

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791061

研究課題名（和文）ガドリニウムによる線維化・石灰化機序の解明

研究課題名（英文）A possible role of gadolinium on fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis

研究代表者

岡田 悦子 (OKADA ETSUKO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90334094

研究成果の概要（和文）：ガドリニウムは骨分化誘導培地において、MC3T3-E1 細胞，ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞，ヒト真皮由来線維芽細胞の石灰化を誘導した。ガドリニウムはヒト真皮由来線維芽細胞の1型コラーゲン mRNA の増加はさせず，細胞増殖を促進した。この結果により，腎性全身性線維症における異所性石灰化の機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Gadolinium induced calcium deposition in MC3T3-E1 cells, human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (HAMSCs) and human dermal fibroblasts (HDFs) in osteogenic differentiation media. Gadolinium did not increase the mRNA expression of type I collagen in HDFs, but did promote cell proliferation.

The result will help us to understand the mechanism of abnormal calcification in nephrogenic systemic fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ガドリニウム，腎性全身性線維症，石灰化，線維化

1. 研究開始当初の背景

腎性全身性線維症 (nephrogenic systemic fibrosis : NSF) は 2000 年に提唱された疾患概念で，皮膚，筋肉，横隔膜，心臓，肝臓，肺など，全身諸臓器の繊維化を特徴とする疾患である。高度の腎機能障害患者に MRI 造影剤であるガドリニウム (Gd) を使用することにより発症することが判っている。また，NSF は線維化を起こす以外に，石灰化を合併する例も報告されている。

2. 研究の目的

近年，血管石灰化の研究に代表されるように，幹細胞や血管平滑筋の能動的な骨芽細胞への形質転換（分化）が石灰化形成の病態の中心であることが明らかになってきた。また，NSF における線維化は，病変部に存在する紡錘形細胞が CD34 陽性のコラーゲン産生細胞であることから，組織に沈着した Gd が末梢血中を循環する fibrocyte を病変部に誘導し線維化を起こすと推測する報告がある。これらの知見は，石灰化，線維化のいずれも，分

化能を持つ細胞に何らかの因子が働き、能動的に形質転換することが病態の中心にあることを示しており、NSFではGdが石灰化、線維化の方向に細胞を誘導している可能性が示唆される。

この仮説を証明するために、骨芽細胞に分化しうる細胞がGdにより石灰化を生じるかを検討した。

3. 研究の方法

(1). 細胞培養

MC3T3-E1 (前骨芽細胞) は理研より購入した。24 well plateに細胞を播種し、増殖培地中で24時間培養後、GdCl₃を0.01~100 μMの濃度で添加した通常の増殖培地 (NM) ないし骨分化誘導培地 (OM) で培養した。NMの組成はaMEM+10%FBSであり、OMの組成はNMに10mM b-glycerophosphate と 50 μg/ml ascorbate-2-phosphate を添加したものである。培地交換は週2回行い、1~2週間培養した。

ヒト皮下組織由来間葉系幹細胞 (HAMSC) はZen-Bioより購入した。96 well plateに細胞を播種し、増殖培地中で24時間培養後、GdCl₃を0.01~100 μMの濃度で添加したNMないしOMで培養した。NMにはMesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza), OMにはhMSC Differentiation BulletKit-Osteogenic (Lonza) を使用した。培地交換は週2回行い、2週間培養した。

ヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) は、当科にて患者の同意を得た上で得られた正常人皮膚を explant culture 法により初代培養したものを使用した。96 well plateに細胞を播種し、増殖培地中で24時間培養後、GdCl₃を0.01~100 μMの濃度で添加したNMないしOMで培養した。NMの組成はDMEM+10%FBS+2mM glutamine であり、OMの組成はNMに10mM b-glycerophosphate と 50 μg/ml ascorbate-2-phosphate を添加したものである。培地交換は週2回行い、3週間培養した。

(2). Alizalin Red 染色 (石灰化染色)

上記の方法で各細胞を1~3週間培養した。培養液を除去後、洗浄、固定し、40mM Alizarin Red S で染色した。色素の定量は10% cetylpyridium chloride を加え、吸光度 (562nm) を測定した。

(3). Oil Red 染色 (脂肪染色)

HAMSC およびヒト皮下脂肪組織由来脂肪前駆細胞を96well plateに播種し、脂肪細胞増殖培地でコンフルエントまで培養し、GdCl₃を0.01~100 μMの濃度で添加した脂肪誘導培地で1~2週間培養した後、Oil Red 染色を行なった。

(4). cell proliferation assay

96well plateに細胞を播種し、24時間培養後、目的とする濃度のGdCl₃を添加し、目的とする時間培養した後、MTS法により細胞増殖能を測定した。

(5). リアルタイム PCR 法

培養細胞からmRNAを抽出し、Random primerを用いた逆転写反応にてcDNAを合成し、TaqMan Gene Expression assayを用いてリアルタイムPCR法を行ない、COL1A2, GAPDHのmRNA発現量を定量した。

4. 研究成果

(1). GdはMC3T3-E1細胞の石灰化を誘導する。

MC3T3-E1はOMにおいて0.01~10 μMのGdの濃度依存性に石灰化が誘導されたが、NMでは誘導されなかった。100 μMにおいてはNM, OMともに石灰化を誘導しなかった。対して、0.01 μM~10 μMでは細胞増殖能は変化がなかったが、100 μMにおいて有意に細胞増殖を促進していた。以上より、GdはMC3T3-E1細胞の石灰化を強力に誘導する。しかし、100 μMと高い濃度においては、MC3T3-E1細胞の分化ではなく、細胞増殖を促進すると考えた。

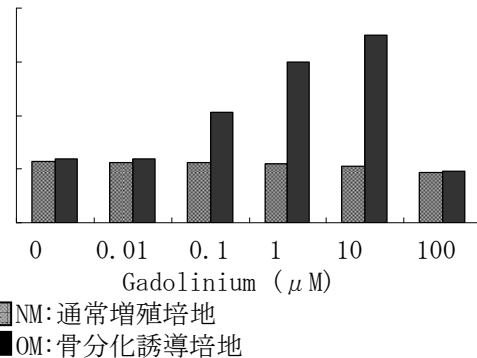


図1. ガドリニウムによるMC3T3-E1細胞の石灰化 (Alizarin red 染色)

(2). Gdはヒト皮下組織由来間葉系幹細胞の石灰化を誘導する。

HAMSCはOMにおいて10, 100 μMの濃度のGd添加で石灰化が誘導され、細胞増殖も促進された。さらに細胞増殖について、GdはNM中において10, 100 μMで細胞増殖を有意に続伸した。

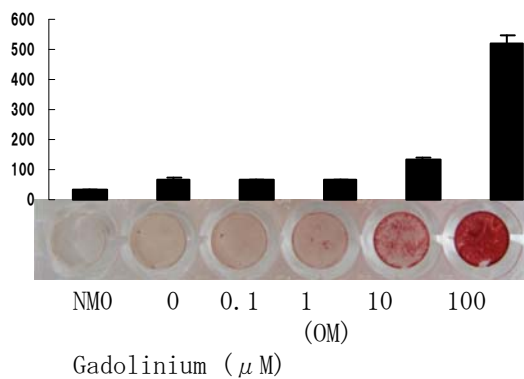


図 2. ガドリニウムによるヒト皮下組織由来間葉系幹細胞の石灰化 (Alizarin red 染色)

(3). Gd はヒト真皮由来線維芽細胞の石灰化を誘導する.

HDF は 2 週間培養した時点では、石灰化の誘導は明らかでなかったが、3 週間培養を続けたところ、OM において 10, 100 μM の Gd 添加で用量依存性に石灰化が誘導された。また、細胞増殖については、NM 中において 10, 100 μM において有意に増殖を促進した。

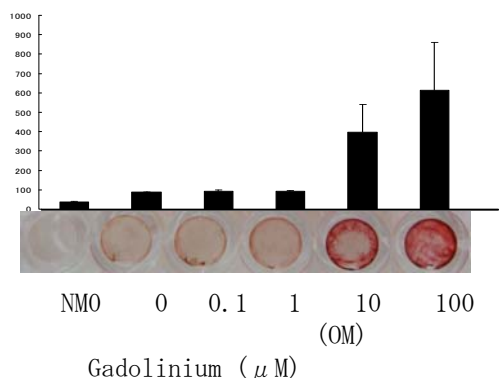


図 3. ガドリニウムによるヒト皮膚由来線維芽細胞の石灰化 (Alizarin red 染色)

(4). Gd は脂肪分化に影響を及ぼさない。HAMSC およびヒト皮下脂肪組織由来脂肪前駆細胞を Gd 添加培地で 1 週間ないし 2 週間培養し、脂肪染色 (oil red 染色) した、Gd の濃度に関わらず、脂肪への分化は見られなかった。したがって、NSF での皮下脂肪減少は Gd が細胞に直接作用して石灰化が促進された結果、脂肪分化が抑制されるという推測は成り立たない。

(5). Gd はヒト真皮由来線維芽細胞の COL1A2 の mRNA 発現量を抑制する。

Gd は HDF に対して、Gd の用量依存性に培養上清中の I 型コラーゲン蛋白量を増加させた。(図 4)

また、I 型コラーゲン mRNA 発現については、有意に抑制していた。Gd による線維化では、ひとつひとつの細胞のコラーゲン産生が増加するのではなく、Gd による細胞増殖の結果、総コラーゲン量が増加しているのではないかと推測される。これは、NSF 患者の皮膚組織内で紡錘形細胞が増加しているという臨床所見にも合致する。

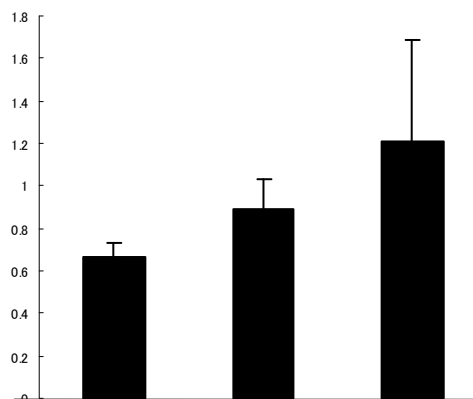


図 4. HAMSC の I 型コラーゲン蛋白産生量 (ELISA 法) Gd 濃度は 1, 10, 100 μM

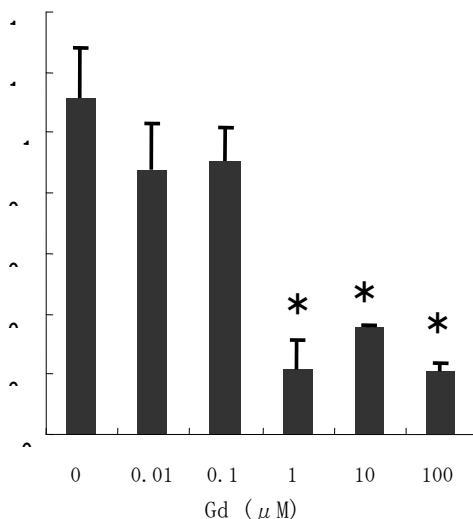


図 5. HAMSC の I 型コラーゲン mRNA 発現量 (Real-time PCR 法 GAPDH 補正值)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Etsuko Okada, Masayoshi Yamanaka, Osamu Ishikawa

Journal of Dermatological Science 査読有 vol62, 2011, 58-63.

[学会発表] (計2件)

1. 岡田悦子, 山中正義, 石川 治
腎性全身性線維症の石灰化機序の検討
第17回分子皮膚科学フォーラム
2010.7.9-10 福岡

2. Etsuko Okada, Masayoshi Yamanaka, Osamu Ishikawa

A possible role of gadolinium on fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis

日本研究皮膚科学会 第34回年次学術大会・総会 2009.12.4-6 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 悦子 (OKADA ETSUKO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90334094