

セルの最高血中濃度 (Cmax) は8.3 μ M、ドセタキセルは2 μ Mである。また、各種癌細胞に対するIC₅₀はパクリタキセルで2.5nM以下、ドセタキセルで0.1~3 nMであることから、皮膚の線維芽細胞に実際に到達する濃度は0.1nM~1 μ M程度ではないかと推測される。そこで10%FBS存在下に、0.001~100nMのパクリタキセル、ドセタキセルを添加し、48時間培養後CellTiter96 AQueous one solution cell proliferation assay (Promega) を用いて細胞増殖能を検討したところ、パクリタキセルでは1nM以上、ドセタキセルで0.1 nM以上の濃度で増殖が抑制された (図1)。

2) タキサン製剤のヒト皮膚由来線維芽細胞のMMP-1, COL1A2, α -SMA mRNA発現に及ぼす影響

0.1~10nMの濃度のパクリタキセル、ドセタキセルのヒト皮膚由来線維芽細胞のMMP-1, COL1A2, α -SMA mRNA発現に及ぼす影響を検討した。MMP-1は0.1nM, 1nMで用量依存性に発現が抑制され、10nMで発現が増強された。 α -SMAは0.1nM, 1nMではmRNA発現に変化なく、10nMで発現が抑制された。COL1A2はいずれの濃度でもパクリタキセル、ドセタキセルによる影響を受けなかった (図2)。10nMにおけるMMP-1発現上昇、 α -SMA発現抑制は、濃度依存性でないことから、TXTの生理的な作用というよりも、細胞増殖の低下 (細胞死) により誘導されたものではないかと考えた。1nMまでのTXTによるMMP-1の発現抑制は濃度依存性でありTXTの作用によるものと考えられるが、COL1A2 (線維芽細胞のコラーゲン合成) や α -SMA (筋線維芽細胞への形質転換) といった

fibrogenicな遺伝子の発現増強はみられず、TXTによる皮膚硬化はTXTの線維芽細胞に対する直接的な作用が主ではないと考えられた。

3) PTXで刺激した正常ヒトPBMC培養上清による正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のI型コラーゲンmRNA発現・蛋白産生に及ぼす影響

TXTによる皮膚硬化が線維芽細胞に対する直接的な作用により生じているのではないとすると、TXTがマクロファージやリンパ球に作用して、そこから放出されたサイトカインやケモカインが線維芽細胞に働きかけて線維化病変を形成する、という従来の説が浮上してくる。そこで、TXTで刺激したヒト末梢血単核球の培養上清を線維芽細胞に添加して、線維芽細胞がfibrogenicな方向に動くか否かを検討した。

方法は図3に示した通りである。ヒト末梢血からヒト末梢血単核球 (PBMC) を分離し、12 well dishに 1×10^6 / wellずつ播種し、それぞれの濃度のTXTを添加する。24時間培養した後に、培養上清をコンフルエントの線維芽細胞の培地と置換する。24時間培養後に、培養上清と細胞層からのmRNAを回収し、リアルタイムPCR法とELISA法にてI型コラーゲンmRNA発現・蛋白産生を検討した。PTX添加PBMCの培養上清にて濃度依存性 (PTX: 0.1, 1, 10nM) にI型コラーゲンのmRNA発現、蛋白産生量は低下していた (図4)。この結果は、TXTによりPBMCから産生されるサイトカイン・ケモカインのうち、ヒト皮膚由来線維芽細胞への働きとしては、I型コラーゲンのmRNA発現、蛋白産生を抑制させるものの働きが強い、ことを示していると考えた。

4) PTXの正常ヒトPBMCのTNF- α 産生に及ぼす影響

皮膚線維芽細胞においてI型コラーゲンのmRNA発現を低下させるサイトカインとして良く知られているものにTNF- α やIFN- γ がある。特にTNF- α については強皮症患者の血清中で上昇しているとする報告の多いサイトカインであり、その線維化病変形成における役割についてはいまだ明確でないものの、強皮症の病態に重要な働きを持っていると考えられている。そこでPTXで24時間刺激したPBMCの培養上清中のTNF- α 濃度を測定したところ、PTX濃度依存性に培養上清中のTNF- α 濃度は上昇していた(図5)。IFN- γ については検出感度以下で測定できなかった。

5) PTXの正常ヒトPBMCのサイトカイン・ケモカイン産生に及ぼす影響

次に、PTXのPBMCが産生する他のサイトカイン・ケモカインを網羅的に検討するため、Human Cytokine Antibody Array Kit (R&D)を用いて、PTXで24時間刺激したPBMCの培養上清を検討した(図6)。画像をスキャナーで取り込み、Image-Jを用いて定量した。positive controlで補正して2倍以上の変化があったものは、IL-1ra、MIF、IL-13、IL-16であり、多くが強皮症患者血清中に上昇しているとする報告のあるものであった(7, 8, 9)。IL-6やMCP-1については今回のArrayでは変化を確認できなかった。

D. 考察

今回の検討では、線維芽細胞に対する直接的なfibrogenicな作用や細胞増殖作用は確認できな

かった。そのため、PBMCから産生されるサイトカインやケモカインが線維芽細胞に対してfibrogenicな働きをするのではないかと考え実験を行なったが、そこから得られた結果は予想とは反し、TXTにより刺激されてPBMCから産生されたサイトカイン・ケモカインは線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制するというものであった。この理由として、一つにはPBMCに対するTXTの濃度と作用時間が考えられる。今回線維芽細胞の増殖に大きな影響を及ぼさない濃度で実験を行なった。しかしPBMCに対してはもっと高濃度で刺激する必要があると思われる。パクリタキセルのCmaxは8.3 μ Mであり、血中半減期は6~16時間である。今回TXTで刺激したPBMCの培養上清を線維芽細胞に添加する実験で使用した濃度は10nMであり約1000倍異なる。血液中のマクロファージ、リンパ球が刺激されることを考えると、Cmaxに近い濃度でPBMCを短時間刺激する必要があるであろう。今後、条件を見直して検討を進めていく予定である。

また、今回出た結果の別の解釈として、病的な皮膚線維化病変を形成している細胞は元々皮膚に存在している線維芽細胞ではない可能性(ターゲットとすべき細胞の選択を誤っている可能性)がある。すなわち、今回の実験では皮膚硬化病変を形成しているのであれば、どのような機序であっても最終的には皮膚線維芽細胞からのコラーゲン産生が増加しているはずであるという仮説の元に実験を進めてきた。しかし、TXTによる皮膚硬化病変の形成機序が、元々皮膚に存在する線維芽細胞によるものではなく、例えばpericyteやfibrocyte、間葉系幹細胞からの病的な線維芽細胞様細胞への分化誘導や、それ

らの細胞自体からの病的なコラーゲン産生によるものである可能性もある。今後、皮膚線維芽細胞以外のコラーゲンを産生し得る細胞や、線維芽細胞様細胞に分化し得る細胞についての検討も必要になってくるのかもしれない。

E. 結論

TXT による皮膚硬化では、TXT による直接的な線維芽細胞に対する作用が主体の可能性は低いと考えられた。マクロファージやリンパ球から放出されるサイトカインが皮膚硬化病変形成に関与しているものと考えられるが、その作用機序については今回の検討では明らかに出来なかった。しかし、上昇するサイトカインパターンは強皮症と近い可能性もあり、TXT による皮膚硬化の機序を明らかにすることは、全身性強皮症の病態解明にも役立つのではないかと考えている。

F. 文献

1. Battafarano DF, Zimmerman GC, Older SA, Keeling JH, Burris HA : docetaxel (Taxotere) associated -like changes of the lower extremities, *Cancer*, 76 : 110-115, 1995.
2. 築場広一, 伊藤宗成, 谷戸克己, 川瀬正昭, 中川秀己, 小林直 : タキサン製剤による強皮症様皮膚硬化, *日本皮膚科学会雑誌*, 116 巻: 201-207, 2006
3. 久保正英, 蘆田龍一, 宮本礼子, 師田暁, 吉本賢隆 : Docetaxel Hydrate により皮膚硬化をみた 1 例, *皮膚科の臨床*, 49 巻: 599-602, 2007
4. Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, Boulamatsis D : Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes, *British Journal of Cancer*, 87 : 21-27, 2002
5. Yamamoto T, Nishioka K. : Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Experimental Dermatology* 14: 81-95, 2005
6. Shibusawa Y, Negishi I, Tabata Y, Ishikawa O.: Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of bleomycin-poly(L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology (Oxford)*. 47:454-457. 2008
7. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, Chen G, Breen P, Buckner JH, Molitor JA, Elkon KB, Schwartz SM. : Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum*. 58 : 1465-1474. 2008
8. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganeli S, Romagnoli R, Ietta F, Paulesu L, Miracco C, Cintonino M, Marcolongo R. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 62: 460-464. 2003
9. Spadaro A, Rinaldi T, Ricciari V, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in autoimmune rheumatic diseases: relationship with the autoantibody profile. *Clin Exp Rheumatol*. 20:213-6. 2002

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

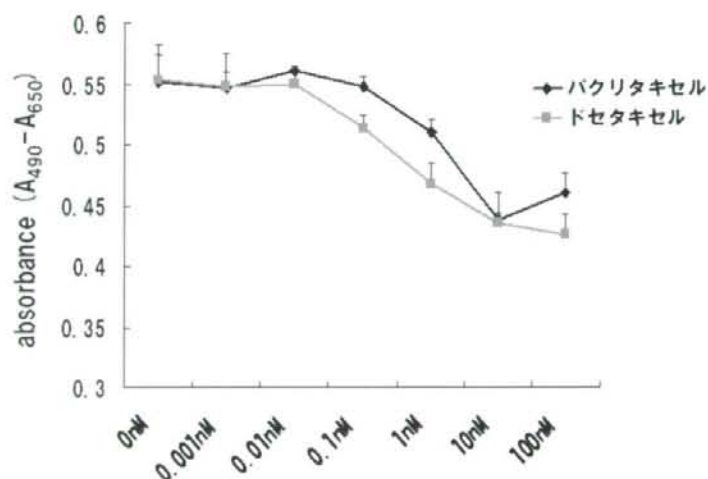


図1：タキサン製剤によるヒト皮膚由来線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響

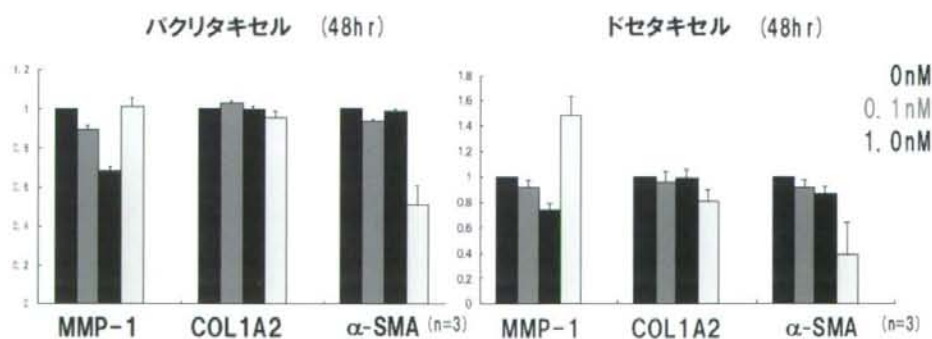


図2：タキサン製剤によるヒト皮膚由来線維芽細胞のMMP-1, COL1A2, α-SMA mRNA発現に及ぼす影響

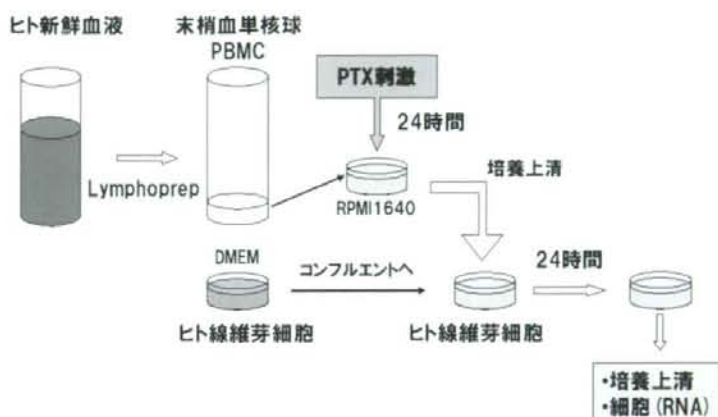


図3：PTXで刺激した正常ヒトPBMC培養上清による正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のI型コラーゲン産生に及ぼす影響（方法）

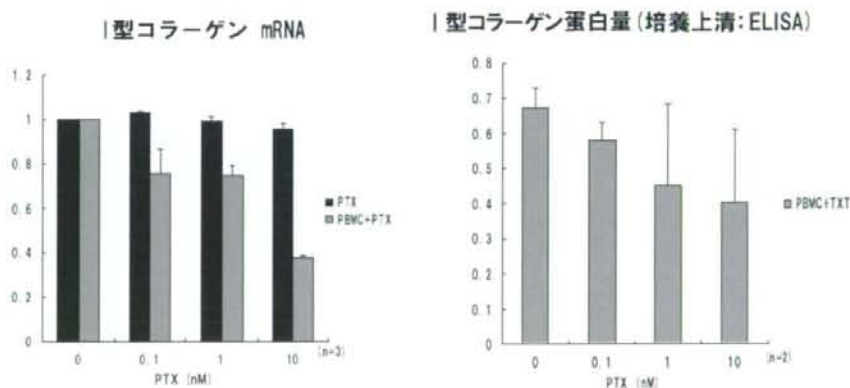


図4：PTXで刺激した正常ヒトPBMC培養上清による正常ヒト皮膚由来線維芽細胞のI型コラーゲン産生に及ぼす影響（結果）

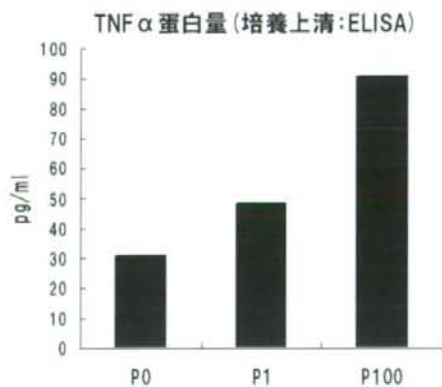
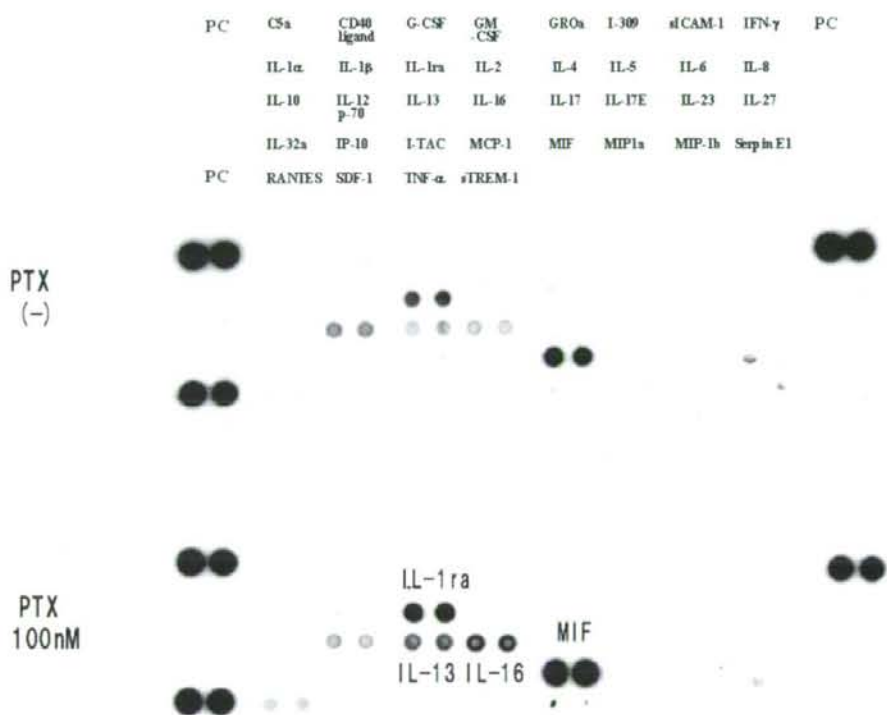


図5：PTXによる正常ヒトPBMCのTNF-α産生に及ぼす影響



Human Cytokine Antibody Array Kit (R&D)

図6 : PTXによる正常ヒトPBMCのサイトカイン・ケモカイン産生に及ぼす影響

ガドリニウムによる皮膚線維化・石灰化形成機序についての検討

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
協力者 岡田悦子 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教
協力者 山中正義 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教
研究代表者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授

研究要旨

ガドリニウム造影剤を腎不全患者、特に透析患者に投与すると、全身諸臓器の線維化・石灰化をきたす腎性全身性線維症(Nephrogenic systemic fibrosis: NSF)を発症することが知られている。今回我々は、ガドリニウムの皮膚線維芽細胞、前骨芽細胞(MC3T3-E1)、ラット破骨細胞に及ぼす影響について検討した。ガドリニウムは線維芽細胞のI型コラーゲン発現・産生を増強しなかったが、MC3T3-E1の石灰化を促進し、ラット破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を促進した。NSFにおける石灰化病変の形成はガドリニウムによる骨芽細胞、破骨細胞の分化誘導によるものと考えられるが、線維化については線維芽細胞のコラーゲン合成に働きかけるものではない可能性が示唆された。

A. 研究目的

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(1)。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(2)。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(3,4)。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(5)。

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細胞が能動的な形質転換(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 ではガドリニウムが石灰化・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。

そこで今回我々は、骨芽細胞に分化し得る形質をもつ細胞 (MC3T3-E1: 前骨芽細胞) を用いて、ガドリニウムが骨芽細胞分化を誘導しうるか否かを検討することから実験を開始した。

ガドリニウムによる石灰化・線維化のメカニズムは、強皮症にも共通するメカニズムがあるはずであり、今回の結果は強皮症研究にもフィードバックしたいと考えている。

B. 研究方法

1) 細胞培養

MC3T3-E1 (前骨芽細胞) は理研より、ラット破骨前駆細胞はプライマリーセル社より購入した。ヒト真皮由来線維芽細胞は、当科にて患者の同意を得た上で生検時に得られた正常部皮膚を explant culture 法により初代培養したものを使用した。

2) cell proliferation assay

96 well plate に MC3T3-E1 ないしヒト真皮由来線維芽細胞を播種し、24 時間培養後、目的とする濃度の GdCl₃ を添加し、48 時間ないし 60 時間後

に CellTiter96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega)により細胞増殖能を測定した。

3) Alizarin Red 染色

24 well plateにMC3T3-E1を 7.5×10^4 /wellで播種し、24時間培養後、目的とする濃度のGdCl₃を添加した培地で培養。培地交換は週2回行ない、1週間ないし2週間培養。培養液を除去後、PBSで1回洗浄、冷70%エタノールを加え、4°Cで1時間固定。蒸留水で3回洗浄後、40mM Alizarin Red S (pH4.2, in deionized water)を500 μ l加え、緩やかに振盪しながら15分間染色。蒸留水で5回洗浄、PBSで1回洗浄した後、写真撮影。(定量) 10% cetylpyridium chrolide (pH7.0, in 10mM sodium phosphate)を500 μ l加え、15分間緩やかに振盪後、吸光度 (562nm) を測定。

4) TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphate)染色

プライマリーセル社より購入したラット破骨前駆細胞を96 well plateに 4×10^4 /wellで播種。目的の濃度のGdCl₃を加えた培地 (M-CSF50ng/ml, RANKL50ng/ml含有) で7日間培養 (培地交換は週2回) 後、プライマリーセル社のTRAP staining kitを使用してTRAP染色を行なった。

培養液を除去後、PBSで1回洗浄、固定液50 μ lを加え、室温で5分間固定。固定液を除去し、蒸留水で3回洗浄後、発色液を50 μ lを加え37°Cで20-60分間加温した。十分に発色したことを確認し、蒸留水で洗浄、乾燥した後、写真撮影した。

5) pit formation assay

96 well plateに象牙切片を置き、1時間培地に馴染ませたあと、ラット破骨前駆細胞を象牙切片上に 8×10^4 /wellで播種した。目的の濃度の

GdCl₃を加えた培地 (M-CSF50ng/ml, RANKL 50ng/ml含有) で14日間培養 (培地交換は週2回) 後、象牙切片を回収。回収した象牙切片は水道水で洗浄後、5mlの1Mアンモニア水中で超音波処理。水道水で洗浄後、ヘマトキシリン液で1分間染色。十分に水洗した後、風乾して、顕微鏡で骨吸収窩を観察した。

6) リアルタイムPCR法

培養細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて mRNA を抽出し、Random primer を用いた逆転写反応にてcDNAを合成し、リアルタイムPCR法を行なった。Applied Biosystems 社の 7300 Real time PCR System を用いた Taqman Gene Expression Assays にて、COL 1 A2, GAPDH (内部標準) の mRNA 発現量を定量した。

(倫理面への配慮)

皮膚組織検体は、診断確定のための生検時に患者から得たものを使用した。皮膚生検前に研究の使用目的、治療の成果には無関係であること、プライバシーの保護を十分に説明し、インフォームドコンセントを文書で得た。皮膚組織検体より初代培養して得た線維芽細胞は、患者名、カルテ番号を記載せず、専用の番号で保存してあり、カルテとの照合も不可能なシステムになっている。今回の研究は、倫理面においても十分に配慮したものである。

C. 研究結果

1) ガドリニウムの前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の細胞増殖に及ぼす影響

まず今回の実験を始めるにあたって、使用するガドリニウムの至適濃度を決定する必要があった。現在までのところ、NSF患者の体内での

ガドリニウムの動態は不明であり、臨床面から濃度を決定することは不可能である。そこでガドリニウムについて文献を検索したところ、ガドリニウムには肝臓のクッパー細胞の機能を抑制する作用があり、多くの動物実験に用いられていることが判った(6)。ラットを用いたin vivoの実験が多かったが、in vitroでマクロファージにガドリニウムを作用させている報告もあり、それらの文献で使用しているガドリニウムの濃度を参考にした(7)。過去の報告では3 μM ~ 3000 μMのGdCl₃をマクロファージに作用させているが、100 μM以上の濃度では培地に溶解できなかつたため、0.01 μM ~ 100 μMのGdCl₃の破骨前駆細胞 (MC3T3-E1) の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。

その結果、GdCl₃は通常の増殖培地 (NM : normal medium) 、骨分化誘導培地 (OM : osteogenic medium) いずれの培地中でも、100 μMでは有意に細胞増殖を促進していたが、0.01 μM ~ 10 μM の濃度ではMC3T3-E1の細胞増殖に影響を与えなかつた (図1)。

2) ガドリニウムは骨分化誘導培地中においてのみ前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

次に、ガドリニウムの前骨芽細胞から骨芽細胞への分化に及ぼす影響をAlizarin red 染色を用いて検討した。その結果、ガドリニウムは0.1 μM ~ 10 μMの濃度でOMにおいてのみ、用量依存性に骨芽細胞への分化を促進していた (図2、図3)。OMは、NMにβ-glycerophosphate と ascorbate-2 phosphateを添加したものであるが、リン酸を多く含んだ培地であり、腎不全患者の生体内環境 (高リン血症) と類似している。細胞培養系においてOM中でのみガドリニウムに

より石灰化が誘導されるという現象は、腎不全患者のみにNSFが生じるという臨床的事実に合致する。

3) ガドリニウムは高リン培地中において前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

ガドリニウムによる石灰化にはリンの濃度が重要であることを証明するために、NMに無機リンを添加した培地を用いて骨芽細胞への分化を検討した。NM中にもリンは含まれており、NMとして使用しているMEM- α 中には0.9mM (2.7mg/dl) 含まれている。健康人の血中リン濃度は2.9~4.5mg/dlであり、NM中には健康人血液中の正常下限程度のリンが含まれていることになる。10 μ Mのガドリニウムを含んだNMに、1、2、4mMの無機リンを添加し骨芽細胞への分化を検討した。その結果、2.7mg/dl、5.7mg/dlの無機リン濃度では分化は誘導されなかったが、8.7 mg/dl、14.7mg/dlの無機リン濃度で骨芽細胞への分化が誘導された(図4)。日本透析医学界による血清リン濃度の管理目標値は3.5~6.0mg/dlであり、今回の我々の結果(5.7mg/dlでは石灰化が誘導されず、8.7 mg/dlで石灰化が誘導された)とも非常によく合致する。

4) ガドリニウムは破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を促進する。

ガドリニウムは肝臓のクッパー細胞の食食能を抑制することが知られており、動物実験でクッパー細胞の食食能を抑制するための試薬として広く用いられている(6)。破骨細胞に対しても、その食食能を抑制、ないし、破骨細胞への分化を抑制することにより、石灰化を促している可能性がある。しかしながら、血管石灰化をはじめとする異所性石灰化では、破骨細胞の分化が

誘導されている(骨代謝が活性化されている)とする報告もあり、仮説を立てにくい。

そこで、ラット破骨前駆細胞を用いてガドリニウムが破骨細胞の分化にどのような影響を与えているのかをTRAP染色を用いて検討した。その結果、ガドリニウムは用量依存性に破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を誘導していることが明らかになった(図5)。

5) ガドリニウムにより誘導された破骨細胞は骨吸収能を有している。

TRAP染色によりガドリニウムは破骨前駆細胞を破骨細胞への分化を誘導していることを確認した。しかしながら、TRAP染色はあくまでも形態的に破骨前駆細胞が多核で大型の細胞に変化した様子を確認しただけであり、この細胞が破骨細胞としての機能を有しているかどうかは不明である。特に、ガドリニウムは肝臓のマクロファージであるクッパー細胞の食食能を抑制することが知られていることから、ガドリニウムが食食能(骨吸収能)を持たない破骨細胞(様細胞)を誘導している可能性もあるのではないかと考えた。そこで、pit formation assayを用いて骨吸収能を検討した。pit formation assayは破骨細胞を骨切片上で培養し、骨吸収窩を観察する方法である。その結果、ガドリニウムを添加していないものに比べてガドリニウムを添加した切片の方が骨吸収窩の形成が目立つようであったが、同じ条件でも全く吸収窩がみられない切片があったり、同じ切片上でも全く吸収窩が形成されない部位があるなどの差が大きく、定量的な検討は行なえなかった。しかし、ガドリニウムにより誘導された多核細胞が食食能(骨吸収能)を有することは確認できたことか

ら、ガドリニウムにより破骨前駆細胞から誘導された多核細胞は骨吸収能を持つ破骨細胞である、ということは確認できた(図6)。

6) ガドリニウムはヒト皮膚由来線維芽細胞の増殖を促進する。

次に、NSFにおける線維化のメカニズムを明らかにするために、ガドリニウムのヒト皮膚由来線維芽細胞に及ぼす影響について確認した。はじめに、ガドリニウムのヒト皮膚由来線維芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討したところ、 $5\mu\text{M}$ ~ $100\mu\text{M}$ の GdCl_3 添加により、ヒト皮膚由来線維芽細胞の増殖は有意に増加していた(図7)。

7) ガドリニウムはヒト真皮由来線維芽細胞のI型コラーゲンmRNA発現を抑制する。

次に、ガドリニウムが線維芽細胞に直接作用してコラーゲン産生を促進しているのか否かを知るために、リアルタイムPCR法にてI型コラーゲンmRNA発現量を測定したところ、 GdCl_3 はI型コラーゲンmRNAを抑制していた(図8)。骨分化誘導培地中でのガドリニウムの効果も確認したが、こちらでは一定の傾向はみられなかった(図8)。骨分化誘導培地はそれ自身がI型コラーゲンの発現を増強するものであり、今回一定の傾向が得られなかったのは、ガドリニウムがI型コラーゲン発現に及ぼす作用よりも骨分化誘導培地による作用の方が強かったためではないかと考えた。

D. 考察

今回の検討により、ガドリニウムは骨芽細胞および破骨細胞の分化を誘導することにより石灰化病変を形成していると考えられた。更に、この石灰化の誘導には高濃度のリンが必要であることが明らか

となり、これはNSFが腎不全患者のみに生じる理由の一つと考えられる。NSF患者の治療にあたってはガドリニウムの除去に加えて、リン濃度を下げることが重要であることが示唆された。今回、NSFにおける線維化病変の形成機序については明らかにできなかった。しかし、石灰化が骨芽細胞および破骨細胞の分化誘導によって生じていることを考えると、線維化も線維芽細胞・線維芽細胞様細胞の分化誘導により生じているものと考えられる。皮膚の線維化病変を形成する主たる細胞の起源については、いまだ明らかになっていないが、骨芽細胞については間葉系幹細胞であることが判っている。間葉系幹細胞は骨のほか、皮膚周辺にある脂肪や筋肉、軟骨、腱などに分化する細胞であり、間葉系幹細胞自体が線維芽細胞様細胞であることを考えると、間葉系幹細胞が皮膚の線維化の起源になっている可能性が考えられる。また今回の検討により、ガドリニウムは破骨細胞の分化も誘導していることが明らかになったが、破骨細胞の起源は骨髄由来単球系細胞であり、NSFの線維化病変に関与しているのではないとする報告(8)のあるfibrocyteの起源も骨髄由来単球系細胞であることから、ガドリニウムは骨髄由来単球系細胞に対しても線維化・石灰化を誘導するような方向に分化を促しているものと考えられる。

線維化と石灰化を誘導する中心的サイトカインと考えられているのは、TGF- β スーパーファミリーに属するTGF- β とBMPであり、共通するシグナル伝達経路(Smad pathwayなど)を有していることを考えると、線維化と石灰化は共通の誘因(NSFではガドリニウム)で起こりうるものと考えられる。また、BMPは間葉系幹細胞からの骨分化を誘導すると同時に、

筋細胞への分化を抑制することが知られており、NSF患者の筋力低下・体重減少などの臨床症状も、ガドリニウムによる間葉系幹細胞からの筋細胞や脂肪細胞への分化の抑制という作用による可能性がある。線維化・石灰化・筋力低下・体重減少といった間葉系幹細胞の分化の異常から説明可能なこれらの症状は、強皮症にも共通する臨床症状であり、今後NSFにおける線維化病変形成機序を明らかにすることは、強皮症の病態解明のための大きな手がかりになるのではないかと考えている。

E. 結論

NSF患者では、ガドリニウムが骨芽細胞および破骨細胞の分化を誘導することにより石灰化病変を形成していることが明らかになった。NSFと全身性強皮症の臨床症状には、線維化・石灰化・筋力低下・体重減少など共通する点も多く、NSFにおける線維化病変形成機序を明らかにすることは、強皮症の病態解明のための大きな手がかりになるのではないかと考えられた。

F. 文献

1. Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, Leboit PE. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet* 2000; 356: 1000-1001.
2. Nagai Y, Hasegawa M, Shinmi K, Kishi C, Tsushima Y, Endo K, Okabe K, Suzuki K, Ishikawa O. Nephrogenic systemic fibrosis with multiple calcification and osseous metaplasia. *Acta Derm Venereol.* 2008; 88: 597-600.

3. Edsall L, English J, Teague M, Patterson JW. Calciphylaxis and metastatic calcification associated with nephrogenic fibrosing dermatopathy. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 247-253.
4. Ruiz-Genao D, Pascual-Lopez M, Fraga S, Aragues M, Garcia-Diez A. Osseous metaplasia in the setting of nephrogenic fibrosing dermatopathy. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 172-175.
5. Vernet D, Nolazco G, Cantini L, Magee TR, Qian A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Evidence that osteogenic progenitor cells in the human tunica albuginea may originate from stem cells: implications for peyronie disease. *Biol Reprod.* 2005; 73: 1199-210.
6. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, Burchardt ER, Rippe RA, Thurman RG. Attenuation of CCl4-induced hepatic fibrosis by GdCl3 treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281:G200-7.
7. Kubota Y, Takahashi S, Takahashi I, Patrick G. Different cytotoxic response to gadolinium between mouse and rat alveolar macrophages. *Toxicol In Vitro.* 2000 Aug; 14: 309-19.
8. Bucala R. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. *J Am Coll Radiol.* 2008; 5: 36-9.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

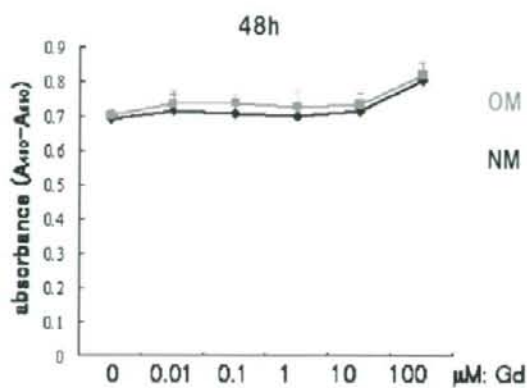


図1 : Gd 添加による前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の cell proliferation assay (48時間後 : MTS 法)

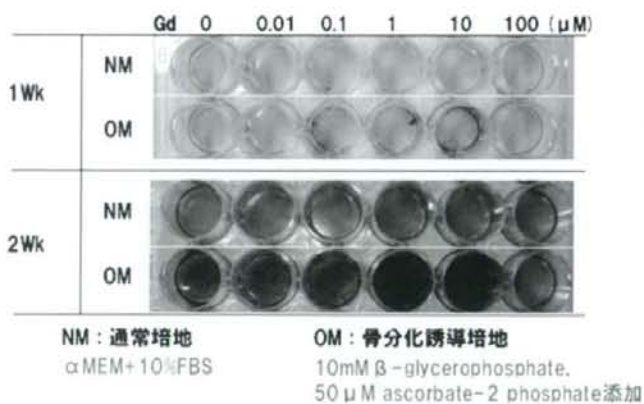


図2 : Gd 添加による前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の骨芽細胞分化に及ぼす影響 (Alizarin Red 染色)

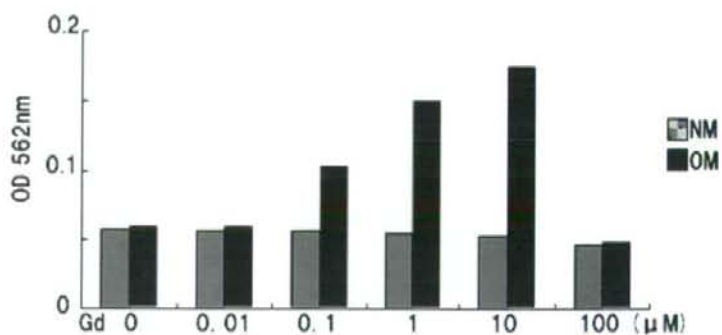


図3 : Gd 添加による前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の骨芽細胞分化に及ぼす影響 (1週間後 : Alizarin Red 染色定量)

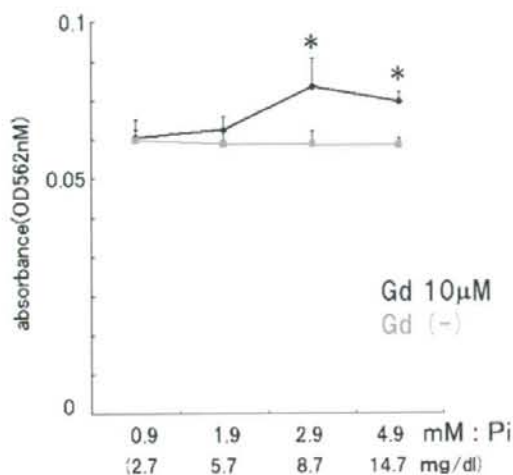


図4：無機リン添加培地中における Gd 添加による前骨芽細胞 (MC3T3-E1) の骨芽細胞分化に及ぼす影響 (1 週間後：Alizarin Red 染色定量)

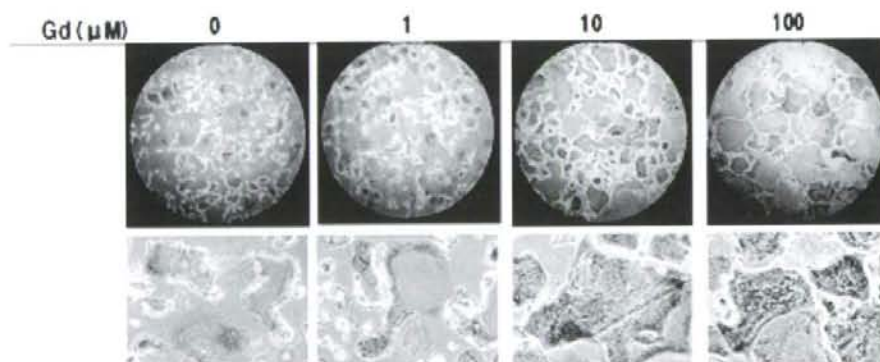


図5：Gd 添加による破骨前駆細胞の破骨細胞分化への影響 (TRAP 染色)

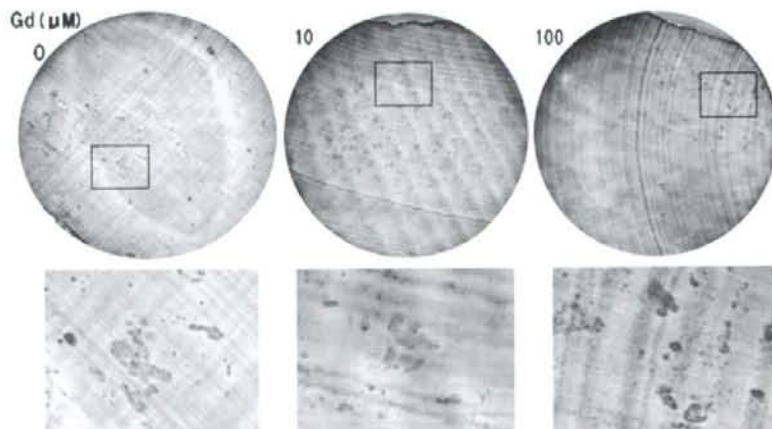


図6：破骨細胞の骨吸収能に及ぼす影響 (Pit formation assay)

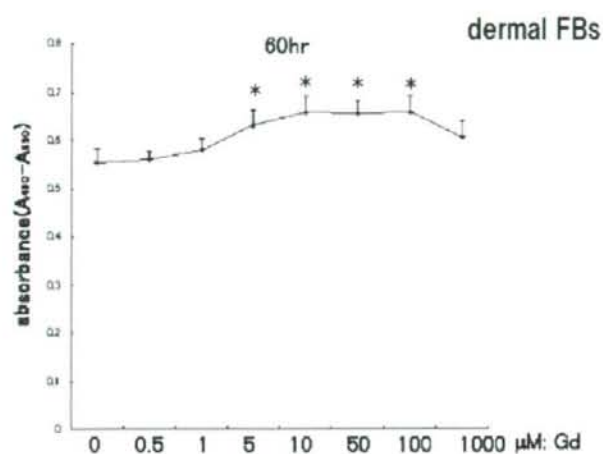


図7：Gd添加によるヒト真皮由来線維芽細胞の cell proliferation assay (60時間後：MTS法)

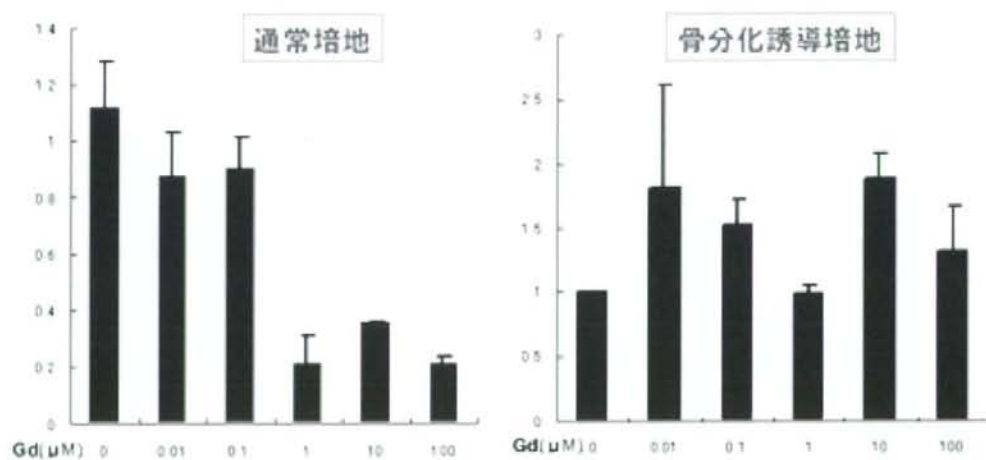


図8：ヒト真皮由来線維芽細胞に対する Gd の影響 COL1A2 mRNA 発現量 (24時間後：real-time PCR法)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

強皮症皮膚由来線維芽細胞における alpha2(I) collagen 遺伝子転写活性化に寄与する調節配列の検討

研究分担者 尹 浩信 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学分野教授
協力者 神人正寿 熊本大学大学院医学薬学研究部形成外科学分野講師

研究要旨

汎発性強皮症患者皮膚由来線維芽細胞においては alpha2(I) collagen 遺伝子の転写活性が上昇している。今回我々はその活性化に関与する転写制御領域および転写因子を同定した。

転写活性上昇には Sp1、Ets 及び Smad 結合部位を含む領域が必要であり、これらの結合部位の特異的変異導入により転写活性の上昇は抑制された。よって本症における転写活性上昇にはこれらの転写因子の相互作用が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

汎発性強皮症の病因として、主に線維化、免疫異常、血管障害などのファクターが挙げられている。このうち線維化は主に I 型 collagen の転写レベルでの増加が原因で、この増加には TGF-beta1 が誘導するシグナル、特に Smad の系が関与していると考えられている。alpha2(I)collagen プロモーター遺伝子においては、TGF-beta が receptor に結合すると、Smad2 および Smad3 を誘導し、Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。この複合体は target 遺伝子に結合し、さらには Sp1 などの他の転写因子とも相互作用して転写活性を増強する。過去の報告においては、(i) 強皮症患者皮膚由来線維芽細胞では、TGF-beta レセプターの強発現が見られる (ii) TGF-beta シグナルを中和抗体あるいはアンチセンスオリゴを用いて阻害した場合、alpha2(I)collagen 遺伝子の発現が抑制される (iii)

Smad3 のリン酸化あるいは DNA 結合能が増加している (iv) alpha2(I) collagen 遺伝子の増加にもかかわらず TGF-beta に対する反応性は低下している。これらの結果をもとに、我々は強皮症由来線維芽細胞において autocrine TGF-beta signaling が存在しているのではないかと仮説を立てた。

過去に Kikuchi らは、alpha2(I) collagen 遺伝子プロモーターの解析を行い、正常皮膚線維芽細胞における同プロモーター上の TGF-beta responsive element と、強皮症皮膚線維芽細胞における同プロモーター活性上昇の責任配列はプロモーターの -376~-108bp にみられることを報告した[1]。よって、強皮症皮膚線維芽細胞にみられる内因性の alpha2(I) collagen 遺伝子プロモーター活性の上昇は TGF-beta 依存性の経路に寄ることが裏付けられた。しかし、さらなる責任配列の同定には未だ至っていない。

今回我々は、プロモーター領域の 5'-deletion 変異や部位特異的変異を用いて、汎発性強皮症における内因性の同遺伝子プロモーター活性上昇の分子機構を詳細に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

患者の同意および本学倫理委員会の承認を得た上で、diffuse cutaneous type の強皮症患者 5 名の前腕由来の皮膚線維芽細胞および正常人 5 名由来の皮膚線維芽細胞を使用した。患者検体の取り扱いには、文部科学省および厚生労働省の指針を遵守して行った。

2) 免疫プロット法

培養細胞の細胞抽出液をポリアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 Smad3 抗体、抗 Sp1 抗体および抗 Ets1 抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて発色させた。

3) DNA affinity precipitation 法

alpha2(I) collagen 遺伝子プロモーターの-307~-269bp に相当する配列をもち、Sp1 および Ets1 結合配列を有するセンス(5'側をビオチン化)およびそのアンチセンスオリゴをアニールして二本鎖 DNA を作成する。さらに同様に Smad の結合配列である CAGA motif を 3 回繰り返した配列を有するセンス及びアンチセンスオリゴをアニールして二本鎖 DNA を作成する。正常人および強皮症患者皮膚由来線維芽細胞より得られた細胞抽出液を poly(dI-dC)、二本鎖 DNA、さらに streptavidin-agarose と反応させ、二本鎖 DNA に結

合した転写因子を免疫プロット法にて検出する。

4) chloramphenicol acetyltransferase (CAT)法

subconfluent の状態の線維芽細胞に、FuGENE6 (Roche) を用いて transient transfection を行った。pSV-beta-galactosidase vector を用いて、導入効率を補正した。細胞抽出液に butyl-CoA と [¹⁴C]-chloramphenicol を加え、Butylated chloramphenicol を抽出し、液体シンチレーションにてカウントした。

-3500bp の alpha2(I) collagen 遺伝子プロモーター全長と CAT レポーター遺伝子を結合させたプラスミドを元に、連続 5' 欠失配列を有するプラスミドを作成し、CAT 法に使用した。さらに、プロモーターの-353~+58bp 部分を有する CAT プラスミドを元に Smad, Sp1 および Ets1 の結合配列それぞれに部位特異的変異を導入したプラスミドも使用した。

C. 研究結果

1) 正常および強皮症皮膚線維芽細胞における alpha2(I) collagen 遺伝子プロモーター活性

まず、-3500bpのalpha2(I)collagen遺伝子全長にCATレポーター遺伝子を結合させたプラスミド(-3500COLA12/CAT)を正常および強皮症由来線維芽細胞に強発現し、alpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性を比較したところ、強皮症由来線維芽細胞では正常細胞の約3倍程度の上昇を示していた(図1)。これは過去の報告と合致しており、強皮症由来線維芽細胞においてはプロモーター活性が内因性に上昇していることを示していると思われた。

2) 強皮症由来線維芽細胞におけるプロモーター

活性上昇の責任配列の検討

次に、この内因性の転写活性上昇の原因となるプロモーター上の転写調節責任領域を調べるため、連続5'欠失配列を有するcollagen遺伝子プロモータープラスミドを正常および強皮症由来線維芽細胞に強発現した。強皮症由来線維芽細胞でみられるプロモーター活性の上昇は-353bpまでプロモーターを短縮しても依然認められたが、さらにプロモーターを-264bpまで短縮した際に有意な減弱が見られた(図2)。加えて-186bpまで短縮したところさらにプロモーター活性の上昇は減弱し、正常細胞と同程度にまでプロモーター活性が低下した。よって強皮症皮膚線維芽細胞におけるalpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性化に関わる転写調節領域はプロモーターの-353~-186bpに存在すると考えられた。

3) 強皮症由来線維芽細胞におけるプロモーター活性上昇に関わる転写因子の検討

前述のように、強皮症皮膚線維芽細胞におけるalpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性化の責任配列はプロモーターの-353~-263bp領域および-263~-186bp領域の両者に存在する。前者の領域にはC/EBPbeta、Ets familyおよびSp1/3などの転写因子の結合部位が存在する(図3)。一方、後者の領域にはSmadやAP-1などの転写因子の結合領域が存在する。これらの転写因子のプロモーター活性化への関与を検討するため、プロモーターの-353~+58bp部分を有するCATプラスミドを元にSmad、Sp1およびEts1の結合配列それぞれに部位特異的変異を導入したプラスミドを正常および強皮症由来線維芽細胞に強発現し、プロモーター活性の変化を調べた(図3)。Smad結合部位の部位特異

的変異(SBE)により、正常線維芽細胞と比較した場合の強皮症由来線維芽細胞におけるプロモーター活性の増加の割合は約40%ほど減弱した。同様に、EtsおよびSp1/3結合領域の部位特異的変異(EBSおよびSBS)によりプロモーター活性の増加は約30%減弱したが、複数の変異を同時に導入したところ、単独の変異にくらべ軽度の低下にとどまったため、これらの転写因子は互いに完全に独立せず互いに依存しながら転写調節を行っていると考えられた。よって、これらの転写因子が強皮症におけるプロモーター活性化には不可欠であり、これらの転写因子が相互に協調して転写を活性化している可能性があると考えられた。

4) 強皮症皮膚線維芽細胞におけるSmad3、Sp1およびEts1のDNA結合能

最後にこれらの転写因子がどのように転写活性の調節に関与しているかを確かめるため、DNA Affinity Precipitation Assayを用いてそれぞれのDNA結合能を正常および強皮症由来線維芽細胞で比較した。その結果、強皮症由来線維芽細胞においては正常に比べSmad3およびEts1のDNA結合能が増加していたが、Sp1の結合能には変化が見られなかった(図4)。

D. 考案

前述のように、強皮症由来線維芽細胞におけるI型コラーゲンの転写レベルでの発現増加はautocrine TGF-beta signalingの結果である可能性がある。一方、近年SmadがTGF-betaの重要なメディエーターであることが示されて以来、そのようなalpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性の増加はすべてSmadの働きによるものと考えられていた。

しかし、今回行った我々の連続5'欠失配列を有するプラスミドを用いたプロモーター解析により、Smad結合領域(SBE)の存在する-263~-186bp領域のみならず、-353~-263bp領域にも責任領域が存在することが判明した。この結果は、SBEの部位特異的変異を導入しても、alpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性のTGF-beta刺激に対する反応は依然として50%程度残存するという過去の報告に合致するものである[2]。最近、alpha2(I) collagenを含む細胞外マトリックス遺伝子の転写制御において、Smad以外にTGF-beta刺激を媒介するシグナル経路 (PKC-delta, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, geranylgeranyl transferase Iおよびp38など)の存在(Non-Smad経路)が相次いで報告されている。したがって、Smadが中心的な役割を果たしているものの、他の転写因子もまた強皮症由来線維芽細胞におけるalpha2(I) collagen遺伝子の転写活性化に関与している可能性が高いと考えられた。

過去の報告において、Ets1はalpha2(I) collagen遺伝子プロモーターに結合し、その活性を増加させるといわれている[3]。一方、KuboらはEts1の発現量は正常および強皮症由来線維芽細胞において変化ないと報告している[4]。我々の検討によって、強皮症ではEts1の発現量ではなくプロモーターへの結合能が増加していることが確かめられた。TGF-beta刺激によりEts1のDNA結合能が増加するといわれているため、我々の結果は本症におけるautocrine TGF-beta signalingの存在を裏付けるものと考えられる。

部位特異的変異の導入による検討において、Sp1はSmadと同様、プロモーター活性の上昇に関与していることが確かめられた。一方、DNA

affinity precipitation法を用いたSp1の結合能の評価では正常および強皮症由来線維芽細胞で変化が見られなかった。よってSp1は発現量やDNA結合能に変化をきたすことなくプロモーター活性を活性化していると考えられる。過去の報告のごとく、本症ではSp1のリン酸化が増加することで転写活性を変化させている可能性がある[5]。本検討に加え、正常線維芽細胞ではTGF-beta刺激によるalpha2(I) collagen 遺伝子プロモーターの活性化にはSp1,Smad3とEts1の3者のシナジスティックな作用が必要であることと[6]、本症においてこれらの転写因子の相互作用が増加していること[7]、さらにはこれらの転写因子の結合部位が近接していることを考慮すると、本症におけるalpha2(I) collagen遺伝子プロモーター活性の上昇にはこれらの転写因子の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

本症の治療にはautocrine TGF-beta signalingの阻害が不可欠であるが、そのターゲットとしてこれらの転写因子に関する更なる研究が必要であると考えられた。

F. 文献

1. Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 45-50.
2. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K: Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in

- normal and scleroderma fibroblasts, *J Immunol* 2004;172: 7123-7135.
3. Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M, Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta, *J Biol Chem* 2002; 277: 20399-20408.
4. Kubo M, Czuwara-Ladykowska J, Moussa O, Markiewicz M, Smith E, Silver RM, Jablonska S, Blaszczyk M, Watson DK, Trojanowska M: Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin, *Am J Pathol* 2003; 163: 571-581.
5. Ihn H, Tamaki K: Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of the type I collagen gene, *Arthritis Rheum* 2000; 43:2240-2247.
6. Zhang W, Ou J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F: Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 modulates transforming growth factor-beta1 stimulation of alpha2(I) collagen (COL1A2) transcription, *J Biol Chem* 2000; 275:39237-39245.
7. Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K: Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts, *Rheumatology* 2006; 45: 157-165.

G. 研究発表

1. 論文発表

Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K:

Potential regulatory elements of the constitutive up-regulated alpha2(I) collagen gene in scleroderma dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343: 904-909

2. 学会発表

H21 年度強皮症研究会議

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし