

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461662

研究課題名(和文)腎性全身性線維症における皮膚線維化、石灰化機序の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of skin fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis

研究代表者

石川 治 (Ishikawa, Osamu)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90168188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎性全身性線維症は全身に線維化・石灰化をきたす疾患であり、ガドリニウムを含む造影剤を透析患者に使用することにより生じることが知られている。間葉系幹細胞が病態に関与する可能性が示唆されているが機序は不明である。本研究の成果によって、皮膚組織に移行したガドリニウムが間葉系幹細胞のエンドセリン-1シグナルを活性化し、石灰化・増殖(線維化)を誘導させ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. We conclude that Gd induces proliferation and calcification of human mesenchymal stem cells via enhancement of endothelin-1/endothelin receptor signalling. Our results contribute to understand the pathogenesis of NSF.

研究分野：皮膚線維化

キーワード：腎性全身性線維症 皮膚線維化 ガドリニウム 間葉系幹細胞 エンドセリン

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

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、石灰化を特徴とする。高度の腎機能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 が発症することが知られている。過去に我々の教室においても実際に 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・皮下の石灰化がみられ、その QOL は著しく損なわれていた（Nagai Y et al. Acta Derm Venereol. 2008; 88: 597-600.）。

NSF の皮膚線維化や石灰化に関する詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。近年、肺や腎臓の線維化では TGF- β を介した、上皮系細胞から間葉系細胞（筋線維芽細胞）に形質転換するメカニズム（Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT）がその病態に関与することが示唆されており、皮膚の線維化についても間葉系細胞の関与が示唆されている。また、石灰化についても、血管石灰化の研究から、間葉系幹細胞や血管平滑筋細胞の骨芽細胞への能動的な分化が石灰化形成の病態に関与することが明らかになってきた。これらの知見より、我々は、NSF の皮膚線維化、石灰化においても間葉系幹細胞がその病態に関与する可能性を考え研究を開始した。

我々は、*in vitro* の実験にて 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た（Okada E, Ishikawa O. J Dermatol Sci. 2011; 62: 58-63.）。この結果は、Gd が直接的に間葉系幹細胞に作用して、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（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。そこで本研究では、Gd がヒト間葉系幹細胞の増殖と石灰化を亢進させるメカニズムを解明したいと考えている。

エンドセリンは、全身性強皮症の病態形成において重要な役割を担っていることが知られている。全身性強皮症患者の血清中のエンドセリンは増加している。また、全身性強皮症に伴う肺高血圧症の病態形成機序として、血管内皮細胞から産生されるエンドセリンが血管平滑筋細胞や血管周皮細胞上のエンドセリン受容体と結合し、血管収縮を引き起こすことによって肺高血圧を生じることが知られている。さらに近年では、エンドセリンが強皮症の皮膚線維化や血管障害の制御にも関与することが明らかになりつつあ

る。石灰化についても、エンドセリンによる制御が知られており、石灰化を起こした血管では、エンドセリンの発現が亢進していることや、エンドセリンは、カルシウムの細胞内への取り込みを促進させること、そして、エンドセリンは、マウス骨芽細胞の骨形成を促進させる（Neuroscience, 165, 584-600, 2010）ことが知られている。

これらの知見より、NSF の皮膚線維化、石灰化においてもエンドセリンが関与しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

(1) Gd によるヒト間葉系幹細胞の増殖、石灰化促進におけるエンドセリンの役割、作用機序を解明する。*in vitro* の実験にて、Gd 刺激による間葉系幹細胞の増殖と石灰化の亢進をすでに明らかにしているが、この系において、エンドセリンやエンドセリン受容体の発現、エンドセリン受容体拮抗薬の効果を検討し、エンドセリン受容体シグナルの役割を検討する。

(2) 腎性全身性線維症患者の病態におけるエンドセリンの役割を解明する。NSF 患者における皮膚線維化、石灰化に対するエンドセリンの役割について、組織学的、生化学的検査や血清学的な評価を詳細に行う。

3. 研究の方法

(1) Gd によるヒト間葉系幹細胞の増殖、石灰化促進におけるエンドセリンの役割、作用機序を解明する。(*in vitro*)

我々は、*in vitro* の実験にて 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た（Okada E, Ishikawa O. J Dermatol Sci. 2011; 62: 58-63.）。この結果は、Gd が直接的に間葉系幹細胞に作用して、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（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。そこで、今回我々は、この Gd 刺激によるヒト間葉系幹細胞の増殖と石灰化の亢進におけるメカニズムの解明を目的とする。まず、この系において、エンドセリンやエンドセリン受容体の発現について検討を行う。また、エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンが Gd によるヒト間葉系幹細胞の増殖と石灰化誘導を抑制するのかどうかについて検討する。ボセンタンが間葉系幹細胞の石灰化、増殖を抑制するのであれば、この機序の一部にエンドセリンシグナルが関与することが強く示唆

される。

これまでに、MAPK のリン酸化が間葉系幹細胞の石灰化を促進させることや、MAPK 阻害剤が間葉系幹細胞の石灰化を抑制することが知られており、MAPK シグナルが間葉系幹細胞の石灰化に重要な役割を担うことが知られている。そこで、我々は Gd 刺激によるヒト間葉系幹細胞の MAPK と Akt の変化について検討した結果、Gd 刺激によって、MAPK と Akt のチロシンリン酸化が亢進することを見出した。そこで、エンドセリン受容体拮抗薬が Gd 刺激による MAPK と Akt のチロシンリン酸化を抑制するのかどうか検討する。

(2) 腎性全身性線維症患者の病態(皮膚線維化、石灰化)におけるエンドセリンの役割を解明する

NSF の患者の組織中のエンドセリンの発現を正常人の組織と比較する。また、石灰化部位においても同様の検討を行う。NSF 患者の血清中のエンドセリン量を測定し、健常人と比較する。

4. 研究成果

(1) ガドリニウム刺激によって間葉系幹細胞のエンドセリン 1 とエンドセリン受容体の発現が亢進する

Gd が MSC の増殖を亢進させる際に、MSC のエンドセリン-1 (ET-1) と ET-1 受容体 (A 型) の発現が RNA レベルと蛋白レベルで増加することを見出した (図 1)。

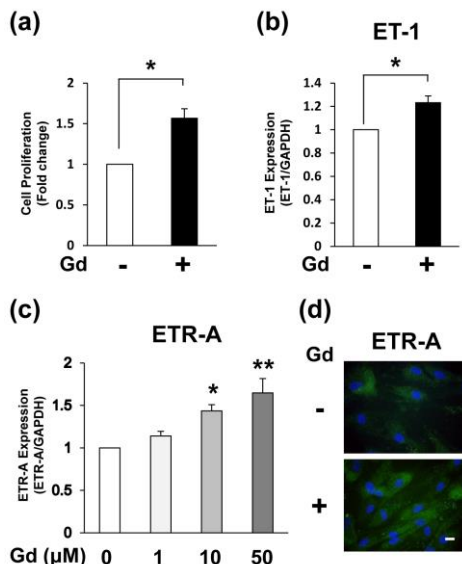


図 1 (a) ガドリニウムによる間葉系幹細胞の増殖亢進。ガドリニウム(50 μM) で 48 時間培養。(b, c) エンドセリン 1 とエンドセリン受容体 A の mRNA の発現量。ガドリニウム(50 μ

M) で 24 時間培養。(d) エンドセリン受容体 A の染色。ガドリニウム(50 μM) で 24 時間培養。

さらに、Gd が MSC の石灰化を亢進させる際に、MSC の ET-1 と ET-1 受容体 (A 型) の発現が RNA レベルと蛋白レベルで増加することを見出した (図 2)。

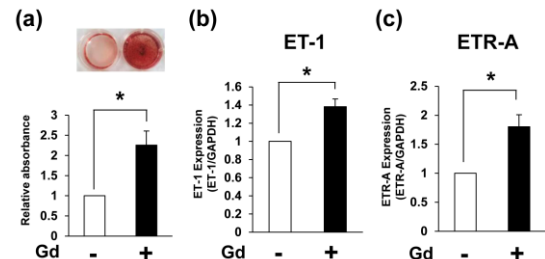


図 2 (a) ガドリニウム刺激による石灰化。間葉系幹細胞をガドリニウム(50 μM) で 2 週間培養。Alizarin red S 濃度を吸光度で測定。(b, c) エンドセリン 1 とエンドセリン受容体 A の mRNA の発現量。ガドリニウム(50 μM) で 2 週間培養。

(2) 間葉系幹細胞のガドリニウムによる増殖亢進と石灰化はエンドセリン受容体拮抗薬によって抑制される

ET 受容体拮抗薬 (ボセンタン) によって Gd による MSC の増殖と石灰化の亢進が抑制された (図 3 a, b)。

また、ボセンタンによって Gd による ERK や Akt のリン酸化亢進の抑制がみられた (図 3 c, d)。

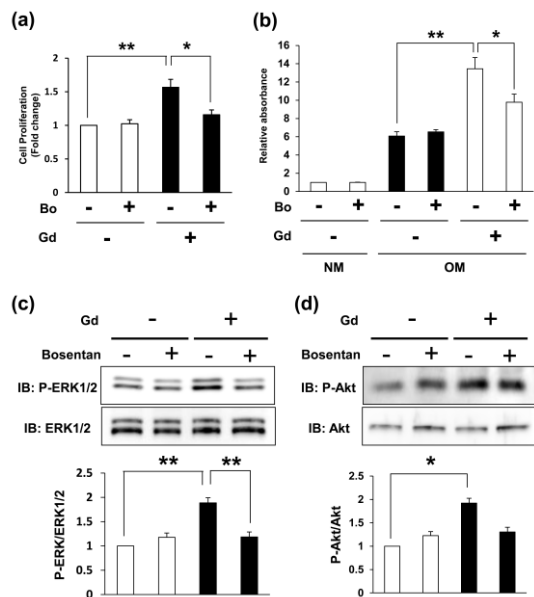


図 3 (a) 間葉系幹細胞のガドリニウムによる増殖

亢進はエンドセリン受容体拮抗薬によって抑制される。間葉系幹細胞をガドリニウム(50 μ M) とボセンタン (0-100 μ M) で 48 時間培養。

(b) 間葉系幹細胞のガドリニウムによる石灰化亢進はエンドセリン受容体拮抗薬によって抑制される。間葉系幹細胞をガドリニウム(50 μ M) とボセンタン (0-100 μ M) で 2 週間培養。 Alizarin red S 濃度を吸光度で測定。

(c, d) 間葉系幹細胞のガドリニウムによる ERK1/2 と Akt のリン酸化亢進はエンドセリン受容体拮抗薬によって抑制される。間葉系幹細胞をガドリニウム(50 μ M) とボセンタン (50 μ M) で 30 分間培養。

(3) 腎性全身性線維症 (NSF) 患者の血清中エンドセリン量と皮膚線維化病変におけるエンドセリン受容体の発現量は亢進している

NSF 患者の血清エンドセリン-1 値は、強皮症患者や健常人より高値だった (図 4a)。また、NSF 患者組織においては ET 受容体の発現が亢進していた (図 4b)。

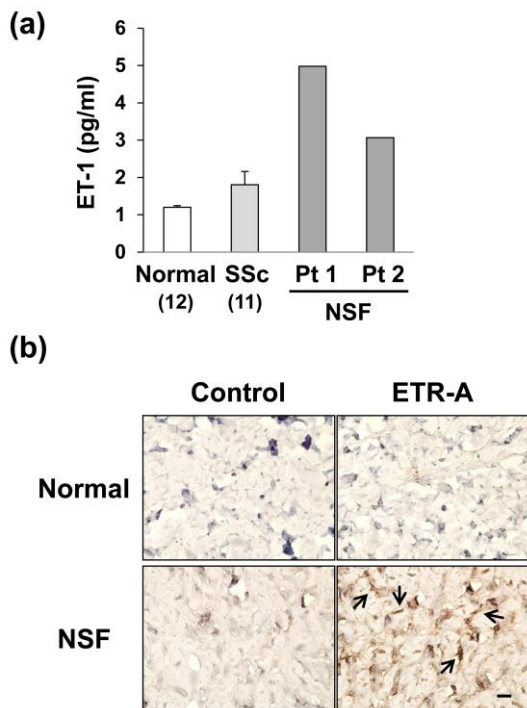
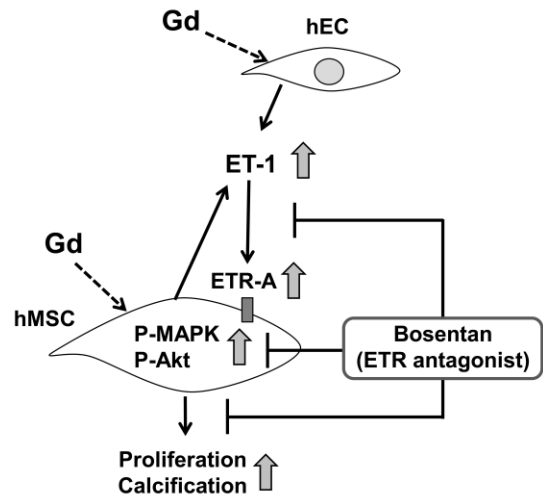


図 4 (a)健常人、強皮症、NSF 患者の血清エンドセリン-1 濃度の比較。(b)健常人、NSF 患者の病変部におけるエンドセリン受容体の染色

(4) 腎性全身性線維症の病態におけるエンドセリン1/エンドセリン受容体シグナルの役割



これらの結果より、皮膚組織に移行した Gd が MSC の ET-1 シグナルを活性化し、石灰化・増殖 (線維化) が誘導される可能性が示唆された (上図参照)。また、腎性全身性硬化症における皮膚硬化と石灰化に対してボセンタンが有効な可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Motegi S, Okada E, Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Monma F, Suzuki T, Ishikawa O Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis. *Experimental Dermatology*, 査読あり 23(9) 2014; 664-669.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Motegi S, Okada E, Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Monma F, Suzuki T, Ishikawa O Role of endothelin-1/endothelin receptor signaling in fibrosis and calcification in nephrogenic systemic fibrosis. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology 2014 年 12 月 12 日~2014 年 12 月 14 日 Osaka

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