

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19173

研究課題名(和文) 神経細胞に対する栄養作用と局所消炎作用とを兼ね備えた新たな神経組織再生医療戦略

研究課題名(英文) Establishment of novel regenerative strategy with neurotrophic and anti-inflammatory effects on neuronal cells

研究代表者

太田 麻衣子(Ohta, Maiko)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：60824993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、以前に、組織修復性サイトカイン刺激により歯周靭帯由来間葉系幹細胞(PDL-MSC)から分泌される神経栄養因子(NGF)が、神経細胞の突起を伸長することや、炎症性サイトカインがPDL-MSCでのNGFの発現を抑制することを報告した。これらの発見は、歯周靭帯では非炎症環境下でMSC由来のNGFによる感覚神経受傷後の再生メカニズムが働くことを示唆している。本研究では、神経組織修復因子としての臨床応用が期待されるNGFによる神経再生効果を最大限に引き出すための細胞・分子学的基盤の一部を確立した。今後は、MSCをはじめとした抗炎症性細胞を応用した革新的な神経再生療法の樹立を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非炎症性環境下では、間葉系幹細胞(MSC)の持つ神経組織再生能力が十分に発揮されることは、以前に報告済みである。本研究では、組織修復性サイトカインTGF-betaが、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)における炎症性サイトカインIL-6の発現を促進することを新たに発見した。興味深いことに、このhMSC由来のIL-6は、神経細胞に対するhMSC由来NGFによる神経細胞再生効果を増強することが、明らかとなった。本研究成果は、MSCを利用した神経再生療法の、炎症環境での利用にも適することを示唆するものであり、hMSCを用いた革新的な神経再生療法の樹立のための細胞・分子学的基盤の一部となるものである。

研究成果の概要(英文)： We previously found that regenerative cytokine TGF-beta induced synthesis and secretion of nerve growth factor (NGF) from periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells (PDL-MSCs), resulting in neurite extension in co-cultured neuronal cells. In addition, inflammatory cytokines abrogated the TGF-beta-induced synthesis of NGF in PDL-MSCs. In this study, we partially elucidated molecular mechanisms underlying MSC-promoted neuroregeneration. In future, we will establish novel neuroregenerative therapy by using MSCs.

研究分野：歯学

キーワード：間葉系幹細胞 神経組織再生 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

三叉神経第三枝下顎神経の枝として知られる下歯槽神経は、下顎孔より入り下顎管を走行してオトガイ孔から出た後にオトガイ神経となりオトガイ部や下唇部の知覚を司る。また、下歯槽神経は下顎管の走行中に多数の分枝を下顎骨内に配し下歯槽神経叢を形成して下顎の歯や歯周組織に分布する。とくに歯周靭帯にはこの組織への圧力センサー（圧力受容器）として働くルフィニ様小体が分布しており、受容された機械的刺激の情報は比較的太い下歯槽神経を介して三叉神経核に送信される。一方、歯髄、象牙質ならびに歯周靭帯には痛覚受容器が分布しており様々な痛み刺激を情報化するが、この情報は細い下歯槽神経を介して三叉神経核に送信される。これらの機械的刺激や痛み刺激を送信する感覚神経が受傷すれば神経突起は萎縮し退行変性が進行する。その後、神経再生過程すなわち軸索や神経突起の伸長に到るまでには、神経周囲のシュワン細胞から分泌される神経栄養因子 nerve growth factor (NGF)をはじめとした神経栄養因子群が働くものと考えられており、NGFなどの神経栄養因子を神経再生医療に応用することが期待されることである。しかし実際の歯科医療の現場では、下顎埋伏智歯の抜歯の際の下歯槽神経損傷時にオトガイ部の知覚麻痺がしばしば認められるが、この治療法としては局所の安静を保ち神経の再生を待つなどの消極的且つ保存的な療法を選択するのみである。また、下歯槽神経やオトガイ神経が再生し知覚麻痺が治癒するまでには1年あるいは2年の歳月を必要とする場合もあり、歯科医療における積極的な神経再生療法の樹立が待たれている。

我々の体内の各組織中には、炎症などによる組織破壊の後に組織再生に働く体性幹細胞 (somatic stem cell) が存在する。体性幹細胞の一つとして知られる間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織、歯髄あるいは歯周靭帯中に存在し、骨組織、軟骨組織、脂肪組織、靭帯組織、血管組織ならびに筋肉組織などの再生能力がある幹細胞として知られており、再生医療への幅広い応用が期待されている。また最近、この間葉系幹細胞は抗炎症性マクロファージ (M2-M $\Phi$ ) と制御性 T 細胞 (Treg) の炎症巣周囲へのホーミングを誘導することで炎症反応を抑制することや、造血性幹細胞移植時に間葉系幹細胞を同時移植することで造血幹細胞ニッチとして働き造血前駆細胞の増殖や分化を支持することなどが明らかとされつつある。このように間葉系幹細胞はその組織再生能力のみならず、周囲の様々な細胞に働きかけてその機能を調節することにより人体に利益を齎すことが明らかとされてきている。しかし、間葉系幹細胞が神経細胞の再生に如何なる利益を齎すかどうかは明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

NGF は神経突起の伸長などに働いて受傷後の神経組織の再生に働く神経栄養因子 (ニューロトロフィン) である。我々はこれまでに、M2-M $\Phi$  から分泌されると報告されている transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) の刺激により、歯周靭帯由来間葉系幹細胞 PD-MSC が NGF を分泌することを報告している (Ohta et al, Int J Mol Med, 43:1484-1494, 2018)。また、興味深いことに、炎症性サイトカイン [interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) ならびに tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )] はこの TGF- $\beta$  による NGF 発現促進効果を抑制するが、その主要なシグナル伝達機構は不明のままである。このように、炎症性サイトカインによる刺激が無い環境下では、歯周靭帯由来間葉系幹細胞の持つ神経組織再生能力が十分に発揮されることから、この間葉系幹細胞を利用した神経再生医療の実現のためには、消炎療法との併用療法が望ましい。

本研究では、神経組織修復因子としての臨床応用が期待される NGF による神経再生効果を最大限に引き出すための細胞・分子学的基盤を確立し、将来的な hMSC をはじめとした抗炎症性細胞を応用した革新的な神経再生療法の樹立を目指したい。

## 3. 研究の方法

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) である UE7T-13 細胞を TGF- $\beta$ 1 で刺激し、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- $\beta$ 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、IL-6 タンパク質の分泌を enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) 法で検討した。

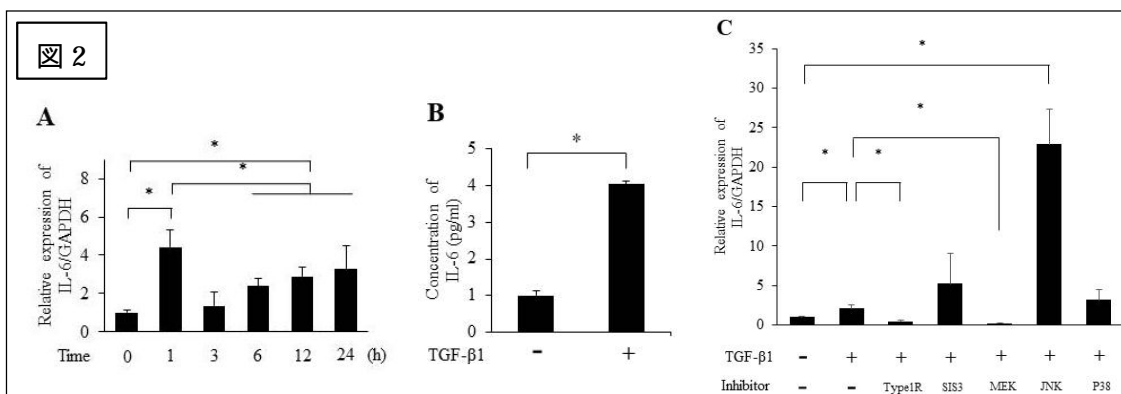
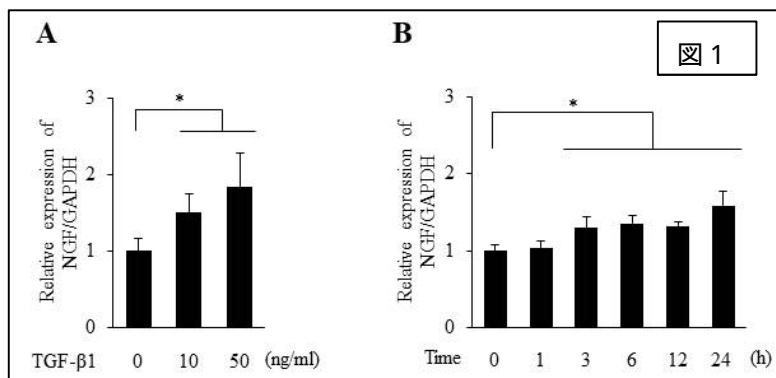
また、以下の(1)~(2)に示す通りに、神経細胞様モデル細胞である PC12 細胞における神経突起伸長に及ぼす NGF ならびに IL-6 の影響を評価した。(1) UE7T-13 細胞を TGF- $\beta$ 1 で前処理し、TGF- $\beta$ 1 誘導性の NGF 及び IL-6 が分泌された培養上清を調整した。可用性 IL-6 受容体 (sIL-6R) と sIL-6R 中和抗体を添加した培養上清を用いて、PC12 細胞を 72 時間培養した。(2) UE7T-13 細胞と PC12 細胞を trans-well チャンバーを用いて非接触型共培養を行った。その際、細胞を TGF- $\beta$ 1 で処理後に、sIL-6R と sIL-6R 中和抗体を添加して 72 時間培養した。

得られたデータの統計学的な評価において、3群以上のデータ集団における2群間比較をす

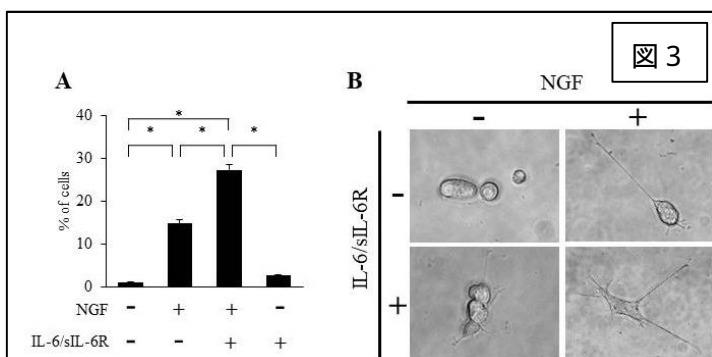
際には、Tukey's multiple comparison test を利用して有意差の検定を実施した。また、2 群間の比較をする際には、Student's t-test を実施した。

#### 4 . 研究成果

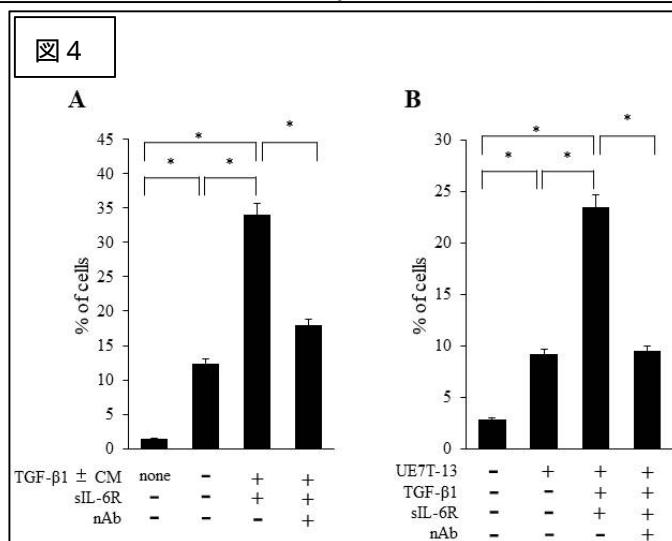
UE7T-13 細胞における NGF の mRNA 発現は、TGF- $\beta$ 1 刺激によって濃度・時間依存的に促進された (図 1 A, B)。また、この TGF- $\beta$ 1 刺激による NGF の発現促進効果は、IL-6 や sIL-6R による刺激の有無には影響されなかった(データ示さず)。加えて、TGF- $\beta$ 1 刺激は UE7T-13 細胞における IL-6 の mRNA 発現を促進した (図 2 A)。IL-6 の発現については、ELISA 法によるタンパク質レベルでの分泌増強が認められた (図 2 B)。また、興味深いことに、TGF- $\beta$  Type 1 受容体と MEK/ERK に



に対する各阻害剤による発現抑制の効果が確認された (図 2 C)。加えて、IL-6 と可溶性 IL-6 受容体の同時投与により、NGF 刺激で認められた PC12 細胞の神経突起の伸長促進効果が、さらに増強された。しかし、IL-6 と可溶性 IL-6 受容体のみによる刺激 (NGF は投与せず) は、この細胞の神経突起の



伸長を誘導しなかった (図 3 A, B)。また、TGF- $\beta$ 1 で前処理された UE7T-13 細胞の培養上清に、さらに sIL-6R を添加して PC12 細胞に与えたところ、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 (図 4 A)。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 (図 4 B)。また、TGF- $\beta$ 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(データ示さず)。



TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1誘導性IL-6の発現増強効果は、TGF- $\beta$  Type 1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SIS3による抑制効果は認められなかった(図2C)。このことから、MSCにおけるTGF- $\beta$ 1誘導性のIL-6の発現増強効果は、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- $\beta$ 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- $\beta$ 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、同時にMSCから分泌されたIL-6が、このNGFによる神経突起伸長効果を増強することが、強く示唆された。本研究成果は、MSCを利用した神経再生療法が、IL-6が存在する炎症環境での利用にも適することを示唆するものであり、hMSCを用いた革新的な神経再生療法の樹立のための細胞・分子学的基盤の一部となるものと考えている。

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経路を活性化することが知られている。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gp130と会合できるようになり、その作用を発揮する。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、その解明は今後の課題である。また、現在、hMSCと抗炎症性M2-マクロファージを併用した革新的な神経再生療法の樹立の可能性について明らかとすべく、hMSC、M2-マクロファージ並びにPC12細胞による非接触型共培養を用いた調査を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihisa MIYAMAE, Maiko OHTA, Kenichi SATO, Akira ISHISAKI, Naoyuki CHOSA	4. 巻 47
2. 論文標題 TGF- $\beta$ 1-induced IL-6 expression via MEK pathway in mesenchymal stem cells enhances NGF-dependent neurite extension in PC12 cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Journal of Iwate Medical University	6. 最初と最後の頁 19-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田麻衣子
2. 発表標題 歯周靭帯組織中の感覚神経再生機構の分子レベルでの解明と感覚神経再生促進療法開発のための分子基盤の確立
3. 学会等名 岩手医科大学歯学会第47回総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田麻衣子
2. 発表標題 歯根膜由来線維芽細胞においてリポ多糖はToll様受容体4を介したシグナル伝達によりトランスフォーミング成長因子ベータにより誘導される神経成長因子の発現を抑制する
3. 学会等名 岩手医科大学歯学会第87回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅美和子, 太田麻衣子, 石川直樹, 三浦仁, 四戸豊, 佐藤雅仁, 佐藤健一
2. 発表標題 気管チューブの咽頭後壁への迷入により手術を延期した1症例
3. 学会等名 第34回東日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大熊高英, 菅美和子, 太田麻衣子, 石川直樹, 四戸豊, 佐藤雅仁, 佐藤健一
2. 発表標題 フェリプレシン含有3%塩酸プロピトカインにより術後メトヘモグロビン血症を発症したメチレンブルーの投与を必要とした一例
3. 学会等名 第47回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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