

## 論文の内容の要旨

論文題目 **KLF5, Fli1 二重ヘテロ欠損マウスの血管新生および**

**脈管形成の異常に関する解析**

氏名 中村 洸樹

全身性強皮症は、若年から中年の女性に好発する自己免疫疾患で、皮膚よび内臓諸臓器の広範な血管障害と線維化を特徴とする。皮膚の硬化のみならず、間質性肺疾患や肺高血圧症、強皮症腎クリーゼなどの致死的な合併症を伴う。この他にも、四肢末端の壊疽、関節変形や拘縮、逆流性食道炎、消化管の運動障害や吸収障害、心拡張障害など多様な病状を呈する全身疾患である。近年は治療薬の開発が少しずつ進み、致死的な合併症についても、部分的に救命や延命が可能となったものもあるが、依然、対症療法しか治療選択肢がないのが現状である。今日も病態解明が進んでいない理由の1つとして、ヒトから得られる臨床検体が限られていることが挙げられる。すなわち、そもそもの疾患頻度が低いことや、腎臓や肺などの内臓組織を研究試料として得ることが難しいことである。比較的容易に採取できる皮膚検体を用いた研究によって、皮膚が線維化するメカニズムは解明が進んだものの、内臓を侵す原因となる血管障害や免疫異常については詳細な機序が明らかになっていない。全身性強皮症で起こる各種の病変は、病理組織学的に見れば線維化と血管障害の二大要因に集約されるため、血管障害についての機序の解明は急務である。以上の背景から、ヒト以外の検体、すなわち動物モデルを用いた研究が望まれるが、これまで有用なモデルは限られていた。

全身性強皮症の疾患モデル動物を作成する上で、有用な候補の1つとして、Ets 転写因子ファミリーの1つである Fli1 (Friend leukemia integration 1)がある。血管内皮細胞や線維芽細胞において、Fli1 を発

現低下させることで、全身性強皮症様の病態を起こすことから、その重要性が議論されてきた。特に、血管内皮細胞においては、Cre-loxP 系を用いて血管内皮細胞特異的に Fli1 をノックダウンしたマウスにおいて、血管新生が恒常的に活性化されることが分かり、全身性強皮症に類似した様々な血管障害が出現することが示されている。また、Sp/KLF 転写因子ファミリーの 1 つで、胎児型ミオシンの転写因子である KLF5 (Krüppel-like factor 5) も、Fli1 と同様に、全身性強皮症の皮膚線維芽細胞で発現が低下していることを我々は過去に報告した。そして、Fli1 と KLF5 の両者を同時にヘテロ欠損させたマウス、すなわち *Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスが、全身性強皮症の主要病態である線維化、血管障害、免疫異常および炎症（自己免疫の出現）の全てを自然発症することも、我々の研究で明らかになった。本研究に先行するこの研究においては、特に線維化の病態に着目して分子生物学的に詳細な解析を行ったものの、血管障害、免疫異常については観察的な追究にとどまっていた。よって、本研究においては、全身性強皮症の病理組織学的な 2 大要因の片方である血管障害のメカニズム解明のために、*Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスを用いて検討を行うこととした。一般に、血管が作られる過程は、血管新生 (Angiogenesis) と脈管形成 (Vasculogenesis) という 2 つに大別される、全身性強皮症に関しては、過去の複数の研究で、血管新生には異常が見られ、脈管形成能は低下していることが示唆されている。先行研究において、*Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスでは、破壊性血管障害と増殖性血管障害の両者を示唆するような異常（血管狭窄像、血管密度低下、低酸素化）が観察されていた。本研究では、これらの血管異常が出現する原因を究明するため、血管新生と脈管形成という 2 つの基本的な過程に分解して検証を行った。

まず、*Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>* マウスでは創傷治癒が遅延した。創傷治癒過程の組織を病理学的に検討したところ、創傷治癒過程における肉芽組織では血管数が増加し、さらには各血管が拡張していた一方で、創傷癒痕部での血管叢は低形成であった。

血管新生については、網膜片を用いた Ex vivo の系を用いて、活性化していることが示された。血管新生を構成するステップは、(i) 周皮細胞の脱落と血管内皮細胞の分離による血管の不安定化、(ii) 基底膜の分解、(iii) 血管内皮細胞の遊走、(iv) 血管内皮細胞の増殖、(v) 血管内皮細胞による管腔形成、(vi)

周皮細胞の再接着や血管内皮細胞の集合による血管の安定化、という6つに分かれるため、その各々について検討を行ったところ、前半のステップは亢進しているため、一見すると血管新生全体が亢進しているように見えるものの、管腔形成のステップ以降に異常が認められるため、血管の吻合が機能せず、最終的に正常な血管が形成されない可能性が示唆された。なお、血管吻合においては、血管内皮細胞が Tip 細胞と Stalk 細胞という2つの対立する極性に分化するバランスが重要であるが、KLF5 と Fli1 の欠損によって、これら2種の細胞のマーカである *Dll4* および *Notch1* の発現のバランスに異常が生じることも判明した。また、*Dll4* および *Notch1* につき、クロマチン免疫沈降法で調べたところ、ヒト血管内皮細胞において Fli1 は *DLL4* および *NOTCH1* のプロモーター領域に結合しており、KLF5 は *NOTCH1* のプロモーター領域に結合していることが示された。よって、これら2つの転写因子が、Tip 細胞や Stalk 細胞の分化誘導に寄与している可能性が示唆された。加えて、VEGF-A165 や bFGF の刺激下で、正常マウス由来の血管内皮細胞の KLF5 および Fli1 が発現低下したことから、血管新生に関連する因子である VEGF-A165 や bFGF が血管内皮細胞に作用する際の伝達経路の中に、KLF5 および Fli1 が含まれていることが示唆された。

続いて、脈管形成について検討した。*Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>*マウスにおいては、In vitro Matrigel プラグアッセイを用いた検討により、脈管形成能が低下していることが示された。全身性強皮症患者では、血管内皮前駆細胞から分化する単球系血管新生促進血球系細胞に異常があることが知られている。この細胞は、脈管形成において、血管平滑筋細胞や周皮細胞へと分化する。血管平滑筋細胞は、収縮的な表現型 (Contractile phenotype) を持つものと、合成的な表現型 (Synthetic phenotype) に分かれ、合成的な表現型を持つ血管平滑筋細胞は、遊走能や増殖能、コラーゲン産生能が高く、脈管形成において血管が作られる初めのステップに寄与する一方、収縮的な表現型を持つ血管平滑筋細胞は、遊走能や増殖能、コラーゲン産生能が低く、形成された血管の安定化に寄与する。血管内皮前駆細胞は、主として骨髄に存在する間葉系幹細胞であるとされているため、*Klf5<sup>+/-</sup>;Fli1<sup>+/-</sup>*マウスの骨髄由来間葉系幹細胞について検討を行ったところ、より合成的な表現型 (Synthetic phenotype) を持つことが分かり、これは全身性強皮

症における骨髄由来間葉系幹細胞と同様の挙動をしていることが判明した。収縮的な表現型を持つ血管平滑筋細胞が減ることで、血管の安定化が起こらないと推論すると、脈管形成によって作られる血管が低形成となり、Matrigel プラグアッセイにおける脈管形成能の低下として観察されたことに合致した。加えて、bFGF 刺激下で正常マウス由来の間葉系幹細胞の KLF5 および Fli1 が発現低下したことからも、脈管形成に関連する因子である bFGF が間葉系幹細胞に作用する際の伝達経路の中に、KLF5 および Fli1 が含まれていることが示唆された。

先行研究において、*Klf5*<sup>+/-</sup>;*Fli1*<sup>+/-</sup>マウスの血管密度が低下することを我々は報告していたが、本研究ではその根拠として、血管新生における部分的な機能亢進や管腔形成能の低下、脈管形成能の低下が寄与している可能性を示した。さらに、Tip 細胞や Stalk 細胞の機能分化異常、血管内皮前駆細胞となる間葉系幹細胞の Synthetic phenotype への変化などが、これらの根底にある可能性を示した。本モデルマウスで見られた血管新生と脈管形成の異常は、全身性強皮症で起こる血管障害の基礎的病態と酷似しており、本研究の成果は、今後の全身性強皮症の血管病変の原因解明や、新規治療薬開発へと発展することが期待される。