

## 論文の内容の要旨

論文題目 全身性強皮症の病態においてボセンタンが疾患修飾薬として作用する可能性についての検討

氏名 赤股 要

全身性強皮症(SSc)は内臓諸臓器の線維化と血管障害を主な症状とする自己免疫疾患であり、その病因は未だ不明である。しかし、エンドセリン-1(ET-1)がSSc患者血漿で高値であることが報告されている。さらにエンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが肺線維芽細胞におけるI型コラーゲンの産生抑制や、SScに伴う新規手指潰瘍を抑制することが報告されている。また転写因子Fli1とコラーゲン発現の関係も報告されており、今回我々はFli1に注目しボセンタンが全身性強皮症の線維化、血管透過性亢進の病態を改善させるメカニズムを解明し、同薬が全身性強皮症の病態において疾患修飾薬になり得るか検討した。

はじめに線維芽細胞を対象とした検討では、ET-1が正常ヒト皮膚線維芽細胞において強力な線維化誘導作用を示す分子メカニズム、およびボセンタンが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機序を明らかにすることを目的に*in vitro*の系で実験を行った。過去のET-1に関する報告より正常ヒト皮膚線維芽細胞においてET-1は線維化関連遺伝子の強力な転写抑制因子を不活性化することにより線維化誘導作用を発揮している可能性を考えた。この仮説を支持するべくCOL1A2遺伝子プロモーターにおけるET-1へのresponsive elementはFli1 binding siteを含む-353 ~ -264bp領

域に存在し、ET-1 刺激は転写抑制因子である Fli1 をターゲットとして線維化作用を示すことが考えられた。この仮説をもとに実験を行い、ET-1 は“c-Abl-PKC- $\delta$ - Fli1” pathway を活性化し、転写抑制因子 Fli1 の DNA 結合能を低下させ、I 型コラーゲン遺伝子の発現を強力に誘導することが明らかとなった。強皮症皮膚線維芽細胞は正常皮膚線維芽細胞に比し ET-1 を過剰産生していることを鑑みると、ボセンタンは ET-1 依存性に活性化された“c-Abl-PKC- $\delta$ - Fli1” pathway を抑制して転写抑制因子 Fli1 の DNA 結合能を回復させることにより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している可能性が示唆された。この仮説どおり、強皮症皮膚線維芽細胞において、ボセンタンは c-Abl と PKC- $\delta$  の発現、PKC- $\delta$  の核内移行、Fli1 のリン酸化を抑制し、結果的に Fli1 の DNA 結合能を著明に亢進させ I 型コラーゲンの産生を抑制した。

*in vivo* の系においてボセンタンが線維芽細胞に対して同様の作用を示すか否かに関して、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを用いて検討した。ボセンタンで処理した同マウスの病変部皮膚の線維化は改善し、その線維芽細胞では Fli1 蛋白の発現が改善していた。この動物モデルの実験結果は、ボセンタンが *in vivo* においても Fli1 の発現を亢進させることにより抗線維化作用を発揮している可能性を示唆した。以上より、強皮症皮膚線維芽細胞とブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスに対するボセンタンの抗線維化作用には、少なくとも Fli1 の発現亢進が関与している可能性が明らかとなった。

次に血管内皮細胞を対象として、ボセンタンが強皮症の血管障害を改善させる可能性について検討した。まずヒト皮膚血管内皮細胞(HDMEC)を ET-1 で刺激したところ、c-Abl と PKC- $\delta$  の蛋白発現量、c-Abl のリン酸化、PKC- $\delta$  の核内移行、Fli1 のリン酸化は亢進し、Fli1 蛋白の発現量は減少した。さらに

c-AblあるいはPKC- $\delta$ の遺伝子サイレンシングを用いた検討により、ET-1 刺激による Fli1 のリン酸化の誘導にはc-AblとPKC- $\delta$ が不可欠であること、PKC- $\delta$ の活性化にはc-Ablが不可欠であることが明らかとなった。これらの結果は、正常ヒト皮膚線維芽細胞と同様に HDMEC においても ET-1 刺激によって“c-Abl-PKC- $\delta$ -Fli1” pathway が活性化され、Fli1 の DNA 結合能が低下することを示唆している。一方、血管の恒常性や血管新生を担う *VE-Cadherin*, *PECAM-1*, *PDGF-B*, *MMP-9* の各種標的遺伝子のプロモーター領域への Fli1 の結合は ET-1 刺激により顕著に抑制された。次にボセンタンが HDMEC における“c-Abl-PKC- $\delta$ -Fli1” pathway”に及ぼす影響について検討を行ったところ、ボセンタンはこの pathway を阻害し、Fli1 のリン酸化を抑制することが明らかとなった。さらに、ボセンタンは Fli1 の mRNA の発現量を変化させることなく Fli1 蛋白の発現量を亢進させた。この事実はボセンタンが血管内皮細胞における Fli1 遺伝子の発現量の低下に起因する血管異常を改善させる作用があると考えられた。過去の検討より SSc では線維芽細胞および血管内皮細胞において Fli1 遺伝子の発現がエピジェネティック制御を介して強力に抑制されていることが報告されており、この Fli1 の発現異常が SSc の線維化と血管障害の病態に深く関与していることと一致していた。

最後に、強皮症血管障害モデルマウスである Fli1 ECKO マウスに対してボセンタンが及ぼす影響について検討を行った。まず、Fli1 血管内皮特異的ノックアウト(ECKO)マウス由来のマウス皮膚血管内皮細胞(MDMEC)を *in vitro* の培養系においてボセンタンで処理したところ Fli1 の発現は亢進し、PKC- $\delta$ の核内移行は抑制された。血管新生、血管恒常性を担う *VE-Cadherin*, *PECAM-1*, *PDGF-B*, *MMP-9* の標的遺伝子のプロモーター領域への Fli1 の結合はボセンタンにより著明に亢進した。一方、

MDMEC における Fli1 遺伝子の mRNA の発現量は変化しなかった。In vivo でも Fli1 ECKO マウスにおいてボセンタンは血管内皮細胞における $\alpha$ -SMA の発現を改善し、エバンスブルーを用いた Fli1 ECKO マウスの皮膚微小血管の血管透過性亢進を改善させた。

今回の検討結果により、ボセンタンは線維芽細胞と血管内皮細胞において Fli1 の DNA 結合能を亢進させ、結果的に抗線維化と血管透過性亢進を改善させることが明らかになった。重要なことに、この過程においてボセンタンは Fli1 遺伝子の転写には一切影響を与えなかった。この事実は、エピジェネティック制御によって転写レベルで Fli1 遺伝子の発現が強力に抑制されていたとしても、ボセンタンは Fli1 の蛋白発現量を回復させることができることを示唆している。

本研究ではボセンタンがSScの病態に及ぼす影響について培養細胞と動物モデルを用いて検討を行い、同薬がSScの疾病素因の一つであるFli1のエピジェネティックな発現異常を是正する作用があることを明らかにした。本研究結果は多因子疾患においてエピジェネティック制御が関与した疾病素因を是正することで疾患修飾作用が発揮される、新しい治療戦略モデルを示している。