

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08799

研究課題名(和文) ガドリニウム刺激による皮膚線維芽細胞のリプログラミングの可能性

研究課題名(英文) Potential reprogramming of skin fibroblasts by gadolinium stimulation

研究代表者

林 周次郎 (Hayashi, Shujiro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00599871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はMRI検査時のガドリニウム(Gd)の投与によって諸臓器に線維化をきたす疾患である腎性全身性線維症を対象にして病態形成メカニズムの検討をおこなったところ、培養線維芽細胞においてGd添加によりCD34陽性の線維芽細胞が多数みられることを見出した。CD34は間葉系幹細胞の表面マーカーの一つである。そこで、Gdの刺激が線維芽細胞を未分化方向へ巻き戻すのではないかと仮説を立てた。キレート結合能の異なる二種類のGd造影剤を用いて解析した結果、キレート結合能が低い造影剤では有意に細胞増殖と複数の未分化マーカーの発現上昇を認めた。この結果はGd刺激がリプログラミングを起こしている可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、iPS細胞作製の技術ならびに考え方の出現により、生命科学の常識が大きく変わった。その一つが、我々を構成する体細胞は、実は、豊富な可塑性を包含しており、様々な環境に応じて、多能性を持つ可能性を持っているという考え方である。本研究では、Gdによる刺激が皮膚線維芽細胞をより未分化な状態に巻き戻す可能性を追究することを目的としている。Gd刺激により線維芽細胞が未分化方向へ巻き戻ることが確認されれば、Gd刺激をうまく利用することによって、iPS細胞を介さない、あるいは、遺伝子の導入などを必要とせず、培地環境の変更で、体細胞が胚葉を越えた分化(direct conversion)を示す可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previously, we investigated the pathogenesis mechanism of nephrogenic systemic fibrosis, a disease that causes fibrosis in various organs due to the administration of gadolinium (Gd) during MRI examinations, and found that the Gd lead to a large number of CD34-positive fibroblasts. CD34 is one of the surface markers of mesenchymal stem cells. Therefore, we hypothesized that Gd stimulation lead fibroblasts to an undifferentiated direction. When two types of Gd contrast media with different chelate binding capacities were used for analysis, the contrast media with low chelate binding capacity significantly increased cell proliferation and increased expression of multiple undifferentiated markers. This result indicates the possibility that Gd stimulation causes reprogramming.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ガドリニウム ガドリニウム造影剤 ガドジアミド ガドテル酸メグルミン リプログラミング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、MRI 検査時のガドリニウム (Gd) の投与によって全身諸臓器に線維化をきたす疾患である、腎性全身性線維症 (NSF) を対象にして病態形成メカニズムの検討をおこなったところ、培養線維芽細胞において、Gd (ガドリアミド) 添加によって線維芽細胞の増殖能の上昇がみられること、さらに、病変局所の真皮において、CD34 陽性の線維芽細胞が多数みられることを見出した。CD34 は間葉系幹細胞の表面マーカーの一つでもあり、上記の研究結果は、Gd の刺激が、線維芽細胞を、ある程度の未分化方向へ巻き戻すのではないかと、という可能性を考えた。

(2) 近年、iPS 細胞作製の技術ならびに考え方の出現により、生命科学の常識が大きく変わった。その一つが、我々を構成する体細胞は、実は、豊富な可塑性を包含しており、様々な環境に応じて、いわゆる多能性を持つ可能性を持っているという考え方である。本研究では、Gd による刺激が、皮膚線維芽細胞を、より未分化な状態に巻き戻す可能性を追究することを目的としており、Gd のこのような作用を詳らかにしようとする研究はこれまでにない。

### 2. 研究の目的

上記のように、NSF 患者の組織において CD34 陽性線維芽細胞が多数みられること、また、Gd 存在下で培養した線維芽細胞の増殖能が増強することから、Gd 添加が、線維芽細胞を幼若化する、あるいは幹細胞の状態へ巻きもどす可能性を考えた。この仮説を基盤として、本研究では、(1) Gd 添加により CD34 陽性線維芽細胞が誘導されることの確認、(2)(1)を確認したのち、得られた CD34 陽性線維芽細胞のキャラクターを確認すること、さらには(3)得られた CD34 陽性線維芽細胞が幹細胞としての機能を持つか否か、ということに関して明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Gd 添加により CD34 陽性線維芽細胞が誘導されることの確認

Gd を実験水でイオン化することが困難であり、Gd 硝酸塩、2 種類の Gd キレート結合能が異なる造影剤 (ガドリアミドとガドテル酸メグルミン) を用いた。正常皮膚線維芽細胞を培養し、Gd を添加する。経時的に CD34 陽性細胞の数ならびに総細胞数を FACS で確認した。

(2) Gd 刺激 (ガドリアミドとガドテル酸メグルミン) により線維芽細胞を刺激し、CD34 陽性細胞のキャラクターの違いを検討する。ガドリアミドとガドテル酸メグルミンでは、前者の方が Gd との結合が弱い。Gd 造影剤存在下で得られた CD34 陽性線維芽細胞を単離し、RT-PCR 法や免疫染色法により、表面マーカーの検討をおこなう。

#### (3) CD34 陽性線維芽細胞の多能性についての検討

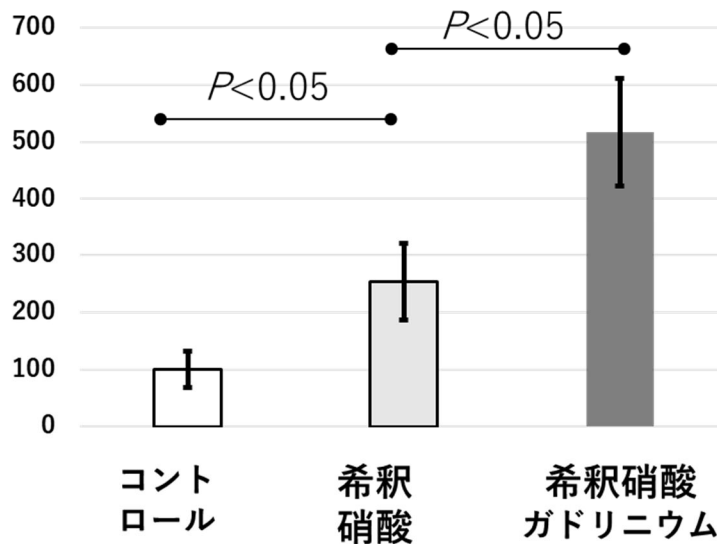
iPS 細胞の検出に用いられている、未分化マーカーとして知られている、転写因子 Nanog、Oct3/4、Sox2 についての発現について検討する。これらのマーカーは iPS 細胞では高度に発現していることが知られているが、その他の ES 細胞などにも発現しており、未分化マーカーとして広く知られている。

### 4. 研究成果

(1) Gd が実験水に溶けないため、コントロール、希釈した硝酸 Gd および硝酸塩の 3 つグループ

間で細胞増殖能を比較した結果、コントロールに比較して硝酸 Gd と硝酸塩では有意に細胞増殖が高かった。さらに硝酸 Gd では硝酸塩と比較して有意に細胞増殖が高かった。CD34 陽性細胞の結果も同様に、コントロールに比較して硝酸 Gd と硝酸塩では有意に細胞増殖が高かった。さらに硝酸 Gd では硝酸塩と比較して有意に細胞増殖が高かった（図 1）。

図1 passage3 における細胞増殖数  
(コントロールを100とした100分率で表示)

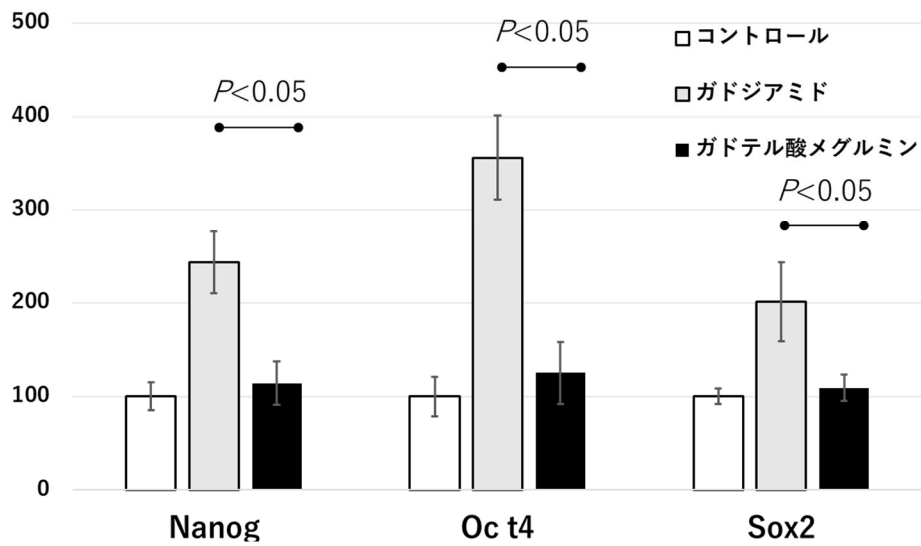


既に Gd 造影剤（ガドジアミド）では、CD34 陽性細胞が増加することが判明しているため、この結果により Gd は CD34 陽性細胞の増加を増やす可能性が高いが、硝酸の影響も強く反映しているため、純粋に Gd イオンの影響を評価することが困難であった。

(2) 次に NSF の発症が少ないと言われているガドテル酸メグルミンは Gd とのキレート結合が安定しているため、つまり Gd イオンが血中で分離していないことが、理由と考えられている。そこで、ガドジアミドとガドテル酸メグルミンで比較することにより、Gd イオンの線維芽細胞への影響を間接的に判断した。ガドジアミドとガドテル酸メグルミンをそれぞれの存在下で、培養皮膚線維芽細胞を培養するとガドジアミドでは有意に細胞増殖および、CD34 陽性細胞の増加を認めることができた。

(3) それぞれの造影剤を添加して培養した線維芽細胞より mRNA を抽出して未分化マーカーとして知られている、転写因子 Nanog、Oct4、Sox2 についての発現を検討したところ、ガドジアミドでは有意に全ての転写因子がガドテル酸メグルミンよりも高く発現していた(図 2)。

図2 passage5 における細胞増殖数  
(コントロールを100とした100分率で表示)



以上より直接的に Gd イオンの影響を確認することはできなかったが、ガドジアミドと硝酸 Gd でどちらも CD34 陽性細胞がコントロールより有意に増加させることと、さらに Gd とのキレート結合が安定しているガドテル酸メグルミンより、不安定で Gd イオンが遊離しやすいガドジアミドにより CD34 陽性細胞の増加と未分化マーカーの上昇を認め、間接的に Gd が線維芽細胞の増殖促進と、幹細胞化を起こしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井川 健  (Ken Igawa)  (00372441)	獨協医科大学・医学部・教授    (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関