

## 論文内容の要旨

Toll-like receptor 4-mediated signaling activated by lipopolysaccharide suppresses transforming growth factor-beta-induced nerve growth factor expression in periodontal ligament-derived fibroblasts  
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  
(岩手医科大学歯学雑誌 平成 30 年掲載予定)

おおた まいこ  
太田 麻衣子

### I. 研究目的

歯根膜にはこの組織への物理的刺激を情報化して三叉神経節に送信する機能を持つ感覚神経終末が配されている。一旦、この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。神経栄養因子 nerve growth factor (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とされている。

歯髄などに存在する間葉系細胞では、抗炎症性ならびに組織修復性サイトカインとして知られるトランスフォーミング成長因子ベータ transforming growth factor-beta (TGF- )の刺激により NGF の産生が促進されると報告されている<sup>1)</sup>。TGF- はその受容体結合後の細胞内シグナル伝達系において、Smad2/3 を介する主要な伝達経路に加え、p38 などの mitogen-activated protein kinase (MAPK)や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt を介する non-Smad 伝達経路を活性化することが知られている<sup>2)</sup>。一方、口腔内常在グラム陰性菌の細胞壁外膜にはリポ多糖 lipopolysaccharide (LPS)が存在しており、LPS は線維芽細胞やマクロファージなどの細胞膜上の Toll 様受容体 Toll-like receptor(TLR)に結合した後、nuclear factor-kappa B (NF- B)を介した主要なシグナル伝達経路に加え、p38 などの MAPK を介したシグナル伝達経路を活性化することにより炎症性サイトカイン産生促進などの炎症性反応を進行させることが知られている<sup>3)</sup>。しかし、歯周靭帯由来間葉系細胞における TGF- による NGF 産生促進効果に対し、LPS がどのような影響を与えるかについて、各細胞内シグナル伝達経路の相互作用 cross-talk の見地から明らかとした例はない。今回われわれは、歯周靭帯由来線維芽細胞で TGF- の刺激により産生誘導される NGF に対し、LPS がどのような影響を及ぼすかについて、その細胞内シグナルに着目して調査した。

### 参考文献

- 1) Lindholm D, Hengerer B, Zafra F, and Thoenen H: Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. Neuroreport 1: 9-12, 1990.
- 2) Mu Y, Gudey SK, and Landström M: Non-Smad signaling pathways. Cell Tissue Res 347: 11-20, 2012.
- 3) Brown J, Wang H, Hajishengallis, GN, Martin M: TLR-signaling networks: An integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. J Dental Res 90: 417-427, 2011.

### II. 研究方法

ラット歯根膜由来 SCDC2 細胞を TGF- 1 で刺激して NGF の発現を誘導した。次いで、この TGF- 1 による NGF 発現誘導効果が LPS の投与によりどのように影響されるかについて qRT-PCR 法や ELISA 法を用いて評価した。また、シグナル伝達分子阻害剤を用い、TGF- 1 により活性化するどのシグナル伝達経路が NGF の発現誘導効果に影響するのかについて調査した。加えて、LPS が TGF- 1 で活性化される細胞内シグナル伝達経路のうちいずれの経路に働いて TGF- 1 による NGF 発現誘導効果に影響するのかについて、ウェスタン

ブロット法にて調査した。さらに、SCDC2細胞と神経突起伸長細胞モデルとしてのラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞との共培養系にて、TGF-1で刺激されたSCDC2細胞より産生されるNGFが神経栄養因子としての活性を有しているかどうか調査した。また、この共培養系を用い、SCDC2細胞より産生されるNGFによるPC12細胞の神経突起伸長誘導効果にLPSがどのような影響を与えるかについて調査した。

### III. 研究成績

1. LPSはSCDC2細胞においてTGF-1により誘導されるNGFの発現を抑制したが、このLPSによる抑制効果はToll様受容体4阻害剤により打ち消された。
2. TGF-1はSmad2/3ならびにp38 MAPK依存的にNGFの発現を誘導する(投稿中の未発表データ)が、LPSはこのTGF-1によるp38 MAPKの活性化を阻害することが明らかとなった。
3. TGF-1によるNGF発現誘導に対するLPSの抑制効果は、NF- $\kappa$ B経路の阻害剤により打ち消された。
4. TGF-1刺激を施したSCDC2細胞とPC12細胞の共培養系にて、PC12細胞の神経突起伸長が有意に促進されたが、この神経突起伸長促進効果は、TGF-1受容体阻害剤、NGF受容体阻害剤、あるいはLPSの投与にて打ち消された。
5. TGF-1刺激によりMAPKファミリーに属するextracellular signal-regulated kinase (ERK)やPI3K/Aktの活性化は認められなかったが、ERKキナーゼ阻害剤ならびにPI3K/Akt阻害剤により、TGF-1で誘導されるNGF発現促進効果が減弱された。

### IV. 考察及び結論

1. 歯周靭帯由来線維芽細胞においてLPSにより活性化されるToll様受容体4を介したNF- $\kappa$ B依存的な細胞内シグナルは、TGF-1によるNGF発現誘導効果を抑制することが示唆された。
2. LPSはTGF-1によるp38 MAPKの活性化を阻害することにより、TGF-1によるNGF発現誘導効果を抑制することが示唆された。
3. TGF-1によるNGF発現誘導効果において、ERKやPI3K/Aktのbasal activity(定常活性)が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
4. 歯周靭帯由来線維芽細胞から分泌されたNGFは神経突起を伸長させる神経栄養的な機能を有しているが、LPSはその機能を抑制することが示唆された。

以上のように口腔内のグラム陰性菌細胞壁外膜由来のLPSは、歯周靭帯由来線維芽細胞におけるTGF-1によるNGF産生促進効果をNF- $\kappa$ B依存的に阻害することにより、歯周靭帯由来線維芽細胞が有する神経組織再生能力を減弱することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授	千葉 俊美 (口腔医学講座 関連医学分野)
副査 教授	石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授	佐藤 健一 (口腔顎顔面再建学講座 歯科麻酔学分野)

本研究では、歯周靭帯由来線維芽細胞(SCDC2細胞)でTGF- $\beta$ の刺激により産生誘導されるNGFに対し、LPSがどのような影響を及ぼすかについて、細胞内シグナル伝達系がどのように影響するか調査し、以下の研究結果を得た。

1. LPS は SCDC2 細胞において TGF- $\beta$ 1 により誘導される NGF の発現を抑制したが、この LPS による抑制効果は Toll 様受容体(TLR) 4 阻害剤により打ち消された。
2. TGF- $\beta$ 1 は Smad2/3 ならびに p38 MAPK 依存的に NGF の発現を誘導するが、LPS はこの TGF- $\beta$  による p38 MAPK の活性化を阻害することが明らかとなった。
3. TGF- $\beta$ 1 による NGF 発現誘導に対する LPS の抑制効果は、NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤により打ち消された。
4. TGF- $\beta$ 1 刺激を施した SCDC2 細胞と PC12 細胞の共培養系で、PC12 細胞の神経突起伸長が有意に促進されたが、この神経突起伸長促進効果は、TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤、NGF 受容体阻害剤、LPS の投与により打ち消された。
5. TGF- $\beta$ 1 刺激により MAPK ファミリーに属する ERK や PI3K/Akt の活性化は認められなかったが、ERK キナーゼ阻害剤ならびに PI3K/Akt 阻害剤により、TGF- $\beta$ 1 で誘導される NGF 発現促進効果が減弱された。

これらの結果より以下のような考察がなされた。

1. SCDC2 細胞において LPS により活性化される TLR4 を介した NF- $\kappa$ B 依存的な細胞内シグナルは、TGF- $\beta$ 1 による NGF 発現誘導効果を抑制することが示唆された。
2. LPS は TGF- $\beta$ 1 による p38 MAPK の活性化を阻害することにより、TGF- $\beta$ 1 による NGF 発現誘導効果を抑制することが示唆された。
3. TGF- $\beta$ 1 による NGF 発現誘導効果において、ERK や PI3K/Akt の basal activity (定常活性) が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
4. SCDC2 細胞から分泌された NGF は神経突起を伸長させる神経栄養的な機能を有しているが、LPS はその機能を抑制することが示唆された。

### 試験・試問結果の要旨

歯周靭帯由来線維芽細胞(SCDC2 細胞)の TGF- $\beta$  刺激により産生誘導される NGF に対する LPS の影響を、細胞内シグナルに関与する Smad2/3、MAPK、PI3K/Akt、TLR、NF- $\kappa$ B について試問し、適切な回答を得た。学位に値する学識を有することを認めた。

### 参考論文

1. IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  suppress TGF- $\beta$ -promoted NGF expression in periodontal ligament-derived fibroblasts through inactivation of TGF- $\beta$ -induced Smad2/3 and p38 MAPK  
Cellular Physiology and Biochemistry 平成 30 年掲載予定  
(Maiko Ohta 他 9 名と共著)