

論文内容の要旨

TGF- β 1-induced IL-6 expression via MEK pathway in mesenchymal stem cells enhances
NGF-dependent neurite extension in PC12 cells.

—間葉系幹細胞の MEK 経路を介した TGF- β 1 誘導性 IL-6 発現は PC12 細胞における
NGF 依存性神経突起伸長を増強する—

(宮前善尚、太田麻衣子、佐藤健一、石崎明、帖佐直幸)

(岩手医科大学歯学雑誌 第 47 巻、第 1 号、令和 4 年 4 月 掲載予定)

みやまえ よしひさ
宮前 善尚

I. 研究目的

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell、MSC) は損傷組織の修復に貢献している (Brohlin et al., PLoS ONE, 2012)。また、神経系の修復や再生には nerve growth factor (NGF) が局所に作用する。一方、マクロファージ等から分泌される transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は免疫応答の制御に重要な役割を果たすとともに、NGF の発現を誘導することが知られている。我々は、ラット歯周靱帯由来 MSC (Okubo et al., J Vasc Res, 2010) において、TGF- β 1 が NGF の発現を促進することを報告した (Ohta et al., Int J Mol Med, 2018)。この NGF の発現誘導は炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin (IL) -1 β によって抑制された。すなわち、炎症性サイトカインは MSC における NGF の発現を抑制することで、神経修復を負に制御することが示唆される。本研究では炎症および抗炎症性の両者の性質を有する IL-6 に着目し、MSC における TGF- β 1 誘導性 NGF の発現、ならびに IL-6 が神経修復に与える影響を検討した。最終的に MSC が有する神経細胞賦活化機構の一端を明らかにし、歯科治療や外科的侵襲によって損傷した末梢神経の効率良い再生を促すための基礎的知見を得ることを目的とした。

II. 研究方法

ヒト骨髄由来 MSC 株である UE7T-13 細胞を TGF- β 1 で処理し、サイトカイン・ケモカイン・成長因子の mRNA 発現について reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) 法で調査した。TGF- β 1 誘導性 IL-6 の発現については、細胞内シグナル伝達経路に特異的な阻害剤の影響を確認するとともに、タンパク質の分泌を enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) 法で検討した。さらに以下に示す二種類の方法を用いて、神経細胞様モデル細胞である PC12 細胞における神経突起伸長に及ぼす NGF な

らびに IL-6 の影響を評価した。最初に、① UE7T-13 細胞を TGF- β 1 で前処理し、TGF- β 1 誘導性の NGF および IL-6 が分泌された培養上清を調整した。可用性 IL-6 受容体 (sIL-6R) と sIL-6R 中和抗体を添加した培養上清で PC12 細胞を 72 時間培養した。さらに、② UE7T-13 細胞と PC12 細胞を trans-well チャンバーを用いて非接触型共培養を行った。細胞を TGF- β 1 で処理後、sIL-6R と sIL-6R 中和抗体を添加して 72 時間培養した。以上の実験を実施することで、UE7T-13 細胞から分泌された TGF- β 1 誘導性 NGF ならびに IL-6 が PC12 細胞の神経突起伸長に及ぼす影響を評価した。

III. 研究成績

UE7T-13 細胞における NGF の mRNA 発現は、TGF- β 1 刺激によって濃度・時間依存的に促進された。この NGF の発現促進は、IL-6 や sIL-6R の存在の有無に影響されなかった。加えて、TGF- β 1 刺激は UE7T-13 細胞における IL-6、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)、TGF- β 1 の mRNA 発現をも促進した。IL-6 の発現については、ELISA 法によるタンパク質の分泌増強ならびに TGF- β Type1 受容体と MEK/ERK の各阻害剤による発現抑制の効果が確認された。さらに、TGF- β 1 で前処理された UE7T-13 細胞の培養上清に sIL-6R を添加して PC12 細胞を培養した結果、神経突起伸長が顕著に増強された。この増強効果は sIL-6R 中和抗体で有意に抑制された。同様に trans-well チャンバーを用いた UE7T-13 細胞と PC12 細胞の非接触型共培養においても、sIL-6R 添加により PC12 細胞の神経突起伸長が増強し、sIL-6R 中和抗体で抑制された。また、TGF- β 1 は PC12 細胞における NGF ならびに IL-6 の発現に影響を与えなかった。

IV. 考察及び結論

TGF- β 1 は主として Smad 経路を介して転写因子 Smad2/3 を活性化することで標的遺伝子の転写を調節する。また、MAP キナーゼ経路として MEK/ERK、JNK、p38 MAPK を活性化することも知られている。本研究において、UE7T-13 細胞における TGF- β 1 誘導性 IL-6 の発現増強は TGF- β Type1 受容体ならびに MEK 阻害剤によって抑制されたが、Smad 経路阻害剤の効果は認められなかった。このことから、MSC における TGF- β 1 誘導性 IL-6 の発現増強は MEK/ERK を介することが示された。一方、PC12 細胞は NGF 刺激で交感神経様ニューロンへと分化することから、神経突起伸長のモデル細胞として汎用される。本研究において、TGF- β 1 で前処理された UE7T-13 細胞の培養上清に sIL-6R を添加して PC12 細胞を培養した結果、神経突起伸長が顕著に増強され、この増強効果は sIL-6R 中和抗体で抑制された。UE7T-13 細胞と PC12 細胞の非接触型共培養においても、同様に sIL-6R 添加により PC12 細胞の神経突起伸長が増強し、sIL-6R 中和抗体で抑制された。この結果から、TGF- β 1 刺激によって MSC から分泌された NGF が PC12 の神経突起伸長を誘導し、同様に分泌

された IL-6 が神経突起伸長を増幅させることが強く示唆された。IL-6 は、膜型受容体と結合すると glycoprotein-130 (gp130) と会合し、主として JAK/STAT 経路を活性化する。膜型受容体を発現しない細胞に対しては sIL-6R と複合体を形成することで作用を発揮する。本研究において PC12 細胞における IL-6 のシグナル伝達経路は明らかになっておらず、IL-6 の神経分化ならびに神経突起伸長の分子メカニズムの解明は今後の課題である。

MSC の免疫調節は細胞間接触と液性因子によって制御される。本研究において、我々は TGF- β 1 が MSC に作用することで NGF と IL-6 の両者の発現を誘導することを明らかにした。MSC より分泌された NGF は神経分化ならびに神経突起伸長を誘導するとともに、同時に分泌された IL-6 が神経突起伸長を増強することが示された。これらの結果は、TGF- β 1 に暴露された MSC の存在する微小環境下では、神経分化と成長が促進されることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	千葉俊美	教授	(口腔医学講座関連医学分野)
副査	佐藤健一	教授	(口腔顎顔面再建学講座歯科麻酔学分野)
副査	帖佐直幸	准教授	(生化学講座細胞情報科学分野)

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell、MSC) は損傷組織の修復に貢献している。また、神経系の修復や再生には nerve growth factor (NGF) が局所に作用する。炎症の場において、マクロファージ等から分泌される transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は免疫応答の制御に重要な役割を果たすとともに、NGF の発現を誘導することが知られており、神経再生・修復の基礎的知見は、一定程度確立されている。一方、臨床の現場では、歯科治療や外科手術の侵襲により損傷した末梢神経の治療は、対症療法に依存している現実があり、根治的治療は確立されていない。本研究では炎症および抗炎症性の両者の性質を有する interleukin (IL)-6 に着目し、MSC における TGF- β 1 誘導性 NGF の発現、ならびに IL-6 が神経修復に与える影響を検討した。最終的に MSC が有する神経細胞賦活化機構の一端を明らかにし、歯科治療や外科的侵襲によって損傷した末梢神経の効率良い再生を促すための基礎的知見を得ることを目的とした。

本研究の結果から、TGF- β 1 の作用によって MSC から分泌された NGF が神経分化のモデル細胞である PC12 の神経突起伸長を誘導すること、さらに同様に分泌された IL-6 が神経突起伸長を増強させることが強く示唆された。IL-6 は膜型受容体と結合すると glycoprotein-130 (gp130) と会合し、主として JAK/STAT 経路を活性化する。膜型受容体を有しない細胞に対しては可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) と複合体を形成することで gp130 と会合し、JAK/STAT 経路を介して作用を発揮する。MSC による免疫調節作用は細胞間の接触と液性因子によって制御される。本研究では液性因子である成長因子やサイトカインに着目しており、TGF- β 1 が MSC に作用することで NGF と IL-6 の両者の発現を誘導することを明らかにした。MSC より分泌された NGF は神経分化ならびに神経突起伸長を誘導するとともに、同時に分泌された IL-6 が神経突起伸長を増強することが示された。これらの結果は、TGF- β 1 に暴露された MSC の存在する微小環境下では、神経分化と成長が促進されることを示唆するものである。

今後の課題として PC12 細胞における IL-6 のシグナル伝達経路の検証、IL-6 の

神経分化ならびに神経突起伸長の分子メカニズムの解明が示された。本研究の成果は今後の神経再生を実現化するための医療、さらには細胞治療やサイトカイン療法の発展に大いに貢献するものと考えられる。本論文は臨床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。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問： 間葉系幹細胞 MSC に対し、IL-1 β および TNF- α でそれぞれ単独で処理すると、NGF の発現はどうなるのか。また、TGF- β 1 による NGF 発現を抑制した IL-1 β および TNF- α をどのように解釈しているか。

答： TGF- β 1 は、炎症抑制性に作用し、炎症性サイトカインである IL-1 β および TNF- α は、炎症促進性に作用する。炎症抑制性に働くと NGF 発現が上昇する一方、炎症促進性に働くと NGF 発現が減少する。従って、MSC を炎症性サイトカインで処理すると、NGF 発現はほとんど変化しない。すなわち、修復の方向に作用した TGF- β 1 の作用を炎症性サイトカインである IL-1 β および TNF- α が抑えたと解釈できる。

問： IL-6 / JAK / STAT 経路において、膜結合型 IL-6 受容体と可溶性 IL-6 受容体があるとの説明があったが、各種細胞は、どちらの受容体を有していることが多いのか。

答： 多くの細胞種は、可溶性 IL-6 受容体を有している一方、膜結合型 IL-6 受容体を有す細胞種は少ない。本研究で用いた間葉系幹細胞 UE7T-13 は、可溶性 IL-6 受容体を有しており、可溶性 IL-6 受容体を添加して実験を進めた。一方、膜結合型 IL-6 受容体を有する細胞として、肝実質細胞が挙げられる。

問： TGF- β 1 による UE7T-13 の NGF 発現ならびに IL-6 発現への影響の実験で、TGF- β 1 の濃度を 10 ng/ml にした理由はなにか。

答： NGF 発現については、TGF- β 1 濃度を 10ng/ml 以上で処理したサンプルの NGF の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に上昇したため、NGF 発現に最低限必要な TGF- β 1 濃度を 10 ng/ml と設定した。同様に、IL-6 発現については、TGF- β 1 濃度を 5ng/ml で処理したサンプルの IL-6 発現の mRNA 発現量と Control 群との間に有意差を認めず、

TGF- β 1 濃度を 10 ng/ml 以上で処理したサンプルの IL-6 の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に上昇したため、IL-6 発現に最低限必要な TGF- β 1 濃度を 10 ng/ml とした。

したがって、NGF ならびに IL-6 発現に対する時間依存性の有無を検証する際の TGF- β 1 濃度についても 10 ng/ml と設定した。

問： TGF- β 1 が UE7T-13 に与える影響において、ケモカインである CXCL12 ならびに CCL2 の mRNA 発現を検証したのはなぜか。

答： CXCL12 ならびに CCL2 は、MSC に対してオートクリン、パラクリンに作用するケモカインである。結果的に TGF- β 1 の CXCL12 ならびに CCL2 発現に対する影響は認められなかったが、TGF- β 1 の影響があれば、NGF の作用を効率的に MSC 自身また周囲の細胞に作用させることも考えられたため、CXCL12 ならびに CCL2 の発現を検証した。

問： TGF- β 1 による UE7T-13 の IL-6 の mRNA 発現に対する影響の実験において、UE7T-13 を TGF- β 1 で処理後、1 時間経過で IL-6 の発現が上昇し、3 時間経過で減少後、6 時間経過で上昇していることについて、どのように考えているか。

答： 複数の TGF- β 1 のシグナル経路を経由している可能性が考えられる。すなわち、TGF- β 1 処理後、1 時間経過で IL-6 発現が上昇する経路と、6 時間経過以降で IL-6 発現が上昇する経路がある可能性があり、結果的に二相性に IL-6 の mRNA 発現が上昇したと考えられる。また、3 時間経過後に IL-6 の発現が減少した理由としては、1 時間経過で IL-6 の発現上昇が飽和状態となり、3 時間経過した段階では、どのシグナル経路も活性化していない可能性が考えられる。

問： TGF- β 1 による IL-6 発現増強効果への影響において、JNK 経路を阻害したのにもかかわらず、TGF- β 1 単独処理群と比較して、IL-6 の発現が上昇したことについて、どのように考えているか。

答： JNK 経路が IL-6 発現に対して抑制的に働いている可能性がある。すなわち、抑制的に働いていた経路を阻害することによって、IL-6 発現促進に関係するシグナル経路が活性化した可能性があると考えている。また、JNK 経路の阻害によって、IL-6 発現促進のシグナルが、その他の経路に多く流れ、IL-6 発現が上昇した可能性がある。

問： 将来的展望として、本研究の基礎的知見が臨床応用されるとしたら、どのような治療方法になると考えているか。

答： 患者の細胞を TGF- β 1 で処理し、TGF- β 1 処理の細胞から TGF- β 1 誘導性 NGF ならびに IL-6 を患者の損傷末梢神経に作用させることを考えている。TGF- β 1 は生体の恒常性を維持する重要なサイトカインであり、多くの細胞種に存在することから TGF- β 1 を用いることが治療の汎用性を考慮すると、有効ではないかと考える。