

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K20652

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来破骨細胞分化抑制ペプチドの作用機序と炎症性骨吸収抑制効果の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms for the inflammatory bone resorption by an osteoclasts differentiation inhibitory peptide derived from mesenchymal stem cells.

研究代表者

菊池 恵美子(青松恵美子)(Kikuchi, Emiko)

岩手医科大学・歯学部・任期付助教

研究者番号：50733854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉形幹細胞(MSC)由来ペプチドSCRG1による破骨細胞分化抑制効果や炎症性骨吸収に対する作用メカニズムについて検証した。組み換えマウスSCRG1 (rmSCRG1)を破骨細胞前駆細胞Raw264.7に作用させ、細胞内シグナル伝達経路や遺伝子発現を検証した。その結果、rmSCRG1はERK1/2のリン酸化を有意に促進した。またmrSCRG1はLPS誘導性ケモカインCCL22の発現を有意に抑制するとともにケモカイン受容体CCR7の発現を促進した。したがって、炎症部位に集積したMSCから分泌されたSCRG1はマクロファージに作用して炎症並びにそれに引き続く炎症性骨吸収を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において破骨細胞分化抑制効果におけるSCRG1の作用点が明らかになることで、SCRG1を利用したペプチド製剤の開発や、シグナル伝達因子をターゲットにした薬剤の開発にも貢献できる。また破骨細胞分化を制御する分子メカニズム解明の一助となるだけでなく、歯周炎や慢性関節リウマチなど炎症性骨吸収を伴った疾患の治療法の確立にも寄与するものである。一方、歯科矯正治療においては圧迫側の破骨細胞分化制御機構を分子レベルで解明することができると、より効率的な矯正治療の実施へと繋がるのが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have examined the mechanism for osteoclast differentiation and inflammatory bone resorption by an osteoclasts differentiation inhibitory peptide, scrapie-responsive gene 1 (SCRG1), derived from mesenchymal stem cells (MSC). Mouse macrophage-like Raw264.7 cells as the osteoclast precursor were investigated activation of the intracellular signal transduction pathways and gene expression analysis after treatment with recombinant mouse SCRG1 (rmSCRG1). As a result, rmSCRG1 was significantly enhanced the phosphorylation of ERK1/2. In addition, mrSCRG1 was promoted the expression of chemokine receptor, CCR7, not only reduced the expression of LPS-induced chemokine, CCL22. Therefore, these results strongly suggested that SCRG1 secreted from MSC in the inflammatory tissues suppress the proinflammation and inflammatory bone resorption through a receptor complex, BST-1/ -integrin on the cell surface and activation of ERK1/2 of macrophages.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：間葉系幹細胞 破骨細胞 炎症性骨吸収

1. 研究開始当初の背景

生理的骨吸収の場では、破骨細胞による骨吸収に伴い骨中から放出される BMP などのカップリングファクターの作用により、間葉系幹細胞 (MSC) が骨芽細胞へと分化する。次いで、骨芽細胞が細胞表面に提示する破骨細胞分化誘導因子 RANKL により破骨細胞分化が誘導される。破骨細胞分化におけるニッチ細胞としての骨芽細胞の役割は国内外を問わず盛んに研究されており、特に RANK - RANKL 系を介した破骨細胞前駆細胞 - 骨芽細胞の細胞間接触による分化制御機構は詳細に報告されている。対して歯周炎や慢性関節リウマチなどの炎症性骨疾患では、局所に浸潤したマクロファージから分泌される IL-1、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの作用によって破骨細胞分化が誘導され、過度の骨吸収が誘導される。

歯科矯正治療時の圧迫側で認められる組織反応において、圧迫側歯根膜では単球/マクロファージが IL-1、IL-6、TNF- α を分泌し、これらがオートクリン/パラクリンに作用することによって、効率良く破骨細胞前駆細胞が破骨細胞へと分化する。しかしながら、炎症性サイトカインが分泌されるにも関わらず、いわゆる炎症反応は認められない。一方、矯正治療時に歯の移動に深く関与する歯根膜には、免疫抑制作用が備わっている MSC が存在する。主として骨髄に存在する MSC は血行性に全身に運ばれて炎症部位に集積し、組織修復に働くとともに免疫抑制作用をも発揮する。しかしながら MSC が炎症性骨吸収の場でどのような働きをしているのかは明らかではなく、特に局所の骨吸収抑制作用発現のために、MSC が分子レベルでどのように関わるかについては不明である。

我々は MSC の培養上清が、破骨細胞前駆細胞様細胞でマウスマクロファージ様細胞である Raw264.7 の RANKL 誘導性破骨細胞分化を有意に抑制することを見出している (図 1、2)。興味深いことに MSC から分化誘導された骨芽細胞の培養上清では、この効果が認められない。すなわち、MSC は骨芽細胞への分化前に特化して破骨細胞分化抑制因子を分泌することが示唆される。そこで DNA アレイを用いて MSC と骨芽細胞との網羅的遺伝子発現頻度差を解析したところ、MSC のみで発現する機能未知のサイトカイン様ペプチド SCRG1 をつぎとめた。ごく最近、我々は SCRG1 が GPI-anchor を有する膜タンパク質 BST1 を受容体として α -integrin と複合体を形成し FAK/PI3K/Akt 経路を活性化することで、オートクリン/パラクリンに MSC の自己複製・遊走・骨分化能といった幹細胞としての潜在的な能力を維持することを突き止めた。さらに、BST1 が Raw264.7 の細胞膜上にも発現していることを確認している (図 3)。

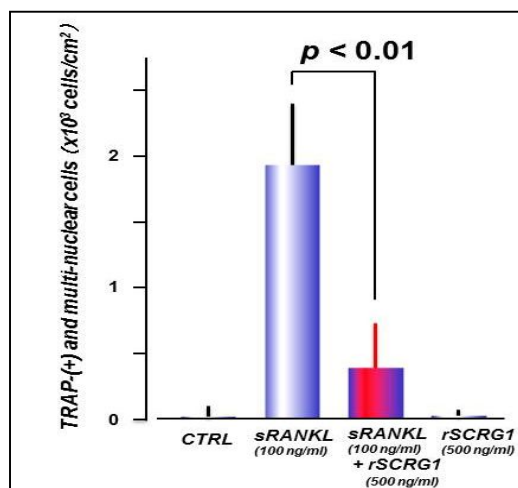
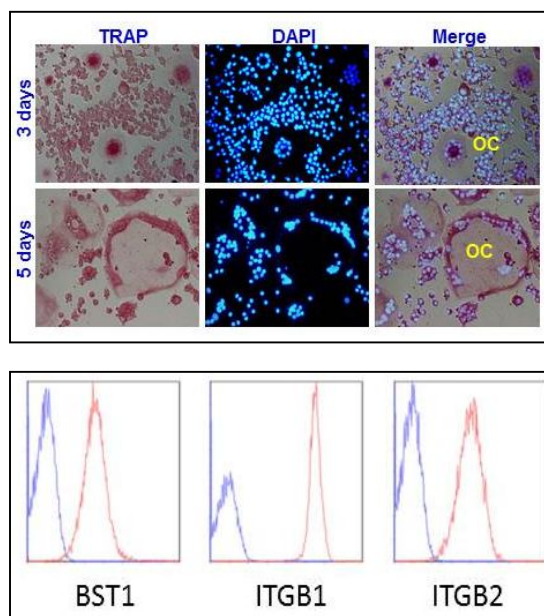


図 1. SCRG1 による破骨細胞分化抑制効果



(上)図 2. TRAP・核染色による破骨細胞分化

(下)図 3. Raw264.7 における SCRG1 受容体の発現

しかしながら SCRG1/BST1 の破骨細胞分化抑制効果における分子メカニズムについては明らかではない。そこで本研究では、MSC が特異的に分泌するペプチド SCRG1 の破骨細胞分化抑制効果について分子レベルで解明することを目的とした。加えて、MSC で特異的に発現している SCRG1 による破骨細胞分化抑制効果と、炎症性骨吸収に対する抑制効果の作用機序を検証したい。

2. 研究の目的

近年、MSC が組織再生作用以外にも、免疫抑制作用などの生命維持のために重要な役割を担っていることが注目されている。本研究では MSC による炎症性骨吸収抑制効果の発現メカニズムについて明らかにする。特に、我々が最近新規に見出した MSC 由来分泌型ペプチド SCR1 による破骨細胞分化抑制効果や炎症性骨吸収に対する作用メカニズムについて解明する。これらの研究成果から、歯科矯正治療における MSC の利用や、歯周病や間接リウマチなどで認められる炎症性骨吸収に対する SCR1 の新規治療薬剤の可能性について検討した。

3. 研究の方法

1) 破骨細胞前駆細胞としてのマウスマクロファージ様細胞 Rwa264.7 を組換えマウス SCR1 (rmSCR1) で処理し、抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法で細胞内シグナル伝達経路を特定した。

2) 同様に Raw264.7 細胞を mrSCR1 で処理し、DNA マイクロアレイ法で遺伝子発現の網羅的解析を、さらには RT-PCR 法で特定の遺伝子発現を詳細に調査した。

4. 研究成果

1) シグナル経路特異的な抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法でシグナル分子のリン酸化を調査したところ、rmSCR1 は Raw264.7 細胞において ERK1/2 のリン酸化を有意に促進した (図 4)。しかしながら、その他の MAP キナーゼや PI3K/Akt 経路のリン酸化は認められなかった。我々は、SCR1 がヒト骨髄由来 MSC の PI3K/Akt 経路ならびに ERK1/2 と JNK を活性化することを明らかにしている。即ち、MSC とマクロファージの SCR1 誘導シグナル経路は異なることが示された。

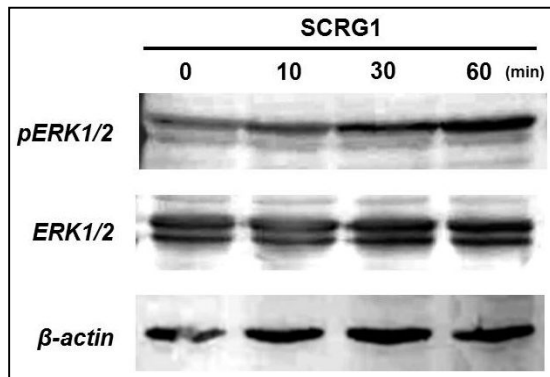


図 4. SCR1 による ERK1/2 リン酸化の増強

2) SCR1 によって発現が誘導される遺伝子を DNA アレイ法と RT-PCR 法で検討した結果、mrSCR1 は Raw264.7 における LPS 誘導性ケモカイン CCL22 の発現を有意に抑制した (図 5)。CCL22 は受容体 CCR4 を発現する単球や Th 細胞を炎症の場に誘引することから、SCR1 は炎症性細胞の集積を抑制することが示唆された。さらに SCR1 は、Raw264.7 のケモカイン受容体 CCR7 の発現を促進した。CCR7 は炎症性細胞の炎症巣からの退出やリンパ組織へのリクルートに必須な因子である。したがって、炎症の収束に伴ってマクロファージが消失するメカニズムに SCR1 が関与する可能性が高い。

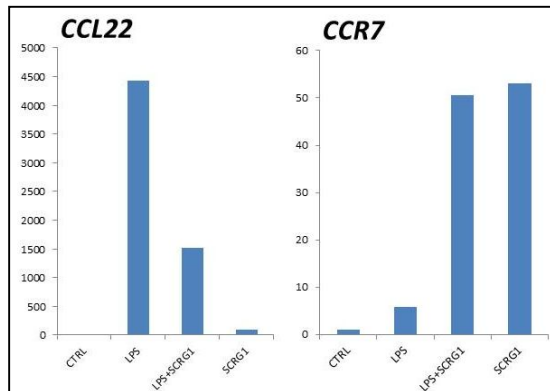


図 5. CCL22、CCR7 の mRNA 発現変動

3) mrSCR1 は Raw264.7 細胞の炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、IL-8 の mRNA 発現を抑制した (図 6)。すなわち、MSC が分泌する SCR1 は炎症の場においてその抑制効果を発揮することが示唆された。

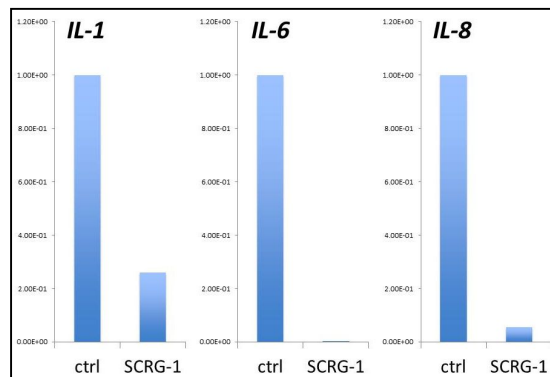


図 6. IL-1、IL-6、IL-8 の mRNA 発現抑制

4) MSC が分泌する SCRG1 は、我々が同定した新規受容体 BST-1/ α 5 β 1-integrin 複合体を介して PI3K/Akt 経路を活性化し、オートクリンに MSC の遊走効果をも促進する。このことから、炎症部位に集積した MSC から分泌された SCRG1 は、MSC の遊走促進に寄与するとともに、マクロファージに作用して炎症ならびにそれに引き続く炎症性骨吸収を抑制することが示唆された(図7)。本研究において SCRG1 による炎症性サイトカインの発現抑制と炎症性骨吸収の抑制効果が認められたことで、SCRG1 を利用したペプチド製剤の開発やシグナル伝達因子をターゲットにした薬剤の開発にも貢献できるものである。

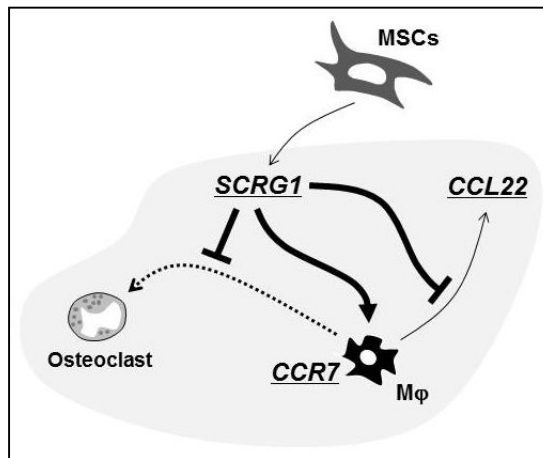


図7 .SCRG1 による炎症抑制効果の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Manabu, Yamada Junko, Aomatsu-Kikuchi Emiko, Satoh Kazuro, Kondo Hisatomo, Ishisaki Akira, Chosa Naoyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4069 ~ 4076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.6492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MANABU INOUE1,2, JUNKO YAMADA1,3, EMIKO AOMATSU KIKUCHI1,3, KAZURO SATOH3, HISATOMO KONDO2, AKIRA ISHISAKI and NAOYUKI CHOSA	4. 巻 15
2. 論文標題 SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4069-4076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.6492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 識野, 横田 聖司, 帖佐 直幸, 菊池 恵美子, 客本育子, 加茂 政晴, 佐藤 和朗, 石崎 明
2. 発表標題 EGFとFGF - 1はERK1/2依存的に顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞の繊維組織産生能力を抑制する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本識野 横田聖司 帖佐直幸 菊池恵美子 木村仁迪 加茂政晴 佐藤和朗 石崎明
2. 発表標題 変形性顎関節症に伴う下顎頭の骨吸収機構を分子レベルで明らかにする研究
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本識野 横田聖司 帖佐直幸 菊池恵美子 木村仁迪 石崎明 佐藤和朗
2. 発表標題 変形性顎関節症に伴う下顎頭の骨吸収の細胞内シグナル伝達機構を明らかにする研究
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横田聖司、木村仁迪、菊池恵美子、帖佐直幸、客本斉子、加茂政晴、石崎明、佐藤和朗
2. 発表標題 顎関節炎症に伴う顎関節組織の変化を細胞・分子レベルで明らかにする研究
3. 学会等名 第75回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 横田聖司、木村仁迪、菊池恵美子、帖佐直幸、客本斉子、加茂政晴、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 顎関節滑膜細胞による顎関節組織の繊維化を促進する細胞内シグナル伝達機構について
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shikino Matsumoto, Seiji Yokota, Naoyuki Chosa, Emiko Kikuchi, Masaharu Kamo, Akira Ishisaki, Kazuro Satoh
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanisms underlying fibrogenic activity expression in fibroblast-like cells derived from mouse temporomandibular joint
3. 学会等名 9th IOC (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------