

授与番号 甲第 344 号

### 論文内容の要旨

SCRG1 はマクロファージ様細胞 Raw264.7 における CCR7 の発現を増強することで CCL19 への走化性を誘導する

(相原 恵子)

(岩手医科大学歯学雑誌 第 45 巻、第 1 号、令和 2 年 4 月掲載予定)

あいはら けいこ  
相原 恵子

### I. 研究目的

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。炎症によって破壊された組織の修復や再生には幹細胞が関与する。間葉系幹細胞 (MSC) は組織再生に働くだけでなく、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 が分泌するサイトカイン様ペプチド SCRG1 が、受容体 BST1/ $\beta$  インテグリン複合体を介してオートクリンに MSC の stemness 維持ならびに遊走を促進するとともに、マクロファージ (M $\phi$ ) にパラクリンに作用することで LPS 誘導性ケモカイン CCL22 の発現を抑制することを報告している。炎症抑制効果を有する MSC と炎症担当細胞である M $\phi$  の相互作用は、炎症の収束において特に重要であると考えられる。そこで本研究では、SCRG1 がパラクリンに M $\phi$  に及ぼす影響に着目し、M $\phi$  におけるサイトカイン関連遺伝子群の発現変動と走化性獲得について検証した。

### II. 研究方法

マウス M $\phi$  様細胞 Raw 264.7 を組換えマウス SCRG1 (rmSCRG1) で 24 時間処理し、サイトカインならびにサイトカイン受容体の遺伝子発現をプライマーアレイにて網羅的に解析した。同様に、Raw264.7 とマウス骨髄由来 MSC である SG2 を 24 時間共培養後、Raw264.7 の遺伝子発現をプライマーアレイにて解析した。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、フローサイトメトリー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 rmSCRG1 で 48 時間前処理し、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。

### III. 研究成績

Raw264.7 を rmSCRG1 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、かつ、SG2 との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。rmSCRG1 による CCR7 の mRNA 発現を qRT-PCR にて定量的に解析した結果、12 倍以上の有意な発現増加を認めた。さらにフローサイトメトリーにて Raw264.7 に表出する CCR7 の発現増強が確認された。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 によって 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。rmSCRG1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約3倍に増加し、走化性の有意な促進が認められた。しかしながら、CCL21に対する走化性は促進されなかった。以上の結果から、SCRG1によってCCR7の発現が増強されたMφ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。

#### IV. 考察及び結論

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Mφ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、MφにおけるCCR7発現の意義は明らかにされていない。本研究では、MSCより分泌されたSCRG1によってMφにおけるCCR7の発現増強が明らかとなった。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。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Mφ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Mφ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Mφ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。

最近になって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きている。特にMSCが産生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によるMφの走化性獲得の発見は意義が高く、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。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 論文審査担当者

主査 八重柏 隆 教授（歯科保存学講座歯周療法学分野）  
副査 石崎 明 教授（生化学講座細胞情報科学分野）  
副査 千葉 俊美 教授（口腔医学講座関連医学分野）

歯周炎はMφを伴う炎症性疾患であり、炎症によって破壊された歯周組織の修復や再生には幹細胞MSCが関与することが知られている。炎症抑制効果を有するMSCと炎症性細胞であるMφの相互作用は、炎症の収束において特に重要である。本研究では、SCRG1がパラクリンにMφに及ぼす影響に着目し、Mφにおけるサイトカイン関連遺伝子群の発現変動と走化性獲得について検証した。

マウスMφ様細胞Raw 264.7を組換えマウスSCRG1（rmSCRG1）で24時間処理し、サイトカインならびにサイトカイン受容体の遺伝子発現をプライマーアレイにて網羅的に解析した。同様に、Raw264.7とマウス骨髄由来MSCであるSG2を24時間共培養後、Raw264.7の遺伝子発現をプライマー

アレイにて解析した。両者のデータにおいて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、フローサイトメトリー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 rmSCRG1 で 48 時間前処理し、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。

Raw264.7 を rmSCRG1 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、かつ、SG2 との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。rmSCRG1 による CCR7 の mRNA 発現を qRT-PCR にて定量的に解析した結果、12 倍以上の有意な発現増加を認めた。さらにフローサイトメトリーにて Raw264.7 に表出する CCR7 の発現増強が確認された。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。rmSCRG1 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約 3 倍に増加し、走化性の有意な促進が認められた。しかしながら、CCL21 に対する走化性は促進されなかった。本研究で、MSC より分泌された SCRGI1 によって Mφ における CCR7 の発現が増強されることが明らかとなった。

#### 試験・試問の結果の要旨

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 SCRGI1 による Mφ の走化性獲得は科学的意義が高く、今後は MSC の性質や能力を利用した細胞治療への応用が十分期待される。今後の歯周病治療の発展に大いに貢献するものと考えられ、本論文は基礎的意義の非常に大きいものであり、学位論文に値すると評価した。

(参考資料) 主査・副査からの質疑応答 (概要)

問：歯肉における MSC 分布は？

答：骨髄に豊富な MSC は血流に乗って血管経由で歯肉に分布していると考ええる。

問：CCL19 と CCL21 の違いは？

答：CCL19 はリンパ節の T 細胞領域に分布し、CCL21 は高内皮細静脈の血管にみられるという分布の違いがある。また、CCL19 と CCL21 の相同性は 30%と低い。

現状では「リンパ系での遊走反応が報告されているが、それ以外についてはほとんどわかっていない」状況にある。

問：中期審査までに示した研究結果と、その後の研究の展開は？

答：中期審査までは遺伝子発現状況までの結果報告であったが、その後、それを実際に裏付ける走化性について本論文にあるように実証・報告した。

問：この研究によって今回はじめて得られた結果と、その臨床との関連は？

答:今回はじめて得られた結果としては、MSC より分泌されたサイトカイン様ペプチド **SCRG1** により、M $\phi$  における **CCR7** の発現が増強され、M $\phi$  の走化性が獲得されるということ。

臨床との関連は、今後、さらに研究を展開することにより、MSC の性質や能力を利用し、炎症部位からのマクロファージの退出を多面的にコントロールし、炎症によって破壊された組織の修復再生を行う細胞治療への応用が期待されること。

問:本研究で最も苦労したこと、その対応・解決方法は?

答: **SCRG1** の濃度設定や血清の影響の検討等が苦労した。多様な条件設定での多くの予備実験を繰り返し実施することにより、方向性が確認でき、再現性のある結果が得られた。