

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 谷口隆志

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が、発症のメカニズムについて詳細は明らかにされていない。全身性強皮症の血管障害は、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、これら血管障害の病態として、新生血管形成の異常と血管の安定化の障害による血管の恒常性の破綻とが挙げられている。生後の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の管腔を形成する *angiogenesis* と、骨髄由来前駆細胞が局所に遊走し血管内皮細胞や血管壁細胞に分化することで新生血管の管腔を形成する *postnatal vasculogenesis* に分類され、*angiogenesis* と *postnatal vasculogenesis* が協調して生後の新生血管形成は行われる。しかし、全身性強皮症では *angiogenesis* が異常活性化している一方で、骨髄由来前駆細胞からの血管内皮細胞や血管壁細胞への分化が抑制される結果 *postnatal vasculogenesis* の過程に障害があり、そのために新生血管形成に異常をきたしていることが知られている。一方で、全身性強皮症の微小血管では血管の安定化を担う細胞である血管壁細胞の機能に異常があり、血管が不安定化していることが知られている。血管壁細胞の機能異常は様々な原因で起こるが、いずれの原因によっても全身性強皮症様の血管障害を引き起こす。

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。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。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おり、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。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一方で、免疫細胞における Fli1 の発現低下の意義については未だ明らかではない。また、血管内皮細胞における Fli1 の発現低下は全身性強皮症の血管障害の中でも *angiogenesis* の異常活性化を通じて全身性強皮症類似の血管障害を再現するが、骨髄細胞が関与する *postnatal vasculogenesis* の異常は再現できていない。

骨髄由来細胞の一つである単球系細胞/マクロファージは新生血管形成の重要な因子の産生や *postnatal vasculogenesis* の過程における血管壁細胞への分化を介して血管の恒

常性の維持に重要な役割を担っており、単球系細胞/マクロファージの異常は血管の恒常性の破綻を引き起こすことが知られている。

そこで、今回我々は骨髄細胞における Fli1 の発現低下が全身性強皮症の病態に及ぼす影響について Cre-LoxP システムを用いて LysM-Cre マウスと Fli1^{lox/lox} マウスを交配させることで骨髄細胞特異的 Fli1 欠損マウス (LysM^{cre/-} Fli1^{lox/lox} マウス ; Fli1 MyeKO マウス)を用いて血管障害に着目して検討することとした。

まずは、Fli1 の発現低下が骨髄由来細胞のひとつであるマクロファージのフェノタイプに及ぼす影響について Fli1 MyeKO マウスの腹腔マクロファージを用いて検討した。マクロファージでは Fli1 の発現低下により vascular endothelial growth factor A (VEGFA)や matrix metalloproteinase 9 (MMP9)の発現亢進、platelet-derived growth factor B (PDGFB)の発現低下をきたし、血管を不安定化するフェノタイプへの分化が促進することが示唆される。また、Fli1 の発現低下はマクロファージの貪食能・運動能・遊走能を亢進させ、新生血管形成促進性に働くことが考えられた。全身性強皮症皮膚血管では血管の安定化に障害があるものの angiogenesis 自体は亢進しており、マクロファージにおける Fli1 の発現低下は総じてその状態へ寄与するフェノタイプへと誘導することが明らかになった。

次に、骨髄細胞における Fli1 の発現低下が実際の新生血管形成に及ぼす影響を Fli1 MyeKO マウス皮下に包埋したマトリゲルプラグへの新生血管形成を観察し評価した。包埋 7 日後のマトリゲルプラグではコントロールでは血管壁細胞に厚く被包され安定した血管を呈していた一方で、Fli1 MyeKO マウスでは新生血管はいびつに拡張し、血管壁の薄い未熟な血管の構造を呈していた。さらにそれらの未熟な血管では血管壁細胞の α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現は低下ないしは不均一な発現を呈していた。血管壁細胞は血管を覆い血管構造を安定化させるが、 α -SMA の発現低下は血管壁細胞の機能不全・血管構造の不安定化を意味する。このことから、骨髄細胞における Fli1 の発現低下は新生血管の安定化に障害をもたらすことがわかった。骨髄由来細胞の一つである単球系細胞は postnatal vasculogenesis の過程で細胞内に管腔を形成し、血管壁細胞へと分化して血管壁の足場を作ることが知られている。包埋 5 日後のマトリゲルプラグはこれら単球系細胞が細胞内管腔を形成し始める時期であるが、包埋 5 日後のマトリゲルプラグにおいて、Fli1 の発現低下によって血管壁細胞への分化を示した単球系細胞では細胞内管腔を作り出す段階で α -SMA の発現が低下していることがわかった。以上から骨髄細胞における Fli1 の発現低下は単球系細胞から分化した血管壁細胞に機能異常をもたらすことが一因として新生血管形成における血管の安定化に異常をもたらすことが示唆された。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。

新生血管形成は血管の損傷に対するリモデリング・血管恒常性の維持に寄与していることから、次にこれら新生血管形成の異常が血管の恒常性にもたらす影響を検討した。そのために、時系列に沿って皮膚微小血管の血管壁細胞の α -SMA 発現を検討した。Fli1 MyeKO マウスの皮膚血管では1ヶ月齢では毛細血管のみで壁細胞の α -SMA の発現が低下し、細動脈・細静脈では壁細胞の α -SMA の発現はコントロールと同程度であった。しかし、2、3ヶ月齢 Fli1 MyeKO マウスでは細動脈、細静脈、毛細血管とすべての皮膚微小血管レベルで血管壁細胞の α -SMA の発現が低下していた。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異常が引き起こされ、血管のリモデリングに障害が見られることで時間経過とともに血管の安定化に障害が見られていることがわかる。

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 という状態であり、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。そこで次に、骨髄細胞における Fli1 の発現低下による皮膚血管の安定化の障害が血管構造に及ぼす影響を検討した。まず血管構造の脆弱化の一つとしての血管透過性を評価するために Evans blue を尾静注し、皮膚血管からの漏出を評価したところ、Fli1 MyeKO マウスでは1ヶ月齢では微少な漏出が見られ、その後2ヶ月齢、3ヶ月齢と血管の透過性が亢進することがわかった。また、fluorescein isothiocyanate (FITC) 抱合デキストラン尾静注にて皮膚血管を可視化したところ、2ヶ月齢以降の Fli1 MyeKO マウスで血管の消失、細動脈の狭窄が見られていた。実際、組織学的に血管構造を観察すると、FITC 抱合デキストランによってはっきりした血管障害を呈していた3ヶ月齢 Fli1 MyeKO マウスでは皮膚細動脈において血管外径の拡大、血管内皮細胞の増殖、血管内腔面積の狭小化が見られた。また、Fli1 MyeKO マウスでは2ヶ月齢以降で組織学的にも皮膚毛細血管の減少が見られた。全身性強皮症における血管障害は、血管の不安定化・脆弱性が病初期からみられ、進行するにしたがって破壊性血管障害・増殖性血管障害などの構造的障害が明確になることから、初期に血管の脆弱性がみられ、時間経過とともに増殖性血管障害・破壊性血管障害を呈した Fli1 MyeKO における血管障害は全身性強皮症における血管障害に類似した所見と考えられる。

全身性強皮症は先行する血管障害に伴って皮膚線維化をきたすことが特徴的であり、Fli1 MyeKO マウスにおいて全身性強皮症類似の経過をとる血管障害が見られたことから、皮膚線維化について検討した。その結果、Fli1 MyeKO マウスは2ヶ月齢以降に皮膚真皮厚の増加・皮膚コラーゲン量の増加、皮膚線維化を呈した。Fli1 MyeKO マウスでは血管障害のみならず、それに引き続く皮膚線維化も時系列に沿って再現していることが明らかになった。

血管障害と線維化についてはその関連は報告されているが、その機序の一つとして血管内皮細胞が間葉系細胞、線維芽細胞に分化することで線維化を引き起こす内皮間葉転

換が重要であるとされている。そこで Fli1 MyeKO マウスで内皮間葉転換が見られるかを皮膚で検討したところ、コントロールでは内皮間葉転換は観察されなかったが、Fli1 MyeKO マウスでは間葉系細胞へ分化した血管内皮細胞が皮膚真皮の血管周囲に観察され、Fli1 MyeKO マウスにおける線維化の一つの原因として血管障害に起因する内皮間葉転換が関与している可能性が示唆された。

結論として、Fli1 MyeKO マウスは全身性強皮症患者と同様に血管障害と皮膚線維化の病態を時系列に沿って示した。その病態としては骨髄細胞における Fli1 の発現低下により骨髄細胞から分化した血管壁細胞の障害による新生血管の安定化の異常が一因となり、新生血管形成の異常により血管の恒常性が破綻した結果、全身性強皮症に類似した血管障害が引き起こされることが関与していると考えられる。全身性強皮症においては骨髄細胞に異常がみられることは報告されているが、その病態に及ぼす影響は明らかではなかった。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の血管障害、線維化の病態が再現されたことで、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関与していることが明らかになった。