

# 博士論文

## 全身性強皮症の病態における上皮細胞での転写因子 Fli1 の 発現低下の意義についての検討

高橋 岳浩

## 目次

I.	要旨.....	5
II.	序文.....	6
III.	研究方法.....	14
	a. SSc 患者および健常人コントロール皮膚検体	
	b. 動物モデル	
	c. 免疫染色法	
	d. 表皮/真皮の剥離処置	
	e. RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR	
	f. コラーゲンの定量	
	g. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
	h. 抗核抗体	
	i. フローサイトメトリー	
	j. 皮膚血管の Evans-blue 染色液による血管透過性の評価、および FITC- デキストランによる描出	
	k. 正常ヒト表皮角化細胞の培養	
	l. Small interfering RNA (siRNA)	

m. クロマチン免疫沈降法

n. プラスミド

o. ルシフェラーゼアッセイ

p. DNA 親和性沈降法 (DNA affinity precipitation)

q. 統計解析

#### IV. 結果.....23

1) SSc 患者表皮角化細胞では Fli1 の発現が著明に低下している

2) KcKO マウス表皮角化細胞は創傷治癒ケラチン K6/K16 の発現亢進など SSc 患者表皮類似の活性化した表現型を呈する

3) KcKO マウスは皮膚の線維化を自然発症する

4) KcKO マウスは食道、肺の線維化と内臓諸臓器における特徴的なリンパ球の集簇像を呈する

5) KcKO マウスは高免疫グロブリン血症、抗核抗体の出現、B 細胞の活性化と CD4 陽性 T 細胞の Th2/17 系への偏倚した活性化を呈する

6) KcKO マウスは皮下の血管の拡張、蛇行、透過性の亢進などの血管の変化も呈する

7) KcKO マウスでは胸腺における自己免疫調整遺伝子の発現低下と内在

性制御性 T 細胞のアウトプットの低下が見られる

8) Fli1 は AIRE 遺伝子の転写を制御する

9) SSc 患者皮膚では AIRE の発現が著明に低下している

V. 考察.....48

VI. 謝辞.....59

VII. 引用文献 .....60

VIII. 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマー.....71



## I. 要旨

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化と血管障害を特徴とする自己免疫疾患であるが、その病態には未解明な点が多く、特に自己免疫の成立についてその機序は殆ど分かっていない。今回私は、本症患者の表皮の異常に着目し、重層扁平上皮細胞の基底部に発現する **Keratin14** の発現細胞特異的に転写因子 **Fli1** をノックアウトしたマウスを作成したところ、皮膚および内臓諸臓器の線維化と血管異常が生じると共に、強い自己免疫の表現型が出現することを見いだした。また、この機序として胸腺上皮における自己反応性 T 細胞の負の選択の異常が関与していることが示唆され、本症の病態を解明する上で新しい知見と考えられた。

## II. 序文

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)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を特徴とする全身性の自己免疫疾患である<sup>1</sup>。本邦での正確な患者数については不明であるが少なくとも2万人以上存在すると考えられている。

その病像には大きな多様性があるが、皮膚硬化の範囲により限局皮膚硬化型(limited cutaneous SSc; lcSSc)とびまん皮膚硬化型(diffuse cutaneous SSc; dcSSc)に大きく分類され、そのうち後者は重篤な内臓諸臓器の線維化、特に間質性肺疾患を高率に生じ、その予後は不良である<sup>2</sup>。このため、その予後改善のためにも病態の解明とそれに基づいた治療法の開発が急がれるが、その病態には今日においても未解明な点が多く、関節リウマチなどの他の膠原病で生物学的製剤の導入によって目覚ましい治療法のパラダイムシフトが起きている状況とは事情が大きく異なる。その大きな理由として、まさに本疾患の特徴、すなわち、①抗核抗体の存在に象徴される自己免疫の病態、皮膚あるいは肺などの内臓諸臓器における炎症細胞浸潤や炎症性・線維化促進的サイトカイン発現の亢進としてみられる免疫異常の病態、②皮膚や内臓諸臓器で見られる線維化の病態、そして③画像上血管の狭窄、蛇行、閉塞などとして捉えられ、末梢の循環障害により临床上 Raynaud 症状、難治性の指尖部潰瘍の形成などとして表れる血管障害の病態、という、3つの病態が互いに相互作用して複雑に絡み合っている存在すると

いう特徴が挙げられる（図 1）。そしていまだに、これらの多様な病態を一元的に説明できる仮説は存在していない。

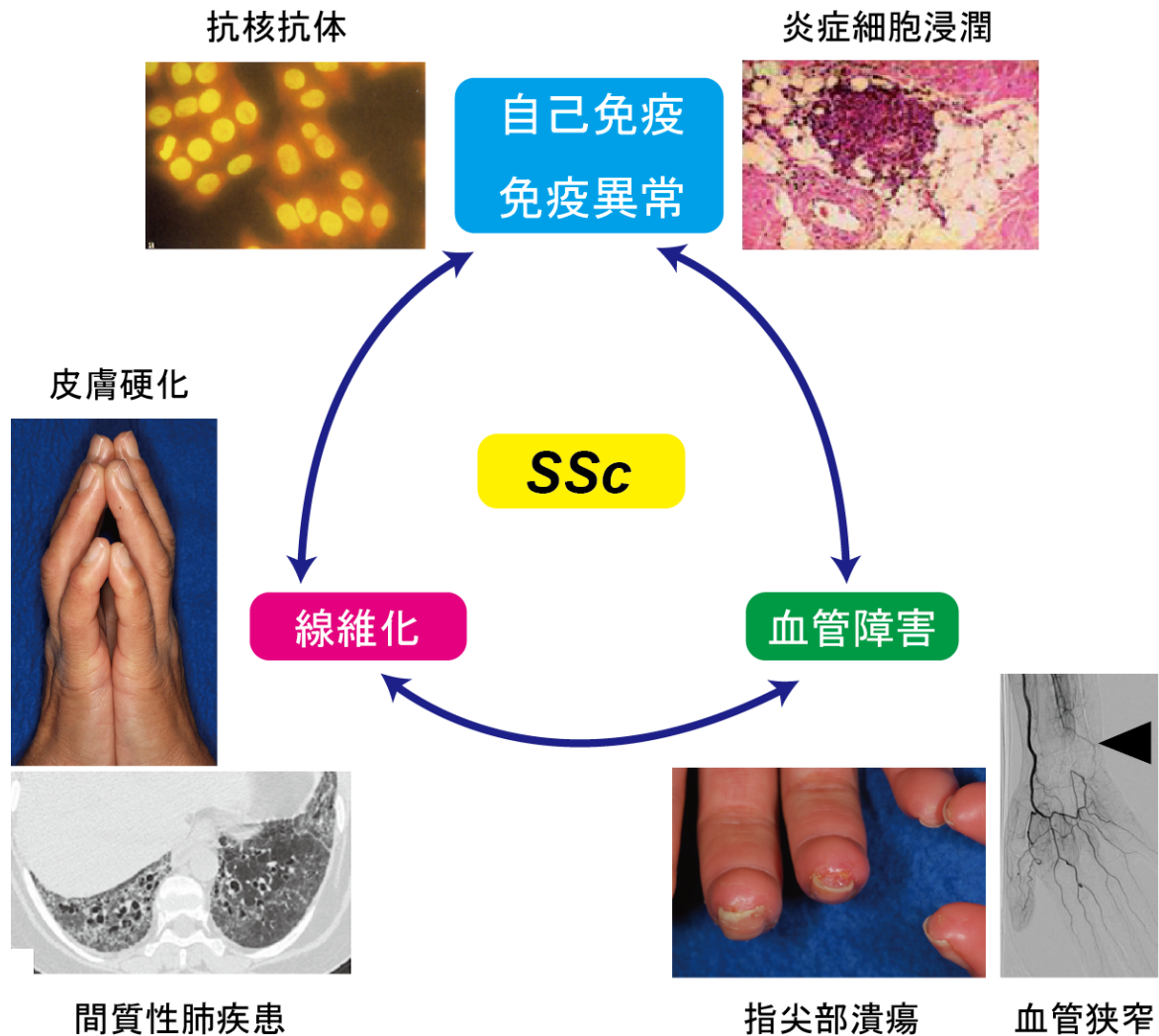


図 1 SSc の病態

SSc の病態は①抗核抗体の存在に象徴される自己免疫の病態、皮膚あるいは肺などの内臓諸臓器における炎症細胞浸潤や炎症性・線維化促進的サイトカイン発現の亢進としてみられる免疫異常の病態、②皮膚、肺、さらに消化管等で見られる線維化の病態、そして③画像上血管の狭窄、蛇行、閉塞などとして捉えられ、臨床上 Raynaud 症状、難治性の指尖部潰瘍の形成などとして表現される血管障害の病態、という 3 つの病態から構成され、これらが互いに相互作用して複雑な病態が形成される。

SSc の発症における最も強い危険因子は家族歴であるが、双生児での SSc の診断一

致率は一卵性と二卵性の間で差が認められないとされている<sup>3</sup>。これらの事実からは SSc の発症には遺伝因子だけでなく環境因子も強く作用することが示唆される。ゲノムワイド関連解析(Genome-Wide Association Study; GWAS)により同定された SSc の疾患感受性遺伝子としては HLA\*DOB1<sup>4</sup>、HLA\*DPB1/2<sup>5</sup> など HLA 領域の遺伝子、あるいは IRF5<sup>6</sup>、FAM167A-BLK<sup>7</sup>、UBE2L3<sup>8</sup>、STAT4<sup>9</sup> など HLA 以外の免疫関連遺伝子などが知られ、遺伝因子に基づく免疫異常が発症において重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>10</sup>。そして、これらの遺伝因子に加え、環境因子によるエピジェネティックな機序により種々の細胞で本症に特異的な形質変化が生じ、免疫寛容の破綻、過剰な炎症反応の誘導、線維芽細胞および血管内皮細胞の恒常的な異常活性化、脈管形成・血管新生の異常が誘導され、本症の病態が形成されることがこれまでの研究で明らかとなって来つつある<sup>11</sup>。

これらの研究の中で、SSc の主要な 3 病態、すなわち免疫異常/炎症、線維化、血管障害の各々に対応する形で、それぞれ B 細胞・T 細胞・マクロファージなどの免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などの異常が、本症の病態形成において果たす役割について多くの知見が蓄積されてきた。免疫異常については、本症における自己抗体の発現には慢性的な B 細胞活性化の関与が指摘され、B 細胞表面における CD19、CD80、CD86、CD95 の恒常的過剰発現が報告されている<sup>12</sup>。また、この慢性的 B 細胞活性化

が IL-6 過剰産生を介して皮膚の線維化に関与する可能性も示唆されている<sup>13</sup>。T 細胞およびマクロファージの活性化も皮膚、肺などの病変組織で確認され<sup>14,15</sup>、T 細胞がオリゴクローナルな増殖と活性化を呈して Th2 優位の環境を形成し<sup>16</sup>、IL-4、IL-13 などの Th2 系サイトカインが上昇して線維化に寄与するとされている<sup>17-20</sup>。さらに、近年自己免疫への関与が注目されている Th17 細胞の本症への関与も指摘される<sup>21</sup> など、免疫細胞の活性化に関する数多くの報告がなされている。ただし、そもそもなぜ本症において自己に対する免疫応答が成立するのかという根源的な問題についてはほとんど検討がなされておらず、いまだ全く解明されていない問題である。

本症の主徴の一つである皮膚の線維化については、主として皮膚線維芽細胞および皮膚微小血管血管内皮細胞について着目した研究が進められてきた。本症ではコラーゲン遺伝子などの細胞外マトリックス遺伝子の恒常的な転写亢進によりコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスタンパク合成の亢進が見られ、これら遺伝子の恒常的転写亢進の機序が I 型コラーゲン遺伝子プロモーターを用いて精力的に検討されてきた<sup>22,23</sup>。また、血管障害については、本症の初期から血管内皮細胞傷害あるいは血管内皮細胞の活性化が見られ、活性化された血管内皮細胞から産生される endothelin-1(ET-1)が線維芽細胞の活性化に重要な寄与を果たすこと、接着因子の発現亢進や血小板・凝固系の活性化の誘導を介して線維化に寄与すること、などが盛んに

検討・解明されてきた<sup>24</sup>。

これら免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞に比較して、SScの皮膚における上皮細胞、すなわち表皮角化細胞については、ほとんど関心を集めてこなかった。しかし近年になり、従来注目されてこなかった本症皮膚表皮の異常が指摘され、表皮およびそれを構成する主要な細胞である表皮角化細胞が、皮膚の線維化の病態において重要な役割を果たすことが示唆されている。実際、SSc患者の皮膚表皮においては、本来創傷治癒過程において発現され創傷治癒ケラチンと呼ばれる Keratin 6 (K6)、Keratin 16 (K16)、Keratin 17 (K17)の発現が皮膚硬化部だけではなく非硬化部を含めて全身的かつ恒常的に亢進しており、また、*in vitro* の検討でも SSc 患者皮膚表皮角化細胞培養シートを正常皮膚線維芽細胞と共培養すると、IL-1 $\alpha$ の産生を介して線維芽細胞におけるコラーゲン産生を誘導すると報告された<sup>25</sup>。また、線維化に重要な役割を果たし、本症においてもその線維化の病態成立において重要である成長因子 TGF $\beta$  の共受容体である CD109 を表皮角化細胞において過剰発現させ、代表的な SSc マウスモデルであるブレオマイシン誘導強皮症モデルマウスを作成するとその線維化が抑制されるとの報告や<sup>26</sup>、SSc ヒト表皮では IL-21 受容体の発現が亢進しており、SSc 皮膚から単離された培養表皮角化細胞でも種々の炎症性・線維化促進的サイトカイン、成長因子の発現が亢進していること<sup>27</sup>などが報告されているが、線維芽細胞、血管内皮細胞、

免疫細胞を対象とした研究がすでに膨大に蓄積されていることに比較して、表皮の異常に関する検討については、未だこれらの限られた数の報告に留まっている。

私が所属する東京大学皮膚科研究グループはこれまで、転写因子 Fli1(Friend leukemia virus integration 1)の線維芽細胞、および血管内皮細胞における恒常的発現低下が SSc の病態において果たす役割を検討し、その重要性を証明してきた<sup>28,29</sup>。本転写因子は 11 のサブファミリーに属する計 27 種の転写因子からなる Ets(E-twenty-six) 転写因子ファミリーのうちの一つであり<sup>30</sup> (表 1)、当初 Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV)によって誘発される赤白血病においてウイルス挿入変異により活性化される遺伝子としてまずマウスで同定され、その後ヒトでのホモログが同定された<sup>31,32</sup>。Hollenhorst らによる Ets 転写因子ファミリータンパクの各種細胞種および臓器における発現の網羅的解析によれば、Fli1 は臓器では特に胸腺、骨髄、脾に、また細胞種としては血管内皮細胞に特に豊富に発現していると報告されている<sup>33</sup>。

Subfamily	Family members
ETS	ETS1, ETS2
ERG	ERG, <b>FLI1</b> , FEV
ELG	GABP $\alpha$ , ELG
TEL	ETV6 (TEL), ETV7 (TEL2)
PEA3	ETV4 (PEA3.E1AF), ETV5 (ERM), ETV1 (ER81), ETV2 (ER71)
SPI	SPI1(PU.1), SPIB, SPIC
ESE	ELF3 (ESE1), ELF5 (ESE2), ESE3 (EHF)
TCF	ELK1, ELK4 (SAP1), ELK3 (SAP2/NET)
TEL	ETVL6 (TEL), ETV7 (TEL2)
PDEF	SPDEF (PDEF/PSE)
ERF	ERF (PE2), ETV3 (PE1)

**表 1 Ets 転写因子ファミリー**

本転写因子ファミリーは 11 のサブファミリーから構成され、ヒトでは計 27 種類の転写因子(マウスでは 26 種類)が知られている。FLI1 は ERG サブファミリーに属する。

SSc 患者皮膚の免疫組織学的検討では、この Fli1 の発現が皮膚線維芽細胞および皮膚微小血管内皮細胞で健常人に比較して、著明に、恒常的に、低下していることが観察される。これまでに、私が所属する東京大学皮膚科の研究グループは、SSc 患者の皮膚線維芽細胞において Fli1 がエピジェネティックな制御により発現が低下している一方、I 型コラーゲン遺伝子の強力な転写抑制因子として機能しており、線維芽細胞における Fli1 の発現低下が I 型コラーゲンの過剰産生をもたらして皮膚の線維化の病態に直接寄与していること<sup>28,29,34-36</sup>、また、血管内皮細胞においては Cre-loxP 系を用



いて血管内皮特異的に Fli1 をノックダウンしたマウスにおいては血管新生が恒常的に活性化され、細動脈の狭窄、毛細血管拡張、血管透過性亢進といった本症に特徴的とされる血管の病理組織学的変化や機能的変化が再現されることを明らかにすることを通して<sup>37</sup>、上記の細胞における Fli1 の発現低下が SSc の線維化および血管障害の病態に重要な役割を果たすことを証明してきた。

そして実は、SSc 患者皮膚の Fli1 についてのこれまでの免疫組織学的検討の中で、線維芽細胞および血管内皮細胞に加え、表皮角化細胞においてもその発現が著しく低下していることを観察していたが、これまでその意義についてはいまだ検討が行われていなかった。そこで私は、表皮角化細胞においても Fli1 の発現低下がその病態形成において何らかの役割を果たしているのではないかと考え、検討を開始することとした。具体的には、表皮角化細胞特異的ノックアウトマウスを作成するために頻用され、重層扁平細胞の基底層に発現する Keratin 14 (K14)のプロモーター下流に部位特異的組み替え酵素 Cre を発現する K14Cre マウスを、Fli1<sup>flox/flox</sup> マウスと交配することにより、Cre-loxP 系を用いて K14 発現細胞特異的 Fli1 欠失マウス (Fli1<sup>flox/flox</sup>; K14cre+/マウス)を作成してその解析を行い、表皮角化細胞 (K14 発現上皮細胞) における Fli1 の発現低下が SSc の病態において果たす役割を解明することを目指し検討を行った。

### III. 研究方法

#### a. SSc 患者および健常人コントロール皮膚検体

SSc ヒト皮膚検体は発症 2 年以内の dcSSc 患者 8 人の前腕より採取した。全ての患者は臨床所見および組織学的所見に基づき診断され、他の膠原病の合併を認めなかった。コントロール群の検体は性別、年齢、採取部位がほぼ合致した 7 人の健常人より採取した。研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を経て、被験者全員から書面による同意を得たうえで施行した。

#### b. 動物モデル

Fli1<sup>flox/flox</sup> マウスは Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生に御提供頂いた。K14Cre (STOCK Tg(KRT14cre)1Amc/J)マウスは The Jackson Laboratory より購入した。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施行した。麻酔には動物用イソフルランの吸入を用い、安楽死については頸椎脱臼あるいは二酸化炭素吸入により行った。

#### c. 免疫染色法

ヒトおよびマウスの皮膚および諸臓器の検体はホルマリン固定、パラフィン包埋し

た後に切片を作成し、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて染色した。抗 Fli1 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)から、抗マウス Aire 抗体は eBioscience (St. Louis, MO, USA)から、抗マウス CD3 抗体、抗マウス F4/80 抗体、抗ヒト AIRE 抗体、抗マウス K6 抗体、抗マウス K16 抗体、抗マウス IL-1 $\alpha$ 抗体は Abcam (Cambridge, UK)より購入した。皮膚真皮の厚さ、浸潤細胞数は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で 2 人の検者で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。

#### **d. 表皮/真皮の剥離処置**

3 ヶ月齢マウスの耳介を採取し、耳介軟骨前面および後面の皮膚を鈍的に剥離し、PBS および 70%エタノールで洗浄後、1.0%ディスパーゼ(Life technologies, Carlsbad, CA, USA)中に 4°C で 12-16 時間浮遊させたのち、表皮と真皮を鑷子にて剥離し、表皮側を RNA の抽出に用いた。

#### **e. RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR**

皮膚組織、表皮シート、肺、食道から RNA を RNeasy Mini Kit(Quiagen)を用いて抽出し、iScript cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用い、プロトコールに

準じて 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)を用いて ABI prism 7000 (Life technologies)で施行、測定した。いずれの検体も triplicates で測定し、その平均を値として用いた。リファレンス遺伝子としては GAPDH を用いた。用いたプライマーの配列を別表”VIII. 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマー” に示す。各プライマーから予想される単一の PCR 増幅産物が生成していることについては mRNA 発現量の測定後に Melt curve を測定することにより確認した。

#### **f. コラーゲンの定量**

QuickZyme Total Collagen Assay Kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, Netherlands)のプロトコールに従い、皮膚および肺組織を 6N HCl で 95°C で 20 時間加水分解処理したものから組織中の含有コラーゲン総量を定量化した。皮膚検体は 6mm パンチ生検で採取したものを、肺組織は左肺全葉を検体として用いた。

#### **g. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

3 ヶ月ないし 8 ヶ月齢のマウスの血清を採取して各種キットを用い、マウス total IgG、IgM、IgA (eBioscience, San Diego, CA, USA)、抗核抗体・抗トポイソメラーゼ I 抗体 (い

いずれも Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)、Interleukin-6 (IL-6; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)の血清中濃度を測定した。

#### **h. 抗核抗体**

蛍光抗体間接法による抗核抗体の検出はヒト喉頭癌由来 Hep-2 細胞(Medical & Biological Laboratories)を用いて行った<sup>38</sup>。マウスの血清を 160 倍希釈して 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 標識抗マウス IgG (100 倍希釈)を用いて検出した。

#### **i. フローサイトメトリー**

脾臓 B 細胞の CD19 染色には抗 CD19 抗体(Biologend, San Diego, CA)を用いた。T 細胞の細胞内サイトカインの染色では、鼠径/腋窩リンパ節からリンパ球を単離後、1 µg/ml の Brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen)の存在下で 10 ng/ml の Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および 1 µg/ml の Ionomycin (Sigma-Aldrich) で 4 時間刺激し、FACS buffer (1%FBS-PBS) で洗浄後、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体(いずれも Biologend)で染色したのち fixative/permeabilization buffer (BD Pharmingen) で処理し、抗 IL-4 抗体、抗 IL-17A 抗体、抗 IFN-γ抗体 (いずれも BioLegend) で細胞内サイトカ

インを染色した。また、胸腺細胞の Foxp3 の染色には Foxp3 staining kit (eBioscience) を用い、プロトコールに準じて行った。染色した細胞は FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて解析した。陽性/陰性のポピュレーションの判定には対応するアイソタイプの抗体をコントロールとして用いた。

#### **j. 皮膚血管の Evans-blue 染色液による血管透過性の評価、および FITC-デキストランによる描出**

生後 8 ヶ月のマウスを動物用イソフルランで麻酔した後、200  $\mu$ l の Evans-blue 染色液あるいは FITC を結合させたデキストラン (Sigma-Aldrich, 2000 kDa, 20 mg/ml in PBS)を尾静脈より静注した。5 分後に頸椎脱臼により安楽死させ、Evans-blue 染色液静注群では血管外への漏出を皮下で観察し、FITC-デキストラン静注群ではマウスから背部皮膚を採取、切離面の皮下血管を蛍光顕微鏡で観察した。

#### **k. 正常ヒト表皮角化細胞の培養**

正常ヒト表皮角化細胞はクラボウ (倉敷、日本) から購入し、インスリン (5 $\mu$ g/ml)、エタノールアミン (0.1mM)、ホスホエタノールアミン (0.1mM)、ヒドロコルチゾン (1 $\mu$ M)、ウシ脳下垂体抽出物 (50 $\mu$ g/ml) および  $\text{Ca}^{2+}$  (0.1mM) を添加した無血清

の MCDB153 培地で培養し、実験には継代数 3-4 の細胞を用いた。

#### **l. Small interfering RNA (siRNA)**

培養ヒト表皮角化細胞に対して培地に Fli1 siRNA (Santa Cruz)または control scrambled RNA (Santa Cruz)と Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を添加して 4 時間培養し、さらに培地のみの環境で 24 時間培養してから検体を採取した。

#### **m. クロマチン免疫沈降法**

EpiQuik ChIP kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA)をプロトコールに準じて用いた。具体的には、培養ヒト表皮角化細胞を 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、超音波破碎装置を用いて 300bp 程度のサイズに破碎、タンパクとクロスリンクした DNA 断片に対して抗 Fli1 抗体を用い、Fli1 タンパク-DNA 複合体を沈降した。陰性コントロールとしては非特異的ウサギ IgG、Input として免疫沈降前の検体を使用した。Proteinase K を用いてクロスリンクを消失させ、残存した DNA を検体として定量的リアルタイム PCR を行い、アガロースゲル電気泳動を用いて生成産物を検出した。定量的リアルタイム PCR には Aire のプロモーター領域の-403~-235bp (primer 1)および-807~-634 (primer 2)を増幅できるように 2 組のプライマーを設計し

た。配列は primer 1: forward 5'-CAGGACAGGGCCACATTC-3'、reverse 5'-AGGGGACACTTCCCTGTGATG-3'、primer 2: forward 5'-GTCAATGCGAGCCTCAATC-3'、reverse 5'-GGCTCAGTCTGATGCAGGA-3'である。

#### n. プラスミド

ヒト Autoimmune Regulator (AIRE) 遺伝子プロモーターの一部 (-1235 ~ +1) を pUC18-basic vector 中にクローニングしたベクターと Fli1 の発現ベクターである pSG5-Fli1 をそれぞれ Immunology, University of Tartu の Part Peterson 教授および Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 教授<sup>39</sup> からご提供いただいた。QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いてクロマチン免疫沈降法の結果から Aire 遺伝子プロモーターにおいて Fli1 が結合していると予想される Ets 転写因子結合配列 3 カ所の部位に一塩基変異を置換した。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* を用い、QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて精製した。

#### o. ルシフェラーゼアッセイ



Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてプラスミドを培養ヒト表皮角化細胞に対してトランスフェクションした。細胞は 24 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。

#### **p. DNA 親和性沈降法 (DNA affinity precipitation)**

培養ヒト表皮角化細胞より全細胞抽出物を回収し、5'末端にビオチンを付加したオリゴヌクレオチドと反応させた。オリゴヌクレオチドは AIRE 遺伝子プロモーター -265 ~ -225 に 対 応 す る EBS-A (Ets binding site)-oligo (5'-GCAGCGCCTCCATCACAGGGAAGTGTCCCTGCGGGAGGCC-3') 及び EBS-A oligo の Ets 転写因子結合配列 GGAA の配列に変異をもつ  $\mu$ EBS-A oligo (5'-GCAGCGCCTCCATCACAGTGAAGTGTCCCTGCGGGAGGCC-3') を用い、これらのオリゴヌクレオチドはそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチドとアニーリングし、2 重鎖オリゴヌクレオチドとして用いた。Gel shift binding buffer (10mM-HCl Tris[pH-8.0], 6% glycerol, 40mM KCl, 1mM DTT, 0.05% NP-40)に 4°C 10 分静置し、終量 1mL の

poly(dI-dC) (Sigma Aldrich)との反応後、Streptoavidine-beads (Thermo Scientific)を 500 pmol の 2 本鎖オリゴヌクレオチドと 4°C で反応させた。これと反応蛋白-DNA-streptoavidine-agarose 複合体を電気泳動しニトロセルロース膜に転写、フィルムに感光させた。

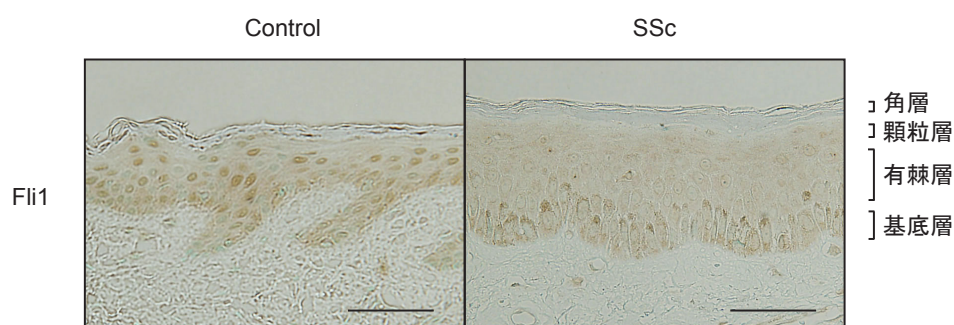
#### q. 統計解析

統計解析は GraphPad Prism 5 を用いて行った。統計学的な有意差は 2 群間で Mann-Whitney U test を用いて解析した。 $P < 0.05$  を統計学的有意差と考えた。値は平均値 $\pm$  s.e.m で表記した。

## IV. 結果

### 1) SSc 患者表皮角化細胞では Fli1 の発現が著明に低下している

はじめに、SSc 患者および健常人皮膚表皮角化細胞における Fli1 の発現を免疫染色により検討した。前述のように、SSc 患者皮膚では線維芽細胞および血管内皮細胞において Fli1 の著明な発現低下が認められることが報告されてきた<sup>28,37</sup>が、これらの細胞と同様、SSc 患者では表皮角化細胞においても Fli1 の発現が健常人に比較して著明に減少していることが確認された (図 2)。



### 図 2 SSc 患者皮膚表皮角化細胞では Fli1 の発現が著明に低下している

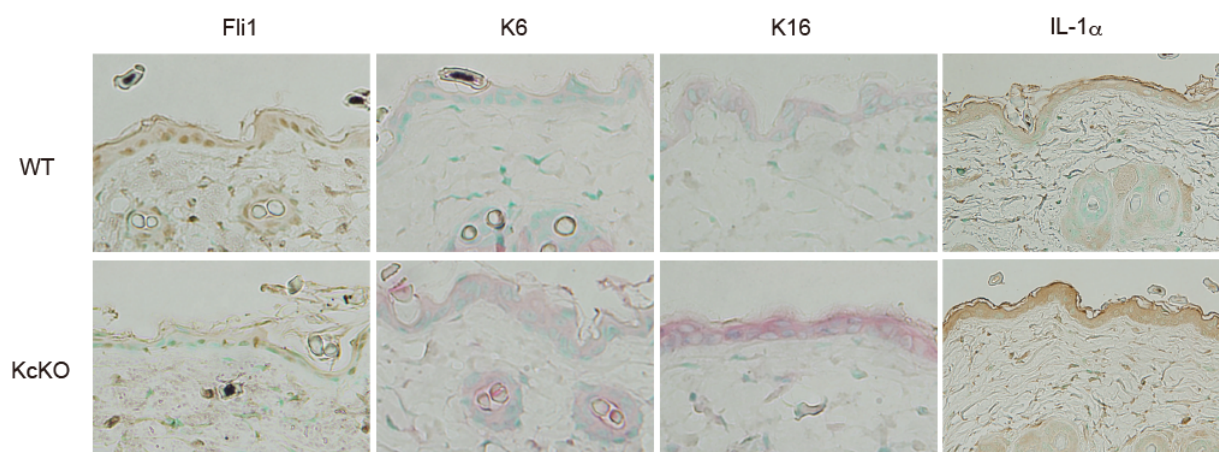
健常人および SSc 患者皮膚組織の Fli1 免疫染色。代表的な組織像を倍率 400 倍の視野で示す。健常人皮膚表皮角化細胞では核に Fli1 が濃染されているが、SSc 患者表皮角化細胞では染色性が著明に低下している。なお、SSc 患者皮膚の表皮基底細胞の核外に褐色に染色されているものはメラニン顆粒である。

### 2) KcKO マウス表皮角化細胞は創傷治癒ケラチン K6/K16 の発現亢進など SSc

#### 患者表皮類似の活性化した表現型を呈する

次に、この表皮角化細胞における Fli1 の発現低下が SSc の病態において果たす役割

を検討するため、Cre-Loxp 系による表皮角化細胞特異的なノックアウトマウス作成のために頻用される K14cre マウスを用いて、Fli1<sup>flox/flox</sup> マウスと交配させることで Fli1<sup>flox/flox</sup>;K14cre+/マウス(以下 KcKO マウス)を作成し、コントロールとして littermate の Fli1<sup>flox/flox</sup> マウス(以下 WT マウス)を用いて比較検討を行った。まず、生後 3 ヶ月後のマウス背部の皮膚を採取し、KcKO マウスの皮膚の表現型を免疫染色により検討した。はじめに、Fli1 の免疫染色により KcKO マウス皮膚表皮角化細胞において Fli1 が効率的にノックダウンされていることを確認した (図 3)。さらに本マウスは、SSc ヒト皮膚表皮角化細胞で皮膚硬化部位、非硬化部位を問わずその発現が亢進している<sup>25</sup>とされる創傷治癒ケラチン K6, K16 の発現が亢進していた(図 2)。また、SSc のヒト表皮角化細胞は IL-1 $\alpha$ 産生亢進を介して皮膚の線維化に寄与するとの報告されている<sup>25</sup>が、KcKO マウスの皮膚表皮では IL-1 $\alpha$ の発現亢進が見られた(図 3)。



**図 3 KcKO マウスの表皮では Fli1 の発現が効率的にノックダウンされ、K6、K16、IL-1 $\alpha$ の発現亢進が見られる**

3 ヶ月齢の KcKO マウスおよびその littermate である WT マウス背部皮膚を採取し、上記分子についての免疫染色を行った。代表的な皮膚組織像を 400 倍の視野で示す。

また、耳介皮膚の表皮と真皮を酵素処理により剥離し、表皮層の mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR により検討したところ、免疫染色の結果と同様に Fli1 の発現低下のほか、K6、K16、Il1a、Il1b の発現上昇が見られた (図 4)。

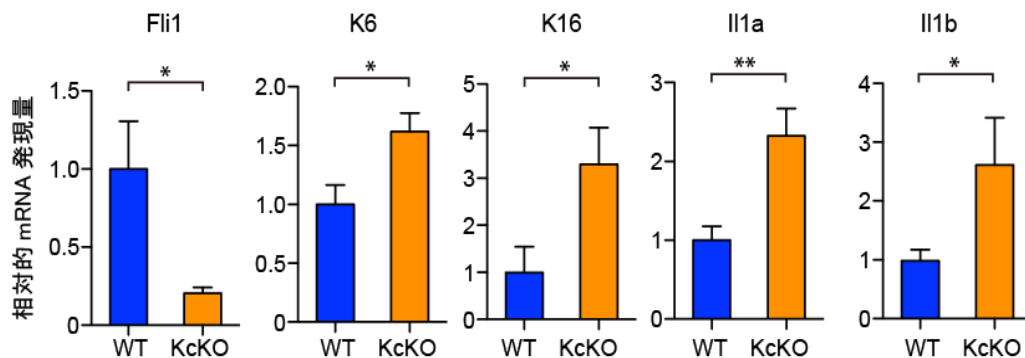


図 4 KcKO マウス表皮では mRNA レベルでも Fli1 の発現低下、K6、K16、Il1a、Il1b の発現亢進が見られ、活性化した表現型を示唆する

3 ヶ月齢マウスの耳介より皮膚を採取、酵素処理により表皮と真皮を分離し、表皮シートより mRNA を抽出、各種分子の発現を定量的リアルタイム PCR により比較した。KcKO マウス皮膚表皮では WT マウスに比較して Fli1 の発現が低下する一方、K6、K16、Il1a、Il1b の発現が亢進していた。n = 6。すべてのグラフは mean ± s.e.m.。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

これらの免疫染色、および mRNA 発現の結果は、KcKO マウス表皮の恒常的に活性化した表現型を示すものと思われた。

### 3) KcKO マウスは皮膚の線維化を自然発症する

上記の結果より、KcKO マウス表皮は SSc で報告されていると同様の活性化した表現型を呈することから、次に私は、SSc における主徴の一つである皮膚の線維化が

KcKO マウスでも見られるかどうかを検討した。すると、実際に KcKO マウスの真皮は WT に比較して膠原線維が密に配列して肥厚しておりその線維化が示唆され(図 5a, b)、この結果は背部皮膚検体のコラーゲン量の定量によっても確認された (図 5c)。

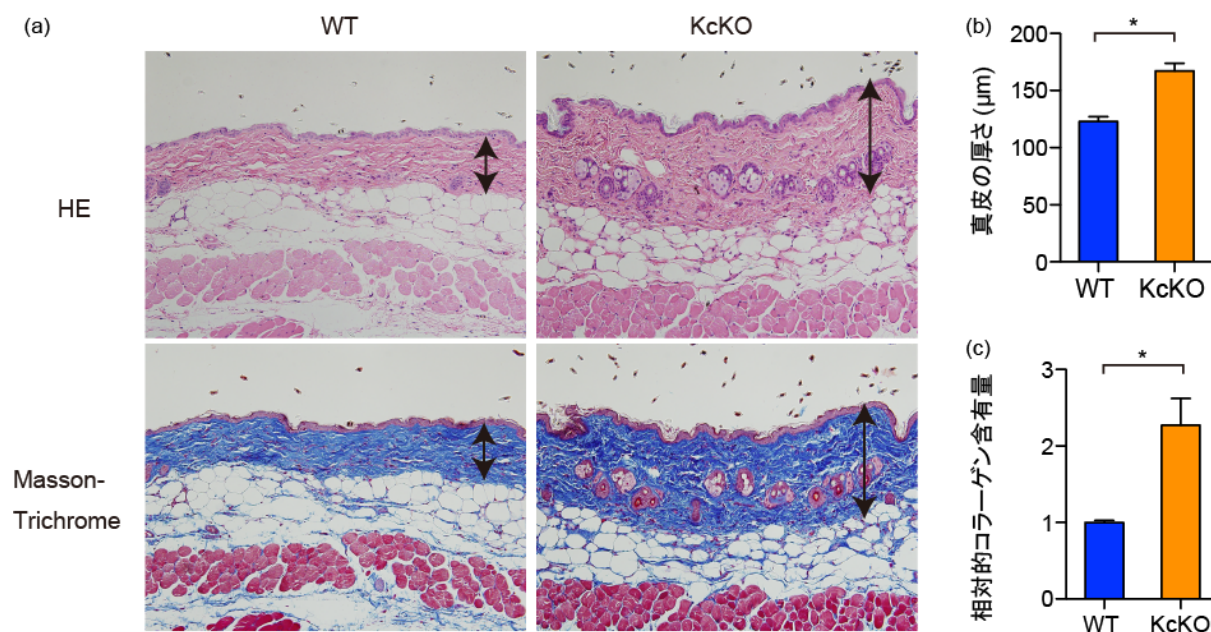


図 5 KcKO マウスは皮膚の線維化を自然発症する

(a) 3 ヶ月齢の WT マウスと KcKO マウス背部皮膚の代表的な皮膚組織像を 100 倍の倍率で示す。矢印は真皮の範囲を示す。(b) 皮膚真皮の厚さを示す。(c) 6mm パンチ皮膚検体のコラーゲン量の比較。n = 6。グラフは mean  $\pm$  s.e.m.。\*P < 0.05。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

また、KcKO マウスにおいては皮膚真皮深層から脂肪織に存在する小血管周囲の細胞浸潤が増加していることが観察され、各種の炎症細胞浸潤を評価するため CD3、F4/80 の免疫染色および Toluidine blue 染色を行い、それぞれで T 細胞、マクロファージ、肥満細胞の高倍率視野中の細胞数を評価したところ、KcKO マウスにおける浸潤数の増加が認められた (図 6a)。また、皮膚全層検体の mRNA の発現を定量的リアルタイム



ム PCR によって比較検討したところ、線維化促進的に作用し SSc 患者皮膚でも発現が亢進しているとされるサイトカイン Il1b、Il6、Ifna、成長因子 Tgfb1、Ctgf、ケモカイン Ccl2 の発現<sup>40-44</sup>が KcKO マウス皮膚で亢進していることが示された (図 6b)。

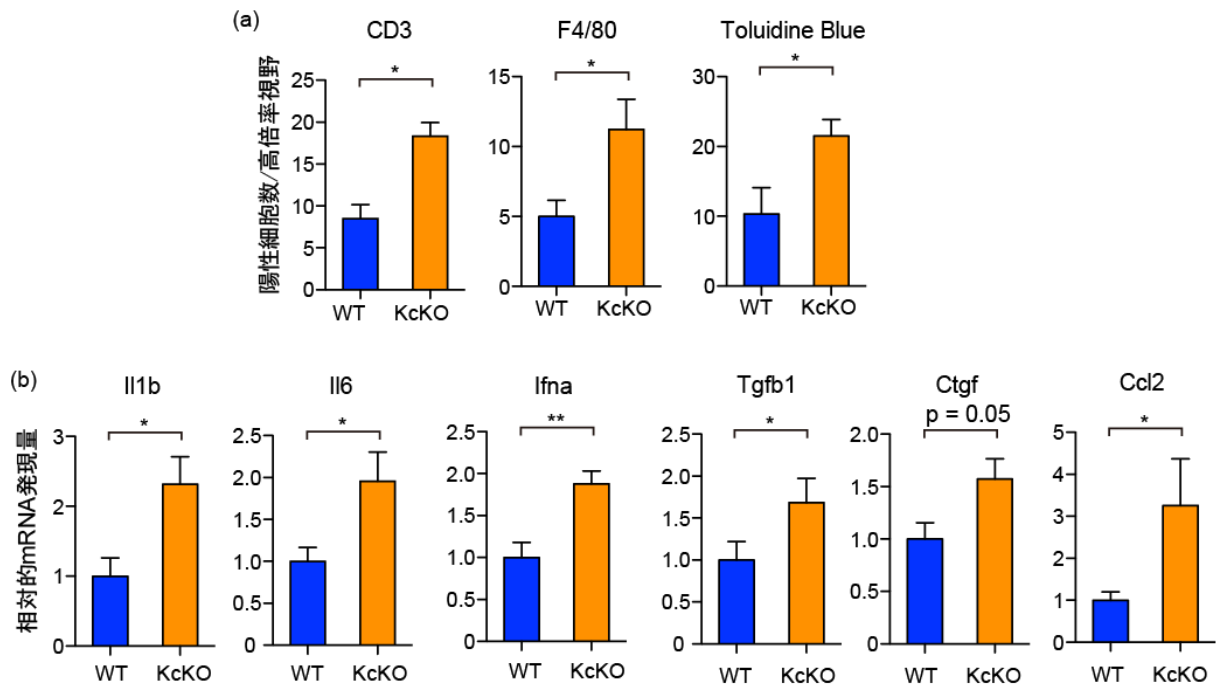


図 6 KcKO マウス皮膚では炎症細胞浸潤が増加しており、炎症性サイトカイン、線維化促進的サイトカインおよび成長因子の発現亢進が見られる

(a) 3 ヶ月齢マウス背部皮膚検体を抗 CD3 抗体、抗 F4/80 抗体による免疫染色、あるいは Toluidine Blue 染色で染色し、200 倍高倍率視野中における T 細胞、マクロファージ、肥満細胞の浸潤数を計測、比較した。(b) 同じく 3 ヶ月齢マウス背部皮膚全層検体から mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法により炎症性サイトカイン、成長因子、ケモカインの発現を比較した。n = 6。すべてのグラフは mean ± s.e.m.。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

これらの結果から、KcKO マウスにおいては SSc 類似の皮膚表皮の活性化の表現型に加え、皮膚の線維化が自然発症することが明らかとなった。

#### 4) KcKO マウスは食道、肺の線維化と内臓諸臓器における特徴的なリンパ球の集族像を呈する

ここまでの結果から、KcKO マウス皮膚は表皮の恒常的活性化および皮膚における線維化など SSc 類似の表現型を呈することが明らかとなった。SSc は皮膚の線維化の他、逆流性食道炎や間質性肺病変として表現される、食道および肺の線維化を高率に合併する<sup>1,45</sup>。そこで次に私は、本マウスがこれらの内臓病変を呈するかどうかについて検討した。前述のように、K14Cre マウスは Cre-Loxp 系を用いて「表皮角化細胞特異的」ノックアウトマウスを作成するために頻用されているマウスではあるが、実は K14 は広く重層扁平上皮の基底層に発現し、同様に K14Cre マウスを用いた過去の研究では、Cre 組み替え酵素の活性は表皮以外にも舌、食道、胸腺の上皮細胞にも見られる（その一方で、肺、肝、腎、小腸、心臓などには見られない）と報告されている<sup>46</sup>。そこでまず特に食道に着目し、SSc における逆流性食道炎の発症部位である下部食道を採取し組織学的に検討した。SSc においては、下部食道において粘膜下層の線維化、およびその下層の平滑筋の萎縮を特徴とするが<sup>45,47,48</sup>、実に、KcKO マウスの食道においても粘膜下層が Masson Trichrome 染色で濃染されてその線維化が示唆され、さらに、その下層の平滑筋が萎縮していた（図 7a）。また、同部位の mRNA の評価では KcKO マウスにおいて炎症性サイトカイン Il1b、Il6、ケモカイン Ccl5、成長



因子 Tgfb1 の発現亢進が見られた (図 7b)。

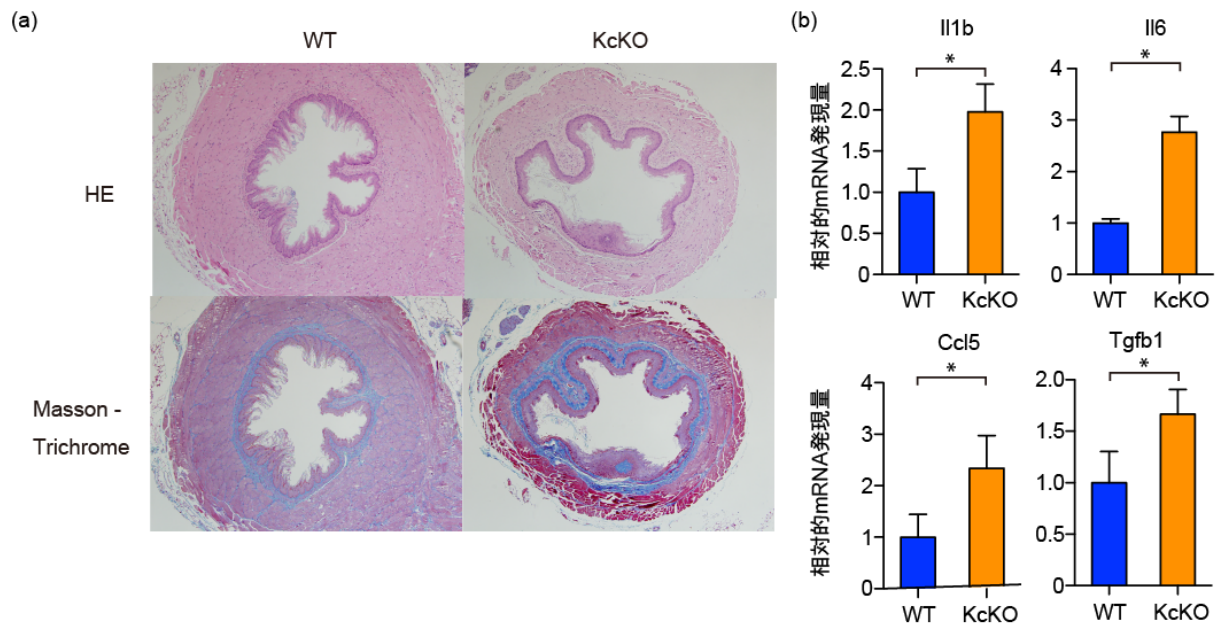


図 7 KcKO マウスの下部食道は粘膜下層の線維化と平滑筋層の萎縮を呈し、炎症性サイトカイン、成長因子の発現亢進が認められる

(a) 3 ヶ月齢のマウス下部食道の代表的な組織像を 100 倍の視野で示す。(b) 下部食道組織から mRNA を抽出し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子の発現を定量的リアルタイム PCR で比較した。n = 4。グラフは mean  $\pm$  s.e.m.。\*P < 0.05。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

次に、肺について検討を行った。通常、肺の気管支上皮には K14 は発現していないことが知られている<sup>46,49</sup>が、興味深いことに、KcKO マウスでは傍気管支領域に炎症細胞浸潤の増加とコラーゲンの蓄積が観察され (図 8a)、左肺全肺の総コラーゲン量の定量でも KcKO マウスでコラーゲン量の増加が見られた (図 8b)。また、mRNA を抽出し、各種の遺伝子発現を検討したところ、KcKO の肺マウスにおいて線維化促進的とされる炎症性サイトカイン Il1b、Il6、Ifna、および、リンパ濾胞の形成に重要な

ケモカイン<sup>50</sup>Ccl21 の mRNA の発現亢進が見られた (図 8c)。

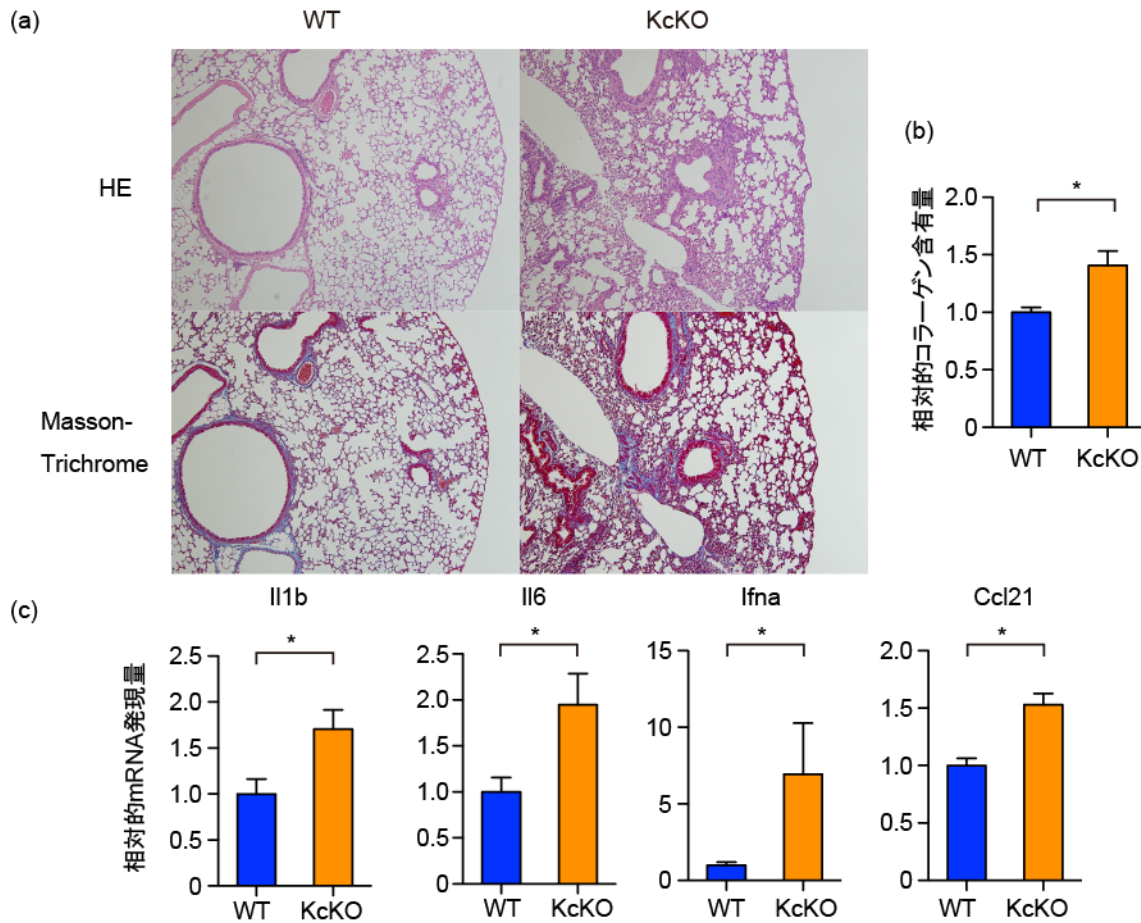
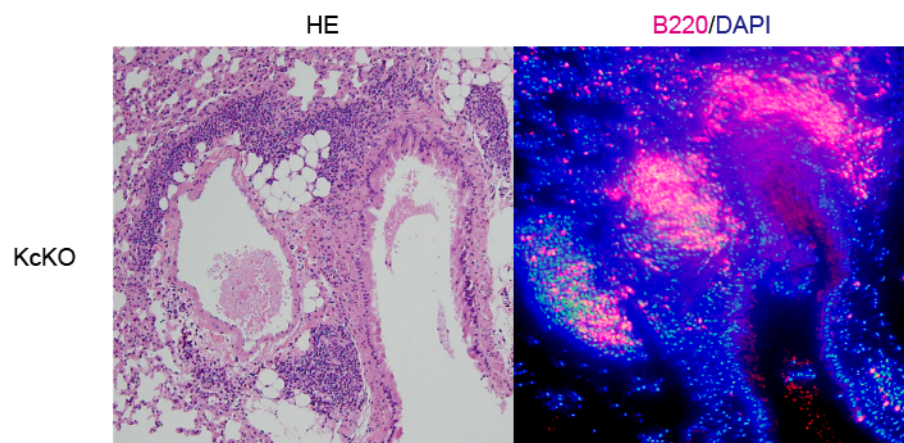


図 8 KcKO マウスの肺は気管支周囲の線維化、炎症細胞浸潤の増加、炎症性サイトカインの発現亢進を呈する

(a) 3 ヶ月齢マウスの肺の代表的な組織像を 100 倍の視野で示す。(b) 左肺全肺のコラーゲン含有量を測定、比較した。WT マウスの平均値を 1 に標準化し、それに対する比率で示す。(c) 肺組織から mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR で mRNA の発現を比較した。WT 群の平均値を 1 と標準化し、それに対する比率で示す。n = 4。グラフは mean  $\pm$  s.e.m.。\*P < 0.05。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

さらに、KcKO マウスでは傍気管支領域各所にリンパ球を主体とする稠密な炎症細胞の集簇像が見られ、いわゆる inducible Brochus-associated Lymphoid Tissue (iBALT) の形成と考えられた (図 9)。関節リウマチやシェーグレン症候群などの自己免疫疾患

の間質性肺病変にその強い免疫異常を反映して iBALT が形成されることはよく知られており<sup>51,52</sup>、また SSc の間質性肺病変でも肺の脈管周囲に B 細胞を主体とする稠密な浸潤が見られることが知られている<sup>53</sup> が、蛍光免疫染色でこの集簇の主体は B220 陽性細胞からなり、B 細胞主体の浸潤と考えられた (図 9)。



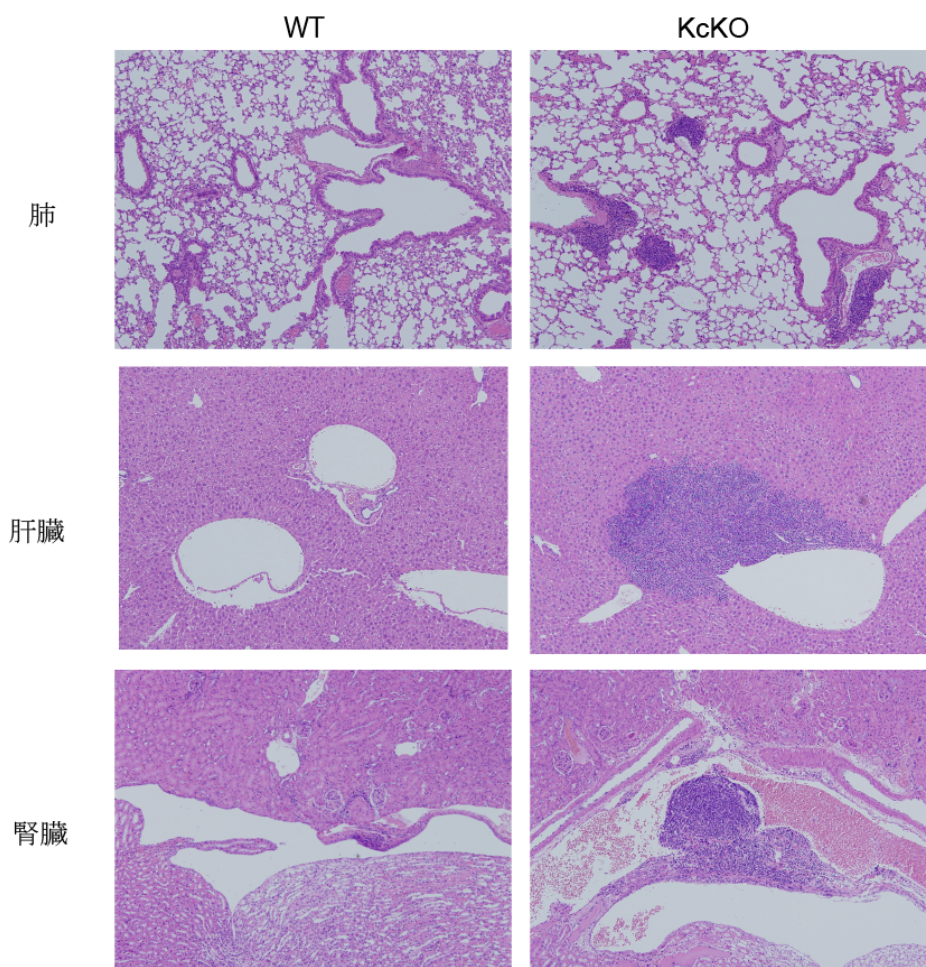
**図 9 KcKO マウス肺の傍気管支領域には iBALT の構造が見られ、それを構成するのは B220 陽性細胞が主体である**

KcKO マウス肺の傍気管支領域の代表的な iBALT の組織写真を 400 倍視野で示す。右は B220 を Alexa Fluor 555(赤)、核を DAPI (青) で染色した蛍光染色の代表的な写真を示す。

また、他の全身諸臓器として肝、腎、大腸を採取し、組織学的な検討を行ったところ、

KcKO マウスでは一定の割合で肝、腎の脈管周囲に肺において見られた iBALT と同様のリンパ球の集簇像が見られることが明らかとなった(図 10 および表 3)。ただし、これら肝、腎などの実質臓器においては Masson Trichrome 染色による組織学的検討で明らかな線維化の所見は認めなかった(data not shown)。





**図 10 KcKO マウスは内臓諸臓器に炎症細胞の集塊の形成を認める**

8 ヶ月齢の WT および KcKO マウスの肺、肝臓、腎臓の代表的な組織写真を 400 倍の倍率で示す。

組織	8 ヶ月 齢	
	WT	KcKO
肺	1/8	7/8
肝臓	2/8	3/8
腎臓	0/8	2/8
心臓	0/8	0/8
胃	0/8	0/8
小腸	0/8	0/8

**表 3 KcKO マウスは内臓諸臓器に炎症細胞の集塊の形成を認め、肺において特に高率に認められる**

8 ヶ月齢の WT および KcKO マウスの各種内臓臓器における炎症細胞の集族像の頻度を示す。各群 8 匹ずつ、解剖学的に同じ切断面で各臓器の切片を作成し、集族像の有

無を評価した。

上記の結果より、KcKO マウスは食道、肺における線維化とともに、肺での iBALT の形成に示されるような強い免疫異常の表現型を有することが示唆された。

## 5) KcKO マウスは高免疫グロブリン血症、抗核抗体の出現、B 細胞の活性化と CD4 陽性 T 細胞の Th2/17 系への偏倚した活性化を呈する

次に私は KcKO マウスの全身的な免疫異常についてさらに解析を進めた。3 ヶ月齢および 8 ヶ月齢の KcKO マウスより血清を採取し、その IgA/G/M 濃度を測定したところ、KcKO マウスではすでに 3 ヶ月齢の時点でも、また 8 ヶ月齢に至ってはより顕著に、高 IgG/M 血症を認めた (図 11)。

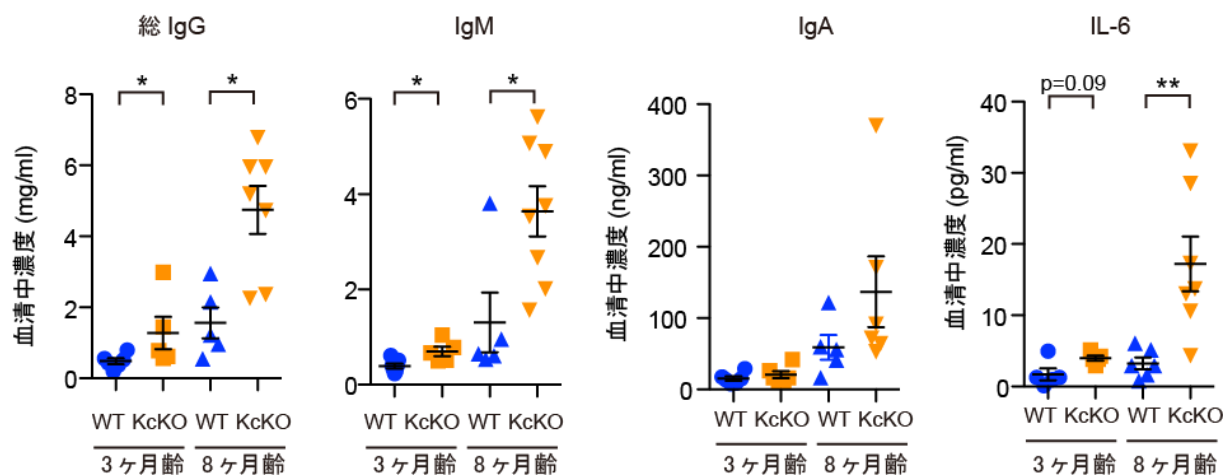


図 11 KcKO マウス血清は高 IgG、IgM 血症を呈し、血清中 IL-6 濃度も上昇している

3 ヶ月齢および 8 ヶ月齢の WT マウス、および KcKO マウスの血清中の濃度を測定した。それらの濃度は 8 ヶ月齢ではいずれも WT マウスに比較して有意に上昇していた。n = 4-7。すべてのグラフは mean  $\pm$  s.e.m.。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。3 ヶ月齢および 8 ヶ月同士のマウスで比較し、統計的検討は Mann-Whitney U test を用いて行った。異な

るグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

次に、Hep-2 細胞を用いて蛍光抗体間接法で血清中の抗核抗体の有無を検討したところ、KcKO マウスで抗核抗体の出現が確認され (図 12a,b)、また SSc の疾患特異的自己抗体とされる抗トポイソメラーゼ I 抗体値がコントロール群に比較して有意に上昇していることが示された (図 12b)。

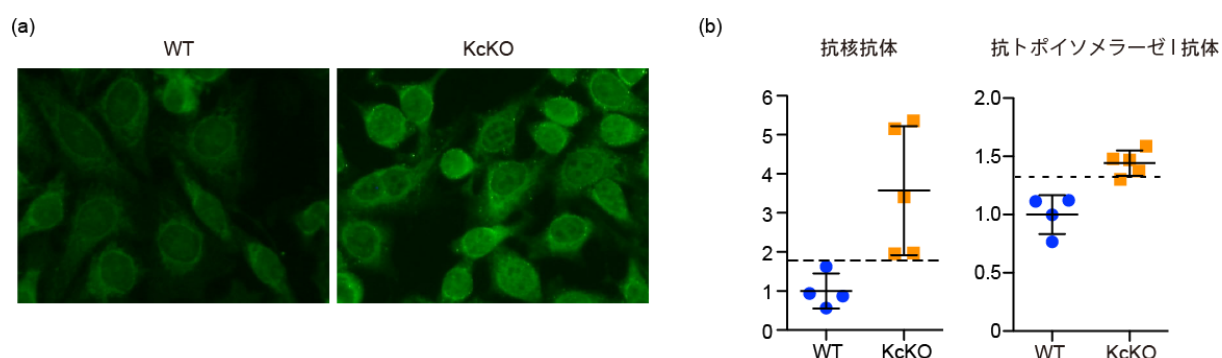


図 12 KcKO マウス血清には抗核抗体および抗トポイソメラーゼ I 抗体の出現が認められる

(a) 8 ヶ月齢のマウス血清を希釈し、Hep-2 細胞を用いて蛍光抗体間接法による評価を行った。代表的な写真を示す。倍率 400 倍。(b) ELISA 法によりマウスの抗核抗体および抗トポイソメラーゼ I 抗体の titer を測定した。グラフは WT マウスの平均値を 1 と標準化して相対値で示す。また、WT マウスの平均値+2x(標準偏差)を「陽性」とし、点線は陽性カットオフ値を示す。KcKO マウスは 5 例中 5 例陽性、抗トポイソメラーゼ I 抗体も 5 例中 4 例で陽性であった。n = 4-5。グラフは mean ± s.e.m.。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

これらの結果より、KcKO マウスでの B 細胞の異常活性化が示唆された。SSc 患者の B 細胞ではその活性化を反映し、細胞表面における CD19 の発現が恒常的に亢進していることが知られている<sup>54</sup>が、WT および KcKO マウス脾臓中の B 細胞でその細胞表面の CD19 の発現をフローサイトメトリーの蛍光強度により定量したところ、その発

現が KcKO マウスで亢進しており、SSc 患者の B 細胞同様、その恒常的活性化を示唆するものと考えられた (図 13)。

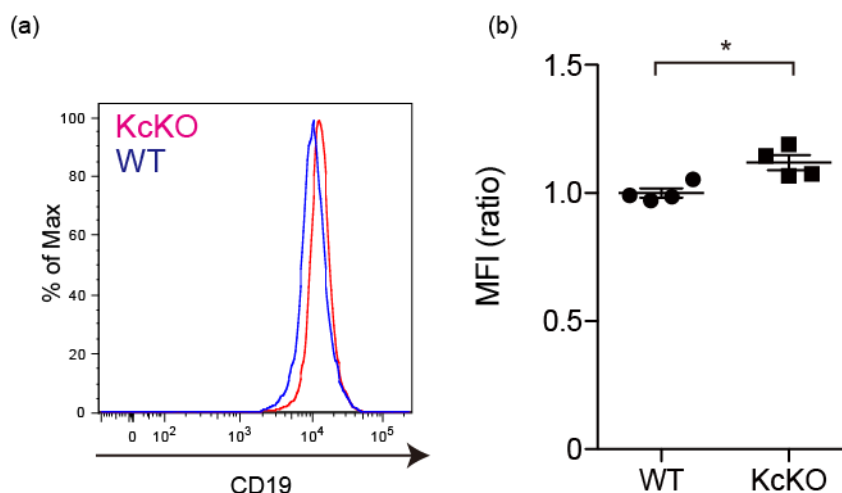


図 13 KcKO マウス脾臓中の B リンパ球では CD19 の発現が上昇しており、その活性化を示唆する

3 ヶ月齢マウスの脾臓中の細胞を CD45, CD3, B220, CD19 で染色、CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>の細胞をゲートし、CD19 の発現強度を比較検討した。(a) KcKO と WT について代表的なプロットを示す。(b) WT マウスと KcKO マウスの CD19 の Mean Fluorescence Intensity(MFI)を比較した。WT の MFI の平均を 1 に標準化し、相対値の比で示す。n = 4。グラフは mean ± s.e.m.。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

次に、T 細胞について検討を行った。SSc においては Th17 系の活性化<sup>55</sup>および Th1/Th2 のバランスにおいて線維化促進的に作用する Th2 系への偏倚が知られている<sup>56</sup>が、CD4 陽性 T 細胞における細胞内サイトカイン IL-4、IL-17A、IFN- $\gamma$  の染色を行ったところ IL-4 および IL-17A 陽性細胞の比率が KcKO マウスで上昇していることが観察され、Th2/Th17 系有意の免疫活性化を示唆するものと考えられた (図 14)。

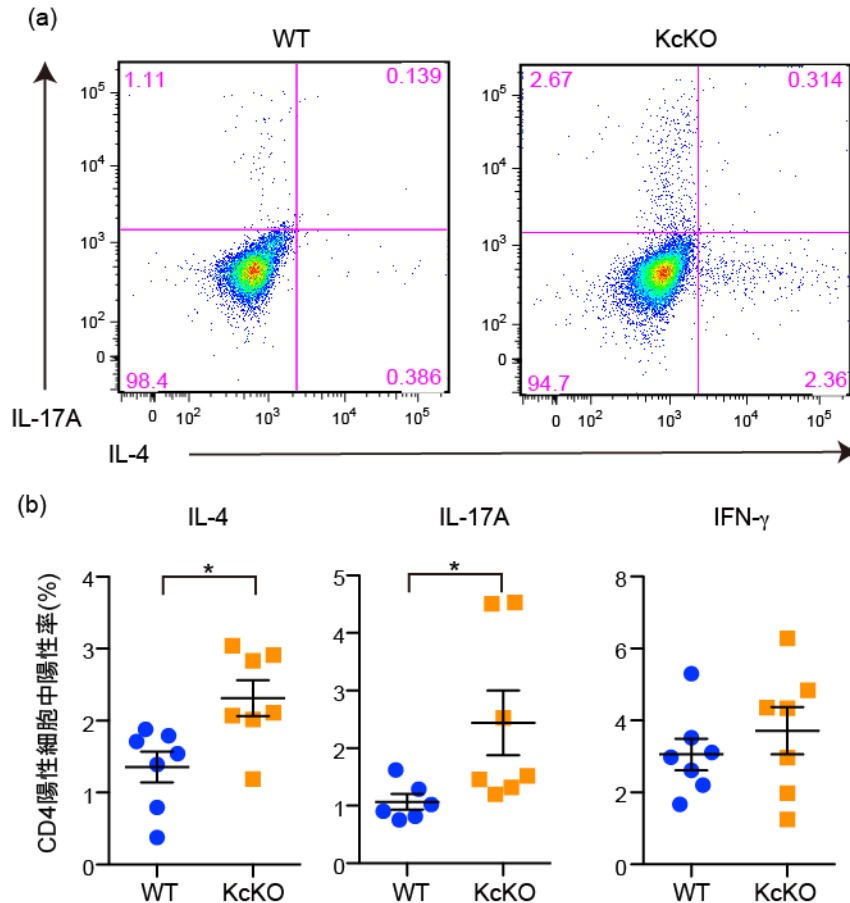


図 14 KcKO マウスは Th2/Th17 系優位の免疫活性化を呈する

3 ヶ月齢マウスの鼠径リンパ節中のリンパ球について CD3、CD4、および細胞内サイトカイン IL-4、IL-17A、IFN- $\gamma$  について染色し、CD3/CD4 陽性細胞中の各サイトカインの陽性細胞の比率について検討した。(A) IL-4、IL-17A で展開したプロットのうち WT、KcKO マウスについて代表的な結果を示す。(B) 各サイトカインの陽性細胞の比率を比較した。n = 7。すべてのグラフは mean  $\pm$  s.e.m.。\*P < 0.05。8 ヶ月齢の同胞マウスで比較し、統計的検討は Mann-Whitney U test を用いて行った。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

## 6) KcKO マウスは皮下の血管の拡張、蛇行、透過性の亢進などの血管の変化も呈する

ここまでの検討で、KcKO マウスは皮膚、食道、肺における線維化と自己免疫・免疫異常を生じることが明らかとなった。SSc は上記の臓器の線維化と自己免疫に加え、



血管新生の異常、血管の蛇行狭窄などの血管異常・血管障害を特徴とする。そこで、本 KcKO マウスでも何らかの血管の変化が見られるかどうか、Evans Blue 染色液あるいは FITC-デキストランを尾静脈から静脈注射して観察を行ったところ、KcKO マウスでは Evans blue 染色液あるいは FITC-デキストランの血管外への漏出が亢進しており、特に FITC-デキストランを用いた評価では KcKO マウス血管の著明な蛇行、狭窄、あるいは色素の血管外漏出などの異常が見られた（図 15）。以上より、KcKO マウスは線維化、自己免疫、血管障害という、SSc に見られる 3 主徴を呈することが明らかとなった。

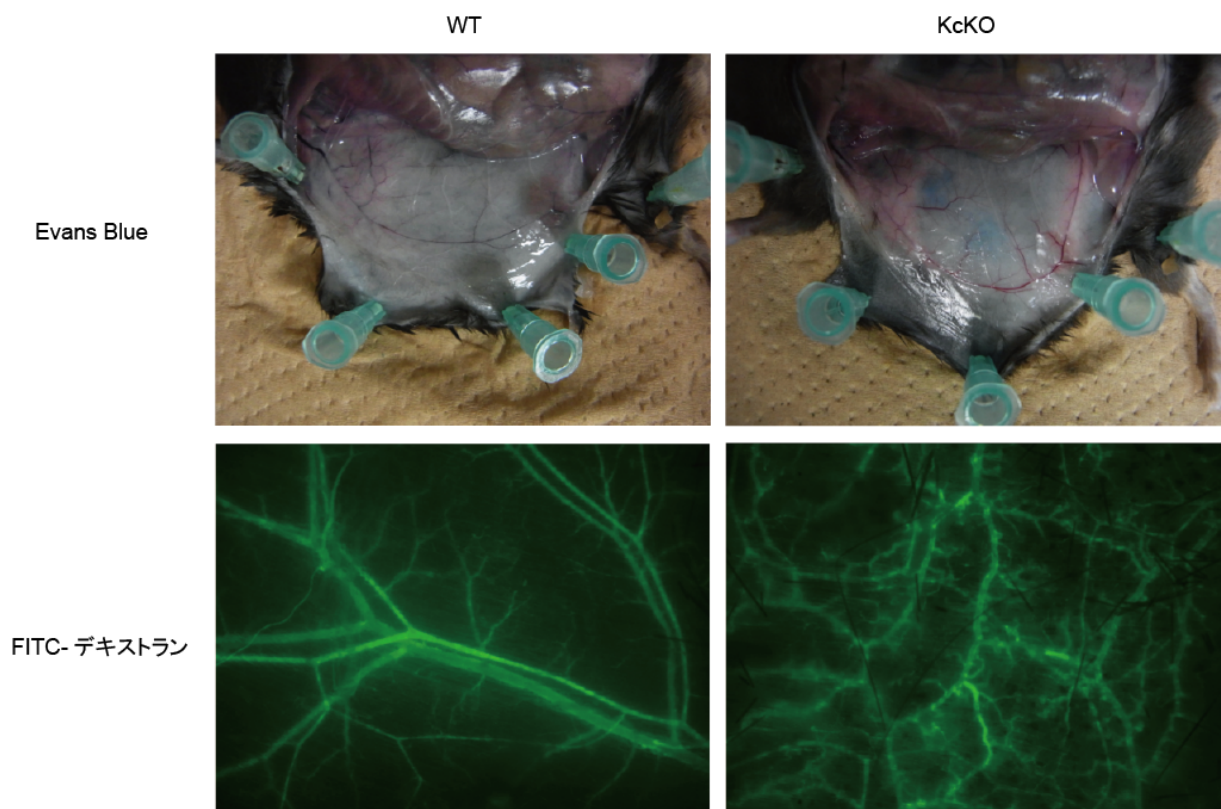
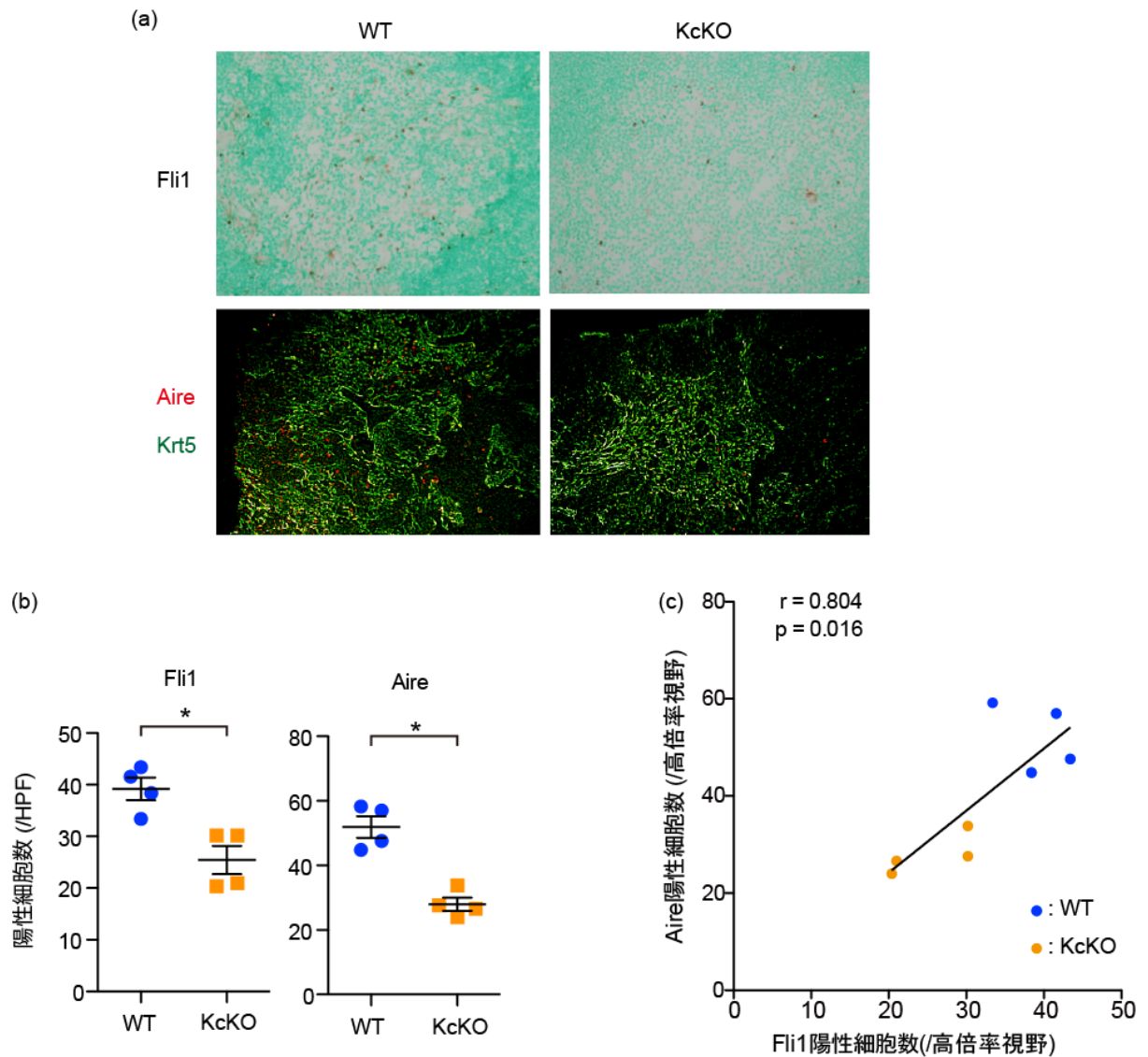


図 15 KcKO マウスでは皮下血管の透過性の亢進、血管の蛇行、狭窄が見られる WT マウスおよび KcKO マウスの尾静脈から Evans Blue 染色液あるいは FITC-デキストランを尾静注し、染色液の漏出あるいは血管の走行を評価した。

## 7) KcKO マウスでは胸腺における自己免疫調整遺伝子の発現低下と内在性制御性 T 細胞のアウトプットの低下が見られる

ここまでの結果で、KcKO マウスにおける予想外の非常に強い自己免疫的な表現型が示唆された。この原因を考える上で、胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell; mTEC)において末梢の自己タンパク（末梢組織特異抗原 tissue-restricted specific antigen; TSA）の発現を master regulator として調節し、自己反応性 T 細胞の除去、すなわち負の選択 negative selection に決定的に重要な役割を果たす自己免疫調整遺伝子 (Autoimmune Regulator 遺伝子; Aire 遺伝子)のノックアウトマウスにおいて、肺における iBALT の形成、自己抗体などの産生が認められるとする報告が存在し<sup>52</sup>、また、K14、Fli1 はともに胸腺上皮細胞にも豊富に発現している<sup>57,58</sup>ことから、K14 発現細胞特異的 Fli1 欠失マウスである KcKO マウスの胸腺髄質上皮細胞にも何らかの異常があるのではないかと予想し、次に私は KcKO マウス胸腺の異常に着目して検討を進めた。まず、胸腺組織の免疫染色、あるいは蛍光免疫組織染色において単位視野あたりの Fli1 および Aire 遺伝子の陽性細胞数が KcKO マウスで減少しており、また、それらの陽性細胞数は互いに強い正の相関を示すことが示された (図 16a-c)。



**図 16 KcKO マウス胸腺上皮において Fli1 と Aire の発現は抑制されており、Fli1 の陽性細胞数と Aire の陽性細胞数は正に相関する**

4 週齢の WT および KcKO マウスより胸腺を摘出し、Fli1 で免疫染色、あるいは Krt5 と Aire に対する抗体を用いて 2 重蛍光免疫染色を行った。Krt5 は胸腺髄質上皮に発現する代表的ケラチンである。(a) 代表的な写真を上に示す。(b) Fli1 と Aire についてそれぞれ高倍率視野中で陽性細胞数をカウントした。(c) 各マウスで Fli1 と Aire についての陽性細胞数の相関を検討した。各群  $n = 4$ 。直線は回帰直線を示し、 $r$  は Spearman の相関係数。

さらに、胸腺上皮は自己免疫に抑制的に作用する制御性 T 細胞 (regulatory T cell;

Treg) の分化にも重要とされており<sup>59</sup>、胸腺における内在性制御性 T 細胞(naturally occurring regulatory Treg; nTreg)のアウトプットを CD3、CD4、Foxp3 の染色によりフローサイトメトリーで検討したところ、KcKO マウスにおいては CD3 陽性細胞中における CD4/Foxp3 陽性細胞の比率の減少が認められ、胸腺からアウトプットされる nTreg の減少が示唆された (図 17)。

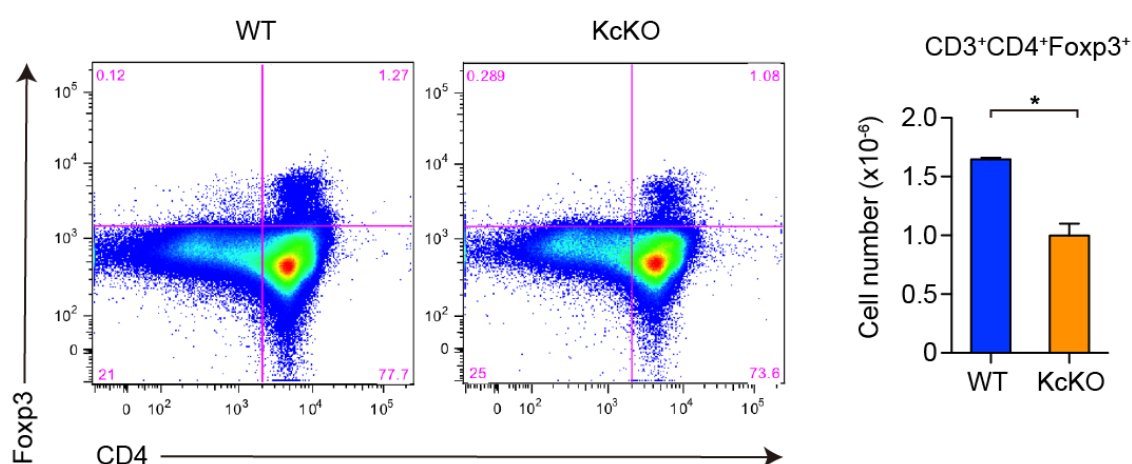


図 17 KcKO マウス胸腺では nTreg のアウトプットが減少する

4 週齢の WT および KcKO マウス胸腺から胸腺細胞を単離し CD3、CD4、Foxp3 で染色し、胸腺における CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の数を検討した。左には CD3 陽性でゲートし、CD4 および Foxp3 で展開した 2 次元プロットのうち代表的なプロットを示す。右は胸腺細胞総数とその中の CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合から算出した胸腺細胞中の CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞(nTreg 細胞)の総数。n = 4。グラフは mean ± s.e.m.。\*P < 0.05。統計的解析は Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

以上より、KcKO マウスの胸腺では胸腺髄質において Aire の発現が著明に低下しており、自己免疫の抑制に重要な nTreg の減少が見られることが示された。

## 8) Fli1 は AIRE 遺伝子の転写を制御する

これらの結果より、Fli1 の発現低下が胸腺上皮における Aire の発現低下を介して自己免疫の表現型を誘導していることが示唆された。つぎに、過去に同じ Ets 転写因子ファミリーである Ets-1/Ets-2/ESE1 が AIRE 遺伝子の転写を制御していることが報告されていることをふまえ<sup>60,61</sup>、転写因子 Fli1 が AIRE 遺伝子の転写を正に制御しているとの仮説のもと *in vitro* で検討を進めた。検討を進めるにあたっては、ヒト胸腺上皮の cell line を用いることが理想的ではあったが、入手および単離培養が困難であるため、同じく上皮系の cell line である培養ヒト皮膚表皮角化細胞を用いて実験を行った。まず、RNA 干渉法により培養ヒト皮膚表皮角化細胞で Fli1 遺伝子発現をノックダウンし、AIRE 遺伝子の発現を検討したところ、Fli1 のノックダウンにより AIRE 遺伝子の発現は有意に低下した (図 18)。

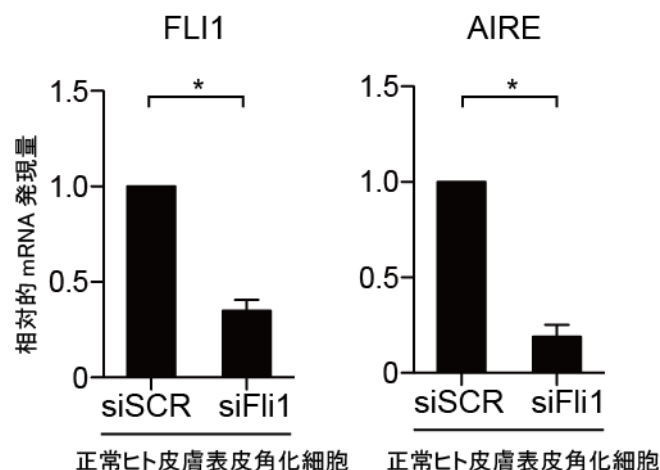


図 18 正常ヒト皮膚表皮角化細胞では Fli1 の発現低下により AIRE の発現は低下する

培養ヒト表皮角化細胞で Fli1 およびコントロールの siRNA をトランスフェクションし、Fli1 遺伝子および AIRE 遺伝子の発現量を定量的リアルタイム PCR 法で評価した。コントロール siRNA 処理した検体の発現量を 1 として Fli1 siRNA 処理した場合の発現量を相対値で示す。n = 4。グラフは mean ± s.e.m.。\*P < 0.05。統計的解析は

Mann-Whitney U test を用いた。異なるグループでも同じ実験を繰り返したが、同様の結果が得られた。

次に、AIRE 遺伝子プロモーター領域の sequential deletion ルシフェラーゼ・プロモーターコンストラクトおよび Fli1 遺伝子発現ベクターまたはコントロールベクターを培養ヒト表皮角化細胞にトランスフェクションしてその転写活性をルシフェラーゼ蛍光強度で検討したところ、Fli1 は AIRE 遺伝子の発現を正に制御していること、その転写制御に重要な領域は転写開始点の-583 塩基より下流の領域に存在することが示唆された (図 19)。

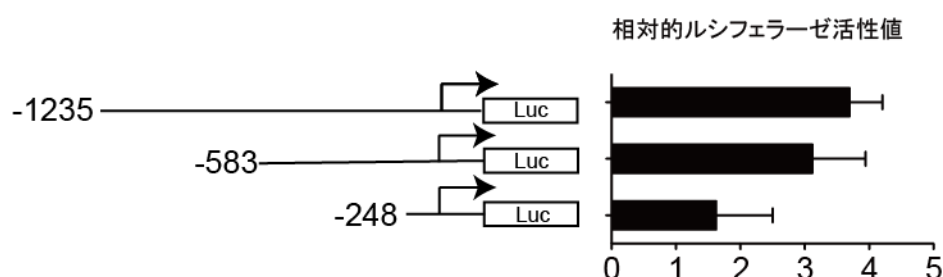


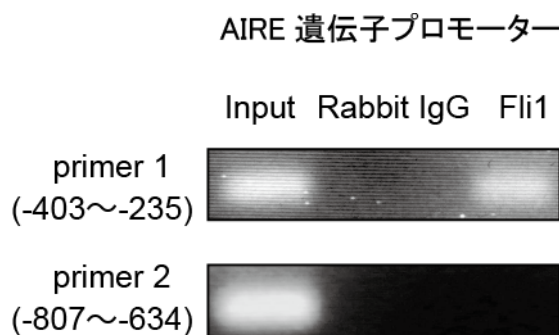
図 19 AIRE 遺伝子は転写開始点-583bp より下流の領域で Fli1 の転写制御を受ける

培養ヒト表皮角化細胞に AIRE 遺伝子プロモーター・ルシフェラーゼコンストラクトのプラスミド、および Fli1 遺伝子発現ベクターまたはコントロールベクターをトランスフェクションさせ、ルシフェラーゼ活性を計測、Fli1 遺伝子発現ベクターをトランスフェクションした場合のルシフェラーゼ活性を、コントロールベクターをトランスフェクションさせた場合のルシフェラーゼ活性を 1 として相対値で表示した。グラフは mean  $\pm$  s.e.m.。同様の実験を 3 回行った結果を示す。

次に、培養ヒト皮膚表皮角化細胞を用いてクロマチン免疫沈降法による検討を行ったところ、AIRE 遺伝子の転写開始点-403 塩基～-235 塩基の領域への Fli1 の結合が示唆



された(図 20)。



**図 20 Fli1 は AIRE 遺伝子プロモーターの-403~-235 の領域に結合している**  
クロマチン免疫沈降法を用い、培養ヒト表皮角化細胞において AIRE 遺伝子プロモーター-403~-235 の領域に Fli1 が結合していることが示された。Negative control として、プロモーター-807~-634 の領域には Fli1 は結合していないことを示す。

この領域には Fli1 を含めた Ets 転写因子ファミリーの転写因子結合共通配列である GGAA（および逆相補配列 TTCC）が 3 カ所存在する。すなわち、-247 塩基からの GGAA(; site A)、-288 塩基からの TTCC(; site B)、-385 塩基からの GGAA(; site C)である（図 21）。Fli1 による AIRE 遺伝子の転写制御部位を決定するため、上記 3 カ所に単独、あるいは組み合わせで 2 ヶ所あるいは 3 ヶ所に同時に GGAA→TGAA/TTCC→TTCA となるように点変異を入れ（図 21）、これら野生型/変異型 AIRE 遺伝子プロモーター・ルシフェラーゼコンストラクトと、Fli1 遺伝子発現ベクターまたはコントロールベクターをトランスフェクションしたところ、①それらの点変異によって Fli1 過剰発現による AIRE 遺伝子転写促進が減弱され、これらの部位で Fli1 が AIRE 遺伝子の転写を制御していること、②site A が最も転写制御に重要と思われること、③site

A/B/C の 3 カ所すべての箇所の変異により Fli1 過剰発現による AIRE 遺伝子の転写促進

進が完全に失われることが明らかとなった (図 21)。

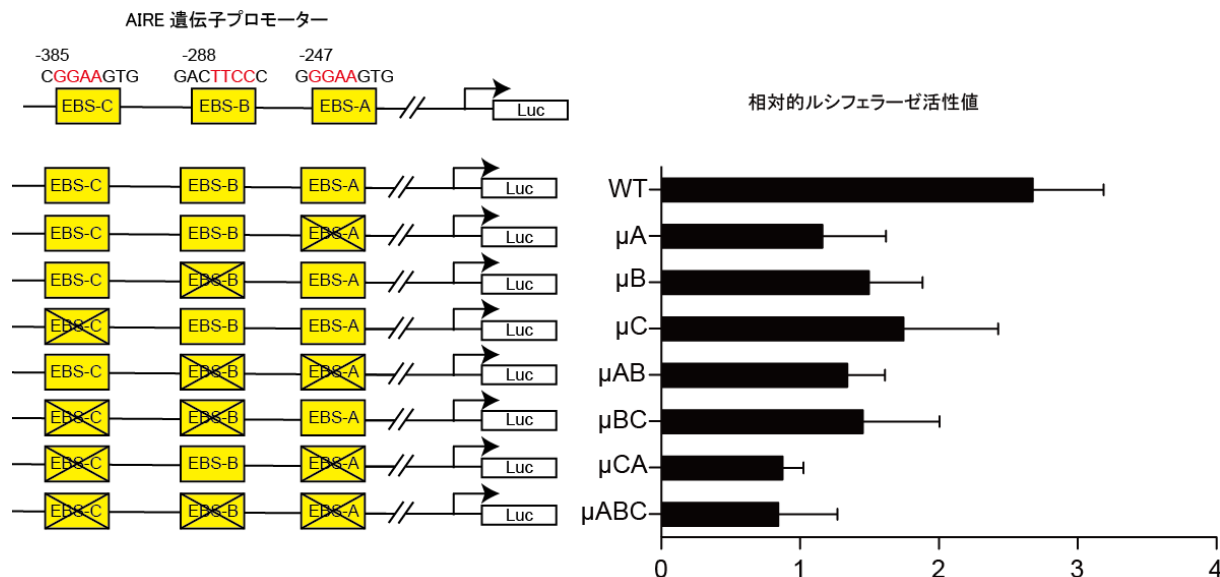


図 21 AIRE 遺伝子の Fli1 過剰発現による転写促進は転写開始点-385 bp~-247 bp にある 3 カ所の Ets 転写因子結合配列の点変異により失われる

site A、site B、site C それぞれに 1 カ所ずつ、あるいは組み合わせて点変異を入れたルシフェラーゼ・プロモーターコンストラクトと、コントロールベクターあるいは Fli1 遺伝子発現ベクターをトランスフェクションした際の AIRE 遺伝子プロモーターのルシフェラーゼ活性を比較した。それぞれの変異プロモーターにコントロールベクターをトランスフェクションした際の活性を 1 として Fli1 遺伝子発現ベクターをトランスフェクションさせた際の数値を比で表す。3 回同様の実験を施行し、グラフは mean ± s.e.m. で示す。

次に、DNA 親和性沈降法を用いて AIRE 遺伝子プロモーター領域への Fli1 の結合を

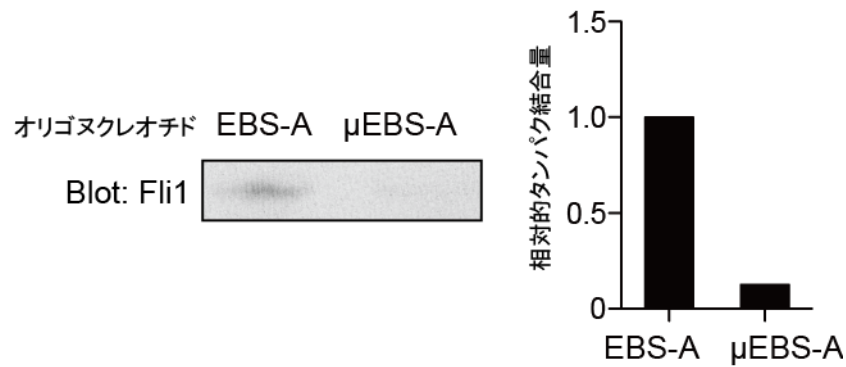
さらに検討した。上記の結果は AIRE 遺伝子の Fli1 による転写制御には特に site A の

配列が重要であることが示唆していたが、DNA 親和性沈降法では site A を含むオリゴ

ヌクレオチドに Fli1 が結合すること、および、site A の点変異(GGAA→TGAA)により

その結合が失われることが示された (図 22)。





**図 22 Fli1 は AIRE 遺伝子プロモーターsite A のオリゴヌクレオチドに結合し、点変異で結合能が低下する**

DNA 親和性沈降法により Fli1 が AIRE 遺伝子プロモーター配列のうち Ets 転写因子結合配列 site A(-247~-244)をはさむオリゴヌクレオチド(-265 ~ -225)に結合し、点変異により結合が失われることを示す。右はデンストメトリーによってバンドの濃度を比較した。

以上から、Fli1 は AIRE 遺伝子プロモーター領域に結合し、その転写を正に制御していることが示された。

## 9) SSc 患者皮膚では AIRE の発現が著明に低下している

上記の検討で、培養ヒト表皮角化細胞を使った上記の検討で Fli1 が AIRE 遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。AIRE 遺伝子についてはもともと mTEC における TSA の転写調節および mTEC の分化成熟についての役割に注目しての報告が圧倒的ではあるが、その意義については未だ不明な点が多いながらも皮膚表皮角化細胞にも発現しているとの報告が見られる<sup>62,63</sup>。そこで私は、図 1 に示したように Fli1 が SSc 皮膚において著明な発現低下を示すことから、本症表皮においても Aire の発現が低下しているのではないかと仮説のもと、SSc 皮膚検体の定量的リアルタイム

PCR を用いた AIRE 遺伝子発現量の検討と、皮膚組織の免疫組織学的検討を行った。

すると、この仮説の通り、mRNA 発現は SSc 患者皮膚で有意に低下しており、かつ、タンパクについては特に表皮において SSc 患者でその発現が健常人に比較して著明に低下していることが明らかとなった (図 23)。

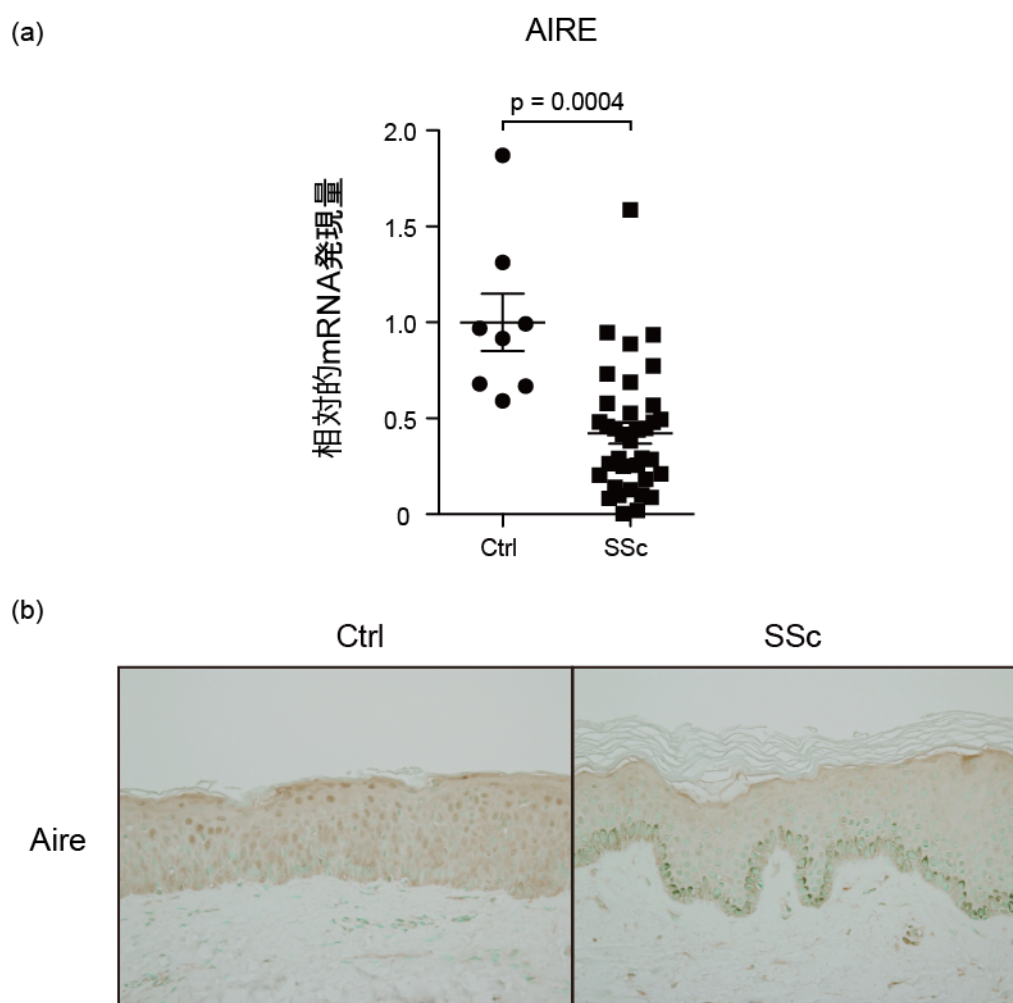


図 23 SSc 患者皮膚では健常人に比較して Aire の発現が著明に低下している

(a) 健常人と SSc 患者皮膚における AIRE 遺伝子の発現の比較。健常人の発現量を 1 に標準化し、その相対値で示す。(b) 健常人と SSc 患者皮膚についてそれぞれ代表的な免疫染色の写真を倍率 400 倍の視野で示す。

上記より、健常人に比較して SSc 患者皮膚において Aire の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現が著明に低下していることが明らかとなった。

## V. 考察

SSc の病因に関する研究はこれまで主としてその主要な 3 病態である線維化、血管障害、免疫異常に対応し、線維芽細胞、血管内皮細胞、およびリンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞に関して盛んに行われてきた。そして、私が所属する東京大学皮膚科研究グループのこれまでの検討により、転写因子 Fli1 の線維芽細胞、および血管内皮細胞における恒常的発現の低下が、SSc の線維化、血管障害の病態において重要な役割を果たすことが明らかとなってきた<sup>28,37</sup>。今回私は、従来注目されてこなかったものの最近いくつかの先駆的な研究によってその異常が指摘されている本症の表皮およびそれを構成する表皮角化細胞の異常に着目し、表皮角化細胞において Fli1 の恒常的発現低下が本症の病態において果たす役割についての検討を、Cre-Loxp 系を用い、重層扁平上皮の基底細胞に発現するケラチン 14 発現細胞特異的に Fli1 をノックダウンしたマウスを作成することにより試みた。すると、本マウスはその表皮において、SSc 患者の表皮において報告されているような活性化した表現型を呈し、さらに皮膚真皮における線維化を呈しただけではなく、食道と肺の線維化、および肺をはじめとした実質諸臓器に免疫活性化を反映すると考えられるリンパ球の集簇像を呈し、血清学的にも抗核抗体の出現等を認め、強い自己免疫の表現型を呈した。また、線維化と免疫異常の他に SSc の 3 主徴としてみられる血管障害についても、血管

透過性の亢進、血管の蛇行、狭窄などの SSc の血管の変化に類似した<sup>37</sup> 異常を呈した。

そして、本マウスが呈した強い免疫異常の原因として次に私はケラチン 14 が豊富に発現している胸腺上皮に着目し、胸腺上皮において **negative selection** の制御を介して自己免疫の成立に決定的に重要な役割を果たしているとする転写因子、自己免疫調節遺伝子 **Aire** の発現が低下していることを示し、*in vitro* で **Fli1** が **Aire** の遺伝子を制御していることを証明した。

従来の研究では、SSc の免疫異常の病態については、免疫細胞の活性化についての研究は行われてきたが、これまで未解決であった初期免疫の異常、なぜ”自己免疫”であるのか、という疑問について何かしらの解答を与えうるような検討を行った研究はほぼ皆無であった。今回の私の検討は、この全く問題に対して一つの示唆を与えうる画期的な研究であると考えられる。

広く知られているように、胸腺は T 細胞の分化成熟に決定的な重要な役割を果たす臓器である。幼若な T 細胞は胸腺髄質において、まず自己の **MHC class II** への反応性があるものが正の選択 **positive selection** を受け、その後、**mTEC** により **MHC class II** で呈示される末梢の自己抗原タンパク、**TSA** に反応するものは負の選択 **negative selection** を受ける。この **negative selection**こそ、自己反応性 T 細胞を除去し、自己免疫の回避に決定的に重要な役割を果たす制御機構、すなわち中枢性免疫寛容(**central**

tolerance)のメカニズムであるが、当然予想されるようにこのシステムの破綻は自己免疫疾患の発症において重要な役割を果たす<sup>64</sup>。Aire は Aire 遺伝子によってコードされるタンパクで、mTEC の核内において TSA の転写を制御する master regulator であり、胸腺上皮における TSA の転写制御は Aire の発現量に用量依存的であること、また、Aire の発現低下は用量依存的に自己反応性 CD4T 細胞の negative selection からの逸脱をもたらすことが知られている<sup>65,66</sup>。さらに、近年の研究で Aire は mTEC の成熟自体において、さらに、胸腺における Treg の分化成熟において、重要な役割を有している可能性があることが明らかとなってきた<sup>67</sup>。ヒトにおいては AIRE 遺伝子は常染色体劣性遺伝形式をとる自己免疫性多内分泌腺症 I 型(autoimmune polyendocrinopathy type 1; APS type 1)あるいは自己免疫性多内分泌腺症状-カンジダ症-外胚葉ジストロフィー(autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy; APECED)の原因遺伝子であることが知られている<sup>68,69</sup>。APECED は 21 番染色体上に存在する AIRE 遺伝子欠損による単一遺伝子疾患であり、副腎皮質機能低下症 (Addison 病)、1 型糖尿病、副甲状腺機能低下症などの自己免疫性内分泌疾患、あるいは口腔・食道カンジダ症などの皮膚粘膜カンジダ症、爪形成不全など外胚葉形成異常の症状を呈する<sup>70</sup>。また、Aire 欠損マウスにおいては mTEC における TSA の発現が著明に低下し、種々の臓器特異的自己免疫疾患を発症することが知られている<sup>71</sup>。例えば Shum らは Aire

欠損マウスにおいて肺において気管支周囲、傍気管支領域に稠密なリンパ球の集塊 (iBALT) を伴って肺の線維化が見られ、ヒトの間質性肺疾患の組織像と類似することに着目し、Aire 欠損がヒト間質性肺疾患の病態成立において果たす役割を検討している<sup>52</sup>。

また、Aire 遺伝子と各種の自己免疫疾患については、遺伝学的研究によってもその関連が明らかとなってきた。たとえば高率に自己免疫性疾患を発症するダウン症患者の胸腺においては Aire 遺伝子および Aire 関連遺伝子の発現が低下していることが報告され、ダウン症患者における自己免疫性疾患に対する高い疾患感受性との関連が考えられている<sup>72</sup>。近年の Genome-wide association study (GWAS)により、Aire の特定の一塩基多型(SNP)が関節リウマチの疾患感受性に関連していることが証明された<sup>73</sup>。また SSc についても、Aire 遺伝子イントロン領域の特定の多型が SSc と慢性甲状腺炎の合併症例と関連していたとの報告が見られる<sup>74</sup>。

SSc の免疫異常については広く研究され、数多くの先行研究が存在する。SSc は抗核抗体のほか抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体など特異的自己抗体の産生を伴い、また、SSc の主要病態のうちの一つである血管障害については抗血管内皮細胞抗体が重要な役割を果たすことも明らかとなっており<sup>75</sup>、B 細胞の異常活性化が背景として考えられている<sup>12,54,76,77</sup>。強い自己免疫異常を反映するとされる

iBALT の形成については関節リウマチやシェーグレン症候群に合併する間質性肺病変で最もよく見られることが知られているが、SSc に合併する間質性肺病変においても肺における B 細胞の浸潤が増加しており、血管などの周囲に稠密な B 細胞の集塊が形成されると報告されている<sup>53</sup>。また、近年 CD20 抗体が SSc 合併間質性肺疾患に用いられ、一部の症例にその有効性が認められることから、本症の病態における B 細胞の活性化の重要性をさらに裏付けるものと考えられる<sup>78</sup>。T 細胞については、線維化促進的に作用する Th2 優位の環境と Th17 細胞の活性化がその病態形成に深く関与していることが明らかとなってきた<sup>56,79-81</sup>。本マウスでは、B 細胞の活性化や、Th2/Th17 系優位の免疫環境、抗核抗体や SSc に疾患特異性の高い抗トポイソメラーゼ I 抗体の陽性を呈するなど、SSc の免疫異常に非常に類似した免疫異常を呈し、これらは従来の本症のモデルマウスが持ち合わせていなかった特徴である。そして、今回 *in vitro* での検討で示し得たように、Fli1 は AIRE 遺伝子を正に転写制御するが、本マウスは胸腺上皮における Fli1 の発現低下を介して Aire の発現が低下していた。前述の通り、Aire の発現低下は用量依存的に自己反応性 CD4T 細胞の **negative selection** からの逸脱をもたらす<sup>66</sup>ことを考えれば、本マウスの上皮細胞における Fli1 の発現低下は Aire の発現低下を介してこの **negative selection** のメカニズムの機能不全ないし機能低下をもたらし、末梢において、自己反応性 CD4T 細胞などによる何らかの自己タ



ンパクの認識、さらに炎症ないし線維化を誘導した、という機序を想定し得る。このような機序が実際に SSc の自己免疫の成立に寄与しているかどうかという問題を考える上で、SSc 患者の胸腺における Fli1 および Aire の発現が低下しているかどうかの検討も興味を持たれるところであるが、胸腺組織は入手困難であることを考え、今回は皮膚における発現の検討を行ったところ、実に、患者皮膚で Aire の発現が低下していること、および Fli1 と Aire の発現量が相関していることが見いだされた。上記の結果を考え併せると、胸腺上皮など上皮細胞における Fli1 の発現低下が SSc 患者における自己免疫および様々な免疫活性化の病態の成立に重要な寄与をしている可能性が示唆されていると考えられ、本症患者の病態についての研究のうえで、新たな視座をあたえるものと考えられた。

本研究は SSc の病態についてこのような新たな視点をもたらしつつも、未だ解決すべきいくつかの疑問点と課題を残している。第一点は、本研究でコンディショナルノックアウトマウスの作成に用いたマウスは K14 のプロモーター特異的ノックアウトマウスであるが、このマウスの非常に特徴的な皮膚および食道の線維化が、それを被覆する皮膚表皮角化細胞あるいは食道扁平上皮細胞の異常活性化に直接に由来するものか、あるいは、胸腺上皮の異常に起因する自己免疫ないし免疫異常に由来するも

のか、あるいは、その両者の寄与によるものか、また両者の寄与であるとするならばその寄与の度合いについてはどちらが優位であるのか、が、明確でないという点である。K14cre マウスについては、Cre-Loxp 系を用いて表皮角化細胞特異的に特定の遺伝子をノックアウトするために頻用されるマウスであるが、実際には、少数ながらも胸腺上皮特異的ノックアウトマウスを作成するために用いたとする論文も見られる<sup>57</sup>。逆に、胸腺上皮特異的ノックアウトマウスの作成に最もよく用いられているのは、胸腺上皮に豊富に発現する Foxn1 遺伝子プロモーター下流に部位特異的酵素 Cre を発現する Foxn1cre マウスであるが<sup>59,82</sup>、実はこの Foxn1 は表皮角化細胞にも発現し、その分化に重要であることが知られている<sup>83</sup>。すなわち、K14cre マウスを用いても、Foxn1cre マウスを用いても、いずれにしろ表皮や胸腺を含める広く上皮細胞特異的なノックアウトマウスになっていると考えられる。そして、今回の KcKO マウスにおいて線維化の見られる部位が皮膚、食道など SSc 患者において特に線維化が見られる臓器と一致し、それは K14 の発現する重層扁平上皮によって被覆される部位であるということは示唆的である。すなわち、一方で表皮あるいは食道上皮の Fli1 の発現低下による活性化により直接に IL-1 $\alpha$ / $\beta$ などの産生を介して直接その下層に線維化が誘導され、あるいは/かつ、胸腺の negative selection の異常に起因する免疫異常を介して間接的に線維化が誘導されている可能性が考えられる。そして、これらの活性化した上皮

の「直接的」寄与と、免疫を関した「間接的」寄与は、本マウスにおいても、あるいは SSc の病態においても両者それぞれが各々に、あるいは、それぞれが相互作用・相乗効果を生じながら存在し、線維化に寄与していることも想像される。また、KcKO マウスでは血管透過性の亢進、血管の異常な拡張、蛇行など、SSc 患者でも見られる血管障害の機能的、形態的異常<sup>37</sup>を呈した。SSc においては血管障害が線維化の病態成立にも極めて重要な役割を果たすことが分かっている<sup>2</sup>。前述のようにこの血管障害の成立には、抗血管内皮細胞抗体の存在が寄与していることも分かってきており<sup>75,84</sup>、本マウスにおいて自己免疫寛容の破綻と免疫の異常活性化から抗血管内皮細胞抗体の産生を介して血管障害を呈し、その帰結として線維化を呈した、という可能性も考慮される。いずれにしろ、KcKO マウスの線維化が、皮膚表皮の活性化の直接的な寄与によるか、胸腺上皮の異常による免疫異常（さらに、抗血管内皮抗体の産生からの血管障害を介する）間接的な寄与によるものであるかを明らかにするためには、たとえば胸腺移植などの方法を用いて KcKO マウスの胸腺を自己の成熟リンパ球を持たない Rag1<sup>-/-</sup>マウス<sup>85</sup>などの免疫不全マウスに移植して、皮膚あるいは内臓の線維化が誘導されるかどうかを検討することは有用と思われるが、今後の検討課題である。

第二点としては、本マウスの免疫異常の病態が胸腺上皮の異常のみに由来するか、あるいは皮膚表皮における異常も免疫異常に関与しているか、という点である。実は

Aire は、胸腺上皮細胞だけでなく、皮膚表皮角化細胞および線維芽細胞でも発現しており、ヒト表皮角化細胞と線維芽細胞を用いた 3 次元培養系の中で血液前駆細胞を培養すると、胸腺における positive/negative selection を受けた細胞と同様、自己 MHC 拘束性を有してかつ自己反応性 T 細胞が除去された、多様な T 細胞受容体のレパトアを有する T 細胞が分化成熟したとする報告、すなわち、胸腺に独立に、末梢である皮膚において T 細胞の分化成熟と末梢性免疫寛容(peripheral tolerance)が誘導されたとする報告が見られる<sup>63</sup>。このことを考えると、本研究における KcKO マウスの T 細胞の異常が、胸腺上皮における T 細胞の分化成熟異常のみに起因するか、あるいは、皮膚などの末梢における T 細胞の分化成熟異常も関与しているのか、という点は未解決な問題点であると思われる。これについても、Aire を欠損した表皮角化細胞-皮膚線維芽細胞の 3 次元培養系、あるいは Fli1 を欠損した表皮角化細胞-皮膚線維芽細胞の 3 次元培養系を用いて血液前駆細胞から T 細胞の分化成熟を検討する in vitro の検討等が考えられるが、これも今後の検討課題と言える。また、この点に関連して、健常人に比較して SSc 患者で Aire の発現が著明に低下している、というのは興味深い観察と思われる。前述のように、皮膚の表皮角化細胞や線維芽細胞における Aire は末梢性免疫寛容 peripheral tolerance の成立に重要な役割を果たすとの報告もある<sup>63</sup>が、その意義についての検討は未だ乏しい。本症皮膚において Fli1 の発現低下が Aire の発現を

介して *peripheral tolerance* の機序に破綻を来たし、SSc の自己免疫を惹起しているという可能性も考慮されるが、これについても皮膚表皮における Fli1、Aire の発現の意義を含めて更なる検討が必要である。

これらのいくつかの未解決の課題を残すものの、本研究は、これまで SSc において全く解明されてこなかったその初期免疫の異常、なぜ本疾患が自己をターゲットとする免疫を伴う疾患であるのか、および、なぜ肝や腎など実質臓器には線維化が(少なくとも一次的には)生じないものの皮膚や食道といった上皮に被覆された臓器において特に線維化が来されるのかという点についての一つの示唆を与えうる画期的な研究と考えられる。また、本マウスは上皮細胞における特異的なノックダウンにより自己免疫・免疫異常、線維化、血管異常という SSc の主要 3 病態を再現する、従来になかった新しいモデルマウスであり、今後 SSc の治療戦略を考える上で有用なモデルとなる可能性がある。昨年、van Bon らは SSc 患者における大規模なプロテオーム解析によってケモカイン CXCL4 の血漿中濃度が SSc 患者において著明に上昇していること、さらに *in vitro* での検討によってこのケモカインが Fli1 の発現を著明に低下させることを示し、このことが本症の病態において重要な役割を果たしている可能性について言及している<sup>86</sup>。この研究における *in vitro* の検討は血管内皮細胞を用いたもの

であり今回私が着目した上皮細胞とは細胞種が異なるものの、今後、CXCL4 をターゲットとした治療によって、SSc 患者の血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞の各々において低下している Fli1 の発現を回復させ、本症の病態を改善させるという戦略について検討の価値があると考えられる。また、SSc の疾患修飾薬として近年注目を集めているチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブやエンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンは Fli1 の転写活性を回復させる作用を有することが知られている<sup>87-91</sup>が、これらの薬剤によって上皮細胞における Fli1 の転写活性を回復させることで本症の病態改善につながるかどうか、本マウスを用いた検討も有用であろう。さらなる検討により、SSc の病態の本質の解明とさらなる新たな治療法の開発が期待される。

## VI. 謝辞

免疫染色を始め、技術的にサポートして下さった実験助手の加賀玉美さんに深謝致します。また、大学院で学ぶ機会を与えて下さり、終始懇切な御指導御鞭撻を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室、佐藤伸一教授に深謝致します。佐藤先生の教室で大学院生活を送ることができた幸運に感謝しております。

本研究の共同研究者である東京大学医学部皮膚科学教室、浅野善英先生には丁寧に御指導御協力頂きました。浅野先生には実験の基礎から方法まで細部にわたり御指導頂き、心より深謝致します。

最後に、Fli1<sup>flox/flox</sup> マウスと Fli1 過剰発現ベクターをご提供いただいた Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 教授、Aire 遺伝子プロモータールシフェラーゼコンストラクトをご提供いただいた Immunology, University of Tartu の Part Peterson 教授に感謝いたします。

## VII. 引用文献

1. Varga, J. & Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* **117**, 557-567 (2007).
2. Asano, Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol* **37**, 54-70 (2010).
3. Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., Jr. & Wright, T.M. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* **48**, 1956-1963 (2003).
4. Radstake, T.R., *et al.* Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* **42**, 426-429 (2010).
5. Zhou, X., *et al.* HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic sclerosis: a genome-wide association study in Koreans with replication in North Americans. *Arthritis Rheum* **60**, 3807-3814 (2009).
6. Ito, I., *et al.* Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* **60**, 1845-1850 (2009).
7. Ito, I., *et al.* Association of the FAM167A-BLK region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **62**, 890-895 (2010).
8. Hasebe, N., *et al.* Association of UBE2L3 polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* **71**, 1259-1260 (2012).
9. Tsuchiya, N., *et al.* Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* **68**, 1375-1376 (2009).
10. Agarwal, S.K. & Reveille, J.D. The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol* **22**, 133-138 (2010).
11. Altorok, N., Almeshal, N., Wang, Y. & Kahaleh, B. Epigenetics, the holy grail in the



- pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* (2014).
12. Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M. & Takehara, K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* **50**, 1918-1927 (2004).
  13. Saito, E., *et al.* CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* **109**, 1453-1462 (2002).
  14. Stifano, G., *et al.* Chronic Toll-like receptor 4 stimulation in skin induces inflammation, macrophage activation, transforming growth factor beta signature gene expression, and fibrosis. *Arthritis Res Ther* **16**, R136 (2014).
  15. Christmann, R.B., *et al.* Association of Interferon- and transforming growth factor beta-regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis. *Arthritis & rheumatology* **66**, 714-725 (2014).
  16. Sakkas, L.I. & Platsoucas, C.D. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* **50**, 1721-1733 (2004).
  17. Kadono, T., Kikuchi, K., Ihn, H., Takehara, K. & Tamaki, K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* **25**, 296-301 (1998).
  18. 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).
  19. Needleman, B.W., Wigley, F.M. & Stair, R.W. Interleukin-1, interleukin-2,

- interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* **35**, 67-72 (1992).
20. Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K. & Takehara, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* **24**, 328-332 (1997).
  21. Deleuran, B. & Abraham, D.J. Possible implication of the effector CD4+ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**, 682-683 (2007).
  22. Ihn, H. Scleroderma, fibroblasts, signaling, and excessive extracellular matrix. *Curr Rheumatol Rep* **7**, 156-162 (2005).
  23. Ihn, H. The role of TGF-beta signaling in the pathogenesis of fibrosis in scleroderma. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **50**, 325-331 (2002).
  24. Shi-Wen, X., *et al.* Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Molecular biology of the cell* **15**, 2707-2719 (2004).
  25. Aden, N., *et al.* Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **130**, 2191-2200 (2010).
  26. Vorstenbosch, J., *et al.* CD109 overexpression ameliorates skin fibrosis in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Arthritis Rheum* **65**, 1378-1383 (2013).
  27. Distler, J.H., *et al.* Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **52**, 856-864 (2005).
  28. 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).
29. Asano, Y., Bujor, A.M. & Trojanowska, M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* **59**, 153-162 (2010).
  30. Gutierrez-Hartmann, A., Duval, D.L. & Bradford, A.P. ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **18**, 150-158 (2007).
  31. Ben-David, Y., Giddens, E.B. & Bernstein, A. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1332-1336 (1990).
  32. Baud, V., Lipinski, M., Rassart, E., Poliquin, L. & Bergeron, D. The human homolog of the mouse common viral integration region, FLI1, maps to 11q23-q24. *Genomics* **11**, 223-224 (1991).
  33. Hollenhorst, P.C., Jones, D.A. & Graves, B.J. Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic acids research* **32**, 5693-5702 (2004).
  34. 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).
  35. Czuwara-Ladykowska, J., Gore, E.A., Shegogue, D.A., Smith, E.A. & Trojanowska, M. Differential regulation of transforming growth factor-beta receptors type I and II by platelet-derived growth factor in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* **145**, 569-575 (2001).
  36. Akamata, K., *et al.* Bosentan reverses the pro-fibrotic phenotype of systemic sclerosis

- dermal fibroblasts via increasing DNA binding ability of transcription factor Fli1. *Arthritis Res Ther* **16**, R86 (2014).
37. Asano, Y., *et al.* Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* **176**, 1983-1998 (2010).
  38. 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<sup>+</sup> T cells. *J Invest Dermatol* **129**, 1688-1695 (2009).
  39. 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).
  40. Zhang, L., *et al.* Association of interleukin 1 family with systemic sclerosis. *Inflammation* **37**, 1213-1220 (2014).
  41. Eloranta, M.L., *et al.* Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **69**, 1396-1402 (2010).
  42. Yamamoto, T. & Nishioka, K. Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *The Journal of investigative dermatology* **121**, 510-516 (2003).
  43. 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).
  44. Wang, Q., *et al.* Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **4**, 4 (2011).

45. Ebert, E.C. Esophageal disease in scleroderma. *J Clin Gastroenterol* **40**, 769-775 (2006).
46. Qiu, W., *et al.* Conditional activin receptor type 1B (Acvr1b) knockout mice reveal hair loss abnormality. *J Invest Dermatol* **131**, 1067-1076 (2011).
47. Lock, G., Holstege, A., Lang, B. & Scholmerich, J. Gastrointestinal manifestations of progressive systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol* **92**, 763-771 (1997).
48. Rose, S., Young, M.A. & Reynolds, J.C. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. *Gastroenterology clinics of North America* **27**, 563-594 (1998).
49. Musah, S., Chen, J. & Hoyle, G.W. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. *Respiratory research* **13**, 107 (2012).
50. Buri, C., Gutersohn, A., Hauser, C., Kappeler, A. & Mueller, C. The chemokines CCL11, CCL20, CCL21, and CCL24 are preferentially expressed in polarized human secondary lymphoid follicles. *J Pathol* **204**, 208-216 (2004).
51. Rangel-Moreno, J., *et al.* Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **116**, 3183-3194 (2006).
52. Shum, A.K., *et al.* Identification of an autoantigen demonstrates a link between interstitial lung disease and a defect in central tolerance. *Sci Transl Med* **1**, 9ra20 (2009).
53. 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).
54. Sato, S., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Tedder, T.F. & Takehara, K. Quantitative

- genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* **165**, 6635-6643 (2000).
55. Radstake, T.R., *et al.* The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One* **4**, e5903 (2009).
  56. Takahashi, T., *et al.* TLR4 knockout ameliorates tissue fibrosis in the murine models of systemic sclerosis. *Arthritis & rheumatology* (2014).
  57. Sukserree, S., *et al.* Autophagy in the thymic epithelium is dispensable for the development of self-tolerance in a novel mouse model. *PLoS One* **7**, e38933 (2012).
  58. Melet, F., Motro, B., Rossi, D.J., Zhang, L. & Bernstein, A. Generation of a novel Fli-1 protein by gene targeting leads to a defect in thymus development and a delay in Friend virus-induced erythroleukemia. *Mol Cell Biol* **16**, 2708-2718 (1996).
  59. Bonito, A.J., *et al.* Medullary thymic epithelial cell depletion leads to autoimmune hepatitis. *J Clin Invest* **123**, 3510-3524 (2013).
  60. Murumagi, A., Vahamurto, P. & Peterson, P. Characterization of regulatory elements and methylation pattern of the autoimmune regulator (AIRE) promoter. *J Biol Chem* **278**, 19784-19790 (2003).
  61. Murumagi, A., Silvennoinen, O. & Peterson, P. Ets transcription factors regulate AIRE gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 768-774 (2006).
  62. Kumar, V., *et al.* The autoimmune regulator (AIRE), which is defective in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients, is expressed in human epidermal and follicular keratinocytes and associates with the intermediate filament protein cytokeratin 17. *Am J Pathol* **178**, 983-988 (2011).

63. Clark, R.A., Yamanaka, K., Bai, M., Dowgiert, R. & Kupper, T.S. Human skin cells support thymus-independent T cell development. *J Clin Invest* **115**, 3239-3249 (2005).
64. Anderson, M.S. & Su, M.A. Aire and T cell development. *Curr Opin Immunol* **23**, 198-206 (2011).
65. Kont, V., *et al.* Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol Immunol* **45**, 25-33 (2008).
66. Liston, A., *et al.* Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med* **200**, 1015-1026 (2004).
67. Matsumoto, M., *et al.* Which model better fits the role of aire in the establishment of self-tolerance: the transcription model or the maturation model? *Frontiers in immunology* **4**, 210 (2013).
68. Nagamine, K., *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* **17**, 393-398 (1997).
69. Finnish-German, A.C. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* **17**, 399-403 (1997).
70. Hanafusa, T. [Function of Aire in central and peripheral immune tolerance]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **37**, 133-138 (2014).
71. Anderson, M.S., *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401 (2002).
72. Lima, F.A., *et al.* Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol* **187**, 3422-3430 (2011).
73. Garcia-Lozano, J.R., *et al.* Association of the AIRE gene with susceptibility to

- rheumatoid arthritis in a European population: a case control study. *Arthritis Res Ther* **15**, R11 (2013).
74. Ferrera, F., *et al.* AIRE gene polymorphisms in systemic sclerosis associated with autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol* **122**, 13-17 (2007).
  75. Kahaleh, B. Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am* **34**, 57-71; vi (2008).
  76. Yoshizaki, A., *et al.* CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* **172**, 1650-1663 (2008).
  77. Tsuchiya, N., *et al.* Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **50**, 4002-4007 (2004).
  78. Jordan, S., *et al.* Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis* (2014).
  79. Sakkas, L.I., Chikanza, I.C. & Platsoucas, C.D. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 679-685 (2006).
  80. Matsushita, T., Hasegawa, M., Hamaguchi, Y., Takehara, K. & Sato, S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol* **33**, 275-284 (2006).
  81. Okamoto, Y., *et al.* Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism* **64**, 3726-3735 (2012).



82. Sun, L., Luo, H., Li, H. & Zhao, Y. Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein & cell* **4**, 342-355 (2013).
83. Li, J., *et al.* Foxn1 promotes keratinocyte differentiation by regulating the activity of protein kinase C. *Differentiation; research in biological diversity* **75**, 694-701 (2007).
84. Mihai, C. & Tervaert, J.W. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **69**, 319-324 (2010).
85. Falk, I., Potocnik, A.J., Barthlott, T., Levelt, C.N. & Eichmann, K. Immature T cells in peripheral lymphoid organs of recombinase-activating gene-1/-2-deficient mice. Thymus dependence and responsiveness to anti-CD3 epsilon antibody. *J Immunol* **156**, 1362-1368 (1996).
86. van Bon, L., *et al.* Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med* **370**, 433-443 (2014).
87. Korn, J.H., *et al.* Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* **50**, 3985-3993 (2004).
88. Matucci-Cerinic, M., *et al.* Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* **70**, 32-38 (2011).
89. Bournia, V.K., Evangelou, K. & Sfikakis, P.P. Therapeutic inhibition of tyrosine kinases in systemic sclerosis: a review of published experience on the first 108 patients treated with imatinib. *Semin Arthritis Rheum* **42**, 377-390 (2013).
90. Tamaki, Z., *et al.* Efficacy of low-dose imatinib mesylate for cutaneous involvement in systemic sclerosis: a preliminary report of three cases. *Mod Rheumatol* **22**, 94-99

(2012).

91. ten Freyhaus, H., Dumitrescu, D., Bovenschulte, H., Erdmann, E. & Rosenkranz, S. Significant improvement of right ventricular function by imatinib mesylate in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol* **98**, 265-267 (2009).

# VIII. 定量的リアルタイムPCRに用いたプライマー

TARGET GENE	Sense	Antisense
<i>Gapdh</i>	5'-CGTGTTCTACCCCAATGT-3'	5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'
<i>Il1a</i>	5'-ATGATCTGGAAGAGACCATCC-3'	5'-GGCAACTCCTTCAGCAACA -3'
<i>Il1b</i>	5'-TTGACGGACCCCAAAAGAT-3'	5'-GAAGCTGGATGCTCTCATCTG-3'
<i>Il6</i>	5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3'	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3'
<i>Ifna</i>	5'-ACCCAGCAGATCCTGAACAT-3'	5'-AATGAGTCTAGGAGGGTTGTATTCC-3'
<i>Ctgf</i>	5'-GTGCCAGAACGCACACTG-3'	5'-CCCCGGTTACACTCCAAA-3'
<i>Tgfb1</i>	5'-GCAACATGTGGAAGTCTACCAGAA-3'	5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3'
<i>Ccl2</i>	5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3'	5'-GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT-3
<i>Ccl5</i>	5'-CATATGCCTCGGACACCA-3'	5'-ACACACTTGGCGGTTTCCT -3'
<i>Fli1</i>	5'-ACTTGGCCAAATGGACGGGACTAT -3'	5'-CCCGTAGTCAGGACTCCCG-3'
<i>Krt6</i>	5'-TTCTCTACTTCCCAGCCTTCTCA-3'	5'-GCCACGGTGGCTGGTTT-3'
<i>Krt16</i>	5'-GACCTCAGCCGATTCTGA -3'	5'-GCGAAGCTGAGCCAGCTGCT -3'
<i>Aire</i>	5'-GTACAGCCGCCTGCATAGC-3'	5'-CCCTTTCCGGGACTGGTTTA-3'
<i>Human GAPDH</i>	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'
<i>Human FLII</i>	5'-GGATGGCAAGGAAGTGTGTA-3'	5'-GGTTGTATAGGCCAGCAG-3'
<i>Human AIRE</i>	5'-GAGAGTGCTGAGAAGGACA-3'	5'-GTTTAATTTCCAGGCACATGA-3'