

審査の結果の要旨

氏名 赤股 要

本研究は全身性強皮症の線維化と血管透過性亢進という2つの病態に対し、エンドセリン拮抗薬であるボセンタンが抗線維化及び血管内皮細胞の関与した血管透過性亢進を改善する作用のメカニズムについて検討している。これらの病態を改善させることから、ボセンタンが全身性強皮症の病態に対する疾患修飾薬となりうるか検討し、以下の結果を得ている。

1. 正常皮膚線維芽細胞をエンドセリン-1(ET-1)存在下で培養すると I 型コラーゲンの発現が誘導された。また、そのメカニズムにはSmadを介したcanonicalなpathwayではなく、non-canonical pathwayを介することが示された。
2. 正常皮膚線維芽細胞にCOL1A2遺伝子のdeletion constructを用いてレポーターアッセイを行うと、COL1A2遺伝子の-353~-264bpの間にET-1のresponsive elementが存在することが示された。
3. 正常皮膚線維芽細胞をET-1存在下で培養すると、Fli1の上流にあるc-Abl, p-c-Abl, PKC- $\delta$ は活性化され、PKC- $\delta$ は核内への移行が促進され、Fli1はリン酸化されることが示された。また、リン酸化されたFli1はコラーゲン遺伝子との結合能を失うことがDNA親和性免疫沈降法やクロマチン免疫沈降法で示された。
4. 強皮症皮膚線維芽細胞をボセンタン存在下で培養すると、I 型コラーゲン蛋白の発現量は減少し、Fli1の上流に位置するc-Abl, PKC- $\delta$ の活性化は抑制され、PKC- $\delta$ の核内移行は阻害された。さらにFli1のリン酸化は阻害され、DNA結合能が増加することで、プロテアソーム系で分解されることが少なくなり、Fli1の総蛋白量は増加した。また、この過程において、Fli1のmRNA発現量は変化しなかった。
5. *In vivo*でもボセンタンはHE染色でブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚の肥厚を改善し、免疫組織染色でブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの皮膚の線維芽細胞におけるFli1の発現は改善がみられ、ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウス皮膚の蛍光抗体二重染色では線維化のマーカーである $\alpha$ -SMAが減少し、Fli1の発現が増加したことが示された。
6. ヒト皮膚微小血管内皮細胞をET-1存在下で培養すると、c-Abl, PKC- $\delta$ の活性化がみられ、PKC- $\delta$ の核内移行が促進された。また、RNA干渉法を用いて検

討したところ、PKC- $\delta$ を干渉し、ET-1を加えると、c-Ablの発現が増えるのみでFli1のリン酸化はみられなかった。またc-Ablを干渉し、ET-1で刺激をするとPKC- $\delta$ の発現亢進やFli1のリン酸化は起こらなかった。以上よりc-AblはPKC- $\delta$ の発現に必要であり、PKC- $\delta$ もFli1のリン酸化に必要と考えられた。これらの結果より、血管内皮細胞においても線維芽細胞と同様の“c-Abl-PKC- $\delta$ -Fli1” pathwayが存在すると考えられた。

7. ET-1存在下でヒト皮膚内皮細胞を培養するとタンパクレベルでFli1の発現は減少し、Fli1のリン酸化が促進されますが、mRNAレベルの変化は見られなかった。
8. ヒト皮膚血管内皮細胞において、ET-1存在下で培養すると、血管新生に重要な遺伝子(*VE-cadherin*, *PE-CAM1*, *PDGF-B*, *MMP-9*)とFli1の結合能が低下し、逆に血管内皮特異的Fli1欠失(Fli1 ECKO)マウスから得られたマウス皮膚微小血管内皮細胞(MDMEC)をボセンタン存在下で培養すると、Fli1と上記の標的遺伝子との結合は増加した。
9. ヒト皮膚血管内皮細胞を用いて、ボセンタン存在下で培養したところ、ET-1とは逆にc-Abl, PKC- $\delta$ の発現及びFli1のリン酸化は抑制され、Fli1の発現は亢進した。よって、ボセンタンは“c-Abl-PKC- $\delta$ -Fli1” pathwayを阻害する可能性が考えられた。
10. Fli1 ECKO マウス皮膚血管内皮細胞をボセンタン存在下で培養したところ、PKC- $\delta$ の核内移行は抑制された。また、Fli1 ECKO マウス皮膚血管内皮細胞をボセンタン存在下で培養したところ、線維芽細胞の検討と同様、Fli1の発現は亢進され、mRNAレベルでの変化は見られなかった。
11. 28日間ボセンタンを野生型とFli1 ECKOマウスに投与したところ、Fli1 ECKOマウスで低下のみられた血管周囲の $\alpha$ -SMAの発現はボセンタンにより改善し、血管透過性をエバンスブルーにて確認したところ、ECKOマウスで見られていた皮膚の微小血管の血管透過性亢進はボセンタンにて改善した。

以上、本論文はボセンタンが線維化、血管内皮細胞の関与した血管透過性亢進を改善させるメカニズムの一部を明らかにした。本研究はボセンタンが強皮症の症状に対して疾患修飾薬となりうることを示唆し、強皮症の治療薬のさらなる開発に貢献する可能性を持ち、学位の授与に値するものと考えられる。