

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11654

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞が分泌する炎症抑制ペプチドを用いた組織再生を伴う歯周炎治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of cell therapy for periodontitis accompanied by tissue regeneration utilizing anti-inflammatory peptide secreted by mesenchymal stem cells

研究代表者

帖佐 直幸 (Chosa, Naoyuki)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80326694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内において間葉系幹細胞(MSC)が組織再生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が、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、炎症の場面に集積したMSCから分泌されたサイトカイン様ペプチドSCRG1が、オートクリンにMSCのstemness維持と遊走能の促進に寄与するとともに、マクロファージにパラクリン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を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近になって間葉系幹細胞(MSC)には多分化能以外にも炎症抑制作用、免疫抑制作用、損傷組織へのホーミングなど様々な能力を有することが明らかになっている。特にMSCが産生・分泌する様々なサイトカインやケモカインがこれらの作用を制御すると考えられている。本研究で明らかとなったMSC由来サイトカイン様ペプチドSCRG1がマクロファージの性状や遺伝子発現に及ぼす影響、さらには特異的な走化性獲得の発見は意義が高く、炎症抑制と組織再生を両立する治療法の確立へと発展させることができる。今後はMSCの性質や能力を利用した細胞治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) play an important role not only in tissue regeneration but also in immune suppression. However, the molecular mechanism of immunosuppression is unknown. In this study, the function of cytokine-like peptide SCRG1 secreted by MSCs accumulated at the site of inflammation was analyzed. We have previously reported that SCRG1 maintains stemness in MSCs through autocrine activity. Here, we elucidated the molecular mechanism by which SCRG1 suppresses inflammation by paracrine activity on macrophages.

研究分野：生化学

キーワード：間葉系幹細胞 歯周炎 炎症抑制

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎はデンタルプラーク中の歯周病原性細菌により惹起される組織破壊性の炎症性疾患である。組織破壊を伴う重篤な炎症は、主として局所に浸潤したマクロファージ (M $\phi$ ) から分泌される IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの作用による過剰な炎症反応が要因とされている。歯周組織の炎症も例外ではなく、我々はこれまでに歯周組織構成細胞を標的とした複数の炎症性サイトカインの相乗的効果が、歯周炎の増悪に関与することを報告している。組織破壊を伴う炎症の治癒には結合組織構成細胞への分化能を有する間葉系幹細胞 (MSC) が関与する。MSC はケモカインの作用により炎症部位に集積することで組織再生に働くとともに、慢性炎症を治癒させるための免疫抑制効果を有することが報告されている。我々は MSC の幹細胞性 stemness を維持するサイトカイン様ペプチドとして、MSC が産生・分泌する SCRG1 を報告した。SCRG1 は、我々によって同定された新規受容体 BST1/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。しかしながら、実際の *in vivo* における炎症の場には様々な細胞が集積することから、単純なオートクリン作用による効果のみを仮定することは現実的ではない。そこで我々は、SCRG1 の M $\phi$  に対するパラクリン作用にも着目した。本研究では、SCRG1 の炎症抑制作用を分子レベルで解明するとともに、炎症抑制と歯周組織再生を両立するペプチド創薬ならびに細胞治療 cell therapy への応用へと発展させる。

### 2. 研究の目的

生体内において MSC が組織再生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が、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、炎症の場を集積した MSC から分泌されたサイトカイン様ペプチド SCRG1 が、オートクリンに MSC の stemness 維持と遊走能の促進に寄与するとともに、M $\phi$  にパラクリン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を明らかにする。SCRG1 の炎症抑制効果を分子レベルで解明するとともに、炎症抑制と組織再生を両立するペプチド創薬ならびに細胞治療 cell therapy への応用へと発展させることを目的とした。具体的には、炎症部位における MSC と歯根膜線維芽細胞 (PDL-F) ならびに M $\phi$  との相互作用について、以下に示す MSC の役割を分子レベルで解明した。

- (1) 歯周炎症部位における PDL-F と MSC の相互作用の解明。
- (2) LPS 誘導性遺伝子発現と RANKL 誘導性破骨細胞分化における SCRG1 の役割。
- (3) M $\phi$  のケモカイン関連遺伝子の発現と走化性獲得における SCRG1 の役割

### 3. 研究の方法

- (1) 歯周炎症部位における PDL-F と MSC の相互作用の解明

我々によって樹立されたラット PDL-F 株の SCDC2, ならびに GFP マウス骨髄由来 MSC 株の SG2 を使用した。SCDC2 を IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  で処理し、MSC の走化性を促進するケモカイン MCP-1/SDF-1 $\alpha$  の発現を qRT-PCR と ELISA で調査した。発現誘導が確認された MCP-1 については、SG2 と SCDC2 における細胞遊走促進効果を trans-well migration assay にて検討した。さらに、SG2 と SCDC2 の接触共培養系と、trans-well system を用いた非接触共培養系における SG2 の炎症関連因子の発現を qRT-PCR で調査するとともに、SCDC2 との共培養における SG2 の性状について flow cytometry で MSC マーカーの発現を、differentiation induction assay で分化能、WST-1 assay による細胞増殖能、ならびに trans-well migration assay にて細胞遊走能をそれぞれ評価した。

- (2) LPS 誘導性遺伝子発現と RANKL 誘導性破骨細胞分化における SCRG1 の役割

マウス M $\phi$  様細胞 Raw264.7 の LPS 誘導性ケモカインやサイトカイン発現における SCRG1 の影響を primer array にて解析した。SCRG1 によって抑制された CCL22 の発現については、細胞内シグナル伝達経路に特徴的な抗リン酸化抗体を用いた western blot で検討した。加えて、RANKL 誘導性の破骨細胞分化における SCRG1 の役割を、破骨細胞形成を tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色にて評価することにより検討した。

- (3) M $\phi$  のケモカイン関連遺伝子の発現と走化性獲得における SCRG1 の役割

Raw264.7 を SCRG1 で処理し、サイトカインやケモカインならびにそれら受容体の遺伝子発現を primer array にて網羅的に解析した。同様に、Raw264.7 と SG2 を接触共培養後、Raw264.7 の遺伝子発現を primer array にて解析した。両者のデータから遺伝子発現が増加すると同定された CCR7 については、mRNA の発現増加を qRT-PCR にて定量的に解析するとともに、flow cytometry にて細胞に表出したタンパク質を確認した。さらに Raw264.7 を SCRG1 で前処理し、CCR7 のリガンドである CCL19 や CCL21 に対する走化性を trans-well migration assay にて検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯周炎症部位における PDL-F と MSC の相互作用の解明

SCDC2 を IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  で処理したところ, MCP-1 の mRNA 発現及びタンパク分泌が促進した (Figure A). MCP-1 は SG2 の細胞遊走能を促進する一方, SCDC2 の遊走能は促進しなかった. また, 接触共培養系では SG2 における抗炎症性サイトカイン IL-10 ならびに TGF- $\beta$ 1 の発現が促進されたが, 炎症性サイトカインの IL-6 の発現は抑制された. 一方で非接触共培養系では, IL-6 の発現抑制及び IL-10, TGF- $\beta$  の発現促進は認められなかった. さらに共培養後の SG2 の性状においては, マウス MSC マーカーである Sca-1, CD44, CD90 の発現増強 (Figure B) ならびに細胞遊走能・骨芽細胞ならびに脂肪細胞への分化能が促進され, 細胞増殖能は抑制された. 炎症性サイトカイン刺激によって PDL-F から分泌されたケモカイン MCP-1 は, MSC にパラクリンに作用することで炎症部位への遊走を促進する. また, 炎症部位にホーミングした MSC は PDL-F との細胞間接着を介した相互作用により炎症性サイトカインの分泌を抑制し, 抗炎症性サイトカインの分泌を促進する. さらに, PDL-F との相互作用により MSC の遊走活性の促進ならびに細胞増殖能が抑制され, 多分化能が促進されることが明らかになった. これらの機能増強は歯槽骨吸収を伴った歯周炎の治癒, すなわち炎症の終息ならびに歯槽骨再生に関与する可能性が示唆される.

### (2) LPS 誘導性遺伝子発現と RANKL 誘導性破骨細胞分化における SCRG1 の役割

最初に Raw264.7 における SCRG1 受容体の発現を flow cytometry で調べた結果, BST1 のみならずインテグリン  $\beta$ 1, インテグリン  $\beta$ 2 の発現が確認された. 次に LPS 誘導性ケモカインやサイトカイン発現における SCRG1 の影響を primer array で解析した. LPS 処理で 100 倍以上, かつ SCRG1 単独処理では発現が変動しない遺伝子の中から, SCRG1 によって LPS 誘導性の発現が抑制された CCL22 に着目した. これまでに我々は, 骨髄由来 MSC において SCRG1 が PI3K/Akt と MAP キナーゼ, JNK と ERK 経路を活性化することを明らかにしている. Raw264.7 において SCRG1 によって誘導されるシグナル伝達経路を解析した結果, SCRG1 は Raw264.7 の ERK1/2 のリン酸化を誘導した (Figure C). そこで, LPS 誘導性 CCL22 の発現増加における MAPK/ERK 阻害剤 U0126 の影響を調査した. その結果, SCRG1 は LPS 誘導性 CCL22 の mRNA 発現増加ならびにタンパク分泌増加の両者を有意に抑制するとともに, その抑制効果は U0126 によって解除された (Figure D). したがって, SCRG1 は ERK の活性化を介して CCL22 の発現を抑制することが示された. 一方, 興味深いことに, SCRG1 は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を有意に抑制した. Raw264.7 を可溶性 RANKL で処理後, TRAP 陽性かつ多核の破骨細胞様細胞の形成を調査した結果, Raw264.7 は RANKL 処理で効率良く破骨細胞様細胞が形成されるのにたいして, SCRG1 で同時に処理することで破骨細胞分化は大きく抑制された. 以上の結果から, MSC から分泌された SCRG1 は炎症の場においてマクロファージにパラクリンに作用することで ERK 経路を介して CCL22 の発現を抑制することが示された. さらに SCRG1 は RANKL 誘導性の破骨細胞分化をも抑制することが明らかになった. すなわち, MSC は SCRG1 を分泌することで単球・マクロファージ系の細胞にパラクリンに作用し, 免疫抑制性にそして炎症性骨吸収を制御することが示唆された.

### (3) M $\phi$ のケモカイン関連遺伝子の発現と走化性獲得における SCRG1 の役割

Raw264.7 を SCRG1 で処理すると, 14 遺伝子で 10 倍以上の発現増加が認められた. また, SG2 と接触共培養された Raw264.7 の遺伝子発現を解析した結果, 4 遺伝子において 100 倍以上の発現増加が認められた. SCRG1 処理で遺伝子発現の増加を認め, 且つ SG2 との接触共培養で特異的に増加する遺伝子としてケモカイン受容体 CCR7 に着目した. SCRG1 による CCR7 の mRNA 発現を qRT-PCR にて定量的に解析した結果, 有意な発現増加を認めた. さらに flow cytometry にて Raw264.7 に表出する CCR7 の発現増強が確認された (Figure E). これらの結果から, SCRG1 は Raw264.7 に作用することで CCR7 の発現を増強することが示された. そこで, SCRG1 による前処理で CCR7 の発現が増強された Raw264.7 の走化性を, trans-well migration assay にて検証した. SCRG1 で前処理した Raw264.7 は, CCL19 を添加した場合のみで遊走した細胞数が増加し, 走化性の有意な促進が認められた (Figure F). しかしながら, CCL21 に対する走化性は促進されなかった. 以上の結果から, SCRG1 によって CCR7 の発現が増強された M $\phi$  は, CCL19 に対する走化性を特異的に獲得することが示された. CCR7 は 7 回膜貫通レセプターを有した G タンパク質共役型受容体である. CCR7 を発現した M $\phi$  は CCL19 や CCL21 に対して走化性を獲得する. CCL19 や CCL21 は樹状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関与する因子として考えられているが, M $\phi$  における CCR7 発現の意義は明らかにされていない. 我々は, SCRG1 が Raw264.7 の ERK1/2 のリン酸化を誘導することを報告しているが, 今後, CCR7 の発現を誘導するシグナル伝達経路が同定されることで, より詳細な発現機序の解明が期待される. 加えて, SCRG1 によって CCR7 の発現が増強された M $\phi$  は CCL19 に対する走化性が促進された. しかしながら, CCL21 に対する走化性は促進されなかった. すなわち, SCRG1 は M $\phi$  のリンパ組織由来ケモカインに対する反応性を高めることにより M $\phi$  が炎症部位から退出するメカニズムに関与する可能性が示唆されるが, CCL19 特異的な走化性獲得の意義は明らかでなく, その解明は今後の課題である.

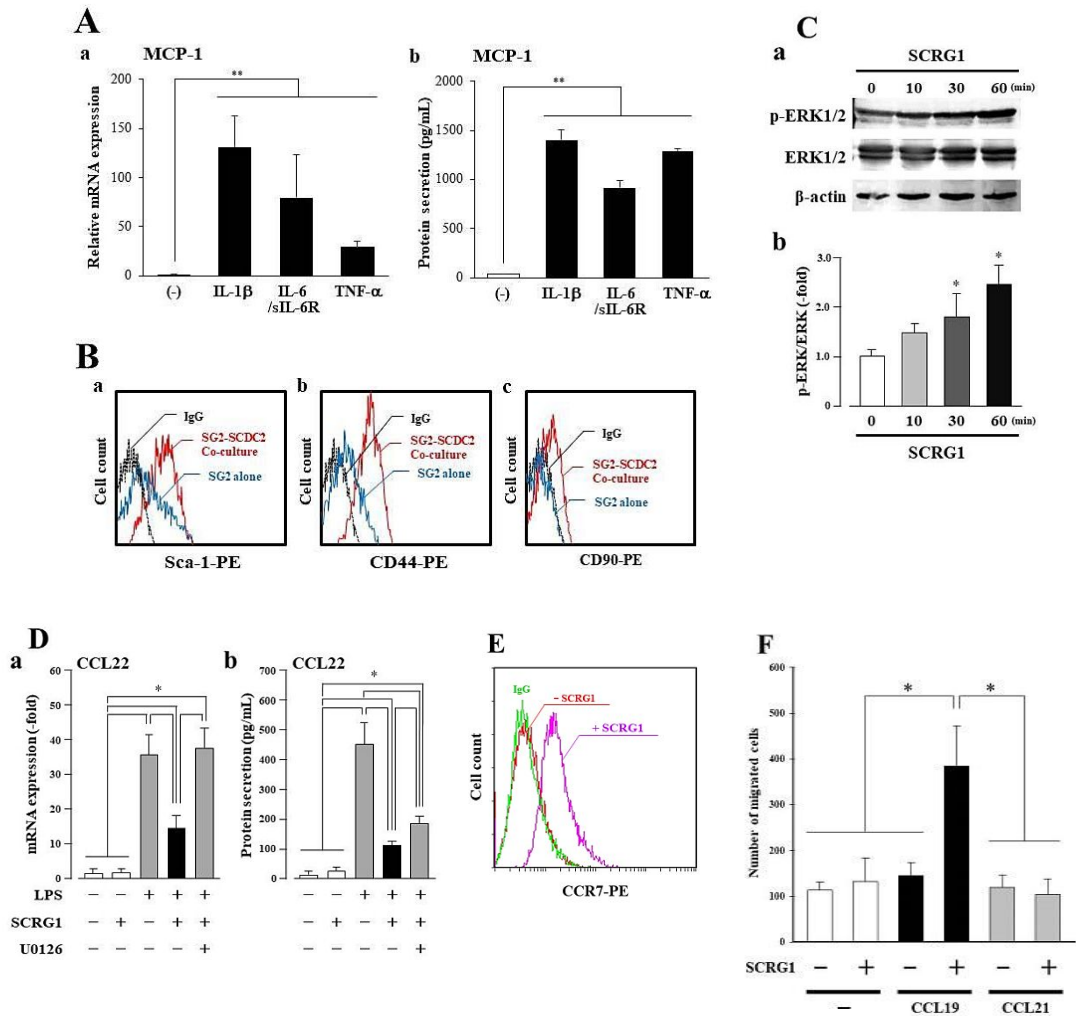


Figure A. Inflammatory cytokines promote MCP-1 production in SCDC2 cells. SCDC2 cells were stimulated with or without IL-1 $\beta$ , IL-6/sIL-6R, or TNF- $\alpha$ . (a) mRNA expression levels were investigated by qRT-PCR using specific primers. Reported values are normalized to Gapdh expression. The results are expressed as the fold change relative to the respective control. (b) The amount of secreted MCP-1 was measured using sandwich ELISA kit for rat-specific MCP-1.

Figure B. MSC stemness of SG2 cells is enhanced by direct co-culture with SCDC2 cells. Cell-surface expression levels of Sca-1 (a), CD44 (b), and CD90 (c) were analyzed with each specific antibody in SG2 cells alone (blue), SG2 cells directly co-cultured with SCDC2 cells (red), and an isotype control IgG (black) using flow cytometry.

Figure C. SCRGI enhances the phosphorylation of ERK1/2 in Raw264.7 cells. (a) ERK1/2 phosphorylation was measured using western blotting with anti-phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) antibody in Raw264.7 cells stimulated with SCRGI. (b) Densitometry analysis of band intensity in western blotting was expressed as the ratio of phosphorylation to the total molecule.

Figure D. SCRGI suppresses LPS-induced CCL22 production through the activation of ERK1/2 in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were stimulated with or without LPS, SCRGI, and U0126. (a) qRT-PCR was performed with specific primers. mRNA expression level of CCL22 was normalized to Gapdh, and the results are expressed as the fold change relative to the unstimulated control. (b) The amount of secreted CCL22 in the culture medium was measured using a sandwich ELISA.

Figure E. SCRGI enhances CCR7 expression in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were cultured in medium containing with SCRGI. Expression of cell surface CCR7 was analyzed by flow cytometry with anti-CCR7 antibody. Specific antibody for stimulated SCRGI (purple), unstimulated (red), and isotype control IgG (green) are shown.

Figure F. Enhanced expression of CCR7 by SCRGI stimulation specifically promotes chemotaxis to CCL19. Raw264.7 cells were pretreated with or without SCRGI. Trans-well migration assay for Raw264.7 cells by stimulation with or without CCL19 or CCL21. The number of cells that had migrated to the underside of the membrane was counted.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Chosa N., Ishisaki A.	4. 巻 54
2. 論文標題 Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRG1/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 37～44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.10.001">https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.10.001</a>	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 Takizawa N., Okubo N., Kamo M., Chosa N., Mikami T., Suzuki K., Yokota S., Ibi M., Ohtsuka M., Taira M., Yaegashi T., Ishisaki A., Kyakumoto S.	4. 巻 358
2. 論文標題 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 411～420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.014">https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.014</a>	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 Suzuki K., Chosa N., Sawada S., Takizawa N., Yaegashi T., Ishisaki A.	4. 巻 2017
2. 論文標題 Enhancement of anti-inflammatory and osteogenic abilities of mesenchymal stem cells via cell-to-cell adhesion to periodontal ligament-derived fibroblasts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 3296498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1155/2017/3296498">doi.org/10.1155/2017/3296498</a>	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 Inoue M., Yamada J., Aomatsu-Kikuchi E., Satoh K., Kondo H., Ishisaki A., Chosa N.	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） <a href="https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6492">doi.org/10.3892/mmr.2017.6492</a>	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21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相原 恵子、横田 聖司、客本 齊子、加茂 政晴、八重柏 隆、石崎 明、帖佐 直幸
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来ペプチドSCRG1はマクロファージのCCR7発現を増強することでCCL19による走化性を促進する
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 山田順子、菊池恵美子、帖佐直幸、佐藤和朗、石崎明
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来ペプチドSCRG1はERK経路を活性化することで破骨細胞分化を抑制する
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 鈴木啓太、帖佐直幸、滝沢尚希、客本齋子、加茂政晴、八重柏隆、石崎明
2. 発表標題 間葉系幹細胞の抗炎症効果は歯根膜線維芽細胞との細胞間相互作用によって増強される
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016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
研究分担者	下山 佑  (Yu Shimoyama)  (90453331)	岩手医科大学・歯学部・講師    (31201)	