

博士論文

骨髄細胞における転写因子 Fli1 の恒常的発現低下が
全身性強皮症の病態に及ぼす影響について

谷口隆志

目次

1)	要旨.....	5
2)	序文.....	6
3)	研究方法	17
1)	動物	
2)	細胞培養	
3)	運動能・遊走能試験	
4)	食食能試験	
5)	マトリゲルアッセイ	
6)	コラーゲンの定量	
7)	免疫染色法	
8)	RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR	
9)	皮膚血管の描出	
10)	皮膚血管透過性の検討	
11)	統計解析	

4)	結果.....	24
1)	マクロファージにおける Fli1 の発現低下は血管を不安定化し新生血管形成を促進するフェノタイプを誘導する。	
2)	骨髄細胞における Fli1 の発現低下は新生血管形成に異常をもたらす。	
3)	Fli1 MyeKO マウスでは血管壁細胞による血管の安定化に障害がみられる。	
4)	Fli1 MyeKO マウスの皮膚血管では血管の脆弱化が見られる。	
5)	Fli1 MyeKO マウスにおける皮膚血管は構造的異常を時系列に沿って呈する。	
6)	Fli1 MyeKO マウスの皮膚の細動脈では血管内皮細胞の増殖、血管拡張、血管の狭窄が見られる。	
7)	Fli1 MyeKO マウスの皮膚では毛細血管の減少が見られる。	
8)	Fli1 MyeKO マウスは皮膚の線維化を呈する。	
9)	骨髄細胞における Fli1 の発現低下は内皮間葉転換を誘導する。	
5)	考察.....	48
6)	まとめ.....	54
7)	謝辞.....	56
8)	文献.....	57

8) 表.....	68
-----------	----

要旨

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。

全身性強皮症病変部皮膚では転写因子 Friend leukemia integration 1 (Fli1)の発現

が様々な細胞で恒常的に低下している。皮膚線維芽細胞、皮膚血管内皮細胞に

おける Fli1 の発現低下は各細胞において全身性強皮症の病態を再現するものの、

免疫細胞における Fli1 の発現低下が全身性強皮症の病態に及ぼす意義について

は未だ明らかでない。今回の研究によって、骨髄細胞における Fli1 の発現低下

が新生血管形成・血管の恒常性の異常を誘導し、全身性強皮症における線維化・

血管障害に類似した所見を引き起こすことを示した。この結果から、全身性強

皮症の病態において骨髄細胞における Fli1 の発現低下が重要な役割を担うこと

が明らかになった。

序文

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である(図 1)¹。その病態については未だ明らかではないが、時系列でみると血管障害が線維化に先行することから血管障害が全身性強皮症の初期の病態に重要であると考えられている。しかし、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。

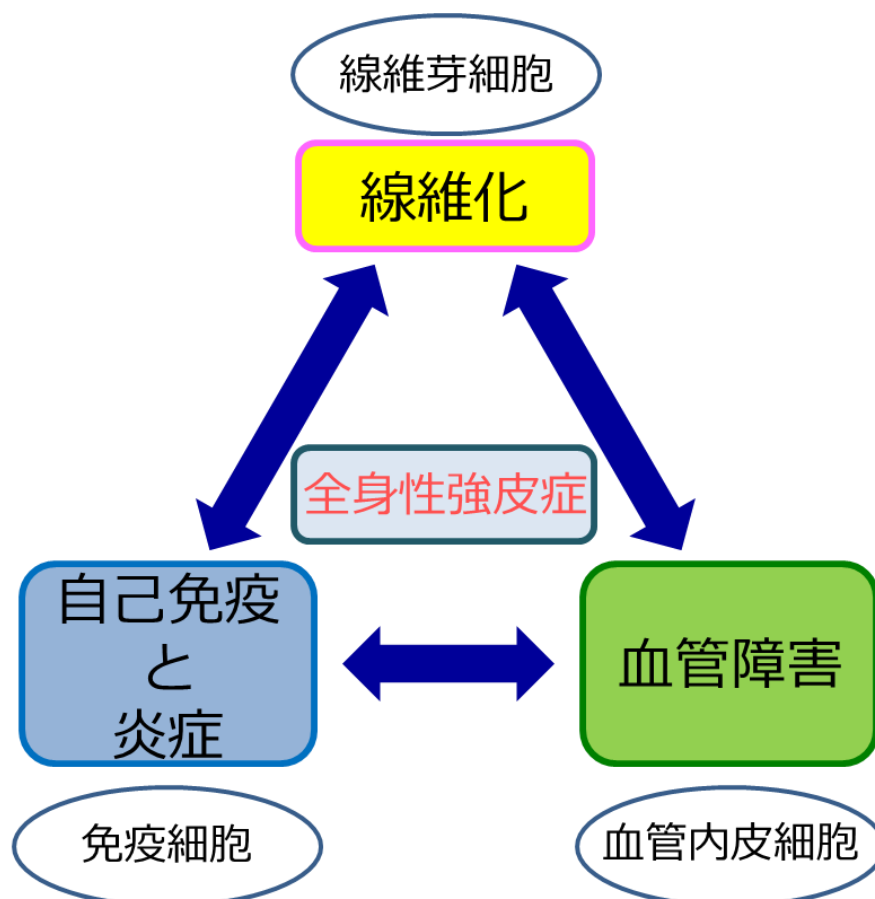


図 1 全身性強皮症の病態：全身性強皮症は線維芽細胞の異常による組織線維化、血管内皮細胞の異常による血管障害、免疫細胞の異常による自己免疫と炎症が互いに関連しあって病態を形成している慢性疾患である。

全身性強皮症における血管障害は、血管構造の破壊を引き起こす破壊性血管障害と血管を構成する組織の増殖によって引き起こされる増殖性血管障害とに分類される(図 2)²。臨床的には、毛細血管などの微小血管では破壊性血管障害による血管の消失と増殖性血管障害の一つである血管内皮細胞の増殖による血管外径の拡張が混在して見られる。一方で、前腕・下腿などの小・中動脈では血管内膜の肥厚・中膜の線維化などによる血管内腔の狭窄を呈し、増殖性閉塞性血管障害と呼ばれる³。全身性強皮症の皮膚微小血管における血管障害の形態的变化は発症早期より爪の根元を覆っている皮膚である後爪郭の毛細血管にて容易に観察され、その変化は全身性強皮症の皮膚線維化や臓器障害を反映していることが報告されている^{4,5}。後爪郭における血管変化は、巨大毛細血管が少数見られるが血管の消失は見られない初期パターン、巨大毛細血管・微小出血・毛細血管消失が混在する活動期パターン、いびつな新生血管の形成と広範な毛細血管消失の混在する後期パターンと分類され、破壊性血管障害と増殖性血管障害が混在している所見が観察される⁶。そして、これらの破壊性血管障害・増殖性血管障害の病態として、血管を覆い安定化させている細胞である周皮細胞や血管平滑筋細胞を総称した血管壁細胞による血管の安定化に障害があ

ることによる血管の恒常性の破綻が挙げられている(図 2)^{6,7}。

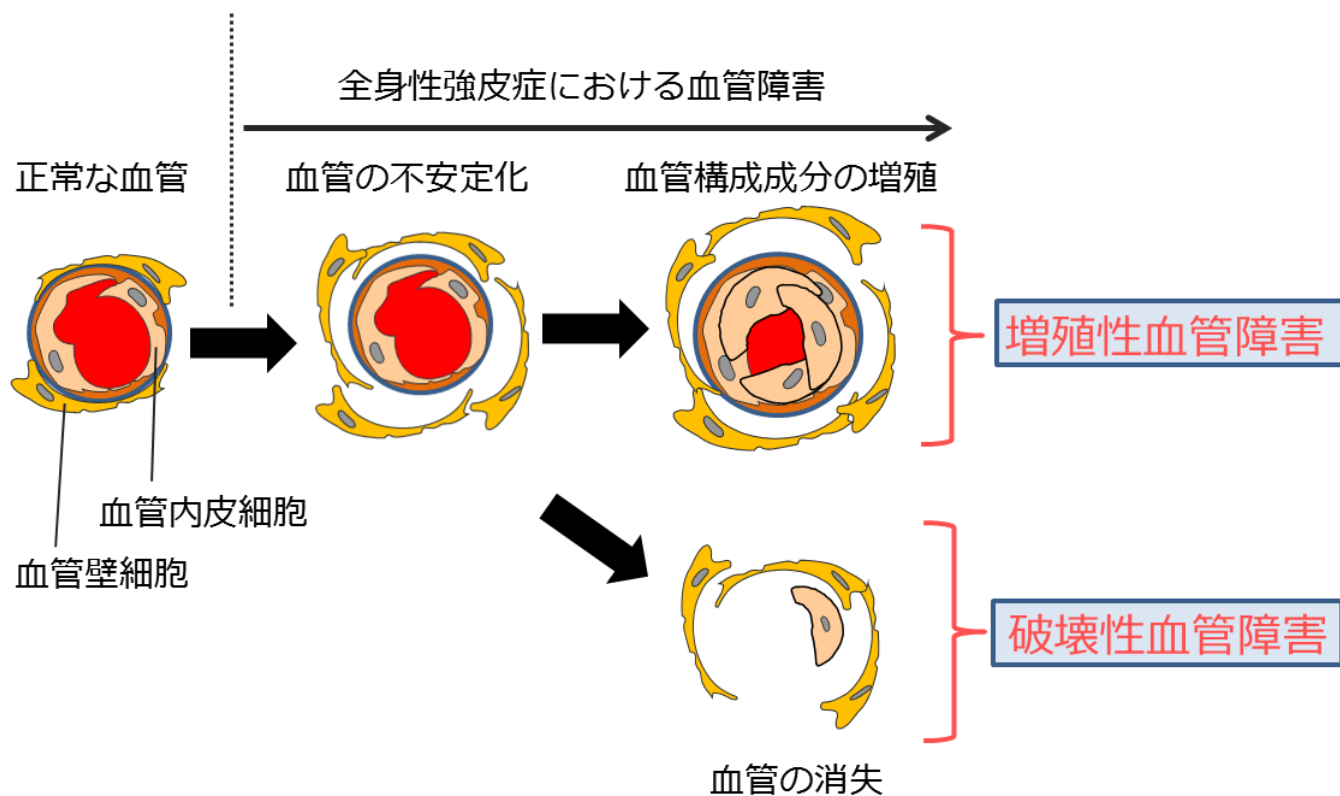
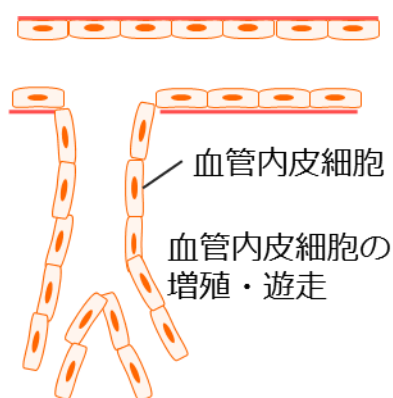


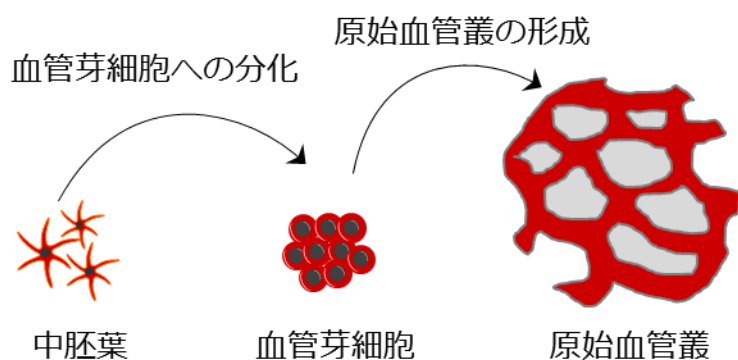
図 2 全身性強皮症における血管障害：全身性強皮症の血管では血管の恒常性に破綻をきたし、血管構成組織の増殖による増殖性血管障害、血管の破壊を引き起こす破壊性血管障害が見られる。

新生血管が形成される過程は血管構造の不安定化、血管を覆う基底膜の破壊、血管内皮細胞の増殖、増殖した血管による血管腔の形成、新生血管の安定化と様々な段階を経て行われ、促進因子と阻害因子により厳密に調節されることで血管の恒常性は保たれている⁸。全身性強皮症ではこのような多くの段階を経て行われる新生血管形成の調節に障害が生じている。新生血管形成は、

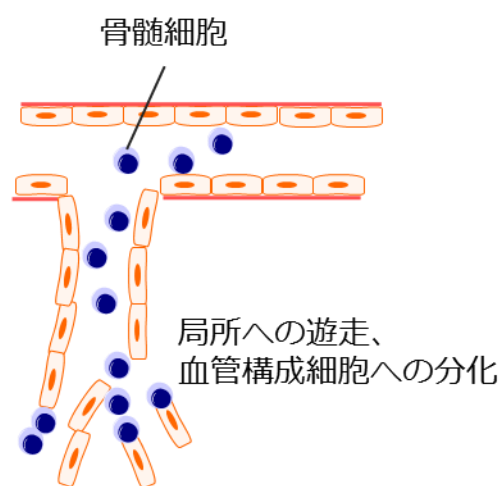
既存の血管から血管内皮細胞が増殖・遊走することで新生血管を形成する angiogenesis、胎生期において中胚葉から分化した血管芽細胞が血管内皮細胞に分化することで原始血管叢を形成する embryonic vasculogenesis、骨髄由来細胞が局所に遊走し血管内皮細胞や血管壁細胞などの血管構成細胞に分化することにより新生血管を形成する postnatal vasculogenesis に分類される(図 3)⁹。胎生期の血管形成では、最初に embryonic vasculogenesis によって原始血管叢が形成され、原始血管叢から angiogenesis によって血管内皮細胞が増殖・遊走することで新生血管が形成される。一方で、生後に新生血管が形成される過程においては angiogenesis と postnatal vasculogenesis が協調して新生血管を作る。



Angiogenesis



Embryonic vasculogenesis



Postnatal vasculogenesis

図 3 新生血管形成の分類：新生血管形成は血管内皮細胞が増殖・遊走することで新生血管を形成する angiogenesis、胎生期中胚葉から分化した血管芽細胞から原始血管叢を形成する embryonic vasculogenesis、骨髄由来細胞が局所に遊走し血管内皮細胞や血管壁細胞など血管構成細胞に分化することで新生血管を形成する postnatal vasculogenesis に分類される。

全身性強皮症では angiogenesis は異常活性化し、postnatal vasculogenesis

の過程には障害があることが知られている(図 4)^{7,10-15}。さらに、血管構造は血管

壁細胞に取り囲まれることにより安定化しているが、全身性強皮症では血管壁

細胞の機能が低下し、血管構造が不安定化していることが知られている^{14,16}。つ

まり、全身性強皮症における血管障害は angiogenesis の異常活性化・postnatal

vasculogenesis の障害といった新生血管形成の障害と血管構造の安定化の障害が

基礎になっていると考えられている(図 4)。

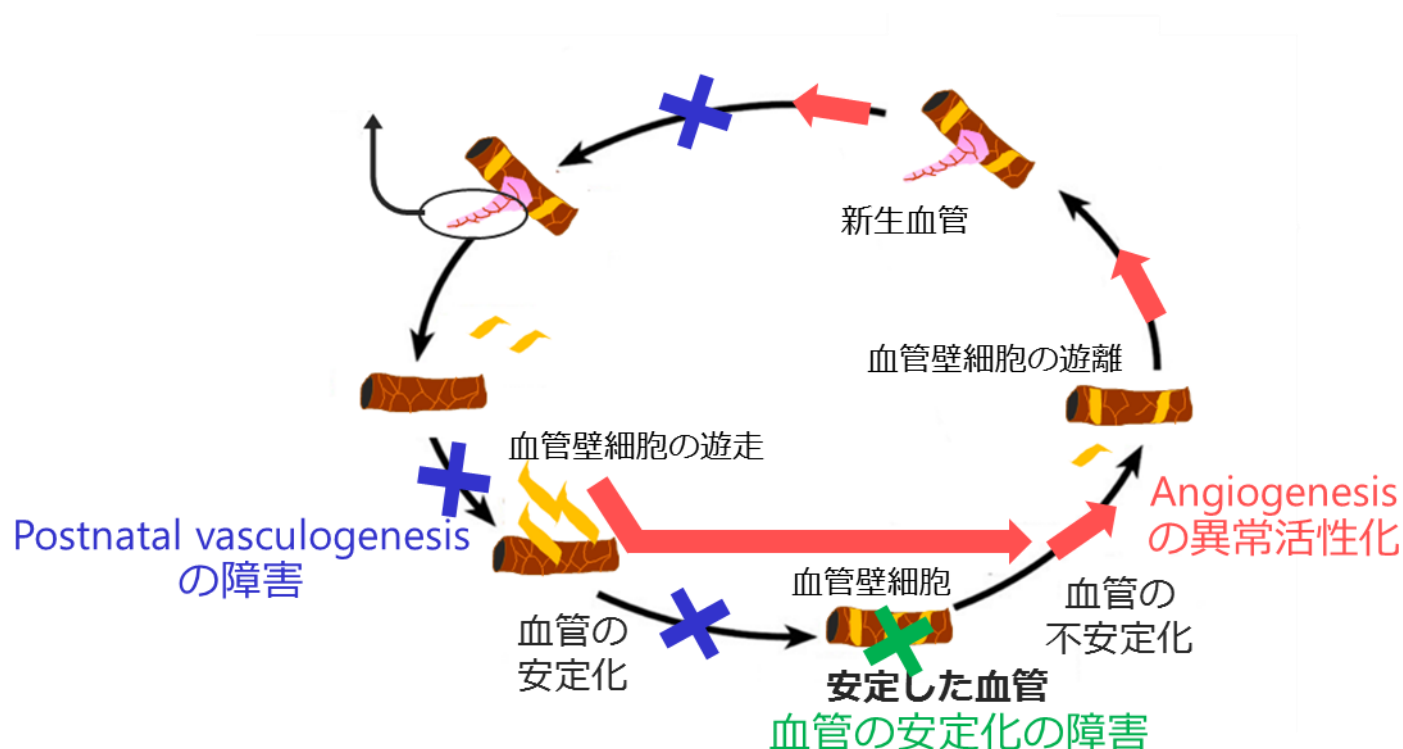


図 4 全身性強皮症における新生血管形成の異常と血管恒常性の破綻: 生後の新生血管形成では angiogenesis と postnatal vasculogenesis が協調し、血管構造の不安定化、新生血管の形成、新生血管の安定化を経て行われる。全身性強皮症では angiogenesis の異常活性化(赤)、postnatal vasculogenesis の障害(青)が見られる。さらに血管の恒常性に破綻をきたし、血管の安定化に障害が見られる(緑)。

全身性強皮症における血管の安定化障害の原因については、血管内皮細胞と血管壁細胞の相互作用の障害、新生血管形成の促進因子と阻害因子の不均衡、血管壁細胞自体の異常などの可能性が挙げられるが、いずれの障害によっても全身性強皮症の血管障害に類似した血管障害が引き起こされる。血管内皮細胞と血管壁細胞の相互作用の障害については、血管壁細胞との相互作用に必要な分子の発現が血管内皮細胞において低下すると、血管内皮細胞と血管壁細胞の相互作用の障害を契機に血管壁細胞の機能不全・遊離を引き起こし、血管の不安定化を起こすとともに全身性強皮症様の血管障害を引き起こすことが知られている¹⁴。新生血管形成の促進因子と阻害因子の不均衡については、全身性強皮症では新生血管形成を促進する因子と阻害する因子の調節が破綻していることが報告されている¹⁷。血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の過剰発現は豊富な新生血管形成を誘導する一方で新生した血管の安定化に障害をもたらす¹⁸。VEGFの過剰発現によって引き起こされる血管変化は形態的に全身性強皮症における後爪郭の毛細血管変化と類似しており、成長因子・サイトカインによる新生血管形成の促進因子と阻害因子の不均衡によっても全身性強皮症における血管障害に類似した病態は引き起こされる。実際、

全身性強皮症では VEGF の発現が亢進しているにもかかわらず、組織は虚血状態のままであり、全身性強皮症におけるこのような VEGF の過発現は、安定し成熟した血管の新生ではなくいびつで未熟な機能的意義の薄い血管の新生に寄与し、結果として組織虚血が改善できないと考えられている^{19,20}。血管壁細胞自体の機能障害については、血管壁細胞の安定化に重要な platelet-derived growth factor (PDGF)受容体 β を欠損したマウスでは血管壁細胞の機能不全により血管の安定化に障害をきたす²¹。血管壁細胞の機能不全により血管が不安定化する状態は pericyte loss とよばれ、血管構造の脆弱化、血管内皮細胞の増殖、血管の拡張、血管腔の狭窄など血管の構造異常を引き起こし、結果として全身性強皮症の血管障害類似の血管障害を呈する²¹。血管壁細胞はその起源は未だ明らかではないが骨髓系細胞の一つである単球系細胞が新生血管形成の過程で血管壁細胞へと取り込まれ、血管壁細胞の形質を示すことから、一部の血管壁細胞は骨髓細胞に由来していることが示唆されている^{22,23}。そして、骨髓系細胞の血管壁への取り込みの障害が血管壁細胞の機能不全による血管の不安定化を引き起こし、全身性強皮症における血管障害に類似した病態を作りだすことも報告されている²¹⁻²⁵。このように、血管壁細胞の機能障害は様々な要因により引き起こさ

れ、最終的には全身性強皮症の血管障害に類似した血管障害を引き起こす。

骨髄細胞の中では単球系細胞のみならずマクロファージも血管恒常性の維持に様々な役割を担っている。マクロファージは新生血管形成促進因子・阻害因子の産生により新生血管形成を調節するほか、新生血管形成の際に細胞外マトリックス内を遊走することで新生血管の通路を作成したりするなど様々な役割を有することが知られている^{22,23,26-29}。

全身性強皮症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ている。転写因子 Friend leukemia integration 1 (Fli1) は E26 transformation-specific (ETS) 転写因子ファミリーの一つであるが、その発現は全身性強皮症皮膚線維芽細胞では epigenetic 制御により発現が低下している³⁰。また、Fli1 は病変部のみならず非病変部皮膚でも線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞など様々な細胞において発現が低下していることから、全身性強皮症の発症初期に Fli1 の発現低下が重要な役割を担っていることが示唆されている^{31,32}。また、全身性強皮症患者の中でも、抗セントロメア抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ III 抗体などそれぞれ異なった臨床症状を呈する全身性強皮症特異抗体の有無によって皮膚組織の各

細胞における Fli1 の発現低下の程度は異なっており、Fli1 の発現低下の程度と各臨床症状との関与も示唆される³³。一方で、Fli1 の発現低下は皮膚線維芽細胞や皮膚微小血管内皮細胞においてそれぞれ全身性強皮症における線維化や血管障害の病態を再現する^{32,34-37}。しかし、血管内皮特異的 Fli1 欠損マウスでは全身性強皮症に類似した angiogenesis の活性化は再現するものの postnatal vasculogenesis の異常については再現できておらず、postnatal vasculogenesis における Fli1 の関与は未だ明らかでない。Fli1 を全欠損したマウスは胎生 11.5 日までに中枢神経系における出血により致死である。この時期は胎児の新生血管の形成が embryonic vasculogenesis から angiogenesis に移行する時期であり、出血の原因は angiogenesis の異常による胎生期の血管形成の異常に起因することが知られている³⁸。つまり、Fli1 の発現低下は embryonic vasculogenesis に影響を与えないことが知られているものの、postnatal vasculogenesis が関与する新生血管形成の異常に及ぼす影響については未だ不明である。

全身性強皮症における血管障害の病態や骨髄細胞の異常が全身性強皮症の病態に及ぼす役割は未だ明らかではないが、骨髄細胞が血管の恒常性の維持に果たす役割を鑑みるに、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は全身性強皮症

の病態に重要な役割を担っていると推測される。そこで本研究にて、骨髄細胞における Fli1 の発現低下が全身性強皮症の病態に及ぼす役割について骨髄細胞特異的 Fli1 欠損マウス(Fli1 MyeKO マウス)を用いて検討した。

研究方法

1) 動物

Cre-loxPシステムを用いて骨髓細胞特異的Fli1欠損マウスを作製した。

具体的にはlysozyme遺伝子プロモーターによって誘導されるDNA組み換え酵素Creを導入したトランスジェニックマウスであるLysM-Creマウスと、Fli1遺伝子内にfloxサイトを導入したトランスジェニックマウスであるFli1^{flox/flox}マウスを交配させ、LysM^{cre/-} Fli1^{flox/flox}マウス(骨髓細胞特異的Fli1欠損マウス; MyeKOマウス)を作成した。LysM^{cre/-} Fli1^{flox/flox}マウスではlysozymeを発現する好中球、単球系細胞、マクロファージなどの骨髓細胞でのみCreを発現し、Creの標的配列である2箇所のfloxサイトで挟まれた部位のDNA配列を除去する³⁹。よって、MyeKOMausでは骨髓細胞特異的にFli1が欠損する。コントロールとしてはFli1^{flox/flox}マウス(MyWTマウス)を用いた。lysozyme-CreマウスはJackson Laboratoryより購入した。Fli1^{flox/flox}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。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。

2) 細胞培養

マウス腹腔マクロファージを過去に報告された方法で採取、維持した^{28,40}。マウス腹腔マクロファージの採取は3%チオグリコール酸を3ヶ月齢のマウスに腹腔内投与し、72時間後に腹腔洗浄液を採取、細胞数をカウントし、1ウェルあたり 1×10^6 個の細胞を6ウェルプレートに30分静置し、プレート底面に固着した細胞を回収することで行った⁴¹。

3) 運動能・遊走能試験

ボーイデンチャンバー(Neuro Probe, Gaithersburg, MD)を10 μ mの穴があったポリエチレンテレフタレート製トラックエッチドメンブレン (HTS FluoroBlock Insert, 10.0 μ m pore size; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)にて上層と下層に分離し、上層にマクロファージ 1×10^5 /mL 個に細胞数を調節した cell suspension を加え、下層にはコントロールないしは5 nM の monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1; R&D Systems)を添加した培地を加えた。18時間後、メンブレンの下面に付着したマクロファージをクリスタルバイオレットにて染色し、細胞数を顕微鏡下に計測した。実験は MyeWT マウス、MyeKO マウスのコントロール群、MCP-1 添加群各6検体ずつ用いて行った。

4) 食食能試験

Phagocytosis assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)の説明書に従い、腹腔マクロファージを 10 万個/well で 24 wells にまき、well にウサギ phycoerythrin(PE)抱合 IgG 付着ラテックスビーズを加えた。24 時間後、細胞を回収し FACSCanto II (BD Biosciences)にて解析した。実験は MyeWT マウス、MyeKO マウス各 6 検体ずつ用いて行った。

5) マトリゲルアッセイ

以前に報告された手順に従って行った⁴²。塩基性線維芽細胞増殖因子 (R&D Systems)とヘパリン(Ajinomoto Pharma)をマトリゲル (BD Biosciences) にそれぞれ終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 mg/mL で添加した。500 μL のマトリゲルプラグを 3 ヶ月齢のメスのマウス腹部に皮下注射し、5 日後、7 日後に回収した。マトリゲルプラグは 10% formaldehyde で固定、その後パラフィン包埋し組織学的検討を行った。実験は MyeWT マウス、MyeKO マウス各 6 検体ずつ用いて行った。

6) 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。皮膚検体はマウス背

部正中皮膚を 6mm パンチ生検で採取したものを検体として用いた。実験は MyeWT マウス、MyeKO マウス各 6 検体ずつ用いて行った。

7) 免疫染色法

マウス背部正中皮膚の検体をホルマリン固定、パラフィン包埋し切片を作った。免疫染色は Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて染色した。抗 α -smooth muscle actin (α -SMA)抗体は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より、抗 von Willebrand factor (vWF)抗体は EMD Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)より購入した。二重蛍光染色は一次抗体として抗 VE-cadherin ヒツジ抗体・抗 fibroblast specific protein 1 (FSP1)ウサギ抗体を用い、二次抗体には fluorescein isothiocyanate (FITC)抱合抗ウサギ IgG 抗体・Alexa Fluor donkey 555 抗ヒツジ IgG 抗体を用いた。抗 VE-cadherin ヒツジ抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)より、抗 FSP1 ウサギ抗体は abcam (Cambridge, U.K.)より購入した。二重蛍光免疫染色で 2 次抗体に用いた FITC 抱合抗ウサギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology より、Alexa Fluor 555 抗ヒツジ IgG 抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA)より購入した。

皮膚の厚さや免疫染色は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で 2 人の検者 (T.T、Y.A) で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。 α -SMA 染色については、皮膚組織検体中の皮膚血管における α -SMA の染色性を細動脈、細静脈、毛細血管のそれぞれの各血管について陰性、弱陽性、陽性の 3 段階に半定量化し、各染色性の血管数がそれぞれの血管の全体数に占める割合を計算した。1 ヶ月齢、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢の MyeWT マウス、MyeKO マウスを各 6 検体ずつ用いて検討した。二重蛍光免疫染色には 3 ヶ月齢の MyeWT マウス、MyeKO マウス各群 8 匹のマウスを用いて行い、200 倍視野にて無作為に選んだ少なくとも 5 視野で VE-cadherin・FSP1 二重陽性細胞数を計測し、それぞれのサンプルで平均を算出した。

8) RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR

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。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH)をリファレンス遺伝子として用いた。プライマーは以下の配列ものを用いた。mouse VEGFA forward, 5'-GCA GGC TGC TGT AAC GAT GA-3', reverse, 5'-GCA TGA TCT GCA TGG TGA TGT T-3'; mouse matrix metaroproteinase 9 (MMP9) forward, 5'-GAG CTG TGC GTC TTC CCC TTC-3', reverse, 5'-GGA ATG ATC TAA GCC CAG TGC-3'; mouse PDGFB forward, 5'-CCC ACA GTG GCT TTT CAT TT-3', reverse, 5'-GTG GAG GAG CAG ACT GAA GG-3'; mouse GAPDH forward, 5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA-3', reverse, 5'-CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA-3'。mRNA 発現量の測定後に Melt curve で Tm が同じであることを確認し、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。実験は MyeWT マウス、MyeKO マウス各 6 検体ずつ用いて行った。

9) 皮膚血管の描出

マウス尾静脈に 20 mg/ml の濃度に phosphate buffered saline (PBS)に溶解した FITC 抱合デキストラン (Sigma-Aldrich, 2000 kDa)を 200 μ l 注射した。5 分後に頸椎脱臼で安楽死させ、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。実験は 1 ヶ月齢、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢の MyeWT マウス、MyeKO マウスを各 6 検体ずつ用いて行った。

10) 皮膚血管透過性の検討

マウス尾静脈に 0.5% で PBS に溶解した Evans blue (Sigma-Aldrich) を 200 μ l 注射した。30 分後に頸椎脱臼で安楽死させ、マウスの皮下を剥離し、腹部皮膚血管からの Evans blue の漏出を観察した。また、皮膚を 6mm パンチでくりぬき、200 μ l の formamide に漬け Evans blue を漏出させ、620nm の吸光度で吸光度計を用いて Evans blue の濃度を測定した。実験は 1 ヶ月齢、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢の MyeWT マウス、MyeKO マウスを各 6 検体ずつ用いて行った。

11) 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。皮膚血管における α -SMA の染色性の定量については二要因混合計画を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。値は平均値 \pm 標準誤差で表記した。

結果

1) マクロファージにおける **Fli1** の発現低下は血管を不安定化し新生血管形成を促進するフェノタイプを誘導する。

まず、**Fli1** の発現低下が骨髄由来細胞の一つであるマクロファージのフェノタイプに及ぼす影響を新生血管形成に重要な因子の発現に着目して検討した。**Fli1** **MyeKO** マウスより採取したマクロファージでは **Fli1** の発現が 70% ノックダウンされていた(図 5)。**Fli1** **MyeKO** マウスより採取した腹腔マクロファージはコントロールマウスより採取した腹腔マクロファージに比較して *Mmp9*、*Vegfa* 遺伝子の mRNA 発現が亢進していた一方で *Pdgfb* 遺伝子の mRNA 発現は低下していた(図 5)。

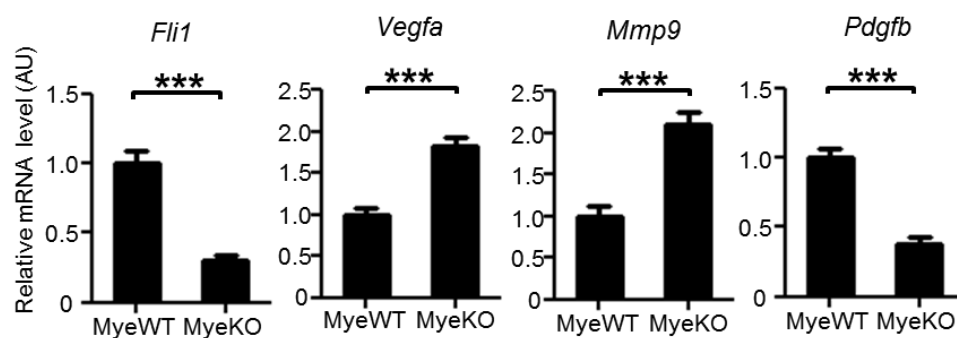


図5 腹腔マクロファージにおける *Fli1*、*Mmp9*、*Vegfa*、*Pdgfb* 遺伝子の mRNA 発現量：コントロール(MyelWT マウス)と比較して *Fli1* MyeKO マウスの腹腔マクロファージでは *Fli1* 遺伝子の発現は 70%低下している。また、*Fli1* MyeKO マウスの腹腔マクロファージでは *Mmp9*、*Vegfa* 遺伝子の mRNA 発現が有意に亢進し、*Pdgfb* 遺伝子の mRNA 発現が有意に低下している。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。データは MyelWT マウスの平均を 1 とし、平均値±標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。*** $p < 0.001$ 。

また、*Fli1* MyeKO マウスより採取した腹腔マクロファージはコントロールに比較して貪食能、運動能、遊走能が亢進していた。(図 6)。

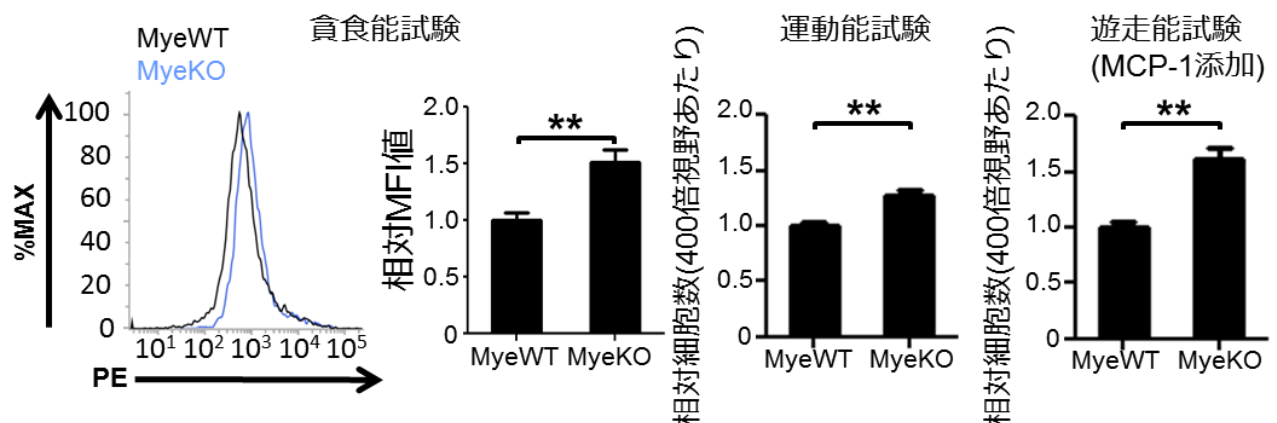


図6 腹腔マクロファージにおける貪食能、運動能、遊走能の検討：コントロール(MyWT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスの腹腔マクロファージでは貪食能、運動能、走化性因子(MCP-1)に対する遊走能が有意に亢進している。貪食能試験では PE 抱合ビーズをマクロファージを培養している well に添加し、24 時間後に細胞を回収し、PE の蛍光強度を FACSCanto II にて解析した。運動能・遊走能試験ではボーイデンチャンバーを 10 μ m の穴があいたポリエチレンテレフタレート製トラックエッチドメンブレンで上層と下層に分離し、上層にマクロファージを添加した。18 時間後、上層より下層に移動したマクロファージ数を計測した。遊走能試験では下層に 5nM の MCP-1 を添加している。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。データは MyeWT マウスの平均を 1 とし、平均値 \pm 標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。** $p < 0.01$ 。

マクロファージにおける Fli1 の発現低下は血管を不安定化し新生血管形成を促進する因子である VEGFA や血管周囲の基底膜を分解することで新生血管形成を促進する MMP9 の発現亢進、血管壁細胞を遊走・安定化させ血管を安定化させる PDGFB の発現低下を誘導した。これは、血管の恒常性を司る因子の産生細胞という意味でのマクロファージの形質が血管を不安定化するフェノタイプに分化したことを示唆する。また、マクロファージの貪食能・運動能・

遊走能の亢進は新生血管形成に促進的に働くことから Fli1 の発現低下はマクロファージの機能においても新生血管形成を亢進させる方向へ作用していると考えられる(図 7)。

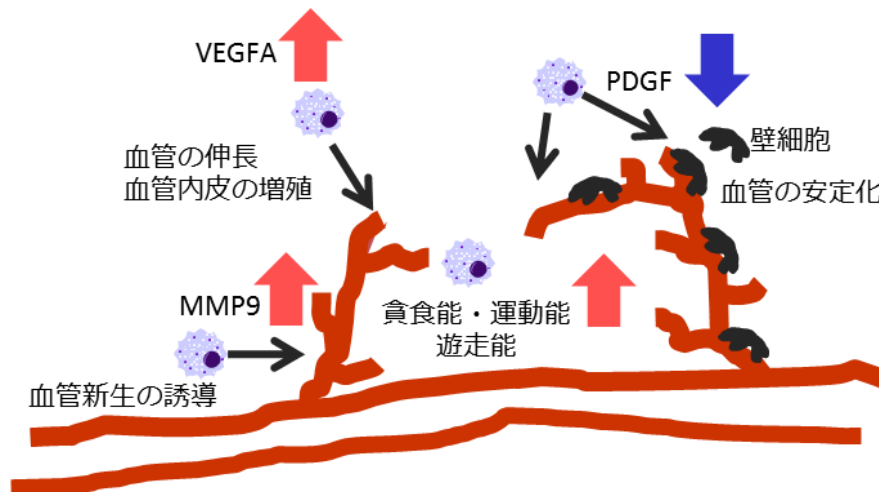


図7 Fli1 の発現低下がマクロファージの新生血管形成に関連したフェノタイプに及ぼす影響：マクロファージにおける Fli1 の発現低下は新生血管形成を促進する MMP9、VEGFA の発現亢進(赤矢印)、壁細胞を遊走させ血管の安定化に寄与する PDGF の発現低下(青矢印)、マクロファージの貪食能、運動能、遊走能の亢進(赤矢印)をもたらし、新生血管形成を促進するフェノタイプへと誘導する。

2) 骨髄細胞における Fli1 の発現低下は新生血管形成に異常をもたらす。

次に、実際のマウスにおける新生血管形成について評価した。この検討にはマトリゲルプラグをマウスの腹部皮下に包埋しプラグ内への新生血管形成を評価する方法であるマトリゲルプラグアッセイを用いた。最初に、マトリゲルプラグ内に安定化した血管が形成される時期である包埋 7 日後の新生血管の形態を HE 染色にて観察した。その結果、Fli1 MyeKO マウスから採取したマ

トリゲルプラグでは血管壁が薄く、いびつに拡張した未熟で不安定な形態の血管が散見された(図 8)。

新生血管が形成される過程の中で骨髄由来細胞の一つである単球系細胞が血管壁細胞への分化を通じて血管を最終的に安定化させることから、Fli1 MyeKO マウスにおいて形態的に未熟な血管が見られた原因として血管壁細胞の機能障害が関与している可能性を考えた。そこで、血管壁細胞による血管安定化の評価のために血管壁細胞における分化度のマーカーである α -SMA の発現を検討した。血管壁細胞における α -SMA の発現低下は血管壁細胞の機能不全・血管安定化作用の障害を意味する。マトリゲルプラグの α -SMA 染色では Fli1 MyeKO マウスで見られた拡張した血管を覆う血管壁細胞の α -SMA の発現が低下ないしは不均一化していた(図 8)。この結果は、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は血管壁細胞の機能障害を引き起こし、血管の安定化に異常をもたらすことを示唆している。

新生血管形成の初期において骨髄由来細胞の一つである単球系細胞が細胞内管腔を形成することで血管内皮細胞による管腔形成の足場を形成することや、細胞内管腔を形成した単球系細胞が最終的には血管壁細胞に分化するこ

とが報告されている^{22,43}。そこで、マトリゲルプラグにて単球系細胞が細胞内管腔を形成し、血管壁細胞への分化を示し始める時期であるマトリゲルプラグ包埋 5 日後の組織を検討した。包埋 5 日後のマトリゲルプラグでは、連続切片にて細胞内に管腔を形成し始めている細胞は MyeWT マウス、Fli1 MyeKO マウス共に α -SMA と単球系細胞のマーカーである F4/80 を発現していることが確認できた(図 9)。単球系細胞は平常状態では α -SMA を発現しないことから、これら細胞内管腔を形成している細胞は血管壁細胞へと分化傾向を示した単球系細胞であることがわかる。さらに、Fli1 MyeKO マウスより採取したマトリゲルプラグでは細胞内管腔を形成している細胞の α -SMA の発現が低下していた(図 8)。これは単球系細胞が血管壁細胞へと分化を始める段階から Fli1 の発現低下により血管壁細胞の機能障害が見られることを示唆する。骨髓細胞における Fli1 の発現低下は骨髓細胞の一つである単球系細胞から分化した血管壁細胞に機能障害を引き起こすことが一因として、最終的に新生血管の安定化に障害をもたらすと考えられた。

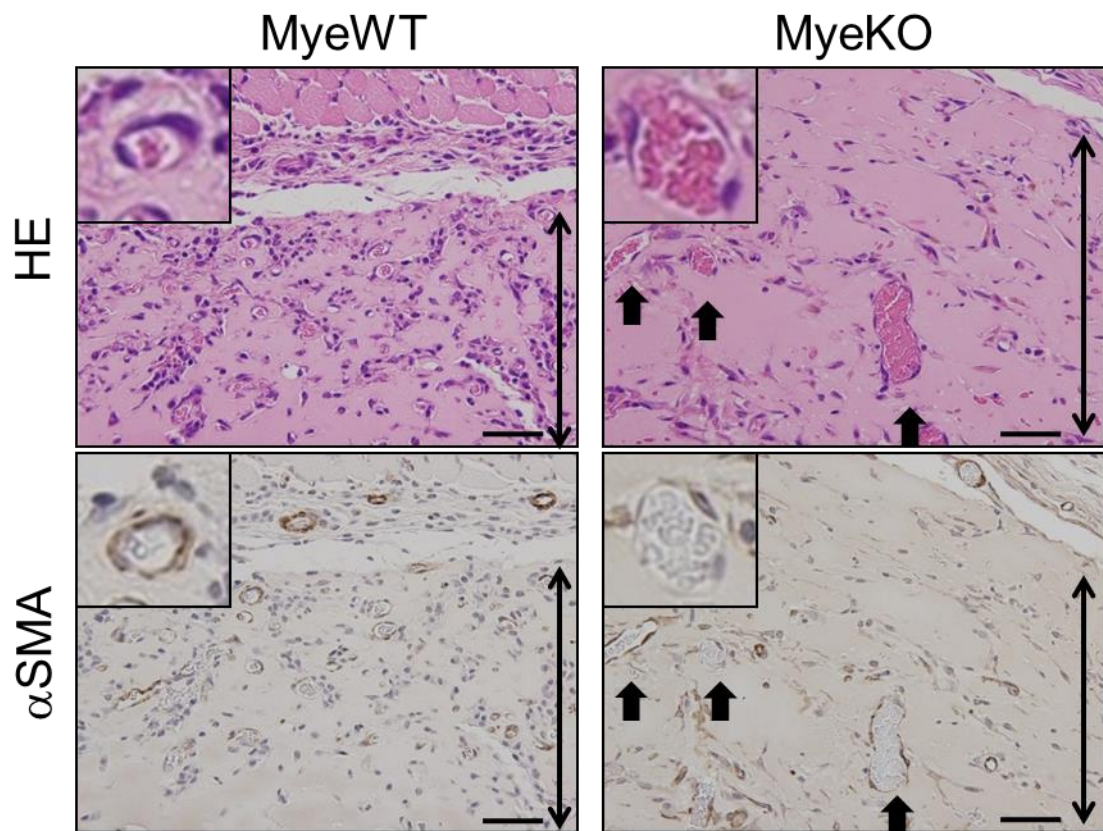


図 8 マトリゲルプラグを用いた新生血管形成の検討(マトリゲルプラグ包埋 7 日後)：コントロール(My^eWT マウス)と比較して Fli1 My^eKO マウスでは HE 染色にて拡張した構造的に未熟な血管が散見され、新生血管を覆う血管壁細胞の α -SMA の発現が低下・不均一化している(矢印)。拡大を差し込み図に示す。Bar は 50 μ m を示す。

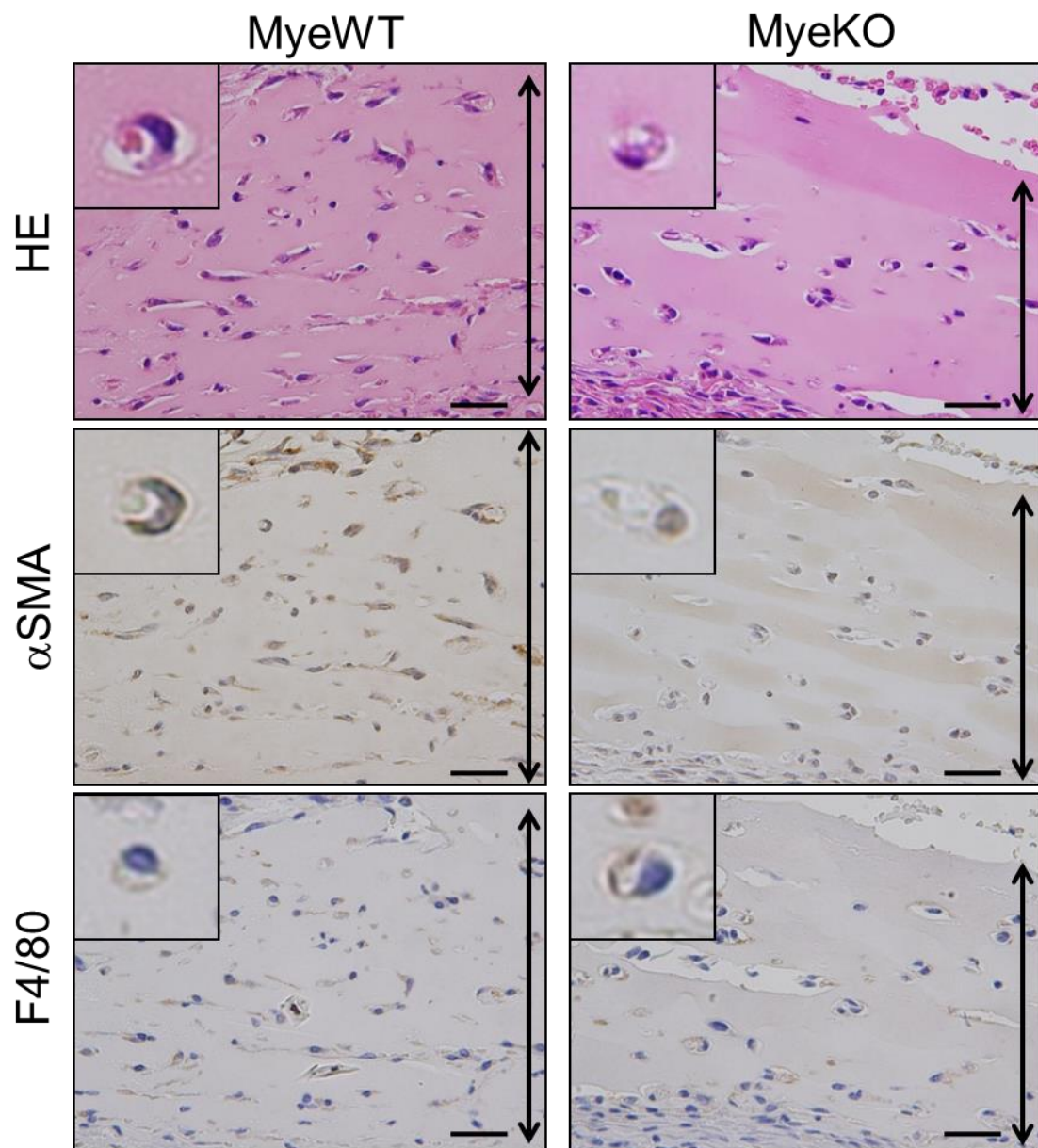


図 9 マトリゲルプラグを用いた新生血管形成の検討(マトリゲルプラグ包埋 5 日後): 連続切片にて細胞内管腔を形成している細胞は α -SMA と F4/80 の両者を発現しており、これらの細胞は血管壁細胞へと分化傾向を示す単球系細胞であるとわかる。コントロール(My WT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは細胞内管腔を形成している単球系細胞の α -SMA の発現が低下している。拡大を差し込み図に示す。Bar は 50 μ m を示す。

3) Fli1 MyeKO マウスでは血管壁細胞による血管の安定化に障害がみられる。

これまでの結果から、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は、新生血管が血管壁細胞によって安定化される過程に異常をもたらすことが関与して新生血管形成に異常をきたすことが明らかになった。血管の恒常性は血管における老化やその他の傷害に対して血管構造を正常に修復することで保たれることから、骨髄細胞における Fli1 の発現低下によって新生血管形成の過程が障害され血管構造の修復機転が正常に働かないことで血管の恒常性に破綻をきたす可能性が考えられた。そこで次に、骨髄細胞における Fli1 の発現低下が血管の恒常性に及ぼす影響を検討した。

Fli1 MyeKO マウスの微小血管における血管の安定性について検討するため、皮膚微小血管の細動脈、細静脈、毛細血管それぞれについて、個々の血管の血管壁細胞の α -SMA の発現を陰性、弱陽性、陽性と半定量化し、その割合を評価した。加齢が血管に傷害をもたらす因子であることを鑑み、Fli1 MyeKO マウス皮膚血管の α -SMA 発現を時系列に沿って検討した。図 10 に示す通り、1 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは細動脈、細静脈の壁細胞の α -SMA 発現はコントロールと比較して差がなかったが、毛細血管においては壁細胞の α -SMA の発現

が低下している毛細血管の割合が増加していた。一方で 2 ヶ月齢以降の Fli1 MyeKO マウスではコントロールと比較して皮膚の細動脈、細静脈、毛細血管のすべてにおいて壁細胞の α -SMA 発現が低下している血管が増加していた(図 10)。

以上のことから、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は加齢に伴い皮膚の微小血管の構造不安定化を引き起こすことが示唆された。これらの機序については、新生血管形成の異常を通じて、加齢を含めた様々な要因による血管の損傷に対する血管のリモデリングに異常をきたし、血管の恒常性に破綻をきたすことで、時間経過とともに血管の不安定化が見られていることが考えられた。このことは 1 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは毛細血管でのみ α -SMA の発現が低下している血管が増加している一方で比較的壁構造の丈夫な細動脈、細静脈でははっきりとした α -SMA の発現低下はみられなかったことや、2、3 ヶ月齢と加齢するに従って血管のリモデリングの異常の蓄積に伴い血管障害が明らかになっていることと矛盾しないと考えられる。

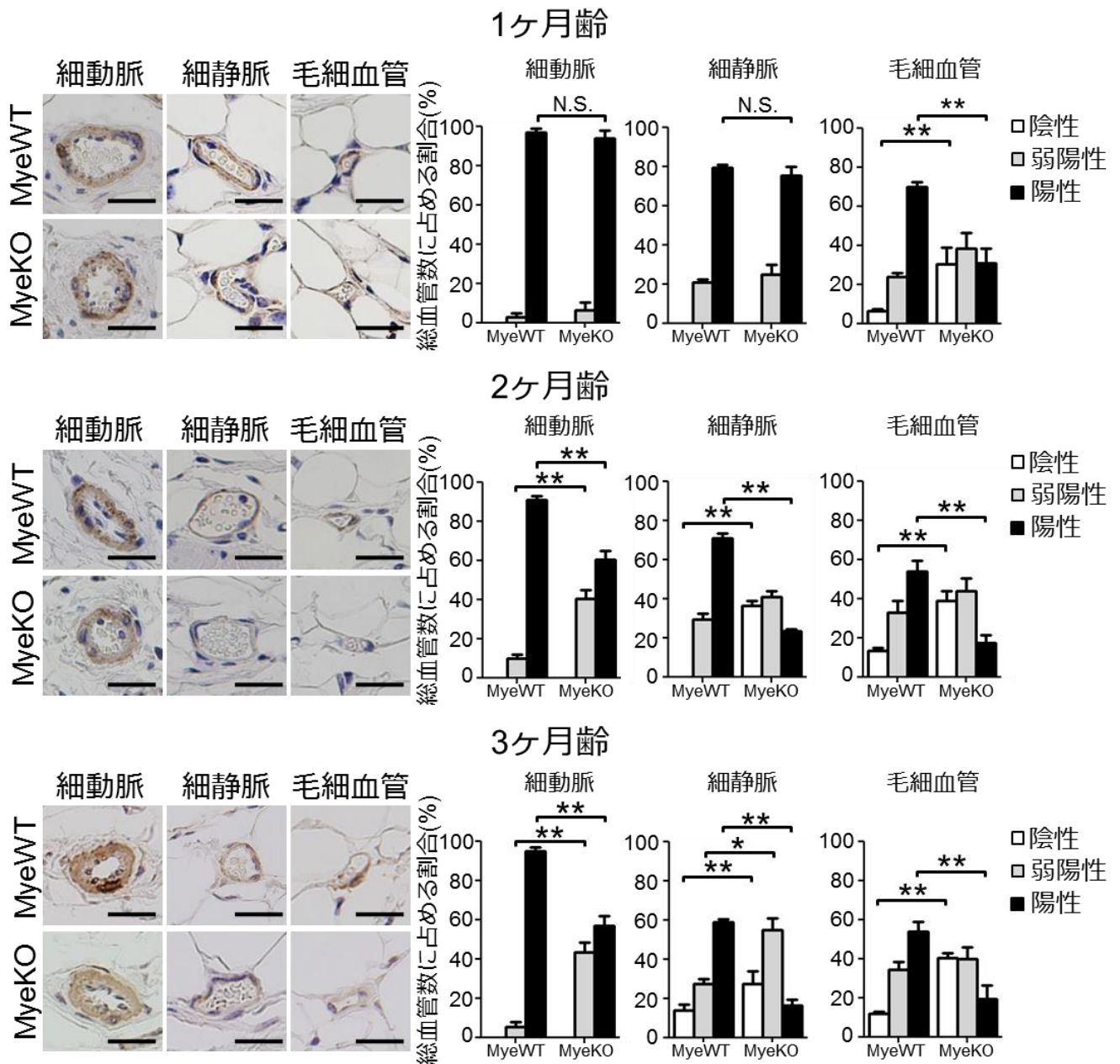


図 10 マウス皮膚の微小血管における壁細胞の α -SMA の発現の検討：細動脈、細静脈、毛細血管の α -SMA 染色(左)と、細動脈、細静脈、毛細血管のそれぞれにおける個々の血管の壁細胞の α -SMA の発現(陰性、弱陽性、陽性)の割合(右)を月齢別に示す。コントロール(MyWT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは1ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは細動脈、細静脈の壁細胞の α -SMA 発現はコントロールと比較して差がないが、毛細血管においては壁細胞の α -SMA の発現が低下している毛細血管の割合が増加している。2ヶ月齢以降の Fli1 MyeKO マウスでは皮膚の細動脈、細静脈、毛細血管において壁細胞の α -SMA 発現が低下しているものの割合が増加している。Bar は 10 μ m を示す。統計は二要因混合計画を用いて行った。データは平均値 \pm 標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、N.S. not significant。

4) Fli1 MyeKO マウスの皮膚血管では血管の脆弱化が見られる。

α -SMA の発現低下に見られるように、血管壁細胞が機能不全をおこし血管の安定化が失われた状態は **pericyte loss** と称される状態であり、血管構造の脆弱化、血管内皮細胞の増殖、血管の拡張、血管腔の狭窄など血管の構造異常を引き起こすことが報告されている(図 11)。そこで次に、Fli1 MyeKO マウスにおいて **pericyte loss** による血管障害が引き起こされているかどうかを検討した。

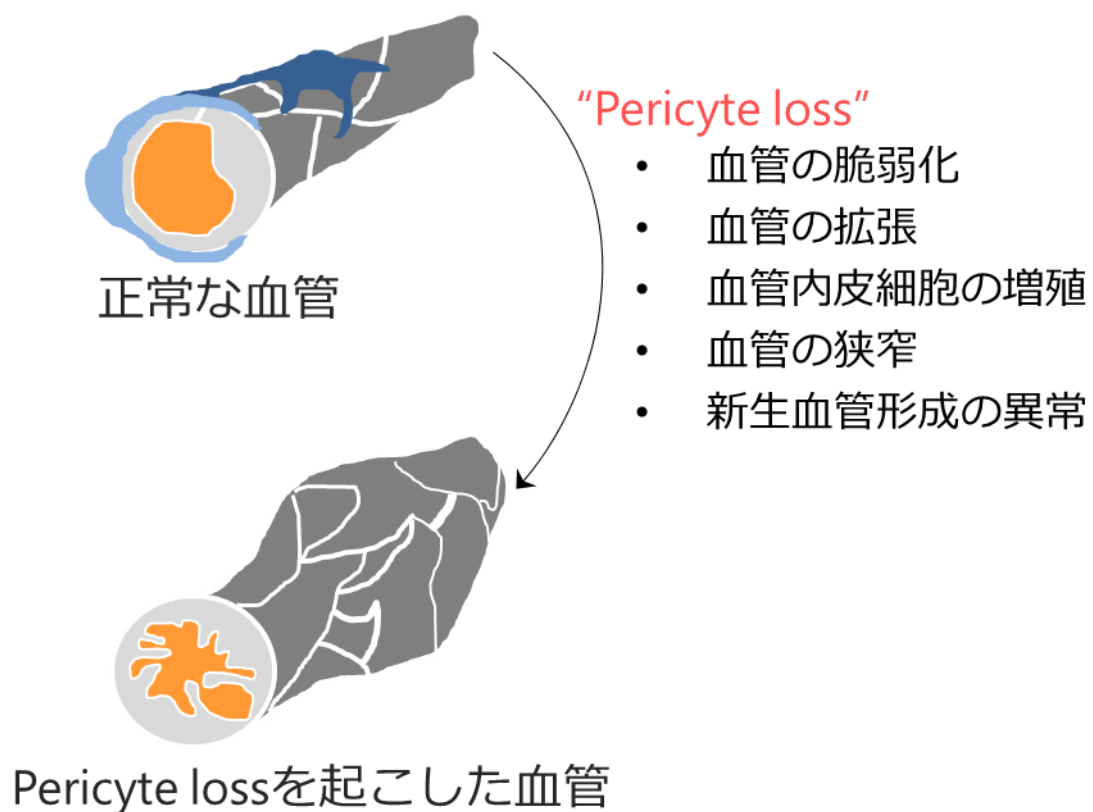


図 11 Pericyte loss によって引き起こされる血管障害: Pericyte loss は血管構造については血管の脆弱化、血管の拡張、血管内皮細胞の増殖、血管狭窄を引き起こすほか、血管の安定化が障害されることから新生血管形成にも異常をきたす。

まずは、血管構造の脆弱化の 1 つとしての血管透過性亢進について検討するために 0.5% Evans blue を尾静注し、腹部皮膚血管からの Evans blue の漏出を検討した。その結果、1 ヶ月齢のマウスでは血管に沿ってごく薄い Evans blue の漏出が軽度見られる程度であったが、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは血管に沿って明瞭に Evans blue の漏出が見られた (図 12A)。さらに、すべての月齢にて血管の背景の皮膚は全体的には淡く Evans blue の漏出が見られていた。Evans blue の漏出を定量的に評価してみても、Fli1 MyeKO マウスでは 1 ヶ月から血管の透過性の亢進が軽度見られ、時間経過とともに次第に血管の透過性が亢進していた(図 12B)。Fli1 MyeKO マウスの皮膚微小血管の血管安定性については先の検討の通り、1 ヶ月齢では壁細胞の α -SMA の発現が低下しているのは毛細血管のみであったのが 2、3 ヶ月と時系列に沿って細動脈、細静脈、毛細血管とすべての皮膚微小血管レベルで壁細胞の α -SMA 発現が低下し、安定性が障害されており、血管透過性の異常はこの結果と合致していた。

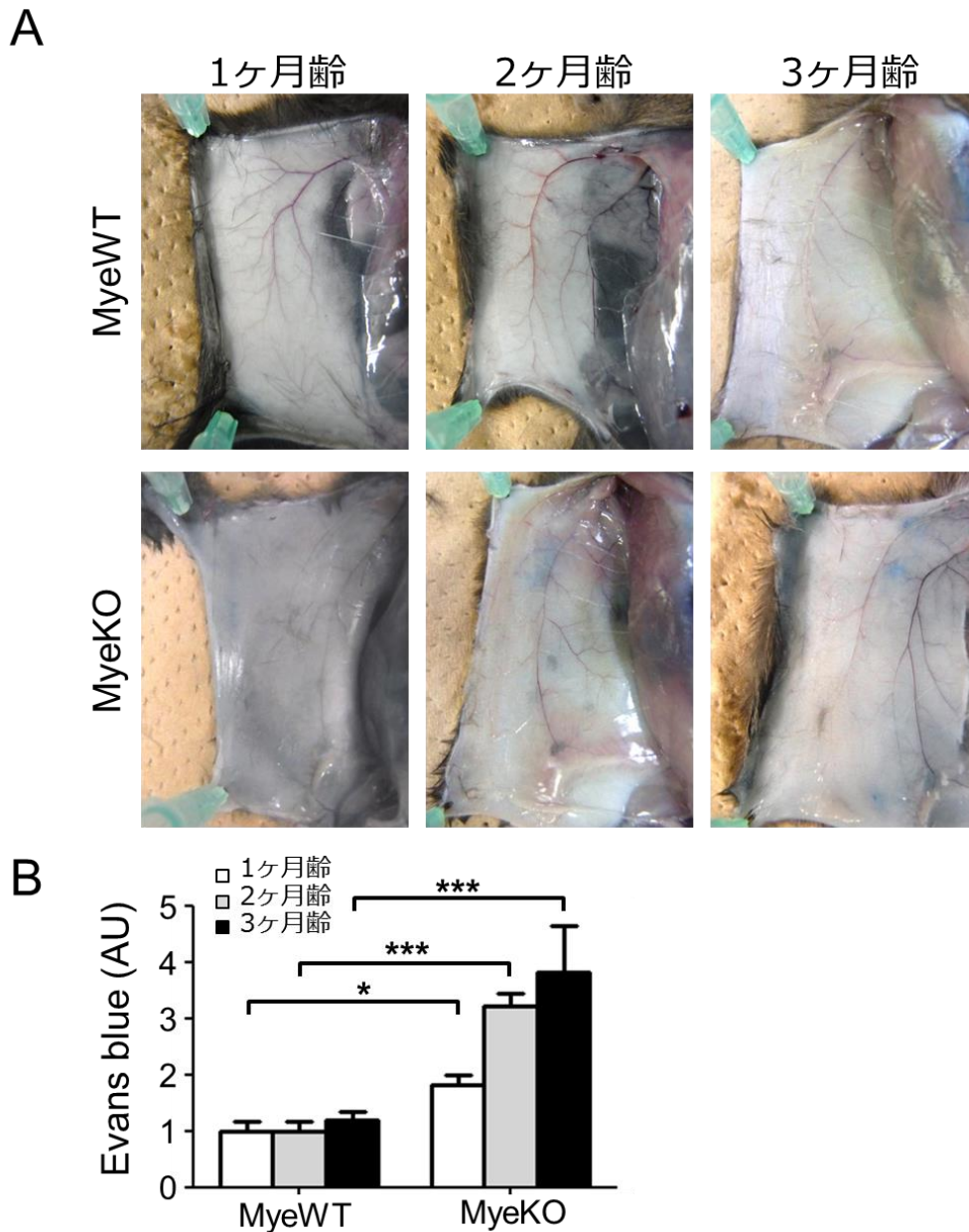


図 12 0.5% Evans blue を用いた皮膚血管の透過性の亢進の検討 : (A) マウス腹部血管からの Evans blue の漏出を検討すると、コントロール(MyeWT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは 1 ヶ月齢では血管に沿って Evans blue のごく淡い漏出が見られ、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢では血管に沿って明瞭に Evans blue の漏出が見られる。(B) Evans blue の漏出を定量すると Fli1 MyeKO マウスでは MyeWT マウスと比較して 1 ヶ月齢から時系列に沿って漏出が増えている。統計解析は one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いた。データは 1 ヶ月齢の MyeWT マウスの平均を 1 とし、平均値±標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 。

5) Fli1 MyeKO マウスにおける皮膚血管は構造的異常を時系列に沿って呈する。

次に pericyte loss によって引き起こされる血管の構造異常が Fli1 MyeKO マウスにおいてみられるかどうか、FITC 抱合デキストランを尾静注し、背部皮膚血管を可視化することで検討した。その結果、1 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスではコントロールに比較して血管の構造異常は見られなかった(図 13)。一方で、2 ヶ月齢では血管がやや消失しており、細動脈の狭窄が少数散見された。さらに、3 ヶ月齢では血管の消失は広範に及んでおり、同様に細動脈の狭窄も多数見られた(図 13)。以上のことから Fli1 MyeKO マウスでは全身性強皮症における構造的な血管障害を時系列に沿って再現することが示唆された。

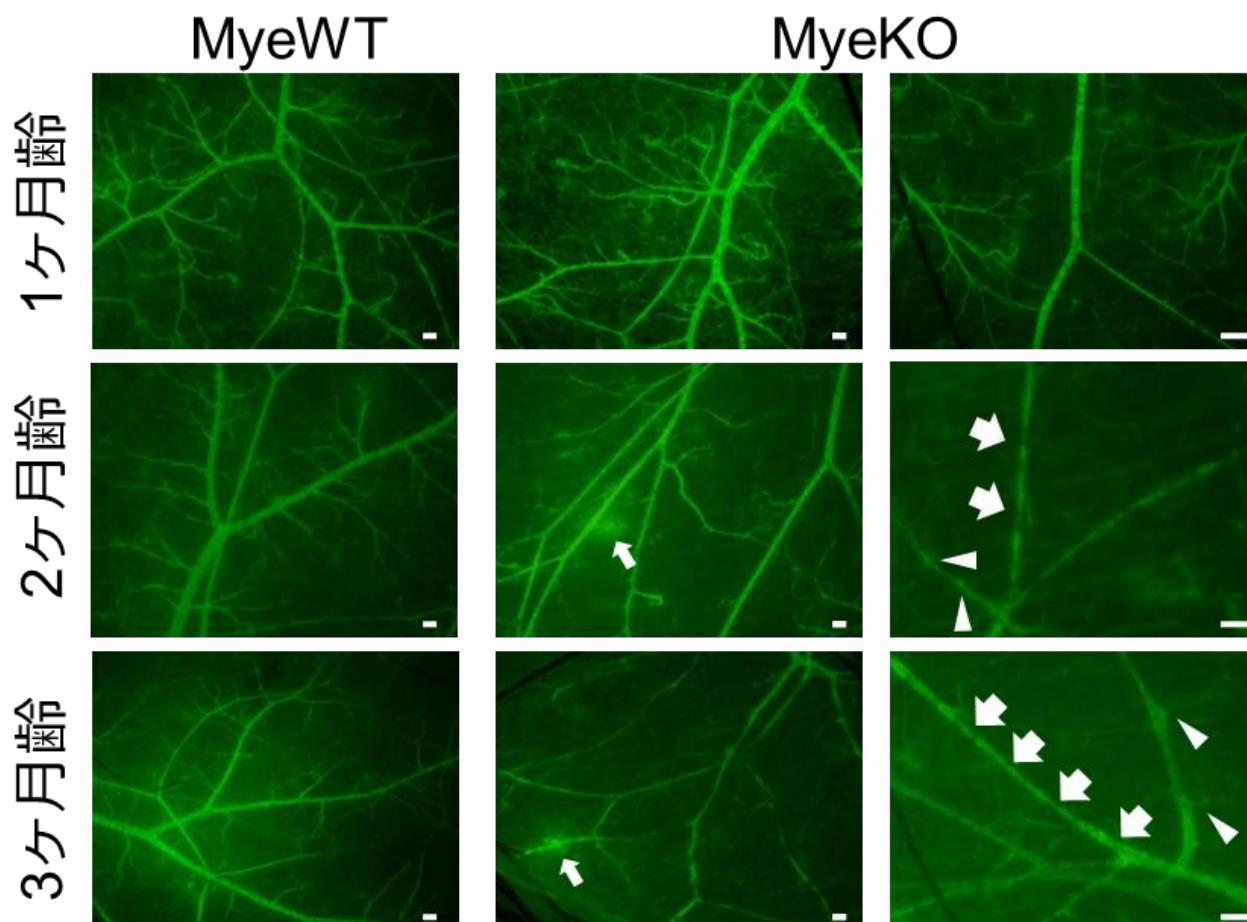


図 13 マウス皮膚血管の構造の検討：FITC 抱合デキストランを尾静注し、背部皮膚の血管構造を蛍光顕微鏡にて観察した。コントロール(MyeWT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは 1 ヶ月齢では違いは見られなかった。2、3 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは FITC の血管外漏出が見られる(細矢印)。2 ヶ月齢では血管消失(矢頭)と、細動脈の狭窄(太矢印)が見られる。3 ヶ月齢でも血管の消失(矢頭)、細動脈の多発狭窄(太矢印)が見られる。Bar は 100 μ m を示す。

6) Fli1 MyeKO マウスの皮膚の細動脈では血管内皮細胞の増殖、血管拡張、血管の狭窄が見られる。

前述したように Fli1 MyeKO マウスは皮膚血管において3ヶ月齢には構造的な血管障害を明確に呈した。pericyte loss による血管拡張、血管内皮細胞の増殖、先に見られた血管狭窄の組織学的な確認のために、皮膚血管を組織学的に検討した。その結果、3ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウス皮膚では細動脈の外径の増加、血管内皮細胞の増殖、血管断面積に占める血管内腔面積の狭小化が見られた(図 14)。このことから、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は血管の安定化に障害をきたし、pericyte loss に特徴的な血管の構造変化を再現していた。

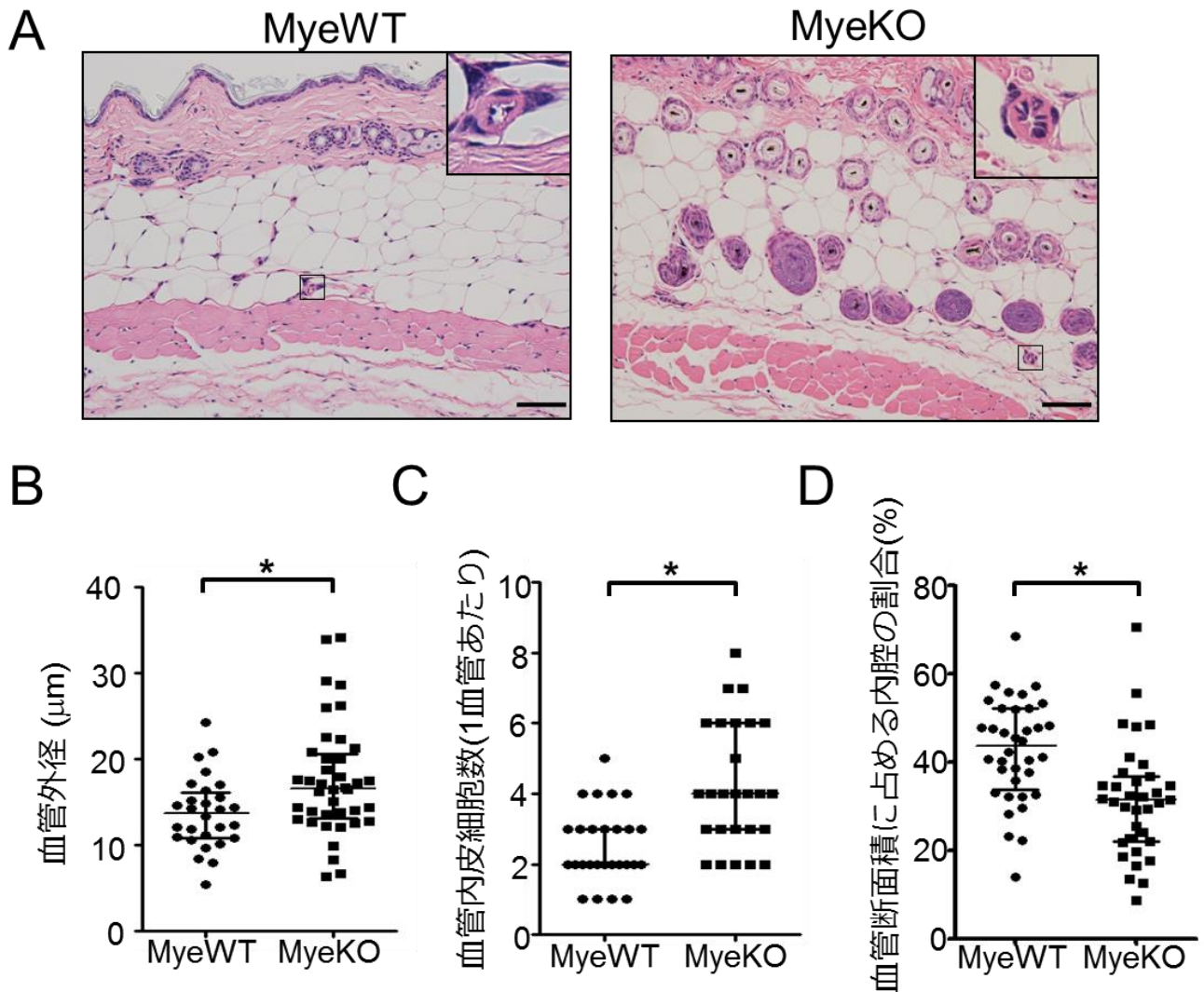


図 14 皮膚血管における細動脈の血管外径、血管内皮細胞数、血管内腔面積の検討：(A)3 ヶ月齢のマウス背部正中皮膚組織の HE 染色。細動脈の拡大を差し込み図に示す。Bar は 50 μm を示す。(B-D) コントロール(My WT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは(B) 血管外径の増加、(C) 血管内皮細胞数の増加、(D) 血管断面積に占める内腔の割合の低下が見られる。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。データは平均値±標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。* $p < 0.05$ 。

7) Fli1 MyeKO マウスの皮膚では毛細血管の減少が見られる。

FITC 抱合デキストランにて可視化した皮膚血管において 2, 3 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスで観察された血管の消失を、血管内皮細胞のマーカーである vWF の組織染色にて血管内皮細胞を染色し皮膚組織の毛細血管数を組織学的に検討した。その結果、2, 3 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは毛細血管数の減少が見られていた(図 15)。この結果は FITC 抱合デキストランの結果と一致し、組織学的にも血管の消失が見られることが確認できた。以上の血管の検討から、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は全身性強皮症に特徴的な破壊性血管障害と増殖性血管障害、増殖性閉塞性血管障害を再現することが示唆された。

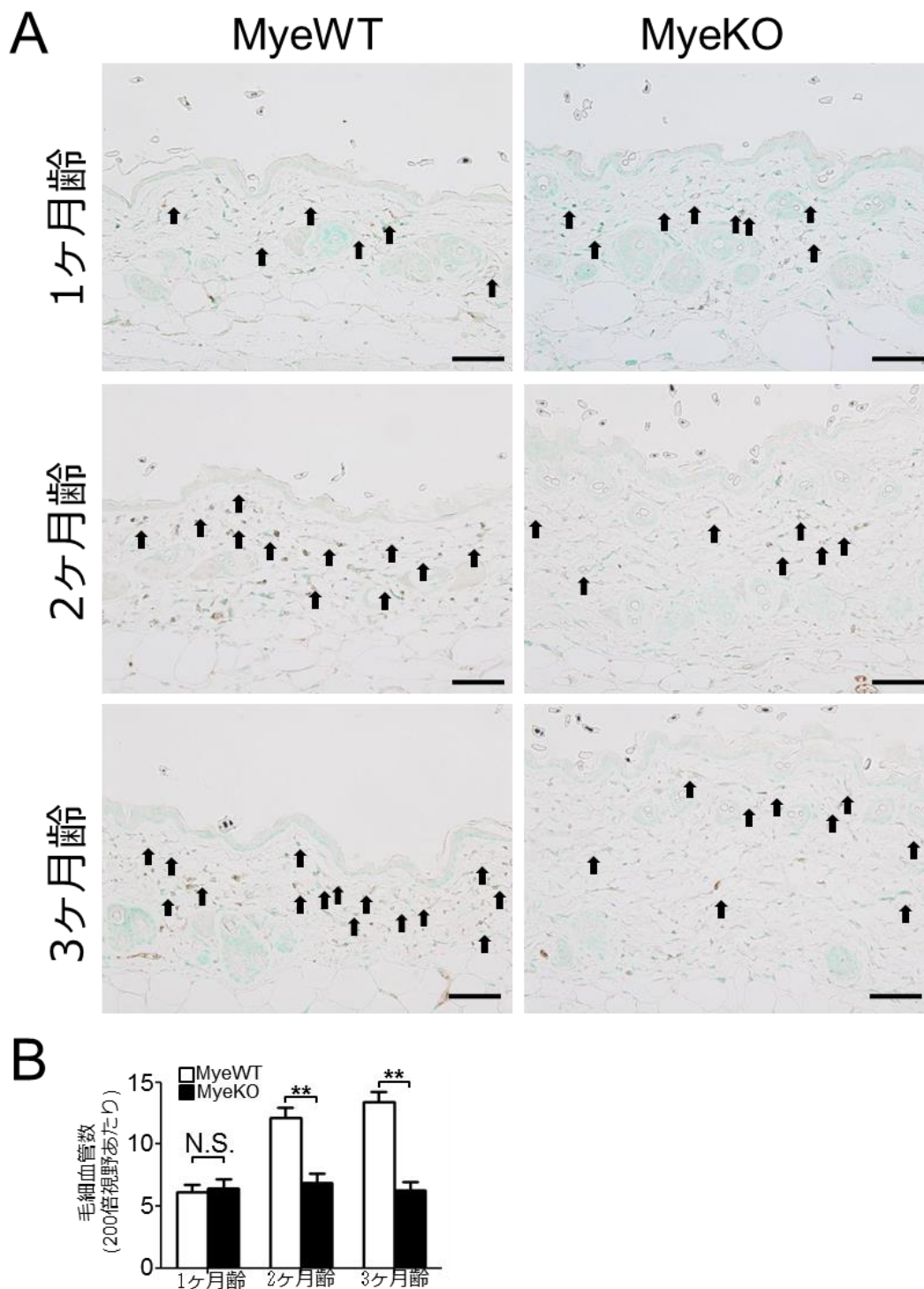


図 15 マウス皮膚組織における毛細血管数の検討：(A) マウス背部正中皮膚の vWF 染色。矢印は vWF 陽性によって示される血管内皮細胞により形成される毛細血管を示す。Bar は 50 μm を示す。(B) コントロール(MyWT マウス)と比較して Fli1 MyeKO マウスでは 2 ヶ月齢以降皮膚毛細血管の減少が見られる。計測は 200 倍視野で無作為に選んだ少なくとも 5 視野で行い、それぞれのサンプルで平均を算出した。統計解析は one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。** $p < 0.01$ 、N.S.not significant。

8) Fli1 MyeKO マウスは皮膚の線維化を呈する。

以上のように、Fli1 MyeKO マウスは全身性強皮症に特徴的な血管障害を呈するがその障害は時間とともに進展していくことが明らかになった。全身性強皮症では血管障害が先行しその後皮膚線維化が現れることから、次に血管障害に伴って皮膚線維化が Fli1 MyeKO マウスに生じているかどうか検討した。その結果、Fli1 MyeKO マウスの皮膚においては 1 ヶ月齢では皮膚線維化は見られず、2 ヶ月齢以降コントロールに比較して皮膚真皮厚の増加、皮膚コラーゲン含有量の増加が見られた(図 16)。

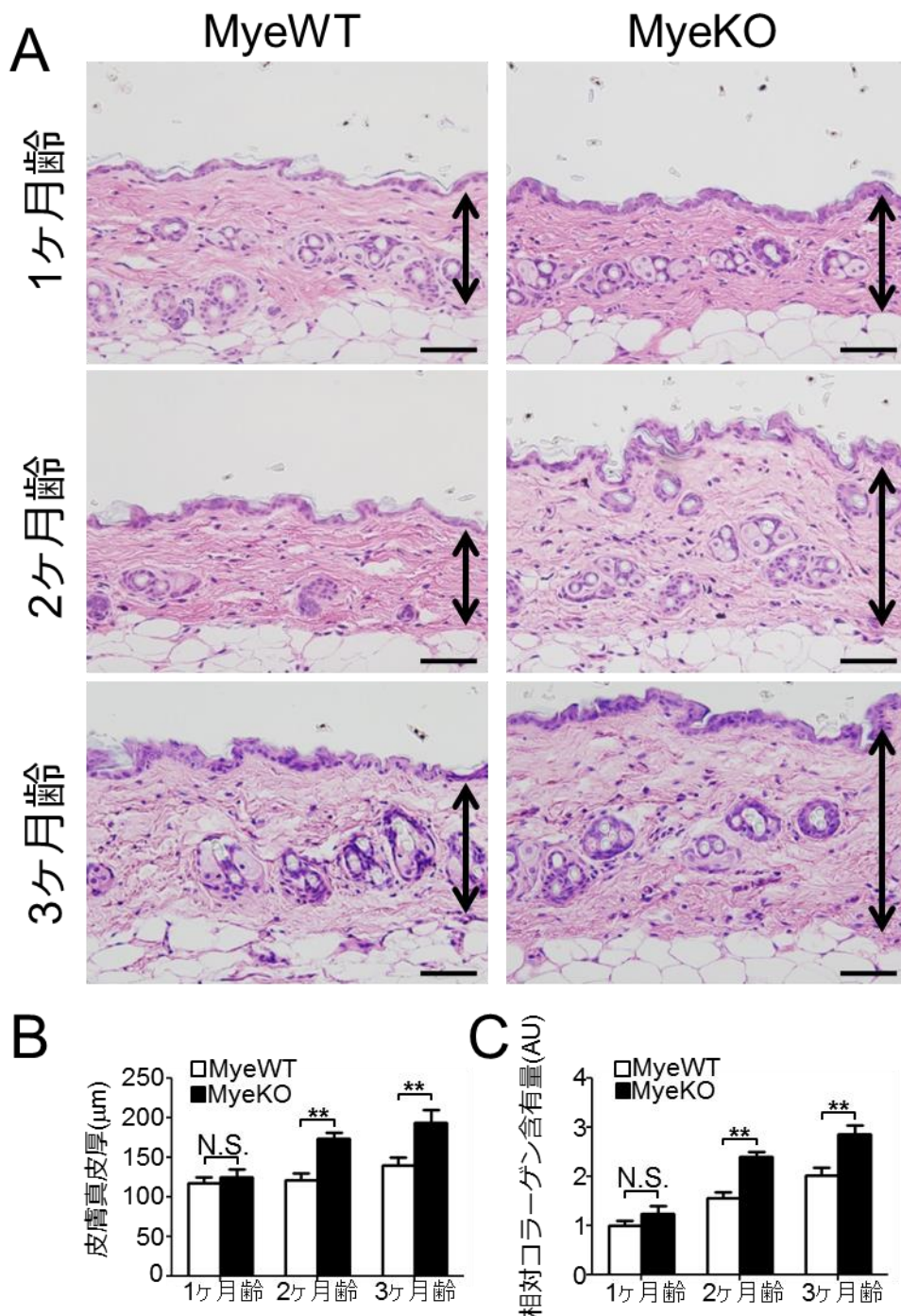


図 16 皮膚真皮厚と皮膚コラーゲン量の検討：(A)各月齢のコントロール (MyeWT マウス)と Fli1 MyeKO マウスのマウス背部正中皮膚の HE 染色。Bar は 50 μm を示す。(B、C) MyeWT マウスと比較して Fli1 MyeKO マウスでは、(B) 皮膚真皮厚、(C)皮膚コラーゲン含有量ともに 2 ヶ月齢以降で有意に増加している。皮膚真皮厚は無作為に選んだ少なくとも 5 視野で測定し、それぞれのサンプルで平均を算出した。相対コラーゲン含有量については 6mm パンチで採取した背部皮膚を用いて計測し、1 ヶ月齢の MyeWT マウスの平均を 1 とした。統計解析は one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いた。データは平均値±標準誤差を用いて表した。各群 6 匹のマウスを用いて検討した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、N.S.not significant。

9) 骨髓細胞における Fli1 の発現低下は内皮間葉転換を誘導する。

血管障害と線維化については因果関係が示唆されているが、両者を直接結ぶ現象として血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化する現象である内皮間葉転換が挙げられる⁴⁴。新生血管を形成する際に血管内皮細胞は増殖するが、安定した血管を形成できない状況では増殖した血管内皮細胞の一部は間葉系細胞に分化することが知られている⁴⁴。内皮間葉転換により血管内皮細胞から分化した線維芽細胞は膠原線維を産生することで線維化に寄与していることが知られている。

そこで、Fli1 MyeKO マウスにおける内皮間葉転換を検討した。マウス背部正中皮膚組織にて血管内皮細胞のマーカーである VE-cadherin と間葉系細胞のマーカーである FSP1 の二重免疫染色を用いて検討した。その結果、コントロールでは VE-cadherin と FSP1 の二重陽性細胞は見られず、内皮間葉転換は見られなかった。一方で、Fli1 MyeKO マウスでは真皮深層の血管周囲に二重陽性細胞が散見され Fli1 MyeKO マウス皮膚では内皮間葉転換が起こっているのがわかった(図 17)。よって、内皮間葉転換が骨髓細胞における Fli1 の発現低下による血管障害と組織線維化を結ぶ病態の一つであることが示唆された。

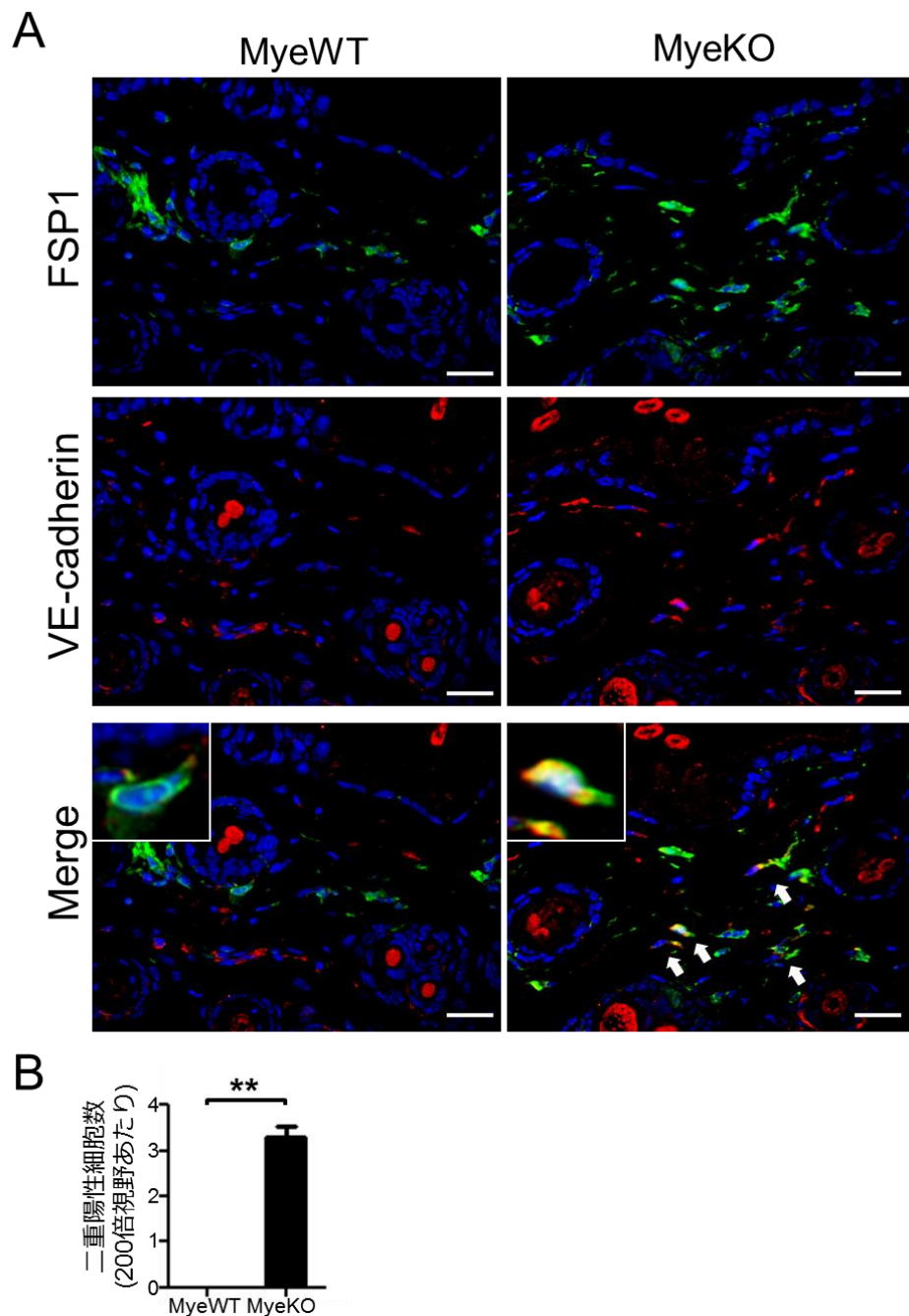


図 17 皮膚組織における内皮間葉転換の検討: (A) 3 ヶ月齢のマウス背部正中皮膚組織における、血管内皮細胞のマーカである VE-cadherin と間葉系細胞のマーカである FSP1 による二重免疫染色。コントロール(MyeWT マウス)では二重陽性細胞は見られないのに対して Fli1 MyeKO マウスでは真皮深層の血管周囲に二重陽性細胞(矢印)が散見される。MyeWT マウスでは FSP1 陽性細胞、Fli1 MyeKO マウスでは二重陽性細胞の拡大を差し込み図に示す。Bar は 50 μ m を示す。(B) 200 倍視野 1 視野あたりの二重陽性細胞数。計測はサンプルあたり無作為に少なくとも 5 視野ずつ行い、平均値を計算した。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差を用いて表した。各群 8 匹のマウスを用いて検討した。** $p < 0.01$ 。

考察

全身性強皮症は血管障害と組織線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である¹。全身性強皮症における単球系細胞/マクロファージなどの骨髄細胞の異常に関する報告は過去になされているが、骨髄細胞の異常が全身性強皮症の病態に及ぼす影響は未だ明らかではない^{45,46}。全身性強皮症皮膚組織では Fli1 の発現は線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞など様々な細胞で低下しており³²、線維芽細胞や皮膚微小血管内皮細胞における Fli1 の発現はそれぞれの細胞において全身性強皮症の病態をよく再現する一方で、骨髄細胞における Fli1 の発現低下の意義は未だ明らかではない^{14,36,37}。今回の研究において、骨髄細胞における転写因子 Fli1 の発現低下が新生血管形成における血管の安定化に障害をきたし血管の恒常性に破綻をきたすとともに全身性強皮症に類似した血管障害を時系列に沿って再現すること、血管障害の進行とともに皮膚の線維化を呈することが明らかになった。

血管の恒常性は周辺環境の成長因子、サイトカインにより厳密に制御されているが、マクロファージでは Fli1 の発現低下により血管を不安定化し新生血管形成を促進する因子である VEGFA や血管周囲の基底膜を分解すること

で新生血管形成を促進する MMP9 の発現亢進、血管血管壁細胞を遊走・安定化させ血管を安定化させる PDGFB の発現低下をきたした。これは、血管の恒常性を司る因子の産生細胞という意味でのマクロファージの形質が血管を不安定化するフェノタイプに分化したことを示唆する。また、Fli1 の発現低下はマクロファージの機能においても貪食能・運動能・遊走能の亢進を通じて新生血管形成を亢進させる方向へ作用していると考えられる。全身性強皮症におけるマクロファージの機能が実際の血管病変に及ぼす影響に関する報告は過去にないが、マクロファージにおける Fli1 の発現低下はマクロファージ自体の機能としても全身性強皮症の表現型を再現している可能性が考えられる。

また一方で、血管壁細胞の起源は未だ明らかではないが、新生血管形成の際に骨髄由来細胞の一つである単球系細胞の細胞内管腔の形成・新生血管の血管壁細胞への分化が見られることから、一部の血管壁細胞は骨髄由来である可能性が報告されている^{22,23}。マトリゲルプラグアッセイで見られたように、単球系細胞が新生血管形成の際に細胞内管腔を作り出している時点から血管壁細胞のマーカーである α -SMA の発現が見られ、骨髄細胞の Fli1 の発現低下によって、単球系細胞から分化している血管壁細胞の α -SMA の発現が低下していた。

さらに、コントロールでは血管壁を血管壁細胞が安定して被包する成熟した血管ができるはずのマトリゲルプラグ包埋7日後においても、Fli1 MyeKO マウスのマトリゲルプラグ内にできた新生血管の壁細胞の α -SMA の発現は低下し、形態的にもいびつに拡張し機能的意義の薄い未熟な血管を形成していた。血管壁細胞における α -SMA の発現低下は血管壁細胞の機能不全・血管安定化作用の低下を意味することから骨髄細胞における Fli1 の発現低下は新生血管の安定化に異常をきたすことがわかる。実際、全身性強皮症皮膚血管では血管壁細胞の α -SMA の発現は低下し、血管が不安定化していることが報告されている^{7,14}。

このことから、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は全身性強皮症の血管壁細胞における α -SMA の発現低下に影響を及ぼしている可能性が示唆される。しかしながら、今回の研究では Fli1 の低下した骨髄細胞が血管壁細胞に分化しているところを直接示すことができなかったため、骨髄細胞における Fli1 の発現低下が血管壁細胞の α -SMA の発現低下をもたらす機序について、Fli1 の発現が低下した周囲の骨髄由来細胞による影響を受けている可能性は否定できず、今後詳細な検討が必要である。また、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は皮膚微小血管において血管壁細胞の α -SMA の発現低下を引き起こした。胎生期の血管形成

は、中胚葉から分化した血管芽細胞が血管内皮細胞に分化することで原始血管叢を形成する embryonic vasculogenesis と既存の血管から血管内皮細胞が増殖・遊走することで新生血管を形成する angiogenesis にて行われる。Fli1 の発現低下は embryonic vasculogenesis に影響を与えないことが報告されており、胎生期の angiogenesis の異常により誘導される細動脈・細静脈の血管安定性の異常が 1 ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは認められなかったことから、生下時の血管構造に骨髓細胞の Fli1 の発現低下は影響を及ぼさないと考えられる。そして、骨髓細胞における Fli1 の発現低下が新生血管形成に異常をきたすことや MyeKO マウスでは時間経過とともに皮膚微小血管の壁細胞の α -SMA の発現が低下し血管構造の不安定化を呈することから、Fli1 MyeKO マウスでは新生血管形成の異常によって血管のリモデリングに異常をきたしたことで時系列に沿って次第に血管安定性が失われていくと考えられる。

全身性強皮症では病初期から血管の血管壁細胞の機能障害による血管の不安定化が見られ、進行に伴い血管の消失や狭窄を呈するが^{47,48}、Fli1 MyeKO マウスは加齢に伴い血管の脆弱化から始まり、その後に血管の消失・血管の狭窄など明らかな構造的な血管障害を呈するなど全身性強皮症と類似した経過を

たどった。Fli1 MyeKO マウスは全身性強皮症の血管障害の病態を時系列に沿ってよく再現していると考えることができる。また、全身性強皮症の血管障害をよく再現するマウスである血管内皮細胞特異的 Fli1 欠損マウスは皮膚血管の血管狭窄や血管内皮細胞の増殖、血管拡張を呈し、全身性強皮症における血管内皮細胞の異常・angiogenesis の異常活性化の病態をよく再現しているが、血管内皮細胞特異的 Fli1 欠損マウスでは全身性強皮症における postnatal vasculogenesis の異常は再現していない¹⁴。Fli1 MyeKO マウスでは新生血管形成において骨髄由来細胞から分化する血管壁細胞に機能異常をきたすことが一因で新生血管形成の障害をもたらすこと、さらに新生血管形成の異常によって血管の恒常性の破綻をきたし全身性強皮症類似の血管障害をもたらしたことから、Fli1 MyeKO マウスでみられた血管障害は全身性強皮症の postnatal vasculogenesis を含めた新生血管形成の異常とそこから引き起こされる血管障害を再現するモデルと考えることができる。実際、血管内皮細胞特異的 Fli1 欠損マウスと比較して、Fli1 MyeKO マウスは全身性強皮症における増殖性血管障害を再現するのみならず血管の消失にみられるように破壊性血管障害も呈することから、骨髄細胞におけ

る Fli1 の発現低下がもたらす新生血管形成の異常が全身性強皮症における破壊性血管障害に重要であることが示唆される。

また、Fli1 MyeKO マウスでは血管障害の進行とともに皮膚真皮の肥厚、コラーゲン含有量の増加が見られ、線維化を呈した。これは全身性強皮症患者において特徴的に見られる所見に類似している⁴⁹。血管障害は線維化と密接に関係していると考えられているが、その機序の一つに血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化する内皮間葉転換がある⁴⁴。内皮間葉転換は安定した血管を形成できない状況で新生血管形成の際に増殖した血管内皮細胞の一部は間葉系細胞に分化する現象であり、pericyte loss によって誘導される⁴⁴。Fli1 MyeKO マウスでは血管の不安定化に続いて明らかな血管の構造異常を呈したのと並行して皮膚線維化を引き起こし、皮膚線維化を起こした Fli1 MyeKO マウスの皮膚では内皮間葉転換が見られることから、Fli1 MyeKO マウスでは血管の安定化の障害に起因した内皮間葉転換が関与し皮膚線維化を呈しているものと考えられる。

まとめ

本研究において、Fli1 MyeKO マウスは全身性強皮症患者と同様に皮膚線維化、血管障害の病態を示した。特に新生血管形成において骨髄由来細胞の一つである単球系細胞から分化した血管壁細胞の障害が関与した新生血管形成の異常をもたらすことが一因で血管の恒常性に異常をきたし、全身性強皮症に類似した破壊性血管障害、増殖性血管障害を呈した。全身性強皮症においては単球系細胞/マクロファージといった骨髄細胞に異常がみられることは報告されているが、骨髄細胞が全身性強皮症の病態に及ぼす影響は未だ明らかではない。転写因子 Fli1 についても、その発現低下が全身性強皮症の病態に及ぼす影響は骨髄細胞では明らかではなかった。今回、骨髄細胞における Fli1 の発現低下によって全身性強皮症に類した血管障害、線維化の病態が再現されたことで、全身性強皮症の病態における骨髄細胞の役割、なかでも骨髄細胞における転写因子 Fli1 の発現低下が全身性強皮症の病態に関与していることが明らかになった。骨髄細胞における転写因子 Fli1 の発現低下をもたらす血管障害、組織線維化は全身性強皮症の病態の一部を再現したモデルと考えられ、それらの異常を引き起こす機序が明らかになることで、全身性強皮症の病態の解明の一助となると

考える。また、全身性強皮症の治療において、皮膚線維化に対しては副腎皮質ステロイド内服療法が奏効することが知られているものの全身性強皮症にはまだ特効薬がない。全身性強皮症に伴う血管障害は難治性皮膚潰瘍の原因となり全身性強皮症患者の生活の質を著しく落としているため、全身性強皮症に伴う血管障害を改善する薬の登場は切に望まれている。本研究によって、骨髄細胞における Fli1 の発現低下が皮膚微小血管の安定化障害をもたらすとともに、皮膚微小血管の構造異常・内皮間葉転換が関与した皮膚線維化をもたらすことが明らかになった。このことは治療応用の観点からすると骨髄細胞における Fli1 の発現低下の是正が全身性強皮症で見られる血管の安定化障害の改善、さらには全身性強皮症に伴う血管障害や線維化の治療として有益である可能性を示唆しており、本研究が全身性強皮症の治療薬開発の一助となることが期待される。

謝辞

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。また、本研究の共同研究者として御指導御協力頂いた東京大学医学部皮膚科学教室、浅野善英講師に深謝いたします。最後に、Fli1^{flox/flox} マウスをご供与いただいた Arthritis Center, Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 先生に深謝いたします。

文献

1. Asano, Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol* **37**, 54-70 (2010).
2. Maurer B, Reich N, Juengel A, Kriegsmann J, Gay RE, Schett G, Michel BA, Gay S, Distler JH, Distler O. Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1382-1387 (2012).
3. Deguchi J, Shigematsu K, Ota S, Kimura H, Fukayama M, Miyata T. Surgical result of critical limb ischemia due to tibial arterial occlusion in patients with systemic scleroderma. *J Vasc Surg* **49**, 918-923 (2009).
4. Maricq, H.R., Harper, F.E., Khan, M.M., Tan, E.M. LeRoy, E.C. Microvascular abnormalities as possible predictors of disease subsets in Raynaud phenomenon and early connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* **1**, 195-205 (1983).
5. Schmidt, K.U. Mensing, H. Are nailfold capillary changes indicators of organ involvement in progressive systemic sclerosis? *Dermatologica* **176**, 18-21 (1988).
6. Cutolo, M., Sulli, A. Smith, V. Assessing microvascular changes in systemic

- sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 578-587 (2010).
7. Trojanowska, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 453-460 (2010).
 8. Ucuzian, A.A., Gassman, A.A., East, A.T. Greisler, H.P. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* **31**, 158-175 (2010).
 9. Masuda, H. Asahara, T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* **58**, 390-398 (2003).
 10. Ribatti D, Cantatore FP, Vacca A, D'Amore M, Ria R, Roncali L, Pipitone V. Systemic sclerosis stimulates angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clin Rheumatol* **17**, 115-120 (1998).
 11. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3908-3913 (2002).
 12. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a

convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis.

Arthritis Res Ther **7**, R1113-1123 (2005).

13. Rajkumar, V.S., Sundberg, C., Abraham, D.J., Rubin, K. Black, C.M. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **42**, 930-941 (1999).
14. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* **176**, 1983-1998 (2010).
15. Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y. Ikeda, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* **364**, 603-610 (2004).
16. Fleming JN, Nash RA, McLeod DO, Fiorentino DF, Shulman HM, Connolly MK, Molitor JA, Henstorf G, Lafyatis R, Pritchard DK, Adams LD, Furst DE, Schwartz SM. Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype? *PLoS One* **3**, e1452 (2008).
17. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, Gay RE, Michel BA, Brühlmann P, Müller-Ladner U, Gay S, Matucci-Cerinic M.

Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* **4**, R11 (2002).

18. Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* **21**, 1939-1947 (2002).
19. Mackiewicz Z, Sukura A, Povilenaite D, Ceponis A, Virtanen I, Hukkanen M, Kontinen YT. Increased but imbalanced expression of VEGF and its receptors has no positive effect on angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Exp Rheumatol* **20**, 641-646 (2002).
20. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, Michel BA, Gay RE, Müller-Ladner U, Matucci-Cerinic M, Plate KH, Gassmann M, Gay S. 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).
21. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C.

- Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **153**, 543-553 (2001).
22. Kumar AH, Martin K, Turner EC, Buneker CK, Dorgham K, Deterre P, Caplice NM. Role of CX3CR1 receptor in monocyte/macrophage driven neovascularization. *PLoS One* **8**, e57230 (2013).
 23. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* **95**, 272-281 (2006).
 24. Rajantie I, Ilmonen M, Alminait A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* **104**, 2084-2086 (2004).
 25. Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* **12**, R205 (2010).
 26. Anghelina, M., Krishnan, P., Moldovan, L. Moldovan, N.I.

- Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol* **168**, 529-541 (2006).
27. Moldovan, N.I., Goldschmidt-Clermont, P.J., Parker-Thornburg, J., Shapiro, S.D. Kolattukudy, P.E. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res* **87**, 378-384 (2000).
 28. Anghelina, M., Krishnan, P., Moldovan, L. Moldovan, N.I. Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev* **13**, 665-676 (2004).
 29. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, Vunjak-Novakovic G. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **35**, 4477-4488 (2014).
 30. Altorok, N., Tsou, P.S., Coit, P., Khanna, D. Sawalha, A.H. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation

- aberrancies. *Ann Rheum Dis* (2014).
31. Wang, Y., Fan, P.S. Kahaleh, B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLII gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, 2271-2279 (2006).
 32. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M. Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol* **163**, 571-581 (2003).
 33. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Akamata K, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Tsuruta D, Trojanowska M, Nagai R, Sato S. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* **5**, 5797 (2014).
 34. Asano, Y., Czuwara, J. Trojanowska, M. Transforming growth factor-beta regulates DNA binding activity of transcription factor Fli1 by p300/CREB-binding protein-associated factor-dependent acetylation. *J Biol*

- Chem* **282**, 34672-34683 (2007).
35. Asano, Y. Trojanowska, M. Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C δ promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor β . *Mol Cell Biol* **29**, 1882-1894 (2009).
36. Asano Y, Markiewicz M, Kubo M, Szalai G, Watson DK, Trojanowska M. Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* **29**, 425-434 (2009).
37. Czuwara-Ladykowska, J., Shirasaki, F., Jackers, P., Watson, D.K. Trojanowska, M. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**, 20839-20848 (2001).
38. Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, Watson DK. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**, 5643-5652 (2000).
39. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. Förster, I. Conditional

- gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265-277 (1999).
40. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* **121**, 2736-2749 (2011).
 41. Shi C, Sakuma M, Mooroka T, Liscoe A, Gao H, Croce KJ, Sharma A, Kaplan D, Greaves DR, Wang Y, Simon DI. Down-regulation of the forkhead transcription factor Foxp1 is required for monocyte differentiation and macrophage function. *Blood* **112**, 4699-4711 (2008).
 42. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* **116**, 5060-5070 (2010).
 43. Tigges, U., Hyer, E.G., Scharf, J. Stallcup, W.B. FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone

- marrow-derived pericytes and macrophages. *Development* **135**, 523-532 (2008).
44. Zordan P, Rigamonti E, Freudenberg K, Conti V, Azzoni E, Rovere-Querini P, Brunelli S. Macrophages commit postnatal endothelium-derived progenitors to angiogenesis and restrict endothelial to mesenchymal transition during muscle regeneration. *Cell Death Dis* **5**, e1031 (2014).
45. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* **12**, R128 (2010).
46. Hamilton, R.F., Parsley, E. Holian, A. Alveolar macrophages from systemic sclerosis patients: evidence for IL-4-mediated phenotype changes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1202-1209 (2004).
47. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, Rabie T, Kaden S, Gröne HJ, Hämmerling GJ, Arnold B, Ganss R. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* **453**, 410-414 (2008).

48. Manzur, M. Ganss, R. Regulator of G protein signaling 5: a new player in vascular remodeling. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 26-30 (2009).
49. Varga, J. Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* **117**, 557-567 (2007).

表 略語一覧

Fli1	Friend leukemia integration 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
ETS	E26 transformation-specific
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
PE	phycoerythrin
α -SMA	α -smooth muscle actin
vWF	von Willebrand factor
FSP1	fibroblast specific protein 1
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
MMP9	matrix metaroproteinase 9
PBS	phosphate buffered saline