

平成23年6月2日現在

期間番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791063
 研究課題名（和文）汎発性強皮症の皮膚線維化及び血管障害における Fli1 遺伝子恒常的発現低下の意義
 研究課題名（英文）The significance of constitutive downregulation of Fli1 gene expression in the pathogenesis of dermal fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis
 研究代表者
 浅野 善英 (ASANO YOSHIHIDE)
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：60313029

研究成果の概要（和文）：汎発性強皮症の病態において、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下は線維芽細胞および血管内皮細胞の恒常的な活性化を誘導し、本症の病態生理に深く関与している。今回の我々の研究により、強皮症患者の指尖潰瘍の発症を予防する効果のあるエンドセリン受容体拮抗薬の作用点の一つが転写因子 Fli1 である可能性、および強皮症患者における創傷治癒異常に転写因子 Fli1 の発現異常が関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Previous reports demonstrated that constitutive downregulation of Fli1 gene largely contributes to the activation of dermal fibroblasts and dermal microvascular endothelial cells in systemic sclerosis, leading to the development of dermal fibrosis and vasculopathy in this disease. Our current study revealed that one of the possible targets by which endothelin receptor antagonist prevents the development of new digital ulcers in SSc is transcription factor Fli1 and that constitutive downregulation of this transcription factor is associated with the delayed wound healing in this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：膠原病、強皮症、線維化、血管障害

1. 研究開始当初の背景

汎発性強皮症 (SSc) は皮膚及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。その病態はいまだ不明であるが、我々の研究により、転写因子 Fli1

の恒常的な発現低下が本症における皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞の恒常的な活性化に関与している可能性が動物モデルを用いた実験により明らかにされていた。しかしながら、転写因子 Fli1 が治療の標的とな

るか否かについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子 Fli1 の発現異常が、皮膚線維芽細胞と皮膚血管内皮細胞の恒常的な活性化を引き起こす機序の更なる検討と、同転写因子を標的とした治療法の可能性について検討することを目的としている。

3. 研究の方法

①エンドセリン(ET)が線維芽細胞を恒常的に活性化する機序の解明

過去の研究により、ETは Smad3 のリン酸化に影響を及ぼすことなく、COL1A2 遺伝子の発現を亢進させることが報告されている。したがって、ETは転写抑制因子を不活性化することによって線維化作用を示している可能性がある。そこで、COL1A2 遺伝子プロモーター/CAT construct の sequential deletion を用いて ET に対する responsive element を決め、Fli1 の関与の有無について検討を行った。

②ETがFli1のリン酸化に及ぼす影響の検討

これまでの我々の研究によって、Fli1 の転写活性は threonine 312 のリン酸化によって制御されていることが明らかにされている。したがって、ETがFli1を threonine 312 でリン酸化するか否かを、抗リン酸化 Fli1 抗体(threonine 312 でリン酸化された Fli1 を特異的に検出する抗体)を用いて免疫ブロット法で検討を行った。

③Fli1の発現低下が血管内皮細胞を恒常的に活性化する機序の解明

5-8 週齢の Fli1 +/- マウスと野生型マウスの耳から皮膚血管内皮細胞(mouse dermal microvascular endothelial cell:MDMEC)を単離し、同細胞において血管新生に関与している遺伝子の発現量を real-time PCR で検討した。

④血管内皮細胞特異的 Fli1 欠失(Fli1 ECKO)マウスにおける創傷治癒異常の検討

我々のこれまでの研究によって、Fli1 ECKO マウスでは強皮症に伴う血管障害の病理組織学的な特徴(毛細血管拡張・細動脈の狭窄・血管透過性の亢進)を再現できることが示されている。同マウスを用いて、創傷治癒遅延の有無およびその機序について検討を行う。創傷治癒については、Fli1 ECKO マウスおよび野生型マウスの背部に直径 6mm の皮膚全層性の潰瘍を作成して、その治癒の過程を比較する。機序については、マウスの尾静脈から FITC-dextran を注入し、創傷痕における新生血管の数を蛍光顕微鏡下で検討する。

4. 研究成果

①エンドセリン(ET)が線維芽細胞を恒常的に活性化する機序の解明

Sequential deletion を用いた CAT promoter assay によって、エンドセリンに対する COL1A2 遺伝子プロモーターの responsive element は-353~-264 の間に存在することが示された(図1)。

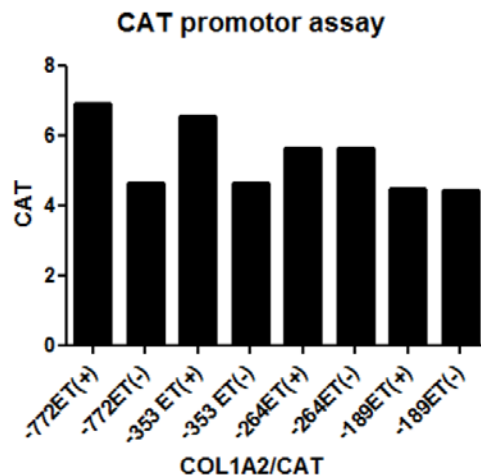


図1. CAT promoter assay

過去の検討によって、-353~-264 の領域は転写因子 Fli1 の結合部位(-285~-282)を含むことが示されている(図2)。したがって、この結果は ET が Fli1 を不活性化して線維化作用を発揮していることを示唆している。

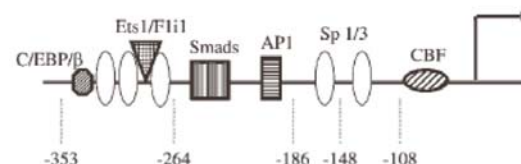
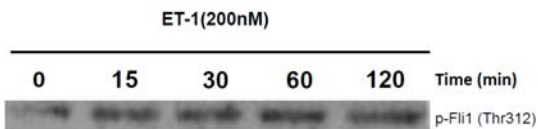


図2. COL1A2 promoter 領域における転写因子の結合部位

②ETがFli1のリン酸化に及ぼす影響の検討
正常皮膚線維芽細胞を ET で刺激し、抗リン酸化 Fli1 抗体を用いて Fli1 のリン酸化の程度を検討したところ、図3に示すように ET 刺激によって Fli1 は速やかに threonine 312 でリン酸化された。

図3. ET 刺激が Fli1 のリン酸化に及ぼす影響



以上の結果から、ETの強力な線維化作用の分子メカニズムの一つとして、ETはFli1を速やかに threonine 312 でリン酸化して、その転写因子としての活性を阻害していることが示された。

③Fli1の発現低下が血管内皮細胞を恒常的に活性化する機序の解明

Fli1 +/- マウスおよび野生型マウス由来のMDMECを用いて、血管新生に関与している遺伝子(PDGF-B, S1P1, N-Cadherin, VE-Cadherin, PECAM-1, MMP-2, MMP-9)の発現について real-time PCR で検討を行った。表1に示すように、Fli1 +/-マウス由来のMDMECでは、血管内皮細胞同士の相互作用に関与する遺伝子(PECAM-1, VE-Cadherin)の発現および血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用に関与する遺伝子(PDGF-B, S1P1, N-Cadherin)の発現は減少しており、一方で血管基底膜の分解に関与する遺伝子(MMP-9)の発現は亢進していた。

表1. Fli1 +/-マウスにおける血管新生関連遺伝子の発現量

Gene	MDMEC (Fli1 ^{+/-} /wild-type)
<i>Fli1</i>	45.5 ± 13.7*
<i>VE-cadherin</i>	63.8 ± 11.6*
<i>PECAM1</i>	59.2 ± 7.3*
<i>COL4A1</i>	91 ± 6.8
<i>MMP-2</i>	99.6 ± 2.1
<i>MMP-9</i>	195.3 ± 27.1*
<i>PDGFB</i>	43.5 ± 1.8*
<i>S1P₁</i>	58.2 ± 6.6*
<i>N-cadherin</i>	137.0 ± 23.7
<i>Tie2</i>	63.6 ± 9.7*

*P < 0.05.

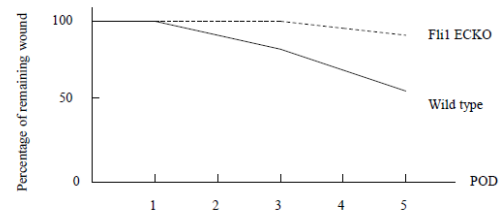
血管内皮細胞同士の相互作用の減弱、血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用の減弱、および血管基底膜の分解の亢進は、血管新生の導入のステップとして非常に重要である。したがって、以上の結果はFli1の恒常的な発現低下が血管新生を恒常的に活性化している可能性を示している。

④血管内皮細胞特異的Fli1欠失(Fli1 ECKO)マウスにおける創傷治癒異常の検討

Fli1 ECKOマウスと野生型マウスを用いて、

創傷治癒を比較したところ、Fli1 ECKOマウスでは著明に創傷治癒が遅延していた(図4)。

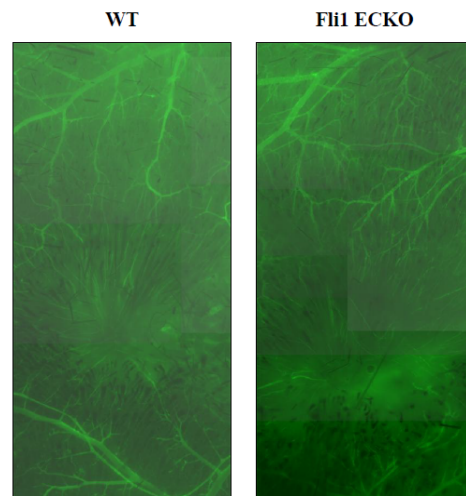
図4. Fli1 ECKOマウスと野生型マウスの創傷治癒の比較



次に、FITC-dextranを創傷作成後14日目のマウスに静注し、創傷瘢痕における血管構造の比較を行った。図5に示すように、Fli1 ECKOマウスでは創傷瘢痕における血管の数が著明に減少していた。

図5. Fli1 ECKOマウスと野生型マウスにおける新生血管の比較

FITC dextran injection experiment (Day 14)



以上の結果から、Fli1 ECKOマウスでは血管新生が恒常的に活性化されているために血管が成熟する機序に異常を来し、結果的に未熟な血管が形成されるために創傷治癒が遅延するものと考えられた。

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 3 件)

- ①Bujor AM, Asano Y, Haines P, Lafyatis R, Trojanowska M. The c-abl tyrosine kinase controls PKC-delta induced Flil phosphorylation in human dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 査読有 in press
- ②Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Flil deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. J Dermatol Sci. 査読有 59, 2010, 153-162.
- ③Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Endothelial Flil deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. Am J Pathol. 査読有 176, 2010, 1983-1998.

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ①Yoshihide Asano. The impact of transcription factor Flil on the regulation of angiogenesis. Japanese Society for Investigative Dermatology.
和歌山、2010.12.3-5
- ②Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Endothelial Flil deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. Japanese Society for Investigative Dermatology.
福岡、2009.12.4-6

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 善英 (ASANO YOSHIHIDE)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60313029

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者