

汎発性強皮症における皮膚線維化および微小血管障害の分子メカニズムの解明

－ Fli 1 遺伝子恒常的発現低下の意義と新しい治療戦略の検討－

東京大学大学院医学系研究科・医学部 皮膚科学 講師 浅野 善英



本研究の目的

汎発性強皮症の原因はいまだ不明であるが、転写因子Fli 1 の恒常的な発現低下が本症における線維化と血管障害の発症に関与している可能性が示唆されている。本研究はFli 1 遺伝子の恒常的発現低下が正常皮膚線維芽細胞および正常皮膚血管内皮細胞の機能に及ぼす影響を明らかにし、Fli 1 遺伝子をtargetとした汎発性強皮症の新規治療の可能性について検討することを目的としている。

【研究成果】

I. エンドセリン (ET) が皮膚線維芽細胞に対して強力な線維化作用を示す機序の解明

①背景

ETは主に血管内皮細胞から産生されるペプチドで、非常に強力な血管収縮作用と血管平滑筋細胞の肥大・増殖作用を持つ。一方、ETは線維芽細胞からも産生され、線維芽細胞に作用すると強力な線維化作用を示す。ET受容体拮抗薬であるボセンタンは、強皮症患者において指尖潰瘍の新生を有意に抑制することが2つの良質な無作為化二重盲検試験により明らかにされている。また、ET受容体拮抗薬は、強皮症皮膚線維芽細胞に作用すると強力な抗線維化作用を示す。強皮症患者の血管病変の形成には、血管壁の線維化が重要な役割を果たしており、ET受容体拮抗薬は血管壁の線維化を改善し、指尖潰瘍の新生を抑制している可能性が示されている。しかしながら、ETが強力な線維化作用を示す機序はいまだ明らかにされていない。

②ETは刺激後早期にI型コラーゲン遺伝子の発現を亢進させる

正常皮膚線維芽細胞をETで刺激し、ヒト・2 (I) コラーゲン (COL1A2) 遺伝子のmRNAの発現量の変化を経時的に検討したところ、ETは刺激後30分からCOL1A2遺伝子のmRNAの発現量を亢進させた。ETは転写活性化因子であるSmad 3 のリン酸化には影響を及ぼさないことが示されている。したがって、ETは刺激後早期にCOL1A2遺伝子の転写抑制因子の活性を抑制している可能性が示唆された。

③ETは刺激後早期にFli 1 のリン酸化を亢進させる

COL1A2遺伝子プロモーターのsequential deletionを持つCAT reporter constructを用いてpromoter assayを行ったところ、ETへのresponsive elementはCOL1A2遺伝子プロモーターの-353から-264の領域に存在することが明らかとなった。この領域はFli 1 結合部位 (-285~-282) を含むため、ETはFli 1 の転写抑制活性を抑制している可能性が示唆された。我々は過去に、Fli 1 の転写抑制活性はthreonine 312のリン酸化により抑制されることを明らかにしている。そこで、ET刺激がFli 1 のリン酸化に及ぼす影響を検討したところ、ETは刺激後15分からFli 1 をthreonine 312で強力にリン酸化した。以上の結果から、ETはFli 1 の転写抑制活性を抑制することによって強力な線維化作用を示していることが明らかとなった。

④今後の研究予定

強皮症モデルマウス（ブレオマイシンによる皮膚硬化モデル・tight skinマウス）を用いて、エンドセリン受容体拮抗薬がin vivoで抗線維化作用を示す機序について検討を行う。

⑤研究結果の意義

我々は強皮症の新しい治療薬として期待されているイマチニブが、強皮症皮膚線維芽細胞におけるFli 1の発現異常を是正することにより抗線維化作用を示すことを最近報告した。本研究は、強皮症の新しい治療薬として期待されているET受容体拮抗薬の標的がFli 1である可能性を明らかにした。以上より、Fli 1の発現異常を是正することが強皮症の新規治療を考える上で重要である可能性が示された。

II. 転写因子Fli 1の恒常的発現低下が血管内皮細胞の動態に及ぼす影響

①背景

我々は過去に、血管内皮細胞特異的Fli 1欠失（Fli 1 ECKO）マウスを作成し、同マウスでは強皮症に伴う血管障害に特徴的な病理組織学的変化（毛細血管拡張・細動脈の狭窄・血管透過性亢進）が再現できることを明らかにした。本研究では、同マウスが血管障害を生じる機序を明らかにすることを目的に検討を行った。

②Fli 1遺伝子の発現低下が血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

ヒト皮膚血管内皮細胞（HDMEC）をFli 1 siRNAあるいはscramble siRNAで処理し、血管新生に関与する遺伝子の発現量について検討した。血管内皮細胞の相互作用を制御する遺伝子（VE-Cadherin, PECAM-1）および血管内皮細胞と血管周皮細胞の相互作用を制御する遺伝子（PDGF-B, S1P 1, VE-Cadherin）の発現はFli 1 siRNAで低下し、一方血管基底膜の分解を促進する酵素（MMP-9）の発現はFli 1 siRNAで亢進した。以上の結果から、Fli 1遺伝子の発現低下は血管新生を促進させる作用がある可能性が示唆された。

③Fli 1遺伝子の発現低下が血管内皮細胞の遊走、増殖、脈管形成に及ぼす影響

HDMECをFli 1 siRNAあるいはscramble RNAで処理し、migration assay, apoptosis assay, tube formation assayを行った。Fli 1 siRNAで処理したHDMECではscramble RNAで処理したHDMECと比較して、migration、cell survival、およびtube formation activityが亢進していた。以上の結果から、Fli 1遺伝子の発現低下は血管新生を亢進させることが示された。

④血管内皮細胞特異的Fli 1欠失マウスでは創傷治癒が遅延する

Fli 1 ECKOマウスと野生型マウスの背部皮膚に直径6 mmの創傷を作成し、その治癒過程を比較したところ、Fli 1 ECKOマウスでは創傷治癒が有意に遅延していた。更に、創傷作成後14日目において、FITC-conjugated dextranを尾静脈から注入して創傷瘢痕における新生血管の数を比較したところ、Fli 1 ECKOマウスでは瘢痕の中心部で新生血管の数が著明に減少していた。以上の結果から、Fli 1の恒常的な発現低下は血管新生を恒常的に活性化するため、最終的に新生血管の成熟が阻害され、創傷治癒が遅延している可能性が示された。

⑤本研究の意義

本研究により、血管内皮細胞におけるFli 1の恒常的な発現低下が強皮症における創傷治癒遅延に関与している可能性が示された。実際に、Fli 1を標的とした治療薬であるET受容体拮抗薬は、一部の強皮症患者において創傷治癒異常を改善することが臨床的に示されている。

以上より、Fli 1は強皮症の創傷治癒異常においても新しい治療の標的となる可能性が示された。