

新規強皮症モデルマウスを用いた皮膚線維化の病態における真皮樹状細胞の役割の解析

浅野善英

東京大学大学院医学系研究科医学部 皮膚科学

【研究の背景】

全身性強皮症は免疫異常・炎症、血管障害、線維化を主要 3 病態とする膠原病である。その病因はいまだ不明であるが、免疫抑制療法が一定の治療効果を示すことから、その病態解明の鍵は免疫異常の分子メカニズムの解明にあると考えられている。本症の病態における T 細胞、B 細胞、マクロファージの役割はこれまでに詳細に検討されてきたが、樹状細胞の役割に関してはいまだ不明な点が多い。

全身性強皮症の病態理解と治療開発は他のリウマチ疾患に比較して遅れているが、その理由の一つとして、本症の病態を忠実に再現するモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。そのような中、我々は 2014 年に本症の主要 3 病態(免疫異常・炎症、血管障害、線維化)を自然発症する世界初の遺伝子改変マウスの作成に成功した¹⁾。強皮症皮膚線維芽細胞においてエピジェネティック制御を介して発現が抑制されている 2 つの転写因子(Fli1 と KLF5)を見出し、その二重ヘテロ欠損マウスを作成することにより確立した動物モデルである。

一方、我々は新規強皮症モデルマウスを確立する過程で、① 線維芽細胞と血管内皮細胞における Fli1 の発現低下が強皮症に類似した皮膚硬化および血管障害を *in vivo* で誘導すること^{2,3)}、② Fli1 の発現低下がマクロファージの M2 分化および CD4 陽性 T 細胞の Th2/Th17 偏倚を促すこと⁴⁾、③ 強皮症の疾患修飾薬として注目されているボセンタンの作用機序が Fli1 の発現異常の是正であること⁵⁾を示し、Fli1 が強皮症の病態において極めて重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

現在、Fli1 の発現低下が強皮症の免疫異常に及ぼす影響に関して研究を進めているが、強皮症に特徴的な B 細胞の異常な活性化や中枢性免疫寛容の破綻による自己反応性 T 細胞の誘導においても Fli1 の発現低下が重要な役割を果たしていることを既に証明している(文献 6 および論文投稿中)。一方、免疫応答の司令塔として機能している樹状細胞については、強皮症の病態における異常の有無は現時点では不明である。そこで今回我々は、強皮症モデルマウスを用いて、樹状細胞が強皮症の病態に及ぼす影響について検討を行うこととした。

【目 的】

本研究の目的は、強皮症モデルマウスを用いて強皮症の病態における樹状細胞の役割を明らかにすることである。

【方 法】

1) マウス

野生型マウス(C57BL/6)を日本エスエルシー株式会社より購入した。*Fli1*^{-/-}マウスはサウスカロライナ州立医科大学の Denis Watson 教授から供与を受けた。すべてのマウスは実験開始時に 6-8 週齢で統一した。BLM 誘発強皮症モデルマウスは日本化薬株式会社のブレオ注射用を phosphate buffered saline (PBS) に bleomycin (BLM) 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部に 200 μ g を連日皮下投与することで作成した。実験の目的に応じて、1 週間もしくは 4 週間投与し、最終注射日翌日に背部皮膚を回収した。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

2) 各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

マウス皮膚より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK)を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR MasterMix

(東洋紡株式会社)を用いて cDNA を作成した。定量的 real-time PCR は THUNDERBIRD qPCR Mix(東洋紡株式会社)、Applied Biosystem StepOnePlus Real-Time PCR System(Applied biosystem, Foster City, CA, USA)を用いて行った。*Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Ctgf*, *Tgfb1*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Il17a*, *Ifng*, *Raldh1*, *Raldh2*, および *Raldh3* 遺伝子の mRNA の相対発現量を算出した。それぞれの検体は triplicate で測定し、平均値を解析に用いた。

3) フローサイトメリー

BLM もしくは PBS を 1 週間投与したマウスを作成し、最終投与日翌日に背部皮膚、腋窩リンパ節、および鼠径リンパ節を採取した。リンパ節からリンパ球を回収、FACS buffer (1%ウシ胎児血清含有 PBS)にて細胞浮遊液を作製した。背部皮膚は用手的に脂肪組織を剥離後、1 mg/ml の Dispase II(和光純薬工業株式会社)に 37℃で 1 時間反応させ、表皮と真皮を分離した。分離後の真皮を剪刃で細かく切り刻んだ後、Tyrode buffer に溶解して 2 mg/ml に濃度を調整した Collagenase type 2(Worthington, Lakewood, NJ, USA)と 90 分反応させた。反応液は 70 μ m メッシュでろ過後、FACS buffer にて細胞浮遊液を作成した。細胞表面マーカーを抗 CD11b 抗体(M1/70; Biolegend, San Diego, CA, USA)、抗 CD11c 抗体(N418; Biolegend)、および抗 CD103 抗体(2E7; Biolegend)にて染色を行った。細胞内マーカーの解析では、1 μ g/ml の brefeldin A(GolgiStop; BD Pharmingen)存在下で 10 ng/ml の phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, Sigma-Aldrich)と 1 μ g/ml の ionomycin(Sigma-Aldrich)にて 4 時間刺激後、細胞を FACS buffer により洗浄し、細胞表面を抗 CD4 抗体(RM4-5; Biolegend)、抗 CD25 抗体(PC61; Biolegend)にて染色した。サンプルを fixation/permeabilization buffer(BD Pharmingen)にて処理し、抗 IFN- γ 抗体(XMG1.2; BioLegend)、抗 IL-4 抗体(11B11; BioLegend)、抗 IL-17A 抗体(TC11.18H10; BioLegend)、および抗 Foxp3 抗体(FJK-16s; eBioscience; San Diego, CA, USA)にて染色を行った。解析は FACSVerse flow cytometer(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて行った。

4) 単一細胞における RALDH 活性の解析

前述と同様の方法でマウス背部皮膚を回収し、細胞浮遊液を作製した。RALDH 活性の解析には ALDEFLUOR staining kit(StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)を用いた。細胞濃度が 1×10^6 個/ml になるように ALDEFLUOR Assay buffer 1 ml で調整後、5 μ l の活性化済み ALDEFLUOR 試薬を加え、半量は即座に 5 μ l の RALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde(DEAB)入りチューブへ写し、37℃で 45 分間反応させた。抗 CD11b 抗体、抗 CD11c 抗体、および抗 CD103 抗体で細胞表面マーカーを染色後、FACSVerse flow cytometer を用いて解析した。

5) マウス骨髄からの樹状細胞の誘導

野生型マウスおよび *FliI*^{-/-}マウスの大腿骨と脛骨から骨髄細胞浮遊液(5×10^6 個)を準備し、10 ng/ml の GM-CSF(Peprotech)存在下で培養した。培養液の 2/3 を 3 日目に新しい培養液に交換し、6 日目に *Escherichia coli*-LPS(0.1 mg/ml; Sigma)で刺激した。7 日目にほとんどの非付着細胞が典型的な樹状細胞の形態に変化していることを確認し、これらの細胞を実験に用いた。

6) 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

【結 果】

1) BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚における RALDH1 の発現量

まずはじめに、野生型マウスと *FliI*^{-/-}マウスに BLM を 1 週間投与し、炎症期の皮膚における *Raldh1*, *Raldh2*, *Raldh3*, *Il2*, *Tgfb1* の発現量について定量的 real-time PCR 法で測定した。*FliI*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比較して、*Raldh1* mRNA の発現量が有意に低下していたが、*Raldh2*, *Raldh3*, *Il2*, *Tgfb1* の mRNA の発現量については両群では差がなかった。

2) 真皮および皮膚所属リンパ節の樹状細胞における RALDH 活性陽性細胞数および RALDH 活性の強度の評価

野生型マウスと *FliI*^{-/-}マウスに BLM を 1 週間投与し、炎症期の皮膚の CD11c 陽性樹状細胞について評価したところ、*FliI*^{-/-}マウス由来細胞において RALDH 活性を有する細胞数が有意に低下しており、また RALDH の mean fluorescence intensity も有意に低下していた。一方、同じ条件下で皮膚リンパ節の CD11c 陽性樹状細胞について評価したところ、*FliI*^{-/-}マウスにおいて RALDH 活性を有する細胞数が有意に低下していたが、RALDH の mean fluorescence intensity については野生型マウスと *FliI*^{-/-}マウスで差はみられなかった。

3) 真皮および皮膚所属リンパ節における Th1/Th2 バランスおよび Th17/Treg バランス

野生型マウスと *Fli1*^{-/-}マウスに BLM を 1 週間投与し、炎症期の真皮および皮膚所属リンパ節における Th1/Th2 バランスおよび Th17/Treg バランスを Flow cytometry で解析した。*Fli1*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、真皮および皮膚所属リンパ節の両方において、Treg の数が有意に低下していた。

4) 骨髄由来樹状細胞の遊走マーカーの発現量に関する検討

野生型マウスと *Fli1*^{-/-}マウスの骨髄細胞から樹状細胞を分化させ、遊走マーカーの発現量について検討を行った。*Fli1*^{-/-}マウスの骨髄由来樹状細胞では野生型マウスの同細胞と比較して、CXCR4 と CCR7 の発現量が有意に亢進していた。一方、CX3CR1 と CCR2 の発現量については変化はなかった。

【考 察】

本研究の目的は皮膚線維化の機序における樹状細胞の役割を明らかにすることであるが、そのため BLM 刺激でより強い皮膚の線維化を誘導する *Fli1*^{-/-}マウスを使用した。BLM を 1 週間投与した炎症期の皮膚において、*Fli1*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して RALDH 活性を有する CD11c 陽性樹状細胞の数が有意に低下しており、個々の樹状細胞における RALDH 活性の強度も低下していることが明らかとなった。また、我々の先行研究のデータ(論文投稿中)に基づき RALDH 活性を有する樹状細胞の分画を調べたところ、今回の検討においても CD11b⁺CD103⁺樹状細胞が RALDH 活性を有することが明らかとなった。

樹状細胞の RALDH 活性はレチノイン酸産生に不可欠であり、レチノイン酸は TGF- β 存在下でナイーブ T 細胞から Treg の誘導を促す。したがって、樹状細胞の RALDH 活性の低下は Treg の誘導を抑制している可能性が示唆される。そこで、BLM を 1 週間投与した炎症期の真皮および皮膚所属リンパ節において、*Fli1*^{-/-}マウスと野生型マウスで Treg の CD4 陽性 T 細胞に占める割合を比較すると、*Fli1*^{-/-}マウスにおいて有意な減少がみられた。一方、この実験系では Th1, Th2, Th17 細胞の CD4 陽性 T 細胞に占める割合については変化は認められなかった。以上より、*Fli1*^{-/-}マウスでは真皮樹状細胞における RALDH 活性が低下し、その結果末梢リンパ組織における Treg の誘導が抑制されていると考えられた。なお、先行研究において、BLM を 1 週間投与した *Fli1*^{-/-}マウスの皮膚では Th2/Th17 サイトカインの mRNA の発現量の亢進が認められることが示されているが⁴⁾、今回の検討では真皮および皮膚所属リンパ節における Th1, Th2, Th17 細胞の割合には変化が認められなかった。このことは、Treg の作用に比較して PMA + ionomycin の刺激が強く、Th1, Th2, Th17 細胞に対する Treg の抑制作用を見出せなかったためと推察した。

BLM で処理した *Fli1*^{-/-}マウスで Treg の分化が抑制されている理由として、樹状細胞による RALDH 活性の低下のほか、樹状細胞の遊走能が障害されている可能性が想定できる。この点について検討するため、骨髄細胞を樹状細胞に分化させ、細胞遊走に関連するケモカインレセプターの発現量について検討した。*Fli1*^{-/-}骨髄由来樹状細胞では野生型骨髄由来樹状細胞と比較して、CXCR4 と CCR7 の発現が有意に亢進していた。この結果は、*Fli1*^{-/-}骨髄由来樹状細胞は野生型同細胞と比較して、遊走能が亢進している可能性を示唆する。したがって、*Fli1*^{-/-}マウスでは樹状細胞の遊走能は亢進しているが、Treg を誘導する能力が低下しているものと推測できる。つまり、樹状細胞の病理的な作用については現時点では不明であるが、遊走能が亢進していることから、自己免疫の誘導・活性化に関与している可能性がある。その過程において Treg の分化誘導能力が低下しており、病理的な免疫応答が活性化されている可能性が考えられる。

今回の検討により、Fli1 の発現低下が樹状細胞の機能を変化させ、皮膚硬化の誘導に寄与している可能性が示唆された。今後、ヒト検体を用いて全身性強皮症における樹状細胞の役割についてさらに検討する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

先行研究により、Fli1 の発現低下は線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージ、表皮細胞において強皮症に類似した形質を誘導できることが示されているが^{2-4, 6)}、今回の検討により樹状細胞では Fli1 の発現低下により Treg の分化が抑制され、線維化がより強く誘導される機序に関与している可能性が示された。このことから、Fli1 の発現低下は樹状細胞においても強皮症の形質を誘導している可能性が示唆され、Fli1 の発現異常による強皮症病態一元化仮説が正しい可能性を強く示唆する結果となった。血管内皮細胞の研究では、強皮症の血管障害に対する疾患修飾作用を有するボセンタンの作用機序

の一つが Fli1 の発現を回復させることであることが明らかとなっており⁵⁾、樹状細胞においても Fli1 の発現を回復させることが全身性強皮症の免疫を標的とした治療戦略となる可能性が示唆された。

本研究の成果は全身性強皮症の病態理解を深める上で非常に有益性が高く、また本研究で得られた知見は他の皮膚線維性疾患にも応用が可能であり、皮膚線維化の病態解明に広く貢献できると思われる。

【参考・引用文献】

- 1 Noda S, Asano Y, Nishimura S *et al.* Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 2014; **5**: 5797.
- 2 Asano Y, Markiewicz M, Kubo M *et al.* Transcription factor Fli1 regulates collagen fibrillogenesis in mouse skin. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 425-34.
- 3 Asano Y, Stawski L, Hant F *et al.* Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol* 2010; **176**: 1983-98.
- 4 Taniguchi T, Asano Y, Akamata K *et al.* Fibrosis, vascular activation, and immune abnormalities resembling systemic sclerosis in bleomycin-treated fli-1-haploinsufficient mice. *Arthritis Rheumatol* 2015; **67**: 517-26.
- 5 Akamata K, Asano Y, Yamashita T *et al.* Endothelin receptor blockade ameliorates vascular fragility in endothelial cell-specific fli-1-knockout mice by increasing fli-1 DNA binding ability. *Arthritis Rheumatol* 2015; **67**: 1335-44.
- 6 Takahashi T, Asano Y, Sugawara K *et al.* Epithelial Fli1 deficiency drives systemic autoimmunity and fibrosis: Possible roles in scleroderma. *J Exp Med* 2017; **214**: 1129-51.