

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790146

研究課題名(和文) ガドリニウムによる皮膚線維化・石灰化機序の解明

研究課題名(英文) The regulation of fibrosis and calcification by gadolinium

研究代表者

山田 和哉 (Yamada, Kazuya)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90420190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：全身に線維化・石灰化をきたす腎性全身性線維症は、ガドリニウム(Gd)を含む造影剤を透析患者に使用することにより生じる。我々は、これまでにGdがヒト間葉系幹細胞の増殖と石灰化を亢進させることを明らかにしている。しかしその機序については未だ十分に解明されていない。ヒト間葉系幹細胞において、Gd刺激により、PDGFレセプター、MAPKやAktのリン酸化が亢進することを明らかにした。また、エンドセリンやエンドセリン受容体の発現量も増加した。これらの結果より、Gdによる石灰化、増殖亢進の機序の一部にPDGFやエンドセリン受容体シグナル伝達、下流のMAPKやAktが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nephrogenic systemic fibrosis (NSF) is characterized by systemic fibrosis and abnormal calcification in patients with severe renal dysfunction. It is considered that gadolinium (Gd)-containing contrast agents used for magnetic resonance imaging trigger the development of NSF. However, the causative role of Gd and the mechanism of Gd-induced fibrosis and calcification in NSF are unknown. ET-1/ET receptor expression and phosphorylation of PDGF receptor, ERK and Akt in human mesenchymal stem cells (MSC) treated with Gd were elevated, suggesting that Gd induces proliferation and calcification of hMSC via enhancement of ETR signaling and/or PDGFR signaling and ERK and Akt pathway.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：腎性全身性線維症 ガドリニウム

1. 研究開始当初の背景

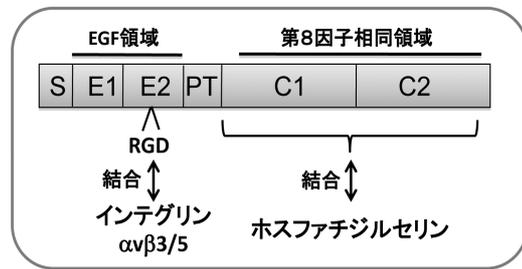
腎性全身性線維症 (nephrogenic systemic fibrosis: NSF) は、2000年に初めて報告された皮膚と皮下組織の肥厚、筋肉・横隔膜・心臓・肝臓・肺など、臓器の線維化を特徴とする疾患である(Cowper SE et al. Lancet 2000; 356:1000-1001)。腎不全患者にガドリニウム (Gd)を含む造影剤を使用することにより高率に NSF が発症することが判っており、Gd は NSF の原因または発症のきっかけになっていると推測されているが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。

我々の教室で経験した NSF 症例は高度の皮膚硬化と関節の拘縮、更に著明な皮膚・皮下の石灰化をきたしていた(Nagai Y et al. Acta Derm Venereol 2008; 88: 597-600)。また、NSF の剖検例の総括によると、皮膚小血管壁や皮下脂肪織内に強く石灰沈着を来しており、Gd も同時に沈着しているとの報告もある(Sanyal S. et al. Nephrol Dial Transplant 2011; 1-11)。これらのことより、Gd が線維化、石灰化病変形成に共通して作用している可能性が示唆される。

我々の教室では、これまでに in vitro の実験系にて Gd がヒト間葉系幹細胞やヒト線維芽細胞の増殖と石灰化を亢進させることを明らかにしている (Okada E et al. J Dermatol Sci 2011;62:58-63)。しかし、Gd がどのように作用し、皮膚線維化、石灰化を誘導するのか、その機序については未だ十分に解明されていない。本研究では、Gd がどのように線維芽細胞あるいは間葉系幹細胞に作用し、細胞内にシグナルを伝え、その増殖(皮膚線維化)分化(石灰化)に影響を与えるのかを明らかにすることが目的である。

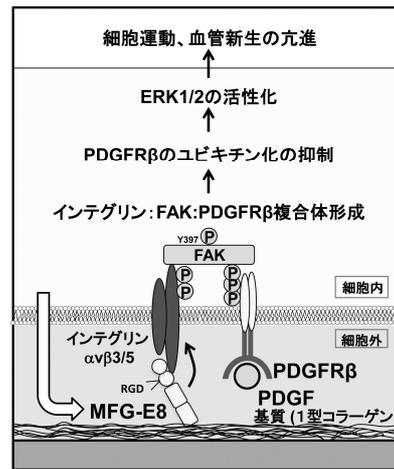
Gd が細胞内シグナルに与える影響に関する最近の報告のなかで、興味深いことに、Gd が PDGF レセプターシグナルに影響を与え、ヒト線維芽細胞の増殖亢進を促すことが示されている (Bhagavathula N et al. Invest Radiol 45(12):769-777, 2010)。また、PDGF レセプターシグナルを阻害する Imatinib (チロシンキナーゼ阻害薬)の投与が、NSF の皮膚硬化に対して有効であったとの報告もある (Paniagua RT et al. J Am Acad Dermatol 2011;65:389-403)これらの知見から、Gd が間葉系幹細胞の PDGF レセプターシグナルの活性化を介して、皮膚線維化や石灰化を誘導する可能性が高い。

申請者の研究室では、分泌蛋白質 MFG-E8 についての研究を行っている。MFG-E8 は、N 末端に 2 つの上皮成長因子様ドメイン (E1, E2) を持ち、E2 ドメインにはインテグリンとの結合に重要な RGD 配列を含む。MFG-E8 は、この RGD 配列を介して、インテグリン $\alpha\beta_3$ や $\alpha\beta_3$ と結合する。一方、C 末端には第 5, 8 凝固因子と相同性をもつドメイン (C1, C2) を有し、この C1, C2 ドメインはリン脂質やコラーゲンと結合することが知られている (下図参照)。



研究協力者である当教室の茂木精一郎講師は、MFG-E8 の研究を継続しており、MFG-E8 が PDGFR β シグナルを制御することを明らかにしている (Motegi S. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 31(11): 2653-2664) (右図参照)。

細胞運動、血管新生の亢進
 ERK1/2の活性化
 PDGFR β のユビキチン化の抑制
 インテグリン: FAK: PDGFR β 複合体形成



MFG-E8 は血管周皮細胞や間葉系幹細胞より産生、分泌され、細胞膜上のインテグリン αV と結合する。そして、PDGF 刺激によりリン酸化された PDGFR β は FAK を介して、インテグリン αV 、MFG-E8 と複合体を形成する。その結果、PDGFR β のユビキチン化が抑制されることにより、PDGFR β シグナル (MAPK) が増強し、細胞運動、血管新生の亢進を引き起こす。この結果より、MFG-E8 も Gd と同様に、間葉系幹細胞の PDGF レセプターシグナルの制御に役割を担っていることが示唆される。

これらの Gd と MFG-E8 の知見を合わせて考慮すると、Gd によるヒト間葉系幹細胞の増殖、石灰化において、MFG-E8 が PDGF レセプターシグナルの制御を介して、重要な役割を担っている可能性が高く、今回の研究構想の着想に至った。

2. 研究の目的

腎性全身性線維症 (NSF) は、ガドリニウム (Gd)を含む造影剤の使用により、全身の皮膚線維化、石灰化を生じる疾患であり、間葉系幹細胞の関与が示唆されているが、詳細な機序は明らかになっていない。

本研究では、in vitro の実験系を用いて、Gd による間葉系幹細胞の増殖、石灰化誘導におけるメカニズムを分子レベルで解明することが目的である。具体的な目的は、Gd によって誘導される間葉系幹細胞の細胞内シグナル変化 (PDGFR β シグナル等) の解明、Gd による間葉系幹細胞の増殖、石灰化誘導

における MFG-E8 の役割の解明である。

3. 研究の方法

ガドリニウムによる間葉系幹細胞の細胞内シグナル変化の検討

我々の教室では、これまでに *in vitro* の実験系にて Gd がヒト間葉系幹細胞やヒト線維芽細胞の増殖と石灰化を亢進させることを明らかにしている (Okada E et al. J Dermatol Sci 2011;62:58-63)。しかし、Gd がどのように作用し、皮膚線維化、石灰化を誘導するのか、その機序については未だ十分に解明されていない。そこで、本研究では、まず Gd がどのように間葉系幹細胞に作用し、細胞内にシグナルを伝え、その増殖 (皮膚線維化)、分化 (石灰化) に影響を与えるのかを検討する。まず、ヒト皮下組織由来間葉系幹細胞、マウス骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、Gd 刺激による細胞内シグナル変化を免疫沈降法、ウエスタンブロット法にて検討する。我々はすでに、骨髄細胞より間葉系幹細胞を誘導する系を確立させている。Gd を含む培地 (10uM, 100uM) と含まない培地にて間葉系幹細胞を処理し、継時的な細胞内シグナル変化をみる。

ガドリニウムによる間葉系幹細胞の細胞内シグナル変化における MFG-E8 の役割

研究協力者である当教室の茂木精一郎は、MFG-E8 が PDGFR β シグナルを制御することを明らかにしている (Motegi S. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 31(11):2653-2664)。間葉系幹細胞より産生、分泌された MFG-E8 は、細胞膜上のインテグリン αV と結合する。そして、PDGF 刺激によりリン酸化された PDGFR β は FAK を介して、インテグリン αV 、MFG-E8 と複合体を形成する。その結果、PDGFR β のユビキチン化が抑制され、PDGFR β シグナル (MAPK) が増強し、細胞運動、血管新生の亢進を引き起こす。この結果より、MFG-E8 も Gd と同様に、間葉系幹細胞の PDGF レセプターシグナルの制御に役割を担っていることが示唆される。そこで、Gd による間葉系幹細胞の細胞内シグナル変化における MFG-E8 の役割を免疫沈降法、ウエスタンブロット法にて検討する。

まず、申請者のグループは、real-time PCR 法や ELISA 法によって、ヒト間葉系幹細胞やマウス骨髄由来間葉系幹細胞が MFG-E8 を高発現していることを確認している。MFG-E8 の機能を検討するために、MFG-E8 野生型 (WT) および遺伝子欠損 (KO) マウスの骨髄由来間葉系幹細胞を用いて比較検討を行った。また、RNA 干渉法 (siRNA や shRNA) によって MFG-E8 の発現を抑制した細胞とコントロール細胞を用いて同様の検討を行った。Gd を含む培地 (10uM, 100uM) と含まない培地にて間葉系幹細胞を処理し、継時的な細胞内シグナル変化 (PDGF レセプターのリン酸化、MAPK、Akt のリン酸化など) をみる。

ガドリニウムによる増殖、石灰化誘導における MFG-E8 の役割

Gd による間葉系幹細胞の増殖、石灰化誘導における MFG-E8 の役割を検討するために、MFG-E8 野生型 (WT) および遺伝子欠損 (KO) マウスの骨髄由来間葉系幹細胞を用いて比較検討を行う。また、RNA 干渉法 (siRNA や shRNA) によって MFG-E8 の発現を抑制した細胞とコントロール細胞を用いて同様の検討を行う。Gd を含む培地 (10uM, 100uM) と含まない培地にて間葉系幹細胞を処理し、細胞の石灰化と細胞増殖について、比較検討を行う。我々はすでに、細胞分化 (石灰化、脂肪分化) や細胞増殖の研究法、定量方法を確立し、論文報告している (Okada E et al. J Dermatol Sci 2011;62:58-63)。

4. 研究成果

ヒト間葉系幹細胞において、Gd 刺激により、PDGF レセプターのリン酸化、そして下流のシグナルである MAPK や Akt のリン酸化が亢進することを明らかにした。

また、ヒト間葉系幹細胞の Gd 刺激によって石灰化や増殖が誘導される条件において、エンドセリンの発現も亢進していることを見出した。また、エンドセリン受容体の発現量も増加していた。これらの結果より、Gd による石灰化、増殖亢進の機序の一部に PDGF やエンドセリン受容体シグナル伝達、下流の MAPK や Akt が関与する可能性が示唆された。

また、MFG-E8 WT および KO マウスの骨髄由来間葉系幹細胞を用いて Gd 刺激による PDGF レセプターのリン酸化、そして下流のシグナルである MAPK や Akt のリン酸化について検討を行ったが、明らかな違いは見られなかった。

さらに、MFG-E8 WT および KO マウスの骨髄由来間葉系幹細胞を用いて Gd 刺激による細胞の石灰化と細胞増殖について、比較検討を行ったが、こちらも明らかな違いは見られなかった。

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, Okada E, Uchiyama A, Yamada K, Uehara A, Ogino S, Takeuchi Y, Ishikawa O
Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis
International Investigative Dermatology, 2013. 5. 8-11, Edinburgh

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 和哉 (YAMADA, Kazuya)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90420190

(2)研究協力者

茂木 精一郎 (MOTEGI, Sei-ichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20420185