

論文の内容の要旨

論文題目：

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

氏名：野田真史

全身性強皮症 (systemic sclerosis: **SSc**) は血管障害と皮膚および肺をはじめとした内臓諸臓器の線維化を特徴とする膠原病で、その発症には免疫異常の関与が示唆されている。**Krüppel-like factor 5 (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、腎尿細管細胞においては線維化を抑制する。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。しかし、**KLF5** の皮膚線維化に与える影響については過去に報告がなく、我々は **KLF5** が皮膚線維化にも関与しているとの仮説の下、本研究を開始した。まず **KLF5** の **SSc** 患者における発現を検索したところ、皮膚組織と培養皮膚線維芽細胞の両方で健常人に比較して発現が低下していた。また、その発現低下には **epigenetic** 制御 (ヒストン脱アセチル化と **DNA** メチル化) が関与していることを明らかにした。

次に、**KLF5** の皮膚線維化における機能を調べるため、野生型マウスと **Klf5**^{+/-} マウスの背部皮下にブレオマイシンを3週間連続注射して線維化を惹起した。すると、**Klf5**^{+/-} マウスでより強い線維化が起こり、しかも誘導された線維化はブレオマイシン投与後も **Klf5**^{+/-} マウスでより長く持続した。同様の所見が非炎症性の線維化モデルにおいても得られるかどうかを明らかにするため、**Klf5**^{+/-} マウスと、**hypodermis** に線維化を自然発症する事で知られる **Tsk/+** マウスを交配したところ、**Tsk/+;Klf5**^{+/-} マウスでは **Tsk/+** マウスに比較してより **hypodermis** が肥厚していた。一方で、**Klf5**^{+/-} マウスは皮膚線維化を自然発症しなかった。これらのことから、**KLF5** がヘテロ欠損すると線維化の刺激に対して反応性が亢進する事が明らかとなった。

さらに、**Klf5**^{+/-} マウスで外部刺激に対する線維化反応が亢進する機序を調べるため、皮膚線維芽細胞を採取して培養したところ、**KLF5**^{+/-} マウスの培養皮膚線維芽細胞では野生型マウスに比べて、線維化の維持に重要な役割を持つ **connective tissue growth factor (CTGF)** の発現量が増加していた。同様の結果はヒト皮膚線維芽細胞に対して

KLF5 siRNA を用いて発現を低下させた時にも得られ、さらにベクターを用いて KLF5 を過剰発現させると CTGF プロモーター活性は顕著に抑制された。これらのことから、KLF5 は CTGF 遺伝子の強力な転写抑制因子として機能していることが明らかになり、その結合部位は KBE1 (KLF5 binding site 1; 転写開始点から -112 ~ -105 bp) にあることを同定した。

CTGF 遺伝子プロモーターに結合して発現を制御する転写因子としては今回明らかとなった KLF5 以外にも過去に報告があり、その中でも転写因子 Friend leukemia integration 1 (Fli1) が CTGF 遺伝子プロモーター上の KBE1 の近傍 (転写開始点から -126 ~ -77 bp) に結合することが報告されている。Ets 転写因子ファミリーの 1 つであり I 型コラーゲンの強力な転写抑制因子である Fli1 は KLF5 と同様 SSc 皮膚線維芽細胞では 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。そして、SSc 皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化されて線維化に寄与する原因として Fli1 の恒常的な発現低下が重要であることを我々は過去の実験で示してきている。CTGF 遺伝子プロモーター上で KLF5 と Fli1 の結合部位が近接していることから、KLF5 と Fli1 の間に物理的、機能的相互作用があることを予想し、まず KLF5 と Fli1 の間に物理的相互作用があるかどうかを免疫沈降法で検討したところ、核内で複合体を形成していることが明らかとなった。さらに、KLF5 と Fli1 の両者を過剰発現させることで、CTGF 遺伝子のプロモーター活性は KLF5 単独を過剰発現させたときに比較して相乗的に強く抑制を受けることを明らかにした。また、KLF5 siRNA と Fli1 siRNA を同時に用いることで、CTGF の発現は KLF5 siRNA 単独の場合に比較し、相乗的に上昇することを明らかにした。以上のことから、KLF5 と Fli1 は CTGF の転写活性を共同して抑制していることが明らかとなった。さらに、I 型コラーゲンの発現は Fli1 siRNA を用いることで過去の報告と同様上昇したが、KLF5 siRNA の影響は受けなかった。

以上の結果から、Fli1 と KLF5 という 2 つの転写因子の発現が SSc 患者の皮膚線維芽細胞においてエピジェネティクス制御により低下しており、Fli1 の恒常的な発現低下によりコラーゲン産生が亢進し、Fli1 と KLF5 の恒常的な発現低下により CTGF の発現が上昇してコラーゲンをはじめとした細胞外器質の蓄積を維持している可能性が示唆された。その状態を再現するために作成した *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの皮膚においては 3 カ月齢以降で真皮の肥厚とコラーゲン含有量の増加が同定され、また CTGF に加えて I 型コラーゲン、fibronectin といった細胞外基質を構成する分子の発現が亢進

していた。さらに、電子顕微鏡で観察すると、2 カ月齢の時点でコラーゲン細線維の構造に異常がみられ、その構造異常は過去に報告されている SSc 患者における変化と類似していた。

以上の結果から、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの皮膚では線維化が自然発症し、コラーゲン線維の高次構造も非常に SSc に類似していることが明らかになった。そのため、SSc 患者の特徴的所見の一つである皮膚血管障害が *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスで再現できるのではないかと考え、研究を進めた。すると、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスは肉眼的な血管拡張を示さなかったものの、FITC-デキストランの静脈注射により皮膚血管を描出し、背部皮膚を切除して蛍光顕微鏡で観察すると、SSc で観察される血管障害と類似した虫喰状の血管狭窄や血管の分枝状構造を示した。さらに、多光子顕微鏡による生体分子イメージングを用いると、血管密度の低下とコラーゲン密度の上昇、血流速度の低下、組織の低酸素化が *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスで観察された。

Klf5^{+/-};Fli1^{+/-} マウスは皮膚において SSc にきわめて類似した線維化と血管障害の所見を示したため、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスが SSc のモデルマウスとなる可能性を考え、SSc で高頻度に障害される臓器である肺を次に観察した。すると、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺においては2 カ月齢で胸膜側の辺縁から肺泡隔壁に肥厚が始まり、4 カ月齢ではより広範囲での間質の線維化とコラーゲン含有量の増加を認めた。8 カ月齢では病変がさらに増悪し、びまん性の肺泡隔壁肥厚と肺泡構造の破壊、肺泡隔壁へのリンパ球浸潤を認めた。さらに、4 カ月齢以降では血管密度の低下と動脈壁の肥厚を認め、8 カ月齢では細動脈の強い狭窄と細静脈の内腔狭窄を認めた。これらの所見は間質性肺炎の病理学的亜型である non-specific interstitial pneumonia (NSIP) の特徴に類似していた。また、細動脈の閉塞と強い動脈壁肥厚は肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension; PAH) の、静脈の閉塞性病変は肺静脈閉塞性疾患 (pulmonary veno-occlusive disease; PVOD) の病理学的特徴に類似していた。これらの特徴はいずれも SSc の肺組織で特徴的にみられる所見であり、これまでの結果は *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスと SSc 患者の間に共通の病態があることを示唆している。

さらなる検索で、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺では SSc 患者の肺と同様 CTGF の発現が上昇していた。そして、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺で蛍光二重染色を行ったところ、CTGF は主に増殖した2 型肺胞上皮細胞から産生されていた。これらの肺間質・血管病変は CTGF を2 型肺胞上皮細胞特異的に過剰発現させたマウスで観察される肺間質・血管

病変に類似しており、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの肺病変についても 2 型肺胞上皮細胞から過剰産生された CTGF が深く関与している可能性が示唆される。

これまでの結果で、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスには皮膚と肺の両者に SSc で特徴的な線維化と血管障害を発症することが明らかとなった。そこで次に、SSc のもう一つの特徴的な所見である免疫異常（炎症細胞浸潤と自己抗体産生）が *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスに存在するかどうかを検索した。すると、肺組織には 3 か月齢付近から血管周囲へのリンパ球浸潤がみられるようになり、8 か月齢ではリンパ球が間質全体にびまん性に、そして一部ではリンパ濾胞様の構造を形成しながら浸潤することがわかった。そして、その多くは CD45R 陽性の B 細胞であった。B 細胞の間質へのびまん性浸潤と濾胞様構造形成は SSc の肺組織においても報告があり、SSc に類似する所見であった。そこで、さらに *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスにおける B 細胞の機能を解析したところ、CD19 の発現が亢進し、SSc の線維化に深く関与している interleukin-6 (IL-6) の産生能が増加していた。IL-6 の発現は同様に *Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの血清、肺組織中でも上昇していた。さらに、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスの血清では抗核抗体が高頻度に陽性であったが 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。以上のことから、*Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}* マウスでは B 細胞が活性化し、活性化した B 細胞が自己抗体産生に関与してい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。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。