

**研究者：黒厚子璃佳**（所属：東京医科歯科大学 小児歯科学・障害者歯科学分野）

## **研究題目：FGF2-CCL11 を軸とした歯髄免疫応答反応の治療への応用戦略の基盤研究**

### **目的：**

近年、組織再生における炎症プロセスの重要性が注目されている。Fibroblast growth factor 2 (FGF2) は、歯科領域においては歯周組織の細胞増殖、血管新生、再生等の研究で臨床応用が進む分子である。他の因子との相互作用も多岐にわたるが、その役割については不明な点も多く残り、歯髄における炎症との関連についても未だ解明されていない。そこで、本研究では FGF2 が歯髄細胞において炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響についての解析を目的とする。

### **対象および方法：**

ヒト歯髄由来 MSC として、永久歯への交換の際に脱落した乳歯の歯髄組織より樹立した SDP11 細胞を使用した。SDP11 細胞では、間葉系幹細胞マーカーである CD146 と Abcg2 および象牙芽細胞マーカーである DSPP と DMP-1 が発現している。また、SDP11 細胞は骨誘導条件下では骨芽細胞様細胞へと分化し石灰化結節を形成する。一方で、脂肪誘導条件下においては脂肪細胞様細胞へ分化し、脂肪滴を形成するといった多能性を示す細胞株である。この SDP11 細胞を 24 時間後に細胞密度が 100% となるよう 35 mm 径細胞培養皿に  $6 \times 10^4$  個播種し 24 時間経過後、20 ng/ml の FGF2 を投与し、48 時間後に mRNA を抽出した。mRNA から作成した cDNA を用いてサイトカインアレイにて炎症性サイトカイン遺伝子の発現解析を行った。C-C Motif Chemokine Ligand 11 (CCL11) に対して、20 ng/ml の FGF2 を投与してから 6、12、24、48、72 時間後の遺伝子発現を解析した。また、0.1、1、10、20、40 ng/ml の FGF2 を 24 時間作用させた際の CCL11 遺伝子発現を解析した。さらに、その発現調節経路を確認するため 20 ng/ml の FGF2 と 10  $\mu$ M の FGF 受容体 (FGFR) 阻害剤 (AZD4547) の刺激を行い 24 時間後に CCL11 遺伝子発現の解析を行った。細胞内シグナル伝達経路を確認するため、20 ng/ml の FGF2 を投与し 5 分後に p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p38MAPK)、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) のリン酸化タンパク質発現をウェスタンブロット法にて解析を行った。FGF2 がどの細胞内シグナル経路を介して CCL11 の発現を調節しているのかを検討するために、各経路の阻害剤 (p38MAPK 阻害剤：SB203580、MEK 阻害剤：U0126、JNK 阻害剤：SP600125) 10  $\mu$ M と 20 ng/ml FGF2 を投与した際の CCL11 の遺伝子発現を解析した。遺伝子発現は定量的リアルタイム PCR 法を用いて解析した。最後に、SDP11 細胞に FGF2 10 ng/ml および CCL11 10 ng/ml を投与し 0、24、72 時間後に細胞増殖へ与える影響をカウント法および CCK8 を用いて解析を行った。また SDP11 細胞へ FGF2 10 ng/ml を投与し、3 週間骨誘導を行った際の細胞分化へ与える影響を検討した。

## 結果および考察：

SDP11 細胞に FGF2 を投与し、サイトカインアレイを用いて 88 種類のサイトカインの遺伝子発現を解析したところ、48 種類のサイトカイン遺伝子に発現の変動が観察された。このうち FGF2 により最も発現が抑制されたものは CCL11 であった。この結果を確認するために、SDP11 細胞に同濃度の FGF2 を投与し、CCL11 の遺伝子発現を解析したところ、12 時間後以降、24、48、72 時間後の発現が抑制されることを確認した (図 1)。次に、FGF2 による CCL11 の発現抑制に対する FGF2 の濃度検定を行ったところ、10、20、40 ng/ml の FGF2 を投与した際に、コントロール群と比較し、有意な発現抑制が認められた。よって、FGF2 は歯髄細胞において 10 ng/ml、12 時間以上の投与で CCL11 の発現抑制に働くことが明らかになった。

次に、FGF2 による CCL11 の発現抑制は FGF2 による直接的な作用であるかどうかを明らかにするために、FGFR 阻害剤を用いて発現抑制作用が FGFR を介しているのか検討を行った。その結果、FGFR 阻害剤を用いると、FGF2 による CCL11 の発現抑制が阻害されることがわかった。このことから、FGF2 による CCL11 の発現抑制は FGFR を介していることが明らかとなった。そこで、さらにその分子制御機構を解明することとした。

FGFR はチロシンキナーゼ型受容体であり、FGF の結合によって FGFR の二量体化が生じ、FGFR の細胞内ドメインであるチロシンキナーゼの活性化が起こり、下流シグナル伝達経路の活性化が惹起される。特に低分子量 G タンパク質 Ras を介した MAPK シグナル伝達経路の活性化は主要な細胞内シグナル伝達経路である。そこで、FGF2 の刺激によって SDP11 細胞においても MAPK シグナル伝達経路が活性化されるか、ウェスタンブロッティング法を用いて解析したところ、FGF2 によって p38MAPK, ERK1/2, JNK はそれぞれリン酸化され、さらに各阻害剤によってこれらの FGF2 によるリン酸化が抑制された。このことから SDP11 細胞において FGF2 刺激によって MAPK シグナル伝達経路が活性化されることが確認できた。そこで、SB203580、U0126、SP600125 処理を行い、FGF2 による CCL11 発現抑制への影響を試験したところ、SP600125 投与群でのみ、FGF2 による CCL11 の発現抑制が阻害されることが明らかとなった。

SDP11 細胞の増殖に対する FGF2 (図 2) および CCL11 の関与、また FGF2 の細胞分化 (図 3) への影響に関しては、現時点では有意な結果が得られなかった。しかし、過去の報告より関与が示唆される結果も示されているため今後条件を検討し解析を継続する予定である。

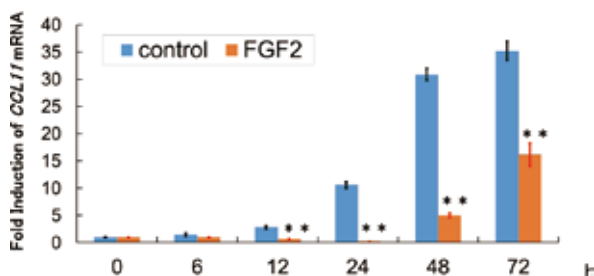


図 1 FGF2 投与後時間経過による CCL11 発現量の変化

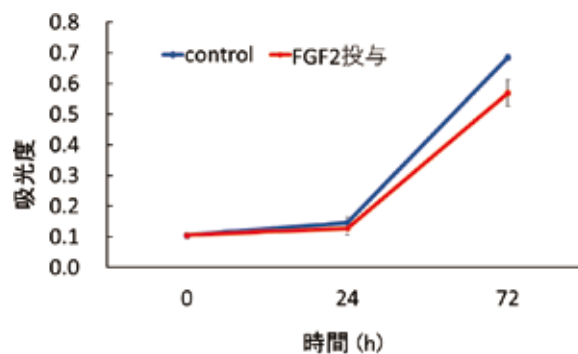


図 2 FGF2 投与による細胞増殖への影響

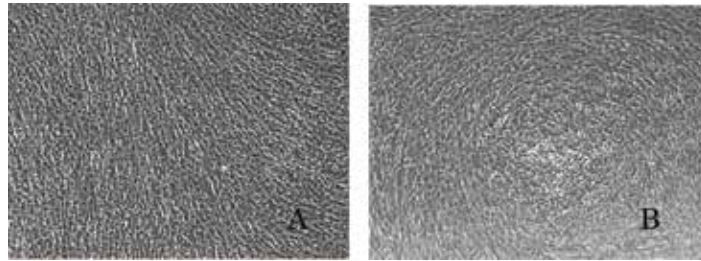


図3 FGF2投与による細胞分化への影響  
A) control  
B) FGF2 10ng/ml

本研究において、FGF2がSDP11細胞の炎症性サイトカインの発現を変化させ、そのうちCCL11の発現を負に制御することがわかった。さらに、その分子制御機構として、FGFRと細胞内シグナル伝達経路の1つであるJNK経路を介していることを明らかにした。FGF2は多種の細胞に様々な影響を及ぼすため多面的作用因子として知られているが、象牙芽細胞の分化においてもFGF2は分化段階の違いによって異なる作用を示すことが報告されている。今回、FGF2が歯髄細胞の炎症性サイトカインの発現を変化させ、さらにCCL11の発現が濃度や時間依存性だったことから、炎症から始まる組織再生の過程において、その状況に応じて多様な細胞を指揮することが示唆され、FGF2は歯髄組織の恒常性や歯髄再生においても有利に働くことが示唆された。また、FGFR阻害剤とJNK阻害剤で処理することでSDP11細胞のFGF2によるCCL11の発現抑制を阻害することを示した結果は、歯髄幹細胞におけるFGF2によるCCL11の発現抑制にFGF2/FGFR/JNK経路が関与している可能性を初めて示唆するものとなった。今回の結果は歯髄組織再生の分子メカニズムの解明に貢献する知見を得たと考える。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・ Rika Kurogoushi, Kokoro Iwata and Tsutomu Iwamoto : Regulation of cytokine expression by fgf2 in dental pulp-derived mesenchymal stem cells, 29th IAPD Congress2023, Maastricht, The Netherlands, 2023