

博士論文

全身性強皮症に類似する線維化、血管障害、免疫異常を呈した
KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスの解析

野田 真史

全身性強皮症に類似する線維化、血管障害、免疫異常を呈した
KLF5、Fli1 ダブルヘテロ欠損マウスの解析

所属：東京大学大学院医学系研究科博士課程外科学専攻皮膚科

指導教員名：佐藤伸一

申請者名：野田真史

要旨

全身性強皮症（SSc）の主要 3 病態は線維化、血管障害、免疫異常であるが、このすべてを一元的に説明できる仮説は未解明である。また、epigenetic 制御による疾患感受性遺伝子の発現異常は SSc の発症に深く関与する。今回我々は、SSc 皮膚線維芽細胞において転写因子 Fli1（Friend leukemia integration 1）と同様に転写因子 KLF5

（Krüppel-like factor 5）の発現が epigenetic 制御により抑制されていること明らかにした。また、Fli1 の発現低下はコラーゲン産生増加を、Fli1 と KLF5 の発現同時低下は線維化の維持に重要な CTGF（connective tissue growth factor）の発現上昇をそれぞれ惹起した。さらに、KLF5 と Fli1 のダブルヘテロ欠損マウスは SSc の主要 3 病態に類似した所見を示し、新規 SSc モデルとして今後の病態解明への利用が期待される。

序文

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)は血管障害と皮膚や肺をはじめとした臓器の線維化を特徴とする慢性疾患で、その発症には自己抗体産生や諸臓器への炎症細胞浸潤といった免疫異常の関与が示唆されている。皮膚では初期には真皮浅層でリンパ球を中心とした血管周囲の細胞浸潤がみられ、その後に真皮の肥厚とコラーゲンの膨化・増生、皮下組織の委縮が起こる。肺においても高頻度に間質性肺疾患、肺高血圧症を合併し、予後規定因子となる。また、抗 Topoisomerase-I 抗体、抗 Centromere 抗体といった自己抗体が陽性となり、それぞれの抗体陽性例で特徴的な所見を示す。自己抗体の存在は診断の重要な手がかりとなるものの、それが直接線維化や血管障害を誘導するような機構は明らかでない。時系列でみると血管障害と自己免疫・炎症が線維化に先行することから血管障害もしくは自己免疫が SSc で最初に発症すると考えられてきたが、発症のメカニズムについて詳細は明らかにされていない。そして、過去にいくつかの SSc マウスモデルが作成されてきたが、線維化、血管障害、免疫異常の3主症状すべてを示すものではなく、このことが SSc の病態解明や新規治療研究が進まない原因ともなってきた。

SSc の線維化では諸臓器において線維芽細胞が恒常的に活性化され、細胞外基質(extracellular matrix; ECM)が蓄積することが主要な病態である。線維芽細胞は血管障害、炎症、自己免疫といった細胞外からの刺激によって恒常的に活性化されると考えられている。しかし、これらの外部環境から隔離して細胞を培養した実験系においても SSc 患者由来の線維芽細胞は恒常的に活性化した状態を維持し、コラーゲンをはじめとした ECM を過剰に産生する。そして、この特徴は継代数とともに徐々に失われるものの、細胞を継代培養しても数回の継代数であれば維持される。よって、SSc 患者由来の線維芽細胞にはその異常を維持できる内在性の異常が存在していること

が示唆される。

SSc は多因子疾患であり、遺伝要因と環境因子の両者がその複雑な病態形成に重要であると考えられる。SSc では家族内発症率が低く、遺伝学的以外の要因が大きく寄与していると推測される。環境因子により後天的に獲得され、DNA 塩基配列を変化させることなく遺伝情報を制御する機序として、epigenetic 制御が知られる。ヒストン修飾（アセチル化、メチル化）と DNA メチル化が代表的であり、いずれも DNA の高次構造を変化させて遺伝子の発現を制御する。これらの修飾は細胞分裂を経ても一定期間維持されるため、epigenetic 制御により発現が変化している遺伝子はその疾患の発症において重要であると考えられている。培養 SSc 患者由来皮膚線維芽細胞（以下、SSc 皮膚線維芽細胞）は I 型コラーゲンを恒常的に過剰発現するが、epigenetic inhibitors を加えるとその発現量は健常人由来皮膚線維芽細胞（以下、正常皮膚線維芽細胞）と同程度まで抑制される¹。そして、I 型コラーゲン遺伝子の発現制御に関わる転写因子の中でも転写抑制因子である Fli1 の発現が epigenetic 制御により抑制されていることが明らかにされている¹。さらに、SSc 皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化されている機序の一つとして Fli1 の恒常的発現低下が重要であることを過去の実験が示してきた²⁻⁴。

Fli1 恒常的発現低下が SSc の病態に寄与することを明らかにするため、*Fli1*^{+/-}マウスを用いて検討したところ、真皮の線維化や肥厚は認められなかったものの、皮膚組織における Col1a2（I 型コラーゲン）遺伝子の発現は亢進し、酢酸抽出法により定量した可溶性 I 型コラーゲンの発現も増加していた。また、*Fli1*^{+/-}マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞は野生型マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞と比較して、I 型コラーゲンを過剰発現していた。これらの結果は、*Fli1*^{+/-}マウスの皮膚では線維芽細胞が活性化しているものの、過剰産生されたコラーゲンを皮膚組織へ蓄積させ、線

維化を確立する重要な因子が欠損していることを示唆している。

TGF- β とその下流のシグナル経路が活性化していることは線維化反応において極めて重要な役割を果たしている。一方で、TGF- β 刺激のみでは線維化は十分に誘導されず、同時に connective tissue growth factor (CTGF) で刺激することが不可欠であるとマウスモデルを用いた検討により明らかにされている^{5,6}。皮膚線維芽細胞における Fli1 の恒常的な発現低下により I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進をはじめとして TGF- β 刺激の作用の多くを再現することができるが、CTGF 遺伝子の発現制御には寄与しない。そして、*Fli1*^{+/-}マウスの皮膚では CTGF 遺伝子の発現量に、野生型マウスと比較しても変化がない。これらの事実は、Fli1 の恒常的発現低下に加え、CTGF 遺伝子の恒常的発現増加を促す異常が併発すれば、線維化を誘導できる可能性を示唆している。

KLF5 は諸臓器での線維化反応を制御する重要な転写因子で、心筋線維芽細胞においては線維化反応を誘導し⁷、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する⁸。さらに、KLF5 は SSc 患者の病変部皮膚において発現が抑制されている⁹。そこでまず本研究で培養 SSc 皮膚線維芽細胞において KLF5 遺伝子の発現量を検討したところ、その発現は低下しており、epigenetic inhibitor で処理すると KLF5 の発現が通常量まで回復した。さらに、培養 SSc 皮膚線維芽細胞では、KLF5 遺伝子のプロモーター領域でヒストン H3 と H4 のアセチル化の程度が低下しており、CpG 部位が一部メチル化されていた。これらの結果より、SSc 皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により KLF5 遺伝子の発現が抑制されており、その異常が SSc の病態において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、我々は培養皮膚線維芽細胞を用いた解析を行い、KLF5 は CTGF 遺伝子の強力な転写抑制因子であり、その発現低下により CTGF 遺伝子の発現が亢進することを

明らかにした。つまり、Fli1 遺伝子の恒常的な発現抑制により TGF- β 経路の活性化に類似した状態が形成され、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現亢進を誘導できるため、理論的にはこの 2 つの転写因子を同時に発現低下させることで、線維化反応を誘導できると考えた。

上記の結果に基づき、*Klf5*^{+/-} マウスと *Fli1*^{+/-} マウスを交配して *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスを作成したところ、SSc で高頻度に影響を受ける皮膚および肺に自然に線維化が生じることが明らかになった。さらに、線維化に加えて皮膚及び肺の血管障害と肺への B 細胞浸潤、B 細胞の活性化、自己抗体産生を示し、いずれも SSc の病態に類似した所見であった。現在までの研究に基づく血管障害および自己抗体産生が SSc の発症初期病態と考察されてきたが、依然として明確な結論は得られていない¹⁰。本研究における知見は KLF5 と Fli1 の 2 つの転写因子が epigenetic 制御により発現低下することが SSc における 3 主要症状を発症させる上で重要な役割を果たしていることを示唆する。このような概念は過去に提唱されておらず、本研究は SSc の病態を明らかにして病態を解明していく上で、重要なデータとなる可能性がある。

方法

患者と皮膚線維芽細胞培養

ヒト皮膚検体は発症から 2 年以内のびまん皮膚硬化型 SSc (diffuse cutaneous SSc: dcSSc) 患者 8 人 (7 人は抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性、1 人は抗核抗体陰性) の前腕伸側遠位 1/3 から採取した。いずれの患者も臨床所見と組織学的所見に基づいて診断され、ほかの膠原病は合併していなかった。コントロール群の検体は年齢、性別、部位がほぼ合致した 8 人の健常人から採取した。研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、また被験者全員から書面上の同意を得た上で行った。線維芽細胞は上記の皮膚検体から同時に採取し、10% ウシ胎児血清を加えた minimal essential medium を用いて培養した。すべての培養線維芽細胞を用いた実験では継代数が 3~6 のものを用いた。

動物モデル

Klf5^{+/-} マウスは東京大学循環器内科の藤生克仁先生、真鍋一郎、永井良三先生から提供していただいた¹¹。*Fli1*^{+/-} マウスは Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生に提供していただいた。タイトスキン (*Tsk*+) マウスは長崎大学皮膚科から提供していただいた^{12,13}。すべての実験は東京大学医学系研究科の動物倫理規定に従って行った。麻酔にはエチルエーテルの吸入を用い、エチルエーテルによる吸入麻酔を深くすることで安楽死を行った。ブレオマイシンを用いた皮膚線維化誘発モデルでは、6 週齢の雌マウスの背部皮膚に対してブレオマイシンを隔日で 3 週間皮下投与した。

コラーゲンの定量

QuickZyme Total Collagen Assay (QuickZyme Biosciences, Leiden, Netherlands)の説明書に従い、皮膚組織と肺組織を 6N HCl で 20 時間、95°C で加水分解し、キットの試薬を用いてその吸光度を測定し、定量化した。皮膚検体は 6mm パンチ生検で採取したものを、肺組織は左葉を検体として用いた。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウスの血清に対して各種キットを用いて、抗 topoisomerase I 抗体 (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)、total IgG, IgM, IgA (eBioscience, San Diego, CA, USA)、interleukin-6 (IL-6; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)の濃度を測定した。

使用した抗体

抗 KLF5 抗体 (KM1784, KM3918) は東京大学循環器内科で作成され、藤生克仁先生、真鍋一郎先生に提供していただいた¹⁴。KM1784 を免疫染色に、KM 3918 をそれ以外の実験系に用いた。抗 CTGF 抗体、抗 Fli1 抗体、抗 Ets1 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)から購入した。抗 α -SMA 抗体と抗 β -actin 抗体は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。抗 acetyl histone H3 and H4 抗体、抗 prosurfactant protein C 抗体、抗 von Willebrand factor (vWF)抗体は EMD Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)から購入した。抗 I 型コラーゲン抗体は Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)から購入した。

免疫染色法

ヒトとマウスの検体はホルマリンで固定してからパラフィンで包埋し、切片を作り、

Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて染色した。皮膚の厚さや細胞数は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で 2 人の検者 (S.N.、Y.A) で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。

抗核抗体

抗核抗体の有無は Hep-2 細胞(Medical & Biological Laboratories)を用いた間接蛍光抗体法により判定した¹⁵。マウスの血清を 160 倍希釈してキットの Hep-2 細胞が付着したスライドグラスに加え 37°C で 30 分静置し、PBS で洗浄したのちに FITC で標識した抗マウス IgG (100 倍希釈)を用いて検出した。

透過型電子顕微鏡

2 カ月齢の雄マウス背部皮膚から検体を採取し、固定し、レジンに包埋したのち、微小切片を作り、JEM-1200EX (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)で観察した。

免疫ブロット

Confluent となった培養皮膚線維芽細胞を血清飢餓状態で 24 時間培養し、全細胞抽出物¹⁶と核内抽出物¹⁷を用意した。皮膚と肺の組織は RIPA バッファー(Santa Cruz)中で鉗子を用いて小さく刻み、遠心し、上清を抽出した。そうして得られた検体を sodium dodecyl sulfate (SDS)ポリアクリルアミドゲル (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて電気泳動し、chemiluminescent techniques (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用いてバンドを検出した。

Small interfering RNA (siRNA)

培養皮膚線維芽細胞に対して 10 nM KLF5 siRNA (Thermo Fisher Scientific)、Fli1 siRNA (Santa Cruz)または control scrambled RNA (Santa Cruz)と HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany)を加えて 48 時間培養し、さらに 24 時間血清飢餓状態で培養してから検体を採取した。

RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR

肺や皮膚組織、培養細胞から 1 μ g の RNA を Qiagen の RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて cDNA に逆転写した。定量的リアルタイム PCR は SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies)を用い、ABI prism 7000 (Life technologies)で測定した。いずれの検体も triplicates としてその平均を値として用いた。18S rRNA をリファレンス遺伝子として用いた。用いたプライマーの配列は表 1 に記載した。mRNA 発現量の測定後に Melt curve を測定し、各プライマーから予想される単一の増幅産物が生成していることを確認した。

クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降法には EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA)を使用説明書に準じて用いた。培養皮膚線維芽細胞を 1%ホルムアルデヒドで処理しクロマチンをクロスリンクしたのち、超音波破碎装置を用いて 300-500 bp のサイズに破碎した。次に、タンパクとクロスリンクした DNA の断片に対して各種抗体を用いて目的の複合体を採取した。各種抗体の陰性コントロールとして、非特異的ウサギ IgG もしくはマウス IgG を用いた。Input には免疫沈降前の検体を使用した。クロスリンクを Proteinase K を用いて消失させてから、残存した DNA を検体として定量的リアルタイム PCR を行い、生成した産物をアガロースゲル電気泳動を用いて検出した。定

量的リアルタイム PCR には KLF5 と CTGF のプロモーター領域を増幅できるようにプライマーを設計した。配列は KLF5 プロモーター 5'-CAGCCCAATCTGTCAGAGAAGT-3'、5'-CGCCTCTATTTACCCCAACTC-3'、CTGF プロモーター (KLF5 binding site 1 、 KBE1 を含む配列) 5'-TCCGGTGTGAGTTGATGAGG-3' and 5'-GCGGGGAAGAGTTGTTGTGT-3'である。

バイサルファイト DNA シーケンス

ゲノム DNA を健常人と SSc 患者の培養皮膚線維芽細胞から NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いて採取した。次に、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signatures, North Ryde, Australia)を用いてバイサルファイト化した。さらに、EpiTaq HS (Takara Bio, Kyoto, Japan)を用いて増幅した。プライマーは MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>) を使用して作成し 4 つの CpG アイランドを含む KLF5 プロモーター上の転写開始点から数えて-273 から -210 bp の部位を増幅するよう設計した。プライマーの配列は 5'-TTGTTAGAGAAGTTGTGTATAAATTG-3'、5'-ACCAACCTATAAACAAAAAAA-3' である。増幅された PCR 産物は pMD20T ベクターに Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio) を用いてクローニングし、シーケンスを行った。QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp>) を用いてメチル化の解析を行った。

プラスミド

connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子プロモーターの一部 (-823 ~ +74) を pGL2-basic vector 中にクローニングしたベクター²³ と Fli1 の発現ベクターである pSG5-Fli1²⁵ を Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の

Maria Trojanowska 先生¹⁸ から提供していただいた。KLF5 の発現ベクターである pCAG-KLF5 は東京大学循環器内科の藤生克仁先生、真鍋一郎先生からいただいた¹⁹。QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて CTGF 遺伝子プロモーター中の KLF5 が結合すると予想される部位に数塩基の変異を置換した。Mutagenesis の際には変異後の塩基配列を基にそれぞれプライマーを作成した。プラスミドの増幅には変異型の *Escherichia coli* を使い、QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて精製した。

ルシフェラーゼアッセイ

X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland) を用いてプラスミドをヒト包皮線維芽細胞に対してトランスフェクションした。また、siRNA をプラスミドと同時にトランスフェクションする際には Lipofectamine 2000 (Life technologies) を用いた。細胞は 30 時間後に回収し、firefly luciferase と *Renilla* luciferase の値を dual luciferase reporter system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて AB-2200 luminometer (ATTO, Tokyo, Japan) で測定した。Firefly luciferase の値を *Renilla* luciferase の値に合わせて補正した。いずれの実験でも 3 回同じ手技を繰り返し、その平均を値として使用した。

Oligonucleotide pull-down assay

過去に報告された手順に従って行った²⁰。5'末端のヌクレオチドにビオチンを付加したオリゴヌクレオチドを作成した。配列は以下のとおりである。(i) CTGF KBE1 oligonucleotides;

5'-GAGGCAGGAAGGTGGGGAGGAATGCGAGGAATGTCCCTGTTTGTG-3' 、

5'-CACAAACAGGGACATTCCTCGCATTCCTCCCCACCTTCCTGCCTC-3'、CTGF プロモーター上の転写開始点から-123 to -79 の位置にあたり、KBE1 を含む。 (ii) CTGF mutated KBE1 oligonucleotides; 5'-GAGGCAGGAAGGTAAGAGGAATGCGAGGAATGTCCCTGTTTGTG-3' 、 5'-CACAAACAGGGACATTCCTCGCATTCCTCTTTACCTTCCTGCCTC-3'、変異した KBE1 の配列を含む。これらの配列を 95°C で 1 時間おき、アニーリングした。健康人の培養皮膚線維芽細胞から採取した核内抽出物を streptavidin の結合したアガロースビーズ、500 pmol の 2 重鎖オリゴヌクレオチドとともに 2 時間、室温で、振盪させた。このタンパク、DNA、アガロースビーズの結合体を、プロテアーゼインヒビターを加えた phosphate buffered saline で 4 回洗浄した。得られたタンパクを免疫ブロットで検出した。

免疫沈降法

健康人の培養皮膚線維芽細胞中に存在する Fli1 と Ets1 を沈降させるため、Pierce Crosslink IP Kit (Thermo Fisher Scientific)を説明書通りに使用した。抗 Fli1 抗体、抗 KLF5 抗体と Protein A/G を 1 時間室温で反応させ、その後に 1 時間室温でクロスリンクを行った。核内抽出物はアガロースレジンとともに 1 時間、4°C で精製し、抗体がクロスリンクされたレジンとともに 4°C で一晩反応させた。採取された抗原を溶出し、免疫ブロットで検出した。

皮膚血管の描出

マウスをエチルエーテルで麻酔した後に 200 μ l の FITC を結合させたデキストラン (Sigma-Aldrich, 2000 kDa, 20 mg/ml in PBS)を尾静脈から注射した。5 分後にエチルエー

テルによる麻酔で安楽死させ、マウスから背部皮膚を採取した。皮膚組織をスライドガラス上に、切離面を下にして置き、蛍光顕微鏡で血管の構造を観察した。

脾臓からの B 細胞採取と刺激

CD19 陽性細胞を MACS 磁気ビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて取り出すことで、マウス脾臓の B 細胞をソーティングした。B 細胞の精製率は抗 CD19 抗体と抗 CD45R 抗体を用いたフローサイトメトリーで確認した。 10^5 個の細胞を 24 ウェルプレートにそれぞれ撒き、5 $\mu\text{g/ml}$ の lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich)、10 $\mu\text{g/ml}$ の抗 CD40 抗体(BioLegend, San Diego, CA, USA)で刺激した。上清は 48 時間後に回収した。

生体分子イメージング

マウス生体内での皮膚における血管構造や血行動態を検索するため、我々は過去の報告²¹を改良した方法で多光子顕微鏡を用いた。マウスはウレタン (1.5 g/kg)で麻酔し、倒立顕微鏡 (Nikon, Eclipse Ti, Tokyo, Japan)を用いて観察した。Texas-Red-dextran (25 mg/kg, 70 kDa, Invitrogen, San Diego, D1830)とHoechst 33342 (10 mg/kg, Invitrogen, H1399)を尾静脈に注射し、それぞれ血管と細胞の核を可視化した。組織はTi: sapphire laser (Visio II, Coherent, Santa Clara, CA)を用いて860 nmの波長で励起し、Nikon A1R-MP systemを用いて撮影した。写真はNIS-Elements software (Nikon)を用いて解析した。

統計解析

統計解析には GraphPad Prism 5 を用いた。統計学的な有意差は 2 群間であれば

Mann-Whitney U test を用いて、多群間であれば one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いて解析した。正規分布に沿う場合には two-tailed t-test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。値は平均値 \pm s.e.m で表記した。

結果

SSc 患者の皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により KLF5 の発現が抑制されている

免疫染色、免疫ブロット、定量的リアルタイム PCR により、SSc 患者の皮膚組織ならびに皮膚線維芽細胞では健常人の組織や細胞に比べて KLF5 の発現が抑制されていることを同定した (図 1a-d)。過去の報告によると SSc における ECM の産生過剰は epigenetic 制御による影響を強く受けている^{1,22,23}。そこで、SSc 患者の皮膚線維芽細胞において KLF5 の発現が epigenetic 制御により抑制されている可能性を検討するため、我々は培養皮膚線維芽細胞に対して 5-aza-2'-deoxycytidine (DNA メチル化阻害薬) と trichostatin A (ヒストン脱アセチル化阻害薬) という 2 つの epigenetic inhibitor を用いた。すると、SSc 皮膚線維芽細胞における KLF5 の mRNA レベルの発現量は 3 倍以上と正常皮膚線維芽細胞と同等になり、COL1A2 (I 型コラーゲン) mRNA の発現量は正常化した。正常皮膚線維芽細胞では epigenetic inhibitor による影響は明らかでなかった (図 1e)。KLF5 遺伝子プロモーター部位でのヒストンアセチル化の程度を検討するためにクロマチン免疫沈降法を行ったところ、KLF5 遺伝子プロモーター部位にあるヒストン H3 と H4 では SSc 皮膚線維芽細胞においてアセチル化の程度が減弱していた (Fig. 1f)。さらに、KLF5 遺伝子プロモーター部位での DNA メチル化の程度を検討するためにバイサルファイトシーケンスを行ったところ、KLF5 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位は SSc 皮膚線維芽細胞ではメチル化されている部位が散見されたものの、正常皮膚線維芽細胞では完全に非メチル化していた。(図 1g)。この部位 (転写開始点から数えて -273~-210 bp) では SSc 皮膚線維芽細胞での DNA メチル化の程度は軽度であったが、他のプロモーター領域でのメチル化の程度も含めて全体としての評価を行うため、5-aza-2'-deoxycytidine を単独で SSc 皮膚線維芽細胞に加えた

ところ、KLF5 mRNA の発現は 86% 上昇した (図 1h)。以上のことから、KLF5 遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化とヒストン脱アセチル化の両者が SSc における KLF5 遺伝子の発現低下に関与していることが示唆された。

Klf5^{+/-} マウスでは皮膚線維化反応が亢進する

次に、ブレオマイシン線維化誘導モデルを用いて、マウス生体内における KLF5 の機能を検討した。ブレオマイシンを背部皮膚に 3 週間隔日で連続投与 (300 µg/day) したところ、野生型マウスに比較し、*Klf5*^{+/-} マウスではより強い真皮の肥厚が見られた (図 2a,b)。しかし、PBS を注射した場合には野生型マウスと *Klf5*^{+/-} マウスの間で真皮の厚さには差が観察されなかった。また、皮膚組織中の CTGF 遺伝子と COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量もブレオマイシンを注射した *Klf5*^{+/-} マウスではブレオマイシンを注射した野生型マウスに比較して増加していた (図 2c)。線維化のマーカーとなる筋線維芽細胞 (α-SMA 陽性線維芽細胞) と CTGF 陽性線維芽細胞の真皮内の数を検討したところ、ブレオマイシンを注射した *Klf5*^{+/-} マウスではブレオマイシン注射後の野生型マウスに比較していずれの数も増加していた (図 2d,e)。さらに、ブレオマイシンを 3 週間隔日で連続投与 (100 µg/day) し、投与終了 3 か月後の時点で真皮肥厚の程度を観察したところ、野生型マウスでは注射終了直後と比較すると有意に真皮肥厚が軽減していたが、*Klf5*^{+/-} マウスでは投与終了後も皮膚の厚さは維持されていた (図 3a,b)。

自然発症で皮下組織 (hypodermis) が肥厚する *Tsk*^{+/+} マウスを *Klf5*^{+/-} マウスと交配することで、炎症反応が介在しない線維化モデルで KLF5 の皮膚線維化への影響を検討した。すると、*Tsk*^{+/+} マウスに比べて *Tsk*^{+/+;}*Klf5*^{+/-} マウスでは hypodermis が厚くなり (図 4a,b)、筋線維芽細胞数や CTGF 陽性線維芽細胞数も増加し (図 4c,d)、CTGF

遺伝子や COL1A2 遺伝子の mRNA 発現量も増加していた (図 4e)。

以上のことから、*Klf5*^{+/-} マウスは皮膚線維化を自然発症はしないが、ブレオマイシンの局所注射や *Tsk*/+ といった線維化を亢進する刺激や形質が存在する場合に線維化反応が増強され、かつ線維化がより強力に維持されることが示唆された。

KLF5 は CTGF 遺伝子の転写抑制因子である

KLF5 ヘテロ欠損で線維化反応が亢進する機序を検索するため、まず我々は野生型マウスと *Klf5*^{+/-} マウスから皮膚線維芽細胞を採取して培養し、各種線維化関連遺伝子の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR で解析した。すると、CTGF の発現が *Klf5*^{+/-} 皮膚線維芽細胞では野生型皮膚線維芽細胞に比較して 50% 上昇していた (図 5)。一方で、コラーゲン、 α -SMA、integrin- β 5 といった他の線維化マーカーの発現量には両群の間で差は観察されなかった。次に、ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 siRNA を用いて KLF5 の発現を減少させたところ、同様に CTGF の mRNA、タンパク発現量は、定常状態、CTGF の発現を大きく上昇させることが知られている TGF- β 1 刺激下のいずれの場合でも大きく上昇した (図 6a,b)。さらに、KLF5 の発現ベクターを CTGF 遺伝子プロモーターとともにヒト包皮線維芽細胞に対しトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイでプロモーター活性を測定したところ、KLF5 の用量依存性に最大 65%、CTGF 遺伝子のプロモーター活性が減少した (図 6c)。KLF5 siRNA を CTGF 遺伝子プロモーターと同時にトランスフェクションし、KLF5 の発現を低下させた際には逆に CTGF 遺伝子プロモーター活性は 49% 上昇した (図 6d)。

次に、KLF5 と CTGF 遺伝子プロモーターの相互作用を調べるため、我々は培養正常皮膚線維芽細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。すると、KLF5 は CTGF 遺伝子プロモーター領域に結合し、SSc 皮膚線維芽細胞や TGF- β 1 刺激下の正常皮膚

線維芽細胞では無刺激の正常皮膚線維芽細胞に比較してその結合能が減少していた（図 6e）。そのため、我々は CTGF 遺伝子プロモーター上で KLF5 が結合する可能性のある部位を検索し、それぞれの部位に Mutagenesis 法を用いてベクターに変異を加えた（図 6f）。それぞれの変異を導入した CTGF 遺伝子プロモーターをヒト包皮線維芽細胞にトランスフェクションしたところ、KBE1（KLF5 binding site 1; 転写開始点から -112 ～ -105 bp）に変異を加えた場合にのみ 2 倍にプロモーター活性が上昇したため、KBE1 に KLF5 が結合し、CTGF 遺伝子の転写抑制因子として働いている可能性が示唆された（図 6g）。KLF5 が実際に KBE1 に結合することを示すため、oligonucleotide pull-down assay を行ったところ、KBE1 に変異がある場合には KLF5 の結合能が消失することがわかった（図 6h）。以上のことから、KLF5 は CTGF 遺伝子プロモーター上の KBE1 に結合することで転写抑制因子として働くことが証明された。

KLF5 と Fli1 は共同して CTGF の転写活性を抑制する

Ets 転写因子ファミリーに属する Ets1 と Fli1 はいずれも CTGF 遺伝子プロモーター上の KBE1 近傍に結合することが過去に報告されている（転写開始点から -126 ～ -77 bp）^{3,24}。そこで、我々は KLF5 と Ets1 または Fli1 との間における物理的相互作用の有無を検討するため、正常皮膚線維芽細胞を用いて免疫沈降法を行った。すると、KLF5 と Fli1 は核内で複合体を形成していることが同定されたが、KLF5 と Ets1 の間に物理的相互作用は観察されなかった（図 7a）。次に、KLF5 と Fli1 が機能的にも共同して CTGF 遺伝子プロモーター活性を制御しているかどうかを検討するため、ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 発現ベクターと Fli1 発現ベクターを同時にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイでその活性の変化量を定量した。すると、Fli1 単独の作用においては CTGF 遺伝子プロモーター活性をわずかに減少させるにとどまっ

たが、Fli1 が KLF5 と同時に作用すると転写抑制因子としての機能を相乗的に亢進させた（図 7b）。同様に、ヒト包皮線維芽細胞に対して KLF5 siRNA と Fli1 siRNA を同時にトランスフェクションして発現を低下させると、CTGF の mRNA、タンパクの発現が両者とも相乗的に増加した（図 7c,d）。一方、Fli1 が転写抑制因子として制御している I 型コラーゲンは Fli1 siRNA を用いると発現が上昇したが、KLF5 siRNA は影響を与えなかった。

***Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスは皮膚線維化を自然発症する**

過去の報告と我々のこれまでの研究で得られた知見を考慮すると、Fli1 遺伝子の恒常的な発現抑制により TGF- β 経路の活性化に類似した状態が形成されて ECM 産生が亢進し、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子の発現亢進を誘導できるため、理論的にはこの 2 つの転写因子を同時に発現低下させることで、線維化反応を誘導できると考えた。そして、SSc 患者の皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により Fli1、KLF5 とともに発現が減少しているが、完全に消失しているわけではない。この状況をマウスで再現するため、*Klf5^{+/-}* マウスと *Fli1^{+/-}* マウスを交配し、KLF5 と Fli1 のダブルヘテロ欠損マウス（*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウス）を作成した。*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの生殖能力は保たれ、明らかな生存率の低下はなく、外見上の異常を示すことはなかった。まず、このマウスにおける皮膚、肺、培養皮膚線維芽細胞において KLF5 と Fli1 の発現レベルが約半分に減少していることを我々は確認した（図 8a-c、図 14a,b）。皮膚線維化について組織を採取して観察したところ、2 カ月齢では真皮の厚さと皮膚中のコラーゲン含有量に野生型マウスと *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの間で差は明らかでなかった。ところが、3 カ月齢の *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは野生型マウスに比較すると、真皮が 45% 肥厚し、コラーゲン線維は組織学上より密に配列していた（図 9a,b）。さ

らに、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの皮膚ではコラーゲン含有量が増加し（図 9c）、CTGF や ECM を構成する分子（コラーゲン、fibronectin）の mRNA 発現量が増加し（図 9d）、筋線維芽細胞と CTGF 陽性線維芽細胞の数が増加していた（図 9e,f）。一方、*Klf5*^{+/-} マウスと *Fli1*^{+/-} マウスはいずれも真皮肥厚、total collagen assay におけるコラーゲン含有量の増加を示さなかったが、*Klf5*^{+/-} マウス皮膚では CTGF mRNA の発現量が、*Fli1*^{+/-} マウス皮膚では COL1A2 mRNA の発現量が増加していた（図 10a-c）。これらの事実は、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおける皮膚線維化の自然発症の 1 つの原因として、Fli1 遺伝子の恒常的な発現抑制により ECM 産生が亢進し、KLF5 遺伝子の恒常的な発現低下により CTGF 遺伝子が発現亢進することでその線維化反応が維持されているという可能性を示唆する。

***Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの真皮では SSc に類似したコラーゲン細線維の異常がみられる**

2 カ月齢の *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウス皮膚を透過型電子顕微鏡で観察したところ、肥大化したコラーゲン細線維が縦断像でみられ、また細線維の直径におけるばらつきが増加している所見が横断像で観察された（野生型：平均 60.8 nm; レンジ 34.1-92.4 nm; *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-}: 平均 100.3 nm; レンジ 11.0-249.3 nm; 図 9g)。重要なことに、SSc 患者皮膚における細線維の異常と同様、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの皮膚では太いコラーゲン細線維が細いコラーゲン細線維と混在していた。一方で、KLF5 のヘテロ欠損単独では細線維の直径がわずかに増加するにとどまり、Fli1 のヘテロ欠損単独では径の小さな細線維が出現するのみであった (*Klf5*^{+/-}: 平均 75.4 nm; レンジ 19.4-157.5 nm; *Fli1*^{+/-}: 平均 62.0 nm; レンジ 11.0-105.9 nm)。これらの結果から、コラーゲン細線維を制御し重合する過程である fibrillogenesis²⁵ に関わる酵素の発現が KLF5 と Fli1 のダブルヘテロ欠損により変化している可能性が示唆された。定量的リアルタイム PCR により

Klf5^{+/-};Fli1^{+/-} マウスと SSc 患者の皮膚組織における fibrillogenesis 関連分子の発現を調べると、両者の組織で decorin 遺伝子の発現が減少し、lumican 遺伝子と ADAMTS2 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2) 遺伝子の発現が上昇していることが同定された (図 11a,b)。また、fibromodulin 遺伝子、biglycan 遺伝子、BMP1 (bone morphogenetic protein 1) 遺伝子、LOX (lysyl oxydase) 遺伝子の発現パターンも SSc 患者と *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは同じ挙動を示し、健常人や野生型マウスとそれぞれ比較して差を認めなかった。さらに、培養ヒト包皮線維芽細胞に対して Fli1 siRNA を用いて発現抑制すると decorin の発現が低下し、KLF5 siRNA を用いて発現抑制すると lumican と ADAMTS2 の発現が増加した (図 11c)。これらの結果は、Fli1 と KLF5 がそれぞれ fibrillogenesis に関わる別々の分子を制御しており、2 つ同時に発現が抑制されると SSc 患者に類似したコラーゲン細線維の異常を起こすことを示唆している。

***Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスにおける皮膚血管障害**

SSc 患者では微小血管の構造異常²⁶、血流の低下²⁷、組織の低酸素化²⁸が生じる。*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは視診による血管拡張は明らかでないものの、FITC-デキストランを尾静脈から注射してから背部皮膚を採取し、血管構造を蛍光顕微鏡で観察すると、1 カ月齢という早い段階から血管の虫食い状狭窄と分枝状の血管構造が観察された (図 12a)。さらに、血管内皮に発現する vWF を組織学的に染色して皮下における血管数を観察したところ、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは野生型マウスに比較して 2 カ月齢以降において血管数の減少がみられた (図 12b)。さらに、生体分子イメージングを多光子顕微鏡で行い、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは真皮コラーゲンの密度が高く、真皮血管の密度が減少していることを同定した (図 12c)。さらに、血行動態を検索すると、細動脈の血流速度が低下し (図 12d)、周囲の間質に低酸素化 (低酸素化マーカー Lox-1

の輝度上昇)が観察された(図 12e)。以上のことから、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスは皮膚において SSc 患者に類似した血管の構造異常^{29,30}、血流低下²⁷、組織低酸素化^{28,31}を示すことが明らかとなった。

Klf5^{+/-};Fli1^{+/-} マウスは SSc 患者の間質性肺疾患に類似した線維化と血管病変を自然発症する

SSc 患者では高頻度で間質性肺疾患や肺高血圧をはじめとした肺病変が観察されるため、我々は *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺組織を検討した。すると、胸膜側の肺辺縁を中心に軽度の肺胞隔壁肥厚が 2 カ月齢でみられた(図 13a)。さらに、4 カ月齢では肺胞構造の破壊とコラーゲン含有量の上昇が確認された(図 13b)。そして、8 カ月齢ではヒトの間質性肺疾患で SSc 患者に多いとされている亜型の non-specific interstitial pneumonia (NSIP)に類似した組織像を示した³²。NSIP に特徴的なびまん性の肺胞隔壁肥厚と散在するリンパ球浸潤がみられたが、ヒトの特発性間質性肺疾患に多いとされている usual interstitial pneumonia (UIP)で高頻度に観察される蜂窩肺はほとんど出現しなかった。また、大型の 2 型肺胞上皮細胞が増加していたが、UIP に特徴的な fibroblastic foci は観察されなかった。さらに、細動脈壁の肥厚と内腔の狭窄が 4 カ月齢から徐々に進行し(図 13c)、3 カ月齢では血管壁を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の増殖能亢進(図 13d)、そして 8 カ月齢の肺組織では肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension; PAH)の存在を示唆するような細動脈の強い狭窄と α -SMA 陽性細胞増殖による顕著な血管壁肥厚を認めた(図 13e)。UIP に特徴的な動脈の plexiform lesions はみられなかったが、隔壁間の細静脈には内膜の肥厚と局所的な内腔狭窄、血管周囲のリンパ球浸潤を認め、肺静脈閉塞性疾患(pulmonary veno-occlusive disease; PVOD)を示唆する所見であった(図 13f)。さらに、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺組織で vWF 染

色によって血管数を測定したところ、4 カ月齢から減少がみられた (図 13g)。これらの線維化、血管病変はヒトの間質性肺疾患と同様、いずれも中心の気管支側ではなく、辺縁の胸膜側に症状が強かった。SSc 患者の肺組織に置いても皮膚と同様 CTGF の発現が亢進していることが報告されているため³³、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの肺組織における CTGF 発現を検索したところ、野生型マウスに比較して CTGF の発現が mRNA、タンパク量共に大きく増加していた (図 14a,b)。また、2 型肺胞上皮細胞のマーカーである pro-surfactant protein C と CTGF で蛍光二重染色を行うと、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでは 2 型肺胞上皮細胞が顕著に増加し、そのうちの多くが CTGF を発現していたため、CTGF は主に 2 型肺胞上皮細胞から産生されていると予想された (図 14c)。これらの結果は、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでは月齢とともに増悪する肺病変を発症し、その組織学的特徴は SSc 患者の間質性肺疾患にきわめて類似し、2 型肺胞上皮細胞からの CTGF 過剰産生が発症に関与している可能性が明らかとなった。

***Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでは B 細胞が活性化し、自己抗体産生が観察される**

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの肺ではしばしば血管周囲の B 細胞浸潤が肺組織の線維化と血管病変が明らかになる以前に観察された (data not shown)。さらに、8 カ月齢の肺組織では B 細胞のリンパ濾胞様の構造と間質におけるびまん性の浸潤がみられ (図 15a,b)、その所見は SSc 患者における間質性肺病変の B 細胞浸潤に類似していた³⁴。B 細胞は IL-6 を産生する細胞の一つであることが知られており³⁵、IL-6 の発現は SSc 患者の皮膚、血清、末梢血単核球、培養皮膚・肺線維芽細胞において増加していることが過去に報告されている^{33,36-39}。そして、IL-6 を加えると培養線維芽細胞において、I 型コラーゲン、 α -SMA、CTGF の発現が増加する³⁷。我々が B 細胞の機能を解析したところ、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの脾臓から取り出した B 細胞は、lipopolysaccharide (LPS) また

は抗 CD40 抗体の刺激に対して野生型マウスに比較すると約 3 倍もの量の IL-6 を産生した (図 15c)。そして、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+} マウスの血清中、肺組織では野生型マウスに比較して IL-6 の発現量が増加していた (図 15d,e)。また、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+} マウスの B 細胞では CD19 の発現が肺では 15%、脾臓では 14% 上昇しており (図 15f)、B 細胞が活性化していることが示唆され、その発現は KLF5 と Fli1 により内在性に制御されている可能性がクロマチン免疫沈降法により示唆された (図 15g)。さらに、抗核抗体は *Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+} マウスの血清でのみ認められたが (図 15h)、血清 total IgG, IgM, IgA 値の上昇や SSc 特異的自己抗体である抗 topoisomerase I 抗体は検出されなかった (data not shown)。以上のことより、*Klf5*^{+/+};*Fli1*^{+/+} マウスでは B 細胞が活性化し、活性化した B 細胞が自己抗体を産生している可能性が示唆された。

考察

線維化を誘導・維持するためには、線維芽細胞における TGF- β signaling の恒常的な活性化と CTGF 遺伝子の恒常的な発現亢進の両者が重要であると考えられてきた^{5,6}。KLF5 と Fli1 は両者とも GWAS (Genome-wide association study) による SSc 患者における変異は知られていないが、今回我々は SSc 皮膚線維芽細胞におけるエピジェネティック制御に注目し、Fli1 と KLF5 という 2 つの転写因子の恒常的な発現低下がその病態において重要な役割を果たしている可能性を見出した。そして、肉眼的な血管拡張や潰瘍形成は示さない、触診で皮膚硬化を判別することはできないという SSc 患者と異なる点はあるものの、実際に *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおいて SSc の皮膚と肺の線維化の病態を再現できることを明らかにした (図 16、17)。さらに、SSc は線維化以外にも血管障害や免疫異常が認められることが特徴だが、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでは①皮膚と肺において血管床が減少している、②皮膚の細動脈では虫喰状の狭窄像が認められる、③皮膚では動脈血流速度の低下と組織低酸素化が観察される、④肺には B 細胞が巣状に浸潤している、⑤B 細胞からの IL-6 産生が上昇している、⑥自己抗体産生が認められる、ことを我々が明らかにしている。つまり、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスは SSc における線維化、血管障害、免疫異常 (炎症細胞浸潤、自己抗体産生) の全てを再現できる画期的な新規 SSc モデルマウスと考えることができる。

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの皮膚は肥厚し、コラーゲン含有量は増加し、コラーゲン線維はより密に配列していた。これらの特徴は SSc 患者において特徴的に見られる所見である¹⁰。KLF5 は CTGF 遺伝子の強力な転写抑制因子として働くことがわかったが、そのヘテロ欠損のみでは皮膚線維化を自然発症はしなかった。しかし、ブレオマイシンの皮下注射や *Tsk*^{+/+} の形質など線維化を促進するような刺激が加わると *Klf5*^{+/-} ヘテロ欠損により、強い線維化の亢進が観察された。過去の報告で CTGF のトランスジェ

ニックマウス^{40,41}や *Klf5*^{+/-} マウス^{7,8}では組織傷害などの外部刺激がなければ組織線維化が進行しないことを考えると、我々の *Klf5*^{+/-} マウスにおける実験結果と合致し、CTGF 亢進単独では線維化を自然発症させる機能はないが、線維化が開始した場合にそれを維持する機能があると予想される。*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおいては *Fli1* の恒常的発現低下とそれによる ECM 関連遺伝子の発現上昇、そして *KLF5* の恒常的発現低下による CTGF 過剰産生が同時に起こることで、皮膚線維化が自然発症した可能性が示唆される。

さらに、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの皮膚は SSc 患者にみられる肉眼的な血管拡張や爪周囲紅斑は示さなかったものの、生体分子イメージングも含めた詳細な解析で、SSc 患者に類似した血管の構造異常²⁹、血管床減少²⁹、血流低下²⁷、組織低酸素化²⁸をきたすことが明らかとなった。一方、*Klf5*^{+/-} マウスでは皮膚血管構造には明らかな異常はなく、*Fli1*^{+/-} マウスでは皮膚血管の蛇行がより多く観察されたが狭窄像は観察されなかった。そして、*Fli1* の血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスが示す皮膚血管の狭窄所見は *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの所見に類似している⁴²。よって、*Fli1* は血管構造を保つために重要なはたらきがあり、*Fli1* の発現低下に加えて CTGF 産生が亢進することで、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおける血管障害が出現する可能性が考えられた。

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの肺間質の線維化と肺胞構造の変化は月齢とともに増悪し、最終的には細動静脈の狭窄も観察された。NSIP に類似したびまん性の間質変化と PAH の病理学的特徴的に酷似した細動脈壁の肥厚、PVOD に類似した細静脈内腔の狭窄はいずれも SSc 患者の肺組織に高頻度で見られる所見であり^{32,43}、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスと SSc 患者の肺病変に共通の病態が潜んでいることを強く示唆する。肺線維化の病態で CTGF が重要な役割を果たしていることは、抗 CTGF 抗体を用いた治療がマウスにおける実験的な肺線維化モデルに対して効果があること⁶、そして CTGF の発現が SSc

患者の肺組織において亢進していること³³から示唆されている。さらに、2型肺胞上皮細胞特異的に CTGF を過剰発現させたトランスジェニックマウスの肺胞構造の異常と血管病変は *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおけるそれらの所見と類似している⁴⁴。これらのことから KLF5 と Fli1 の発現低下により 2型肺胞上皮細胞において CTGF が過剰発現することが肺間質・血管病変に深く関与している可能性が示唆される。

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおいては肺組織に顕著な B 細胞浸潤を認め、CD19 の発現が亢進し、脾臓 B 細胞は外部刺激に対して野生型マウスに比較して 3 倍も多くの IL-6 を産生した。B 細胞と IL-6 が SSc の病態に重要であることは、IL-6 受容体抗体のトシリズマブ⁴⁵と抗 CD20 抗体（抗 B 細胞療法）であるリツキシマブ⁴⁶が一部の SSc 患者に有効であることから示唆されている。また、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの肺組織と同様、SSc 患者の間質性肺病変ではびまん性、もしくはリンパ濾胞様の構造を形成する B 細胞の浸潤がしばしばみられる³⁴。さらに、血清 IL-6 値は皮膚線維化の重症度や SSc 患者の予後と相関する^{37,47}。自己免疫に関しては、我々の結果では特異抗体の存在は証明できなかったものの、ブレオマイシン皮膚線維化誘発モデルと同様^{15,48}、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウス血清では抗核抗体がしばしば陽性となった。以上のことから、KLF5 と Fli1 の発現が同時に低下することにより、B 細胞の浸潤と活性化、自己抗体産生が起こり、組織傷害と炎症性サイトカインの作用により皮膚線維化と血管障害に寄与する可能性が示唆される。

結論として、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスは SSc 患者と同様、線維化、血管障害、免疫異常という 3 つの主要な病態を示した。KLF5 と Fli1 がいずれも SSc 患者の皮膚において恒常的に発現低下していることを考慮すると、*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスは実際の SSc で起こっている現象を再現した、SSc の画期的な動物モデルとすることができる。そして、Fli1 と KLF5 の発現異常による SSc の病態モデルは、今後の治療戦略を考える

上でも非常に有用である。SSc の病態において中心的な役割をもつ転写因子の発現や機能異常を改善することができれば、疾患の自然経過を修飾できると考えられるが、近年 SSc の疾患修飾治療薬として注目を集めているボセンタンとイマチニブは、いずれも Fli1 の転写活性を強力に回復する機能を持っている⁴⁹。また、既存の薬剤で Fli1 や KLF5 の発現を上昇させる、もしくは CTGF プロモーターに対する結合能を変化させる分子が見つかれば、SSc の治療に応用できる可能性が出てくるとともに、その治療効果を *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスを用いて評価できる可能性がある。今後、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスを用いた研究で、SSc の病態が明らかになり、新規治療が開発されることを期待する。

謝辞

電子顕微鏡による解析を行っていただいた大阪市立大学皮膚科の鶴田大輔先生、生体分子イメージングによる解析を行っていただいた自治医科大学分子病態研究部の西村智先生に感謝いたします。そして、*Klf5*^{+/-} マウスと抗 KLF5 抗体、KLF5 発現ベクターをご提供いただき、実験についてご指導いただいた東京大学循環器内科の藤生克仁先生と真鍋一郎先生に感謝いたします。また、実験全般においてご指導いただきました東京大学皮膚科の浅野善英先生、佐藤伸一先生、自治医科大学学長の永井良三先生に感謝いたします。最後に、*Fli1*^{+/-} マウスと Fli1 発現ベクターをご提供いただき、論文作成についてご指導いただいた Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生に感謝いたします。

引用文献

1. Wang, Y., Fan, P.S. & Kahaleh, B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, 2271-2279 (2006).
2. Kubo, M., *et al.* Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* **163**, 571-581 (2003).
3. Nakerakanti, S.S., Kapanadze, B., Yamasaki, M., Markiewicz, M. & Trojanowska, M. Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. *J Biol Chem* **281**, 25259-25269 (2006).
4. Asano, Y. & Trojanowska, M. Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C delta promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* **29**, 1882-1894 (2009).
5. Mori, T., *et al.* Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* **181**, 153-159 (1999).
6. Wang, Q., *et al.* Cooperative interaction of CTGF and TGF- β in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **4**, 4 (2011).
7. Takeda, N., *et al.* Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* **120**, 254-265 (2010).
8. Fujiu, K., Manabe, I. & Nagai, R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* **121**, 3425-3441

(2011).

9. Whitfield, M.L., *et al.* Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12319-12324 (2003).
10. Varga, J. & Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* **117**, 557-567 (2007).
11. Shindo, T., *et al.* Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med* **8**, 856-863 (2002).
12. Spyropoulos, D.D., *et al.* Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**, 5643-5652 (2000).
13. Green, M.C., Sweet, H.O. & Bunker, L.E. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* **82**, 493-512 (1976).
14. Oishi, Y., *et al.* SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med* **14**, 656-666 (2008).
15. Ishikawa, H., Takeda, K., Okamoto, A., Matsuo, S. & Isobe, K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4⁺ T cells. *J Invest Dermatol* **129**, 1688-1695 (2009).
16. Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M. & Tamaki, K. Increased expression levels of integrin α v β 5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol* **164**, 1275-1292

(2004).

17. Ihn, H. & Tamaki, K. Competition analysis of the human alpha2(I) collagen promoter using synthetic oligonucleotides. *J Invest Dermatol* **114**, 1011-1016 (2000).
18. Kothapalli, D., Hayashi, N. & Grotendorst, G.R. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* **12**, 1151-1161 (1998).
19. Oishi, Y., *et al.* Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* **1**, 27-39 (2005).
20. Wu, K.K. Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown. *Methods Mol Biol* **338**, 281-290 (2006).
21. Nishimura, S., *et al.* In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* **118**, 710-721 (2008).
22. Huber, L.C., *et al.* Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* **56**, 2755-2764 (2007).
23. Jüngel, A., Distler, J.H., Gay, S. & Distler, O. Epigenetic modifications: novel therapeutic strategies for systemic sclerosis? *Expert Rev Clin Immunol* **7**, 475-480 (2011).
24. Van Beek, J.P., Kennedy, L., Rockel, J.S., Bernier, S.M. & Leask, A. The induction of CCN2 by TGFbeta1 involves Ets-1. *Arthritis Res Ther* **8**, R36 (2006).
25. Asano, Y., *et al.* Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* **29**, 425-434 (2009).
26. Distler, J., Gay, S. & Distler, O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic

- sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **45 Suppl 3**, iii26-27 (2006).
27. Mugii, N., *et al.* Reduced red blood cell velocity in nail-fold capillaries as a sensitive and specific indicator of microcirculation injury in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **48**, 696-703 (2009).
 28. Distler, O., *et al.* Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* **95**, 109-116 (2004).
 29. Manetti, M., Guiducci, S., Ibba-Manneschi, L. & Matucci-Cerinic, M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* **14**, 1241-1254 (2010).
 30. Gabrielli, A., Avvedimento, E.V. & Krieg, T. Scleroderma. *N Engl J Med* **360**, 1989-2003 (2009).
 31. Silverstein, J.L., Steen, V.D., Medsger, T.A. & Falanga, V. Cutaneous hypoxia in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Dermatol* **124**, 1379-1382 (1988).
 32. Bouros, D., *et al.* Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1581-1586 (2002).
 33. Hsu, E., *et al.* Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* **63**, 783-794 (2011).
 34. Lafyatis, R., O'Hara, C., Feghali-Bostwick, C.A. & Matteson, E. B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* **56**, 3167-3168 (2007).

35. Barr, T.A., *et al.* B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* **209**, 1001-1010 (2012).
36. Hasegawa, M., *et al.* Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* **25**, 308-313 (1998).
37. Khan, K., *et al.* Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1235-1242 (2012).
38. Giacomelli, R., *et al.* Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor beta 1. *J Rheumatol* **23**, 291-296 (1996).
39. Hasegawa, M., Sato, S., Ihn, H. & Takehara, K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 612-617 (1999).
40. Yokoi, H., *et al.* Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int* **73**, 446-455 (2008).
41. Tong, Z., *et al.* Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes. *Hepatology* **50**, 939-947 (2009).
42. Asano, Y., *et al.* Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* **176**, 1983-1998 (2010).
43. Overbeek, M.J., *et al.* Pulmonary arterial hypertension in limited cutaneous systemic sclerosis: a distinctive vasculopathy. *Eur Respir J* **34**, 371-379 (2009).
44. Chen, S., *et al.* CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in

neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**, L330-340 (2011).

45. Shima, Y., *et al.* Expansion of range of joint motion following treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Mod Rheumatol* (2013).
46. Bosello, S., *et al.* B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Res Ther* **12**, R54 (2010).
47. Sato, S., Hasegawa, M. & Takehara, K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* **27**, 140-146 (2001).
48. Yamamoto, T., *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* **112**, 456-462 (1999).
49. Bujor, A.M., Asano, Y., Haines, P., Lafyatis, R. & Trojanowska, M. The c-Abl tyrosine kinase controls protein kinase C δ -induced Fli-1 phosphorylation in human dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* **63**, 1729-1737 (2011).

図1

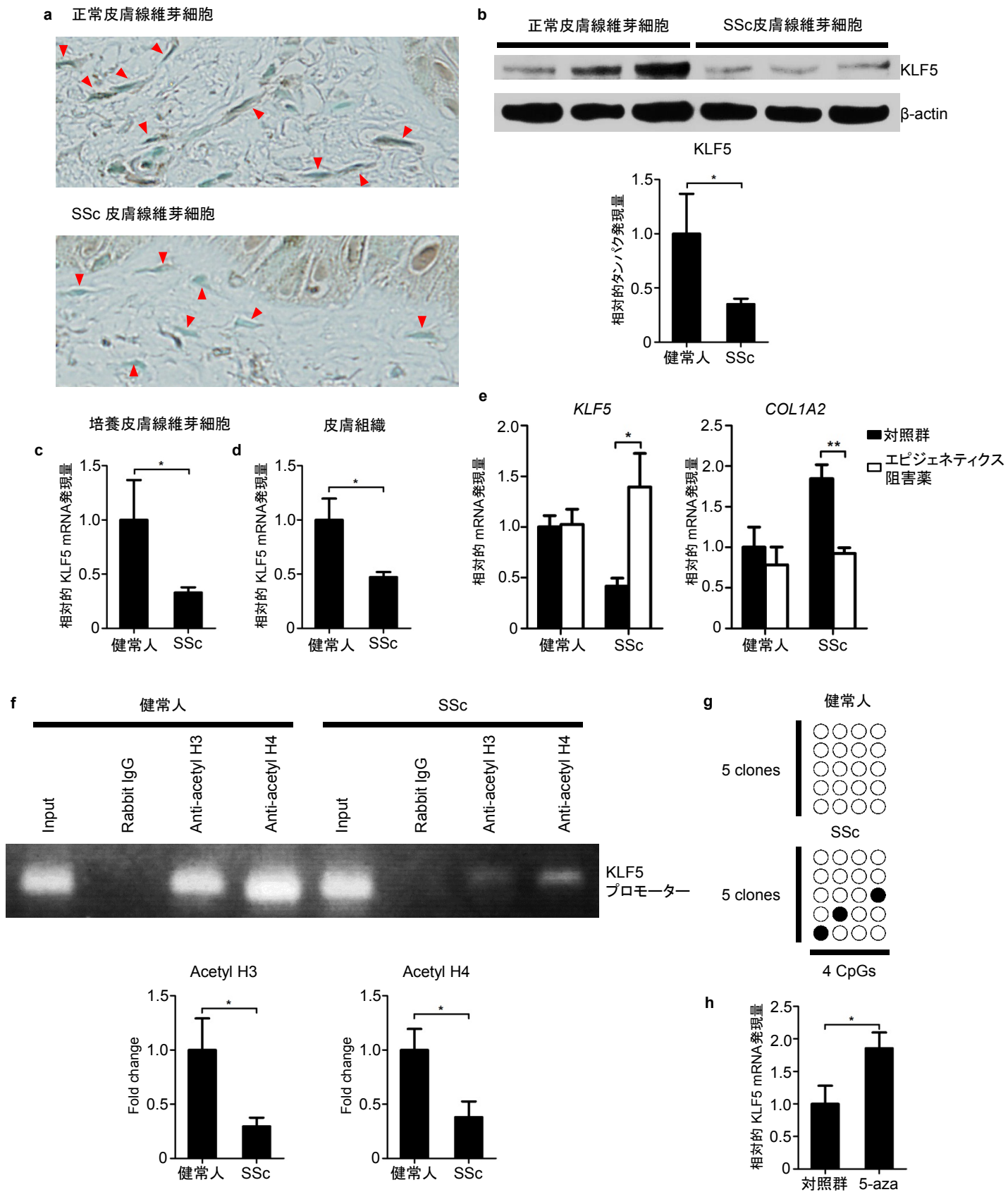


図1

KLF5の発現は epigenetic制御により全身性強皮症(SSc)の皮膚線維芽細胞では減少している。(a) ヒト皮膚組織のKLF5染色。赤い矢印が皮膚線維芽細胞を示している。(b) 培養皮膚線維芽細胞におけるKLF5タンパクの発現。下部のパネルはdensitometric analysesの結果を示している。 $n = 3$ 。もう一つの異なるグループの3人のSSc患者と3人の健常人で同じ実験を行い、類似の結果が得られた。(c) KLF5 mRNAの培養皮膚線維芽細胞における発現。 $n = 5$ (健常人)、 $n = 8$ (SSc)。(d) KLF5 mRNAの皮膚組織における発現。 $n = 8$ 。(e) 培養皮膚線維芽細胞を2つの エピジェネティクス阻害薬(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza, 5 μ Mとtrichostatin A, 2 μ M)で48時間処理した。KLF5とCOL1A2のmRNAレベルを測定した。(f) anti-acetyl histone H3 or H4抗体を培養正常皮膚線維芽細胞に用いて クロマチン免疫沈降法を行った。PCRはKLF5プロモーターに特異的なプライマーを用いて行った。下のパネルは定量的リアルタイムPCRの結果を示している。(g) KLF5上のCpGアイランド。黒丸はメチル化されたCpG、白丸は非メチル化されたCpGを示す。シーケンスを行った領域は 4つのCpGを含み、転写開始点から -273から-210 bpの領域である。4人のSSc患者と4人の健常人から得られた5クローンを解析した。(h) 培養正常皮膚線維芽細胞を5-aza (5 μ M)で48時間処理した。KLF5 mRNA の発現量を測定した。(a,b,f,g)代表的な結果を示した。(b-f, h)データはmean + s.e.mで示した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。Two-tailed unpaired t-test。(a,e,f,h) $n = 5$ 。

図2

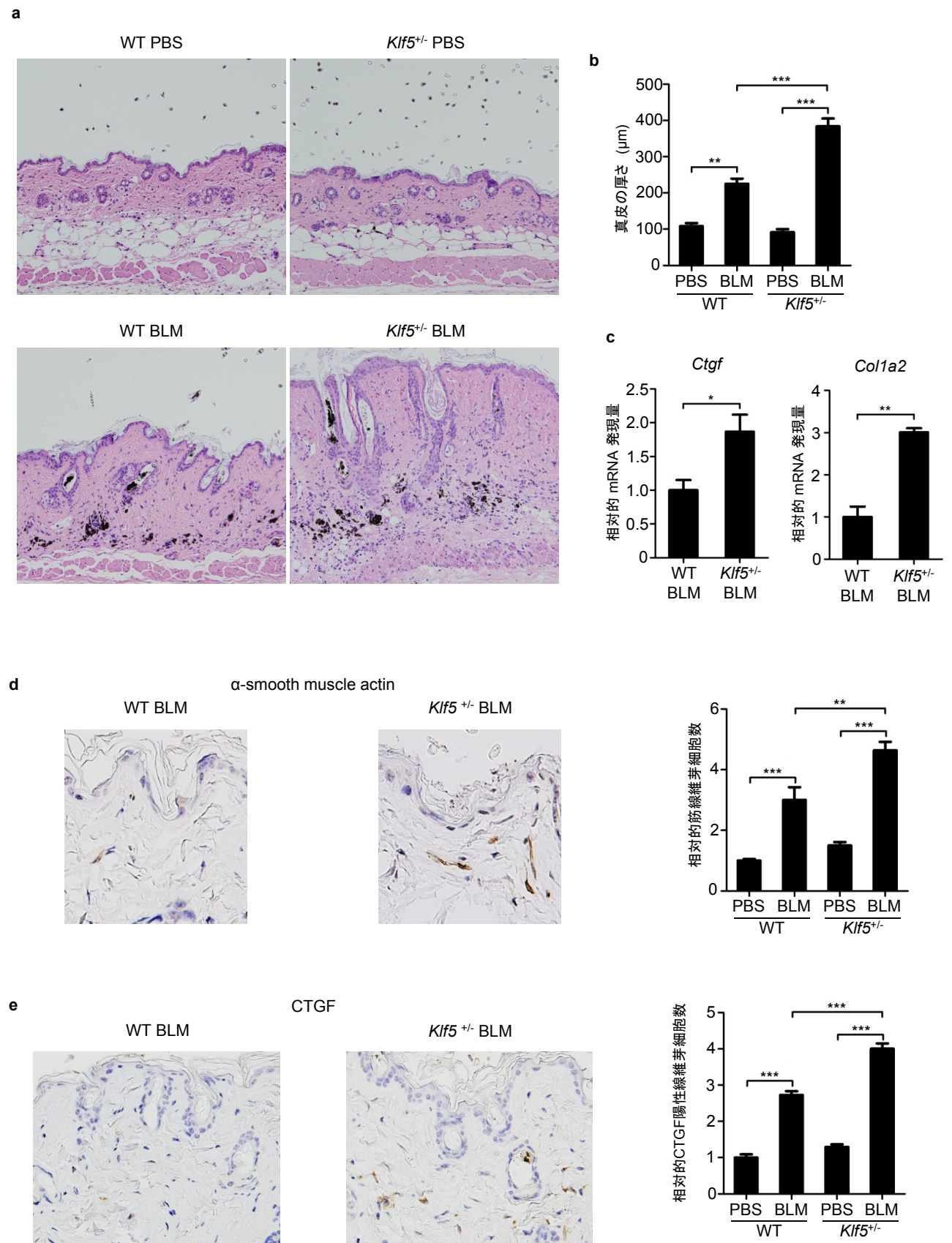


図2

*Klf5*のヘテロ欠損はブレオマイシン(BLM)誘導性皮膚線維化を増悪させる。6週齢の雌マウス背部皮下にBLM (300 μ g隔日投与を3週間) を注射した。(a)野生型(WT)マウスと*Klf5*^{+/-}マウスに対してphosphate buffered saline (PBS) またはBLMを注射した後の代表的な背部皮膚組織像を100倍の倍率で示す。(b)真皮の厚さをグラフに示す。(c) *Ctgf* と *Col1a2* の皮膚組織におけるmRNA発現量。(d,e)真皮中の筋線維芽細胞(α -SMA陽性細胞)とconnective tissue growth factor (CTGF)陽性線維芽細胞の相対数を示す。High power field (hpf) 中の数をPBS注射を行ったWTマウスを1として相対値を表示する。 $n = 3-4$ 。すべてのグラフはmean + s.e.m.。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。One-way ANOVA with Bonferroni correction (多群間比較)、two-tailed unpaired t-test (2群間比較)。異なるグループのマウスでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

図3 a

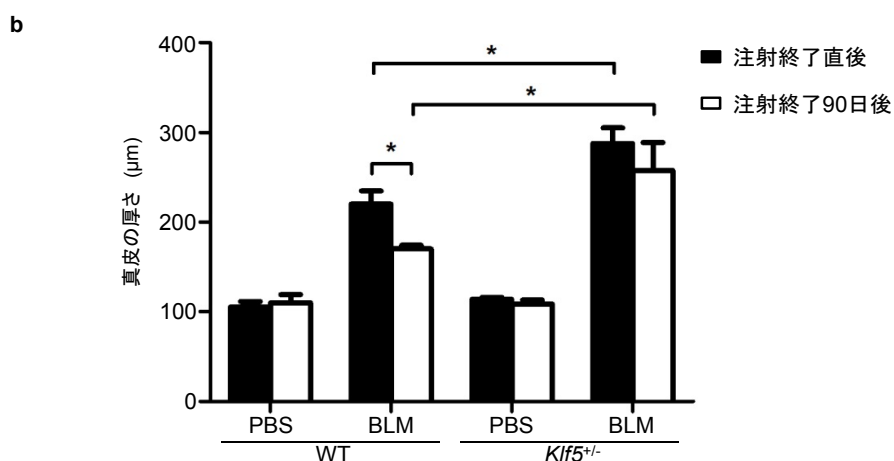
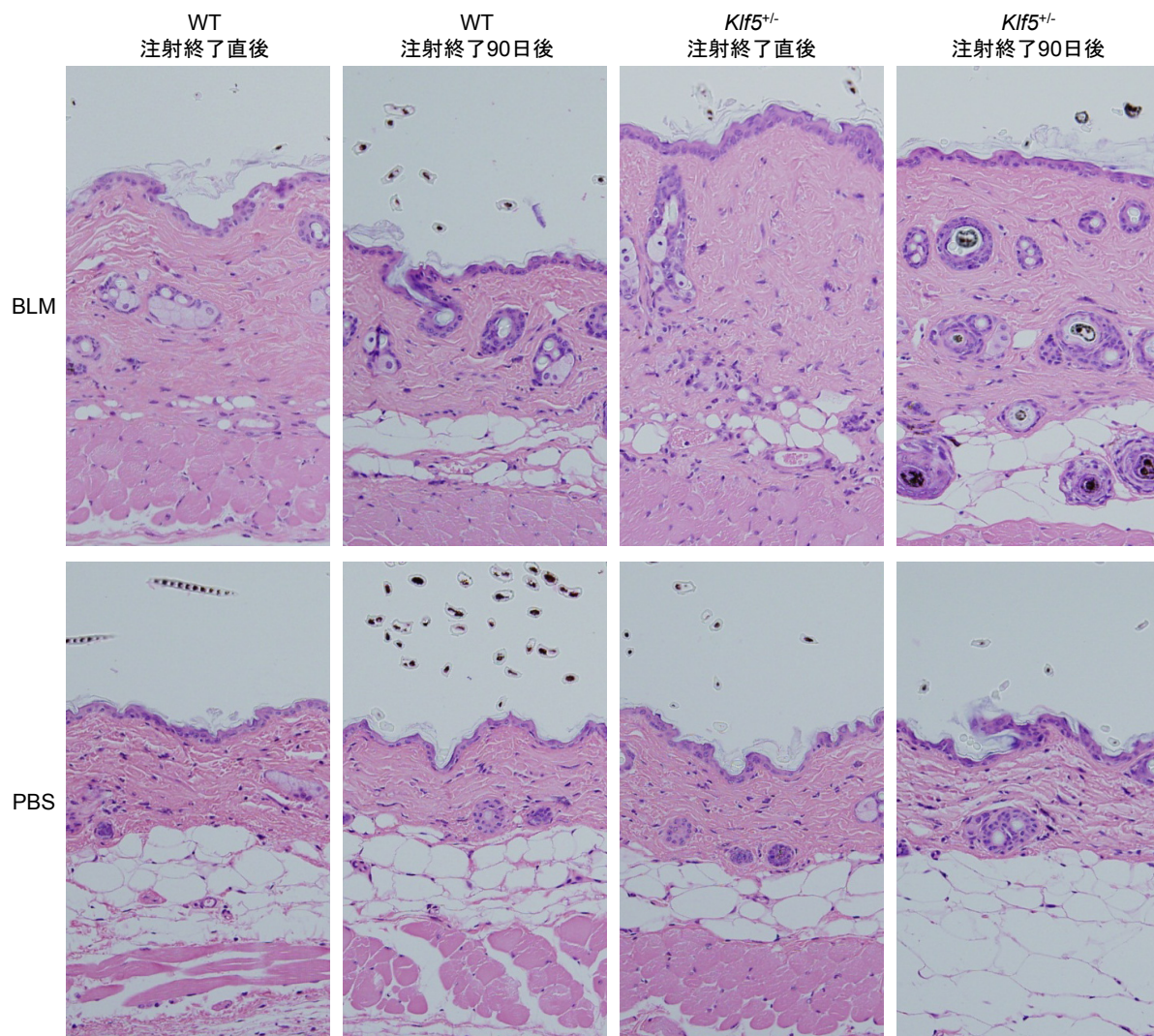


図3

ブレオマイシン (BLM) 誘導性の皮膚線維化は $Klf5^{+/-}$ マウスでより長く維持された。6週齢の雌マウス背部皮下にBLM (100 μ g隔日投与を3週間) を注射した。皮膚組織は注射終了後1日後 もしくは90日後 に採取された。(a)野生型 (WT) マウスと $Klf5^{+/-}$ マウスに対してphosphate buffered saline (PBS) またはBLMを注射した後の代表的な背部皮膚組織像を100倍の倍率で示す。(b)真皮の厚さをグラフに示す。 $n = 4$ 。すべてのグラフはmean + s.e.m.。* $P < 0.05$ 。Two-tailed unpaired t-test。

図4

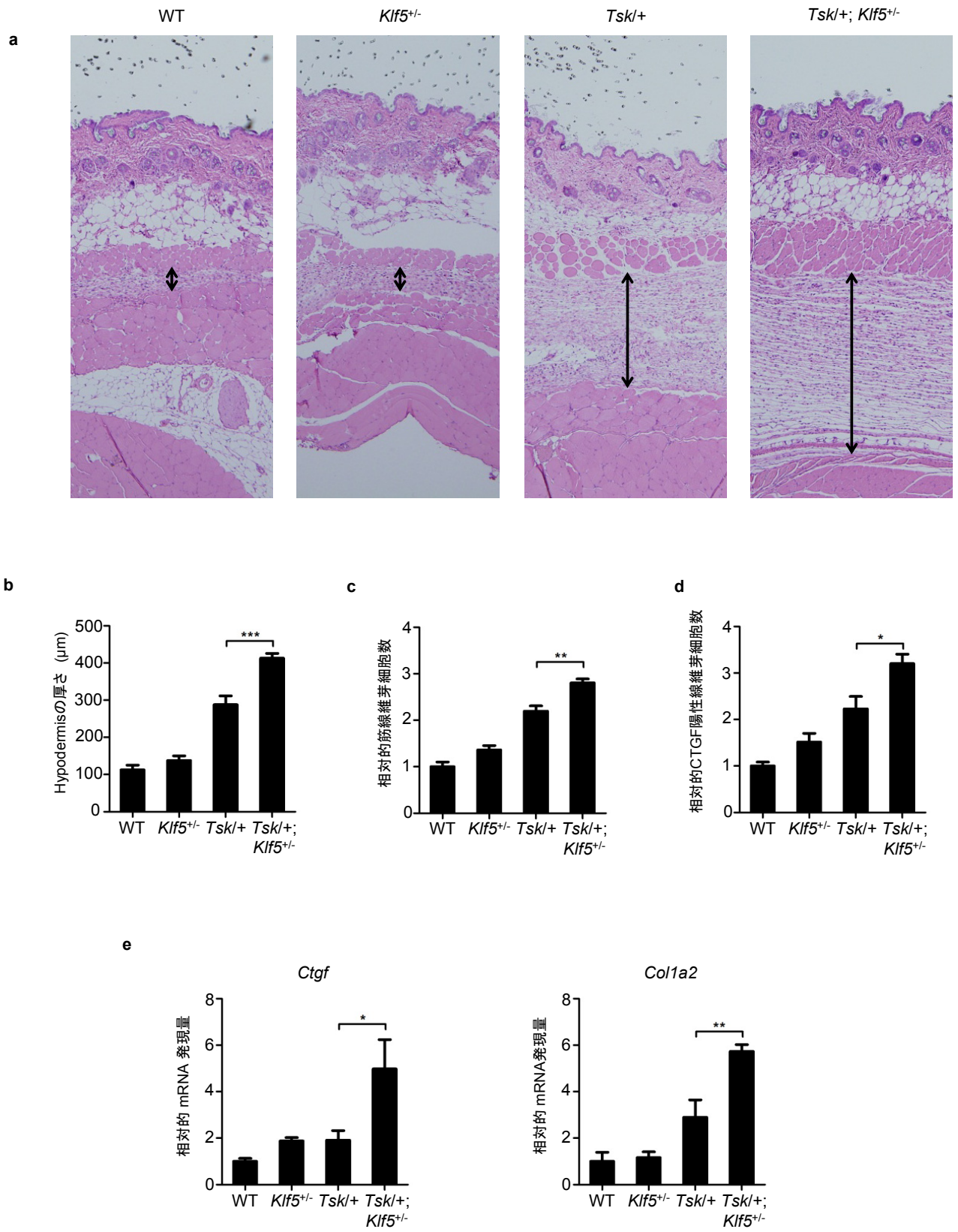


図4

*Klf5*のヘテロ欠損は*Tsk/+*におけるhypodermisの肥厚を増悪させる。(a) *Tsk/+* マウスと*Klf5*^{+/-} マウスを交配して出現する4群のマウスの代表的な皮膚組織像100倍の倍率で示す。(b)hypodermisの厚さをグラフで示す。(c,d)hypodermis中の筋線維芽細胞(α-SMA陽性細胞)とconnective tissue growth factor (CTGF)陽性線維芽細胞の相対数を示す。High power field (hpf) 中の数をWTマウスを1として相対値を表示する。(e) 皮膚組織中の*Ctgf*と*Col1a2* のmRNA発現量を示す。 $n = 4$ 。すべてのグラフはmean + s.e.m.。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。One-way ANOVA with Bonferroni correction。

図5

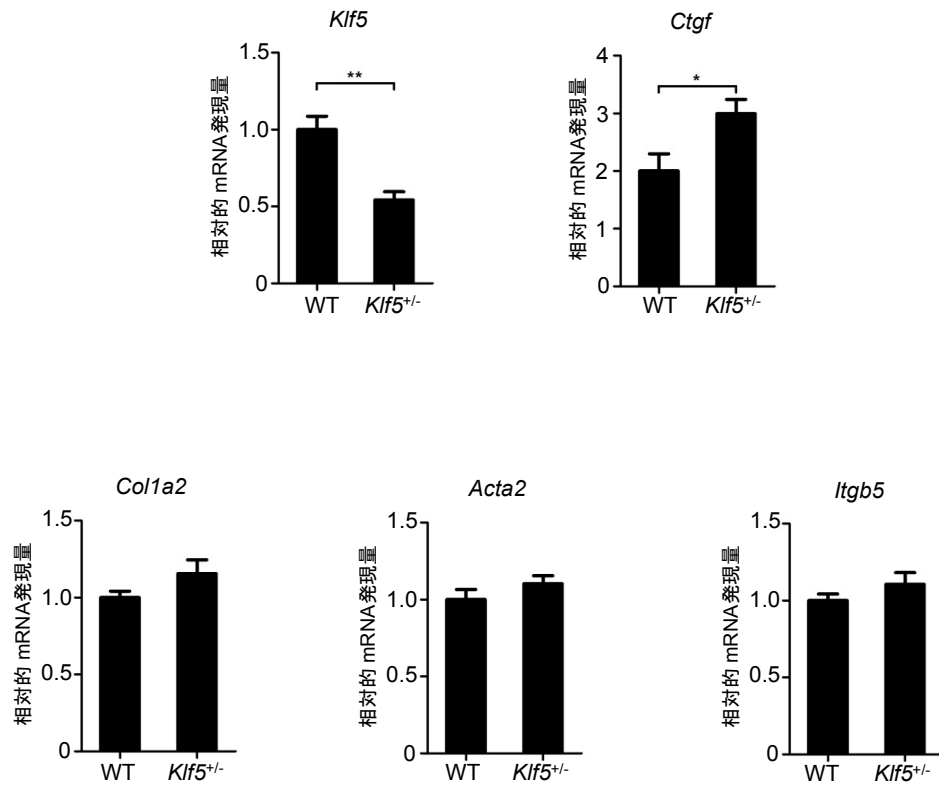


図5

Klf5^{+/-} マウスから採取した培養皮膚線維芽細胞では、線維化を亢進する分子の中で、CTGFのmRNAレベルのみ野生型マウスと比較して上昇していた。*Klf5*, *Ctgf*, *Col1a2*, *Acta2* (α -smooth muscle actin), *Itgb5* (integrin β 5) の mRNA発現量を定量的リアルタイムPCRを用いて測定した。 $n = 4$ 。データはmean + s.e.m.。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Two-tailed unpaired t-test。

図6

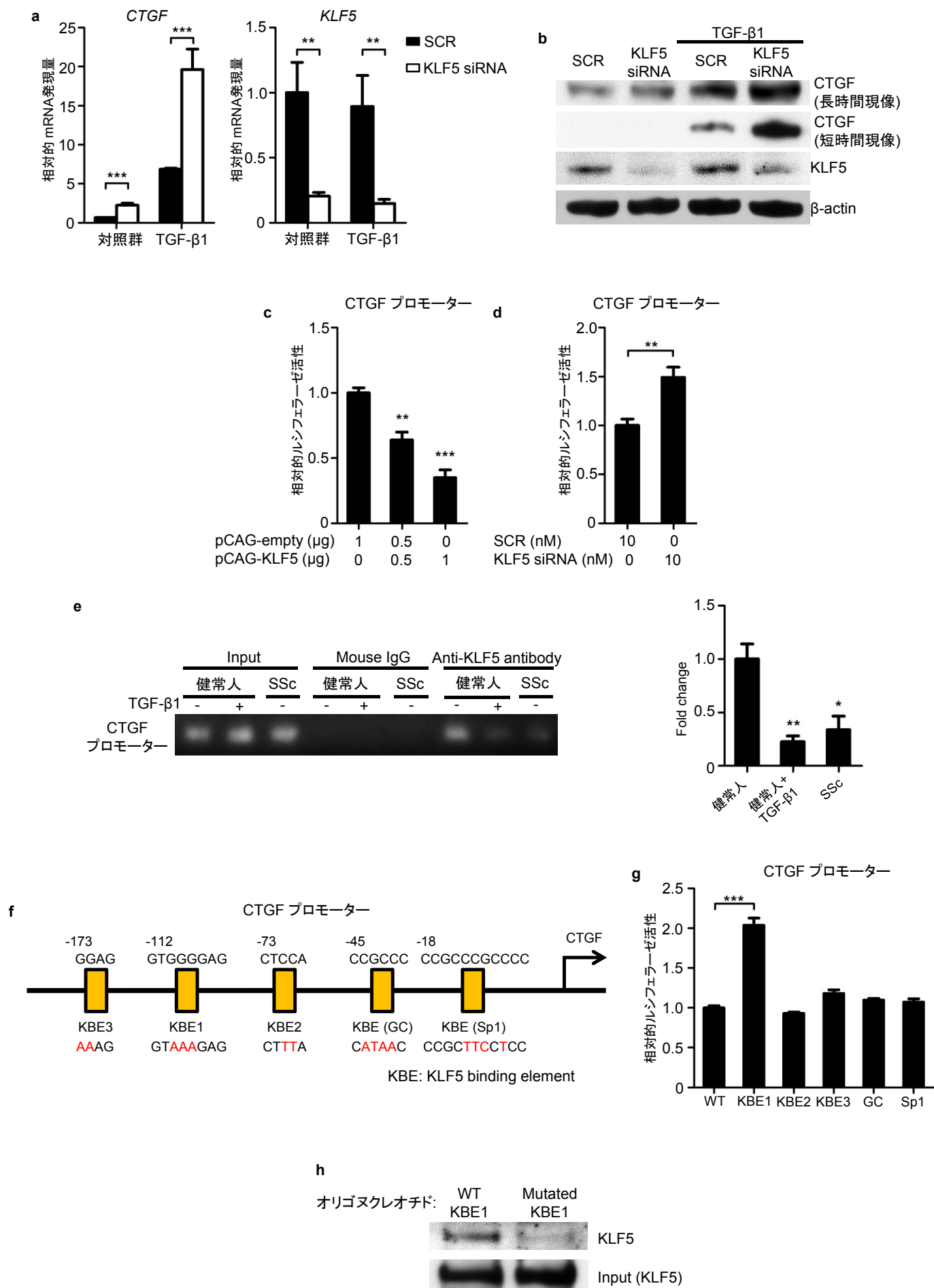


図6

KLF5はCTGF遺伝子の転写抑制因子である。(a,b) ヒト包皮線維芽細胞に対してscrambled control RNA (SCR) または KLF5 siRNA をトランスフェクションして24時間培養し、その後に血清飢餓状態でTGF- β 1 (2 ng/ml)にて24時間刺激した。KLF5とCTGFのmRNAとタンパク発現量を測定した。(c) ヒト包皮線維芽細胞に対してCTGFプロモーターベクターとKLF5過剰発現ベクターをトランスフェクションし、30時間後にプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。(c) ヒト包皮線維芽細胞に対してCTGFプロモーターベクターとSCRもしくはKLF5 siRNAをトランスフェクションし、30時間後にプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。(e) ヒト皮膚線維芽細胞に対してクロマチン免疫沈降法を用い、CTGFプロモーター上でのKLF5の結合の有無を調べた。Inputを陽性コントロール、マウスIgGを陰性コントロールとして用いた。定量的リアルタイムPCRにより結合量を定量化し、Inputで補正したグラフを下に示す。 $n = 4$ 。(f) CTGFプロモーター上のKLF5が結合する可能性のある部位を示す。変異させた配列は赤字で示す。KBE, KLF5-binding element。(g) 変異したCTGFプロモーターベクターを用いてcと同様にルシフェラーゼアッセイを行った。(h) Oligonucleotide pull-down assay を、正常なKBE1の配列を含むオリゴヌクレオチドもしくは変異したKBE1の配列をもつoligonucleotideを用いて行った。Inputにはoligonucleotideを結合させる前の正常皮膚線維芽細胞からの核内抽出物を用いた。グラフのデータは3回独立した実験を繰り返して得られた3つの値のmean + s.e.m。プロット写真は3回独立した実験を行い、代表的なデータを提示した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。Two-tailed unpaired t-test。c,e では有意差は最も左のグループと比較して表示している。

図7

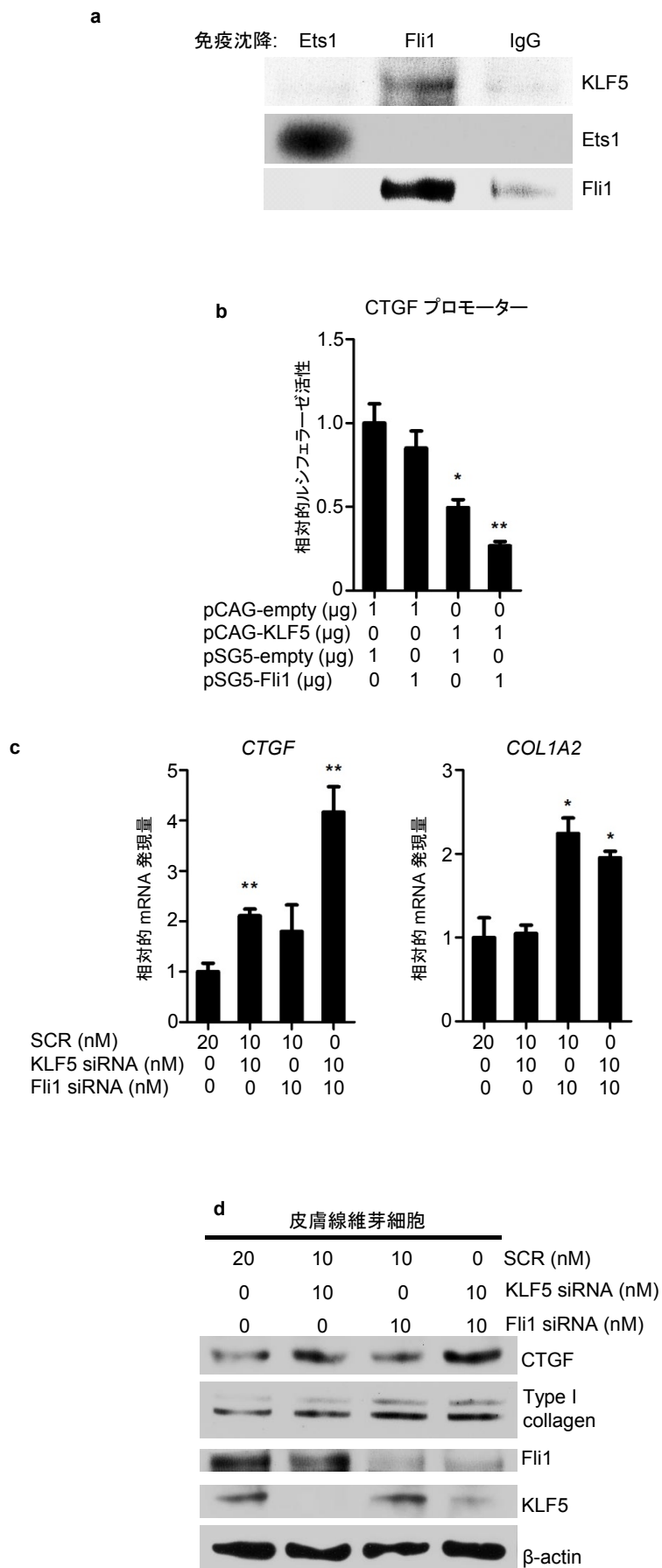


図7

KLF5とFli1は共同してCTGF遺伝子の転写を抑制する。(a) 核内抽出物を抗Ets1抗体、抗Fli1抗体で免疫沈降させ、得られたタンパクをブロットした。陰性コントロールとしてウサギIgGを用いた。(b) ヒト包皮線維芽細胞に対してKLF5過剰発現ベクターとFli1過剰発現ベクターを同時にトランスフェクションし、30時間後にプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定した。(c,d) ヒト包皮線維芽細胞に対してscrambled control RNA (SCR)、KLF5 siRNA、Fli1 siRNAをトランスフェクションして48時間培養し、その後24時間血清飢餓状態にして*Ctgf*と*Col1a2*のmRNAとタンパク発現量を測定した。dのバンド下の数値はdensitometryの結果。グラフのデータは3回独立した実験を繰り返して得られた3つの値のmean + s.e.m。ブロット写真は3回独立した実験を行い、代表的なデータを提示した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。Two-tailed unpaired t-test。b,c では有意差は最も左のグループと比較して表示している。

図8

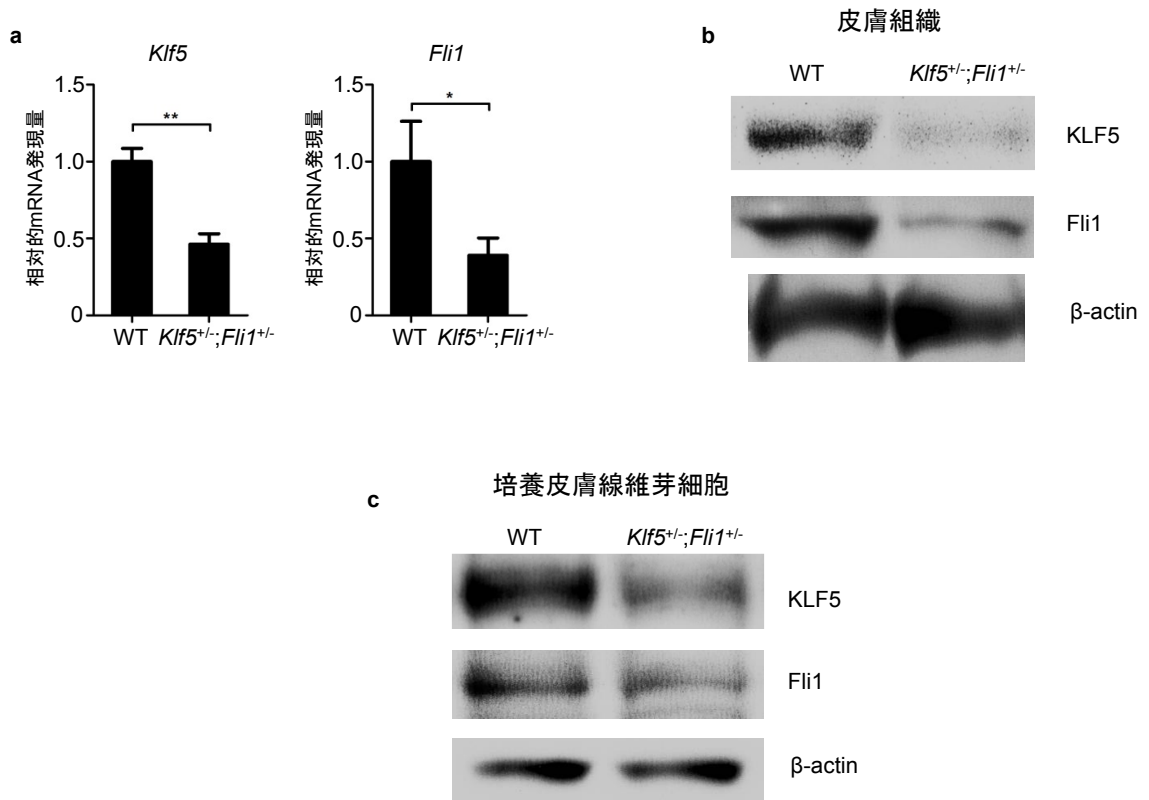


図8

Klf5^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスにおける皮膚組織でのKLF5とFli1の発現量は野生型マウスの約半量である。(a) マウス皮膚における*Klf5*と*Fli1*のmRNA発現量。 $n = 8$ 。データはmean + s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。(b) マウス皮膚におけるKLF5とFli1のタンパク発現量。 $n = 4$ で実験を行い、代表的な写真を提示した。(c) 培養皮膚線維芽細胞におけるKLF5とFli1のタンパク発現量。 $n = 4$ で実験を行い、代表的な写真を提示した。

図9

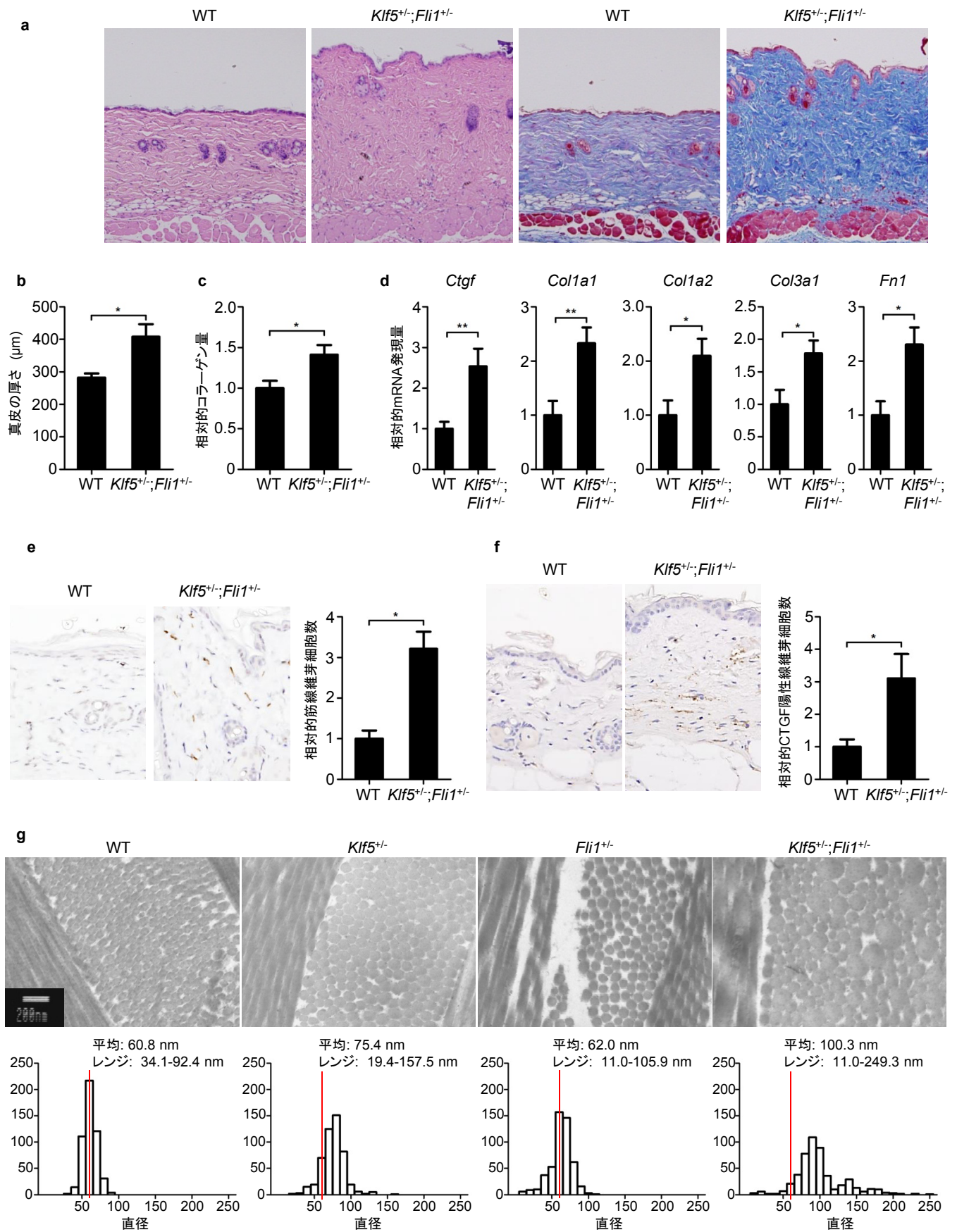
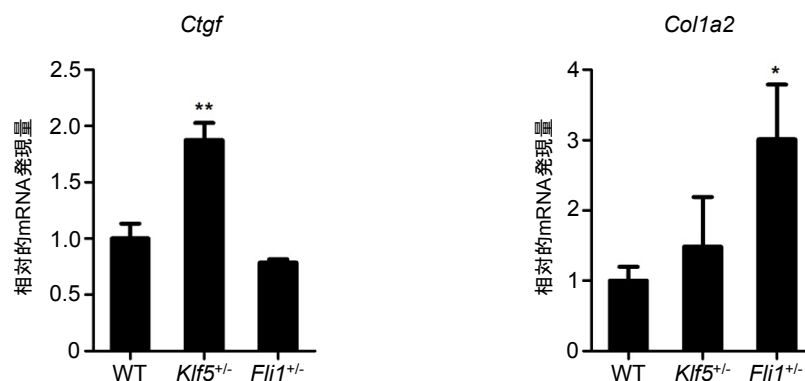


図9

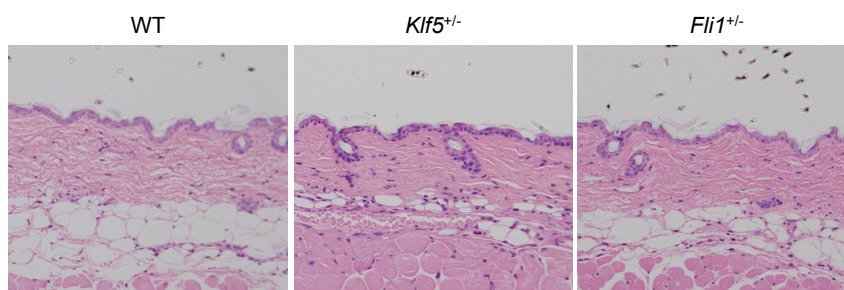
Klf5^{+/-};Fli1^{+/-} マウスは自然に皮膚線維化を発症する。(a) 3カ月齢雄マウスの背部皮膚の写真を100倍の倍率で示す。各グループ7匹ずつからの代表的な写真を示す。右の写真はMasson's trichrome染色。(b) 真皮の厚さを示す。 $n = 7$ 。雌マウスでも実験を行い、同様の結果が得られた。(c) 皮膚組織中のコラーゲン含有量をtotal collagen assayを用いて測定し、相対値で示した。 $n = 8$ 。(d) 細胞外基質を構成する分子のmRNA発現量を定量的リアルタイムPCRで測定した。 $n = 8$ 。(e,f) 真皮中の筋線維芽細胞(α -SMA陽性細胞)とconnective tissue growth factor (CTGF)陽性線維芽細胞の相対数を示した。 $n = 5$ 。(g) 透過型電子顕微鏡でマウス背部皮膚を観察した。コラーゲン細線維の縦断像と横断像が示されている。倍率は20000倍。径の平均、レンジ、径ごとの頻度はそれぞれのグループで500本の細線維で細小径を測定した結果である。ヒストグラムの赤い線は野生型マウスで最も高い頻度で見られた径を示している。データは mean + s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Two-tailed Mann-Whitney U test。

図10

a



b



c

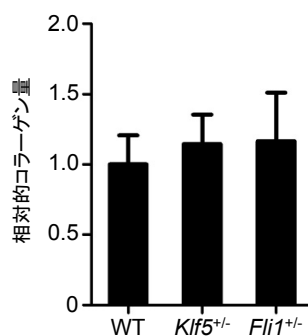


図10

Klf5^{+/-} マウス、*Fli1*^{+/-} マウスの両者とも真皮肥厚とコラーゲン含有量の上昇を示さない。(a) 野生型 (WT)、*Klf5*^{+/-} マウス、*Fli1*^{+/-} マウスで *Ctgf* と *Col1a2* の mRNA 発現量を定量的リアルタイムPCRで測定した。(b) 3カ月齢のマウスでの背部皮膚組織を示す。代表的な写真を100倍の倍率で示す。(c) total collagen assayで測定した皮膚組織のコラーゲン含有量を示す。 $n = 4$ 。データは mean + s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Two-tailed unpaired t-test。統計学的有意差は、WTマウスと比較した。

图 11

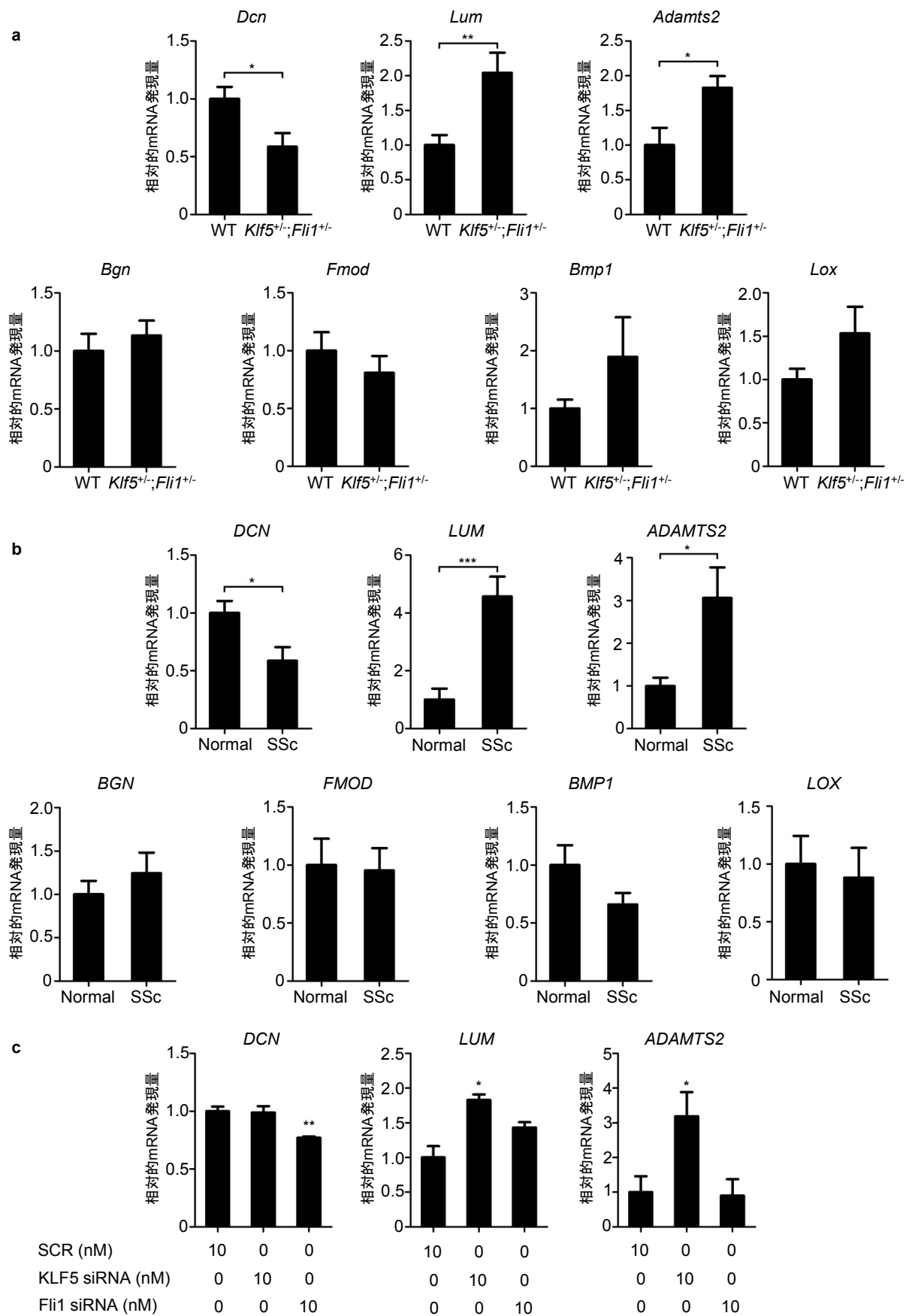


図11

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスではfibrillogenesisに関連する遺伝子の発現に異常がある。(a) 野生型 (WT) マウスと*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの皮膚組織におけるfibrillogenesis関連遺伝子のmRNA 発現量。 *n* = 7。(b) 健常人とSSc患者の皮膚組織におけるfibrillogenesis関連遺伝子のmRNA 発現量。 *n* = 7。(c) ヒト包皮線維芽細胞にscrambled control RNA (SCR)、KLF5 siRNA、Fli1 siRNAをトランスフェクションして48時間培養し、さらに血清飢餓状態にして24時間培養した。検体を回収し、各種遺伝子のmRNA発現量を測定した。統計学的有意差はSCR群と比較した。*n* = 3-4回の独立した実験の mean + s.e.m.。**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。Two-tailed unpaired t-test。

図12

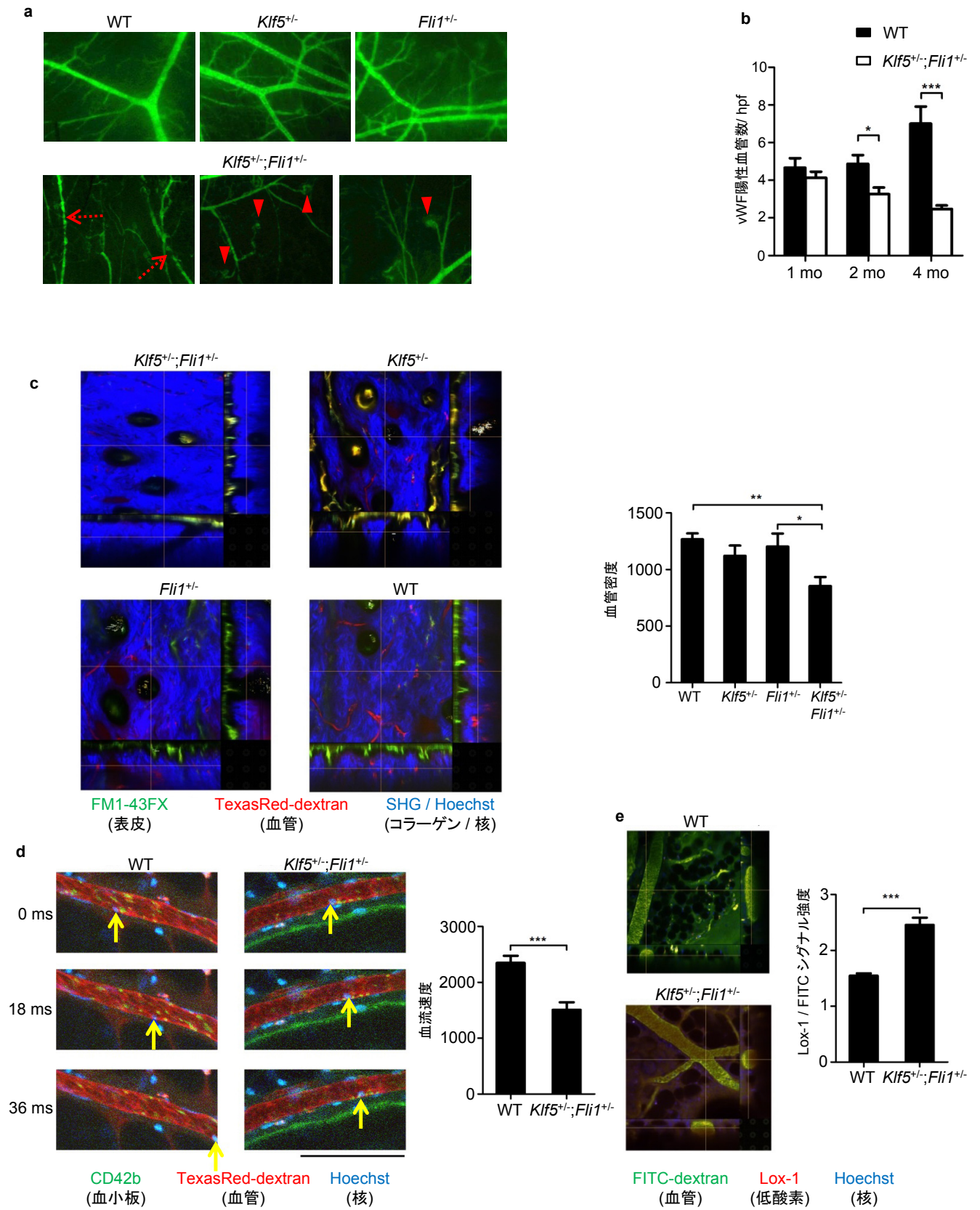


図12

Klf5^{+/-};Fli1^{+/-} マウス皮膚は血管傷害、血管床の減少、血流低下、組織低酸素化を示す。(a) 皮膚血管は尾静脈からFITC-デキストランを注射する事で描出された。*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスは血管の狭窄(矢印)、異常な血管構造(矢印頭)を示した。 $n = 3$ の中で代表的な写真を示す。(b) von Willebrand factor (vWF)染色により皮下血管の数を測定した。各月齢で3匹中、 $n = 15$ high power fields (hpf)の中で血管数を測定した。(c-e) 生体イメージングで4カ月齢マウスの皮膚組織を観察した。表皮、血管、コラーゲン、血小板、核、低酸素マーカーに対して図に示した染色を施し、3色で観察した。(c)それぞれのグループにおいて左上の写真が一定の深さでの横断像であり、その右と下に位置する写真が縦断像である。血管の密度を測定した。それぞれのグループで4匹ずつ、計 $n = 20$ の視野で測定した。(d) 皮膚の細動脈。黄色の矢印は同じ白血球の動きを18ミリ秒ごとに追っている。細動脈の血流速度を測定した。それぞれのグループで3匹ずつ、 $n = 15$ 視野で測定した。(e) 間質の低酸素化を、低酸素化マーカー (Lox-1)を用いて測定した。それぞれのグループで4匹ずつ、 $n = 20$ 視野で測定した。データはmean + s.e.m。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。cは one-way ANOVA with Bonferroni correction。

図13

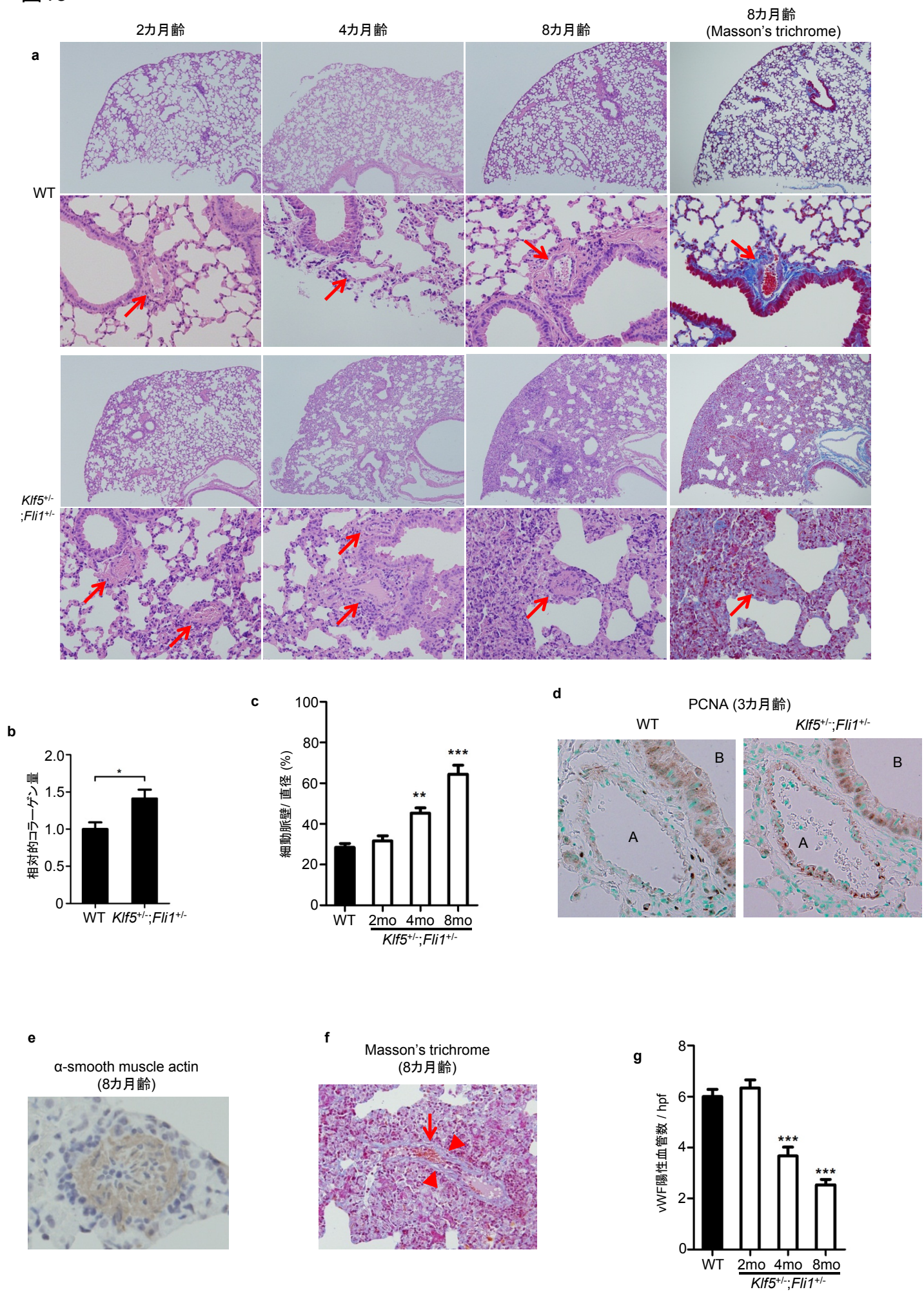


図13

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスはSSc患者の間質性肺炎に類似した肺病変を示す。(a) 野生型(WT)マウスと*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの肺組織を2, 4, 8カ月齢で示す。倍率は40倍と400倍の両者で示す。左3列のパネルはhematoxylin and eosin染色、右1列のパネルはMasson's trichrome stainingの代表的な写真を示している。矢印は気管支細動脈である。それぞれの時点で、7匹のマウスの組織を調べた。(b) total collagen assayで測定したコラーゲン含有量の相対値を示す。 $n = 4$ 。(c) *Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおける細動脈の狭窄を定量化した。血管壁の厚さを全血管径で割った%を表示した。それぞれの時点で3匹のマウスで計 $n = 15$ 血管の値を測定した。(d) 3カ月齢のマウスにおけるProliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色。Aは細動脈、Bは細気管支を示す。(e) 8カ月齢の*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおける肺組織の狭窄した細動脈を示す。 α -SMA染色。倍率は400倍。(f) 8カ月齢の*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスにおける隔壁間の細静脈を示す。Masson's trichrome染色の結果を示す。内膜は線維化し、血管周囲にリンパ球の浸潤がみられる。矢印頭は内腔の狭窄を示す。矢印は赤血球の鬱滞を示す。(g) 肺における血管数をvon Willebrand factor (vWF)染色により測定した。hpf, high power field。すべてのグラフのデータはmean + s.e.m。 $*P < 0.05$, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。c,g での統計学的有意差はWT群と比較している。

図14

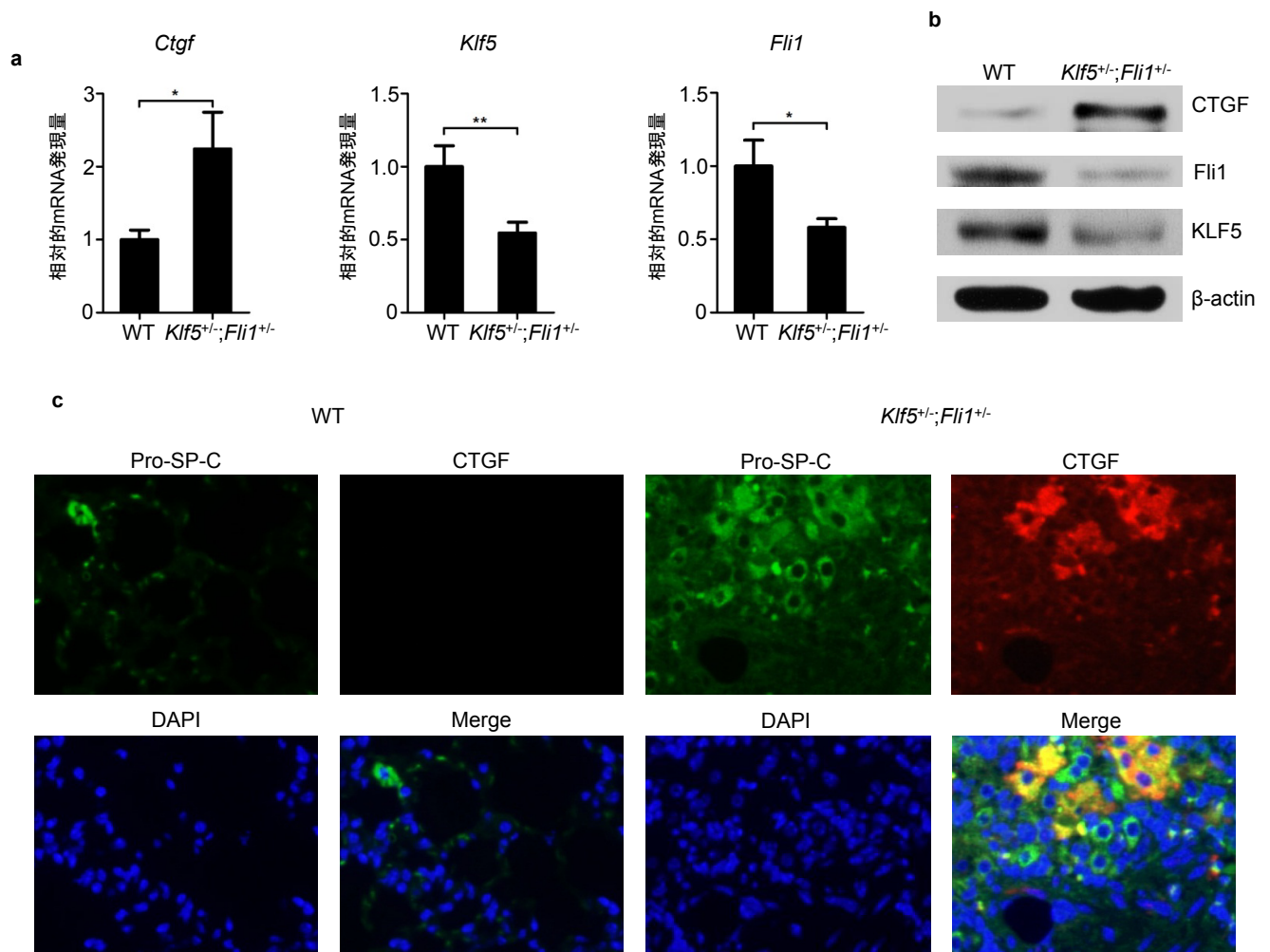


図14

Klf5^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスの2型肺胞上皮細胞ではconnective tissue growth factor (CTGF) の発現量が大きく増加している。(a) *Ctgf*, *Klf5*, *Fli1* の mRNA発現量を肺組織において定量的リアルタイムPCRで測定した。 $n = 9$ 。データはmean + s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。(b) *Ctgf*, *Klf5*, *Fli1* のタンパク発現量を肺組織において免疫ブロットで測定した。結果は異なる組のマウスを用いて3回独立した実験を行ったものの代表例である。(c) 野生型(WT)マウスと*Klf5*^{+/-}; *Fli1*^{+/-} マウスにおいて2型肺胞上皮細胞のマーカであるpro-surfactant protein C (pro-SP-C)とCTGFで二重染色を行った。Pro-SP-CはFITC (緑)、CTGFはAlexa Flour 555 (赤)、核を4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 青)で染色した。3回独立した実験を行い、その代表例を示す。

図15

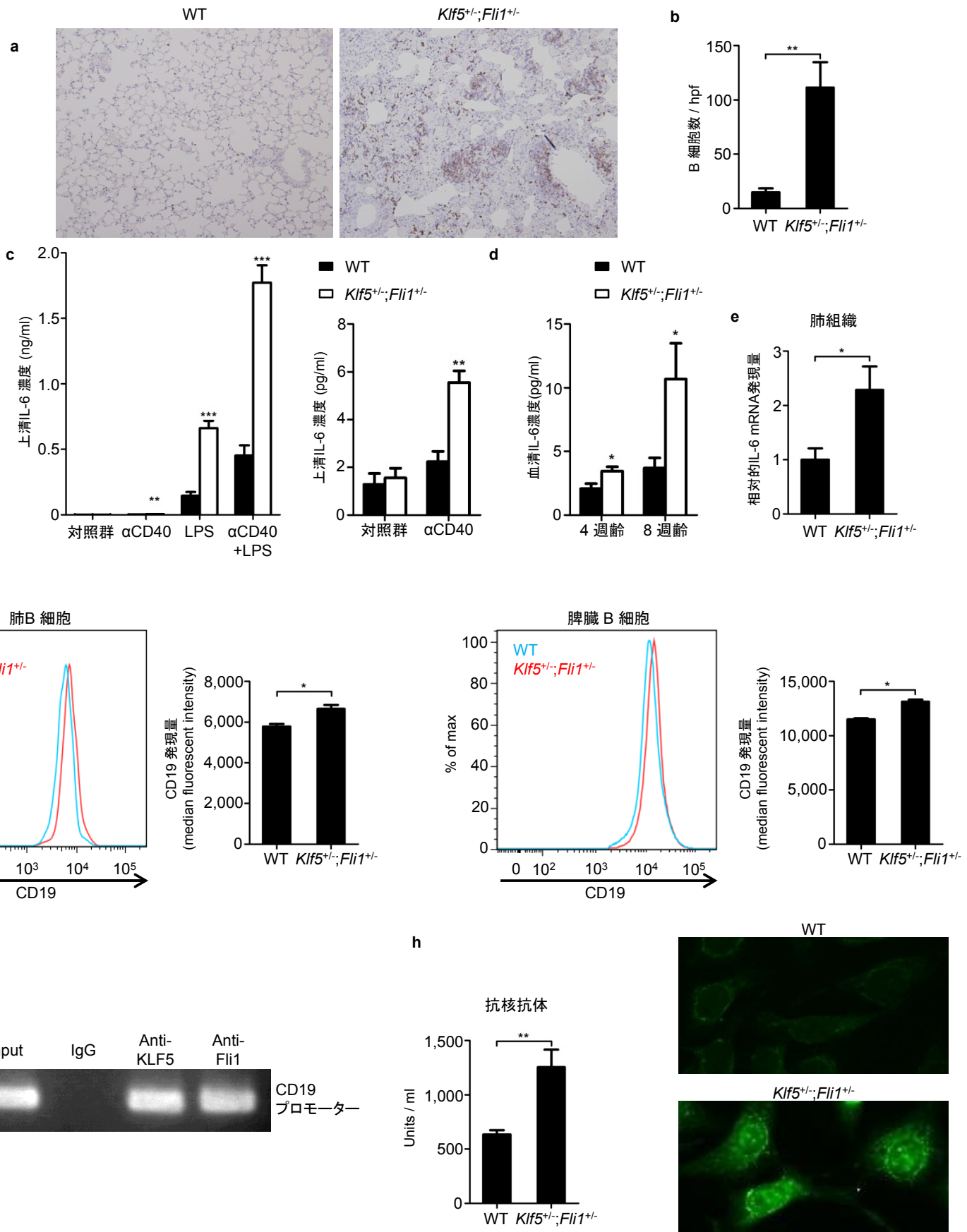


図15

Klf5^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでのB細胞活性化と自己抗体産生。(a) 8カ月齢の野生型(WT)マウスと*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスでの代表的な肺組織。B細胞特異的なB220染色の結果を示す。(b) B細胞の数を肺組織で測定した。 $n = 8$ 。(c) B細胞は2カ月齢のマウスの脾臓からCD19陽性細胞をMACS磁気ビーズで採取した。その後、lipopolysaccharide (LPS)と抗CD40抗体 (α CD40)で48時間刺激した。上清中のIL-6の値をELISAで測定した。それぞれのグループで4匹ずつのマウスからduplicateにして刺激を行った計8検体の値を示す。無刺激時と α CD40単独刺激時のIL-6の値が小さかったため、右に別のグラフとして掲載した。(d) マウス血清のIL-6値を4週齢と8週齢においてELISAで測定した。 $n = 7$ 。(e) 肺組織中のIL-6 mRNA発現量を定量的リアルタイムPCRで測定した。 $n = 7$ 。(f) 肺と脾臓B細胞中のCD19の発現量をMedian fluorescent intensityで比較した。 $n = 5$ 。(g) クロマチン免疫沈降によるCD19プロモーターとKLF5、Fli1との相互作用。ネガティブコントロールとしてIgG、ポジティブコントロールとしてInputを用いた。(h) マウス血清中の抗核抗体をELISA(左)とHep-2細胞(右)を用いて検出した。陽性例では核内に点状の染色がみられ、細胞質も淡く染まっていた。データはmean + s.e.m.。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ 。Two-tailed Mann-Whitney U test。(c,d) 統計学的有意差はWT群と比較した。

図16: *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスにおける特徴のサマリー

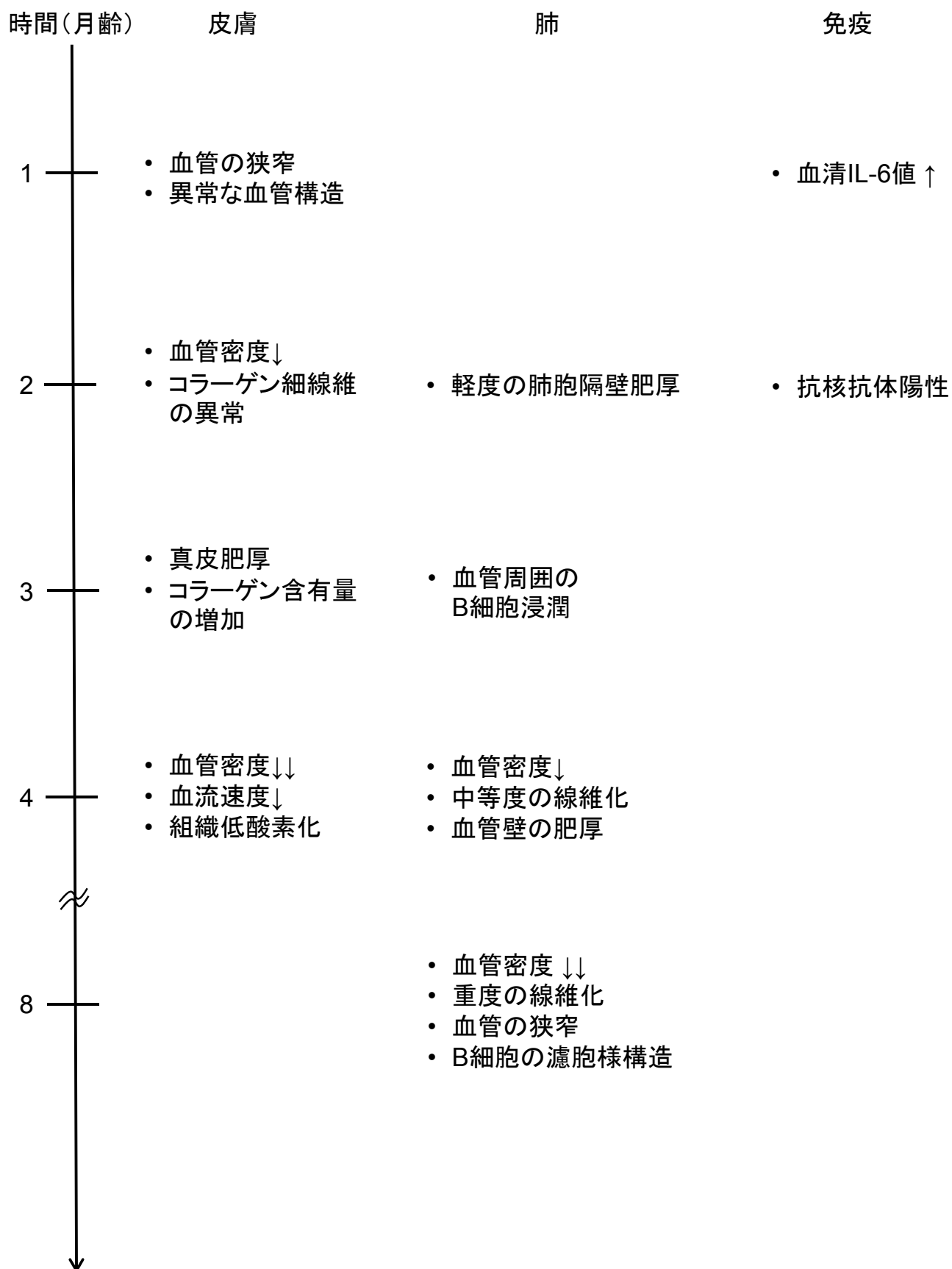


図17: SSc患者と*Klf5*^{+/-};*Fli1*^{+/-} マウスの類似点と相違点

- 類似点
 - 血管障害
 - 皮膚の血管密度低下
 - 皮膚血管・肺細動静脈の狭窄
 - 皮膚血管の構造異常
 - 皮膚血管血流速度低下
 - 皮膚組織低酸素化
 - 線維化
 - 真皮肥厚、肺間質線維化
 - 皮膚、肺におけるコラーゲンの蓄積
 - 真皮コラーゲン細線維の直径変化
 - Fibrillogenesis関連遺伝子の発現異常
 - 炎症
 - B細胞活性化
 - IL-6産生亢進
 - 自己免疫
 - 抗核抗体陽性
- 相違点
 - 血管障害
 - 肉眼的血管拡張の欠如
 - 血流障害による潰瘍形成なし
 - 線維化
 - 触診で判定できない
 - 自己免疫
 - 抗topoisomerase I抗体陰性

表1

定量的リアルタイムPCRに用いたプライマーの配列。プライマーは5'末端から3'末端に配列を並べた。

| Gene | Human | Mouse |
|----------------|--|--|
| <i>Klf5</i> | CCCTTGACATACACAATGC GGATGGAGGTGGGGTTAAAT | TGGTTGCACAAAAGTTTATAC GGCTTGGCGCCCGTGTGCTTCC |
| <i>Fli1</i> | GGATGGCAAGGAACTGTGTAA GGTTGTATAGGCCAGCAG | ACTTGGCCAAATGGACGGGACTAT CCCGTAGTCAGGACTCCCG |
| <i>Ctgf</i> | TTGCGAAGCTGACCTGGAAGAGAA AGCTCGGTATGTCTTCATGCTGGT | GTGCCAGAACGCACACTG CCCCGGTTACACTCCAAA |
| <i>Col1a2</i> | GATGTTGAACTTGTGCTGAGG TCTTTCCCATTCATTTGTCTT | GGAGGGAACGGTCCACGAT GAGTCCGCGTATCCACAA |
| <i>Dcn</i> | TGCAGGTCTAGCAGAGTTGTGT AATGCCATCTTCGAGTGGTC | TGAGCTTCAACAGCATCACC AAGTCATTTTGCCCAACTGC |
| <i>Lum</i> | CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC | AGATGCTTGATCTTGGAGTAAGA CAATGAACTTGAAAAGTTTGATG |
| <i>Fmod</i> | CCACTTCACCCACTCCACTT CTGGTGACCTCCAATCTGGT | CAATGTCTACACCGTCCCTGA AGAAGGCTGCTGGAGTTGAAG |
| <i>Lox</i> | GTGGCCGACCCCTACTACATCC AGCAGCACCCCTGTGATCATAATCTC | GAGAGGTTGGCGAACA AGTACGACTTCGGCAC |
| <i>Bgn</i> | AGGAGGCGGTCCATAAGAAT AGGGTTGAAAGGCTGGAAT | GTGTTGCTTCTTCATCTGGCTATG ACCTTCCGCTGCGTTACTG |
| <i>Bmp1</i> | CTGTGAGTGGGTCAATTGTGG GGTGTCATCCGAGTGGAAT | CCATGTCTCTATTGTACGCGAGAA AAGATGCCCCTGGAGAATGTG |
| <i>Adamts2</i> | CTGGCAAGCATTGTTTTAAAGGA GGAGCCAAACGGACTCCAAG | AGTGGGCCCTGAAGAAGTG CAGAAGGCTCGGTGTACCAT |
| <i>Acta2</i> | CCGACCGAATGCAGAAGGA ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA | AGCTGTTTTCCCATCCATTG GCGCTTCATCACCCACGTAG |
| <i>Il6</i> | CCACTCACCTCTTCAGAACGAAT TTGGAAGCATCCATCTTTTTCA | AGTTGCCTTCTTGGGACTGA TCCACGATTTCCAGAGAAC |
| <i>18s</i> | CGCCGCTAGAGGTGAAATTC TTGGCAAATGCTTTCGCTC | CGCCGCTAGAGGTGAAATTC TTGGCAAATGCTTTCGCTC |
| <i>Itgb5</i> | | ACCTGCCAAGATGGCATATC CACGGACACTTCAAAGGATG |
| <i>Col1a1</i> | | GCCAAGAAGACATCCCTGAAG TGTGGCAGATACAGATCAAGC |
| <i>Col3a1</i> | | TTTGTGCAAGTGGAACCTG TGGACTGCTGTGCCAAAATA |
| <i>Fn1</i> | | CTGTGACAACTGCCGTAG CGATGCTTGGAGAAGCTG |