

## 審査の結果の要旨

氏名 谷口 隆志

本研究は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役割、特に血管障害・線維化の病態に関する役割を明らかにするために、骨髄細胞特異的 Fli1 欠損マウス(Fli1 MyeKO マウス)の表現型を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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ついての検討を行った。Fli1MyeKO マウスの腹腔マクロファージはコントロールマウスに比較して、血管を不安定化し新生血管形成を促進する因子である vascular endothelial growth factor A (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 matrix metalloproteinase 9 (MMP9)の mRNA 発現亢進、血管周皮細胞を遊走・安定化させ血管を安定化させる platelet-derived growth factor B (PDGFB)の mRNA 発現低下を呈した。マクロファージにおける Fli1 の発現低下は、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を、血管を不安定化するフェノタイプに分化させることが示唆される。
2. Fli1 MyeKO マウスより採取した腹腔マクロファージは野生型マウスに比較して貪食能・運動能・遊走能が亢進していた。マクロファージにおける貪食能・運動能・遊走能の亢進は新生血管形成促進性に働くことから、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の機能においても貪食能・運動能・遊走能を亢進させ新生血管形成促進性に働くフェノタイプへ誘導することが示された。
3. マトリゲルプラグアッセイを用いた新生血管形成の検討を行った。血管完成期において、コントロールマウスでは新生血管が血管壁細胞に厚く被包され安定した血管の構造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分化度のマーカーである血管壁細胞の $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現が低下、不均一化していることが示された。血管壁細胞は血管を覆い血管構造を安定化させるが、 $\alpha$ -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し、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示された。
4. マトリゲルプラグアッセイを用いた新生血管形成初期の検討では、マトリゲルプラグ内に細胞内管腔を作っている細胞が散見された。それらの細胞は $\alpha$ -SMA と F4/80 を発現しており、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示したものであることがわかった。さらに、Fli1 MyeKO マウスではこれら血管壁細胞への分化を示した単球系細胞における $\alpha$ -SMA の発現が低下していた。つまり、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。

5. 新生血管形成の異常は血管損傷に対する血管リモデリングの障害を引き起こし、その結果として血管の不安定化をひきおこすことから、マウス皮膚微小血管の安定性における骨髄細胞の Fli1 の発現低下の影響を検討した。Fli1 MyeKO マウスの背部皮膚では1ヶ月齢では毛細血管でのみ血管壁細胞の $\alpha$ -SMA の発現が低下していた。一方、2、3ヶ月齢 Fli1 MyeKO マウス背部皮膚では細動脈、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 $\alpha$ -SMA の発現が低下していた。骨髄細胞における Fli1 の発現低下は時間経過とともに皮膚微小血管の安定化に障害をもたらすことが示された。

6. 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知られているが Fli1 MyeKO マウスで pericyte loss による血管障害が見られるかどうか検討した。血管構造の脆弱化の一つとしての血管透過性の評価のために 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ヶ月齢と時間経過に伴い明瞭な漏出を呈した。骨髄細胞の Fli1 の発現低下によって、時間経過とともに血管の透過性が亢進することが示された。

7. 皮膚血管構造を fluorescein isothiocyanate (FITC) 抱合デキストランにて可視化したところ、1ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは血管の消失、血管狭窄など明らかな構造異常は見られなかった一方で、2ヶ月齢以降の Fli1 MyeKO マウスでは血管の消失が散見され、細動脈の狭窄が見られていた。

8. Fli1 MyeKO マウスの皮膚組織を用いて von Willebrand factor (vWF) 染色にて血管内皮細胞を染色し、皮膚の毛細血管数を組織学的に検討した。その結果、Fli1 MyeKO マウスでは1ヶ月齢では毛細血管の減少は見られなかったが2ヶ月齢以降で皮膚毛細血管が減少するがわかった。

9. pericyte loss による血管障害の組織学的な検討のため3ヶ月齢 Fli1 MyeKO マウスの背部皮膚微小血管の病理学的検討を行った。その結果、細動脈の血管外径の拡大、血管内皮細胞の増殖、血管内腔面積の狭小化が見られた。以上6、7、8、9の結果より Fli1 MyeKO マウスでは pericyte loss による血管障害が見られることがわかった。

10. Fli1 MyeKO マウスで皮膚線維化が見られるかどうかの検討を行った。1ヶ月齢の Fli1 MyeKO マウスでは皮膚線維化は見られなかったが、2ヶ月齢以降の Fli1 MyeKO マウス皮膚では背部皮膚真皮厚の増加・皮膚コラーゲン量の増加がみられ、皮膚線維化を起していることがわかった。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 マウスは全身性強皮症に類似した経過の血管障害・皮膚線維化を呈することが示された。

11. 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。間葉系マーカーである fibroblast specific protein 1(FSP1)と血管内皮細胞のマーカーである VE-cadherin の二つのマーカーを発現する細胞は内皮間葉転換を起こした細胞の存在を示唆する。このことから、3ヶ月齢マウスの背部皮膚を用いて内皮間葉転換の検討を行った。その結果、Fli1 MyeKO マウスでは間葉系マーカーである FSP1 と VE-cadherin をともに発現する細胞が真皮の血管周囲にみられ、Fli1 MyeKO マウス皮膚では内皮間葉転換が起こっていることが示された。一方で、コントロールでは二重陽性細胞は観察されなかった。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。

以上、本論文は骨髄細胞特異的 Fli1 欠損マウスが全身性強皮症に類似した血管障害・皮膚線維化を呈することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、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役割の解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。