

論文の内容の要旨

論文題目 表皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスにおける創傷治癒についての検討

氏名 尾松 淳

全身性強皮症は皮膚および肺、食道などをはじめとする内臓諸臓器の線維化と血管障害、自己免疫反応という 3 つの特徴を有する全身性疾患である。臨床的には、線維化として皮膚硬化や間質性肺病変、血管障害としてレイノー症状や後爪郭の毛細血管の変化、自己免疫反応として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が表出する。その病態については未だ解明されていないが、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果たす役割に関しては多くの知見が蓄積されてきている。

加えて、全身性強皮症では指(趾)尖潰瘍などの創傷治癒遅延が一般的に見られる。具体的には、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、治療上臨床的に非常に問題となっている。我々の先行研究によって、全身性強皮症においては、血管内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してしまうような血管の修復と新生に異常がみられており、創傷治癒が遅延する原因の一つとして明らかになっている。しかし一般的に皮膚の創傷治癒過程においては、血管内皮細胞だけではなく、血小板・好中球、線維芽細胞や表皮細胞が密接に関わっている。皮膚の創傷治癒は大きく分けて炎症、増殖、組織再構築の 3 つの過程を経て治癒を得る。具体的には、皮膚組織が損傷を受けると炎症期として血小板による止血、好中球による異物の除去、マクロファージの貪食などみられる。そして増殖期に、表皮細胞は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。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。全身性強皮症の創傷治癒遅延における表皮細胞の関与についてはこれまで検討がほとんど行われていない。

また、近年、全身性強皮症の病態に対してエピジェネティック制御によって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、全身性強皮症患者の線維芽細胞、血管内皮細胞など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 欠失マウスでは皮膚の血管に狭窄や拡張、瘤が生じ、全身性強皮症患者に特異的な血管障害が再現される。我々の先行研究において、重層扁平細胞の基底部に発現する Keratin 14 に対する特異的 Fli1 欠失マウスが全身性強皮症の主要病態であ

る線維化と免疫異常を自然発症し、特に免疫異常が生じる原因として **Keratin14** が豊富に存在する胸腺髄質上皮細胞においても **Fli1** が低下し、胸腺髄質上皮細胞の形質変化と **autoimmune regulator** の発現低下が関係することが示された。本研究に先行するこの研究においては、特に線維化と免疫異常については分子生物学的に詳細な解析を行ったものの、血管障害ならびに創傷治癒遅延においては解析が行われていない。

そこで、本研究ではこれまで検討されてこなかった全身性強皮症の創傷治癒遅延に対する表皮細胞の関与について上記マウスを用いた詳細な検討を行った。まず、**Cre-loxP** 系を用い、**Keratin 14** 発現細胞特異的 **Fli1** 欠失マウス（以下、**Fli1 KcKO** マウス）を作成した。次に、我々は **Fli1 KcKO** マウスと対照群の背部皮膚の一部を切除して創傷治癒過程を観察した。**Fli1 KcKO** マウスでは、対照群に比べ創傷治癒が遅延していた。しかし、上皮化した皮膚の癒痕組織では、血管の形態異常や数の異常はみられず血管障害を示唆する所見は見られなかった。一方、創部周囲の病理組織学的検討において、創部の表皮の形成が対照群に比較して遅延していた。そのため、表皮細胞の遊走・増殖能の異常が創傷治癒遅延をきたしている可能性が考えられたため、*in vitro* において検討を行った。具体的には、マウスから表皮細胞を単離し、培養した後、**scratch assay**、**transwell assay**、**BrdU assay** を用いて遊走能、増殖能に関して検討したところ、**Fli1 KcKO** マウスでは表皮細胞の遊走能、増殖能が有意に低下していた。次に、皮膚検体を用いて表皮細胞の遊走能、増殖能に関わる因子の mRNA 発現について対照群と比較したところ、促進因子である **Epidermal Growth Factor (EGF)-1**、**EGF-2**、**Keratinocyte growth factor**、**Heparin Binding EGF Like Growth Factor(HB-EGF)**が低下している一方、**Transforming growth factor-β**、**Bone morphogenetic protein 6** などの阻害因子が上昇し、線維化マーカーである **connective tissue growth factor** は上昇していた。以上の結果から、強皮症の表皮細胞においては上皮化を阻害する因子が亢進していることで、表皮細胞の遊走能、増殖能が阻害され創傷治癒が遅延していることが示された。

次に我々はエンドセリン拮抗薬の一つであるボセンタンに注目した。エンドセリン-1 (**ET-1**) が全身性強皮症患者血漿で高値であることが報告されている。我々は過去の報告において、ボセンタンが線維芽細胞や血管内皮細胞における **Fli1** の発現を回復させることで強力な抗線維化作用や血管の機能異常を回復させることを明らかにしている。

加えて、全身性強皮症に伴う新規手指潰瘍を抑制することが報告されている。全身性強皮症患者の表皮細胞に対する **ET-1** とボセンタンについてこれまで研究がなされておらず、検討をおこなった。全身性強皮症患者の表皮細胞では **ET-1** が強く発現していた。そして **Cell line** である培養ヒト皮膚表皮角化細胞 (**NHEK**) に対して **RNA 干渉法** により **Fli1** 遺伝子発現をノックダウンしたところ **ET-1** の発現が亢進した。**Fli1 KcKO** マウスにおいても **ET-1** の発現が亢進していた。そこでボセンタンの創傷治癒過程への影響を調べるため

に、12 週齢の *Fli1* KcKO マウスに対して創傷作成の 7 日間前から毎日ボセンタンを腹腔内投与した群と、リン酸緩衝液を投与した対照群において、創傷治癒に差が出るかを検討したところ、投与群では創傷治癒が改善していた。そこで、*Fli1* 遺伝子発現をノックダウンした NHEK を用いてボセンタンによる表皮細胞の変化を *in vitro* で検討したところ、遊走能が改善していた。よってボセンタンは血管内皮細胞、線維芽細胞だけではなく、表皮細胞においても遊走能を改善させることで創傷治癒を改善させると考えられた。

本研究は、全身性強皮症の表皮細胞における転写因子 *Fli1* の発現低下が表皮細胞の遊走能・増殖能を低下させることをつきとめ、これまで報告されていた血管障害や線維化という観点以外の、表皮細胞機能異常という観点からも創傷治癒遅延が生じ、ボセンタンが創傷治癒を改善させることを表皮細胞の観点から明らかにした。これにより、全身性強皮症における創傷治癒遅延に対する今後のさらなる病態解明や新規治療法開発に役立つことが期待される。