

平成 30 年 6 月 5 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：2016～2017

課題番号：16H06754

研究課題名(和文)新規SScモデルマウスと新規SLEモデルマウスを用いた重複症候群の病態解析

研究課題名(英文)A new murine model of SSc/SLE overlap syndrome

研究代表者

赤股 要 (Akamata, Kaname)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00779788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症と全身性エリテマトーデスの重複症候群では、ループス腎炎の頻度が低く、漿膜炎の頻度が高くなることが知られている。本研究では、新規強皮症モデルマウス(Klf5+/-;Fli1+/-マウス)を用いてイミキモド誘発性SLEモデルマウスを作製し、両疾患の病態干渉の分子メカニズムを解析することを目的として立案された。追加解析により、新規強皮症モデルマウスでは皮膚硬化・間質性肺疾患のほか、心線維化と消化管蠕動運動障害を発症すること、腎臓の線維化を発症しないことが明らかとなっているが、この事実を踏まえ、現在イミキモド誘発SLEモデルを作製し、病態干渉の分子メカニズムについて解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc)/ systemic lupus erythematosus (SLE) overlap syndrome is characterized by the low frequency of lupus nephritis and the high frequency of serositis, but the molecular mechanism underlying this observation has still remained unknown. To investigate the molecular mechanism regulating the pathological interference between SSc and SLE, we decided to generate a new overlap syndrome animal model, namely, Klf5+/-;Fli1+/- mice treated with imiquimod, in which double heterozygous loss of KLF5 and Fli1 induces SSc symptoms and imiquimod administration induces lupus symptoms. At the time of writing, we have demonstrated that Klf5+/-; Fli1+/- mice develop cardiac and intestinal symptoms similar to those of SSc without renal involvement. Now, we are investigating whether imiquimod-induced lupus symptoms are modified in Klf5+/-;Fli1+/- mice. The histological analysis of the skin, lung, heart, kidney, esophagus, and intestine is now on going.

研究分野：膠原病、特に全身性強皮症

キーワード：全身性強皮症 全身性エリテマトーデス 動物モデル Fli1 KLF5

1. 研究開始当初の背景

①研究の学術的背景

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) 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。その病因ははまだ不明であるが、最近我々は本症の主要3病態 (免疫異常・血管障害・線維化) を自然発症する世界初の遺伝子改変マウス (*Klf5^{+/+};Fli1^{+/+}* マウス) の確立に成功した。SSc 皮膚線維芽細胞において epigenetic な機序を介して発現が低下している2つの遺伝子 (*KLF5* と *FLI1*) を二重ヘテロ欠損させたマウスである。SSc の病態形成においては環境要因が重要であり、遺伝要因はその重症度を規定することが双生児研究の結果から示唆されているが、その概念を支持する点からも SSc の病態を考える上で非常に重要なモデルマウスである。現在、新規 SSc モデルマウスを用いて様々な観点から SSc の病態解析を行っているが、今まで明らかにされてこなかった様々な新しい知見が得られている。

一方、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) についても、2014年に比較的簡便な方法で作製できる新規モデルマウスが報告された。イミキモド (TLR7 と TLR9 のリガンド) 含有クリームを耳に外用することにより、TLR7 依存性に SLE に類似した内臓病変 (ループス腎炎、心膜炎)、皮膚炎、光線過敏症、血清学的異常を発症するモデルマウスである。同モデルの利点は、マウスの遺伝的背景の違いに関わらず比較的短期間で高度に SLE の病態を模倣したモデルが作成できる点である。

SSc は様々な膠原病を合併するが (オーバーラップ症候群)、そのような症例では両疾患の病態が干渉しあい、典型的な SSc とはやや異なる臨床症状を呈する。事実、SSc と SLE の病態干渉が想定される混合性結合組織病では、SLE に比較すると腎炎の合併は少なく、SSc に比較すると重篤な間質性肺疾患の合併は少ない。オーバーラップ症候群の病態を理解するうえで病態干渉は非常に重要な概念であるが、その詳細な分子メカニズムについてこれまで検討されてこなかった。その主要な要因の一つとして、容易に作成できるオーバーラップ症候群のモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。

前述の通り、2014年に新規 SSc モデルマウスと新規 SLE モデルマウスが確立された。この2つのモデルを組み合わせれば、SSc と SLE の病態干渉について検討が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規 SSc モデルマウスと新規 SLE モデルマウスを用いて、それぞれの病態が干渉する分子メカニズムを明らかにし、SSc, SLE, および SSc/SLE オーバーラップ症候群の治療戦略へとつながる病態理解を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

Klf5^{+/+} マウスは自治医科大学の永井良三先生から供与を受けた。*Fli1^{+/+}* マウスは Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生から供与を受けた。両マウスを交配し、*Klf5^{+/+};Fli1^{+/+}* マウスを作製した。SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスは、*Klf5^{+/+};Fli1^{+/+}* マウスの耳にイミキモド含有クリームを週に1回、合計3回外用することにより作製し、最終外用日から1週間後のマウスを解析に用いた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

(2) 組織学的評価

Klf5^{+/+};Fli1^{+/+} マウスの心臓、腎臓、大腸のパラフィン切片を作成し、H&E 染色と Masson-Trichrome 染色を行った。SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスの皮膚、肺、心臓、腎臓、食道、下部消化管、肝臓のパラフィン切片を作製し、H&E 染色と Masson-Trichrome 染色を行った。

(3) 免疫染色

上記の各臓器のパラフィン切片を用いて、VEVTR M.O.M Immunodetection Kit (Vector laboratories) の製品マニュアルにしたがって、抗 α -smooth muscle actin (α -SMA) 抗体 (Sigma-Aldrich) と反応させた後、DAB (0.2mg/ml, DOJINDO LABORATORIES) で発色させた。大腸については、抗 SMemb 抗体を用いた染色も行った。

(4) TUNEL 染色

肺および心臓のパラフィン切片を用いて、In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) の製品マニュアルにしたがって、TUNEL 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(5) 各種遺伝子の mRNA の発現量の検討

マウスの背部皮膚から RNeasy min kit (Qiagen) を用いて Total RNA を作成した。作成した Total RNA より RverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO LIFE SCIENCE) を用いて complementary DNA を作成した。Realtime quantitative PCR は SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) と ABI Prism 7000 system (Life Technologies) を用いて測定を行った。各々の mRNA 量は *Gapdh* mRNA を用いて補正した。

(6) Intracellular cytokine staining

SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスの両側鼠径リンパ節と脾臓を摘出した。リンパ節はすり潰してリンパ球を分離した。脾臓から取り出した血球は、RBC lysis buffer (0.0017M Trizma, Sigma-Aldrich, 0.1M NH₄Cl 2.675g, Sigma-Aldrich) を添加してリンパ球を分離した。リンパ球は抗 CD3 抗体 (17A2), 抗 CD4 抗体 (RM4-5), 抗 CD8 抗体 (53-6.7) を用いて表面抗原の染色を行った。また 10 ng/ml phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich), 1 g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), 1 g/ml brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) で4時間刺激を行い、抗 IL-4 抗体 (11B11,

BioLegend), 抗 IL-17A 抗体 (TC11-18HC0.1, BioLegend), 抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2, BioLegend) を用いて、細胞内抗原の染色を行った。染色されたリンパ球を FACS Verseflow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析した。

(7) 血尿・蛋白尿の評価

マウスを背側から保定し、下腹部を尿道口に向けてゆっくりと圧迫摩擦して尿を採取した。採取した尿に試験紙を浸し、血尿および蛋白尿の程度を評価した。

(8) 血管の構造的評価

マウスの尾静脈から FITC-dextran (2000 kDa, 20 mg/ml in PBS) を 200 μ l 注射し、5 分後にマウスを安楽死させた。背部皮膚を剥離し、蛍光顕微鏡下で真皮と脂肪組織境界部の血管構造を観察した。

(9) 血管の透過性の評価

マウスの尾静脈から Evans blue 色素 (0.5% in PBS) を 200 μ l 注射し、30 分後にマウスを安楽死させた。腹側皮膚を剥離し色素の漏出を肉眼的に確認した。Evans blue 色素の定量化は、血管を避けるように 4mm パンチで皮膚を 3 箇所採取し、formamide (150 μ l) で溶解させた後、620nm の蛍光波長で観察した。

(10) 統計学的解析

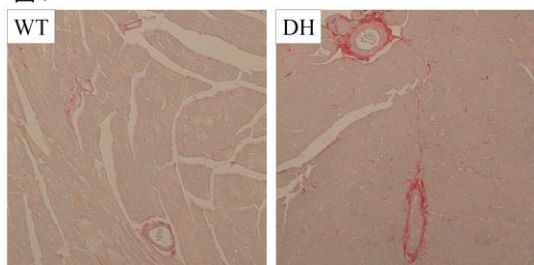
2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。多群間の比較には分散分析法 (ANOVA) と Bonferroni post hoc test を用いた。P<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの心病変の評価

SSc/SLE オーバーラップ症候群では漿膜炎の頻度が高くなることが知られている。そこで、まず *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの心病変について評価を行った。H&E 染色および Masson-Trichrome 染色を行ったところ、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスでは野生型マウスに比してびまん性に線維化が生じており、特に血管周囲において線維化が強く生じていた (図 1)。

図1



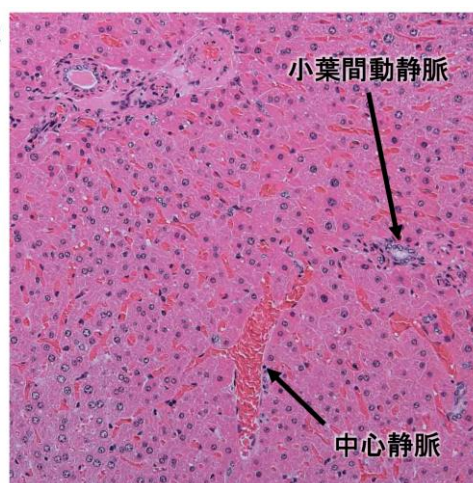
SSc の心臓では、アポトーシスによって毛細血管数が減少し、組織が低酸素化に陥ることによって線維化が進むと考えられている。そこで TUNEL 染色を行ったところ、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの心臓の毛細血管では TUNEL 陽性細胞が観察されたが、野生型マウスの心臓の毛細血管では TUNEL 陽性細胞

は見られなかった。以上の結果から、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスでは SSc と同様に、毛細血管にアポトーシスが生じ、組織が低酸素化に陥ることにより線維化が生じていることが示唆された。

(2) *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの肝臓の評価

SSc では肝臓は線維化から守られているが、SLE ではしばしば自己免疫性肝炎を合併する。そこで、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの肝臓について評価を行った。Masson-Trichrome 染色では *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスと野生型マウスで大きな差はなく、肝線維化は生じていないことが示された。一方、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスでは中心静脈にうっ血が顕著に認められた (図 2)。この事実から、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスでは心線維化により右心の拡張障害が生じ、肝うっ血が生じていることが示唆された。

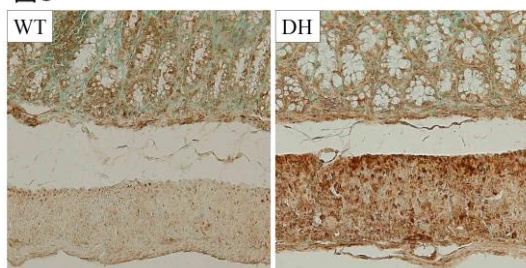
図2



(3) *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの大腸の評価

SSc では大腸の蠕動運動障害がしばしば認められる。そこで、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの大腸平滑筋の形質について評価するため、SMemb の発現量について免疫染色で検討した。野生型マウスの大腸平滑筋では SMemb の発現は低下しており、contractile phenotype を呈していたが、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの大腸平滑筋では SMemb の発現は亢進しており、synthetic phenotype を呈していた (図 3)。以上の結果から、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスの大腸では線維化と蠕動能低下が生じている可能性が示唆された。事実、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+}マウスでは野生型マウスに比して、1 日当たりの便数の減少が認められた。

図3



(4) *Klf5^{+/-};Flil^{+/-}*マウスの腎臓の評価

*Klf5^{+/-};Flil^{+/-}*マウスの腎組織について H&E 染色と Masson-Trichrome 染色で評価を行ったが、野生型マウスと比較して違いは明確ではなかった。なお、*Klf5^{+/-};Flil^{+/-}*マウスでは細動脈の狭窄がわずかに散見された。

(5) SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスの解析

上記の検討により、既報告と合わせて *Klf5^{+/-};Flil^{+/-}*マウスの皮膚、肺、心臓、腎臓、肝臓、食道、大腸の病変に関する情報が揃ったので、次に SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスの解析を進めることとした。野生型マウス、SLE モデルマウス、*Klf5^{+/-};Flil^{+/-}*マウス、SSc/SLE オーバーラップ症候群モデルマウスの4群で、上記の臓器病変、および B 細胞と T 細胞の解析、尿所見の解析を進めている。予備実験においてヒトの SSc/SLE オーバーラップ症候群と類似した変化が生じる可能性が示唆されているが、現在検体数を増やして統計解析で有意な変化かどうか解析を進めている段階である。今後、臓器病変の変化から病態干渉のメカニズムに関する作業仮説を立て、*in vitro* において細胞レベルで解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤股 要 (Akamata, Kaname)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00779788