

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2011～2013

課題番号：22591237

研究課題名（和文）ガドリニウムによる皮膚線維化・皮膚石灰化モデルマウスの作製

研究課題名（英文）The establishment of gadolinium-induced skin fibrosis and calcification mice model.

研究代表者

石川 治（ISHIKAWA OSAMU）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90168188

研究成果の概要（和文）：

全身諸臓器に線維化・石灰化をきたす腎性全身性線維症（nephrogenic systemic fibrosis: NSF）は、ガドリニウム(Gd)造影剤を透析患者に投与することにより生じることが知られている。本研究では、ガドリニウムを用いた線維化疾患モデルマウス、石灰化疾患モデルマウスを作製し、その発症メカニズムを検討することを目的とした。マウス骨髄由来間葉系幹細胞の局所注入と Gd 徐放剤の局所注入を行った。その結果、局所の石灰化はみられなかったものの、皮膚線維化がみられた。今後は今回得られた Gd による皮膚線維化モデルマウスを用いて、その機序を解明し、治療への応用を目指す。また、Gd による皮膚石灰化モデルマウスの作成についても更なる検討を行う。

研究成果の概要（英文）：

Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is an acquired disorder characterized by systemic fibrosis and abnormal calcification in patients with severe renal dysfunction. Growing evidence supports the hypothesis that gadolinium (Gd)-containing contrast agents used for magnetic resonance imaging trigger the development of NSF. The aim of this study was to establish the Gd-induced skin fibrosis and calcification mice model. Subcutaneous injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and Gd-loaded hydrogel induced skin fibrosis in mice, but not skin calcification. Next we will examine the mechanism of Gd-induced skin fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：腎性全身性線維症、ガドリニウム、線維化、石灰化、間葉系幹細胞

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、全身諸臓器の線維化を特徴とする疾患である。高度の腎機能不全患者にガドリニウム造影剤を使用することにより、高率に NSF が発症することが判っているが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。

最近、我々の教室で NSF 患者を診察する機会を得たが、高度の皮膚の硬化と関節の拘縮、更に著明な皮膚・皮下の石灰化をきたしており、その QOL は著しく損なわれていた (Nagai et al. *Acta Derm Venereol.* 2008; 88: 597-600.)。NSF は線維化をおこす疾患として知られているが、自験例以外にも石灰化病変の合併は多数報告されている (Edsall et al. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 247-253.)。全身性強皮症でもしばしば皮膚や軟部組織に石灰化が生じることがあり、また陰茎の線維化を特徴とする Peyronie's disease でも 15~25% に石灰化を伴うことが知られている (Vernet et al. *Biol Reprod.* 2005; 73: 1199-210.)。石灰化形成機序については、これまで組織の変性過程に起こる受動的なカルシウム結晶の沈着と考えられており、強皮症における石灰沈着も血行障害に基づく皮膚の栄養障害の結果生じるものと考えられてきた。しかしながら、近年、特に血管石灰化の研究から、幹細胞や血管平滑筋細胞の骨芽細胞への能動的な形質転換（分化）が石灰化形成の病態の中心にあることが明らかになってきた。また、肺や腎臓の線維化では TGF- β を介した上皮系細胞から筋線維芽細胞に形質転換するメカニズム (Epithelial-Mesenchymal

Transition: EMT) がその病態の中心にあることが明らかになってきており、皮膚線維化についても線維化を形成する細胞の起源について、近年盛ん

に研究が進められている。これらの知見は、石灰化・線維化はいずれも何らかの因子により分化能をもつ細胞が能動的に形質転換（分化）をすることが病態の中心にあることを指し示しており、NSF ではガドリニウム (Gd) が石灰化（骨分化）・線維化の方向に細胞の分化を誘導している可能性が示唆される。

皮膚における線維化病変・石灰化病変の起源となる細胞はいかなる細胞であろうか？

まず、骨、脂肪、筋肉など様々な細胞への分化能をもつ細胞として知られている間葉系幹細胞がその候補として挙げられる。特に脂肪組織内には多数の間葉系幹細胞が存在することが広く知られている。更に、皮膚由来線維芽細胞の中にも多分化能を有する細胞が多数含まれていることが近年盛んに報告されている (Chen et al. *Journal of Cell Science* 2007; 120:2875-83. Lorenz et al. *Experimental Dermatology* 2008; 17:925-32)。そこで我々は、Gd がヒト真皮由来線維芽細胞 (Human dermal fibroblast: HDF) とヒト皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞 (human adipose tissue derived mesenchymal stem cell: HAMSC) を線維化・石灰化の方向に誘導するか否かを検討した。その結果、Gd は、正常リン濃度の培地中では HDF、HAMSC の細胞増殖を促進し、高リン濃度の培地中においては HDF、HAMSC の骨分化を誘導することを明らかにした (Okada E, Ishikawa O, *J Dermatol Sci*)。この結果は、Gd が直接的に HDF や HAMSC に作用して、細胞増殖や骨分化を誘導することにより、線維化病変（線維芽細胞や間葉系幹細胞の増殖）・石灰化病変（線維芽細胞や間葉系幹細胞の骨分化）を形成し得る可能性を示唆している。

Gd を用いた NSF モデル動物については、Sieber らがすでに、ラットの尾静脈からガドリニウム造影剤を大

量に投与することにより、皮膚線維化病変が得られることを報告している (Sieber et al. Eur Radiol (2008) 18: 2164-73)。その報告の中で、種々のガドリニウム造影剤をラットに投与したところ、Gadodiamide が最も高度な皮膚線維化病変を形成し、皮膚組織内のガドリニウム濃度も最も高かったとしている。この結果からも、皮膚に沈着したガドリニウムが線維化病変形成に関与していることは明らかであるが、その詳細なメカニズムについては検討されていない。そこで本研究では、Gd を用いた皮膚線維化モデルマウス、皮膚石灰化モデルマウスを作製し、線維化病変・石灰化病変形成機序を明らかにしたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに *in vitro* で得た知見を元に、ガドリニウムを用いた線維化疾患モデルマウス、石灰化疾患モデルマウスを作製し、その発症メカニズムを詳細に検討することを目的とする。本研究で得られる知見は、全身性強皮症、ケロイドなどの線維化疾患、および皮膚石灰化の発症メカニズムの解明と治療法の開発に大きく貢献できるものと考えている。

3. 研究の方法

皮膚線維化モデルマウスの作製

Gd を $10\mu\text{M}$ ～ 10mM の濃度で、マウスの背部に皮下注射する。4週間後に皮膚を採取し、ホルマリン固定後、HE 染色を行い組織学的に皮膚厚 (真皮厚) を測定する。

また、間葉系幹細胞の局所注入と Gd 徐放化ドラッグデリバリーシステム (DDS) を用いた皮膚線維化モデルマウスの作製を試みる。

マウス骨髄より間葉系幹細胞を誘導し、Gd 徐放剤と混ぜて、マウスの背部皮下に注入する。4週間後に皮膚を採取し、ホルマリン固定後、HE 染色を行い組織学的に皮膚厚 (真皮厚) を測定する。

皮膚石灰化モデルマウスの作製

Gd とリンを $10\mu\text{M}$ ～ 10mM の濃度で、マウスの背部に皮下注射する。4週間後に皮膚を採取し、HE 染色およびコ

ッサ染色にて皮膚石灰化を評価する。また、間葉系幹細胞の局所注入と Gd 徐放化ドラッグデリバリーシステム (DDS) を用いた皮膚石灰化モデルマウスの作製を試みる。

マウス骨髄より間葉系幹細胞を誘導し、Gd 徐放剤と混ぜて、マウスの背部皮下に注入する。4週間後に皮膚を採取し、HE 染色およびコッサ染色で石灰化を評価する。

腎性全身性線維症は、高度の腎機能不全患者にガドリニウム含有造影剤を使用することにより発症することから、マウスにおいても腎臓の部分摘出によって、高度の腎機能不全状態を作りだし、より腎性全身性線維症の患者に近い状態を作り出す。その後、間葉系幹細胞と Gd 徐放を局注して石灰化について検討を行う。

4. 研究成果

まず最初に、様々な種類のマウスに Gd やリンを局所注射して、皮膚線維化、石灰化を試みたが、成果は得られなかった。

そこで、次に間葉系幹細胞の局所注入と Gd 徐放化ドラッグデリバリーシステム (DDS) を用いて、皮膚線維化モデルマウス、皮膚石灰化モデルマウスの作製を試みた。生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放化 DDS 医薬品は、細胞増殖因子や薬剤を局所に徐放することにより、薬理活性を高めることができる。

まず、マウス骨髄より間葉系幹細胞を誘導、作成した。作成した間葉系幹細胞と Gd 徐放剤の局所注入を行った。その結果、局所の石灰化はみられなかったものの、皮膚の線維化がみられた。さらに石灰化の誘導を目的として、より腎性全身性線維症の病態に近いモデルを作成するために、マウスの腎臓を片方摘出した後に、間葉系幹細胞と Gd 徐放剤の局所注入を行った。しかし、局所の石灰化は得られなかった。今後は今回得られた Gd による皮膚線維化モデルマウスを用いて、その機序を解明し、治療への応用を目指す。また、Gd による皮膚石灰化モデルマウスの作成についても更なる検討を行う。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Motegi S, Ishikawa O

Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis

International Investigative Dermatology

2013年5月8日～2013年5月11日
Edinburgh

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 治 (ISHIKAWA OSAMU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90168188