

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791256

研究課題名（和文）全身性強皮症に伴う血管障害の発症機序におけるエンドセリンの意義

研究課題名（英文）The role of endothelin in the pathogenesis of vasculopathy associated with 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）：全身性強皮症は血管障害および皮膚と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。その病態は未だ不明であるが、近年その線維化と血管障害の病態においてエンドセリンが重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。我々はこれまでに、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が強皮症の線維化と血管障害の病態に密接に関与していること、およびエンドセリン受容体拮抗薬が Fli1 の転写活性を増強することによって強皮症皮膚線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すことを明らかにしてきた。本研究では、強皮症血管障害モデルマウスを用いて検討を行い、エンドセリン受容体拮抗薬は転写因子 Fli1 の転写活性を増強することによって強皮症の血管障害を改善し、その臨床効果を示している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem autoimmune disease characterized by initial vascular injuries and resultant fibrosis of skin and certain internal organs. Although the pathogenesis of SSc still remains unknown, recent studies have demonstrated that endothelins play a crucial role in the development of vasculopathy and fibrosis associated with SSc. Consistently, we recently showed that Fli1 deficiency is closely linked to the activation of fibroblasts and endothelial cells in SSc and a dual endothelin receptor antagonist, bosentan, reverses the pro-fibrotic phenotype of SSc dermal fibroblasts by increasing the transcriptional activity of Fli1. Based on these findings, we herein investigated the impact of bosentan on SSc vasculopathy using endothelia cell-specific Fli1 knockout mice, which mimic the morphological and functional abnormalities of SSc vasculopathy. A series of studies revealed that bosentan reverses Fli1 deficiency-dependent vasculopathy in these mice by increasing transcriptional activity of Fli1, suggesting that a similar mechanism potentially underpins the clinical efficacy of bosentan for SSc vasculopathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

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：全身性強皮症、血管障害、Fli1、エンドセリン、ボセンタン

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(systemic sclerosis; SSc)は血管障害と皮膚および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、近年、エンドセリン(ET)が本症の線維化と血管障害の病態に深く関与している可能性が示唆されている。欧米で行われた2つの良質な無作為化二重盲検試験では、ボセンタン(ET受容体拮抗薬)はSScに伴う指尖潰瘍の新生を有意に抑制する効果があることが明らかにされた。一方、最近我々は、ボセンタン投与中のSSc患者において、手指のチアノーゼが著明に改善するとともに、画像評価において尺骨動脈の狭窄の改善を確認し得た症例を報告した。ボセンタンは培養強皮症肺線維芽細胞に対して強力な抗線維化作用を示すことを鑑みると、これらの臨床データは、ボセンタンは血管拡張作用を示すとともに血管の線維化を改善させることにより末梢血流を改善させ、指尖潰瘍の新生を抑制している可能性を示唆している。

一方、我々はこれまでに、転写因子Fli1の恒常的な発現低下がSSc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を明らかにしてきた。Fli1の恒常的な発現低下は、線維芽細胞においてはI型コラーゲンをはじめとした細胞外基質の発現を亢進させて線維化を誘導するが、血管内皮細胞においては血管新生を恒常的に活性化させる作用を示す。SSc患者では血管新生が恒常的に活性化していることが知られているが、実際に血管内皮細胞特異的Fli1欠失(Fli1 ECKO)マウスを作成すると、SScに特徴的な血管障害の病理組織学的変化(毛細血管の拡張、細動脈の狭窄)および血管の機能異常(血管透過性の亢進)を再現できる。

メシル酸イマチニブおよびボセンタンは、SScの線維化と血管障害の両方に対して有用性が期待されている薬剤である。最近我々は、SScにおいてメシル酸イマチニブの標的となる分子の一つがFli1であることを報告したが、一方、強皮症皮膚線維芽細胞を用いた予備実験によってボセンタンの標的となる分子もFli1である可能性を見出した。以上の結果は、疾患修飾薬として作用する可能性のある2つの薬剤が共通してFli1の転写活性を変化させることによりその臨床効果を発揮している可能性を示唆している。前述の通り、Fli1の発現異常がSScの血管障害の病態に深く関与していることを鑑みると、ボセンタンはSScの血管障害に対してもFli1を介して臨床効果を発揮している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子Fli1に注目して検討を行い、エンドセリン受容体拮抗薬がSScの血管障害を改善する機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および試薬

ヒト皮膚微小血管内皮細胞(human dermal microvascular endothelial cells: HDMECs)はタカラバイオ株式会社より購入した。ボセンタンはアクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社より供与を受けた。

(2) 免疫ブロット法

HDMECsからwhole cell lysateを作成し、各15 μ gの検体を10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を一次抗体と反応させた後、horseradish peroxidaseと結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescenceで発光させ、X-rayフィルムに感光させた。

(3) 血管内皮細胞特異的Fli1欠失(Fli1 ECKO)マウス、Fli1^{+/+}マウス

Fli1^{flox/flox}マウス、Fli1^{+/+}マウスはボストン大学のProf. Maria Trojanowskaから供与を受けた。Fli1^{flox/flox}マウスとTie2-Creマウスを交配し、Fli1^{flox/flox};Tie2-Cre(+)マウス(Fli1 ECKOマウス)を作成した。同マウスでは皮膚血管内皮細胞におけるFli1遺伝子のmRNAの発現量は野生型マウス由来の皮膚血管内皮細胞と比較して約20-50%に減少していた。

(4) 免疫染色

Vector社のvectastain ABC kitを使用した。一次抗体はFli1 (BD Bioscience), α -smooth muscle actin (α -SMA) (Biomarker)を使用した。

(5) Evans blue injection

8週齢の野生型マウスあるいはFli1 ECKOマウスに、ボセンタンあるいは蒸留水を4週間連日腹腔内投与した。その後、尾静脈からEvans blue色素を注射し、30分後に安楽死させ、皮膚における色素の漏出の程度について検討した。

(6) FITC-dextran injection

8週齢の野生型マウスあるいはFli1 ECKOマウスに、ボセンタンあるいは蒸留水を4週間連日腹腔内投与した。その後、尾静脈からFITC-dextranを注射し、5分後にマウスを

安楽死させた。創部周囲の皮膚を剥離し、蛍光顕微鏡下で真皮と脂肪組織の境界部の血管構造を観察した。

(7) Wound healing experiment

雄、月齢 3 カ月の野生型マウス(C57BL/6) および Fli1 ECKO マウスの背部に直径 8mm の full-thickness skin punch wound を 2 つ 作成し、創傷治癒の過程を観察した。

(8) 統計学的解析

統計的な解析には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

なお、実験動物の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。マウスの取扱いは、苦痛を最小限とするため、麻酔、安楽死などを適切に施行した。

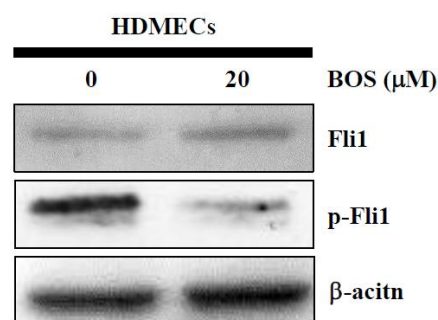
4. 研究成果

(1) HDMECs において、ET 受容体拮抗薬は転写因子 Fli1 のリン酸化を抑制する

我々は本研究課題と並行して、ET が正常皮膚線維芽細胞および強皮症皮膚線維芽細胞に及ぼす影響について検討を行い、以下の知見を得た。①正常皮膚線維芽細胞において、エンドセリン-1(ET-1)刺激は I 型コラーゲンの発現を亢進させる、②正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激に対する COL1A2 遺伝子プロモーターの responsive element は -353 ~ -264 の領域に存在する、③正常皮膚線維芽細胞において、ET-1 刺激は転写因子 Fli1 のリン酸化を誘導し、その DNA 結合能を抑制する、④強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは Fli1 の DNA 結合能を亢進させることにより I 型コラーゲンの発現を抑制する。以上の結果をもとに、HDMECs においても ET-1 が Fli1 の転写活性に影響を及ぼしている可能性について検討を行った。ET-1 は血管の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たしており、HDMECs により恒常的に産生されている。したがって、HDMECs において ET-1 が Fli1 におよぼす影響について評価するため、ボセンタンによる autocrine ET-1 の阻害が Fli1 に及ぼす影響について検討を行った。図 1 に示すように、ボセンタンで処理することにより Fli1 のリン酸化は抑制された。一方、ボセンタンは Fli1 の蛋白量を増加させた。我々の過去の研究により、Fli1 は DNA 結合能を失うと速やかに proteasomal pathway で分解されることが明らかにされている。つまり、Fli1 はリン酸化されると DNA 結合能を失って速やかに分解されるが、逆にリン酸化が阻害されると DNA に結合して安定となるため、蛋白の発現量は亢進する。したがって、以上の結果は HDMECs においても皮膚線維芽細胞と同

様の機序によって、Fli1 の転写活性が制御されていることを示唆していると考えられた。

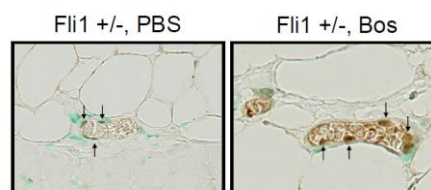
図 1



(2) Fli1^{+/+}マウスにボセンタンを投与すると、血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現が亢進する

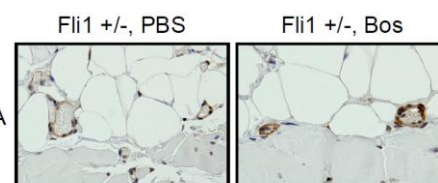
次に、ボセンタンが血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現を亢進させる効果が in vivo においても認められるか否かについて検討を行うため、Fli1^{+/+}マウスにボセンタンを 4 週間腹腔内投与し、皮膚小血管の血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現量について免疫染色で検討を行った。図 2 に示すように、ボセンタン投与により血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現は著明に亢進した。

図 2



血管内皮細胞における Fli1 蛋白の発現低下は血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用の減弱(pericytes loss)を誘導し、血管を脆弱化させる。したがって、ボセンタンが pericytes loss に及ぼす影響についても検討した。図 3 に示すように、Fli1^{+/+}マウスの皮膚小血管における α-SMA の発現は、ボセンタン投与により亢進した。つまり、血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用が強くなり(pericyte loss が改善)、血管が安定化していることが示唆された。以上の結果から、ボセンタンは Fli1 の発現低下に依存する血管異常を改善させる作用があることが明らかとなった。

図 3

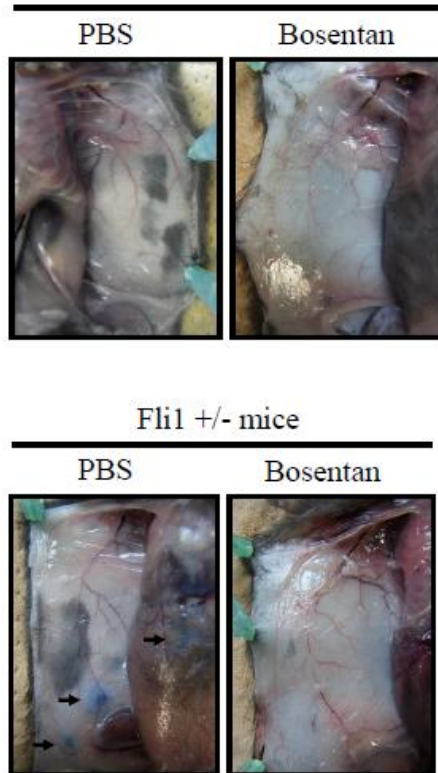


(3) Fli1^{+/+}マウスにボセンタンを投与すると、

血管透過性の亢進が改善する

我々の過去の検討において、Fli1 ECKO マウスでは血管透過性が亢進していることが示されている。その主要な原因の一つは pericyte loss による血管の脆弱化と考えられる。上記の通り、ボセンタンは Fli1^{+/+}マウスの皮膚小血管における pericyte loss を改善させる効果がある。そこで、次にボセンタンが Fli1^{+/+}マウスの血管透過性に及ぼす影響について、Evan blue 色素を用いて検討した。図4に示すように、蒸留水を投与した Fli1^{+/+}マウスでは、皮膚において Evans blue 色素の血管外漏出が顕著であったが、ボセンタンを投与した Fli1^{+/+}マウスでは Evans blue 色素の血管外への漏出は全く認められなかった。一方、野生型マウスではボセンタンの有無に関係なく Evans blue 色素の血管外漏出は認められなかった。以上の結果から、ボセンタンは Fli1^{+/+}マウスの血管障害を改善させる作用があることが明らかとなった。

図4 WT mice

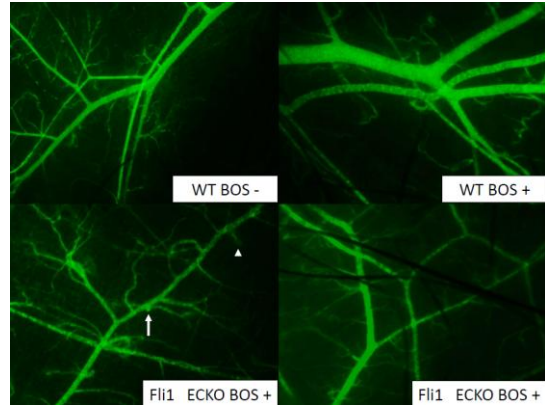


(4) ボセンタンは Fli1 ECKO マウスの血管構造の異常を改善する

次に、ボセンタンが Fli1 ECKO マウスの血管の構造異常に及ぼす影響について検討した（血管構造の異常は、Fli1 ECKO マウスの方が Fli1^{+/+}マウスよりも強いことが既に明らかになっているため、Fli1 ECKO mice を用いた）。図5に示すように、Fli1 ECKO マウスでは、蛇行した毛細血管、小動脈瘤細（矢

印）、異常毛細血管網（矢頭）などの所見が認められたが、ボセンタン投与によりこの異常を示す血管の数は減少した。一方、野生型マウスではボセンタンの有無で血管構造には大きな変化は認められなかった。以上の結果から、ボセンタンは Fli1 依存性の血管構造の異常を是正する作用があることが示された。

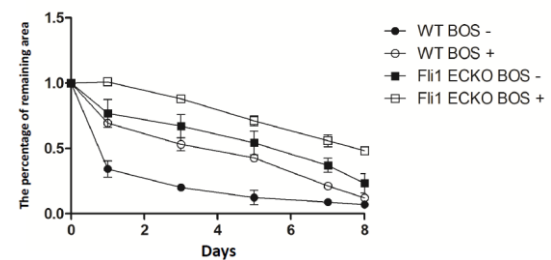
図5



(5) ボセンタンは Fli1 ECKO マウスの創傷治癒に影響を及ぼさない

我々は予備実験により、Fli1 ECKO マウスでは創傷治癒が遅延していることを明らかにしている。そこで、ボセンタンが Fli1 ECKO マウスの創傷治癒に及ぼす影響について検討を行った。図6に示すように、ボセンタンは野生型マウスの創傷治癒を有意に遅延させたが、Fli1 ECKO マウスにおいてはボセンタンは創傷治癒に有意な影響を及ぼさなかった。

図6



以上の結果より、ボセンタンは Fli1 の発現低下に伴う血管構造および血管の機能異常を是正する作用はあるが、血管内皮細胞における Fli1 の発現低下に起因する創傷治癒異常には影響を及ぼさないことが示された。欧米で行われた RAPIDS1, RAPIDS2 試験では、ボセンタンは SSc 患者の指尖潰瘍の治癒を促す効果はないが、指尖潰瘍の新規発症を予防する効果があると報告されている。本研究の結果は同試験の結果を支持する結果となった。つまり、ボセンタンは SSc に内在する

Fli1 依存性の血管障害を改善することによって皮膚潰瘍の新生を抑制している可能性が示唆された。

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60313029

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)

1. Noda S, Asano Y, Takahashi T, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Kuwano Y, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. Decreased cathepsin V expression due to Fli1 deficiency contributes to the development of dermal fibrosis and proliferative vasculopathy in systemic sclerosis. *Rheumatology* (Oxford). 2013;52:790-9. 査読有

2. Noda S, Asano Y, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. A possible contribution of altered cathepsin B expression to the development of skin sclerosis and vasculopathy in systemic sclerosis. *PLoS One*. 2012;7:e32272. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Asano Y. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. The 37th annual meeting of JSID (招待講演) 2012 年 12 月 8 日、沖縄

2. 浅野善英、強皮症の基礎と臨床、第 61 回東海膠原病研究会 (招待講演)、2012 年 07 月 14 日、名古屋

3. 浅野善英、強皮症の血管障害、日本皮膚科学会総会 (招待講演) 2012 年 6 月 2 日、京都

4. Asano Y, Trojanowska M, Sato S. The mechanism of impaired wound healing in animal models with increased vascular senescence. The 36th annual meeting of the JSID, 2011 年 12 月 8 日 Kyoto, JAPAN

5. Akamata K, Asano Y, Sato S. Bosentan reverses the profibrotic phenotype of systemic sclerosis dermal fibroblasts through increasing the DNA binding ability of transcription factor Fli1. The 75th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, 2011/11/8 Chicago, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野善英 (ASANO YOSHIHIDE)