

論文の内容の要旨

全身性強皮症の病態における上皮細胞での 転写因子 Fli1 の発現低下の意義についての検討

高橋 岳浩

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)は皮膚および肺、食道などをはじめとした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。その病態については未だ解明されていないが、近年の活発な研究により、免疫異常、線維化、血管障害の 3 病態各々に対応し、免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の異常がその病態形成において果たす役割について多くの知見が蓄積されてきた。免疫異常については、B 細胞、T 細胞およびマクロファージの慢性的・恒常的活性化が病態に深く関与していることが報告されている。また線維化と血管障害については、主として皮膚線維芽細胞および皮膚微小血管血管内皮細胞についての研究が盛んに行われ、線維芽細胞ではコラーゲン遺伝子などの細胞外マトリックス遺伝子の恒常的な発現の亢進がみられること、血管内皮細胞についてはその恒常的な異常活性化が見られ、接着因子の発現亢進や血小板・凝固系の活性化の誘導を介して線維化にも寄与すること、などが報告されてきた。

一方で、SSc の皮膚の表皮の異常については、これまでほとんど関心を集めてこなかった。しかし近年、表皮、およびそれを構成する主要な細胞である表皮角化細胞が、皮膚の線維化の病態において重要な役割を果たすことが報告されてきている。たとえば、SSc 患者の皮膚表皮においては本来創傷治癒過程において発現され創傷治癒ケラチンと称される Keratin 6 (K6)、Keratin 16 (K16)などの発現が皮膚硬化部だけではなく非硬化部を含めて恒常的に亢進しており、*in vitro* の検討でも SSc 患者皮膚表皮角化細胞はその IL-1 α の産生を介して線維芽細胞におけるコラーゲン産生を誘導するとの報告や、線維化に重要な役割を果たす TGF β の共受容体である CD109 を表皮角化細胞において過剰発現させ、代表

的な SSc マウスモデルであるブレオマイシン誘導 SSc モデルマウスを作成したところその線維化が抑制されたとの報告、あるいは、SSc 表皮では IL-21 受容体の発現が亢進しており、SSc 患者由来の培養表皮角化細胞では種々の炎症性・線維化促進的サイトカイン、成長因子の発現が亢進していることなどが報告されている。しかし、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞を対象とした研究がすでに膨大に蓄積されていることに比較して、表皮の異常に関する検討については、今日まで、これらの限られた数の報告に留まっている。

私が所属する東京大学皮膚科の研究グループはこれまで、Ets 転写因子ファミリーの一つである転写因子 Fli1 の発現が SSc 患者皮膚の皮膚線維芽細胞および血管内皮細胞において健常人に比較して著明に低下していることに着目し、このことが SSc の病態において果たす重要な役割を証明してきた。具体的には、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おり、Fli1 の発現低下が I 型コラーゲンの過剰産生をもたらして直接皮膚の線維化の病態に寄与している可能性を示し、また、血管内皮細胞については Cre-loxP 系を用いて血管内皮特異的に Fli1 をノックアウトしたマウスにおいて血管新生が恒常的に活性化され、細動脈の狭窄、毛細血管拡張、血管透過性亢進といった SSc に特徴的とされる血管の病理組織学的変化や機能変化が再現され、血管内皮細胞における Fli1 の発現低下が SSc の血管障害の病態成立に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

これらの検討の中で、SSc 患者の皮膚では上記の通り線維芽細胞および血管内皮細胞において発現が低下していることに加え、実は表皮角化細胞においてもその発現が著しく低下していることを観察していたが、その意義については未だ検討していなかった。そこで私は、表皮角化細胞においても Fli1 の発現低下がその病態形成において何らかの役割を果たしているのではないかとの仮説に基づき、検討を行うこととした。具体的には Cre-loxP 系を用い、重層扁平細胞の基底部に発現する Keratin 14 (K14)のプロモーター下流に部位特異的組み替え酵素 Cre を発現して表皮角化細胞特異的ノックアウトマウスを作成するために頻用される K14-Cre マウスを Fli1^{flox/flox} マウスと交配することにより、K14 発現細胞特異的 Fli1 欠失マウス (Fli1^{flox/flox}; K14^{cre+/+} マウス; KcKO マウス)を作成し、表皮角化細胞における Fli1 の発現低下が何らかの異常な表現型を呈するかどうか、また、それが SSc の病態形成において果たす役割について何らかの示唆を与えうるかどうかの検討を行った。

すると、本マウスの表皮は創傷治癒ケラチン K6、K16 などの恒常的な発現亢進が見られ慢性的な活性化が認められるのみならず、真皮の炎症細胞浸潤の増加、真皮の肥厚とコラーゲン量の増加、線維化促進的サイトカイン・成長因子の発現亢進が見られ、皮膚の線維化が自発的に生じることが明らかとなった。さらに、内臓諸臓器の検討を進めたところ、SSc 患者でもその多くに線維化が出現する下部食道における線維化が見られたのに加え、肺をはじめとした内臓諸臓器に稠密なリンパ球の集簇像が見られ、特に肺には傍気管支領域に線維化と稠密なリンパ球の集簇の形成が見られ、これは関節リウマチ、シェーグレン症候群、全身性ループスエリテマトーデス、SSc などの自己免疫疾患患者において、あるいは自己免疫疾患モデル動物においてしばしば見られる **inducible Bronchus-Associated Lymphoid tissue (iBALT)** に相当する構造であると考えられた。血清学的な検討でも抗核抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体の出現などが観察され、上記所見と併せて本 **KcKO** マウスにおいて強い自己免疫の表現型が出現しているものと考えられた。加えて、SSc においてはその 3 主徴として線維化、免疫異常に加えて血管障害が見られるが、**KcKO** マウスの皮下血管は血管透過性が亢進し、虫食い状の狭窄や分枝状の血管構造が観察され、血管の異常も有することが明らかとなった。

私は **KcKO** マウスが呈するこれら線維化、免疫異常、血管障害の表現型のうち、非常に強い免疫異常の表現型に着目してさらに検討を続けた。特に、本マウスは **K14** 発現細胞に特異的なノックアウトマウスであるが、**K14** は自己反応性 T 細胞の排除、即ち中枢性免疫寛容(**central tolerance**)における負の選択 **negative selection** に決定的に重要な役割を果たす胸腺上皮細胞にも豊富に発現されていることに着目して、胸腺上皮細胞における **Fli1** の発現低下がその強い免疫異常の病態の形成に関与しているのではないかと仮説のもとに検討を行った。すると、**negative selection** に決定的に重要な役割を果たす胸腺髄質上皮細胞(**medullary Thymic Epithelial Cells; mTEC**)において **Fli1** の発現低下が認められ、また同時に、**mTEC** において自己タンパクである末梢組織抗原(**Tissue-restricted Specific Antigen; TSA**)の発現を制御するとされる **master regulator** 遺伝子、**Autoimmune Regulator (Aire)** 遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。

次に私は、**Ets** 転写因子ファミリーのうち **Ets1**, **Ets2**, **ESE1** が **Aire** の転写を制御するという既報告が存在することを念頭に、**Aire** 遺伝子が **Fli1** の転写制御を受けるのではないかと仮説を立てた。そこで、胸腺上皮細胞は単離・培養が

困難であるため同じく上皮細胞である培養ヒト皮膚表皮角化細胞を用いて *in vitro* での検討を進めたところ、Fli1 は Aire 遺伝子のプロモーター領域に結合しており、Fli1 が Aire 遺伝子の転写を制御していることを明らかにした。

そして最後に、Aire 遺伝子についてはもともと mTEC における TSA の転写調節および mTEC の分化成熟についての役割に注目しての報告が圧倒的ではあるが、皮膚表皮角化細胞にも発現していて末梢性免疫寛容(peripheral tolerance)の成立に重要な役割を果たしているという報告も存在することに注目し、SSc 患者皮膚における Aire 遺伝子の発現を mRNA および免疫組織学的方法により検討したところ、実にその発現は SSc 患者において健常人に比較して著明に抑制されていることが明らかとなった。

SSc の免疫異常の病態については、なぜ自己免疫が来されるのかという問題、その初期の免疫の異常のメカニズムについては全く未解明であった。本研究における知見は、皮膚表皮角化細胞を含めた上皮細胞における転写因子 Fli1 の発現低下が SSc の 3 主徴の病態成立の上で重要な役割を果たし、また、なぜ自己免疫が出現するのか、という全く未解明かつ根源的な問題についての一つの示唆を与える点で画期的と考えられた。