

研 究

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

岩手医科大学歯学部歯科保存学講座歯周療法学分野

(主任: 八重柏 隆)

(受付: 2019年12月20日)

(受理: 2019年12月28日)

抄 録

間葉系幹細胞 (MSC) は様々な免疫担当細胞の機能を制御することが報告されている。本研究ではマクロファージにおける MSC 由来サイトカイン様ペプチド scrapie responsive gene 1 (SCRG1) のパラクリン作用を解明した。マウスマクロファージ様細胞 Raw264.7 を SCRG1 による刺激ならびに骨髓由来 MSC である SG2 との共培養で発現上昇する遺伝子として、C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) を同定した。SCRG1 で刺激された Raw264.7 は CCR7 の有意な発現増強を認めた。CCR7 は CC-chemokine ligand (CCL) 19 や CCL21 の受容体として、T 細胞や樹状細胞のリンパ組織へのリクルートに必須な因子として知られている。Raw264.7 を SCRG1 で前処理して trans-well migration assay で CCL19 と CCL21 に対する走化性を検証した。未処理の Raw264.7 は CCL19 や CCL21 に対して走化性を示さなかったが、SCRG1 で前処理した Raw264.7 は CCL19 に対する走化性が有意に促進された。しかしながら、CCL21 に対する走化性は促進されなかった。以上の結果から、SCRG1 によって CCR7 の発現が増強されたマクロファージは、CCL19 に対する走化性を特異的に獲得することが示された。炎症部位に集積した MSC から分泌された SCRG1 は、マクロファージにパラクリンに作用することで CCL19 への走化性を獲得するとともに、マクロファージ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た。MSC 由来の SCRG1 によるマクロファージ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。

緒 言

歯周炎はデンタルプラーク中に含まれる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。歯周炎によって歯周組織が破壊されると、著しい QOL (quality of life) の低下を招く。歯周炎の発症および進行には宿主の免疫応答が関与している事が明らかとなってお

SCRG1 induces chemotaxis to CCL19 by enhancing the expression of CCR7 in macrophage-like Raw264.7 cells
Keiko AIHARA

Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University
Takashi YAEGASHI
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒 020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 45 : 35-45, 2020

り、歯面からの付着上皮の剥離、歯周ポケット形成および歯槽骨吸収を特徴とした病態形成に関わっている。これまでに、歯周炎の病態形成に関与する免疫担当細胞が多数報告されている。Ebersole らは1型ヘルパーT細胞(Th1)が産生するinterferon(IFN)- γ がマクロファージを活性化し、interleukin(IL)-1 β やtumor necrosis factor(TNF)- α の産生を誘導する事を報告している^{1,2)}。これらの炎症性サイトカインは骨芽細胞などのreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)発現を上昇させる事で破骨細胞の分化を促進し、歯槽骨吸収が引き起こされる。

一方、炎症によって破壊された組織の再生が開始されるためには炎症の収束が必須である。歯周炎発症と歯周治療後の創傷治癒に関しては、主にマクロファージが重要な役割を担っている。マクロファージは炎症促進型のM1マクロファージと炎症抑制型のM2マクロファージに大別される。M1マクロファージはlipopolysaccharide(LPS)などにより活性化され、inducible nitric oxide synthase(iNOS)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症促進因子を産生する^{3,4)}。M2マクロファージはIL-4やIL-13によって誘導され、IL-10やtransforming growth factor(TGF)- β 、vascular endothelial growth factor(VEGF)などの抗炎症性サイトカインを産生し、血管新生やアポトーシス細胞の除去、炎症の収束と組織修復への転換において中心的役割を担っている⁵⁾⁻⁸⁾。

炎症によって破壊された組織の修復や再生には幹細胞(stem cell)が関与する。間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)は自己複製能に加えて骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、線維芽細胞といった間葉組織構成細胞への多分化能を有した体性幹細胞である⁹⁾。これまでに、骨髄、皮下脂肪、関節軟骨ならびに滑膜など生体組織から幅広く採取されている¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。我々は、MSCの多分化能が様々な成長因子、サイトカイン、またはケモカインによる刺激によって調節されていることを報告した¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。

最近、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があることが報告された¹⁹⁾。加えて、MSCは細胞間接着による相互作用や、様々な成長因子、サイトカイン、ケモカインを分泌することで免疫調節機能を発揮することが明らかになってきた^{20,21)}。MSCによる免疫抑制効果は、移植片対宿主病²²⁾および多系統萎縮²³⁾で既に報告されており、炎症性サイトカインの放出を抑制することで免疫寛容を誘導することが示されている²⁴⁾。*In vitro*の研究において、MSCはリンパ球の増殖を直接的に抑制するとともに、樹状細胞やマクロファージの炎症性サイトカインの分泌を調節する²⁵⁾⁻²⁸⁾。また、MSCから分泌される様々なサイトカインやケモカインは、免疫抑制および損傷した組織の修復を促進する²⁹⁾⁻³²⁾。

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bone marrow stromal cell antigen 1(BST1) / β 1-integrin複合体を介してオートクリンにMSCに作用することでstemness維持に関与することを報告した³³⁾。SCRG1はDronらによってスクレイピー感染マウスの脳で発見され、伝染性海綿状脳症の神経変性および脳損傷においてオートファジーに関与することが報告されている³⁴⁾⁻³⁶⁾。興味深いことに、SCRG1はoctamer-binding transcription factor 4(Oct-4)およびCD271 / low-affinity nerve growth factor receptor(LNGFR)の発現を維持することでMSCの自己複製、遊走能を維持することが示された³³⁾。

MSCから分泌されるSCRG1は、*in vivo*において様々な細胞に影響を及ぼすと予測される。炎症抑制効果を有するMSCと炎症担当細胞であるマクロファージの相互作用は炎症の収束において特に重要である。そこで本研究では、MSCによって分泌されたSCRG1が炎症組織においてパラクリンにマクロファージに及ぼす影響に着目し、マクロファージのサイトカイン / サイトカイン受容体の遺伝子発現の変動ならびに走化性を検証した。

材料 / 対象・方法

1. 試薬

組換えマウス SCRG1 (rmSCRG1, Met²¹-His⁹⁸, *Saccharomyces cerevisiae* 由来) は MyBiosource (MBS1098477, San Diego, CA, USA) より購入した。組換えマウス CCL19/MIP-3β (rmCCL19, *Escherichia coli* 由来) と CCL21/6Ckine (rmCCL21, *Escherichia coli* 由来) は Bio-Techne (Minneapolis, MN, USA) より購入した。

2. 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞 Raw264.7 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。Raw264.7 は 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む minimum essential medium Eagle's α -modification (α MEM, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて 37°C, 5% CO₂ の存在下で培養した。Green fluorescent protein (GFP) -トランスジェニックマウスの脛骨骨髓より樹立された MSC 様細胞 SG2 と線維芽細胞様細胞 SG6 は既報^{15)~17)}に従い培養した。すなわち, 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low glucose, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて 37°C, 低酸素 (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) 条件下で培養した。

3. 共培養と細胞分離

1.0 × 10⁶ cells の SG2 または SG6 を直径 100 mm の cell culture dish (Nunclon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に播種し, 10% FBS を含む DMEM を用いて低酸素条件下で培養した。24 時間培養後, 10% FBS を含む α MEM に懸濁した 1.0 × 10⁷ cells の Raw264.7 を播種し, さらに 24 時間共培養した。共培養後の細胞から, 磁気細胞分離装置 (MACS separator) と mouse lineage cell depletion kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて Raw264.7 を単離した。

4. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA は ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。得られた total RNA から cDNA を合成するための逆転写反応は, PrimeScript RT master mix (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて通法に従って行った。合成された cDNA を含む溶液 10 μ L に 70 μ L の H₂O を加えて PCR 反応のための鋳型とした。qRT-PCR は, Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara Bio) と SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) を用いてインターカレーター法にて行った。すなわち, 鋳型 cDNA 溶液 8 μ L に 10 μ L の 2 × SYBR Premix Ex Taq II と 1 μ L の 10 μ M センスプライマー, 1 μ L の 10 μ M アンチセンスプライマーを加えて, 98 °C で 5 秒熱変性, 63 °C で 30 秒のアニーリングと伸長反応を 1 サイクルとした 2-step PCR を 50 サイクル行った。センスまたは, アンチセンスプライマーの塩基並列は次の通りである: C-C chemokine receptor type 7 (*Ccr7*, 5'-TGGTCAGTGCCCAAGTGGAG-3', 5'-TCAAAGTTGCGTGCCCTGGAG-3'), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3')。mRNA の発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法によりハウスキーピング遺伝子としての *Gapdh* を対照とした値を算出した。

5. プライマーアレイ

SG2 と共培養された Raw264.7, または 500 ng/mL の rmSCRG1 と 5% FBS を含む α MEM で 24 時間処理された Raw264.7 の遺伝子発現を PrimerArray mouse cytokine-cytokine receptor interaction (PN001, Takara Bio) で分析し, その結果を PrimerArray analysis tool version 2.2 (Takara Bio) で網羅的に解析した。

6. フローサイトメトリー

Raw264.7 を 1000 ng/mL の rmSCRG1 と 1%

FBSを含む α MEMで48時間培養後, Cell dissociation buffer (enzyme-free, PBS-based, Gibco) を用いて回収した. 得られた 1×10^6 cells の Raw264.7 に phycoerythrin (PE) -conjugated anti-mouse CCR7 (CD197, Clone:4B12, BioLegend, San Diego, CA, USA) を 4°C で1時間作用させ, CytoFLEX (Beckman Coulter, Atlanta, Georgia, USA) を使用して解析した.

7. マイグレーション

既報に従い trans-well migration assay を行った¹⁸⁾. マイグレーションチャンバーの上段に cell culture inserts (8.0- μm pore size; Falcon, Corning, NY, USA), 下段に 24-well cell culture companion plates (Falcon) を使用した. Raw264.7 を 1000 ng/mL の rmSCRG1 と 1 % FBS を含む α MEMで48時間培養後, 1.0×10^6 cells を 350 μL の α MEMでマイグレーションチャンバーの上段に播種した. 下段には 50 ng/mL の rmCCL19 または rmCCL21 を含む 600 μL の α MEM を添加した. 12 時間の培養後に播種面に残存した細胞を綿棒で剥がし, cell culture

inserts の裏面に遊走した細胞のみを 4 % paraformaldehyde (phosphate buffer solution, Wako Pure Chemical) で固定, Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で 15 分間染色した. 光学顕微鏡 Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) での観察後, 拡大倍率 100 倍で Leica Application Suite (Leica Microsystems) にて写真撮影し, 視野に含まれる細胞数をカウントした.

8. 統計解析

提示されたデータは, 少なくとも 3 回以上の独立した実験結果を平均 \pm 標準偏差 (SD; n=5) として表示した. Tukey の多重比較検定によって統計的に分析し, $P < 0.05$ の値を示す群間を統計的な有意差とした.

結 果

1. SCRG1 のパラクリン作用によって発現が増加する遺伝子の同定

MSC によって分泌された SCRG1 は, 受容体 BST-1/ β -integrin 複合体を介してオートクリンに MSC の stemness を維持する³³⁾. 加えて,

Table 1. Genes whose expression increased more than 10-fold stimulated with rmSCRG1 in Raw264.7 cells.

Gene symbol	Gene name	Fold change relative to unstimulated Raw264.7 cells
<i>Ccl17</i>	chemokine (C-C motif) ligand 17	267652
<i>Pdgfd</i>	platelet-derived growth factor, D polypeptide	107204
<i>Tnfrsf19</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	89524.8
<i>Ccl21c</i>	chemokine (C-C motif) ligand 21c (leucine)	10441.2
<i>Il1b</i>	interleukin 1 beta	809.002
<i>Flt4</i>	FMS-like tyrosine kinase 4	648.067
<i>Ccl22</i>	chemokine (C-C motif) ligand 22	96.3358
<i>Cxcl11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	89.8845
<i>Ccl12</i>	chemokine (C-C motif) ligand 12	70.5219
<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	53.0765
<i>Ngfr</i>	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	34.5353
<i>Pdgfc</i>	platelet-derived growth factor, C polypeptide	26.9087
<i>Met</i>	met proto-oncogene	26.5382
<i>Csf1</i>	colony stimulating factor 1 (macrophage)	17.8766

BST-1 を発現するマウスマクロファージ様細胞 Raw264.7 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が報告されている³⁷⁾.

本研究では最初に SCRGI が Raw264.7 にパラクリンに作用することによる遺伝子発現の変動をプライマーアレイで解析した. Raw264.7 を 500 ng/mL の rmSCRGI で 24 時間処理し, 8 種類 のハウスキープング遺伝子と 88 種類のサイトカイン・サイトカイン受容体関遺伝子の発現変動を PrimerArray mouse cytokine-cytokine receptor interaction にて解析した. 未処理の Raw264.7 と比較して 10 倍以上の発現増加が認められた遺伝子を Table 1 に示す. SCRGI 処理によって 14 遺伝子に発現増加が認められた. rmSCRGI は *Saccharomyces cerevisiae* 由来であることから, より mature な SCRGI の作用を確認するため, マウス骨髄由来 MSC である SG2¹⁷⁾ と Raw264.7 の共培養実験を行った. Raw264.7 を SG2 と 24 時間共培養後に mouse lineage cell depletion kit を用いて Raw264.7 を単離し, 同様のプライマーアレイで遺伝子発現の変動を解析した. マウス骨髄由来線維芽細胞様細胞 SG6 との共培養と比較することで, 100 倍以上の発現増加を認めた 4 遺伝子を Table 2 に示す. これらの結果から, Raw264.7 において SCRGI 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 *Ccr7* に着目した.

2. SCRGI はマクロファージにおける CCR7 の発現を増強する

Raw264.7 を 1000 ng/mL の rmSCRGI で 24

時間処理し, qRT-PCR で *Ccr7* の mRNA 発現を解析した. その結果, 12 倍以上の有意な発現増加を認めた (Figure 1). さらに Raw264.7 に表出する CCR7 をフローサイトメトリーで解析した. rmSCRGI で 48 時間処理した Raw264.7 は顕著な CCR7 の発現増強が認められた

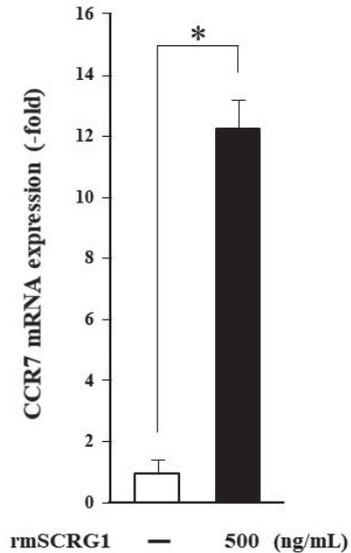


Figure 1 : SCRGI increases *Ccr7* mRNA expression levels in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were cultured in α MEM containing with 1% FBS and 1000 ng/mL of rmSCRGI for 24 h. qRT-PCR was performed with specific oligonucleotide primers for *Ccr7*. Transcript expression of *Ccr7* was normalized to *Gapdh* and results are indicated as fold-increase relative to the unstimulated cells by rmSCRGI. Data are presented as the means \pm SD (n=5). * $p < 0.05$ was considered significant.

Table 2. Genes whose expression increased more than 100-fold in Raw264.7 cells co-cultured with SG2 compared to SG6 cells.

Gene symbol	Gene name	Fold change relative to Raw264.7 culture only		Ratio of expression of co-culture with SG2 and SG6
		Co-culture with SG2	Co-culture with SG6	
<i>Cntfr</i>	ciliary neurotrophic factor receptor	24057776	0.63728031	37750697
<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	111756.56	0.37892914	294927.33
<i>Hgf</i>	hepatocyte growth factor	49667.000	0.57038186	87076.752
<i>Pdgfra</i>	platelet derived growth factor receptor	765.36282	0.15072598	5077.8427

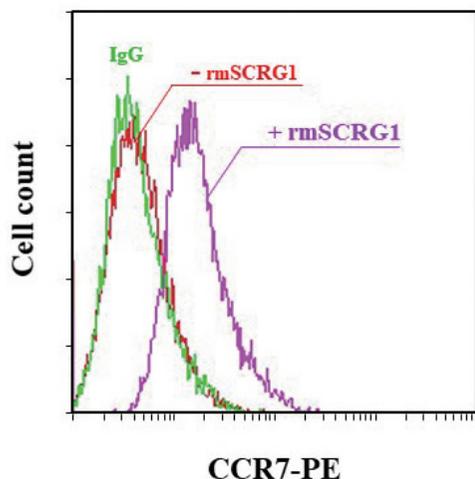


Figure 2 : SCR1 enhances CCR7 protein expression in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were cultured in a MEM containing with 1% FBS and 1000 ng/mL of rmSCR1 for 48 h. Expression of cell surface CCR7 was analyzed by flow cytometry with PE-conjugated anti-mouse CCR7 antibody. Specific antibody for stimulated rmSCR1 (purple), unstimulated (red), and isotype control IgG (green) are shown. Experiment was repeated at least three times with similar results. Representative data is shown.

(Figure 2). これらの結果から、SCR1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。

3. CCR7の発現増強はCCL19への走化性を特異的に促進する

CCR7は7回膜貫通レセプターを有したGタンパク共役受容体である。マクロファージに発現したCCR7とケモカインCCL19やCCL21が結合することで走化性を誘導することが報告されている³⁸⁾。また、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³⁹⁾。

Raw264.7を1000 ng/mLのrmSCR1を含む培地で48時間前培養し、trans-well

migration assayでケモカイン特異的な走化性を検証した。rmSCR1で前処理したRaw264.7をマイグレーションチャンバーの上層に播種し、下層にrmCCL19またはrmCCL21を添加した。rmSCR1で前処理したRaw264.7において、rmCCL19を下層に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(Figure 3)。しかしながら、rmCCL21に対する走化性は促進されなかった。対照群としてのrmSCR1未処理のRaw264.7はrmCCL19やrmCCL21に対する走化性に変化は認められなかった。以上の結果から、SCR1によってCCR7の発現が増強されたマクロファージは、CCL19に対する走化性が特異的に促進されることが示された。

考 察

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效果が、歯周炎の増悪に関与することを報告している^{40, 41)}。この分子メカニズムを明らかにする過程で、歯肉や歯根膜の線維芽細胞あるいはマクロファージから分泌された炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6ならびにTNF- α が線維芽細胞に作用することで、MSCの遊走促進効果を有するケモカインstromal cell-derived factor (SDF)-1 α / C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)ならびにmonocyte chemoattractant protein (MCP)-1 / CCL2の発現を誘導することを明らかにした¹⁸⁾。興味深いことに、MSCは線維芽細胞と細胞間接着を形成することで、抗炎症性サイトカインTGF- β とIL-10の発現を増強した。すなわち、線維芽細胞とMSCの相互作用は炎症抑制に重要な役割を担うことが示唆される。一方我々は、MSCのstemnessを維持するサイトカイン様ペプチドとしてSCR1を報告した³³⁾。MSCが分泌するSCR1は、我々によって同定された新規受容体BST-1 / β 1-integrin複合体を介してPhosphoinositide 3-kinase (PI3K) / Akt (protein kinase B, PKB)経路を活性化し、オートクリンにMSCの遊走効果を

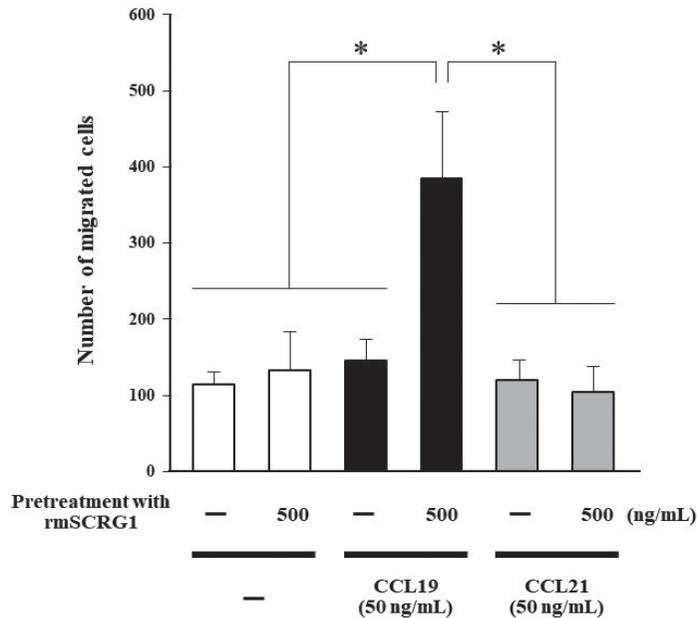


Figure 3 : Enhanced expression of CCR7 by SCR1 stimulation specifically promotes chemotaxis to CCL19. Raw264.7 cells were pretreated with or without 1000 ng/mL of rmSCR1 for 48 h. Trans-well migration assay for Raw264.7 cells by stimulation with or without 50 ng/mL of rmCCL19 or rmCCL21. After incubation for 12 h, the number of cells that had migrated to the underside of the membrane was counted. Data are presented as the means \pm SD (n=5). * p < 0.05 was considered significant.

も促進する。すなわち線維芽細胞由来の SDF-1 α 、MCP-1 と MSC 由来の SCR1 が相乗的に作用することで、より効果的な MSC の遊走が実現され、結果的に TGF- β や IL-10 による炎症の収束が期待される。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、SCR1 のマクロファージに対するパラクリン作用にも着目した。

マウスマクロファージ様細胞 Raw264.7 を rmSCR1 で刺激すると 14 遺伝子について mRNA 発現の上昇が認められた (Table 1)。本研究に用いた rmSCR1 は *Saccharomyces cerevisiae* 由来であることから、より mature な SCR1 の作用を確認するため、マウス骨髄由来 MSC である SG2¹⁶⁾ と Raw264.7 の共培養実験を行った。対照としたマウス骨髄由来線維芽細胞様細胞 SG6 と比較すると、SG2 の SCR1

mRNA 発現量は 3 倍以上であった (データは示さない)。Raw264.7 を SG2 と共培養すると 4 遺伝子について mRNA 発現の上昇が認められた (Table 2)。これら異なる実験で *Ccr7* の mRNA 発現のみ増加が認められた。そこで、定量的解析法である qRT-PCR で詳細に検討したところ、rmSCR1 刺激によって、Raw264.7 における *Ccr7* の mRNA 発現は 12 倍以上の有意な増加を認めた (Figure 1)。加えて、フローサイトメトリーで細胞に表出する CCR7 を確認したところ、rmSCR1 で刺激した Raw264.7 において顕著な CCR7 の発現増強が認められた (Figure 2)。これらの結果から、SCR1 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。また、*Ccr7* の mRNA 発現上昇は、固定した SG2 との共培養では認められないことから (データは示さない)、SG2 より分泌された SCR1 が Raw264.7 にパラクリンに作用したことが示唆された。

Raw264.7 は SCRG1 受容体としての BST-1 に加えて、 β 1- および β 2-integrin も発現している³⁷⁾。Glycosylphosphatidylinositol-anchor を有する BST-1 は CD38 ファミリーに属する NADase / ADP-ribosyl cyclase 活性を持つ ectoenzyme として知られている^{42, 43)}。骨髓由来間質細胞で発見され^{44, 45)}、プレ B 細胞においては細胞増殖や遊走を促進する⁴⁶⁾。BST-1 と β 1- または β 2-integrin 複合体は agonist monoclonal antibody の刺激により focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を誘導する^{47)~49)}。さらに、BST-1 は、Akt と mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化を介して白血球の接着と遊走を調節する^{50, 51)}。我々は、Raw264.7 において rmSCRG1 が extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化を誘導することを報告している³⁷⁾。今後、マクロファージにおいて SCRG1 によって誘導されるシグナル伝達経路が確定されることで、より詳細な発現機序の解明が期待される。

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 を発現するマクロファージは CCL19 や CCL21 に対して走化性を獲得する³⁸⁾。また、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^{39, 52)}。すなわち、CCR7 を発現した樹状細胞はリンパ管内皮やリンパ節の T 細胞領域に発現する CCL19 や CCL21 に走化性を示す。リンパ管内皮を通過後にリンパ節の T 細胞領域に移動して T 細胞と接触することで免疫応答を惹起する。SCRG1 によって CCR7 の発現が増加した Raw264.7 は、rmCCL19 に対する走化性が特異的に促進されることが示された (Figure 3)。しかしながら、rmCCL21 に対する走化性は促進されなかった。CCR7 は、CCL19 および CCL21 と結合する際にそれぞれ異なったコンホメーションをとっていると考えられている⁵³⁾。いずれの状態の受容体も G タンパク質シグナル伝達を活性化することができるが、 β -arrestin の会合、そしてその結果生じる脱感作や ERK

を介したシグナル伝達は、主に CCL19 によって誘導される。これは、1つの受容体を介した2種類のリガンドによる異なった細胞応答の仲介を可能にし、受容体への選択性の高い治療薬を開発するための有用な特性となり得る。本研究で示された CCL19 特異的な走化性の獲得の意味は明らかでなく、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た。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^{30-32, 54)}。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 によるマクロファージ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。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究をさせていただく機会と研究の遂行にあたり御指導賜りました岩手医科大学学生化学講座細胞情報科学分野石崎明教授に対し深甚なる感謝の意を表すとともに、岩手医科大学歯科保存学講座歯周療法学分野八重柏隆教授、細胞情報科学分野の皆様、ならびに、歯周療法学分野の皆様、御指導、御支援賜りましたすべての皆様に衷心より感謝の意を表します。なお、本論文の一部は第 42 回日本分子生物学会年会（令和元年 12 月 3 日～12 月 6 日、福岡）において発表した。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Ebersole, J. L., Taubman, M. A.: The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 5: 112-41, 1994.
- 2) Ebersole, J. L., Cappelli, D.: Gingival crevicular fluid antibody to *Actinobacillus actinomycetem-comitans* in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 9 (6) : 335-44, 1994.
- 3) Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.

- S., Bradley, A., Stewart, T. A.: Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.*, 259 (5102) : 1739-1742, 1993.
- 4) Gordon, S.: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.*, 3 (1) : 23-35, 2003.
 - 5) Montaner, L. J., da Silva, R. P., Sun J., Sutterwala, S., Hollinshead, M., Vaux, D., Gordon, S.: Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol.*, 15: 162 (8) : 4606-13, 1999.
 - 6) Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., Paul, W. E.: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.*, 17: 701-38, 1999.
 - 7) Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A.: Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer.*, 40 (11) : 1660-7, 2004.
 - 8) Stout, R. D., Suttles, J.: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.*, 76 (3) : 509-13, 2004.
 - 9) Prockop, D. J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.*, 4: 276 (5309) : 71-4, 1997.
 - 10) Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, L., Fisk, N. M.: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.*, 15: 98 (8) : 2396-402, 2001.
 - 11) In 't Anker, P. S., Noort, W. A., Kruisselbrink, A. B., Scherjon, S. A., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H. H., Fibbe, W. E.: Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34 (+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.*, 31 (10) : 881-9, 2003.
 - 12) In 't Anker, P. S., Noort, W. A., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A. B., van Bezooijen, R. L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H. H., Fibbe, W. E.: Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.*, 88 (8) : 845-52, 2003.
 - 13) In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F.H., Willemze, R., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H.: Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.*, 15: 102 (4) : 1548-9, 2003.
 - 14) Nakahara, H., Dennis, J. E., Bruder, S. P., Haynesworth, S.E., Lennon, D. P., Caplan, A. I.: In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res.*, 195 (2) : 492-503, 1991.
 - 15) Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.*, 13 (12) : 4279-95, 2002.
 - 16) Sawada, S., Chosa, N., Takizawa, N., Yokota, J., Igarashi, Y., Tomoda, K., Kondo, H., Yaegashi, T., Ishisaki, A.: Establishment of mesenchymal stem cell lines derived from the bone marrow of green fluorescent protein-transgenic mice exhibiting a diversity in intracellular transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signaling. *Mol Med Rep.*, 13 (3) : 2023-31, 2016.
 - 17) Igarashi, Y., Chosa, N., Sawada, S., Kondo, H., Yaegashi, T., Ishisaki, A.: VEGF-C and TGF- β reciprocally regulate mesenchymal stem cell commitment to differentiation into lymphatic endothelial or osteoblastic phenotypes. *Int J Mol Med.*, 37 (4) : 1005-13, 2016.
 - 18) Suzuki, K., Chosa, N., Sawada, S., Takizawa, N., Yaegashi, T., Ishisaki, A.: Enhancement of Anti-Inflammatory and Osteogenic Abilities of Mesenchymal Stem Cells via Cell-to-Cell Adhesion to Periodontal Ligament-Derived Fibroblasts. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 3296498. doi: 10.1155/2017/3296498.
 - 19) Regulski, M. J.: Mesenchymal Stem Cells: "Guardians of Inflammation". *Wounds.*, 29 (1) : 20-27, 2017.
 - 20) Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V.: Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.*, 8 (9) : 726-36, 2008.
 - 21) Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A.B., Ren, G.: How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.*, 33 (3) : 136-43, 2012.
 - 22) Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., Ringdén, O.: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.*, 1; 363 (9419) : 1439-41, 2004.
 - 23) Stemberger, S., Jamnig, A., Stefanova, N., Lepperdinger, G., Reindl, M., Wenning, G. K.: Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. *PLoS One.* 2011; 6 (5) : e19808. doi: 10.1371/journal.pone.0019808.
 - 24) Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V.: Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.*, 8 (9) : 726-36, 2008.
 - 25) Meirelles, Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D.T., Caplan, A. I.: Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20 (5-6) : 419-27, 2009.
 - 26) Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. M.: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.*, 15: 99 (10) : 3838-43, 2002.

- 27) Ooi, Y. Y., Ramasamy, R., Rahmat, Z., Subramaiam, H., Tan, S. W., Abdullah, M., Israf, D. A., Vidyadaran, S.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate BV2 microglia responses to lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol.*, 10 (12) : 1532-40, 2010.
- 28) Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., Mezey, E.: Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2) -dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.*, 15 (1) : 42-9, 2009.
- 29) Aggarwal, S., Pittenger, M.F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.*, 15; 105 (4) : 1815-22, 2005.
- 30) Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., Moretta, L.: Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.*, 1; 111 (3) : 1327-33, 2008.
- 31) Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.*, 1; 109 (1) : 228-34, 2007.
- 32) Lee, R. H., Oh, J. Y., Choi, H., Bazhanov, N.: Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair. *J Cell Biochem.*, 112 (11) : 3073-8, 2011.
- 33) Aomatsu, E., Takahashi, N., Sawada, S., Okubo, N., Hasegawa, T., Taira, M., Miura, H., Ishisaki, A., Chosa, N.: Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci Rep.*, 13; 4: 3652, 2014.
- 34) Dandoy-Dron, F., Guillo, F., Benboudjema, L., Deslys, J. P., Lasmézas, C., Dormont, D., Tovey, M. G., Dron, M.: Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem.*, 27; 273 (13) : 7691-7, 1998.
- 35) Dron, M., Bailly, Y., Beringue, V., Haeblerlé, A. M., Griffond, B., Risold, P. Y., Tovey, M. G., Laude, H., Dandoy-Dron, F.: Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci.*, 22 (1) : 133-46, 2005.
- 36) Dron, M., Bailly, Y., Beringue, V., Haeblerlé, A. M., Griffond, B., Risold, P. Y., Tovey, M. G., Laude, H., Dandoy-Dron, F.: SCRG1, a potential marker of autophagy in transmissible spongiform encephalopathies. *Autophagy.*, 2 (1) : 58-60, 2006.
- 37) Inoue, M., Yamada, J., Aomatsu-Kikuchi, E., Satoh, K., Kondo, H., Ishisaki, A., Chosa, N.: SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells. *Mol Med Rep.*, 15 (6) : 4069-4076, 2017.
- 38) Xuan, W., Qu, Q., Zheng, B., Xiong, S., Fan, G. H.: The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol.*, 97 (1) : 61-9, 2015.
- 39) Charo, I. F., Ransohoff, R. M.: The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.*, 9; 354 (6) : 610-21, 2006.
- 40) Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A., Naruishi, K.: Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Biomedical Research*, 43: 31-40, 2013.
- 41) Takizawa, N., Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A., Naruishi, K.: Secreted caveolin-1 enhances periodontal inflammation by targeting gingival fibroblasts. *Biomedical Research*, 43: 1-11, 2013.
- 42) Ishihara, K., Hirano, T.: BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo. *Chem Immunol.*, 75: 235-55, 2000.
- 43) Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., Aydin, S.: Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.*, 1; 88 (3) : 841-86, 2008.
- 44) Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T., Hirano, T.: BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 7; 91 (12) : 5325-9, 1994.
- 45) Goldstein, S. C., Todd, R. F. 3rd.: Structural and biosynthetic features of the Mo5 human myeloid differentiation antigen. *Tissue Antigens.*, 41 (4) : 214-8, 1993.
- 46) Funaro, A., Ortolan, E., Bovino, P., Lo Buono, N., Nacci, G., Parrotta, R., Ferrero, E., Malavasi, F.: Ectoenzymes and innate immunity: the role of human CD157 in leukocyte trafficking. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 1; 14: 929-43, 2009.
- 47) Lavagno, L., Ferrero, E., Ortolan, E., Malavasi, F., Funaro, A.: CD157 is part of a supramolecular complex with CD11b/CD18 on the human neutrophil cell surface. *J Biol Regul Homeost Agents.*, 21 (1-2) : 5-11, 2007.
- 48) Hussain, A. M., Lee, H. C., Chang, C. F.: Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. *Protein Expr Purif.*, 12 (1) : 133-7, 1998.
- 49) Okuyama, Y., Ishihara, K., Kimura, N., Hirata, Y., Sato, K., Itoh, M., Ok, L. B., Hirano, T.: Human BST-1 expressed on myeloid cells functions as a receptor molecule. *Biochem Biophys Res Commun.*, 21; 228 (3) : 838-45, 1996.
- 50) Lo Buono, N., Parrotta, R., Morone, S., Bovino, P., Nacci, G., Ortolan, E., Horenstein, A. L., Inzhutova, A., Ferrero, E., Funaro, A.: The CD157-integrin

- partnership controls transendothelial migration and adhesion of human monocytes. *J Biol Chem.*, 27; 286 (21) : 18681-91, 2011.
- 51) Funaro, A., Ortolan, E., Ferranti, B., Gargiulo, L., Notaro, R., Luzzatto, L., Malavasi, F.: CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration. *Blood.*, 15; 104 (13) : 4269-78, 2004.
- 52) Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M.: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.*, 1; 99 (1) : 23-33, 1999.
- 53) Kohout, T. A., Nicholas, S. L., Perry, S. J., Reinhart, G., Junger, S., Struthers, R. S.: Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem.*, 28; 279 (22) : 23214-22, 2004.
- 54) Aggarwal, S., Pittenger, M. F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.*, 15; 105 (4) : 1815-22, 2005.

SCRG1 induces chemotaxis to CCL19 by enhancing the expression of CCR7 in macrophage-like Raw264.7 cells

Keiko AIHARA

Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Takashi YAEGASHI)

[Received : December 20 2019 : Accepted : December 28 2019]

Abstract : Mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to modulate the properties in various types of immunocompetent cells. In this study, MSC-derived cytokine-like peptide, scrapie responsive gene 1 (SCRG1), was investigated for paracrine activity in macrophages. C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) was identified as a gene whose expression increases in mouse macrophage-like Raw264.7 cells upon stimulation with SCRG1 and co-culture with bone marrow-derived MSC, SG2 cells. Raw264.7 cells stimulated with SCRG1 were significantly increased the expression of CCR7. CCR7 is a receptor for CC-chemokine ligand (CCL) 19 and CCL21, which is an essential receptor for recruitment of T cells and dendritic cells to lymph nodes. Raw264.7 was pretreated with SCRG1, and then chemotaxis to CCL19 and CCL21 was investigated using trans-well migration assay. As a result, Raw264.7 cells pretreated with SCRG1 were significantly increased chemotaxis to CCL19; untreated with SCRG1 did not chemotaxis. Therefore, it was indicated that macrophages whose CCR7 expression was enhanced by SCRG1 stimulation specifically acquired chemotaxis to CCL19. It was suggested that SCRG1 secreted from MSCs in inflammatory tissue induces chemotaxis to CCL19 by paracrine activity in macrophages, and it will be involved in the mechanism by which macrophages exit the inflammatory tissue. The finding that MSC-derived SCRG1 promotes chemotaxis in macrophages may be available for cell therapy using MSC.

Key words : Mesenchymal stem cells, macrophage, SCRG1, CCR7, CCL19, chemotaxis