

論文の内容の要旨

論文題目 巨核球/血小板特異的 Fli1 欠失マウスにおける創傷治癒とモノクロタリン誘発性皮膚線維化の解析

氏名 平林 恵

全身性強皮症 (systemic sclerosis、以下 SSc) は線維化、血管障害、自己免疫および炎症という 3 つの特徴を有する全身性の結合織疾患である。臨床的には、これらの特徴はそれぞれ、皮膚硬化や間質性肺病変、レイノー症状や後爪郭の毛細血管の変化、自己抗体の存在や病理組織学上の炎症性細胞の浸潤といった所見として表出する。

皮膚科領域において、SSc の治療上臨床的に特に問題となるのがいわゆる指(趾)尖潰瘍であり、手指や足趾の一部が自然脱落したり、合併する骨髄炎の治療に難渋して足の切断を要したりすることも稀ならず経験される。SSc の皮膚潰瘍には SSc の特徴である血管障害とそれに伴う創傷治癒の異常が関与している。一般に、正常では、皮膚の外傷は大きく分けて炎症、増殖、組織再構築の 3 つの段階を経て治癒を得る。具体的には、皮膚組織が物理的外傷を受けると、炎症期にはまず血小板が止血を行うとともに成長因子などを分泌しながらマクロファージや線維芽細胞を活性化させ、一方好中球が異物を除去して痂皮となって排出されるかマクロファージに貪食される。そして増殖期に、表皮細胞はその形質を変えて細胞接着を促し、増殖と移動を行いながら上皮化を進める一方、血管が新生し、マクロファージや線維芽細胞が集まり細胞外基質を産生し、肉芽組織を形成する。細胞外基質は徐々にコラーゲンに置換され、筋線維芽細胞の働きによって創が収縮する。組織再構築期には、新しい血管はアポトーシスにより分解されて消失し、コラーゲンは様々な細胞の分泌する細胞外基質分解酵素の働きにより分解されより太い束に置換される。一方、SSc の皮膚においては、血管の修復と新生に欠陥があり、特に周皮細胞の担う血管の安定性が欠如して脆弱な血管を形成するとともに、表皮角化細胞の成熟に異常があり、治癒は遅延する一方、血管内皮細胞 (およびおそらく周皮細胞) が線維芽細胞に転化して、過剰な線維化を引き起こす。

近年、そのエピジェネティック制御によって SSc の病態に重要な役割を果たすと考えられているのが Friend leukemia virus integration 1 (Fli1) である。Fli1 は Ets transcription factor family のひとつであり、SSc 患者の線維芽細胞、血管内皮細胞に加えて近年では表皮細胞において発現が低下していることが知られている。Fli1 は I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子である一方、血管の成熟や安定性に関わる分子の制御にも関わっており、血管内皮特異的 Fli1 欠失マ

ウス (*Fli1* EcKO) では皮膚の血管に狭窄や拡張、瘤が生じ、SSc に特異的な血管障害が再現される。また、上皮細胞特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* KcKO) では、上皮細胞の活性化により皮膚と食道の線維化が起こり、また胸腺髄質上皮の形質変化と *autoimmune regulator* の発現低下に伴い自己免疫と間質性肺疾患が再現できる。

このように、これまでは、皮膚に恒常的に存在する細胞および浸潤するリンパ球を中心に病因論が進められてきたが、SSc の 3 つの特徴のうち血管障害に着目すると、血流中に存在する血球細胞の関与もあることが推測され、今回筆者らは血小板に注目した。巨核球/血小板特異的に *Fli1* を欠失したマウスを作製し、その表現型を分析して血小板における *Fli1* 発現低下の SSc の病態への関与を検討することを計画した。

SSc と血小板との関係についてはすでにまとめられている。血小板は損傷した上皮によって刺激されて、血栓を形成したり TXA2 などの血管作動性物質を放出したりすることで血管の機能不全や虚血に寄与する。また、組織の線維化の結果増加したI型コラーゲンは、血小板の活性化をさらに増強する。一方、血小板は、さまざまな向線維性の伝達物質 (PDGF、TGF- β 、リゾリン脂質や serotonin) を放出して線維化に働く。最後に、血小板は HMGB-1 などの向炎症性作動物質を産生する一方、IFN- γ や T 細胞から放出されるその他のサイトカインは巨核球の成熟を促し、血小板を活性化する。

まず、我々は巨核球/血小板特異的 *Fli1* 欠失マウス (*Fli1* MPcKO) を用いた創傷治癒実験を行った。背部皮膚の一部を切除して治癒過程を観察すると、対照の *Pf4-Cre*^{+/+} に比べて切除 2 日後に創面積の有意な縮小がみられた。また、*Fli1* MPcKO の上皮化した皮膚の癒痕組織では、筋線維芽細胞の著明な増殖と、小血管の増生、コラーゲン沈着量の増加が認められた。

各種サイトカインの mRNA の定量では、*Fli1* MPcKO において、IFN- γ の発現が低下し、MMP-13 の発現が上昇していることがわかった。過去の報告からは IFN- γ はコラーゲン合成、沈着を抑制し、創傷治癒を遅延させる方向に働き、MMP-13 は逆に線維芽細胞を組織化して創収縮を促進する方向に働くと考えられ、*Fli1* PcKO マウスでは、IFN- γ の発現減弱と MMP13 の発現増強が、筋線維芽細胞の増殖と創閉鎖の促進、真皮における小血管の新生の亢進、コラーゲン沈着の促進に寄与したと考えられる。

これらの結果から、*Fli1* MPcKO と SSc の病態を比較する。SSc では、血管新生、すなわち既存の血管から分岐して新たな血管を形成する機構は亢進している一方、血管内皮細胞において血管の成熟と安定性を司る *Fli1* の発現が低下しているため、血管の再生が障害され、結果的に創傷治癒後の癒痕組織では新生血管は増えない。*Fli1* MPcKO では血小板が *Fli1* の欠失により機能異常を来していると考えられるが、血管内皮細胞は *Fli1* の発現を保っているため、血管の不安定性という SSc の形質は模倣せず、結果的に血管新生の亢進をそのまま反

映して新生血管が増えていると考えられる。一方、*Fli1* MPcKO の線維芽細胞は、やはり *Fli1* の発現を保っているが、創傷治癒の過程で活性化されて膠原線維を産生し、皮膚硬化を生じている。SSc 患者の線維芽細胞は、I 型コラーゲンの転写抑制因子である *Fli1* の発現低下により活性化されているため、正常の線維芽細胞をも活性化させうる *Fli1* MPcKO の血小板は、SSc の線維芽細胞であれば更に強く線維化を亢進させるものと推測される。

以上の創傷治癒実験では、皮膚への損傷に対する反応としての線維化が *Fli1* MPcKO では対照に比べて亢進していることが示された。*Fli1* MPcKO において線維化は血管障害の結果として生じるのではないかと推測し、血管内皮細胞に障害を与えることで線維化が亢進するかみることにしたのが、続いて行ったモノクロタリン投与実験である。

モノクロタリン (monocrotaline、以下 MCT) は、*Crotalaria spectabilis* という植物の種に由来する 11 員環のアルカロイドであり、慢性低酸素暴露モデルとともに肺高血圧症 (pulmonary hypertension, PH) のモデルとして主にラットに用いられてきた。MCT は皮下投与または腹腔投与で用いられ、ラットでは比較的確立されたモデルであるが、マウスではこの薬物の肝臓による代謝が系統や個体によって大きく異なるため、投与方法は一定していない。マウスでは MCT は少量連日投与よりも、高容量少数回投与の方がより PH を再現しやすいと言われている。2013 年の世界保健機構による PH の分類では、第 1 群に pulmonary arterial hypertension (PAH) が位置している。PAH の特徴は、肺動脈のリモデリングによる肺血管抵抗と右室負荷による右心不全であり、病理学的には肺小動脈の閉塞がみられる。MCT を投与されたラットの肺では、肺の血管内膜の肥厚や単球の浸潤、血管周囲の浮腫が観察されており、この薬剤は血管内皮細胞に傷害を与えていると考えられている。今回の実験では、高用量で少数回投与することとし、過去の文献を参考に、9~10 週齢のマウスに対して、MCT 200mg/kg を週 1 回、計 4 回投与し、検体の採取は最終投与 1 週間後に行った。MCT を投与された *Fli1* MPcKO の皮膚では、著明な真皮肥厚とコラーゲン量の増加、および筋線維芽細胞の増殖がみられた。また重要なことに、真皮内の血管の α -SMA の染色性は低下していて、これは MCT の投与によって血管内皮細胞や周皮細胞が傷害されていることを意味する。仮説としては、傷害された血管内皮細胞が endothelial-mesenchymal transition を起こして、線維芽細胞を供給して線維化を担っている可能性がある。また、*Fli1* は巨核球の分化において、血小板を形成する前の段階で核内分裂や細胞質の成熟に関わっているため、MCT によって傷害された血管内皮に機能異常をもった血小板が凝集して血栓を形成し、線維芽細胞を活性化していることも考えられる。

本研究は、血小板機能異常が線維化を亢進させることを明らかにしたものであり、延いては血小板機能異常の SSc の病態への関与を示唆するものである。また、涉猟しうる限りにおいて、MCT 投与によるマウスの皮膚の線維化につい

て述べた文献はなく、本研究は新規性を有すると考える。さらに、*Fli1* MPcKO マウスに対する MCT 投与は、週 1 回計 4 回の投与で皮膚の線維化が再現できることから、非常に簡便な SSc モデルとなりえ、本症の病態の解明や治療法の開発に役立つことが期待される。

終