Y, Yamashita T, Takahashi T, Nakamura K, Miura S, Ichimura Y, Toyama T, Taniguchi T, Sumida H, Tamaki Z, Miyazaki M, Yoshizaki A, Sato S. Systemic sclerosis complicated with localized scleroderma-like lesions induced by Köbner phenomenon. *J Dermatol Sci*. 2018;89(3):282-289.

3. Toyama T, Asano Y, Miyagawa T, Nakamura K, Hirabayashi M, Yamashita T, Saigusa R, Miura S, Ichimura Y, Takahashi T, Taniguchi T, Yoshizaki A, Sato S. The impact of transcription factor Fli1 deficiency on the regulation of angiogenesis. *Exp Dermatol*. 2017;26(10):912-918.

4. 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;214(4):1129-1151.

5. Saigusa R, Asano Y, Nakamura K, Hirabayashi M, Miura S, Yamashita T, Taniguchi T, Ichimura Y, Takahashi T, Yoshizaki A, Miyagaki T, Sugaya M, Sato S. Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts Suppress Th1 Cytokine Production via Galectin-9 Overproduction due to Fli1 Deficiency. *J Invest Dermatol*. 2017;137(9):1850-1859.

6. 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*. 2017;44(8):1198-1205.

7. Taniguchi T, Miyagawa T, Tamaki Z, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Yoshizaki A, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S, Asano Y. A possible implication of reduced levels of LIF, LIFR, and gp130 in vasculopathy related to systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 2017;309(10):833-842.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Asano Y. A road from basic research to clinical trials - to meet patients' DesiReS -. International Investigative Dermatology 2018 (招待講演)(国際学会) 2018 年

2. Asano Y. Skin research provides a window into new aspects of systemic disease

pathogenesis. International Investigative Dermatology 2018 (招待講演)(国際学会) 2018年

3. Asano Y. A new murine model of PAH associated with SSc - a potential tool to investigate the pathogenesis of this clinical entity. The 22nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society (招待講演) 2018年

4. Asano Y. A new murine model of systemic sclerosis; Klf5+/-;Fli1+/- mice. The 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (招待講演)(国際学会) 2018年

5. Asano Y. Skin research provides a window into new aspects of systemic disease pathogenesis. 1st Joint Symposium of Department of Dermatology, Seoul National University and The University of Tokyo (招待講演)(国際学会) 2018年

6. Asano Y. Fli1-deficient B cells contribute to the development of tissue fibrosis, vasculopathy, and immune abnormalities characteristic of systemic sclerosis. 15th International Workshop on Scleroderma Research (招待講演)(国際学会) 2017年

7. Taniguchi T, Asano Y., Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Yoshizaki A, Sato S. Fli1 deficiency potentially regulates M2 macrophage / B cell axis in systemic sclerosis. The 42nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (国際学会) 2017年

8. Taniguchi T, Asano Y., Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Ichimura Y, Takahashi T, Toyama T, Yoshizaki A, Sato S. Fli1 deficiency promotes CXCL13 expression from macrophages, contributing to the development of systemic sclerosis. 47th Annual ESDR Meeting 2017 (国際学会) 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : Maria Trojanowska

ローマ字氏名 : Maria Trojanowska

研究協力者氏名 : Yuan Zhuang

ローマ字氏名 : Yuan Zhuang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。